



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

• • •

**Inhibición optogenética de las neuronas estriatales
sobre el reforzamiento de una acción y sobre la
locomoción:
estriado dorsomedial versus dorsolateral**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARGELIA ITZEL LLANOS MORENO



DIRECTOR DE TESIS:

DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR

CIUDAD DE MÉXICO, 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.

1. Datos del alumno

Llanos
Moreno
Argelia Itzel
56 79 80 84
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
309242144

2. Datos del tutor

Dr.
Fatuel
Tecuepetla
Aguilar

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Violeta Gisselle
López
Huerta

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Alonso
Martínez
Canabal

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Leticia
Ramírez
Lugo

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Josué Orlando
Ramírez
Jarquín

7. Datos del trabajo escrito

Inhibición optogenética de las neuronas estriatales sobre el reforzamiento de una acción y sobre la locomoción: estriado dorsomedial vs dorsolateral
48 p
2019

Agradecimientos Académicos

El reciente trabajo se realizó en el laboratorio de sub-circuitos neuronales, perteneciente al departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, división de neurociencias.

El desarrollo de este proyecto fue gracias al apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Ciencia Básica 220412 y Fronteras de la ciencia 2022. Así como los donativos por parte del programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA) IA200815 y IN226517.

Agradezco a mi tutor, Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar, por la oportunidad de formar parte su laboratorio, por la confianza y forjarme en el ámbito académico, así como por compartir sus conocimientos.

A mis sinodales que forman parte de este trabajo por su apoyo y asesorías, la Dra. Violeta Gisselle López Huerta, el Dr. Alonso Martínez Canabal, la Dra Leticia Ramírez Lugo y el Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, por su asistencia técnica en la manipulación de líneas de ratones transgénicos y en herramientas de biología molecular, para la realización de este trabajo. Así como a la M. C. Yiatziri Valdéz Fernández y Elia Jaimes Castelán.

A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por su apoyo y ayuda en la obtención de imágenes de microscopía confocal y apoyo académico. A la Dra. Ruth Rincón Heredia por la ayuda en la obtención de imágenes de microscopía de epiflorecencia.

A la M en IBB Gabriela Xóchitl Ayala Méndez, la Dra. Ariadna Aparicio Juárez, a la Dra. Claudia Rivera Cerecedo y al Dr. Héctor Malagón Rivero por su apoyo en el cuidado y reproducción de los animales del bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

Contenido

Abreviaturas	6
Resumen	7
1 Introducción	8
2 Antecedentes	10
2.1 Los ganglios basales	10
2.2 Las vías de interconexión de los GB: vía directa y vía indirecta....	11
2.3 Modelos funcionales de los GB: Modelo Antagónico vs Modelo Cooperativo	13
2.4 Compartimentos estriatales: DLS y DMS.....	14
2.5 Participación del DMS y el DLS en la generación de conductas...	15
2.6 El estriado y la selección de acciones guiadas por reforzador	15
2.7 El estriado y sus implicaciones sobre el control del movimiento..	17
3 Planteamiento del Problema.....	19
4 Pregunta de investigación	19
5 Hipótesis.....	19
6 Objetivo general.....	20
6.1 Objetivos particulares.....	20
7 Materiales y Métodos	21
7.1 Animales.....	21
7.2 Genotipificación	21
7.3 Cirugía estereotáxica: Inyección de virus e implantación de fibras ópticas	22
7.4 Asociación Acción-Recompensa.....	23
7.5 Adquisición	24
7.6 Prueba de extinción	24
7.7 Ensayo reverso.....	24
7.8 Prueba de preferencia de lugar en tiempo real	25
7.9 Locomoción en campo abierto	25
7.10 Verificación anatómica	26
7.11 Análisis de datos	26
8 Resultados	27
8.1 Inhibición de las neuronas de la vía indirecta sobre la realización de acciones guiadas por reforzador	27
8.2 Inhibición de las neuronas de la vía directa sobre la realización de acciones guiadas por reforzador	31
8.3 Los experimentos control de la inhibición de las vías estriatales sobre la realización de acciones guiadas por reforzador.....	34
8.4 Inhibición de las vías estriatales en una prueba de preferencia de lugar en tiempo real.....	35
8.5 Correlación entre los efectos de inhibición en la selección de acciones versus la preferencia de lugar en tiempo real	36
8.6 Inhibición de las vías estriatales sobre la locomoción.....	38
9 Discusión.....	40

9.1	Los efectos observados al inhibir a las vías estriatales en el DMS concuerdan con el modelo antagónico de las vías de los GB	41
9.2	Los efectos observados al inhibir a la vía indirecta en el DLS difieren del modelo antagónico de las vías de los GB.....	41
	¿Por qué la inhibición de la vía indirecta en el DLS genera efectos contrarios a su inhibición en el DMS?.....	42
	¿Cómo se explica que la inhibición de la vía indirecta haya tenido un efecto similar al manipular el DMS o el DLS?.....	42
9.3	Los efectos observados al inhibir la vía directa en el DLS difieren del modelo antagónico de las vías de los GB.....	43
	¿Por qué la inhibición de la vía directa en el DLS en la prueba de selección de acciones es positiva?	43
10	Conclusiones generales	45
	Referencias	46

Abreviaturas

GB: Ganglios Basales
DMS: Dorsomedial Striatum
DLS: Dorsolateral Striatum
GPi: Globo pálido interno
SNr: Sustancia *nigra pars reticulata*
GPe: Globo pálido externo
NST: Núcleo subtalámico
SNc: Sustancia *nigra pars compacta*
NEMs: Neuronas espinosas medianas
D1: Receptor de dopamina tipo 1
D2: Receptor de dopamina tipo 2
ChR2: Channelrodopsina-2
AP: Anteroposterior
ML: Medial lateral
DV: Dorsoventral
A2A: Receptor de adenosina tipo 2
Arch3.0: Arqueorodopsina3.0
PFA: Paraformaldehído
NEMind: Neuronas de la vía indirecta
NEMdir: Neuronas de la vía directa
eYFP: Enhanced Yellow Fluorescent Protein

Resumen

Los seres vivos son capaces de moverse y desarrollar estrategias para seleccionar acciones que generen beneficios a lo largo de su vida, lo cual es vital para desenvolverse en el medio y para su supervivencia.

La adaptación conductual de los animales a cambios en el medio ambiente depende de la actividad de un conjunto de núcleos subcorticales llamados ganglios basales (GB). Dentro de los GB se encuentra el núcleo estriado, una estructura cerebral en la que, se propone, se llevan a cabo procesos de selección de acciones.

Los GB se interconectan a través de dos vías cuyos cuerpos celulares se ubican en el estriado: la vía directa y la vía indirecta. Estas vías son antagónicas (según el modelo clásico de los GB); sin embargo, el estriado se subdivide en compartimentos que contienen subcircuitos sensomotores (estriado dorsolateral; DLS) y asociativos (estriado dorsomedial; DMS). La literatura actual muestra que las manipulaciones optogenéticas de las neuronas estriatales dentro del DLS y el DMS, tiene efectos diferenciales sobre la selección de acciones, pero también similares al momento de iniciar acciones.

Para evaluar una posible contribución diferencial de la actividad de las neuronas del DMS contra las del DLS, en un trabajo previo del laboratorio se realizaron activaciones optogenéticas de las neuronas de las vías estriatales en ambos compartimentos. De estos experimentos se observó que la activación de estas vías generó efectos similares sobre la selección de acciones pero diferenciales sobre la locomoción. Dado que la activación optogenética de las neuronas puede dar falsos positivos, en este trabajo de tesis inhibimos transitoriamente la actividad de las vías de los GB en el DMS o el DLS, y evaluamos sus efectos sobre la selección de acciones guiadas por reforzador y sobre la locomoción.

Concluimos que la inhibición de las vías estriatales en el DMS tiene efectos antagónicos, sin embargo, el inhibir estas vías en el DLS tiene efectos contrarios al DMS. Por lo tanto, proponemos que la contribución de las vías estriatales no puede ser generalizada para todo el estriado, identificamos que sus contribuciones dependen del compartimento estriatal evaluado. La contribución de las vías estriatales en el DMS es compatible con un modelo clásico, pero su contribución en el DLS requiere de una reinterpretación de los modelos actuales.

1 Introducción

Los organismos necesitan seleccionar acciones y moverse apropiadamente para desenvolverse en su medio. Actualmente se sabe que el estriado es indispensable para estas funciones, el estriado es el núcleo más grande de los ganglios basales (GB). Los GB se interconectan anatómicamente a través de células estriatales que dan origen a dos vías: la vía directa y la vía indirecta (Gerfen, 2006). El funcionamiento inapropiado de estas vías genera disquinesias, corea, distonias, problemas para poder iniciar movimientos y alteraciones cognitivas. Estos síntomas son observados en la enfermedad de Parkinson, de Huntington y el síndrome de Tourette (Albin RL., et al., 1989; Wichmann T., y DeLong MR., 1996; Hikosaka O. et al, 2000; Jill R. Crittenden y Graybiel AM., 2011).

La contribución de las vías de los GB sobre la generación de conductas se explica a través de modelos funcionales. El modelo clásico de los GB propone que la activación de las vías directa o indirecta tiene efectos opuestos sobre la selección de acciones y sobre la generación de movimientos (DeLong M.R., 1990; Albin RL et al., 1989; Kravitz et al., 2010, 2012). Experimentos de activación optogenética de las neuronas estriatales de estas vías apoyan directamente este modelo: la activación de la vía directa promueve el movimiento, teniendo un efecto reforzante, y la activación de la vía indirecta decrementa la generación de movimientos, pudiendo ser aversiva (Kravitz et al., 2010, 2012; Kreitzer et al., 2013, 2014). Sin embargo, varios trabajos apoyan un modelo funcional alternativo de los GB, el cual postula que la actividad de las vías estriatales coopera entre sí para permitir la apropiada selección de acciones (Hikosaka O., 2000; Cui G. et al, 2013; Jin X. et al, 2014; Tecuapetla et al., 2016).

Además, dentro del estriado existen compartimentos que son parte de sub-circuitos asociativos y sensomotores (Yin HH., 2005, 2009). Los sub-circuitos de asociación se encuentran dentro del estriado dorsomedial (DMS) y los sensomotores en el estriado dorsolateral (DLS) (Redgrave P., et. al., 2010; Yin HH., 2005, 2009). Por lo tanto, se debe realizar una evaluación de las contribuciones de cada uno de estos compartimentos, antes de poder

generalizar los modelos funcionales para explicar la contribución de las vías de los GB en la generación de conductas.

Para evaluar la contribución del DMS y DLS sobre la generación de conductas, en un trabajo previo del laboratorio, se activó a las neuronas de la vía directa o indirecta en los compartimientos del estriado por medio de optogenética (Cuevas-Vicente, 2017). De este trabajo se observó que la activación de las neuronas de las vías estriatales, generó efectos opuestos sobre la selección de acciones guiadas por un reforzador (sin ser diferentes los efectos al modular su actividad en el DLS en comparación con su modulación en el DMS), pero no sobre la locomoción. Dado que la activación de neuronas por sí sola constituye una sola cara de la interpretación de la contribución de sub-circuitos neuronales en la generación de conductas, es necesario realizar experimentos de pérdida de la función en los que se inhiba a la actividad de las neuronas estriatales. Este argumento se fundamenta en que la activación optogenética puede no sólo activar, sino sincronizar a las neuronas manipuladas abriendo la posibilidad a falsos positivos al interpretar la contribución de un sub-circuito neuronal (Jaidar et al., 2019). Por lo tanto, para contrastar los experimentos antes mencionados, en este trabajo de tesis realizamos experimentos de inhibición optogenética durante la selección de una acción guiada por reforzador y durante la evaluación de la locomoción de animales.

De estos experimentos emerge una visión en la que los compartimientos DLS y DMS tienen contribuciones específicas sobre la selección de una acción guiada por reforzador y sobre la locomoción.

2 Antecedentes

2.1 Los ganglios basales

Los GB son un conjunto de núcleos subcorticales en el cerebro de los cordados. Sus proyecciones anatómicas procesan señales sensoriales, motoras, cognitivas y motivacionales (Gerfen CR., et al., 1990). Los GB forman un circuito donde reciben señales de la corteza cerebral, y mandan señales al tálamo, el cual a su vez manda señales la corteza (**Figura 1**).

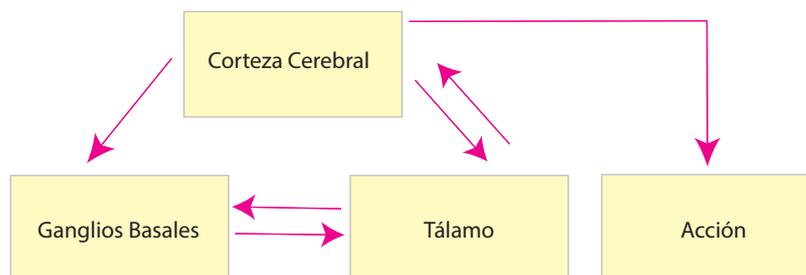


Figura 1. Circuito corteza-GB-tálamo. Esquema representativo del circuito que conforma a la corteza, mandando y recibiendo señales de los GB, de igual manera manda y recibe señales del tálamo, y las proyecciones de los GB que mandan y reciben señales del tálamo.

Los núcleos que componen a los GB pueden ser categorizados como: núcleos de entrada, núcleos de salida y núcleos intrínsecos. Los núcleos de entrada a los GB son los núcleos estriado y subtalámico (NST), reciben entradas excitatorias de la corteza y del tálamo. Los núcleos de salida son el globo pálido interno (GPi), y la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr). Los núcleos intrínsecos encargados de llevar señales de los núcleos de entrada a los de salida, son el globo pálido externo (GPe) y el NST (**Figura 2**); de manera importante, estos núcleos reciben inervación dopaminérgica de la sustancia *nigra pars compacta* (SNc).

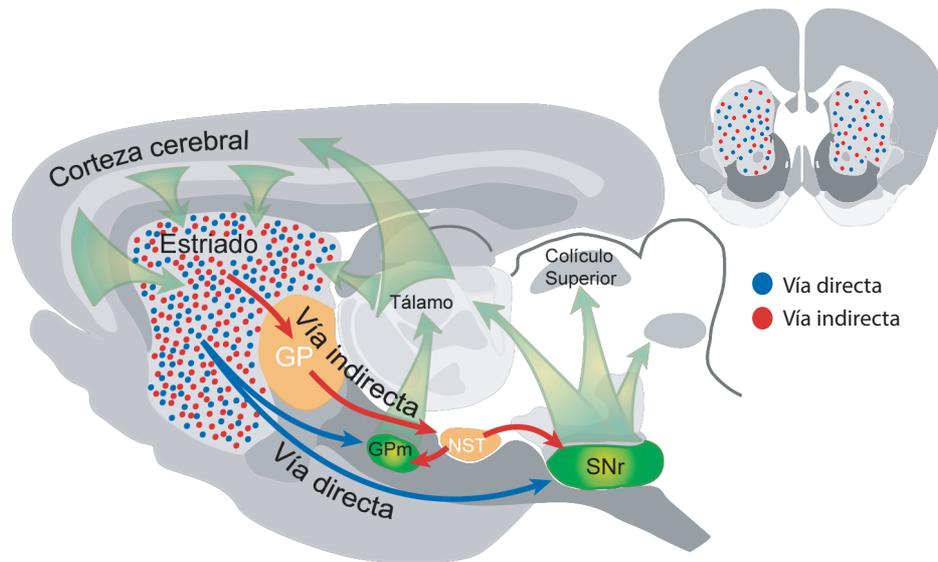


Figura 2. Las neuronas de proyección del estriado se dividen en dos vías: neuronas de la vía directa (rojo) o neuronas de la vía indirecta (azul). Esquema de los ganglios basales mostrando las proyecciones de las vías directa e indirecta a través de sus núcleos. GP, globo pálido; GPm, globo pálido medio = GPI; NST, núcleo subtalámico; SNr, sustancia *nigra pars reticulata*. A la derecha, rebanada coronal que muestra la distribución de las neuronas de las vías estriatales. Esquema modificado de Gerfen 2006 y Florio Tiziana M., et al., 2018.

2.2 Las vías de interconexión de los GB: vía directa y vía indirecta

El núcleo estriado recibe proyecciones glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, y entradas dopaminérgicas de la SNc y del VTA (Gerfen CR., et al., 1990). Las neuronas del estriado son neuronas espinosas medianas (NEMs; 95% del total de neuronas) que, dependiendo a dónde proyectan y/o por los receptores que presentan, se dividen en NEMs de la vía directa o de la vía indirecta (**Figura 2**). El 5 % restante de neuronas estriatales son interneuronas (Gerfen CR., et al., 1990; Chang HT., et al., 1982; Kemp y Powell, 1971).

Las NEMs de la vía directa inervan directamente a los núcleos de salida, el GPi y la SNr, y expresan los receptores a dopamina tipo 1 (D1) (Lanciego, José L., et al., 2012). La transmisión sináptica de esta vía es de naturaleza GABAérgica que inhibe a las neuronas de salida de los GB desinhibiendo a las neuronas del tálamo, éstas últimas de naturaleza glutamatérgica activan a la corteza motora promoviendo el movimiento (**Figura 2**) (Albin et al., 1989; Gerfen CR., et al., 1990; Saunders et al., 2015).

Las NEMs de la vía indirecta proyectan al núcleo intrínseco GPe, el cual proyecta al NST, que a su vez proyecta a los núcleos de salida; las neuronas

de la vía indirecta expresan los receptores a dopamina tipo 2 (D2) o el receptor 2A a adenosina (A2A). La transmisión sináptica del estriado al GPe es de naturaleza GABAérgica, que al inhibirlo desinhibe al NST, que al ser de naturaleza glutamatérgica activa a las neuronas de la SNr, en consecuencia inhiben a las neuronas del tálamo y que en turno dejan de excitar a la corteza, inhibiendo la generación de movimientos (**Figura 2**). La figura 3 presenta la descripción antes mencionada en diagrama de cajas y flechas.

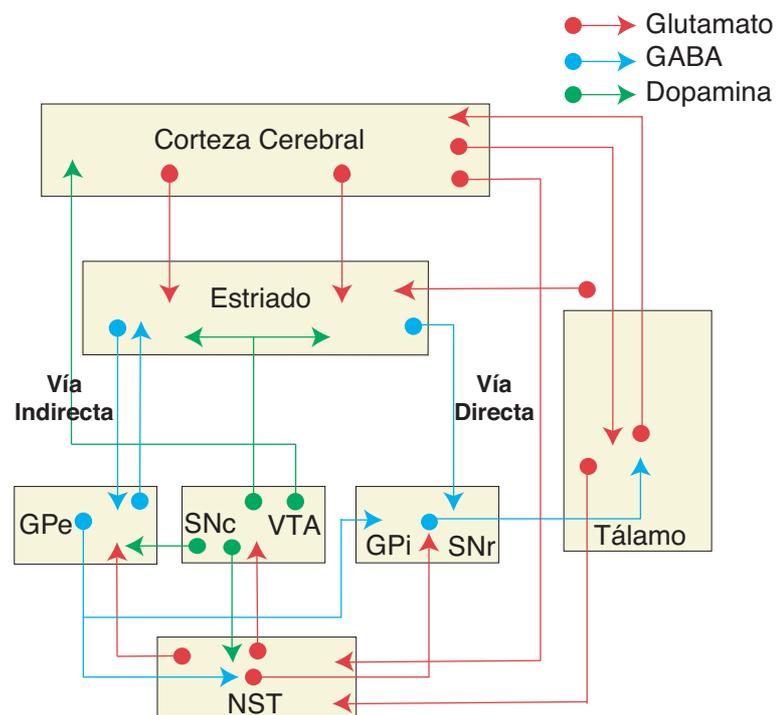


Figura 3. Esquema de las vías de los GB y sus conexiones. Esquema modificado de Lanciego, José L., et al., 2012.

2.3 Modelos funcionales de los GB: Modelo Antagónico vs Modelo Cooperativo

Para explicar la contribución de los GB en la generación de conductas se han postulado diferentes modelos funcionales. El modelo clásico de los GB propone que la activación de las vías directa o indirecta tiene efectos opuestos sobre la selección de acciones y sobre la generación de movimientos (DeLong MR., 1990; Albin RL et al., 1989; Kravitz et al., 2010, 2012), es decir, se habla de un modelo antagónico. Los experimentos de activación optogenética de las neuronas estriatales de estas vías apoyan directamente este modelo: la activación de la vía directa promueve el movimiento, teniendo un efecto reforzante, y la activación de la vía indirecta decrementa la generación de movimientos, y se sugiere su activación genera aversión en los animales (Kravitz et al., 2010, 2012) (**Tabla 1**). Una nota importante es que estos experimentos de manipulación optogenética se realizaron en el compartimento dorsomedial del estriado.

Sin embargo, de igual forma hay trabajos que apoyan un modelo funcional alternativo de los GB donde se postula que la actividad de las vías estriatales coopera entre sí para permitir la apropiada generación y selección de acciones (Hikosaka O., 2000; Cui G. et al, 2013; Jin X. et al, 2014; Tecuapetla et al., 2016), llamado aquí como modelo cooperativo (**Tabla 1**).

Modelo Antagónico			Modelo Cooperativo				
Prueba	Activación (DMS)		Vía directa		Vía indirecta		Lectura
	Vía directa	Vía indirecta	Inicio	Ejecución	Inicio	Ejecución	
Acción	↑	↓	↑	↑	↑	↓	Activación
Preferencia	↑	↓	↑		↓		
Locomoción	↑	↓	DMS	DLS	DMS	DLS	
			↑	↓	↓	↑	

Tabla 1. Efectos observados en distintas pruebas que apoyan los modelos funcionales de las vías estriatales.

Por lo tanto, tenemos dos modelos de funcionamiento de los GB que podrían explicar la contribución de las vías estriatales en las conductas de los individuos: el modelo antagónico y el modelo cooperativo.

2.4 Compartimentos estriatales: DLS y DMS

El estriado es el núcleo de entrada más grande a los GB (**Figura 2**), se divide anatómicamente por las entradas corticales que recibe en los compartimentos ventral (sub-circuitos de motivación), dorsomedial (sub-circuitos de asociación; DMS) y dorsolateral (sub-circuitos sensomotores; DLS) (Alexander, 1995). Debido a esta división anatómica, se argumenta que el DMS contribuye a realizar acciones guiadas a objetivos, mientras que el DLS contribuye principalmente en la generación de movimientos (Yin et al., 2005, 2009) (**Figura 4.A**). Se sugiere esta división funcional (región límbica, asociativa, sensomotora) se mantiene a lo largo del resto de los ganglios basales (Redgrave P., et al., 2010) (**Figura 4.B**).

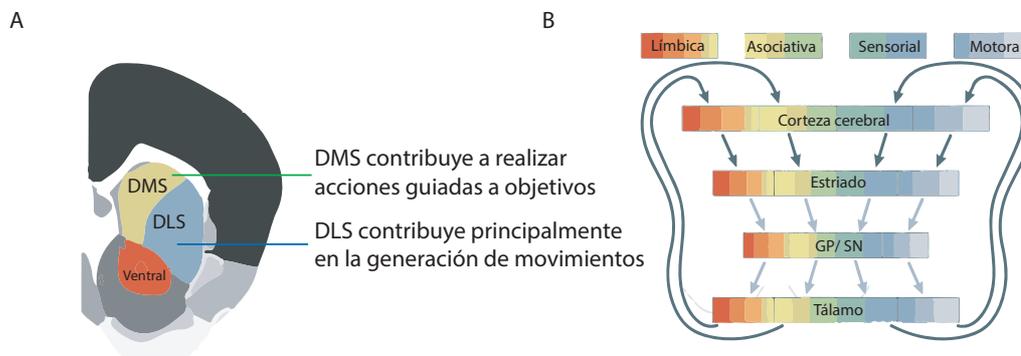


Figura 4. Esquema de los Ganglios Basales y su división funcional dada las entradas corticales.

A, Rebanada coronal mostrando los compartimentos del estriado; DMS: estriado dorsomedial, DLS: estriado dorsolateral.

B, Modelo de subcircuitos a lo largo de los ganglios basales, límbicos (rojo-amarillo), asociativos (amarillo-verde), sensorial (verde-azul) y motores (azul-gris). Esquemas modificados de Florio Tiziana M., et. al., 2018; Alexander, 1995.

2.5 Participación del DMS y el DLS en la generación de conductas

El estriado dorsal está directamente implicado en el aprendizaje instrumental (Yin et al., 2010). La literatura actual sugiere que el DMS es necesario para generar acciones dirigidas a objetivos, mientras que el DLS es necesario para generar conductas habituales. Un comportamiento es guiado por una consecuencia cuando se tiene la habilidad de predecir el resultado de una acción, mientras que un comportamiento habitual se da cuando un estímulo controla el resultado de una acción (Redgrave P., et al., 2010). La lesión bilateral del DMS interrumpe la generación de conductas guiadas por una consecuencia (Yin et al., 2005; Yin et al., 2009), mientras que la lesión del DLS interrumpe la formación de hábitos (Yin et al., 2005, 2009; Rodrigues S., et al., 2017).

2.6 El estriado y la selección de acciones guiadas por reforzador

A la selección óptima de una acción, es decir, la acción más reforzante o menos aversiva, se le conoce como una toma de decisión económica. Para que un individuo pueda tomar una decisión económica se requiere:

- Establecer una asociación entre una acción y la consecuencia a la que conlleva.
- Iniciar las acciones seleccionadas comparando, descartando y suprimiendo las acciones competitivas no seleccionadas.
- Adaptar dinámicamente su comportamiento en respuesta a cambios en la consecuencia de la acción asociada.

La toma de decisiones pasa por una red neuronal formada por la región cortical, límbica y el cerebro medio; las proyecciones de estas estructuras convergen en los ganglios basales, específicamente en el estriado. El estriado integra información cognitiva y motivacional que van a guiar la selección de una acción económica (Macpherson T., et al., 2014). Para que una acción económica ya seleccionada se preserve, se requiere que sea reforzada cada vez que se ejecute, incrementando la probabilidad de que se repita la conducta del individuo (Macpherson T., et al., 2014).

Experimentalmente se ha documentado que la activación de las neuronas estriatales de la vía directa o de la vía indirecta (en el DMS) facilita o evita la selección de una acción, respectivamente (Kravitz et al., 2012; Frank MJ. et al., 2012; Tai Lung-Hao, et al., 2012), (**Figura 5A**), ésto es similar al efecto de su activación sobre la locomoción (**Figura 6A**). Sin embargo, la activación de estas vías en el DLS tiene efectos contrarios a su activación en el DMS cuando el animal esta por iniciar acciones (Tecuapetla et al., 2016) (**Figura5.B**).

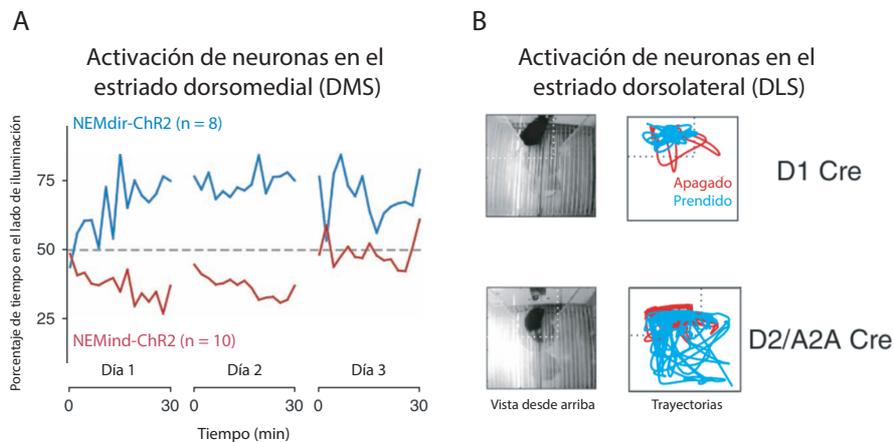


Figura 5. La activación de las neuronas estriatales de la vía directa o la indirecta genera efectos diferenciales dependiendo del compartimento estriatal que se manipule.

A, Auto-estimulación de neuronas de las vías estriatales en el DMS en un paradigma de preferencia de lugar. La auto-estimulación de la vía directa genera preferencia (arriba de 50), mientras que la auto-estimulación de la vía indirecta genera evitación (debajo de 50). En azul vía directa (NEMdir-ChR2), en rojo vía indirecta (NEMind-ChR2). Tomado de Kravitz et al., 2012.

B, Trayectoria recorrida por animales que recibieron la activación de la vía directa (arriba) o la vía indirecta (abajo) en el DLS antes de iniciar el palanqueo que los conducía a una recompensa. En rojo trayectoria del animal cuando la luz está apagada; en azul trayectoria del animal mientras la luz está encendida. Tomado de Tecuapetla et al., 2016.

2.7 El estriado y sus implicaciones sobre el control del movimiento

El individuo requiere seleccionar la mejor respuesta entre distintas alternativas competitivas, según el contexto en el que se encuentre. Este es uno de los aspectos más importantes del control motor. (Florio Tiziana M., *et al.*, 2018; Mink JW., 2018). Experimentalmente, se ha observado que la activación de las vías estriatales en el DMS genera efectos opuestos sobre la locomoción, es decir, la activación de la vía directa promueve el movimiento mientras que la activación de la vía indirecta lo decrementa (**Figura 6A**) (Kravitz *et al.*, 2010). La activación de estas vías en el estriado DLS genera efectos contrarios sobre el inicio de acciones, la activación de la vía directa frena el inicio, la activación de la vía indirecta incrementó la locomoción (Tecuapetla *et al.*, 2016) (**Figura 5B**). En línea con estos experimentos, la eliminación de las neuronas de la vía directa en el DMS reduce la ambulación, efecto no observado al eliminar a las neuronas de esta vía en el DLS; por el contrario, si se elimina a las neuronas de la vía indirecta en el DLS no se produce un incremento en la actividad locomotora, pero al eliminarlas del DMS se observa una locomoción exacerbada (**Figura 6B**) (Durieux *et al.*, 2012).

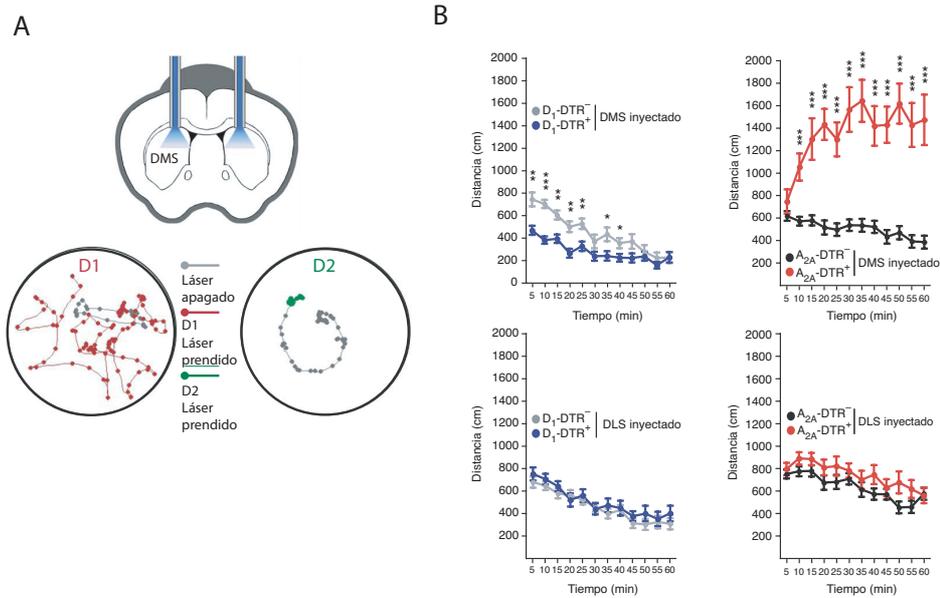


Figura 6. La activación de las neuronas de las vías estriatales genera efectos antagónicos sobre la locomoción, mientras que la delección de las mismas genera efectos sólo en la vía indirecta del DMS.

A, Activación de neuronas de las vías estriatales en el DMS en un campo abierto. La activación de las neuronas de la vía directa aumenta el movimiento (trayectoria roja), mientras que la activación de las neuronas de la vía indirecta lo disminuye (trayectoria verde); en gris trayectoria de láser prendido. Tomado de Kravitz et al., 2010.

B, Delección de las neuronas estriatales en los compartimentos DMS y DLS. La delección de las neuronas de las neuronas de la vía indirecta en el DMS incrementa el movimiento en comparación con los controles, en el DLS y en la vía directa no se aprecian diferencias. En azul la vía directa y en rojo la vía indirecta. Tomado de Durieux et al., 2012.

En resumen, con respecto a la contribución de las vías estriatales a la selección de acciones y a la locomoción, la literatura actual sugiere que:

1. La activación optogenética de las vías estriatales en el DMS es capaz de facilitar (vía directa) o evitar la selección de una acción (vía indirecta).
2. La activación optogenética de las vías estriatales en el DMS es capaz de aumentar (vía directa) o disminuir (vía indirecta) la locomoción.
3. La activación optogenética de las vías estriatales en el DLS frena (vía directa) o interrumpe la selección de una acción (vía indirecta).

4. Parece que dependiendo del compartimento del estriado que se manipule, los efectos sobre la selección de acciones y sobre la locomoción son diferentes.

3 Planteamiento del Problema

Los experimentos de activación optogenética de las vías estriatales en el DMS y DLS muestran efectos diferenciales sobre la selección de acciones y la locomoción. Sin embargo la interpretación de la contribución de las vías no puede emerger de sólo experimentos de activación optogenética. De particular relevancia es que la activación optogenética no sólo activa sino que impone actividad sincrónica sobre las neuronas moduladas, pudiendo generar falsos positivos (Jaidar et al., 2019). Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis para poder tener una interpretación de la contribución de las vías estriatales del DMS y el DLS a la selección de acciones y la locomoción realizamos inhibiciones optogenéticas planteando la siguiente pregunta:

4 Pregunta de investigación

¿Se puede generalizar la contribución de las vías estriatales a la selección de acciones y a la locomoción independientemente de la región del estriado que se manipule?

5 Hipótesis

- La inhibición de las vías estriatales en el DMS y DLS contribuye de manera diferencial a la selección de acciones guiadas por reforzador y sobre la locomoción.
- El DMS es de mayor relevancia para la generación de acciones guiadas por reforzador.
- El DLS es de mayor relevancia para la locomoción.

6 Objetivo general

- Inhibir la actividad de las neuronas estriatales de las vías directa o indirecta en el DMS o en el DLS comparando sus efectos sobre la selección de acciones guiadas por reforzador, y sobre la locomoción.

6.1 Objetivos particulares

Inhibir la actividad de las neuronas estriatales de las vías directa e indirecta en el DMS y en el DLS durante:

1. Una tarea de condicionamiento operante para evaluar su efecto sobre la selección de acciones guiadas por reforzador
2. Un paradigma de preferencia de lugar en tiempo real para evaluar su efecto en ausencia de reforzadores.
3. Una prueba de campo abierto para evaluar su efecto sobre la locomoción.

7 Materiales y Métodos

7.1 Animales

Para llevar a cabo los experimentos en este proyecto se utilizaron dos líneas de ratones transgénicos, la línea D1 que expresa la enzima Cre recombinasa bajo el promotor del receptor de dopamina tipo 1 (marca a las neuronas de la vía directa), y la línea A2A que expresa la Cre bajo el promotor del receptor de adenosina A2a (marca a las neuronas de la vía indirecta). Todos los experimentos fueron realizados con animales heterocigotos, los cuales se obtuvieron al cruzar ratones transgénicos con ratones silvestres C57BL6/J. Para los experimentos se usaron animales >8 semanas de edad, machos y hembras (ya que el sexo no hizo distinción en las pruebas realizadas). Para la tarea de condicionamiento operante los animales fueron privados de alimento y mantenidos al 80-85% de su peso inicial.

No todos los animales pasaron por las tres pruebas conductuales (palanqueo, preferencia en línea y campo abierto) de lo contrario se especifica en el texto.

7.2 Genotipificación

A los 21 días postnatales los animales fueron destetados, sexados e identificados con aretes metálico numerados. Se obtuvo una muestra de ADN genómico de cada uno de los ratones y se realizó una PCR amplificando un producto de 100 pares de bases del gen de la Cre-recombinasa, junto con un producto de 300 pares de bases del gen de un control interno (gen de interleucina 2), para así identificar a los animales positivos a Cre-recombinasa.

7.3 Cirugía estereotáxica: Inyección de virus e implantación de fibras ópticas

Para la cirugía los animales se anestesiaron inicialmente con 4% de isoflurano y posteriormente se mantuvieron con 1% isoflurano y oxígeno 1 L/min, manteniendo una frecuencia respiratoria= 1/seg. Este procedimiento se realizó sobre una plancha térmica para mantener la temperatura del animal durante el procedimiento.

El primer paso en la cirugía fue la limpieza y depilación de la zona cefálica y se procedió a colocarlo sobre el aparato estereotáxico, después se procedió a exponer el cráneo y a limpiar con agua oxigenada (10%). Una vez alineado el cráneo usando como referencia los puntos bregma y lamda, se realizaron trépanos e inyecciones virales de manera bilateral. Las coordenadas para los animales manipulados en el estriado DMS: +0.5 mm anteroposterior (AP), ± 1.6 mm medial lateral (ML), -2.3 dorsoventral (DV); para los animales manipulados en el DLS: +0.5mm AP, ± 2.7 mm ML; -2.3 DV (**Figura 7A**).

Las inyecciones virales fueron de 1 μ L de Arch3.0-eYFP serotipo 5 (**Figura 7B**) (rAAV5/Ef1 α -DIO_eARCH3.0-EYFP, UNC GTC Vector Core, #AV4841D, 4.4×10^{12} virus molecules/mL) o de una proteína reportera eYFP (AAV1.EF1 α .DIO.eYFP.WPRE, 1×10^{13} virus molecules/mL) (animales control). Para las inyecciones virales se utilizó un nano-inyector, haciendo la inyección a una velocidad de 4.6nL cada 5 seg con pipetas de borosilicato, puntas entre 25-50 micras. Después de cada inyección se dejó la pipeta para permitir que el virus se difundiera durante 15 minutos.

Después de inyectar ambos hemisferios, se procedió a implantar fibras ópticas de 300 μ m de diámetro, 0.37 de apertura numérica, y se cubrió el cráneo con cemento y acrílico dental. Los animales se mantuvieron en recuperación de 2-4 días antes de iniciar los experimentos. Para cuando los animales llegaron a la fase experimental de adquisición tenían de 11 días de expresión del virus.

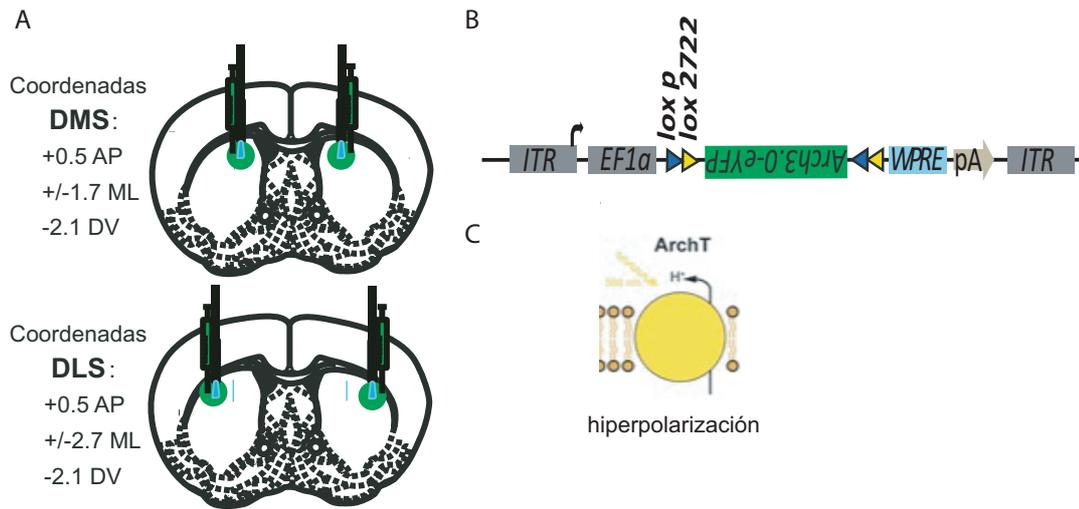


Figura 7. Esquema de las inyecciones virales y la opsina utilizada para inhibición.

- A)** Coordenadas de infección e implantación de fibras para manipulaciones en el DMS y DLS. **B)** Constructo del vector viral para Arqueorodopsina. **C)** Representación del funcionamiento de Arqueorodopsina.

7.4 Asociación Acción-Recompensa

Para el experimento de selección de acciones guiadas por un reforzador, se utilizó una caja de comportamiento operante con dos palancas situadas a los lados y a la misma distancia de un comedero (MED associates). Para que los individuos identificaran y asociaran el lugar donde se recibirían los reforzadores, se realizó una primera sesión en donde cada uno de los animales fue introducido 30 minutos en la caja de comportamiento operante, recibiendo un reforzador positivo (pellet 14 mg, #F05684, Bio-Serv) aleatoriamente cada minuto (pre-entrenamiento).

Posteriormente, se realizaron tres sesiones en donde se presentó una palanca a uno de los lados del comedero, el objetivo fue que el animal asociara la acción de presionar la palanca presentada con el objetivo de recibir un reforzador positivo, las sesiones terminaban transcurridos 30 minutos o tras realizar 15 veces la acción requerida (ó 30 la última sesión). Las palancas presentadas fueron contrabalanceadas en los animales.

Posteriormente en otra sesión se le presentó al animal la palanca contraria teniendo que realizar la misma acción 30 veces o terminando la sesión a los 30 minutos. Ésto para que el animal asociara que realizar la acción

de presionar cualquiera de las palancas presentadas llevaría a un reforzador positivo.

7.5 Adquisición

Durante siete sesiones de 30 minutos cada una, se presentaron ambas palancas a los extremos del comedero. Al ser presionadas dieron un reforzador positivo; sin embargo, una de ellas simultáneamente dio un pulso continuo de luz verde (550 nm; 30 mW) para inhibir las neuronas estriatales por 2 segundos. La palanca de luz fue contrabalanceada. Aquí se evalúa si el animal prefiere o evita la acción que presenta inhibición de las neuronas estriatales (**Figura 8**).

7.6 Prueba de extinción

Posterior a la adquisición, en una sesión de 10 minutos se evaluó el valor que los animales asignaron a las acciones realizadas previamente, exponiendo ambas palancas, sin embargo en esta ocasión, ninguna de las acciones llevaba a recompensa o inhibición, preguntando si en ausencia de los reforzadores o inhibición los animales mantienen la preferencia adquirida (**Figura 8**).

7.7 Ensayo reverso

En un último grupo de animales manipulados en el DLS, se realizó un protocolo de doce sesiones de 30 minutos cada una. Las palancas presentadas durante la fase de adquisición fueron invertidas, la palanca que daba el pulso de luz se cambió a dar sólo el reforzador, y viceversa, la palanca que sólo dio un reforzador ahora dio reforzador y un pulso de luz verde (550 nm; 30 mW). Aquí se evalúa si el animal es capaz de seguir la preferencia ya mostrada en la fase de adquisición (**Figura 8**).

7.8 Prueba de preferencia de lugar en tiempo real

En una sesión de 20 minutos se colocó al animal en una caja de acrílico de 40cm x 40cm con una altura de 30cm. Dicha caja se dividió virtualmente en cuatro cuadrantes, seleccionando uno en donde cada vez que el animal se desplazara recibiría un pulso continuo de luz verde (550 nm; 30 mW) sobre las neuronas estriatales. Se obtuvieron videos a 15 fotos por segundo. Ésto para responder si existía preferencia a la auto-inhibición en una prueba conductual que no involucrara la obtención de un reforzador (**Figura 8**).

7.9 Locomoción en campo abierto

En una sesión extra de 15 minutos se colocó al animal en una caja de acrílico de 40cm x 40cm con una altura de 30cm, cuantificando las coordenadas del animal para calcular la locomoción al recibir un pulso de luz verde y evaluar el cambio de movimiento horizontal al inhibir a las diferentes vías en el DMS y DLS. Los animales recibieron un pulso continuo de luz verde (550 nm) cada minuto (30 mW, por cinco segundos) (**Figura 8**).

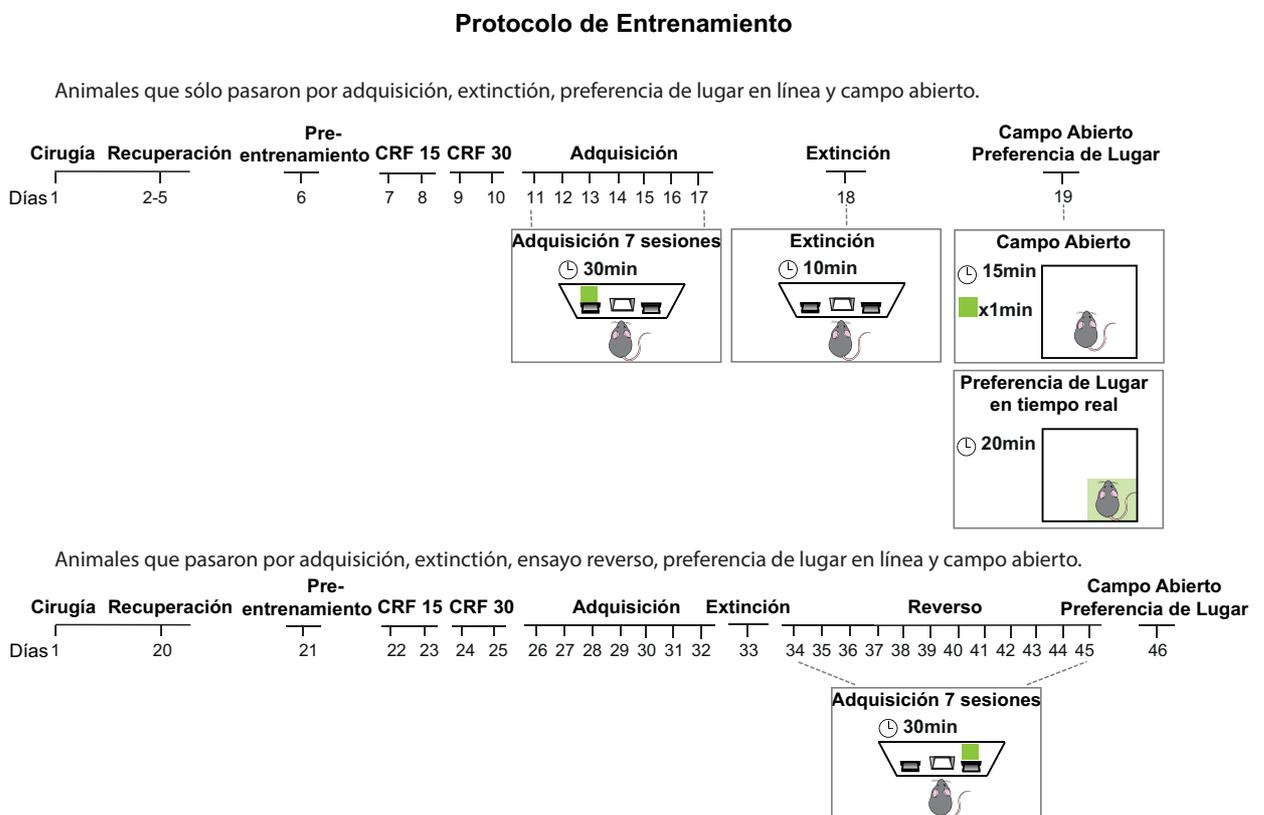


Figura 8. Línea temporal del protocolo de entrenamiento

7.10 Verificación anatómica

Una vez concluidos los experimentos, se anestesiaron a los animales con una mezcla de ketamina/xilacina (85%-15%) por vía intraperitoneal, y se procedió perfundir a los animales con PBS 0.1M y PFA (paraformaldehído) 4% para fijar el tejido. Posteriormente se obtuvieron rebanadas coronales de 100 μm (para identificar claramente la marca de fluorescencia y de la fibra implantada) y después se montaron; se utilizó Mowiol como medio de montar y Hoescht (200 $\mu\text{g/mL}$) para marcar los núcleos celulares. Se realizó la verificación anatómica en un microscopio confocal para observar la fluorescencia de las proteínas Arch3.0-eYFP y eYFP.

7.11 Análisis de datos

Durante el palanqueo se usaron programas de MEDPC que llevaron los conteos de las variables, las presiones en las diferentes palancas. Estos datos fueron analizados en Graph Pad Prism 6. Primero se realizaron las pruebas de normalidad D'Agostino & Pearson omnibus, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov con Dallal-Wilkinson-Lillie para valor de P; los datos debieron pasar por lo menos 2 pruebas de normalidad para poder ser sometidos a estadísticas paramétricas. Para las comparaciones de las variables se realizaron pruebas de t y ANOVA para los datos paramétricos, y U de Mann-Whitney o Wilcoxon para los no paramétricos.

En la prueba de preferencia de lugar en tiempo real y campo abierto se utilizó el programa de Bonsai (<http://www.kampff-lab.org/bonsai>) para analizar los videos y obtener las coordenadas en cada fotograma del video, la información obtenida fue analizada en MATLAB, para posteriormente ser graficados en Graph Pad Prism 6.

8 Resultados

8.1 Inhibición de las neuronas de la vía indirecta sobre la realización de acciones guiadas por reforzador

Para determinar el efecto de la inhibición de las neuronas de la vía indirecta sobre la generación de acciones guiadas por reforzador se realizó un experimento de comportamiento operante en el que se le requirió a los animales escoger el presionar una de dos palancas por siete días – fase de adquisición. La presión de una palanca guió a una recompensa y la otra palanca a una recompensa más auto-inhibición (ver métodos sección 7.5). Posteriormente a la adquisición se realizó una prueba de extinción de 10 minutos, en la cual se presentaron ambas palancas sin que ninguna diera reforzador o auto-inhibición, cuantificando las presiones realizadas en cada una de las palancas, ésto para evaluar si las acciones seleccionadas durante la adquisición persistían en ausencia la auto-inhibición o el reforzador (pellet), (ver métodos sección 7.6).

Estos experimentos estuvieron divididos en dos grupos de animales. Un grupo en el que se inhibió el DMS y otro en el que se inhibió el DLS (**Figura 9**)

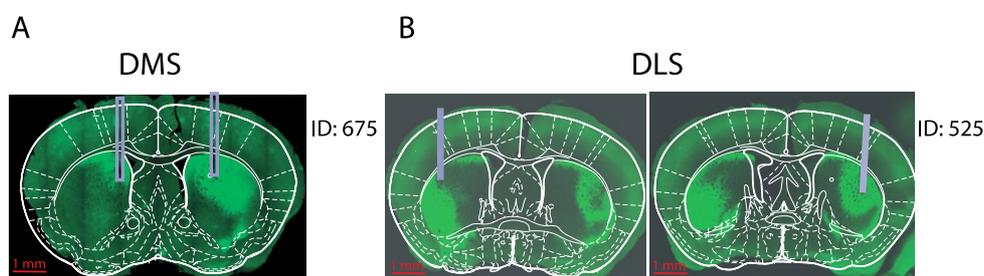


Figura 9. Ejemplo de rebanadas de animales inhibidos en el estriado dorsomedial (DMS) A, o dorsolateral (DLS) B.

Durante la fase de adquisición, observamos que los animales que presionaron la palanca que guiaba a la auto-inhibición en el DLS, optaron por evitar la palanca que guiaba a la auto-inhibición ($p < 0.05$, ANOVA; **Figura 10-A2**) (día 7 de adquisición animales $DLS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}$: presiones en la palanca con reforzador = 52 ± 5 versus presiones en la palanca con reforzador + auto-inhibición = 7 ± 2 ; $n = 6$, $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 10-A3**).

Por el contrario los animales que recibieron inhibición en el DMS seleccionaron con mayor frecuencia el presionar la palanca de auto-inhibición +

reforzador ($p < 0.01$, ANOVA; **Figura 10-B2**) (día 7 de adquisición animales $DMS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}$: presiones en la palanca con reforzador + auto-inhibición = 69 ± 8 versus presiones en la palanca sólo con reforzador = 10 ± 4 ; $n = 7$, $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 10-B3**).

Para evaluar que acción seleccionaban (la que guiaba a auto-inhibición+reforzador versus la que guiaba sólo a reforzador), realizamos un análisis de cocientes entre las presiones en las dos palancas por animal (un valor de este cociente por arriba de 50% indica que los animales seleccionaron la acción que guiaba a la auto-inhibición+reforzador, mientras que por debajo de 50% que evitaban esta acción). Estos cocientes (número de presiones realizadas en la palanca de auto-inhibición+reforzador (PE) multiplicado por 100 y dividido entre el número de presiones totales (PT)) confirmó una selección de acciones opuesta por la palanca que guiaba a la auto-inhibición+reforzador dependiendo del compartimento estriatal que se inhibió ($p < 0.01$, ANOVA; **Figura 10-C1**) (día 7, animales $DLS-A2A Cre Arch3.0-eYFP$ cociente = 13 ± 3 , $n = 6$ versus $DMS-A2A Cre Arch3.0-eYFP$ cociente = 76 ± 11 , $n = 7$; $p < 0.01$, U de Mann-Whitney; **Figura 10-C2**).

En la prueba de extinción, los animales en los que se inhibieron en el DLS, no reportaron mantener lo observado durante la adquisición ($DLS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}$: presiones en la palanca que previamente daba sólo reforzador = 30 ± 6 versus presiones en la palanca que previamente daba reforzador+auto-inhibición = 36 ± 8 ; $n = 10$, $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 10-A4**). Por el contrario, en el DMS la inhibición de las neuronas de la vía indirecta mostró que los animales mantuvieron la preferencia de la adquisición ($DMS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}$: presiones en la palanca que previamente daba reforzador+auto-inhibición = 64 ± 9 versus presiones en la palanca que daba sólo reforzador = 27 ± 11 ; $n = 7$, $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 10B.4**). El análisis de los cocientes mostró diferencias entre los compartimentos durante la adquisición (**Figura 10-C1 y C2**), pero no durante la extinción **Figura 10-C3**).

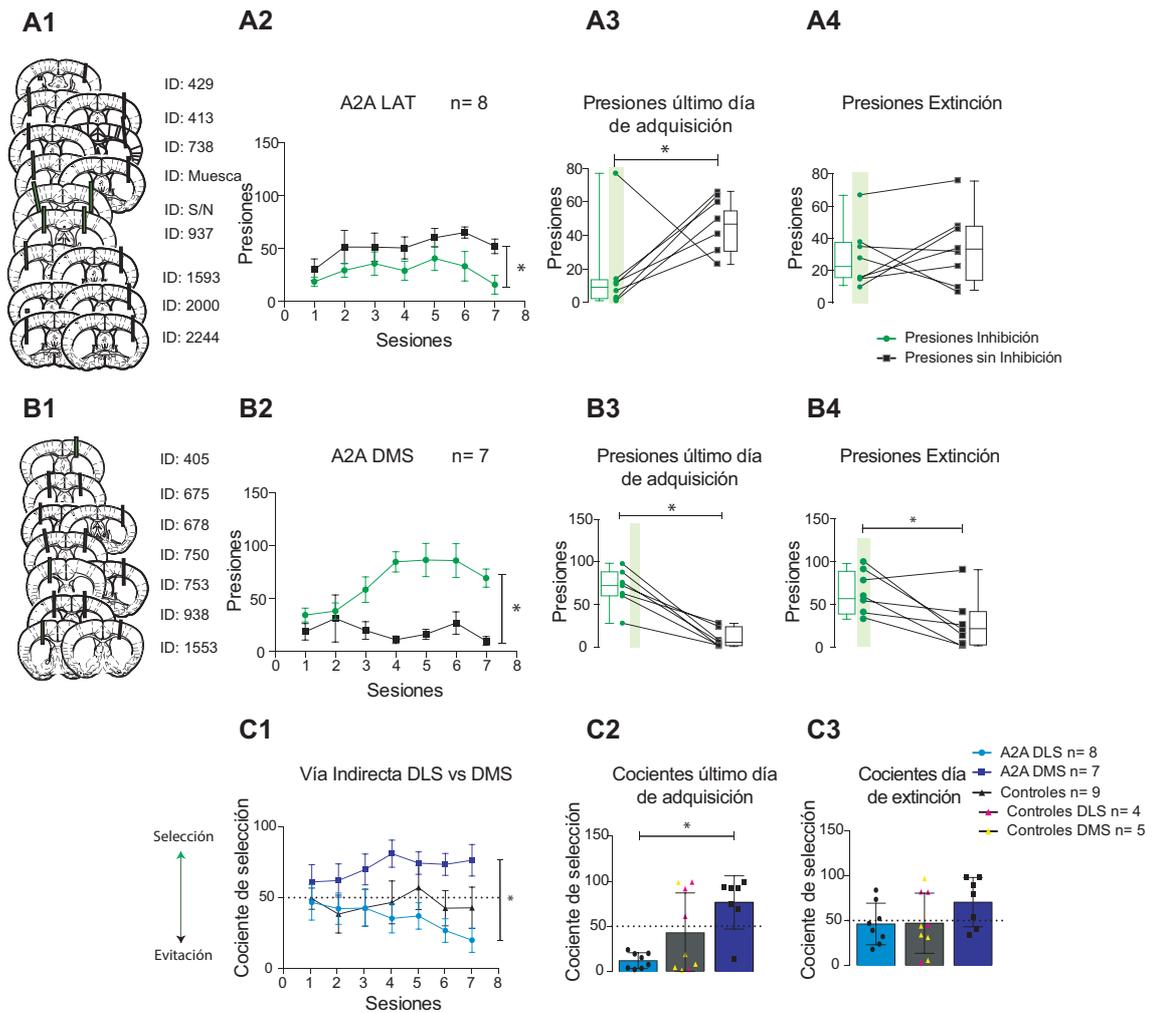


Figura 10. La inhibición en las neuronas de la vía indirecta selecciona o evita una acción dependiendo del compartimento que se manipule.

A1 y B1) Esquemas de rebanadas coronales mostrando dónde quedaron las marcas de las fibras para manipulación en animales A2A- Cre/Arch-eYFP en el DLS (n=6) o el DMS (n=7).

A2 y B2) Presiones por palanca de los animales manipulados en el DLS o DMS respectivamente a lo largo de las 7 sesiones (* $p < 0.05$, ANOVA).

A3 y B3) Número de presiones por palanca el último día de la adquisición en el DLS o el DMS (* $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon).

A4 y B4) Número de presiones por palanca el día de la prueba de extinción en el DLS o el DMS (* $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon).

C1 y C2) Cociente del número de presiones realizadas en la palanca de auto-inhibición+reforzador versus en la de reforzador, comparado los compartimentos DLS versus DMS en la vía indirecta a lo largo de la adquisición (* $p < 0.01$, ANOVA) y sólo el día 7 (C2).

C3) Comparación del día de la prueba de extinción entre DMS y DLS, y controles (* $p < 0.01$, U de Mann-Withney).

Dado que los resultados de inhibir a la vía indirecta en el DLS resultan contrarios a lo que el modelo clásico de la vía indirecta postulaba (se esperaba que la inhibición de esta vía generara la selección de la acción que guiaba a la auto-inhibición), decidimos realizar un nuevo grupo de animales al cual, adicionalmente a la adquisición, se le realizó un protocolo de ensayo reverso. El ensayo reverso pregunta si los animales pueden actualizar la acción realizada dado un cambio de contingencia (cambiarles la palanca que les daba auto-inhibición para ver si la identifican) (ver métodos sección 7.7).

Para este nuevo grupo (n=4) realizamos un cociente del número de palanqueos $[(\text{Palanca auto-inhibición} + \text{reforzador} * 100) / \text{Palanqueos Totales en ambas palancas} = (\text{PE} * 100) / \text{PT}]$, normalizándolo al primer día de adquisición y luego al primer día del ensayo reverso. De este análisis observamos que, de cuatro animales $\text{DLS}_{\text{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}}$, dos de ellos mostraron un cambio en su preferencia respecto al primer día de adquisición, y el mismo cambio en el ensayo reversal, evitando la palanca que les daba auto-inhibición (**Figura 11B y 11C**). Justo en estos dos animales, *a posteriori*, identificamos la apropiada implantación de fibras ópticas en el DLS. Ésto corroboró que en efecto la selección de una acción que guía a la inhibición de la vía indirecta es evitada cuando se inhibe el DLS.

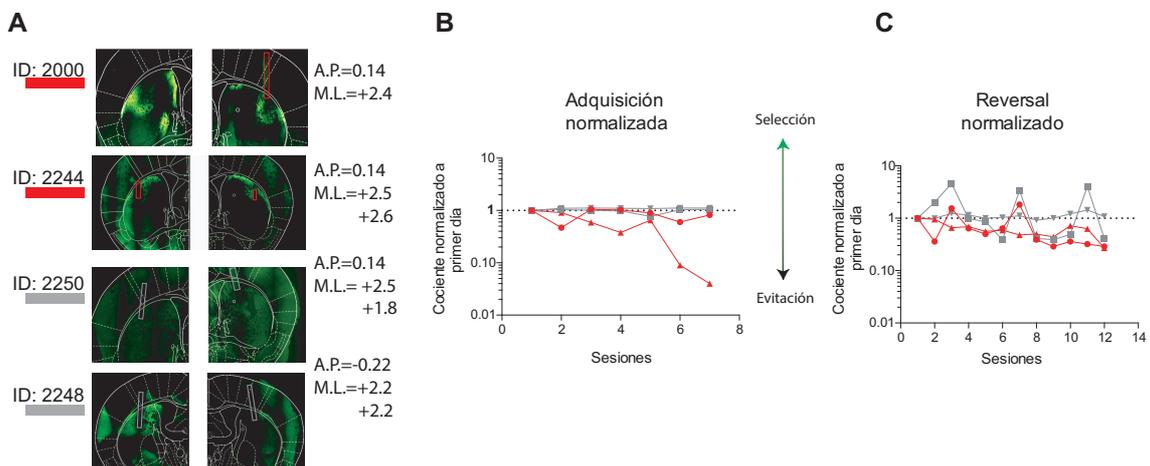


Figura 11. La selección de una acción que guía a la inhibición de la vía indirecta en el DLS es evitada en la adquisición y el ensayo reverso de una contingencia.

A) Rebanadas de animales A2A sometidos al ensayo reverso, note que sólo dos tienen la marca de las fibras en el DLS, auto-fluorescencia debida a complicaciones del montaje.

B) Cociente de selección por animal normalizado al día inicial durante la fase de adquisición.

C) Cociente de selección por animal normalizado al día inicial durante la fase del ensayo reverso.

8.2 Inhibición de las neuronas de la vía directa sobre la realización de acciones guiadas por reforzador

Para determinar el efecto de la inhibición de las neuronas de la vía directa (NEMdir) sobre la generación de acciones guiadas por reforzador se realizó un experimento similar al anterior esta vez inhibiendo a las neuronas de la vía directa en el DMS o el DLS (**Figura 12-A1; 12-B1**). De igual forma, se realizó una prueba de extinción después de la adquisición.

Los animales que recibieron auto-inhibición+reforzador en el DLS, seleccionaron la acción que guiaba a la auto-inhibición ($p < 0.05$, ANOVA, **Figura 12-A2**) (día 7 de adquisición animales $DLS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP}$: presiones en la palanca de auto-inhibición+reforzador=74+/-19 versus presiones en la palanca con sólo reforzador=25+/-9 $n=7$, $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 12-A3**). Mientras que los animales que recibieron auto-inhibición en el DMS seleccionaron la acción que guiaba solo al reforzador ($p < 0.05$, ANOVA, **Figura 12-B2**) (día 7 de adquisición animales $DMS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP}$: presiones en la palanca sólo con reforzador= 67+/-16 versus presiones en la palanca con auto-inhibición+ reforzador= 14+/-8; $n=6$, $p < 0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 12-B3**).

Al comparar los cocientes de selección por compartimentos, DLS contra DMS, observamos una diferencia por compartimento ($p < 0.05$, ANOVA; **Figura 12-C1**) (día 7 animales $DLS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP}$ cociente de preferencia= 77+/-4, $n=7$ versus $DMS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP}$ cociente de preferencia= 29+/-15, $n=6$; $p < 0.01$, U de Mann-Withney; **Figura 12-C2**) , que se mantuvo en la prueba de extinción (**Figura 12-C3**).

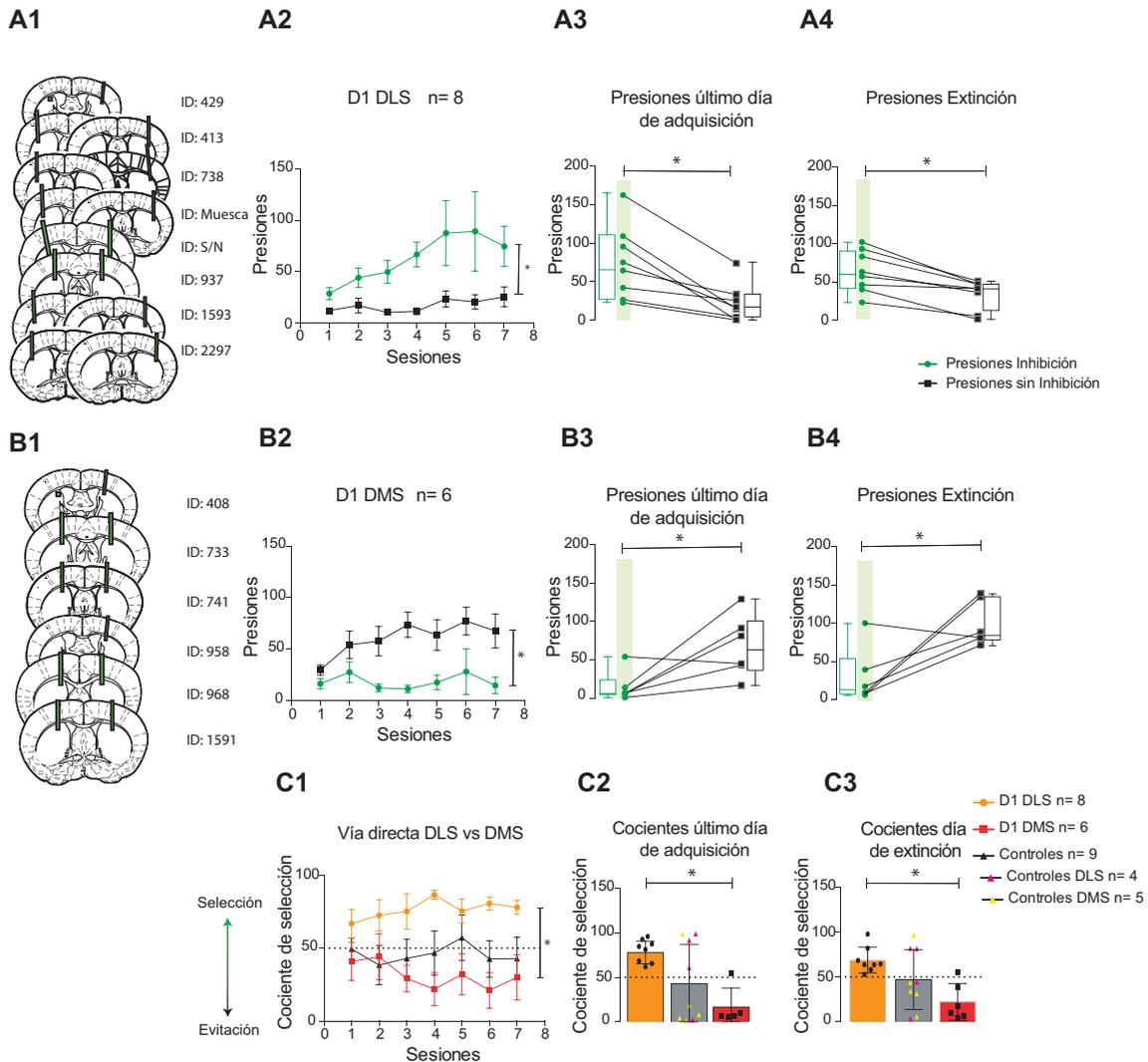


Figura 12. La inhibición en las neuronas de la vía directa selecciona o evita una acción dependiendo del compartimento que se manipule.

A1 y B1) Esquemas de rebanadas coronales mostrando dónde quedaron las marcas de las fibras para manipulación en animales D1-Cre/Arch-eYFP en el DLS (n=7) o DMS (n=6).

A2 y B2) Presiones por palanca de los animales manipulados en el DLS o DMS respectivamente a lo largo de la fase de adquisición (*p<0.05, ANOVA).

A3 y B3) Número de presiones por palanca el último día de la adquisición en el DLS o DMS (*p<0.05, prueba de Wilcoxon).

A4 y B4) Número de presiones por palanca el día de la prueba de extinción en el DLS o el DMS (*p<0.05, prueba de Wilcoxon).

C1 – C3) Cociente de selección comparado la inhibición de la vía directa por compartimento durante la adquisición y (*p<0.01, ANOVA; C1), durante el ultimo día de adquisición (C2) o durante la extinción (C3).

Nuevamente, y dado que los resultados de inhibir a la vía directa en el DLS resultó contrario a lo que el modelo clásico de la vía directa postulaba (se

esperaba que la inhibición de esta vía generara evitación de la acción que guiaba a la auto-inhibición de esta vía), decidimos realizar un nuevo grupo de animales DLS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP} al cual también se le realizó un protocolo de ensayo reverso. El ensayo reverso pregunta si los animales pueden actualizar la acción realizada dado un cambio de contingencia (cambiarles la palanca que les daba auto-inhibición para ver si la identifican) (ver métodos sección 7.7).

Para este nuevo grupo (n=4) realizamos un cociente del número de palanqueos $[(\text{Palanca inhibición} + \text{reforzador} * 100) / \text{Palanqueos Totales}]$ en ambas palancas $= (\text{PE} * 100) / \text{PT}$, normalizándolo al primer día de adquisición y luego al primer día del ensayo reverso. Desafortunadamente de este grupo de cuatro animales, 3 se perdieron tres en el transcurso del experimento. Del animal restante observamos que mostró un cambio en su preferencia respecto al primer día de adquisición, y el mismo cambio en el ensayo reverso, seleccionando la palanca que les daba auto-inhibición (**Figura 13**). Este animal, *a posteriori*, mostró la apropiada implanatación de fibras ópticas en el DLS, corroborando que en efecto la selección de una acción que guía a la inhibición de la vía directa en el DLS es seleccionada.

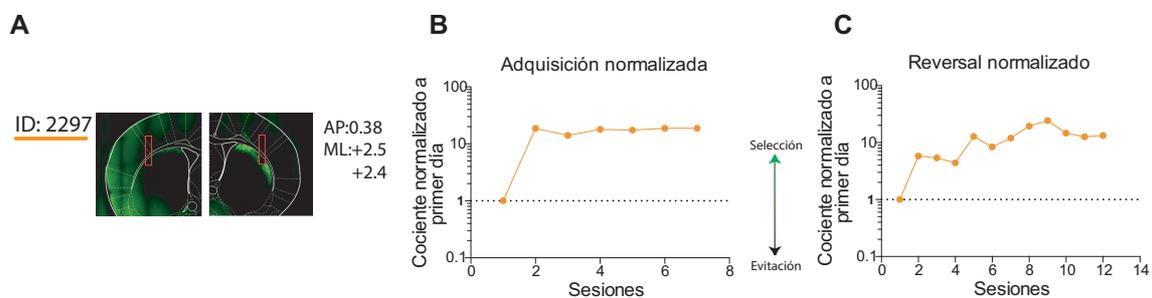


Figura 13. La acción que guía a la inhibición de la vía directa en el DLS es seleccionada en la adquisición y el ensayo reverso de una contingencia.

A) Rebanadas del animal D1 sometido al ensayo reverso, note la marca de las fibras en el DLS, auto-fluorescencia debida a complicaciones del montaje.

B) Cociente de selección por animal normalizado al día inicial durante la fase de adquisición.

C) Cociente de selección por animal normalizado al día inicial durante la fase del ensayo reverso.

8.3 Los experimentos control de la inhibición de las vías estriatales sobre la realización de acciones guiadas por reforzador

Para verificar que la selección o evitación de acciones observadas al inhibir a las neuronas estriatales no se debiera a la iluminación o el posible calor inducido por la misma (30 mW, puede cambiar la temperatura; Stujenske, 2015) y no a la inhibición, realizamos experimentos como los antes descritos en animales que estuvieron sujetos al mismo procedimiento de palanqueo pero que sólo expresaban eYFP. En este caso, no se observó una selección consistente de acciones de los animales por la palanca que presentaba auto-inhibición+reforzador ni durante la adquisición ($p > 0.05$, ANOVA; **Figura 14A**; 3 A2A eYFP laterales; 4 A2A eYFP Mediales; 1 D1 eYFP Lateral: 1 D1 eYFP Medial: $n=1$), ni durante el último día de la adquisición (día 7 palanca sólo con reforzador=56 \pm 11 versus presiones en la palanca con auto-inhibición+reforzador=45 \pm 16; **Figura 14B**), ni en el día de prueba de extinción (eYFP: presiones en la palanca con auto-inhibición+reforzador=45.44 \pm 50.52 versus presiones en la palanca con reforzador=56.11 \pm 49.87; $n=9$, $p > 0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 14C**).

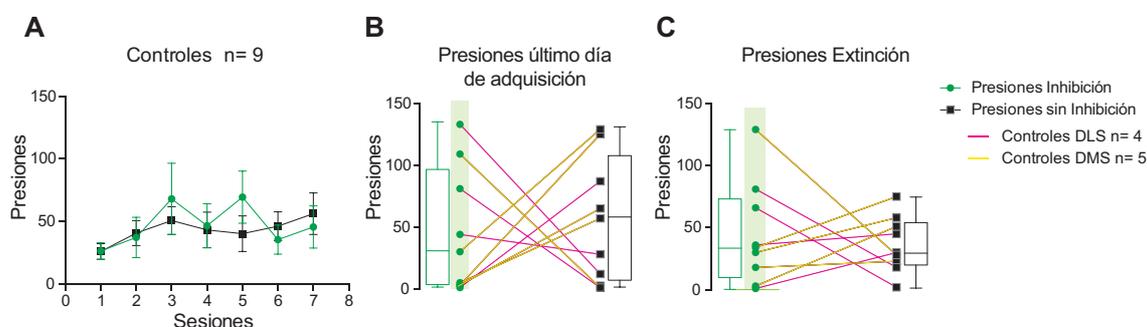


Figura 14. La inhibición de las neuronas en animales control no indujo preferencias.

A) Presiones por palanca de los animales control ($p > 0.05$, ANOVA), en verde las presiones de la palanca con auto-inhibición+reforzador y en negro las presiones de la palanca de sólo reforzador.

B) Número de presiones por palanca el último día de la adquisición ($p > 0.05$, prueba de Wilcoxon).

C) Número de presiones por palanca el día de la prueba de extinción ($p > 0.05$, prueba de Wilcoxon).

8.4 Inhibición de las vías estriatales en una prueba de preferencia de lugar en tiempo real

Para evaluar si los resultados de la prueba de palanqueo pudiesen estar influenciados por la competencia entre los efectos de la inhibición de las vías y la obtención de un reforzador, decidimos correr una segunda prueba instrumental, la cual no requiere reforzador (pellet). Dicha prueba consistió en poner a los animales en una caja de acrílico (similar al campo abierto) el cual se dividió virtualmente en cuatro cuadrantes permitiendo la inhibición de las neuronas estriatales sólo en uno de estos compartimentos (ver métodos sección 7.8). De este experimento observamos que al inhibir a las neuronas de la vía indirecta en el DLS o en el DMS hubo una preferencia por el cuadrante que inhibió a esta vía (DLS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}: cuadrante inhibición=6.5±0.6 min versus cuadrantes sin inhibición=4.1±0.3 min)(DMS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}: cuadrante inhibición =6.9±0.9 versus cuadrantes sin inhibición=3.7±0.3; $p>0.05$, prueba de Wilcoxon; **Figura 15A-B**). Cocientes de preferencia: DLS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}=60±3, $n=14$, DMS_{A2A-Cre/Arch3.0-eYFP}=63±4, $n=9$; $p<0.05$ **Figura 15C**).

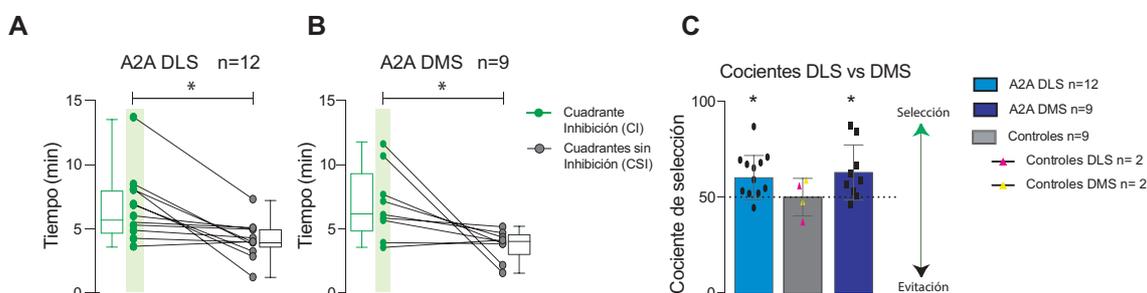


Figura 15. La inhibición de la vía indirecta, en un protocolo de preferencia de lugar en tiempo real, induce preferencia por el cuadrante de inhibición.

A y B) Tiempo en cuadrante con inhibición (verde) versus sin inhibición (gris) en animales en los que se inhibió a la vía indirecta en el DLS (**A**) o en el DMS (**B**). * $p<0.05$, prueba de Wilcoxon.

C) Cocientes a partir de los datos de **A y B**, * $p<0.05$, prueba de Wilcoxon contra 50.

Al evaluar a los animales que recibieron inhibición en esta misma prueba de preferencia de lugar en tiempo real en la vía directa observamos que sólo los animales que recibieron inhibición en el DMS presentaron una evitación por el cuadrante con inhibición (DMS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP}: cuadrante inhibición=1.3±0.2

min versus cuadrante sin inhibición=4.5+/-0.4 min; n=4, t de Student; **Figura 16A-B**). Cocientes de preferencia (DLS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP} cociente de preferencia=56.14+/-4, n=4, DMS_{D1-Cre/Arch3.0-eYFP} cociente de preferencia=22.02+/-2, n=4; p<0.05 contra 50%= no preferencia, prueba de Wilcoxon; **Figura 16C**).

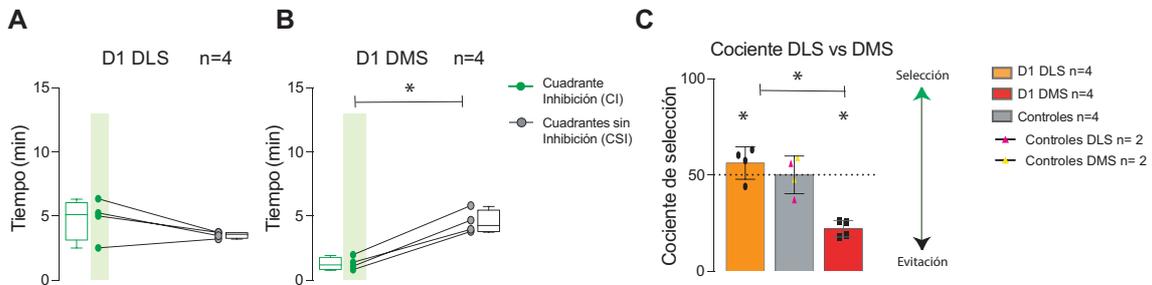


Figura 16. La inhibición de la vía directa en el DMS, en un protocolo de preferencia de lugar en tiempo real, induce evitación del cuadrante de inhibición.

A y B) Tiempo en cuadrante con inhibición (verde) versus sin inhibición (gris) en animales en los que se inhibió a la vía indirecta en el DLS (**A**) o en el DLS (**B**). *p<0.05, t de Student.

C) Cocientes a partir de los datos de **A y B**, *p<0.05, prueba de Wilcoxon contra 50.

Esta misma prueba de preferencia de lugar en tiempo real en animales control no reflejó preferencias (**Figura 17**).

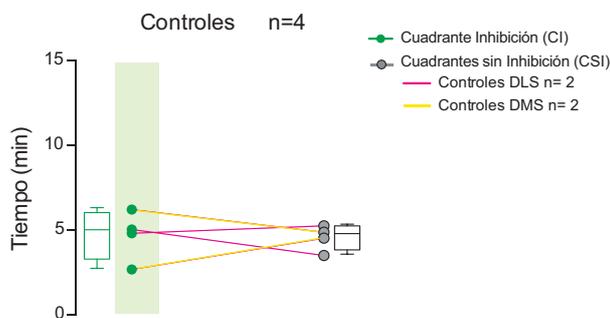


Figura 17. Los animales control no mostraron preferencia de lugar en tiempo real.

8.5 Correlación entre los efectos de inhibición en la selección de acciones versus la preferencia de lugar en tiempo real

Con la finalidad de corroborar los resultados de la inhibición hasta ahora descritos, se hipotetizó que si los efectos observados dependiesen de la

magnitud de la inhibición deberíamos observar una correlación entre los efectos por animal en las diferentes pruebas evaluadas. La **Figura 18A** muestra una correlación significativa entre los cocientes de selección del último día de la adquisición y los valores en la prueba de preferencia de lugar en línea de animales en los que se inhibió a la vía indirecta en el DLS. Esta correlación corrobora que la inhibición de la vía indirecta en el DLS guía a la evitación de acciones guiadas por reforzador y facilita la preferencia de lugar en línea dependiendo de la magnitud de la inhibición. Este mismo análisis, en los otros *sets* de experimentos requiere un mayor número de animales antes de poder asignar una correlación o su ausencia (**Figura 18B-D**).

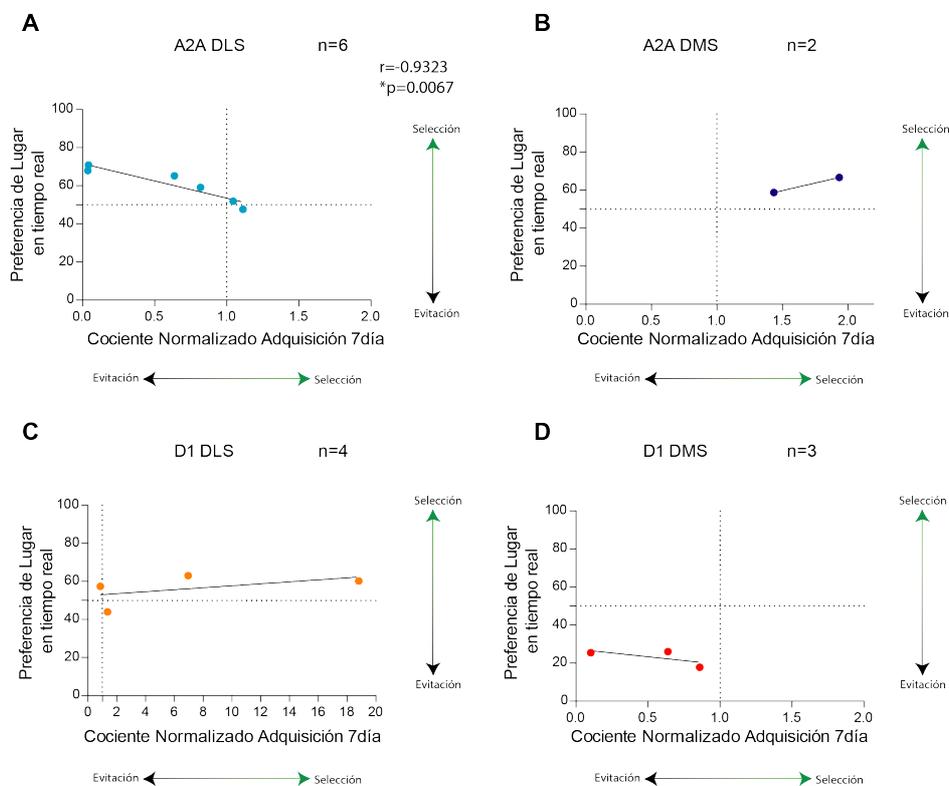


Figura 18. Correlación entre el efecto de inhibir a las neuronas de la vía indirecta en el DLS en la prueba de selección de acciones y la preferencia de lugar en tiempo real.

A) Correlación entre el cociente para seleccionar una acción (día 7 de la adquisición) y la preferencia de lugar en tiempo real ($r = -0.93$ $n = 6$, $*p < 0.01$, correlación de Pearson).

B, C y D) Igual que A para dos animales en los que se inhibió a la vía indirecta en el DMS (**B**), cuatro animales que se inhibieron en la vía directa en el DLS (**C**) y 3 animales en el DMS (**D**). Más animales son requeridos en **B-D**.

8.6 Inhibición de las vías estriales sobre la locomoción

Para evaluar la posible influencia de la actividad estriatal sobre la locomoción de los animales, inhibimos transitoriamente la actividad de las vías por compartimento (DLS y DMS) y evaluamos su efecto sobre el desplazamiento horizontal. Para este análisis, separamos los ensayos en ensayos en los que la inhibición ocurrió cuando el animal se encontraba en bajo movimiento (es decir, se encontraba moviéndose muy lento al momento de la inhibición), y ensayos en los que la inhibición ocurrió cuando el animal se encontraba desplazándose (ver métodos sección 7.10).

Siguiendo este análisis, observamos que la inhibición de la vía indirecta en el DLS en comparación a su inhibición en el DMS decrementó la locomoción de los animales en los ensayos rápidos (**Figura 19**).

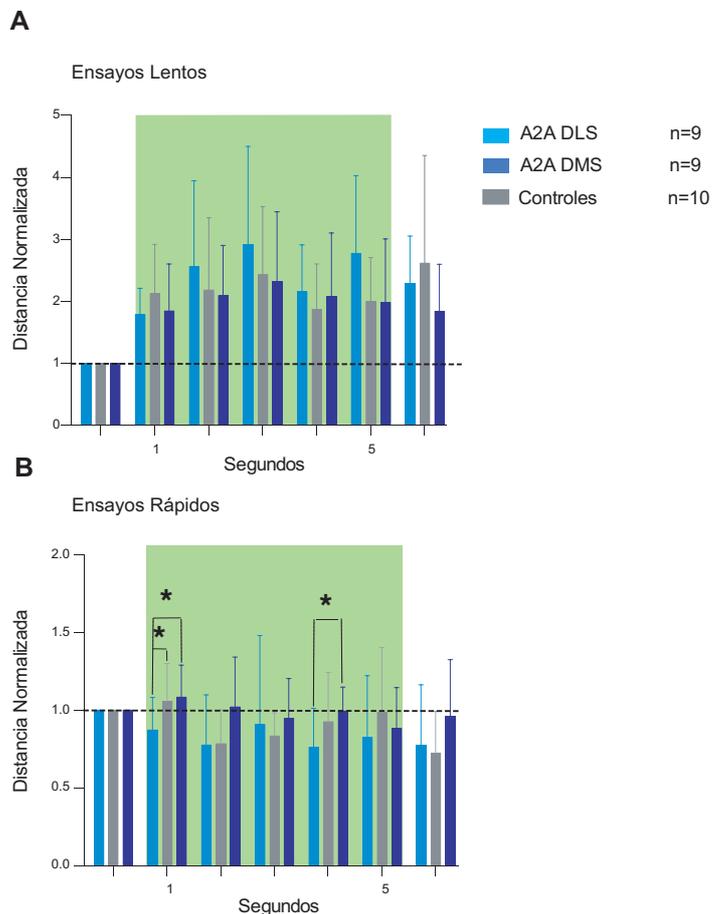


Figura 19. La inhibición de la vía indirecta en el DLS disminuye el desplazamiento de los animales contrario a su inhibición en el DMS.

A) Desplazamiento normalizado a un segundo previo a la inhibición, promedio de ensayos en los que los animales recibieron la inhibición cuando estaban en bajo movimiento.

B) Ensayos en los que los animales recibieron la inhibición cuando se encontraban desplazándose (* $p < 0.05$; Kruskal-Wallis).

La inhibición de la vía directa mostró que hubo periodos en que en el DLS incrementó la locomoción y su inhibición en el DMS decrementó la locomoción de los animales, tanto en ensayos lentos como en ensayos rápidos (Figura 20).

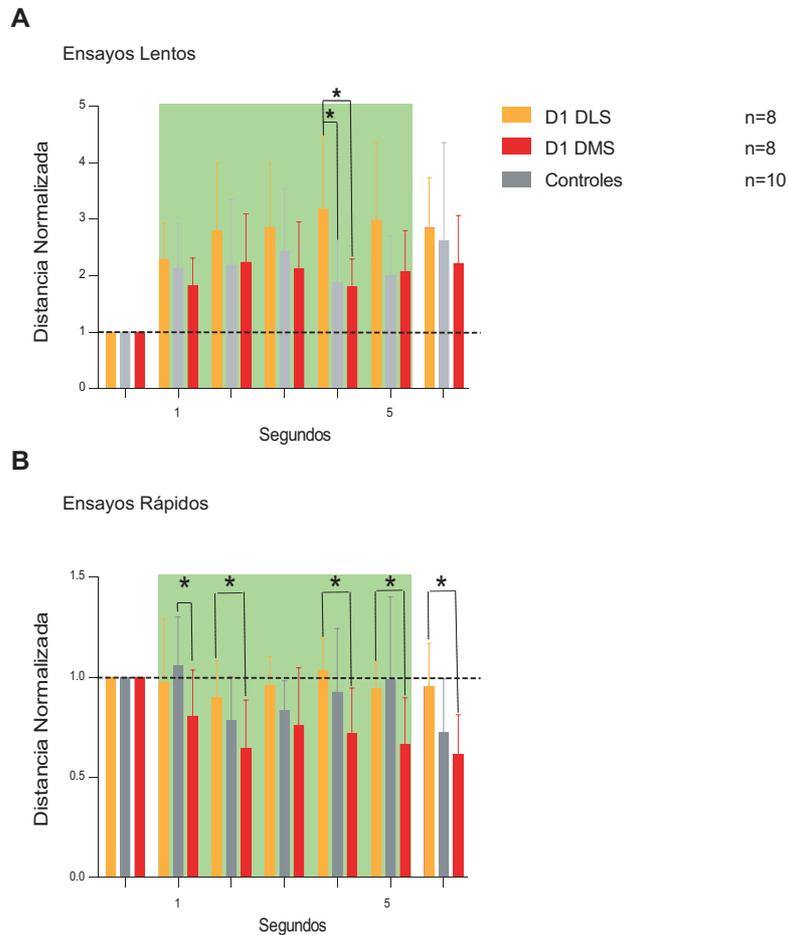


Figura 20. La inhibición de la vía directa tiene efectos opuestos sobre la locomoción dependiendo del compartimento estriatal que se manipule.

A) Desplazamiento normalizado a un segundo previo a la inhibición, promedio de ensayos en los que los animales recibieron la inhibición cuando estaban en bajo movimiento (* $p < 0.05$; Kruskal-Wallis; DMS($n=8$); DLS ($n=8$)).

B) Ensayos en los que los animales recibieron la inhibición cuando se encontraban en ensayos rápido (* $p < 0.05$; Kruskal-Wallis).

En resumen, la inhibición de las neuronas de las vías estriatales por compartimento mostró que su inhibición en el DMS ejerció la modulación esperada (inhibición de la vía indirecta: incremento en la locomoción; inhibición de la vía directa: decremento en la locomoción), pero en el DLS los efectos fueron opuestos a lo observado en el DMS, enfatizando que la interpretación

generalizada de la contribución de estas vías sobre la locomoción independiente del comportamiento evaluado es infundada.

9 Discusión

De los resultados observados en este trabajo, identificamos que 1) la inhibición de las neuronas de la vía indirecta en el DLS evita la selección de una acción guiada por reforzador, mientras que la inhibición de esta vía en el DMS lo facilita. 2) La inhibición de las neuronas de la vía directa en el DLS facilita la selección de una acción, mientras que su inhibición en el DMS lo evita. 3) La inhibición de la vía indirecta tanto en el DLS como en el DMS induce preferencia de lugar en tiempo real. 4) La inhibición de la vía directa en el DMS induce evitación pero no en el DLS. 5) La inhibición de las vías estriatales en el DMS tienen efectos opuestos a su inhibición en el DLS sobre la locomoción (ver el resumen de estos efectos en la **Tabla 2**).

Prueba	Inhibición			
	Vía indirecta		Vía directa	
	DLS	DMS	DLS	DMS
Acción guiada por un reforzador	↓	↑	↑	↓
Preferencia de Lugar en tiempo real	↑	↑	↓	↓
Locomoción	↓	↑ ¿?	↑	↓

Tabla 2. Efectos observados de la inhibición de las neuronas de las vías estriatales por compartimento en cada una de las pruebas evaluadas. En negro se muestra cuando lo observado estuvo de acuerdo al modelo antagónico de las vías estriatales, en rojo cuando lo observado está en contra de este modelo. Las flechas en signos de interrogación son tendencias observadas que requieren una mayor n de experimentos..

9.1 Los efectos observados al inhibir a las vías estriatales en el DMS concuerdan con el modelo antagónico de las vías de los GB

Trabajos previos, apoyando el modelo funcional antagónico de las vías estriatales, han mostrado que la activación de la vía directa promueve la selección de acciones y la generación de movimientos, mientras que activación de la vía indirecta induce la evitación de acciones y decrementa los movimientos (Durieux et al., 2012; Kravitz et al., 2012; Tai et al., 2012). A partir de estas evidencias era esperado que la inhibición de las vías estriatales tuviera efectos opuestos a su activación. Los resultados de este trabajo muestran que al inhibir la vía directa o indirecta en el DMS, en un protocolo de selección de acciones (**Figura 10-B2; Figura 11-B2**), en la preferencia de lugar en tiempo real (**Figura 15B; Figura 16B**), o en la evaluación de sus efectos sobre la locomoción (**Figura 18-19**, barras en color oscuro) concuerdan con dicha predicción. Por lo tanto, concluimos que la contribución de las vías estriatales, al igual que lo previamente reportado, es antagónica.

9.2 Los efectos observados al inhibir a la vía indirecta en el DLS difieren del modelo antagónico de las vías de los GB

La literatura actual no permite hacer una predicción acerca de lo que deberíamos observar como resultado de las inhibiciones de las vías estriatales en el DLS, sólo permite decir que su inhibición no podría tener los mismos efectos que en el DMS. Por ejemplo, la delección de las neuronas de ambas vías en el DLS no tiene el mismo efecto sobre la locomoción de los animales (Durieux et al., 2012).

De nuestros resultados, la inhibición de la vía indirecta en el DLS mostró efectos contrarios al DMS en la selección de acciones (durante la adquisición; **Figura 10A1-A2**) y sobre la locomoción (**Figura 19-20**), y similares al DMS en ausencia del reforzador, en la prueba de preferencia de lugar en tiempo real (**Figura 15A**).

¿Por qué la inhibición de la vía indirecta en el DLS genera efectos contrarios a su inhibición en el DMS?

En primera instancia, la explicación es que estos compartimentos estriales son parte de circuitos de interconexión que reciben entradas de diferentes de cortezas y que, se hipotetiza, mantienen este flujo de información de manera paralela a lo largo de los GB y su innervación sobre el tálamo (Florio Tiziana M., et. al., 2018; Gerfen CR. et al., 1990) (**Figura 4**). Esta idea es apoyada por datos de este mismo estudio, en los que observamos que las innervaciones de neuronas de la vía indirecta que se originan en el DMS versus el DLS sobre su salida inmediata, el GPe, muestran territorios diferentes de innervación (**Figura 21**). Y por la literatura que muestra que el GPe está involucrado en la selección de acciones, dependiendo de subterritorios dentro de este núcleo (Suryanarayana SM., et al., 2019).

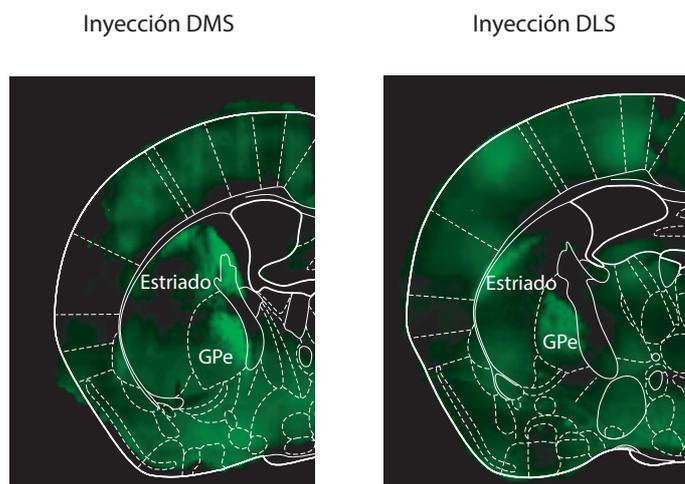


Figura 21. Rebanadas coronales a nivel del globo pálido externo (GPe) mostrando la innervación de la vía indirecta cuando se inyectó una proteína reportera en las células estriales de esta vía en el DMS (izquierda) o en el DLS (derecha). Nótese la distribución diferencial de axones dentro del GPe.

¿Cómo se explica que la inhibición de la vía indirecta haya tenido un efecto similar al manipular el DMS o el DLS?

En la tarea de selección de acciones compiten dos mecanismos: 1) el efecto reforzante de recibir un pellet por la acción (presionar una palanca), y 2) el efecto de la inhibición de la vía. Dado que la inhibición de los compartimentos de la vía indirecta tuvo un efecto similar en la prueba de preferencia de lugar (en ausencia del reforzador), la idea de que la

competencia entre estos dos mecanismos mencionados explique la diferencias observadas es plausible. Adicionalmente, el haber observado un efecto en los animales en los que se inhibió a la vía indirecta en el DMS pero no en el DLS, en la prueba de extinción sostiene el argumento de que estos dos procesos compitieron teniendo efectos diferenciales. Definir el por qué estos procesos compiten de manera diferencial dado el compartimento estriatal implicado debe ser motivo de estudios futuros. Otra posible explicación es que la inhibición de la vía indirecta en el DLS interfiere con los circuitos sensomotores (afectando el movimiento), lo cual podría ser negativo para la selección de una acción. En línea con esta explicación, está el hallazgo de que la inhibición de esta vía en el DLS sobre la locomoción de los animales mostró disminuir su desplazamiento (ver **Figura 19 y tabla 2**).

9.3 Los efectos observados al inhibir las vía directa en el DLS difieren del modelo antagónico de las vías de los GB

En lo que respecta a las inhibiciones de la vía directa en el DLS, en todas las pruebas evaluadas, su inhibición reportó efectos positivos (contrarios) a lo observado en el DMS (y a lo esperado por el modelo antagónico). Al igual que para la vía indirecta la explicación, en primera instancia, es atribuible a que estos compartimentos estriatales son parte de circuitos de interconexión que reciben entradas y tienen salidas que se integran diferencialmente de acuerdo al compartimento (ver **Figura 4 y 21**).

¿Por qué la inhibición de la vía directa en el DLS en la prueba de selección de acciones es positiva?

Para contestar estableceremos por qué su inhibición en el DMS es negativa. El DMS participa en la codificación del valor de las acciones (Kravitz et al., 2012; Frank MJ. et al., 2012; Tai Lung-Hao, et al., 2012), por lo tanto si un animal es expuesto a elegir entre dos acciones que son positivas pero una de ellas es pareada con la inhibición del DMS, es de esperarse que el animal elija la acción que no inhibe al DMS. Esto es lo observado cuando se inhibió a la vía directa en el DMS. Usando este argumento entonces podemos concluir

que el DLS no codifica un valor positivo de la acción, porque cuando inhibimos a la vía directa en este compartimento de hecho los animales prefieren la acción asociada a su inhibición (ver **Tabla 2**). Por lo tanto, para explicar que la inhibición del DLS sea positiva tenemos que recurrir a una explicación alterna como que la inhibición de los circuitos sensomotores sea positiva per se. En línea con esta explicación, está el hecho que los animales prefieren la estimulación de esta vía aún en ausencia del reforzador (prueba de preferencia de lugar en tiempo real) (**Figura 16A**). Y también en línea está el hecho de que su inhibición parece facilitar la locomoción de los animales (**Figura 20**).

En conclusión, nuestros datos muestran evidencia de que la contribución de las vías estriatales en el DLS es diferente a sus contribuciones en el DMS. Proponemos que la generalización de las funciones de las vías es inapropiada o debe actualizarse con la evidencia presentada. En apoyo a esta idea están resultados recientes en los que diferentes regiones del estriado (estriado anterior versus posterior) contribuyen de manera diferencial a la generación de conductas (Guo L. et al., 2018; Akam T. et al., 2017).

10 Conclusiones generales

Este trabajo de tesis muestra que la inhibición de las vías estriatales tiene efectos diferenciales dependiendo del compartimento estriatal en donde se manipulen:

1. La inhibición de las vías del estriado dorsomedial generó efectos consistente con el modelo clásico de contribución antagónica sobre la selección de acciones y sobre la locomoción.
2. La inhibición de las vías estriatales en el estriado dorsolateral tiene contribuciones incompatibles con el modelo clásico:
 - La inhibición de la vía indirecta en el DLS es negativa para la selección de una acción y para la locomoción, pero no para la preferencia de lugar. Suponemos interfiere con la apropiada selección de acciones.
 - La inhibición de la vía directa es positiva para la selección de una acción, para la locomoción y para la preferencia de lugar. Suponemos es independiente de la codificación del valor de un reforzador pero sí impone un valor positivo.
3. La contribución de las vías estriatales no se pueden generalizar para todo el estriado.

Referencias

- Akman T., Rodrigues-Vaz I., Zhang X., Pereira M., Oliveira R., Dayan P., Costa R. M. (2017). Single-Trial Inhibition of Anterior Cingulate Disrupts Model-based Reinforcement Learning in a Two-step Decision Task.
- Albin, L. R., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. Elsevier Science Publishers Ltd, 12, 366-375.
- Alexander, G. (1995). Handbook of Brain Theory and Neural Networks. (M. A. Arbib Ed.). Cambridge, Massachusetts.
- A., D., & Balleine, B. (1994). Motivational control of goal-directed action. *Animal Learning & Behavior*, 22 (1), 1-18.
- Bergstrom, HC., Lipkin, A. M., Lieberman, A. G., Pinard, C. R., Gunduz-Cinar, O., Brockway, E. T., Holmes, A. (2018). Dorsolateral Striatum Engagement Interferes with Early Discrimination Learning. *Cell Rep*, 23(8), 2264-2272. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29791838>. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.081
- Calabresi et al., 2014, Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal, *Nat. Neurosci.*, 17, 1022-1030.
- Chang HT., et al., 1982, A Golgi Study of Rat Neostriatal Neurons: Light Microscopic Analysis, *The Journal of Comparative Neurology*, 208:107-126.
- Cuevas-Vicente, 2017, Activación optogenética de las vías directa e indirecta de los ganglios basales: estriado dorsomedial versus dorsolateral, Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cui G., et al, 2013, Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation, *Nature*; 494(7436): 238–242.
- DeLong M.R., 1990, Primate models of movement disorders of basal ganglia origin., Elsevier Science Publishers Ltd, (UK) 0166- 2236190.
- Dickinson A, Balleine B.,1994, Motivational control of goal-directed action., *Anim. Learn. Behav.* ; 22:1–18.
- Durieux PF, et al., 2012. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1 and D2 neurons in distinct dorsal striatum subregions, *The EMBO Journal*; 31, 640–653.
- Domjan, M.,2010, Principios de aprendizaje y conducta. Sexta edición. Wadsworth Cengage Learning. Editores, México D.F.
- Florio Tiziana M., et al., 2018, The Basal Ganglia: more than just a switching device, *CNS Neurosci Ther.* 2018;24:677–684.
- Frank, M.J., et al., 2004, By carrot or by stick: cognitive reinforcement learning in parkinsonism. *Science* 306, 1940–1943.
- Graybiel AM, et al., 1994, The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, 265:1826-1831.

- Gerfen, CR., et al., 1990, D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* (80), 250, 1429–1432.
- Gerfen CR., 2006, Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease, *Nat. Neurosci.*, 9, 157-158.
- Guo, L., Walker, W. I., Ponvert, N. D., Penix, P. L., & Jaramillo, S. (2018). Stable representation of sounds in the posterior striatum during flexible auditory decisions. *Nat Commun*, (1), 1534.
- Hikosaka O. et al, 2000, Role of the Basal Ganglia in the Control of Purposive Saccadic Eye Movements, *Physiological Reviews*, Vol. 80, No. 3
- Jaidar O, Carrillo-Reid L, Lopez-Huerta VG, Nakano Y, Garcia-Munoz M, Hernandez A, Lazarus M, Bargas J and Arbuthnott GW, 2019. Direct synchronous activation of both striatal output networks mimics the effects of dopamine depletion. *EJN*. Online.
- Jill R. Crittenden and Graybiel AM., 2011, Basal ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments, *Frontiers in Neuroanatomy* (5) 59.
- Jin X. et al 2014, Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and cocatenation of action sequences, *Nat Neurosci.*; 17(3): 423–430.
- Kemp JM. and Powell TPS., 1971, The Structure Of The Caudate Nucleus Of The Cat: Light And Electron Microscopy, *Phil. Trans. R. Soc. Lord. B.*, 262, 383-401.
- Kemp, JM., and Powell, T.P, 1971, The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 262, 429–439.
- Kimchi EY, and Laubach M, 2009, The Dorsomedial Striatum Reflects Response Bias during Learning, *The Journal of Neuroscience*, 29(47):14891–14902 • 14891.
- Kravitz et al, 2010, Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry, *Nature.*; 466:622–626.
- Kravitz et al, 2012, Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement, *Nat. Neurosci.*, 15, 816-818.
- Kreitzer, Anatol C., et al., 2013, Control of Basal Ganglia Output by Direct and Indirect Pathway Projection Neurons, *The Journal of Neuroscience*, 33(47):18531–18539 • 18531.
- Kreitzer Anatol C. and Nelson Alexandra B., 2014, Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction, *Annu Rev Neurosci.*, 37: 117–135.
- Lanciego, José L., et al., 2012, Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia, *Cold Spring Harb Perspect Med*; 2.
- Laurent M., De Backer J-F, Rial D, Schiffmann SN and de Kerchove d’Exaerde A., 2017, Bidirectional Control of Reversal in a dual action task by Direct and Indirect Pathways activation in the dorsonlateral striatum in the Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 11:256.
- M. Costa Rui, et al., 2016, Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Current Biology* 26, R257–R274.

- Macpherson T., et al., 2014, Striatal direct and indirect pathways control decision making behavior, *Frontiers Psychology*, 5:1301.
- Mink JW., 1996, The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.*50, 381–425.
- Mink JW., 2018, Basal Ganglia mechanisms in action selection, pasticity, and dystonia., *European Journal of Paediatric Neurology*, 22, 225e229.
- Oldenburg Ian A. y Bernardo L. Sabatini, 2015, Antagonistic but Not Symmetric Regulation of Primary Motor Cortex by Basal Ganglia Direct and Indirect Pathways, *Neuron* 86, 1174–1181.
- Parker et al, 2016, Pathway-Specific Remodeling of Thalamostriatal Synapses in Parkinsonian Mice, *Neuron*, 89, 734–740.
- Redgrave P., et al., 2010, Goal-directed and habitual control in the basal ganglia-implications for Parkinson’s disease, *Nat Rev Neurosci.*, 11(11): 760–772. doi:10.1038/nrn2915.
- Rodrigues S., et al., 2017, Dorsal striatum D1-expressing neurons are involved with sensorimoyot gating on prepulse inhibition test. *Journal of Psychopharmacology*, 31(4): 505-513.
- Samejima, et al., 2005, Representation of Action-Specific Reward Values in the Striatum. *Science* (80-.), 310, 1337–1340.
- Saunders A. et al., 2015, A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex, *Nature*, 7;521(7550): 85-89.
- Shin J.H., Kim D., Jung M.W. (2018). Differential coding of reward and movement information in the dorsomedial striatal direct and indirect pathways. *Nature communications*, 9:404.
- Stujenske J. M., Spellman, T., & Gordon, J. A. (2015). Modeling the Spatiotemporal Dynamics of Light and Heat Propagation for In Vivo Optogenetics. *Cell Rep*, 12 (3), 525-534.
- Suryanarayana S. M., Koteleski J. H., Grillner S., Gurney K. N., (2019). Roles for globus pallidus externa revealed in a computational model of action selection in the basal ganglia. Elsevier Science Publishers Ltd, (109), 113-136.
- SgROI S and Tonini R, 2018, Opioidergic Modulation of Striatal Circuits, Implications in Parkinson’s Disease and Levodopa Induced Dyskinesia, *Front. Neurol.*, 9:524.
- Tai Lung-Hao, et al., 2012, Transient stimulation of distinct subpopulations of striatal neurons mimics changes in action value, *Nat Neurosci.*,15(9): 1281–1289. doi:10.1038/nn.3188.
- Tecuapetla et al., 2016, Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution., *Cell* 166, 703–715.
- Wichmann T., and DeLong MR., 1996, Functional and pathophysiological models of basal ganglia, *Current Opinion in Neurobiology*, 6:751-758.

- Watanabe K, and Hikosaka O., 2005, Immediate Changes in Anticipatory Activity of Caudate Neurons Associated With Reversal of Position-Reward Contingency, *J Neurophysiol* 94: 1879–1887, 2005; doi:10.1152/jn.00012.
- Wichmann T., y DeLong MR., 1996, Functional and pathophysiological models of the basal ganglia, *Current Opinion in Neurobiology* 1996, 6:751-758
- Yee DM. and Braver TS., 2017, Interactions of motivation and cognitive control, *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 19:83-90.
- Yin, H. H., et al., 2005, The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 22, 513–523. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x.
- Yin HH, Knowlton BJ., 2006, The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Rev. Neurosci*; 7:464–476. [PubMed: 16715055]
- Yin, H. H., et al., 2009, Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat. Neurosci.* 12, 333–341. doi: 10.1038/nn.2261.
- Yin, H. H., 2010. The sensorimotor striatum is necessary for serial order learning. *J. Neurosci.* 30, 14719–14723. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3989-10.2010