



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA VÍA INDIRECTA DE LOS GANGLIOS BASALES AL CAMBIO/TRANSICIÓN ENTRE SECUENCIAS DE ACCIONES POR MEDIO DE OPTOGENÉTICA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Kathia Itzel Ramírez Armenta

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Bargas Díaz
Instituto de Fisiología Celular

Dra. Angélica Zepeda Rivera
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Agosto, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero para la realización de este trabajo mediante el proyecto con clave: 220412, y por la beca con número de CVU: 699418.

A la Universidad Nacional Autónoma de México mediante el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA), Proyectos: IA200815 y IN2266517.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el apoyo económico para la asistencia a diversos eventos académicos para la presentación de los resultados generados en este proyecto.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar por su dirección y compromiso con el proyecto, por contribuir a mi crecimiento académico y personal.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. José Bargas Díaz y Dra. Angélica Zepeda Rivera, por su crítica constructiva hacia el proyecto en cada seminario y por contribuir a mi crecimiento académico.

A los miembros del jurado para la obtención del grado, Dra. Lourdes Massieu Trigo, Dra. Diana Escalante Alcalde, Dr. Francisco Sotres Bayón, Dr. Ranier Gutierrez y al Dr. Pavel Rueda por sus observaciones y comentarios al proyecto.

Al Psic. Asai Sánchez Fuentes por el desarrollo del paradigma conductual utilizado en este proyecto y la asesoría para el análisis de datos.

Al cDr. Edgar Díaz Hernández, por su asesoría técnica para el aprendizaje de técnicas básicas del laboratorio y manejo de animales, así como su crítica constructiva durante el desarrollo del proyecto.

Al Biol. Héctor Alatraste León, por su asesoría técnica durante la realización este proyecto.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, por la asesoría técnica en el manejo de las líneas transgénicas utilizadas en el laboratorio y técnicas de biología molecular.

A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, por el asesoramiento y las facilidades para la utilización de los equipos de microscopia a su cargo y, por contribuir a mi crecimiento académico mediante sus observaciones y comentarios.

A la Biol. Ariadna Aparicio Juárez, M.en IBB Gabriela Xochitl Ayala Méndez, Dra. Claudia Rivera Cerecedo, Dr. Héctor Malagón Rivero por su apoyo para la reproducción y mantenimiento de las cepas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

Al cDr. José Vergara por su asesoría para la realización del análisis de resultados a través de la interfaz de MATLAB.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Secuencias de Acciones	2
Circuito Cortico-Estriatal en la Generación de Secuencias de Acciones	3
Ganglios Basales: Generalidades	5
Ganglios Basales: Secuencias de Acciones	6
Vías de los ganglios basales para la regulación del control motor	7
La vía indirecta de los ganglios basales y su participación en el control motor.	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
JUSTIFICACIÓN	11
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
General.....	12
Específicos	12
METODOLOGÍA	13
Modelo de Estudio	13
Implementación de una estrategia para el estudio del cambio entre secuencias de acciones	14
Registro e Identificación de Neuronas de la Vía Indirecta Durante el Cambio/Transición entre dos Secuencias de Acciones in vivo	16
Expresión de Opsinas e Implante de Electrodo/Fibra para Registro y Fotoidentificación.	16
Fotoidentificación	18
Análisis de la actividad de la vía indirecta	19
Manipulación de la Actividad de la Vía Indirecta por Medio de Optogenética.....	21
Expresión de opsinas e implante de fibras ópticas	21
Manipulación de la Actividad de la Vía Indirecta Durante la Transición	22
Histología	23
RESULTADOS	25
Implementación de una tarea para el estudio del cambio/transición entre secuencias de acciones.	25
Expresión de Opsinas por medio de Inducción Viral	29
Registros Extracelulares de la Actividad Unitaria de Neuronas de la Vía Indirecta	30

Análisis de la actividad de la vía indirecta durante la realización de cadenas de secuencias de acciones consecutivas	32
Análisis del patrón de actividad de la vía indirecta durante cadenas de secuencias estímulo-respuesta.....	33
Análisis del patrón de actividad de la vía indirecta durante cadenas de secuencias autoiniciadas.....	37
La actividad de las neuronas de la vía indirecta es diferencial alrededor del cambio entre secuencias dependiendo del tipo de cadena de acciones que se realiza.	41
Inhibición de la Actividad de la Vía Indirecta Durante la Realización de Cadenas de Secuencias	44
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIÓN	54
ANEXOS	55
BIBLIOGRAFÍA	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de organización de secuencias de acciones.	2
Figura 2. Contribución del circuito cortico-estriatal a la generación de secuencias de acciones.....	4
Figura 3. Esquema general de la Conectividad de los Ganglios Basales.	8
Figura 4. Modelo experimental para el estudio de la actividad de la vía indirecta.....	13
Figura 5. Programa de entrenamiento para la implementación de una estrategia que permita el estudio del cambio entre secuencias de acciones.	15
Figura 6. Expresión de opsinas en el estriado. Channelrodhopsin y Archeorodhopsin.	16
Figura 7. Registros electrofisiológicos in vivo.	18
Figura 8. Manipulación optogenética durante la realización de cadenas de secuencias de acciones.....	22
Figura 9. Establecimiento de una estrategia para el estudio del cambio/transición entre secuencias de acciones en animales silvestres.....	26
Figura 10. Establecimiento de una estrategia para el estudio del cambio/transición entre secuencias de acciones en animales A2a_Cre.	28
Figura 11. Expresión de Proteínas Exógenas.....	29
Figura 12. Identificación de neuronas de la vía indirecta por medio de optogenética.	31
Figura 13. Actividad de una unidad de la vía indirecta durante la realización de secuencias consecutivas: Unidad representativa.....	32
Figura 14. Patrón de actividad de las neuronas de la vía indirecta durante la realización de cadenas estímulo-respuesta.	34
Figura 15. Regresión lineal entre parámetros de la cadena y la actividad de la vía indirecta en cadenas estímulo-respuesta.	36
Figura 16. Patrón de actividad de las neuronas de la vía indirecta durante la realización de cadenas autoiniciadas.....	38
Figura 17. Regresión lineal entre parámetros de la cadena y la actividad de la vía indirecta en cadenas autoiniciadas.....	40
Figura 18. Comparativo entre los patrones de actividad de la vía indirecta para cadenas estímulo-respuesta contra cadenas autoiniciadas.	42
Figura 19. Neuronas de la vía indirecta que discriminan entre cadenas E-R y A.....	43
Figura 20. Localización del sitio de infección y protocolos de manipulación	44
Figura 21. La inhibición de la vía indirecta antes de iniciar una cadena estímulo-respuesta afecta los parámetros de la segunda secuencia.....	46
Figura 22. La inhibición de la vía indirecta antes de iniciar y durante la realización de la primera secuencia retrasa la transición y afecta los parámetros de la realización de las cadenas de acciones autoiniciadas.....	47

ANEXO

Anexo 1. Comparación intersecuencia de los patrones de actividad para cada una de las presiones individuales.....	55
Anexo 2. Comparación de los intervalos entre presiones por secuencia para cada condición.....	56

RESUMEN

INICIAR, EJECUTAR Y CAMBIAR ENTRE SECUENCIAS DE ACCIONES SON MECANISMOS QUE PERMITEN LA SUPERVIVENCIA DE LOS INDIVIDUOS. LAS PATOLOGÍAS QUE AFECTAN LA FUNCIONALIDAD DE LOS GANGLIOS BASALES (GB) AFECTAN LA CAPACIDAD PARA GENERARLOS APROPIADAMENTE. EL ANÁLISIS DE LA ANATOMÍA DE LOS GB POSTULA DOS VÍAS DE INTERCONEXIÓN A LO LARGO DE ESTE SISTEMA: LA VÍA DIRECTA E INDIRECTA. LOS MODELOS QUE INTERPRETAN LA CONTRIBUCIÓN DE ESTAS VÍAS SOBRE EL CONTROL MOTOR COINCIDEN EN QUE LA ACTIVIDAD DE LA VÍA DIRECTA FACILITA LA EJECUCIÓN DE LOS PROGRAMAS MOTORES DESEADOS, PERO DEBATEN ACERCA DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA VÍA INDIRECTA A PARTIR DE DOS EVIDENCIAS EXPERIMENTALES: 1) LA ACTIVACIÓN DE ESTA VÍA INHIBE EL MOVIMIENTO Y 2) EXISTE UN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE ESTA VÍA ANTES DEL INICIO DE UNA ACCIÓN. ESTAS AFIRMACIONES, APARENTEMENTE CONTRADICTORIAS, PLANTEAN LA SIGUIENTE PREGUNTA: ¿POR QUÉ LA VÍA INDIRECTA SE ACTIVA ANTES DEL INICIO DE UNA SECUENCIA DE ACCIONES?

EN ESTE TRABAJO EVALUAMOS SI LA ACTIVIDAD DE LA VÍA INDIRECTA PERMITE EL CAMBIO ENTRE DOS SECUENCIAS DE ACCIONES. PARA ESTE FIN, ENTRENAMOS A SUJETOS EXPERIMENTALES A REALIZAR SECUENCIAS DE ACCIONES EN CADENA SOLICITÁNDOLES TRANSITAR ENTRE ELLAS EN DOS MODALIDADES: TRANSICIONES ESTÍMULO-RESPUESTA Y AUTOINICIADAS. A TRAVÉS DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS IN VIVO E IDENTIFICACIÓN FOTOASISTIDA, OBSERVAMOS QUE LAS NEURONAS DE LA VÍA INDIRECTA CONTIENEN ACTIVIDAD QUE SE MODULA DURANTE EL INICIO, LA EJECUCIÓN, EL CAMBIO Y EL FINAL DE CADENAS DE SECUENCIAS ACCIONES. LA INHIBICIÓN OPTOGENÉTICA DE ESTAS NEURONAS, DURANTE TRANSICIONES AUTOINICIADAS, AUMENTA EL TIEMPO DE CAMBIO ENTRE LAS SECUENCIAS, AFECTANDO TAMBIÉN LA CORRECTA EJECUCIÓN DE LA CADENA DE SECUENCIAS.

INTRODUCCIÓN

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales relacionados con la planeación, selección y ejecución de movimientos. La importancia de su estudio radica en que diversas patologías como la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourette y el trastorno obsesivo compulsivo, coinciden en presentar alteraciones en los patrones de actividad normales de estos núcleos y, por tanto, problemas en procesos de selección, inicio y ejecución de acciones (Albin et al. 1989; Mahlon R. DeLong 1990). La fisiología de estos núcleos se ha tratado de explicar partiendo del hecho de que en este sistema existen dos vías originadas por dos distintos tipos de neuronas de proyección que conectan el núcleo estriado, principal estructura de entrada de ganglios basales, con las estructuras de salida (sustancia nigra pars reticulata y el núcleo entopeduncular): la vía directa constituida por las neuronas estriatonigrales ó estriatoentopedunculares y la vía indirecta constituida por neuronas estriatopallidales (Redgrave et al. 2011).

Actualmente, la contribución de estas vías se interpreta desde dos perspectivas: la perspectiva antagónica y la perspectiva concurrente. La perspectiva antagónica propone que la vía directa favorece la realización de movimientos mientras que la activación de la vía indirecta inhibe la realización de los mismos (Durieux et al. 2009; Kravitz et al. 2010; Oldenburg & Sabatini 2015). Por otro lado, la perspectiva concurrente propone que ambas vías se activan simultáneamente para permitir la iniciación de movimientos (Cui et al. 2014; Jin et al. 2014). Desde ambas perspectivas se concluye que la actividad de la vía directa facilita los movimientos, sin embargo, para la vía indirecta no hay una clara interpretación. Si bien la activación de esta vía previo al inicio de una secuencia de acciones pudiera contribuir a la adecuada selección del programa motor deseado (Kim et al. 2017), también existe la posibilidad de que permita el cambio/transición entre estados, es decir del momento previo al inicio de la ejecución propiamente dicha. De ser cierta la aseveración anterior, sobre la contribución al cambio/transición entre estados, se sustentaría una noción más compleja acerca de la contribución de la vía indirecta de los ganglios basales al control motor.

Por lo tanto, en el presente proyecto nos propusimos resolver la disyuntiva sobre la actividad de la vía indirecta a través de registros opto-electrofisiológicos in-vivo y de la inhibición optogenética de esta vía en animales realizando transiciones entre secuencias de acciones consecutivas. Los resultados de este proyecto contribuyen a la comprensión de la participación de este subcircuito sobre la selección, inicio, cambio/transición y ejecución de secuencias de acciones.

ANTECEDENTES

Secuencias de Acciones

La capacidad de aprender y generar acciones secuenciales es un mecanismo conductual utilizado por todos los organismos como parte de las habilidades que permite asegurar su supervivencia. Actualmente existen modelos para explicar cómo las acciones son organizadas, a través de la experiencia, en secuencias precisas de movimiento para producir habilidades complejas (Jin & Costa 2015). La organización de las acciones en secuencias, se ha explicado a través de dos teorías principales: 1) Según la teoría de la cadena de reflejos (estructura serial), se define una secuencia de acciones (sistema de movimientos) como: “Una combinación de movimientos enlazados entre sí de tal forma que el estímulo generado por la ejecución de cierto movimiento es requerido para la realización de los siguientes” (**Figura 1A**, Washburn 1917) . Es decir, la organización serial está basada en el principio estímulo-respuesta. 2) El modelo jerárquico, sugiere que las secuencias de acciones se organizan como sub-secuencias que a su vez están compuestas por elementos de sub-sub-secuencias y, los principales nodos tienen la capacidad de acceder a los diferentes componentes de niveles inferiores (**Figura 1b**, Jin & Costa 2015). Se ha establecido que para generar un patrón secuencial se requiere la imposición de un esquema general que, a pesar de un amplio rango y variedad de elementos, determina la secuencia de actos específicos (Lashley 1951).

A. Orden Serial



B. Orden Jerárquico

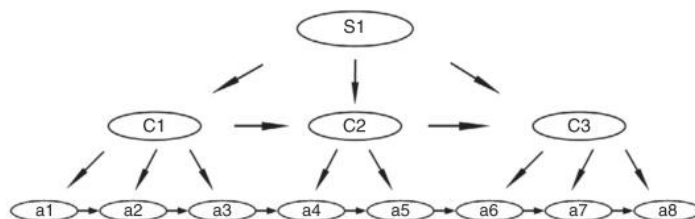


Figura 1. Modelo de organización de secuencias de acciones.
A. Modelo serial. B. Modelo jerárquico. (Modificado de Jin & Costa,2015)

Desórdenes del movimiento como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la distonía están caracterizados por una disfunción en la regulación de acciones voluntarias (Albin et al. 1989; M R DeLong 1990). Una acción voluntaria se define como todo aquello que el sujeto realiza de manera consiente y por una causa identificada (Frankfurt 1988). Diversos estudios han demostrado que pacientes con este tipo de patologías presentan problemas tanto en el aprendizaje como en la ejecución de secuencias de acciones (Benecke et al. 1987; Ghilardi et al. 2003; Seidler et al. 2007). Derivado de lo anterior, una gran cantidad de estudios en animales y humanos han demostrado que el estriado, el cerebelo y las estructuras relacionadas que forman el circuito cortico-estriatal y cortico-cerebelar contribuyen al aprendizaje y ejecución de secuencias motoras (Doyon 2008).

Circuito Cortico-Estriatal en la Generación de Secuencias de Acciones

Las conexiones cortico-estriatales tienen un rol central en el desarrollo de conductas dirigidas a objetivos, incluida la motivación y cognición necesaria para desarrollar las acciones apropiadas para obtener una consecuencia específica (Haber 2016). Las conductas que involucran secuencias de acciones pueden ir desde complejas habilidades humanas, movimientos instintivos especie-específicos hasta secuencias motoras aprendidas (Aldridge & Berridge 1998). Con respecto a estas últimas, se ha demostrado que en las primeras fases del entrenamiento para la realización de acciones existe una amplia variabilidad en la actividad neuronal en el estriado y la corteza motora. Esta variabilidad decreta de manera sustancial al momento en el que se consolida la acción (Barnes et al. 2005; Costa et al. 2004), lo que sugiere modificaciones plásticas en la circuitería cortico-estriatal que pudieran facilitar el desempeño más eficiente de programas motores específicos tras el aprendizaje (Yin et al. 2009). La contribución de la corteza a la ejecución de secuencias motoras ha sido ampliamente estudiada. Por ejemplo, Mushiake y colaboradores reportaron que la corteza motora suplementaria participa en el desempeño de secuencias específicas de movimientos, además han sugerido que las neuronas de la corteza pre-motora participan de manera específica y diferencial en secuencias guiadas visualmente con respecto a aquellas que deben realizarse sin una guía sensorial (Mushiake et al. 1990; Mushiake et al. 1991; **Figura 2A**). Adicionalmente a los estudios anteriores, Tanji & Shima encontraron que la corteza suplementaria no solo se activa para ciertos movimientos, sino que además, lo hacen para secuencias con movimientos en un orden específico, lo que pareciera indicar que estas células contribuyen a la planeación y codificación de múltiples movimientos futuros (**Figura 2B**, Tanji & Shima 1994).

Además se ha demostrado que la corteza prefrontal muestra una activación co-temporal con todos los segmentos de una secuencia, y la fuerza de representación de un segmento dado es específica a su posición en la cadena de ejecución (Averbeck et al. 2002), lo que apoya la teoría de organización serial de acciones en secuencia.

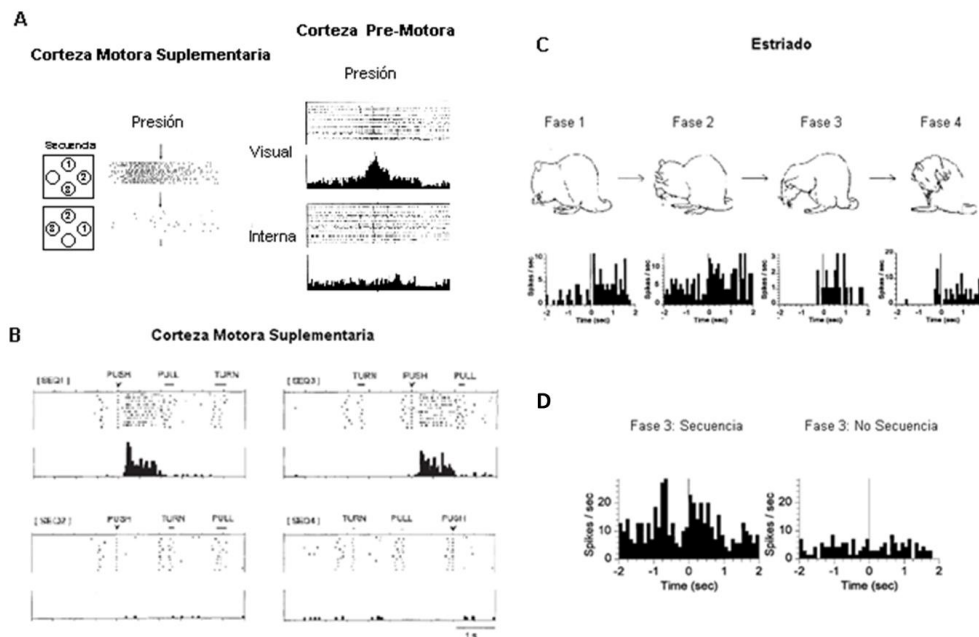


Figura 2. Contribución del circuito cortico-estriatal a la generación de secuencias de acciones. **A.** Unidad representativa de la corteza suplementaria que se activa para una secuencia de movimientos específica (panel izquierdo) y, unidad representativa de la corteza premotora que se activa de manera específica durante secuencias guiadas (panel derecho; Modificado de Mushiake et al. 1990; Mushiake et al. 1991). **B.** La corteza motora suplementaria se activa de manera selectiva para acciones que aparecen con un orden específico (Modificado de Tanji & Shima 1994). **C.** Actividad estriatal durante la realización de secuencias complejas de acicalamiento en ratas. **D.** Actividad neuronal del núcleo estriado observada para una acción particular cuando se realiza dentro y fuera de una secuencia (Modificado de Aldridge & Berridge 1998).

Con respecto a la actividad estriatal durante la realización de patrones secuenciales complejos, como lo son las conductas de acicalamiento en ratas, Aldridge y Berridge han demostrado que las neuronas estriatales presentan actividad correlacionada con cada una de las acciones estereotipadas que componen la secuencia de acicalamiento (**Figura 2C**). Lesiones en esta estructura, y no en otros sistemas motores como la corteza primaria, secundaria o el cerebelo, incrementan la probabilidad de una ruptura en la estructura serial de la cadena de secuencias (Aldridge & Berridge 1998). Además, la depleción de dopamina en el estriado sugiere que esta

estructura es importante para el mantenimiento de la organización secuencial de las conductas de pelea en ratas juveniles (Pellis et al. 1993).

Más adelante se describirá con mayor profundidad los estudios que sustentan la idea e importancia de la participación del estriado, en el aprendizaje y la ejecución de secuencias de acciones. A continuación, se describen algunas generalidades sobre los ganglios basales, las teorías que explican su contribución al movimiento voluntario, y su relación con la ejecución de secuencias de acciones.

Ganglios Basales: Generalidades

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales implicados en distintas funciones relacionadas con la actividad motora [aprendizaje motor, funciones y comportamientos ejecutores y emociones (Lanciego et al. 2012)]. Las estructuras que se incluyen dentro de este conjunto son: el núcleo caudado y putamen (estriado en roedores), los segmentos externo e interno del globo pálido (este último núcleo entopeduncular en roedores), el núcleo subtalámico y la sustancia nigra. El entendimiento de la fisiología que rige la actividad de estos núcleos fue altamente reforzado por diversas observaciones clínicas durante el siglo pasado las cuales asociaban lesiones en el núcleo lenticular y en el núcleo subtalámico con signos parkinsonianos, distonia y hemibalismo (Wilson 1925; Martin 1927; Albin et al. 1989; Mahlon R. DeLong 1990). A partir de estos estudios, una gran cantidad de esfuerzo ha sido encausado para tratar de comprender la actividad de los ganglios basales tanto en un concepto anatómico-fisiológico como patológico.

Diversos estudios anatómicos han demostrado que estos núcleos son un punto importante donde convergen aferencias de distintas regiones cerebrales. El estriado, principal núcleo de entrada de los ganglios basales, recibe aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza y del tálamo (Webster 1961; Webster 1965; Kemp & Powell 1971; Gerfen 1984), dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y el área ventral tegmental (Kubota et al. 1986), serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe (Lavoie & Parent 1990) y colinérgicas del tallo cerebral.

La población de neuronas presentes en el estriado está compuesta en su mayoría por neuronas de proyección espinosas medianas de naturaleza GABAérgica (95%) y en una pequeña parte por interneuronas (Chang et al. 1982; Kemp & Powell 1971). Estas últimas divididas en principio por su naturaleza química en interneuronas GABAérgicas e interneuronas colinérgicas tónicamente activas. A su vez, las interneuronas GABAérgicas presentes en el estriado pueden sub-clasificarse

según su perfil molecular basado en la expresión de marcadores como parvoalbumina, calretinina y somatostatina (Kawaguchi et al. 1995).

Las neuronas de proyección del estriado, las neuronas espinosas medianas, se clasifican por su patrón de proyección y, además, por la expresión de neuropéptidos y receptores específicos. Las neuronas espinosas medianas GABAérgicas con proyecciones monosinápticas hacia la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y al segmento interno del globo pálido (GPi) que además expresan dinorfina, sustancia P y el receptor de dopamina D1 se integran como parte de la vía directa. Aquellas neuronas espinosas GABAérgicas que proyectan hacia la SNr a través del segmento externo del globo pálido (GPe) y el núcleo subtalámico (STN) que además expresan receptores de dopamina D2 y encefalina forman parte de la vía indirecta. Además, es importante mencionar que se ha demostrado que las aferencias que recibe el estriado son diferenciales para cada una de los subcircuitos descritos con anterioridad (**Figura 3**; Lei 2004; Guo et al. 2015; Wall et al. 2013).

Ganglios Basales: Secuencias de Acciones

Una de las primeras evidencias que demostró la contribución de la actividad estriatal a la planeación y desarrollo de movimientos fueron las observaciones de Romo & Schultz, que evidenciaron una población de neuronas estriatales que se activaban de manera fásica previo al inicio de una acción específica (Schultz & Romo 1988).

Estudios posteriores, han determinado que el estriado es pieza clave para el aprendizaje y el correcto desempeño de conductas motoras (Aldridge & Berridge 1998; Yin et al. 2009; Tecuapetla et al. 2016). Sin embargo, pocos estudios han evidenciado que existen cambios plásticos región (dorsomedial/dorsolateral) y vía específicos involucrados en el aprendizaje de una habilidad. Con respecto a lo anterior, se ha observado que el estriado dorsomedial está involucrado principalmente en fases tempranas del aprendizaje motor mientras que la región lateral participa en la fase final del entrenamiento, esta última fase propicia potenciación de la transmisión glutamatérgica específicamente en neuronas de la vía indirecta de la región dorsolateral (Yin et al. 2009).

Además, se ha demostrado que existe una modulación diferencial en la actividad estriatal cuando una acción específica se realiza dentro de un patrón secuencial a cuando lleva a cabo de manera aleatoria (**Figura 2D**). Este tipo de codificación es particular a la región dorsal cuando se compara contra los patrones de actividad del estriado ventral. Se ha sugerido que esta actividad pudiera estar

implicada en las transiciones acción-acción de la cadena general o en la estructura de la cadena global (Aldridge & Berridge 1998).

Vías de los ganglios basales para la regulación del control motor

La participación de los ganglios basales en el control motor se explica a través de la participación de los dos principales sub-circuitos que los conforman: la vía directa e indirecta (Gerfen 2006). Existen dos perspectivas, una antagónica y una sinérgica, para explicar cómo estas vías interactúan para regular la actividad motora.

La perspectiva antagónica sugiere que la activación de la vía directa se activa para propiciar el movimiento, mientras que la vía indirecta lo hace para inhibirlo (Alexander & Crutcher 1990; Gerfen 1984; Mahlon R. DeLong 1990; Kravitz et al. 2010; Durieux et al. 2012; Tai et al. 2012). Esto es que la activación cortical produce la liberación de glutamato que activa a las neuronas de proyección espinosas medianas que proyectan hacia la SNr y el GPi (vía directa), lo cual ejerce un efecto inhibitor en las neuronas GABAérgicas de la sustancia nigra que proyectan hacia el tálamo, generando una desinhibición en esta estructura que proyecta hacia la corteza (**Figura 3**). El resultado de esta cadena de eventos es la generación del movimiento. Por otro lado, la activación glutamatérgica de las neuronas que proyectan hacia el GPe y el NST (vía indirecta) y, posteriormente hacia la SNr, resulta en la disminución de la actividad locomotriz (Durieux et al. 2009; Kravitz et al. 2010; Durieux et al. 2012; Freeze et al. 2013).

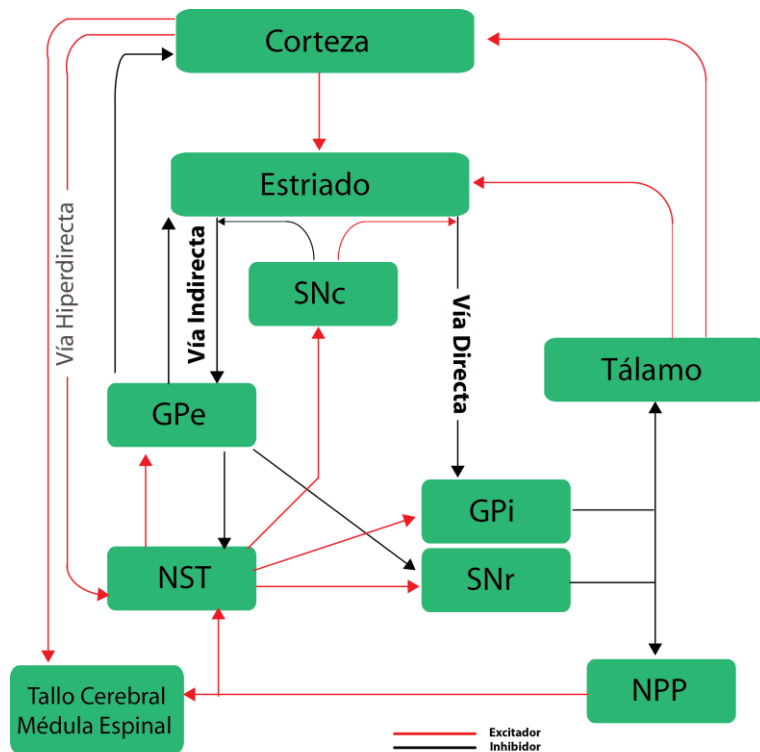


Figura 3. Esquema general de la Conectividad de los Ganglios Basales.

En rojo se ilustran las principales aferencias excitatorias, mientras que en negro las proyecciones inhibitorias de naturaleza GABAérgica. SNc: Sustancia Nigra pars compacta. SNr: Sustancia Nigra pars reticulata. GPe: Globo Pálido Externo. GPi: Globo Pálido Interno (Entodenduncular en roedores). NST: Núcleo Subtalámico. NPP: Núcleo Pedúnculo Pontino.

Entre las últimas evidencias experimentales que apoyan esta visión, se encuentran los trabajos de Kravitz y colaboradores en los que, utilizando un modelo de denervación de los axones dopaminérgicos, demuestran que la activación bilateral de las neuronas de la vía directa decrece los signos de inmovilidad e incrementa el tiempo de deambulación mientras que la estimulación de la vía indirecta decreta este tiempo e incrementa bruscamente el tiempo que el roedor pasa detenido (Kravitz et al. 2010).

Por otra parte, la perspectiva sinérgica sugiere que ambas vías pueden funcionar de manera concurrente para lograr los movimientos deseados (Mink 1996; Hikosaka et al. 2000; Hikida et al. 2010; Cui et al. 2014; Jin et al. 2014; Tecuapetla et al. 2014). Recientes estudios en los que se evalúa los cambios en calcio intracelular, como reportero de actividad neuronal, registros extracelulares y manipulaciones optogenéticas en animales en libre movimiento han demostrado que existe la activación simultánea de ambas vías precediendo la realización del movimiento (Cui et al. 2014; Tecuapetla et al. 2014; Tecuapetla et al. 2016).

Ambas perspectivas se concilian en el estudio de Jin y colaboradores (Jin et al. 2014) quienes observaron distintos patrones de disparo para cada una de las vías durante la realización de una secuencia de acciones. Sugiriendo que la vía indirecta muestra una activación precediendo al inicio de la secuencia y una inhibición durante la ejecución de la misma, corroborando el hecho de que ambas vías se activan de manera concomitante durante la iniciación de las secuencias motoras (Jin et al. 2014).

La vía indirecta de los ganglios basales y su participación en el control motor.

Estudios de ablación de las neuronas estriatopalidales realizados en animales en libre movimiento en paradigmas de campo abierto (Durieux et al. 2009; Hikida et al. 2010; Sano et al. 2013), así como los experimentos de activación optogenética demuestran la contribución de este subcircuito a la reducción en el movimiento general (Kravitz et. al 2013, Oldenburg & Sabatini 2015). Por otra parte, la vía indirecta se ha relacionado a procesos de selección para el control de la generación de acciones específicas (Kim et. al. 2017). A continuación, se revisarán brevemente algunos de los trabajos que demuestran la contribución de este subcircuito al control de conductas dirigidas a objetivos.

Se ha demostrado que el estriado almacena información de experiencias anteriores y la utiliza como parte del proceso de generación de conductas. Con respecto a la vía indirecta, Tai y colaboradores, mediante técnicas optogenéticas lograron mimetizar el fenómeno en el que el valor asignado a una recompensa específica propicia que la vía indirecta sea capaz de sesgar la conducta hacia la generación de acciones específicas, así como de modificar el tiempo de respuesta para conseguir un objetivo (Tai et. al. 2012). Además, se ha demostrado que la información sobre objetos o acciones específicas que no propician la obtención de la consecuencia esperada se codifica en las neuronas estriatopalidales. Es decir, las neuronas de la vía indirecta incrementan su tasa de disparo al reconocer esta clase de objetos, y transmiten esta información a lo largo de la vía. La consecuencia final sobre el movimiento es la supresión del programa motor que promueve conseguir el objetivo determinado, lo que demuestra la importante participación de la vía indirecta en los procesos selección de acciones (Kim et. al. 2017). Por otra parte, la modificación de los patrones de actividad de la vía indirecta por medio de optogenética en animales realizando secuencias de acciones genera el término anticipado de la conducta. Cuando esta alteración se realiza en el momento previo al inicio de la secuencia, el sujeto retrasa el inicio de la conducta (Tecuapetla, et.

al. 2016). Lo que muestra que este subcircuito es importante para el inicio y la ejecución de secuencias motoras.

Actualmente, no se tiene una clara interpretación de la contribución de este subcircuito al control y generación de secuencias de acciones, dado que si bien la activación de esta vía previo al inicio de una secuencia de acciones pudiera contribuir a la adecuada selección del programa motor deseado (Kim et al. 2017) , también existe la posibilidad de que permita el cambio/transición entre estados, es decir del momento previo al inicio a la ejecución propiamente dicha, ya que la alteración de la actividad de la vía justo antes de iniciar propicia el aborto inmediato de la acción (Tecuapectla et. al. 2016).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Derivado de lo anterior, podemos resumir que la corteza se activa muy probablemente guiando la actividad del estriado para la iniciación, cambio y realización de secuencias de acciones. La activación de la vía directa, durante el inicio y la realización de secuencias de acciones, facilita la salida de los programas motores deseados y permite la ejecución del movimiento, mientras que la activación de la vía indirecta, durante el inicio y la realización de secuencias de acciones, inhibe programas motores simultáneos que compiten con la realización del movimiento deseado. No obstante, queda latente la posibilidad de que la vía indirecta se active durante la iniciación de una secuencia de acciones para permitir el cambio entre estados motores. Por lo tanto, en el presente proyecto, a través de registros opto-electrofisiológicos e inhibición optogenética de la vía indirecta de los ganglios basales *in- vivo*, nos propusimos estudiar tal alternativa.

JUSTIFICACIÓN

Esclarecer la contribución de la vía indirecta de los ganglios basales a la selección de acciones y en particular a la realización de secuencias motoras consecutivas permitirá favorecer o refutar la generalización que se hace acerca de que la activación de esta vía inhibe los programas motores no deseados para permitir la selección de acciones.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las neuronas estriatales de la vía indirecta se activan para permitir la transición entre secuencias de acciones?

HIPÓTESIS

La vía indirecta de los ganglios basales contribuye a la correcta ejecución de cadenas de secuencias de acciones, específicamente mediando el cambio/transición entre ellas.

OBJETIVOS

General

Disecionar la contribución de la vía indirecta de los ganglios basales al cambio/transición entre secuencias de acciones

Específicos

- a) Implementar con animales en libre movimiento una estrategia para el estudio del cambio entre secuencias de acciones
- b) Registrar e identificar la actividad de las neuronas de la vía indirecta durante el cambio/transición entre dos secuencias de acciones
- c) Manipular la actividad de la vía indirecta durante el cambio/transición entre acciones por medio de optogenética.

METODOLOGÍA

Modelo de Estudio

Se utilizaron ratones machos A2a-Cre de entre 8 y 12 semanas de edad derivados de la línea KG 139 (Gong et al. 2003) (**Figura 4A**). Los animales A2A-Cre expresan la enzima cre-recombinasa en función del promotor del receptor para adenosina (A2a). Se ha reportado que este receptor se encuentra altamente expresado en el estriado formando heterómeros principalmente con el receptor D2 de dopamina, lo que ha permitido asociarlo como uno de los marcadores principales de la vía indirecta (**Figura 4B**, Qiaozhen et al., 2009; Yu, Gupta, Chen, & Yin, 2009). La utilización de la línea descrita anteriormente nos permitió identificar la actividad específica de esta vía en animales *in vivo* utilizando la técnica de identificación foto-asistida de poblaciones neuronales (PINP, Lima et al. 2009) y la manipulación específica del sub-circuito de interés mediante optogenética.

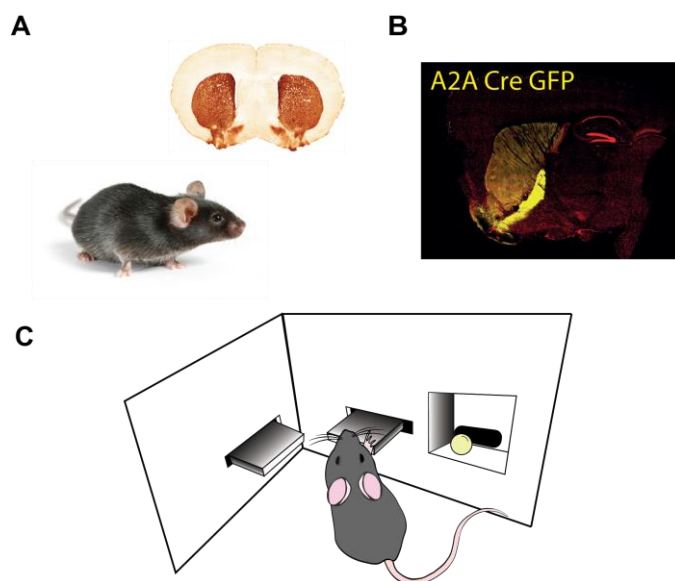


Figura 4. Modelo experimental para el estudio de la actividad de la vía indirecta.

A. Ratón A2A-Cre y representación de la expresión del receptor A2a en el cuerpo estriado (Adaptado de GENSAT). **B.** Corte sagital para representar el marcaje de las neuronas de la vía indirecta y de sus respectivas proyecciones en ratones A2a-Cre. **C.** Esquema de la caja de comportamiento operante utilizada para la implementación del paradigma conductual.

Implementación de una estrategia para el estudio del cambio entre secuencias de acciones

La implementación de una tarea de comportamiento operante se llevó a cabo en cajas de entrenamiento (Med-Associates, Inc; # MED-307A-CT-B1) equipadas con dos palancas, un receptáculo para recepción de comida y 2 sensores infrarrojos para la detección de diferentes eventos durante cada sesión (**Figura 4C**).

Se diseñó un plan de entrenamiento que consistió en 6 fases consecutivas siendo la última aquella donde es posible evaluar la transición entre dos secuencias de acciones (**Figura 5**). A continuación, se describe cada una de ellas:

- 1) **Pre-Entrenamiento**: Dirigido a que el animal explore la caja de entrenamiento y localice el sitio donde se entregarán las recompensas. Consiste en una sesión de 30 min donde cada 30 s, de manera aleatoria, se le administrará un comprimido de 14 mg de sacarosa (recompensa, **Figura 5A**).
- 2) **Reforzamiento Continuo**: En esta fase se presentará una palanca la cual debe ser presionada para obtener el reforzador. Consiste en 3 sesiones donde cada presión origina una recompensa, la sesión termina cuando el sujeto obtenga 15 recompensas o, en su caso, transcurran 30 min (**Figura 5B**). En una cuarta sesión se expone la segunda palanca.
- 3) **Secuencias de Razón Fija**: Para obtener recompensa el animal debe de presionar 8 veces consecutivas la palanca expuesta, esta se presenta de manera alternada. En esta fase debe realizar 15 secuencias en cada palanca para finalizar la sesión (**Figura 5C**).
- 4) **Secuencias de Razón Fija con Castigo**: Consiste en la tarea descrita anteriormente, pero con la restricción de que el animal no puede visitar el sitio de entrega de recompensas hasta haber terminado la secuencia de 8 presiones. En el caso contrario, la palanca será retraída y la luz se apagará por 10 s. Para finalizar la sesión debe completar 15 ensayos en cada palanca.
- 5) **Cadenas de Secuencias Estímulo-Respuesta**: En esta fase el animal debe de realizar 2 secuencias de 4 presiones en cada palanca para obtener el reforzador. Se presenta la primera palanca e inmediatamente cuando se completan las 4 presiones esta se retrae y se expone la segunda palanca para que el animal pueda terminar las 4 presiones restantes y así generar un reforzador (**Figura 5D**). No se permite que se generen visitas

al sitio de entrega de recompensas antes de terminar la cadena de secuencias. La sesión termina cuando se consiguen 30 recompensas o transcurren 30 min.

- 6) **Cadenas de Secuencias Estímulo-Respuesta y Autoiniciadas:** Es la última fase del entrenamiento, se compone de 3 repeticiones Cadenas Estímulo-Respuesta y, 3 repeticiones de cadenas de secuencias donde las palancas se exponen al mismo tiempo y se mantienen expuestas durante la realización de la tarea, igualmente se necesitan 4 presiones en cada palanca antes de recibir la recompensa, pero el sujeto es libre de decidir cuantas presiones realizar antes de transitar a la segunda secuencia (**Figura 5E**). Son acreedoras de castigo las secuencias interrumpidas por visitas al sitio de entrega de recompensa o por presionar la siguiente palanca antes de terminar la primera secuencia. La sesión termina cuando se consiguen 30 recompensas.

Para fomentar el rendimiento de los animales, estos fueron mantenidos al 80 % de su peso inicial durante las sesiones de entrenamiento, reentrenamiento y registro. Se hizo un monitoreo del peso corporal antes de cada sesión y, con base en este, se reguló el alimento suministrado diariamente.

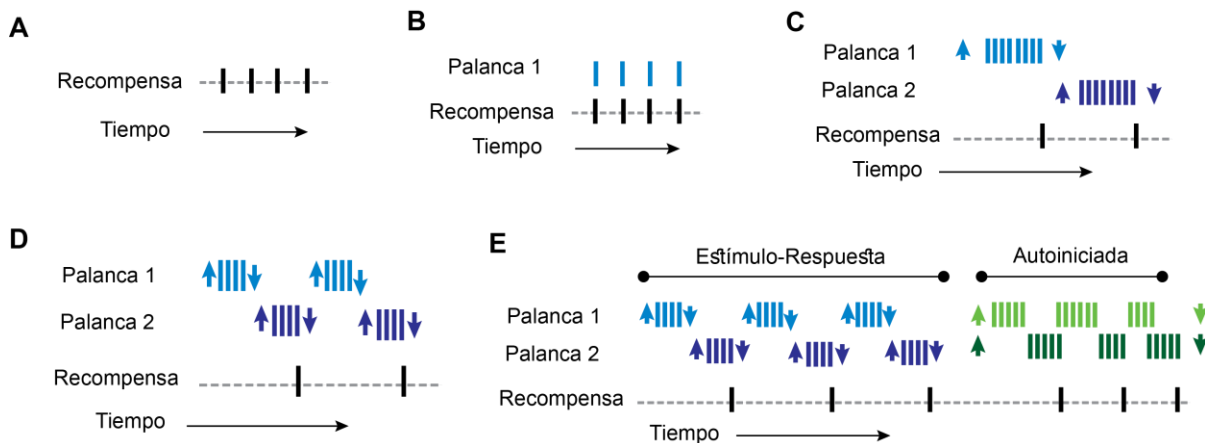


Figura 5. Programa de entrenamiento para la implementación de una estrategia que permita el estudio del cambio entre secuencias de acciones.

A. Pre-Entrenamiento. **B.** Reforzamiento continuo. **C.** Secuencias de Razón Fija. **D.** Cadenas Estímulo-Respuesta. **E.** Cadenas Estímulo-Respuesta y Autoiniciadas. (↑) Exposición de la palanca. (↓) Retracción de la palanca. Presiones en palanca uno y dos para secuencias estímulo respuesta respectivamente (| |). Presiones en palanca uno y dos para secuencias autoiniciadas (| |). Entrega del reforzador (|).

Registro e Identificación de Neuronas de la Vía Indirecta Durante el Cambio/Transición entre dos Secuencias de Acciones *in vivo*

Expresión de Opsinas e Implante de Electrodo/Fibra para Registro y Fotoidentificación.

Para determinar la actividad de la vía indirecta de los ganglios basales *in vivo* se realizaron registros electrofisiológicos extracelulares en animales transgénicos que, como se mencionó anteriormente, expresan la enzima cre-recombinasa en función del promotor del receptor para adenosina (A2a). La expresión cre-dependiente de la opsin en el estriado dorsal se indujo a través de la inyección del vector viral adenoasociado serotipo 1 para la expresión de *Channelrhodopsin* (**Figura 6A**; AAV.2.1-Ef1a-DIO-hChR2-(H134R)-eYFP, UNC Vector Core, #AV4378, 3.9×10^{12} vg/mL).

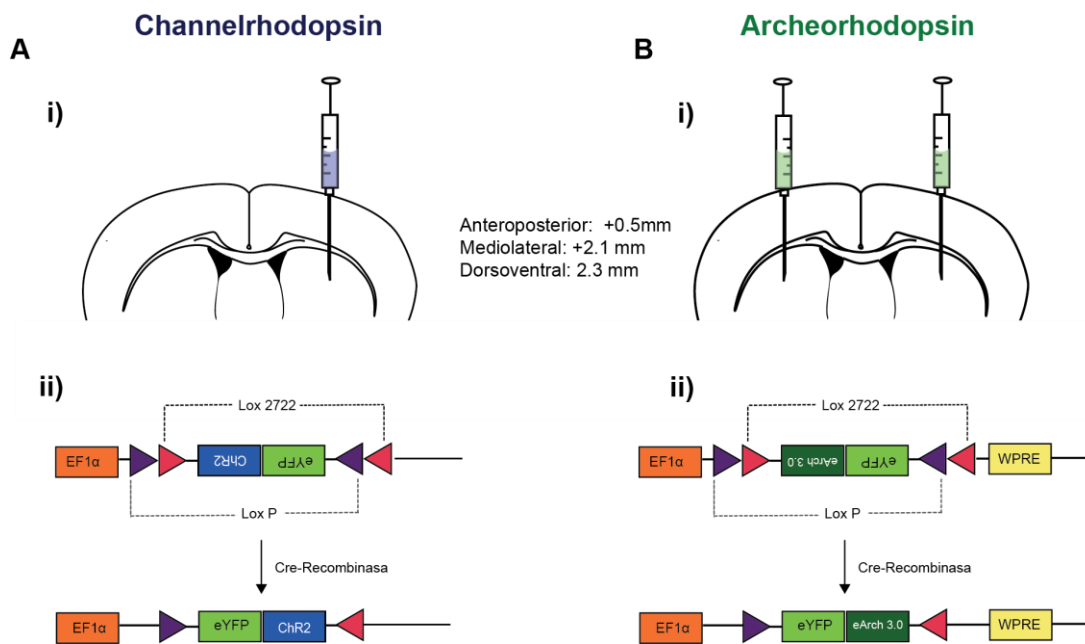


Figura 6. Expresión de opsinas en el estriado. Channelrodopsin y Archeorodopsin.

A. i) Diagrama representativo del sitio de inyección viral. **A ii)** Esquema del constructo viral para la expresión de channelrodopsin en el estriado. **B i)** Diagrama representativo de los sitios en inyección bilateral de Archeorodopsin. **B ii)** Esquema del constructo viral que permite la expresión de la opsin de forma específica.

Durante la cirugía, se removió una región del cráneo de aproximadamente 0.5 mm x 0.5 mm para permitir la inyección del virus. El volumen total de vector administrado fue de 500 nL a una velocidad de 55.3 nL/min en la región dorsoventral del estriado derecho, utilizando un micro-inyector (Nanoject II, Drummon Scientific) (Coordenadas en función de bregma: Anteroposterior: +0.5 mm, Mediolateral: +2.1 mm y Dorsoventral: 2.3 mm, **Figura 6A**). La pipeta fue retirada 10 a 12 minutos después de finalizar la inyección del virus para permitir la difusión de este. Posteriormente, para el registro de actividad neuronal en el estriado dorsal en animales en libre movimiento, fue necesaria la implantación de una matriz de 16 electrodos (Innovative Neurophysiology Inc.) a la cual se le acoplo una fibra óptica de 200 µm de diámetro para la estimulación y fotoidentificación de neuronas de la vía indirecta (**Figura 7A y B**).

Los animales se mantuvieron en recuperación por 5 días antes de iniciar una fase de reentrenamiento para, posteriormente, continuar con los registros electrofisiológicos durante la realización de la tarea (**Figura 7D**).

Registros electrofisiológicos *in-vivo*.

Antes de iniciar el registro, los animales fueron sedados en una cámara de anestesia para permitir la colocación de la fibra que conecta la fibra óptica con el láser de emisión de luz azul (475 nm) y, con la tarjeta que permite el paso de la señal captada por los electrodos hacia el sistema. Tras 10 minutos de recuperación, los animales fueron trasladados a la caja de entrenamiento para iniciar con la selección de unidades antes de exponerlos a la conducta operante.

Se realizó una clasificación inicial de señales a través de la interfaz *Cereplex Direct Software Suite* utilizando barras para delimitar las señales electrofisiológicas que son derivadas de la actividad neuronal y así diferenciarlas del ruido de fondo (denominamos ruido a las señales que no podemos clasificar como señales provenientes de la actividad neuronal; **Figura 7C**, panel izquierdo). Las señales fueron adquiridas utilizando un filtro de paso alto de 750 Hz y con una velocidad de muestreo de 30 000 puntos por segundo. Tras la selección de unidades, se inició el registro de la actividad neuronal durante la realización de la tarea (**Figura 7D**). Es importante mencionar que como parte de los análisis post-registro se realizó una segunda clasificación de unidades a través de un análisis de componentes principales por medio del software *Offline Sorter* (versión 2.8.8, Plexon, Inc; **Figura 7C**).

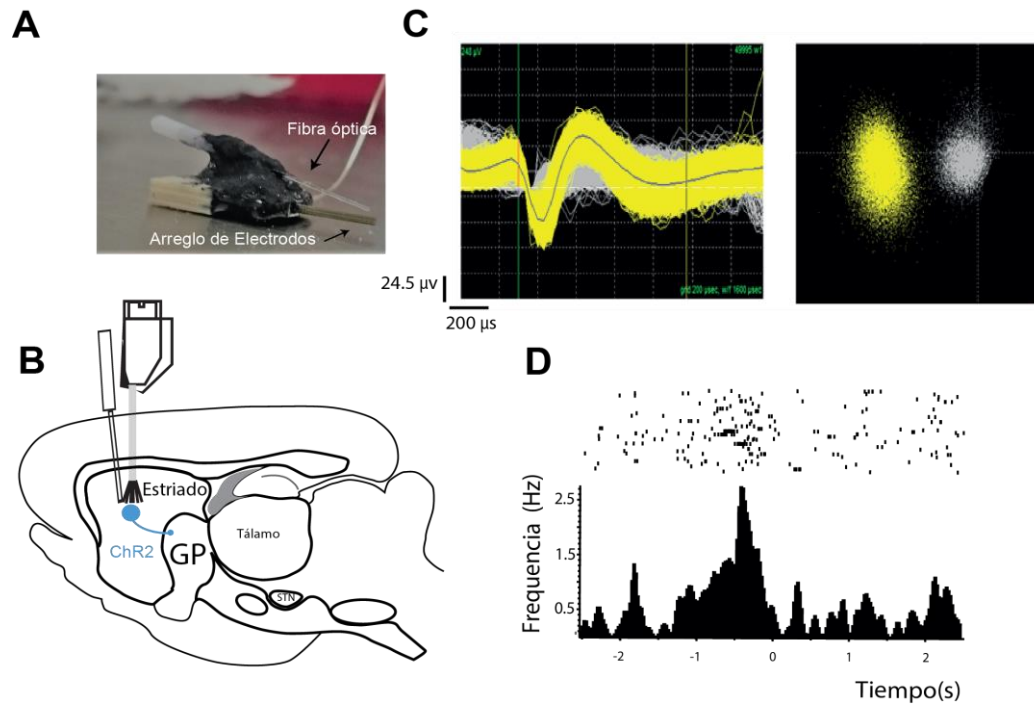


Figura 7. Registros electrofisiológicos in vivo.

A. Fibra óptica acoplada a un arreglo de 16 electrodos para el registro extracelular de la actividad neuronal y su posterior fotoidentificación. **B.** Diagrama representativo de la localización del arreglo en el estriado dorsal para el registro durante la realización de la tarea de comportamiento operante.

C. Ejemplo representativo de una unidad aislada durante la clasificación post-registro. **D.** Actividad registrada a lo largo de la sesión conductual para una unidad representativa.

Fotoidentificación

Al finalizar la sesión de registro, el estriado dorsolateral fue estimulado con luz azul de 475nm y, 1-5 mW, (longitud de onda necesaria para estimular a la opsina expresada tras la infección) utilizando dos protocolos distintos, estimulación continua por un segundo y estimulación con una frecuencia de 10 Hz (pulsos de 10 ms). Se determinó que la unidad registrada correspondía a una neurona de la vía indirecta, sólo si respondía positivamente a la activación con luz azul (incrementando su frecuencia de disparo en el momento de la estimulación con una latencia menor a 6 ms, esto debido a la activación directa de las neuronas por los estímulos lumínicos; para criterios adicionales ver análisis de la actividad de la vía indirecta más adelante). Lo anterior nos permitió identificar la actividad de las neuronas de la vía indirecta de las señales de la población general registrada in vivo

y así poder aislar la actividad de este sub-circuito durante el cambio/transición entre secuencias de acciones (Lima et al. 2009).

Análisis de la actividad de la vía indirecta

Los datos obtenidos a partir de los registros extracelulares in vivo se analizaron a través de un análisis de componentes principales utilizando el software Offline Sorter V2.8 (Plexon, Inc.) agrupando aquellas señales que estuvieran en el mismo componente y cuyo intervalo pico-pico fuera el mismo.

Se utilizó el software NeuroExplorer V3.2 para evaluar la respuesta a la estimulación con luz agrupando la actividad registrada de cada unidad en intervalos de 10 ms. Aquellas unidades que presentaron un incremento en la actividad cuando esta fue alineada a la estimulación se consideraron como posibles neuronas de la vía indirecta y sus respectivos datos fueron exportados a MATLAB para posteriores análisis. Una neurona fue considerada como positiva para la expresión de *channelrodhopsin* y, por lo tanto, como neurona de la vía indirecta si cumplía con los siguientes postulados (**Figura 12 A-E**):

- 1) La latencia en respuesta al estímulo lumínico es menor a 6 ms.
- 2) La respuesta evocada se mantiene durante todo el estímulo.
- 3) Las formas de onda evocadas por el estímulo son idénticas a la de la señal espontánea ($R > 0.9$ y $p < 0.05$).

Para determinar la dinámica poblacional de la vía indirecta a lo largo de la realización de una cadena de secuencias, la actividad de las unidades clasificadas pertenecientes a la vía indirecta fue graficada partiendo de los histogramas perievento (PHS) de cada unidad. Cada PHS fue generado a partir de la suma acumulada de potenciales de acción registrados en todos los ensayos en un intervalo de tiempo específico (10 ms) que se movió a lo largo de toda la sesión y que fue alineada a un evento específico. Los eventos de interés a los cuales se alineó la actividad de la vía indirecta durante el paradigma conductual fueron la primera y la última presión de cada una de las secuencias que conformaban la cadena (**Figura 13 B-E**).

La actividad de las unidades identificadas fue normalizada a una condición basal definida como el intervalo entre 3 a 2 segundos previos a la primera presión de la primera secuencia. Derivado de la necesidad de corroborar que los patrones de actividad, en términos de puntuación z, no fueran

influenciados por diferencias en la actividad basal de ambas condiciones, se calculó el promedio de la actividad basal por condición para cada neurona y se comparó a través de una prueba Wilcoxon (**Figura 18D**).

También para determinar la modulación de la actividad de una neurona con respecto a un evento específico, se utilizaron curvas ROC donde se comparó la actividad alrededor de este con respecto a la distribución de la actividad basal de todos los ensayos en ventanas de tiempo de 100 ms que se movían en pasos de 10 ms. A partir del análisis anterior se definieron dos criterios para clasificar una neurona como modulada: 1) Al menos el 40% de las ventanas debería ser significativamente diferente de la basal en los 2 cuadrantes previos o posteriores al evento (un cuadrante se definía como una ventana de 250 ms) y, 2) Al normalizarla con respecto a la basal, la unidad presentaba una activación de al menos 2 valores de puntuación z en 500 ms alrededor del evento. Como resultado, se establecieron tres categorías de modulación: a) Pre/Post: donde la neurona presenta actividad significativa antes del inicio o posterior al término de la secuencia, b) Presiones: la neurona presenta actividad significativa durante la ejecución de la secuencia y c) Ambas: la neurona presenta actividad significativa antes del inicio y durante la ejecución de las presiones (**Figuras 14 y 16**). El número de neuronas reclutadas a lo largo de la cadena de eventos se determinó a partir de la suma del número total de neuronas que fueron moduladas en una ventana de tiempo específica sin importar la categoría a la que pertenecieran.

Para determinar si la actividad promedio de las neuronas moduladas en cada una de las épocas mencionadas anteriormente en cadenas estímulo-respuesta difería de su contraparte en cadenas autoiniciadas se utilizó un análisis de ventanas móviles en el tiempo (intervalos de 100 ms que se mueven en pasos de 10 ms) desde un segundo antes hasta un segundo después del evento de interés, partiendo de los PHS en puntuación z (**Figura 18A-B**). El mismo tipo de análisis fue utilizado para comparar la actividad alineada a cada presión de la misma secuencia e intersecuencia (**Anexo 1**; Kruskal Wallis $p < 0.05$).

Por medio de análisis de regresión lineal, se determinó la correlación existente entre la actividad de la vía indirecta y los diferentes parámetros que componen la cadena de secuencias (número de presiones, duración, latencia de transición). Se utilizaron ventanas de 100 ms que se movían en pasos de 20 ms para determinar la tasa de disparo por unidad y, esta se contrastó contra el parámetro de interés medido en ese ensayo. Los criterios para incluir a una unidad como codificante para un parámetro específico fueron: un valor de $Q > 0.05$ (bondad del ajuste) y los intervalos de

confianza máximos y mínimos, que multiplicados entre si fueran mayores a cero (como referencia del valor de la pendiente). (**Figuras 15 y 17**).

Además, a través de análisis de curvas ROC evaluamos si la actividad de las neuronas podría diferenciar entre cadenas estímulo-respuesta y autoiniciadas. Para determinar lo anterior se normalizaron todos los ensayos (E-R y A) de cada unidad por intervalos de tiempo móviles (intervalos de 100 ms, pasos de 10 ms; **Figura 19**).

Manipulación de la Actividad de la Vía Indirecta por Medio de Optogenética

Expresión de opsinas e implante de fibras ópticas

Para probar que la actividad neuronal de la vía indirecta se relaciona con el cambio/transición entre secuencias de acciones se utilizaron animales de la línea A2a-Cre, los cuales expresaban bilateralmente, por medio de inducción viral la opsina archeorhodopsin (**Figura 8A**). La cual es una bomba de protones transmembranal que, al ser activada por luz verde (550 nm), tiene la capacidad de inhibir el disparo neuronal o la liberación de neurotransmisor, con resolución de milisegundos (Chow et al. 2010).

La expresión cre-dependiente de la opsina en el estriado dorsal se indujo a través de la inyección del vector para *Archeorodopsin* (rAAV5/Ef1 α -DIO-eARCH3.0-EYFP, UNC GTC Vector Core, #AV4841D, 4.4×10^{12} virus molecules/mL). Durante la cirugía, se removió una región del cráneo de aproximadamente 0.5 mm x 0.5 mm para permitir la inyección del virus. El volumen total de vector administrado fue de 500 nL a una velocidad de 55.3 nL/min en la región dorsoventral del estriado de ambos hemisferios (**Figura 8B**), utilizando un microinyector (Nanoject II, Drummon Scientific) (Coordenadas en función de Bregma: Anteroposterior: +0.5 mm, Mediolateral: 1.8 - 2.1 mm y Dorsoventral: 2.3 mm). La pipeta fue retirada 10 a 12 minutos después de finalizar la inyección del virus para permitir la difusión de este. Posteriormente se colocó una fibra óptica de 300 μ m de diámetro en cada punto de inyección para la manipulación de neuronas de la vía indirecta expresando la opsina (**Figura 8C**). De la misma manera, en un grupo paralelo de animales A2a-Cre se indujo la expresión del marcador eYFP como control experimental.

Los animales se mantuvieron en recuperación por 4 días antes de iniciar una fase de reentrenamiento para, posteriormente, continuar con las sesiones de manipulación durante la realización de la tarea.

Manipulación de la Actividad de la Vía Indirecta Durante la Transición

La manipulación de la actividad de la vía indirecta se realizó en las sesiones de la última fase del entrenamiento, donde los sujetos son capaces de realizar de manera estereotipada cadenas estímulo respuesta y autoiniciadas (**Figura 10I**). Las sesiones tuvieron una duración de 60 min sin límite de reforzadores. Para la activación de las opsinas se conectaron las fibras ópticas implantadas a un par de fibras que recibían el haz de un láser de 556 nm (Single Longitudinal Mode Laser, #MSL-FN-556, CNI) y cuyo paso era limitado por un obturador controlado automáticamente desde el equipo. Los animales fueron sedados para la implantación de las fibras conectadas al laser. Posteriormente, los individuos fueron trasladados a la caja de comportamiento para iniciar la sesión. Es importante mencionar que los sujetos tuvieron 2 sesiones previas de habituación a las fibras para evitar variaciones en el comportamiento derivada de la conexión.

Se establecieron 3 protocolos de manipulación que permitieron inhibir la actividad de la vía indirecta en tres diferentes momentos de la cadena de secuencias de acciones: 1) antes de iniciar, 2) en la primera presión y, 3) antes de transitar a la segunda secuencia (**Figura 8C**). Es importante mencionar que los protocolos se realizaron en sesiones independientes. La inhibición de la actividad neuronal se presentó de manera aleatoria con una probabilidad del 50% por ensayo en pulsos de luz continua por 2 segundos (25-30 mW).

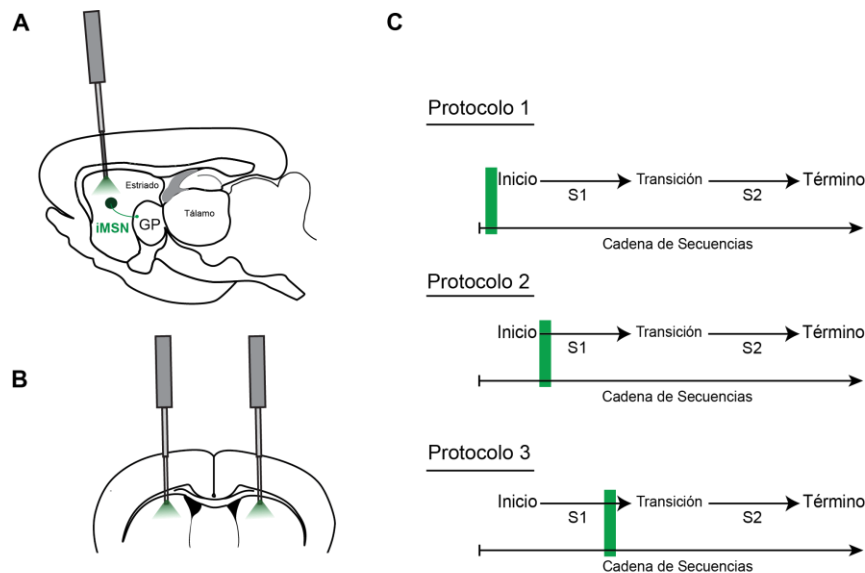


Figura 8. Manipulación optogenética durante la realización de cadenas de secuencias de acciones.

A. Diagrama representativo de la localización de la fibra y sitio de inhibición (recuadro verde), y de las proyecciones que son inhibidas durante la manipulación (vista sagital). **B.** Esquema del sitio de inyección e

implantación de fibras (superior) y corte coronal obtenido de un sujeto experimental. **C.** Representación de los diferentes protocolos de manipulación optogenética, el recuadro verde indica el inicio de la inhibición.

A partir de los datos obtenidos se analizaron los efectos de la manipulación sobre los distintos parámetros que conforman la cadena de secuencias de acciones: número de presiones y duración de ambas secuencias, así como la latencia para transitar referida como el tiempo que transcurre entre el término de la primera secuencia y el inicio de la segunda. Los datos por ensayo y por condición de cada uno de los sujetos fueron normalizados a la condición control (ensayos sin inhibición, 50% del total de ensayos por condición). Posteriormente, por grupo (experimentales (Arch 3.0) y controles (eYFP)) los datos de todos los sujetos fueron agrupados para, a través de una prueba de U de Mann Wilthney, evaluar los posibles efectos sobre la realización de cadenas de secuencias (**Figuras 21 y 22**). Es importante mencionar que este análisis se realizó por separado para cada una de las modalidades de transición.

Histología

Para verificar la expresión de ChR2 o Arch 3.0 y el sitio de implante del optrodo de registro o fibra óptica de la manipulación optogenética, el cerebro de los animales fue extraído. Primeramente, los sujetos fueron anestesiados con una dosis de ketamina/xilacina (95 mg/ 1mg, i.p.) para posteriormente ser perfundidos con amortiguador de fosfatos (PBS 0.1M) seguido de paraformaldehído al 4% (PFA). Los cerebros se mantuvieron en PFA al menos 12 horas antes de ser seccionados en un micrótopo (Lancer Microtome Series 1000 Sectioning System) para obtener cortes coronales de 100 μ m. Para el montaje de las muestras se utilizó el medio VECTASHIELD con DAPI (VectorLabs, #H-1200). Los cortes fueron visualizados a través de un microscopio de epifluorescencia para determinar el área de infección y, la localización del electrodo y fibras ópticas.

Para corroborar la especificidad de la línea A2a-Cre para marcar la vía indirecta de los ganglios basales se indujo la expresión de ChR2 en el estriado dorsal de una hembra transgénica de 2 meses de edad. 15 días post-quirúrgicos, se obtuvo el cerebro de acuerdo al protocolo descrito anteriormente y se obtuvieron cortes sagitales de 100 μ m. Las muestras se incubaron 20 min en una solución que contenía tritón x-100 al 0.1% y suero de cabra al 0.4% en PBS 0.1M. Durante toda la noche a temperatura ambiente se mantuvo en agitación los cortes con el anticuerpo primario (Anti-encefalina, NOC1, MAB350) 1:200 en PBS -Triton 0.4%. A la mañana siguiente, se realizaron 5 lavados de 5 min con PBS 0.1M. Posteriormente se agregó un anticuerpo secundario (1:1000) y se

incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS 0.1M por 5 min. Para el montaje de las muestras se utilizó el método descrito con anterioridad.

En el caso de las manipulaciones optogenéticas, para determinar si el sujeto experimental era incluido en el análisis final de datos, cada cerebro fue sometido a la asignación de una escala arbitraria en función de los siguientes criterios: segmento terminal de la fibra óptica en la región dorsomedial del estriado (DMS), expresión de la proteína reportera con intensidad máxima en el DMS y co-localización del segmento terminal y la expresión de la proteína reportera; cada criterio equivalía a un punto en escala arbitraria, lo que originaba un total máximo de 6 puntos teniendo en cuenta ambos hemisferios. Los sujetos eran incluidos si obtenían un puntaje igual o mayor a 5 en escala arbitraria.

RESULTADOS

Implementación de una tarea para el estudio del cambio/transición entre secuencias de acciones.

Para poder estudiar la actividad de la vía indirecta de los ganglios basales a través de registros electrofisiológicos durante la realización de transiciones entre secuencias de acciones, se entrenó a los animales a desarrollar cadenas de secuencias de acciones. El programa de entrenamiento consistió en seis fases consecutivas: 1) Pre-entrenamiento, 2) Reforzamiento Continuo, 3) Secuencias de Razón Fija, 4) Secuencias de Razón Fija con Castigo, 5) Transiciones Estímulo-Respuesta y 6) Transiciones Estímulo-Respuesta y Autoiniciadas.

La finalidad de la fase de reforzamiento continuo fue establecer en el animal la asociación entre presionar la palanca y obtener una recompensa. Observando que durante las 3 sesiones de esta fase existió un incremento en la frecuencia de presiones tanto en animales experimentales (Frecuencia Sesión (FS) 1 = 0.40 presiones/min \pm 0.08; FS2= 0.93 presiones/min \pm 0.21; FS3= 1.5 presiones/min \pm 0.22; ANOVA $p < 0.005$; **Figura 10A**) como en animales silvestres (**Figura 9A**). En una cuarta sesión se expuso la palanca número 2 evaluando que los animales fueron capaces de generalizar el hecho de presionar la palanca para obtener recompensa [Palanca1 = 1.5 \pm 0.22, Palanca2 = 1.71 \pm 0.30 presiones/min; T-test $p > 0.05$ para sujetos experimentales (**Figura 7A-B**) y Palanca1 = 1.85 \pm 0.36, Palanca2= 3.27 \pm 0.47 presiones/min; T-test $p > 0.05$ para el grupo control (**Figura 9A-B**)].

Las dos fases siguientes estuvieron encaminadas a lograr que el animal sea capaz de realizar secuencias de presiones consecutivas (**Figura 9C**). Las gráficas presentadas en la figura 9D y 10D muestran un aumento en el número de presiones por secuencia para ambas palancas conforme avanzó el número de sesiones sin diferencia evidente entre grupos (silvestres versus experimentales: Sesión1 $p = 0.638$, Sesión2 $p = 0.364$, Sesión3 $p = 0.362$, T-test).

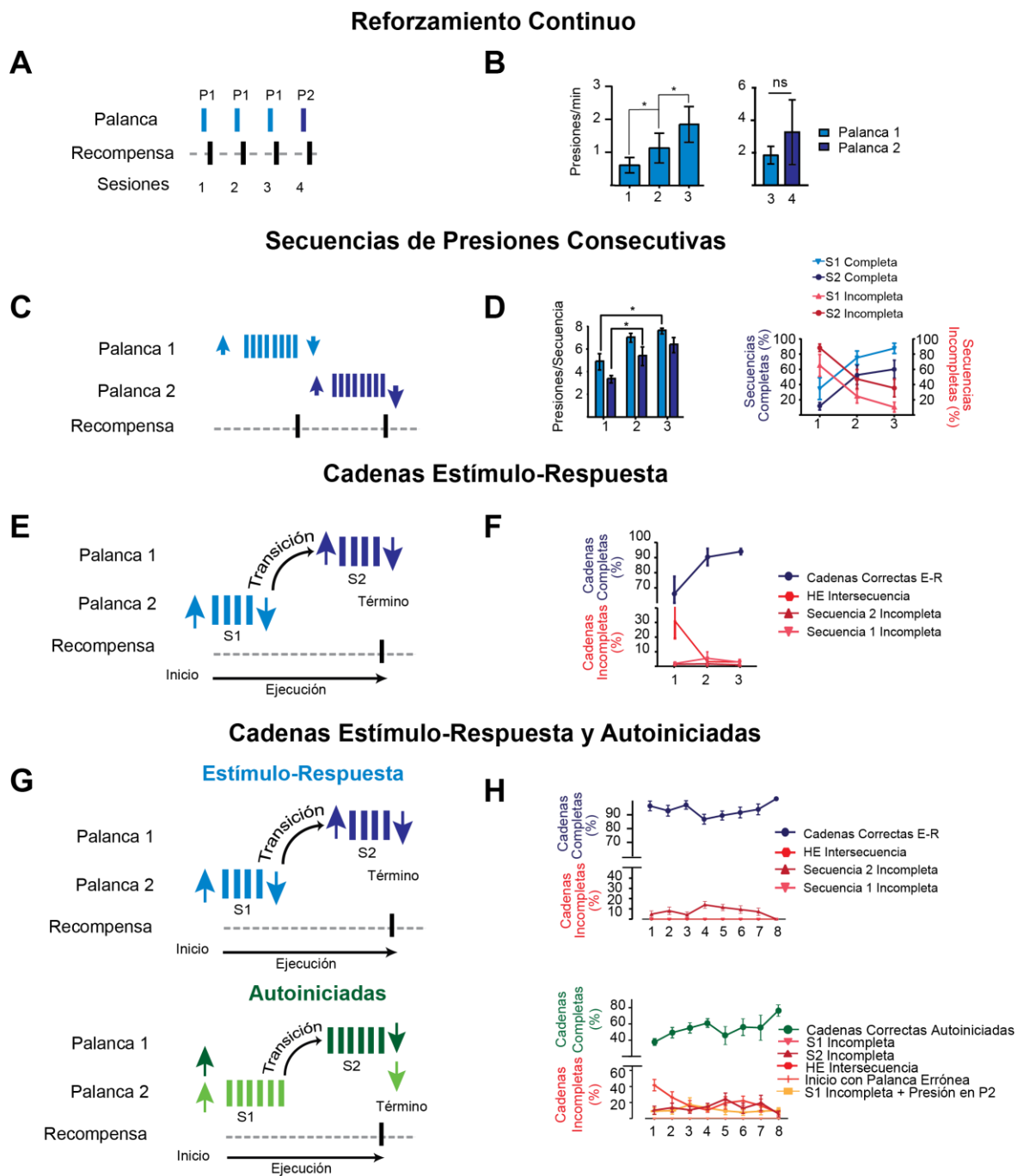


Figura 9. Establecimiento de una estrategia para el estudio del cambio/transición entre secuencias de acciones en animales silvestres.

A. Reforzamiento continuo. **B.** Incremento en la frecuencia de presiones por minuto durante la fase de reforzamiento continuo (n=6). **C.** Secuencias de razón fija. **D.** Tras tres sesiones de entrenamiento, los sujetos son capaces de generar presiones consecutivas en ambas palancas antes de adquirir la recompensa. **E.** Cadenas de secuencias E-R. **F.** Aumento en el porcentaje de cadenas correctas que involucran secuencias E-R. **G.** Cadenas E-R y A. **H.** Desempeño de los sujetos a lo largo de las sesiones que involucran cadenas E-R y A de manera intercalada.

La utilización de sanciones para moldear la conducta del animal favoreció la asociación de la tarea solicitada (Sesión1 (sin castigo): Palanca1= 3.4 ± 0.66 , Palanca2: 2.74 ± 0.26 presiones/secuencia;

Sesión3 (con castigo): Palanca1= 7.73 ± 0.26 , Palanca2: 6.18 ± 0.83 presiones/secuencia; U de Mann-Whitney; $p < 0.02$ para el grupo control; Sesión1 (sin castigo): Palanca1= 3.18 ± 0.21 , Palanca2: 3.22 ± 0.24 presiones/secuencia; Sesión3 (con castigo): Palanca1= 6.39 ± 0.22 , Palanca2: 6.42 ± 0.20 presiones/secuencia, U de Mann-Whitney; $p < 0.01$ para el grupo experimental), lo que pudo reflejarse además, en una disminución en el número de ocasiones en las que los sujetos abortaron la secuencia que estaban ejecutando (**Figuras 9D y 10D**, panel derecho).

Las figuras 9F y 10F muestran que desde la primera sesión se alcanzó un alto porcentaje de cadenas correctas durante la condición estímulo-respuesta sin diferencias significativas entre grupos (media-sesión1(Control)= $95.5 \% \pm 2.6$; media-sesión1(A2a) = 73.6 ± 2.94 ; $p = 0.79$; U de Mann-Whitney). Por tanto, tras las primeras 4 etapas del entrenamiento, los sujetos ya eran capaces de realizar secuencias consecutivas al responder a condiciones estímulo-respuesta, lo que nos permitió mover a los animales a la última fase del entrenamiento. En esta fase última fue posible estudiar el cambio/transición entre dos tipos de cadenas de secuencias de acuerdo con dos modalidades distintas: cadenas estímulo-respuesta (E-R) y aquella donde el animal es libre para decidir el momento de transitar hacia la segunda palanca [cadenas autoiniciadas (A)]. En la gráfica de la figura 10I puede apreciarse como los animales fueron capaces de realizar ambos tipos de cadenas y como su rendimiento mejoró a lo largo de las sesiones de cadenas autoiniciadas, [porcentaje de cadenas correctas Sesión1= $22.5 \% \pm 2.46$ contra sesión previa al implante = $76\% \pm 5.0$ (Mann-Whitney, $p < 0.05$)]. Para las cadenas estímulo-respuesta el cambio a lo largo de las sesiones no tuvo significancia estadística, sin embargo la tasa de secuencias correctas se mantuvo alrededor del 70%; incluso tras el procedimiento de implante de electrodos del que además es posible recuperar el porcentaje de secuencias correctas en las siguientes cuatro sesiones posteriores a la intervención [cadenas estímulo-respuesta: sesión previa= $96.5 \pm 3.5\%$ contra sesión 4 posterior a la intervención= $96.5 \pm 2.02\%$ (U de Mann-Whitney, $p > 0.05$); Cadenas autoiniciadas: sesión previa= $76.0 \pm 5.0\%$ contra sesión 4 posterior a la intervención= $53.0 \pm 8.1\%$ (U de Mann-Whitney, $p > 0.05$).

Por último, del análisis de la realización de cadenas de acciones (**Figura 10H**), se encontraron diferencias significativas en la duración de la segunda secuencia entre condiciones (cadenas-E-R- Secuencia2= 1.55 ± 0.12 vs cadena-A-Secuencia2= 2.16 ± 0.20 segundos Wilcoxon $p < 0.05$; **Figura 10H** panel central), esto debido a un mayor número de presiones en las cadenas autoiniciadas ya que cuando se cuantifica la duración de las primeras cuatro presiones para cada tipo de cadena no se observan diferencias (Wilcoxon $p > 0.05$, Figura 10H inserto). Otro parámetro que difirió entre tipos de cadena fue la duración de la transición entre secuencias (Transición-E-R= 1.30 ± 0.2 vs Transición-A= 0.9 ± 0.07 segundos, Wilcoxon $p < 0.05$).

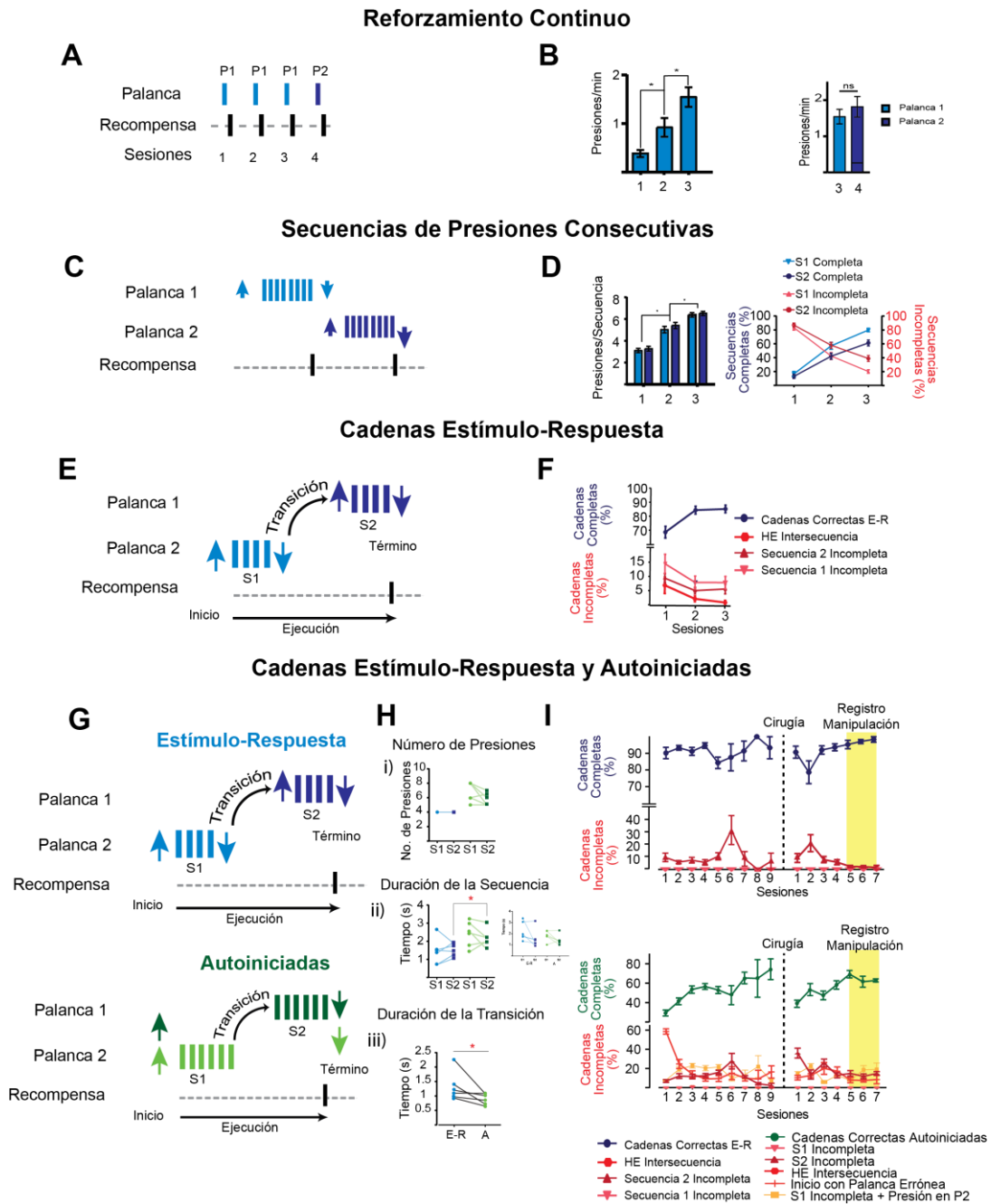


Figura 10. Establecimiento de una estrategia para el estudio del cambio/transición entre secuencias de acciones en animales A2a_Cre.

A. Reforzamiento continuo. **B.** Incremento en la frecuencia de presiones por minuto. **C.** Secuencias de razón fija. **D.** Tras tres sesiones de entrenamiento, los sujetos son capaces de generar presiones consecutivas. **E.** Cadenas de secuencias E-R. **F.** Aumento en el porcentaje de cadenas correctas que involucran secuencias E-R y A. **G.** Cadenas E-R y A. **H.** Parámetros evaluados durante la sesión de registro. **I.** Desempeño de los sujetos a lo largo de las sesiones que involucran cadenas estímulo-respuesta y autoiniciadas de manera intercalada. La línea punteada indica el día de implante de fibras y electrodos, la región amarilla indica las sesiones de registro y manipulación.

Expresión de Opsinas por medio de Inducción Viral

La fotoidentificación y manipulación durante los registros extracelulares de las neuronas de la vía indirecta requiere, primeramente, la expresión de opsinas en la población de interés. Lo anterior, se realizó mediante la inyección de partículas virales que contenían la secuencia codificante para la expresión de *channelrhodopsin* y *eYFP*, flanqueadas por sitios de reconocimiento específico para la enzima cre-recombinasa (Cardin et al., 2010; Hamilton & Abremski, 1984, **Figura 2**).

La figura 11A muestra una fotomicrografía de un animal A2a Cre cruzado con una línea de ratón (Ai35) reportera para expresar la proteína GFP en todas las neuronas que contengan Cre. Se observa la distribución de la GFP a lo largo del estriado y el globo pálido. Como puede observarse no existen proyecciones con marca fluorescente hacia SNr, lo que muestra la especificidad de la línea A2a-Cre para marcar exclusivamente a la vía indirecta de los ganglios basales (Qiaozhen et al. 2009; Yu et al. 2009). La utilización de técnicas de marcaje mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra encefalina no correlacionó de la forma que podía esperarse, pero aun en este caso es posible observar en algunas células la superposición de las señales para eYFP y encefalina (**Figura 11B-C**).

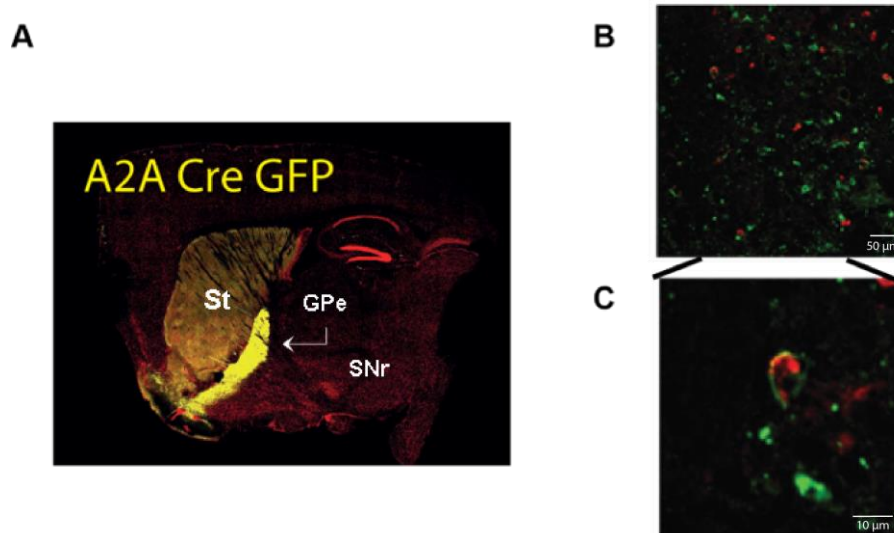


Figura 11. Expresión de Proteínas Exógenas.

- A. Distribución de la infección viral en la región dorsal del estriado (St) y en el globo pálido (GPe) (Corte sagital).
- B. Marcaje inmunofluorescente contra neuronas de la vía indirecta (Rojo: Marcaje contra encefalina, Verde: eYFP).
- C. Ejemplo de una célula donde ambas marcas co-localizan.

Registros Extracelulares de la Actividad Unitaria de Neuronas de la Vía Indirecta

Una vez recopilada la actividad eléctrica durante la ejecución de la tarea se realizó un análisis de las señales obtenidas para efectuar una segunda clasificación de unidades a través de *off line sorting* y análisis de componentes principales (**Figura 7**). Siguiendo el análisis mencionado se lograron identificar un total de 242 unidades en la región dorsomedial del estriado de un total de 6 sujetos experimentales (**Figura 12F**). Para evaluar la participación de la vía indirecta durante el cambio/transición entre secuencias de acciones se utilizaron ratones A2a-Cre que expresaban channelrhodopsin (**Figura 12G**) en la región dorsomedial del estriado. Se identificaron 34 neuronas que reunieron los criterios para ser consideradas de la vía indirecta (12% del total de unidades registradas, **Figura 12F**). La clasificación de neuronas positivas a estimulación se realizó mediante el uso de los siguientes criterios: 1) La respuesta evocada ante un pulso de luz se mantuvo durante todo el estímulo (**Figura 12A**), 2) La latencia de respuesta al estímulo luminoso es menor o igual a 6 ms (**Figura 12E**) y 3) La forma de la espiga extracelular evocada por el estímulo es similar a la de la señal registrada durante la conducta (evaluado por $R > 0.9$ y $p < 0.05$; **Figura 12 B-D**).

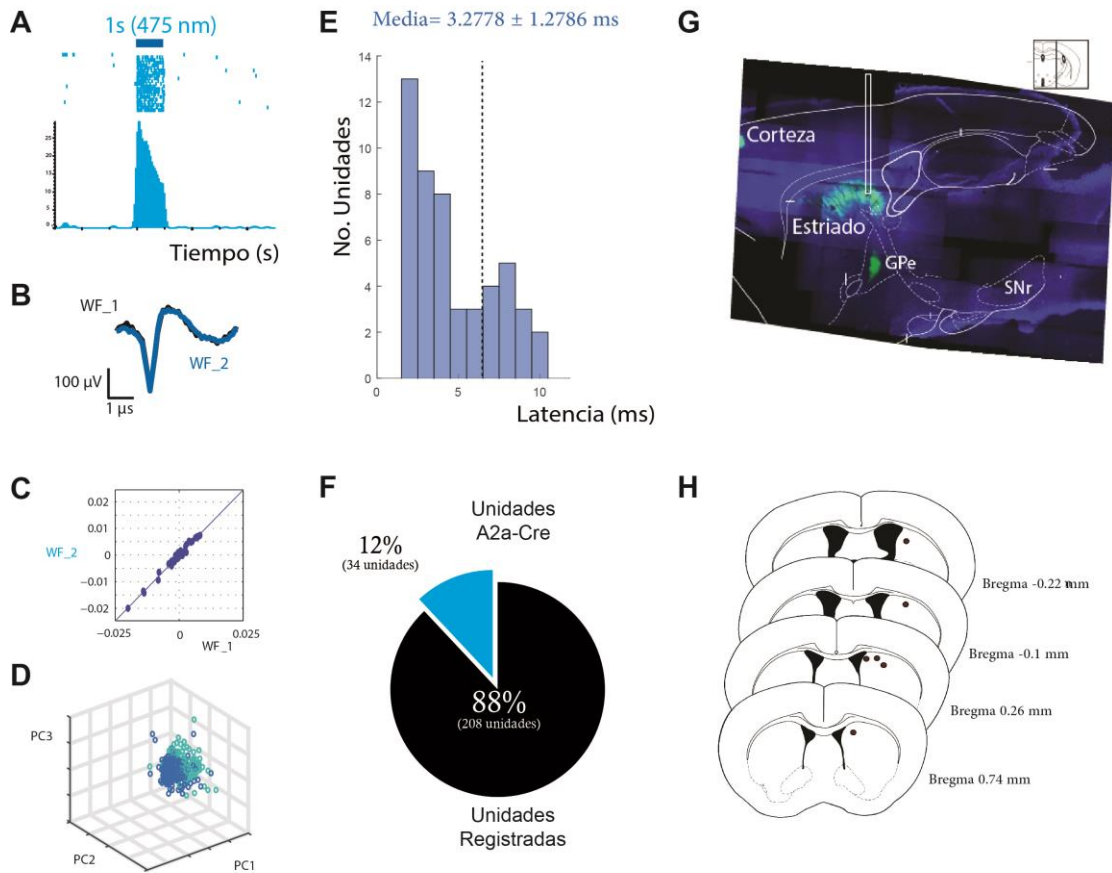


Figura 12. Identificación de neuronas de la vía indirecta por medio de optogenética.

A. Histograma perievento de una unidad representativa durante la estimulación continua por un segundo con luz azul. **B y C.** Comparación y correlación entre una espiga generada durante la tarea de comportamiento operante y una inducida por la estimulación luminosa para la misma unidad representativa. **D.** Análisis de componentes principales utilizado para corroborar la identidad de las unidades fotoidentificadas. **E.** Histograma de latencias de respuesta para todas las neuronas fotoidentificadas, se utilizó como punto de corte 6 ms. **F.** Proporción de unidades fotoidentificadas como neuronas de la vía indirecta. **G.** Corte coronal que muestra la localización del arreglo de electrodos y fibra óptica sobre el sitio de expresión de la opsina (región verde) en el estriado dorsal y el globo pálido externo. **H.** Diagrama para representar la localización de los electrodos en el estriado dorsomedial de diferentes animales registrados.

Análisis de la actividad de la vía indirecta durante la realización de cadenas de secuencias de acciones consecutivas

Un estudio previo ha demostrado que las neuronas de la vía indirecta muestran actividad diferencial (activación/inhibición) durante el inicio y la realización de secuencias de movimientos (Jin et al., 2014). En este trabajo de tesis proponemos que la activación de la vía indirecta de los ganglios basales observada previo al inicio de una secuencia de acciones permite la adecuada transición a la acción consecutiva. Derivado de lo anterior, los registros de la actividad neuronal *in vivo* que se presentan a continuación se llevaron a cabo en sujetos experimentales entrenados a realizar cadenas de secuencias consecutivas (**Figura 10**), lo que nos dio un espacio temporal adecuado para el estudio de la actividad neuronal durante la transición entre dos secuencias de acciones. La figura 13 ejemplifica los principales eventos de interés en los cuales se centrará el análisis de la actividad de la vía indirecta en este trabajo: el inicio y el término de cada una de las secuencias que forman la cadena. Como puede observarse en esta figura, existe una modulación temporal de las neuronas de la vía indirecta en cada uno de los eventos de interés, resalta de manera importante el incremento de actividad previo a la presión de la palanca activa y la posterior inhibición justo en el momento de la presión seguida de una activación generando un patrón en forma de “M” (**Figura 13B**).

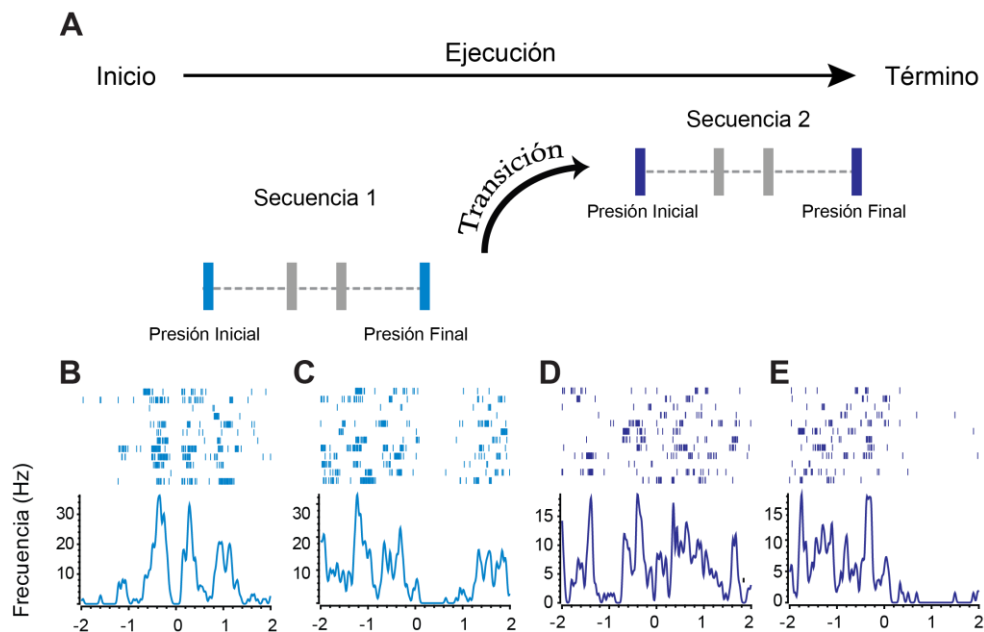


Figura 13. Actividad de una unidad de la vía indirecta durante la realización de secuencias consecutivas: Unidad representativa.

A. Diagrama de los principales componentes que conforman al paradigma conductual. **B-E.** Histograma perievento de una neurona fotoidentificada como parte de la vía indirecta alineada a los principales eventos de interés: **B.** Presión inicial S1, **C.** Última presión S1, **D.** Presión inicial S2 y **E.** Última presión S2.

Análisis del patrón de actividad de la vía indirecta durante cadenas de secuencias estímulo-respuesta

La figura 14A muestra la dinámica poblacional de la actividad de la fracción modulada de las 34 neuronas A2a-Cre en cada una de las cuatro épocas de interés durante la ejecución de cadenas de secuencias estímulo-respuesta (E-R). Al hacer un análisis de reclutamiento de neuronas en el tiempo (ver metodología), observamos que existe un incremento en el número de neuronas reclutadas alrededor de los eventos de interés (**Figura 14B**), reflejándose en la actividad promedio (en puntuación z) de las neuronas moduladas para cada época (**Figura 14C**, panel superior en color negro).

Al desglosar el patrón global de actividad, de las unidades que se modularon durante el inicio de la cadena (63%), se desprenden tres categorías notorias (**Figura 14C**, paneles inferiores de color):

1) Neuronas Preparatorias (Pre): El 24% de las neuronas registradas se modulan con una activación previa al inicio de la cadena de secuencias E-R, similar a lo reportado anteriormente cuando se trató de una secuencia de presiones (Jin et al. 2014).

2) Neuronas de Ejecución (Ejecución): El 18% de las unidades se activan y se mantienen sostenidas tras el inicio de la primera secuencia de presiones.

3) Neuronas Preparatorias y de Ejecución (Ambas): El 21% de las neuronas de la vía indirecta se activa previo al inicio de la cadena de secuencias, se encuentra inhibida durante la realización de la presión y, dicha inhibición va seguida de una activación durante la ejecución. Lo anterior propicia un patrón en forma de “M” que puede observarse en las tres primeras presiones consecutivas de la primer secuencia (**Anexo 1**, Panel A).

Tanto las unidades de la categoría 2 y 3 mostraron una activación sostenida previa al término de la primera secuencia que fue seguida de una pendiente abrupta tras concluir la última presión de la secuencia¹, manteniéndose inhibida al inicio de la transición entre secuencias (**Figura 14C**, Segundo Panel Izq.-Der).

Derivado de la estructura de la tarea conductual, compuesta por dos secuencias de acciones consecutivas, al evaluar la actividad de las neuronas de la vía indirecta durante el inicio de la segunda secuencia encontramos un decremento en el número de neuronas preparatorias con respecto a la secuencia 1 (de solo el 6%), mientras que la proporción de las categorías de ejecución (21%) y de activación/ejecución (26%) prevalecieron. Es importante mencionar que las unidades que se modulan en cada época no son siempre las mismas, si no que varían dependiendo el evento a analizar (**Anexo1**, Panel A: Inserto).

Cadenas Estímulo-Respuesta

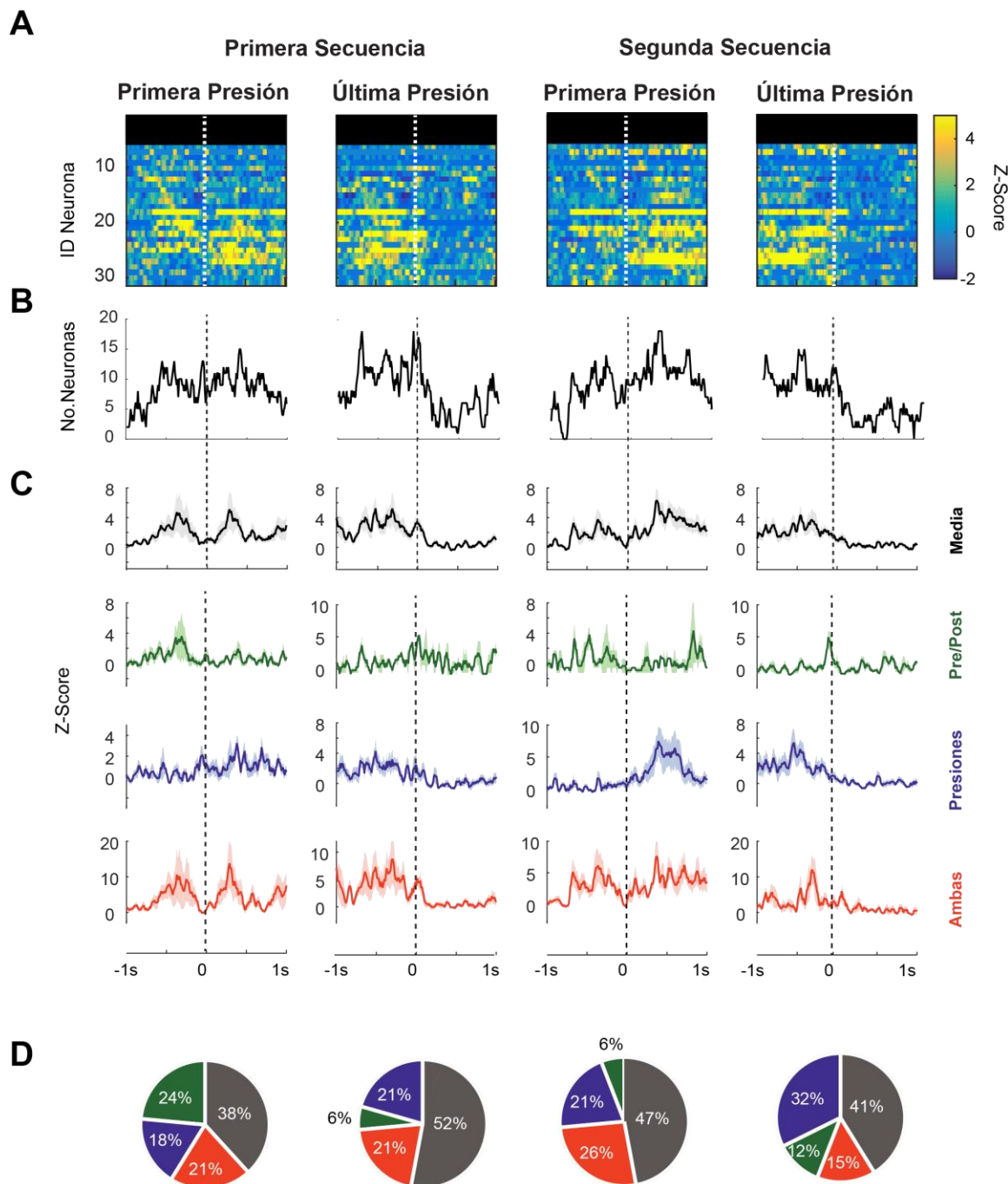


Figura 14. Patrón de actividad de las neuronas de la vía indirecta durante la realización de cadenas estímulo-respuesta. **A.** Mapa de color de las neuronas que se modulan a lo largo de los cuatro eventos de interés, las regiones en color negro indican unidades que solo se encuentran moduladas en las cadenas autoiniciadas. **B.** Número de neuronas con actividad significativas a lo largo de la cadena de secuencias. **C.** Promedio de la actividad de las neuronas que se modulan en cada época por categoría (Negro: Promedio de neuronas moduladas, Verde: Neuronas que se activan antes o después de la ejecución de la secuencia, Azul: Neuronas que se activan durante la ejecución de la secuencia. Rojo: Neuronas que se activan antes y durante la ejecución. **D.** Proporciones de neuronas moduladas por categoría.

Para determinar la relación de la actividad de las neuronas de la vía indirecta con los parámetros que conforman la cadena de secuencias estímulo-respuesta realizamos un análisis de regresión lineal que se ilustra en la figura 15. Para este análisis, se calculó la tasa de disparo por neurona en una ventana de 100 ms que se movía 20 ms y se contrastó contra el parámetro de interés medido en ese ensayo. Los criterios para incluir a una unidad como codificante para un parámetro específico fueron: un valor de $Q > 0.05$ (bondad del ajuste) y los intervalos de confianza máximos y mínimos, que multiplicados entre sí fueran mayores a cero (como referencia del valor de la pendiente). De este análisis observamos que existe un incremento en el número de neuronas que codifica para el número de presiones de la primera secuencia conforme nos acercamos al inicio de la cadena, y este disminuye tras la primera presión (**Figura 15A**). Además, observamos que la duración de la transición parece codificarse tras el inicio de la cadena y el término de la primera secuencia (**Figura 15C**). El número de presiones de la segunda secuencia fue el parámetro que reclutó un mayor número de neuronas a lo largo de toda la cadena de secuencias estímulo-respuesta (**Figura 15D**).

Cadenas Estímulo-Respuesta

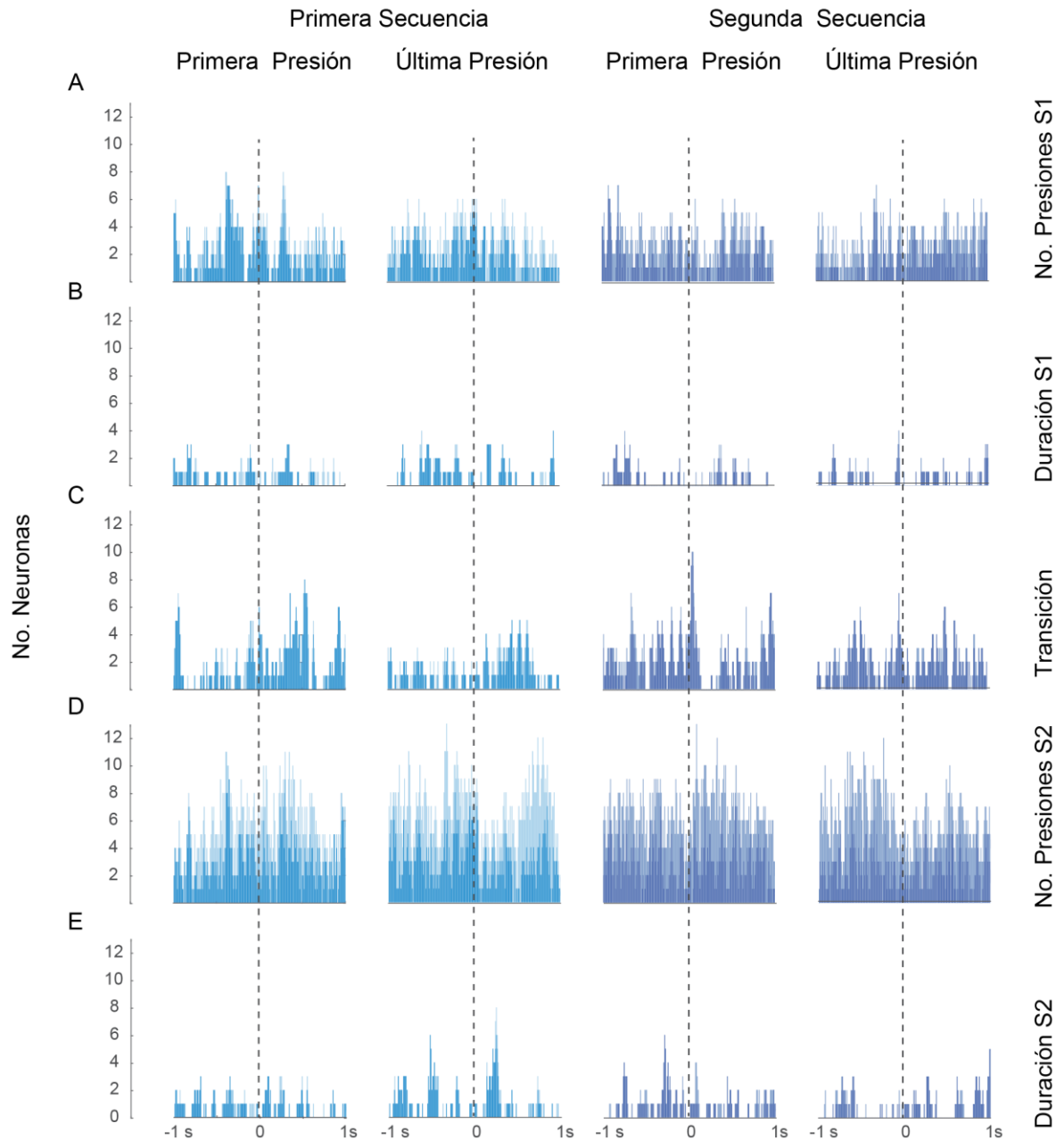


Figura 15. Regresión lineal entre parámetros de la cadena y la actividad de la vía indirecta en cadenas estímulo-respuesta.

Número de neuronas cuya actividad correlaciona con el parámetro indicado para cada uno de los eventos de interés en cadenas estímulo-respuesta: **A.** Número de presiones de la secuencia 1. **B.** Duración de la secuencia 1. **C.** Latencia de transición. **D.** Número de presiones de la secuencia 2. **E.** Duración de la secuencia 2. El análisis se realizó tomando la actividad por ensayo en ventanas de 100 ms que se mueven en pasos de 10 ms.

Análisis del patrón de actividad de la vía indirecta durante cadenas de secuencias autoiniciadas.

Para contrastar la actividad de la vía indirecta durante la realización de cadenas guiadas con respecto a cadenas autoiniciadas, evaluamos los patrones de actividad de las neuronas de la vía indirecta durante cadenas de secuencias que involucran la terminación de la primera secuencia e inicio de la segunda secuencia por elección del sujeto (cadenas de secuencias con transiciones autoiniciadas) (**Figura 16**).

A partir de este análisis determinamos que el 66% de las neuronas de la vía indirecta se moduló al inicio de una cadena de secuencias autoiniciadas y que, el 35% se activó de una forma similar al patrón en forma de “M” observado en las cadenas E-R (**Figura 16C**, Panel Izquierdo, Trazo Rojo). Este patrón de actividad solo se presentó en la primera presión y no se mantuvo a lo largo de las presiones de la primera secuencia, pero si se siguió observando la inhibición de la vía justo en el momento de la presión (Anexo1, Panel B).

La activación previa al término de la primera secuencia fue seguida de un decremento de la actividad pero que persistió posterior a la última presión de la secuencia uno. Sorprendentemente, cuando se promedió la actividad de todas las neuronas moduladas durante el inicio de la segunda secuencia no se observó un patrón de activación previo durante la realización de cadenas autoiniciadas (**Figura 16C**, tercer panel de Izq-Der, trazo negro). Lo anterior es derivado a que existió una reducción en el número de neuronas preparatorias y un incremento en la respuesta durante la ejecución (**Figura 16D**).

Cuando se comparó el término voluntario de la cadena contra la actividad durante el término de la secuencia1, se observó claramente que no existe el decremento gradual observado al término de la secuencia 1, lo que nos lleva a sugerir que el término de la primera secuencia representa una transición real entre dos elementos de una cadena global y difiere de la actividad reclutada para el término de la cadena completa (**Figura 16C** y Anexo 1, Panel B). Es importante recalcar que las unidades que se modulan en cada época no son siempre las mismas, si no que varían dependiendo del evento a analizar, de la misma manera que se modifican las proporciones de unidades moduladas (Anexo 1, Panel B, Inserto).

Cadenas Autoiniciadas

A

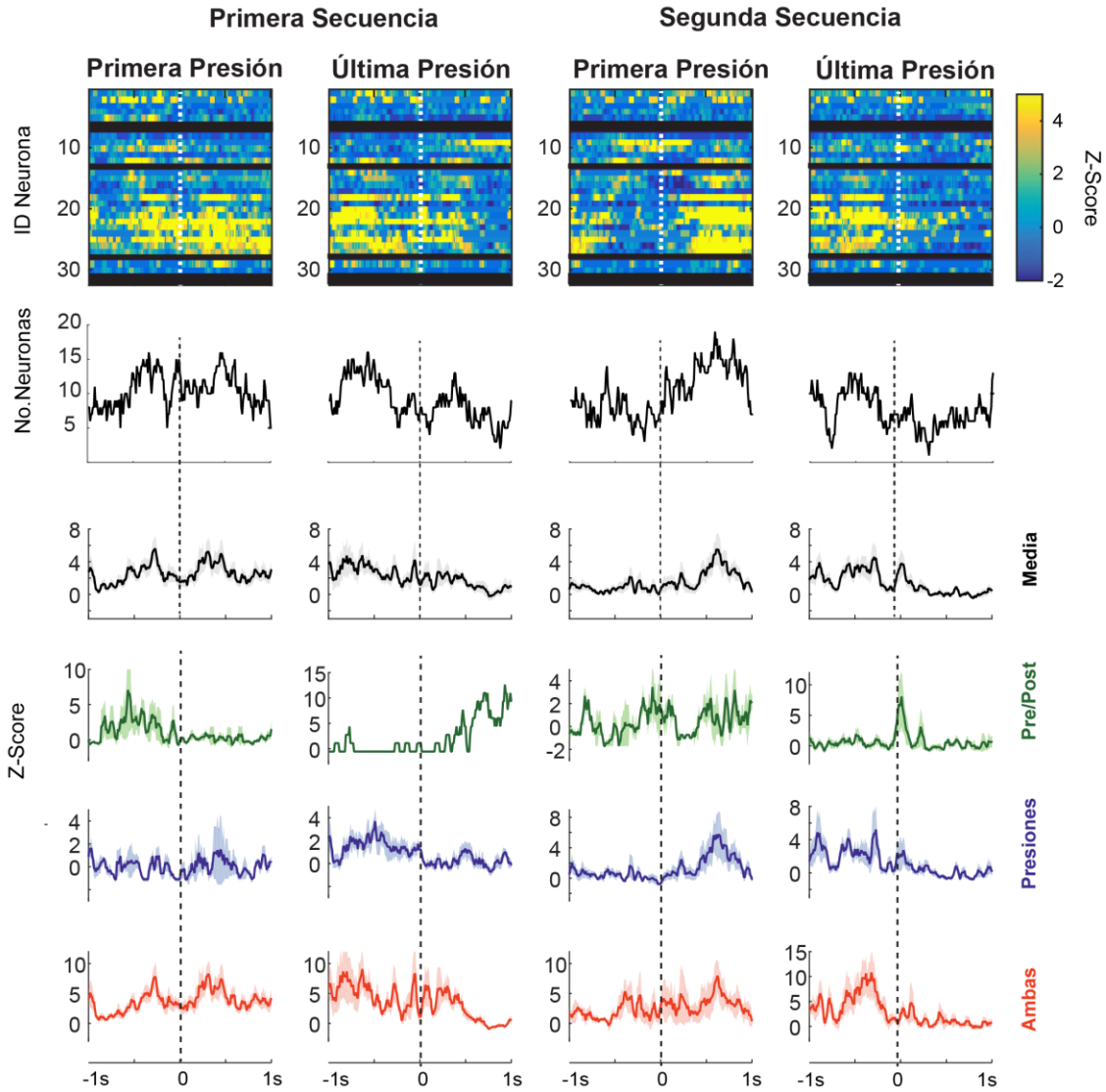


Figura 16. Patrón de actividad de las neuronas de la vía indirecta durante la realización de cadenas autoiniciadas. A. Mapa de color de las neuronas que se modulan a lo largo de los cuatro eventos de interés, las regiones en color negro indican unidades que solo se encuentran moduladas en las cadenas estímulo-respuesta. **B.** Número de neuronas con actividad significativas a lo largo de la cadena de secuencias. **C.** Promedio de la actividad de las neuronas que se modulan en cada época por categoría (Negro: Promedio de neuronas moduladas, Verde: Neuronas que se activan antes o después de la ejecución de la secuencia, Azul: Neuronas que se activan durante la ejecución de la secuencia. Rojo: Neuronas que se activan antes y durante la ejecución. **D.** Proporciones de neuronas moduladas por categoría.

Los análisis de regresión lineal de la actividad de las neuronas de la vía indirecta durante el inicio y la ejecución de cadenas de secuencias autoiniciadas mostraron que los parámetros de la primera secuencia (número de presiones y duración) reclutan un mayor número de neuronas al momento de la transición (**Figura 17**). En esta condición el número de presiones de la segunda secuencia empieza a codificarse tras el término de la primera secuencia y se mantiene hasta antes del inicio de la segunda secuencia (**Figura 17D**), lo que nos permite sugerir que la vía indirecta puede contener información acerca de los parámetros de la secuencia consecutiva. Con respecto a la transición existió un incremento puntual en el número de neuronas que codifican para la duración justo antes del inicio de la cadena de secuencias (**Figura 17C**), lo que apoya la hipótesis anterior.

Cadenas Autoiniciadas

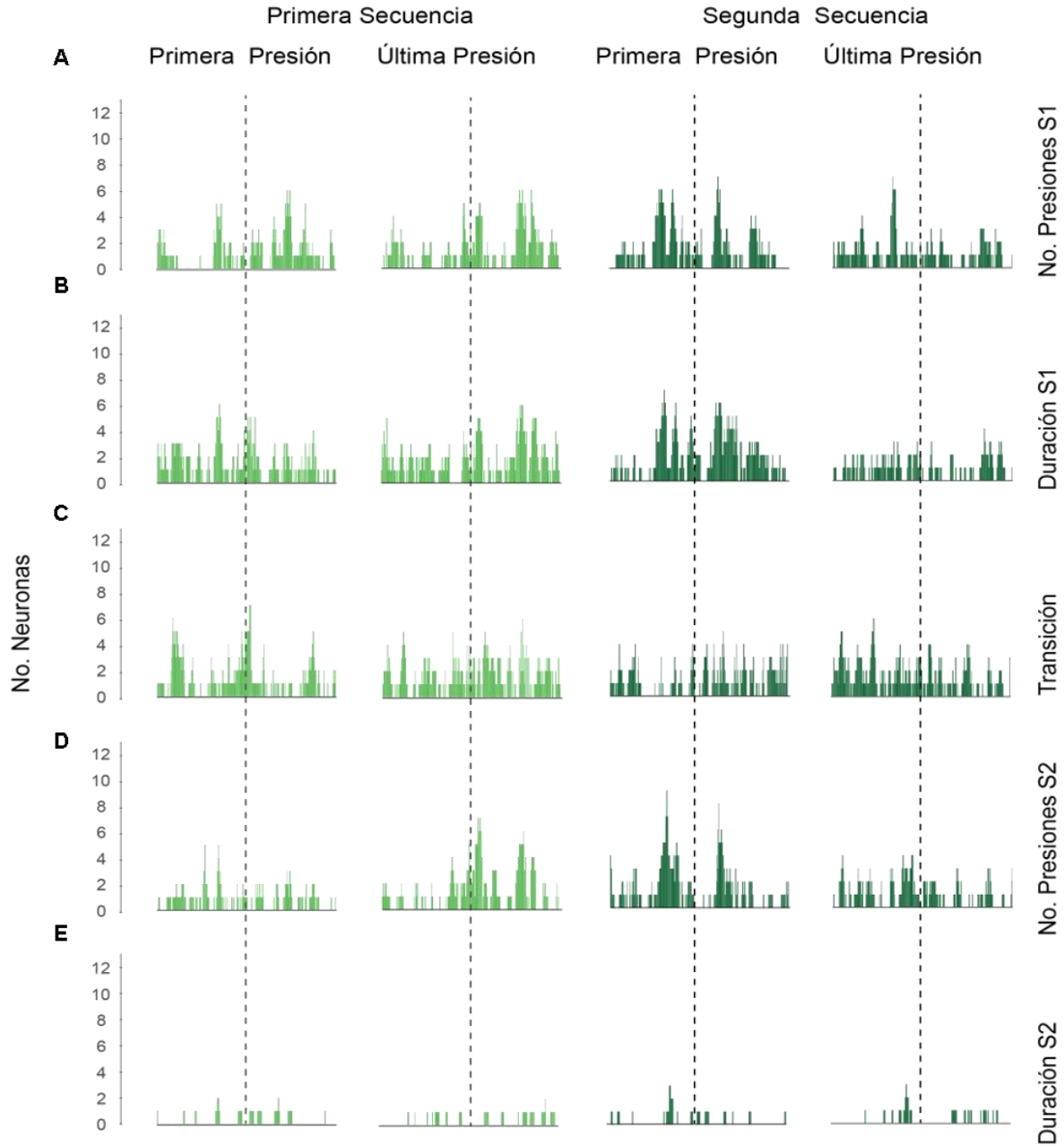


Figura 17. Regresión lineal entre parámetros de la cadena y la actividad de la vía indirecta en cadenas autoiniciadas. Número de neuronas cuya actividad correlaciona con el parámetro indicado para cada uno de los eventos de interés en cadenas autoiniciadas. El análisis se realizó tomando la actividad por ensayo en ventanas de 100 ms que se mueven en pasos de 10 ms.

La actividad de las neuronas de la vía indirecta es diferencial alrededor del cambio entre secuencias dependiendo del tipo de cadena de acciones que se realiza.

A diferencia de trabajos previos donde se evaluó la actividad de la vía indirecta durante la realización de una sola secuencia de acciones autoiniciada (Jin et al., 2014), el protocolo conductual que propusimos en el presente trabajo permitió hacer la distinción entre la ejecución de secuencias de acciones que guían el comportamiento motor del sujeto hacia la transición a la secuencia consecutiva (por la retracción de la palanca1 y la presentación de la palanca2) y aquellas que permiten que el animal transite de manera autónoma hacia la siguiente secuencia (ambas palancas están expuestas). Lo anterior nos permitió determinar si existe una modulación diferencial entre los patrones de actividad registrados en cada una de las condiciones.

Cuando comparamos la actividad promedio de las neuronas moduladas de la vía indirecta durante secuencias estímulo respuesta contra autoiniciadas, observamos que las principales diferencias se encontraron en los eventos alrededor del cambio entre secuencias de acciones (**Figura 18 A-B**, paneles centrales con asterisco rojo). Es importante mencionar que en este punto, la capacidad de modulación de una neurona se determinó comparando la actividad durante 500 ms antes o 500 ms después del evento en cuestión, esto con respecto a la actividad basal (2-3 s antes del inicio de la primera secuencia) y, para comparar entre condiciones se utilizó un análisis de ventanas móviles en el tiempo (intervalos de 100 ms que se mueven en pasos de 10 ms) desde un segundo antes hasta un segundo después del evento de interés, partiendo de los PHS en puntuación z (comparación evaluada por Kruskal-Wallis $p < 0.05$).

Con respecto al término de la primera secuencia, cuando se trató de cadenas E-R se presentó una activación sostenida previa al término de la primera secuencia que va seguida de una pendiente abrupta tras concluir la última presión para mantenerse inhibida al inicio de la transición entre secuencias (**Figura 18A** azul claro → azul oscuro), pero cuando analizamos las cadenas autoiniciadas la activación previa al término de la primera secuencia es seguida de un decremento gradual de la actividad que persiste alrededor de 500 ms después de la última presión de la secuencia uno (**Figura 18A** verde claro → verde oscuro). Por otra parte, el inicio de la segunda secuencia en una cadena E-R estuvo marcada por el incremento en la actividad de la vía indirecta (**Figura 18A** secuencia2 presión inicial), este incremento no fue observado en el promedio de la actividad de cadenas autoiniciadas, en esta se presenta una inhibición sostenida que se mantuvo aun iniciada la segunda secuencia (**Figura 18B** secuencia2 presión inicial). A pesar de que no existió diferencia significativa entre la proporción de unidades moduladas en cada una de las condiciones,

fue claramente observable que no son las mismas neuronas las que son reclutadas en cada etapa entre condiciones (**Figura 18C**, y ver también **Figuras 14C-D** y **16C-D**).

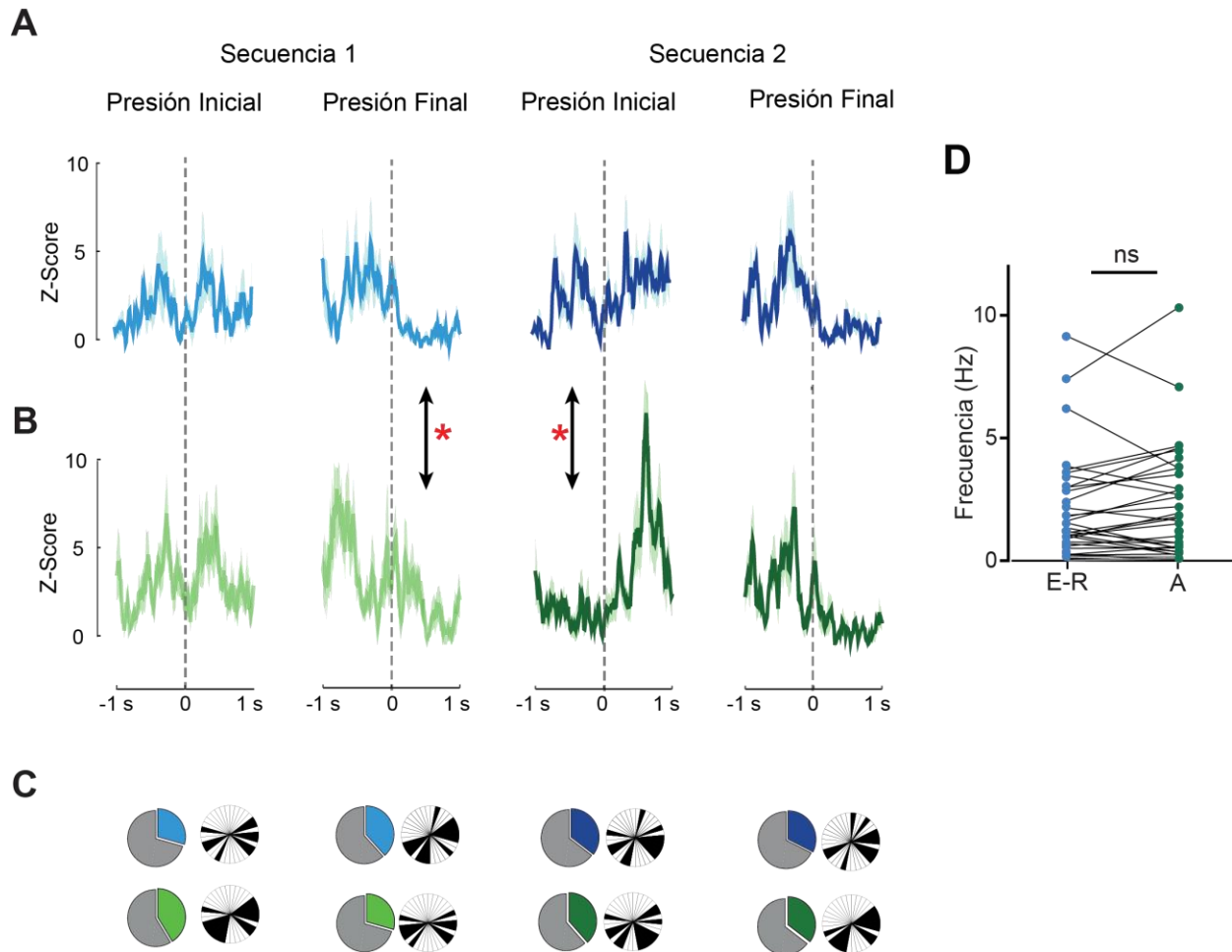


Figura 18. Comparativo entre los patrones de actividad de la vía indirecta para cadenas estímulo-respuesta contra cadenas autoiniciadas.

A. Patrones de actividad poblacional de neuronas de la vía indirecta durante cadenas E-R. **B.** Patrones de actividad poblacional de neuronas de la vía indirecta durante cadenas autoiniciadas. Diferencia significativa entre las distribuciones de los patrones poblacionales calculados por intervalos de 100 ms (Kruskal Wallis $p < 0.05$). **C.** Proporción de neuronas de la vía indirecta por condición moduladas en cada época (Azul: Cadenas E-R, Verde: Cadenas A.). En los gráficos de pastel, blanco y negro, el negro representa unidades moduladas. **D.** Comparativo poblacional entre las medias individuales de actividad basal para cada condición (Wilcoxon $p > 0.05$).

Debido a que los análisis de la actividad neuronal hasta ahora presentados fueron producto de una normalización a un periodo basal, es necesario corroborar que los patrones diferenciales observados entre tipos de cadenas no fueron derivados de diferencias en la actividad basal entre condiciones, para tal fin se comparó la media de dicha actividad basal para cada condición por neurona y de

manera poblacional no se obtuvieron diferencias significativas (**Figura 18D**, Wilcoxon $p > 0.05$). Como control adicional, para evaluar si las diferencias observadas entre condiciones en los patrones de actividad alrededor de la transición no fueran derivados de diferencias en la ejecución de la conducta, se determinaron los intervalos entre presiones por secuencia y condición (**Anexo 2 A-F**). Se determinó que no existen diferencias entre condiciones para los intervalos entre presiones de la primera secuencia (Wilcoxon $p > 0.05$, **Anexo 2 G-I**), con respecto a la segunda secuencia el último intervalo es mayor para cadenas estímulo respuesta (Wilcoxon $p < 0.05$, **Anexo 2 L**).

Por último, derivado de las diferencias encontradas al comparar ambas la actividad de la vía indirecta en ambos tipos de cadenas, preguntamos de manera individual si las neuronas eran capaces de diferenciar entre cadenas estímulo respuesta y autoiniciadas a través de un análisis de curvas ROC (ver metodología). Concluyendo que el ~15% de las neuronas de la vía indirecta son capaces de distinguir entre tipos de cadena en los eventos alrededor de la transición entre secuencias (**Figura 19**, paneles centrales).

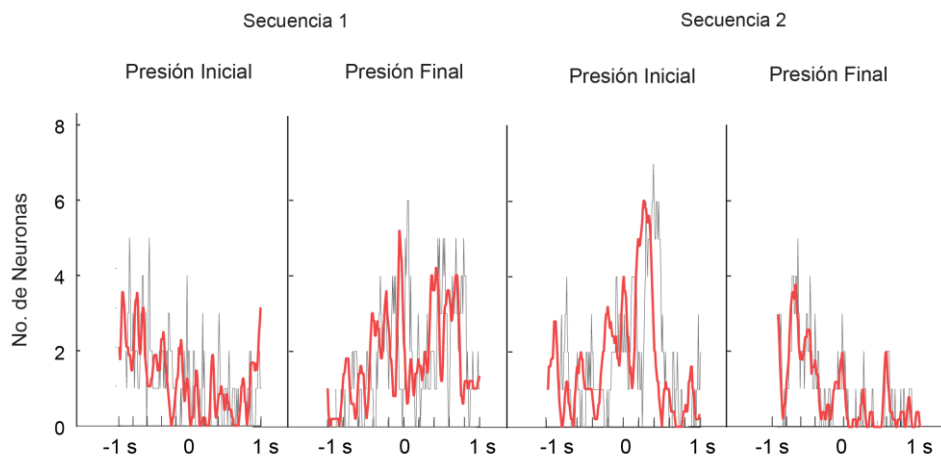


Figura 19. Neuronas de la vía indirecta que discriminan entre cadenas E-R y A.

Número de unidades significativas a lo largo del tiempo para la diferenciación entre cadenas estímulo-respuesta y autoiniciadas, en gris claro se muestra el número de neuronas totales mientras que en rojo se muestra el número de neuronas con suavizado gaussiano de 5 puntos.

Inhibición de la Actividad de la Vía Indirecta Durante la Realización de Cadenas de Secuencias

Para poder evaluar la necesidad de la actividad de la vía indirecta en el cambio/transición entre secuencias de acciones se implantaron animales A2a-Cre, que fueron tratados para expresar la opsina *Archeorhodopsin3.0* en el sub-circuito de la vía indirecta, con fibras ópticas de manera bilateral (**Figura 20A**, también ver **Figura 11A**). Decidimos inhibir la actividad de esta vía utilizando 3 distintos protocolos que involucraron diferentes tiempos de inhibición durante la primera secuencia (definido por el propio comportamiento de cada animal) (**Figura 20C**).

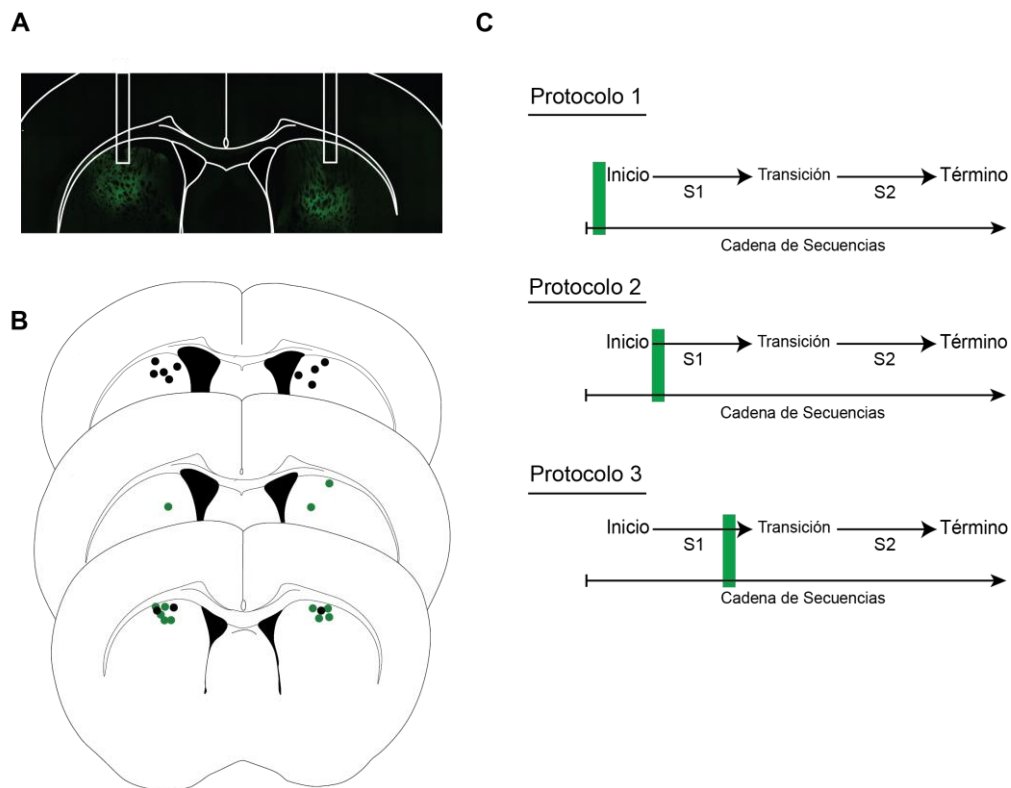


Figura 20. Localización del sitio de infección y protocolos de manipulación optogenética.

A. Corte coronal representativo para mostrar la expresión de archeorhodopsin3.0 eYFP (verde) y la localización de las fibras ópticas en el estriado dorsomedial. **B.** Diagrama de la localización de las fibras en los sujetos experimentales (verde) y controles (negro). **C.** Protocolos de manipulación de la actividad de la vía indirecta durante la realización de cadenas de secuencias. Protocolo1: antes de iniciar la secuencia1, Protocolo2: al realizar la primera presión, Protocolo3: previo al término de la secuencia1.

Durante los experimentos de inhibiciones optogenéticas se analizaron los siguientes parámetros: número de presiones en la primera secuencia, duración de la primera secuencia, duración de la transición, número de presiones en la secuencia 2, duración de la segunda secuencia y tiempo total por ensayo. La **figura 21** muestra un análisis de todos los ensayos de cadenas estímulo respuesta, normalizando los ensayos por animal a su condición control. A partir de esta comparación encontramos que si inhibimos la actividad de la vía indirecta justo antes de que el sujeto inicie una cadena de secuencias estímulo-respuesta afectamos la fase tardía de la misma, modificando la duración y el número de presiones de la segunda secuencia. No se observaron diferencias en los protocolos restantes.

Con respecto a la inhibición de la vía indirecta durante la realización de cadenas autoiniciadas (**Figura 22**), observamos que, si inhibimos antes del inicio de la cadena, no sólo afectamos los parámetros de la fase tardía de la cadena (número de presiones y duración de la segunda secuencia (U de Mann-Whitney $p < 0.05$), sino que además incrementamos la latencia de transición (U de Mann-Whitney $p < 0.05$). Por otra parte, y apoyando el hecho de la modulación diferencial de los patrones de actividad de la vía indirecta entre condiciones, cuando inhibimos a la vía indirecta durante la ejecución de la secuencia autoiniciada (protocolos 2 y 3, **Figura 8C**), somos capaces de modificar el desempeño del sujeto en línea, es decir, modificamos los parámetros de la secuencia que se está realizando (Duración de la secuencia 1 para el protocolo de inhibición en la primera presión, y número de presiones de dicha secuencia para el protocolo de inhibición justo antes de la transición, U de Mann-Whitney $p < 0.05$; **Figura 22**).

Derivado de los resultados de la inhibición optogenética de la vía indirecta durante la realización de cadenas de acciones podemos concluir que la actividad de esta vía es necesaria para la apropiada realización de cadenas de secuencias de acciones y es específicamente requerida para la adecuada transición de secuencias de acciones en cadenas autoiniciadas.

Cadenas de Secuencias Estimulo-Respuesta

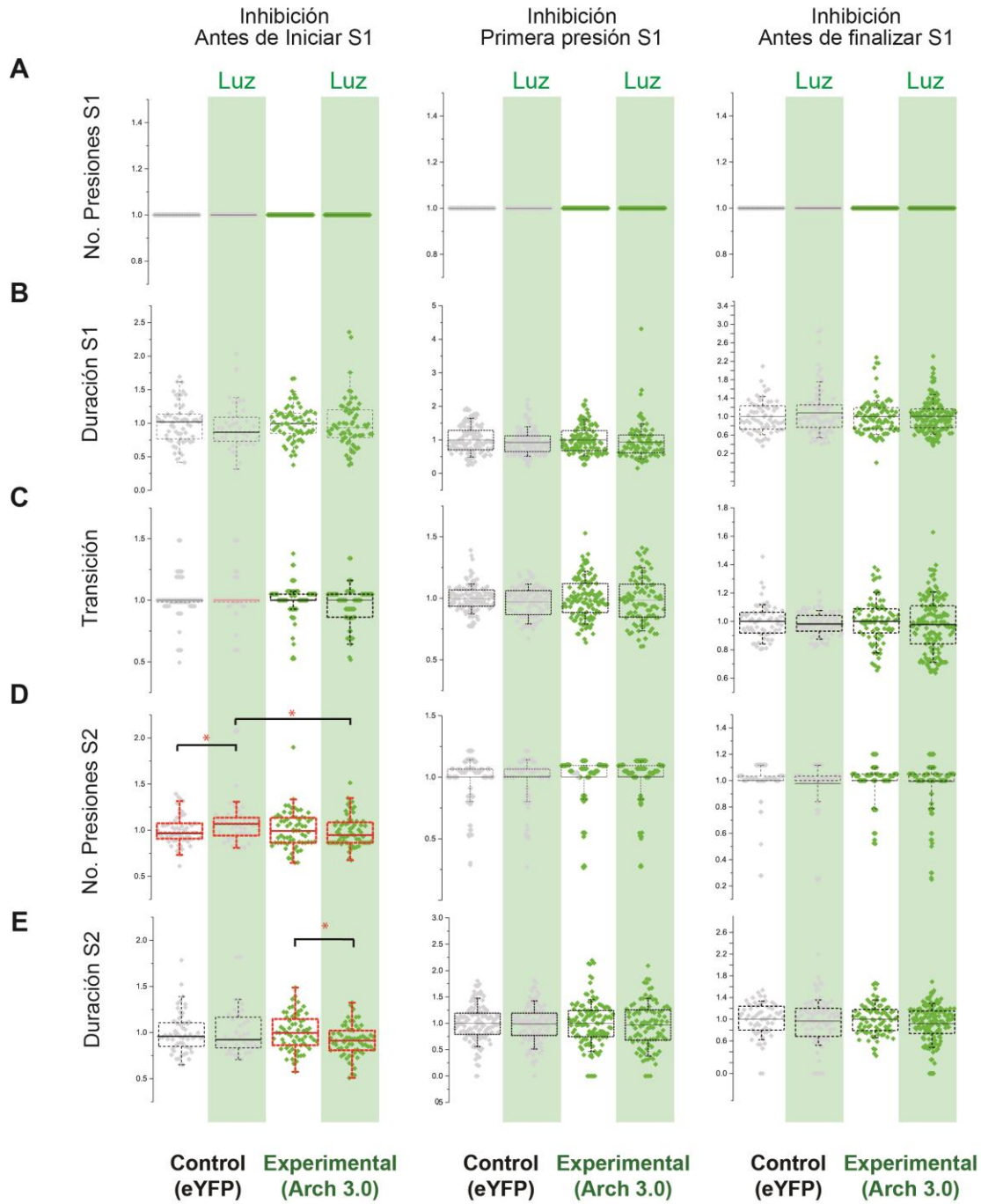


Figura 21. La inhibición de la vía indirecta antes de iniciar una cadena estímulo-respuesta afecta los parámetros de la segunda secuencia.

Inhibición antes de iniciar (columna derecha), al iniciar la secuencia1 (columna de en medio) y previo a la finalización de la secuencia1 de la cadena. En cada columna se presentan los ensayos individuales para animales control y experimentales (n=6 para cada grupo), ensayos con inhibición (marcados en verde), normalizados a la media de la condición sin inhibición por animal. **A.** Presiones durante la secuencia1. **B.** Duración de la secuencia1. **C.** Duración de la transición. **D.** Presiones durante la secuencia2. **E.** Duración de la secuencia2. *U de Mann-Whitney $p < 0.05$.

Cadenas de Secuencias Autoiniciadas

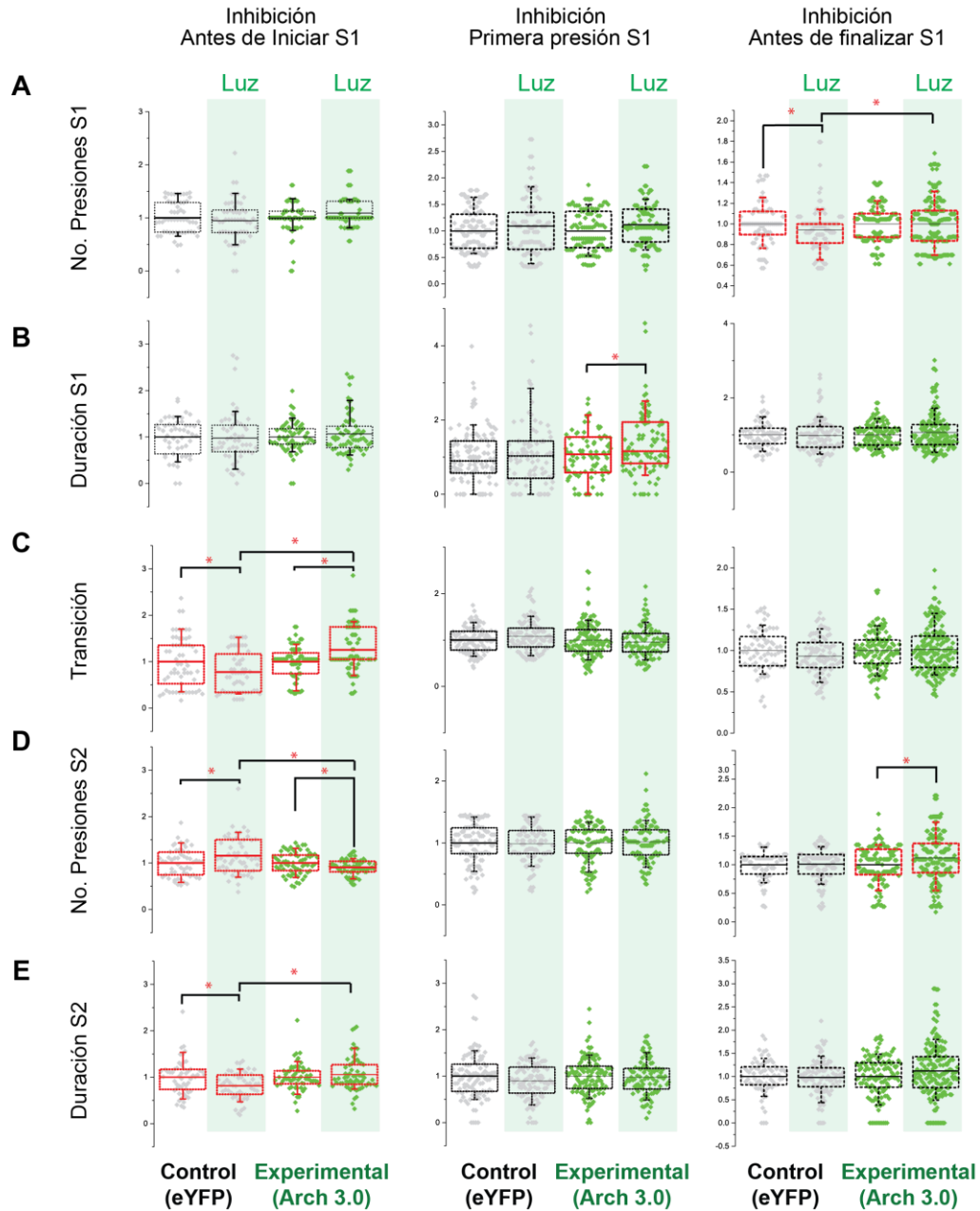


Figura 22. La inhibición de la vía indirecta antes de iniciar y durante la realización de la primera secuencia retrasa la transición y afecta los parámetros de la realización de las cadenas de acciones autoiniciadas.

Inhibición antes de iniciar (columna derecha), al iniciar la secuencia1 (columna de en medio) y previo a la finalización de la secuencia1 de la cadena. En cada columna se presentan los ensayos individuales para animales control y experimentales (n=6 para cada grupo), ensayos con inhibición (marcados en verde), normalizados a la media de la condición sin inhibición por animal. **A.** Presiones durante la secuencia1. **B.** Duración de la secuencia1. **C.** Duración de la transición. **D.** Presiones durante la secuencia2. **E.** Duración de la secuencia2. *U de Mann-Whitney p<0.05

DISCUSIÓN

El estudio de los ganglios basales ha permitido identificar que estos núcleos participan en el aprendizaje, la selección y el control de movimientos. En los últimos años, se han propuesto ideas que confrontan las teorías clásicas que explicaban la contribución de la vía directa e indirecta a procesos relacionados con la preparación y ejecución de acciones de manera antagónica. En este trabajo nos propusimos estudiar la contribución de la vía indirecta a la transición entre secuencias de acciones, basándonos en la siguiente hipótesis: “La activación de la vía indirecta de los ganglios basales permite la adecuada transición a la acción (o secuencia) consecutiva”.

Definimos como secuencia de acciones o movimientos, a una serie de componentes motores que se realizan de forma ordinal y estereotipada. Implicando que la realización de una cadena de movimientos contiene la ejecución ordinal de dos o más secuencias de acciones consecutivas. Los paradigmas conductuales que se han utilizado para estudiar la actividad de la vía indirecta durante comportamientos voluntarios (dirigidos a objetivos) utilizan la ejecución de presiones individuales, o en secuencia para la obtención de reforzadores (Kravitz et al., 2012; Cui et al. 2014; Jin et al. 2014; Tecuapetla et al. 2016; Vicente et al. 2015). Si bien la realización de presiones en secuencia nos permite tener transiciones entre eventos individuales (transición entre presiones consecutivas), se ha mostrado que el estriado almacena la información de los elementos individuales de una secuencia como una acción individual completa (Jin & Costa 2010). Por lo tanto, fue necesario diseñar un paradigma conductual que permitiera estudiar *in vivo*, con un espacio temporal adecuado, la actividad de las neuronas de la vía indirecta de los ganglios basales durante la transición entre dos secuencias de acciones consecutivas.

Tras las tres primeras fases del esquema de entrenamiento propuesto en este trabajo, los sujetos fueron capaces de realizar secuencias de presiones consecutivas sin importar el sitio de presentación de la palanca (**Figura 9B y 10B**). A partir de la tercera fase y durante el resto del programa de entrenamiento, el uso de sanciones para moldear la conducta del animal fue una herramienta utilizada para acelerar la adquisición de la tarea conductual (**Figuras 9D y 10D**). Las sesiones finales que involucraron la transición entre secuencias en respuesta a un estímulo dado fueron realizadas con el 80% de ensayos correctos para sujetos control y experimentales, lo que nos permitió evaluar la eficiencia del esquema de entrenamiento utilizado y su utilidad para el estudio del subcircuito de interés durante la ejecución de cadenas de secuencias (**Figuras 9E-H y 10E-H-I**).

La disfunción de los ganglios basales se ha identificado como una de las principales causas en desórdenes del control motor. La enfermedad de Parkinson, es una de las principales patologías que se ha relacionado a alteraciones en los patrones de actividad de las vías descendentes de los ganglios basales (e.g. Albin et al. 1989). Se ha documentado que los individuos con la enfermedad de Parkinson tienen problemas con la iniciación auto iniciada de acciones motoras aprendidas (Snijders & Bloem 2010), por lo tanto, en este trabajo se decidió incluir en el paradigma conductual sesiones que intercalaran ensayos donde las transiciones entre secuencias fueran guiadas por la retracción y presentación de las palancas (cadenas E-A) y, ensayos en los que el sujeto fuera libre de auto-iniciar la transición hacia la segunda secuencia (cadenas A).

En resumen, el paradigma conductual desarrollado en el presente proyecto permitió no solo tener el espacio temporal para evaluar la actividad neuronal (vía indirecta de los ganglios basales para los fines de este estudio) durante la realización de cadenas de secuencias consecutivas (**Figuras 11-19**), sino también nos permitió determinar si existe una contribución específica/diferencial del subcircuito de interés cuando se realizan transiciones estímulo-respuesta y autoiniciadas (**Figuras 20-22**).

La expresión de proteínas de interés en el estriado dorsomedial de animales transgénicos A2a-Cre estuvo limitada a las neuronas cuyas proyecciones son dirigidas hacia el globo pálido segmento externo (**Figura 11**), en línea con la especificidad ya reportada para el estudio de la vía indirecta de los ganglios basales (Gong et al. 2003; Schiffmann & Vanderhaeghen 1993). Otro marcador molecular representativo de este subcircuito es la encefalina (Gerfen 1984). En este trabajo, la expresión de esta no fue detectada en el total de las neuronas identificadas como A2a-Cre, quizás debido a que existen variaciones en la inmunoreactividad contra encefalina a lo largo del estriado indicando que existe una mayor co-localización en las regiones ventrales de este núcleo y particularmente en la región de los estriosomas (McCollum et al. 2012), lo que pudiera explicar la baja co-localización de esta en las neuronas de la vía indirecta encontrada en el estriado dorsomedial en este trabajo. No obstante la baja co-localización de neuronas expresando GFP y encefalina (**Figura 11B-C**), el hecho que las proyecciones de las neuronas A2a Cre expresando eYFP (al cruzar animals A2a Cre con la línea reportera Ai35, esta última expresa GFP solo en las neuronas que contengan Cre) proyectan exclusivamente al globo pálido segmento externo (**Figura 11A**), nos da la certeza de que la línea A2a Cre es una línea de exclusividad para marcar a las neuronas de la vía indirecta (Qiaozhen et al. 2009; Yu et al. 2009).

Ya corroborada la especificidad de las neuronas A2a para el marcaje de la vía indirecta, la identificación de la actividad proveniente de las neuronas de esta vía se realizó a partir de registros de actividad unitaria en el estriado dorsomedial por la técnica de fotoidentificación asistida (**Figura 12**). Esta técnica está basada en la expresión de ChR2 en subpoblaciones neuronales específicas. Las neuronas expresando ChR2 son detectadas por electrofisiología in vivo a partir de la iluminación de estas por pulsos de luz azul que generarán, con una latencia corta, potenciales de acción detectables en la población de interés (Lima et al. 2009; Jin et al. 2014; Cohen et al. 2012). Se ha demostrado que la latencia de respuesta de las neuronas estriato-palidales a la estimulación lumínica cuando se utiliza la línea de transgénicos D2-Cre es de 4 ms a 9 ms (Jin et al. 2014; Ian A. Oldenburg & Sabatini 2015). Por otra parte, cuando se utilizaron animales A2a-Cre tras protocolos de estimulación con luz continua la latencia promedio de respuesta a la estimulación lumínica fue de 3.9 ± 0.48 ms (Tecuapetla et al. 2016). En el presente trabajo utilizamos un umbral máximo de latencia de 6 ms para incluirlas como neuronas A2a-Cre positivas al estímulo lumínico aplicado. Teniendo en este estudio una latencia de respuesta promedio de 3.3 ± 1.28 ms (**Figura 12E**), concordando con protocolos similares para la fotoidentificación de la vía indirecta.

La participación del estriado en la generación de secuencias motoras ha sido reportada tanto para el caso de conductas naturales como para aquellas donde el sujeto ha sido entrenado (Berridge & Fentress 1987; Aldridge et al. 2004; Jin et al. 2014; Rueda-Orozco & Robbe 2015). En este trabajo registramos la actividad neuronal de la vía indirecta de los ganglios basales en el estriado dorsal de sujetos en libre movimiento realizando cadenas de secuencias de acciones. Encontrando que alrededor del 40-50% de las neuronas de la vía indirecta modifican su tasa de disparo con respecto a un evento específico de la tarea utilizada (**Figuras 14 y 16**). Con respecto a lo anterior, se ha reportado que el 41% de las neuronas del estriado dorsomedial codifica el patrón secuencial de cadenas complejas de movimiento en ratas (Aldridge & Berridge 1998). Lo que apoya la idea de que el estriado, y en particular la vía indirecta, contribuye a la realización de cadenas de secuencias.

Jin y colaboradores mostraron que las neuronas de la vía indirecta contienen actividad diferencial, 40% de las neuronas registradas mostraron activación/inhibición, durante el inicio y la realización de secuencias de presiones (Jin et al. 2014). En este trabajo cuando analizamos los patrones de actividad de la vía indirecta durante el inicio de la cadena de secuencias de acciones observamos patrones de actividad consistentes con los mencionados anteriormente (aunque en menor proporción en este trabajo, 24% y 12% para el inicio y realización de cadenas E-A y cadenas A respectivamente; **Figuras 14 y 16**). Además, encontramos una tercera categoría de disparo de las neuronas de la vía indirecta que no ha sido previamente descrita, compuesta por neuronas que se

activan previo al inicio de la secuencia, se inhiben durante la presión y presentan una activación fásica justo después de realizar la acción, lo que les otorga un patrón en forma de “M” (**Figura 13B; 14C y 16C** paneles en rojo de la izquierda). Esta dinámica de actividad se presentó al inicio de ambos tipos de cadenas, pero sólo en las estímulo-respuesta se presenta de manera consecutiva para las tres primeras presiones de la secuencia uno (**Anexo1**). Indicando que la forma de “M” podría ser consecuencia de estar observando la activación previa necesaria para la ejecución de la presión a la que se encuentra alineada la actividad y, el segundo pico de activación podría ser esta misma actividad pero para poder realizar la presión consecutiva, como si en este punto de la cadena hubiera neuronas que codifican las acciones individuales de la secuencia; aparte de aquellas que solo se activan precediendo al inicio de la cadena completa y a aquellas que se mantienen activas durante la ejecución (**Figuras 14C y 16C**). La diferencia en la proporción de neuronas para cada categoría con respecto a estudios previos podría explicarse a que los registros en esta tesis fueron realizados en el estriado dorsomedial (**Figura 12H**).

Con respecto a la actividad de la vía indirecta durante la transición entre secuencias de acciones E-R, observamos un incremento durante la ejecución de la última presión de la primera secuencia y, tras esta, una súbita inhibición que se mantuvo durante el inicio del cambio hacia la siguiente palanca (**Figura 18**). Esta activación previa al término de una secuencia se presentó de igual manera al final de la segunda secuencia y coincide con la dinámica reportada para este subcircuito al término de una secuencia de presiones (Jin et al. 2014) y, concuerda con la idea anterior indicando que esta vía se activa para inhibir el movimiento (Jin et al. 2014; Kravitz et al. 2013; Oldenburg & Sabatini 2015; Durieux et al. 2009). En cuanto al inicio de la segunda secuencia se observó predominantemente una activación previa y posterior a la primera presión, pero tal patrón de actividad difiere del observado al inicio de la primera secuencia (más neuronas fueron reclutadas durante la ejecución del inicio de la segunda secuencias tanto en cadenas E-A como autoiniciadas; **Figuras 14B**). No se descarta que el patrón de activación observado en este punto de la cadena pudiera ser consecuencia del sonido de exposición de la palanca momentos antes del inicio de la acción (en el caso de cadenas E-A), ya que se ha demostrado que la presentación de un tono previo al inicio de una tarea operante produce un incremento en la actividad de la vía indirecta (Oldenburg & Sabatini 2015), no obstante en este trabajo también observamos un mayor reclutamiento de neuronas de la vía indirecta en la segunda secuencia de cadenas autoiniciadas (**Figura 16B**), las cuales carecieron de la retracción de la palanca.

De igual manera la vía indirecta durante el cambio entre secuencias autoiniciadas mostró un incremento previo a la última presión de la primera secuencia, pero este persistió tras el inicio de la

transición (**Figura 16 y 18** segunda columna). En este punto, es importante mencionar que se ha propuesto que este subcircuito contribuye al proceso de selección de acciones activándose para permitir la supresión de programas motores no adecuados y, facilitar así la salida de aquellos programas motores que sean los más favorables (Kim et al. 2017). Es posible que, en esta condición, careciente de estímulos que indiquen el cambio, se requiera que la vía se mantenga activa para inhibir programas motores alternos y permitir el correcto tránsito a la segunda secuencia. Con respecto al inicio de la segunda secuencia, el promedio de la actividad de la vía indirecta reflejó un incremento en el número de neuronas que presentan un patrón de actividad silente con un incremento de la actividad justo después del inicio de la secuencia (**Figura 16 y 18** tercera columna). Con respecto a este punto, surgen dos hipótesis: 1) En este punto del entrenamiento las cadenas autoiniciadas se codifican como una acción única y, por lo tanto, no es requerido un incremento en la actividad para el inicio de la segunda secuencia. 2) Una vez que es seleccionada la acción, lo que se refleja en la actividad sostenida tras el término de la primera secuencia, la vía indirecta debe permanecer silente para permitir la transición. Con respecto a esta última aseveración, se ha reportado que la activación de este subcircuito previo al inicio de una secuencia de acciones propicia el aborto de la misma (Tecuapetla et al. 2016), lo que apoya la idea de que, en cadenas autoiniciadas es necesario la inhibición de la vía para permitir la transición entre dos acciones.

Al determinar si las neuronas de la vía indirecta podían discriminar entre tipos de cadenas, se determinó que el 15% de las neuronas de la vía indirecta en el estriado dorsomedial son capaces de presentar patrones de actividad diferencial ante cadenas estímulo-respuesta y autoiniciadas (**Figura 19**). El mayor número de unidades capaces de discriminar entre condiciones se encontró en los eventos alrededor del cambio entre secuencias y se descartó que fuera derivado de diferencias en la ejecución de la conducta (**Anexo 2**). Reforzando la idea de la participación de esta vía en distintas condiciones que involucren el tránsito entre secuencias.

Una primera forma de preguntar si la actividad registrada de la vía indirecta codifica para los parámetros de la conducta estudiada es por medio de análisis de correlación entre la actividad de la vía indirecta con los parámetros que conforman el paradigma conductual. De este tipo de análisis, para el caso de las cadenas de secuencias de acciones E-R, observamos que el número de presiones para ambas secuencias es el parámetro que se codifica en un mayor número de neuronas a lo largo de la cadena y que la duración de la transición para esta condición, parece codificarse desde el término de la primera secuencia hasta el inicio de la segunda secuencia (**Figura 15**).

Una segunda aproximación para estudiar cómo la actividad de la vía indirecta contribuye a la generación de cadenas de secuencias de acciones es por medio la inhibición de la actividad de esta vía en ventanas temporales específicas durante la conducta y medir las consecuencias de la inhibición selectiva sobre como los parámetros conductuales son afectados (**Figuras 20-22**). Los resultados de las inhibiciones temporales por medio de optogenética de la vía indirecta mostraron que la inhibición de esta vía previo al inicio de una cadena de secuencias de acciones afecta la correcta ejecución de la parte final de la cadena, reduciendo la duración y el número de presiones realizadas en la segunda secuencia (**Figura 21 y 22**, columna de la derecha). Al respecto, se ha reportado que lesiones en el estriado reducen la probabilidad de terminar la secuencia estereotipada de acicalamiento en ratas (Berridge & Fentress 1987). Esto nos permite sugerir que la información acerca de los parámetros de la cadena completa se encuentra codificada desde antes de que se inicie la cadena de secuencias de acciones, es decir, la vía indirecta contribuye con la correcta ejecución de la cadena de secuencias de acciones completa previo al inicio de la misma. Por otra parte, cuando se inhibió la actividad de la vía indirecta durante la realización de la secuencia¹ se afectaron los parámetros en línea, es decir de la cadena que se estaba ejecutando, esto exclusivamente para las cadenas autoiniciadas (**Figura 22**). En concordancia con lo anterior, Tecuapetla y colaboradores, han reportado que la inhibición de la vía indirecta del estriado dorsolateral durante la ejecución de una secuencia de acciones produce una disminución en el número de presiones de la secuencia que se está realizando (Tecuapetla et al. 2016). Por último, es importante mencionar, que la poca concordancia entre los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición optogenética con respecto a las especulaciones realizadas a partir de los análisis de regresión lineal (correlación entre la actividad y los parámetros conductuales) puede deberse a las diferencias en la población que compone cada uno de los grupos de datos. Si bien la regresión parte de una población estadísticamente válida (34 unidades), el número de neuronas que se manipulan durante las inhibiciones optogenéticas es mucho mayor (~1000 neuronas por hemisferio; Tecuapetla et al., 2016).

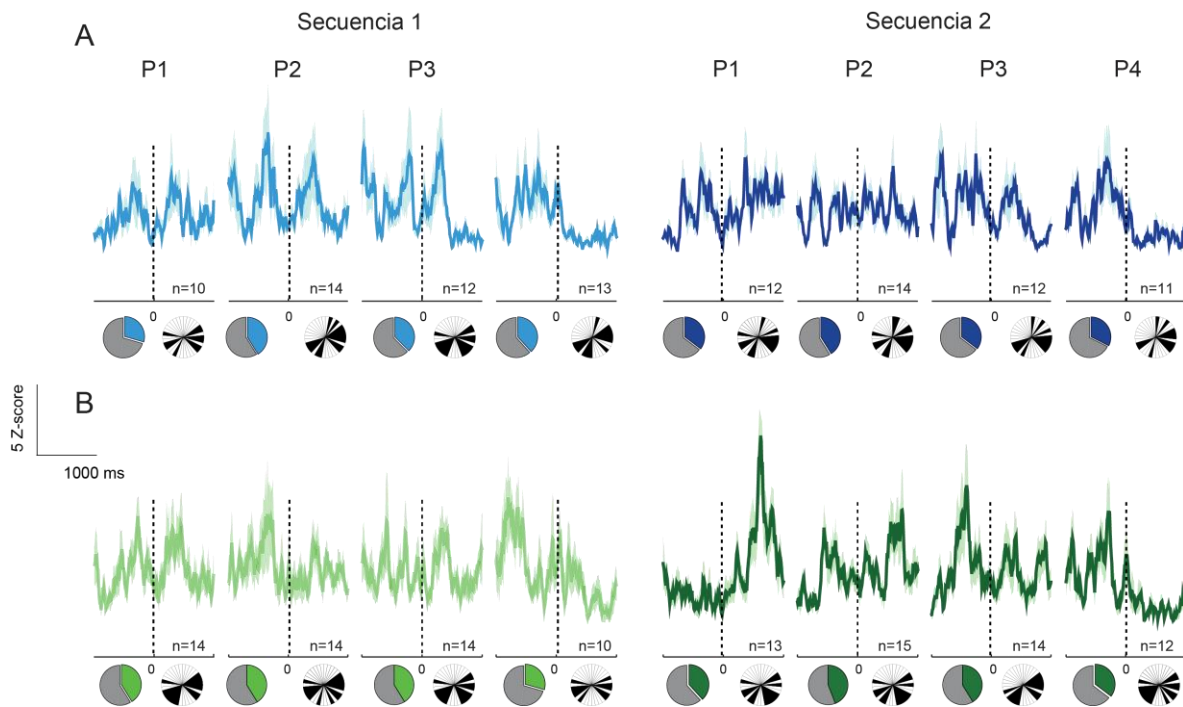
CONCLUSIÓN

A partir del cumplimiento de los objetivos planteados aceptamos la hipótesis de trabajo planteada habiendo mostrado que:

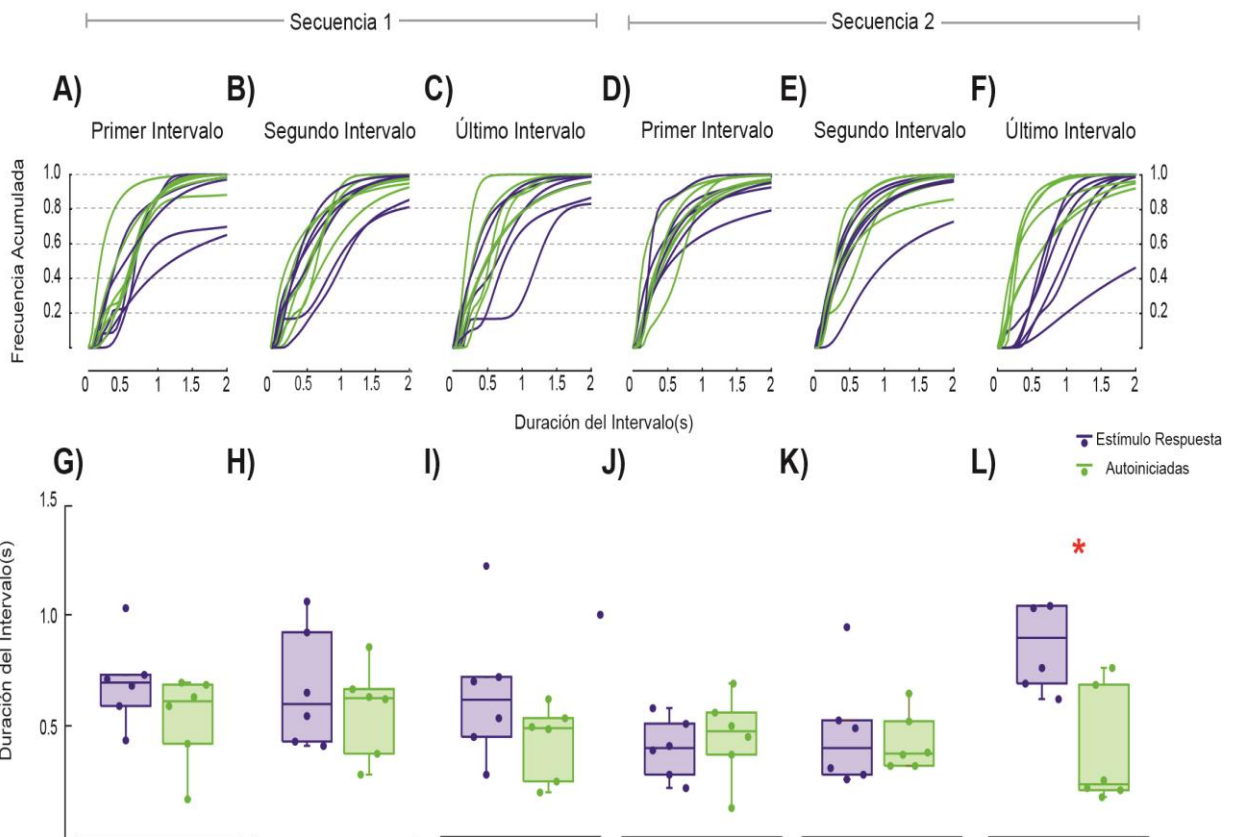
- 1) La actividad de la vía indirecta, registrada en el estriado dorsomedial, presenta patrones de actividad durante el inicio, la ejecución y la transición entre secuencias de acciones, y que estos patrones de actividad son diferenciales en función del tipo de cadena de secuencias de acciones que se realice (transiciones estímulo-respuesta o autoiniciadas).
- 2) La actividad de la vía indirecta de los ganglios basales, en el estriado dorsomedial, es necesaria para la correcta ejecución de cadenas de secuencias de acciones, y es específicamente necesaria para la apropiada transición autoiniciada entre secuencias de acciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo son de crítica relevancia para refinar la idea generalizada acerca de la contribución de la vía indirecta de los ganglios basales sobre la realización de acciones postulando que la activación de esta vía es requerida para la inhibición de programas motores no deseados. Nuestros datos sustentan una noción más compleja en la cual la vía indirecta no sólo se activa para permitir la apropiada selección de la secuencia de acciones a realizar, sino que también codifica los parámetros de ejecución y, participa en el control del cambio/transición autoiniciado entre secuencias.

ANEXOS



Anexo 1. Comparación intersecuencia de los patrones de actividad para cada una de las presiones individuales. A. Patrón de actividad alineado a cada una de las presiones individuales que conforman las dos secuencias de cadenas E-R. **B** Patrón de actividad alineado a cada una de las presiones individuales que conforman las dos secuencias de cadenas autoiniciadas.



Anexo 2. Comparación de los intervalos entre presiones por secuencia para cada condición. A-F) Curvas de la distribución de los intervalos entre presiones por animal y condición en términos de frecuencia acumulada (Verde: secuencias estímulo-respuesta; Azul: secuencias autoiniciadas). **G-F)** Mediana de la duración del intervalo entre presiones por animal para la sesión de registro, por condición para cada uno de los intervalos indicados en la parte superior. (* U de Mann-Withney $p < 0.05$)

BIBLIOGRAFÍA

- Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), pp.366–375.
- Aldridge, J.W. & Berridge, K.C., 1998. Coding of Serial Order by Neostriatal Neurons : A “ Natural Action ” Approach to Movement Sequence. , 18(7), pp.2777–2787.
- Aldridge, J.W., Berridge, K.C. & Rosen, A.R., 2004. Basal ganglia neural mechanisms of natural movement sequences. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82(8–9), pp.732–739.
- Alexander, G.E. & Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences*, 13(7), pp.266–71.
- Averbeck, B.B. et al., 2002. Parallel processing of serial movements in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), pp.13172–13177.
- Barnes, T.D. et al., 2005. Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature*, 437(7062), pp.1158–1161.
- Benecke, R. et al., 1987. Disturbance of sequential movements in patients with Parkinson’s disease. *Brain*, 110(2), pp.361–379.
- Berridge, K.C. & Fentress, J.C., 1987. Disruption of natural grooming chains. , 15(4), pp.336–342.
- Cardin, J. a et al., 2010. Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. *Nature protocols*, 5(2), pp.247–254.
- Chang, H.T., Wilson, C.J. & Kitai, S.T., 1982. A Golgi study of rat neostriatal neurons: Light microscopic analysis. *The Journal of Comparative Neurology*, 208(2), pp.107–126.
- Chow, B.Y. et al., 2010. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*, 463(7277), pp.98–102.
- Cohen, J.Y. et al., 2012. Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature*, 482(7383), pp.85–88.
- Costa, R.M., Cohen, D. & Nicoletis, M.A.L., 2004. Differential Corticostriatal Plasticity during Fast and Slow Motor Skill Learning in Mice. *Current Biology*, 14(13), pp.1124–1134.
- Cui, G. et al., 2014. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494(7436), pp.238–242.
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), pp.281–285.
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences*, 13(7), pp.281–285.
- Doyon, J., 2008. Motor sequence learning and movement disorders. *Current Opinion in Neurology*, 24(4), pp.478–483.
- Durieux, P.F. et al., 2009. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward

- processes. , 12(4), pp.2008–2010.
- Durieux, P.F., Schiffmann, S.N. & de Kerchove d'Exaerde, A., 2012. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *The EMBO Journal*, 31(3), p.640 LP-653.
- Frankfurt, H.G., 1988. *The Importance of What We Care About: Philosophical Essays*, Cambridge University Press.
- Freeze, B.S. et al., 2013. Control of Basal Ganglia Output by Direct and Indirect Pathway Projection Neurons. *Journal of Neuroscience*, 33(47), pp.18531–18539.
- Gerfen, C.R., 2006. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 9(2), pp.157–158. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nn0206-157>.
- Gerfen, C.R., 1984. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, 311, pp.461–4.
- Ghilardi, M.-F. et al., 2003. Impaired sequence learning in carriers of the DYT1 dystonia mutation. *Annals of Neurology*, 54(1), pp.102–109.
- Gong, S. et al., 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature*, 425(6961), pp.917–925.
- Guo, Q. et al., 2015. Whole-Brain Mapping of Inputs to Projection Neurons and Cholinergic Interneurons in the Dorsal Striatum. *Plos One*, 10(4), p.e0123381.
- Haber, S.N., 2016. Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), pp.7–21.
- Hamilton, D.L. & Abremski, K., 1984. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *Journal of Molecular Biology*, 178(2), pp.481–486.
- Hikida, T. et al., 2010. Distinct Roles of Synaptic Transmission in Direct and Indirect Striatal Pathways to Reward and Aversive Behavior. *Neuron*, 66(6), pp.896–907.
- Hikosaka, O., Takikawa, Y. & Kawagoe, R., 2000. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological reviews*, 80(3), pp.953–978.
- Jin, X. & Costa, R.M., 2015. Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, pp.188–196.
- Jin, X., Tecuapetla, F. & Costa, R.M., 2014. Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nature neuroscience*, 17(3), pp.423–30.
- Kawaguchi, Y. et al., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18(12), pp.527–535.
- Kemp, J.M. & Powell, T.P.S., 1971. The Structure of the Caudate Nucleus of the Cat: Light and Electron Microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 262(845), pp.383–401.
- Kim, H.F., Amita, H. & Hikosaka, O., 2017. Indirect Pathway of Caudal Basal Ganglia for Rejection of Valueless Visual Objects. *Neuron*, 94(4), p.920–930.
- Kravitz, A. V et al., 2013. Control of Basal Ganglia Circuitry. , 466(7306), pp.622–626.
- Kravitz, A. V et al., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of

- basal ganglia circuitry. *Nature*, 466(7306), pp.622–626.
- Kubota, Y., Inagaki, S. & Kito, S., 1986. Innervation of substance P neurons by catecholaminergic terminals in the neostriatum. *Brain Research*, 375(1), pp.163–167.
- Lanciego, L. et al., 2012. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12).
- Lashley, K., 1951. The problem of serial order in behavior. 1951, (7), pp.112–147.
- Lavoie, B. & Parent, A., 1990. Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 299(1), pp.1–16.
- Lei, W., 2004. Evidence for Differential Cortical Input to Direct Pathway versus Indirect Pathway Striatal Projection Neurons in Rats. *Journal of Neuroscience*, 24(38), pp.8289–8299.
- Lima, S.Q. et al., 2009. PINP: A new method of tagging neuronal populations for identification during in vivo electrophysiological recording. *PLoS ONE*, 4(7).
- Martin, P., 1927. Hemichorea resulting from a location lesion of the brain (the syndrome of the body of Luys). *Brain*, 50, pp.637–651.
- McCollum, L.A., Roche, J.K. & Roberts, R.C., 2012. Immunohistochemical Localization of Enkephalin in the Human Striatum: A Postmortem Ultrastructural Study. *Synapse (New York, N.y.)*, 66(3), pp.204–219.
- Mink, J.W., 1996. the Basal Ganglia : Focused Selection and Inhibition of Competing Motor Programs. , 50.
- Mushiake, H., Inase, M. & Tanji, J., 1991. Neuronal activity in the primate premotor, supplementary, and precentral motor cortex during visually guided and internally determined sequential movements. *Journal of neurophysiology*, 66(3), pp.705–718.
- Mushiake, H., Inase, M. & Tanji, J., 1990. Selective coding of motor sequence in the supplementary motor area of the monkey cerebral cortex. *Experimental Brain Research*, 82(1), pp.208–210.
- Oldenburg, I.A. & Sabatini, B.L., 2015. Antagonistic but Not Symmetric Regulation of Primary Motor Cortex by Basal Ganglia Direct and Indirect Pathways. *Neuron*, 86(5), pp.1174–1181.
- Pellis, S.M. et al., 1993. The role of the striatum in organizing sequences of play fighting in neonatally dopamine-depleted rats. *Neuroscience Letters*, 158(1), pp.13–15.
- Qiaozhen, L. et al., 2009. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Analytical Chemistry*, 81(21), pp.8715–8723.
- Redgrave, P., Vautrelle, N. & Reynolds, J.N.J., 2011. Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: Selection and reinforcement. *Neuroscience*, 198, pp.138–151.
- Rueda-Orozco, P.E. & Robbe, D., 2015. The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nat Neurosci*, 18(3), pp.453–460.
- Sano, H. et al., 2013. Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(17), pp.7583–94.
- Schiffmann, S.N. & Vanderhaeghen, J.J., 1993. Adenosine A2 receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. *The Journal of Neuroscience*, 13(3), pp.1080–1087.

- Schultz, W. & Romo, R., 1988. Neuronal activity in the monkey striatum during the initiation of movements. *Experimental Brain Research*, 71(2), pp.431–436.
- Seidler, R.D., Tuite, P. & Ashe, J., 2007. Selective impairments in implicit learning in Parkinson's disease. *Brain Research*, 1137, pp.104–110.
- Snijders, A.H. & Bloem, B.R., 2010. Cycling for Freezing of Gait. *New England Journal of Medicine*, 362(13), p.e46.
- Tai et al., 2012. Transient stimulation of distinct subpopulations of striatal neurons mimics changes in action value. *Nat Neurosci*, 15(9), pp.1281–1289.
- Tanji, J. & Shima, K., 1994. Role for supplementary motor area cells in planning several movements ahead. *Nature*, 371(6496), pp.413–416.
- Tecuapetla, F. et al., 2014. Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nature communications*, 5, p.4315.
- Tecuapetla, F. et al., 2016. Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell*, 166(3), pp.703–715.
- Vicente, A. et al., 2015. Direct and indirect striatal projection pathways reinforce different action strategies. *Submitted*, 26(7), pp.R267–R269.
- Wall, N. et al., 2013. Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron*, 79(2), pp.347–360.
- Washburn, M.F., 1917. Movement and Mental Imagery: Outlines of a Motor Theory of the Complexer Mental Processes. *Philosophical Review*, 26(1).
- Webster, K.E., 1961. Cortico-striate interrelations in the albino rat. *Journal of Anatomy*, 95(Pt 4), p.532–544.3.
- Webster, K.E., 1965. The cortico-striatal projection in the cat. *Journal of Anatomy*, 99(Pt 2), pp.329–337.
- Wilson, S.A.K., 1925. Disorders of motility and of muscle tone. *Lancet*, ii, pp.53–62.
- Yin, H.H. et al., 2009. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature Neuroscience*, 12(3), pp.333–341.
- Yu, C. et al., 2009. Genetic deletion of A2A adenosine receptors in the striatum selectively impairs habit formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(48), pp.15100–15103.