



Facultad de Medicina



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Activación optogenética de las vías directa e indirecta de los ganglios basales: estriado dorsomedial versus dorsolateral

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA

Nisa del Carmen Cuevas Vicente

TUTOR

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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.

A mi familia

*La vida de cada hombre es un camino hacia sí mismo,
el intento de un camino, el esbozo de un sendero*

-H. Hesse

Agradecimientos Académicos

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

Agradezco enormemente a mi tutor el Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar por guiarme en la realización de este proyecto. De él aprendí cada una de las técnicas utilizadas en esta tesis y desarrollé un pensamiento crítico gracias a sus comentarios del tema.

Agradezco al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por su apoyo técnico en la manipulación de líneas de animales transgénicos y en herramientas de biología molecular, importantes para la realización del proyecto.

A los miembros del jurado que revisó la tesis: Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar, Dr. José Bargas Díaz, Dr. Rudolf Marinus Buijs, Dra. Carolina Escobar Briones y Dr. Francisco Xavier Sotres Bayón, por su retroalimentación y crítica constructiva.

A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por su ayuda en la obtención de imágenes de microscopía confocal y por su retroalimentación académica al trabajo.

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

A la Dra. Rosa Ventura Martínez, Dra. Gloria Soldevila, Dra. Guadalupe Ángeles López, M. en C. Arimelek Cortés y profesores de la LIBB que son parte importante en mi formación académica.

Esta tesis se desarrolló gracias a los Programas de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA), mediante los proyectos: IA200815 y IN2266517. Gracias a la beca de conclusión de estudios PAPIIT-DGAPA.

Agradecimientos personales

En la culminación de este trabajo crecí personal y académicamente. Al inicio del proyecto descubrí mi amor por las neurociencias y al final, la pasión por continuar respondiendo preguntas.

Gracias a mis padres Roberta Vicente y Zeferino Cuevas, por motivarme a seguir adelante. Gracias por enseñarme a luchar por mis objetivos, por confiar en mí y por ser los mejores tutores que me pudo dar la vida, por enseñarme los principios de todo científico: honestidad, confianza, perseverancia. Gracias por ser los mejores profesores de bioética, los mejores psicólogos y por brindarme los valores para ser un buen líder; por enseñarme que las personas valen más que cualquier proyecto. A mi hermana Rosa, por enseñarme a ser fuerte y mantener una sonrisa en todo momento. A mi sobrino Axel por ser mi motivación, mi estímulo positivo en momentos difíciles y por enseñarme cuales son las prioridades de mi vida.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla por guiarme en el camino de la investigación, contagiarme su entusiasmo por el trabajo. Agradezco a cada uno de los integrantes del BL-202, con los que conviví día a día mientras realizaba este proyecto y se convirtieron en mi familia. A José Luis, por enseñarme su dedicación, por ser mi apoyo en momentos difíciles y por brindarme una sonrisa a cada momento, a Argelia por mantener un ambiente positivo día a día, tu sonrisa ilumina días grises. A Iván por tu apoyo, amistad y por tu sentido del humor. Héctor, eres un ejemplo a seguir y te agradezco por tus enseñanzas, tus comentarios de apoyo y consejos. Edgar y Asai les agradezco por enseñarme y cuidarme como a una hermana menor. Kathia, por las discusiones prolongadas que acababan en pláticas y consejos. Rubén, te agradezco por enseñarme tu perspectiva y por los mejores consejos para no preocuparme de la vida.

Cada uno de ustedes es un alumno de excelencia, no pierdan nunca la motivación por hacer ciencia.

A la Dra. Rosa Ventura por enseñarme a ser organizada, responsable y por brindarme la confianza de una amiga. A Lupita por su paciencia en enseñarme desde cero, su amabilidad, optimismo y consejos tanto académicos como personales.

A la Dra. Soldevila por transmitirme su pasión por la ciencia, determinación y por enseñarme que en la ciencia no siempre tenemos los resultados que esperamos. Agradezco al laboratorio de inmunología por enseñarme a trabajar y disfrutar del trabajo, hice compañeros pero lo más importante, se convirtieron en mis amigos. A Ramsés por ser un gran técnico y amigo. A Ari por ser mi maestro, por transmitirme sus cualidades como un excelente estudiante y su amor por la investigación. A Sandra por sus enseñanzas y su optimismo, a Marisol por la motivación con la que trabaja.

Agradezco también al laboratorio AL-105 por compartir momentos divertidos como grupo. A la Dra. Yazmín por sus consejos, enseñanzas y por convertirse en una amiga. A Carlitos por su apoyo en todo momento, su amistad y su carisma en momentos difíciles.

A la Dra. Paula Licon por su apoyo, gracias por considerarme amiga de su laboratorio y abrirme sus puertas. Arely, gracias por tu amistad incondicional, tus atenciones y consejos. Eugenio, gracias por tu visión del mundo y por las sonrisas compartidas.

Agradezco a mi familia biomédica, a la Licenciada Cynthia Lima, por ayudarnos durante toda la licenciatura y a Mayra por ser parte del equipo biomédico. A mis compañeros y amigos: Fabiola, gracias por cada una de las risas compartidas, por tu apoyo, por estar siempre en momentos buenos y malos y ser la mejor compañera de equipo. Aldo y Alex, gracias por hacerme reír, por ser el equipo de foráneos más divertido. Roy, gracias por escucharme y por brindarme consejos, por preocuparte y ser un gran amigo. Ceci, gracias por tranquilizarme cada que te pedía un consejo, por ser una gran persona y ayudar en todo momento. Diego gracias por ser tan relajado y por enseñarme que vamos lento porque vamos lejos. Rodrigo, gracias por tu apoyo y por los paseos en bicicleta.

Agradezco a mis amigos: Karen por su apoyo en estos once años de amistad, a Débora por acompañarme en los mejores y peores momentos, a Emiliano por ser positivo en todo momento y motivarme, a Julio por ser un ejemplo a seguir y ser el mejor consejero, amigo y compañero de casa. A cada una de las personas que me ayudaron a darme cuenta de que quiero ser una científica exitosa, pero sobre todo, quiero ser una persona que disfruta lo que hace.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 ¿Cómo se selecciona una acción?	2
2.2 Reforzamiento de una acción	4
2.3 Aprendizaje	5
2.4 ¿Es una acción lo mismo que un movimiento?	5
2.5 Los circuitos involucrados en la selección de acciones	6
2.6 Ganglios basales.....	7
2.6.1 El núcleo subtalámico	8
2.6.2 El núcleo estriado: vía directa e indirecta	9
2.6.3 El globo pálido: segmento externo e interno	10
2.6.4 Los núcleos de salida de los ganglios basales	10
2.7 El estriado dorsomedial <i>versus</i> estriado dorsolateral: su relación con la generación de acciones en busca de objetivos y acciones habituales.....	10
2.8 El estriado dorsomedial y su participación en la codificación del valor asignado a las acciones.....	12
2.9 Otros tipos neuronales dentro del estriado	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
6. HIPÓTESIS	16
7. OBJETIVO GENERAL.....	16
7.1 Objetivos Específicos.....	17
8. MATERIALES Y MÉTODOS	17
8.1 Animales	17
8.2 Genotipificación.....	18
8.3 Expresión Viral.....	18
8.4 Cirugía estereotáxica: Inyección de virus e implantación de fibras	18
8.5 Estimulación optogenética	19
8.6 Asociación Acción-Recompensa.....	19

8.7 Adquisición de la relación acción 1 → recompensa, acción 2 → recompensa más autoestimulación.	20
8.8 Prueba para evaluar la asignación de un valor atribuido a la acción	21
8.9 Prueba para inducir la asociación de una nueva contingencia y evaluar si los animales son capaces de seguir la estimulación asociada a la acción	21
8.10 Prueba para evaluar la asignación de un valor atribuido a la acción después del ensayo reverso.....	22
8.11 Estimulación sin recompensa.....	22
8. 12 Protocolo de preferencia de lugar en tiempo real.....	23
8.13. Protocolo de cambio de movimiento: Campo abierto.....	23
8. 14 Verificación Anatómica.....	24
8.15 Análisis de datos	24
9.0 RESULTADOS	26
9.1 Animales utilizados en el estudio	26
9. 2 La autoestimulación de las neuronas del estriado DL y DM genera preferencias similares sobre la selección de acciones guiadas por reforzador..	27
9.3 Sólo los animales autoestimulados en el estriado dorsomedial mantuvieron la preferencia instaurada durante la adquisición	29
9.4 La autoestimulación de las neuronas de la vía indirecta del estriado dorsolateral no revierte la preferencia instaurada durante la adquisición	30
9.5 Los animales con autoestimulación en el estriado dorsolateral de la vía indirecta no revierten la preferencia impuesta durante la adquisición aún en ausencia de reforzador y autoestimulación	33
9.6 La autoestimulación de la vía indirecta no revierte la preferencia inicial aún en ausencia de la recompensa.	34
9.7 La autoestimulación de la vía directa y la vía indirecta en la prueba de condicionamiento de lugar en tiempo real genera preferencia y evitación de la autoestimulación respectivamente	36
9.8 La activación del estriado dorsomedial vs dorsolateral genera efectos motores diferentes	39
10. DISCUSIÓN	42
11. APORTACIONES GENERALES	49
12. BIBLIOGRAFÍA	50

Abreviaturas

AP Anteroposterior

GB Ganglios Basales

Cz Corteza

ChR2 *Channelrhodopsin 2*

DM Dorsomedial

DL Dorsolateral

DV Dorsoventral

eYFP Proteína fluorescente amarilla

GPe Globo pálido segmento externo

GPi Globo pálido segmento interno

NEMs Neuronas Espinosas Medianas

NST Núcleo subtalámico

ML Mediolateral

SNc Sustancia *nigra pars compacta*

SNr Sustancia *nigra pars reticulata*

Str Estriado

Th Tálamo

VTA Área tegmental ventral

Índice de figuras

FIGURA 1.	8
FIGURA 2.	11
FIGURA 3.	25
FIGURA 4.	26
FIGURA 5.	28
FIGURA 6.	30
FIGURA 7.	32
FIGURA 8.	34
FIGURA 9.	36
FIGURA 10.	38
FIGURA 11.	41

RESUMEN

Para llevar a cabo una acción se requiere seleccionarla y ejecutarla. Actualmente se han propuesto diferentes modelos que explican el proceso de selección de acciones y la arquitectura que debe tener el sistema que guíe este proceso. Una de las estructuras cerebrales propuestas para la selección de acciones son los ganglios basales. En el estriado, el núcleo más grande de los ganglios basales, se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas que interconectan a los ganglios basales a través de dos vías, la directa y la indirecta.

El modelo clásico del funcionamiento de las vías de los ganglios basales postula que la actividad de la vía directa promueve el movimiento, mientras que la actividad de la vía indirecta lo disminuye. Sin embargo, en trabajos recientes se han detectado inconsistencias con este modelo. Por ejemplo, en algunos estudios se ha observado que ambas vías están activadas al inicio del movimiento. Una hipótesis para explicar estas inconsistencias es que las funciones de las vías de los ganglios basales dependen del compartimento del estriado que se manipule. Para evaluar esta hipótesis, en este trabajo nos preguntamos si la activación por medio de manipulaciones optogenéticas del estriado dorsomedial *versus* el estriado dorsolateral ejerce un control diferente sobre la selección de una acción guiada por reforzador y sobre el movimiento.

Nuestros resultados sugieren que la función de las vías de los ganglios basales no se puede generalizar, sino que debe especificarse con respecto al compartimento del estriado que se estudie.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando realizamos una acción en búsqueda de un objetivo, existe integración sensorial de los fenómenos que detectamos en nuestro ambiente y coordinación motora que responde ante un evento determinado (Kropotov & Etlinger, 1999). Tanto la actividad neuronal de integración sensorial, como la actividad neuronal de respuesta motora pasan por los ganglios basales, en particular por el principal núcleo de entrada a este sistema: el estriado (Kropotov & Etlinger, 1999; Redgrave *et al.*, 1999).

Las principales vías de los ganglios basales son la vía directa y la vía indirecta. La primera proyecta del estriado a la sustancia *nigra pars reticulata* y al globo pálido segmento interno, mientras que la vía indirecta hace un relevo antes de alcanzar estos núcleos. Las vías de los ganglios basales están implicadas en el movimiento, selección de acciones y reforzamiento de conductas (Calabresi *et al.*, 2014).

En este trabajo nos preguntamos si la activación de los dos principales tipos neuronales de proyección del núcleo estriado (neuronas espinosas medianas de la vía directa e indirecta), contribuyen a la selección de una acción guiada por reforzador de manera opuesta, como se ha sugerido anteriormente (Kravitz *et al.*, 2012). Evaluamos si la activación de las neuronas estriatales de cada vía, en los diferentes compartimentos del estriado (dorsomedial y dorsolateral), tiene un efecto diferente sobre la selección de una acción guiada por reforzador y/o sobre la generación de movimiento.

El razonamiento para esta comparación de los diferentes compartimentos anatómicos del estriado, nace de la vasta literatura que reporta la participación del estriado dorsomedial en la generación de conductas en busca de un objetivo (Yin, Knowlton, *et al.*, 2005; Yin, Ostlund, *et al.*, 2005) Por otra parte, la actividad del estriado dorsolateral se considera necesaria para generar conductas habituales (Yin *et al.*, 2004, 2006).

Para lograr la activación de las neuronas estriatales como un evento asociado a una acción (presionar una palanca) expresamos la opsina ChR2 (por su nombre en inglés *Channelrhodopsin2*). Se utilizaron animales transgénicos que permitieron dirigir la expresión de ChR2 específicamente a neuronas de la vía directa (animales D1 Cre) o a neuronas de la vía indirecta (animales A2A Cre) de los ganglios basales. Las manipulaciones de actividad se realizaron sólo en una de las dos acciones que guiaban a recompensa en un protocolo de condicionamiento operante y de preferencia de lugar. También se manipuló la actividad neuronal mientras el animal se encontraba en movimiento para evaluar los cambios en el desplazamiento horizontal.

Nuestros resultados plantean un escenario de mayor complejidad que el modelo clásico de funciones antagónicas de las vías de los ganglios basales. Encontramos contribuciones específicas de cada compartimento del estriado y proponemos que la activación de la vía indirecta en el estriado dorsolateral contribuye a la instauración de acciones habituales.

2. ANTECEDENTES

2.1 ¿Cómo se selecciona una acción?

El proceso de selección de una acción requiere atención para responder a la demanda de la acción es decir, procesar preferencialmente un estímulo de toda la información que existe en el ambiente (Moray, 1970; Allport, 1980). Igualmente, se requiere de un componente motor preparatorio, que anticipe la realización de un movimiento y supresión de otros (Evarts, 1984). El proceso sensorial (atención) y el componente motor de la selección de una acción no producen una acción. Estos procesos sólo filtran entre todas las posibles opciones y dicha selección llevará posteriormente a la ejecución de una acción. Al conjunto de los procesos de atención y a la implementación motora para obtener una consecuencia se le conoce como programación de la acción (Kropotov & Etlinger, 1999).

Dentro de los diferentes modelos para explicar cómo se selecciona una acción, se postulan dos hipótesis principales. Una de estas hipótesis postula que la selección de una acción requiere la descomposición jerárquica de estímulos sensorimotrices que llevarán a ejecutar la acción (Botvinick, 2007). Otra hipótesis plantea que no existe selección de jerarquías, sino que se presenta un fenómeno de auto-organización en los sistemas neuronales. Esto significa que la organización del sistema neuronal genera una secuencia de estados atractores que llevarán a la realización de un comportamiento (Kelso, 1995).

Cuando los animales están expuestos a una selección múltiple en paralelo, la urgencia o saliencia por realizar un comportamiento dependerá de factores extrínsecos (estímulos medio ambientales) e intrínsecos (demandas del sistema biológico), por lo que se requiere de mecanismos de selección múltiple (Redgrave *et al.*, 1999).

Para resolver el problema de selección tanto en sistemas biológicos como en sistemas artificiales, se han propuesto arquitecturas especiales del sistema que ejecuta la selección de acciones. Una de las posibles arquitecturas que explican la selección de acciones, es la arquitectura de inhibición recíproca recurrente. En esta, existe una conexión recíproca de cada miembro y una conexión excitatoria al elemento de salida. Este tipo de arquitectura tiene un mecanismo de tipo *winner take all* y podemos encontrar estas conexiones en el sistema nervioso central, un ejemplo son los ganglios basales (Wickens, 1993).

Todos los organismos están expuestos a seleccionar acciones sencillas y complejas. En algunos casos se selecciona una acción sin que esta tenga una consecuencia o se desconoce la consecuencia de dicha acción. Por ejemplo, un animal selecciona entre dos caminos desconocidos. Por otra parte, otro tipo de selección de acciones se realiza con previo conocimiento del resultado de dicha acción. Por ejemplo, un animal selecciona tomar un camino específico con previo conocimiento de que ese camino cuenta con mayores recursos alimenticios. En el segundo caso, se considera que la selección se da por la existencia de un estímulo positivo. La selección de una acción guiada por un estímulo positivo

aumenta la frecuencia por realizar dicha acción, a este proceso se le denomina reforzamiento (Skinner, 1938).

2.2 Reforzamiento de una acción

El reforzamiento es el proceso de presentación de un estímulo relacionado temporalmente con otro estímulo o una respuesta. Un estímulo es capaz de aumentar, disminuir o no cambiar la frecuencia de respuesta y se denomina reforzamiento, castigo o estímulo neutro (Skinner, 1938). Para que una acción seleccionada se mantenga en eventos posteriores, debe existir un mecanismo que refuerce la acción seleccionada, maximizando la acción que lleva a una recompensa y disminuyendo las acciones que llevan a castigos. Este proceso se conoce como la ley del efecto (Thorndike, 1898). Una acción se selecciona en función de la consecuencia inmediata con la que se asocia y el reforzamiento incrementa la probabilidad de que se repita la conducta del animal en eventos futuros (Thorndike, 1898; Skinner, 1938). El estímulo puede reforzar cuando es presentado por primera vez o a través de condicionamiento (Skinner, 1938).

La autoestimulación de ciertas regiones del cerebro es reforzante. Los trabajos de Olds & Milner, 1954 fueron los primeros en utilizar protocolos de autoestimulación para estudiar el reforzamiento de una conducta. En estos experimentos, el animal recibía estimulación cada que realizaba una acción (presionar una palanca), por lo tanto, tenía el control de las estimulaciones que recibía. Los estudios demostraron que la autoestimulación del área septal aumentó la frecuencia con la que los animales presionaban la palanca. Esta acción no tenía otro reforzador además de la estimulación. Recientemente, se ha estudiado la autoestimulación de las vías de los ganglios basales y los resultados demuestran que la autoestimulación de la vía directa es reforzante. Sin embargo, los resultados no son tan claros para la vía indirecta, pues se ha observado que la autoestimulación puede causar evitación en algunos casos y reforzamiento en otros (Kravitz *et al.*, 2012; Vicente *et al.*, 2016). Para entender mejor la asociación entre una acción y su consecuencia es necesario definir aprendizaje y condicionamiento.

2.3 Aprendizaje

El aprendizaje es la capacidad para modificar una acción en consecuencia de la experiencia previa. Esta modificación de la conducta involucra estímulos y/o respuestas específicas, que se van almacenando en la memoria cada vez que realizamos una acción (Domjan, 2010). El aprendizaje se puede llevar a cabo por medio de condicionamiento estímulo-estímulo (condicionamiento clásico) (Pavlov, 1927; Turkkán, 1989) o por medio de condicionamiento estímulo-respuesta (Thorndike, 1898, 1911; Catania, 1999). El condicionamiento se refiere a los procedimientos para establecer una relación entre una acción y su consecuencia (Domjan, 2010).

En el aprendizaje por condicionamiento instrumental, el organismo tiene que actuar sobre el medio para conseguir una consecuencia (Thorndike 1898, 1911). En este tipo de aprendizaje se pueden establecer dos fases: (I) aprendizaje del evento que tiene una consecuencia e identificación de la consecuencia (II) descubrir una acción que lleve a esa consecuencia (Schwartz, 1980). Desde los primeros estudios de condicionamiento operante (Thorndike, 1911) se mostró que el reforzamiento de una acción requiere de un reforzador. En el reforzamiento positivo, la respuesta es seguida de un estímulo deseable y produce un incremento en la tasa de respuestas (Domjan, 2010).

2.4 ¿Es una acción lo mismo que un movimiento?

Una acción se define como el proceso de hacer algo para lograr un objetivo. Tomar un vaso de agua es un ejemplo de una acción, el objetivo de esta acción es tomar el agua que se encuentra dentro del vaso. Una acción puede estar constituida de un solo movimiento, como moverse horizontalmente de derecha a izquierda para alcanzar un punto. Sin embargo, puede estar compuesta de varios movimientos o secuencias de movimientos (Grammont, 2010).

La hipótesis de programación de una acción (Kropotov & Etlinger, 1999) propone que la acción se divide en:

- 1) Proceso de selección: Selección, iniciación, preparación y supresión de acciones.
- 2) Consolidación de la acción en una unidad.
- 3) Realización de la acción y almacenamiento del resultado en forma permanente.
- 4) Reconstrucción de la acción.
- 5) Descomposición del movimiento que es parte de la acción.

De los puntos descritos anteriormente, observamos que el movimiento voluntario forma parte sólo de una etapa en la programación de una acción. Para realizar acciones se requiere de uno o varios movimientos o secuencias de movimientos para lograr un objetivo.

2.5 Los circuitos involucrados en la selección de acciones

Como se mencionó anteriormente, la programación de una acción requiere su división en diferentes fases y en cada una de ellas intervienen circuitos neuronales específicos (Kropotov & Etlinger, 1999). Una acción incluye una fase de selección/iniciación de una acción y su implementación con movimientos específicos.

Pensemos en la manera de alcanzar un vaso de agua. Podemos alcanzarlo rápido o lento, siguiendo una trayectoria específica e incluso evitando algún obstáculo para poder alcanzar dicho vaso. Estas acciones diferentes conducirían al mismo objetivo que es beber el agua dentro del vaso, pero dependiendo de las condiciones uno selecciona qué acción realizar para alcanzar el objetivo. Se reconoce a los ganglios basales y a los circuitos tálamo-corticales como los substratos fisiológicos en los que se lleva a cabo la selección de acciones (Mink, 1996; Redgrave *et al.*, 1999; Gurney *et al.*, 2001; Grillner *et al.*, 2005; Hikosaka, 2005; Humphries *et al.*, 2006).

Por otro lado, los circuitos neuronales involucrados en el control del movimiento se pueden dividir en cuatro subsistemas y cada uno de estos tiene contribuciones únicas para la ejecución de movimientos (Purves, 2004). El primer subsistema involucrado en el control motor son los circuitos locales en la médula espinal y tallo

cerebral. Aquí participan las neuronas motoras primarias inferiores que promueven el movimiento de músculos así como neuronas locales (Burke *et al.*, 1977; Sherrington, 1947). El segundo subsistema está compuesto por neuronas del tallo cerebral y de la corteza cerebral, estas neuronas participan en el control de movimientos voluntarios. Los núcleos del tallo cerebral que participan en el control del movimiento son el núcleo vestibular, la formación reticular, el colículo superior y el núcleo rojo. (Purves, 2004). La corteza motora primaria, el área premotora y la corteza premotora medial son importantes en el proceso de planeación de movimientos voluntarios (Evarts, 1981). Las neuronas motoras del tallo cerebral participan regulando tono muscular, orientación del cuerpo con respecto a la información sensorial percibida (Purves, 2004). El cerebelo es el tercer componente clave en el control motor, participa detectando errores motores entre el intento de un movimiento y el movimiento realizado (Eccles, 1967). El cuarto subsistema que participa en el control del movimiento son los ganglios basales para una correcta iniciación (selección) del movimiento (Alexander, 1986; Redgrave *et al.*, 1999; Rubchinsky *et al.*, 2003; Grillner *et al.*, 2005; Humphries *et al.*, 2006).

2.6 Ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales que comprenden al núcleo estriado (formado por el caudado y putamen en primates), globo pálido segmento externo (GPe) y segmento interno (GPi), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y *pars reticulata* (SNr) (Ver **Figura 1**). Los ganglios basales interactúan con la corteza cerebral a través del tálamo y también modulan la actividad de núcleos del tallo cerebral (Nelson *et al.*, 2015). Los ganglios basales son un sistema altamente conservado, identificándose sus componentes desde moscas, lampreas y aves (Grillner & Robertson, 2016).

Además, se sabe que en diferentes enfermedades y síndromes en humanos, como la enfermedad de Parkinson, de Huntington, síndrome de Tourette, síndrome obsesivo compulsivo, así como en adicciones a drogas se presentan

2.6.2 El núcleo estriado: vía directa e indirecta

El núcleo estriado recibe proyecciones glutamatérgicas de prácticamente todas las cortezas (Cz→Str) y del tálamo (Th→Str) (Ver **figura 1**; Alexander, 1986; Smith, 2004; Berendse & Groenewegen 1990, Ragsdale & Graybiel 1991). Cortezas específicas y diferentes núcleos del tálamo proyectan a compartimentos específicos del estriado (los diferentes compartimentos se abordaran más adelante). El estriado también recibe entradas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y del área tegmental ventral (VTA), así como entradas serotoninérgicas de los núcleos del *raphe* (Steinbusch, 1981) y proyecciones del sistema histaminérgico del hipotálamo (Haas, 2003).

Las neuronas estriatales de proyección se subdividen en dos clases: 1) Neuronas espinosas medianas de la vía indirecta que proyectan a núcleos intermedios de los ganglios basales (GPe y NST) y se caracterizan por expresar marcadores moleculares como el receptor a dopamina tipo 2 (D2) (Ver **figura 1**; Gerfen *et al.*, 1990) o el receptor a adenosina tipo 2 (A2A) (Schiffmann & Vanderhaeghen, 1993). 2) El segundo tipo neuronal de proyección del estriado está constituido por neuronas espinosas medianas de la vía directa que proyectan a los núcleos de salida de los ganglios basales (SNr y GPi) y se caracterizan por expresar el receptor a dopamina tipo 1 (D1) (Ver **figura 1**; Gerfen *et al.*, 1990). Ambos tipos neuronales son de naturaleza GABAérgica (Kita & Kitai, 1988).

Esta división en dos tipos neuronales es muy importante para explicar las funciones del estriado y su respuesta ante la liberación de dopamina proveniente del cerebro medio (Calabresi *et al.*, 2014). La dopamina activa cascadas de señalización por proteínas G que para el caso de los receptores de dopamina del tipo I culmina en una modulación positiva de la actividad de las neuronas estriatales de la vía directa. Por otro lado, la dopamina ejerce un efecto inhibitorio sobre la activación de los receptores a dopamina tipo 2 (Surmeier *et al.*, 2007; Planert *et al.*, 2013).

2.6.3 El globo pálido: segmento externo e interno

Dentro de los GB existe un núcleo que interconecta a prácticamente todos los núcleos de este sistema. Este núcleo es el globo pálido segmento externo (GPe), que recibe entradas excitatorias del núcleo subtalámico e inhibitorias de la vía indirecta (Ver **figura 1**). El GPi recibe entradas excitatorias del núcleo subtalámico e inhibitorias de la vía directa. Ambos segmentos del globo pálido contienen neuronas de proyección gabaérgicas (Kita & Kita 2001; Mallet *et al.*, 2012).

2.6.4 Los núcleos de salida de los ganglios basales

Los núcleos de salida de los ganglios basales son el globo pálido interno (GPi o GPM en roedores) y la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr), estos reciben entradas inhibitorias del estriado y excitatorias del núcleo subtalámico (Nelson & Kreitzer, 2014). También recibe entradas del núcleo tegmental pedúnculo pontino (Edley & Graybiel, 1983) y del globo pálido segmento externo (Sato *et al.*, 2000). Tanto la SNr como el GPi influyen la actividad de la corteza a través de su proyección hacia el tálamo (GB→Th→Cz) (Parent & Parent, 2004) y hacia núcleos del tallo cerebral como el colículo superior y el núcleo pedúnculo pontino (Hikosaka, 2007; Benarroch, 2013) que juegan un papel fundamental en la regulación del movimiento.

2.7 El estriado dorsomedial versus estriado dorsolateral: su relación con la generación de acciones en busca de objetivos y acciones habituales

Los ganglios basales y el estriado se han dividido de acuerdo a sus funciones y por las entradas que reciben de diferentes cortezas en: límbico (motivacional, emocional), asociativo (cognitivo) y sensorimotor como resultado de diferentes estudios en humanos y primates no humanos. Estas divisiones se pueden identificar de manera anatómica en estriado ventral (motivacional: núcleo accumbens), estriado dorsomedial (asociativo) y el estriado dorsolateral (sensorimotor) (Alexander, 1986; Draganski *et al.*, 2008 Ver **figura 2**).

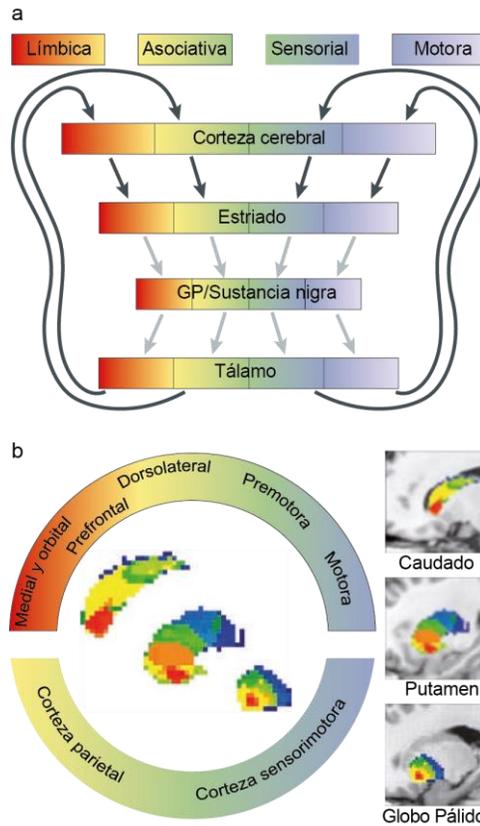


Figura 2. (A) Conexiones de la corteza con los ganglios basales, permitiendo una segregación anatómica a lo largo de los núcleos de los ganglios basales. **(B)** Segregación rostro-caudal de las entradas de diferentes cortezas al núcleo estriado (caudado y putamen). Esquema tomado de Redgrave, 2011.

El estriado y su relación con el aprendizaje instrumental han sido ampliamente estudiados (Balleine *et al.*, 2009). La idea que domina el campo de los ganglios basales es que el estriado dorsomedial es necesario para generar acciones dirigidas a conseguir objetivos (Yin, Knowlton, *et al.*, 2005; Yin, Ostlund, *et al.*, 2005) y el estriado dorsolateral es necesario para generar acciones habituales (Yin *et al.*, 2004, 2006).

Una acción se considera dirigida a un objetivo, cuando se asume que el actor estima la consecuencia (valor: positivo o negativo) de la respuesta por realizar dicha acción (Adams & Dickinson, 1981; Dickinson & Balleine, 1994). Por otro lado, se piensa que una acción se genera de manera habitual cuando la

realización de la acción es insensible a la devaluación de la consecuencia de realizar dicha acción (Yin & Knowlton, 2006).

Se ha observado que al lesionar el estriado dorsomedial (mediante neurotoxinas o con farmacología) se bloquea la capacidad de los sujetos a realizar acciones guiadas por objetivos (Yin, Knowlton, *et al.*, 2005; Yin, Ostlund, *et al.*, 2005). Por otro lado, lesiones en el estriado dorsolateral imposibilitan que los animales realicen acciones habituales (Yin *et al.*, 2004, 2006). Por ejemplo, al inactivar el área asociativa del estriado, se daña la adquisición de secuencias motoras nuevas, pero deja intactas las secuencias aprendidas. Sin embargo, al dañar el estriado sensorimotor, se ven afectadas sólo las secuencias aprendidas (Miyachi *et al.*, 1997). También se ha demostrado (en primates no humanos) que existe actividad neuronal en la parte asociativa del estriado cuando los animales aprenden una secuencia motora nueva. Similarmente, existe actividad en el área sensorimotora cuando los animales realizan una acción aprendida (Miyachi *et al.*, 2002).

2.8 El estriado dorsomedial y su participación en la codificación del valor asignado a las acciones

Como parte del proceso de selección de acciones en la búsqueda de una consecuencia, se piensa que el actor estima el valor de la respuesta de diferentes acciones y selecciona aquella con valor más alto. Esto es basado en el modelo que asume que los actores realizan acciones guiados por un valor memorizado de dicha acción. Es un tipo de selección de acciones guiadas por reforzador.

El núcleo caudado en primates (estriado dorsomedial en roedores) está estrechamente relacionado con el proceso de estimación del valor de una acción. Participa evaluando la respuesta obtenida ante una acción y actualizando el valor a dicha acción. Esto se sabe por experimentos en primates, los animales fueron entrenados a recibir una recompensa grande o una pequeña. Para recibir la recompensa se solicitó al animal realizar una de dos acciones, una acción lo llevaba con mayor probabilidad a obtener una recompensa grande y la otra acción

a obtener la recompensa pequeña. La probabilidad con que dichas acciones estuvieron asociadas con el tamaño de la recompensa se presentó en bloques y los animales tuvieron que seleccionar la acción en función de la probabilidad de obtener recompensa grande. De este estudio se identificó que la actividad neuronal en el núcleo caudado respondió a cambios en el valor de la acción (Samejima, 2005). También se logró identificar que algunas neuronas tienen actividad predictiva (Lau & Glimcher, 2008). Inspirados por este trabajo, recientemente se realizaron estudios en roedores, en los que se manipuló de manera específica la actividad de las neuronas estriatales de la vía directa *versus* la vía indirecta. La conclusión de estos experimentos es que la activación de las vías estriatales controla de manera opuesta la selección de una acción. La estimulación de la vía directa es reforzante, mientras que la estimulación de la vía indirecta causó evitación. El efecto de la manipulación de las vías estriatales es dependiente de la historia previa con la que se obtuvo una recompensa (Tai *et al.*, 2012).

Así, tenemos que la selección de acciones puede ser guiada por reforzador. En los modelos de reforzamiento operante se postula que el animal tiene que estimar el valor de una acción, seleccionar la acción y actualizar el valor de la acción con la respuesta obtenida (Rescorla & Wagner, 1972; Mikhael & Bogacz, 2016; Schultz *et al.*, 1997). El hecho de que las vías estriatales contribuyan de manera opuesta sobre la selección de acciones guiada por reforzador, concuerda con la propuesta de que el sistema dopaminérgico del cerebro medio codifica la presencia o ausencia de acciones recompensadas (Schultz, 2007). Se propone que dicho sistema tiene un efecto opuesto sobre el disparo de las neuronas estriatales de proyección (Surmeier *et al.*, 2007; Gerfen & Surmeier, 2011; Planert *et al.*, 2013; Ketzef *et al.*, 2017).

2.9 Otros tipos neuronales dentro del estriado

Además de las neuronas estriatales que constituyen las vías de proyección: la vía directa y la vía indirecta, dentro del estriado existen interneuronas colinérgicas y varios tipos de interneuronas GABAérgicas. Actualmente se han descrito cinco

tipos de interneuronas GABAérgicas y se diferencian por sus propiedades electrofisiológicas, morfológicas y bioquímicas en poblaciones que expresan una de las siguientes moléculas: parvalbúmina, somatostatina, calretinina, neuropéptido Y y tiroxina hidroxilasa (Tepper, 2010).

2.10 Modelos funcionales de las vías estriatales

El modelo clásico de las vías directa e indirecta de los ganglios basales propone que la corteza (motora, premotora, sensorial) activa a las neuronas espinosas medianas (NEMs) del estriado que proyectan hacia la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) y globo pálido segmento interno (GPi) en lo que se conoce como la vía directa (Ver **Figura 1**). Las NEMs son de naturaleza GABAérgica, así que su activación inhibe a las neuronas de la SNr que también son GABAérgicas. La inhibición de las neuronas de la SNr desinhibe a las neuronas del tálamo que son glutamatérgicas y proyectan hacia la corteza (Calabresi *et al.*, 2014). Evidencia experimental sustenta que la activación de las neuronas estriatales de la vía directa promueve el movimiento (Kravitz, 2010).

Por otro lado, la vía indirecta consta de NEMs que proyectan al GPe. La inhibición del GPe que tiene neuronas GABAérgicas da como resultado la desinhibición de las neuronas glutamatérgicas del NST. En consecuencia, la activación del NST activa a las neuronas GABAérgicas de la SNr que proyectan hacia el tálamo (Calabresi *et al.*, 2014). La activación de las neuronas estriatales de la vía indirecta en el estriado disminuye el movimiento (Kravitz *et al.*, 2010).

La evidencia directa que sustenta la función antagónica de las vías de los ganglios basales sobre el control motor proviene de un estudio en el que por medio de activación optogenética (estriado dorsomedial) de la vía directa, incrementaron la deambulación y los movimientos finos de los animales. En ese mismo estudio, la activación de la vía indirecta disminuyó los movimientos ambulatorios e incrementó el estado de congelamiento de los animales (Kravitz *et al.*, 2010). El mismo grupo de investigadores observó que la autoestimulación de las neuronas de la vía directa ejerce un efecto reforzante sobre la acción asociada a la

autoestimulación. Sin embargo, la autoestimulación de las neuronas de la vía indirecta indujo evitación por realizar la acción asociada a autoestimulación, aunque los resultados de de esta vía no son tan marcados. (Kravitz, 2012).

Aunque el modelo clásico de las vías de los ganglios basales propone que las vías participan de manera opuesta en la generación de movimientos, existe evidencia actual apoyando un modelo funcional de cooperación entre las dos vías para el inicio de una acción (Cui *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014; Tecuapetla *et al.*, 2016). Incluso existe un reporte mostrando que la autoestimulación de la vía directa y de la vía indirecta está asociada de manera positiva a la realización de una acción, enfatizando que la sensibilidad de cada vía es diferente. La activación optogenética de neuronas de la vía directa provoca que los animales sean sensibles a la detección de cambios en el entorno (Vicente *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento se han estudiado a las vías directa e indirecta de los ganglios basales de manera general, a pesar de la evidencia experimental que muestra la contribución diferente de cada uno de los compartimentos del estriado sobre la selección de acciones guiada por reforzador. Por lo tanto, en esta tesis comparamos de manera sistemática la contribución de cada compartimento (dorsomedial y dorsolateral) de las vías estriatales sobre la selección de acciones guiadas por reforzador y sobre el control del movimiento.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para evaluar si las neuronas de la vía directa e indirecta en cada compartimento del estriado contribuyen de diferente manera sobre la selección de acciones y sobre el control del movimiento, nos planteamos comparar la contribución de su activación en el estriado dorsomedial *versus* el estriado dorsolateral.

Consideramos que la respuesta a esta problemática puede resolver algunas de las inconsistencias entre los modelos funcionales que explican la contribución de las vías directa e indirecta de los ganglios basales.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La activación de las neuronas de la vía directa e indirecta en los compartimentos del estriado tiene contribuciones diferentes sobre la selección de una acción guiada por reforzador y sobre el movimiento?

6. HIPÓTESIS

Dado que la activación del estriado dorsomedial *versus* dorsolateral de las vías directa e indirecta tienen una contribución diferente dependiendo del compartimento activado, entonces habrá diferencias sobre la selección de acciones guiada por reforzador y sobre el movimiento.

7. OBJETIVO GENERAL

Comparar la activación del estriado dorsomedial *versus* dorsolateral analizando la consecuencia de esto sobre la selección de acciones guiadas por reforzador y sobre el movimiento.

7.1 Objetivos Específicos

1. Determinar las diferencias por la activación del estriado dorsomedial vs dorsolateral de las vías directa e indirecta de los GB sobre la selección de acciones guiada por reforzador, en una prueba de condicionamiento operante.
2. Evaluar las diferencias por la activación del estriado dorsomedial vs dorsolateral de las vías de los GB en un protocolo de preferencia de lugar en tiempo real.
3. Determinar las diferencias generadas por la activación del estriado dorsomedial vs dorsolateral de ambas vías de los GB sobre el desplazamiento horizontal, en una prueba de campo abierto.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Animales

Se utilizaron líneas de ratones transgénicos BAC que expresan la enzima Cre recombinasa bajo el promotor del receptor de dopamina D1 (D1-Cre EY217) y de adenosina A2A (A2A-Cre KG139). Los ratones transgénicos BAC se cruzaron con ratones silvestres C57BL/6J, para obtener ratones homocigotos. En este estudio se utilizaron ratones machos y hembras de 8 a 12 semanas (D1-cre: n=16 experimentales, n=12 controles, A2A-cre: n=17 experimentales, n=8 controles).

Los animales se alojaron en el bioterio y *vivarium* del Instituto de Fisiología Celular durante su reproducción y fase experimental respectivamente, bajo condiciones reguladas de temperatura (22°), humedad y ciclo de luz oscuridad (12h/12h) se les dio agua y alimento *ad libitum*. En el período experimental los animales se mantuvieron en un 80% de su peso. Todos los estudios siguieron el protocolo N° FTA03-14 aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

8.2 Genotipificación

Al día 21 postnatal se separó la camada y se obtuvieron muestras de tejido provenientes de la cola de los animales, con el objetivo de extraer el ADN. La extracción se realizó con un kit (*Thermo SCIENTIFIC*) y posteriormente se realizó una PCR amplificando la secuencia de la enzima Cre-recombinasa.

8.3 Expresión Viral

Se utilizó un vector de virus adenoasociado del serotipo 1 para la opsina ChR2-eYFP y a los animales control se les infectó con un vector viral que contiene solamente la proteína reportera amarillo fluorescente eYFP.

8.4 Cirugía estereotáxica: Inyección de virus e implantación de fibras

Se indujo anestesia con 4% de isoflurano y se mantuvo con 1% isoflurano y oxígeno (1 L/min) mediante un sistema de anestesia (*E-Z Anesthesia*) acoplado al aparato estereotáxico (*David Kopf Instruments*), regulando la temperatura del animal (*Physitemp Instruments*). Después de limpiar y depilar la zona cefálica, se expuso el cráneo del animal y se limpió con agua oxigenada (10%). Una vez que el cráneo quedó completamente alineado, se realizaron trépanos bilateralmente utilizando un taladro dental (*marathon SDE-H355P1*) con las siguientes coordenadas: para dorsomedial +0.5 mm anteroposterior (AP), ± 1.6 mm mediolateral (ML); para dorsolateral +0.5mm AP, ± 2.5 mm ML, respecto a bregma (Paxinos, 2013).

El virus DIO-ChR2-eYFP o DIO-eYFP (500 nL) se inyectó a 4.6 nL cada 5 segundos a una velocidad de 23 nL/s (9 minutos para el virus total) bilateralmente en el estriado dorsomedial y dorsolateral (-2.3 mm dorsoventral, tomando como cero el cerebro del animal), en una micropipeta de borosilicato (*Drummond scientific*, 25 μ m) acoplado a un nano-inyector (*Nanoject II Drummond Scientific*). Se dejó la pipeta en el cerebro del animal 15 min después de finalizar la inyección, para permitir la difusión del virus. Después de infectar los dos hemisferios, se implantaron fibras ópticas de 200 μ m de diámetro (para algunos animales de 300 μ m), elaboradas manualmente (Sparta *et al.*, 2011). Finalmente se cubrió el

cráneo del animal con cemento y acrílico dental (*Ortho jet*) y se mantuvo en recuperación de 4 a 7 días (Ver **figura 3**).

8.5 Estimulación optogenética

En las fases experimentales, el animal fue implantado con fibras ópticas acopladas a las fibras previamente colocadas en el cerebro del animal. Las fibras se cubrieron con cinta negra para evitar la salida de luz. Para la implantación, se anestesió con isoflurano al animal por un período corto de tiempo (~1 min) y se permitió la recuperación de la anestesia por 10 minutos antes de iniciar cada prueba. Los animales fueron estimulados con luz azul (470 nm de longitud de onda) proveniente de un Led (*Doric Instruments*). En cada prueba varían los protocolos de estimulación.

8.6 Asociación Acción-Recompensa

Pre-entrenamiento: La sesión de pre-entrenamiento se realizó con el objetivo de que el animal identificara el comedero y asociara que en este lugar recibiría recompensa. Un día antes de exponer a los animales a la caja de comportamiento operante, se les pesó (este peso se tomó como el 100%) y se redujo el alimento, para llevar a los animales a un 80-90% de su peso. El día uno en la cámara de comportamiento operante se les dio una sesión de 30 minutos a cada uno. En este intervalo de tiempo los animales recibieron aleatoriamente recompensas de *pellets* (comprimidos alimenticios de 14mg c/u *Bio Serv*) en el comedero de la caja, ubicado en la parte central de la misma.

Reforzamiento continuo 15 (CRF 15): La sesión de reforzamiento continuo duró 30 minutos, en esta prueba se presentó una palanca en la cámara de comportamiento operante, ubicada a la derecha o izquierda del comedero. El animal recibió un *pellet* como recompensa cada que realizó una acción (presionar la palanca). La sesión terminó cuando el animal realizó 15 veces la acción o finalizaron los 30 minutos de la sesión. La presentación de la palanca derecha e izquierda en la sesión de CRF15 se realizó en la misma proporción para todos los animales.

Reforzamiento continuo 30 (CRF 30): Los animales pasaron por una segunda sesión de reforzamiento continuo en la misma palanca a la que fueron expuestos anteriormente. Sin embargo, en esta sesión se les pidió que realizaran 30 veces la acción asociada a recompensa. Al igual que en la sesión previa, el animal recibió una recompensa cada que presionó la palanca. Esta sesión tuvo como objetivo fortalecer la asociación acción-recompensa.

Reforzamiento continuo 30 con cambio de palanca (CRF 30): En esta última sesión, se presentó la palanca contraria a la que fueron expuestos previamente. Esta sesión de reforzamiento continuo duró media hora y terminó cuando el animal realizó 30 veces la acción asociada a la recompensa es decir, pudo conseguir hasta 30 recompensas de *pellets*. En esta sesión se esperaba que el animal reconociera la otra palanca y asociara que esta también le daría recompensa. Esta etapa de entrenamiento tuvo el objetivo de que los animales no desarrollaran preferencia por una palanca, pues en las pruebas siguientes el animal estuvo expuesto a las dos palancas.

8.7 Adquisición de la relación acción 1 → recompensa, acción 2 → recompensa más autoestimulación.

Durante la fase de adquisición los animales realizaron 4 o 7 sesiones, cada sesión duró 30 minutos y se expusieron ambas palancas. Al inicio del protocolo experimental se realizaron cuatro sesiones y no se observó disminución en la frecuencia de respuesta. Por este motivo, se extendió el protocolo a siete sesiones, que también respondió si la conducta se revertía a pesar de más días de asociación.

El animal recibió un *pellet* como recompensa por cada acción realizada. Ambas acciones (presionar palanca izquierda o presionar palanca derecha) dieron recompensa, sin embargo sólo una acción dio estimulación de luz azul (470 nm) de 2 segundos por cada presión (Ver **figura 5A**) La palanca que dio estimulación fue contraria a la expuesta en la última sesión de CRF30. Todas las sesiones fueron vídeograbadas. En la fase de adquisición se evaluó si el animal fue capaz de identificar que al realizar una acción recibiría autoestimulación y si prefería

realizar la acción asociada a autoestimulación (vía directa) o por el contrario, la evitaba (vía indirecta). Esta hipótesis está sustentada en trabajos previos que muestran que la autoestimulación de la vía directa es reforzante y de la vía indirecta genera evitación (Kravitz *et al.*, 2012; Tai *et al.*, 2012).

8.8 Prueba para evaluar la asignación de un valor atribuido a la acción

Para evaluar la posible modificación del valor asignado a una acción se han diseñado paradigmas en los que se instaura una relación entre una acción y una consecuencia (fase de adquisición; acción→reforzador). Después, se evalúa la posible modificación del valor asignado a dicha acción en ausencia del reforzador. Se denomina extinción a aquella prueba que evalúa los efectos de la adquisición en ausencia de reforzador (Domjan, 2010) y existe evidencia que muestra que la extinción no elimina lo que se aprendió en la fase de adquisición (Bouton & Woods, 2008).

El ensayo de extinción duró 10 minutos, durante esta sesión se expusieron las dos palancas sin embargo, ahora ninguna de las acciones dio recompensa y el animal no recibió autoestimulación (Ver **figura 6A**) En esta sesión, se preguntó al animal si en ausencia de recompensa y autoestimulación mantenía su preferencia por una de las palancas, como consecuencia de una asociación acción+recompensa+autoestimulación en la fase de adquisición. Para el análisis de la prueba de extinción se tomaron los primeros cinco minutos de la prueba.

8.9 Prueba para inducir la asociación de una nueva contingencia y evaluar si los animales son capaces de seguir la estimulación asociada a la acción

Para preguntar si los animales realizan las acciones guiados por una consecuencia y no de manera habitual, es necesario realizar un cambio en la contingencia entre la acción y su consecuencia (Redgrave *et al.*, 2010). Por lo tanto, decidimos realizar una prueba de inversión de la acción asociada a autoestimulación. La acción que era guiada únicamente por la presentación de recompensa ahora fue seguida por la presentación de recompensa+autoestimulación (**Figura 7A**). La fase de ensayo reverso constaba

de 4 o 7 sesiones, cada una duró 30 minutos. En cada sesión se expusieron las dos palancas, cada acción (presionar una palanca) dio como recompensa un *pellet* y sólo una de las acciones dio adicionalmente estimulación de luz azul. En este protocolo, se cambió la acción asociada a autoestimulación es decir, el animal debió presionar la palanca contraria a la que daba estimulación en la fase de adquisición. Mediante esta prueba se preguntó al animal si fue capaz de identificar la nueva acción que lo llevaba a recibir estimulación y cambiaba su preferencia (vía directa) o evitación (vía indirecta) por la autoestimulación.

8.10 Prueba para evaluar la asignación de un valor atribuido a la acción después del ensayo reverso

El ensayo de extinción duró 10 minutos, se presentaron las dos palancas en la caja de comportamiento operante, el animal no recibió estimulación ni recompensa al realizar cualquiera de las dos acciones evaluadas (Ver **figura 8A**). Con esta sesión respondimos si el animal identificó el cambio en la acción asociada a autoestimulación y fue capaz de mantener esta nueva preferencia (vía directa) o evitación (vía indirecta) en ausencia de recompensa y estimulación. Para el análisis de la prueba sólo se tomaron los primeros cinco minutos de la prueba.

8.11 Estimulación sin recompensa

De los resultados obtenidos nos preguntamos si el valor de la recompensa *per se* competía con la estimulación. Para responder esto, se expuso al animal a una sesión de 30 minutos, se presentaron las dos palancas y una de éstas dio estimulación de luz azul de dos segundos por cada presión que realizó el ratón. Ninguna de las acciones llevó a recibir una recompensa de *pellets*. Este experimento nos permitió identificar si la recompensa modificaba la preferencia o evitación por la autoestimulación.

Para el caso de la vía indirecta este protocolo fue más largo. Se realizaron dos sesiones en ausencia de recompensa, posteriormente se evaluó la asociación de los animales en ausencia de estimulación. Por último se cambió la contingencia de la palanca asociada a autoestimulación en dos sesiones más (Ver **figura 9A–C**).

8. 12 Protocolo de preferencia de lugar en tiempo real

Para responder si los animales preferían (vía directa) o evitaban (vía indirecta) la autoestimulación en otra prueba conductual que no involucrara la obtención de recompensa, se realizó el protocolo de preferencia de lugar en tiempo real. En este protocolo la acción asociada a autoestimulación fue diferente, la acción a realizar era desplazarse hacia un cuadrante que daba autoestimulación.

Este protocolo constaba de 5 sesiones, cada sesión tuvo una duración de 15 minutos. En la fase de adquisición se expuso por primera vez al animal a una caja cuadrada (40 cm de largo x 40 cm de ancho y 31 cm de altura). Se eligió al azar un cuadrante de la caja. Por medio de un programa de detección del cuerpo del animal, se dio estimulación cada que el animal realizó la acción de desplazar su cuerpo hasta el cuadrante seleccionado y se mantuvo en movimiento dentro del mismo. El animal estuvo expuesto a dos sesiones en las que se mantuvo en la misma posición el cuadrante que dio estimulación. Durante la tercera sesión no se dio autoestimulación de luz azul, por lo que se le preguntó al animal si fue capaz de asociar la acción que previamente lo llevaba a recibir autoestimulación. Por último, se cambió el cuadrante asociado a autoestimulación y se expuso al animal dos sesiones (Ver **figura 10A-C**). Con esto, preguntamos al animal si detectaba el cambio en la acción que lo guiaba a recibir estimulación y modificaba su conducta ya sea prefiriendo (vía directa) o evitando (vía indirecta) el cuadrante asociado a estimulación.

8.13. Protocolo de cambio de movimiento: Campo abierto

Se evaluaron los efectos de la activación optogenética de cada compartimento del estriado en cada una de las vías, sobre el movimiento del animal (midiendo el desplazamiento horizontal) mediante la prueba de campo abierto. Se evaluó únicamente el desplazamiento del animal, ya que existe evidencia que muestra el papel de las vías de los ganglios basales en la modulación de movimiento (Kravitz, 2010).

Se colocó al ratón en una caja de acrílico de 40 cm x 40 cm, con una altura de 31 cm. La sesión tuvo una duración de diez minutos, se presentó una estimulación cada minuto (un tren de pulsos de luz azul de 10 segundos) con pulsos de 20 Hz de frecuencia (Ver **figura 11A**). La siguiente pregunta que surgió fue si el estado de movimiento del animal en el momento que recibía estimulación tenía influencia en el comportamiento motor observado. Para hacer un análisis más fino, separamos los ensayos en los que un segundo antes de recibir estimulación el animal estaba realizando poco movimiento (ensayos de poco movimiento) y en los que un segundo antes de recibir estimulación el animal realizaba mayor movimiento (ensayos de mayor movimiento).

8. 14 Verificación Anatómica

Al finalizar todos los experimentos, los animales fueron anestesiados con ketamina/xilacina (85%-15%) por vía intraperitoneal. Cuando el animal entró en anestesia profunda se procedió con la perfusión. Primero se expuso la cavidad torácica del animal, permitiendo acceso al corazón, se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo y por medio de un sistema de perfusión se administraron aproximadamente 15 mL de PBS al 0.1M, después se administró PFA (paraformaldehído) al 4% para fijar el tejido. Se extrajo cuidadosamente el cerebro del animal y se colocó en PFA al 4% por 24 horas. El cerebro se cambió a PBS al 0.1M y se colocó en un bloque agar al 4%. Se obtuvieron rebanadas coronales de 100 µm de grosor por medio del *Vibratome Series 1000* de *Ted Pella, Inc*.

Las rebanadas se montaron en un portaobjetos y se utilizó Hoescht (20 µg/ mL) como medio de montar para marcar los núcleos de las células. Por último, se realizó la verificación anatómica por medio de un microscopio de epifluorescencia que permitió observar la fluorescencia de la proteína ChR2-eYFP y eYFP.

8.15 Análisis de datos

Se utilizaron programas de MEDPC que permitieron contabilizar el número de presiones realizadas durante cada sesión de las pruebas conductuales así como el número de recompensas obtenidas. Para el campo de preferencia de lugar y

campo abierto se realizó un análisis de la trayectoria de cada animal dentro de la caja. Para esto se utilizó el programa *Mouse Tracker* y se realizó un análisis del centro de masa del animal. El programa detectó el momento en que el animal recibía estimulación ya que en el ensayo se adquiere también una señal visual pareada al estímulo. Los análisis de tiempo de permanencia en el cuadrante con estimulación y el cambio en el desplazamiento del animal se realizaron con *Matlab*. Se utilizó el programa *Graph Pad Prism 6* para comparar todos los datos obtenidos tanto en el comportamiento operante como para el análisis de campo de preferencia de lugar y campo abierto. Las pruebas estadísticas utilizadas son U de Mann-Whitney y para el caso de los ensayos pareados prueba de Wilcoxon, se indica en el texto.

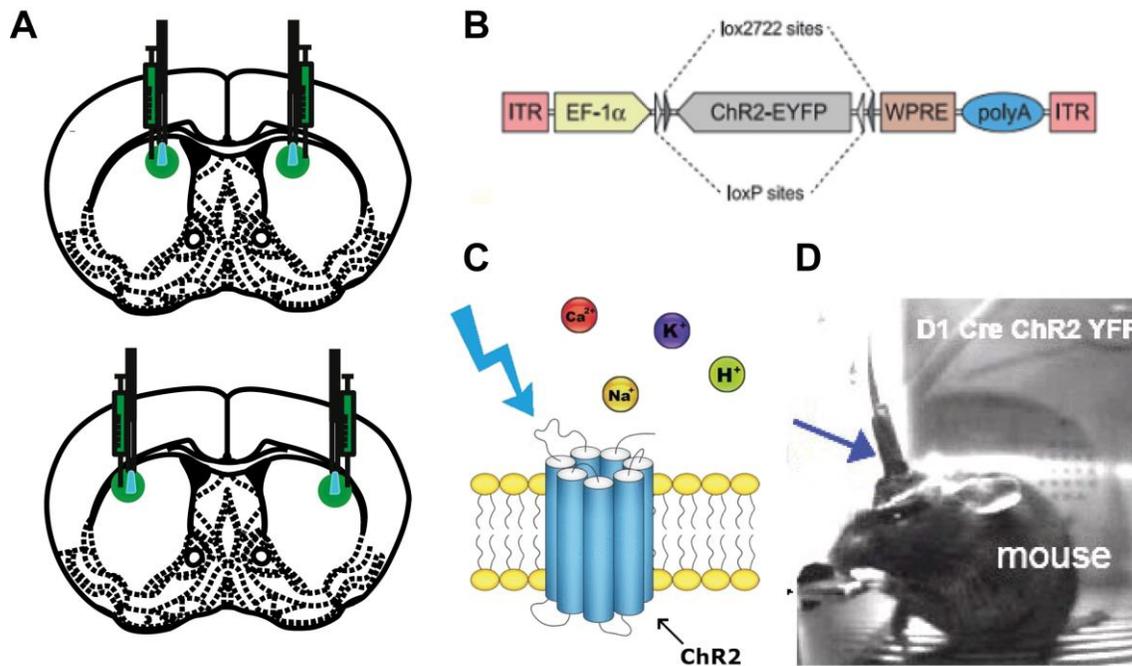


Figura 3. Esquema representativo de manipulaciones optogenéticas. (A) Sitio de inyección de virus e implantación de fibras. (B) Constructo del vector viral con *Channelrhodopsin*. (C) Representación de la función de *Channelrhodopsin*. (D) Animal con manipulaciones optogenéticas realizando la tarea conductual.

9.0 RESULTADOS

9.1 Animales utilizados en el estudio

Implantamos animales D1 Cre o A2A Cre en el estriado dorsolateral (DL) o dorsomedial (DM) (D1 Cre ChR2-eYFP: DM n=9, DL n=7; A2A Cre ChR2-eYFP: DM n=11, DL n=6) (**Figura 4A-B**). El mismo procedimiento se realizó para los grupos control (D1 Cre eYFP: DM n=6, DL n=6; A2A Cre eYFP: DM n=4, DL n=4) (**Figura 4A-B**).

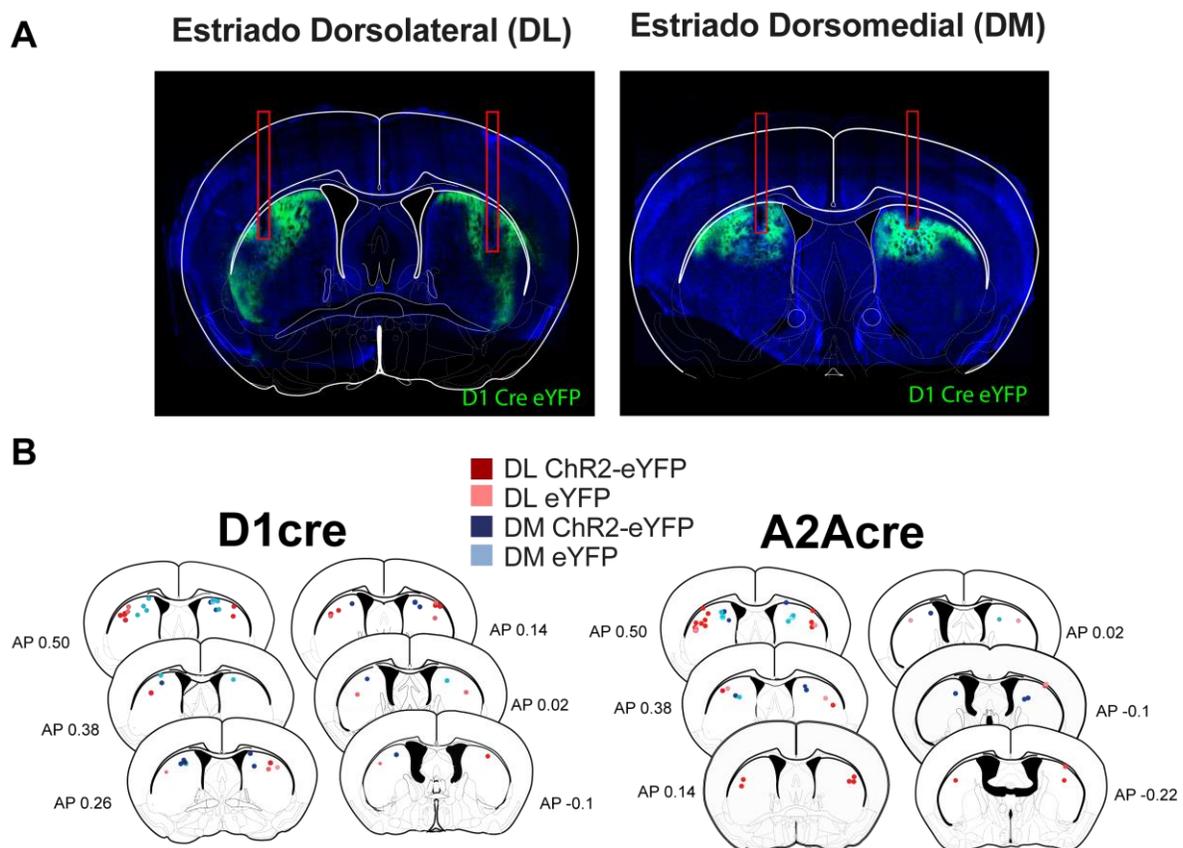


Figura 4. Sitio anatómico de manipulaciones optogenéticas. **(A)** Imagen representativa de la expresión de eYFP y sitio de implantación de fibras ópticas en el estriado dorsolateral (izquierda) y el estriado dorsomedial (derecha) de un animal D1 Cre, el cuadro rojo indica la trayectoria de las fibras ópticas. **(B)** Esquemas representando los sitios donde se ubicó la punta de la fibra óptica para los diferentes grupos experimentales (D1 Cre ChR2-eYFP: DM n=9, DL n=7; A2A Cre ChR2-eYFP: DM n=11, DL n=6) y grupos control (D1 Cre eYFP: DM n=6, DL n=6; A2A Cre eYFP: DM n=4, DL n=4).

9. 2 La autoestimulación de las neuronas del estriado DL y DM genera preferencias similares sobre la selección de acciones guiadas por reforzador

Observamos que los animales experimentales, ya sea con manipulación en el estriado dorsomedial o dorsolateral, realizaron un mayor número de veces la acción asociada a autoestimulación+recompensa (presionar palanca con autoestimulación) a lo largo de la prueba de adquisición (**Figura 5 D**; DL n=7 animales, 4 tuvieron 4 sesiones, 3 siete sesiones; DM n=9 animales, 7 tuvieron 4 sesiones y 2 tuvieron 7 sesiones; comparación promedio de todas las sesiones; $p < 0.05$, U de Mann-Whitney). Además, mantuvieron esta preferencia hasta la última sesión de adquisición (**Figura 5 E**; DL n =7; DM n=9 $p < 0.05$, U de Mann-Whitney) mostrando un cociente mayor comparado con los controles (**Figura 5 D-E**; $p < 0.05$ U de Mann-Whitney).

Contrario a lo observado con la vía directa, la autoestimulación de las neuronas de la vía indirecta en ambos compartimentos del estriado causó evitación por la acción asociada a la recompensa+autoestimulación. El cociente del número de presiones en la palanca asociada a autoestimulación+recompensa entre la palanca asociada sólo a recompensa se mantuvo por debajo de uno para ambos compartimentos. Esto indica que los animales evitaron realizar la acción asociada a autoestimulación a lo largo de la prueba de adquisición (**Figura 5 H**; DL n=11, 4 tuvieron 4 sesiones, 7 tuvieron 7; DM n=6 2 tuvieron 4 sesiones y 4 tuvieron 7 sesiones; comparación promedio de todas las sesiones; $p < 0.05$ U de Mann-Whitney) y se mantuvo hasta la última sesión de adquisición (**Figura 5 I**; DL n=11; DM n=6 ; $p < 0.05$ U de Mann-Whitney). Se observó un cociente menor comparado con los animales control (**Figura 5D-E**; $p < 0.05$ U de Mann-Whitney).

La activación de las neuronas de la vía directa e indirecta, independiente del compartimento manipulado generó preferencia en el caso de la vía directa y evitación en el caso de la vía indirecta durante la fase de adquisición.

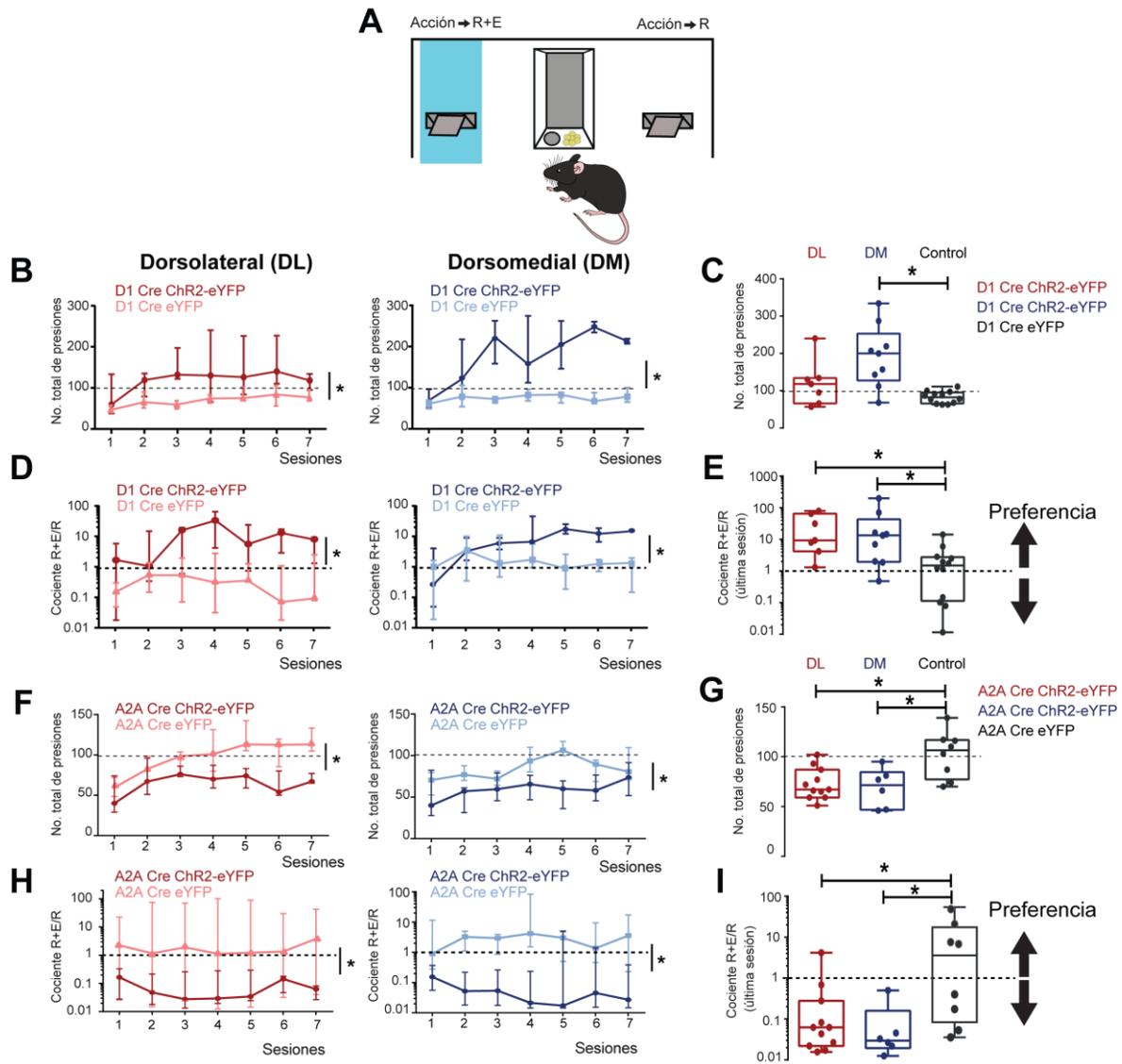


Figura 5. La autoestimulación de neuronas de la vía directa induce preferencia por la acción asociada a la autoestimulación+recompensa, mientras que la activación de la vía indirecta induce evitación. **(A)** Esquema de la tarea conductual durante la fase de adquisición. **(B)** Presiones totales durante sesiones de 30 minutos cuando los animales D1 Cre fueron autoestimulados en el estriado dorsolateral (izquierda) y en el estriado dorsomedial (derecha). **(C)** Número de presiones en el último día de adquisición. **(D)** Cociente del número de presiones de la palanca que presentó autoestimulación+recompensa (acción->R+E) entre la palanca que presentó sólo recompensa (acción) de los datos presentados en B. **(E)** Misma relación que en D presentando únicamente la última sesión. **(F-I)** Misma presentación que en B-E, en este caso para animales A2A Cre. * $p < 0.05$; Prueba U de Mann-Whitney.

9.3 Sólo los animales autoestimulados en el estriado dorsomedial mantuvieron la preferencia instaurada durante la adquisición

En la sesión de extinción, observamos que sólo los animales con activación en el estriado dorsomedial de la vía directa mantuvieron preferencia por realizar la acción que estuvo asociada a autoestimulación+recompensa en la fase de adquisición (**Figura 6C**; ChR2-eYFP DM n=9, $p < 0.05$ Prueba de Wilcoxon). Por otra parte, los animales con manipulación en el estriado dorsolateral perdieron esta preferencia, es decir, no identificaron la acción que los guiaba a recibir autoestimulación en sesiones previas (**Figura 6B**, ChR2-eYFP DL n=7, $p > 0.05$ Prueba de Wilcoxon). Los animales manipulados en el estriado dorsolateral vs el dorsomedial no presentaron diferencias en el número total de presiones realizadas durante la fase adquisición, por lo que descartamos que uno de los grupos haya estado más expuesto a la recompensa o autoestimulación (**Figura 5 B y C**, DM n=9 DL n=7 $p > 0.05$ U de Mann-Whitney).

De manera similar, sólo los animales que recibieron autoestimulación de la vía indirecta en el estriado dorsomedial durante la fase de adquisición, mantuvieron la preferencia por realizar la acción no asociada a autoestimulación (evitaron realizar la acción que guiaba a autoestimulación) en la sesión de extinción (**Figura 6E**, $p < 0.05$ ChR2-eYFP DM n=6 Prueba de Wilcoxon). Este efecto es contrario al de los animales manipulados en el estriado dorsolateral (**Figura 6D**, ChR2-eYFP DL n=11 $p > 0.05$ Prueba de Wilcoxon).

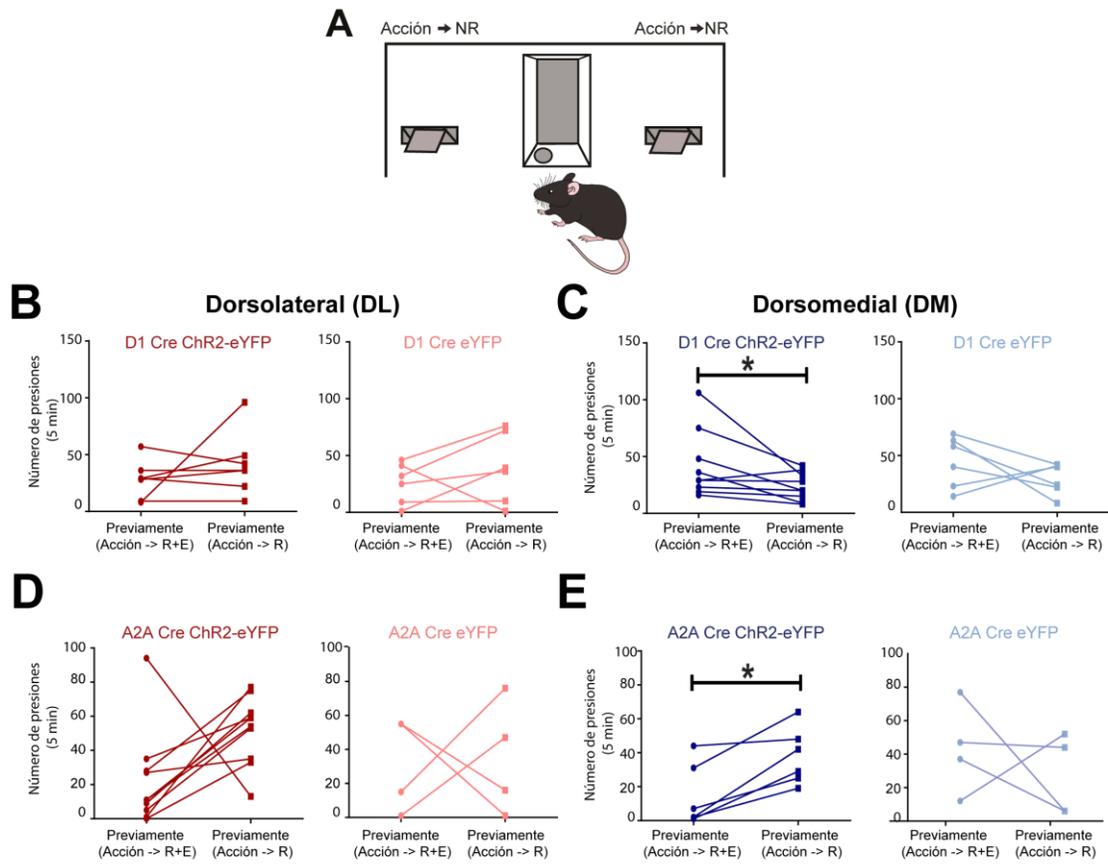


Figura 6. Durante la prueba de extinción sólo los animales autoestimulados en el estriado dorsomedial mostraron una preferencia positiva (D1 Cre ChR2-eYFP) o negativa (A2A Cre ChR2-eYFP) por la acción asociada a la autoestimulación+recompensa (Acción->R+E) en sesiones previas. (A, B, C y D) Número de presiones realizadas durante 5 min, en ausencia de autoestimulación y recompensa, para los animales expresando ChR2-eYFP del lado izquierdo, y sus respectivos animales control (expresando sólo eYFP) del lado derecho (D1Cre ChR2-eYFP: DM n=9, DL=7; D1Cre-eYFP: DM n=6, DL=6; A2A Cre ChR2-eYFP: DM n=6, DL=11; A2ACre-eYFP: DM n=4, DL=4 * $p < 0.05$; Prueba de Wilcoxon).

9.4 La autoestimulación de las neuronas de la vía indirecta del estriado dorsolateral no revierte la preferencia instaurada durante la adquisición

En el ensayo de inversión, observamos que los animales en los que se autoestimuló a las neuronas de la vía directa, mostraron un cambio en su preferencia como consecuencia de la inversión de la acción asociada a autoestimulación+ recompensa (Figura 7D-E; DM n=9, DL n=7 $p < 0.05$ U de

Mann-Whitney). Sus respectivos controles continuaron realizando por igual ambas acciones (**Figura 7D-E**; DM n=6, DL n=6 $p > 0.05$ U de Mann Whitney).

Cuando realizamos el mismo experimento en los animales que recibieron autoestimulación de la vía indirecta, sólo los animales con manipulación en el estriado dorsomedial lograron identificar el cambio y evitaron realizar la acción asociada a autoestimulación a lo largo de la fase del ensayo reverso (**Figura 7H** DM n=6 $p < 0.05$; Prueba U de Mann Whitney). Los animales con manipulación en el estriado dorsolateral no identificaron el cambio en la contingencia (**Figura 7H** DL n=11 $p > 0.05$; Prueba U de Mann Whitney). Esta diferencia conductual por manipulación en el estriado dorsomedial vs dorsolateral fue evidente hasta la última sesión del ensayo de inversión de palancas (**Figura 7 I** ChR2 DM n=6, DL n=11; eYFP DM n=4, DL N=4, $p < 0.05$; Prueba U de Mann Whitney).

Los resultados del ensayo reverso muestran que los animales con manipulaciones en el estriado dorsomedial y dorsolateral de la vía directa fueron capaces de identificar un cambio en la contingencia y cambiar su preferencia inicial. Sin embargo, los animales manipulados en la vía indirecta mostraron diferencias conductuales dependiendo del compartimento manipulado. Fueron capaces de identificar y cambiar su preferencia inicial para el caso de los animales con activación del estriado dorsomedial. Por el contrario, los animales manipulados en el estriado dorsolateral no actualizaron el cambio en la contingencia.

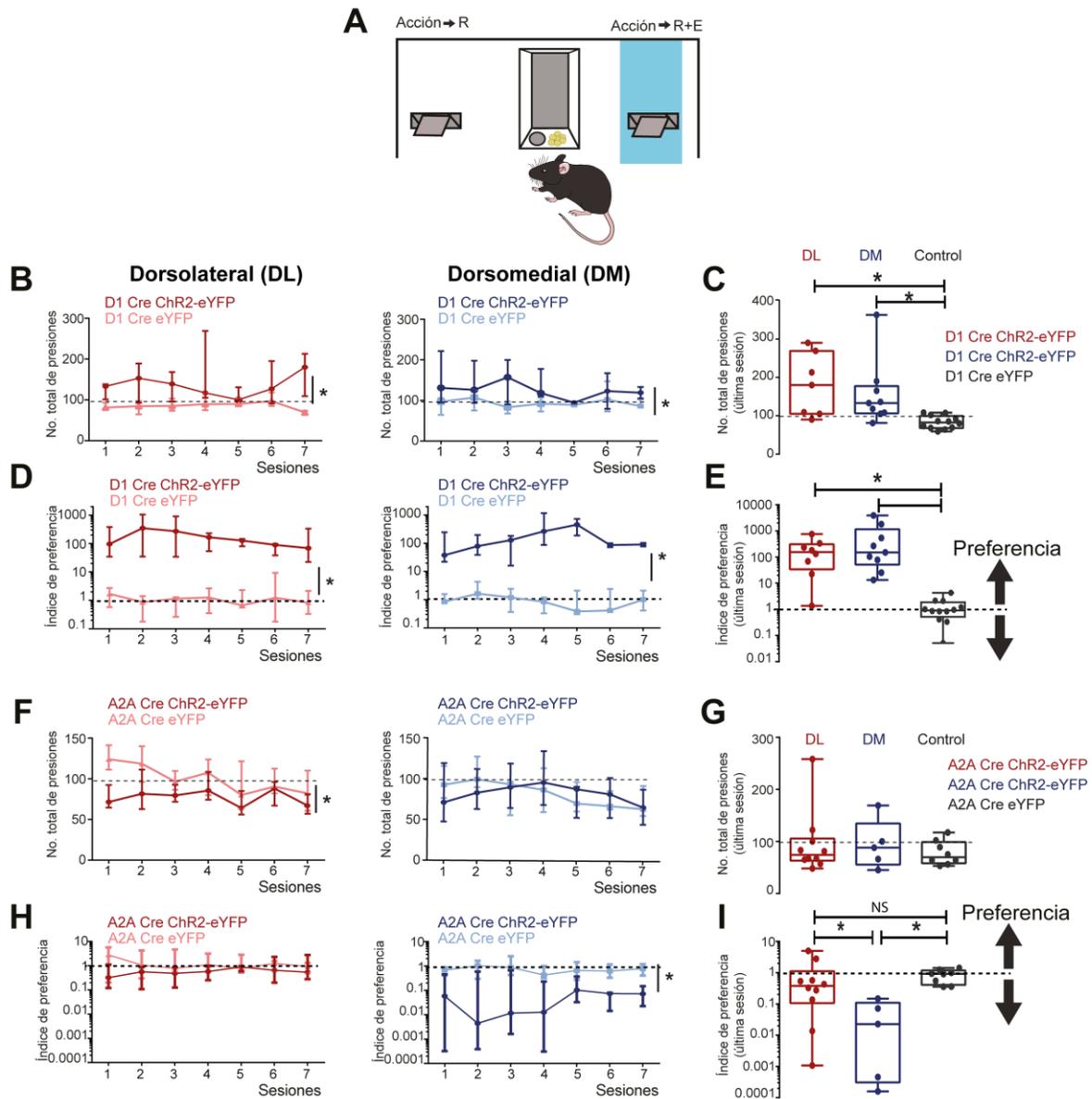


Figura 7. La autoestimulación de las neuronas de la vía indirecta del estriado dorsolateral no revierte la acción asociada a la autoestimulación (**A**) Esquema de la tarea conductual durante la fase del ensayo reverso (**B**) Presiones totales durante sesiones de 30 minutos cuando los animales D1 Cre fueron autoestimulados en el estriado dorsolateral (derecha) y en el estriado dorsomedial (izquierda). (**C**) Número de presiones en la última sesión del ensayo reverso. (**D**) Índice de preferencia = Cociente del número de presiones de la palanca que presentó autoestimulación+recompensa (acción->R+E) entre la palanca que presentó sólo recompensa (acción) normalizado a la última sesión de adquisición. (**E**) Cociente de la última sesión del ensayo reverso presentado en D (**F-I**) Misma presentación que en B-E, en este caso para animales A2A Cre. * $p < 0.05$; Prueba U de Mann-Whitney.

9.5 Los animales con autoestimulación en el estriado dorsolateral de la vía indirecta no revierten la preferencia impuesta durante la adquisición aún en ausencia de reforzador y autoestimulación

Como observamos previamente, los animales con autoestimulación en la vía indirecta en la fase de adquisición evitaron presionar la palanca con autoestimulación. Estos animales realizaron en promedio el mismo número de presiones (Ver **Figura 5 H, I**) es decir, estuvieron expuestos en igual medida a recibir un número similar de veces la autoestimulación. Realizamos el protocolo de extinción seguido del ensayo reverso sólo para los animales A2A Cre. Los animales con estimulación en el estriado dorsolateral en la fase del ensayo reverso mantuvieron la preferencia impuesta desde la fase de adquisición. No cambiaron esta preferencia aún en ausencia de recompensa y autoestimulación en comparación con sus animales control (**Figura 8B**; $n=7$; $p<0.05$ Prueba de Wilcoxon). De manera preliminar, los tres animales con autoestimulación en el estriado dorsomedial identificaron el cambio en la contingencia. La preferencia que se cambió en el ensayo reverso se mantuvo en ausencia de recompensa y autoestimulación, aunque es necesario aumentar el número de animales en este ensayo (**Figura 8C**).

La preferencia adquirida por la acción que guía sólo a recompensa (o evitación de la autoestimulación) durante la fase de adquisición se revirtió únicamente en los animales con autoestimulación en el estriado dorsomedial. Una vez instaurada esta preferencia, los animales con manipulaciones en el estriado dorsolateral no identificaron el cambio en la contingencia.

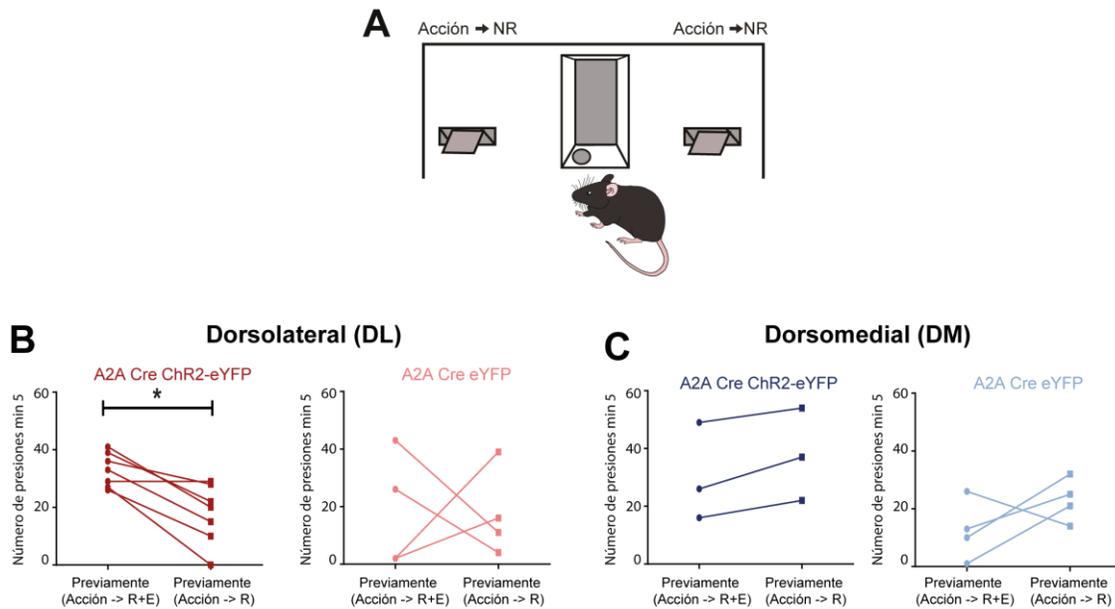


Figura 8. La autoestimulación de las neuronas de la vía indirecta del estriado dorsolateral no revierte la acción asociada a la autoestimulación en ausencia del reforzador y la autoestimulación. **(A)** Esquema de la prueba de extinción. **(B)** Número de presiones al minuto 5 del ensayo de extinción, después del ensayo reverso para animales A2A Cre con estimulación previa en el estriado dorsolateral (A2Acre ChR2-eYFP DL n=7; DM n=3; A2Acre-eYFP DL n=4; DM n=4) **(C)** Igual que en A, con estimulación previa en el estriado dorsomedial. *p< 0.05 Prueba de Wilcoxon.

9.6 La autoestimulación de la vía indirecta no revierte la preferencia inicial aún en ausencia de la recompensa.

En la vía indirecta sólo los animales con manipulación en el estriado dorsomedial identificaron el cambio en la contingencia. Esto nos llevó a preguntarnos si el valor de la recompensa *per se* competía con la autoestimulación, la cual parecía evaluarse como un estímulo negativo. Para responder esto, se realizó el mismo protocolo, en ausencia de recompensa.

La palanca asociada a autoestimulación en las primeras dos sesiones de esta fase fue la misma que en la fase de adquisición (presión→autoestimulación+recompensa). Al evaluar el cociente del número de presiones realizadas en la palanca asociada a autoestimulación entre la palanca que no guiaba a estimulación, se observó que ambos grupos (estriado dorsomedial y dorsolateral), evitaron la autoestimulación, aunque es necesario aumentar el número de

animales. (Figura **9D y G**, ChR2 DL; n=10 animales, 6 animales con 2 sesiones; eYFP DL n= 6; ChR2 DM n=3 animales, 2 con dos sesiones; eYFP DM controles n=4).

En este mismo protocolo, durante la prueba de extinción de la autoestimulación (**Figura 9B**), se observó que los animales con manipulación en el estriado dorsolateral realizaron más veces las acción que previamente les dio autoestimulación y evitaron presionar esta palanca aún en ausencia de autoestimulación (**Figura 9 E y H**). Esta asociación no la observamos en el primer ensayo de extinción, después de la adquisición inicial (**Figura 7**) y solamente en ausencia de recompensa se logra ver este efecto.

En el protocolo de ausencia de recompensa se observó que los animales con manipulaciones en el estriado dorsomedial son sensibles a detectar este cambio. Sin embargo, los animales con manipulación en el estriado dorsolateral continuaron realizando la acción que prefirieron desde la fase de adquisición (**Figura 9 F, I**).

Los resultados obtenidos muestran que la recompensa *per se* juega un papel importante y pudiera competir con la autoestimulación. La preferencia que los animales con manipulaciones en el estriado dorsolateral adquirieron en un principio de su desempeño conductual (fase de adquisición) se mantuvo a lo largo de las sesiones. Por otro lado, sólo los animales con manipulaciones en el estriado dorsomedial identificaron los cambios aún en ausencia de recompensa.

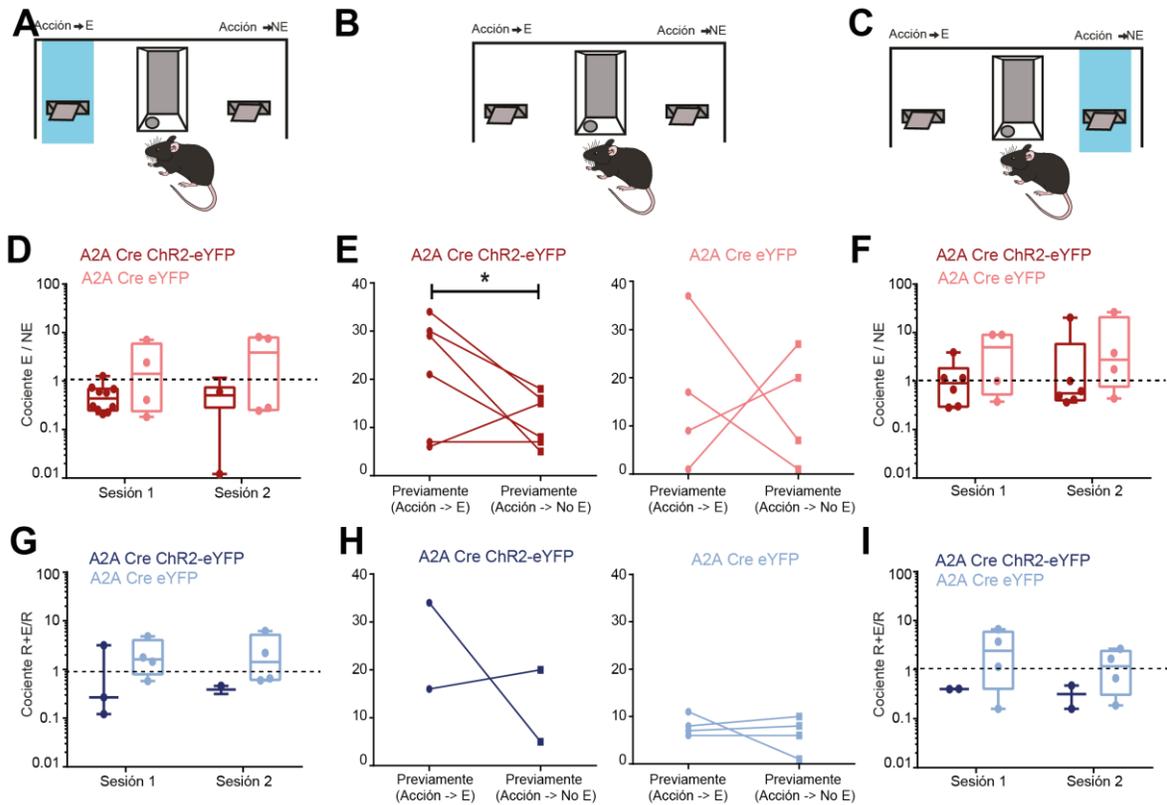


Figura 9. La autoestimulación de la vía indirecta no revierte la preferencia inicial aún en ausencia de la recompensa. **(A-C)** Esquemas de la prueba conductual de cada columna. **(D)** Cociente del número de presiones realizadas en la palanca asociada a estimulación entre la palanca que sin estimulación de animales con manipulación en el estriado DL, en cada sesión de la prueba. **(E)** Número total de presiones al minuto diez del ensayo de extinción (ausencia de estimulación) de animales con manipulaciones en el estriado DL. **(F)** Cociente como en D para las sesiones en las que se cambió la acción asociada a autoestimulación. **(G-I)** Igual que D-F para animales con manipulación en el estriado dorsomedial. (A2A Cre Chr2 DL; n=10 animales, 6 con 2 sesiones; DM n=3 animales, 2 con dos sesiones; A2A Cre eYFP DL n= 6; DM controles n=4 *p<0.05 Prueba de Wilcoxon).

9.7 La autoestimulación de la vía directa y la vía indirecta en la prueba de condicionamiento de lugar en tiempo real genera preferencia y evitación de la autoestimulación respectivamente

En el protocolo de preferencia de lugar en tiempo real, los animales con manipulaciones en la vía directa identificaron el cuadrante en donde recibieron estimulación y pasaron más tiempo en este. Esta preferencia se observó en la manipulación de los dos compartimentos del estriado dorsomedial y dorsolateral (**Figura 10G**, n=7 para DL y n=9 para DM; n=6 para DL eYFP, n=6 DM eYFP

* $p < 0.05$; Prueba U de Mann Whitney). Al realizar la misma prueba en ausencia de autoestimulación, no se observan diferencias en el tiempo de permanencia en el cuadrante que dio autoestimulación en comparación con los otros cuadrantes, para ninguno de los compartimentos (**Figura 10 H**, $n=7$ para DL y $n=9$ para DM $p > 0.05$; Prueba U de Mann Whitney). Cuando se cambió el cuadrante en el que los animales recibieron autoestimulación, ambos grupos identificaron el cambio y permanecieron más tiempo en el nuevo cuadrante asociado a la autoestimulación (**Figura 10 I** $p < 0.05$; Prueba U de Mann Whitney).

Por otro lado, la activación de neuronas de la vía indirecta causó el efecto opuesto. Los animales con manipulaciones ya sea en el estriado dorsomedial o dorsolateral evitaron realizar la acción asociada a la autoestimulación, por lo que pasaron menos tiempo en el cuadrante asociado a autoestimulación (**Figura 10 J y M**, $n=10$ para DL y $n=5$ para DM; $n=4$ para DL eYFP y $n=4$ para DM eYFP $p < 0.05$; Prueba U de Mann Whitney). Al igual que los animales D1, las manipulaciones en la vía indirecta no mantuvieron el efecto en ausencia de la autoestimulación (en este caso de evitación (**Figura 10 K y N**, $n=10$ para DL y $n=5$ para DM $p > 0.05$; Prueba U de Mann Whitney). Sin embargo, identificaron el cambio en el cuadrante con estimulación y cambiaron su comportamiento para evitar el cuadrante nuevo con autoestimulación. No se reportaron diferencias entre los efectos por manipulación de estriado dorsolateral *versus* dorsomedial (**Figura 10 L y O**, $n=10$ para DL y $n=5$ para DM $p < 0.05$; Prueba U de Mann-Whitney).

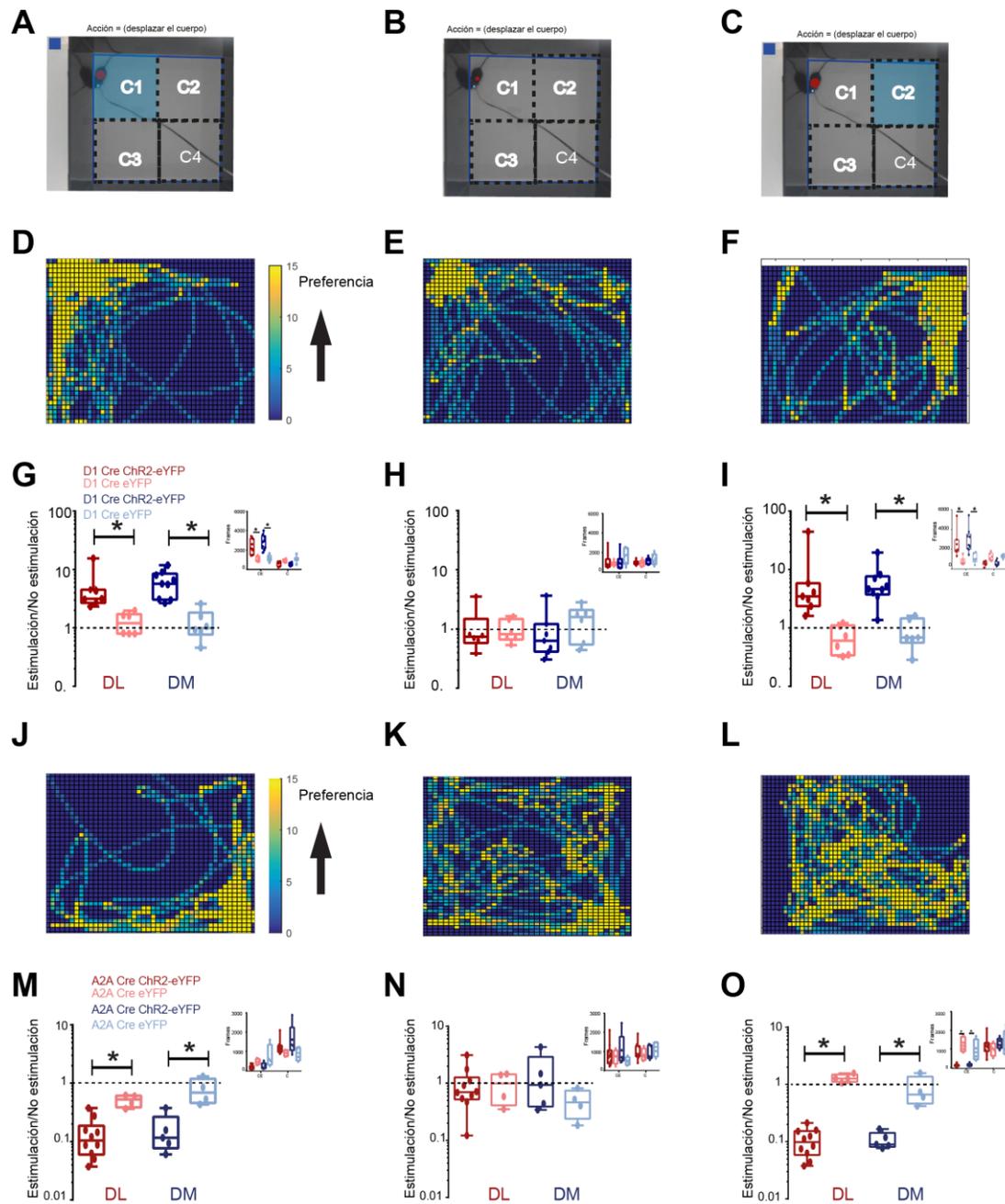


Figura 10. La autoestimulación de la vía directa e indirecta en ambos compartimentos induce preferencia por la acción asociada a la autoestimulación en la prueba de campo de preferencia de lugar. **(A-C)** Representación gráfica de los protocolos de autoestimulación en cada columna. **(D-F)** Gráfico de color mostrando el desplazamiento de un animal D1 Cre en los protocolos mostrados en A-C. **(G)** Cociente del número de *frames* en el cuadrante de estimulación entre el número de *frames* en los cuadrantes sin estimulación durante dos sesiones consecutivas. **(H)**. Cociente como en G pero en ausencia de estimulación. **(I)** Igual que G, en este caso cambiando la estimulación a otro cuadrante. **(J-O)** Igual que D-I en animales A2A Cre.

9.8 La activación del estriado dorsomedial vs dorsolateral genera efectos motores diferentes

En los experimentos de campo abierto, observamos que la activación de la vía directa en el estriado dorsolateral disminuyó el desplazamiento horizontal del animal. Este efecto fue significativo desde los primeros cinco segundos de estimulación (**Figura 11 B**, $n=7$ para dorsomediales; controles eYFP, $n=12$ $p<0.05$ U de Mann-Whitney). Sin embargo, no observamos efecto por la estimulación de la vía directa en el estriado dorsomedial (**Figura 11B**; dorsomediales $n=9$, controles eYFP, $n=12$, $p>0.05$ U de Mann-Whitney). Al analizar los primeros 5 segundos de estimulación en los ensayos de poco movimiento se observó un decremento del desplazamiento por estimulación del estriado dorsolateral (**Figura 11C**; DL ChR2-eYFP $n=7$, eYFP, $n=12$, $p<0.05$; U de Mann-Whitney). La activación del estriado dorsolateral mantuvo a los animales en un estado de poco movimiento al recibir la estimulación. Por otra parte, los animales con estimulación en el estriado dorsomedial aumentaron su movimiento, incluso por arriba de los animales control (**Figura 11C**, 4 segundos color oscuro; DM ChR2-eYFP $n=9$, eYFP, $n=12$ $p<0.05$ U de Mann-Whitney). De manera similar, en los ensayos de mayor movimiento el efecto general observado por activación del estriado dorsolateral fue disminución en el desplazamiento horizontal del animal. Sin embargo, no observamos un efecto por la activación de las neuronas de la vía directa en el estriado dorsomedial (**Figura 11D**, $p>0.05$, U de Mann-Whitney).

Al comparar los efectos de la estimulación en los diferentes compartimentos del estriado en los animales A2A Cre ChR2-eYFP y sus controles, observamos que la estimulación del estriado dorsolateral aumentó la locomoción de los animales (**Figura 11E**; $n=10$; $p<0.05$; U de Mann-Whitney). Aunque la estimulación del estriado dorsomedial también mostró una tendencia a incrementar la locomoción, no fue un incremento significativo (**Figura 11E**, $n=5$; $p>0.05$; U de Mann-Whitney). En este caso, al separar los ensayos por el estado de movimiento antes de recibir estimulación (un segundo antes), en los ensayos de poco movimiento el efecto se pierde. Los animales con manipulación en el estriado ya sea dorsomedial o dorsolateral mantuvieron un desplazamiento horizontal muy parecido al de los

animales control (**Figura 11F**, n=9 para dorsolateral y n=5 para dorsomedial; n=7 para eYFP, $p>0.05$ U de Mann-Whitney). Por el contrario, al analizar los ensayos de mayor movimiento, los animales con estimulación en el estriado dorsomedial disminuyeron su locomoción (**Figura 11G**, $p<0.05$; n=5; U de Mann-Whitney sólo por 200ms). Mientras que los animales con estimulación en el estriado DL mostraron un incremento en el desplazamiento (**Figura 11G**, n=10 $p<0.05$ Prueba U de Mann-Whitney). Se observó una clara diferencia entre las manipulaciones de ambos compartimentos (DL *versus* DM; DL n=10 y DM n=5, $p<0.05$; U de Mann-Whitney).

En conjunto, los resultados nos indican que la contribución de cada una de las vías en cada compartimento es específica sobre la locomoción del animal. Además, la contribución depende del estado de movimiento en el que se encontraba el animal.

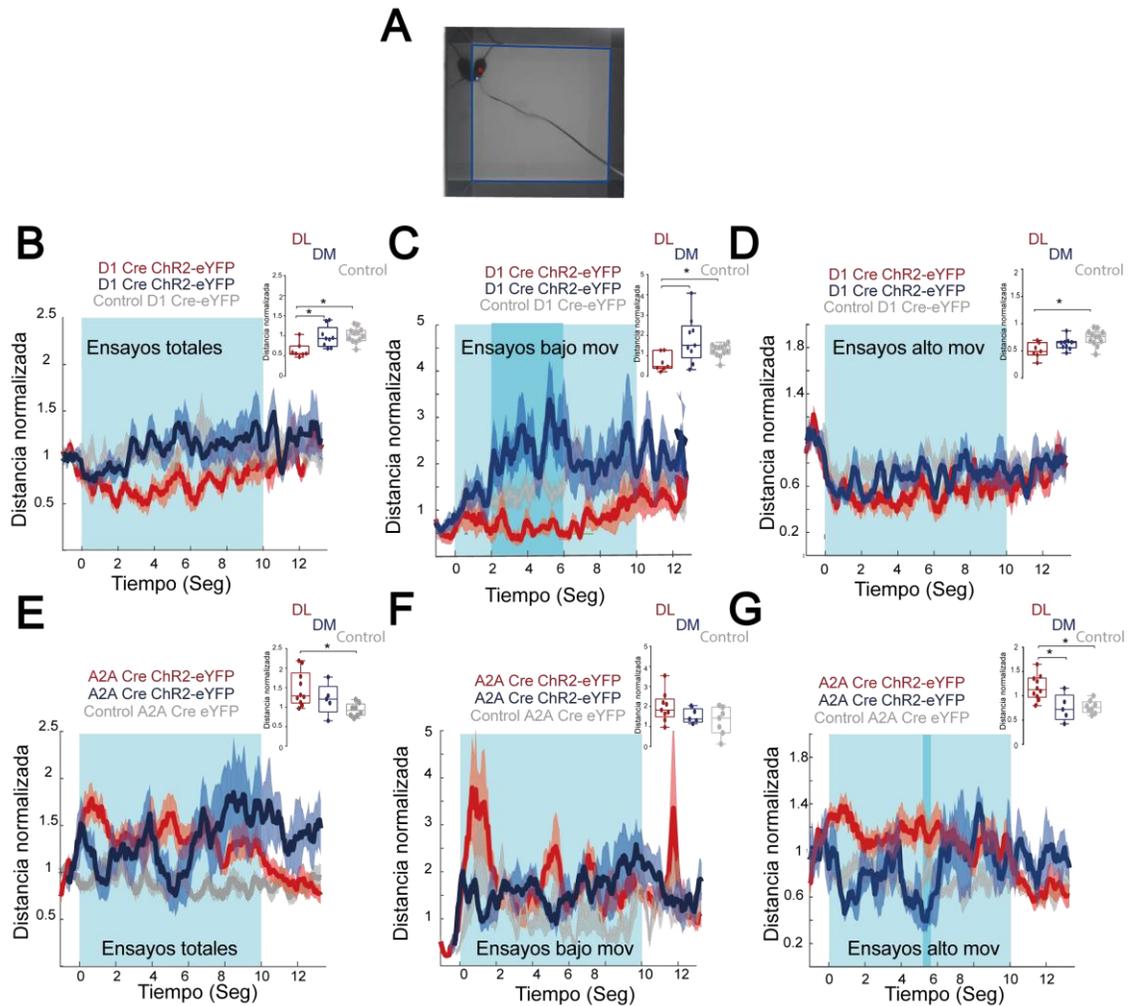


Figura 11. La activación del estriado dorsomedial vs dorsolateral genera efectos motores diferentes en ambas vías. **(A)** Vista superior de un animal en la prueba de campo abierto. **(B)** Estimulación de 10s a 20Hz en animales D1 Cre. **(C)** Cambio en el desplazamiento horizontal del animal durante estimulación en ensayos de poco movimiento. **(D)** Cambio en el desplazamiento horizontal del animal durante estimulación en ensayos de mayor movimiento. A la izquierda de cada gráfica se muestra la cuantificación del promedio de la distancia normalizada en los primeros 5s de estimulación. **(E-G)** Igual que B-D para animales A2A Cre. * $p < 0.05$ Prueba U de Mann Whitney

10. DISCUSIÓN

Derivado de este estudio encontramos que: 1) la activación de las vías de los ganglios basales tienen efectos opuestos sobre la realización de una acción guiada por reforzador. La activación de la vía directa facilita la realización de una acción mientras que la activación de la vía indirecta la disminuye. 2) Sólo la activación de las neuronas del estriado dorsomedial induce una preferencia que se mantiene aún en ausencia de la autoestimulación. 3) La estimulación de la vía indirecta del estriado dorsolateral establece una preferencia por la acción no asociada a estimulación que no se revierte. 4) La activación de las vías de los ganglios basales tiene efectos opuestos en el protocolo de preferencia de lugar en tiempo real. 5) La activación de las vías estriatales tiene modulaciones específicas sobre el desplazamiento de los animales, dependiendo del compartimento manipulado y del estado del movimiento del animal.

La activación de las vías de los ganglios basales tiene efectos opuestos sobre la realización de una acción guiada por reforzador

Todos los animales que recibieron estimulación en la vía directa de los ganglios basales incrementaron el número de veces que realizaron la acción (presionar una palanca (**Figura 5B**), específicamente de la acción asociada a la autoestimulación (**Figura 5D**). No encontramos diferencias entre el estriado dorsolateral y dorsomedial. Este resultado se observa a pesar de que la estimulación del estriado dorsolateral generó disminución en el desplazamiento de los animales (ver **Figura 11A-C**). En conclusión, la activación de la vía directa facilitó la realización de la acción asociada a autoestimulación, a pesar de que la estimulación de esta vía genera un déficit motor para el caso del estriado dorsolateral. Estos datos apoyan la participación de la vía directa de los ganglios basales en el reforzamiento de una conducta, pues al activar esta vía se seleccionó la acción asociada a autoestimulación. La acción pareada a la activación de la vía directa se evaluó como un estímulo positivo, estos resultados son consistentes con reportes previos (Kravitz, 2012).

Cuando nos preguntamos si había diferencias al activar el compartimento dorsolateral *versus* dorsomedial de la vía indirecta, no encontramos diferencias ni en la tasa total de trabajo (**Figura 5F**) ni en la evitación de la acción asociada a la autoestimulación de esta vía (**Figura 5H**). De estos experimentos concluimos que la activación de esta vía, en ambos compartimentos evoca que los animales eviten la acción asociada a la autoestimulación de la vía. Este hallazgo es consistente con la idea de que la autoestimulación de la vía indirecta causa un estímulo negativo y el animal evita realizar la acción asociada a autoestimulación (Kravitz, 2012; Tai *et al.*, 2012). Esto deja abierta la pregunta si la activación de esta vía está exclusivamente asociada a las acciones que son suprimidas. En otros estudios se han reportado momentos discretos de la selección y realización de acciones durante los que esta vía también se activa (Cui, 2013).

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que no hay diferencia en el proceso de selección de una acción asociada a autoestimulación si comparamos la activación de los compartimentos dorsomedial y dorsolateral de las vías de los ganglios basales. Sin embargo, las vías parecen actuar de manera antagónica en el proceso de reforzamiento de una conducta. Mientras que la activación de la vía directa refuerza la acción asociada a autoestimulación, la activación de la vía indirecta evita la realización de esta acción.

Sólo la activación de las neuronas del estriado dorsomedial induce una preferencia que se mantiene aún en ausencia de la autoestimulación

Cuando preguntamos si los animales podían reportar la preferencia aprendida, en ausencia de autoestimulación y de recompensa, observamos que sólo los animales que recibieron autoestimulación en el estriado dorsomedial reportaron dicha preferencia. No así, los animales que recibieron autoestimulación en el estriado dorsolateral para ambas vías de los ganglios basales (**Figura 6**). Sabemos que el estriado dorsolateral está preferentemente involucrado en los circuitos sensorimotrices y es necesario para el establecimiento de acciones habituales (Yin *et al.*, 2004, 2006; Yin & Knowlton, 2006). Por otra parte, el estriado dorsomedial forma parte de circuitos de asociación y esta

preferentemente relacionado con la realización de acciones dirigidas a la búsqueda de un objetivo (Yin, Knowlton, *et al.*, 2005; Yin, Ostlund, *et al.*, 2005). Una posible explicación para nuestros resultados es que la autoestimulación del estriado dorsomedial moduló el valor asignado a la acción cuando se recibió autoestimulación (Samejima, 2005; Tai *et al.*, 2012). Este cambio en el valor asignado a dicha acción se detectó en la prueba de extinción (Bouton & Woods, 2008). Esto también implicaría que la activación del estriado dorsolateral no tuvo el efecto de modular el valor asignado a autoestimulación. Así, la preferencia inducida por las manipulaciones de este compartimento fue exclusivamente en línea, sin que se trasladara a una memoria que indicara la modificación del valor asignado a dicha acción.

La estimulación de la vía indirecta del estriado dorsolateral establece una preferencia por la acción no asociada a estimulación que no se revierte

Nos preguntamos si los animales eran capaces de identificar que una acción era guiada por la autoestimulación de las vías. Para esto, los sometimos a una prueba de inversión entre la acción y su consecuencia (**Figura 7**). De éstos experimentos, observamos que los animales que recibieron autoestimulación de la vía directa tanto en el estriado dorsolateral como en el dorsomedial, lograron actualizar la acción realizada para seguir la autoestimulación (**Figura 7B-E**).

Sin embargo, para el caso de manipulación de la vía indirecta, sólo los animales que recibieron autoestimulación en el estriado dorsomedial lograron seguir la acción que ahora no les daba autoestimulación. Esto se reportó como una actualización en la evitación de la acción asociada a autoestimulación (**Figura 7 F-I** columna de la izquierda). La actualización se observa incluso en ausencia de estimulación (**Figura 8C**). Sorpresivamente, los animales en los que se autoestimuló la vía indirecta en el estriado dorsolateral no invirtieron su comportamiento (**Figura 7H-I**). Estos animales continuaron realizando la acción asociada a autoestimulación, sin mostrar evitación (**Figura 7H**) y mantuvieron este comportamiento en ausencia de estimulación (**Figura 8B**). Este último hallazgo sugiere que los animales con estimulación en el estriado dorsolateral no

detectaron los cambios en la acción asociada a autoestimulación. Si bien, durante la fase de adquisición la activación de ambos compartimentos indujo evitación por la acción que guiaba a autoestimulación (**Figura 5F**), cuando se realizó un cambio en la acción asociada a autoestimulación sólo los animales con manipulaciones en el estriado dorsomedial identificaron este cambio (**Figura 7H**). Una posibilidad para explicar la insensibilidad de detectar el cambio de la acción asociada a autoestimulación, es que en estos animales durante la primera fase de adquisición indujimos la formación de una conducta habitual. Esta conducta está compuesta de la evitación de una acción y como consecuencia el reforzamiento de selección de la otra acción que lo llevaba a recibir recompensa. Actualmente, se ha reportado que el estriado dorsolateral participa en la formación de conductas habituales (Yin, 2005) y que la participación de la vía indirecta es necesaria también en la formación de conductas habituales (Yu, 2009). Esto respalda la posibilidad de que la autoestimulación de la vía indirecta del estriado dorsolateral (en conjunto con el reforzamiento de otra acción) indujera la selección de una acción de manera habitual.

La activación de las vías de los ganglios basales tiene efectos opuestos en el protocolo de preferencia de lugar en tiempo real

En el protocolo de condicionamiento operante los animales recibieron recompensa por realizar la acción (presionar una palanca), esta recompensa *per se* podría competir con la modulación de la autoestimulación. En el protocolo de preferencia de lugar el animal no obtuvo recompensa y la acción asociada a autoestimulación fue diferente sin embargo, también se observó el reforzamiento de una conducta. Como resultados de esta prueba, observamos que la activación de las neuronas de la vía directa en el estriado dorsomedial *versus* el estriado dorsolateral, en ambos casos generó una preferencia por permanecer en el lugar asociado a la estimulación (**Figura 10G**). Contrario a esto, los animales que recibieron autoestimulación de la vía indirecta, en esta misma prueba, evitaron permanecer en el cuadrante asociado a la autoestimulación (**Figura 10M**). Para las manipulaciones de la vía directa, observamos una modificación en la preferencia de los animales cuando cambiamos el cuadrante asociado a autoestimulación, en

la misma prueba (**Figuras 10 I y O**). Sin embargo, en este caso en ninguna de las condiciones logramos observar la preferencia en ausencia de autoestimulación para ninguna de las vías manipuladas (**Figura 10 H y N**). De este experimento, concluimos que en un paradigma conductual diferente, la activación de la vía directa reforzó la acción asociada a autoestimulación, valorando a dicha acción como un estímulo positivo. De manera contraria, la activación de la vía indirecta evaluó negativamente a la acción asociada a autoestimulación y los animales evitaron realizar esta acción. Esto es consistente con la visión de que las vías de los ganglios basales actúan de manera antagónica en el reforzamiento de una conducta (Kravitz *et al.*, 2012; Tai *et al.*, 2012).

De este experimento no observamos diferencias entre los animales que recibieron autoestimulación en el estriado dorsolateral *versus* en el estriado dorsomedial. Una posible explicación de este fenómeno, es que la acción de permanencia en un lugar (desplazamiento hacia el cuadrante con estimulación) es más difícil de identificar que la acción de presionar una palanca. Además, las sesiones en este protocolo fueron menos que las de comportamiento operante. Aún así, los animales cambiaron su preferencia cuando se les cambió el cuadrante asociado a autoestimulación, en los dos grupos experimentales.

Se observan efectos diferentes por la manipulación de cada compartimento del estriado sobre la locomoción del animal (**Figura 11**). Esto plantea la posibilidad de que al reportar el efecto de las vías sobre la selección de acciones guiada por autoestimulación, la activación de las vías involucra un efecto motor y un efecto reforzante (vía directa) o de evitación (vía indirecta).

La activación de las vías estriatales tiene modulaciones específicas sobre el desplazamiento de los animales, dependiendo del compartimento manipulado y del estado del movimiento del animal

Al evaluar el efecto de la estimulación de las vías estriatales sobre la locomoción, los resultados muestran que existen diferencias sobre el desplazamiento del animal por la activación de cada compartimento del estriado (dorsomedial *versus*

dorsolateral). Esto depende de la vía activada y del estado de movimiento del animal en el momento de la manipulación.

En el caso de la vía directa, la activación del compartimento dorsolateral disminuyó la locomoción (**Figura 11B-C**) mientras que la activación del estriado dorsomedial incrementó el desplazamiento del animal en cierto período de la estimulación (ensayos en los que el animal prácticamente estaba inmóvil; **Figura 11C**). Otro factor clave a considerar cuando se determina el efecto de la modulación de las vías estriatales sobre la locomoción, es el estado de movimiento en el que se encuentra el animal al recibir la estimulación. Por ejemplo, al activar a la vía directa los efectos más marcados los vemos cuando el animal realizaba poco movimiento (**Figura 11C**). Si tomamos en cuenta de manera general todos los ensayos en los que se activó a la vía directa, los resultados son inconsistentes con previos reportes. En otros trabajos observan incremento en la deambulación por la activación de esta vía (Kravitz, 2010; Dureux, 2012). Sin embargo, obtenemos resultados consistentes con estos reportes si analizamos sólo los ensayos de bajo movimiento pues observamos un incremento sobre la locomoción (**Figura 11 C**). No obstante, un hallazgo no esperado es que la activación de la vía directa (en el estriado dorsolateral) disminuyó la locomoción de los animales (**Figura 11 B-D**). Dicho hallazgo concuerda con un reporte previo que muestra que la activación de dicha vía impone una pausa sobre la realización de acciones (Tecuapetla, 2016). Esta pausa se da probablemente a través de la interrupción del funcionamiento apropiado de dicha vía, imponiendo episodios de distonía. No obstante, se mantiene un efecto reforzante en la prueba de condicionamiento operante y de preferencia de lugar en tiempo real. Esto es de gran importancia al evaluar la contribución que el movimiento tiene como reforzador de acciones. En este caso, aunque imponemos un posible déficit motor, no deja de ser reforzante.

En el caso de la activación de la vía indirecta, cuando activamos el estriado dorsomedial *versus* el estriado dorsolateral y analizamos todos los ensayos de movimiento, observamos un incremento en la locomoción, que sólo es significativo

para la activación del estriado dorsolateral (**Figura 11E**). Cuando hicimos un análisis más detallado y evaluamos únicamente ensayos de mayor movimiento, en los animales con manipulación en el estriado dorsolateral el desplazamiento se mantuvo en un estado de mayor movimiento. Por otra parte, la activación del estriado dorsomedial provocó fluctuaciones de disminución en el movimiento del animal, por debajo de las manipulaciones del estriado dorsolateral (**Figura 11G**). Nuevamente, si evaluamos de manera general todos los ensayos en los que se activó a la vía indirecta nuestros datos no son consistentes con reportes previos que muestran disminución del movimiento. (Kravitz, 2010; Durieux, 2012). Observamos incrementos en la locomoción por la activación de esta vía (**Figura 11E**). Sin embargo, si analizamos los ensayos los ensayos de mayor movimiento, observamos diferencia sobre la locomoción a causa de la activación de la vía indirecta en el estriado dorsomedial *versus* dorsolateral. Esto nos permite concluir que la activación de la vía indirecta en el estriado dorsomedial disminuyó la locomoción comparado a su activación en el estriado dorsolateral.

11. APORTACIONES GENERALES

A través de los resultados obtenidos en el presente estudio podemos aceptar la hipótesis planteada en un inicio. La activación del estriado dorsomedial en comparación con la del estriado dorsolateral de las vías directa e indirecta de los ganglios basales tiene una contribución diferente sobre la selección de acciones guiada por reforzador y sobre el movimiento del animal. Por lo que proponemos que no se puede generalizar la función de las vías a los diferentes compartimentos de los ganglios basales, además enfatizamos que la contribución de los diferentes compartimentos del estriado sobre la realización de una acción es específica. La activación del estriado dorsolateral incrementa (vía directa) o decremента (vía indirecta) la realización de una acción. La activación del estriado dorsomedial tiene una contribución tanto sobre la realización como sobre el reforzamiento de una acción.

Además, observamos que los animales con autoestimulación en el estriado dorsolateral no revierten la preferencia que se impuso en los ensayos iniciales, llevándolos a realizar una acción aparentemente negativa.

Finalmente, mostramos que la activación del compartimento dorsomedial *versus* el dorsolateral genera efectos motores diferentes para cada una de las vías que también depende del estado de movimiento del animal. Proponemos que la actividad de las vías de los ganglios basales tiene contribuciones diferentes sobre la locomoción que son específicas del estado de movimiento en el que el animal se encuentra.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C.D. & Dickinson, A. (1981) Instrumental responding following reinforcer devaluation. *Q. J. Exp. Psychol. Sect. B*, **33**, 109–121.
- Alexander, G. (1986) Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, **9**, 357–381.
- Allport, D.A., 1980. Attention and performance. In: Claxton, G. _Ed., Cognitive psychology, new directions. Routledge and Kegan Paul, London, pp. 112]153
- Balleine, B.W., Liljeholm, M., & Ostlund, S.B. (2009) The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav. Brain Res.*, **199**, 43–52.
- Benarroch, E.E. (2013) Pedunculo pontine nucleus Functional organization and clinical implications.
- Berendse HW, Groenewegen HJ (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol*,299(2):187-228.
- Botvinick, M. M. (2007). Multilevel structure in behavior and the brain: a model of Fuster's hierarchy. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 362(1485), 1615-1626.
- Bouton, M.E., & Woods, A.M. (2008). Extinction: Behavioral mechanisms an their implications. In R. Menxel (Ed.), *Learning theory and behavior*. (Vol. 1, pp. (1994) Coherent behaviour from many adaptive processes. In *From Animals to Animals 3: Proceedings of the Third International Conference on the Simulation of Adaptive Behaviour* (ed. Cliff D.,Husbands P., Meyer J.-A. and Wilson S.W.), pp. 22-29. MIT Press, Cambridge, MA.
- Burke, R.E., Strick, P.L., Kanda, K., Kim, C.C., & Walmsley, B. (1977) Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.*, **40**, 667–680.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.*, **17**, 1022–1030.
- Carpenter MB, Carleton SC, Keller JT, Conte P. Connections of the subthalamic nucleus in the monkey (1981). *Brain research.*; 224:1–29. [PubMed: 7284825]
- Catania, A.C. (1999). Thorndike's legacy: Learning, selection, and the law of effect. *Journal of experimental Analysis of Behavior*,72, 425-428
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., & Costa, R.M. (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, **494**, 238–242.
- DeLong, M.R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.*, **13**, 281–285.
- Dickinson, A. & Balleine, B. (1994) Motivational control of goal-directed action. *Anim. Learn. Behav.*, **22**, 1–18.

Domjan, M. (2010). Principios de aprendizaje y conducta. Sexta edición. Wadsworth Cengage Learning. Editores, México D.F

Draganski, B., Kherif, F., Kloppel, S., Cook, P.A., Alexander, D.C., Parker, G.J.M., Deichmann, R., Ashburner, J., & Frackowiak, R.S.J. (2008). Evidence for Segregated and Integrative Connectivity Patterns in the Human Basal Ganglia. *J. Neurosci.*, **28**, 7143–7152.

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. *EMBO J.*, **31**, 640–653.

Eccles, J.C. (1967) Circuits in the cerebellar control of movement. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 336–343.

Evarts, E. V. (1981) Functional studies of the motor cortex. In *The Organization of the Cerebral Cortex*, F. O. Schmitt, F. G. Worden, G. Adelman and S. G. Dennis (eds.). Cambridge, MA: MIT Press, pp. 199–236.

Evarts, E.V., Shinoda, Y., Wise, S.P., (1984). Neurophysiological approaches to higher brain functions. A Neurosciences Institute Publication, John Wiley and Sons, pp. 198.

Edley, S.M. & Graybiel, A.M. (1983) The afferent and efferent connections of the feline nucleus tegmenti pedunculopontinus, pars compacta. *J. Comp. Neurol.*, **217**, 187–215.

Gerfen, C., Engber, T., Mahan, L., Susel, Z., Chase, T., Monsma, F., & Sibley, D. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (80-)*, **250**, 1429–1432.

Gerfen, C.R. (2006) Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.*, **9**, 157–158.

Gerfen, C.R. & Surmeier, D.J. (2011) Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.*, **34**, 441–466.

Grammont, F.(2010) Naturalizing Intention in Action

Grillner, S., Hellgren, J., Ménard, A., Saitoh, K., & Wikström, M.A. (2005) Mechanisms for selection of basic motor programs - Roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci.*, **28**, 364–370.

Grillner, S. & Robertson, B. (2016) Review The Basal Ganglia Over 500 Million Years.

Groenewegen, H.J. & Berendse, H.W. (1990) Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **294**, 607–622.

Gurney, K., Prescott, T.J., & Redgrave, P. (2001) A computational model of action selection in the basal ganglia. I. A new functional anatomy. *Biol. Cybern.*, **84**, 401–410.

Haas, H. & Panula, P. (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in **4**, 1–10.

- Hikosaka, O. (2007) GABAergic output of the basal ganglia. *Prog. Brain Res.*, **160**, 209–226.
- Hikosaka, O. (2005) Basal Ganglia Orient Eyes to Reward. *J. Neurophysiol.*, **95**, 567–584.
- Humphries, M.D., Stewart, R.D., & Gurney, K.N. (2006) A Physiologically Plausible Model of Action Selection and Oscillatory Activity in the Basal Ganglia. *J. Neurosci.*, **26**, 12921–12942.
- Jin, X., Tecuapetla, F., & Costa, R.M. (2014) Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nat. Publ. Gr.*, **17**, 423–430.
- Kelso, J.A.S. (1995) *Dynamic Patterns: The Self-Organizations of Brain and Behavior*.
- Ketzef, M., Spigolon, G., Johansson, Y., Bonito-Oliva, A., Fisone, G., & Silberberg, G. (2017). Dopamine Depletion Impairs Bilateral Sensory Processing in the Striatum in a Pathway-Dependent Manner. *Neuron*, **94**, 855–865.e5.
- Kita H, Kitai ST. (1988) Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res*, **3**;447(2):346-52.
- Kita H & Kita T. (2001) Number, origins, and chemical types of rat pallidostriatal projection neurons. *The Journal of comparative neurology*; **437**:438–48.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC.(2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, **466**(7306):622-6
- Kravitz, A. V, Tye, L.D., & Kreitzer, A.C. (2012) Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat. Neurosci.*, **15**, 816–818.
- Kropotov, J.D. & Etlinger, S.C. (1999) Selection of actions in the basal ganglia-thalamocortical circuits: Review and model. *Int. J. Psychophysiol.*, **31**, 197–217.
- Lau, B. & Glimcher, P.W. (2008) Value Representations in the Primate Striatum during Matching Behavior. *Neuron*, **58**, 451–463.
- Mallet, N., Micklem, B.R., Henny, P., Brown, M.T., Williams, C., Bolam, J.P., Nakamura, K.C., & Magill, P.J. (2012) Dichotomous Organization of the External Globus Pallidus. *Neuron*, **74**, 1075–1086.
- Mikhael, J.G. & Bogacz, R. (2016) Learning Reward Uncertainty in the Basal Ganglia. *PLoS Comput. Biol.*, **12**, 1–28.
- Mink, J.W. (1996) The basal ganglia: Focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol.*, **50**, 381–425.
- Miyachi, S., Hikosaka, O., & Lu, X. (2002) Differential activation of monkey striatal neurons in the early and late stages of procedural learning. *Exp. Brain Res.*, **146**, 122–126.
- Miyachi, S., Hikosaka, O., Miyashita, K., Kárádi, Z., & Rand, M.K. (1997) Differential roles of monkey striatum in learning of sequential hand movement. *Exp. Brain Res.*, **115**, 1–5.

- Moray, N. (1970). Attention: Selective Processes in Vision and Hearing. Academic, N.Y
- Nambu, A., Takada, M., Inase, M., & Tokuno, H. (1996) Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *J. Neurosci.*, **16**, 2671–2683.
- Nambu, A., Tokuno, H., Hamada, I., Kita, H., Imanishi, M., Akazawa, T., Ikeuchi, Y., & Hasegawa, N. (2000) Excitatory Cortical Inputs to Pallidal Neurons Via the Subthalamic Nucleus in the Monkey. *J Neurophysiol* 84: 289–300.
- Nelson, A.B. & Kreitzer, A.C. (2014) Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.*, **37**, 117–135.
- Obeso, J.A. & Lanciego, J.L. (2011) Past, Present, and Future of the Pathophysiological Model of the Basal Ganglia. *Front. Neuroanat.*, **5**, 1–6.
- Olds, J. & Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **47**, 419–427.
- Parent, M. & Parent, A. (2004) The pallidofugal motor fiber system in primates. *Park. Relat. Disord.*, **10**, 203–211.
- Pavlov, I.P. (1927). Conditioned reflexes (G.V. Anrep, trans.).London: Oxford University Press
- Penney, J.B. & Young, A.B. (1983) Speculations on the Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders. *Annu. Rev. Neurosci.*, **6**, 73–94.
- Planert, H., Berger, T.K., & Silberberg, G. (2013) Membrane Properties of Striatal Direct and Indirect Pathway Neurons in Mouse and Rat Slices and Their Modulation by Dopamine. *PLoS One*, **8**, 1–14.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A., McNamara, J., and Williams, M. (2010). Sinauer Associates; 3rd edition.
- Ragsdale, CW Jr.& Graybiel, AM (1991) Compartmental organization of the thalamostriatal connection in the cat. *The Journal of comparative neurology.*; 311:134–67.
- Redgrave, P., Prescott, T.J., & Gurney, K. (1999) The basal ganglia: A vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience*, **89**, 1009–1023.
- 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**, 138–151.
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M.C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M.R., & Obeso, J.A. (2010) Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 760–772.
- Recorla, R. A., & Wagner, A. R. (1972). A Theory of Pavlovian Conditioning: Variations in the Effectiveness of Reinforcement and Nonreinforcement. In A. H. Black, & W. F. Prokasy

(Eds.), *Classical Conditioning II: Current Research and Theory* (pp. 64-99). New York: Appleton-Century-Crofts.

Rubchinsky, L.L., Kopell, N., & Sigvardt, K. (2003) Modeling facilitation and inhibition of competing motor programs in basal ganglia subthalamic nucleus-pallidal circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 14427–14432.

Samejima, K. (2005) Representation of Action-Specific Reward Values in the Striatum. *Science (80-.)*, **310**, 1337–1340.

Sato F, Lavallee P, Levesque M, Parent A. (2000) Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *The Journal of comparative neurology*, 417:17–31.

Schiffmann, S.N. & Vanderhaeghen, J.J. (1993) Adenosine A2 receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. *J. Neurosci.*, **13**, 1080–1087.

Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P.R. (1997) A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science (80-.)*, **275**, 1593–1599.

Schultz, W. (2007) Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu. Rev. Neurosci.*, **30**, 259–288.

Schwartz, B. (1980) Development of complex, stereotyped behavior in pigeons. *J. Exp. Anal. Behav.*, **33**, 153–166.

Sherrington, C. (1947) *The Integrative Action of the Nervous System*, 2nd Ed. New Haven: Yale University Press.

Skinner, B.F. (1938) *The Behavior of Organisms: An experimental analysis*. *Psychol. Rec.*, 486.

Smith Y, Hazrati LN, Parent A. (1990) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method. *The Journal of comparative neurology*, 294:306–23.

Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M. (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends in neurosciences*, 27:520–7.

Sparta, D.R., Stamatakis, A.M., Phillips, J.L., Hovelsø, N., van Zessen, R., & Stuber, G.D. (2011) Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits. *Nat. Protoc.*, **7**, 12–23.

Steinbusch, H.W.M. (1981) *Distribution of Serotonin-Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Rat-Cell Bodies and Terminals*, Neuroscience.

Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.*, **30**, 228–235.

- Tai, L.-H., Lee, A.M., Benavidez, N., Bonci, A., & Wilbrecht, L. (2012) Transient stimulation of distinct subpopulations of striatal neurons mimics changes in action value. *Nat. Neurosci.*, **15**, 1281–1289.
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S.Q., & Costa, R.M. (2016) Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell*, **166**, 703–715.
- Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T., & Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, **4**, 150.
- Thorndike, E.L.(1898) Animal intelligence: An experimental study of the association processes in animals. Psychological Review Monograph, **2**
- Thorndike, E.L.(1911) Animal intelligence: Experimental studies. New York: Macmillan
- Turkkan, J.S. (1989). Classical conditioning: The new hegemony. *The Behavioral and Brain Sciences*, **12**, 121-179.
- Vicente, A.M., Galvão-ferreira, P., Tecuapetla, F., & Costa, R.M. (2016) Direct and indirect. *Curr. Biol.*, **26**, R267–R269.
- Wickens J. (1993) *A theory of the striatum.*, Pergamon, Oxford.
- Yin, H.H. & Knowlton, B.J. (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 464–476.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., & Balleine, B.W. (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 181–189.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., & Balleine, B.W. (2006) Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behav. Brain Res.*, **166**, 189–196.
- Yin, H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., & Balleine, B.W. (2005) The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 513–523.
- Yin, H.H. & Knowlton, B.J. (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 464–476.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., & Balleine, B.W. (2005) Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 505–512.
- Yu, C., Gupta, J., Chen, J., & Yin, H.H. (2009) Genetic Deletion of A2A Adenosine Receptors in the Striatum Selectively Impairs Habit Formation **29**, 15100–15103.