



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA CANNABINÉRGICO EN LA ACTIVIDAD DEL
GLOBO PÁLIDO EXTERNO Y EL CONTROL DE LA VELOCIDAD**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARIO GABRIEL MARTÍNEZ MONTALVO

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. PAVEL E. RUEDA OROZCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. LUIS ALBERTO TELLEZ LIMA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Dr. ISAAC OBED PÉREZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

JURIQUILLA, QUERÉTARO. OCTUBRE DEL 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología de los Hábitos (A-02) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutela del Dr. Pavel E. Rueda Orozco y financiado con el apoyo de los proyectos PAPIIT: IA201918 y IA201020; y CONACyT: FC206_1702. Además, se agradece la asistencia técnica de la Dra. María Teresa Peña Rangel y Augusto Cuahutli Pacheco.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología, por las instalaciones y la planta docente que me permitieron llevar a cabo mi proyecto de investigación y enriquecieron mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría (No. de beca: 925898).

A mi comité tutor, integrado por el Dr. Luis Alberto Tellez Lima y el Dr. Isaac Obed Pérez Martínez, por su apoyo y las aportaciones brindadas a lo largo de estos cuatro semestres.

A los miembros del jurado para mi examen profesional: el Dr. Hugo Merchant Nancy, el Dr. Víctor Hugo De Lafuente Flores, el Dr. Luis Alberto Tellez Lima, la Dra. María de la Luz Navarro Angulo y el Dr. Pavel E. Rueda Orozco. Por sus aportaciones a la mejora del presente trabajo.

A la Dra. Nuri Aranda López, la M. en C. Leonor Casanova Rico y Ma. del Carmen Mendoza López por su instrucción y apoyo en la realización de trámites por parte de la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología.

A la Lic. Ma. Lourdes Lara Ayala por su disposición y apoyo para las video conferencias y enlaces durante las clases y los tutoriales.

A la Dra. Alejandra Castilla y el MVZ. Martín García por su apoyo técnico y servicio de para el cuidado de los animales del bioterio.

A la Unidad de Microscopia por su disposición y apoyo técnico para el uso del equipo de la unidad.

Dedicatorias

A mi familia: mi padre Ismael F. Martínez Ramírez, mi madre Gabriela Montalvo Gutiérrez, a Violeta y a mis hermanas Damara, Sugey y Fernanda. Por brindarme todo su cariño y apoyo, gracias a ustedes he llegado a donde estoy y tomo fuerza cada vez que las cosas se tornan difíciles.

A los amigos que he mantenido por tanto tiempo, pese a que la distancia entre nosotros ahora sea más larga: Luis, Omar, Elan, Daniel, Moisés, Leslie y Julio. También a mis amigos cuya amistad se ha forjado más recientemente, por ahora me vienen a la memoria Pablo, Dieter, Gama y Ame.

Al doctor Pavel Ernesto Rueda Orozco, por toda la paciencia y las enseñanzas que me ha brindado durante estos dos años. Gracias a usted aprendo algo nuevo cada día e, incluso, reaprendo por cada error que me ha ido ayudando a corregir. Lo admiro mucho y agradezco la oportunidad de que me haya permitido integrarme a su equipo de trabajo.

A los demás integrantes del laboratorio A-02: Tere, Augusto, Annie, Karen, Elizabeth, Paola, Silvia, Perla y Diana. Porque de todas he aprendido algo y he recibido mucho apoyo durante esta etapa de mi formación.

Y, finalmente, una dedicatoria especial para Yasmín, Elizabeth, Silvia, Diana y Karen. Con quienes he tenido la oportunidad de convivir más cercanamente y formar un vínculo especial basado en el cariño, apoyo y experiencias compartidas.

¡A todos ustedes, muchas gracias!

ÍNDICE

I. LISTA DE ABREVIATURAS	1
III. RESUMEN	2
III. ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. GANGLIOS BASALES	5
2.1. Anatomía de los ganglios basales.....	5
2.1.1. Globo pálido externo (GPe)	6
2.2. Función de los ganglios basales y su relación con el control motor	7
2.3. Ganglios basales y estimación temporal	10
3. SISTEMA CANNABINÉRGICO	13
3.1. Descripción del sistema cannabínérgico	13
3.2. Participación del sistema cannabínérgico en la ejecución del movimiento .	15
3.3. El sistema cannabínérgico y la estimación temporal.....	17
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	20
6.1. Objetivo general	20
6.2. Objetivos específicos	20
7. MÉTODO.....	20
7.1. Animales	20
7.2. Protocolo conductual.....	21
7.3. Registros electrofisiológicos de alta densidad en animal anestesiado	24
7.4. Aparatos y programas	27
8. RESULTADOS	27

8.1 Tarea con componentes espaciotemporales y administraciones sistémicas diferenciales del agonista cannabinérgico CP55940.....	32
8.2 Tarea con componentes espaciotemporales y administraciones locales diferenciales del agonista cannabinérgico CP55940.....	36
8.3 Registros electrofisiológicos en animal anestesiado y administraciones sistémicas diferenciales de CP55940	41
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIÓN	51
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
12. MATERIALES SUPLEMENTARIOS.....	60

I. LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonil-glicerol
AP	Antero-posterior
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
L	Lateral
NEMs	Neuronas espinosas medianas
NST	Núcleo subtalámico
rCB1	Receptor a cannabinoides tipo I
rCB2	Receptor a cannabinoides tipo II
SBF	Striatal beat-frequency model
SNC	Sustancia <i>nigra pars compacta</i>
SNr	Sustancia <i>nigra pars reticulata</i>
THC	Tetrahidrocannabinol
Vía i.p.	Vía de administración intraperitoneal

III. RESUMEN

La manipulación del sistema cannabinérgico se ha relacionado con alteraciones en la memoria, la regulación del apetito, la estimación temporal y el control del movimiento. Esto podría deberse a que regiones involucradas en estos procesos presentan una alta expresión del receptor a cannabinoides tipo I (rCB1). El globo pálido externo (GPe), el cual presenta una alta expresión del rCB1, es el primer relevo en la vía indirecta de los ganglios basales, un grupo de estructuras subcorticales relacionadas con el control del movimiento y la estimación temporal. Por lo que el objetivo de este trabajo fue discernir la participación del sistema cannabinérgico en la actividad neuronal del globo pálido externo y su relación con el control de la velocidad. Para ello utilizamos un protocolo conductual que nos permite estudiar de manera independiente el componente espacial, la estimación temporal y el control de la velocidad en roedores entrenados para ejecutar secuencias de movimientos. Con lo que encontramos que la administración sistémica de un agonista cannabinérgico provoca una disminución en la velocidad de los animales que es independiente a la representación espacial y temporal de esta secuencia de movimientos. Posteriormente, mediante administraciones locales de agonistas y antagonistas cannabinérgicos en el GPe y registros electrofisiológicos en animal anestesiado, encontramos que estos cambios en la velocidad no están relacionados con el rCB1 presente en el GPe.

III. ABSTRACT

Cannabinergic system activation has been related with alterations in memory, appetite regulation, temporal estimation and movement control. It has been suggested that these effects may be related to high expression of the cannabinoid receptor 1 (rCB1) in the regions involved in these processes. The external globus pallidus (GPe), that expresses high levels of the rCB1, is the first relay in the indirect pathway of basal ganglia, a group of subcortical structures related to movement control and temporal estimation. The objective of this work was to discern the

participation of the cannabinergic system in the neural activity of the external globus pallidus and its relationship with speed control. To this aim, we used a behavioral protocol where we could independently study the spatial, temporal and speed component of the execution of sequences of movements in highly trained rodents. We found that the systemic injections of a cannabinergic agonist caused a decrease in the speed of animals, but this effect was independent of the spatial and temporal representation of the sequence of movements. Local administrations of cannabinergic agonist/antagonist directly into the GPe, as well as electrophysiological recordings in anesthetized animals, confirmed that the speed changes produced by systemic injections were not associated to the rCB1 expressed in the GPe. These results suggest that the speed control of movement is not related to the activation of rCB1 in the external globus pallidus.

1. INTRODUCCIÓN

Los ganglios basales son un grupo de estructuras subcorticales cuya función ha sido relacionada principalmente con el control de movimiento, la selección de acciones, la formación de hábitos y con procesos cognitivos como la memoria, el aprendizaje y la motivación (Ospina-García, et al., 2017). El procesamiento correcto de estas funciones es importante para la supervivencia de los seres vivos y su interacción con el ambiente (Kim et al., 2019). Por ejemplo, para la correcta realización de movimientos es importante el control de parámetros como la amplitud, la velocidad, la dirección, la fuerza y el “timing” con que deben ejecutarse determinadas acciones o comandos motores. En patologías como la enfermedad de Parkinson se presenta una disfunción en el circuito que forman los ganglios basales, lo que resulta en bradicinesia, temblor y rigidez del movimiento, síntomas que pueden llegar a ser incapacitantes para los pacientes que los padecen (Albin, Young, & Penney, 1989; DeLong, 1990; Redgrave et al., 2010).

La actividad en el circuito de los ganglios basales puede ser modulada por factores como la transmisión de señales GABAérgicas, colinérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas en distintos elementos del circuito. Además de estos elementos, uno de los sistemas de modulación más estudiados recientemente es el sistema

endocannabinoide, el cual también se encuentra presente en los ganglios basales (Iversen, 2003). El sistema endocannabinoide, o sistema cannabinérgico, es un sistema de neurotransmisión retrógrada que modula a la baja la liberación del neurotransmisor en las terminales presinápticas (Freund, Katona, & Piomelli, 2003). En los ganglios basales se han encontrado receptores a cannabinoides en las terminales que llegan al estriado, al globo pálido (interno y externo) y a la *substantia nigra pars reticulata*. Se ha visto que la activación diferencial de estos receptores, mediante administraciones sistémicas de agonistas cannabinérgicos, provoca hiperlocomoción con dosis bajas e hipolocomoción con dosis altas (Sulcova, Mechoulam, & Fride, 1998).

Gran parte de la investigación sobre el sistema cannabinérgico y su modulación sobre los ganglios basales ha sido realizada con administraciones sistémicas de agonistas y analizando el flujo de información en el circuito que conforman estas estructuras (Gerdeman, Partridge, Lupica, & Lovinger, 2003; Glass, 1997; Sañudo-Peña, Tsou, & Walker, 1999). No es sino hasta los últimos años que se ha comenzado a explorar con más detalle cómo se modula cada uno de los núcleos del circuito tras la activación de los receptores a cannabinoides, y cómo esto afecta la salida de información hacia los sistemas motores y su correlato conductual (Goodman & Packard, 2015).

El globo pálido externo es el primer relevo en la vía indirecta de los ganglios basales, la cual se ha visto relacionada con la inhibición del movimiento en condiciones fisiológicas y con una sobreactivación en patologías como la enfermedad de Parkinson (DeLong, 1990), por lo que proponemos que el análisis de la modulación por cannabinoides en este núcleo nos permitiría discernir con mayor precisión cómo el sistema endocannabinoide modula el movimiento, y su posible potencial terapéutico.

Por este motivo, el objetivo de este proyecto es determinar los efectos de administraciones sistémicas y locales de agonistas y antagonistas cannabinérgicos sobre la actividad neuronal del globo pálido externo y su relación con el control de parámetros cinemáticos como la velocidad.

2. GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales tradicionalmente relacionados con la planificación, integración y ejecución del movimiento (Albin et al., 1989). Sin embargo, investigaciones recientes han reportado que estas estructuras también se ven involucradas en la adquisición de hábitos motores, el procesamiento emocional, el aprendizaje y la memoria (Da Cunha & Packard, 2009). Los GB están integrados por los siguientes núcleos: 1) el cuerpo estriado, constituido por el núcleo caudado, el putamen y el núcleo *accumbens*; 2) el globo pálido, en sus segmentos interno (GPi) y externo (GPe); 3) la sustancia *nigra*, que consta de una parte *compacta* (SNc) y una *reticulata* (SNr); y 4) el núcleo subtalámico (NST) (Kandel, Schwartz & Jessell 2014).

2.1. Anatomía de los ganglios basales

Desde un punto de vista anatómico, los núcleos de los GB pueden dividirse en los que corresponden a la porción dorsal y los correspondientes a la porción ventral. La porción dorsal está constituida por el cuerpo estriado y el globo pálido (en sus segmentos interno y externo). En la porción ventral encontramos la parte del cuerpo estriado que corresponde al núcleo *accumbens*, el núcleo subtalámico y la sustancia *nigra* (*pars compacta* y *pars reticulata*) (Ospina-García et al., 2017).

El núcleo estriado es el principal núcleo de entrada de información en los GB, este recibe aferencias procedentes de prácticamente toda la corteza cerebral y el tálamo (Graybiel & Grafton, 2015). Estas proyecciones son en su mayoría excitatorias y activan la transmisión de información inhibitoria del estriado hacia el complejo compuesto por el GPi y la sustancia *nigra reticulata*, que constituyen los núcleos de salida de los GB, o hacia el GPe. El flujo de información que va del cuerpo estriado a los núcleos de salida es conocido como la vía directa, mientras que la vía indirecta está conformada por el cuerpo estriado, el GPe, el núcleo subtalámico y, finalmente, la sustancia *nigra reticulata* y el GPi (figura 1) (Kandel, Schwartz & Jessell 2014; Redgrave et al., 2010).

2.1.1. Globo pálido externo (GPe)

El globo pálido externo es el primer relevo en la vía indirecta, recibe proyecciones GABAérgicas de neuronas espinosas medianas (NEMs) del cuerpo estriado que expresan el receptor dopaminérgico D2. En roedores, el GPe se sitúa en una región caudomedial respecto al estriado, la cápsula interna separa la porción dorsal del GPe del tálamo dorsal (Kita & Jaeger, 2016).

La inactivación del GPe, por actividad de la vía indirecta, provoca que su acción inhibitoria sobre el NST se detenga. Debido a que el NST es un núcleo glutamatérgico, cuando la actividad del GPe disminuye, el NST puede liberar glutamato sobre los núcleos de salida de los GB e inhibir la salida motora (Kandel & Schwartz, 2014). Aunado a esto, se ha demostrado que las NEMs correspondientes a las vías directa e indirecta (D1 y D2) no se encuentran perfectamente segregadas, si no que presentan colaterales hacia otras regiones del estriado que podrían estar influyendo en la actividad de ambas vías (Taverna, Ilijic, & Surmeier, 2008). Por lo que el GPe puede resultar un buen blanco para el estudio de la vía indirecta sin la influencia de las colaterales de la vía directa.

En lo referente a la interacción entre el GPe y el NST, se ha encontrado que el NST también envía proyecciones glutamatérgicas hacia el globo pálido externo, lo que plantea la existencia de una modulación inhibitoria del GPe hacia el NST, como lo sugiere el modelo clásico, y una regulación del NST hacia el GPe que es de naturaleza excitatoria. Esto confiere al GPe un rol como integrador de información ascendente y descendente en el circuito de lo GB, información que posteriormente podría ser procesada por el resto de los núcleos de la vía indirecta (Kita & Jaeger, 2016).

El GPe, en ratas está conformado por aproximadamente 46 mil neuronas (Oorschot, 1996), de las que la mayoría son GABAérgicas y un pequeño porcentaje (alrededor de 5%) pertenece a neuronas colinérgicas de proyección a la corteza cerebral (Chan et al., 2016; Gerfen & Bolam, 2010). Las neuronas GABAérgicas del GPe pueden subdividirse en dos tipos: las llamadas protopalidales, que representan aproximadamente el 70%, se caracterizan por un tipo de disparo tónico con

pequeñas pausas espontáneas y en su mayoría proyectan al NST; y las neuronas arkypalidales, las cuales representan del 25-30% restantes, que proyectan a la porción dorsal del estriado y presentan un patrón de disparo irregular en forma de ráfagas (Kita, 2007; Mallet et al., 2012)

2.2. Función de los ganglios basales y su relación con el control motor

La vía directa y la vía indirecta (figura 1) fueron descritas originalmente por Albin y colaboradores en 1989 como dos vías segregadas anatómicamente y funcionalmente (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Observando que la vía directa se veía relacionada con la facilitación del movimiento y la vía indirecta con la inhibición del mismo, se despertó el interés por entender cómo interactuaban los núcleos que constituyen cada una de estas vías para originar ambos estados funcionales en los GB (DeLong, 1990).

Como se había mencionado anteriormente, la vía directa está constituida por el cuerpo estriado y los núcleos de salida de los GB (el GPi y la SNr). Al ser el principal núcleo de entrada, el estriado recibe aferencias excitatorias de múltiples áreas de la corteza cerebral, el tálamo y el tronco encefálico. Debido a que el cuerpo estriado está constituido en su mayoría por células GABAérgicas de proyección (conocidas como neuronas espinosas medianas), la activación de éste provocaría la transmisión de información inhibitoria hacia el GPi y la sustancia *nigra reticulata*. En condiciones basales, la función del GPi y la sustancia *nigra reticulata* es mantener la inhibición de manera tónica en los núcleos motores del tálamo (Gerfen & Bolam, 2010); sin embargo, al recibir una inhibición fásica originada en las proyecciones estriatales, los núcleos de salida de los GB dejarían de actuar sobre los núcleos motores del tálamo, permitiendo el flujo de la salida motora y la facilitación del movimiento (Kandel, Schwartz & Jessell 2014; Redgrave et al., 2010).

Por otra parte, en la vía indirecta las proyecciones inhibitorias de las NEMs del estriado llegarían al segmento externo del globo pálido, con lo que cesaría el efecto inhibitorio del GPe sobre el siguiente elemento del circuito: el núcleo subtalámico. El núcleo subtalámico es el único núcleo glutamatérgico de los GB, por lo que al cesar su inhibición estas prolongaciones excitatorias activan los núcleos de salida

de los GB, favoreciendo la inhibición tónica sobre los núcleos motores del tálamo y, por lo tanto, la inhibición del movimiento (Redgrave et al., 2010).

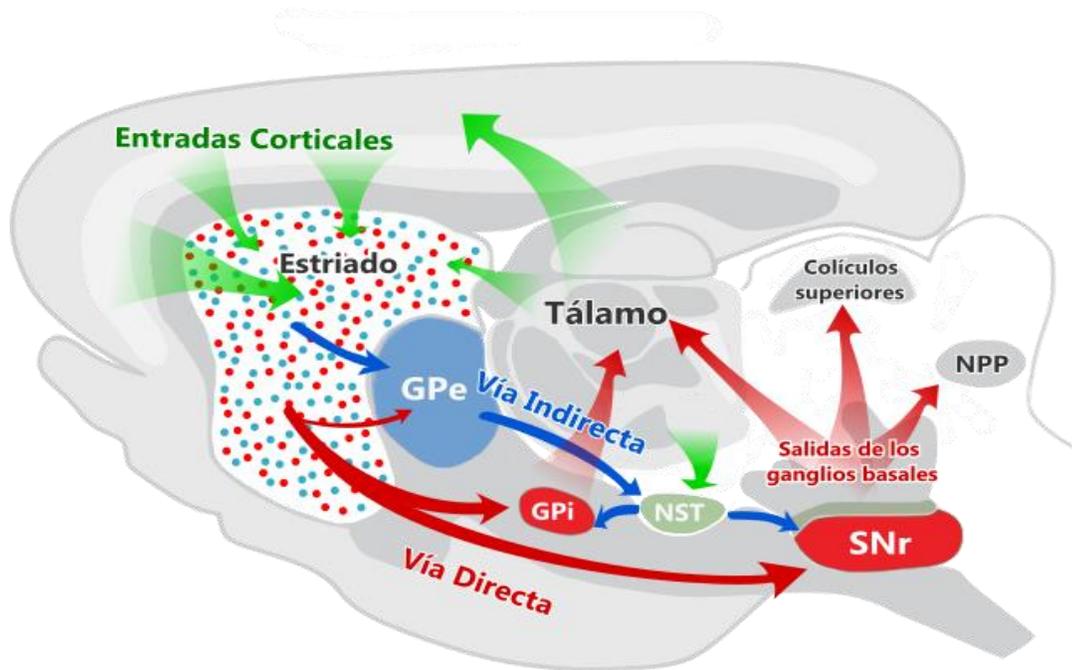


Figura 1. Circuito de los ganglios basales. Se pueden observar las proyecciones clásicas de la vía directa e indirecta, así como las colaterales de cada núcleo que se han ido observando recientemente. Las flechas verdes representan las aferencias de información provenientes de la corteza y el tálamo, las flechas rojas las proyecciones de la vía directa y las azules las de la vía indirecta. Los puntos en el estriado representan las neuronas espinosas medianas de la vía directa (puntos azules) e indirecta (puntos rojos) respectivamente. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalámico; SNr: sustancia *nigra pars reticulata*; NPP: núcleo pedúnculo pontino. Modificado de (Gerfen & Bolam, 2010).

Independientemente de las proyecciones recibidas directamente de la corteza cerebral y el tálamo, las vías directa e indirecta también se ven afectadas por la irrigación dopaminérgica de la sustancia *nigra pars compacta*. Bajo estas condiciones, la vía directa, que posee receptores D1 acoplados a proteínas Gs, facilitan su transmisión sináptica; mientras la vía indirecta, que posee receptores

D2, acoplados a proteínas Gi, inhibe su transmisión sináptica. Por lo tanto, las aferencias dopaminérgicas hacia ambas vías provocan el mismo efecto, reducir la inhibición de los núcleos motores talámicos y facilitar el movimiento (Kandel, Schwartz & Jessell 2014).

En contraste con la visión clásica, las investigaciones recientes sugieren que la función de los GB no se limita a la inhibición o la facilitación del movimiento, sino que también podrían estar modulando aspectos finos del control motor como el vigor (que involucra velocidad, amplitud, fuerza y frecuencia del movimiento) o la estimación temporal para iniciar la ejecución de una secuencia motora (Turner & Desmurget, 2010).

Basándose en la hipótesis de que los GB controlan el vigor del movimiento, Yttri y Dudman (2016) diseñaron una tarea en que ratones debían desplazar una barra horizontal de manera bimanual y posteriormente evaluar la amplitud, velocidad y duración de cada desplazamiento. Una vez que los animales estaban entrenados, estimularon optogenéticamente neuronas estriatales para activar las vías directa e indirecta y observar cómo se afectaba el desempeño conductual. Inicialmente ambas vías fueron estimuladas cuando los animales realizaban desplazamientos rápidos de la barra, con lo que observaron que la estimulación en la vía directa provocaba un aumento en la velocidad de desplazamiento, mientras que la estimulación en la vía indirecta disminuía la velocidad (como lo predice el modelo clásico). No obstante, cuando la estimulación se realizó durante los desplazamientos lentos los resultados se invirtieron: la estimulación de la vía directa resultaba en un decremento en la velocidad del desplazamiento y la estimulación de la vía indirecta en un aumento de la velocidad. Con estos resultados dedujeron que ambas vías podrían estar modulando bidireccionalmente el movimiento (Yttri & Dudman, 2016).

Un problema presente al realizar estudios sobre la vía directa e indirecta desde su origen estriatal es que el cuerpo estriado también se encuentra modulado por distintos tipos de interneuronas, o que las eferentes emitidas por cada vía llegan a presentar colaterales hacia otras regiones del estriado (Kandel, Schwartz & Jessell

2014; Taverna, Ilijic, & Surmeier, 2008). Debido a esto, una estrategia alternativa para estudiar la vía indirecta sería el análisis de la modulación del relevo en el GPe y sus efectos sobre la actividad neuronal y la ejecución de movimiento.

El GPe recibe aferencias del cuerpo estriado y se ha visto que sus proyecciones GABAérgicas no sólo conectan con el núcleo subtalámico, sino que también presentan colaterales hacia el GPi y la sustancia *nigra pars reticulata* (Gerfen & Bolam, 2014). También se le confiere un rol importante en el control de parámetros del movimiento como el vigor, lo que lo vuelve un blanco para el estudio de la función de los ganglios basales.

2.3. Ganglios basales y estimación temporal

El procesamiento de la información temporal es crítico para el aprendizaje, la integración sensorial y la ejecución de la conducta (Paton & Buonomano, 2018). La percepción o estimación del tiempo es relevante debido a que nos permite anticipar, planear y responder efectivamente a los eventos que se presentan en nuestro entorno, aún de forma inconsciente (Block & Zakay, 1997). Para esto, el cerebro debe integrar la información proveniente de los diversos estímulos sensoriales, realizar una evaluación y ejecutar una respuesta en un lapso comprendido entre los cientos de milisegundos y los segundos (Buhusi & Meck, 2005).

Los GB reciben información de prácticamente toda la corteza cerebral y de múltiples núcleos talámicos, por lo que se encuentran implicados en el procesamiento del tiempo sensorial y motor en la escala comprendida entre los cientos de milisegundos y los segundos (Paton & Buonomano, 2018). Estudios con resonancia magnética funcional en humanos han descrito una activación significativa en el caudado-putamen durante tareas de comparación de intervalos temporales (revisado en Paton & Buonomano, 2018; Buhusi & Meck, 2005). Además, se ha reportado que pacientes con patologías como la enfermedad de Parkinson o Huntington presentan déficits en la discriminación y seguimiento de intervalos de tiempo (revisado en Ivry, 1996; Mauk & Buonomano, 2004; Meck, 1996); estos efectos también se han observado en modelos animales, donde ratas sometidas a lesiones electrolíticas en

la SNc o en el estriado dorsal son incapaces de realizar tareas de discriminación temporal (Meck, 1996).

Para entender cómo nuestro cerebro procesa la información temporal se han propuesto diversos modelos, uno de ellos es el denominado *Modelo del marcapasos-acumulador* (Church, 1984; Gibbon, Church, & Meck, 1984). En este modelo se plantea la existencia de tres funciones básicas que nos ayudan con la estimación de la duración de un evento: la primera es la actividad *marcapasos*, la cual va generando una serie de pulsos a través del tiempo, lo que le confiere una función similar a la de un metrónomo; la segunda es la función del *acumulador*, que va almacenando de forma continua los pulsos emitidos por el marcapasos, los cuales son requeridos para la estimación de una duración determinada; y la tercera es el *switch* entre el marcapasos y el acumulador, que marca el inicio y el final del almacenaje de los pulsos. La estimación de la duración estaría basada en el número total de pulsos alcanzados por el acumulador antes de que el switch dé la señal que detenga el almacenaje (Arstila, 2017).

Se han realizado diversas investigaciones para encontrar el sustrato biológico de este modelo, mapeando sus componentes en diversas estructuras cerebrales y sistemas de neurotransmisión (Buhusi & Meck, 2005). La arquitectura del circuito de los GB y el sistema dopaminérgico se han propuesto como *locus* de estos componentes, donde las neuronas dopaminérgicas de la SNc, especialmente aquellas cuyas proyecciones terminan sobre receptores D2 (vía indirecta), operan como unidades marcapasos y los pulsos emitidos por estas neuronas son acumulados por las NEMs en el estriado dorsal (revisado en Ivry, 1996).

Otro modelo es el llamado *striatal beat-frequency model* (SBF; Matell & Meck, 2004), el cual postula que la información temporal se integra a través de la vía cortico-talamo-estriatal, donde el cuerpo estriado monitorea los patrones de actividad provenientes de la corteza cerebral y el tálamo, actuando como un detector de coincidencias en el que el procesamiento temporal se basa en la activación simultánea de las neuronas espinosas medianas, sobre todo por las oscilaciones corticales (Buhusi & Meck, 2005). Esta detección de coincidencias implica la

habilidad de las NEMs de censar sincronías en los patrones de actividad en múltiples áreas corticales, a través de la disposición espacial de sus campos receptivos (Merchant, Harrington, & Meck, 2013).

En comparación con el modelo tradicional del *marcapasos-acumulador*, donde la actividad dopaminérgica es asumida como el sustrato neurobiológico de los pulsos marcapasos, en el SBF el rol de la actividad fásica dopaminérgica es el de funcionar como una especie de gatillo que indica la entrada de una señal relevante, constituida por la sincronización de las oscilaciones corticales, y el restablecimiento de los potenciales de membrana en las NEMs (Meck, Penney, & Pouthas, 2008).

Por último, en estudios recientes se ha planteado que la información temporal es integrada por circuitos dentro de los GB, sobre todo por microcircuitos estriatales, donde la codificación del tiempo transcurrido, o duración de un evento, ocurre dentro poblaciones neuronales y que éstas posteriormente son implementadas como un 'reloj poblacional'. Se sugiere que en esta forma de codificación del tiempo existe un patrón espaciotemporal de actividad (actividad secuencial), donde la velocidad y la secuencia con la que se activa determinada población de neuronas refleja la velocidad del reloj interno, el cual utilizamos como una guía para dar temporalidad a la conducta. Estas secuencias de actividad, que atraviesan a los elementos de la población, pueden ser estiradas o contraídas por simples variaciones en la magnitud de las entradas excitatorias a la red, o por cambios relacionados con la depresión a corto plazo en neuronas estriatales (revisado en Paton & Buonomano, 2018).

Uno de los trabajos donde se han observado estos patrones de actividad es en el realizado por Mello, Soares y Paton (2015) donde, en una tarea que evaluaba la estimación temporal para la obtención de un reforzador, neuronas en el estriado ajustaban la duración de sus secuencias de disparos en función del tiempo relativo a cada uno de los ensayos. Por otra parte, Hidalgo-Balbuena y colaboradores utilizaron una tarea con componentes espacio-temporales, en donde ratas debían aprender a ejecutar una secuencia de movimientos en un periodo de tiempo determinado, y encontraron que estos patrones de actividad secuencial pueden ser evocados en la corteza somatosensorial, el tálamo y el estriado por estímulos

somatosensoriales, y que esta representación provee una referencia temporal para el aprendizaje y la ejecución de movimientos estereotipados (Hidalgo-Balbuena, Luma, Pimentel-Farfan, Peña-Rangel, & Rueda-Orozco, 2019).

3. SISTEMA CANNABINÉRGICO

La descripción del sistema cannabinérgico comenzó debido a la observación de los efectos psicoactivos provocados por el componente activo del cannabis, el tetrahidrocannabinol (THC), y la identificación de los receptores a los que éste se acoplaba (Devane, Dysarz, Johnson, Melvin, & Howlett, 1988; Herkenham et al., 1991; Howlett, Johnson, Melvin, & Milne, 1988). Posteriormente, se encontró que el organismo sintetizaba ligandos endógenos que se acoplaban a los mismos receptores que el THC, conocidos como endocannabinoides (Devane et al., 1994; Stella, Schweitzer, & Plomelli, 1997; Sugiura et al., 1995), y que este sistema regulaba diversas funciones fisiológicas. En el sistema nervioso central, el sistema endocannabinoide juega un papel importante como modulador retrógrado de la transmisión sináptica (Castillo, Younts, Chávez, & Hashimoto, 2012) y se encuentra involucrado en procesos como la memoria (Rueda-Orozco, Montes-Rodríguez, Soria-Gómez, Méndez-Díaz, & Prospéro-García, 2008), la estimación temporal (Crystal, Maxwell, & Hohmann, 2003), la regulación del apetito (Soria-Gómez et al., 2014) y la realización de movimientos voluntarios (revisado en Katona & Freund, 2012).

3.1. Descripción del sistema cannabinérgico

El sistema cannabinérgico, o sistema endocannabinoide, está compuesto por los ligandos endógenos, sus receptores y los genes y enzimas involucrados en sus procesos metabólicos. Podemos encontrar que este sistema funciona tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico y regula una gran cantidad de procesos fisiológicos.

Los endocannabinoides son moléculas sintetizadas a partir de los ácidos grasos; los primeros en identificarse y los más estudiados son la anandamida y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) (Devane et al., 1994). A diferencia de otros sistemas de

transmisión en el cerebro, los endocannabinoides no son sintetizados y almacenados en las terminales de las células nerviosas, sino que son generados y liberados a demanda por las neuronas postsinápticas (Castillo et al., 2012). Una vez ocurrida su liberación, los endocannabinoides son desactivados rápidamente mediante sistemas de recaptación y degradación (Busquets-Garcia et al., 2015; Grotenhermen, 2006).

El sistema endocannabinoide está compuesto por dos grandes grupos de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi/o: los receptores a cannabinoides tipo 1 y tipo 2 (rCB1 y rCB2). En el sistema nervioso central el receptor más abundante es el rCB1, y las regiones que lo expresan con una mayor densidad son la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo y los ganglios basales (Busquets-Garcia et al., 2015). Los rCB1 suelen encontrarse en las terminales presinápticas y conforman un sistema de neurotransmisión retrógrada que modula a la baja la liberación del neurotransmisor correspondiente a la terminal sináptica (Busquets-Garcia, Bains, & Marsicano, 2018).

En los GB las mayores concentraciones del rCB1 se encuentran en el estriado dorsolateral, en las terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral; en el globo pálido externo (GPe), en las terminales GABAérgicas de las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta; y en la sustancia *nigra pars reticulata*, en las terminales provenientes de las neuronas espinosas medianas de la vía directa y las terminales glutamatérgicas provenientes del núcleo subtalámico (Fig. 2; Mackie, 2005; Tsou, Brown, Sañudo-Peña, Mackie, & Walker, 1998).

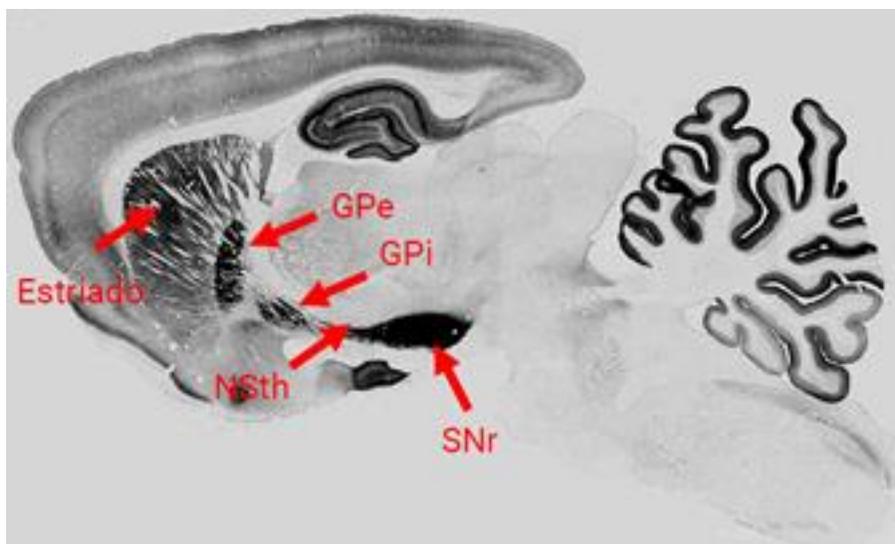


Figura 2. Expresión del rCB1 en el cerebro de rata. Vista sagital que muestra la expresión de receptores rCB1 en el cerebro de rata. Se puede observar que la mayor densidad de expresión se encuentra en el hipocampo, el cerebelo, el cuerpo estriado, los dos segmentos del GP, el núcleo subtalámico y la sustancia *nigra pars reticulata*. Modificado de Martínez-Vargas y Prospéro-García (sin publicar). GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NStH: núcleo subtalámico; SNr: sustancia *nigra pars reticulata*.

3.2. Participación del sistema cannabinérgico en la ejecución del movimiento

Tomando en cuenta la abundante expresión del rCB1 en los ganglios basales, se han realizado múltiples estudios sobre el papel del sistema endocannabinoide en la regulación de su función. Rueda-Orozco y colaboradores (2008) reportaron que administraciones intra-estriatales de agonistas y antagonistas cannabinérgicos afectan la extinción de la memoria procedimental, que está relacionada con la actividad de este circuito. Por otra parte, los efectos motores de la administración sistémica de cannabinoides también han sido documentados, encontrando que a dosis bajas se produce hiperlocomoción y que a dosis altas se produce hipolocomoción, llegando incluso al punto de la catalepsia. Estos efectos diferenciales han sido observados con la administración de agonistas endógenos, como la anandamida (Sulcova et al., 1998), o agonistas exógenos, como el THC y

el WIN55.212-2 (Katsidoni, Kastellakis, & Panagis, 2013; Prescott, Gold, & Martin, 1992).

Dada la alta expresión del rCB1 en los diferentes relevos del circuito de los GB, se ha propuesto que el efecto bifásico podría estar relacionado con la activación anatómicamente diferencial del receptor a diferentes dosis (Fernández-Ruiz, Lastres-Becker, Cabranes, González, & Ramos, 2002). Esta hipótesis no había podido ser explorada debido a la falta de herramientas experimentales precisas. Sin embargo, con el uso de modelos transgénicos donde la expresión del receptor está condicionada en linajes celulares particulares, como las proyecciones cortico-estriatales o las neuronas de la vía directa, estos problemas ya pueden ser abordados.

Por ejemplo, se ha logrado demostrar un aumento en las espigas de alto voltaje, un tipo particular de oscilaciones cortico-tálamo-estriatales asociadas a la hipolocomoción, durante la administración sistémica de cannabinoides y que este incremento podría ser producido por la activación específica del rCB1 en las proyecciones estriato-nigrales de la vía directa (Sales-Carbonell et al., 2013). También se ha demostrado que la administración sistémica del agonista cannabinérgico WIN55.212-2, disminuye la actividad espontánea en las neuronas del GP, y que esta disminución es acompañada de una baja en la tasa de respuesta a estímulos en neuronas estriatales (Miller & Walker, 1996).

A pesar de que estos experimentos sugieren que la activación diferencial de los rCB1 en los ganglios basales produce distintos efectos conductuales, y modulan la actividad neuronal en los distintos núcleos del circuito, sigue siendo necesario entender cómo la modulación selectiva de cada elemento afecta la activación de las vías directa e indirecta y cómo esto influye en la ejecución del movimiento.

3.3. El sistema cannabinérgico y la estimación temporal

Uno de los efectos más reportados por consumidores de marihuana son las alteraciones en la percepción del tiempo, descritas comúnmente como la sensación de que el tiempo transcurre más rápido. Este efecto, conocido como sobreestimación del tiempo, también ha sido reportado en investigaciones realizadas con voluntarios a los que se administran agonistas cannabinérgicos sintéticos, acompañado de una disminución en la capacidad para reproducir intervalos de tiempo al dar golpeteos con la mano o presionar un botón (Atakan, et al., 2012). Sewell y colaboradores (2013) plantean que este efecto se presenta de manera dosis dependiente, ya que encontraron un mayor decremento en la capacidad de censar el tiempo cuando administraron una dosis alta de THC que cuando la administración fue a dosis bajas, además reportan que el efecto es aún más alto para fumadores infrecuentes y no fumadores que para consumidores regulares de marihuana.

Esta relación dosis dependiente también ha sido encontrada en ratas, donde administraciones intraperitoneales de 3 mg/Kg de WIN 55, 212-2 (agonista sintético de los rCB1) provocan una alta variabilidad en la discriminación de intervalos de tiempo, que disminuye cuando las concentraciones son de 1 mg/Kg.y 2 mg/Kg (Crystal et al., 2003).

Se han sugerido diversos mecanismos fisiológicos para explicar estos efectos. Uno de ellos propone que los cannabinoides exógenos disminuyen los niveles de glutamato en la hendidura sináptica de las neuronas espinosas medianas en el estriado, una estructura importante para regular la velocidad del reloj interno; este glutamato proviene de las proyecciones cortico-estriatales, en cuyas terminales existe una alta expresión del rCB1 que al activarse regula a la baja la liberación del neurotransmisor. Además, esta disminución en las entradas glutamatérgicas en el estriado podría estar provocando efectos diferenciales las vías directa e indirecta de los GB, cuyo desbalance tiende a un aumento en la velocidad del reloj interno (Sewell et al., 2013).

Otra hipótesis es que estos efectos se presentan debido a un desbalance en la actividad de la vía indirecta de los GB, la cual se ha propuesto que juega un papel importante en la estimación temporal (Meck, 1996), y donde además se ha encontrado una co-expresión de receptores D2 y rCB1 (Meck, 1996; Sewell et al., 2013).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La visión clásica del circuito de los GB describe a las vías directa e indirecta como rutas del flujo de información, relacionando la activación de la primera con la facilitación del movimiento y a la segunda con la inhibición del mismo (DeLong, 1990). Las aproximaciones recientes han estudiado la función de ambas vías enfocándose en el núcleo estriado. Sin embargo, debido a la alta presencia de colaterales axónicas, así como la comunicación entre neuronas de ambas vías (Taverna & Surmeier, 2010; Gerfen & Bolam, 2010), estudiar el papel de una vía en este núcleo puede dificultar las interpretaciones de los resultados. En este contexto, el GPe, el primer relevo de la vía indirecta, puede ser un blanco para el estudio de funciones motoras específicas y la regulación de parámetros cinemáticos, como la velocidad o la amplitud de los movimientos.

Por otra parte, se ha visto que la administración agonistas cannabinérgicos provoca aumento en la locomoción a dosis bajas y conforme la dosis se incrementa, la velocidad y movilidad general disminuye (Katsidoni et al., 2013; Sulcova et al., 1998). El GPe es uno de los núcleos de los GB que expresa una alta densidad de rCB1 (Mackie, 2005; Tsou et al., 1998), por lo que su modulación podría estar implicada en los efectos de la manipulación del sistema cannabinérgico sobre la ejecución del movimiento.

Otro efecto observado tras la administración de cannabinoides son las alteraciones en la estimación temporal (Crystal et al., 2003; Sewell et al., 2013), siendo la sobreestimación la alteración más reportada (Atakan et al., 2012). Los GB también se han relacionado con la percepción del tiempo, que es importante para los

procesos de integración sensorial, toma de decisiones y ejecución del movimiento (Buhusi & Meck, 2005); sin embargo, el papel que juega la expresión del rCB1 en los GB para modular la estimación temporal aún no es del todo claro.

Por este motivo, este proyecto se enfocó en estudiar el papel del sistema cannabinérgico en la actividad neuronal del globo pálido externo y su relación con el control de la velocidad en una tarea con componentes espaciotemporales.

5. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis general es que ***“la activación del sistema cannabinérgico modula la actividad neuronal del GPe y el control de la velocidad en una tarea con componentes espaciotemporales”***, por lo que:

- Debido a que la administración sistémica de dosis bajas y altas de agonistas cannabinérgicos provocan hiperlocomoción e hipolocomoción respectivamente (Sulcova et al., 1998; Katsidoni et al., 2013; Prescott et al., 1992), y que la administración de cannabinoides se ha visto relacionada con una sobrestimación del tiempo (Crystal et al., 2003; Sewell et al., 2013), también es posible hipotetizar que: ***“la administración sistémica de dosis diferenciales de agonistas cannabinérgicos provocará cambios en la actividad neuronal del globo pálido externo y efectos diferenciales en la velocidad y la estimación temporal”***
- Por otra parte, debido a que el rCB1 se encuentra altamente expresado en las terminales GABAérgicas provenientes del estriado en el GPe (Tsou et al., 1998), y que su activación produce una disminución en la liberación de GABA (Castillo et al., 2012); y por otro lado, de acuerdo al modelo clásico de los GB, la activación de la vía indirecta inhibe el movimiento, es posible hipotetizar que ***“la administración directa de agonistas cannabinérgicos en el GPe provocará un aumento en la velocidad de los animales durante la ejecución de la tarea”***

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de la administración de dosis diferenciales de agonistas cannabinérgicos, de manera sistémica y directamente en el globo pálido externo, sobre la actividad neuronal del GPe y el control de la velocidad.

6.2. Objetivos específicos

- Administrar dosis sistémicas y locales diferenciales de un agonista cannabinérgico y evaluar sus efectos sobre el control de la velocidad y la estimación del tiempo en una tarea con componentes espaciotemporales
- Administrar dosis sistémicas diferenciales de un agonista cannabinérgico y evaluar la actividad neuronal del GPe en registros electrofisiológicos de alta densidad en animal anestesiado.

7. MÉTODO

7.1. Animales

Se utilizaron ratas adultas de ambos sexos de la cepa Long Evans. Los experimentos conductuales fueron realizados en ratas macho. Los experimentos en animal anestesiado fueron realizados en ambos, ratas macho y hembra. Los animales se mantuvieron en el bioterio del laboratorio dentro de cajas de policarbonato, con un ciclo luz/oscuridad de 12/12 h (las luces del bioterio eran encendidas a las 8:00 y se apagaban a las 20:00), con acceso a agua y comida *ad libitum*.

Todos los protocolos de cuidado y manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología, UNAM, (82.A) y con fundamento en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

7.2. Protocolo conductual

La tarea que utilizamos está basada en el diseño de Rueda-Orozco y Robbe (2015), con ligeras modificaciones, en donde las ratas deben correr en una caminadora realizando una secuencia determinada de movimientos en un periodo mínimo de siete segundos; lo que nos permite evaluar parámetros como la velocidad, la aceleración, la posición y la estimación temporal (Fig. 3).

La tarea está constituida por una serie de ensayos, entre 40 y 160 ensayos por sesión, con una duración máxima de 20 segundos cada uno. Cada ensayo inicia con el encendido general de las luces y, un segundo después, comienza el desplazamiento de la banda de la caminadora. Para obtener un reforzador (una gota de agua azucarada al 10%), los sujetos deben evitar la parte frontal de la caminadora, denominada zona de reforzamiento, por al menos 7 segundos; después de este intervalo los sujetos pueden ingresar a la zona de reforzamiento, lo cual enciende una luz color verde y provoca que la banda de la caminadora se detenga, tras lo que es entregado el reforzador (Fig. 3B, imagen superior).

Por el contrario, si los sujetos entran a la zona de reforzamiento antes de que transcurran los 7 segundos el ensayo es considerado incorrecto, por lo que las ratas continúan corriendo hasta cubrir los 20 segundos y, al terminar, no se entrega el reforzador (Fig. 3B, imagen inferior). Los ensayos incorrectos son acompañados de un estímulo auditivo a 1.5 KHz (65 dB).

En la versión original de la tarea, la conducta era evaluada con la banda de la caminadora corriendo a una velocidad fija. Sin embargo, en el laboratorio hemos observado que los animales son capaces de ajustar exitosamente su ejecución ante cambios impredecibles de velocidad ensayo tras ensayo (Ortega-Romero, 2019), haciendo posible separar el componente temporal de los componentes espaciales y de control de la velocidad durante la ejecución de la tarea.

Por lo tanto, en este proyecto utilizamos la versión de cambios aleatorios de velocidad. Para esto, después de largos periodos de entrenamiento corriendo a velocidades fijas, los animales son sometidos a ensayos en donde la velocidad de

la caminadora varía de forma impredecible ensayo tras ensayo en un rango entre los 27 y los 33 cm/s (Fig. 3C). De esta forma los sujetos deben ajustar su velocidad ensayo a ensayo. Después de largos periodos de entrenamiento, los sujetos desarrollan una secuencia de movimientos y cambios de velocidad muy estereotipados, lo que nos permite enfocarnos en aspectos de la codificación y control de la velocidad.

Las ratas fueron entrenadas diariamente y la duración de cada sesión variaba dependiendo del desempeño de cada animal. Las sesiones podían concluir tras cumplir con alguno de los siguientes criterios: 1) se evaluaba constantemente el porcentaje de respuestas correctas en los últimos 40 ensayos, si este superaba el 75% la sesión se detenía (se ha 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 ensayos correctos; y 3) al alcanzar 160 ensayos totales, sin importar si eran correctos o incorrectos. El número de ensayos por sesión podía variar entre 40 (30 minutos aproximadamente) y 160 (de 120 a 140 minutos). Normalmente los animales tardan entre 35 y 50 sesiones en alcanzar porcentajes mayores al 75% de respuestas correctas.

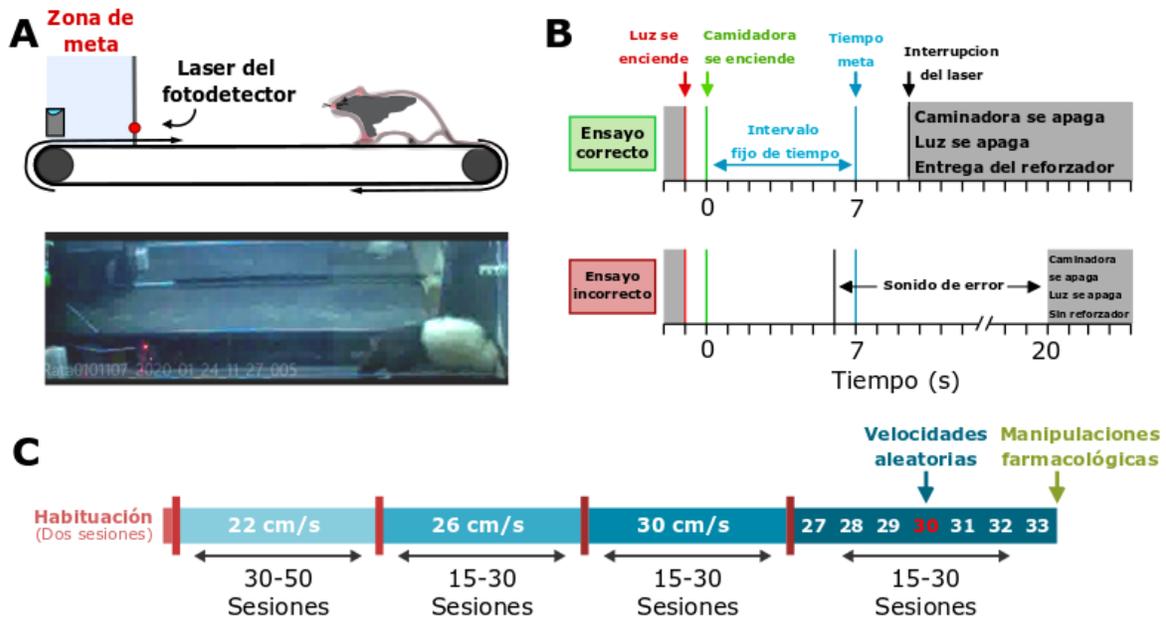


Figura 3. Tarea con componentes espacio-temporales. A) Esquema del *setup* de la tarea. B) Descripción, en orden de aparición, de los elementos que componen la tarea. Se ejemplifican un ensayo correcto (superior) y un ensayo incorrecto (inferior). C) Línea del tiempo con el protocolo de entrenamiento de los animales. Cada animal es entrenado una sesión por día, por lo que pueden pasar más de tres meses para que las ratas se encuentren altamente entrenadas. Modificado de Rueda-Orozco y Robbe (2015).

Una vez que los animales alcanzaron porcentajes mayores al 75% de respuestas correctas fueron sometidos al protocolo de velocidades aleatorias por al menos 30 sesiones más. Después se realizaron las manipulaciones experimentales, en las que se evaluó su desempeño bajo las siguientes condiciones:

- 1) En condiciones control
- 2) Tras la administración sistémica de dosis diferenciales del agonista canabinnérgico CP55940
- 3) Tras la administración local, mediante cánulas dirigidas bilateralmente al GPe, de dosis diferenciales del agonista cannabinnérgico CP55940

- 4) Tras la administración sistémica del agonista cannabinérgico CP55940 simultánea a la administración local, mediante cánulas dirigidas bilateralmente al GPe, del antagonista AM251

En la figura 4 se puede observar el procedimiento para el protocolo experimental con las administraciones sistémicas y locales. Las administraciones sistémicas de CP55940 fueron a concentraciones de 0.01 mg/Kg, 0.05 mg/Kg, 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg. Las administraciones locales de CP55940 fueron a concentraciones de 0.5 µg/500nl, 1 µg/500nl, 5 µg/500nl y 10 µg/500nl. Para las administraciones conjuntas del agonista sistémico CP55940 y el antagonista local AM251 las concentraciones fueron 0.3 mg/Kg y 10 µg/500nl respectivamente. Todas las administraciones se realizaron 15 minutos antes de dar inicio a la tarea conductual. Como se puede observar en la figura 4, se mantuvo un espacio de dos sesiones control entre cada sesión experimental.



Figura 4. Protocolo experimental para las manipulaciones farmacológicas durante la tarea con componentes espacio-temporales. Esquema del protocolo experimental para la evaluación de la tarea con componentes espacio-temporales, en condiciones control y tras las manipulaciones farmacológicas mencionadas. Todas las administraciones se realizaron 15 minutos antes de comenzar la sesión correspondiente a ese día, únicamente se realizó la administración de una de las dosis por cada sesión experimental. Todas las manipulaciones farmacológicas se realizaron después de, por lo menos, dos sesiones control.

7.3. Registros electrofisiológicos de alta densidad en animal anestesiado

Para realizar los registros electrofisiológicos, se utilizó una dosis de 1.1 g/kg de uretano como anestésico. El volumen final de la dosis se dividió en tres aplicaciones, que fueron administradas vía i.p. con un espacio de 30 minutos entre cada

aplicación. También se administró una dosis de 0.025 mg/Kg de atropina y una de 0.1 mg/Kg de dexametasona antes de la cirugía.

Pasada la tercera dosis de uretano, y una vez que la rata dejó de presentar reflejos, se procedió a montar a las ratas en el aparato estereotáxico, se limpió el cráneo y se niveló lambda y bregma. Se realizaron dos trépanos en la parte posterior del cráneo, uno en el área correspondiente al cerebelo y otro en el área parietal contralateral a la craneotomía, para introducir dos tornillos miniatura como tierra y referencia. Posteriormente se realizó una craneotomía con un área de 1.5 x 1.5 mm para ingresar al GPe con centro en AP: - 0.8 mm y L: 4.3 mm, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2009).

Una vez realizada la craneotomía y retirada la duramadre, se introdujo un arreglo de microelectrodos con 32 canales (silicon probe A1X32 Edge) posicionado con un ángulo de 13° (figura 5A, izquierda). El arreglo de microelectrodos se hizo descender de manera gradual hasta llegar al GPe (H 6.75 mm). La temperatura, la respiración y los reflejos fueron monitoreados constantemente durante la cirugía; en caso de ser necesario, se administraron dosis complementarias de uretano.

Para producir respuestas a la estimulación somatosensorial se realizó un protocolo de estimulación eléctrica en la pata delantera contralateral al sitio registro, constituido por 50 trenes de cinco pulsos cada uno, con un intervalo de 300 ms entre cada pulso (figura 5A, derecha).

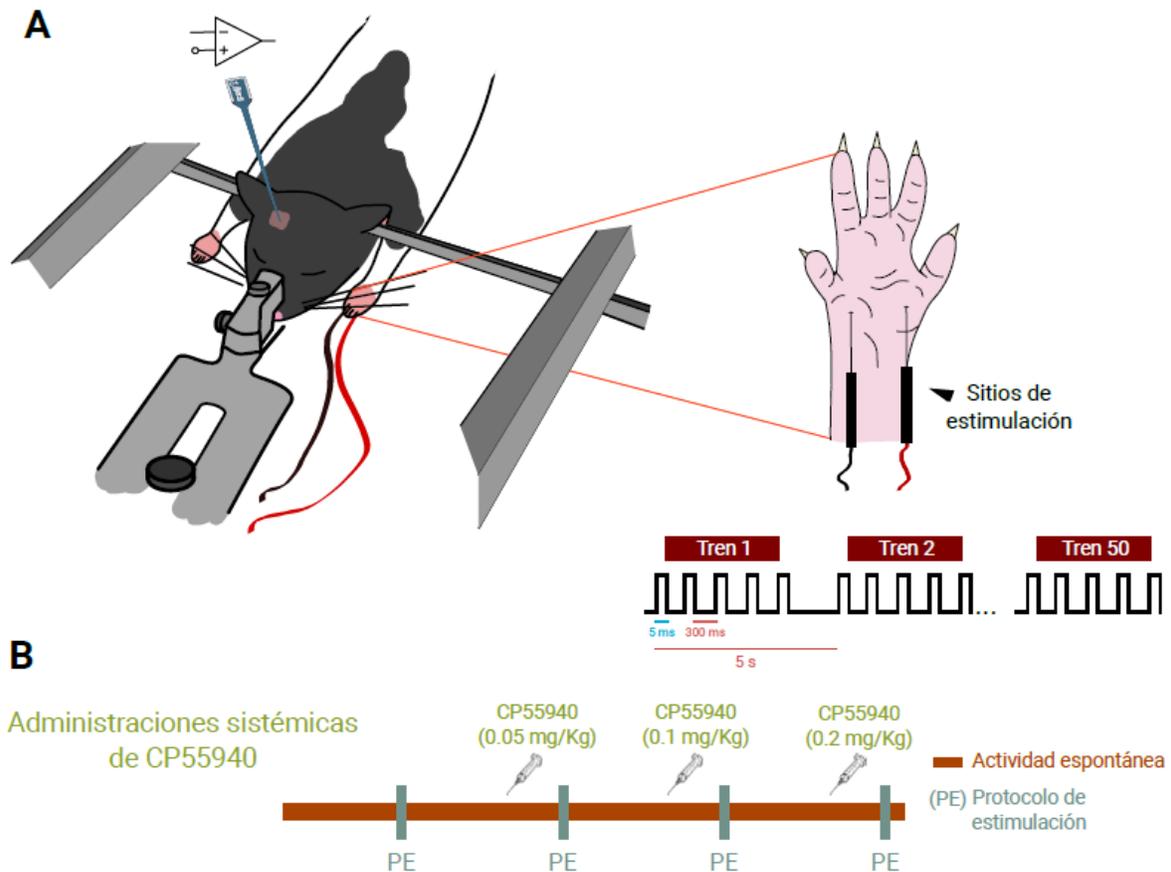


Figura 5. Registros electrofisiológicos en animal anestesiado. A) Modelo de animal anestesiado y sitios de estimulación en la pata delantera contralateral al sitio de registro. B) Protocolo experimental: las administraciones de CP55940 se comenzaron después del protocolo de estimulación control. El resto de los protocolos de estimulación se realizaron 15 minutos después de la administración de CP55940 correspondiente.

Se realizaron registros y protocolos de estimulación bajo las siguientes condiciones:

- 1) En condición control
- 2) Tras la administración sistémica de 0.05 mg/Kg de CP55490
- 3) Tras la administración sistémica de 0.1 mg/Kg de CP55490
- 4) Tras la administración sistémica de 0.2 mg/Kg de CP55490

A diferencia de las manipulaciones farmacológicas en la tarea conductual, donde se daba una administración por sesión, durante los registros electrofisiológicos se realizaron todas las administraciones seriadas durante el mismo registro (Fig. 5B),

con un espacio de aproximadamente 20 minutos entre cada administración, ya que al terminar los registros los animales fueron perfundidos y se extrajeron sus cerebros para la verificación histológica del sitio de registro.

7.4. Aparatos y programas

Para realizar la tarea conductual se utilizó una caminadora modificada para el uso en ratas, sus medidas fueron adaptadas de manera que se parecieran a las del artículo original (longitud de 80 cm, ancho de 14 cm y paredes de acrílico de 50 cm de alto). La caminadora fue controlada por medio de un programa diseñado en el laboratorio con el lenguaje de programación LabVIEW, National Instruments. Para registrar las trayectorias de cada ensayo fue utilizada 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 delimitaba el área de reforzamiento.

Para visualización de los registros electrofisiológicos se utilizaron los programas Neuroscope y NDManager (<http://neurosuite.sourceforge.net>). Las señales fueron adquiridas con una frecuencia de muestreo de 20 KHz mediante el sistema Intan RHD2000. Después de la aplicación de un filtro pasa altas, se realizó un proceso de spike sorting semiautomatizado utilizando el programa de libre acceso Klustakwik (<http://klustakwik.sourceforge.net>) y la aplicación gráfica de clasificación de espigas Klusters (<http://klusters.sourceforge.net>) (Hazan, Zugaro, & Buzsáki, 2006).

El análisis conductual, electrofisiológico y estadístico se llevó a cabo mediante MATLAB, utilizando códigos realizados en el laboratorio.

8. RESULTADOS

En artículos anteriores (Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Rueda-Orozco & Robbe, 2015) se ha demostrado que la tarea que utilizamos es altamente eficaz para que, después de largos periodos de entrenamiento, los animales desarrollen una estrategia común, incorporando la misma secuencia de movimientos (como se puede ver representada en la figura 6A). En donde, una vez que se han encendido las luces y la banda de la caminadora comienza a moverse (Fig. 6A, paso 1), las

ratas se dejan desplazar pasivamente desde la parte anterior hacia la parte posterior de la caminadora (Fig. 6A, paso 2); después se presenta un “periodo de mantenimiento” donde los animales mantienen su posición en la parte posterior, corriendo a la velocidad de la caminadora (Fig. 6A, paso 3); y, finalmente, realizan una aceleración para alcanzar la zona de meta (parte anterior de la caminadora) (Fig. 6A, paso 4).

Esta secuencia de movimientos debe ser realizada bajo una regla temporal, ya que si las ratas entran a la zona de reforzamiento antes de los siete segundos, establecidos como tiempo meta, se marca un ensayo incorrecto tras lo que los animales deben seguir corriendo hasta que transcurran los 20 segundos que constituyen el ensayo, acompañados de un estímulo auditivo a 1.5 KHz (65 dB) como sonido de error y al final no es entregado el reforzador. Conforme pasa el entrenamiento las ratas logran extraer bastante bien la regla espaciotemporal, por lo que al final son capaces de realizar con precisión la secuencia de movimientos en 7 segundos.

En la figura 6B podemos ver trayectorias espaciotemporales representativas de una rata durante las primeras sesiones (izquierda) y después de más de treinta días de entrenamiento (derecha). La escala de las abscisas corresponde al tiempo, que en este caso representa los primeros 15 segundos de cada ensayo; en las ordenas se encuentra la posición de las ratas en la caminadora, donde la parte inferior corresponde a la zona de reforzamiento. En la sesión a la izquierda de la figura 6B podemos observar que la rata aún no extrae la regla temporal ni ha desarrollado la secuencia de movimientos, por lo que comete una gran cantidad de ensayos incorrectos (marcados en rojo). Mientras que en la sesión de la derecha se puede ver que la rata comete muy pocos ensayos incorrectos y que las trayectorias de posición correspondientes a los ensayos correctos (marcadas en negro) se superponen, lo que nos indica que la rata ha desarrollado una secuencia estereotipada de movimientos.

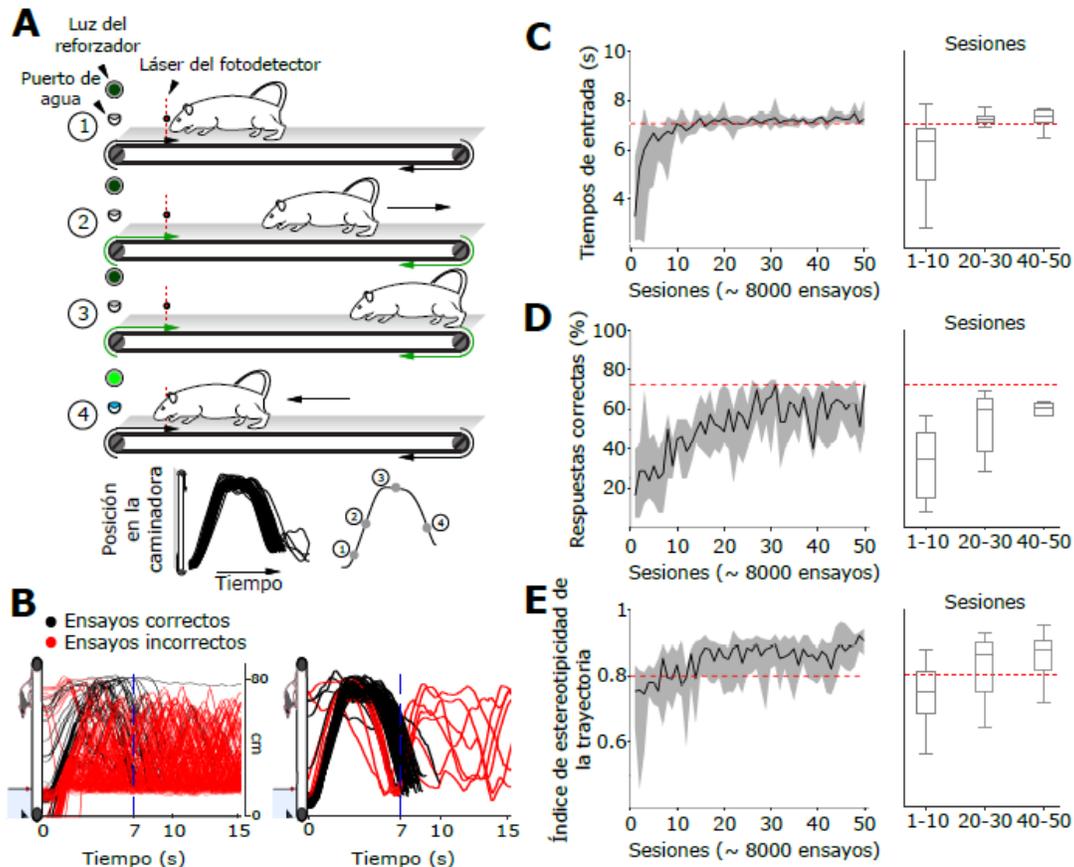


Figura 6. Desarrollo de la estereotipicidad en la secuencia de movimientos. A) Representación de los pasos en la secuencia de movimientos desarrollada por las ratas después de largos periodos de entrenamiento. B) Comparación de las trayectorias espaciotemporales (posición) de la cuarta sesión (izquierda) contra la sesión 48 (derecha) de una rata representativa. C) Promedio de los tiempos de entrada de un grupo de nueve ratas, desde la primera sesión hasta la sesión 50. D) Promedio del porcentaje de respuestas correctas del grupo de nueve ratas durante las 50 sesiones. E) Promedio del índice de estereotipicidad de las trayectorias del mismo grupo, desde la primera sesión hasta la sesión 50. El índice de estereotipicidad de las trayectorias se obtiene al realizar una correlación entre todas las trayectorias de cada rata en cada una de las sesiones. La región sombreada en C, D y E corresponde a la variabilidad en los valores.

En la figura 6C (izquierda) se observa la curva de aprendizaje correspondiente al ajuste en los tiempos de entrada, con el tiempo meta marcado en 7 segundos, durante las primeras 50 sesiones del entrenamiento (promedio de 9 ratas). A la

derecha se pueden ver tres gráficas de caja y bigote, donde la primera corresponde a las primeras diez sesiones, la segunda a las sesiones que van de la 20 a la 30, y en la última las sesiones que van de la 40 a la cincuenta; podemos observar cómo disminuye considerablemente la variabilidad en los tiempos de entrada, ajustándose con precisión a los 7 segundos conforme aumentan las sesiones de entrenamiento.

En la figura 6D se encuentra la curva correspondiente al porcentaje de respuestas correctas (promedio de 9 ratas) durante las primeras 50 sesiones. Se puede ver con claridad que el porcentaje es más alto conforme aumenta el número de sesiones.

La figura 6E corresponde al índice de estereotipicidad de las trayectorias de posición (promedio de 9 ratas), el cual obtuvimos al realizar una correlación entre todas las trayectorias espaciotemporales de cada sesión en cada una de las ratas. Podemos observar cómo, conforme aumenta el número de sesiones de entrenamiento, el valor del coeficiente de correlación es cada vez más cercano a uno y con menor variabilidad.

Una vez que las ratas mantuvieron un porcentaje de respuestas correctas por encima del 72.5 % corriendo a una velocidad de 30 cm/s, incorporamos el protocolo de velocidades aleatorias, en donde la velocidad de la caminadora podía cambiar de forma impredecible en un rango de 27 a 33 cm/s ensayo tras ensayo. En este protocolo es necesario que las ratas aprendan a censar la velocidad a la que la caminadora se mueve para poder ajustar alguno de los elementos de su ejecución y mantener el tiempo de entrada a la zona de meta (7 segundos).

En la figura 7 podemos ver los elementos de la ejecución de la tarea de una rata representativa durante el protocolo de velocidades aleatorias. Las trayectorias espaciales (Fig. 7A) parecen modificarse muy poco, lo cual se puede ver más claramente en la figura 7C, donde las diferencias en la posición para todas las velocidades se encuentran por debajo de diez (una diferencia de centímetros más cercana a cero nos indica que existe una mayor similitud entre las trayectorias de posición).

En la figura 7B se encuentra el promedio de los picos de velocidad alcanzados por esta rata durante los últimos tres segundos antes de cruzar el fotodetector que

delimita la zona de meta, donde podemos ver que los picos de velocidad se ajustan de acuerdo a la velocidad a la que se desplace la caminadora; alcanzando el pico de velocidad más bajo en los ensayos donde la caminadora se desplazó a 27 cm/s y el pico más alto para los ensayos donde se desplazó a 33 cm/s. Lo cual también se puede observar en la figura 7D, donde la rata ajusta de forma lineal su velocidad al correr en relación con las velocidades a las que se desplazaba la caminadora.

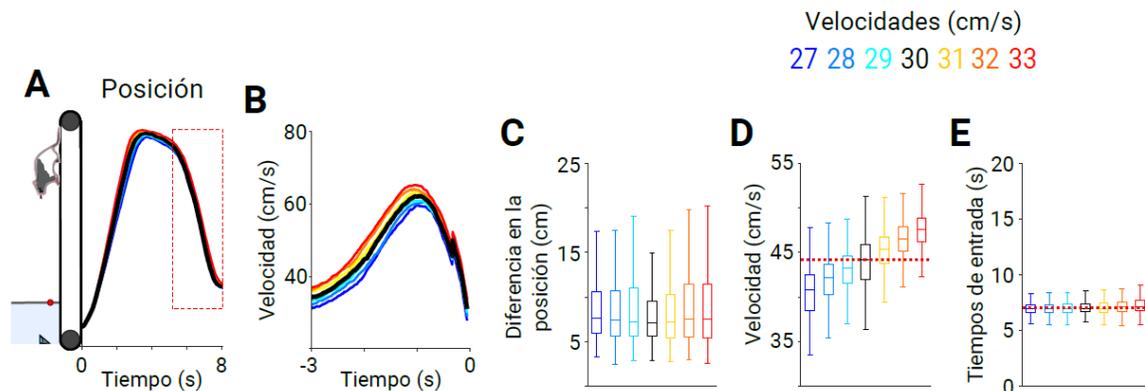


Figura 7. Ajuste en la ejecución de la tarea durante el protocolo de velocidades aleatorias. Ajustes en la ejecución de la secuencia de movimientos de una rata representativa durante el protocolo de velocidades aleatorias. En la parte superior izquierda se encuentra el código de colores correspondiente al rango de velocidades. A) Trayectorias de posición B) Promedio de los picos de velocidad alcanzados durante los últimos tres segundos antes de la interrupción del fotodetector, los cuales corresponden al segmento resaltado con un recuadro rojo en las trayectorias de posición de la figura A. C) Diferencias en la posición para cada una de las velocidades. Una diferencia de centímetros más cercana a cero nos indica que existe una mayor similitud entre las trayectorias de posición. D) Promedio de las velocidades alcanzadas en relación con las velocidades a las que se movía la caminadora. E) Promedio de los tiempos de entrada para cada velocidad del protocolo.

En la figura suplementaria 1 se pueden encontrar estos parámetros para las 9 ratas utilizadas durante este proyecto.

En la figura 7E podemos ver que los tiempos de entrada se mantuvieron al margen del tiempo meta, por lo que el componente temporal en la ejecución de la rata se mantuvo intacto independientemente de la velocidad a la que tuviera que correr.

De acuerdo con la observación de estos parámetros podemos determinar que el elemento de mayor ajuste en la ejecución es la velocidad, ya que las trayectorias espaciales no presentaron mayor cambio y los tiempos de entrada se mantuvieron intactos. Estos mismos ajustes se observaron en todas las ratas entrenadas en este protocolo (n=9, figura suplementaria 1). Después de alcanzar altos índices de desempeño en el protocolo de velocidades aleatorias se realizaron las manipulaciones farmacológicas.

8.1 Tarea con componentes espaciotemporales y administraciones sistémicas diferenciales del agonista cannabinérgico CP55940

Con el objetivo de observar si nuestra tarea era sensible a los efectos descritos tras administraciones sistémicas diferenciales de un agonista cannabinérgico: hiperlocomoción tras dosis bajas e hipolocomoción tras dosis altas (Katsidoni et al., 2013; Prescott et al., 1992), se evaluó el desempeño de ocho ratas en la tarea durante sesiones control y durante sesiones en las que fueron administradas, por vía intraperitoneal, dosis de 0.01 mg/Kg, 0.05 mg/Kg, 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg de CP55940. Cada animal recibió por lo menos 2 administraciones por dosis. Las inyecciones de cada dosis fueron administradas en sesiones separadas y entre cada sesión de inyección hubo por lo menos 2 sesiones control. Los parámetros evaluados fueron el mantenimiento de la trayectoria de posición, los picos de velocidad alcanzados y los tiempos de entrada a la zona de reforzamiento en cada ensayo.

En la figura 8 se observan las trayectorias espaciales y los picos de velocidad promedio de una rata representativa. La línea negra corresponde a la velocidad central del protocolo de velocidades aleatorias (30 cm/s) en condiciones control. Podemos ver que las sesiones en las que se administraron 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg se presentó una mayor modificación de la trayectoria de posición y una disminución de todos los picos de velocidad.

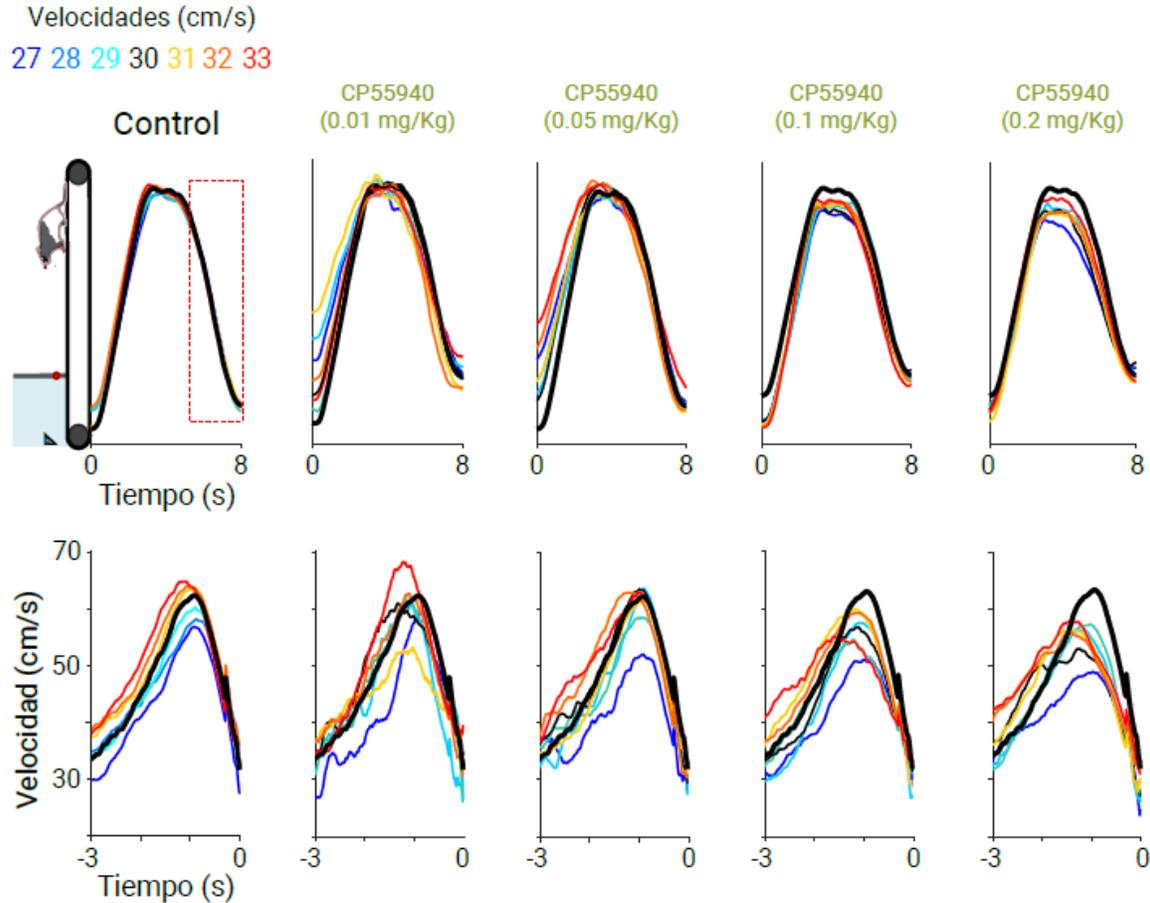


Figura 8. Trayectorias promedio de posición y picos de velocidad representativos en condiciones control y tras administraciones sistémicas de CP55949. Trayectorias espaciales (fila superior) y picos de velocidad (fila inferior) de una rata representativa durante la tarea con componentes espacio-temporales, en condiciones control y tras administraciones sistémicas, vía IP, de 0.01 mg/Kg, 0.05 mg/Kg, 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg de CP55949. Trayectorias espaciales (fila superior). La línea negra con mayor grosor corresponde a la velocidad central del protocolo de velocidades aleatorias (30 cm/s) en condiciones control.

Esos efectos se pueden observar para el grupo de ocho ratas en las boxplots de la figura 9, donde la posición y la velocidad fueron normalizadas a la velocidad central del protocolo (30 cm/s) durante la condición control.

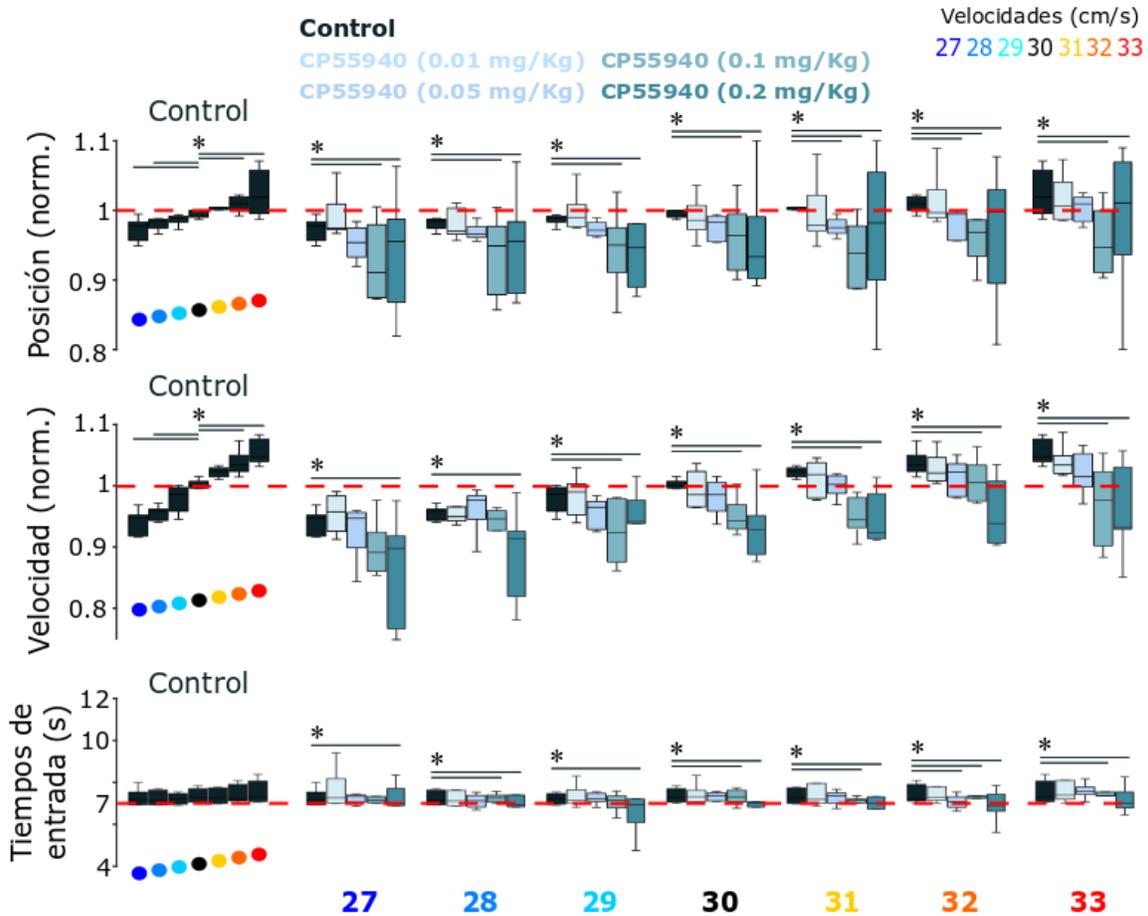


Figura 9. Efecto de las administraciones sistémicas diferenciales de CP55940 sobre la ejecución de la tarea con componentes espaciotemporales. Boxplots correspondientes a los parámetros evaluados en la tarea con componentes espaciotemporales en condiciones control y tras las administraciones sistémicas de CP55940 ($n = 5$). A) Posición normalizada. B) Velocidad normalizada. C) Tiempos de entrada. La posición y la velocidad se normalizaron a la velocidad central del protocolo de velocidades aleatorias (30 cm/s) de la condición control.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el Test de Bonferroni como prueba *post hoc*. Para las sesiones control (boxplots color negro, columna de la izquierda) se compararon los valores alcanzados durante la velocidad central (30 cm/s) contra el resto de las velocidades. Para el análisis entre condiciones se compararon las sesiones con manipulación farmacológica (gama de azules) contra la condición control (en negro) para cada velocidad del protocolo. * $p < 0.05$.

Con fines comparativos, podemos encontrar los parámetros durante sesiones control a la izquierda de cada gráfica. Se puede ver que al realizar la normalización los valores de posición también muestran modificaciones en la condición control, con un ajuste similar al de la velocidad, donde las ratas permanecen menos tiempo en la parte posterior de la caminadora para las velocidades bajas (valores por debajo de uno) y más tiempo para las velocidades altas (valores por arriba de 1). Al realizar el análisis estadístico (Test de Kruskal-Wallis, Test de Bonferroni como prueba *post hoc*) encontramos diferencias significativas al comparar los valores de posición y velocidad normalizados de la velocidad central del protocolo (30 cm/s) contra las dos velocidades más altas (32 y 33 cm/s) y las dos velocidades más bajas (27 y 28 cm/s). Estos resultados nos indican que las ratas son capaces de censar la velocidad a la que se mueve la caminadora para ajustar su velocidad y su posición, y así mantener los tiempos de entrada alineados a 7 segundos, que no mostraron diferencias significativas al aplicar la misma prueba estadística.

Después realizamos el mismo análisis estadístico para comparar los valores de posición, velocidad y tiempo de las sesiones control contra las sesiones en las que se realizaron las manipulaciones farmacológicas. Encontrando disminuciones significativas en la posición y la velocidad durante las sesiones en las que se administraron 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg de CP55940. Esto nos indica que las ratas alcanzaron picos de velocidad más bajos tras las administraciones del agonista cannabinérgico, acompañados de una modificación en las trayectorias de posición, en donde los animales permanecían menos tiempo en la parte posterior de la caminadora e incluso, si nos basamos en las trayectorias de la rata representativa en la figura 8, no se dejaban desplazar completamente hasta la pared posterior.

Al analizar los valores de tiempo también encontramos diferencias significativas en las dos administraciones más altas, donde podemos observar que disminuye la variabilidad y las boxplots alcanzan un mejor ajuste a los siete segundos. Este es un resultado sorprendente ya que, al parecer, el efecto observado es el contrario a la sobreestimación temporal comúnmente reportada en la literatura (Crystal et al., 2003; Atakan et al., 2012; Sewell et al., 2013).

8.2 Tarea con componentes espaciotemporales y administraciones locales diferenciales del agonista cannabinérgico CP55940

Posteriormente, nos preguntamos si el GPe, por su posición anatómica y funcional como primer relevo de la vía indirecta, estaba relacionado con los efectos de las administraciones sistémicas del CP55940, por lo que implantamos cánulas bilaterales en cuatro ratas para realizar administraciones locales diferenciales de CP55940, y evaluamos los mismos parámetros que en las administraciones sistémicas (posición, velocidad y tiempos de entrada).

En la figura 10 se pueden ver las trayectorias promedio de la posición y los picos de velocidad de una rata representativa mientras ejecuta la tarea bajo diferentes dosis locales del agonista cannabinérgico. Se observan modificaciones en la posición y un aumento en la variabilidad de los picos de velocidad, con un efecto mayor tras las administraciones de 5 µg/500nl y 10 µg/500nl.

Al realizar la normalización de los parámetros para las cuatro ratas (Fig. 11) y aplicarles la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Bonferroni, encontramos las mismas diferencias significativas en los valores de posición que los producidos por las administraciones sistémicas: una disminución tras las administraciones con una concentración más alta de CP55940 (Fig. 11A).

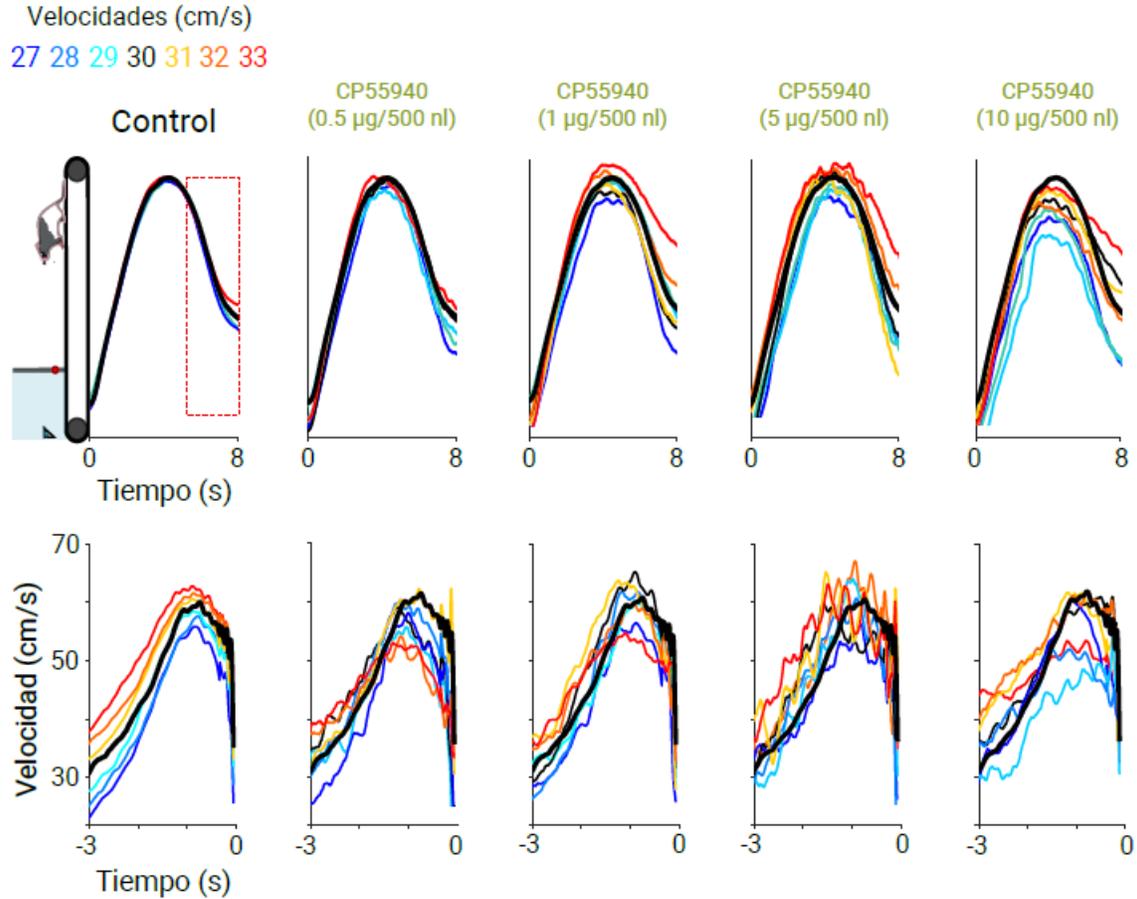


Figura 10. Trayectorias promedio de posición y picos de velocidad representativos en condiciones control y tras administraciones locales en el GPe de CP55949. Trayectorias de posición (fila superior) y picos de velocidad (fila inferior) de una rata representativa durante la tarea con componentes espacio-temporales, en condiciones control y tras administraciones locales en el GPe de 0,5µg/500nl, 1µg/500nl, 5µg/500nl y 10 5µg/500nl de CP55949. La línea negra con mayor grosor corresponde a la velocidad central del protocolo de velocidades aleatorias (30 cm/s) en condiciones control.

En cambio, a pesar de que aumenta la variabilidad en la velocidad después de las administraciones (Fig. 11B), no encontramos todas las diferencias significativas que habíamos visto durante las administraciones sistémicas. Esto nos indica que los picos de velocidad no disminuyeron durante las administraciones locales.

Además, en la figura 11C, también encontramos diferencias significativas en los tiempos de entrada; pero, contrario a lo que habíamos visto durante las

administraciones sistémicas, las administraciones locales altas en el GPe produjeron una disminución significativa en los tiempos de entrada para las dosis más altas. También puede observarse que en las dosis más bajas se produjo un aumento en la variabilidad. Lo que nos indica que las administraciones de CP55949 directas en el GPe provocan alteraciones en la estimación temporal.

Finalmente, con el objetivo de observar si la administración local de un antagonista cannabinérgico bloqueaba los efectos conductuales encontrados tras las administraciones sistémicas de CP55940, realizamos sesiones experimentales en donde administramos de forma local 10 μ g/500nl de AM251 simultáneamente a la administración sistémica de 0.2 mg/Kg de CP55940. En la figura 12 podemos encontrar los valores normalizados de posición y velocidad y los valores de tiempo en segundos para el grupo de cuatro ratas en las que se realizaron estos experimentos, comparados contra la condición control y las sesiones en las que únicamente se realizaron administraciones sistémicas de 0.2 mg/Kg de CP55940.

En donde podemos observar que el bloqueo local de los rCB1 en el GPe no disminuye por completo los efectos de las administraciones sistémicas de una dosis alta de un agonista cannabinérgico.

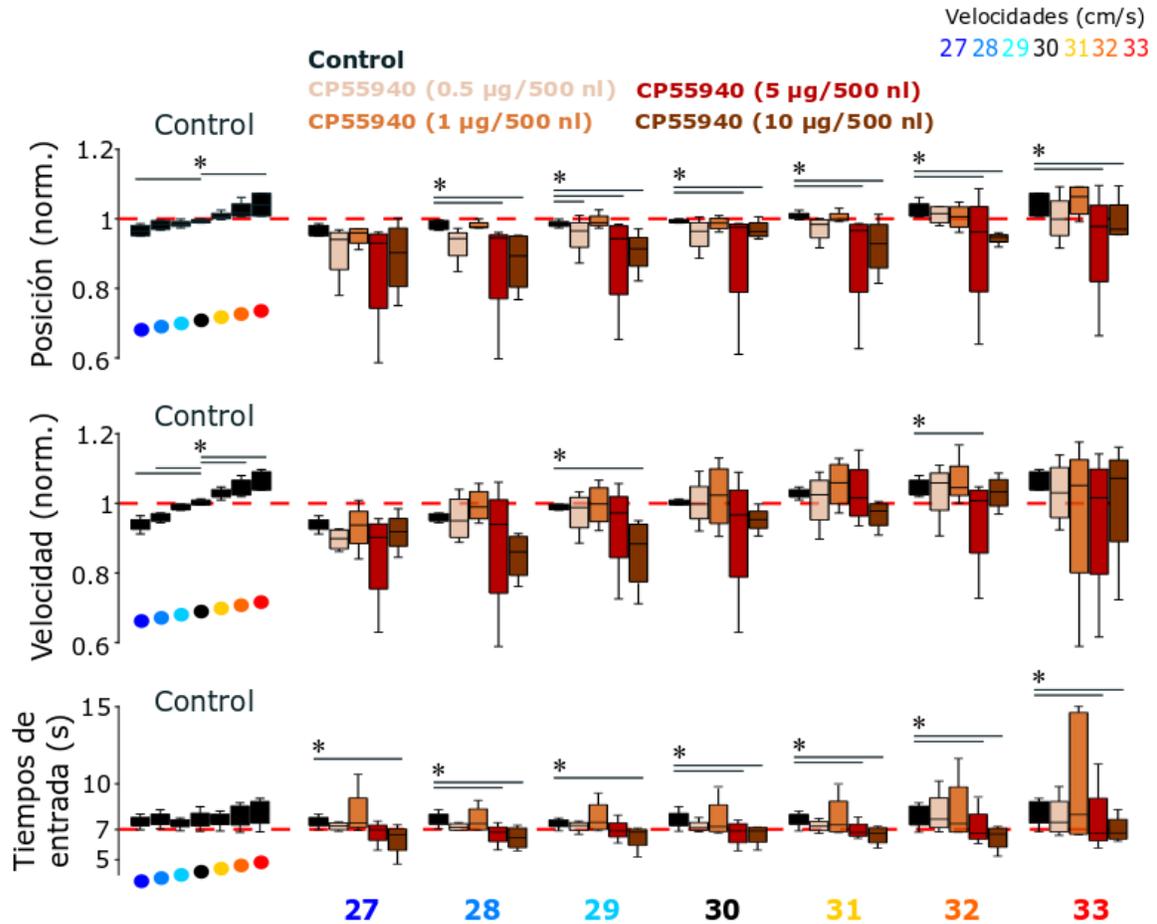


Figura 11. Efecto de las administraciones locales diferenciales de CP55940 sobre la ejecución de la tarea con componentes espaciotemporales. Boxplots correspondientes a los parámetros evaluados en la tarea con componentes espaciotemporales en condiciones control y tras las administraciones locales de CP55940 (n = 4). A) Posición normalizada. B) Velocidad normalizada. C) Tiempos de entrada. La posición y la velocidad se normalizaron a la velocidad central del protocolo de velocidades aleatorias (30 cm/s) de la condición control.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el Test de Bonferroni como prueba *post hoc*. Para las sesiones control (boxplots color negro, columna de la izquierda) se compararon los valores alcanzados durante la velocidad central (30 cm/s) contra el resto de las velocidades. Para el análisis entre condiciones se compararon las sesiones con manipulación farmacológica (en colores cálidos) contra la condición control (en negro) para cada velocidad del protocolo. *p < 0.05.

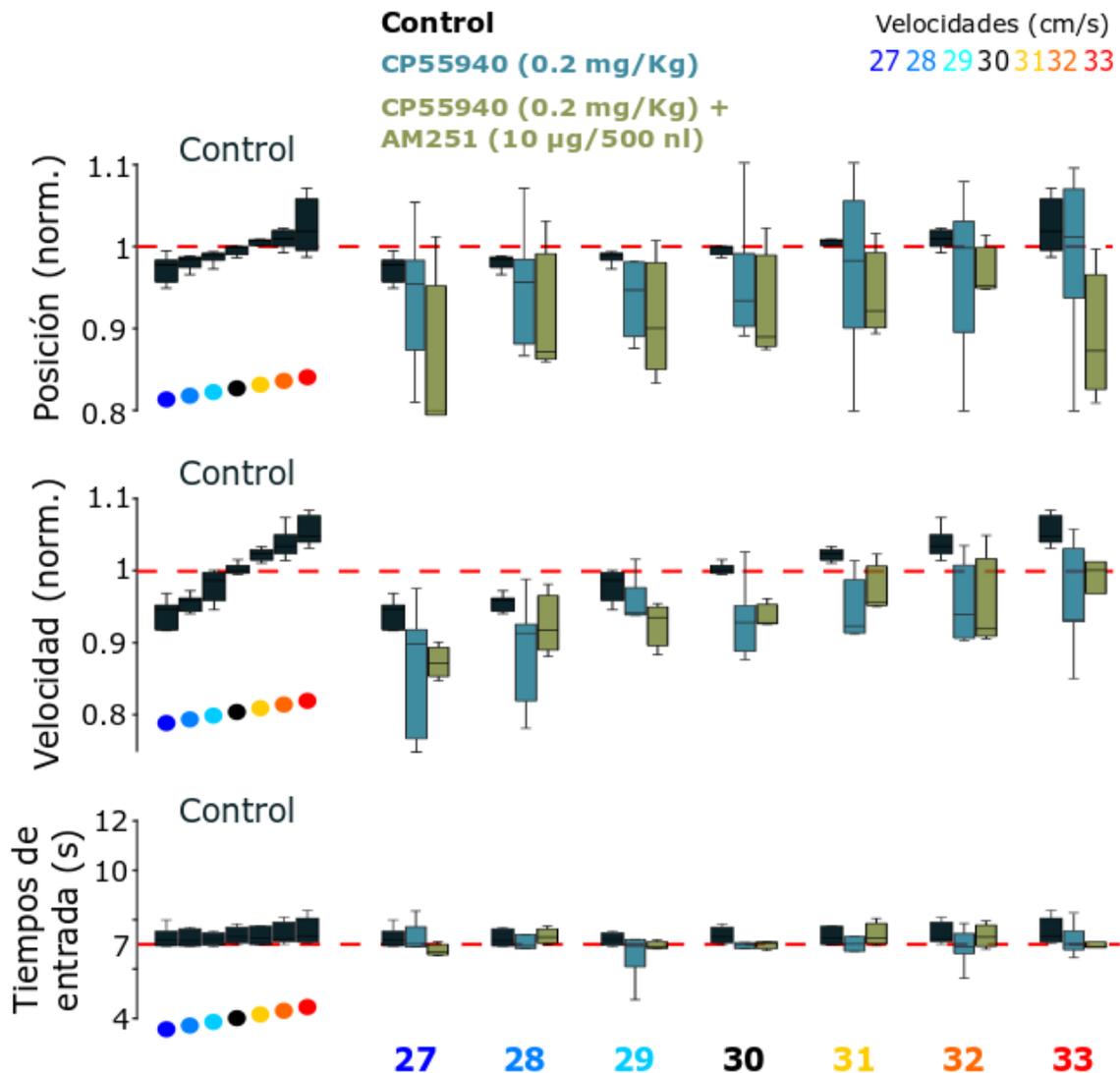


Figura 12. La administración local de un antagonista en el GPe no bloquea los efectos conductuales provocados por administraciones sistémicas altas de CP55940. Boxplots correspondientes a los parámetros evaluados en la tarea con componentes espaciotemporales en condiciones control, tras la administración sistémica de 0.2 mg/Kg de CP55940 y tras la administración local de 10 µg/500nl simultánea a la administración sistémica 0.2 mg/Kg de CP55940. A) Posición normalizada. B) Velocidad normalizada. C) Tiempos de entrada en segundos. La posición y la velocidad se normalizaron a la velocidad central del protocolo de velocidades aleatorias (30 cm/s) de la condición control.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el GPe no está relacionado con las disminuciones de la velocidad y el decremento en la variabilidad en los tiempos de entrada observados tras las administraciones sistémicas altas del agonista cannabinérgico (CP55940), ya que al realizar las administraciones locales encontramos los efectos contrarios y lo único que se mantuvo fue la modificación en las trayectorias de posición. Además, al realizar la administración sistémica de la dosis de 0.2 mg/Kg CP55940 simultánea a la administración local de un antagonista, pudimos observar que no se bloquean los efectos provocados por el CP55940, ya que los valores de posición, velocidad y tiempo de entrada no regresaron a los obtenidos durante las sesiones control.

8.3 Registros electrofisiológicos en animal anestesiado y administraciones sistémicas diferenciales de CP55940

Con el objetivo encontrar un correlato electrofisiológico a la disminución en la velocidad y la mejora en los tiempos de entrada durante las administraciones sistémicas, realizamos registros electrofisiológicos en condiciones control y tras administraciones sistémicas de 0.05 mg/Kg, 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg a diez ratas de la cepa Long Evans; de los cuales logramos registrar 390 neuronas del GPe para analizar su respuesta a estímulos somatosensoriales (en la pata delantera contralateral al sitio de registro) en las distintas condiciones. Los estímulos consistieron en la aplicación de 50 trenes, constituidos por 5 pulsos a 32 Volts cada uno, a una frecuencia de 3.3 Hz y con una separación de 5 segundos entre el inicio de cada tren. Este protocolo ha sido usado en el laboratorio para medir este tipo de respuestas en la corteza somatosensorial primaria, el estriado y la SNr (Báez-Cordero, et al, 2020; Hidalgo-Balbuena et al., 2019).

En la figura 13 se muestra una matriz poblacional que representa la actividad en valores Z de las 390 neuronas durante la condición control (Fig. 13A). Encontramos dos poblaciones neuronales con diferentes respuestas ante la estimulación: una población que respondía con excitación y otra que respondía con inhibición. En la figura 13B se pueden observar los valores Z alcanzados por ambas poblaciones,

así como la respuesta promedio de todas las neuronas que integran la totalidad de las neuronas registradas (gris) o las subpoblaciones que fueron clasificadas como inhibición (azul) o excitación (naranja).

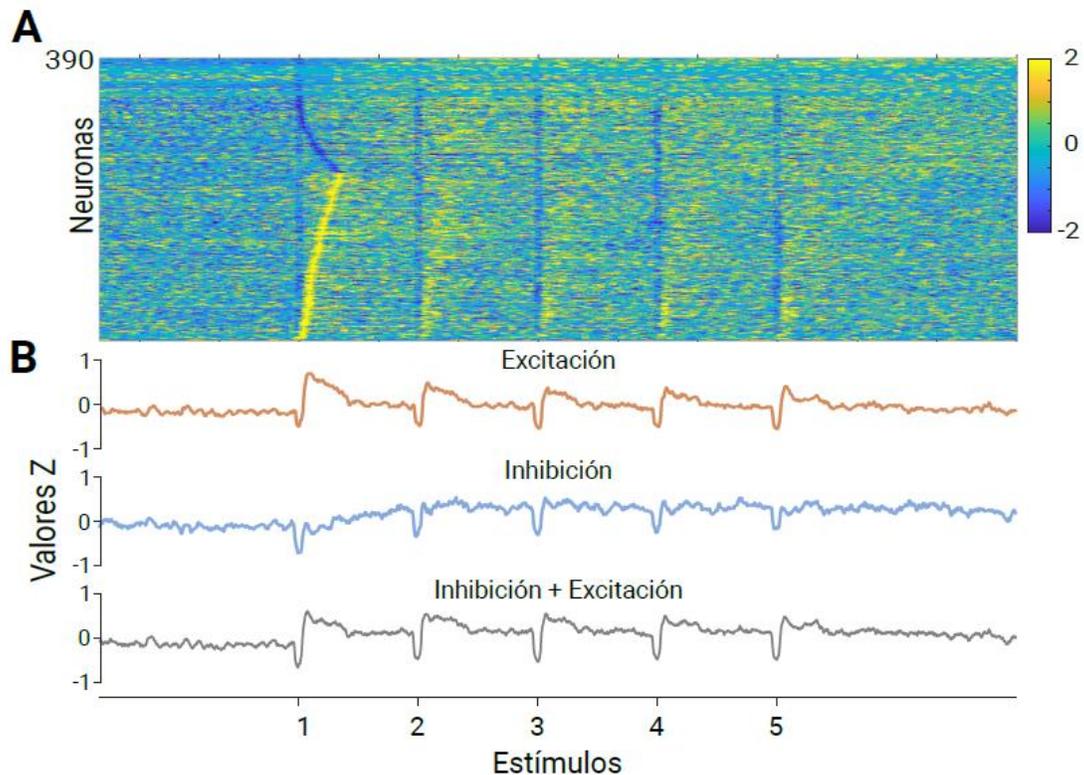


Figura 13. Caracterización de las respuestas en neuronas del GPe a estímulos somatosensoriales. Se encontraron dos poblaciones neuronales con distintas respuestas a los estímulos somatosensoriales: una con respuestas excitatorias y otra con respuestas inhibitorias. A) Matriz de actividad poblacional que incluye a las 390 neuronas del GPe y sus respuestas a los estímulos (actividad normalizada a valores Z). B) Valores Z alcanzados por las respuestas excitatorias, inhibitorias y la integral de ambas respuestas.

En la figura 14 se encuentran nuevamente las respuestas a estímulos somatosensoriales durante la condición control, seguidas por las respuestas durante las condiciones farmacológicas en donde se administraron tres dosis diferenciales de CP55940; la figura 14A corresponde a la matriz poblacional, donde podemos observar que las respuestas se mantienen después de las

administraciones de CP55940. En la figura 14B se ven los valores Z alcanzados para ambas poblaciones durante todas las condiciones.

En las boxplots de la figura 14C podemos observar que la tasa de disparo espontánea, en ausencia de los estímulos, no cambió durante ninguna de las condiciones.

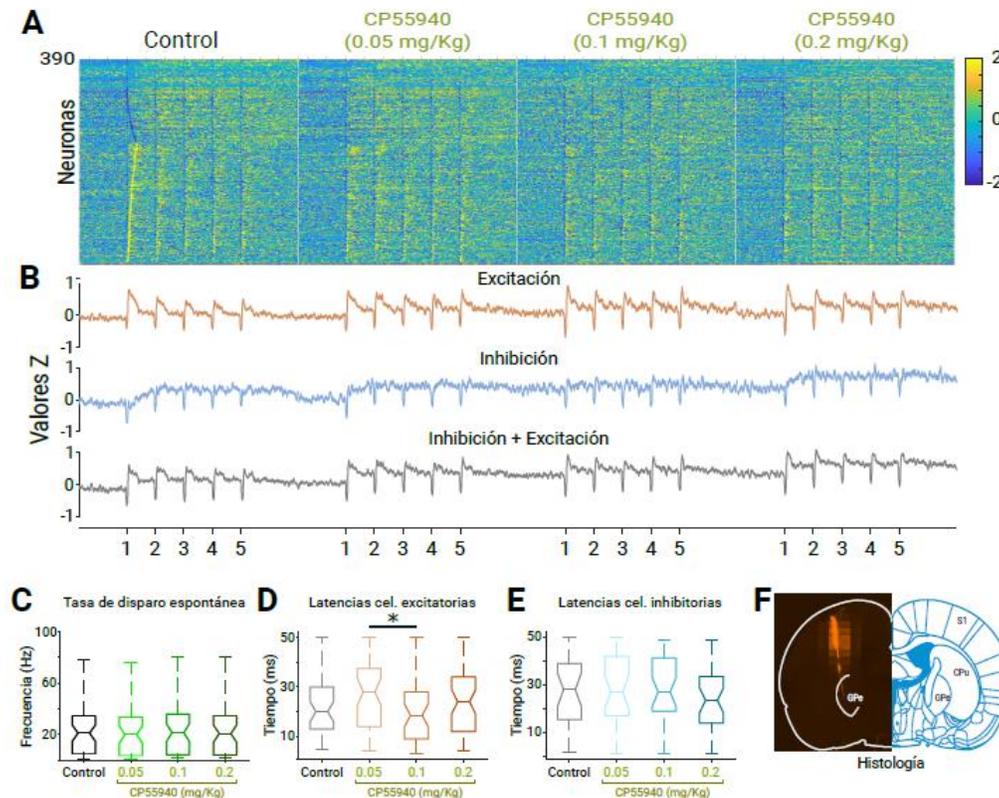


Figura 14. Respuesta a los estímulos somatosensoriales durante las distintas condiciones experimentales. Respuestas excitatorias e inhibitorias evocadas por la estimulación somatosensorial durante las cuatro condiciones. A) Matriz poblacional de las respuestas en las 390 neuronas durante condiciones control y después de las administraciones de CP55940. B) Valores Z alcanzados por ambas poblaciones durante las cuatro condiciones. C) Boxplots de la tasa de disparo espontánea en las cuatro condiciones. D) Latencias de las respuestas excitatorias durante las cuatro condiciones. E) Latencias de las respuestas inhibitorias durante las cuatro condiciones. F) Corroboración histológica representativa del sitio de registro. Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y el test de Bonferroni como prueba *post hoc*.

Sólo se encontró una diferencia significativa en las latencias de las respuestas excitatorias (Fig. 14D), alcanzando una mayor latencia después de la administración de 0.05 mg/Kg que disminuye durante la siguiente administración (Test de Kruskal-Wallis, Test de Bonferroni como prueba *post hoc*). No se encontraron diferencias en las latencias de las respuestas inhibitorias (Fig.14E).

La distribución en el porcentaje de neuronas que perteneció a cada una de las dos poblaciones no presentó cambios evidentes, como se puede observar en la figura 15A. Por otro lado, en la figura 15B se despliegan los boxplots correspondientes a las respuestas excitatorias (fila superior) e inhibitorias (fila inferior) evocadas por cada estímulo del tren de estimulación (las amplitudes se presentan en valores Z). En todos los casos encontramos diferencias significativas al comparar la intensidad de la respuesta en el primer estímulo contra los siguientes cuatro estímulos de cada tren en cada condición. Esos patrones de respuesta no se modificaron bajo ninguna dosis del agonista cannabinérgico.

Estos resultados sugieren que la actividad del GPe no muestra cambios tras distintas administraciones sistémicas de un agonista cannabinérgico, por lo que podemos deducir que los efectos conductuales encontrados con las mismas manipulaciones farmacológicas no se relacionen con la función del GPe específicamente. Lo anterior se confirma con los resultados conductuales observados tras las administraciones locales del mismo agonista, donde, si bien los cambios en las trayectorias de posición se mantuvieron, los efectos sobre la velocidad y los tiempos de entrada fueron distintos a los obtenidos después de las manipulaciones sistémicas.

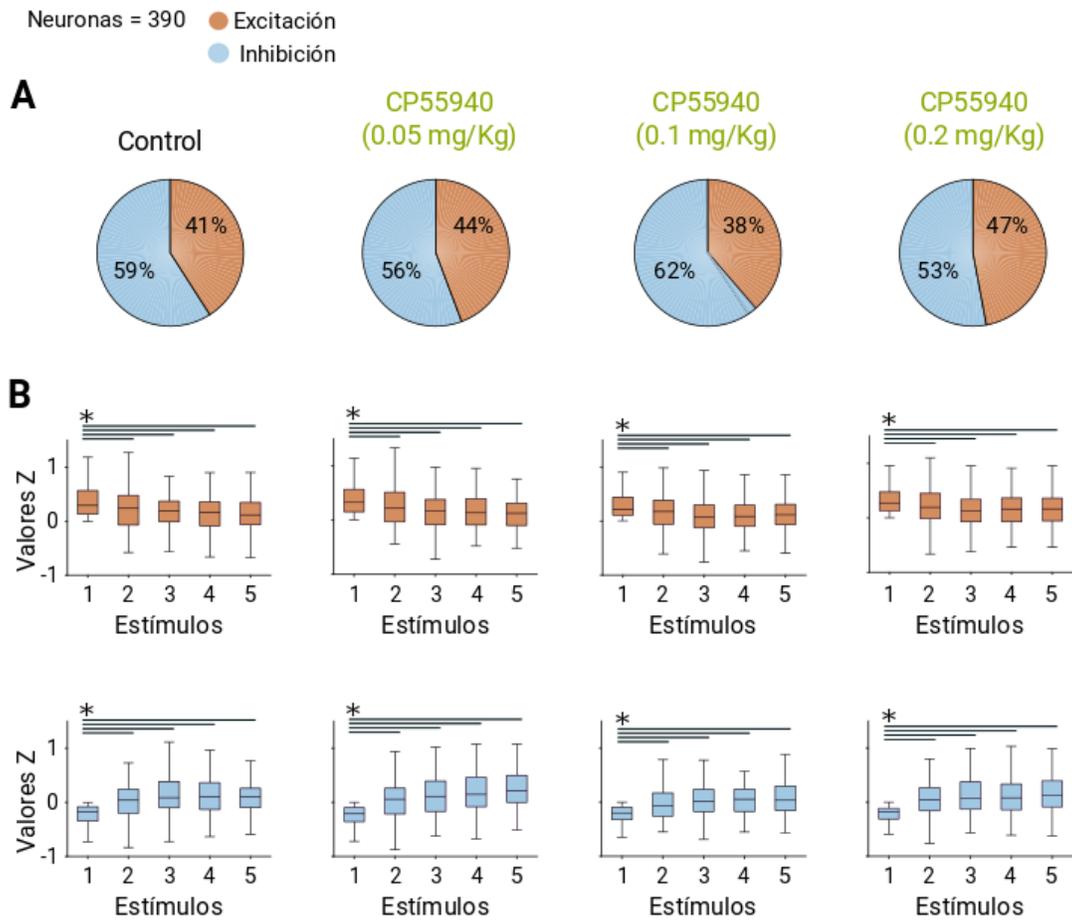


Figura 14. Distribución de las respuestas de las poblaciones excitatoria e inhibitoria a través de las condiciones. A) Distribución del porcentaje de neuronas perteneciente a cada población durante cada condición. B) Boxplots correspondientes a las respuestas excitatorias (superior) e inhibitorias (inferior), en valores Z, para el promedio de los cincuenta trenes de estimulación.

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y el Test de Bonferroni como prueba *post hoc*. Se compararon las respuestas alcanzadas, en valores Z, durante el primer estímulo de cada tren contra los cuatro estímulos subsecuentes. * $p < 0.05$. La distribución en los valores las respuestas se mantuvo durante todas las condiciones.

9. DISCUSIÓN

Dos de los efectos más reportados tras la administración sistémica de agonistas cannabinérgicos son las alteraciones en la ejecución del movimiento y las alteraciones en la estimación temporal. Se han encontrado efectos diferenciales en el control del movimiento, donde administraciones bajas de agonistas (tanto exógenos como endógenos) provocan hiperlocomoción; mientras que administraciones altas provocan hipolocomoción, llegando incluso al punto de la catalepsia (Sulcova et al., 1998; Katsidoni, Kastellakis, & Panagis, 2013; Prescott, Gold, & Martin, 1992). En cuanto a los cambios en la estimación temporal lo más frecuentemente reportado es la sobreestimación del tiempo, acompañada de un déficit en la capacidad de reproducción de intervalos temporales, ambos efectos con una relación aparentemente dosis dependiente (Crystal et al., 2003; Atakan et al., 2012; Sewell et al., 2013).

Con el objetivo de evaluar estos efectos, nosotros utilizamos una tarea con componentes espaciotemporales, en donde ratas deben correr en una caminadora realizando una secuencia estereotipada de movimientos en un periodo de tiempo determinado (siete segundos). En artículos anteriores se ha demostrado que esta tarea es altamente eficaz para que, después de largos periodos de entrenamiento, los animales desarrollen una estrategia común, incorporando exactamente la misma secuencia de movimientos con base una regla temporal bien delimitada, que es cruzar a la zona de meta después de siete segundos de haber comenzado la secuencia (Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Rueda-Orozco & Robbe, 2015), y en donde podemos evaluar parámetros como las trayectorias de posición (construidas a partir de la zona de la caminadora en la que se encuentren las ratas en un momento determinado), la velocidad y la estimación del tiempo.

Adicionalmente, en el presente trabajo, cuando las ratas alcanzaron altos porcentajes de respuestas correctas corriendo a 30 cm/s, incorporamos un protocolo de velocidades aleatorias: en donde la velocidad a la que se desplazaba la caminadora podía variar en un rango de 27 a 33 cm/s ensayo tras ensayo. En este protocolo es necesario que las ratas aprendan a censar la velocidad a la que

la caminadora se mueve para poder ajustar la velocidad a la que ellas corren y la aceleración que ejecutan al pasar a la zona de meta, con el objetivo de mantener el tiempo de entrada (7 segundos). Nosotros encontramos que los picos de velocidad son más bajos para las velocidades entre 27 y 29 cm/s y más altos para las velocidades de 31 a 33 cm/s (Fig. 7); con un ajuste en las trayectorias de posición, donde las ratas permanecieron menos tiempo en la parte posterior de la caminadora, o no se dejan llevar por completo, cuando tenían que correr a velocidades bajas.

Una vez que las ratas alcanzaron un buen desempeño en el protocolo de velocidades aleatorias realizamos las manipulaciones farmacológicas, tras lo que encontramos disminuciones significativas en los valores de velocidad y de posición en las sesiones que se administraron 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg de CP55940 (Fig. 9, A y B). Lo que quiere decir que las ratas disminuyeron los picos de velocidad en todos los ensayos y no se dejaron llevar por completo a la parte posterior de la caminadora cuando administramos dosis altas de un agonista cannabinérgico. Además, también encontramos diferencias significativas en los tiempos de entrada después de administrar dichas concentraciones de CP55940, encontrando que las ratas estimaban con mayor precisión el tiempo que en condiciones control (Fig. 9C).

Al observar estos resultados, nosotros interpretamos que la disminución en los valores de posición apareció como una estrategia de compensación en la ejecución de la tarea. Donde las ratas, al no poder alcanzar las mismas velocidades al correr que en la condición control, ajustaban su posición en la caminadora con el objetivo de mantener su secuencia de movimientos alineada al tiempo meta. La habilidad de los animales para realizar este ajuste significaría que, a pesar de sufrir los efectos de la droga, mantuvieron representaciones espaciales y temporales eficientes para contrarrestar sus efectos en el control de la velocidad.

Las disminuciones en la velocidad tras las administraciones altas que observamos coinciden con la hipolocomoción reportada previamente (Sulcova et al., 1998; Katsidoni, Kastellakis, & Panagis, 2013; Prescott, Gold, & Martin, 1992) y los cambios en las trayectorias de posición bien podrían ser una compensación para

mantener una ejecución óptima de la tarea o podrían ser un efecto aislado, ya que también se ha reportado que existen alteraciones en la percepción del espacio tras el consumo de marihuana (Tart, 1970).

Por otra parte, las diferencias que encontramos en los tiempos de entrada nos indican que, contrario a los que se reporta en la literatura (Atakan et al., 2012; Crystal et al., 2003; Sewell et al., 2013), las ratas mejoraron su estimación temporal: disminuyendo la variabilidad y presentando tiempos de entrada perfectamente ajustados a los siete segundos. Esto podría deberse al diseño del componente temporal en nuestra tarea, donde el tiempo de entrada se mantienen fijo y las ratas aprenden a realizar la ejecución siempre bajo las mismas reglas de temporalidad. Los estudios realizados sobre el sistema cannabínérgico y estimación temporal regularmente utilizan tarea de discriminación de intervalos, donde se presentan intervalos con diferentes duraciones y la atención a las pistas sensoriales que componen estos intervalos juega un papel importante. En cambio, la tarea que utilizamos favorece la estereotipicidad de la secuencia de movimientos con reglas espaciotemporales fijas y bastante bien delimitadas, donde se favorece la adquisición de un hábito y, una vez que las ratas se encuentran altamente entrenadas, la atención es requerida para censar la velocidad de la caminadora y ajustar el movimiento, mientras que el componente temporal se mantiene intacto. No obstante, esto es sólo una hipótesis, y aunque los cambios que observamos en el componente temporal nos parece un dato bastante interesante su origen no nos queda del todo claro.

Posteriormente, con el objetivo de determinar si los cambios que habíamos observado se relacionaban con la actividad del GPe, realizamos administraciones locales bilaterales del mismo agonista cannabínérgico. Encontramos las mismas disminuciones en los valores de las trayectorias de posición tras administraciones altas ($5\mu\text{g}/500\text{nl}$ y $10\mu\text{g}/500\text{nl}$); pero no encontramos diferencias significativas en los valores de velocidad tras ninguna de las administraciones (Fig. 11, A y B). Por otra parte, también encontramos diferencias significativas en los tiempos de entrada tras la administración de $5\mu\text{g}/500\text{nl}$ y $10\mu\text{g}/500\text{nl}$, aunque en este caso aumento la

variabilidad de sus valores (Fig. 11A). Por lo que, contrario a lo que observamos tras las administraciones sistémicas, aumentó la variabilidad en los tiempos de entrada.

En los estudios sobre estimación temporal, un aumento en la variabilidad de los resultados es un indicador de una alteración en la estimación temporal (Buhusi & Meck, 2005), lo cual normalmente se observa en personas con lesiones en el cerebelo o con una disminución en la irrigación dopaminérgica en los ganglios basales (como ocurre en los pacientes con enfermedad de Parkinson). En este caso no realizamos experimentos de lesión, sino que modulamos directamente la actividad del GPe; ya que, al regular a la baja la liberación del neurotransmisor (liberación de GABA en las terminales estriato-palidales), la activación de los rCB1 debía mantener activo al GPe, el cual inhibiría al núcleo subtalámico (único núcleo glutamatérgico de los GB) y permitiría que los núcleos de salida de lo GB también permanecieran inhibidos.

Estos cambios en la estimación temporal al modular la vía indirecta de lo GB apoyan la hipótesis de que la actividad de esta vía estaría implicada en el procesamiento temporal en los GB (Buhusi & Meck, 2002, 2005; Meck, 1986). Aunque existen estudios que han demostrado que la manipulación de ambas vías provocan efectos sobre el procesamiento del tiempo; al realizar manipulaciones optogenéticas, Bakhurin y colaboradores (2020) encontraron que la estimulación de la vía directa produce el reinicio del reloj interno, mientras que la estimulación de la vía indirecta produce una pausa en éste. Por lo que la contribución de las vías directa e indirecta de los GB al procesamiento temporal aún no es del todo clara.

Retomando los resultados que obtuvimos tras las administraciones locales de CP55940 en el GPe sobre la velocidad alcanzada por los animales (Fig. 11B), nosotros no esperábamos específicamente observar los mismos decrementos que se presentaron tras las administraciones sistémicas, sino un aumento en la velocidad de los animales que se presentaría de forma dosis dependiente. Esta hipótesis la planteamos siguiendo la fisiología de la vía indirecta descrita por el modelo clásico de los GB (Albin et al., 1989; DeLong, 1990), donde la activación de

la vía indirecta (inhibición del estriado sobre el GPe) inhibe el movimiento. Nosotros al regular la inhibición del GPe, mediante la activación de los rCB1 en las terminales estriato-palidales, esperábamos una facilitación del movimiento, que se vería reflejada con un incremento dosis dependiente de la velocidad durante nuestra tarea. No obstante, si bien se presentó un aumento en la variabilidad de los valores normalizados de velocidad, no se encontraron diferencias significativas.

Por último, para encontrar el correlato electrofisiológico de lo observado en los experimentos conductuales, realizamos registros electrofisiológicos en un modelo de animal anestesiado y analizamos la respuesta de neuronas del GPe a trenes de estímulos somatosensoriales en la pata delantera contralateral al sitio de registro, en condiciones control y tras la administración sistémica de 0.05 mg/Kg, 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg de CP55940.

Con lo que logramos registrar 390 neuronas y clasificamos su respuesta en dos poblaciones distintas: una población con respuestas inhibitorias y una población con respuestas excitatorias (Fig. 13). Ambas poblaciones respondieron con mayor intensidad al primer estímulo de cada tren que a los estímulos subsecuentes, y ese mismo patrón de respuesta se mantuvo durante las condiciones control y tras las manipulaciones farmacológicas (Fig. 14). Por lo que no encontramos diferencias en la actividad neuronal del GPe tras las administraciones sistémicas de un agonista cannabínérgico.

Creemos que estos resultados se deben a que existen diferentes áreas cerebrales con una alta expresión del rCB1, entre ellas la corteza cerebral y el estriado (Iversen, 2003; Tsou et al., 1998) que regulan la llegada de información GPe; siendo la corteza cerebral una de las áreas con mayores proyecciones hacia el estriado, de donde posteriormente surgen la vía directa e indirecta. Al administrar el agonista cannabínérgico de forma sistémica todas estas áreas se encontrarían bajo la activación del rCB1, por lo que muchas de las entradas de información al GPe también se encontrarían moduladas y mitigarían el efecto sobre éste.

Para evitar que los rCB1 de la corteza cerebral y el estriado también se encontraran bajo los efectos del CP55940, intentamos realizar registros en los que la

administración se realizara de forma local. Es importante resaltar que los registros que realizamos requieren de una alta estabilidad, en donde una vez que tenemos colocado el arreglo de microelectrodos en el sitio de registro seguimos la actividad de las neuronas por varios minutos antes de comenzar las manipulaciones farmacológicas. Sin embargo, cuando realizábamos la infusión del fármaco sobre el mismo núcleo de registro la actividad de las neuronas que nos encontrábamos siguiendo desaparecía, creemos que debido a que la infusión provocaba que salieran del campo de los electrodos.

Por lo que debemos pensar en un nuevo método de registro y de administración local para poder realizar estos experimentos.

10. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la administración sistémica de altas concentraciones de un agonista cannabinérgico (CP55940) provoca una disminución en la velocidad, una modificación en las trayectorias de posición y una mayor precisión en la estimación temporal.

Al realizar administraciones locales del mismo agonista en el GPe encontramos cambios en las trayectorias de posición y la estimación del tiempo, pero no en la velocidad. Además, al administrar simultáneamente una dosis alta de CP55940 de forma sistémica y un antagonista cannabinérgico (AM 251) de forma local, encontramos que los efectos conductuales provocados por el agonista no se bloquean. Lo que nos indica que la modulación farmacológica del sistema cannabinérgico en el GPe no se encuentra relacionada con el control de la velocidad.

Por otra parte, al evocar respuestas a la estimulación somatosensorial en neuronas del GPe, encontramos que estas respuestas no se modifican tras administraciones sistémicas diferenciales de CP55940. Lo que nos indica que los efectos conductuales encontrados tras administraciones sistémicas de CP55940 no están relacionados con cambios en la actividad neuronal del globo pálido externo.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). *The functional anatomy of basal ganglia disorders*.
- Arstila, V. (2017). Experience and the pacemaker-accumulator model. *Journal of Consciousness Studies*.
- Atakan, Z., Morrison, P., G. Bossong, M., Martin-Santos, R., & A. Crippa, J. (2012). The Effect of Cannabis on Perception of Time: A Critical Review. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/138161212802884852>
- Báez-Cordero, A. S., Pimentel-Farfan, A. K., Peña-Rangel, T., & Rueda-Orozco, P. E. (2020). Unbalanced Inhibitory/Excitatory Responses in the Substantia Nigra Pars Reticulata Underlie Cannabinoid-Related Slowness of Movements. *The Journal of Neuroscience*, 40(30), 5769–5784.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.0045-20.2020>
- Bakhurin, K. I., Li, X., Friedman, A. D., Lusk, N. A., Watson, G. D., Kim, N., & Yin, H. H. (2020). Opponent regulation of action performance and timing by striatonigral and striatopallidal pathways. *ELife*.
<https://doi.org/10.7554/elife.54831>
- Block, R. A., & Zakay, D. (1997). Prospective and retrospective duration judgments: A meta-analytic review. *Psychonomic Bulletin and Review*.
<https://doi.org/10.3758/BF03209393>
- Buhusi, C. V., & Meck, W. H. (2002). Differential effects of methamphetamine and haloperidol on the control of an internal clock. *Behavioral Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.116.2.291>
- Buhusi, C. V., & Meck, W. H. (2005). What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nature Reviews Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nrn1764>
- Busquets-Garcia, A., Bains, J., & Marsicano, G. (2018). CB1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology*.

<https://doi.org/10.1038/npp.2017.206>

Busquets-Garcia, A., Desprez, T., Metna-Laurent, M., Bellocchio, L., Marsicano, G., & Soria-Gomez, E. (2015). Dissecting the cannabinergic control of behavior: The where matters. *BioEssays*.

<https://doi.org/10.1002/bies.201500046>

Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimotodani, Y. (2012). Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron*.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>

Church, R. M. (1984). Properties of the Internal Clock. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1984.tb23459.x>

Crystal, J. D., Maxwell, K. W., & Hohmann, A. G. (2003). Cannabinoid modulation of sensitivity to time. *Behavioural Brain Research*.

[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00062-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00062-7)

Da Cunha, C., & Packard, M. G. (2009). Preface. Special issue on the role of the basal ganglia in learning and memory. *Behavioural Brain Research*.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.026>

DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V)

Devane, W. A., Axelrod, J., Axelrod, J., Simpson, J. T., Mackie, K., & Devane, W. A. (1994). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6698>

Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*.

Kandel, E., Schwartz, J. (2014). *Principles Of Neural Science-McGraw-Hill Medical (2000). Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Fernández-Ruiz, J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., González, S., & Ramos, J. A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. <https://doi.org/10.1054/plaf.2001.0350>
- Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2003>
- Ospina-García, N., Pérez-Lohman, C., Vargas-Jaramillo, J. D., Cervantes-Arriaga, A., & Rodríguez-Violante, M. (2017). Ganglios Basales y Conducta. *Revista Mexicana de Neurociencia Noviembre-Diciembre* (Vol. 18).
- Gerdeman, G. L., Partridge, J. G., Lupica, C. R., & Lovinger, D. M. (2003). It could be habit forming: Drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00065-1)
- Gerfen, C. R., & Bolam, J. P. (2010). The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374767-9.00001-9>
- Gerfen CR, P. R. and H. N. (2014). GENSAT BAC Cre-recombinase driver lines to study the functional organization of cerebral cortical and basal ganglia circuits, *80*(6). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.016.GENSAT>
- Gibbon, J., Church, R. M., & Meck, W. H. (1984). Scalar Timing in Memory. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1984.tb23417.x>
- Glass, M. (1997). Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01390.x>
- Goodman, J., & Packard, M. G. (2015). The influence of cannabinoids on learning and memory processes of the dorsal striatum. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.06.008>
- Graybiel, A. M., & Grafton, S. T. (2015). The striatum: Where skills and habits

meet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021691>

Grotenhermen, F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide.

Cannabinoids (Vol. 1). Retrieved from www.cannabis-med.org

Hazan, L., Zugaro, M., & Buzsáki, G. (2006). Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods*.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.017>

Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R., & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-02-00563.1991>

Hidalgo-Balbuena, A. E., Luma, A. Y., Pimentel-Farfan, A. K., Peña-Rangel, T., & Rueda-Orozco, P. E. (2019). Sensory representations in the striatum provide a temporal reference for learning and executing motor habits. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12075-y>

Howlett, A. C., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Milne, G. M. (1988). Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: Development of a cannabinoid receptor model. *Molecular Pharmacology*.

Iversen, L. (2003). Cannabis and the brain. *Brain*.

<https://doi.org/10.1093/brain/awg143>

Ivry, R. B. (1996). The representation of temporal information in perception and motor control. *Current Opinion in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80037-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80037-7)

Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*.

<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150420>

Katsidoni, V., Kastellakis, A., & Panagis, G. (2013). Biphasic effects of Δ^9 -

- tetrahydrocannabinol on brain stimulation reward and motor activity. In *International Journal of Neuropsychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1017/S1461145713000709>
- Kim, N., Li, H. E., Hughes, R. N., Watson, G. D. R., Gallegos, D., West, A. E., ... Yin, H. H. (2019). A striatal interneuron circuit for continuous target pursuit. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10716-w>
- Kita, H., & Jaeger, D. (2016). Organization of the Globus Pallidus. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00013-1>
- Kita, Hitoshi. (2007). Globus pallidus external segment. *Progress in Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60007-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60007-1)
- Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2-10>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.027>
- Matell, M. S., & Meck, W. H. (2004). Cortico-striatal circuits and interval timing: Coincidence detection of oscillatory processes. *Cognitive Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.cogbrainres.2004.06.012>
- Mauk, M. D., & Buonomano, D. V. (2004). The neural basis of temporal processing. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144247>
- Meck, W. H. (1986). Affinity for the dopamine D2 receptor predicts neuroleptic potency in decreasing the speed of an internal clock. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90109-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90109-7)
- Meck, W. H. (1996). Neuropharmacology of timing and time perception. *Cognitive Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0926-6410\(96\)00009-2](https://doi.org/10.1016/0926-6410(96)00009-2)

- Meck, W. H., Penney, T. B., & Pouthas, V. (2008). Cortico-striatal representation of time in animals and humans. *Current Opinion in Neurobiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.002>
- Mello, G. B. M., Soares, S., & Paton, J. J. (2015). A scalable population code for time in the striatum. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.036>
- Merchant, H., Harrington, D. L., & Meck, W. H. (2013). Neural Basis of the Perception and Estimation of Time. *Annual Review of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170349>
- Miller, A. S., & Walker, J. M. (1996). Electrophysiological effects of a cannabinoid on neural activity in the globus pallidus. *European Journal of Pharmacology*.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00111-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00111-2)
- Oorschot, D. E. (1996). Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: A stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *Journal of Comparative Neurology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960318\)366:4<580::AID-CNE3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960318)366:4<580::AID-CNE3>3.0.CO;2-0)
- Paton, J. J., & Buonomano, D. V. (2018). The Neural Basis of Timing: Distributed Mechanisms for Diverse Functions. *Neuron*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.045>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2009). The Rat Brain. *Elsevier Academic Press*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Prescott, W. R., Gold, L. H., & Martin, B. R. (1992). Evidence for separate neuronal mechanisms for the discriminative stimulus and catalepsy induced by Δ^9 -THC in the rat. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/BF02244975>
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., ... Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>

- Rueda-Orozco, P. E., Montes-Rodriguez, C. J., Soria-Gomez, E., Méndez-Díaz, M., & Prospéro-García, O. (2008). Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. *Neuropharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.04.013>
- Rueda-Orozco, P. E., & Robbe, D. (2015). The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.3924>
- Sales-Carbonell, C., Rueda-Orozco, P. E., Soria-Gomez, E., Buzsaki, G., Marsicano, G., & Robbe, D. (2013). Striatal GABAergic and cortical glutamatergic neurons mediate contrasting effects of cannabinoids on cortical network synchrony. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1217144110>
- Sañudo-Peña, M. C., Tsou, K., & Walker, J. M. (1999). Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00293-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00293-3)
- Sewell, R. A., Schnakenberg, A., Elander, J., Radhakrishnan, R., Williams, A., Skosnik, P. D., ... D'Souza, D. C. (2013). Acute effects of THC on time perception in frequent and infrequent cannabis users. *Psychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/s00213-012-2915-6>
- Soria-Gómez, E., Massa, F., Bellocchio, L., Rueda-Orozco, P. E., Ciofi, P., Cota, D., ... Marsicano, G. (2014). Cannabinoid type-1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.005>
- Stella, N., Schweitzer, P., & Plomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/42015>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., ... Waku, K. (1995). 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid

receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>

Sulcova, E., Mechoulam, R., & Fride, E. (1998). Biphasic effects of anandamide. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00422-X](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00422-X)

Tart, C. T. (1970). Marijuana intoxication: Common experiences. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/226701a0>

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*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5493-07.2008>

Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00436-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00436-3)

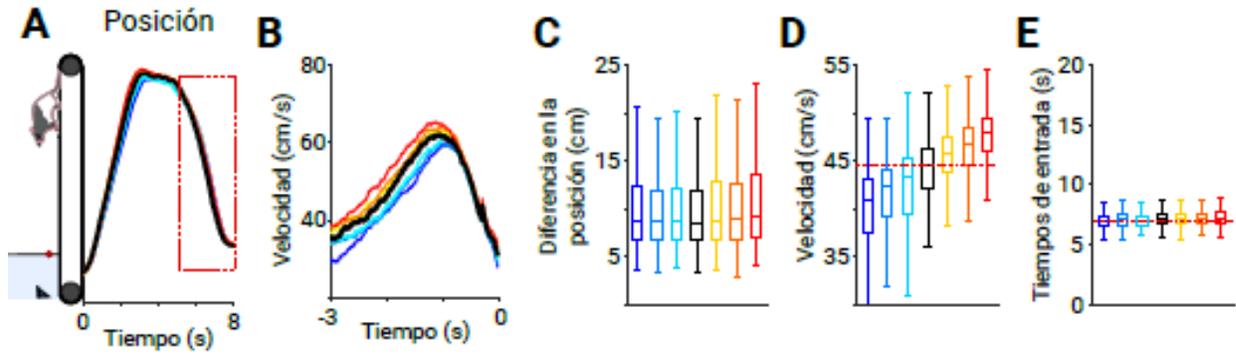
Turner, R. S., & Desmurget, M. (2010). Basal ganglia contributions to motor control: A vigorous tutor. *Current Opinion in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.022>

Yttri, E. A., & Dudman, J. T. (2016). Opponent and bidirectional control of movement velocity in the basal ganglia. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature17639>

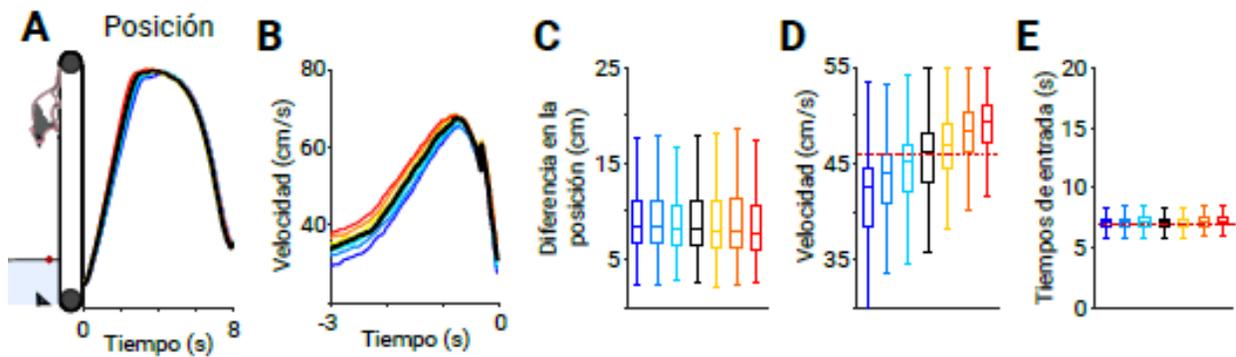
12. MATERIALES SUPLEMENTARIOS

Velocidades (cm/s)
27 28 29 30 31 32 33

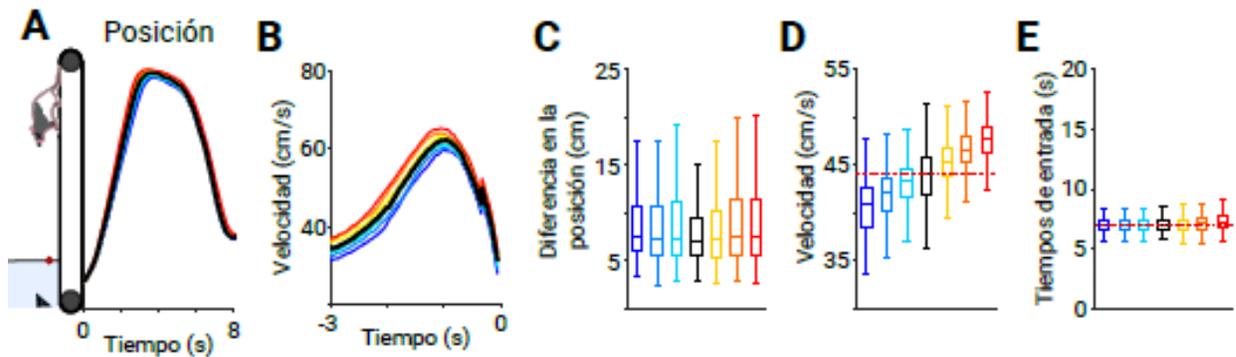
Rata No. 1



Rata No. 2

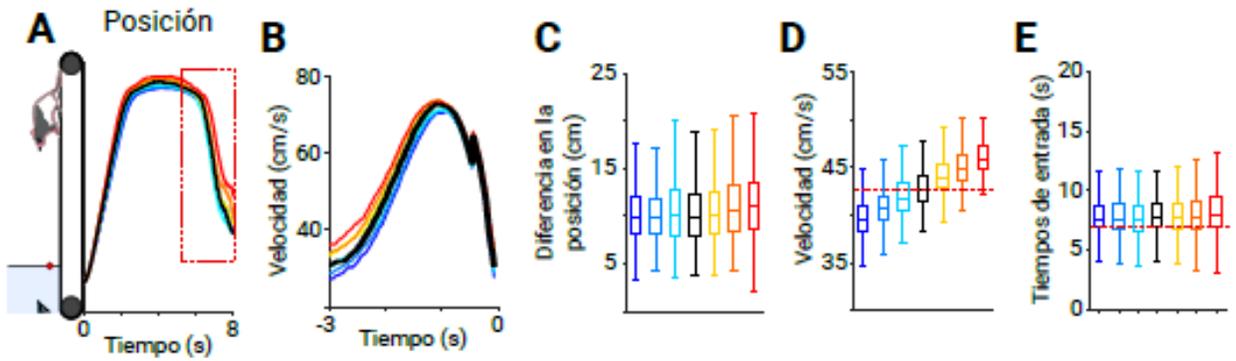


Rata No. 3

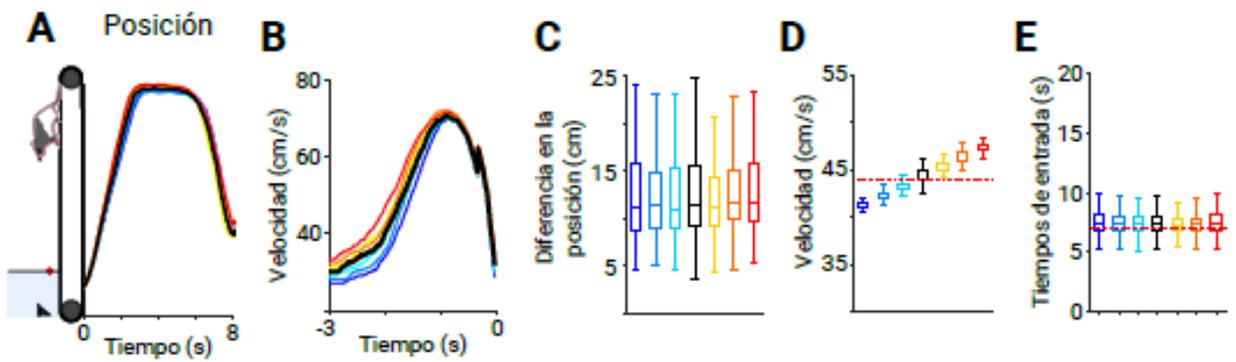


Velocidades (cm/s)
 27 28 29 30 31 32 33

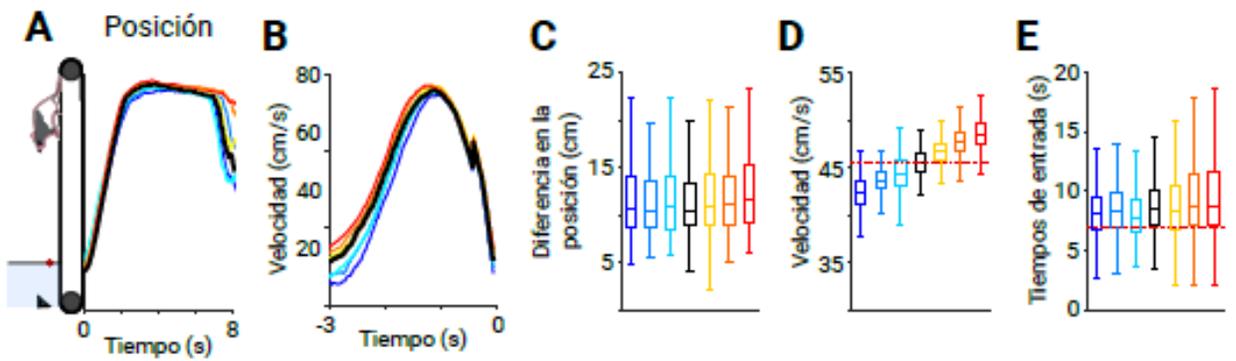
Rata No. 4



Rata No. 5



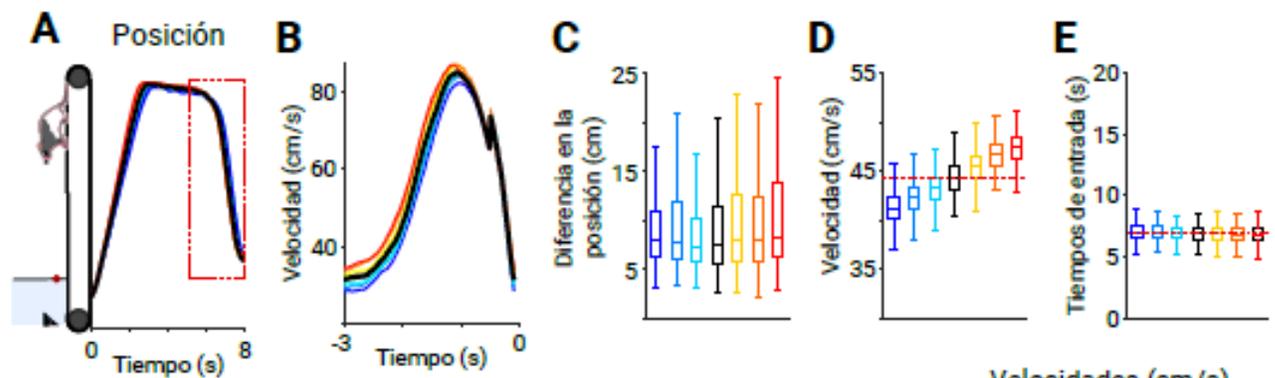
Rata No. 6



Velocidades (cm/s)

27 28 29 30 31 32 33

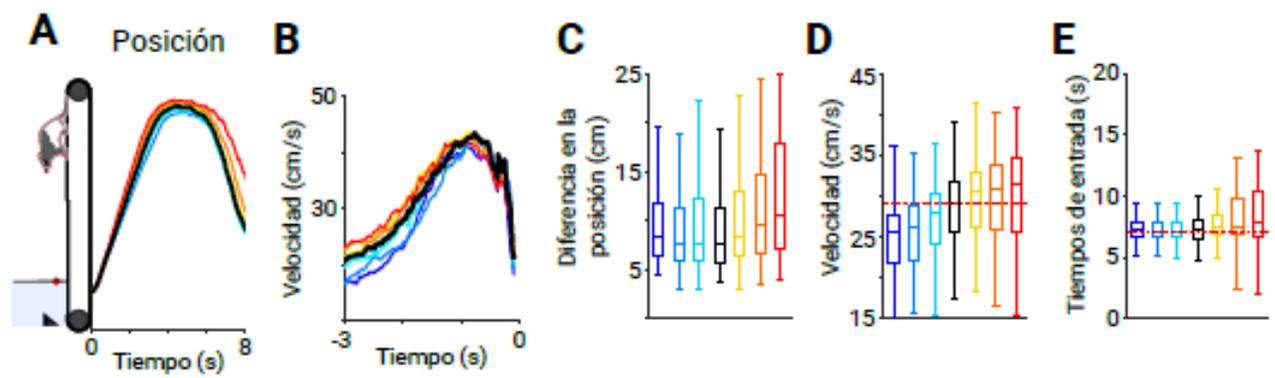
Rata No. 7



Velocidades (cm/s)

17 18 19 20 21 22 23

Rata No. 8



Rata No. 9

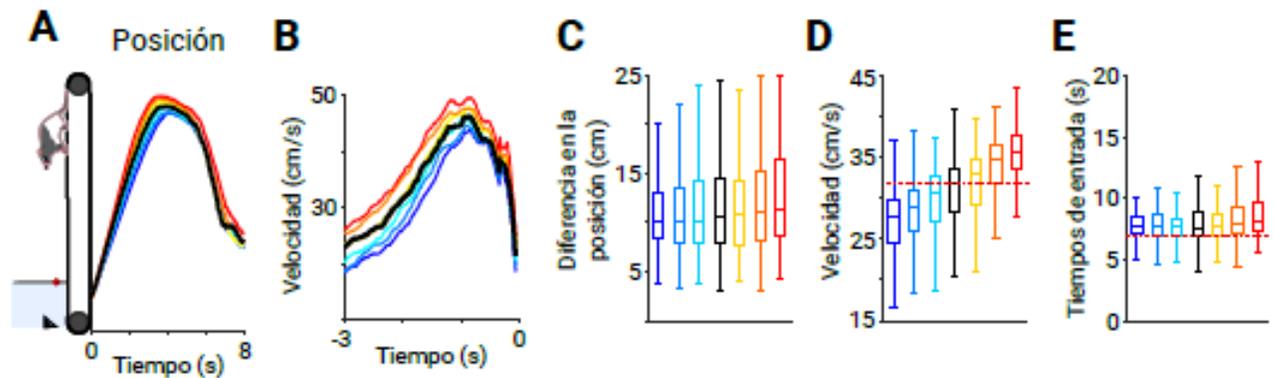


Figura suplementaria 1. Ajuste en la ejecución de la tarea durante el protocolo de velocidades aleatorias. A) Trayectorias de posición. B) Promedio de los picos de velocidad alcanzados durante los últimos tres segundos antes de la interrupción del fotodetector. C) Diferencias en la posición para cada una de las velocidades. Una diferencia de centímetros más cercana a cero nos indica que existe una mayor similitud entre las trayectorias de posición. D) Promedio de las velocidades alcanzadas en relación con las velocidades a las que se movía la caminadora. E) Promedio de los tiempos de entrada para cada velocidad del protocolo.

Las ratas 8 y 9 no pudieron realizar la tarea corriendo en el rango de 27 a 33 cm/s, por lo que corrieron con un rango de 17 a 23 cm/s. Al normalizar los datos esa diferencia en el rango de velocidades pudo ser eliminada.