



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Paradigma de condicionamiento operante en ratas semi-restringidas para el registro yuxtacelular en la corteza sensoriomotora

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

BIÓLOGA SANTANA CHÁVEZ ANA GABRIELA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ROJAS PILONI JOSÉ GERARDO

Departamento de Neurobiología del desarrollo y Neurofisiología,
Instituto de Neurobiología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. RUEDA OROZCO PAVEL ERNESTO

Departamento de Neurobiología del desarrollo y Neurofisiología,
Instituto de Neurobiología UNAM

DR. SOTRES BAYÓN FRANCISCO

Departamento de Neuropatología Molecular
Instituto de Fisiología Celular

INB Campus UNAM Juriquilla, QRO. QRO. Noviembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Neurobiología

A mi tutor el Dr. Gerardo Rojas Piloni por toda su confianza, infinita paciencia y consejos. Gracias por siempre estar dispuesto a explicar, enseñar y hacer de sus estudiantes mejores profesionistas.

A la Dra. Mónica López Hidalgo por mostrarme ese sello de delicadeza y perfección para realizar cirugías, así como, por todos sus consejos.

Al Dr. Rafael Olivares Moreno, todas tus enseñanzas y esfuerzos para hacer de mí una mejor profesionista son completamente invaluablees y los llevare siempre, gracias por tu amistad y por ser un gran maestro jedi.

Al Lic. Cutberto Dorado por su colaboración y valiosa amistad.

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Rueda Orozco Pavel Ernesto y Dr. Sotres Bayón Francisco por sus grandes retroalimentaciones y el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

A la unidad de Enseñanza y Posgrado: M. en C. Leonor Casanova Rico y Guadalupe Amador Uribe, gracias por todo el apoyo.

A el Bioterio: MVZ. José Martin García Servín y Alejandra Castillo León

Al departamento de videoconferencia: Psicóloga Ma. De Lourdes Lara Ayala

A Mónica Cano Ruiz y Diana Esparza por su colaboración durante el programa de verano. Chicas su ayuda y compañía fue invaluable, las quiero.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo para cursar la maestría en ciencias en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Número de becario (CV 778934).

El presente proyecto fue realizado en el laboratorio de integración sensoriomotora A-13 de Instituto de Neurobiología y fue financiado por el proyecto 846 de Fronteras de la Ciencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-DGAPA 201518

DEDICATORIAS

A mis padres (Elena y Gabriel), a mis hermanos (Erick y Carlos) y a David porque sin importar la distancia, su compañía y amor ha sido el mejor motor para realizar cada meta en mi vida. Los llevo siempre impresos en mi memoria, en mi corazón y en cada una de mis acciones.

Son simplemente todas las combinaciones de números...

A ti Sofy por estar aquí siempre, como mi amiga, como mi hermana, como mi gran confidente...

A mi madrina Tere, porque su cariño siempre ha estado reflejado en su apoyo incondicional.

A Raúl, Daryl, Joss, Oscar, Dany, quienes me han mostrado que la amistad no tiene limitaciones temporales ni barreras geográficas.

A mi querido petite comité (Fer, Sol, May) y a ustedes Lau y Erika, gracias por ser mi familia durante estos dos años.

A ti, Rubén, por qué solo tu pudiste llenar mis días de café y poesía, de risas y loca curiosidad.

"Él nunca sabrá cuanto le quiero, porque hay más de mí en él que en mí misma "

Emily Brontë

A Andy y Arturo, jamás olvidare esa confianza ciega de que yo estaría aquí y lograría todo esto.

Entré en la jungla del sistema nervioso ¡y quedé tan fascinada por su belleza que decidí dedicarle todo mi tiempo, mi vida!

Rita Levi-Montalcini

La única manera de expresar lo que sentimos es mediante la producción o la creación y eso nos hace ser quienes somos, porque sentir y no actuar es como no existir.

Gerardo Rojas Piloni

RESUMEN

La corteza sensoriomotora juega un papel relevante en la capacidad de los mamíferos para aprender y ejecutar movimientos precisos. Las neuronas excitatorias y las interneuronas inhibitorias de la corteza sensoriomotora forman circuitos que participan en distintas fases de un movimiento como la planeación y la ejecución motora; sin embargo, la manera en que estos circuitos procesan la información secuencial sigue siendo un tema de estudio. Por ello, ha sido necesario desarrollar técnicas que permitan el estudio de la actividad neuronal antes y durante la ejecución de un movimiento.

La semi-restricción (cabeza fija) junto con registros electrofisiológicos, ha sido utilizada para el estudio de la actividad neuronal durante determinados comportamientos, así como en tareas motoras en roedores. Por ello, en el presente estudio se generó un modelo experimental en condiciones de cabeza fija con una tarea conductual que involucra etapas antes y durante un movimiento (presión de palanca) con una de las extremidades anteriores mediante aproximaciones sucesivas. Ello permitió, mediante registros electrofisiológicos y marcaje yuxtacelular en la corteza sensoriomotora, caracterizar de manera funcional a las neuronas que participan en la regulación de distintas fases del movimiento.

El paradigma conductual consistió en 4 etapas sucesivas de aprendizaje, que permitió obtener animales que ejecutan un movimiento (presión de la palanca) en condiciones de semi-restricción (cabeza fija) de manera similar a animales en libre movimiento. Además, se realizó el registro yuxtacelular de 23 neuronas a distintas profundidades de la corteza sensoriomotora.

Las neuronas registradas en la corteza sensoriomotora se clasificaron en 4 tipos, 3 de las cuales están involucradas en procesos de preparación y ejecución del movimiento y un tipo neuronal que no está relacionado al movimiento.

En conjunto el presente trabajo muestra que el modelo experimental aquí descrito, permite adecuadamente el registro y marcaje neuronal yuxtacelular a lo largo de la corteza sensoriomotora en animales con semi-restricción del movimiento. Esto proporciona una técnica completa que permitirá en futuros trabajos, contestar preguntas puntuales sobre la activación neuronal de la corteza sensoriomotora para regular los movimientos.

ABSTRACT

The sensorimotor cortex plays an important role in the ability of mammals to learn and execute precise movements. The excitatory neurons and the inhibitory interneurons of the sensorimotor cortex form circuits that participate in different phases of a movement such as motor planning and execution; however, the way in which these circuits process sequential information is still a subject of study. Therefore, it has been necessary to develop techniques that allow the study of neuronal activity before and during the execution of a movement.

The head-fixed technique together with electrophysiological records, has been used for the study of neuronal activity during certain behaviors, as well as in motor tasks in rodents. Therefore, in the present study an experimental model was generated under head-fixed condition with a behavioral task which involves previous stages and during a movement (lever press) with one of the forelimbs by successive approximations. This allowed, through electrophysiological recordings and juxtacellular marking in the sensorimotor cortex, to functionally characterize the neurons that participate in the regulation of different phases of the movement.

The behavioral paradigm consisted of 4 successive stages of learning, which allowed obtaining animals that perform a movement (lever press) under head-fixed conditions in a similar way to freely moving animals. In addition, the juxtacellular recording of 23 neurons was performed at different depths of the sensorimotor cortex.

The neurons recorded in the sensorimotor cortex were classified into 4 types, 3 of which are involved in processes of preparation and execution of the movement and a neuronal type that is not related to movement.

Overall, the present work shows that the experimental model described here adequately allows the recording and juxtacellular neuronal marking through the sensorimotor cortex in animals with semi-restriction of movement. This provides a complete technique that will allow future work to answer specific questions about the neuronal activation of the sensorimotor cortex to regulate movements.

ÍNDICE

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	2
<i>DEDICATORIAS</i>	4
<i>RESUMEN</i>	6
<i>ABSTRACT</i>	7
<i>ÍNDICE</i>	8
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Movimiento	11
2.2 Corteza sensoriomotora	12
2.3 Semi-restricción (cabeza fija)	16
2.4 Condicionamiento operante en animales con cabeza fija	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO GENERAL	21
6. OBJETIVOS PARTICULARES	22
7. OBJETIVO PARTICULAR: Modelo de condicionamiento operante que permita, durante la ejecución de movimientos (presión de la palanca) en las extremidades anteriores en animales semi-restringidos (cabeza fija), un desempeño igual a las condiciones de libre movimiento.	23
7.1 MATERIALES Y MÉTODO	23
7.1.1 Aparatos	23
7.1.2 Tarea conductual	24
7.1.3 Cirugía para la implantación de la placa de semi-restricción (cabeza fija)	26
7.1.4 Análisis	27
7.2 RESULTADOS	28
7.2.1 Animales en libre movimiento	28
7.2.2 Condición de semi-restricción (cabeza fija)	38
8. OBJETIVO PARTICULAR: Registros yuxtacelulares en la corteza sensoriomotora en animales semi-restringidos (cabeza fija) durante la ejecución de movimientos	43
8.1 MATERIALES Y MÉTODO	43
8.1.1 Cirugía para la ventana crónica:	43
8.1.2 Registro electrofisiológico:	45

8.1.3	Histología:	46
8.1.4	Análisis:	46
8.2	RESULTADOS	47
9.	OBJETIVO PARTICULAR: Analizar la actividad eléctrica neuronal en la corteza sensoriomotora antes y durante la ejecución de movimientos	49
9.1	MATERIALES Y MÉTODO	49
9.2	RESULTADOS	50
10.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	57
11.	CONCLUSIONES	67
12.	BIBLIOGRAFÍA	68
13.	ANEXOS	76

1. INTRODUCCIÓN

La corteza sensoriomotora (SMC) ha mejorado la capacidad de los mamíferos para aprender y ejecutar movimientos nuevos y precisos (Nudo y Frost, 2009), así como la capacidad de incorporar información sensorial de distintas áreas neocorticales.

Las neuronas de la corteza sensoriomotora, que comprende a la corteza somatosensorial primaria (S1) y motora primaria (M1), se activan o inactivan de manera diferencial antes y durante la ejecución de un movimiento voluntario, generando una escala secuencial en función del tiempo (Svoboda y Li, 2017). Estas secuencias corresponden a fases específicas de un movimiento voluntario, tales como la preparación motora, la iniciación, la ejecución y el término del movimiento (Isomura et al., 2009). Sin embargo, la manera en que las células excitatorias y las interneuronas inhibitoras en las diferentes capas de la corteza motora procesan esta información secuencial no es clara (Isomura et al., 2009). Es por esto que se han desarrollado técnicas electrofisiológicas y de imagen que permiten estudiar la actividad de neuronas individuales y su correlación con una conducta específica en animales en libre movimiento (Kerr y Denk, 2008) o en animales con movimiento restringido.

La técnica de semi-restricción donde la cabeza de los roedores se posiciona de manera fija, limitando su movimiento, en conjunto con técnicas fisiológicas actuales, como el registro de células in vivo intracelulares (Lee et al., 2006; Harvey et al., 2009) y yuxtacelulares (De Kock et al., 2007; Houweling y Brecht, 2008; Isomura et al., 2009) ha sido utilizada para elucidar la participación cortical en el comportamiento y las respuestas motoras en tareas conductuales condicionadas. Considerando los múltiples usos de esta técnica y la habilidad natural de los roedores para realizar movimientos con las extremidades anteriores, decidimos generar un modelo experimental a través de una tarea conductual que involucra distintas fases de un movimiento voluntario (presión de palanca) con la finalidad de evaluar la actividad neuronal de la corteza S1 y M1 durante la planeación y ejecución de movimientos voluntarios.

2. ANTECEDENTES

2.1 Movimiento

El movimiento implica un cambio de lugar o posición de un cuerpo u objeto (Gowitzke et al., 1999), el sistema motor de los mamíferos puede realizar tres tipos de movimiento:

- a) Movimientos voluntarios: estos son dirigidos por una motivación, con un propósito, su ejecución puede mejorar con la práctica (aprendizaje motor) y puede producirse en respuesta a un estímulo externo.
- b) Respuestas reflejas: respuestas rápidas estereotipadas e involuntarias ante estímulos incondicionados.
- c) Patrones motores rítmicos: son una combinación de actos voluntarios y reflejos, es decir el inicio y el término de estos movimientos son voluntarios, sin embargo, una vez iniciados, el movimiento continúa de manera estereotipada. (Carles et al., 2007).

Existen diversas teorías sobre la manera en que se controlan los movimientos (control motor), en las que se reflejan las concepciones existentes sobre la forma en la que el movimiento es controlado por el sistema nervioso, enfatizando en cada una, distintos componentes neuronales del movimiento (Abernethy et al., 2013)

De acuerdo con la teoría jerárquica, para ejecutar un movimiento cualquiera, se necesita la interacción de diversas estructuras del sistema nervioso central, las cuales están organizadas jerárquicamente de modo que las órdenes salen desde un nivel superior hacia un nivel inferior, reconociendo que cada nivel puede actuar sobre otros dependiendo la actividad (Schmidt y Lee, 2005)

En el nivel inferior se encuentran las motoneuronas de la asta anterior de la médula espinal, así como las motoneuronas de núcleos troncoencefálicos. En este nivel la médula espinal es la estructura que integra o coordina actividades musculares elementales y el mantenimiento de la postura. También desarrolla automatismos simples de marcha y movimientos reflejos simples (Abernethy et al., 2013).

En el nivel intermedio, se encuentra el tronco del encéfalo (formación reticular, núcleos vestibulares, núcleo rojo y los tubérculos cuadrigéminos superiores) que controla y ajusta el tono muscular, regula la postura y el mantenimiento del equilibrio. Estos núcleos, del tronco del encéfalo son generadores centrales de pautas o secuencias motoras, como los respiratorios, los de la masticación o los de la marcha (Abernethy et al., 2013).

Finalmente, en el nivel más alto de la jerarquía, se encuentran la corteza motora (corteza sensoriomotora y corteza motora secundaria), la cual interviene en el control de los actos motores, desde que se establece la finalidad de los mismos hasta la organización de un comando motor y se da la orden de cómo se ha de realizar el acto motor (Scott, 2016). Del mismo modo, encontramos los sistemas moduladores formados por los ganglios basales (cuerpo estriado, globo pálido, núcleo subtalámico y la sustancia negra) y el cerebelo, el cual, interviene en el desarrollo del movimiento regulando el equilibrio y la adecuación de la postura (Abernethy et al., 2013).

2.2 Corteza sensoriomotora

La corteza sensoriomotora (SMC) que engloba a la corteza somatosensorial primaria (S1) y a la motora primaria (M1), ha mejorado la capacidad de los mamíferos para aprender y ejecutar movimientos nuevos y precisos (Nudo y Frost, 2009), así como la capacidad de incorporar información sensorial de distintas áreas neocorticales.

Las cortezas S1 y M1 contienen múltiples tipos de neuronas con características particulares distribuidas en un arreglo laminar, las cuales forman circuitos para la integración de la información sensoriomotora. De manera general, la capa 1 se caracteriza por tener dendritas provenientes de neuronas piramidales y fusiformes de capas más profundas (Amaral y Peter, 2013). Las capas 2/3 están formadas por neuronas excitatorias del tipo esférico (en la capa 2) (Amaral y Peter, 2013) o piramidales (Donoghue y Wise, 1982; Brecht et al., 2004), las cuales proyectan hacia la capa 5 de distintas áreas corticales, (Weiler et al., 2008).

Por otra parte, en estas capas existe una población de interneuronas GABAérgicas no piramidales e inhibitoras de respuesta rápida (en su mayoría células de cesto y células de candelabro), que disparan potenciales de acción de corta duración con una alta frecuencia de descarga (Cauli et al., 1997).

A nivel de la capa 4 existen neuronas pequeñas esféricas granulares que constituyen la entrada principal sensorial de la región talámica (Amaral y Peter, 2013) y neuronas piramidales estrelladas espinosas que inervan a las células piramidales corticoespinales de la capa 5 a través de axones colaterales (Cho et al. 2004;).

Las neuronas principales de la capa 5 de la corteza sensoriomotora son neuronas piramidales excitatorias (Ramaswamy y Markram, 2015), las cuales integran información muy diversa y son las encargadas de coordinar y ejecutar las tareas motoras, así como de recibir una gran cantidad de entradas de las cuales, algunas son de tipo sensorial. La capa 5 dividida en 5a y 5b posee neuronas de tipo empenachado (Tipo 1), y de tipo no empenachado (Tipo 2). Las neuronas piramidales del Tipo 1 se caracterizan por tener un árbol dendrítico apical prominente, presentar un patrón de descarga en ráfagas y proyectan principalmente a los colículos superiores, la médula espinal, el estriado y el puente (Hallman et al., 1988; Larkman y Mason, 1990; Kasper et al., 1994; Hattox y Nelson, 2007; Ramaswamy y Markram, 2015) Las neuronas de la capa 5 no empenachadas tienen escasas dendritas apicales, con menos ramas oblicuas y nunca descargan en ráfagas (Molnár y Cheung, 2006; Hattox y Nelson, 2007). Sus principales conexiones axonales se dan con el hemisferio contralateral o al estriado ipsilateral.

Finalmente, las neuronas de la capa 6 son heterogéneas de tipo polimórfico o multiforme; sin embargo, la mayoría de ellas son de tipo fusiformes y proyectan a diversos núcleos talámicos (Amaral y Peter, 2013).

Durante la ejecución de un movimiento voluntario se sabe que las neuronas de la corteza motora se activan o inactivan de manera diferencial para modular la ejecución de movimientos y por lo tanto la conducta donde se ven reflejados (Isomura et al., 2009).

La integración sensoriomotora ha sido un tema central en la neurofisiología para entender los mecanismos que permiten que exista un flujo apropiado de información sensorial aferente, así como el adecuado desempeño motor (Borde, 2004). Se sabe, por ejemplo, que existen clases diferentes de neuronas piramidales en S1 que envían diferentes

proyecciones de salida hacia M1 y S2 (somatosensorial secundaria) generando una interacción funcional y jerárquica entre sistemas sensoriales y motores (Suter y Shepherd, 2015). Además, conocemos que los aspectos sensoriomotores incluyen la integración de la información sensorial entrante (extero- o intero-receptiva) en la ejecución del movimiento para que este sea constante y pueda adaptarse a cambios en el medio ambiente (Scott, 2016). En el aprendizaje de habilidades motoras, se sabe que muchos movimientos producen activación de receptores periféricos (propioceptivos y cutáneos) generando actividad autoinducida que es transmitida al sistema nervioso central donde interactúa con el comando motor y otros procesos (Rudomin, 1999; Rudomin y Schmidt, 1999; Seki et al., 2003) generando una estimación del estado del cuerpo durante el movimiento, aunque a una escala de tiempo más rápida que la integración de la información sensorial.

Se han identificado seis procesos neurológicos críticos involucrados en la generación de un movimiento: tres procesos de "qué" relacionados con el establecimiento de la meta (selección del objeto, identificación de la localización del objeto y la restricción de la tarea para identificar un objetivo) y tres procesos de "cómo" que describen el movimiento para lograr esa meta (cinemática, selección de la acción y especificaciones del movimiento) (Wong et al., 2015). El sistema sensoriomotor, media y recluta información contextual sensorial y de planeación de otras áreas neocorticales que pueden no estar disponibles para los circuitos motores subcorticales y espinales para la ejecución correcta de movimientos (Moreno-Lopez et al., 2016).

Aprender una habilidad motora implica organizar acciones en secuencias novedosas que se puede ejecutar de manera eficiente y reproducible para resolver una tarea dada (Luft y Buitrago, 2005; Shmuelof et al., 2012).

Se ha mostrado recientemente que M1 está involucrada en el aprendizaje de nuevas habilidades motoras, ya que al lesionar esta corteza los animales pierden la capacidad de aprender movimientos que involucran mayor precisión (Kawai et al., 2015). Del mismo modo, Gandolfo et al. (2000) usando las propiedades de sintonización direccional de las neuronas para clasificar el aprendizaje y el procesamiento de las células en M1 y relacionándolas con la memoria durante los períodos de adaptación y readaptación, mostraron que hay tipos neuronales que tienen relevancia en el aprendizaje de habilidades y la memoria, ya que algunos muestran cambios en sus propiedades de ajuste durante la

fase de adaptación y otras muestran cambios en la sintonización durante la adaptación, los cuales perduraron más allá del aprendizaje mostrando que pueden proporcionar el sustrato necesario para la retención de habilidades.

La organización funcional del control motor secuencial, mediado por la corteza sensoriomotora, ha sido caracterizada principalmente en primates no humanos (Tanji, 2001; Graziano 2007), mientras que en roedores no ha sido explorada en detalle (Isomura et al., 2009). Sin embargo, también los roedores tienen una gran habilidad para realizar movimientos voluntarios finos con las extremidades anteriores, movimientos que engloban una coordinación espaciotemporal (Whishaw y Pellis, 1990; Iwaniuk y Whishaw, 2000; Whishaw 2005). En este sentido, Isomura et al. (2009), realizaron un análisis de la activación e inactivación de neuronas de la corteza motora en diferentes momentos durante la ejecución de un movimiento voluntario. De esta manera, mostraron que, a través de las capas corticales, las células piramidales excitatorias se activan temporalmente en distintas fases motoras secuenciales (por ejemplo, preparación, iniciación y ejecución). Por el contrario, las interneuronas inhibitorias, son reclutadas predominantemente para la ejecución motora, sugiriendo que estas podrían participar mediante la inhibición equilibrada o la inhibición recurrente.

La activación diferencial entre las neuronas de la corteza motora confirma que existe una organización funcional de los elementos que participan en el control motor. Sin embargo, la caracterización de los grupos neuronales implicados en el movimiento se ha realizado principalmente de manera funcional, y poco se sabe de las correlaciones morfológicas y hodológicas con aspectos funcionales.

2.3 Semi-restricción (cabeza fija)

La técnica de semi-restricción donde la cabeza de los roedores se posiciona de manera fija, limitando así su movimiento, ha sido utilizada para realizar registros intracelulares de células in vivo (Harvey et al., 2009) y yuxtacelulares (De Kock et al., 2007; Houweling y Brecht, 2008; Isomura et al., 2009) ya que permiten otorgar la estabilidad mecánica necesaria para este tipo de registros.

Distintos trabajos experimentales se han enfocado directamente al desarrollo y a la caracterización de la condición de semi-restricción (cabeza fija) (Kimura et al. 2012; Cornelius et al., 2010). Es así que se ha mostrado que, en animales no entrenados, las condiciones de cabeza fija proporcionan grandes ventajas durante los registros electrofisiológicos. Entre ellas está que las señales están libres de efectos de la anestesia y son menos propensas a la contaminación por artefactos relacionados con el movimiento general de los animales (Cornelius et al. 2010). Asimismo, la cabeza fija proporciona alta estabilidad mecánica necesaria para analizar señales neuronales usando calcio o colorantes sensibles al voltaje en animales despiertos (Dombeck et al., 2007; Ferezou et al., 2007; Greenberg et al., 2008).

De la misma manera, se ha mostrado que animales entrenados en una conducta particular (Cornelius et al., 2010; Guo et al., 2014) ofrece diversas ventajas, ya que los animales con semi-restricción muestran un mejor control sobre las salidas motoras (Cornelius et al., 2010). Diversos trabajos sobre control motor (Bermejo et al., 1998; Haiss y Schwarz, 2005; Hentschke et al., 2006) han mostrado que se pueden implementar operantes en roedores, donde los animales ejecuten movimientos de alcance con alta precisión, lo que es importante, ya que estos organismos se han convertido en el mamífero modelo para las manipulaciones de la neurociencia experimental, por el amplio conocimiento anatómico, fisiológico y farmacológico de su sistema nervioso central.

En los trabajos descriptivos sobre la semi-restricción (cabeza fija), se ha mostrado que existen condiciones elementales a considerar para implementarla. Ya sea que esta técnica este aunada a un tipo de condicionamiento o no, entre los datos a considerar esta un periodo óptimo para la implantación de sistema, que oscila entre las 12 semanas de vida

de la rata, cuando los animales alcanzan un peso corporal de 250-300 g (Cornelius et al. 2010).

Con respecto al sexo, también existen diferencias que necesitan consideración; una de ellas es el peso corporal de las hembras, cuyo aumento es más lento después de las 12 semanas que los machos, lo que da como resultado una mayor estabilidad y menor estrés mecánico con el sistema de fijación al cráneo. Sin embargo, esta ventaja se compensa con el cráneo más fuerte de los machos, que permite un anclaje superior de la cabeza al hueso con tornillos (Cornelius et al., 2010).

2.4 Condicionamiento operante en animales con cabeza fija

La mayoría de las conductas motoras en los mamíferos se adquieren y perfeccionan mediante la práctica, es decir, son aprendidas y se transforman en movimientos de gran perfección. El aprendizaje motor está implicado en gran parte de los aprendizajes asociativos instrumentales u operantes, a pesar de que en muchos casos la respuesta motora ha sido aprendida previamente al condicionamiento (Correa, 2007).

El condicionamiento operante para efectuar movimientos en ratas con la cabeza fija fue establecido por primera vez por Welsh et al. (1995), quien investigó los movimientos de lamido. A partir de ese momento muchos investigadores han implementado los condicionamientos operantes como el movimiento de las vibrisas (Bermejo et al., 1996; 1998; Hentschke et al., 2006) y el movimiento de palanqueo (Harvey et al., 2001; Isomura et al., 2009) para estudiar distintas dinámicas del control motor.

El condicionamiento operante es un aprendizaje asociativo que hace referencia a un proceso en el cual la frecuencia con que está ocurriendo una conducta, se modifica o se altera debido a las consecuencias que produce (Reynolds, 1968).

Al medio en el que se desarrollan las respuestas conductuales se le divide en varias clases de estímulos, uno de ellos es el reforzante, que va después de la respuesta, e incrementa la frecuencia de la misma; aumentando la probabilidad de que estas respuestas ocurran en la conducta futura del organismo (Reynolds, 1968).

Un reforzador puede ser positivo cuando su aparición aumenta la probabilidad de que ocurra una respuesta (Reynolds, 1968), por lo general se presenta como un estímulo agradable para el sujeto después de una conducta (Myers, 2003) o negativo, si su desaparición genera que la respuesta ocurra en el futuro con mayor probabilidad (Reynolds, 1968), este por lo general se presenta como un estímulo desagradable, el cual es eliminado o disminuido al presentarse una conducta (Myers, 2003). Así mismo, se considera que un reforzador puede ser primario si es innato y es importante biológicamente para la supervivencia o bienestar del individuo o secundario si es aprendido, es decir adquiere su calidad de reforzador después de asociarse con los reforzadores primarios (Myers, 2003).

En cuanto al uso de un reforzador particular, la mayoría de los trabajos donde se ha implementado un condicionamiento operante coinciden que, cuando el reforzador es comida o agua, la privación tanto de alimento como de agua son efectivos y están estrechamente ligados (Roca y Bruner, 2003). Se ha mostrado que la privación severa de agua aún por 48h no causa estrés fisiológico ni alteraciones en el comportamiento en la rata (Cornelius et al., 2010), sin embargo, la privación puede modularse para que el acceso al agua se controle de tal manera que los animales consigan un volumen suficiente durante los ensayos diarios (Cornelius et al., 2010).

Por otro lado, usar solo el estado motivacional tiene una gran influencia en el condicionamiento. En este sentido, Meyer et al. (2014) observaron que, en ratas no privadas, el uso de reforzadores distintos a los de los alimentos, son suficientes para generar motivación. Diversos estudios han mostrado que la sacarosa, por su valor en el estado de recompensa es suficiente para generar que un sujeto ejecute una conducta y que la concentración que debe administrarse está relacionada a su efectividad como reforzador y al estado fisiológico de los animales (Díaz et al., 2004).

Finalmente, para implementar un paradigma conductual bajo condiciones de semi-restricción (cabeza fija) se habla de una adaptación progresiva a la tarea, por lo que esta se divide en elementos que se presentan de manera gradual para ser reforzados, hasta que el animal ejecute de manera conjunta y correcta la tarea deseada (Cornelius et al., 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Un aspecto fundamental para entender la dinámica funcional de los circuitos neuronales es la caracterización funcional, hodológica y morfológica de las neuronas que participan en la regulación de dicho circuito. Para caracterizar cada uno de estos parámetros ha sido necesario desarrollar técnicas electrofisiológicas y de imagen que permitan el estudio de la actividad de neuronas individuales y su correlación con la conducta en animales en libre movimiento (Kerr y Denk, 2008).

La técnica de semi-restricción (cabeza fija) en conjunto con técnicas fisiológicas como el registro de células in vivo intracelulares (Lee et al., 2006; Harvey et al., 2009) y el registro yuxtacelular (De Kock et al., 2007; Houweling y Brecht, 2008; Isomura et al., 2009) han permitido elucidar la participación de las neuronas corticales en el comportamiento y las respuestas motoras en tareas conductuales condicionadas. Asimismo, la capacidad óptima de los roedores para llevar a cabo movimientos finos con sus patas delanteras (Whishaw y Coles, 1996; Iwaniuk y Whishaw, 2000) durante el condicionamiento de tareas conductuales, permiten diseñar paradigmas apropiados para entender la participación neuronal durante la ejecución de movimientos simples. Sin embargo, pocos grupos de investigación han podido combinar este aprendizaje de una respuesta especializada de las extremidades anteriores con la restricción del movimiento de la cabeza (Harvey et al., 2001; Heck et al., 2007; Isomura et al., 2009). Debido a que estos paradigmas están diseñados para esclarecer la dinámica funcional de circuitos neuronales que regulan una respuesta motora particular, es necesario que el movimiento se ejecute de manera similar a condiciones fisiológicas normales, donde los animales se encuentran libres, permitiendo que la información funcional obtenida bajo este modelo no esté afectada por la semi-restricción y sea similar a condiciones normales, aunque algunos trabajos han mencionado los posibles efectos de la semi-restricción durante la ejecución de un paradigma conductual (Cornelius et al., 2010), no se ha profundizado en mostrar que la semi-restricción (cabeza fija) no afecta en términos de una movimiento.

Por lo que, en este proyecto de tesis se pretende generar un sistema de condicionamiento operante que permita la ejecución de un movimiento (presión de la palanca) en las extremidades anteriores en animales con cabeza fija de manera similar a animales con libre movimiento. Asimismo, se pretende que dicho condicionamiento en conjunto con la técnica de registro yuxtacelular permita analizar la actividad neuronal de la corteza sensoriomotora antes y durante la ejecución de movimientos voluntarios.

4. HIPÓTESIS

H1: El desempeño de los animales en un paradigma de condicionamiento operante será diferente con cada tipo de reforzamiento (agudo, crónico y agua con sacarosa 8%)

H2: El desempeño conductual para la ejecución de movimientos con las extremidades anteriores de ratas semi-restringidas (cabeza fija), no será diferente al de las ratas en libre movimiento.

H 3: Las neuronas de la corteza sensoriomotora se activarán de manera diferencial (frecuencia de potenciales de acción) antes y después de la ejecución de un movimiento en animales con cabeza fija.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la actividad neuronal mediante potenciales de acción de la corteza sensoriomotora durante una tarea conductual a través de potenciales de acción en animales con semi-restricción (cabeza fija) antes y durante la ejecución de movimientos.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar diferentes tipos de reforzamiento (agudo, crónico y agua con sacarosa 8%) mediante el desempeño de los sujetos (ratas) durante un condicionamiento operante
- Generar un modelo experimental a través de un condicionamiento operante que permita, durante la ejecución de un movimiento (presión de la palanca) en las extremidades anteriores en animales semi-restringidos (cabeza fija), un desempeño igual a las condiciones de libre movimiento.
- Realizar registros yuxtacelulares en la corteza sensoriomotora en animales semi-restringidos (cabeza fija) durante la ejecución de movimientos.
- Analizar la actividad eléctrica neuronal en la corteza sensoriomotora antes y durante la ejecución de movimientos.

7. OBJETIVO PARTICULAR: Modelo de condicionamiento operante que permita, durante la ejecución de movimientos (presión de la palanca) en las extremidades anteriores en animales semi-restringidos (cabeza fija), un desempeño igual a las condiciones de libre movimiento.

7.1 MATERIALES Y MÉTODO

Con la finalidad de explorar la participación de los distintos grupos de neuronas que conforman la corteza sensoriomotora antes y durante la ejecución del movimiento, se generó un paradigma conductual de condicionamiento operante. Para ello, se utilizaron ratas de 21 días de edad de la cepa Wistar, las cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura y luz controlada ($23\pm^{\circ}\text{C}$, con un ciclo de 12 h de iluminación y 12 de obscuridad, iniciándose a las 7:00 h), con acceso libre al alimento (Lab Diet-5001). Los animales fueron aclimatados a las condiciones de bioterio y a la manipulación durante 3 días previos a la tarea conductual. En la manipulación los animales fueron tomados por el experimentador y posicionados en puntos diferentes de la caja habitación hasta que los animales permitían de manera natural ser tocados por el investigador. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

7.1.1 Aparatos

La conducta fue montada en una caja de conducta de 39 cm ancho x 47cm largo x 20 cm de altura cuyas paredes laterales eran de acrílico negro mientras que el techo era de acrílico transparente. El piso estaba conformado por una mesa anti-vibratoria cubierta con lona anti-manchas gris. Al centro del panel posterior, a 13 cm del piso se encuentra un foco de 28V cuya finalidad es proveer la luz para indicar el inicio de los ensayos. Del lado izquierdo a 12 cm de la luz se encuentra una apalanca estándar (Lafayette Instrument modelo 80110), arriba de la cual a 6 cm del suelo se encuentra la punta de un bebedero o

dispensador de agua el cual, está conectado a una bomba peristáltica (Lafayette Instrument modelo 80204P) (ver Anexo 1). La sesión experimental fue controlada mediante el programa ABETT II Standard (Lafayette Instrument versión 2.16.1) el cual, controla mediante un módulo de interfaz (Modelo 81409) los distintos componentes dentro de la caja de conducta y registra en tiempo real los eventos que ocurren durante la sesión.

7.1.2 Tarea conductual

Los animales fueron entrenados mediante un operante libre para ejecutar un movimiento voluntario de la extremidad izquierda anterior, al presionar una palanca. Dicho entrenamiento consistió en sesiones diarias de 60 min diarias; cada sesión fue dividida en ensayos teniendo la posibilidad de realizar como máximo 500 ensayos correctos en cada sesión.

Dentro de cada sesión, un ensayo fue definido por la presencia del estímulo visual, la emisión de la respuesta (movimiento de presión de la palanca) y finalmente la entrega del reforzador. Cada ensayo fue separado por un periodo variable aleatorio (periodo inter-ensayo) que va de los 3 a 6 s (valores enteros 3,4,5,6 s). El inicio de cada ensayo fue indicado con un estímulo visual (luz encendida) que se usó como indicador para la ejecución del movimiento, cuya duración máxima es de 3s, sin embargo, los animales podían emitir la respuesta dentro de este periodo (3s) provocando que se apague el estímulo lumínico.

Para motivar la ejecución de la tarea se probaron tres tipos de reforzamiento diferente, el primero basado en el suministro de agua con sacarosa en una concentración del 8%, con acceso libre a agua durante las 23 h posteriores al entrenamiento, los dos restantes estuvieron basados en la restricción de agua aguda o crónica (reforzador positivo primario). Para la restricción aguda, los animales recibieron agua durante la sesión y una hora ad libitum posterior, mientras que para la restricción crónica los animales sólo recibieron agua durante la sesión.

Dentro del paradigma conductual, se usó un programa de reforzamiento de razón fija donde los animales debían presionar la palanca cuando la luz se encontraba encendida para recibir 15µl del reforzador (agua o sacarosa 8%), de lo contrario después de 3 s la luz se apaga y comienza a correr el periodo inter-ensayo.

Con el propósito de evitar conductas precipitadas en los animales, el paradigma fue condicionado a que los animales no deben realizar ningún palanqueo durante el periodo inter-ensayo, de lo contrario, se da un periodo de *time out* de 8 s.

El *time out* consiste en un tiempo de espera de 8s donde no hay estímulo lumínico, el cual se reinicia si los animales siguen emitiendo la respuesta de manera incontrolada, sin embargo, si los animales dejan de emitir la respuesta, al término de los 8s la luz vuelve a encenderse.

Durante cada sesión se evaluó el desempeño (emisión de la respuesta) mediante el número de palanqueos correctos (presencia de luz) contra el número de palanqueos erróneos (palanqueos en ausencia de luz), así como la eficiencia (ejecución adecuada de la respuesta) mediante el número de aciertos (palanqueo en presencia de luz) y omisiones (veces que se enciende la luz y no se emite la respuesta). Estos parámetros permitieron determinar que la ejecución del movimiento fuera precisa, iniciando en un tiempo determinado siempre con la presencia de luz.

El paradigma conductual fue presentado mediante aproximaciones en cuatro fases consecutivas:

- 1era fase del condicionamiento: asociación del palanqueo con el suministro del reforzador (agua). En esta fase los animales se encontraban en libre movimiento y recibieron agua únicamente cuando presionaron la palanca.
- 2da fase del condicionamiento: asociación luz-palanqueo y suministro del reforzador. En esta fase los animales se encontraban en libre movimiento y sólo recibieron agua cuando la luz se encontraba encendida.

- 3er fase del condicionamiento: asociación de la restricción del movimiento y el suministro del reforzador. En esta fase los animales fueron sometidos a condiciones de restricción de movimiento, mediante la técnica de semi-restricción (cabeza fija) ya que contaron con un poste anclado al cráneo que sirvió para sujetar la cabeza a un sujetador. La condición de semi-restricción fue presentada de manera sucesiva, acostumbrando primero al animal al sujetador y posteriormente a posicionarse y ser sujeta con el mismo. Los animales recibieron agua después de un periodo de tiempo en el que no intentaron liberarse o no realizaron forcejeo; este tiempo fue variable y se incrementó conforme los animales toleraron la falta de movimiento en razón de 5, 10, 20, 30, segundos hasta llegar a los 60 minutos de la sesión. Al final los animales fueron sometidos a las condiciones de semi-restricción (cabeza fija) mientras realizaban la tarea de la primera fase.
- 4ta fase del condicionamiento: asociación luz-palanqueo y suministro del reforzador en condiciones de semi-restricción (cabeza fija). En esta fase los animales fueron sometidos a las condiciones de restricción de movimiento y resolvieron la tarea de la 2da fase.

El cambio de los animales de una fase a otra fue definido de acuerdo al desempeño y la eficiencia, los cuales debían llegar a un desempeño máximo o mayor al 80% y mantenerse estables por un periodo de tiempo (mayor a 3 sesiones).

7.1.3 Cirugía para la implantación de la placa de semi-restricción (cabeza fija)

Los animales fueron anestesiados con isoflurano (3.5% inducción, 1% mantenimiento); fueron colocadas en un aparato estereotáxico donde se realizó una incisión longitudinal a lo largo de la parte superior de la cabeza para exponer el cráneo. Por medio de un taladro dental neumático se realizaron 4 trépanos, evitando el área que cubre la corteza sensoriomotora contralateral a la extremidad con la que los animales

realizaron el palanqueo; dos serán marcados en una posición concordante con la placa para fijar la cabeza (ver Anexo 2), uno en el hueso occipital y uno en el parietal anterior a lambda.

Para fijar la placa de semi-restricción (ver Anexo 2) se colocó una capa fina de pegamento dental (UV Te-Economic Plus, Ivoclar vivadent), en los trépanos se colocaron tornillos de acero inoxidable autoperforantes de 1 mm. Posteriormente la parte de la placa sujeta al cráneo y los tornillos se cubrieron con acrílico dental (Ortho-Jet Powder).

7.1.4 Análisis

Dentro del paradigma conductual, se analizaron:

1. El desempeño, mediante el número de palanqueos para la primera y el porcentaje de palanqueos correctos e incorrectos para la segunda fase del condicionamiento.
2. La eficiencia, mediante el porcentaje de aciertos y omisiones en la segunda fase.

Los datos fueron analizados mediante una ANOVA para medidas repetidas seguida de una comparación múltiple de Bonferroni para los grupos donde se analizaron parámetro intrasujeto y los datos seguían una distribución normal, de lo contrario se usó una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba Dunn's.

En los casos donde fue necesario comparar entre grupos, se usó una ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple de Tukey-Kramer cuando se comparó más de 3 grupos y una Prueba t de Student para datos no pareados cuando se comparó entre dos.

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Animales en libre movimiento

La finalidad de seguir un programa de reforzamiento es que aumenta la probabilidad de que ocurra una conducta determinada (Feldman, 2014). Debido a que el presente trabajo buscó modelar un condicionamiento operante para la ejecución de movimientos voluntarios en ratas bajo condiciones de semi-restricción (cabeza fija), fue necesario comparar en tres tipos de reforzamiento diferente (agudo (n= 11), crónico (n= 4) y agua con sacarosa al 8% (n= 4)), la motivación de los animales y el tiempo que tomaba para que alcanzaran la máxima eficiencia.

Los resultados mostraron una diferencia significativa; entre el número de sesiones que le tomó a cada grupo aprender el paradigma y llegar a su máxima eficiencia en la segunda fase, la cual es definida como el punto donde los animales ejecutan la tarea con más del 80% de aciertos.

Durante la primera etapa, al grupo con restricción aguda le tomó 7 sesiones (ANOVA de medidas repetidas: $F= 3.97$, $p< 0.0001$; Bonferroni sesión 9 vs sesión 1: $t 9.111$, $p< 0.05$), 9 para el crónico (ANOVA de medidas repetidas: $F= 9.549$, $p< 0.0001$; Bonferroni sesión 9 vs sesión 1: $t 5.191$, $p< 0.05$) y 24 para agua con sacarosa (ANOVA de medidas repetidas: $F= 3.811$, $p< 0.0001$; Bonferroni sesión 24 vs sesión 1: $t 4.068$, $p< 0.05$). Durante la segunda fase al grupo con restricción aguda le tomo 22 sesiones, mientras que los grupos con restricción crónica y agua con sacarosa no alcanzaron el máximo del 80% de eficiencia.

Al comparar el desempeño obtenido mediante el número de palanqueos en las últimas sesiones de entrenamiento con los tres programas de reforzamiento (restricción aguda, crónica y agua con sacarosa), observamos que tanto la restricción crónica como el suministro de agua con sacarosa al 8% no generan una motivación suficiente para que los animales ejecuten la tarea conductual en comparación con el grupo de restricción aguda (ANOVA de una vía $F= 20.51$, $p< 0.0001$; prueba Tukey agudo vs crónico: $q= 6.822$, $p< 0.05$ y agudo vs sacarosa: $q= 6.936$, $p< 0.05$) (Figura 1a).

Asimismo, el desempeño en la segunda fase confirma que el agua con sacarosa al 8% no es el reforzador indicado para este paradigma conductual con animales de 21 días, debido a que los animales no ejecutan la tarea con la misma eficiencia que los grupos restringidos de agua (ANOVA de una vía $F= 39.95$, $p< 0.0001$; prueba Tukey sacarosa vs crónico: $q= 8.672$, $p< 0.05$ y sacarosa vs agudo: $q= 12.48$, $p<0.05$) (Figura 1b).

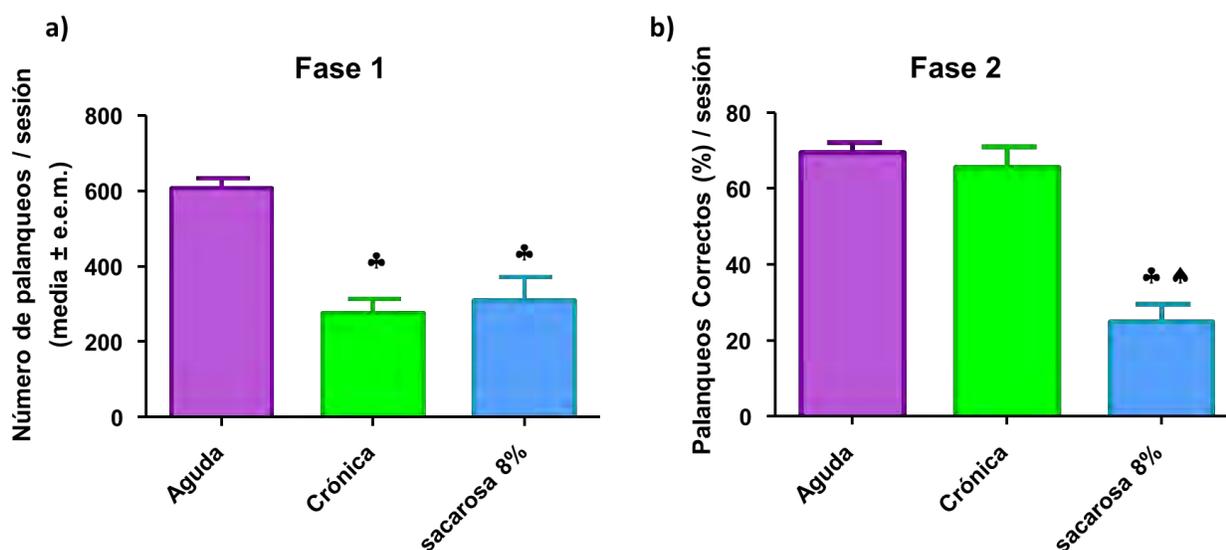


Figura 1: Desempeño en la última sesión de entrenamiento, evaluado mediante el número de palanqueos (media \pm e.e.m) para la primera fase (a) y porcentaje de palanqueos correctos (media \pm e.e.m) para la segunda fase (b) con los distintos reforzadores. Los símbolos * denotan una diferencia de $p<0.05$ vs restricción aguda y ^ una diferencia $p<0.05$ vs restricción crónica (ANOVA seguida de una comparación múltiple de Tukey-Kramer). Tamaño de la muestra, $n= 11$ aguda, $n= 4$ crónica y $n= 4$ sacarosa 8%.

Con la finalidad de evaluar el estado fisiológico de los animales, se evaluó el peso. A pesar de que los animales con restricción crónica mostraron un desempeño similar (Figura 1b) al del grupo con restricción aguda en la segunda fase, las condiciones óptimas fisiológicas de los animales se vieron comprometidas, ya que observamos que los animales presentaron una ganancia baja de peso a pesar de que aumentaba el consumo de agua al transcurrir las sesiones (Figura 2). Al final de las sesiones de entrenamiento en la segunda fase para este grupo con restricción crónica, el promedio del peso a los 44 días de vida (figura 2 b) se mantuvo en $76 \text{ g} \pm 4.702 \text{ e.e.m}$, siendo que en condiciones fisiológicas

normales los animales entre 42 y 49 días deben tener un peso oscilante de 185- 230 g en macho (Cossio et al., 2013) y entre 180-210 g para hembras (Figuroa et al., 2013). Considerando todo lo antes misionado se decidió que la restricción aguda era la más adecuada para la estandarización del condicionamiento.

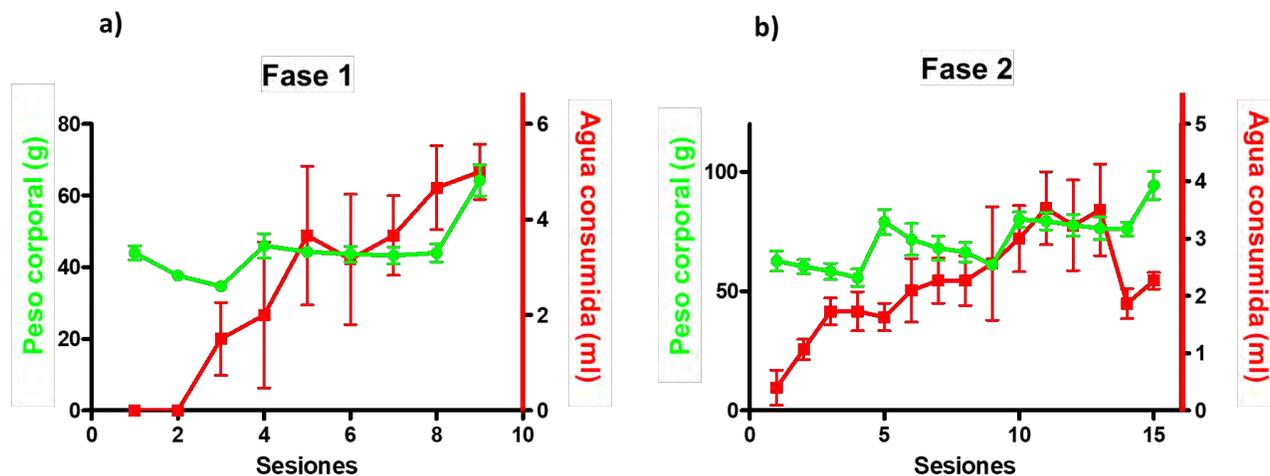


Figura 2: Cambios en el peso corporal (verde) y el consumo de agua total (rojo) durante las distintas sesiones de la primera (a) y segunda (b) fase del condicionamiento en animales con restricción crónica. Dentro de las gráficas se muestran los datos de media \pm e.e.m del peso y el consumo de agua a lo largo de las sesiones. Tamaño de la muestra, n= 4 crónica.

Se evaluó con mayor detalle el desarrollo del aprendizaje con el paradigma de restricción aguda durante las diferentes sesiones en la primera fase. De esta manera, observamos cómo el número de palanqueos para obtener el reforzador (Figura 3) aumentó gradualmente, siendo estadísticamente significativo a partir de la sesión 3 sesiones (ANOVA de medidas repetidas: $F= 3.97$, $p< 0.0001$; Bonferroni sesión 3 vs sesión 1: $t 6.220$, $p< 0.05$ y sesión 2 vs sesión 3: $t 3.491$, $p <0.05$) donde puede afirmarse que los animales aprenden la asociación de la presión de la palanca con el suministro del reforzador. Esto reafirma que el grupo de restricción aguda es el que muestra un aprendizaje en un número menor de sesiones en la primera fase del condicionamiento.

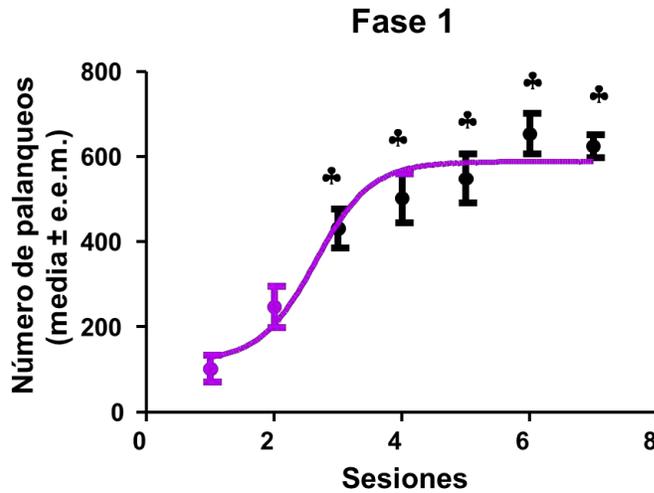


Figura 3: Número de palanqueos durante distintas sesiones de la primera fase (media \pm e.e.m.). Los puntos negros dentro de la gráfica denotan una diferencia de $p < 0.05$ vs sesión 1 y los símbolos una diferencia \clubsuit $p < 0.05$ vs sesión 2 (ANOVA para medidas repetidas seguida de una comparación múltiple de Bonferroni). Tamaño de la muestra, $n = 11$.

Asimismo, a lo largo de las 7 sesiones que duro la primera fase, el consumo de agua total (consumo durante la tarea más consumo posterior) se mantuvo constante (Figura 4a), mientras que el peso corporal de los animales aumento hasta alcanzar un promedio de $78.0 \text{ gr} \pm 3.4 \text{ e.e.m}$. Esto indica que el consumo de agua en la restricción de agua es suficiente para mantener el peso al 80% con respecto a condiciones fisiológicas normales, ya que para ratas wistar el peso entre 21 a 29 días, esta reportado en promedio entre los 62 y 102 g en machos (Cossio et al. 2013) y menor a 100 g en hembras (Figuroa et al. 2013). Al analizar el consumo de agua durante la tarea y posterior a ella (consumo total), encontramos que conforme los animales conocen la condición del paradigma, el mayor consumo de agua se realiza durante la tarea (Figura 4b) indicando que, a pesar de que exista un aumento en el desempeño conductual, el volumen administrado en la recompensa no provoca la saciedad en los animales.

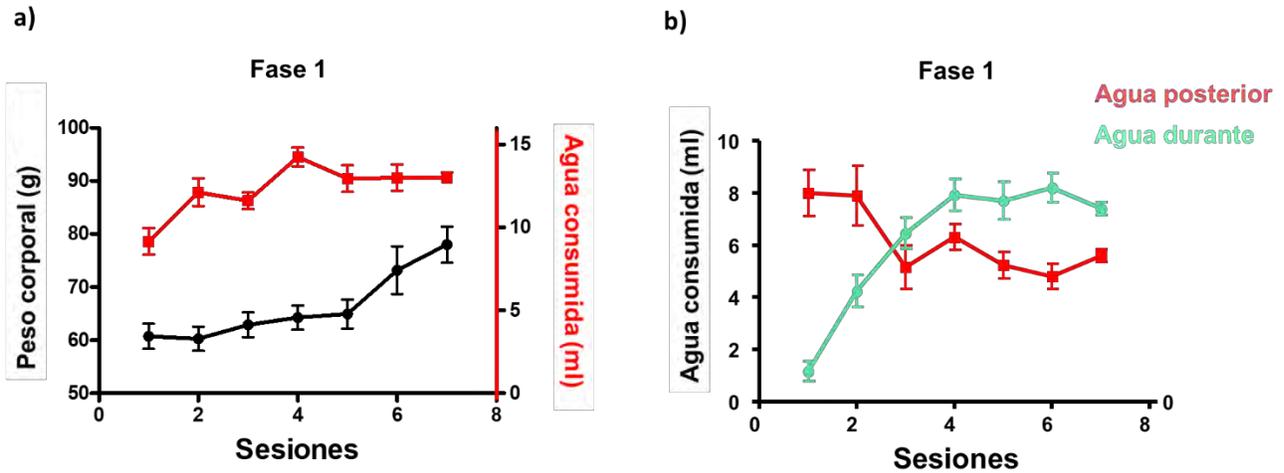


Figura 4: Cambios en el peso corporal y el consumo de agua durante las distintas sesiones de la primera fase, (a) muestra el peso (negro) y consumo de agua total (rojo) en cada sesión y (b) el consumo de agua durante (línea verde) y consumo de agua posterior (línea roja) a la tarea. Dentro de las gráficas se muestran los datos de media \pm e.e.m del peso y el consumo de agua a lo largo de las sesiones. Tamaño de la muestra, $n=11$.

En la segunda fase del paradigma para el grupo con restricción aguda, se analizó el desarrollo del aprendizaje cuantificando el porcentaje de palanqueos correctos (dentro del periodo de luz) (Figura 5a) como el de incorrectos (fuera del periodo de luz) (Figura 5b). Así, las ratas del grupo con restricción aguda aprenden la asociación de la luz-palanca y suministro del reforzador a partir de la sesión número 5 (ANOVA de medidas repetidas: correctos $F=52.49$, $p<0.0001$, incorrectos $F=52.55$, $p<0.0001$; Bonferroni sesión 5 correctos vs sesión 1 correctos: $t=5.328$, $p<0.05$, sesión 5 incorrectos vs sesión 1 incorrectos: $t=5.323$, $p<0.05$), y alcanzan su máxima eficiencia (75-80%) en la tarea a partir de la sesión 22 (Figura 5a). Considerando que el aprendizaje de habilidades motoras implica una mejora en la velocidad, precisión o consistencia de un movimiento con entrenamiento (Makino et al., 2016). Analizamos distintos parámetros dentro del paradigma de la segunda fase que nos permitiera determinar si, este periodo de transición entre la 5ta sesión y la 22, es reflejo de un refinamiento del movimiento debido al entrenamiento.

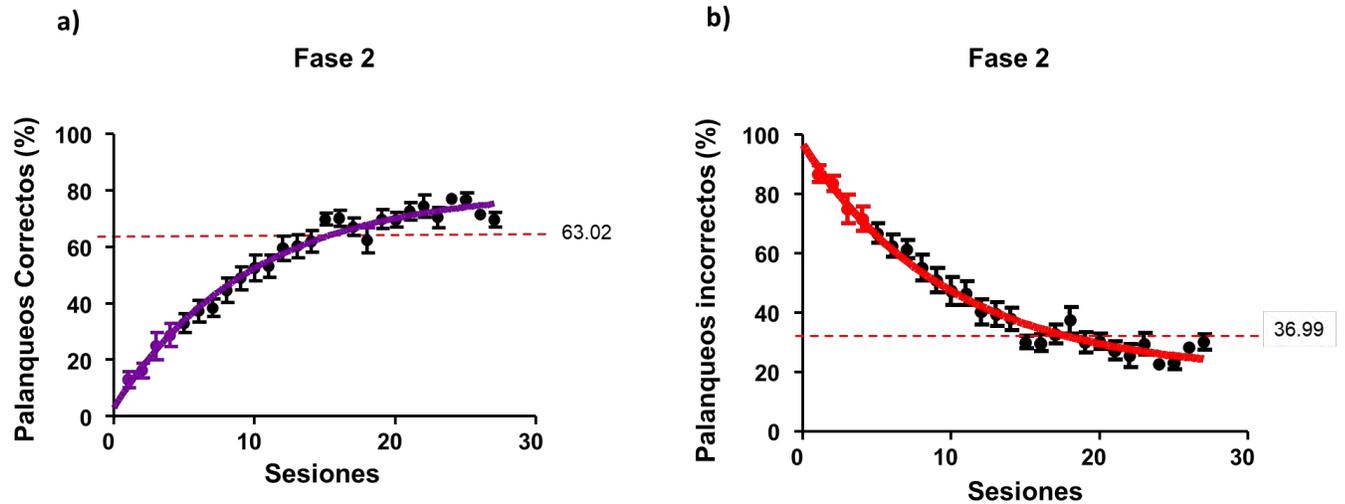


Figura 5. Porcentaje de palanqueos correctos (media \pm e.e.m) (a) e incorrectos (media \pm e.e.m) (b) para distintas sesiones de la fase 2, la línea roja punteada expresa el intervalo de confianza del 95% a lo largo de las sesiones. Los puntos negros dentro de la gráfica denotan una diferencia de $p < 0.05$ vs sesión 1,2,3 y 4 (ANOVA para medidas repetidas seguida de una comparación múltiple de Bonferroni). Tamaño de la muestra, $n = 11$.

Adicionalmente, se analizó el porcentaje de aciertos (veces que se enciende la luz y el animal responde) (Figura 6a) y omisiones (veces que se enciende la luz y el animal no responde) (Figura 6b) a lo largo de las 27 sesiones de entrenamiento para la segunda fase. Los resultados mostraron que a partir de la sesión 2 (ANOVA de medidas repetidas: aciertos $F = 7.695$, $p < 0.0001$, omisiones $F = 3.193$, $p < 0.0001$; Bonferroni sesión 2 aciertos vs sesión 1 aciertos: $t = 4.566$, $p < 0.05$, sesión 2 omisiones vs sesión 1 omisiones: $t = 4.570$, $p < 0.05$) los animales han aprendido la asociación luz- palanca y suministro del reforzador (Figura 6), llegando al 80% de eficacia en la sesión 5.

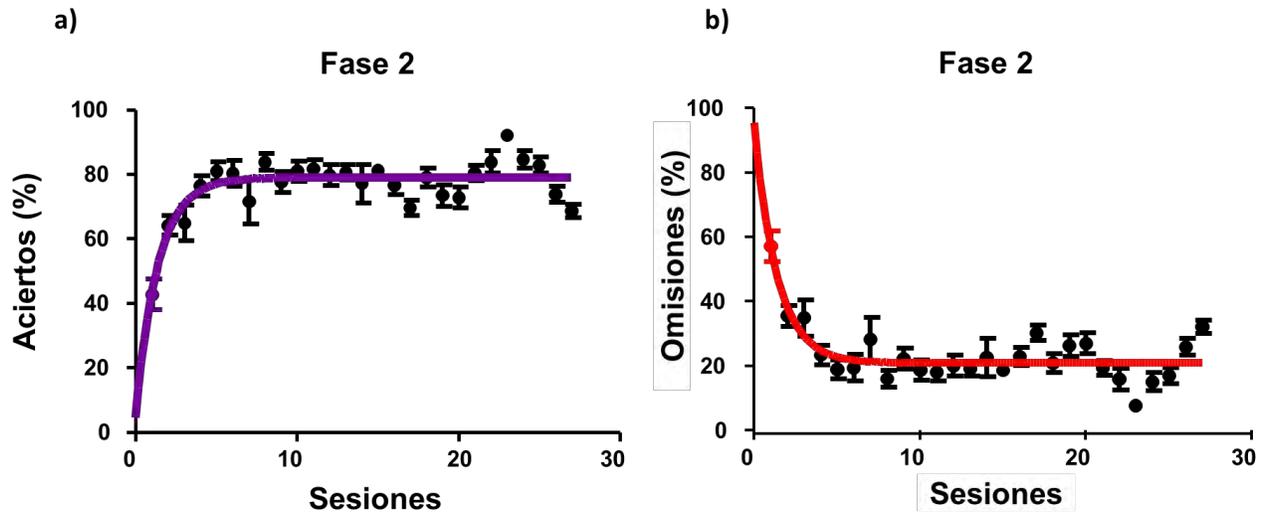


Figura 6. Porcentaje de aciertos (media \pm e.e.m) (a) y omisiones (media \pm e.e.m) (b) para distintas sesiones de la fase 2. Los puntos negros dentro de la gráfica denotan una diferencia de $p < 0.05$ vs sesión 1 (ANOVA para medidas repetidas seguida de una comparación múltiple de Bonferroni). Tamaño de la muestra, $n = 11$.

Asimismo, al analizar el tiempo de reacción (tiempo entre el encendido de la luz y el palanqueo), observamos que este disminuye conforme avanza el entrenamiento (Figura 7) siendo significativamente diferente al control (inicio del entrenamiento) a partir de la sesión 9 (ANOVA de medidas repetidas: $F = 16.45$, $p < 0.0001$; Bonferroni sesión 9 vs sesión 1 aciertos: $t = 4.837$, $p < 0.05$). El tiempo de reacción alcanzó un valor de 0.67 ± 0.04 s en la sesión 22, donde de acuerdo al porcentaje de palanqueos correctos, los animales han llegado a su máxima eficiencia. Esto muestra que durante las 13 sesiones de diferencia que toma a los animales llegar a la máxima eficiencia, el movimiento se vuelve más preciso y veloz, lo que habla de un refinamiento en la conducta más que del aprendizaje de la misma.

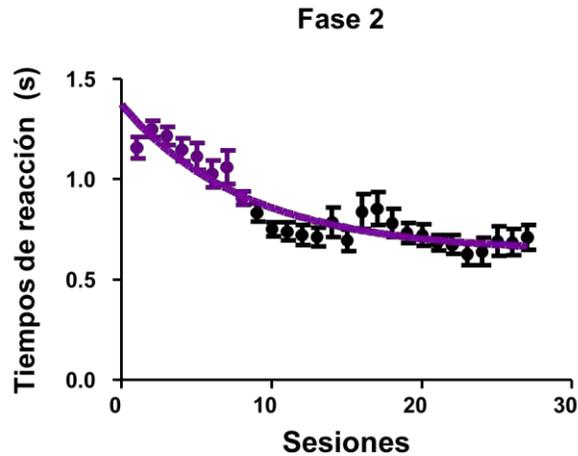


Figura 7. Tiempos de reacción (media \pm e.e.m) durante las diferentes sesiones de la fase 2 del condicionamiento. Los puntos negros dentro de la gráfica denotan una diferencia de $p < 0.05$ vs sesión 1 (ANOVA para medidas repetidas seguida de una comparación múltiple de Bonferroni). Tamaño de la muestra, $n = 11$.

Al analizar la proporción de palanqueos correctos e incorrectos a lo largo del tiempo dentro de cada sesión, observamos que tanto el número (Figura 8 a, c y e), como el porcentaje de palanqueos correctos (Figura 8 b, d y f) aumenta conforme el animal va progresando en las diferentes sesiones. En la última sesión de condicionamiento donde los animales aprendieron la condición del paradigma, el número de palanqueos disminuyen al final de la sesión (ANOVA de medidas repetidas: $F = 6.194$, $p < 0.05$; Bonferroni 60 min vs 10,20 min: $t = 4.040$, $p < 0.05$) (Figura 8 e), sin que se afecte la eficiencia (Figura 8 f) (medida en el porcentaje). Esto indica que la ejecución del operante en el grupo con restricción aguda a lo largo del tiempo, proveerá las condiciones necesarias para que el movimiento esté presente durante todo el tiempo que tarde el registro electrofisiológico.

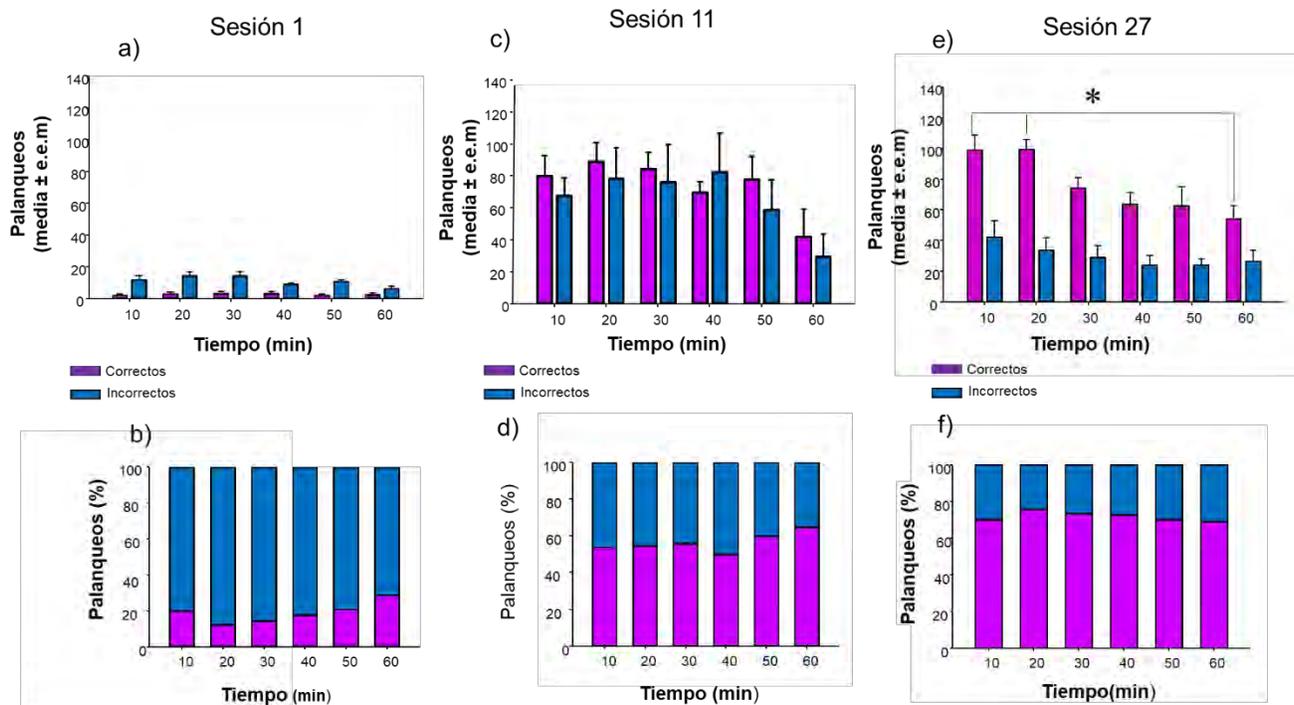


Figura 8. Cambios en el desempeño de los animales a lo largo de los 60 minutos del condicionamiento durante distintas sesiones de la segunda etapa. Numero (media \pm e.e.m) (a, c y e) y porcentaje (media \pm e.e.m) (b, d, f) de palanqueos correctos (rosa) e incorrectos (azul) medidos cada 10 minutos. Los símbolos * denotan una diferencia de $p < 0.05$ vs sesión 1 y 2 (ANOVA para medidas repetidas seguida de una comparación múltiple de Bonferroni). Tamaño de la muestra, $n = 11$.

Durante las 27 sesiones de la segunda fase, el consumo de agua total incrementó de manera proporcional al aumento del peso de los animales (Figura 9a). El peso corporal a los 55 días de vida (190.000 ± 2.64 e.e.m) se mantiene al 80% de las condiciones fisiológicas normales, el cual para ratas Wistar entre 30 a 56 días, oscila entre los 140- 264 g en macho (Cossio. et al. 2013) y entre 100- 230 g en hembras (Figuroa et al. 2013). Al analizar el consumo de agua durante la tarea y posterior a ella (Figura 9b), observamos que conforme la rata aprende la condición del paradigma, el consumo durante la tarea aumenta, pero no sobrepasa el consumo posterior, indicando que al término del paradigma las ratas aún tienen la necesidad de consumir agua. Esto sugiere que las disminuciones del número de palanqueos al final de la sesión se deben probablemente a una saciedad parcial, pero no total de los animales.

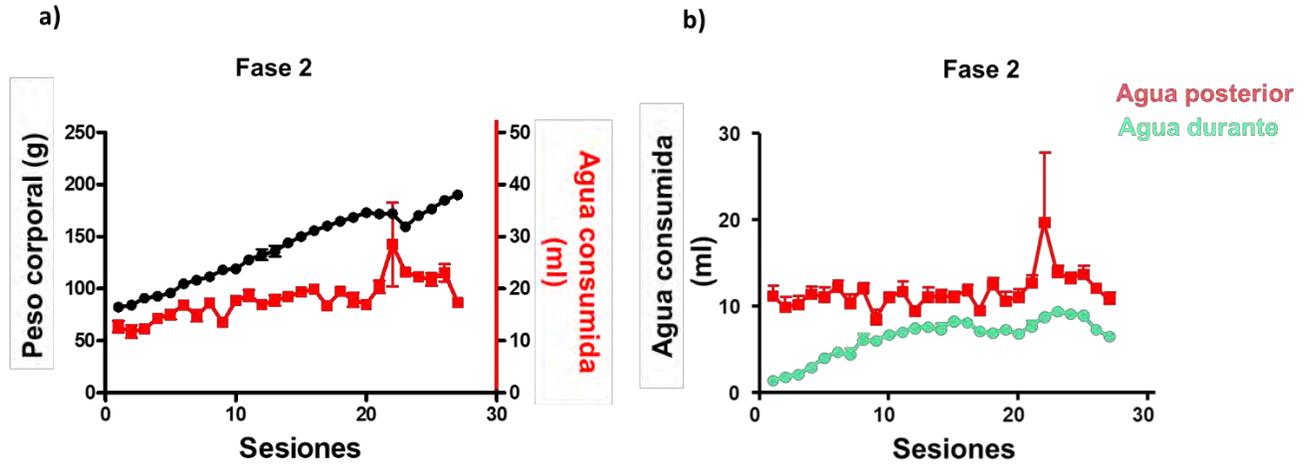


Figura 9: Cambios en el peso y el consumo de agua durante las distintas sesiones de la segunda fase, (a) muestra el peso (negro) y consumo de agua total (rojo) en cada sesión y (b) el consumo de agua durante (línea verde) y consumo de agua posterior (línea roja) a la tarea. Dentro de las gráficas se muestran los datos de media \pm e.e.m del peso y el consumo de agua a lo largo de las sesiones. Tamaño de la muestra, $n= 11$.

Una vez que el grupo con restricción aguda alcanzó una eficiencia del 75-80% durante varias sesiones del paradigma conductual, se procedió a realizar la cirugía para colocar el poste de de semi-restricción (cabeza fija); los animales pasaron 6 días en recuperación posterior a los cuales se procedió a implementar la tercera etapa del paradigma.

Al final del periodo de recuperación la condición de semi-restricción (cabeza fija) fue presentada en dos fases diferentes, con la finalidad de permitir que los animales se habituaran mejor a la condición de semi-restricción (fases 3 y 4).

Para la tercera fase, la condición de restricción (cabeza fija) fue presentada mediante acercamientos sucesivos, primero se expuso por una sesión a los animales al uso de la barra y los tornillos de fijación. Posteriormente se les acostumbro a posicionarse de manera voluntaria en los soportes de fijación, lo cual llevo en promedio 4 sesiones. Finalmente, se acostumbró a los animales a estar fijos y a palanquear simulando las condiciones de la primera fase, lo cual llevo en promedio 5 sesiones.

Una vez que los animales efectuaban el condicionamiento durante toda la sesión con la cabeza fija, se comparó el número de palanqueos con los realizados en condiciones de libre movimiento. De esta forma, se observó que no hay una diferencia en el desempeño conductual de los animales en ambas condiciones (Prueba t de Student para datos no pareados cabeza fija vs libre movimiento: $t= 0.3737$ $df= 9$, $p= 0.7173$) (Figura 11).

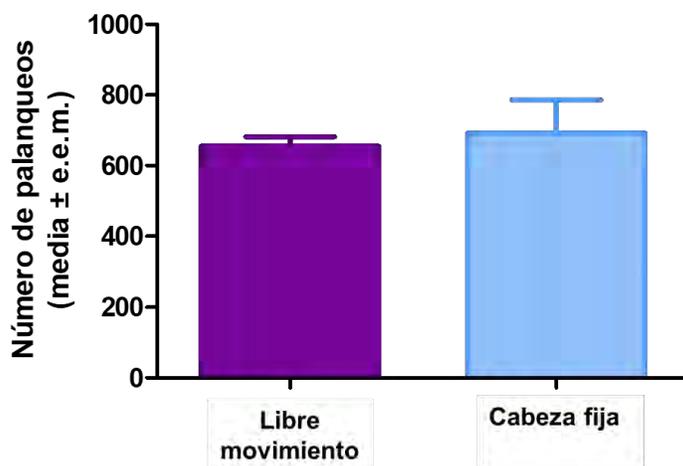


Figura 11: Comparación del número de palanqueos (media \pm e.e.m) de la última sesión en libre movimiento contra la última sesión de la fase 3 en condiciones de semi-restricción (cabeza fija). Tamaño de la muestra, $n= 11$ libre movimiento y $n= 6$.

La cuarta fase del condicionamiento tomo en promedio de 9 sesiones, durante las cuales los animales asociaron la tarea de la segunda fase con la condición de semi-restricción. A lo largo de estas sesiones, se observó un aumento en el porcentaje de palanqueos correctos (Figura 12a), sin embargo, solo alcanzaron una eficiencia máxima del 45 % (Figura 12a), lo que equivale a un 30 ó 35% menos de la eficiencia máxima presentada en condiciones de libre movimiento, por lo que el desempeño es diferente (prueba Prueba t de Student para datos no pareados cabeza fija vs libre movimiento: $t= 9.254$ $df= 15$, $p< 0.0001$) (Figura 12b).

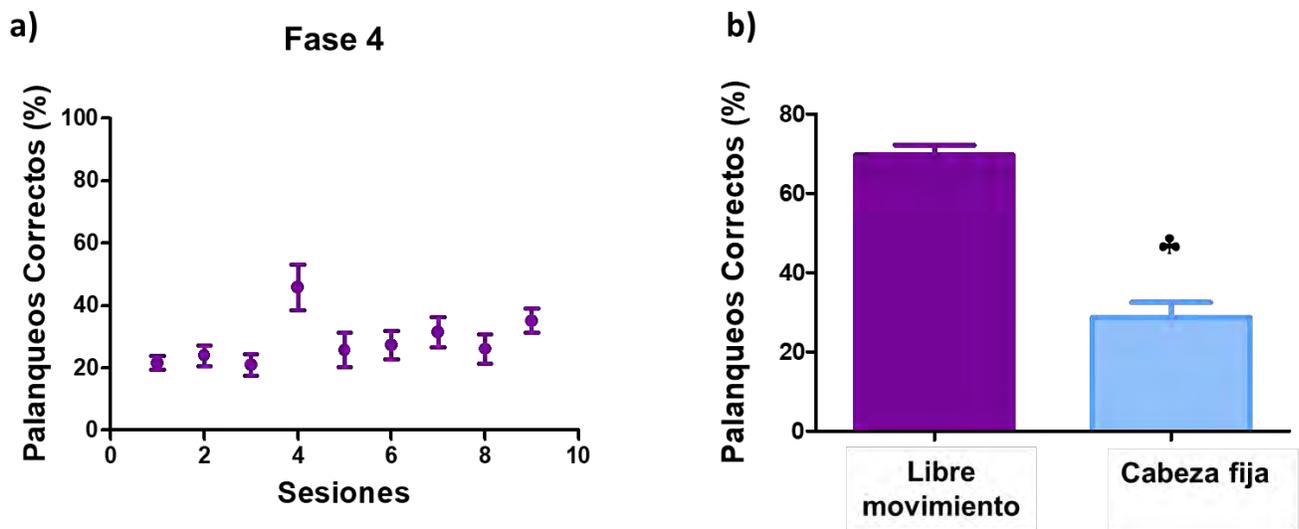


Figura 12: Cambios en el porcentaje de palanqueos correctos en animales con la cabeza fija. a) porcentaje de palanqueos correctos (media \pm e.e.m) a lo largo de las sesiones de la fase 4 y b) comparación del porcentaje de palanqueos correctos (media \pm e.e.m) entre la última sesión de la fase dos en libre movimiento contra la última sesión de la 4 fase con la cabeza fija. Los símbolos ♣ denotan una diferencia de $p<0.0001$ vs libre movimiento (Prueba t de Student para datos no pareados). Tamaño de la muestra, $n= 11$ libre movimiento y $n= 6$.

Analizando los aciertos y omisiones durante las diferentes sesiones de la fase 4 observamos que, el porcentaje de aciertos es muy variable entre sesiones. Esto indica que los animales muestran una conducta susceptible a los cambios en las condiciones que se presenten en el momento de la sesión y no que estos no conozcan la regla establecida en el operante, ya que logran la misma eficiencia que en libre movimiento (prueba Prueba t de Student para datos no pareados cabeza fija vs libre movimiento: $t= 1.642$ $df= 15$, $p= 0.0356$) (Figura 13b).

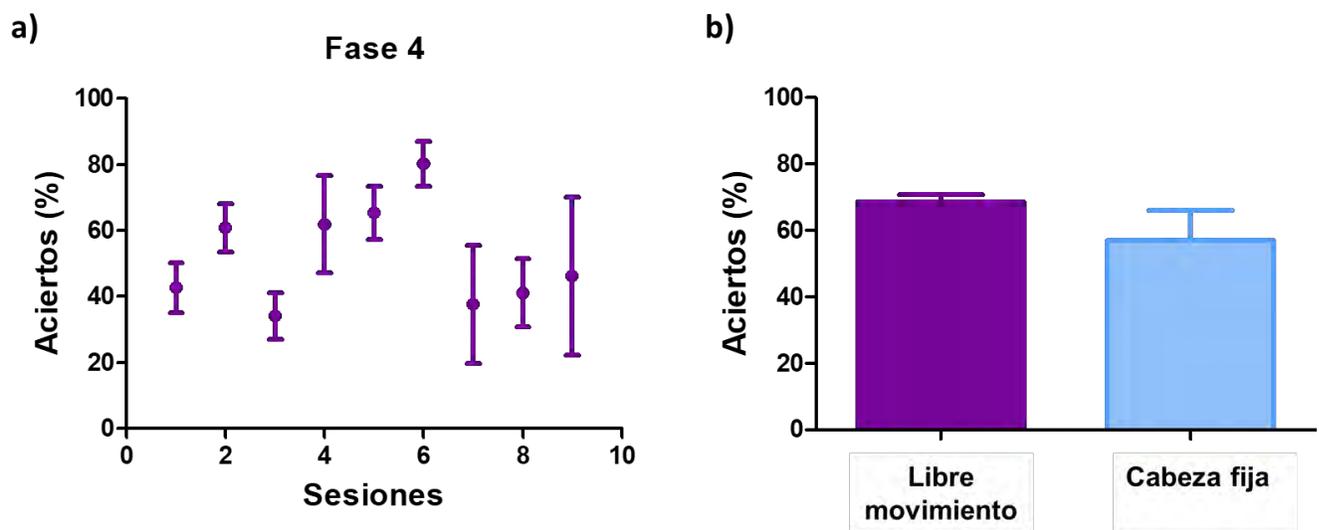


Figura 13: Cambios en el porcentaje de aciertos en animales con la cabeza fija. a) porcentaje de aciertos (media \pm e.e.m) a lo largo de las sesiones de la fase 4 y b) comparación del porcentaje aciertos (media \pm e.e.m) entre la última sesión de la fase dos en libre movimiento contra la última sesión de la 4 fase con la cabeza fija. Tamaño de la muestra, $n= 11$ libre movimiento y $n= 6$.

Es importante hacer notar que, en esta fase, no hay diferencias (prueba Prueba t de Student para datos no pareados cabeza fija vs libre movimiento: $t= 0.9123$ $df= 15$, $p= 0.376$) en el tiempo de reacción entre los animales en libre movimiento (0.67 ± 0.04 s) y animales con cabeza fija (0.70 ± 0.08 s) (Figura 14). Esto indica que el movimiento en los animales semi-restringidos se ejecuta con la misma precisión que en condiciones de libre movimiento.

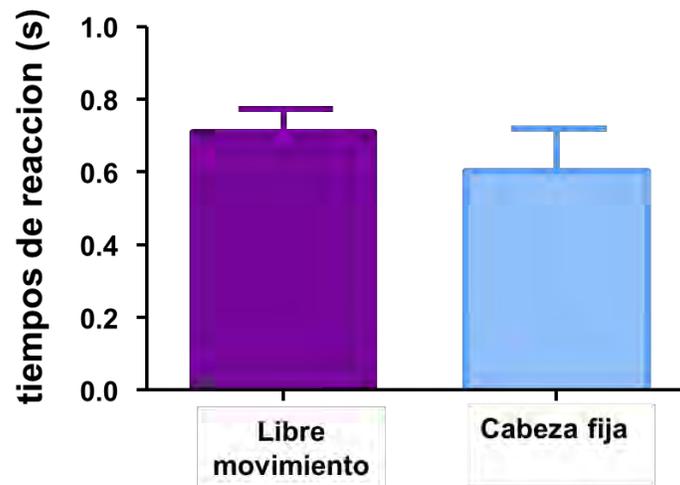


Figura 14. Comparación de los tiempos de reacción (media \pm e.e.m) entre la última sesión de la fase dos en libre movimiento contra la última sesión de la 4 fase con cabeza fija. Tamaño de la muestra, $n= 11$ libre movimiento y $n= 6$.

8. OBJETIVO PARTICULAR: Registros yuxtacelulares en la corteza sensoriomotora en animales semi-restringidos (cabeza fija) durante la ejecución de movimientos

8.1 MATERIALES Y MÉTODO

Una vez aprendido el condicionamiento operante y con la finalidad de explorar la actividad neuronal unitaria extracelular de la corteza sensoriomotora antes y durante la ejecución del movimiento, se realizaron registros electrofisiológicos unitarios y yuxtacelulares en la corteza sensoriomotora a distintas profundidades.

8.1.1 Cirugía para la ventana crónica:

Los animales fueron anestesiados con isoflurano (3.5% inducción, 1 % mantenimiento) y mantenidos en un colchón caliente a 37°C. Mediante un taladro dental se realizó una ventana de 3 x 4 mm en el cráneo sin dañar la duramadre sobre la corteza sensoriomotora contralateral a la pata con la cual cada animal realizaría el palanqueo durante la tarea. Tomando como referencia a Paxinos y Watson (2004) el centro de la ventana se realizó 1 mm AP con respecto a bregma y 2.5 mm lateral con respecto a la línea media (Figura 15). Esta ventana se cubrió con un cubreobjetos de 5 mm de diámetro y se selló con Rubber Liquid (Body Double Fast).

Para estabilizar el cubreobjetos, la zona fue cubierta al mismo nivel que el acrílico dental con una capa de papel aluminio estéril y Rubber Liquid.

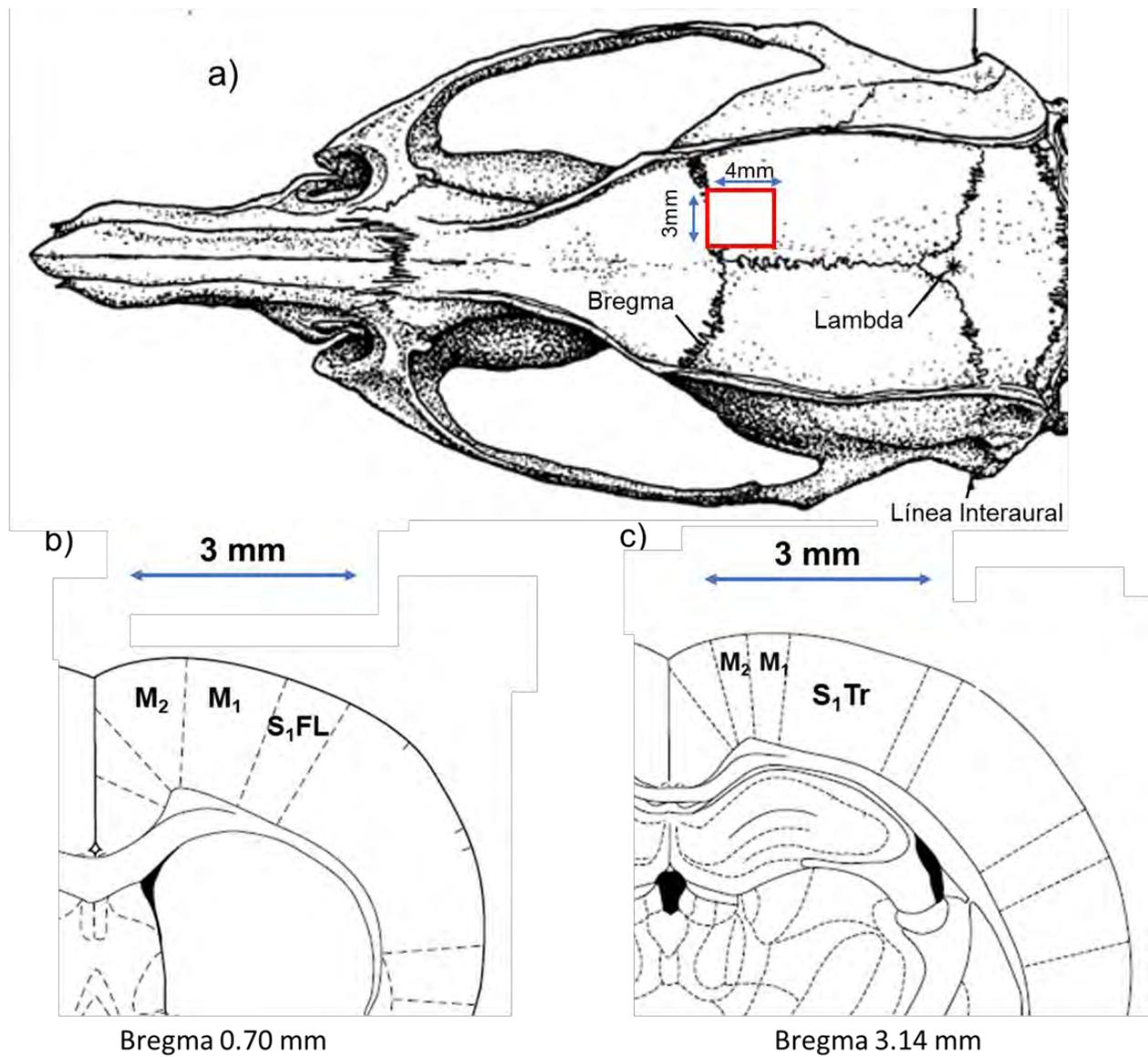


Figura 15: a) Posición de la ventana crónica en el cráneo, b) Corte coronal donde se muestran las estructuras que se encuentran en el borde rostral de la ventana y c) corte coronal donde se muestran las estructuras que se encuentran en el borde caudal de la ventana. (Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2004)

8.1.2 Registro electrofisiológico:

Al siguiente día de efectuada la ventana crónica, los animales fueron colocados dentro de la caja de conducta para realizar las sesiones de registro las cuales, tuvieron una duración de 60 min y se realizaron bajo las mismas condiciones que las sesiones de entrenamiento.

Durante el periodo en el que los animales se encontraban realizando la tarea de condicionamiento se realizaron registros electrofisiológicos yuxtacelulares mediante electrodos de borosilicato llenos de Biocitina al 2% (SIGMA B4261) disuelta en Ringer de Rata, con resistencias entre 7 a 10 M Ω .

Para cada registro se utilizó un electrodo acoplado a un micromanipulador (Luigs & Neumann D-40), mediante el cual se hizo descender este electrodo en distintas capas corticales dentro de la corteza sensoriomotora. Las señales fueron registradas, se amplificaron y filtraron para posteriormente ser digitalizadas y grabadas mediante el programa Spike2 (versión 8.11), el uso de este programa además nos permitió mostrar en canales independientes la actividad de los diferentes componentes dentro de la caja de condicionamiento (luz, palanca y bomba peristáltica).

Para cada sesión de registro se retiró la cubierta y el portaobjetos de la ventana crónica, para permitir la entrada del electrodo; cubierta que fue colocada nuevamente al término de la sesión bajo condiciones asépticas y material estéril.

El marcaje microiontoforético con biocitina se realizó mediante sesiones en las cuales se aplicaron pulsos cuadrados continuos de baja intensidad de corriente positiva (<7 nA, 200 ms on /200 ms off), mientras que gradualmente se aumentó la corriente en pasos de 0.1 nA y monitoreando la forma de onda AP (amplitud) y frecuencia (Pinault ,1996). La apertura de la membrana se indicó por un aumento repentino en la frecuencia AP. Las sesiones de llenado se repitieron varias veces (10-40 min).

Una vez terminada la sesión de registro los animales fueron llevados a su caja habitación durante 2 horas para permitir la difusión de biocitina a lo largo de la neurona.

8.1.3 Histología:

Dos horas después del último registro yuxtacelular los animales fueron anestesiados profundamente (pentobarbital 45 mg / kg de peso) y se perfundieron de manera intracardiaca con una solución tampón de fosfatos 0.1 M, seguido de paraformaldehído (4% en solución tampón de fosfatos 0,1 M, pH 7,4). El cerebro fue retirado y almacenado a una temperatura de 4°C durante 12 horas en el mismo fijador.

Posteriormente, los cerebros obtenidos fueron procesados utilizando un vibrotomo (Leica VT1200S) para obtener cortes de cerebro horizontales con un grosor de 50µm; dichos cortes fueron colectados en cajas de 12 pozos con solución tampón de fosfatos 0.1 M.

Finalmente se realizaron 5 lavados con una solución tampón de fosfatos 0.1 M en agitación a temperatura ambiente, posterior a los cuales se efectuó una reacción con estraptavidina (5mg /ml) disuelta en una solución con tritón (0.3 g de tritón en 100 ml solución tampón de fosfatos 0.1 M) en agitación por 3 h a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo, se realizaron 5 lavados con una solución tampón de fosfatos 0.1 M; los cortes fueron montados en portaobjetos (SuperFrost Plus VWR Micro Slides) y cubiertos con cubreobjetos para ser observados en el microscopio de fluorescencia (Nikon ECLIPSE E600 unida a una cámara Cool SNAP fx Lens C-D45x).

8.1.4 Análisis:

Los registros electrofisiológicos obtenidos para cada neurona, se analizaron inicialmente mediante histogramas perievento, tomando la frecuencia de descarga de neuronas individuales en distintas capas corticales.

Tomando en cuenta que la actividad preparatoria se atribuye a periodos de tiempo antes de un movimiento y que la ejecutora es durante el movimiento (Wong et al., 2015; Isomura et al.,2009), los eventos utilizados para la construcción de los histogramas perievento fueron, el inicio del encendido de la luz, previo al movimiento y el final del palanqueo (cuando la palanca alcanzo su máxima posición) durante el movimiento.

Los histogramas perievento fueron construidos analizando 0.5 s previos a cada evento y 1s posterior, tomando como mínimo 15 descargas por neurona.

8.2 RESULTADOS

La técnica de registro yuxtacelular permite realizar registros electrofisiológicos de neuronas individuales; seguido por electroporación de biocitina para el marcaje celular. Esto proporciona la opción de identificación además de poder reconstruir células para vincular la función (fisiología) con la estructura (morfología) (Narayanan et al., 2014). En conjunto con el condicionamiento operante bajo condiciones de cabeza fija, se obtuvo el registro unitario de 23 neuronas a distintas profundidades que van desde 1000 a 2000 micras (media $1555 \mu\text{m} \pm 58.43$) a lo largo de la corteza sensoriomotora (S1 y M1). Dicha actividad pudo ser analizada inicialmente mediante histogramas perievento de potenciales de acción sincronizados con la luz y con el palanqueo (Figura 16).

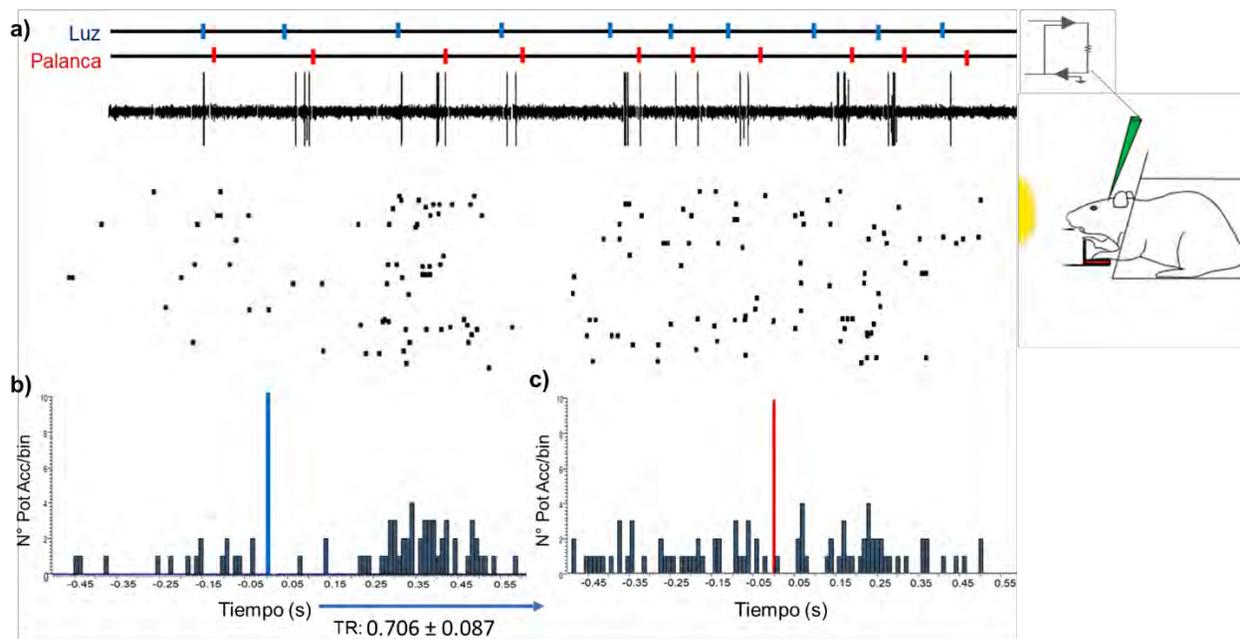


Figura 16: Registro electrofisiológico de una neurona obtenido durante la sesión de registro y ejecución del operante e histogramas perievento con los distintos eventos de luz y palanca. (a) ejemplo de los registros de ocurrencia de potenciales de acción, b) histograma perievento obtenido en función de la luz (línea azul) y (c) en función del palanqueo (línea roja). Cada histograma fue realizado tomando ventanas de tiempo de 0.5 s previos al evento y 1.0 s después con un tamaño de bin de 0.01s.

De las 23 neuronas registradas durante la ejecución del operante se obtuvo el marcaje de dos neuronas con profundidades de 1031.97 μm y 1887.48 μm de las cuales solo se obtuvo la imagen mediante el microscopio de fluorescencia (Figura 17b). Dichas neuronas lograron marcarse durante un periodo de 10 a 20 min (Figura 17a) al administrar los pulsos cuadrados de corriente, permitiendo la entrada biocitina al interior de la célula.

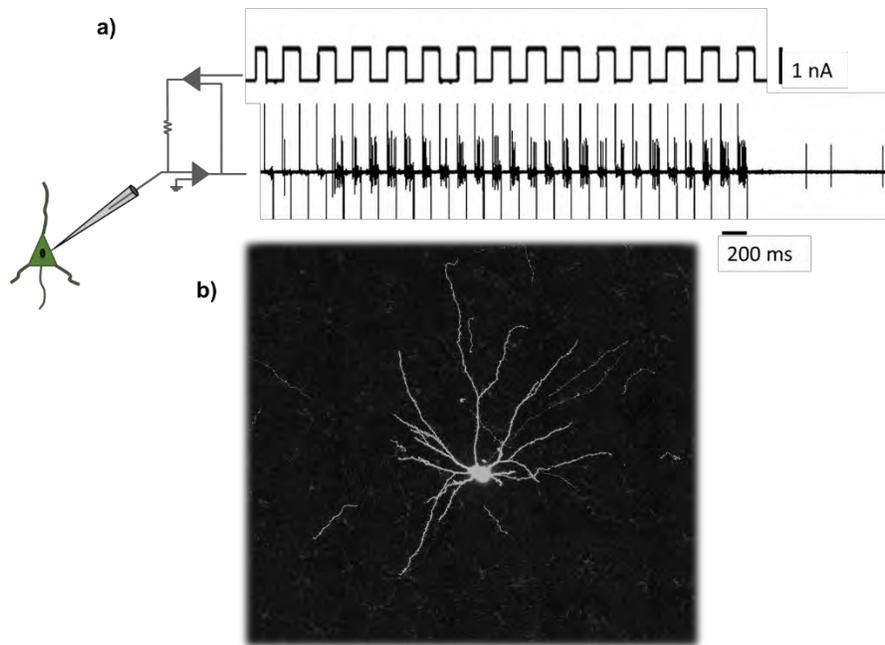


Figura 17: Marcaje yuxtacelular. a) Muestra el registro de la señal obtenida durante la administración de pulsos cuadrados en el marcaje y la activación en respuesta de la neurona y b) muestra la imagen obtenida en el microscopio de fluorescencia de la neurona marcada.

9. OBJETIVO PARTICULAR: Analizar la actividad eléctrica neuronal en la corteza sensoriomotora antes y durante la ejecución de movimientos

9.1 MATERIALES Y MÉTODO

Con las señales previamente obtenidas en los registros yuxtacelulares y los histogramas perievento, se realizó un análisis numérico más detallado para efectuar una clasificación que permitiera identificar neuronas que están relacionadas con la presencia de luz y las que están relacionadas con el movimiento de palanqueo. Para ello todos los datos obtenidos en los histogramas perievento fueron analizados mediante una prueba t de Student para datos pareados, de la actividad basal (0.5 s previos al evento) contra 0.5 s de la actividad posterior del evento. Ello permitió analizar si existían diferencias significativas entre el número de potenciales de acción por bin previos al evento, con los posteriores. Para aquellos datos que satisficieron la diferencia, se utilizó como un criterio extra de clasificación positiva aquellos datos que posteriores al evento superaron el promedio más dos veces la desviación estándar de la actividad basal. Así, aquellas neuronas cuya actividad (número de potenciales de acción) alrededor del evento sobrepaso el promedio más dos desviaciones estándar en más de dos bins fueron consideradas dentro de una categoría particular.

Finalmente, para cada categoría se obtuvo un histograma perievento promedio de actividad de todas las neuronas y una representación mediante mapas de color del histograma perievento de cada neurona dentro de dicha clasificación.

9.2 RESULTADOS

Con la finalidad analizar si la actividad neuronal cambia (potenciales de acción) antes y durante del movimiento se analizó la actividad de cada histograma perievento relacionado a la luz o al palanqueo, comparando la actividad basal contra la actividad posterior al evento (tabla 1 y 2). Mostrando que solo 2 neuronas no cambian su actividad a lo largo del paradigma, mientras que el resto muestra cambios antes y durante la ejecución del movimiento, por lo que se usó el siguiente criterio de clasificación positiva.

Finalmente se obtuvieron 4 clasificaciones finales para las 23 neuronas registradas, las cuales son: neuronas tipo 1 o relacionadas con la presencia de luz, neuronas tipo 2 o neuronas relacionadas con el movimiento de palanqueo, neuronas tipo 3 relacionadas con ambos eventos (cuya señal aumenta al presentarse tanto la luz como el movimiento) y las neuronas tipo 4 o no relacionadas con el movimiento de presión de la palanca (cuya actividad no cambia a lo largo del registro).

Tabla 1: Comparación entre la actividad basal y la actividad posterior a la presencia de luz.

N° de neurona	Profundidad (mm)	Histograma perievento (Luz)				
		Basal (media P. A ± SD/ bin)	Posterior (media P. A ± SD/ bin)	t	df	p
1	1651	0	0.9 ± 1.035	6.148	49	< 0.0001
2	1879	2 ± 1.262	4.2 ± 2.587	5.391	49	< 0.0001
3	1879	0	0.529 ± 0.833	4.538	50	< 0.0001
4	1371	0.4 ± 0.53	0.34 ± 0.658	0.5735	49	0.569
5	1371	0.14 ± 0.35	0.72 ± 0.783	5.408	49	< 0.0001
6	1956	0.74 ± 0.852	1.38 ± 1.210	3.466	49	0.0011
7	1395	0.14 ± 0.40	0.24 ± 0.43	1.4	49	0.167
8	1234	3.1 ± 1.776	3.88 ± 1.674	2.439	49	0.0184
9	1452	1.28 ± 0.948	2.84 ± 1.92	5.35	49	< 0.0001
10	1031	2.620 ± 1.48	3.66 ± 1.78	2.817	49	0.007
11	1201	0	0.400 ± 0.699	5.715	49	< 0.0001
12	1634	0.82 ± 0.94	1.62 ± 0.9875	4	49	0.0002
13	1634	0.68 ± 0.712	1.22 ± 1.093	2.909	49	0.0054
14	1484	0	0.32 ± 0.652	3.466	49	0.0011
15	1484	0.18 ± 0.437	0.32 ± 0.512	1.469	98	0.1451
16	1602	0	0.14 ± 0.40	2.447	49	0.018
17	1602	1.24 ± 1.117	1.86 ± 1.278	2.428	49	0.0189
18	1675	0.32 ± 0.586	1 ± 1.178	3.653	49	0.0006
19	1675	3.04 ± 1.665	5.92 ± 2.870	5.943	49	< 0.0001
20	1268	0	0.44 ± 0.644	4.831	49	< 0.0001
21	1690	0.26 ± 0.487	1.02 ± 1.078	4.662	49	< 0.0001
22	1690	3.9 ± 2.092	6.54 ± 3.459	4.845	49	< 0.0001
23	1869	2.76 ± 1.598	11.84 ± 6.261	9.851	49	< 0.0001

Los valores mostrados corresponden a la media de los potenciales de acción (P. A) ± la desviación estándar (SD) / bin de la actividad basal y posterior para los 23 registros de neuronas individuales, así como, los resultados de la prueba t de Student. Los valores que fueron significativamente diferentes se muestran en color negro.

Tabla 2: Comparación entre la actividad basal y la actividad posterior a la presencia del palaqueo.

N° de neurona	Profundidad (mm)	Histograma perievento (palanca)				
		Basal (media P. A ± SD/ bin)	Posterior (media P. A ± SD/ bin)	t	df	p
1	1651	0.34 ± 0.557	0.84 ± 1.017	3.416	49	0.0013
2	1879	6.4 ± 2.441	3.08 ± 2.293	6.649	49	< 0.0001
3	1879	0	0.28 ± 0.64	3.093	49	0.003
4	1371	0.28 ± 0.496	0.7 ± 0.90	3.128	49	0.003
5	1371	0.5 ± 0.58	0.98 ± 1.097	2.791	49	0.0075
6	1956	3.16 ± 1.867	2.02 ± 1.72	3.135	49	0.0029
7	1395	0.06 ± 0.23	0.18 ± 0.437	1.63	49	0.1095
8	1234	4.32 ± 2.226	3.52 ± 1.843	2.048	49	0.046
9	1452	6.2 ± 2.259	6.58 ± 2.475	0.972	49	0.3354
10	1031	8.52 ± 2.54	9.300 ± 2.985	1.304	49	0.1983
11	1201	0.14 ± 0.35	0.62 ± 1.123	3.006	49	0.0042
12	1634	2.347 ± 1.332	2.17 ± 1.223	0.8056	147	0.4218
13	1634	1.94 ± 1.284	2.28 ± 1.471	1.231	98	0.2213
14	1484	0	0.14 ± 0.35	2.824	49	0.0068
15	1484	1.16 ± 1.017	1.56 ± 1.215	1.785	98	0.0774
16	1602	0	0.08 ± 0.34	1.661	49	0.103
17	1602	2.3 ± 1.418	2.24 ± 1.379	0.2185	49	0.828
18	1675	0.86 ± 0.926	0.86 ± 1.050	0	49	1
19	1675	6.8 ± 2.356	6.44 ± 3.058	0.7925	49	0.4319
20	1268	0.18 ± 0.061	0.56 ± 0.951	2.518	49	0.0151
21	1690	0.54 ± 0.761	1.386 ± 1.558	3.5	43	0.001
22	1690	10.38 ± 2.968	8.2 ± 2.949	3.551	49	0.0009
23	1869	15.44 ± 4.841	11.16 ± 5.289	4.221	98	< 0.0001

Los valores mostrados corresponden a la media P. A ± SD/ bin de la actividad basal y posterior para los 23 registros de neuronas individuales, así como, los resultados de la prueba t de Student. Los valores que fueron significativamente diferentes se muestran en color negro.

Dentro de la clasificación de tipo 1 encontramos 8 neuronas que aumentaban su actividad justo después del encendido de la luz y hasta 500 ms después (Figura 18c). Estas neuronas disminuyeron su actividad al ejecutarse el movimiento (Figura 18d). Al analizar su actividad mediante los histogramas perievento promedio, observamos que la actividad se incrementó un $200 \pm 33.2\%$ posterior al encendido de la luz y, su actividad basal regresó posterior al palanqueo.

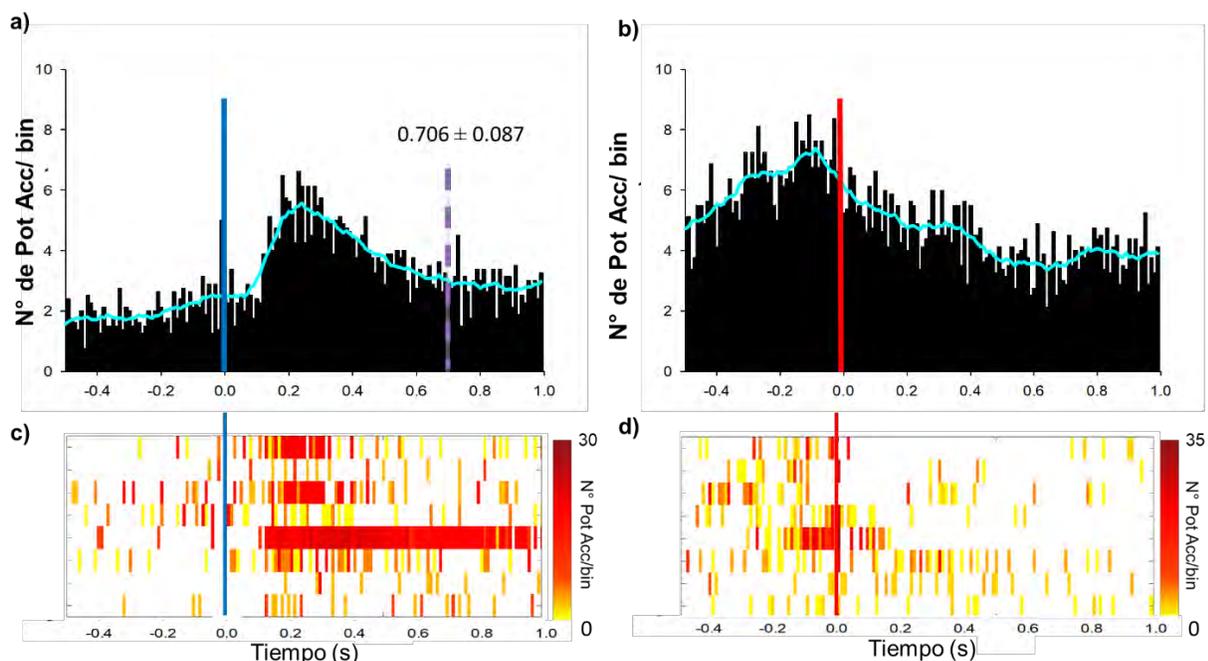


Figura 18: Actividad de las neuronas tipo 1, a y b) histogramas perievento promedio de la actividad de las neuronas tipo 1 sincronizados con la luz y el palanqueo, respectivamente. El histograma fue realizado promediando la actividad de todas las neuronas tipo 1, tomando ventanas de tiempo de 0.5 s previos al evento y 1.0 s después, utilizando bins de 0.01s; la línea morada punteada representa el promedio del tiempo de reacción obtenidos en los respectivos ensayos, y el área sombreada representa el error estándar del promedio del tiempo del tiempo de reacción; la línea acua representa el promedio de la actividad obtenida en estos histogramas. c y d) mapa de colores de la actividad individual de las 8 neuronas tipo 1 registradas obtenidos mediante su histograma periestimuló sincronizado con la luz (línea azul) o el palanqueo (línea roja), respectivamente. El mapa de color se obtuvo mediante el histograma perievento de cada neurona tipo 1, restando el promedio de la actividad basal a la actividad posterior al evento; la gama de color representa en amarillo la actividad más baja (1 potencial de acción) en rojo oscuro la actividad más alta (30 potenciales de acción para los histogramas con luz y 35 para los de palanqueo).

En cuanto a las neuronas tipo 2 solo encontramos una neurona cuya actividad no se modificaba (figura 19a y c) con la presencia de luz (media 0.39 ± 0.0680 e.e.m de la actividad basal vs 0.4082 ± 0.0767 e.e.m. de la actividad posterior al evento), pero si aumentaba al presentarse el palanqueo (media 0.2857 ± 0.0714 e.e.m. de la actividad basal vs 0.5900 ± 0.08299 e.e.m de la actividad posterior al evento) (Figura 19 b y d).

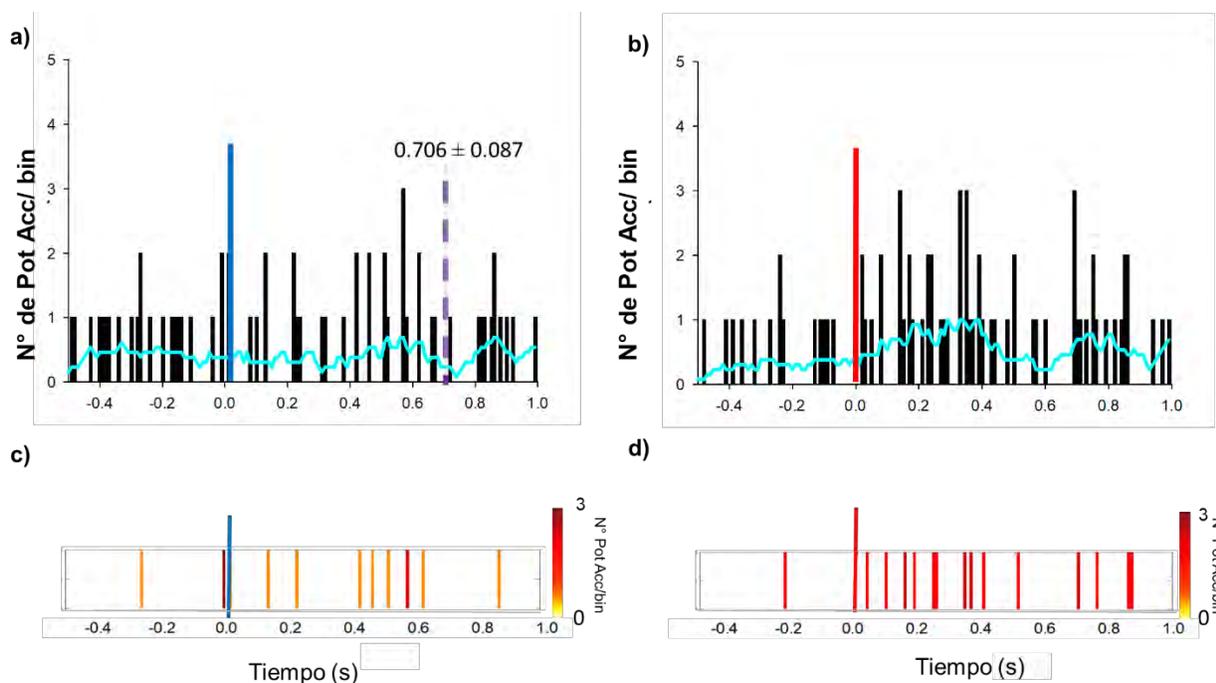


Figura 19: Actividad de la neurona tipo 2 a y b) histogramas perievento de la actividad de una neurona tipo 2 sincronizado con el encendido de la luz y con el palanqueo respectivamente. El histograma fue realizado tomando ventanas de tiempo de 0.5 s previos al evento y 1 .0 s después, utilizando bins de 0.01s; la línea morada punteada representa el promedio del tiempo de reacción obtenidos en los respectivos ensayos, y el área sombrada representa el error estándar del promedio del tiempo del tiempo de reacción; la línea acua representa el promedio de la actividad obtenida en estos histogramas. c y d) mapa de colores de la actividad individual de la neurona tipo 2 obtenido mediante su histograma perievento sincronizado con la luz (línea azul) o el palanqueo (línea roja), respectivamente. El mapa de color se obtuvo mediante los histogramas perievento de cada neurona tipo 3, restando el promedio de la actividad basal (0.5 s previos al evento) a la actividad posterior al evento (1.0 s posterior al evento); La gama de color representa en amarillo la actividad más baja (1 potencial de acción) en rojo oscuro la actividad más alta (3 potenciales de acción para el histograma con luz y 3 para el de palanqueo).

Para la clasificación de neuronas tipo 3, se obtuvo un total de 12 neuronas, las cuales, mostraron un aumento en la actividad tanto en presencia de luz como en presencia del palanqueo (Figura 20c y d). El histograma promedio de la actividad de estas neuronas al presentarse la luz muestra que después de la presencia de luz la actividad neuronal aumenta hasta un promedio de 173% (± 53.31 e.e.m) durante 1 s (Figura 20a) y que al presentarse el palanqueo aumenta en promedio el 96% (± 18.95 e.e.m) (Figura 20b).

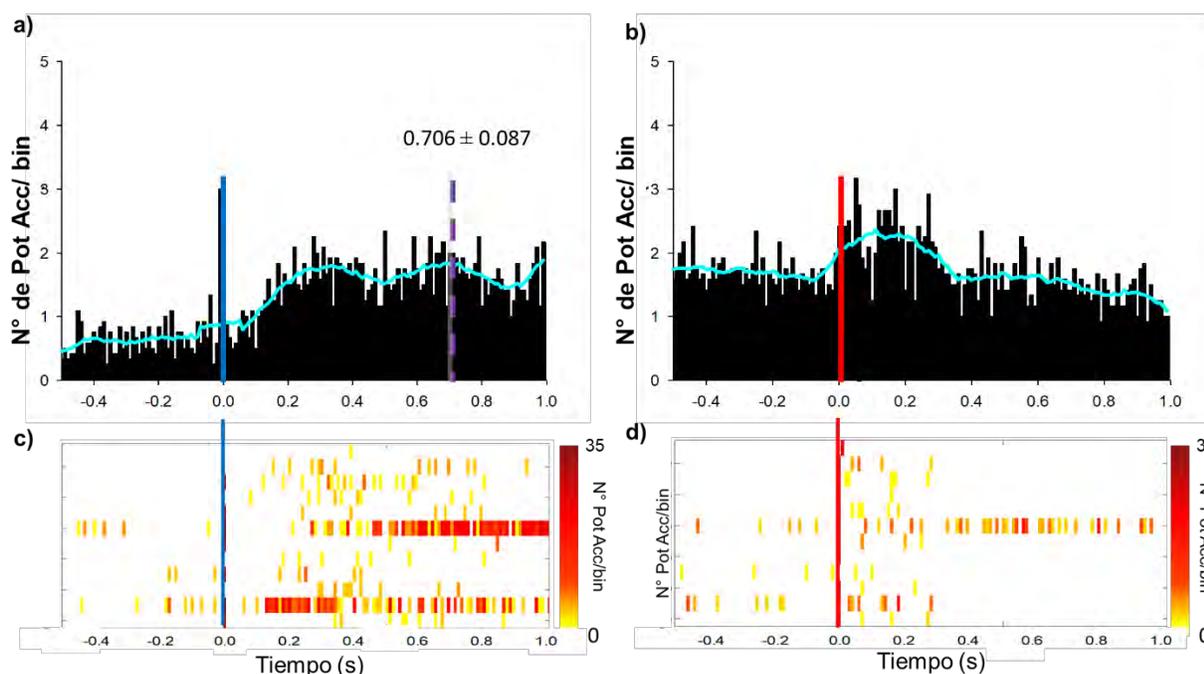


Figura 20: Actividad de las neuronas tipo 3, a y b) histogramas perievento promedio de la actividad de las neuronas tipo 3 sincronizados con la luz y el palanqueo, respectivamente. El histograma fue realizado promediando la actividad de todas las neuronas tipo 3, tomando ventanas de tiempo de 0.5 s previos al evento y 1.0 s después, utilizando bins de 0.01s; la línea morada punteada representa el promedio del tiempo de reacción obtenidos en los respectivos ensayos, y el área sombreada representa el error estándar del promedio del tiempo del tiempo de reacción; la línea acua representa el promedio de la actividad obtenida en estos histogramas. c y d) mapa de colores de la actividad individual de las 12 neuronas tipo 3 registradas obtenidos mediante su histograma perievento sincronizado con la luz (línea azul) o el palanqueo (línea roja), respectivamente. El mapa de color se obtuvo mediante los histogramas perievento de cada neurona tipo 3, restando el promedio de la actividad basal (0.5 s previos al evento) a la actividad posterior al evento (1.0 s posterior al evento); la gama de color representa en amarillo la actividad más baja (1 potencial de acción) en rojo obscuro la actividad más alta (35 potenciales de acción para los histogramas con luz y palanca).

Dentro de la clasificación de neuronas tipo 4, encontramos 2 neuronas cuya actividad no cambia posterior al encendido de la luz (Figura 21a y c) ni con el palaqueo (Figura 21b y d)

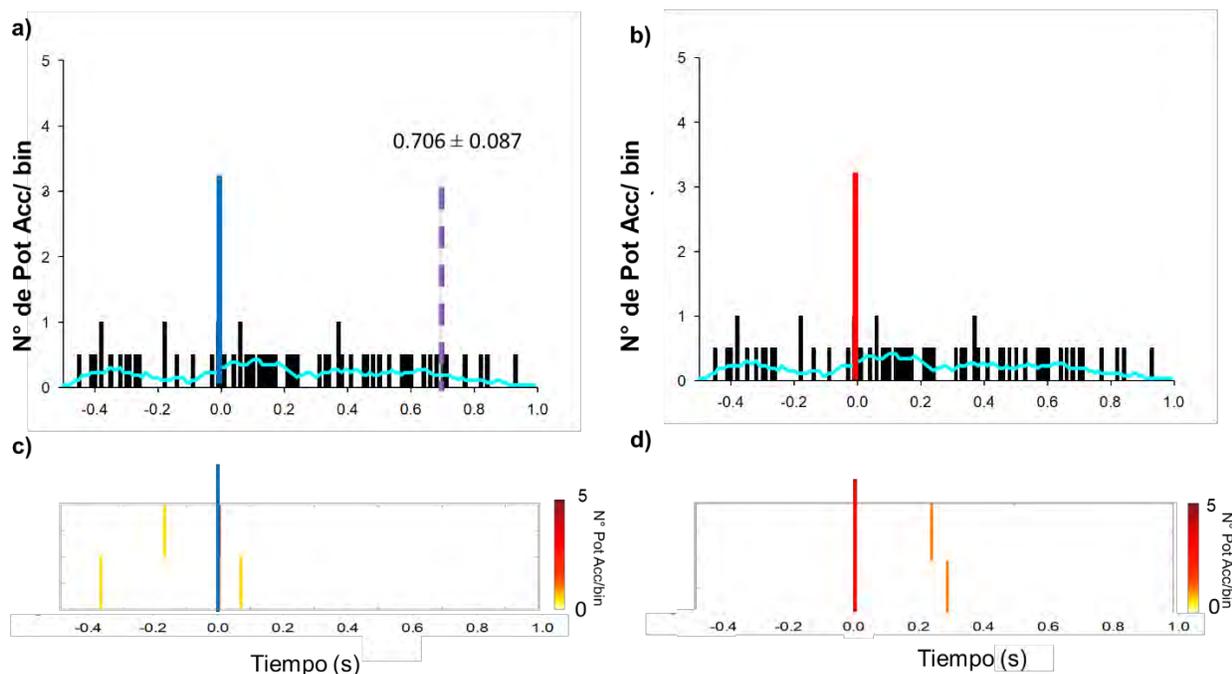


Figura 21: Actividad de las neuronas tipo 4, a y b) histogramas perievento promedio de la actividad de las neuronas no relacionadas sincronizados con la luz y el palaqueo, respectivamente. El histograma fue realizado promediando la actividad de todas las neuronas tipo 4, tomando ventanas de tiempo de 0.5 s previos al evento y 1.0 s después, utilizando bins de 0.01s; la línea morada punteada representa el promedio del tiempo de reacción obtenidos en los respectivos ensayos y el área sombrada representa el error estándar del promedio del tiempo del tiempo de reacción; la línea acua representa el promedio de la actividad obtenida en estos histogramas. c y d) mapa de colores de la actividad individual de las 2 neuronas tipo 4 registradas obtenidos mediante su histograma perievento sincronizado con la luz (línea azul) o el palaqueo (línea roja), respectivamente. El mapa de color se obtuvo del histograma perievento de cada neurona tipo 4, restando el promedio de la actividad basal (0.5 s previos al evento) a la actividad posterior al evento (1.0 s posterior al evento); la gama de color representa en amarillo la actividad más baja (1 potencial de acción) en rojo oscuro la actividad más alta (5 potenciales de acción para los histogramas con luz y palanca)

10. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Mediante aproximaciones sucesivas y el uso de una restricción aguda de agua en el presente trabajo generamos un modelo experimental aunado a un sistema de condicionamiento operante que permite que ratas de 3 meses de edad ejecuten un movimiento (presión de la palanca) con la cabeza fija. El desarrollo del paradigma toma 25 sesiones de entrenamiento de una hora diaria, 3 de la primera fase (ver Figura 3) y 22 de la segunda (ver Figura 5, 6 y 7) para aprender y perfeccionar el movimiento en libre movimiento sin comprometer las condiciones fisiológicas de los animales, además mostramos que durante toda la sesión de entrenamiento el desempeño de los animales es estable (ver Figura 8f) proporcionando el tiempo y las condiciones para realizar los registros yuxtacelulares.

Posteriormente mostramos que aprender la condición de semi-restricción (cabeza fija) a los animales les toma en promedio 10 sesiones, al final de las cuales, los animales ejecutan el paradigma de la primera fase (ver Figura 11) con el mismo desempeño que en libre movimiento. Asimismo, lleva 9 sesiones para que los animales ejecuten las condiciones de la segunda fase (ver Figura 12), y aunque solo lo hacen con una eficiencia máxima del 40%, el movimiento se ejecuta con la misma precisión que en condiciones de libre movimiento (ver Figura 13a y b y Figura 14).

Con los animales ya entrenados, y el manejo aséptico que se usó en la ventana crónica, logramos realizar registros yuxtacelulares al menos durante 6 sesiones diferentes de 60 min diarios en cada uno de los animales, de las cuales se obtuvieron 23 registros y dos marcajes yuxtacelulares neuronales a distintas profundidades de la corteza sensoriomotora que van desde 1000 a 2000 micras, los cuales fueron analizados mediante histogramas perievento. Finalmente, con base en los histogramas perievento, se obtuvieron 4 clasificaciones neuronales, las tipo 1 relacionadas con la presencia de luz (n=8) (ver Figura 18), las tipo dos relacionadas con el palanqueo (n=1) (ver Figura 19), las tipo 3 relacionadas con ambos eventos (n=12) (ver Figura 20) y las no relacionadas con los anteriores (n=2) (ver Figura 21).

Un sistema de condicionamiento que permite realizar registro yuxtacelulares en ratas, mientras ejecutan un movimiento con la condición de cabeza fija, representa una buena alternativa para el estudio de la dinámica de los circuitos neuronales involucrados en las distintas fases de un movimiento. Considerando que la rata es un animal estándar de laboratorio, genéticamente menos variable, los datos obtenidos pueden tener una alta reproducibilidad y precisión, por lo que se pueden analizar procesos celulares, subcelulares y moleculares relacionados con los procesos sensoriomotores en una escala espaciotemporal precisa (Cornelius et al., 2010). Los estímulos sensoriales (visuales, táctiles o auditivos) para condicionar un movimiento se pueden presentar al sujeto de una manera espacialmente diferente y las respuestas o movimientos pueden ser monitoreados completamente con una alta velocidad (Kimura et al., 2012).

Implementar sistemas operantes implica establecer criterios claros en la selección de la edad de los animales, los tiempos en los que se presentan los periodos inter-ensayo, el orden en que se presentaran los elementos de la tarea para generar un condicionamiento y el tipo reforzamiento que debe implementarse para regular el éxito o fracaso del mismo. Algunos de los pocos grupos que ha logrado estandarizar este tipo de condicionamiento en condiciones cabeza fija, han utilizado agua como reforzador (Kimura et al., 2012; Cornelius et al., 2010), sacarina al 0.1% (Isomura et al., 2009) y sacarosa entre 8 al 10% (Murphy et al., 2016) como reforzadores. En el presente trabajo se analizaron dos parámetros de restricción aguda o crónica y el esquema de reforzamiento sin privación, en el cual se administraba solo agua con sacarosa al 8% durante la tarea.

En el esquema de reforzamiento de agua con sacarosa al 8%, nuestros animales mostraron una baja eficiencia al efectuar la conducta (número de palanqueos y porcentaje de palanqueos correctos) en comparación con los otros sistemas de reforzamiento (ver Figura 1). Diversos estudios sobre el valor hedónico de diferentes carbohidratos, como la sacarosa para condicionar operantes, muestran que concentraciones del 8% aumentan la frecuencia de una conducta, y concentraciones de más de 32% la disminuye (Sclafani y Ackroff, 2015). Además, muestran que el valor calórico de la sacarosa provoca que el desempeño conductual de la tarea sea más eficiente dentro de los primeros 10 min de las sesiones y posteriormente se alcanza la saciedad (Sclafani y Ackroff, 2015). A pesar de que no contamos con una medida de consumo de alimento diario en nuestros animales,

los datos mostrados por Sclafani y Ackroff (2015) sobre la saciedad calórica usando un reforzamiento de sacarosa al 8% podrían explicar por qué nuestro grupo con sacarosa al 8%, efectúan un mínimo de conductas para obtener el reforzador (ver Figura 1), quizá esa frecuencia menor de conductas sea suficiente para que lleguen a la saciedad calórica.

A pesar de que los datos muestran que en la segunda fase el desempeño del sistema de reforzamiento crónico y agudo es similar (ver Figura 1b). Al analizar los datos de peso y consumo de agua (ver Figura 2), observamos que la restricción crónica fue demasiado severa para la edad de nuestros animales, causando una pérdida de peso importante a lo largo de las diferentes sesiones que podía reflejarse como desnutrición. En condiciones normales de laboratorio, se ha observado que las ratas toleran una restricción del 61% del volumen de consumo normal diario de agua que para animales adultos oscila entre 20 a 30 ml diarios, lo cual reduce su peso a un nivel estable en torno al 90%. Si el volumen de ingesta cae por debajo del 36% del peso corporal y no se estabiliza, puede alcanzar niveles críticos (Collier y Dnarr 1966), tal cual fue observado en nuestro grupo de restricción crónica (ver Figura 2).

La selección final del esquema de reforzamiento de restricción aguda se dio tanto por los parámetros fisiológicos y conductuales observados con los otros reforzadores, como por el desempeño de los animales bajo restricción aguda en la primera fase (ver Figura 1a) y en la segunda (ver Figura 1b).

De acuerdo con los datos obtenidos en la segunda fase de condicionamiento, los animales aprenden la asociación de luz, palanqueo y suministro del reforzador en la 5ta sesión (ver Figura 6). Sin embargo, para que los animales ejecuten el movimiento de manera más eficiente, es necesario que dicho movimiento sea entrenado durante más tiempo, lo cual se refleja en el aumento del porcentaje de palanqueos correctos (ver Figura 5) y la disminución en el tiempo de reacción en el resto de las sesiones (ver Figura 7). En algunas tareas operantes, el aprendizaje motor implica una mejoría en la velocidad, precisión o consistencia de un movimiento con entrenamiento; esto está precedido por entrenamiento perceptivo (para distinguir entre señales) y aprendizaje de la asociación sensoriomotora (para vincular el estímulo) a la salida de comportamiento adecuado, lo que implica que en estas tareas estén involucrados diferentes circuitos para la modulación conductual (Makino et al., 2016). A nivel de sistemas, el aprendizaje motor puede causar cambios en el lugar

de acción de los circuitos corticales a subcorticales. Las células piramidales en corteza, se optimizan, produciendo conexiones sinápticas y cambios en las entradas excitadoras cortico-corticales y talamo-corticales, además se genera una plasticidad en las interneuronas locales (Papale y Hooks, 2018). Se ha propuesto que, durante el aprendizaje motor, los microcircuitos de M1 se autoorganizan para integrar varios tipos de señales relacionadas con la planificación motriz y la retroalimentación sensorial en las salidas motoras (Thoroughman y Shadmehr, 2000; Scott, 2012). Esta autoorganización podría estar implicada en la ejecución correcta del operante, llevando más tiempo que la asociación con la ejecución de la tarea bajo la presencia de luz.

Finalmente mostramos que, a diferencia del reforzamiento crónico, el agudo permite mantener un nivel óptimo en el consumo de agua diario en los animales aproximado de 19 a 20 ml al final de la segunda etapa, lo que se refleja en un mantenimiento del 80% en el peso (ver Figura 4 y 9). En este sentido, Cornelius et al. (2010), enfatizan que, para un entrenamiento conductual, basta con que el acceso al agua se controle de forma que los animales obtengan suficiente volumen de agua durante las sesiones de entrenamiento diarias, por lo que proporcionar una hora libre de acceso a agua posterior, garantiza que el consumo diario se mantenga al 100% del que tendrían en condiciones fisiológicas normales el cual, oscila entre 20 a 30 ml diarios en animales de 250 a 300g (Collier y Dnarr 1966).

El diseño de la placa de fijación para la cabeza es esencial para asegurar el soporte y la comodidad postural de los animales al ejecutar la respuesta operante. Nuestro sistema, además de tener las medidas adecuadas para realizar la ventana crónica y la estabilidad para realizar los registros, debido a su tamaño pequeño permite que los animales se mantengan en mejores condiciones y reduce las lesiones que puedan causarse por el movimiento dentro de su caja habitación. Considerando que la conducta de un organismo está determinada por los eventos que preceden o acompañan a la conducta, por los eventos ambientales que cambian como consecuencia de la conducta y por la experiencia previa del organismo con el medio ambiente (Reynolds, 1968), es importante mantener a los animales cómodos y libres de estrés tanto en sus cajas habitación como en el ambiente que efectúan la conducta.

La fase 3 del sistema de condicionamiento, representa una transición esencial para la habituación de los animales a la nueva condición de mantener la cabeza fija. En este sentido, Cornelius et al., (2010) mostraron la efectividad de presentar la condición semi-restricción mediante aproximaciones graduadas repetidas de aspectos individuales de la situación final, que equilibren la ansiedad por la obtención del líquido con la presencia gradual de los estímulos. Esto se logra mediante la administración de recompensa con cada aproximación. Así, diseñamos en el presente trabajo las aproximaciones presentadas durante las 9 sesiones en promedio que le tomó a los animales asociar las condiciones de semi-restricción con la ejecución de la tarea en condiciones similares a la fase 1 (ver Figura 11), dejando que los animales aprendieran a un ritmo individual hasta sentirse cómodos con la restricción de movimiento.

Cornelius et al., (2010) también menciona que el estrés y la aversión son efectos no deseados comunes en condicionamientos ligados a la posición de cabeza fija que, al menos, conducirán a períodos de entrenamiento prolongados necesarios para condicionar a los animales incluso en tareas simples. Además, mantener a los roedores bajo condiciones de inmovilidad de la cabeza en un espacio abierto es experimentado por el animal como una posición expuesta y amenazante que genera estrés, por lo que el desempeño de la conducta disminuye (Cornelius et al., 2010). Sin duda, el bajo desempeño mostrado por nuestros animales en la etapa 4 (ver Figura 12) es reflejo del estrés y la aversión propios del sistema de semi-restricción. A pesar de que con las aproximaciones sucesivas habíamos logrado disminuir esta condición, la presencia de periodos entre el encendido de luz, durante los cuales los animales no pueden realizar ningún movimiento a diferencia de la fase 3 (pueden presionar la palanca sin restricción) podría estar generando una sensación mayor de vulnerabilidad y estrés, debido a que se encuentran expuestos a un espacio abierto sin la posibilidad de moverse o huir, provocando que el instinto de supervivencia de estos animales sea más fuerte que la necesidad por obtener el reforzador. Además, las variaciones de la eficiencia observadas al analizar el número de aciertos (ver Figura 13 a) donde mostramos que los animales si pueden llegar a efectuar sesiones con un 80% de eficiencia y los datos obtenidos al compararlos con libre movimiento (Figura 13 b) muestran que efectivamente son capaces de efectuar la respuesta de manera correcta siempre y cuando esta competencia entre supervivencia y reforzador se incline a favor de

la recompensa. Del mismo modo, mostramos que el movimiento ejecutado mientras los animales están fijos de la cabeza se ejecuta de la misma manera que en libre movimiento, ya que los tiempos de reacción (ver Figura 13b) son iguales.

Se ha considerado que el tiempo de reacción puede reflejar la ruta mas corta de procesamiento de información desde la percepción de un estímulo hasta la respuesta conductual, lo que permite definir al sustrato neuronal que subyace esta respuesta. De esta manera, el tiempo de reacción podría considerarse un comportamiento único que engloba un sustrato neuronal particular y que esta medida es sensible para el inicio del movimiento (Blokland, 1998). Durante el periodo del tiempo de reacción, se llevan a cabo una serie de procesos que permiten al cerebro percibir el medio ambiente circundante, identificar un particular objeto de interés, determinar la acción requerida en respuesta a ese objeto, y emitir un comando motor para implementar la acción deseada; abarcando claramente dominios de percepción y movimiento (Wong et al., 2015).

Actualmente se han implementado diversas técnicas para el estudio de la morfología y fisiología neuronal in vivo durante el desempeño de conductas particulares. A nivel celular, se han usado técnicas de imagen no invasivas en roedores para la visualización y análisis de la función celular basada en la actividad de calcio con microscopia de dos fotones o basada en fluorescencia combinada con microscopia confocal (Kerr y Denk, 2008).

La técnica de dos fotones ha tomado auge recientemente para analizar la actividad de calcio neuronal in vivo, sin embargo, la profundidad alcanzable todavía está limitada a aproximadamente 1000 μ m (Kerr y Denk 2008); considerando que las neuronas piramidales corticales en las capas infragranulares proporcionan la salida mayor de la corteza y, por lo tanto, es probable que sean moduladores importantes de los procesos sensoriales y motores (Hattox y Nelson, 2007). Además, el análisis de la actividad de calcio muestra una resolución temporal limitada para analizar estas capas más profundas de la corteza sensoriomotora. En este sentido, estudios con animales transgénicos que expresan GCaMP3 (indicador de la actividad de calcio) (Issa et al., 2014; Marshel et al., 2011), donde se evalúa la actividad de calcio en zonas corticales involucradas con la percepción de estímulos sensoriales, no demostraron la resolución temporal que se necesitan para analizar la actividad en la escala de tiempo de percepción y comportamiento (Wekselblatt et al., 2016).

Por otra parte, la microscopía confocal puede proporcionar información selectiva de una porción de la muestra con una alta resolución espacial (Kerr y Denk, 2008) utilizada para analizar la morfología celular; sin embargo, para alcanzar regiones profundas del cerebro se requiere de especímenes transparentes y acceso lateral al tejido, cosa que no está disponible en el cerebro in vivo (Kerr y Denk, 2008) por lo que esta técnica se limita al estudio de tejido in vitro.

Del mismo modo, se han utilizado técnicas de electrofisiología extracelulares mediante el registro del disparo de poblaciones neuronales usando multielectrodos como los “Silicon probes” para analizar el procesamiento sensoriomotor, la navegación, la emoción y la memoria, durante periodos largos de tiempo y con alta calidad (Okun et al., 2016). Sin embargo, estas técnicas se limitan a la obtención de datos fisiológicos y no morfológicos, así mismo se han utilizado registros intracelulares o patch clamp en su configuración de célula completa in vivo (Brecht et al., 2004; Lee et al., 2006; Harvey et al., 2009;), que permiten analizar actividad neuronal y la morfología incluso en animales en libre movimiento (Lee et al., 2006), sin embargo, el mantenimiento y la estabilidad de los registros es aún limitada.

Otra de las alternativas utilizadas ha sido el registro yuxtacelular (De Kock y Sakmann, 2007; Houweling y Brecht, 2008; Isomura et al., 2009) que tiene como principal ventaja permitir la electroporación de biocitina para el marcaje celular, generando una opción para identificar y reconstruir células post hoc para vincular la función (fisiología) con la estructura (morfología) (Narayanan et al., 2014). Típicamente, la reconstrucción morfológica de las neuronas implica la reconstrucción de la morfología dendrítica y axonal que puede ser extendido a la cuantificación de las densidades de las espinas dendríticas, botones sinápticos, o incluso la reconstrucción de la morfología neuronal a una resolución nanométrica (Narayanan et al., 2014). Esta técnica se puede utilizar para el registro in vivo de diversos tipos de células a través de capas corticales o subcorticales en una gran variedad de especies, aunque la mayoría de los estudios han aplicado la técnica en pequeños roedores como ratones o ratas (De Kock et al., 2007; Houweling y Brecht, 2007; Isomura et al., 2009) Los registros yuxtacelulares son relativamente estables y pueden, ser aplicados en animales anestesiados (Sakata y Harris, 2009; De Kock y Sakmann, 2007) y despiertos con la cabeza fija (De Kock et al., 2007), o incluso animales en libre movimiento

(Herfst et al., 2011), proporcionando una herramienta versátil para responder diversas preguntas sobre la actividad neuronal bajo diversas condiciones.

En el presente trabajo logramos obtener la estabilidad de registro y el marcaje propios de esta técnica en animales despiertos con la cabeza fija mientras los animales ejecutaban un movimiento lo cual, permitirá estudiar a nivel neuronal, la dinámica de la regulación de dicho movimiento, mientras se obtienen datos morfológicos que permitan establecer poblaciones neuronales que modulan dicha actividad del movimiento.

Una de las principales preocupaciones dentro del presente trabajo, era lograr la estabilidad mecánica para el marcaje neuronal, a pesar de los movimientos propios del cerebro que surgen en animales despiertos, sin embargo, como otros autores (Lee et al., 2006) logramos estabilizar los registros utilizando agar al 4% en la ventana crónica durante toda la sesión. Del mismo modo, logramos realizar al menos 6 sesiones de registro en cada uno de nuestros animales, manteniendo siempre las condiciones asépticas requeridas para evitar daños y amenazas fisiológicas. Esto proporciona una ventaja al disminuir el uso de animales y aumentar el número de datos que pueden obtenerse durante los registros.

Diversos autores han mostrado que en roedores (Hyland, 1998; Laubach, 2000; Isomura et al., 2009) las neuronas de la corteza motora se activan o inactivan antes y durante la expresión del movimiento. Esto implica que, existe activación temporal neuronal diferencial que podría corresponder a fases secuenciales del movimiento voluntario individual, como la preparación motora, la iniciación, la ejecución y la terminación (Isomura et al., 2009) del movimiento. En este sentido, en el presente trabajo analizamos la actividad neuronal con base a dos eventos, el primero relacionado con la presencia del estímulo de luz el cual, era indicativo de que debía efectuarse el palanqueo (previo al movimiento) y la segunda relacionada con la presencia del movimiento, esto nos permitió clasificar la actividad neuronal en 4 tipos, uno relacionado a la presencia de luz, uno relacionado con el palanqueo, otro relacionado con ambos eventos y uno donde la actividad neuronal no está relacionado.

Isomura et al., (2009) mostraron que neuronas piramidales relacionadas con la actividad preparatoria o previa al movimiento, muestran un aumento gradual de la actividad durante el estado in móvil (antes de efectuar el movimiento), asimismo mostró que esta actividad previa al movimiento que podría estar involucrada en la iniciación motora, era fásica,

precedía al inicio del movimiento y se reducía rápidamente durante la expresión del movimiento. Acorde a esta descripción, nosotros podríamos decir que las neuronas cuya actividad estaba más relacionada con la presencia de luz (ver Figura 17) podrían ser de tipo preparatorias, ya que su actividad máxima es justo antes de que inicie el movimiento y decae al inicio de este.

Del mismo modo, otros autores mencionan que el nivel de activación durante la preparación esta correlacionado con la rapidez con que el animal responde a una señal para iniciar la acción (Lecas et al., 1986; Riehle y Requin., 1993) y que predice los tiempos de reacción (Riehle y Requin , 1993; Churchland et al., 2006). Así mismo mencionan que la planificación motora se refiere coloquialmente a cualquier proceso relacionado con la preparación de un movimiento que ocurre durante el tiempo de reacción antes del inicio del movimiento y que involucra procesos que no son estrictamente relacionados con el motor, como la toma de decisiones sobre la identidad de los estímulos relevantes para la tarea en el entorno (Wong et al., 2015), esta actividad previa sin duda es lo que mostramos con las neuronas cuya activación se ve relacionada justo con el estímulo de luz que da la pauta para el inicio del movimiento (ver Figura 17) justo antes del promedio del tiempo de reacción.

Isomura et al, (2009), encontraron que las neuronas cuya actividad estaba relacionada con el movimiento muestran una depresión tónica en la actividad y un disparo constante durante la expresión del movimiento. Esto podría contribuir a la ejecución motora y / o la retroalimentación somatosensorial; de acuerdo con nuestros resultados, la neurona relacionada con el movimiento de presión de la palanca, muestra este patrón de disparo, ya que a pesar de que sufre un aumento en la actividad posterior al palanqueo en más de dos puntos, la actividad se muestra de manera constante.

En cuanto a la clasificación de neuronas tipo 3 que participan en ambos eventos sabemos que aún existen limitantes en el análisis de la señal que no permiten realmente discriminar si están relacionadas o no con la presión de la palanca. Una de estas limitantes gira alrededor del periodo de inicio y final del movimiento, si bien conocemos en tiempo real cuando el animal presiona totalmente la palanca y el periodo promedio de respuesta de cada animal durante la conducta (tiempos de reacción), no se conocemos el punto exacto donde el animal comienza a mover la extremidad anterior para presionar la palanca y

cuando deja de presionarla, por lo que es necesario en un futuro implementar un método que permita seguir la trayectoria de la extremidad anterior desde que comienza hasta que termina el movimiento de presión de la palanca y con ello definir de manera puntual las ventanas temporales para la clasificación.

Los datos obtenidos a partir de los registros en la corteza sensoriomotora con el método de análisis utilizado indican que existe un mayor número de neuronas involucradas con la fase previa al movimiento relacionada al estímulo de luz la cual, podría ser del tipo preparatorio (ver Figura 17), que las involucradas con la fase del palanqueo (ver Figura 18). Se ha mostrado anteriormente que la actividad preparatoria está presente de manera notoria en la corteza premotora dorsal (PMd), la corteza motora primaria (M1) (Riehle y Requin, 1989; Isomura et al,2009), la corteza motora lateral (ALM) y otras estructuras subcorticales como el estriado, los colículos superiores, tálamo y cerebelo. (Li et al., 2015; Chen et al.,2017; Svoboda y Li ,2017).

Dada la posición de la ventana crónica, podemos especular que los registros obtenidos en el presente trabajo a distintas profundidades de la corteza se efectuaron en zonas cuyas poblaciones neuronales están más implicadas con esta fase de preparación y modulación sensorial previa al movimiento. Por ello, una de las medidas a tomar en futuros trabajos será identificar la zona de registro de manera más puntual.

Finalmente, en el presente trabajo definimos parámetros de condicionamiento operante y un sistema de semi-restricción que nos permitieron realizar marcajes y registros yuxtacelulares durante la ejecución de movimientos, los cuales en conjunto una vez logremos obtener seguimiento completo del movimiento pueden ser utilizados para identificar diferentes parámetros de la regulación secuencial del movimiento; parámetros como la organización temporal, patrones fisiológicos de activación y morfología.

Una de las perspectivas que buscamos dentro de nuestro laboratorio es utilizar todos los parámetros de este trabajo, para identificar el papel de neuronas de la capa 5 que proyectan al tracto corticoespinal durante la ejecución de un movimiento.

Distintos trabajos han mostrado la existencia de proyecciones axónicas de M1, S1 y áreas premotoras que contactan con distintas regiones de la médula espinal (Bareyre et al., 2002; Asante y Martin, 2013; Olivares et al.,2017) y que los circuitos corticoespinales (CS) regulan directamente la actividad motriz a través de las vías motoras CS, por lo que pueden

afectar indirectamente el control motor mediante la modulación de información sensorial durante la ejecución de movimientos (Moreno et al., 2016). Asimismo, se ha mostrado mediante registros yuxtacelulares que algunas de las neuronas que regulan actividad previa al movimiento en M1 envían proyecciones axónicas a las estructuras subcorticales, por lo que es posible que estas neuronas sean importantes para la integración intracortical y córtico-subcortical de la información motora para coordinar las fases secuenciales del movimiento (Isomura et al., 2009).

11. CONCLUSIONES

- El sistema operante usado en el presente trabajo permite entrenar animales de 10 a 12 semanas de vida, bajo condiciones de semi-restricción (cabeza fija) para ejecutar un movimiento (presión de la palanca); movimiento que se realiza con la misma precisión que en libre movimiento.
- El diseño de la placa para mantener la cabeza fija aunado al condicionamiento, permite la ejecución de un movimiento preciso de presión de palanca mientras se realizan registros y marcaje de tipo yuxtacelular a distintas profundidades de la corteza sensoriomotora, proporcionando una herramienta para evaluar la actividad neuronal antes y durante la ejecución de un movimiento.
- El diseño del condicionamiento operante permite analizar la actividad obtenida en los registros yuxtacelulares mediante histogramas perievento de acuerdo a estímulos particulares, mostrando que a lo largo de la corteza sensoriomotora existen 4 tipos de neuronas, las relacionadas con la luz, relacionadas con el palanqueo, relacionadas con ambos eventos y las no relacionadas.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abernethy B., Kippers V., Hanrahan S., Pandy M., McManus A., Mackinnon L. (2013). The biophysical foundations of human movement 3er edición. Human Kinetics. 219-243.
- Amaral G., Peter L., Strick. (2013). The Organization of the central nervous system. In Principles of neuroscience. Kandel R., 5ta edition. NY: Mc Graw Hill. 337-356.
- Asante C.O., Martin J.H. (2013). Differential Joint-Specific Corticospinal Tract Projections within the Cervical Enlargement. PLoS ONE 8(9): e74454.
- Bareyre F. M., Haudenschild B., Schwab M.E. (2002). Long-lasting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord. Journal Neuroscience, 22:7097-7110.
- Bermejo R., Harvey M., Gao P., Zeigler H. P. (1996). Conditioned whisking in the rat. Somatosensory and Motor Research, 13, 225–233.
- Bermejo R., Houben D., Zeigler H.P. (1998). Optoelectronic monitoring of individual whisker movements in rats. Journal Neurosciences Methods, 83:89–96.
- Brecht, M., Krauss A., Muhammad S., Sinai-Esfahani L., Bellanca S., Margrie TW. (2004). Organization of rat vibrissa motor cortex and adjacent areas according to cytoarchitectonics, microstimulation and intracellular stimulation of identified cells. Journal Comparative Neurology, 479, 360–373.
- Blokland A. (1998). Reaction time responding in rats. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, Vol. 22, No. 6, 847–864.
- Borde M., Curtí, S. V., Rivero C. (2004). Modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Una intención con dos resultados. Revista de Neurología. 38 (3), 253-260.
- Carles S., Guillazo G., Redolar D., Torras M., Vale A. (2007). Fundamentos de Neurociencia Primera ed. Editoria UOC. pp149.
- Cauli, B., Etienne A., Bertrand L., Angulo M., Ropert N., Tsuzuki K., Hestrin S., Rossier J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. Journal Neuroscience. 17, 3894–3906.
- Chen T., Li N., Daie K., Svoboda K. (2017). Map of Anticipatory Activity in Mouse Motor Cortex. Neuron. May 17. 94, 866–879.

- Cho R. H., Segawa S., Mizuno A., Kaneko T. (2004). Intracellularly labeled pyramidal neurons in the cortical areas projecting to the spinal cord. I. Electrophysiological properties of pyramidal neurons. *Neuroscience Research*, 50, 381–394.
- Cho, R.-H., Satoko S., Keiko O., Akio M., Takeshi K. (2004). Intracellularly labeled pyramidal neurons in the cortical areas projecting to the spinal cord. II. Intra- and juxta-columnar projection of pyramidal neurons to corticospinal neurons. *Neuroscience Research*, 50, 395–410.
- Collier G, Dnarr F. (1966). Defense of water balance in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 61:5–10.
- Correa M. (2007). Neuroanatomía funcional de los aprendizajes implícitos: asociativos, motores y de hábitos. *Revista de Neurología*, 44(4), 234-242.
- Cornelius S., Harald H.O., Sergejus B., Florent H., Maik C., Todor V., Caroline G., Christian W. 2010. The head-fixed behaving rat—Procedures and pitfalls. *Somatosensory and Motor Research*, December, 27(4), 131–148.
- Cossio B., M., Gómez C. R., Vargas R. V., Rosalvo T. H, Arruda M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2151-2156.
- Churchland, M.M., Yu, B.M., Ryu, S. I., Santhanam, G., Shenoy, K.V. (2006). Neural variability in premotor cortex provides a signature of motor preparation. *Journal. Neuroscience*, 26, 3697–3712.
- Díaz E., De la Casa L., Ruiz G., Baeyens, F. (2004). Aprendizaje sabor-sabor en la adquisición de preferencias gustativas. *Psicológico*, 25, 135-146.
- De Kock, C. P. J., Bruno, R. M., Spors, H., Sakmann, B. (2007). Layer- and cell type-specific suprathreshold stimulus representation in rat primary somatosensory cortex. *Journal Physiology (London)*, 581, 139–154.
- Donoghue, J. P., Wise S. P. (1982). The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *Journal of Comparative Neurology* 212, 76–88.
- Dombeck D. A., Khabbaz A. N., Collman F., Adelman T. L., Tank D. W. (2007). Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron*, 56, 43–57.

- Figueroa C. M., Pérez H. I., Mejía Z. R. (2013). Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *REVISTA MVZ CÓRDOBA* • Volumen 18 Suplemento 2013
- Feldman (2014). *Psicología con aplicaciones a países de habla hispana*. Décima edición. México DF: Mc Graw Gill.
- Ferezou I., Haiss F., Gentet L. J., Aronoff R., Weber B., Petersen C. C. (2007). Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron*, 56,907–923.
- Gandolfo F., Li C., Benda B. J., Schioppa C. P., Bizzi E. (2000). Cortical correlates of learning in monkeys adapting to a new dynamical environment. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 97,2259-2263
- Graziano, MS., Aflalo T. N. (2007). Mapping behavioral repertoire onto the cortex. *Neuron* 56(2): 239-51.
- Greenberg D. S., Houweling A. R., Kerr J. N. (2008). Population imaging of ongoing neuronal activity in the visual cortex of awake rats. *Nature Neuroscience*, 11,749–751.
- Gowitzke B. (1999). *El cuerpo y sus movimientos*. Bases científicas 1er edición. Editorial Paidotribo. pp 50.
- Guo Z., Nuo L., Huber D., Ophir E., Gutnisky D., Ting T., Feng G., Svoboda K. (2014). Procedures for Behavioral Experiments in Head-Fixed Mice. *Plos ONE*. V9I2, e88678
- Haiss F, Schwarz C. (2005). Spatial segregation of different modes of movement control in the whisker representation of rat primary motor cortex. *Journal Neuroscience*, 25,1579–1587.
- Hallman L. E., Schofield B. R., Lin C. S. (1988). Dendritic morphology and axon collaterals of corticotectal, cortico-pontine and callosal neurons in layer V of the primari visual cortex of the hooded rat. *Journal of Comparative Neurology*, 272,149-160.
- Hattox A., Nelson S. (2007). Layer V Neurons in Mouse Cortex Projecting to Different Targets Have Distinct Physiological Properties. Department of Biology, Brandeis University, Waltham, Massachusetts. *Journal of Neurophysiology*, 98, 3330–3340.
- Harvey C. D., Collman F., Dombeck D. A., Tank D. W. (2009). Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation. *Nature*, 461,941–946.

- Harvey M. A., Bermejo R., Zeigler H. P. (2001). Discriminative whisking in the head-fixed rat: Optoelectronic monitoring during tactile detection and discrimination tasks. *Somatosensory and Motor Research*, 18, 211–222.
- Heck D. H, Thach W. T, Keating J. G. (2007). On-beam synchrony in the cerebellum as the mechanism for the timing and coordination of movement. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 104, 7658–7663.
- Hentschke H., Haiss F., Schwarz C. (2006). Central signals rapidly switch tactile processing in rat barrel cortex during whisker movements. *Cerebral Cortex*, 16, 1142–1156.
- Herfst L., Burgalossi., Haskic K., Tukker J., Schmidt., Brecht. (2012). Friction-based stabilization of juxtacellular recordings in freely moving rats. *Journal Neurophysiology* 108: 697–707, 2012.
- Houweling A. R., Brecht M. (2008). Behavioural report of single neuron stimulation in somatosensory cortex. *Nature*, 451, 65–68.
- Hyland B. (1998). Neural activity related to reaching and grasping in rostral and caudal regions of rat motor cortex. *Behavioural Brain Research*, 94, 255–269
- Issa J. B, Haeffele B. D, Agarwal A., Bergles D. E., Young E. D, Yue D.T. (2014). Multiscale optical Ca²⁺ imaging of tonal organization in mouse auditory cortex. *Neuron*, 83, 944–959.
- Isomura Y., Harukuni R., Takekawa T., Aizawa H., Fukai T. (2009). Microcircuitry coordination of cortical motor information in self-initiation of voluntary movements. *Nature Neuroscience*, 12, 1586–1593.
- Iwaniuk A. N., Whishaw I. Q. (2000). On the origin of skilled forelimb movements. *Trends Neuroscience*. Aug, 23(8), 372-6.
- Kasper E. M., Lübke J., Larkman A. U., Blakemore C. (1994). Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex III. Differential maturation of axon targeting, dendritic morphology and electrophysiological properties. *Journal of Comparative Neurology*, 339, 495-518.
- Kawai R., Markman T., Kampff. R., Olveczku P. (2015). Motor cortex is required for learning but not for executing a motor skill. *Neuron*, may 6 vol 86, 800-812.
- Kerr J.N., Denk W. (2008). Imaging in vivo: watching the brain in action. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 195-205.

- Kimura R., Saiki A., Fujiwara-Tsukamoto Y., Ohkubo F., Kitamura K., Matsuzaki M., Sakai Y., Isomura Y. (2012). Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *Journal Neurophysiology*, 108, 1781–1792.
- Larkman A., Mason A. (1990). Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex I. Establishment of cell classes. *Journal Neuroscience*, 10,1407-1414.
- Laubach M., Wessberg J., Nicolelis, M. A. L. (2000). Cortical ensemble activity increasingly predicts behaviour outcomes during learning of a motor task. *Nature*, 405, 567–571.
- Lee A., Manns I., Sakmann B., Brech M. (2006). Whole-Cell Recordings Neurotechnique in Freely Moving Rats. *Neuron* 51, 399–407.
- Lecas J. C., Requin J., Anger C., Vitton N. (1986). Changes in neuronal activity of the monkey precentral cortex during preparation for movement. *Journal Neurophysiology*, 56,1680-1702.
- Li N., Chen T., Guo Z., Gerfen Ch., Svoboda K. (2015). Amotor cortex circuit for motor planning and movement. *Nature*, March 5, vol 519.
- Luft, A. R., Buitrago, M. M. (2005). Stages of motor skill learning. *Molecular Neurobiology* 32: 205
- Makino H., Hwang E. J., Hedrick N.G., Komiyama T. (2016). Circuit Mechanisms of Sensorimotor Learning. *Neuron*, 92,705–721.
- Marshel J. H., Garrett M. E., Nauhaus I., Callaway E.M. (2011). Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron*, 72, 1040–1054.
- Meyer, P. J., Cogan, E. S., Robinson, T. E. (2014). The form of aconditioned stimulus can influence the degree to which it acquires incentive motivational properties. *PLoS ONE*, 9, e98163.
- Molnár Z., Cheung A. P. F. (2006). Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neuroscience Research*, 55,105-115.
- Moreno-López Y., Olivares-Moreno R., Cordero-Erausquin M., Rojas-Piloni G. (2016). Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Frontiers in Neuroanatomy*. 10:24. doi: 10.3389/fnana.2016.00024
- Murphy T., Boyd J., Bolaños F., Vanni M., Silasi G., Haupt D., LeDue J. (2016).High-throun automated home-cage mesoscopic functional imaging of mouse cortex. *Nature Communications*. DOI: 10.1038/ncomms11611.

- Myers D. G. (2003). *Psicología* 7ª edición. Medica Panamericana. Buenos Aires. Madrid. pp 323- 326.
- Nudo R.J., Frost S.B. (2009). 'The Evolution of motorcortex and motor systems, *Evolutionary Neuroscience*, ed. J. H. Kaas (Oxford: Academic Press), 727–756.
- Olivares-Moreno R., Moreno-López Y., Concha L., Martínez-Lorenzana G., Condés-Lara M., Cordero-Erausquin M., Rojas-Piloni G. (2017). The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Structure and Function*. Dec;222(9):3945-3958. doi: 10.1007/s00429-017-1447-6.
- Okun M., Lak A., Carandini M., Harris K. D. (2016). Long Term Recordings with Immobile Silicon Probes in the Mouse Cortex. *PLoS ONE* 11(3): e0151180. doi:10.1371/ journal.pone.0151180.
- Papale A. E., Hooks B. M. (2018). Circuit Changes in Motor Cortex During Motor Skill Learning. *Neuroscience*, 368, 283-297.
- Paxinos G., Watson C. (2004). *The rat brain in stereotaxic coordinates: the new coronal set*. 5ta edition. Elsevier Academic Press. CHN.
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *Journal Neuroscience Methods*, 65, 113–136.
- Rajeevan T., Narayanan, Hemanth M., Robin B., Roel de Haan, Anton W., Pieneman, Christiaan P.J., De Kock. (2014). Juxtosomal Biocytin Labeling to Study the Structure-function Relationship of Individual Cortical Neurons. *Journal of Visualized Experiments*, (84), e51359, doi:10.3791/51359.
- Ramaswamy S., Markram H. (2015). Anatomy and physiology of the thick-tufted layer 5 pyramidal neuron. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9,233.
- Reynolds G. S. (1968). *A primer of operant conditioning*. Universidad de California. San Diego.
- Riehle A., Requin J. (1993). The predictive value for performancespeed of preparatory changes in neural activity of the monkey motor and premotor cortex. *Behavior Brain Research*,53,35-49.

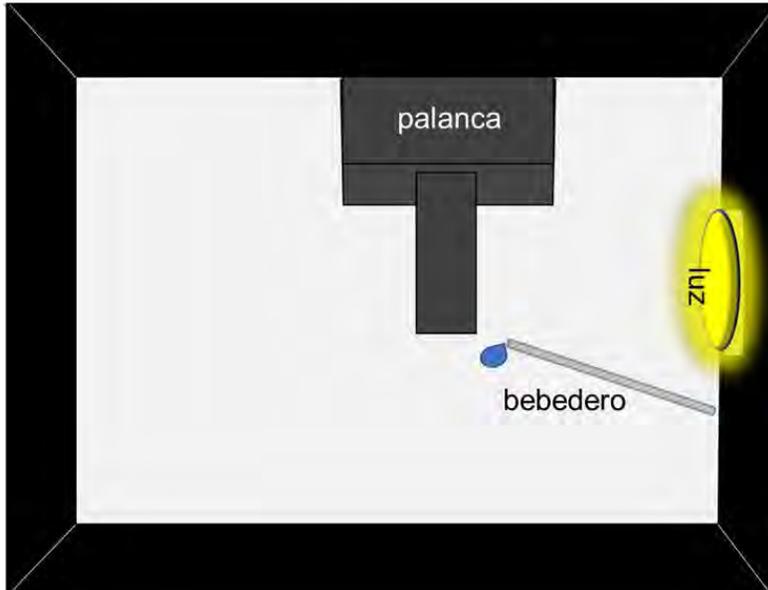
- Riehle, A., Requin, J. (1989). Monkey primary motor and premotor cortex: single-cell activity related to prior information about direction and extent of an intended movement. *Journal Neurophysiology*, 61, 534–549.
- Roca, A., Bruner, C. A. (2003). Efectos de la frecuencia de reforzamiento sobre el palanqueo por agua en ratas privadas de comida. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 29(2), 119-130.
- Rudomin, P. (1999). Presynaptic selection of afferent in flow in the spinal cord. *Journal the Physiology (Paris)*, 93, 329–347.
- Rudomin P. y Schmidt, R. F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp. Brain Research*, 129, 1–37.
- Sclafani A., Ackroff K. (2016). Operant licking for intragastric sugar infusions: differential reinforcing actions of glucose, sucrose and fructose in mice. *Physiology Behavior*, January 1, 153: 115–124.
- Seki K., Perlmutter, S. I., Fetz E. E. (2003). Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement. *Nature Neuroscience*, 6, 1309–1316.
- Shemuelof L., Krakeuer W., Mazzoni P. (2012). How is a motor skill learned? Change and invariance at the levels of task success and trajectory control. *Journal Neurophysiology*. Jul 15, 108(2): 578-594.
- Svoboda K., Li N. (2017). Neural mechanisms of movement planning: motor cortex and beyond. *Current Opinion in Neurobiology Elsevier*, November, 49,33–41.
- Scott, S.H. (2012). The computational and neural basis of voluntary motor control and planning. *Trends in Cognitive Sciences*, 16, 541–549.
- Scott S.H. (2016). A functional taxonomy of bottom-up sensory feedback processing for motor actions. *Trends Neurosciences*, 39, 512–526.
- Schmidt, R. A., Lee, T. D. (2005). *Motor control and learning: A behavioral emphasis*, 4th edición. Champaign, IL, US: Human Kinetics.
- Suter A. B., Shepherd G. M. (2015). Reciprocal interareal connections to corticospinal neurons in mouse M1 and S2. *Journal of Neurosciences*. February 18.35(7):2959-2974.
- Tanji J. (2001). Sequential Organization of Multiple Movements: Involvement of Cortical Motor Areas. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1):631-651

- Thoroughman K. A., Shadmehr R. (2000). Learning of action through adaptive combination of motor primitives. *Nature* 407, 742–747
- Weiler N., Wood L., Yu J., Solla SA., Shepherd G. M. (2008). Top-down laminar organization of the excitatory network in motor cortex. *Nature Neuroscience*, 11, 360–366.
- Welsh J. P, Lang E. J, Sugihara I., Lliná's R. (1995). Dynamic organization of motor control within the olivocerebellar system, *Nature* 374,453–457.
- Wekselblatt J., Flister E., Piscopo D., Niell C. (2016). Large-scale imaging of cortical dynamics during sensory perception and behavior. *Journal Neurophysiology* 115:2852-2866
- Wishaw I. Q., B. L. Coles (1996). Varieties of paw and digit movement during spontaneous food handling in rats: postures, bimanual coordination, preferences, and the effect of forelimb cortex lesions. *Behavior Brain Research*, 77(1-2), 135-48.
- Wishaw I. Q. (2005). Prehension. In: *The Behavior of the Laboratory Rat*, edited by Wishaw IQ, Kolb B. New York: Oxford Univ. Press, p. 162–170.
- Wishaw I. Q, Pellis S. M. (1990). The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. *Behavior Brain Research*, 41, 49–59, 1990.
- Wong L. A., Hauth M. A., Krakauer W. J. (2015). Motor planning. *The Neuroscientist*, 21(4), p 385–398

13. ANEXOS

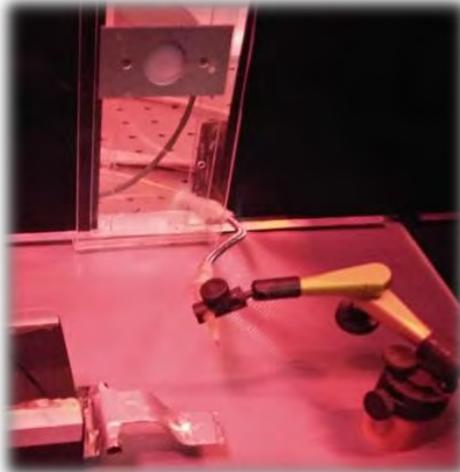
13.1 Anexo 1: Esquema de la caja de conducta

a)



Elementos	Distancia
luz - piso	13 cm
luz - pared de la caja	18 cm
luz - bebedero	5 cm
bebedero- piso	6 cm
bebedero palanca	0.5 cm
palanca - piso	1 cm
palanca- luz	12cm

b)



c)

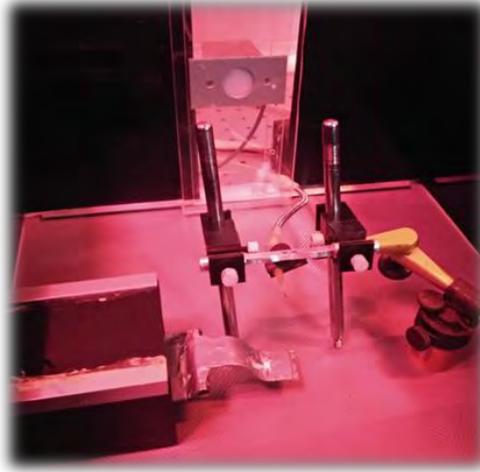


Figura 22. Caja de condicionamiento. a) muestra un esquema de la posición y las distancias de los elementos principales (luz, palanca y bebedero) que componen la caja de condicionamiento, b) fotografía de los elementos principales de la caja de conducta sin la estructura que sostiene la barra de semi-restricción (cabeza fija) y c) fotografía de los elementos principales de la caja de conducta con la estructura que sostiene la barra de semi-restricción (cabeza fija).

13.2 Anexo 2: Plano del de la placa de Head-Fixed

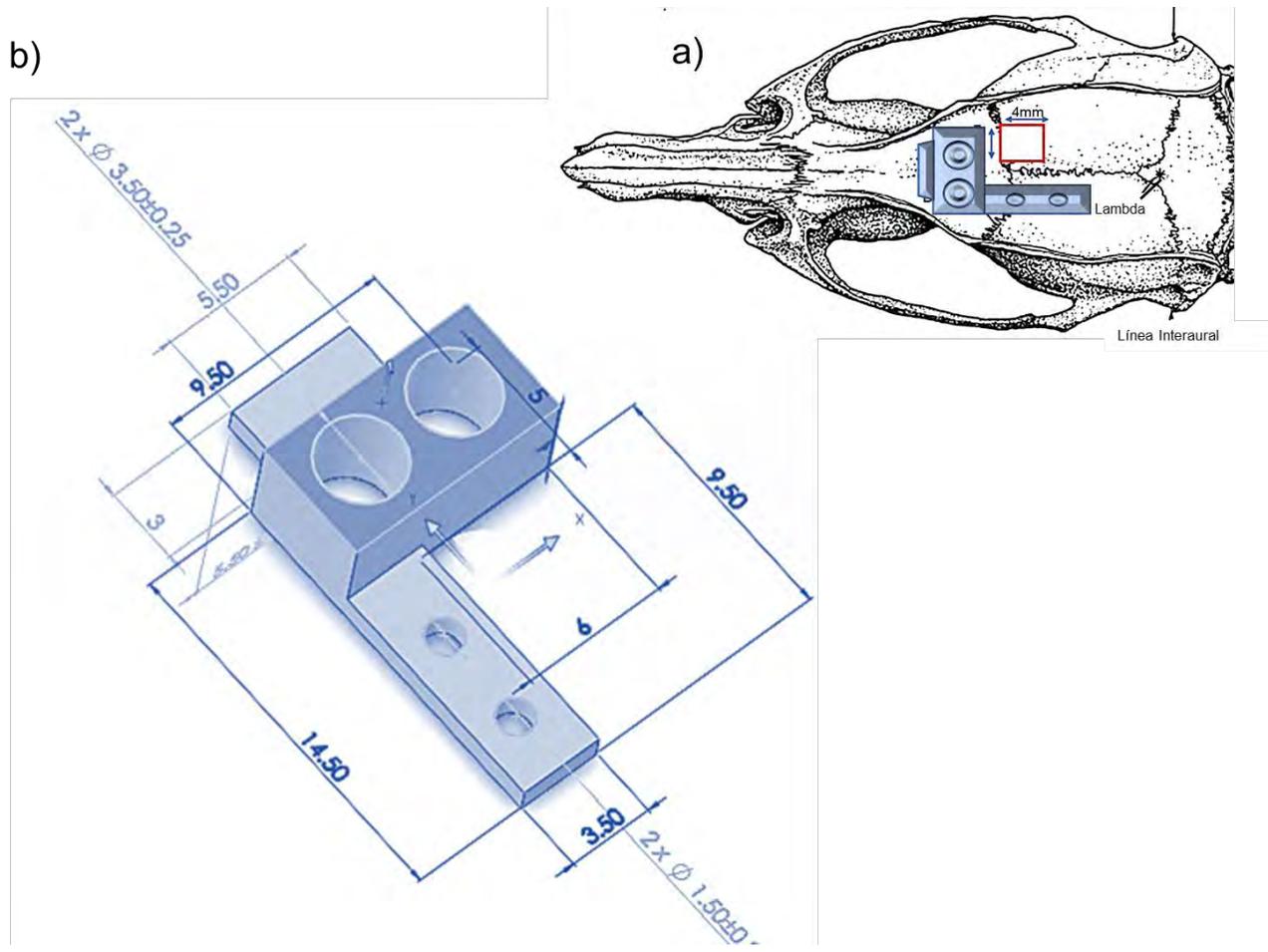


Figura 23. Plano de la placa de Head -fixed; a) se muestra la posición de la placa con respecto al cráneo de rata, en este, se puede observar que la placa permite respetar espacios de ubicación con referencias anatómicas y el espacio de la ventana crónica (rojo); b) muestra el plano con las medidas de la placa de Head-fixed.