



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

CONTROL DE LA ACTIVIDAD DEL GLOBO PÁLIDO
EXTERNO POR ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGIA

P R E S E N T A :

DIANA ITZEL ORTEGA ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice

I.	Título	
II.	Índice	
III.	Agradecimientos	
IV.	Resumen	
V.	Lista de abreviaturas	
1.	Introducción	1
2.	Ganglios basales	3
2.1.	Descripción anatómica y tipos celulares	3
2.2.	Modelos de la función de los ganglios basales	6
2.2.1.	Vigor y motivación del movimiento	7
3.	Globo pálido externo	9
3.1.	Tipos celulares y neuroquímica del GPe	9
3.2.	Función	11
3.3.	Patología	13
4.	Planteamiento del problema	14
5.	Hipótesis	15
6.	Objetivos	15
7.	Métodos	16
7.1.	Animales	16
7.2.	Procedimientos	16
7.2.1.	Inyección de trazadores y virus	16
7.2.2.	Registros electrofisiológicos en animal anestesiado	17

7.2.3. Estimulación optogenética	18
7.2.4. Implantación de fibras	19
7.2.5. Histología	19
7.2.6. Protocolo conductual	19
7.2.7. Estimulación en animales en libre movimiento	22
7.3. Aparatos	22
8. Resultados	23
8.1. Resultados de los registros electrofisiológicos	33
8.2. Estimulación optogenética del GPe durante la ejecución de la conducta	37
9. Discusión y conclusiones	40
10. Referencias	43
11. Anexos	49

Esta tesis y proyecto experimental fue realizado en el laboratorio A-02 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México supervisado por el Dr. Pavel E. Rueda Orozco con el apoyo de los proyectos PAPIIT: IA201916 y IA201018; CONACyT: FC206_1702. Además del apoyo técnico de: Dra. Ma. Teresa Peña Rangel; Augusto Cuahutli Pacheco; MVZ Martín García;

Resumen

Los ganglios basales (GB) de acuerdo al modelo clásico se encargan de facilitar (iniciar) o inhibir (detener) los movimientos, aunque otros modelos han propuesto que los GB podrían adicionalmente codificar información cinemática para controlar el vigor (velocidad, amplitud y dirección) con el que se realizan los movimientos.

El objetivo de este proyecto es estudiar cómo se llevaría a cabo el control de los parámetros cinemáticos en los GB, en este trabajo nos centraremos en un núcleo específico de los GB, el globo pálido externo (GPe) el cual debido a sus conexiones funcionales y posición anatómica es ideal para estudiar la vía indirecta de los GB. A su vez nos centraremos en un solo parámetro cinemático, la velocidad. Para ello modificamos un protocolo conductual para ratas que permite medir con exactitud la posición y tiempo de los movimientos de los animales. De manera paralela implementamos protocolos de estimulación optogenética y registro electrofisiológico con multielectrodos en animales anestesiados para evaluar cómo se modificaba la actividad neuronal del GPe bajo el control optogenético. Conjuntando ambos protocolos se estimuló optogenéticamente el GPe en animales en libre movimiento.

Encontramos que la activación optogenética del GPe no produce cambios en la velocidad de los animales, pero si se ve afectado el componente temporal de los movimientos de los animales. De manera que durante los ensayos estimulados optogenéticamente los animales realizaban exactamente la misma secuencia de movimientos que en los ensayos control, pero anticiparon el inicio de la secuencia.

Lista de abreviaturas

CC	Cuerpo calloso
CI	Cápsula interna
d-NEMs	Neuronas espinosas medianas de la vía directa
Et al.	Y colaboradores
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
i-NEMs	Neuronas espinosas medianas de la vía indirecta
LB	Línea basal
Lml	Lámina medular lateral
mGluR4	Receptor metabotrópico de glutamato 4
NEMs	Neuronas espinosas medianas
NST	Núcleo subtalámico
PV	Parvalbúmina
SNr	Sustancia <i>nigra reticulata</i>
SNc	Sustancia <i>nigra compacta</i>
VL	Ventrículo lateral

1. Introducción

La capacidad de realizar movimientos con precisión es una necesidad para la sobrevivencia de los seres vivos, para la realización de cualquier movimiento es necesario el control preciso de parámetros cinéticos del movimiento como: la amplitud, la velocidad, la fuerza y la dirección de los mismos.

Se ha observado que en patologías que implican a los ganglios basales (GB), como las enfermedades de Parkinson o Huntington, el control de los parámetros cinéticos del movimiento se encuentra comprometido, lo que genera síntomas tales como temblor, entrecimiento y rigidez en los movimientos, movimientos incontrolables (coreas), problemas con el balance y la coordinación, que afecta severamente la calidad de vida de quien los padece (Ho *et al.*, 2009; Marsden, 1982; Schrag *et al.*, 2000).

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales altamente interconectados, se ha descrito que la información proveniente de las cortezas y el tálamo transita a través de ellos por dos vías segregadas anatómicamente y funcionalmente; las vías directa e indirecta. Evidencia anatómica y funcional sustenta la propuesta clásica (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990) que la activación de la vía directa facilita el movimiento mientras que la activación de la vía indirecta lo inhibe. A pesar de esto, aún estamos lejos de entender cuál es el papel específico de los GB durante el control del movimiento o de los parámetros cinemáticos específicos del mismo, como la velocidad, la dirección o la amplitud.

Con respecto a la producción de movimientos, se ha sugerido que la activación de la vía directa facilitaría el inicio de movimientos deseados mientras que al mismo tiempo la vía indirecta inhibiría los movimientos no deseados (DeLong, 1990). Sin embargo, la evidencia experimental indica que la activación de ambas vías es necesaria durante la ejecución de movimientos (Cui G *et al.*, 2013). Aunado a esto, la mayor parte de los estudios se han centrado en el cuerpo estriado, el principal núcleo de entrada de los GB y en donde ambas vías (directa e indirecta) se encuentran homogéneamente distribuidas en las células principales, las neuronas espinosas medianas (NEMs). Las NEMs de ambas vías se encuentran altamente

interconectadas mediante sinapsis colaterales e interneuronas (Taverna *et al.*, 2008) por lo que la activación de una vía tiene una influencia directa sobre la otra. Esto ha hecho aún más complejo el esclarecimiento del papel de cada una de las vías durante la ejecución y el control de los movimientos.

El globo pálido externo (GPe) es el primer relevo de la vía indirecta, recibe información principalmente de las NEMs que expresan el receptor dopaminérgico D2 y envía proyecciones GABAérgicas principalmente al núcleo subtalámico (NST). El modelo clásico, así como la evidencia anatómica y electrofisiológica indican que su activación inhibe a las neuronas del NST, lo que a su vez resulta en el decremento en la actividad de las neuronas de la sustancia nigra reticulata (SNr) lo que facilitaría el movimiento. Así mismo, podría esperarse que su inhibición (por activación de las NEMs de la vía indirecta) resultaría en el efecto contrario.

A pesar de que el modelo clásico predice claramente que la activación/inactivación del GPe debería facilitar/inhibir el movimiento, registros en primates no humanos han mostrado que, en el GPe existe una representación somatotópica del cuerpo y extremidades del animal (Georgopoulos *et al.*, 1983; Hamada *et al.*, 1990) y además la actividad de neuronas individuales esta correlacionada con movimientos activos y pasivos de las extremidades del animal, así como con la velocidad, la dirección, o el vigor del movimiento. Estos antecedentes muestran que el papel del GPe y la vía indirecta en el control motor aun no es claro, pero sugieren que su implicación va más allá de una función de “interruptor” del movimiento.

1. Ganglios basales

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales del encéfalo involucrados en el control motor, formación de hábitos, aprendizaje y memoria (Ashby *et al.*, 2010; Lanciego *et al.*, 2012). Estos núcleos están compuestos por 1) el estriado, 2) el globo pálido externo (GPe) e interno (GPi); 3) el núcleo subtalámico (NST), 5) la sustancia nigra pars compacta (SNc) y reticulata (SNr) (Kandel *et al.*, 2000).

1.1. Descripción anatómica y tipos celulares

El estriado es el principal núcleo que recibe la información de entrada a los GB, en primates está compuesto por el núcleo caudado, el putamen, y el núcleo acumbens (Lanciego *et al.*, 2012). Recibe información glutamatérgica principalmente de la capa V de la corteza, asimismo del tálamo y el tallo cerebral (Kandel *et al.*, 2000). Se compone de neuronas de proyección llamadas neuronas espinosas medianas (NEMs ésta es la que aparece en tus abreviaturas) e interneuronas. El 95% de las neuronas del estriado son NEMs las cuales utilizan el neurotransmisor GABA, las neuronas restantes son interneuronas que utilizan acetilcolina o GABA como neurotransmisor. Las NEMs proyectan al GPe, GPi y SNr, aquellas que proyectan al GPe expresan el receptor D2 de dopamina lo que da lugar a la vía indirecta (i-NEMs), las NEMs que proyectan directamente a los núcleos de salida (GPi/SNr) expresan el receptor D1 dando lugar a la vía directa (d-NEMs) (Lanciego *et al.*, 2012; Reiner, 2010).

El globo pálido se divide en dos núcleos, uno interno (GPi) y otro externo (GPe), ambos difieren tanto en funcionalidad como conectividad. El GPe, en los primates se ubica medial al putamen y se separa de este por la lámina medular lateral (lml), la lámina medular medial separa al GPe del GPi (Figura 1B). En los roedores se ha descrito la ubicación del GPe medial al estriado y separado del GPi por la cápsula interna (CI), en la cual esta embebido el GPi (Figura 1A). EL GPe recibe fibras GABAérgicas aferentes estriatales de las neuronas i-NEMs y aferentes glutamatérgicas del NST, además, recibe escasas aferencias del GPi, SNc, corteza

cerebral y del núcleo intralaminar del tálamo. Las proyecciones del GPe van hacia el GPi, NST y el estriado principalmente, aunque también proyecta escasamente al tálamo, los colículos inferiores y el núcleo tegmental pedúnculo pontino. El GPi recibe aferencias del estriado por medio de las d-NEMs (Kita, 2007; Reiner, 2010). Las características del GPe se describirán más a fondo en su apartado.

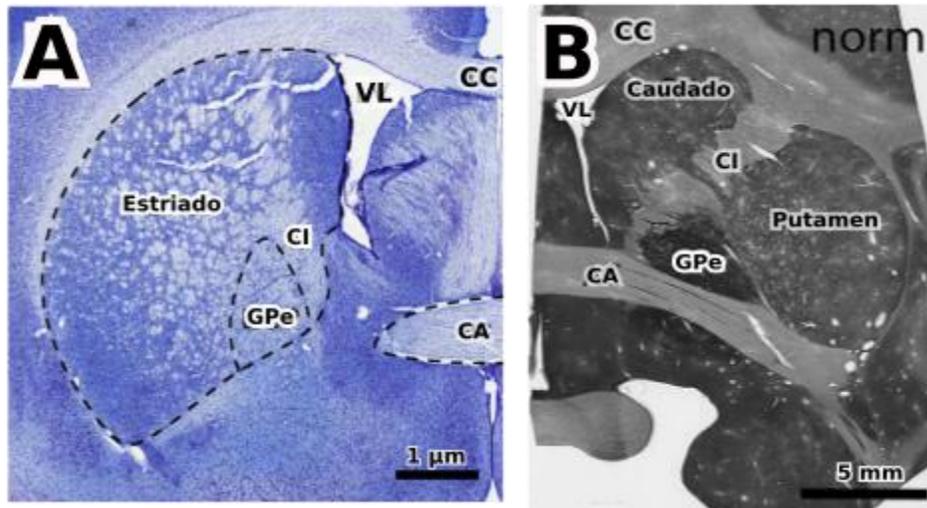


Figura 1. Anatomía del GPe. A) Corte coronal de cerebro de rata con tinción de Nissl. B) Corte coronal de cerebro de mono teñido con inmunohistoquímica para mGluR4. Modificado de Ni *et al.*, (2018) y Bogenpohl *et al.* (2013).

La sustancia nigra está compuesta de dos núcleos; la pars compacta y la pars reticulata, ésta último junto con el GPi se consideran la salida de los GB, debido a que son los núcleos encargados de comunicarse con las demás estructuras del cerebro fuera de los GB como el tálamo, los colículos superiores y el núcleo pedúnculo pontino, ambos se comunican por medio de proyecciones GABAérgicas. Por otra parte, la SNc se encuentra en la parte dorsal de la sustancia nigra, recibe principalmente proyecciones del estriado mediante las cuales forma un asa de retroalimentación, también recibe proyecciones del GPe y presenta una población densa de neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el estriado y escasamente al NST (Reiner, 2010).

El NST es el único núcleo glutamatérgico de los GB (Reiner, 2010), recibe proyecciones inhibitorias del GPe y proyecciones excitatorias de la corteza, el tálamo y el tallo cerebral, envía información a ambos segmentos del globo pálido y la sustancia nigra pars reticulata (Lanciego *et al.*, 2012).

La información proveniente de las cortezas y el tálamo transita en los GB a través de dos vías principales de comunicación, las cuales se conocen como la vía directa e indirecta (Figura 2). En la vía directa la información es transportada del estriado a los núcleos de salida (GPi/SNr), mientras que en la indirecta la información pasa del estriado al GPe, quien proyecta directamente al GPi/SNr o releva con el NST, que también mandará la información a los núcleos de salida. Existe otra vía llamada la vía hiperdirecta, recibe ese nombre debido a que la información de la corteza va directamente al NST y posteriormente a los núcleos de salida.

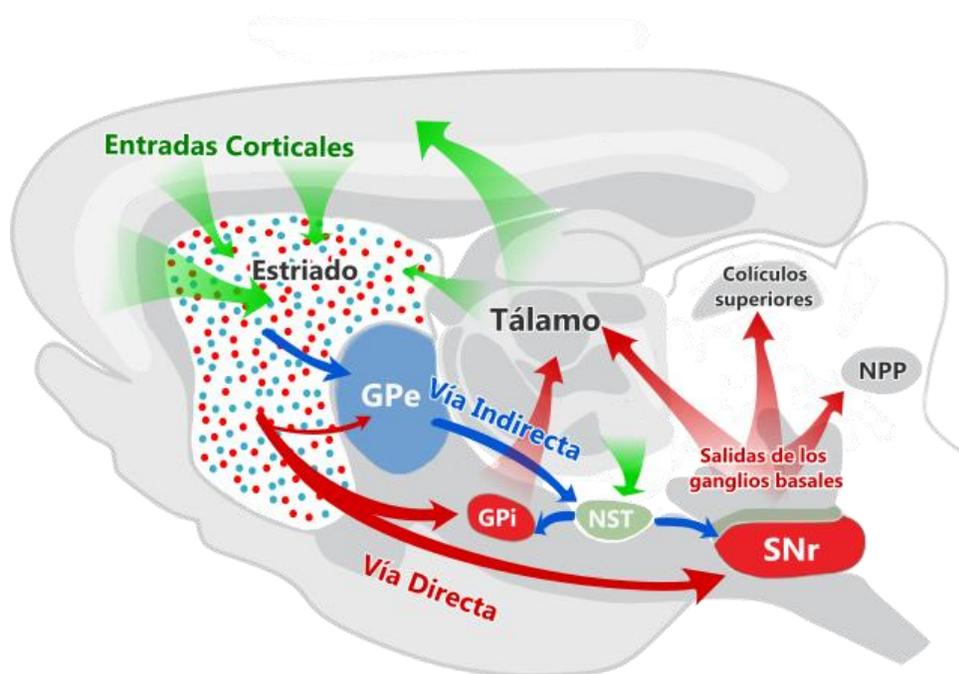


Figura 2. Los GB y sus principales vías de procesamiento de información. Las flechas verdes representan la información de entrada cortical y talámica, las flechas rojas representan las proyecciones de la vía directa, las azules de la vía indirecta. Los puntos rojos y azules en el estriado representan la distribución de las i-NEMs y d-NEMs. Modificado de Reiner (2010).

1.2. Modelos de la función de los ganglios basales

A partir de observaciones realizadas en pacientes que presentaban desordenes motores asociados a disfunciones en los GB, se observó que la sintomatología era altamente variable, por ejemplo, algunos desordenes mostraban movimientos excesivos y rápidos tal como en la enfermedad de Huntington, mientras que otros como el Parkinson se caracterizaban por presentar movimientos lentos y rígidos. Debido al amplio espectro de síntomas que se encontró, se hipotetizó que las vías directa e indirecta de los GB debían tener efectos opuestos en la conducta, debido a las salidas opuestas que presenta cada vía en los núcleos de salida (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990).

La teoría que surgió, y actualmente se considera canónica, considera que la vía directa se encarga de facilitar la ejecución de los movimientos mientras que la vía indirecta inhibe la ejecución de los movimientos. La facilitación del movimiento se lleva a cabo mediante la inhibición de los núcleos de salida de los GB (GPi/SNr), los cuales envían proyecciones GABAérgicas al tálamo motor, por lo que el resultado final sería un aumento en la actividad del tálamo y por consiguiente aumento de la actividad locomotora. Por otro lado; la inhibición de los movimientos estaría dada por la activación de los núcleos de salida de los GB (GPi/SNr), los cuales mediante sus proyecciones GABAérgicas inhibirían la actividad del tálamo, lo cual da como resultado una disminución en la actividad locomotora. Esta teoría de la inhibición/facilitación de los movimientos fue comprobada experimentalmente mediante estimulación optogenética en ratones que expresaban una canalrodopsina dependiente de Cre en células D1-Cre o D2-Cre del estriado, y estimularon individualmente las vías directa o indirecta de los GB (Kravitz *et al.*, 2010). El experimento demostró que la activación de la vía indirecta producía comportamientos parkinsonianos tales como: acinesia, bradicinesia y disminución de la iniciación locomotora, mientras que la activación de la vía directa disminuía el comportamiento de congelamiento y aumentaba la iniciación locomotora.

De acuerdo con el modelo de inhibición y facilitación se postuló la teoría de “selección, mantenimiento y cancelación de acciones”, en esta se postula que las

acciones se componen de una serie de comandos motores, los cuales normalmente se encuentran inhibidos mediante la actividad del GPe. Por lo tanto, para que algún comando motor específico se pueda ejecutar, el estriado debe de activarse para inhibir al GPe, lo que detiene la inhibición del comando motor y se permite la iniciación de acciones. La selección de acciones se realiza con la ayuda de la actividad dopaminérgica que proyecta al estriado y le manda información dependiente del resultado esperado y obtenido anteriormente (Grillner *et al.*, 2005; Houk, 2011).

Las dos teorías anteriores coinciden entre sí, en conjunto postulan que la vía indirecta inhibe el movimiento y evita que acciones no necesarias se realicen, mientras, que la vía directa promueve la realización de acciones, pero también hay investigaciones que sugieren que el control motor que realizan los GB va más allá de iniciar o detener el movimiento.

1.2.1. Vigor y motivación del movimiento

Dudman y Krakauer (2016) teorizaron que, en ciertos animales los GB se encargan principalmente del control motor simple, pero en los primates y roedores los GB han evolucionado de forma que son necesarios para controlar otros aspectos del control motor, como el vigor (velocidad, amplitud y frecuencia) de los movimientos complejos. Diversas investigaciones han apoyado la teoría del papel de los GB en el control del vigor, por ejemplo; se ha observado que la inactivación farmacológica del GPi ocasiona en monos enlentecimiento de los movimientos (Desmurget & Turner, 2010). Por otro lado, Rueda-Orozco y Robbe (2015), demostraron que el estriado tiene una representación continua de parámetros del vigor y contexto del movimiento; a su vez Panigrahi *et al.* (2015), demostraron en roedores que la representación del vigor en el estriado se encuentra comprometida en un modelo de la enfermedad de Parkinson, lo que resulta conductualmente en una disminución de la frecuencia de movimiento y declive en la velocidad.

A partir de la hipótesis del vigor de los movimientos Yttri y Dudman (2016) entrenaron ratones a mover una palanca cierta distancia, posteriormente mediante técnicas optogenéticas estimularon las células estriatales específicas de las vías directa e indirecta, mientras, registraban el cambio en el movimiento de la palanca. En primera instancia, estimularon cada vía en el momento en que los animales realizaban movimientos rápidos, observaron que en los ensayos subsiguientes los animales estimulados en la vía directa aumentaban la velocidad del desplazamiento de la palanca, mientras, que los animales estimulados en la vía indirecta disminuían su velocidad, tal como se predice en el modelo clásico (Figura 3A). Sin embargo, cuando en otro protocolo la estimulación se aplicó durante los ensayos más lentos, los resultados se invirtieron, los subsiguientes ensayos a la estimulación de la vía indirecta mostraron decremento en la velocidad del desplazamiento de la palanca (Figura 3B), mientras, que en la vía indirecta hubo aumento en la velocidad del desplazamiento. Estos resultados demuestran que ambas vías pueden controlar el movimiento de manera bidireccional, y las respuestas encontradas perduran en el tiempo, aunque se detenga la estimulación optogenética (Yttri & Dudman, 2016).

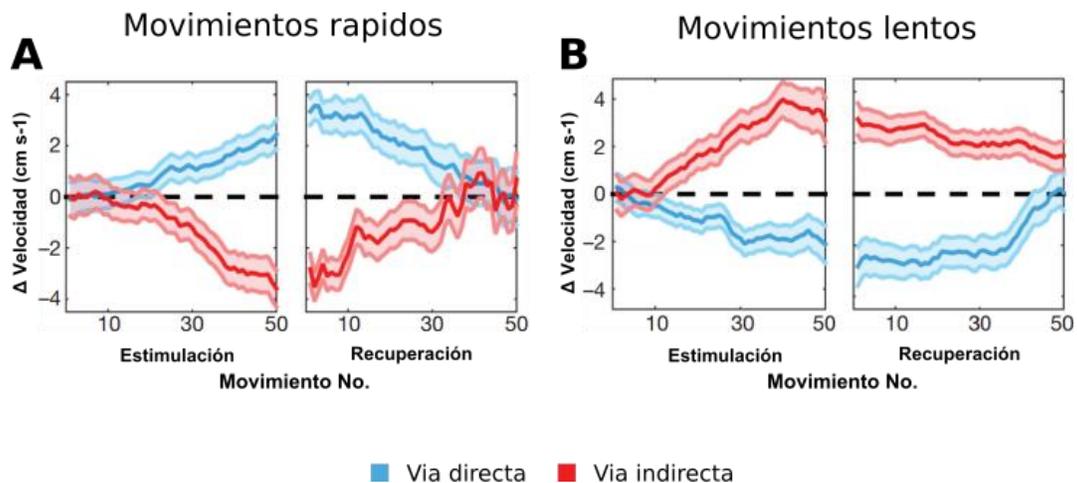


Figura 3. La estimulación durante movimientos rápidos o lentos produce control bidireccional y opuesto en el control de la velocidad. A) promedio poblacional del cambio de velocidad en función de los ensayos, cuando el tercio de ensayos más rápidos fueron estimulados, B) igual que A, pero cuando la estimulación ocurrió en el tercio de ensayos más lentos. Modificado de Yttri & Dudman (2016).

2. Globo pálido externo

El estudio de las vías directa e indirecta se ha realizado principalmente en el estriado, debido a que es la estructura de entrada a los GB, en donde el número de células que presenta cada vía es equivalente. Sin embargo, estudios como el de Taverna *et al.* (2008) han demostrado que ambas poblaciones neuronales presentan colaterales que establecen conexiones tanto con las d-NEMs como con las i-NEMs, estas últimas con un porcentaje mayor (Figura 4), por lo que la estimulación de cualquier vía produciría un efecto sobre ambos sistemas de proyección. Por lo tanto, para el estudio de la vía indirecta sería ideal investigar otra estructura de los GB, como el GPe, ya que es el siguiente relevo de la vía indirecta.

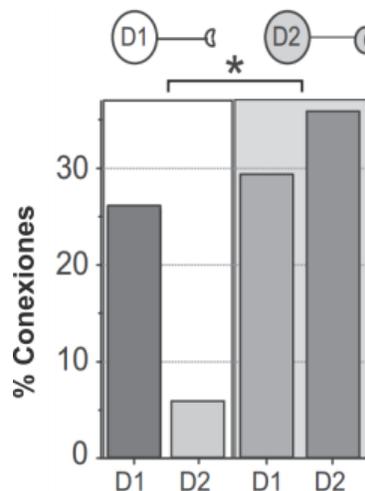


Figura 4. Porcentajes de conexiones unidireccionales de las neuronas estriatales. Los dibujos superiores representan el tipo de neurona presináptica, las columnas representan el tipo de neurona postsináptica.

2.1. Tipos celulares y neuroquímica del GPe

La mayoría de las neuronas del GPe son GABAérgicas aunque también existe un pequeño porcentaje, alrededor del 5%, de neuronas colinérgicas de proyección las cuales, se encuentran posicionadas en la porción ventromedial del GPe y proyectan hacia la corteza cerebral (Chan *et al.*, 2016; Reiner, 2010).

Las neuronas GABAérgicas se dividen en dos tipos diferentes, las llamadas protopalidales, las cuales representan aproximadamente el 70% de todas las neuronas del GPe. Estas neuronas disparan de manera tónica, frecuente e interespaciada con pausas espontáneas (Figura 5A), en su mayoría proyectan al NST. La mayoría de ellas (55%) expresan la proteína parvalbúmina (PV) y el factor de transcripción NKx2.1 y algunas expresan Lhx6 (Kita, 2007). El segundo tipo es conocido como neuronas arkypalidales, las cuales representan el 25-30% restante de todas las neuronas del GPe. A diferencia de las neuronas Protopalidales estas disparan irregularmente, en forma de ráfaga, menos frecuentemente (Figura 5B), proyectan al estriado dorsal, presentan el factor de transcripción Foxp2, PPE y también la mayor parte de estas presentan el factor de transcripción Npas1 (Kita, 2007; Nicolas Mallet *et al.*, 2012). Por otra parte, Cooper & Stanford (2002) han encontrado que también existen una pequeña población de interneuronas en el GPe las cuales son positivas a calretinina.

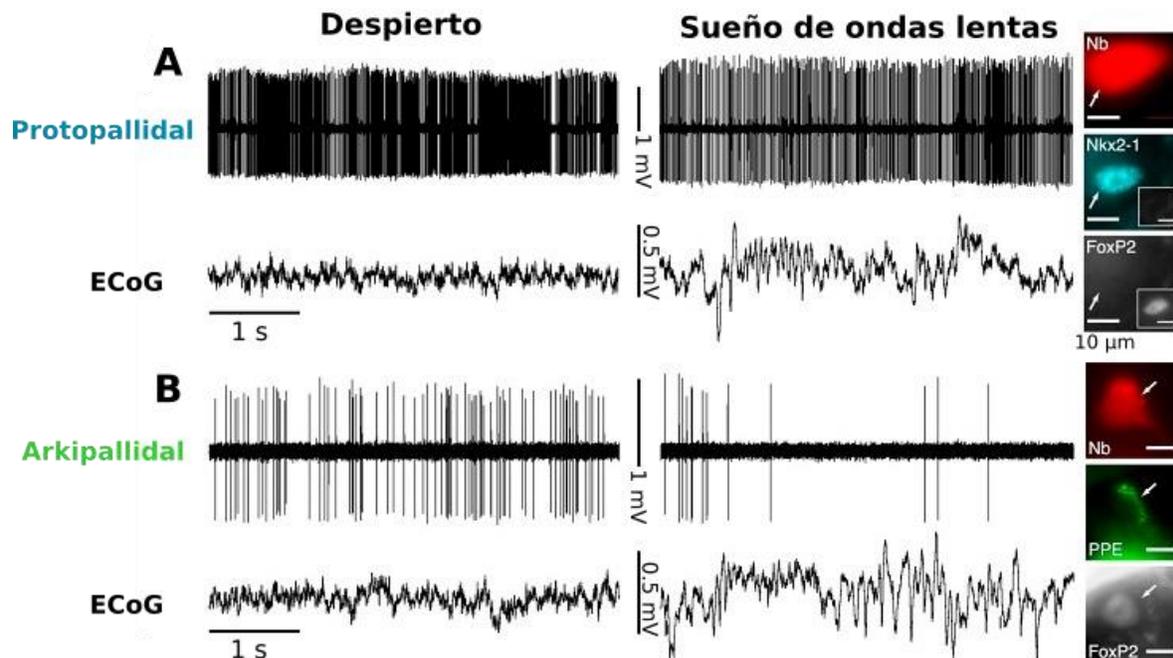


Figura 5. Propiedades de neuronas identificadas como Protopalidales y Arkypalidales. A) Registro de la actividad de una célula protopalidal cuando el animal está despierto (izquierda) y cuando se encuentra en sueño de ondas lentas, las imágenes de la derecha

muestran la célula marcada con neurobiotina (Nb, roja) y co-expresando NKx2-1 (azul), pero no FoxP2 (gris). Los recuadros pequeños en las imágenes demuestran células FoxP2 positivas y Nkx2-1 negativas. B) Célula arkipalidal, co-expresando PPe (verde) y FoxP2 (gris). Modificado de Schmidt *et al.* (2013).

Aproximadamente existen en la rata 46 mil neuronas en el GPe, en roedores tres cuartos del número total proyectan al GPi, NST, y SN, algunas de estas también mandan colaterales hacia las interneuronas estriatales (Reiner, 2010). Los axones de las neuronas del GPe presentan grandes botones sinápticos los cuales tienen vesículas circulares pequeñas y enlogadas (Reiner, 2010).

En el GPe está presente la dopamina y sus metabolitos en niveles relativamente altos, debido a que las terminales estriatales que proyectan presentan receptores dopaminérgicos de la familia D2 (Gittis *et al.*, 2014).

2.2. Función

Inicialmente se consideraba que el GPe servía para el control motor, principalmente como un relevo de información del estriado al NST, debido a esto, por mucho tiempo la investigación de los GB dejó a un lado al GPe. Actualmente se piensa que por tener conexiones con la principal entrada de los GB (estriado) y las salidas (GPi/SNr) por medio de sus proyecciones GABAérgicas (Figura 6), le confiere una posición privilegiada para poder modular y/o integrar la actividad de los GB (Arkadir, 2004; Elias *et al.*, 2007; Reiner, 2010).

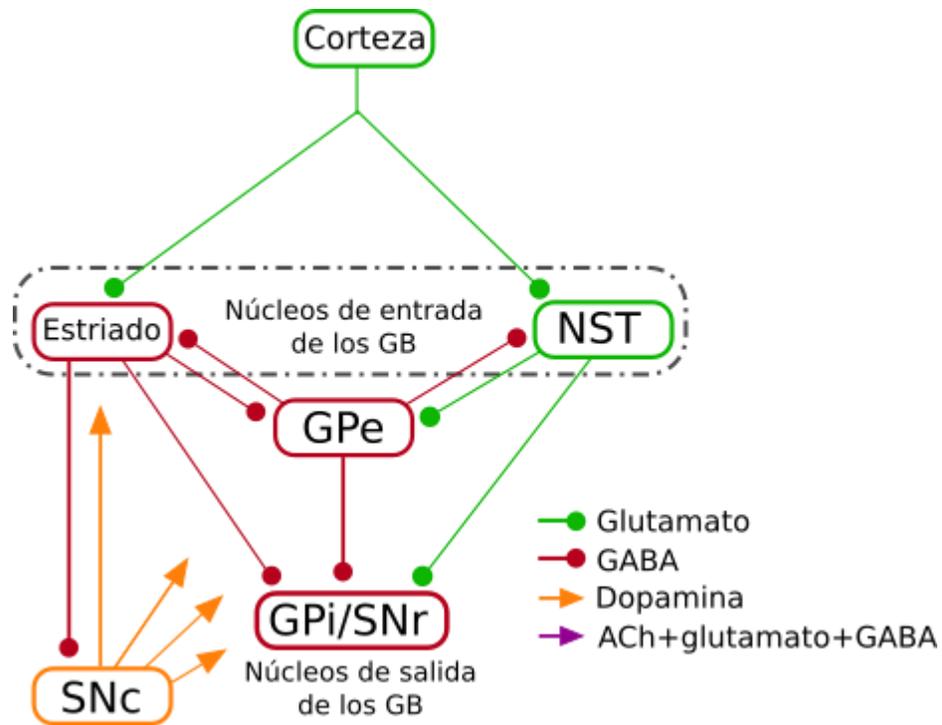


Figura 6. Conexiones entre los GB. La corteza manda proyecciones glutamatérgicas al NST (Vía hiperdirecta) y al estriado, el NST manda proyecciones glutamatérgicas al GPe y a los núcleos de salida de los GB. Por el otro lado el estriado manda proyecciones GABAérgicas al GPe, SNC y a los núcleos de salida. La SNC manda proyecciones dopaminérgicas hacia el estriado, GPe y a los núcleos de salida, por último, el GPe proyecta al estriado, NST y a los núcleos de salida. Modificada de Reiner (2010).

Diversos estudios han encontrado que el GPe participa en el control del vigor del movimiento, entre ellos se encuentra el de Georgopoulos *et al.* (1983) quienes enseñaron a monos a realizar movimientos con el brazo siguiendo un target visual al mismo tiempo que registraba la actividad de neuronas de varios núcleos de los GB, el GPe modificaba su tasa de disparo de acuerdo con la dirección, velocidad o amplitud en que se realizaba el movimiento. Por medio de una tarea similar, pero sin el target visual, Turner y Anderson (1997) encontraron que la tasa de disparo de neuronas del GPe aumentaba en algunas células y en otras disminuía milisegundos antes del inicio del movimiento y se mantenía la tasa de disparo hasta

el término del movimiento, dependiendo de cuál era la direccionalidad y amplitud del movimiento la magnitud del incremento o decremento en la tasa de disparo cambiaba.

Otros estudios han investigado la relación de la actividad del GPe con funciones cognitivas como el aprendizaje, respecto a este tema Schechtman *et al.* (2016) encontraron que el disparo neuronal del GPe puede predecir cambios en el comportamiento de una tarea que se está aprendiendo y su disparo disminuye conforme aumentan los ensayos correctos. También se ha relacionado al GPe con predicción de la recompensa de los movimientos que se realizaran, esto fue estudiado por Arkadir (2004) en una tarea visual-motora probabilística, en esta tarea se encontró que las neuronas disparaban de acuerdo con la probabilidad de recibir recompensa, en este mismo estudio se encontró que al igual como se había reportado en estudios previos la tasa de disparo neuronal correlacionaba con la direccionalidad del movimiento.

2.3. Patología

El GPe en modelos de Parkinson presenta actividad sincronizada con el NST por medio de oscilaciones en forma de ráfagas de alta frecuencia. En estos modelos se ha observado que la administración de agonistas de dopamina, como L-DOPA, o estimulación cerebral profunda cesan la sincronía, debido a esto se piensa que la actividad sincrónica puede estar relacionada con el origen de síntomas que se presentan en la enfermedad de Parkinson (Chan *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2009; N. Mallet *et al.*, 2008). Otros estudios han demostrado que la aplicación de estimulación eléctrica en el GPe mejora síntomas parkinsonianos como la bradicinesia, temblores en reposo y postura (Frañois *et al.*, 2004; Vitek *et al.*, 2004; Yelnik *et al.*, 2000).

Inyecciones de bicuculina en el GPe provocan hiperactividad en las neuronas del GPe junto con aparición de discinesia, conductas estereotipadas e hiperactividad (Frañois *et al.*, 2004; Matsumura *et al.*, 1995). A su vez la activación de los

receptores subtipo D2 del GPe provoca comportamientos estereotipados e incremento de la actividad locomotora mientras que el bloquear estos receptores produce acinesias y catalepsia (Gittis *et al.*, 2014).

3. Planteamiento del problema

Los modelos de la función de los GB que han surgido han propuesto que los GB no solo se encargan de aumentar o disminuir el movimiento, como clásicamente se había planteado, también se encargan de modificar y adaptar los parámetros del vigor del movimiento para poder realizar acciones (Dudman & Krakauer, 2016). Diversos estudios han demostrado que existe una representación de la direccionalidad, amplitud y velocidad de los movimientos en los GB (Thura & Cisek, 2017). Estas evidencias demuestran que los GB están efectivamente implicados en el control del vigor de los movimientos, pero hasta ahora se desconoce el cómo se lleva a cabo el control o modulación de los parámetros cinéticos ni como la alteración de la representación de los parámetros se refleja en el desempeño de los movimientos.

Entre los núcleos de los GB que se han asociado con los parámetros cinéticos se encuentra el GPe, el cual es el primer relevo de la vía indirecta, clásicamente relacionada con la inhibición de los movimientos, adicionalmente posee una representación somatotópica de las extremidades de los animales y anatómicamente presenta conexiones tanto las entradas como salidas de los GB, por lo que esta estructura probablemente esté implicada de alguna manera en el control de parámetros cinéticos tales como; la velocidad.

La velocidad es un parámetro cinético del que poco se ha estudiado en animales, pero no por ello menos importante, en patologías como el Parkinson o Huntington el control de la velocidad de los movimientos se encuentra severamente comprometido y es uno de los síntomas más apreciables. Adicionalmente la velocidad es un parámetro relativamente fácil de evaluar mientras se conozca la posición de los animales en el tiempo.

Por estas razones, nos proponemos estudiar el GPe de los GB y su papel en el control de la velocidad.

4. Hipótesis

La hipótesis general del proyecto es que la actividad neuronal del GPe ajusta la velocidad de los movimientos, de manera que el incremento de la actividad neuronal del GPe aumentaría la inhibición sobre los núcleos de salida lo que removería la inhibición de estos sobre el tálamo y resultaría en aumento de la velocidad de los movimientos (Figura 7).

5. Objetivos

El objetivo general del proyecto consta en incrementar la actividad neuronal del GPe durante la ejecución de una tarea, mientras se registran los cambios en el movimiento de los animales.

Los objetivos específicos para poder llevar a cabo el general son:

1. Implementar una tarea conductual que permita la evaluación de la velocidad de los animales, así como la modificación de esta.
2. Implementar y verificar el correcto funcionamiento de un protocolo de estimulación optogenética que permita incrementar la actividad neuronal del GPe en animales anestesiados.
3. Realizar el protocolo de estimulación optogenética durante la tarea conductual, mientras se evalúan los movimientos de los animales.

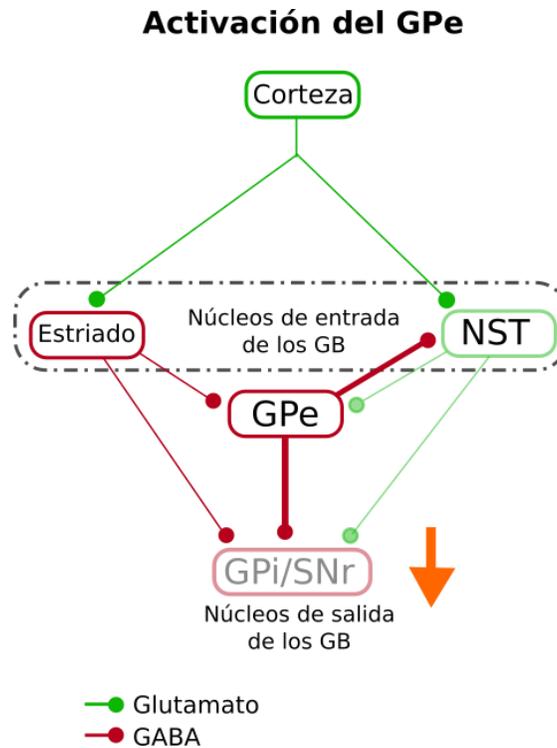


Figura 7. Hipótesis gráfica de la activación del GPe. Se observa el resultado de la activación del GPe (líneas más gruesas indican mayor actividad y líneas difuminadas indican menor actividad).

6. Métodos

6.1. Animales

Se utilizaron ratas adultas Long Evans, en ciclo de 12h de luz/oscuridad (las luces se prendían a las 08:00am y se apagaban a las 20:00pm) con alimento y agua disponibles ad libitum. Se utilizaron once ratas para el protocolo conductual y siete para los registros electrofisiológicos.

6.2. Procedimientos

6.2.1. Inyección de trazadores y virus

Para corroborar el sitio de inyección en el GPe antes de realizar la administración de virus se inyectó el trazador anterógrado fluoro-Ruby (Dextran, Tetramethylrhodamine, 10,000 MW, Lysine Fixable). El virus que se utilizó para la estimulación optogenética fue el rAAV5/CamKIIhChR2(H134R)-EYFP-WPRE-PA12 para la expresión de "Channelrhodopsin 2". Las coordenadas de inyección fueron determinadas mediante el atlas de Paxinos y Watson (2014), fueron para el GPe (P: -0.72; L:3; V: -5.8) y para el estriado (P:0.6; L:3.5; V: -3.5). Las cirugías se realizaron bajo anestesia profunda con un coctel de ketamina (80 mg/kg) y xilaxina (10mg/kg) (i.p.). Para mantener niveles óptimos de anestesia, cuando fue necesario se utilizó sevoflourano (0.2 - 2%). El nivel de anestesia se determinó mediante el monitoreo continuo de la temperatura, frecuencia respiratoria y el reflejo nociceptivo en las patas traseras. Los animales fueron administrados con una dosis subcutánea única de atropina (como antiexpectorante) y gentamicina (antibiótico). La inyección de los virus y trazadores se realizó con una jeringa Hamilton (Neuro-Syringe 7001, 1µL) acoplada a una bomba de microinyección (modelo WPI-UIMP3). Los volúmenes utilizados fueron entre 100 y 500 nl y fueron inyectados a una velocidad de 200 nl/min. A su término, se esperó 10 minutos antes de retirar la jeringa. Al finalizar, se tapó el trépano con pegamento, se agregó barnicina en el cráneo, y se procedió a suturar al animal. Después de la cirugía los animales fueron alojados en pares, el periodo de incubación antes de realizar los experimentos de estimulación optogenética fue de al menos 3 semanas, en el caso de las inyecciones con trazadores el periodo de incubación fue de 10 días antes de extraer y procesar los cerebros.

6.2.2. Registros electrofisiológicos en animal anestesiado

Los registros electrofisiológicos fueron realizados bajo anestesia irreversible mediante una dosis de 1.1 g/kg de uretano. Mediante este protocolo de anestesia es posible registrar respuestas somatosensoriales evocadas en las cortezas sensoriales primarias y los ganglios basales. La dosis final se aplicó en tres inyecciones i.p separadas por 30 minutos cada una. Al igual que en las cirugías para

la inyección de virus, la temperatura, respiración y reflejos se monitoreaban constantemente durante todo el experimento, en caso de ser necesario se administraban dosis suplementarias de ketamina. Cuando la rata dejó de presentar reflejos, se montó en el aparato estereotáxico. Se limpió el cráneo, y se niveló la altura del eje anterior-posterior mediante la medición de lambda y bregma en el eje vertical. Se hicieron dos trépanos en el cráneo para introducir dos tornillos miniatura que sirvieron como tierra y referencia. Para los registros en el GPe los tornillos se colocaron sobre el cerebelo y para los registros en la SNr los tornillos se colocaron uno sobre el cerebelo y otro sobre la corteza parietal, en el hemisferio contralateral a la craneotomía. Se realizó una craneotomía de 2.2 x 1.4 mm² para el GPe con centro en AP:0.2 y L:3.7. Para SNr fue de 2 x 2.3 con centro en AP: -5.6 y L: 2.4. Después, se retiró la dura madre. Posteriormente, se introdujo un arreglo de microelectrodos de 64 canales (silicon probe) posicionada coronalmente (64-Busaki Long Probe) a la superficie del cerebro. El microarreglo se movió lentamente hasta llegar al sitio de registro deseado (i.e. GPe, SNr) Al terminar los registros de potenciales de acción, los animales fueron perfundidos y sus cerebros extraídos para procesamiento y análisis histológicos.

6.2.3. Estimulación optogenética

Para estimular optogenéticamente, se utilizó una fibra óptica de 200 micras de diámetro y 8 mm de largo, introducida en el trépano realizado anteriormente para la infección del virus. La canalrodopsina se estimuló con luz LED de una longitud de onda de 465nm a 26 mW. Se utilizaron dos protocolos de estimulación que variaron un poco mientras experimentábamos con cual era más eficiente. En el primero, se aplicaron 50 estímulos de 500ms de duración, en intervalos de 5s entre cada estímulo, este protocolo no cambió a lo largo de los experimentos. En el segundo protocolo, se aplicaron 50 trenes de 10 estímulos a 3.3Hz, cada estímulo tenía una duración de 5ms, finalmente se disminuyó el número de estímulos en cada tren de 10 a 5 y se modificaron las duraciones de los estímulos de 5 a 50 ms.

6.2.4. Implantación de fibras ópticas

Para la implantación de fibras ópticas en animales entrenados se siguió el protocolo de anestesia e inyección de virus mencionado anteriormente. Estas cirugías fueron realizadas después de al menos 5 meses de entrenamiento en la tarea de integración velocidad-tiempo-espacio (ver más adelante). En la misma cirugía se realizaron infecciones bilaterales del GPe e implantes bilaterales de fibras ópticas. El volumen de las inyecciones fue 800 nl para cada GPe (AP:0.2 y L:3.7) a una velocidad de 200 nl/min. Una vez realizada la inyección se introdujeron fibras ópticas de 0.8 milímetros de longitud y 200 μ m de diámetro en el GPe (AP:0.2 y L:3.5). Las fibras fueron fijadas al cráneo de los animales mediante cemento dental y 4 tornillos de soporte. Al finalizar los procedimientos quirúrgicos se aplicaron tratamientos antibióticos y analgésicos locales y sistémicos. Después de la cirugía los animales fueron alojados individualmente, el periodo de incubación antes de realizar los experimentos de estimulación optogenética fue de al menos 4 semanas.

6.2.5. Histología

Para la histología, se rebanaron los cerebros con un Vibratomo Leica VTS1200 y se realizaron a 60 mm/s, 80 mm de amplitud y a 50 micras. Las rebanadas se montaron posteriormente en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron. Las laminillas se inspeccionaron en un microscopio de fluorescencia.

6.2.6. Protocolo conductual

En este proyecto utilizamos la tarea para ratas diseñada en Rueda-Orozco y Robbe (2015). En este protocolo conductual, que desde ahora llamaremos “de integración velocidad-tiempo-espacio” (Figura 8), los animales deben obtener reforzadores mediante la ejecución de una secuencia de movimientos estereotipada en un contexto espacio-temporal preciso. Un video con el protocolo conductual puede observarse en la siguiente dirección electrónica: <https://www.youtube.com/watch?v=x9KPIK6r0Ag>. Decidimos utilizar esta tarea

debido a que el protocolo puede ser modificado para que los sujetos ajusten su velocidad de ejecución dependiendo de la dinámica experimental. En la versión original los sujetos son entrenados a correr en una caminadora a una velocidad fija (eg. 22 cm/s). Cada ensayo inicia con el encendido de las luces generales, seguido un segundo después, por la activación de la caminadora. Para obtener un reforzador, los sujetos deben de evitar la parte frontal de la caminadora (zona de reforzamiento) por al menos 7 segundos, si después de este intervalo los sujetos cruzan a la zona de reforzamiento, la caminadora se detiene y se entrega una gota de agua azucarada (10%). Por el contrario, si los sujetos entran en la zona de reforzamiento antes de 7 segundos, el ensayo se considera un error, los sujetos deben continuar corriendo hasta 20 segundos y no se entrega reforzador. Los ensayos incorrectos son señalados con un estímulo auditivo a 1.5 kHz (65dB). Esta tarea fue diseñada de forma que fuera posible cuantificar los diversos parámetros cinemáticos del movimiento; tales como velocidad, posición espacial, aceleración etc.

Las ratas fueron entrenadas diariamente, cada sesión tenía una duración variable, el número de ensayos por sesión vario entre 40 (aprox. 30 min.) a 160 (aprox. 120 min.). El número de ensayos depende directamente del desempeño del animal, y las sesiones pueden terminar por alguno de los siguientes 3 criterios: 1) durante todo momento se evalúa el porcentaje de respuestas correctas en los últimos 40 ensayos, si se supera el 75% la sesión se detiene, hemos observado que de esta manera los animales están más motivados a realizar la tarea correctamente desde el inicio de la sesión. 2) al alcanzar 60 reforzadores y 3) al alcanzar 160 ensayos sin importar si son incorrectos. Normalmente todos los animales tardan entre 35 y 50 sesiones en alcanzar porcentajes mayores al 75% de respuestas correctas.

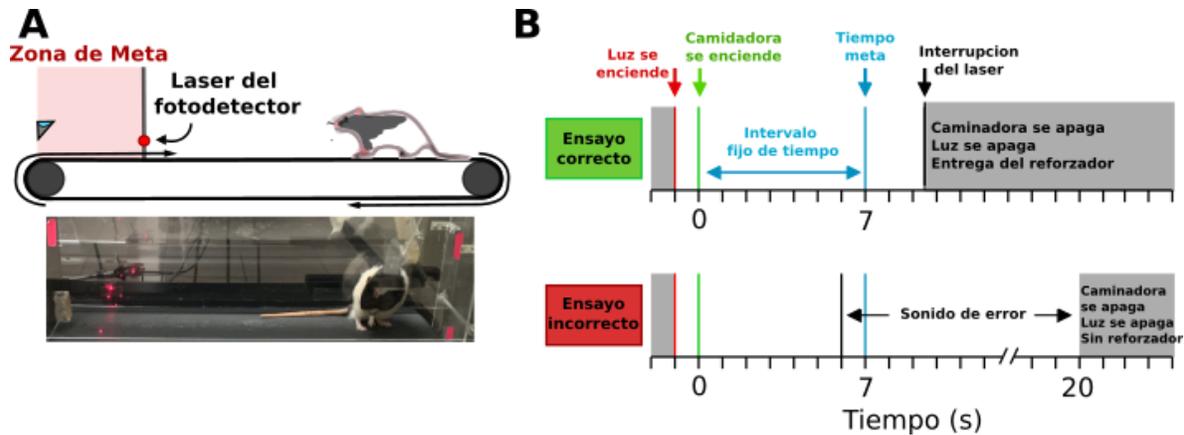


Figura 8. Tarea conductual de la caminadora. En A) Se muestra esquematizado el aparato conductual, B) descripción de la tarea (Modificado de Rueda-Orozco & Robbe, 2015).

Después de 50 sesiones, cuando la conducta de los animales es estable, se modificó la velocidad en que los animales corren a 26 cm/s durante 15 a 20 sesiones dependiendo del desempeño, nuevamente se cambió la velocidad a 30 cm/s, el cambio era a una velocidad mayor a la que antes realizaba correctamente. Cuando algún animal presentaba dificultades en realizar la tarea en alguna velocidad se cambiaba a una velocidad más baja y después de algunas sesiones se intentaba incrementar la velocidad nuevamente. Estos cambios se hicieron con el objetivo de que las ratas se habituaran a correr a diferentes velocidades. Al finalizar, a partir de la última velocidad que se les presento a los animales (VB) se seleccionaron tres velocidades más lentas (V1-V3) y tres más rápidas (V4-V6), de manera que se reunieron siete velocidades (Figura 9). En las siguientes sesiones estas velocidades se presentaron de forma aleatoria (todas con la misma probabilidad de ocurrencia) de ensayo a ensayo. De esta manera, los animales no pudieran predecir cuál iba a ser la velocidad de cada ensayo, así pudimos evaluar el desempeño de los animales cuando se requería realizar un ajuste en la velocidad de sus movimientos.

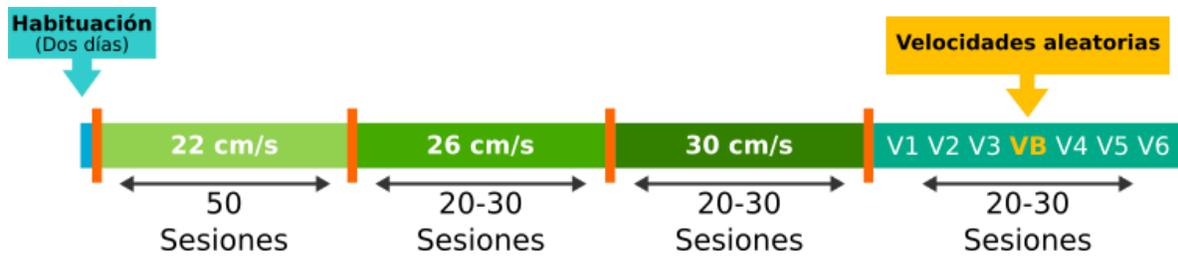


Figura 9. Línea de tiempo del protocolo conductual.

7.2.7 Estimulación en animales en libre movimiento

Previamente a la estimulación se habituó a los animales a estar conectados al estimulador mediante las fibras ópticas. Para ello durante una semana se conectaron los animales al estimulador mientras realizaban la tarea, pero no se aplicó ningún protocolo de estimulación. Después de la habituación, los animales se estimularon con luz azul a 5-9 mW continuamente, la estimulación iniciaba cuando el animal llegaba a la parte trasera de la caminadora y terminaba en el momento que cruzaba el haz del fotodetector, esto se realizó para estimular a los animales únicamente cuando estuvieran moviéndose activamente en la caminadora. Este protocolo se aplicó durante siete sesiones, durante las cuales se obtuvieron entre 80 y 120 ensayos de cada velocidad estimulada y de igual manera no estimulados.

6.3. Aparatos

Para la realización del protocolo conductual se utilizó una caminadora para humanos que fue modificada para el uso de ratas, sus medidas se modificaron de manera que fueran iguales a las del artículo original (longitud de 80 cm., ancho de 14 cm., paredes de acrílico de 50 cm. de alto). La caminadora se controla por medio de un programa hecho en el laboratorio creado en el lenguaje de programación de LabVIEW, National Instruments. Para registrar las trayectorias de cada ensayo se utiliza una cámara de alta velocidad (100 cuadros por segundo). Los reforzadores

se entregaban mediante un bebedero situado en la pared frontal de la zona de reforzamiento, un fotodetector acoplado a un láser delimita el área de reforzamiento.

7. Resultados

Inicialmente se verificó que los animales aprendieran la tarea correctamente y los datos de la curva de aprendizaje fueran consistentes a los ya reportados en el artículo original (Rueda-Orozco & Robbe, 2015), por lo que se graficó el tiempo de llegada en nueve sujetos. Al igual que como fue reportado, las ratas inicialmente presentaron un promedio de llegada por debajo de 7 segundos y con alta variabilidad. Conforme aumentaron las sesiones de entrenamiento la variabilidad disminuyó y el tiempo de llegada se aproximó y quedó por encima del tiempo meta con bastante exactitud. A diferencia de como fue reportado originalmente, nuestras ratas requirieron menos sesiones para alcanzar el tiempo meta (20 sesiones aproximadamente) (Figura 10). Después de aprender la tarea todos los animales desarrollaron un patrón de conducta muy estereotipado, el cual puede dividirse en 4 fases: 1) al principio de los ensayos el animal usualmente se encuentra en la parte delantera de la caminadora (Figura 11 A-1), 2) cuando la caminadora empieza a moverse el animal se deja llevar hacia la parte trasera de la misma (Figura 11 A-2), 3) al llegar a la parte trasera los animales mantienen su posición espacial corriendo a la velocidad de la caminadora (Figura 11 A-3) y 4) Finalmente, los animales realizan una aceleración final que los conduce a cruzar a la zona de reforzamiento (Figura 11 A-4). Esta conducta se puede observar en forma gráfica en las trayectorias del movimiento de las ratas durante todos los ensayos (Figura 11 D y C) y fue virtualmente idéntica a la conducta expresada por los animales reportados anteriormente.

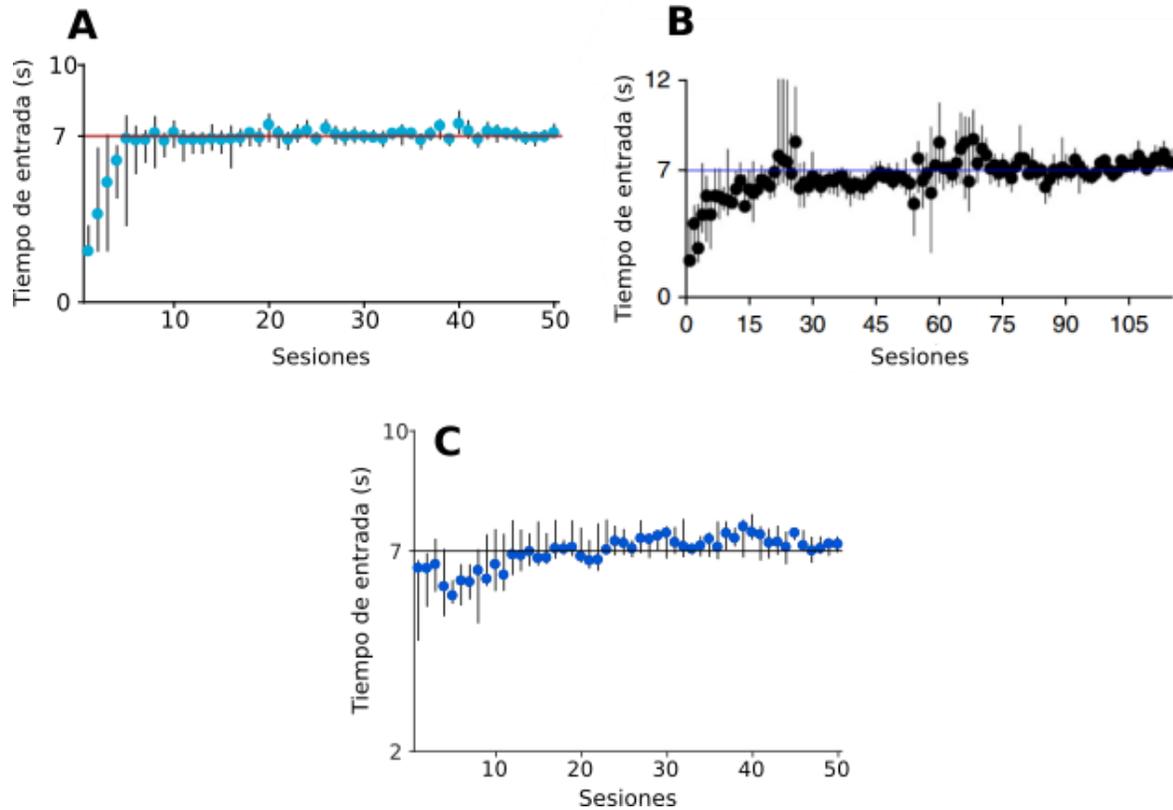


Figura 10. Tiempos de entrada a la zona de paro. A) Tiempos de entrada a la zona meta registrados en las primeras 50 sesiones de una rata representativa (mediana \pm primer y tercer cuartiles). B) Tiempos de entrada de una rata representativa registrados en el artículo original de la tarea representativa (mediana \pm primer y tercer cuartiles), tomado de Rueda-Orozco y Robbe (2015). C) Tiempos de entrada de todas las ratas entrenadas representativa (mediana \pm primer y tercer cuartiles).

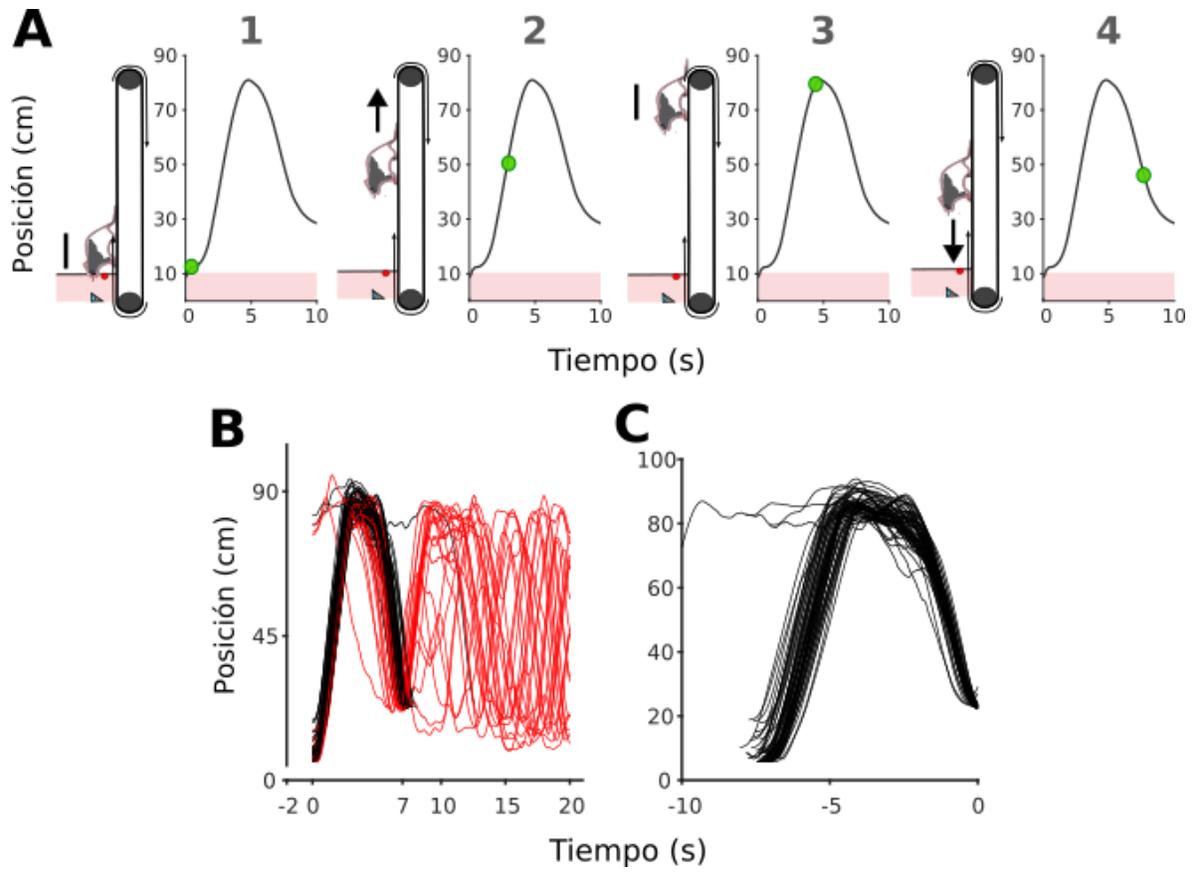


Figura 11. Secuencia estereotipada de la conducta y sus trayectorias. A) 1-4 Componentes de la conducta de los animales al realizar la secuencia de movimientos. Los ensayos inician con el animal al frente de la caminadora, (1) los animales se dejan llevar hasta la parte trasera de la caminadora por el movimiento natural de la banda (2); al llegar a la parte trasera mantienen su posición espacial corriendo a la velocidad de la banda (3) para finalmente ejecutar una aceleración controlada y llegar a la zona de reforzamiento (4). Los puntos verdes sobre la trayectoria representan la posición del animal en ese momento de la secuencia de movimientos. B) Trayectorias del movimiento de una rata en una sola sesión alineadas al inicio de los ensayos, las líneas en rojo representan los ensayos incorrectos y en negro los correctos, en C) se representan las mismas trayectorias (solo ensayos correctos), pero alineadas al final de la secuencia de movimientos. Observe la alta similitud de las trayectorias, indicativo de alto nivel de estereotipicidad.

Durante las primeras 50 sesiones los animales fueron entrenados con la caminadora moviéndose a una velocidad fija de 22 cm/s, una vez que los animales presentaron

una conducta estable se realizaron dos aumentos de velocidad constante a través de las sesiones. El primer cambio fue realizado después de la sesión 50 de entrenamiento, y fue de 22 cm/s a 26 cm/s. Esta velocidad se mantuvo constante entre 20 y 30 sesiones (91 ± 41 ensayos) después de las cuales se realizó el segundo cambio, de 26 cm/s a 30 cm/s. Algunos animales se rehusaron a correr a la velocidad más alta por lo que la velocidad se cambió a una menor en la que realizara la tarea correctamente (e.g. 29 cm/s).

Encontramos que a pesar de los cambios de velocidad las ratas eran capaces de adaptar su conducta prácticamente de forma inmediata durante los primeros ensayos de la primera sesión después del cambio, y mantenían esta conducta estable en todas las sesiones subsiguientes. Esto se puede observar en los tiempos de llegada desplegados en la Figura 12A y B. En este caso el incremento en la velocidad disminuyó ligeramente los tiempos de llegada, en promedio menos de 500 ms (Figura 12A), a pesar de esto los tiempos se mantuvieron por encima del tiempo meta (Figura 12B). Por esta razón, a pesar del cambio de velocidad, los sujetos mantuvieron el mismo porcentaje de respuestas correctas por sesión.

La variabilidad en los tiempos de llegada tampoco sufrió cambios significativos después del cambio de velocidad, como lo indica el estimado de los intervalos intercuartil (Figura 12C), o la varianza (Figura 12D), esta última sí mostró una disminución significativa en el último bloque.

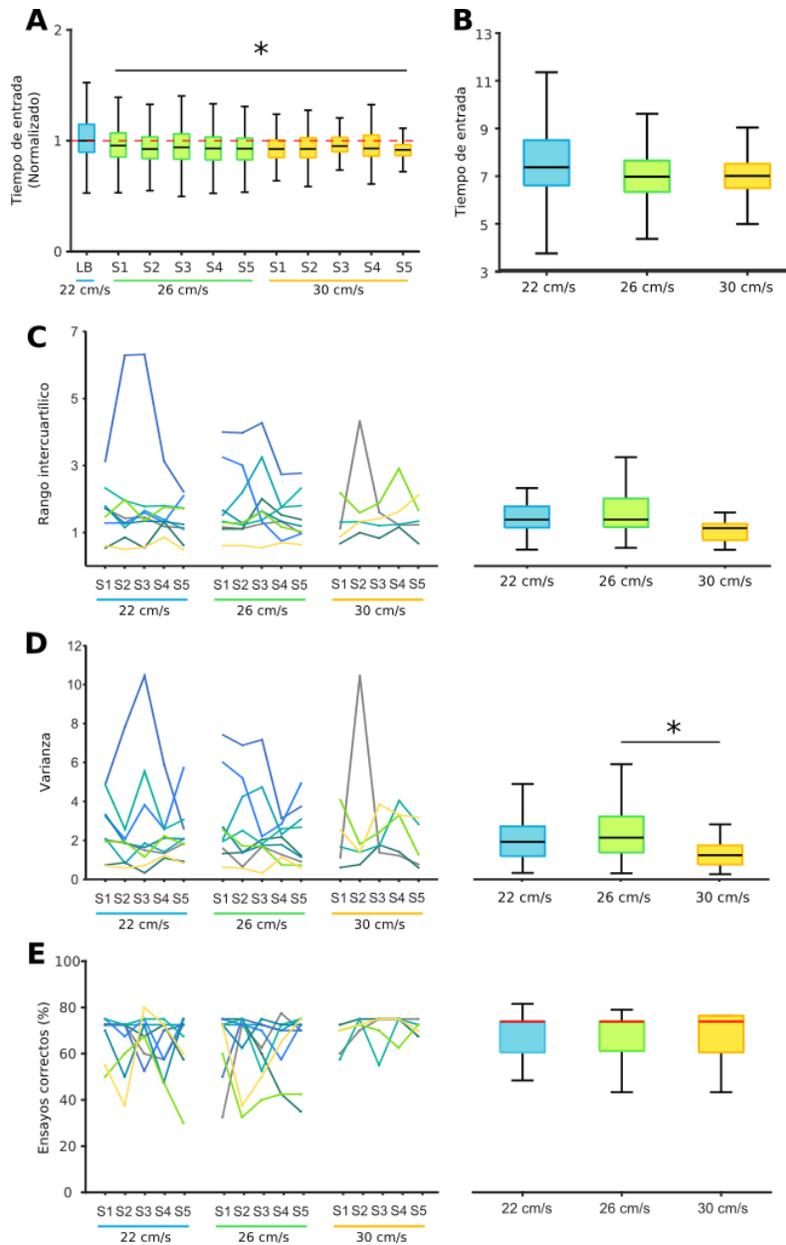


Figura 12. Conducta en diferentes velocidades constantes. En A) se observa en boxplots el tiempo de llegada normalizado de cinco días individuales después de los cambios de velocidad, en comparación con los últimos cinco días agrupados de la LB. En B) se grafica el tiempo de llegada sin normalizar de los primeros cinco días después del cambio de velocidad agrupados y la LB. En C), D) y E) se grafica el rango intercuartílico, la varianza y el tiempo de llegada respectivamente, en las gráficas de la izquierda se observan los animales individuales en los 5 primeros ensayos de cada velocidad, mientras que en las gráficas de la derecha se grafican las mismas variables, pero en boxplots por grupos de cada velocidad. Los asteriscos representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Todos juntos, estos primeros resultados indican que cuando se realiza un cambio en la velocidad los sujetos son capaces de adaptar rápidamente su conducta para mantener la eficiencia. Es de llamar la atención que los cambios en la velocidad de la caminador produjeron únicamente ligeros cambios en la variabilidad de la conducta y cambios en los tiempos de llegada en el rango de las decenas de milisegundos.

Los cambios realizados indican que los sujetos son capaces de adaptarse rápidamente, sin embargo, debido a que la velocidad se mantiene constante a lo largo de varias sesiones después del cambio, lo más probable es que los animales puedan predecir que las condiciones de velocidad serán constantes, lo cual descarta esta versión de la tarea para evaluar ajustes dinámicos en la velocidad, por ejemplo, de un ensayo a otro. Para evaluar esto, realizamos modificaciones en la velocidad de la caminadora de forma aleatoria y de ensayo a ensayo (ver métodos). De esta manera los sujetos no podrían predecir si el siguiente ensayo sería a un ensayo “rápido” o “lento” y por lo tanto deberían ajustar su velocidad ensayo tras ensayo. Para esto recolectamos ensayos a diferentes velocidades en varias sesiones diferentes para cada animal, el objetivo fue coleccionar al menos 300 ensayos para cada velocidad, por lo que en promedio coleccionamos información en por lo menos 20 sesiones para cada animal. Los datos fueron agrupados por velocidad sin importar la sesión en la que fueron coleccionados. Se graficó el tiempo de entrada de cada animal para todas las velocidades utilizadas. Sorprendentemente los cambios aleatorios de velocidad produjeron resultados similares a los obtenidos con el protocolo anterior. Encontramos que las ratas fueron capaces de adaptarse eficientemente a los cambios aleatorios de velocidad, con respecto a los tiempos de llegada, los nueve animales mantuvieron tiempos de llegada iguales en todas las velocidades (sin diferencias significativas; Figura 13A-I). A pesar de esto, también pudo observarse una ligera tendencia a tiempos de entrada más largos en los ensayos más rápidos (Figura 13J). Esta tendencia también se vio reflejada en el porcentaje de respuestas correctas calculado para cada velocidad (Figura 13K). De manera interesante, con excepción de un animal,

la variabilidad en los tiempos de entrada no sufrió cambios importantes en ninguna velocidad (Figura 13L).

Al igual que en el protocolo anterior, los cambios y variabilidad en los tiempos de entrada dependiendo de la velocidad nunca fueron mayores a 500ms, indicando que una vez que la secuencia de movimientos ha sido sobre-entrenada los animales son muy eficientes para ajustar la velocidad ante cambios permanentes o súbitos. La siguiente pregunta que nos planteamos fue, ¿cuál es la variable que los animales modifican para ajustar el tiempo de llegada? Debido a que todos los animales presentan una secuencia de movimientos estereotipada con etapas bien definidas (Figura 11), fue posible evaluar si los ajustes fueron el resultado de un cambio en la aceleración final (Figura 11A4) o en un parámetro temporal, como en el tiempo de espera en la parte posterior de la caminadora (Figura 11A-3).

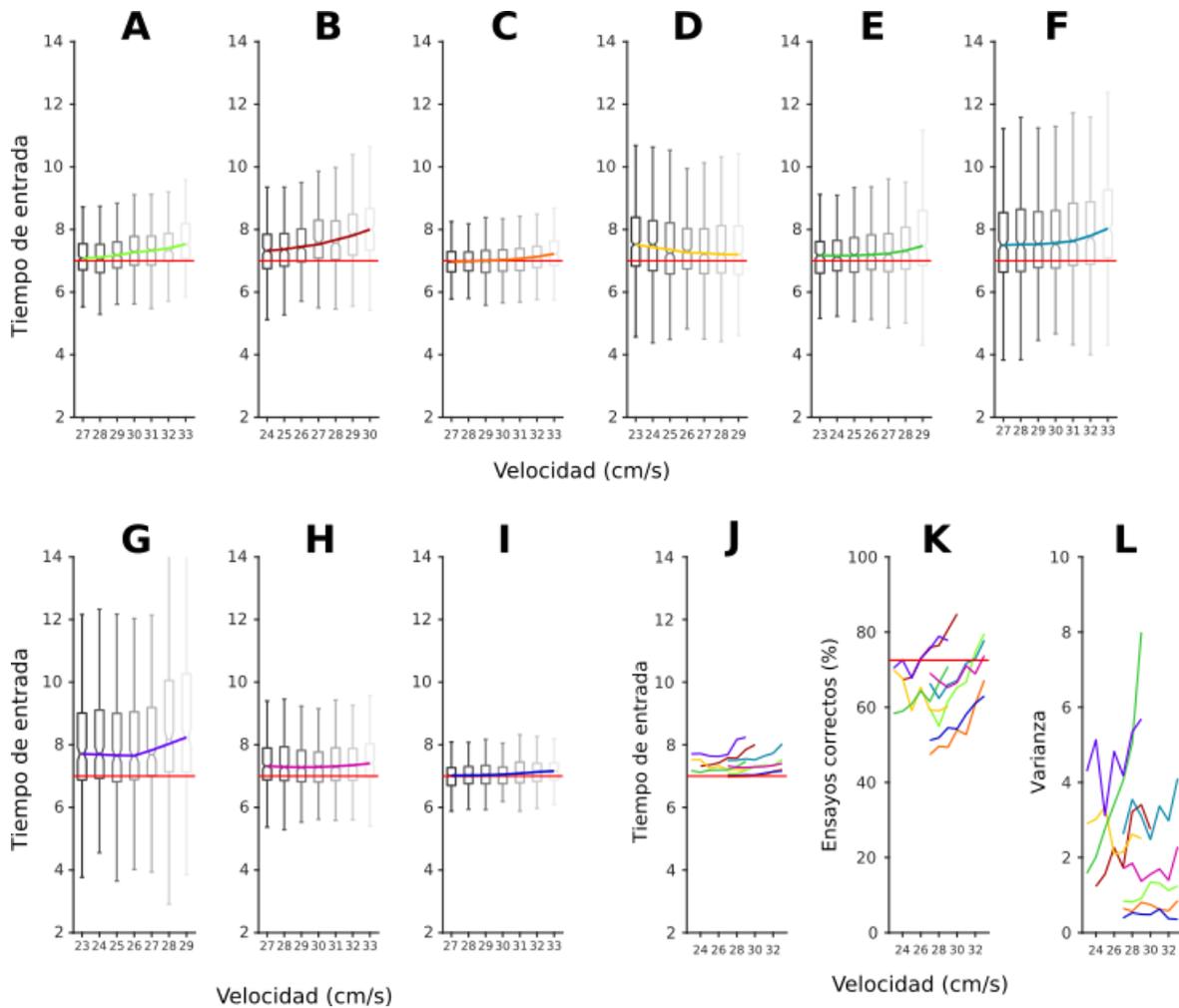


Figura 13. Conducta de los ensayos de cada velocidad aleatoria. De A) a I) se grafica el tiempo de entrada de todas las ratas individuales de acuerdo a las velocidades aleatorias en boxplots, las medias están marcadas por la línea. En J), K) y L) se grafica el tiempo de entrada, porcentaje de ensayos correctos y varianza respectivamente, de acuerdo a las velocidades aleatorias de todas las ratas, cada línea representa un animal diferente. En el anexo 1 se encuentran los valores P de las gráficas A-I.

Para evaluar estas posibilidades, analizamos las trayectorias de todos los ensayos a cada una de las velocidades (Figura 14). Al realizar una inspección visual de las gráficas, notamos que los animales pasaban siempre por el mismo lugar y siempre en el mismo momento a pesar de los cambios de velocidad. La ausencia de variabilidad en las trayectorias indica que el componente temporal de la ejecución

se mantiene estable en todas las fases de la secuencia de movimientos cuando el animal corre a diferentes velocidades. Este resultado solo podría explicarse por un ajuste en la velocidad, debido a que la primera fase es un desplazamiento pasivo (Figura 11A-2) automáticamente descarta un ajuste de la velocidad por parte del animal. Por otro lado, durante la etapa de mantenimiento en la parte trasera de la caminadora (Figura 11A-3), el animal realiza un ajuste a la velocidad a la que se mueve la caminadora, de otra manera sería imposible mantener la posición espacial. Finalmente, existe un ajuste final a la velocidad en la etapa de aceleración final, en este caso la única opción para que las trayectorias se sobrelapen es que el animal realice una aceleración directamente proporcional al cambio de velocidad de la caminadora. Para corroborar si efectivamente esta era la estrategia que utilizaban, se graficó el cambio de las velocidades y posición normalizadas de acuerdo a la velocidad base (Figura 15). Se encontró que, efectivamente, la velocidad de los animales aumenta conforme la velocidad de los ensayos aumenta mientras que la posición de la rata se mantiene constante.

En conclusión, nuestros datos indican que los animales hacen un ajuste en la aceleración final dependiendo del cambio de velocidad impuesta por la caminadora para mantener el patrón de conducta estereotipado espacial y temporalmente. Para analizar el papel del globo pálido externo en esta conducta realizamos las manipulaciones optogenéticas que se describen en las siguientes secciones.

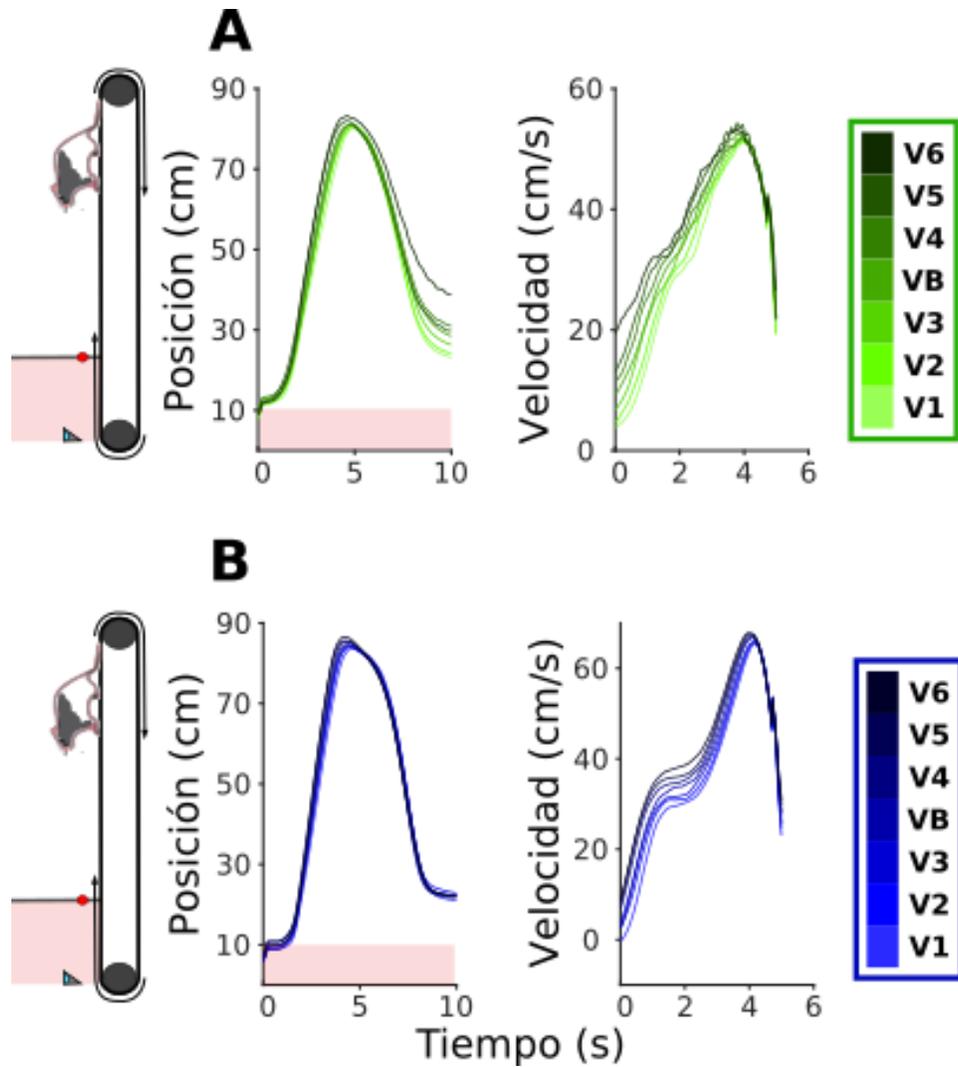


Figura 14. Trayectorias representativas de los animales en la tarea de velocidades aleatorias. En las gráficas de la izquierda el eje de las y representa la posición de la rata con respecto a la caminadora (en cm.), la línea sombreada roja representa la zona de paro, las trayectorias están alineadas de acuerdo al inicio del ensayo, nótese que la rata inicia en la parte delantera de la caminadora y después se deja llevar hacia atrás, debido a ello se considera que ese segmento de la trayectoria es movimiento pasivo. En las gráficas de la derecha el eje de las y representa la velocidad de la trayectoria las cuales fueron alineadas de acuerdo a ésta. Los trayectos de todas las ratas se pueden observar en el Anexo 2.

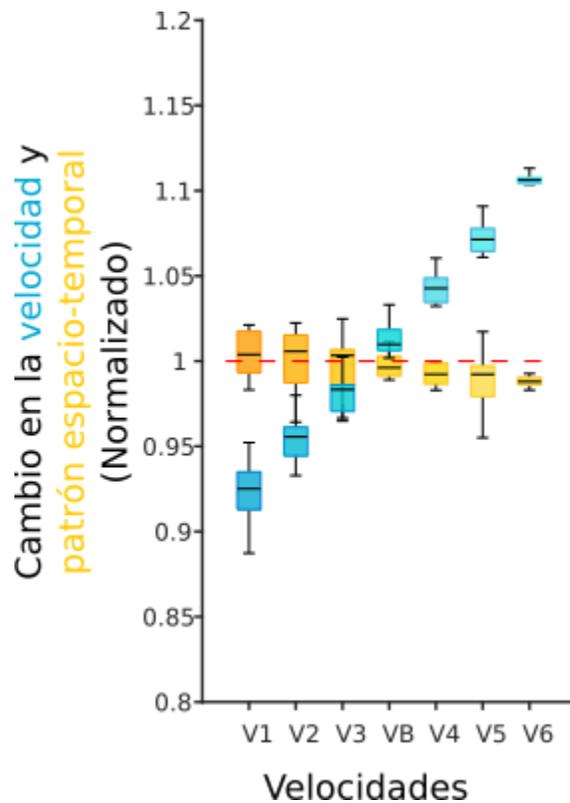


Figura 15. Relación de la velocidad y el patrón espacio-temporal. Se grafica el cambio de las velocidades (en azul) normalizadas a la velocidad base y en amarillo se grafica el cambio de la posición de la caminadora en los ensayos. No se tomó en cuenta el desplazamiento pasivo que realiza la rata al inicio del ensayo.

7.1. Resultados de los registros electrofisiológicos

El GPe en ratas es una estructura relativamente pequeña (aprox. 1 mm^3), por lo que antes de iniciar con los experimentos de infección y registros electrofisiológicos, realizamos algunas pruebas para asegurarnos de las mejores coordenadas estereotáxicas. Para esto inyectamos un trazador anterógrado (fluoro-Ruby) (Figura 16). Gracias a estas inyecciones pudimos determinar qué volúmenes de 1 microl en las siguientes coordenadas produjeron un buen marcaje en el GPe y sus fibras hacia la SNr.

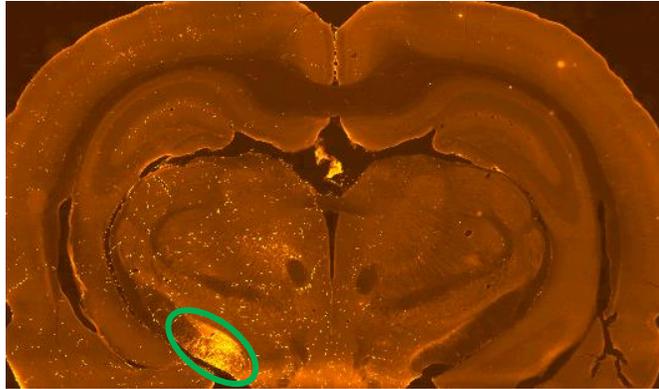


Figura 16. Inyección del trazador fluoro-Ruby en el GPe. Se muestran las proyecciones del GPe en la SNr.

Posteriormente se realizaron las infecciones y registros electrofisiológicos con el objetivo de modificar la actividad neuronal del GPe. Para ello se seleccionó un núcleo que proyectara al GPe, el estriado dorsolateral, y otro núcleo que recibiera proyecciones del GPe, la SNr. Se establecieron tres experimentos diferentes con estos núcleos:

- 1) Infección y estimulación en el estriado con registro en el GPe
- 2) Infección, estimulación y registro en el GPe
- 3) Infección, estimulación y registro en la SNr.

En la figura 17 se muestran los resultados histológicos que confirman que nuestras infecciones produjeron la expresión de opsinas en el GPe. También pueden observarse las terminales de estas células infectadas en las regiones de proyección del GPe. Finalmente, se muestra un ejemplo del tracto de los electrodos para registro en el GPe de un animal registrado.

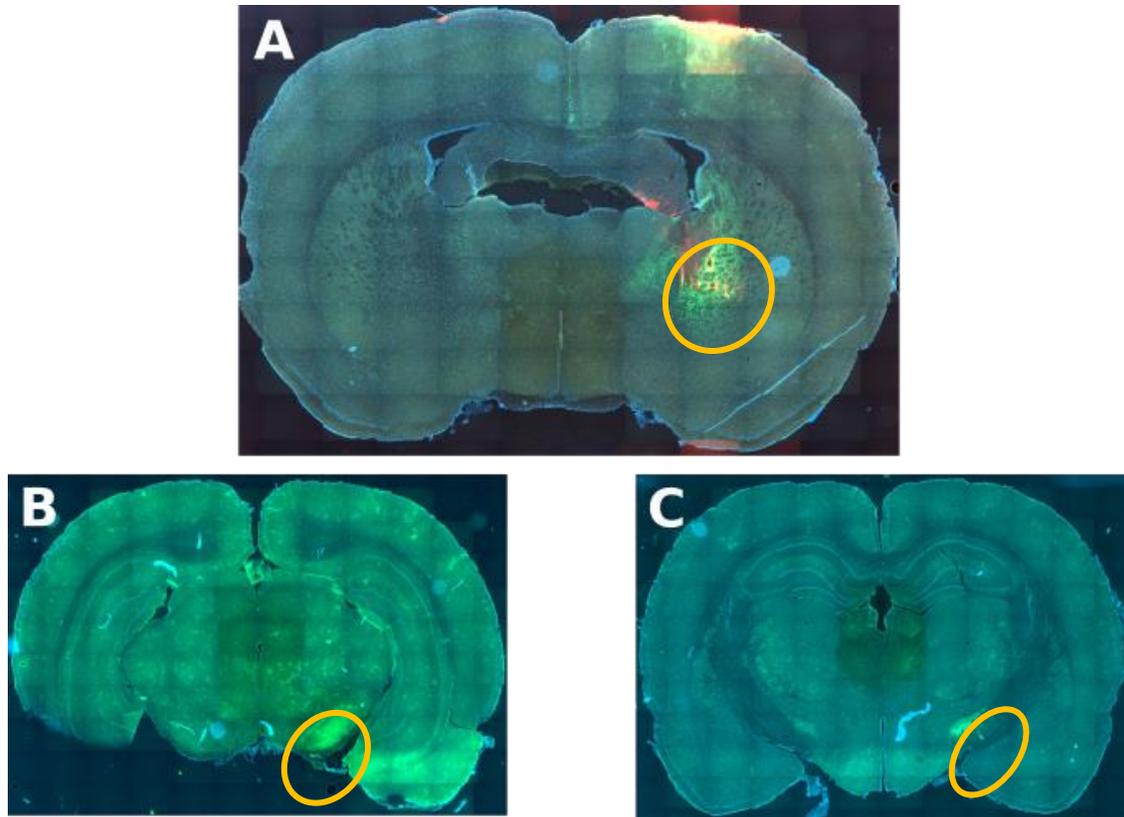


Figura 17. Expresión de la infección de canalrodopsina. En A se observa en verde la expresión de canalrodopsina en el GPe junto con el sitio de registro de la silicon probe en rojo. En B se observan las proyecciones del GPe a la SNr y en C hacia el NST.

En la Figura 18 se muestran los resultados de los registros electrofisiológicos con estimulación de canalrodopsina 2. En el experimento de estimulación del GPe y registro de la SNr se registraron 145 células de las cuales el 62% respondió ante la estimulación. Pudo observarse que al momento de aplicar la estimulación, ya sea continua o en trenes, la actividad de la SNr disminuye claramente, de manera que prácticamente toda la actividad desaparece (Figura 18 A-C). Cuando se estimuló el estriado y se registró el GPe se registraron 200 células de las cuales el 68% respondió, la actividad que se registró disminuyó en ambos protocolos, aunque en la estimulación continua en un inicio prácticamente desaparece toda la actividad y conforme la estimulación continúa aumenta la actividad (Figura 18 D - F). Por último, en la estimulación del GPe y registro en el mismo se registraron 162 células de las cuales el 82% respondió, y se observó aumento en la actividad siempre que se estimulaba sin importar el protocolo (Figura 18 G - H).

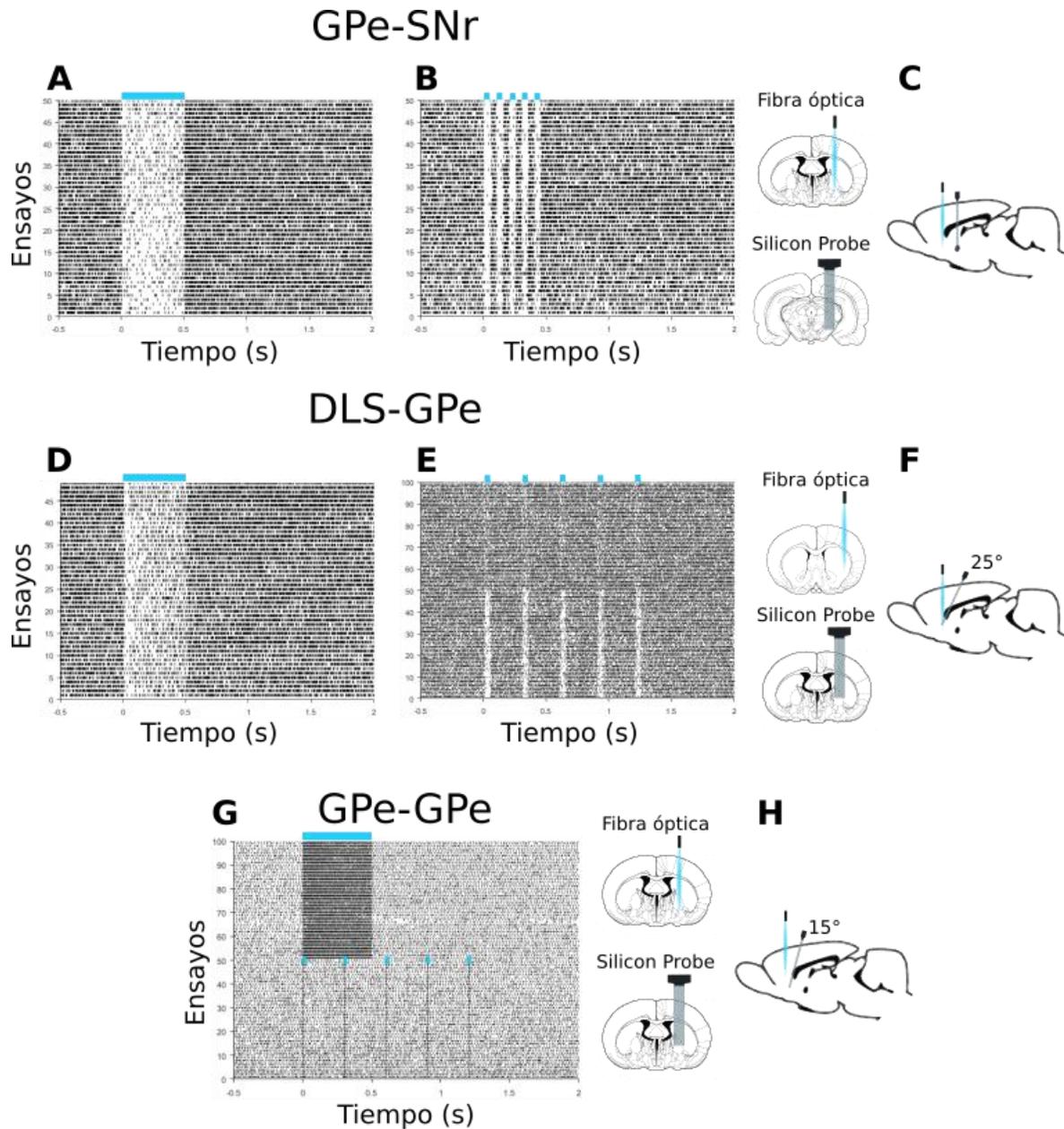


Figura 18. Graficas rasters de la actividad multiunitaria, junto con la representación gráfica del experimento. A), B), D), E) y G) Son graficas de los potenciales de acción registrados a lo largo de las sesiones de los protocolos, las barras azules indican estimulación optogenética durante ese periodo. C), F) y H) Son representaciones de la ubicación en cortes coronales donde la fibra y la silicon probe fueron posicionadas, a su vez se muestra un corte sagital para demostrar cómo se posicionaron ambas. Nótese que debido a la cercanía de los sitios de infección y registro en los experimentos F) y H) se tuvo que meter la silicon probe de manera angulada (25° y 15° respectivamente).

8.2 Estimulación optogenética del GPe durante la ejecución de la conducta

Una vez que se corroboró que los modelos conductual y optogenético eran viables, seleccionamos a dos ratas expertas en la tarea (> 100 sesiones de entrenamiento, > 25, 000 ensayos). Estos animales fueron infectados bilateralmente en el GPe con los mismos virus y se les implantaron fibras ópticas dirigidas al mismo núcleo. Después de su periodo de recuperación (10 días) e incubación y re-habitación (20 días), los animales fueron estimulados optogenéticamente mientras realizaban la tarea. En cada sesión se seleccionaron aleatoriamente 50% de los ensayos para ser estimulados. La estimulación fue continua y se aplicó desde el momento que los animales llegaban a la parte trasera de la caminadora y se continuó hasta el final de la secuencia de movimientos, esto con el objetivo de estimular únicamente cuando la rata se movía de manera activa (Figura 19A). En los ensayos en los que el animal cometía errores, la estimulación óptica se detenía cuando el animal ingresaba por primera vez en la zona meta.

Al comparar el promedio de las trayectorias estimuladas con las no estimuladas (Figura 19B) se pueden observar dos diferencias fundamentales, 1) en los ensayos estimulados los animales pasan más tiempo en la parte trasera de la caminadora, y 2) la última fase de la secuencia – la aceleración final (Figura 11A-4) – es virtualmente idéntica en ambos tipos de ensayos (Figura 19B). Para confirmar estas observaciones, primero cuantificamos las diferencias absolutas entre las trayectorias producidas en cada ensayo a diferentes velocidades y comparamos estos resultados con el promedio de las trayectorias producidas en los ensayos a la velocidad basal. De esta manera, si una trayectoria es muy diferente a la trayectoria basal la diferencia entre ambas será diferente a 1, para los ensayos donde las trayectorias sean más cortas los valores estarán por debajo de 1, mientras que en las trayectorias más largas los valores estarán por encima de 1. En ambos animales, las trayectorias con el componente de la posición producidas en ensayos estimulados fueron siempre mayores a las trayectorias basales (Figura 19 Ci, Ciii). En comparación, el componente de la velocidad no se vio afectado por la

estimulación, los animales fueron capaces de compensar todos los cambios de velocidad (Figura 19 Cii, Civ).

En conjunto, los experimentos de estimulación optogenética en GPe muestran que la activación de este núcleo durante la ejecución de ajustes a la velocidad afecta principalmente el momento en que los animales comienzan a ejecutar la última fase de la secuencia de movimientos (pasan más tiempo en la parte trasera de la caminadora), pero una vez que esta fase ha comenzado los parámetros cinemáticos de la misma no cambian. Estos datos sugieren que la vía indirecta estaría implicada en el momento en que los animales inician la última aceleración de la secuencia de movimientos, pero no en el control momento a momento de la misma.

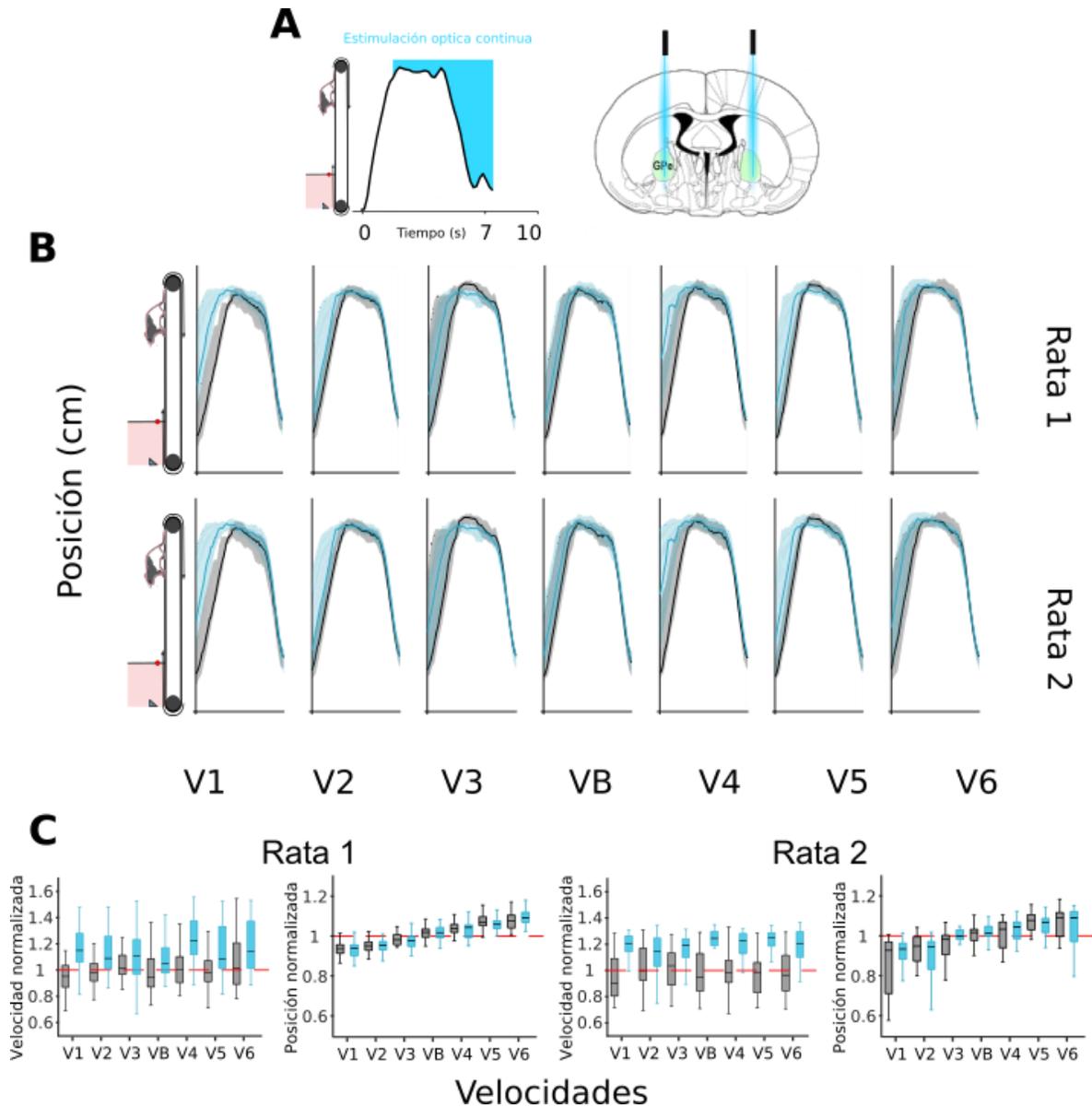


Figura 19. La manipulación optogenética del GPe afecta el componente temporal pero no la velocidad. En A) se representa gráficamente el protocolo de estimulación utilizado (izquierda) y el lugar en el que se estimuló e implantó la fibra (derecha), en azul se representa la estimulación optogenética con luz azul. En B) se muestra el promedio de todas las trayectorias correspondientes a cada velocidad, para cada animal, en azul se muestran los ensayos estimulados y en gris los no estimulados. En C) se grafica para ambas ratas el cambio de las velocidades normalizadas a la velocidad base y el cambio de la posición normalizado a la posición de la velocidad base, tanto para ensayos estimulados (azul) como no estimulados (gris).

9. Discusión y conclusiones

El aprendizaje de la tarea de integración velocidad-tiempo-espacio es evidente y las ratas aprenden la tarea de manera precisa, una vez aprendida la tarea correctamente las ratas llegan con gran exactitud a la zona de reforzamiento (Figura 10C), con milisegundos de diferencia al tiempo meta. Los cambios a velocidades constantes no impiden a las ratas realizar la tarea correctamente y su adaptación a ellos fue rápida, se puede observar que desde el primer día de cambio la mayoría de las ratas se adaptan (Figura 12A) e incluso conforme pasan las sesiones va disminuyendo la variabilidad de su conducta, lo que indica que se vuelven más expertas en la tarea (Figura 12D).

Por otro lado, se observa que aunque las ratas realizan correctamente la tarea, su percepción del tiempo se altera sutilmente, esto se puede apreciar en el protocolo de velocidades aleatorias, en el cual se observa de manera clara una relación entre el aumento del tiempo de llegada y velocidad (Figura 13), lo cual muestra que las ratas tienden a sobreestimar el tiempo de llegada conforme aumenta la velocidad, estos resultados concuerdan con una teoría que se ha propuesto respecto a los parámetros cinéticos de los GB, la cual se ha referido como “Compensación de la velocidad y precisión”, Thura y Cisek (2017) con respecto a esta teoría demostraron, en monos, que en tareas en las cuales es necesario tomar una decisión rápidamente la precisión de la conducta disminuye mientras que cuando hay mayor tiempo de deliberación para realizar la conducta ésta se vuelve más precisa, de manera similar en nuestros resultados se observó que, conforme la velocidad aumenta las ratas pierden precisión en el desempeño de la tarea y sobreestiman el tiempo de llegada. Con respecto a este mismo protocolo, los resultados de las gráficas normalizadas a la velocidad base demuestran que las ratas ajustan su velocidad para poder seguir una trayectoria espacial prácticamente idéntica (Figura 14), las trayectorias que no se ajustaban perfectamente con las demás eran velocidades altas, las cuales se aproximaban a velocidades en las que algunos animales se rehusaban a correr, posiblemente debido a su similitud con las velocidades que se les dificultaban podría ser una explicación del porqué estas trayectorias difieren de

las demás. De acuerdo a los resultados expuestos en la Figura 15, una vez que los animales han desarrollado un patrón conductual estereotipado sobre-entrenado, y los sujetos son sometidos a cambios impredecibles de la velocidad de la caminadora, estos tienden a ajustar su velocidad de tal manera que el patrón espacio-temporal de la secuencia de movimientos se mantiene prácticamente sin cambios en las diferentes velocidades.

En general, estos resultados indican que la tarea conductual es eficiente para evaluar cambios espaciotemporales, la cuasi perfección que muestran la mayoría de las ratas en sus trayectorias permite distinguir claramente los efectos de una disrupción en la representación temporal o espacial de las ratas, el desplazamiento de las curvas de las trayectorias del movimiento sirve como un indicador para averiguar qué componente del movimiento se ve afectado.

Para poder modificar la actividad del núcleo GPe, en este proyecto nos propusimos adicionalmente y de manera paralela al modelo conductual establecer un protocolo de estimulación optogenética en animal anestesiado. La estimulación realizada en animales a quienes se les expresó el receptor canalrodopsina, en el GPe y estriado, provocó aumento del disparo neuronal tanto para el protocolo de estimulación continua (Figura 18 A,D,G), como en el de estimulación en trenes (Figura 18 B,C,G), esto significa que es posible inhibir de manera indirecta la actividad neuronal del GPe mediante sus proyecciones estriales y aumentar la actividad neuronal del GPe al estimularlo directamente, a su vez la estimulación del GPe tal como se ha descrito mediante sus proyecciones gabaérgicas inhibe la actividad neuronal del núcleo de salida, la SNr (Figura 18 A y B).

Por último, la estimulación en libre movimiento concluyó que la activación del GPe no afecta la velocidad del movimiento de los animales, debido a que no hay diferencias con el ajuste de la velocidad en la trayectoria final, sin embargo, en los ensayos estimulados se modifica el tiempo de iniciación de la secuencia de movimientos; se observó que los animales seguían realizando la misma secuencia estereotipada de movimientos, pero los animales iniciaban la secuencia antes que los ensayos control, por ende al graficar las diferencias de la posición y velocidad

normalizadas se aprecian diferencias en la posición pero las velocidades muestran una línea continua.

Estos resultados van de acuerdo con la teoría clásica de la facilitación e inhibición motora de los GB, de acuerdo a la cual la activación de la vía directa aumentaría la actividad del GPe lo cual resultaría en la iniciación y aumento de los movimientos. La estimulación continua del GPe no aumentó los movimientos a pesar de que se mantuvo constantemente hasta el término de los ensayos, únicamente se vio afectado el inicio de los movimientos, esto podría ser debido a que nuestra tarea consiste en una secuencia de movimientos sobre aprendidos y estereotipados por lo que ya se habría establecido un hábito motor.

Los resultados fueron diferentes a lo esperado, sin embargo, nos ayuda a dilucidar información nueva sobre el papel del GPe durante la realización de movimientos, en futuros proyectos sería necesario explorar el efecto de la inhibición del GPe durante la tarea; de acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto se esperaría que la inhibición del GPe provocara que la secuencia de movimientos se retrasara a comparación de los controles. A su vez sería interesante corroborar si se obtendrían los mismos resultados al estimular las neuronas de vía directa e indirecta únicamente en lugar de un núcleo exclusivamente.

10. Referencias

- Aceves, J. J., Rueda-orozco, P. E., Hernandez-martinez, R., Galarraga, E., & Bargas, J. (2011). Bidirectional plasticity in striatonigral synapses : A switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways, 764–773.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Arkadir, D. (2004). Independent Coding of Movement Direction and Reward Prediction by Single Pallidal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(45), 10047–10056. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2583-04.2004>
- Ashby, F. G., Turner, B. O., & Horvitz, J. C. (2010). Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(5), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.02.001>.Cortical
- Bogenpohl, J., Galvan, A., Hu, X., Wichmann, T., & Smith, Y. (2013). Metabotropic glutamate receptor 4 in the basal ganglia of parkinsonian monkeys: Ultrastructural localization and electrophysiological effects of activation in the striatopallidal complex. *Neuropharmacology*, 66, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.017>
- Chan, C. S., Glajch, K. E., Gertler, T. S., Guzman, J. N., Mercer, J. N., Lewis, A. S., ... Surmeier, D. J. (2011). HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 14(1), 85–92. <https://doi.org/10.1038/nn.2692>.HCN
- Chan, C. S., Hegeman, D. J., Hong, E. S., & Hern, V. M. (2016). The external globus pallidus : progress and perspectives. *European Journal of Neuroscience*, 43(10), 1239–1265. <https://doi.org/10.1111/ejn.13196>
- Cooper, A. J., & Stanford, I. M. (2002). Calbindin D-28k positive projection neurones and calretinin positive interneurons of the rat globus pallidus. *Brain Research*, 929(2), 243–251. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03263-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03263-2)

- Cruz, A. V., Mallet, N., Magill, P. J., Brown, P., & Averbeck, B. B. (2009). Effects of Dopamine Depletion on Network Entropy in the External Globus Pallidus. *Journal of Neurophysiology*, *102*(2), 1092–1102. <https://doi.org/10.1152/jn.00344.2009>
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, *13*(7), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V)
- Desmurget, M., & Turner, R. S. (2010). Motor Sequences and the Basal Ganglia: Kinematics, Not Habits. *Journal of Neuroscience*, *30*(22), 7685–7690. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0163-10.2010>
- Dudman, J. T., & Krakauer, J. W. (2016). The basal ganglia: From motor commands to the control of vigor. *Current Opinion in Neurobiology*, *37*, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.02.005>
- Elias, S., Joshua, M., Goldberg, J. A., Heimer, G., Arkadir, D., Morris, G., & Bergman, H. (2007). Statistical Properties of Pauses of the High-Frequency Discharge Neurons in the External Segment of the Globus Pallidus. *Journal of Neuroscience*, *27*(10), 2525–2538. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4156-06.2007>
- François, C., Grabli, D., McCairn, K., Jan, C., Karachi, C., Hirsch, E. C., ... Tremblay, L. (2004). Behavioural disorders induced by external globus pallidus dysfunction in primates II. Anatomical study. *Brain*, *127*(9), 2055–2070. <https://doi.org/10.1093/brain/awh239>
- Georgopoulos, a P., DeLong, M. R., & Crutcher, M. D. (1983). Relations between parameters of step-tracking movements and single cell discharge in the globus pallidus and subthalamic nucleus of the behaving monkey. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *3*(8), 1586–1598. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-08-01586.1983>
- Gittis, A. H., Berke, J. D., Bevan, M. D., Chan, C. S., Mallet, N., Morrow, M. M., & Schmidt, R. (2014). New Roles for the External Globus Pallidus in Basal

- Ganglia Circuits and Behavior. *Journal of Neuroscience*, 34(46), 15178–15183. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3252-14.2014>
- Grillner, S., Hellgren, J., Ménard, A., Saitoh, K., & Wikström, M. A. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs - Roles for the striatum and pallidum. *Trends in Neurosciences*, 28(7), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.05.004>
- Hamada, I., DeLong, M. R., & Mano, N. (1990). Activity of identified wrist-related pallidal neurons during step and ramp wrist movements in the monkey. *J.Neurophysiol.*, 64(0022–3077 (Print)), 1892–1906. <https://doi.org/10.1152/jn.1990.64.6.1892>
- Ho, A. K., Gilbert, A. S., Mason, S. L., Goodman, A. O., & Barker, R. A. (2009). Health-Related Quality of Life in Huntington ' s Disease : Which Factors Matter Most ?, 24(4), 574–578. <https://doi.org/10.1002/mds.22412>
- Houk, J. C. (2011). Action selection and refinement in subcortical loops through basal ganglia and cerebellum. *Modelling Natural Action Selection*, (April), 176–207. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511731525.014>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science. Neurology* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1036/0838577016>
- Kita, H. (2007). Globus pallidus external segment. *Progress in Brain Research*, 160(06), 111–133. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60007-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60007-1)
- Kravitz, A. V., Benjamin S. Freeze, Philip R. L. Parker, Kenneth Kay, M. T. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, & A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Lanciego, L., Luquin, N., & Obeso, A. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a009621.
- Mallet, N., Micklem, B. R., Henny, P., Brown, M. T., Williams, C., Bolam, J. P., ... Magill, P. J. (2012). Dichotomous Organization of the External Globus

- Pallidus. *Neuron*, 74(6), 1075–1086.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.027>
- Mallet, N., Pogosyan, A., Marton, L. F., Bolam, J. P., Brown, P., & Magill, P. J. (2008). Parkinsonian Beta Oscillations in the External Globus Pallidus and Their Relationship with Subthalamic Nucleus Activity. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14245–14258.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4199-08.2008>
- Marsden, C. (1982). The mysterious motor function of the basal ganglia. *Neurology*, 32(5), 514–39. Retrieved from
<http://n.neurology.org/content/32/5/514.abstract>
- Matsumura, M., Tremblay, L., Richard, H., & Fillion, M. (1995). Activity of pallidal neurons in the monkey during dyskinesia induced by injection of bicuculline in the external pallidum. *Neuroscience*, 65(1), 59–70.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00484-M](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00484-M)
- Mattis, J., Tye, K. M., Ferenczi, E. A., Ramakrishnan, C., O’Shea, D. J., Prakash, R., ... Deisseroth, K. (2012). Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nature Methods*, 9(2), 159–172. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1808>
- Ni, R.-J., Huang, Z.-H., Shu, Y.-M., Wang, Y., Li, T., & Zhou, J.-N. (2018). Atlas of the Striatum and Globus Pallidus in the Tree Shrew: Comparison with Rat and Mouse. *Neuroscience Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0212-z>
- Panigrahi, B., Martin, K. A., Li, Y., Graves, A. R., Vollmer, A., Olson, L., ... Dudman, J. T. (2015). Dopamine Is Required for the Neural Representation and Control of Movement Vigor. *Cell*, 162(6), 1418–1430.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.014>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2014). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Seventh Edition. *Elsevier Academic Press*, 170, 547–612.
- Reiner, A. (2010). *Handbook of basal ganglia structure and function. Handbook of*

basal ganglia structure and function. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374767-9.00002-0>

- Rueda-Orozco, P. E., & Robbe, D. (2015). The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nature Neuroscience*, *18*(3), 453–462. <https://doi.org/10.1038/nn.3924>
- Schechtman, E., Noblejas, M. I., Mizrahi, A. D., Dauber, O., & Bergman, H. (2016). Pallidal spiking activity reflects learning dynamics and predicts performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(41), E6281–E6289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612392113>
- Schmidt, R., Leventhal, D. K., Mallet, N., Chen, F., & Berke, J. D. (2013). Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nature Neuroscience*, *16*(8), 1118–1124. <https://doi.org/10.1038/nn.3456>
- Schrag, A., Jahanshahi, M., & Quinn, N. (2000). How Does Parkinson ' s Disease Affect Quality of Life ? A Comparison With Quality of Life in the General Population, *15*(6), 1112–1118.
- Taverna, S., Ilijic, E., & Surmeier, D. J. (2008). Recurrent Collateral Connections of Striatal Medium Spiny Neurons Are Disrupted in Models of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, *28*(21), 5504–5512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5493-07.2008>
- Thura, D., & Cisek, P. (2017). The Basal Ganglia Do Not Select Reach Targets but Control the Urgency of Commitment. *Neuron*, *95*(5), 1160–1170.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.039>
- Turner, R. S., & Anderson, M. E. (1997). Pallidal discharge related to the kinematics of reaching movements in two dimensions. *Journal of Neurophysiology*, *77*(3), 1051–1074.
- Vitek, J. L., Hashimoto, T., Peoples, J., DeLong, M. R., & Bakay, R. A. E. (2004). Acute stimulation in the external segment of the globus pallidus improves parkinsonian motor signs. *Movement Disorders*, *19*(8), 907–915.

<https://doi.org/10.1002/mds.20137>

Yelnik, J., Damier, P., Bejjani, B. P., Francois, C., Gervais, D., Dormont, D., ...

Agid, Y. (2000). Functional mapping of the human globus pallidus: Contrasting effect of stimulation in the internal and external pallidum in Parkinson's disease. *Neuroscience*, *101*(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00364-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00364-X)

Yttri, E. A., & Dudman, J. T. (2016). Opponent and bidirectional control of movement velocity in the basal ganglia. *Nature*, *533*, 402–406.

<https://doi.org/10.1038/nature17639>

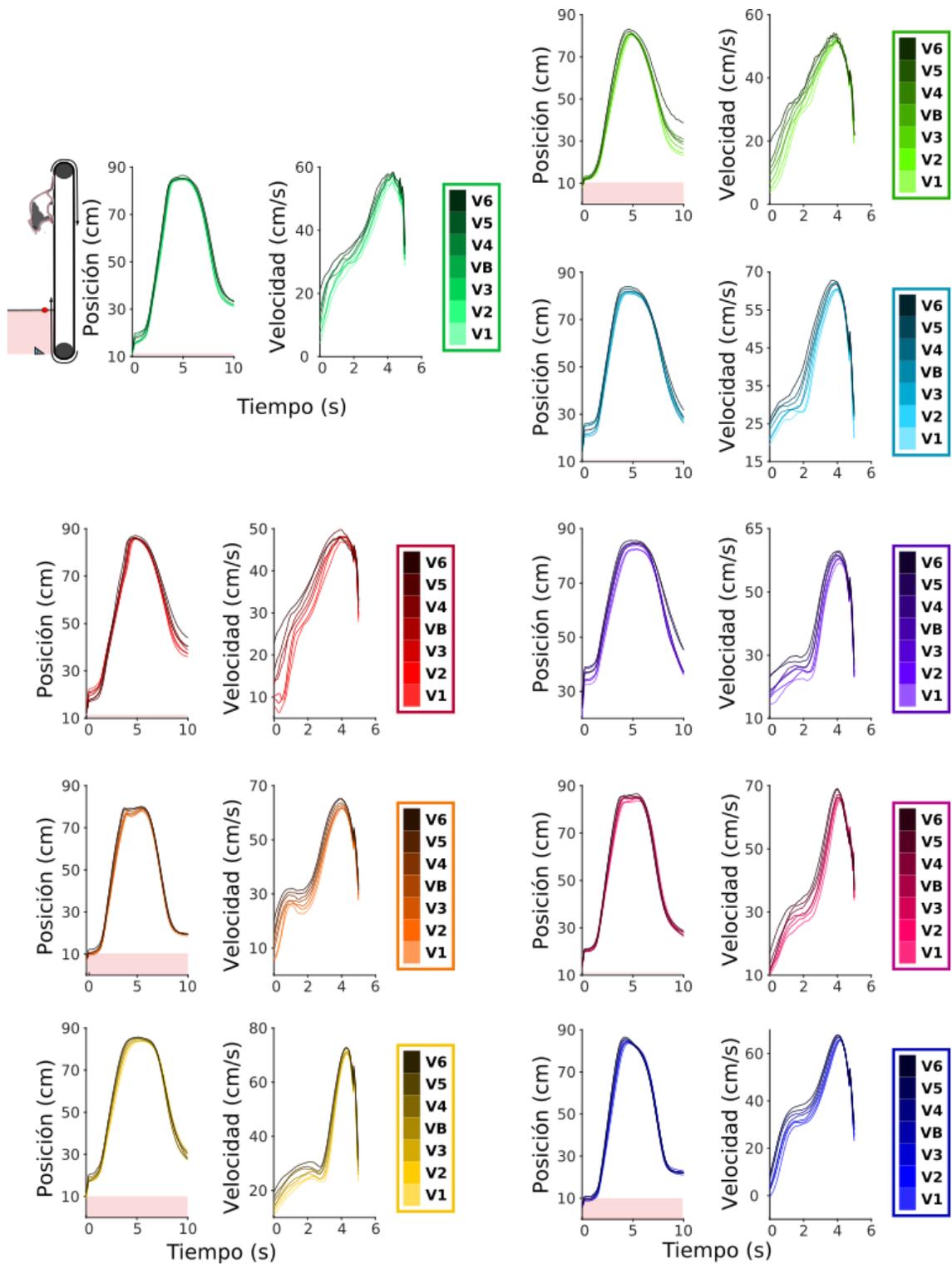
11. Anexos

A			B			C			D		
Corrección de Bonferroni											
Grupos comparados		Valor P									
V1	V2	1									
V1	V3	1	V1	V3	1	V1	V3	1	V1	V3	0.021
V1	V4	0.038	V1	V4	0.001	V1	V4	0.817	V1	V4	0.236
V1	V5	0.005	V1	V5	0.001	V1	V5	0.331	V1	V5	< 0.001
V1	V6	< 0.001	V1	V6	< 0.001	V1	V6	< 0.001	V1	V6	0.003
V2	V3	0.914	V2	V3	1	V2	V3	1	V2	V3	0.017
V2	V4	0.003	V2	V4	0.017	V2	V4	1	V2	V4	1
V2	V5	< 0.001	V2	V5	0.014	V2	V5	1	V2	V5	0.013
V2	V6	< 0.001	V2	V6	< 0.001	V2	V6	< 0.001	V2	V6	0.085
V3	V4	0.568	V3	V4	0.598	V3	V4	1	V3	V4	0.303
V3	V5	0.017	V3	V5	0.522	V3	V5	1	V3	V5	1
V3	V6	< 0.001	V3	V6	< 0.001	V3	V6	0.001	V3	V6	1
V4	V5	1									
V4	V6	0.007	V4	V6	0.472	V4	V6	0.138	V4	V6	1
V5	V6	0.254	V5	V6	0.003	V5	V6	< 0.001	V5	V6	1

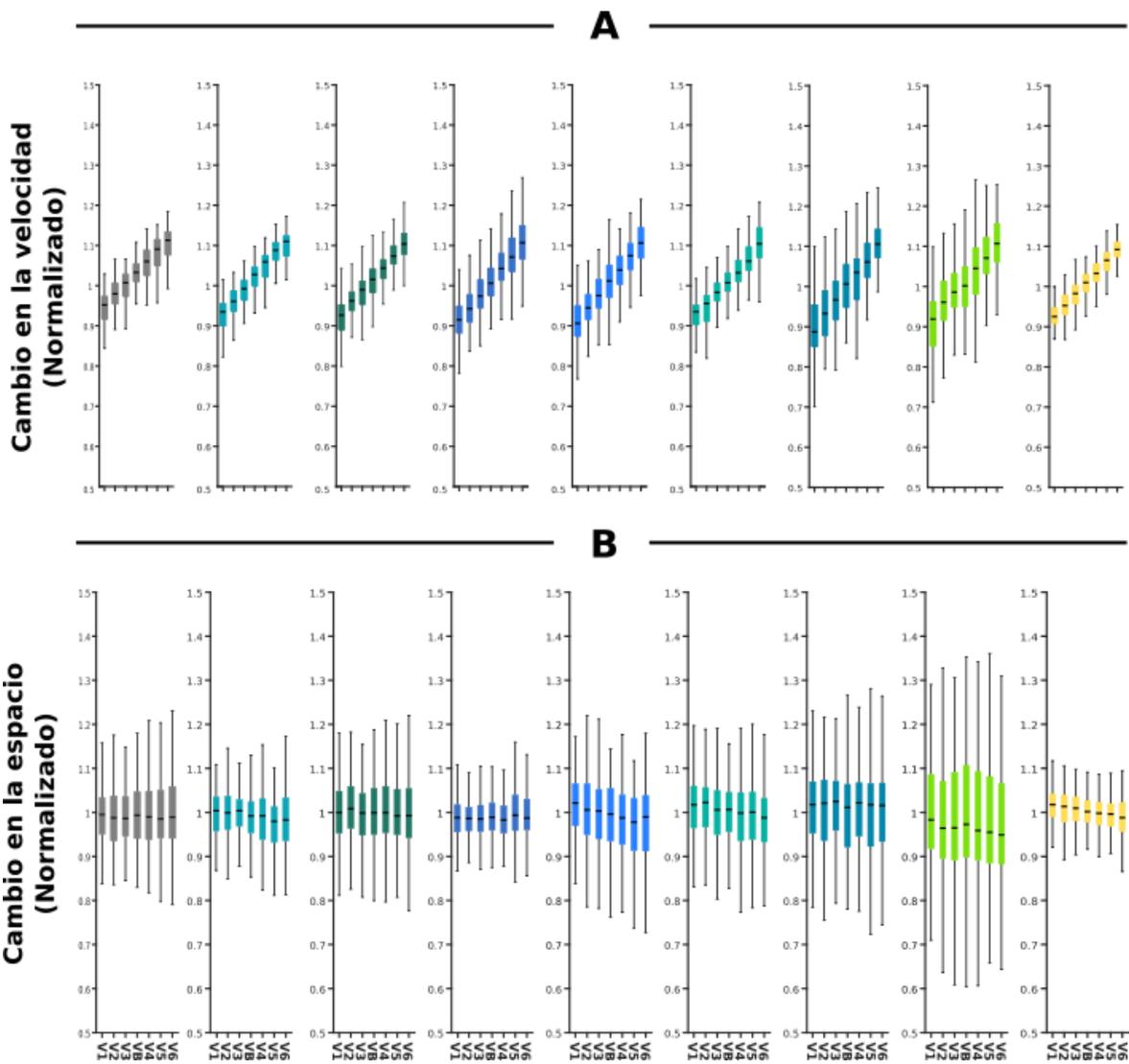
E			F			G		
Corrección de Bonferroni			Corrección de Bonferroni			Corrección de Bonferroni		
Grupos comparados		Valor P	Grupos comparados		Valor P	Grupos comparados		Valor P
V1	V2	1	V1	V2	1	V1	V2	1
V1	V3	1	V1	V3	1	V1	V3	1
V1	V4	0.607	V1	V4	1	V1	V4	1
V1	V5	0.91	V1	V5	0.29	V1	V5	0.004
V1	V6	< 0.001	V1	V6	< 0.001	V1	V6	0.001
V2	V3	1	V2	V3	1	V2	V3	1
V2	V4	1	V2	V4	0.881	V2	V4	1
V2	V5	0.204	V2	V5	0.216	V2	V5	0.047
V2	V6	< 0.001	V2	V6	< 0.001	V2	V6	0.015
V3	V4	1	V3	V4	1	V3	V4	1
V3	V5	1	V3	V5	1	V3	V5	0.002
V3	V6	< 0.001	V3	V6	< 0.001	V3	V6	< 0.001
V4	V5	1	V4	V5	1	V4	V5	1
V4	V6	0.014	V4	V6	< 0.001	V4	V6	0.025
V5	V6	0.302	V5	V6	0.4	V5	V6	0.007

H			I		
Corrección de Bonferroni			Corrección de Bonferroni		
Grupos comparados		Valor P	Grupos comparados		Valor P
V1	V2	1	V1	V2	1
V1	V3	1	V1	V3	1
V1	V4	1	V1	V4	0.151
V1	V5	1	V1	V5	0.002
V1	V6	0.672	V1	V6	< 0.001
V2	V3	1	V2	V3	1
V2	V4	1	V2	V4	1
V2	V5	1	V2	V5	0.063
V2	V6	0.287	V2	V6	0.005
V3	V4	1	V3	V4	1
V3	V5	1	V3	V5	0.409
V3	V6	0.052	V3	V6	0.054
V4	V5	1	V4	V5	1
V4	V6	0.033	V4	V6	0.09
V5	V6	1	V5	V6	0.008

Anexo 1. Valores P del test de Bonferroni. Los índices son correspondientes a los de la Figura 14. Los valores P sombreados son significativos.



Anexo 2. Trayectorias individuales de todas las ratas. Las trayectorias del lado izquierdo están alineadas al inicio de los ensayos, las de la derecha están alineadas al termino de los ensayos. Los ensayos comienzan con la rata posicionada al frente de la caminadora.



Anexo 3. Graficas de todas las ratas. A) Cambio, en las diferentes velocidades, de la velocidad de los animales normalizado con respecto a la velocidad basal en que corría el animal. B) Cambio, en las diferentes velocidades, del espacio (posición del animal) normalizado con respecto a la velocidad basal en que corría el animal.