

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA**

**PLASTICIDAD NEURONAL EVOCADA POR ESTÍMULOS SOMATOSENSORIALES EN LOS CIRCUITOS
CORTICO-TÁLAMO-ESTRIATALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**ANA ELIZABETH HIDALGO BALBUENA
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

TUTOR PRINCIPAL

**DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

COMITÉ TUTOR

**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**DR. MARIO TREVIÑO VILLEGAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

JURIILLA, MÉXICO 2019



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.

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

Agradecimientos institucionales

A la

Universidad Nacional Autónoma de México

Y al

Instituto de Neurobiología

Que facilitaron las instalaciones para llevar a cabo la maestría y mi apoyo de investigación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico brindado estos dos años (Becaria No. 478896)

A mi comité tutor, **Dr. Fernando Peña** y el **Dr. Mario Treviño**, por sus aportaciones a lo largo de la maestría. Gracias por la ayuda y paciencia brindada durante los tutorales y a lo largo del semestre.

A los integrantes de jurado de examen **el Dr. Fernando Peña, el Dr. Luis Carrillo-Reid, Dra. Mónica López Hidalgo y la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez** quienes dieron lectura a la tesis y la enriquecieron con sus aportaciones.

Dedicatorias

Este proyecto se lo dedico completamente a mi papá **Emigdio Hidalgo Pantoja**, a mi mamá **Guadalupe Yolanda Balbuena Alonso** y a mi hermano **Gustavo Hidalgo Balbuena**.

Gracias por su amor incondicional, por siempre apoyar mis proyectos, por la confianza que han tenido en mí todos estos años, gracias por escucharme y aconsejarme, darme la fuerza para poder superar cada obstáculo e impulsarme a ser mejor, por comprender mis decisiones y apoyarlas. Agradezco infinitamente la familia que tengo, porque gracias a los cimientos que me han dado como ser humano, me han permitido buscar e ir por lo que quiero. Son los seres que más amo. Este trabajo no solo es mío es de ustedes porque gracias a su apoyo y amo me han ayudado a lograrlo. Los admiro y amo infinitamente.

Al **Dr. Pavel Rueda**. Agradezco infinitamente todo el apoyo, la confianza, y enseñanzas que me has brindado. Gracias por impulsarme a ser mejor en mi trabajo. Eres un gran investigador y un gran tutor, te admiro muchísimo y en verdad me siento muy afortunada de poder ser parte de tu equipo de trabajo. Gracias por todo el esmero que pones en cada uno de tus estudiantes y en sus proyectos y por ser un gran pilar en mi formación, porque gracias a ese esmero este proyecto se está culminando de una manera increíble. Gracias por exigir más, por enseñarme que las cosas solo se pueden hacer de una manera y esa manera es hacerlas excelentemente. Aparte de ser un gran tutor, eres una gran persona. Solo me queda expresarte mi profundo agradecimiento.

A los integrantes del laboratorio A-02 **Ana Karen, Ana Silvia, Mario, Annie, Dianita, Perla, Paola, Dra. Tere Peña, Augusto**. Gracias por el excelente equipo de trabajo que hemos formado, por las enseñanzas, por la ayuda que cada uno me ha ofrecido, he aprendido demasiado de ustedes, en ustedes he conocidos personas sumamente trabajadoras y dedicadas, los admiro y quiero mucho. Gracias por todos los momentos compartidos, porque más que un equipo de trabajo, nos hemos apoyado en aspectos personales y porque la convivencia que tenemos permite que día nuestro laboratorio sea un lugar increíble para trabajar.

Ana Karen Pimentel, doctora!!!! gracias por la paciencia, por compartir tu conocimiento, por las pláticas, por tu amistad el cual ha sido un gran tesoro para mí, por estar siempre conmigo, por compartir momentos agradables y escucharme, por ser una persona que siempre está dispuesta a ayudar por

ayudarme a ser mejor persona. **Ana Silvia Báez**, gracias por esas noches de estudio, platicas y desvelos en el lab, por explicarme las cosas que no entendía y hacerlas fáciles, por escuchar mis patoaventuras, por enseñarme que menos es más, gracias por tu amistad y decirme cuando la estaba regando. **Mario**, amigo, llevamos muchos años siendo amigos en los cuales hemos compartido y pasado etapas de nuestra vida juntos, eres una gran persona del cual he aprendido cosas increíbles. En general a los tres les agradezco por estar conmigo, ser personas a las que admiro mucho (y se los he dicho en algunas ocasiones) tanto académicamente como en forma personal hemos pasado momentos increíbles juntos y compartimos el gusto por nuestro trabajo. Solamente me queda decir que, me encantó conocerlos en esta etapa.

A mis amigos de la maestría (*Kandel's Crew*) **Fernando, Martín, Jalil, Jonathan, Omar, Poncho, Cindy, Luis Temo, Santiago, Miriam**. Gracias por permitir que esos momentos de estrés en la maestría se aminoraran, y ¡claro! agradezco esos seminarios, donde podíamos compartir nuestros proyectos y desestresarnos después, por cada vez que nos juntamos a estudiar. Por esas reuniones donde cantamos, bailamos, platicamos, jugamos y compartimos nuestras vivencias. En verdad han sido personas a las cuales agradezco haber conocido y compartir esta etapa de nuestras vidas.

Fernando, Jalil y Martín. Amigos en ustedes encontré, tres grandes hombres que admiro increíblemente, que han sido verdaderos amigos, en los que puedo confiar, me han cuidado. Gracias por esas platicas interminables, por sus consejos, por ser sinceros, por apoyarme. Son amigos que encontré en esta etapa de mi vida y que me han hecho ser mejor persona. No tengo palabra para decirles el cariño que les tengo.

Gama, Viry, Luis Verdín, Isaac, Luis Ángel, Brenda, Ame, Mario. Han sido compañeros increíbles en esta etapa de mi vida, en verdad me da mucho gusto conocerlos, aprender de ustedes, convivir con ustedes, compartir momentos, jueves de alitas. Gracias por estar en mis triunfos y fracasos. En verdad ha sido genial compartir todo este tiempo con ustedes. Gracias por su amistad.

Diana, Anna, Magaly y Cinthya. Amigas, no saben el cariño tan grande que les tengo, son personas increíbles que han estado conmigo desde la licenciatura y se han vuelto parte de mi vida, gracias por escucharme en esos momentos donde sentía que ya no podía y hacerme ver que podía eso y más. Gracias por todos estos años de cariño, risas comprensión, llanto, salidas, llamadas por teléfono. A pesar de la distancia, el cariño sigue creciendo.

Ale Garay y Pablo. Desde que estábamos en la licenciatura han sido personas que han estado conmigo ¡cuántos años llevamos juntos! Compartiendo nuestras metas, ayudándonos, confiando en nosotros, gracias por siempre confiar en mí y estar siempre, gracias por todo el cariño que siempre me han mostrado, alguna vez dijimos que nos encontramos en el momento adecuado y ese momento adecuado se ha vuelto una vida.

ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN	13
LOS GANGLIOS BASALES	15
EL NÚCLEO ESTRIADO	17
ESTRIADO DORSOLATERAL (DLS)	18
VÍA CORTICO-ESTRIATAL	19
VÍA TÁLAMO-ESTRIATAL	21
PLASTICIDAD NEURONAL	24
TIPOS DE PLASTICIDAD SINÁPTICA	24
<i>PLASTICIDAD SINÁPTICA DE CORTO PLAZO EN LA VÍA CORTICO Y TÁLAMO ESTRIATAL</i>	26
DINÁMICA DEL ESTRIADO DORSOLATERAL.	29
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS.	31
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES.	32
MÉTODOS	33
SUJETOS	33
CIRUGÍA PARA INFECCIÓN DE VIRUS	33
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	34
ESTIMULACIÓN SOMATOSENSORIAL DURANTE LOS REGISTROS <i>IN VIVO EN ANIMAL ANESTESIADO</i>	35
ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA	37
ANÁLISIS DE DATOS	39
ANÁLISIS DE LOS DATOS NEURONALES.	39

RESULTADOS	40
<i>EL MODELO DE ESTIMULACIÓN MECÁNICA GENERA REPRESENTACIONES SENSORIALES EN S1 Y EDL EN ANIMALES ANESTESIADOS.</i>	40
<i>LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA EN TRENES EVOCA PCP EN LA CTX S1 Y EL EDL EN UN MODELO DE ANIMAL ANESTESIADO POR URETANO</i>	44
<i>ESTIMULACIÓN ESPECÍFICA DE EN LA VÍA CORTICO-TÁLAMO-ESTRIATAL EVOCA PCP</i>	46
<i>PCP EN LA VÍA CORTICO-ESTRIATAL Y TÁLAMO-ESTRIATAL</i>	52
<i>PCP DE LAS NEURONAS QUE RESPONDIERON AL PRIMER COMPONENTE</i>	53
<i>PCP DE LAS NEURONAS QUE RESPONDIERON AL SEGUNDO COMPONENTE</i>	55
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIÓN	61
ANEXOS	62
REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo de vía directa e indirecta.
- Figura 2.** Esquema representativo, donde se ejemplifican las diferentes áreas del estriado.
- Figura 3.** Se observa en la imagen la proyección cortico-estriatal.
- Figura 4.** Se observa en la imagen la proyección tálamo-estriatal.
- Figura 5.** Ejemplo de facilitación de corto plazo.
- Figura 6.** Corrientes postsinápticas excitatorias evocadas por la estimulación optogénica de las terminales de los núcleos talámicos central lateral.
- Figura 7.** Esquema representativo de la silicon probe.
- Figura 8.** Esquema de la estimulación somatosensorial in vivo.
- Figura 9.** Esquemas de protocolos de estimulación mecánica.
- Figura 10.** Esquema de los diferentes sitios de infección con virus y estimulación con fibra óptica.
- Figura 11.** Esquemas de protocolos de estimulación óptica.
- Figura 12.** Respuesta arquetípica de la Ctx S1 y EDL.
- Figura 13.** Respuesta poblacional de la Ctx S1 y EDL.
- Figura 14.** Latencia de respuesta en la Ctx S1 y EDL.
- Figura 15.** Respuesta neuronal de la Ctx S1 y EDL ante estímulos repetidos.
- Figura 16.** Actividad poblacional ante estimulación mecánica repetida.
- Figura 17.** Histología.
- Figura 18.** Actividad neuronal evocada por la estimulación lumínica.
- Figura 19.** Respuesta poblacional de la Ctx S1 y EDL estimulación lumínica.
- Figura 20.** Comparación de latencias ante estímulos lumínicos y mecánicos.
- Figura 21.** Controles de registros electrofisiológicos con optogénica.

Figura 22. Controles de actividad poblacional optogenética.

Figura 23. Actividad poblacional ante estimulación mecánica repetida.

Figura 24. Primer y segundo componente evocado por la estimulación repetida.

Figura 25. Porcentajes de neuronas que respondieron en el primer componente.

Figura 26. Plasticidad de corto plazo en el primer componente.

Figura 27. Porcentajes de neuronas que respondieron en el segundo componente.

Figura 28. Plasticidad de corto plazo en el segundo componente.

RESUMEN

Se ha propuesto que la actividad del microcircuito estriatal en su región dorsolateral (EDL) integra información sensorio-motora de las vías cortico-estriatales y tálamo-estriatales para producir comandos motores automáticos. Ambas vías muestran múltiples tipos de plasticidad sináptica que moldean la dinámica del microcircuito estriatal, sin embargo, no hay evidencia de las implicaciones de esa modificación en la actividad del microcircuito. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es analizar el papel de la plasticidad sináptica de las proyecciones cortico y tálamo estriatales en la actividad del microcircuito estriatal. Con este objetivo hemos desarrollado un modelo de estimulación somatosensorial in vivo en animales anestesiados, donde se producen representaciones sensoriales robustas en la actividad neuronal de los circuitos cortico-tálamo-estriatales, registrados mediante electrofisiología multiunitaria de alta densidad. Nuestro modelo también es útil para realizar manipulaciones optogenéticas y farmacológicas. Con este método hemos encontrado evidencia funcional de la existencia de una vía directa somatosensorial entre el núcleo ventro-posterolateral del tálamo y el estriado dorsolateral. Mediante este modelo pretendemos estudiar la plasticidad sináptica de corto plazo evocada por la estimulación de vías cortico- y tálamo- estriatales.

ABSTRACT

It has been proposed that the dorsolateral striatum (DLS) integrates sensory-motor information from the corticostriatal and thalamo-striatal pathways to produce motor commands, however the specific role of the information provided by each pathway has not yet been clarified. It has been previously reported that both pathways present multiple types of neuronal plasticity, but the implications of these results in the activity of the striatal microcircuit are to be determined. For these reasons, the objective of this work was to analyze the role of neuronal plasticity of the cortical and thalamic striatal projections in the activity of the striatal microcircuit, in an in vivo model in anesthetized animals. For this we have developed a model of somato-sensorial and optogenetic stimulation in rats, in conjunction with high density multiunit recordings. Our model is also useful for optogenetic and pharmacological manipulations. With this method we have found evidence of the existence of a direct somatosensory pathway between the ventro-posterolateral nucleus of the thalamus and the dorsolateral striatum. Through this model, we intend to study short-term synaptic plasticity, evoked by the stimulation of cortical and thalamo-striatal pathways.

ABREVIATURAS

CTX S1	Corteza somatosensorial primaria
EDL	Estriado dorsolateral
EPSP	Potenciales post sinápticos excitatorios
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
IT	Neuronas interencefálicas
LTD	Depresión de corto plazo
LTP	Potenciación de corto plazo
NEMs	Neuronas espinosas medianas
NST	Núcleo subtalámico
NTA	Neuronas tónicamente activas
PCP	Plasticidad de corto plazo
PT	Neuronas del tracto piramidal
PV	Parvalbúmina
SNc	Sustancia <i>nigra pars compacta</i>
SNr	Sustancia <i>nigra reticulata</i>

INTRODUCCIÓN

Diariamente llevamos a cabo movimientos complejos, tales como: caminar, estrechar la mano cuando saludamos o tomar una taza de café. Para llevar a cabo estas acciones de una manera precisa requerimos de un control motor preciso. A su vez, el control motor requiere de la codificación e integración de estímulos somato-sensoriales (Ebbesen & Brencht, 2017). Para llevar a cabo esta integración, codificación y representación es necesaria una red neuronal con diversas estructuras del Sistema Nervioso, una estructura clave en la representación de este cúmulo de información sensoriomotora, son los ganglios basales, en particular el estriado dorsolateral o sensoriomotor.

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales involucrados en funciones sensoriomotoras compuestos por el núcleo estriado, el globo pálido en sus segmentos interno y externo, la sustancia nigra pars compacta y pars reticulata y el núcleo subtalámico (Parent & Hazrati, 1995). Las principales funciones atribuidas a los ganglios basales incluyen la formación de hábitos, el aprendizaje motor y la selección de acciones (Steiner, H & Tseng KY. (2017). En los ganglios basales el núcleo con mayor entrada de información es el estriado. Este recibe proyecciones de prácticamente todas las regiones corticales y de diferentes núcleos talámicos, dichas proyecciones tienen una influencia en la dinámica del microcircuito de los ganglios basales (Steiner, H. & Tseng K., 2017). Una de las características de las vías cortico-estriatales y tálamo-estriatales es el fenómeno de plasticidad sináptica. Al respecto, utilizando registros electrofisiológicos in vitro, se ha descrito que ambas vías presentan plasticidad de corto plazo (Centonze, Picconi, Gubellini, Bernardi, & Calabresi, 2001; Ellender, Harwood, Kosillo, Capogna, & Bolam, 2013; Jun Ding, Jayms D. Peterson, 2012; Sciamanna, Ponterio, Mandolesi, Bonsi, & Pisani, 2015). Sin embargo, pocos son los estudios que se han encargado de estudiar los mecanismos de plasticidad neuronal in vivo en estas sinapsis y por lo tanto aún desconocemos si estas propiedades pudieran presentarse mediante protocolos de estimulación que involucren sistemas sensoriales o motores particulares. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar la plasticidad de corto plazo evocada por estímulos somatosensoriales en las vías cortico- y tálamo-

estriatales, en un modelo in vivo y analizar sus efectos en la dinámica de redes del microcircuito estriatal.

Con este fin implementamos un modelo de estimulación somatosensorial in vivo, en animal anestesiado, en donde es posible evocar representaciones sensoriales robustas en la corteza somatosensorial primaria y en el estriado dorsolateral. Para registrar la actividad simultánea de decenas de células, utilizamos arreglos de multielectrodos basados en silicón. Finalmente, para estudiar el componente específico de las vías cortico – y tálamo – estriatales, utilizamos técnicas optogenéticas.

Nuestros resultados indican que es posible evocar representaciones sensoriales robustas en el estriado dorsolateral, además estas representaciones son similares a las previamente reportadas en la corteza somatosensorial primaria en condiciones similares. Por otro lado, un análisis de la latencia de respuestas entre regiones corticales y estriatales, así como experimentos de estimulación optogenética, indican que la información somatosensorial en el estriado dorsolateral proviene de una vía cortical clásica, pero también de una vía directa desde el tálamo. Finalmente, hemos observado que ambas vías, cortico – y tálamo – estriatales, son susceptibles a presentar distintos tipos de plasticidad de corto plazo (facilitación y depresión) y éstas pueden ser evocadas mediante estímulos somatosensoriales.

LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) son un grupo de estructuras subcorticales, las cuales han sido implicadas en el aprendizaje, control motor, la formación de hábitos y la selección de acciones basadas en resultados deseados (Steiner, H. & Tseng, KY., 2017). Los GB han sido fuertemente relacionados con el movimiento, y se ha descrito que su actividad neuronal se correlaciona con parámetros cinemáticos como la fuerza y velocidad (Rueda-Orozco & Robbe, 2015, H. H. Yin, 2017), también ha sido asociados con diversas patologías como la enfermedad de Parkinson, Huntington y el síndrome de Tourette que conduce de manera predecible a trastornos en el movimiento, como la falta de movimiento (hipocinesia) o los movimientos incontrolables (hipercinesia) (Graybiel, A.M & Grafton, 2018).

Anatómicamente, los GB están involucrados en un bucle cortical-basal ganglio-tálamo-cortical (Parent & Hazrati, 1995), conformados por una serie de núcleos conectados secuencialmente: el estriado, el globo pálido externo (GPe), el núcleo subtalámico (NST), el globo pálido interno (GPi), y sustancia nigra pars reticulata (SNr) y compacta (SNc) (Kandel, 2015, Steiner, H. & Tseng, KY., 2017).

El principal núcleo de entrada de los GB es el estriado, y los núcleos de salida son GPi y la SNr. En el estriado la información es recibida principalmente por las neuronas espinosas medianas (NEMs), de naturaleza GABAérgica. Las NEMs están divididas en dos poblaciones homogéneamente distribuidas en estriado y que dan lugar a la vía directa, que va del estriado a la SNr/Gpi, e indirecta, que hace relevos secuenciales en GPe y el NST antes de llegar a los núcleos de salida (Figura, 1; Redgrave, P., et al, 2010). La transmisión cortico-estriatal y en general la actividad de los ganglios basales es modificada por las proyecciones dopaminérgicas que recibe de la sustancia nigra compacta (SNc) ejerciendo un efecto dual en las neuronas estriatales.

La vía directa expresa receptores de dopamina D1, sustancia P y dinorfina en el estriado, al ser estimulada por proyecciones dopaminérgicas de la SNc es activada. La activación de la vía directa, produce una inhibición de los núcleos de salida (GPi y SNr) dando como resultado la liberación de la inhibición a nivel

del tálamo motor y por lo tanto una facilitación del movimiento (Vanduffel & Arsenault, 2016)

Por otro lado, la vía indirecta, conformada por neuronas que expresan receptores dopaminérgicos tipo D2 y encefalina, envía proyecciones GABAérgicas al GPe que a su vez envía proyecciones GABAérgicas al NST, este último envía proyecciones glutamatérgicas a los núcleos de salida GPi/SNr. Por lo tanto, la activación de las MSN de la vía indirecta resulta en la inhibición del GPe, lo que a su vez resulta en un incremento en la actividad del NST y por lo tanto un incremento en la actividad de las neuronas del GPi/SNr, que a su vez inhibirían a los núcleos motores del tálamo suprimiendo el movimiento (Redgrave, P., et al, 2010).

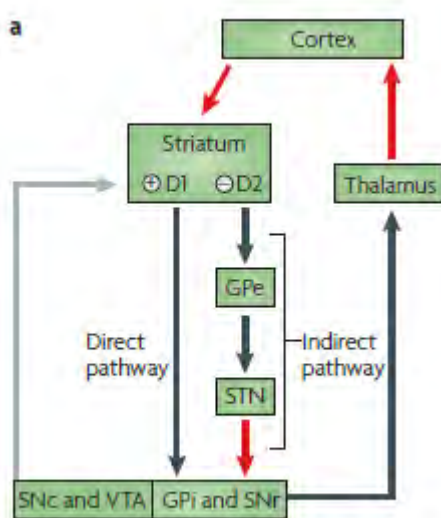


Figura 1. Esquema representativo de vía directa e indirecta. Proyecciones glutamatérgicas (línea roja), proyecciones GABAérgicas (línea azul) y proyecciones dopaminérgicas (línea gris). Tomada de (Redgrave, P., et al, 2010)

El núcleo estriado

El núcleo estriado está conformado principalmente por dos tipos de neuronas, las neuronas de proyección y las interneuronas. Las neuronas de proyección se conocen como neuronas espinosas medianas (NEMs), con un diámetro aproximado de 20 μm , componen aproximadamente el 95% del estriado. Una característica de las NEMs es que son neuronas inhibitoras y usan GABA como neurotransmisor. Son neuronas de actividad fásica, con una tasa de descarga espontánea muy baja (0.5-1 espigas/s), pero que pueden alcanzar frecuencias relativamente altas (10-40 espigas/s).

Por otro lado, la población restante (5%) está constituida por diferentes tipos de interneuronas que pueden ser divididas en dos grandes grupos, las colinérgicas y las GABAérgicas. Las interneuronas colinérgicas, son neuronas mucho más grandes, con árboles dendríticos espinosos, tienen un patrón de disparo continuo y constante por lo que también se les conoce como neuronas tónicamente activas (NTAs). Por otro lado, las interneuronas GABAérgicas son clasificadas en tres poblaciones: 1) las que expresan parvalbúmina (PV), llamadas interneuronas fast-spiking, 2) las interneuronas que expresan calretinina (CR) y 3) las que expresan somatostatina/ neuropéptido Y/ sintetasa de óxido nítrico (SOM/NPY/NOS) (Doing, N, Bolam, P., 2001, p. 127, Fino, E., Vandercasteele, M., Perez S., Saudou, F. & Venance, L., 2018).

En primates el estriado está compuesto por el núcleo caudado y el putamen los cuales están separados por la capsula interna. En roedores, la región dorsal del estriado se divide en medial (homóloga del caudado) o asociativo y lateral (homóloga del putamen). Este proyecto está enfocado en la región dorsolateral (putamen) del estriado (EDL), que recibe información principalmente de las cortezas sensoriales y motoras primarias, por lo que también se le conoce como estriado sensoriomotor. Además, tanto en primates como en roedores la región ventral del estriado también es conocida como núcleo accumbens. Estas divisiones pueden observarse en la figura 2. Los cuales no se encuentran separados por la capsula interna, pero se encuentran separados por axones provenientes de la corteza motora que generan la separación entre una estructura y otra (Steiner, H.& Tseng, KY., 2017).

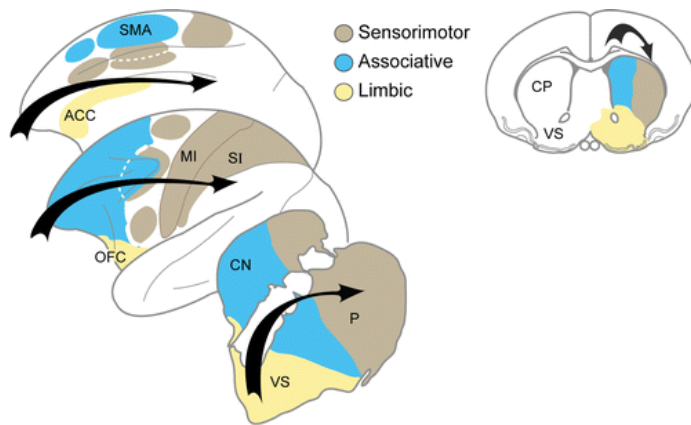


Figura 2. Esquema representativo, donde se ejemplifican las diferentes áreas del estriado. Estriado dorsomendial (asociativo) de color azul, estriado ventral (límbico) de color amarillo y estriado dorsolateral (sensoriomotor). Esquema tomado de (Graybiel AM, 2008)

Graybiel AM. 2008. Annu. Rev. Neurosci. 31:359–87.

Estriado Dorsolateral (DLS)

Una larga línea de estudios de lesiones en roedores ha demostrado que el EDL es necesario para la formación de hábitos (Steiner, H & Tseng KY. (2017) , codificación de parámetros cinemáticos (Rueda-Orozco & Robbe, 2015), y del inicio y el final de secuencias de movimientos (Ann M Graybiel & Grafton, 2018; Rueda-Orozco & Robbe, 2015). También se ha propuesto que el EDL contribuye a la ejecución de memorias de procedimiento, especialmente los hábitos motores (Graybiel, A.M., 2008).

Por otro lado, se sabe que en el EDL de primates y roedores existe una representación somatotópica de prácticamente todas las regiones del cuerpo (Flaherty A.W. & Graybiel, A.M., 1991). De particular relevancia para este proyecto, sabemos que las regiones corticales motoras y sensoriales con representaciones de las extremidades anteriores se encuentran hacia la región más laterales del EDL (Hunnicut et al., 2016). Registros electrofisiológicos en roedores en libre movimiento han demostrado que la actividad de neuronas individuales en el EDL presenta correlaciones con movimientos específicos de las extremidades delanteras (West et al., 1990). También se ha demostrado que estas representaciones son en muchas ocasiones dependientes de un contexto específico (Carelli & West, 1991). A pesar de los muchos ejemplos de representaciones sensoriales en el EDL, el origen preciso (Corteza vs Tálamo) y la función específica de las mismas es aún desconocido. Al respecto, algunos

estudios han demostrado que, para algunas regiones como las vibrisas, el origen de las representaciones sensoriales en el EDL proviene de ambos, la corteza y el tálamo (Smith, J.B., Mowery, T.M & Alloway, K.D., 2012). Entender la función de estas proyecciones sería fundamental para comprender su papel en la función estriatal y las conductas relacionadas.

Vía cortico-estriatal

La proyección cortico-estriatal es crítica para la selección del comportamiento (Redgrave et al., 2010). Aquí, las neuronas corticales de proyecciones glutamatérgicas, envían sus axones a los GB, en donde principalmente contactan con las NEMs y las interneuronas de disparo rápido (Steiner, H.& Tseng, KY., 2017)

Las proyecciones cortico-estriales se distribuyen topográficamente. Experimentos realizados en primates, en los cuales se inyectaron trazadores anterógrados en la corteza somatosensorial primaria, han mostrado que en el putamen se reciben entradas somatosensoriales (Flaherty & Graybiel, 1991). Experimentos similares han corroborado esta información en roedores (Figura 3; Hintiryan et al., 2016)

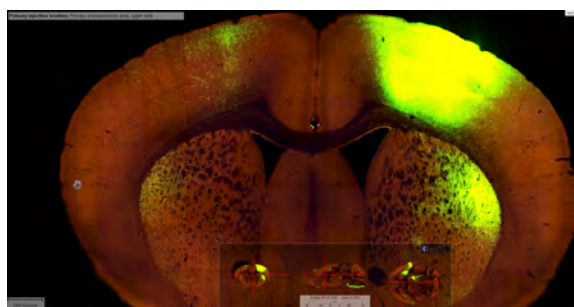


Figura 3. Se observa en la imagen la proyección cortico-estriatal. Rebanada de cerebro donde se inyectó a cada cerebro de ratón una proteína fluorescente verde (EGFP), que expresa un virus adenoasociado (AAV) como un marcador viral anterógrado en una región cerebral particular. Imagen tomada de *Allen Brain Atlas* (Allen Institute; <http://connectivity.brain.org>).

Las proyecciones glutamatérgicas corticales al estriado, provienen principalmente en la capa 5, y en algunos casos en la capa 3 (Steiner, H.& Tseng, 2017). Los dos principales subtipos de neuronas corticostriatales basados en la distribución de sus colaterales axónicas subcorticales son: las neuronas intratelencefálicas (IT) y las neuronas del tracto piramidal (PT) (Steiner, H.& Tseng, KY., 2017). Las neuronas IT proporcionan colaterales axónicas que se distribuyen solo dentro del cuerpo estriado y la corteza cerebral (Cowan y Wilson, 1994, Wilson, 1987, Zheng, T. y Wilson, C., 2002). Estas neuronas están ubicadas en la mitad superficial de la capa 5 con algunas distribuidas en capas 2 y 3. Las neuronas PT se localizan principalmente en la corteza motora primaria y proyectan al tallo cerebral y a la médula espinal, pero se ha demostrado que también aportan colaterales de axones al estriado (Gerfen C.R., 2014)

En condiciones normales, las NEMs suelen presentar bajas frecuencias de disparo debido a sus propiedades intrínsecas de membrana en el estado “down state” oscilan alrededor de los -75 mV y en el estado de “up state” es alrededor de -54 mV (Wilson & Kawaguchi, 1996), y se ha propuesto que la principal forma de ser activadas es a través de entradas corticales acopladas espacial y temporalmente (Callabresi, P., 1996, Sepencer H.J., 1976). Por lo tanto, se ha propuesto que la actividad de las neuronas del cuerpo estriado está bajo el control directo de la entrada cortical excitatoria, que representa la principal fuerza impulsora de despolarización hacia este núcleo. Los estudios electrofisiológicos pioneros *in vivo* han demostrado que la activación de los insumos corticales produce potenciales sinápticos excitadores (EPSPs) en el cuerpo estriado. Estudios *in vitro* en rebanadas de roedor, donde se realizaron registros intracelulares, han demostrado que las neuronas corticostriatales de la rata presentan cambios espontáneos en el potencial de membrana (Redgrave et al., 2010). El curso del tiempo de estos cambios se asemeja mucho a las transiciones de hiperpolarización/despolarización de membrana espontáneas hiperpolarizaciones observadas en las neuronas del estriado registradas intracelularmente *in vivo*. Cuando estas despolarizaciones espontáneas de la membrana cortical alcanzan el umbral para la activación de los potenciales de acción, provocan el disparo de las neuronas corticostriatales y, a su vez, activan los cambios sincrónicos en el potencial de la membrana en las neuronas del

estriado a través de la liberación de glutamato. Por esta razón, solo las entradas sinápticas excitadoras sincronizadas espacial o temporalmente, o ambas, pueden provocar el disparo de las neuronas del estriado.

Experimentos donde se han utilizado trazadores retrógrados en el estriado dorsolateral para observar las proyecciones que provienen de las neuronas corticostriatales, se ha observado el estriado dorsolateral no solo integra información sensoriomotora de la corteza somatosensorial, sino que también de regiones sensoriales y núcleos inespecíficos de tálamo (Hoover, J.K., Hoffer, Z.S. & Alloway, K.D., 2003).

Vía tálamo-estriatal

Las proyecciones provenientes del tálamo hacen contacto sináptico con ambas, las NEMs y las interneuronas estriatales. Las proyecciones talámicas son glutamatérgicas y una de sus características es la presencia de transportadores vesiculares de glutamato del tipo 2 vGluT2 (Steiner, H. & Tseng, KY., 2017).

En los primeros estudios electrofisiológicos en gatos y ratas anestesiados, la estimulación eléctrica de los núcleos intralaminares EPSP en las neuronas estriatales (Kocsis and Kitai, 1977). Estudios posteriores, también realizados en ratas anestesiadas, demostraron que las respuestas excitatorias tálamo-estriatales podrían ser provocadas tanto en NEMs como en interneuronas colinérgicas (Steiner, H. & Tseng, KY., 2017).

Gran parte de las proyecciones tálamo-estriatales provienen de los núcleos intralaminares (Ellender et al., 2013) que reciben información sensorial y motora de la médula espinal, el pedúnculo pontino y los núcleos tegmentales laterodorsales, los núcleos cerebelosos centrales, el colículo superior, el núcleo reticular talámico (Hintiryan et al., 2016; Smith, Yoland, Dineshh, Raju, Nanda, Bijili, Pare, Jean-Francois, Galvan, 2010; J. B. Smith et al., 2012; Yamanaka et al., 2018) y el pálido ventral. Los núcleos talámicos intralaminares proporcionan información no solo al estriado, sino también a gran parte de la corteza cerebral. En los mamíferos, los núcleos talámicos intralaminares como se observa en la

figura 4, residen en un campo que también incluye el complejo nuclear talámico mediodorsal y de la línea media (Reiner, Jiao, & Mar, 2003)

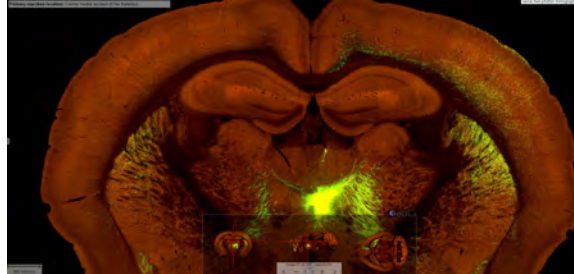


Figura 4. Se observa en la imagen la proyección tálamo-estriatal. Rebanada de cerebro donde se inyectó a cada cerebro de ratón una proteína fluorescente verde (EGFP), que expresa un virus adenoasociado (AAV) como un marcador viral anterógrado en una región cerebral particular. Imagen tomada de *Allen Brain Atlas* (Allen Institute; <http://connectivity.brain.org>).

Estudios anatómicos utilizando el trazador retrogrado Fluorogold (FG) inyectado en diferentes regiones del EDL revelaron la presencia de una amplia distribución de neuronas en diferentes núcleos del tálamo, entre los que destacan los núcleos talámicos intralaminares. Además, también se observaron neuronas marcadas en el complejo ventrobasal, en donde destacan los núcleos ventro-postero-lateral (VPL) y ventro-postero-medial (VPM), indicando la presencia de vías directas de información sensorial entre el tálamo y los ganglios basales (Erro, E., Lanciego, J.L. & Giménez-Amaya, 2002)).

Es importante recalcar que el tálamo es un núcleo de suma importancia como uno de los relevos que lleva información somatosensorial a las cortezas a través de los sistemas de la columna dorsal y el lemnisco-medial. En la literatura clásica se describe una vía somatosensorial canónica, en donde las terminaciones axonales de los mecanorreceptores de la piel ingresan a la medula espinal a través de la raíz dorsal, ascienden mediante los fascículos gracilis y cuneatus, decusan en el lemnisco medio, y hacen sinapsis en el VPL (extremidades y cuerpo) y el VPM (cara), desde donde se originan proyecciones hacia las cortezas sensoriales primarias. Además, evidencia anatómica indica la presencia de una proyección directa a los ganglios basales desde el VPL (Erro E. et al.,

2002; Elena, E., Lanciego, J.L., Arribas, J. & Giménez-Amaya, J.M 2001). Observaciones similares fueron realizadas por Smith et al (2012), pero en proyecciones desde el VPM y el POrn hacia el DLS (Smith, J.B., Mowery, T.M. & Alloway, K.D., 2019).

Diversos estudios se han encargado de estudiar las características y el papel de las proyecciones tálamo-estriatales que se originan en los núcleos intralaminares, como el complejo Central/Parafascicular (Castle et al., 2005; Minamimoto, Hori, & Kimura, 2009). Sin embargo, las características básicas y la función de las proyecciones sensoriales tálamo-estriatales aún son ampliamente desconocidas.

PLASTICIDAD NEURONAL

Una de las más importantes propiedades del cerebro de los mamíferos es la plasticidad. La neuroplasticidad se ha definido como “la habilidad del sistema nervioso de responder a estímulos intrínsecos o extrínsecos mediante la reorganización de estructuras conexiones y funciones” (Cramer et al., 2011). La plasticidad se produce en varios niveles organizativos del sistema nervioso, de esta manera al hablar de plasticidad podemos hablar de plasticidad neuronal, glial, plasticidad sináptica, etc.

Los cambios ocurridos en las sinapsis son regulados tanto por procesos efímeros (de corto plazo) como duraderos (de largo plazo). Algunos de estos cambios conducen a una disminución de la fuerza sináptica (conocida como depresión) y otros que conducen al aumento en la fuerza sináptica (conocida como facilitación). Una de las principales características descritas para las vías cortico – y tálamo – estriatales es la presencia de diversos tipos de plasticidad neuronal, entre las más importantes están la potenciación de largo plazo (LTP) y la depresión de largo plazo (LTD) (Centonze et al., 2001).

Tipos de plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica se puede clasificar según la temporalidad de la prevalencia de su respuesta, puede ser plasticidad de corto y largo plazo, ambos tipos de plasticidad pueden presentar facilitación, aumento, potencialización y depresión (Purves, 2016). La facilitación de corto plazo es el incremento rápido en la fuerza sináptica en la escala de cientos de milisegundos. Se ha propuesto que esta ocurre usualmente por un incremento en la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas, esto puede ocurrir por incrementos transitorios en las concentraciones de calcio (calcio residual) (Zucker & Regehr, 2002). Un ejemplo clásico de potenciación de corto plazo es la facilitación del pulso pareado (Fig. 5)

Otro tipo de plasticidad ocurre cuando los cambios se presentan en la región postsináptica, por ejemplo, cuando se presentan cambios en la eficacia del receptor postsináptico o cuando aumenta el número de receptores, La duración de estos cambios determinará si la plasticidad es de corto o largo plazo. Ambos ejemplos anteriores resultarían en una facilitación en la transmisión, sin embargo, lo contrario también puede ocurrir. Por ejemplo, la desensibilización de los receptores postsinápticos podría ser importante, como se ha demostrado durante la estimulación de alta frecuencia (Eugenín & Editors, 2017)

También se han reportado cambios en el número de sitios donde el neurotransmisor se puede liberar lo cual representa un mecanismo para aumentar efectivamente el conjunto máximo de receptores activables y, por lo tanto, constituye un poderoso mecanismo potencial para cambiar la fuerza absoluta de las conexiones sinápticas (Jędrzejewska-Szmek, J., Damodaran, S., Dorman, D.B. & Blackwell, K.T., 2017)

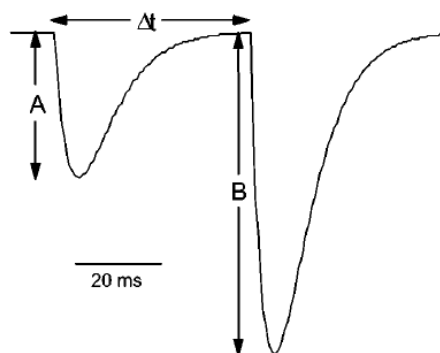


Imagen 5. Ejemplo de facilitación de corto plazo. Se muestra el cambio de amplitud en la espiga A y en la B, como respuesta a estímulos pareados. Δt muestra la diferencia de tiempo entre el estímulo A y B (tomada de Zucker, R.S. et al., 2002)

La depresión sináptica tanto de corto y largo plazo es una disminución de la fuerza sináptica, producida cuando dos o más potenciales de acción provenientes de la célula presináptica producen una respuesta disminuida en la amplitud de los potenciales post sinápticos, también se ha observado que la depresión sináptica está mediada en gran medida de manera presináptica. (Purves, 2016).

Los dos tipos de plasticidad de corto plazo pueden interactuar y formar patrones más complejos en la relación pre-post sinapsis (Markram H., Gupta, A.,

Uziel, A et al, 1998; Barroso-Flores et al, 2017). A pesar de que la PCP parece ser una característica intrínseca de la comunicación interneuronal y por lo tanto se estima que estaría presente en todas las sinapsis, aún no hay un consenso acerca de su función. Sin embargo, se especula su implicación en mecanismos de generación de patrones poblacionales, adaptación sensorial, control de ganancia dinámico, y representaciones temporales (Motanis et al, 2018;). Algunos trabajos muestran claramente que la dinámica de redes corticales está directamente relacionada con el tipo de plasticidad de corto plazo (PCP) que se expresa en las conexiones de la red (Carrillo-Reid, L., Lopez Huerta, V.G., Garcia- Munoz, M., Theiss, S. & Arbuthnott, G.W., 2015). En los ganglios basales se han reportado diversos tipos de PCP en las sinapsis cortico y tálamo estriatales, sin que hasta el momento conozcamos su función.

Plasticidad sináptica de corto plazo en la vía cortico y tálamo estriatal

Debido a que las proyecciones cortico y tálamo estriatales representan la inmensa mayoría de las entradas sinápticas al estriado, ha sido y es importante el estudio de sus diferencias y posibles funciones. Al respecto se ha propuesto que mientras las proyecciones cortico-estriatales estarían involucradas en aspectos cognitivos y motivacionales del comportamiento (Graybiel, A.M., 2000). Las terminales tálamo-estriatales, podrían ser adecuadas para el papel de transmitir señales episódicas sincronizadas con precisión (Ding, J., Peterson, J.D., Surmeier, D.J., 2008). Sin demeritar éstas y otras especulaciones con respecto las funciones de ambas vías, aún estamos lejos de comprender el papel de ambas en la funcionalidad de los circuitos estriatales o las conductas asociadas.

En términos estructurales, una de las características de la vía cortico-tálamo-estriatal es que presentan plasticidad sináptica (Steiner, H.& Tseng, 2017). En estudios in vitro se ha visto que los axones de las neuronas corticales y talámicas se cortan a corta distancia de sus cuerpos celulares, lo que hace imposible estimular fuera del estriado y activar selectivamente una u otra clase axonal (Kawaguchi Y, Wilson CJ & Emson PC., 1989). Otra característica morfológica es que las sinapsis cortico y talamoestriatal se entremezclan en los árboles

dendríticos de las NEMs (Wilson, 2004), haciendo de la estimulación local una estrategia ineficaz para la activación selectiva de una sola vía. Otra característica que da forma a la actividad estriatal es la heterogeneidad de las NEMs. En el cuerpo estriado, hay dos clases principales de neuronas espinosas medianas que pueden distinguirse sobre la base de la expresión del receptor de dopamina (DA) D1 y D2 y la proyección axonal. Trabajos realizados por el grupo de Surmeier muestra que la plasticidad a corto plazo en las sinapsis corticostriatales formadas en las NEMs es significativamente diferente de la de las sinapsis talamostriatales formadas en la misma neurona (Ding, J., Peterson, J.D. & Surmeier, D.J., 2008). Las sinapsis corticostriatales mostraron una facilitación de pulso pareada atribuible a una baja probabilidad de liberación cuántica basal en los terminales presinápticos. En contraste, las sinapsis talamostriatales mostraron una prominente depresión de pulso pareado atribuible a una alta probabilidad de liberación en las terminales presinápticas. Estas características sinápticas fueron indistinguibles en los NEMs de la vía directa e indirecta y se tradujeron en distintos patrones de aumento en respuesta a la estimulación repetitiva de cada vía.

En otro trabajo, (Ellender et al., 2013) utilizando una preparación *in vitro* y manipulaciones optogenéticas estudiaron las diferencias en la PCP entre los núcleos parafascicular y central medial del tálamo y la corteza. Encontraron que las proyecciones provenientes de la corteza y del núcleo parafascicular expresaron una clara depresión de corto plazo ante estímulos repetitivos a 10 y 20 Hz, las proyecciones provenientes del núcleo central lateral mostraron un patrón bifásico donde los primeros estímulos del tren provocaron una robusta facilitación mientras que los subsiguientes mostraron depresión. Estas y otras medidas llevaron a los autores a la conclusión de que las entradas provenientes del núcleo central fueron más eficientes para producir potenciales de acción en las NEMs, mientras que las entradas provenientes del núcleo parafascicular tendrían un carácter modulador (Fig.6).

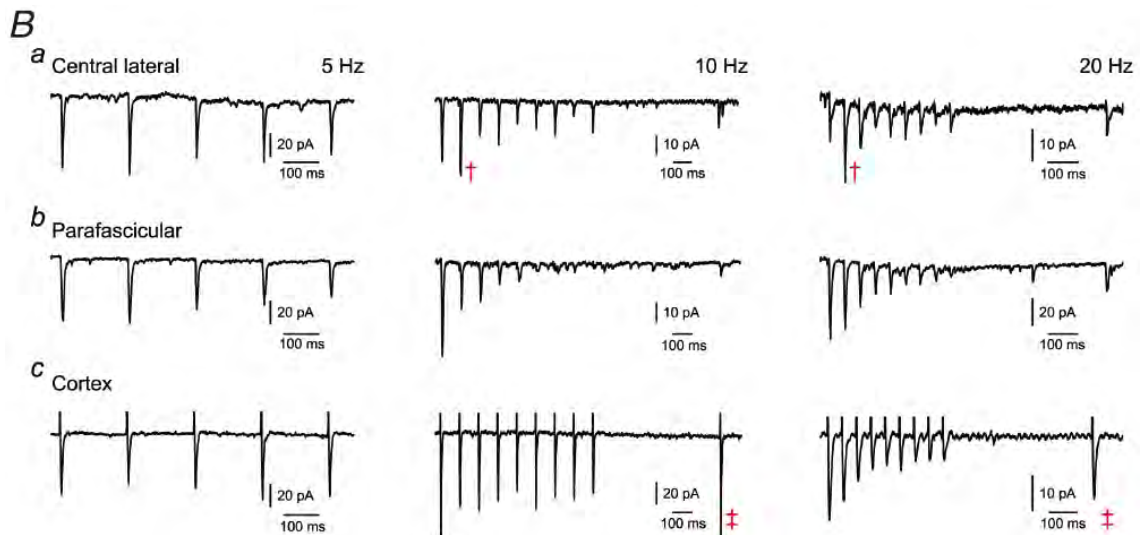


Figura6. Corrientes postsinápticas excitatorias evocadas por la estimulación optogenética de las terminales de los núcleos talámicos central lateral (a), parafascicular (b) y de la corteza (c) en el estriado. Los trenes de estimulación fueron aplicados a 5 Hz (izquierda), 10 Hz (centro) y 20 Hz (derecha) en rebanadas de cerebro de ratón. Tomado de Ellender et al, 2013.

Una posible explicación para las diferencias en la probabilidad de liberación es que las proyecciones cortico - tálamo - estriatales expresan diferentes proteínas transportadoras de glutamato vesicular: vGluT1 y vGluT2 respectivamente. Estas dos proteínas transportadoras se expresan diferencialmente en las terminales de las fibras cerebelosas paralelas y las fibras trepadoras, donde existe una divergencia similar en la probabilidad de liberación (Miyazaki, Fukaya, Shimizu, & Watanabe, 2003). Otra posible explicación se deba la expresión diferencial de los receptores AMPA y NMDA, la abundancia relativa de los receptores de NMDA en la vía corticostriatal provoca un carácter facilitador del terminal presináptico para promover una despolarización dendrítica más prolongada y robusta.

Con respecto a la plasticidad neuronal en el estriado provocada por la estimulación específica de proyecciones sensoriales que se originen en el tálamo, existe un único reporte en la literatura. Alloway y colaboradores (Alloway, Smith, & Watson, 2014) idearon una preparación in vivo y en ratas ligeramente anestesiadas en donde era posible evocar respuestas neuronales en el EDL ante la estimulación de las vibrisas o la estimulación eléctrica de los núcleos talámicos VPM y POm (relevos de información somatosensorial de las vibrisas). Los

autores demostraron que la estimulación de estos elementos produjo PCP (principalmente depresión), a frecuencias de 5 y 8 Hz, más lentas que las reportadas en estudios *in vitro*, pero más cercanas a las del movimiento de las vibrisas durante la exploración natural ~10Hz; (Deschênes, Moore & Kleinfeld, 2012). A pesar de que el objetivo del estudio de Alloway y col. no era una descripción y entendimiento de los mecanismos de la función de la PCP evocada por estímulos sensoriales, sus hallazgos sugieren que la estimulación de vías sensoriales sería capaz de evocar cambios efímeros en los pesos sinápticos.

DINÁMICA DEL ESTRIADO DORSOLATERAL.

Con respecto a los cambios en la actividad neuronal en el estriado, diversos estudios electrofisiológicos, *in vitro* (Bargas, Galarraga, & Aceves, 1991; Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández -Cruz A, Galarraga E, 2012), en animales *in vivo* y libre movimiento (Barnes, Kubota, Hu, Jin, & Graybiel, 2005; Gouvêa et al., 2015; Rueda-Orozco & Robbe, 2015) han tratado de dilucidar cuál es el papel de la dinámica estriatal. Carrillo-Reid y col en el 2008 propusieron que el estriado poseía la conectividad y lo mecanismos intrínsecos, para ser un generador de patrones. Para estudiar la dinámica del microcircuito estriatal *in vitro*, utilizaron imagenología de calcio y registros de voltaje en NEMs. Activando la preparación mediante la adición de NMDA en la solución de perfusión investigaron si la dinámica de red era capaz de generar patrones. Observaron que la actividad poblacional se organizaba en estados que se repetían y alternaban, por lo que se concluyeron la presencia de una organización básica de procesamiento de información en el microcircuito estriatal (Luis Carrillo-Reid et al., 2008)

Estudios realizados *in vivo* como el de (Barnes et al., 2005; Jog, Kubota, Connolly, Hillegaart, & Graybiel, 1999), donde se registró la actividad neuronal en roedores realizando una tarea en un laberinto en T, en donde los animales giraban a la derecha o izquierda siguiendo indicaciones auditivas para recibir una recompensa. En estos trabajos se encontró que el incremento en la actividad

neuronal del EDL, estaba relacionado con el inicio y el final de una secuencia de movimientos, pero interesantemente no con la ejecución de esta.

Por otro lado, (Rueda-Orozco & Robbe, 2015), utilizando una tarea en donde el control de parámetros cinemáticos de la ejecución era indispensable para la obtención de reforzadores, demostraron que además de las previamente mencionadas señales de inicio/final, en el EDL también existe una representación de parámetros cinemáticos, como la velocidad y posición del animal.

La información anterior muestra que la actividad estriatal está altamente relacionada a parámetros necesarios para la ejecución, pero no nos permite entender cómo es que mecanismos intrínsecos de la comunicación de esta región con otras estructuras, como la PCP, podrían intervenir en la salida conductual final. Al respecto (Mello et al., 2015) registraron neuronas del cuerpo estriado en ratas que realizaban una tarea de estimación de intervalos de tiempo. Encontraron que la actividad de poblaciones estriatales se organizaba en forma de secuencias de activación que abarcaban el intervalo a estimar. De forma interesante, encontraron que la posición relativa de las neuronas dentro de la secuencia no cambiaba, sino que la secuencia “escalaba” dependiendo del intervalo a estimar. Los autores concluyen que al menos en parte, la organización secuencial podría deberse a mecanismos como la PCP provocada por el flujo sensoriomotor evocado por el movimiento del animal. Esta posibilidad ha sido propuesta con anterioridad por otros autores (revisado en, Motanis, Seay, & Buonomano, 2018).

JUSTIFICACIÓN

Se ha propuesto que el EDL integra información sensorial y motora de las cortezas y el tálamo para producir y/o modular comandos motores. A pesar de la contundente evidencia anatómica de estas interacciones, aun no se tiene un conocimiento claro de las diferencias y características de las vías corticales sensoriales y talámicas. También se desconoce, cómo la integración de ambas vías modifica la dinámica poblacional del estriado dorsolateral. Para comprender el funcionamiento del estriado y en general de los GB, es necesario contar con una caracterización minuciosa del procesamiento de información sensorial en estos núcleos en modelos *in vivo*. Con este propósito hemos implementado un modelo en roedores que nos permite estudiar *in vivo*, la dinámica poblacional del estriado, evocada por la estimulación sensorial y la activación específica de las vías cortico y tálamo estriatales.

HIPÓTESIS.

Estudios anatómicos y electrofisiológicos *in vivo* han demostrado consistentemente la existencia de representaciones sensoriales en el EDL. A pesar de que el componente sensorial constituye una de las mayores entradas de información a los ganglios basales, hasta el momento se desconoce en detalle el origen o el papel de estas representaciones en la dinámica de actividad estriatal. Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que una de las principales características de las vías cortico-tálamo-estriatales es la presencia de plasticidad sináptica de corto plazo. En este contexto la hipótesis de este proyecto es que:

La estimulación en trenes de vías cortico y tálamo estriatales sensoriales producirá diferentes tipos de plasticidad de corto plazo in vivo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la estimulación somatosensorial produce plasticidad de corto plazo en las vías cortico-tálamo-estriatales, y que tipo de plasticidad de corto plazo se evoca en cada vía.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Analizar las respuestas neuronales evocadas en el EDL por la estimulación mecánica de las extremidades en un modelo en rata *in vivo* y en animal anestesiado.
2. Implementación de herramientas optogenéticas para la manipulación específica en las vías cortico – estriatal y tálamo – estriatal.
3. Examinar si el modelo de estimulación mecánica *in vivo* y el de estimulación optogenética es equiparable para el estudio de la dinámica estriatal y plasticidad neural en la vía cortico-tálamo-estriatal.
 - a) Cuantificar el número de neuronas que responden en la corteza S1 y EDL ante la estimulación mecánica y la estimulación optogenética en el VPL y S1.
 - b) Analizar latencias de disparo en corteza S1 y estriado dorsolateral evocada por la estimulación mecánica y la estimulación optogenética del VPL.
 - c) Identificar si se genera plasticidad neuronal en la corteza S1 y el estriado dorsolateral evocada por la estimulación somatosensorial y la estimulación optogenética en el VPL, mediante el análisis de la tasa de disparo
 - d) Identificar el tipo de plasticidad neuronal evocada por la estimulación somatosensorial y la estimulación optogenética en el VPL.

MÉTODOS

Sujetos

Se utilizaron ratas machos y hembras Wistar y Long-Evans de 250-500 g., alojadas en pares en cajas de acrílico, en condiciones de temperatura estable (22° C), ciclo de luz/obscuridad de 12 horas, y acceso a comida y agua *ad libitum*. Las ratas fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología y alojadas en el bioterio satélite del laboratorio con un mínimo de dos días previos a los procedimientos quirúrgicos, con el fin de disminuir los niveles de estrés.

La presente investigación fue aprobada por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología, bajo el proyecto 82A, titulado “Papel de los ganglios basales en el aprendizaje y ejecuciones de secuencias motoras complejas.”

Cirugía para infección de virus

Los animales fueron infectados en el núcleo de interés con virus obtenidos de la Universidad de North Carolina Vector Core, el constructo que utilizamos para este proyecto fue el rAAV5-CamKIIa-hchR2-(H134R)-EYFP-WPRE-PA para la expresión de Canalrodopsina de tipo 2 (hchR2). La hchR2 fue activada por estimulación óptica a una longitud de onda de 465nm, al haber sido activada permitió el flujo de cationes (Deisseroth, 2011). Los virus fueron inyectados mediante cirugía estereotáxica en condiciones de anestesia profunda. La anestesia se indujo con un cocktail de Ketamina (90 mg/kg) – Xilazyna (5 mg/kg), durante la cirugía el nivel óptimo de anestesia se mantuvo con Sevofluorano (0.2 – 2 %). Para evitar oclusión de las vías respiratorias e infecciones se administró una dosis única de atropina 0.025 mg/kg y Gentamicina 5mg/kg. El nivel de anestesia se determinó mediante el monitoreo constante de la respiración y la temperatura y los reflejos nociceptivos. Las microinyecciones se realizaron a través de un trepano de ~ 0.4 mm de diámetro centrado en las siguientes coordenadas con respecto a bregma. En milímetros para el VPL, AP: -2.3, L: 2.8, V: -5, y para la corteza S1, AP: 0.5, L: 3.8.7, V: -1.5. El volumen de virus utilizado

fue 500 – 2000 nl. Las administraciones fueron realizadas con una microjeringa Hamilton® (Neuro-Syringe 7001, 1µL) acoplada a una bomba de infusión (modelo WPI-UMP3) a una velocidad de 200nL/min. Al término de las administraciones, esperamos 10 min antes de retirar la jeringa y suturar a los animales. Los experimentos electrofisiológicos en animales infectados fueron realizados al menos 4 semanas después de las inyecciones, tiempo de incubación necesario para la expresión de las opsinas.

Registros electrofisiológicos *in vivo*

Se realizaron registros electrofisiológicos mediante arreglos de multielectrodos, con ayuda de procedimientos de “separación de células” (spike sorting), estos procedimientos permiten el registro simultáneo de varias decenas de neuronas. El microarreglo (“silicon probe” modelo Buszaki-64), mide 1.4 mm de ancho y 5mm de largo, conformado por 8 puntas separadas por una distancia de 200µm y cada punta contiene 8 microelectrodos. En la figura 8 se esquematiza el arreglo de microelectrodos y su posición en las estructuras a registrar.

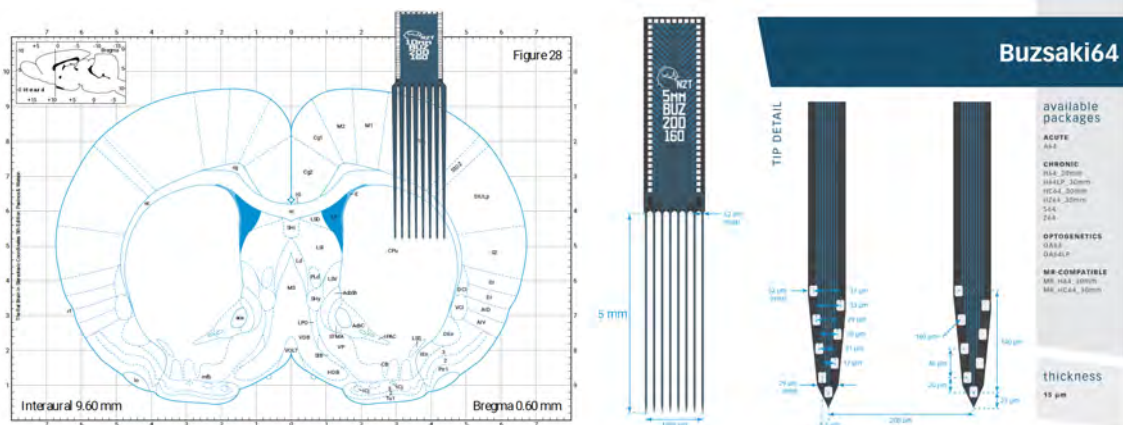


Figura 7. Esquema representativo de la silicon probe. En esta figura de la izquierdo se muestra la silicon probe con sus ocho shanks, de lado izquierdo son dos shanks representativos y las medidas correspondientes entre la distancia entre uno de ellos y las distancias entre los microelectrodos.

Los registros electrofisiológicos se realizaron en animales anestesiados con uretano a una dosis de 1.1 – 1.5 g/kg. Se ha reportado que estas dosis la actividad cortical presenta oscilaciones de alto voltaje a frecuencias de ~1 Hz, además la estimulación somatosensorial, auditiva y visual produce respuestas robustas en regiones corticales primarias (Contreras et al., 2013; Mochol, Hermoso-mendizabal, Sakata, Harris, & De, 2015)). La dosis final del anestésico fue distribuida en tres inyecciones intraperitoneales (1 cada 30 minutos). La inserción de los electrodos se realizó a través de una craneotomía y durotomía de aproximadamente 2 mm x 2 mm sobre la corteza somatosensorial primaria centrada en las siguientes coordenadas con respecto bregma AP = 0.2 y L = 3.7. El sistema de registro fue aterrizado y referenciado mediante dos microtornillos fijos al cráneo del animal sobre la región del cerebelo. Finalmente, inmediatamente antes de la inserción, los electrodos fueron teñidos con Dil (Sigma-Aldrich®), para su posterior localización histológica.

Al finalizar los registros, los sujetos fueron perfundidos de manera intracardiaca, con 60 ml de solución salina al 0.9% seguido de 60 ml de paraformaldehído al 4%. Posteriormente los cerebros son seccionados en rebanadas de 50 micrómetros, las rebanadas son montadas en portaobjetos y visualizadas y fotografiadas con un microscopio de epifluorescencia.

Estimulación somatosensorial durante los registros in vivo en animal anestesiado

Los estimuladores mecánicos fueron colocados en las extremidades delanteras de los animales, el cual está conformado por una punta de algodón (12 mm de diámetro) acoplado a una válvula solenoide y colocado en la palma de la pata delantera contralateral al sitio de registro (Figura 8). Los protocolos de estimulación fueron controlados automáticamente mediante rutinas programas en la plataforma LabVIEW.



Figura 8. Esquema de la estimulación somatosensorial in vivo. Se muestra un esquema de un animal anestesiado en registro in vivo. Se observa sus patas delanteras y como están colocadas para ser estimuladas adecuadamente

Se utilizaron los siguientes protocolos para la estimulación mecánica y óptica. Basado en la frecuencia del movimiento cíclico de las extremidades de ratas corriendo en una caminadora a una velocidad de 30cm/s aprox. (Rueda-Orozco, P.E. & Robe, D., 2015)

- 50 estímulos de 5 ms con un intervalo de 5s entre estímulos (Figura 9a).
- 50 trenes de 5 estímulos (5 ms / estímulos) a 3.3 Hz con un intervalo entre trenes de 5s (Figura 9b).

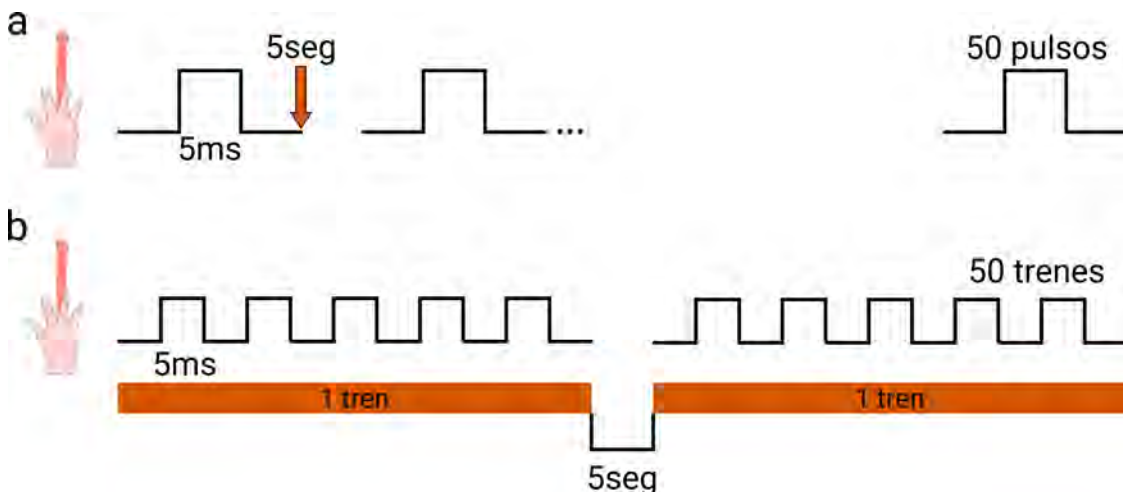


Figura 9. Esquemas de protocolos de estimulación mecánica. a) 50 estímulos con una duración de 5ms y un intervalo entre cada estímulo de 5 segundos (flecha naranja). b) Protocolo de estimulación repetida, conformados por 50 trenes, cada tren compuesto por cinco estímulos.

Estimulación optogenética

Después de introducir la silicon probe, se introdujo una fibra óptica (200 μm de diámetro) en EDL, corteza S1 o VPL. La intensidad de luz que se utilizó en cada experimento fue determinada mediante la comparación con las respuestas a estímulos mecánicos, en general utilizamos intensidades entre 0.5 y 2.5 mW. Dependiendo de la proyección a estimular (Figura 9) las fibras ópticas fueron insertadas en el VPL o directamente en S1 o el DLS.

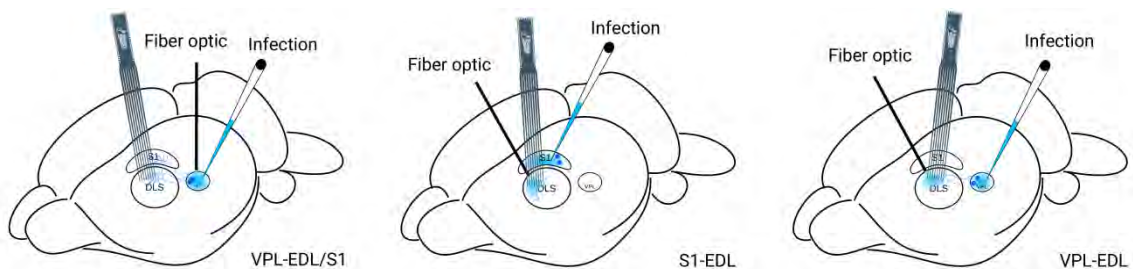


Figura 10. Esquema de los diferentes sitios de infección con virus y estimulación con fibra óptica.

En la figura de lado izquierdo se muestra que el sitio de infección (azul) fue en el VPL, la estimulación en el VPL y el registro en EDL. En la figura de en medio se muestra que el sitio de infección fue S1, la estimulación en las fibras eferentes del EDL y el registro en EDL y finalmente en la figura de lado derecho muestra el sitio de infección fue VPL, la estimulación en las fibras eferentes del VPL para el EDL y el sitio de registro en EDL

Se llevaron los siguientes protocolos de estimulación:

- 50 estímulos de 5 ms y un intervalo de 5 s entre estímulos.
- 50 trenes de 5 estímulos (5 ms / estímulo), a 3.3 Hz, con un intervalo entre trenes de 5 s.

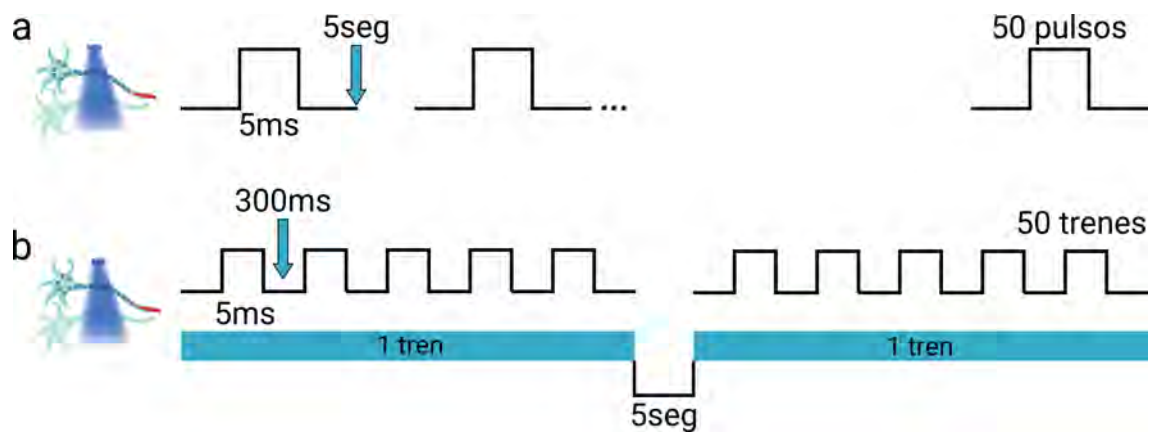


Figura 11. Esquemas de protocolos de estimulación óptica. a) 50 estímulos con una duración de 5ms y un intervalo entre cada estímulo de 5 segundos (flecha azul). b) Protocolo de estimulación repetida, conformados por 50 trenes, cada tren compuesto por cinco estímulos.

ANÁLISIS DE DATOS

Para la adquisición y procesamiento de datos electrofisiológicos se utilizaron las señales neurofisiológicas de banda ancha (0.1–8000 Hz) registradas con los arreglos de microelectrodos (Neuronexus, Buzsaki-64) y se amplificaron 1000 veces a través del sistema de amplificación Intan RHD2000 o Plexon VLSI y un amplificador PBX2. Las señales fueron adquiridas de forma continua a 20 kHz. Para los registros realizados con los amplificadores Plexon se utilizaron dos tarjetas de digitalización de 32 canales (National Instruments - PXI-e 6363, resolución de 16 bits). La clasificación de espigas se realizó de forma semiautomática utilizando el software de agrupación en clúster KlustaKwik (<http://klustakwik.sourceforge.net>) y la aplicación gráfica de clasificación de espigas Klusters (<http://klusters.sourceforge.net>) (Hazan, 2006)).

Análisis de los datos neuronales.

La tasa de disparo se obtuvo, estimando el número de potenciales de acción en bins de un milisegundo. Para todos los análisis, la actividad neuronal se extrajo de intervalos 1 segundo antes y dos segundos después de cada estímulo. Después, la tasa de disparo fue normalizada a valores Z.

Para determinar las latencias de respuesta a la estimulación mecánica u óptica, los datos neuronales se binarizaron a una resolución de 1 ms. Se construyeron histogramas peri-evento y se calculó un límite de confianza del 99% basado en la actividad basal (-1 segundo antes de cada estimulación) para cada célula. Las respuestas a la estimulación se consideraron significativas si excedían el límite de confianza por al menos 1 ms y la latencia de respuesta se definió como el momento en que el primer bin superaba el límite de confianza después de la estimulación mecánica u óptica.

RESULTADOS

El modelo de estimulación mecánica genera representaciones sensoriales en S1 y EDL en animales anestesiados.

Estudios previos han demostrado anatómicamente y electrofisiológicamente la presencia de representaciones somatotópicas de las extremidades delanteras y traseras y el tronco, en el EDL de roedores (Brown, 1992; Carelli & West, 1991). Aunque los componentes sensoriales constituyen una de las mayores entradas de información a los ganglios basales, hasta el momento se desconoce en detalle el origen o el papel de estas representaciones en la dinámica de la actividad estriatal. Para evaluar las representaciones sensoriales en el EDL, se realizaron registros extracelulares multiunitarios en S1 y EDL. Se registraron 12 animales, de los cuales se obtuvieron 656 células de la capa IV y V de S1 y 579 células en el EDL. Los registros en S1 se realizaron en profundidades entre 0.8 y 1.5 mm y en el DLS entre 3 y 4.5 mm con respecto a la superficie del cerebro. En la imagen 12, se observan graficas de barrido “raster plots” representativos de neuronas que respondieron en la S1 y el EDL ante un solo estímulo mecánico. Consistente con reportes previos (Chapin J K, Waterhouse, 1981; Luczak, McNaughton, & Harris, 2015) la estimulación cutánea evocó respuestas en S1 y también en el EDL. En ambas estructuras se encontraron cuatro respuestas arquetípicas. Un primer grupo de células exhibieron respuestas excitatorias con latencias cortas (figura 12a), un segundo grupo de células muestra una respuesta compleja, compuesta por una activación de latencia corta, seguida de una inactivación y finalmente una segunda activación “rebote” (figura 12b). Un tercer grupo mostró una inactivación transitoria seguida por una respuesta excitatoria alrededor de los 100-300 ms (figura 12c). Finalmente, un último grupo de células mostró una inactivación transitoria (figura 12d).

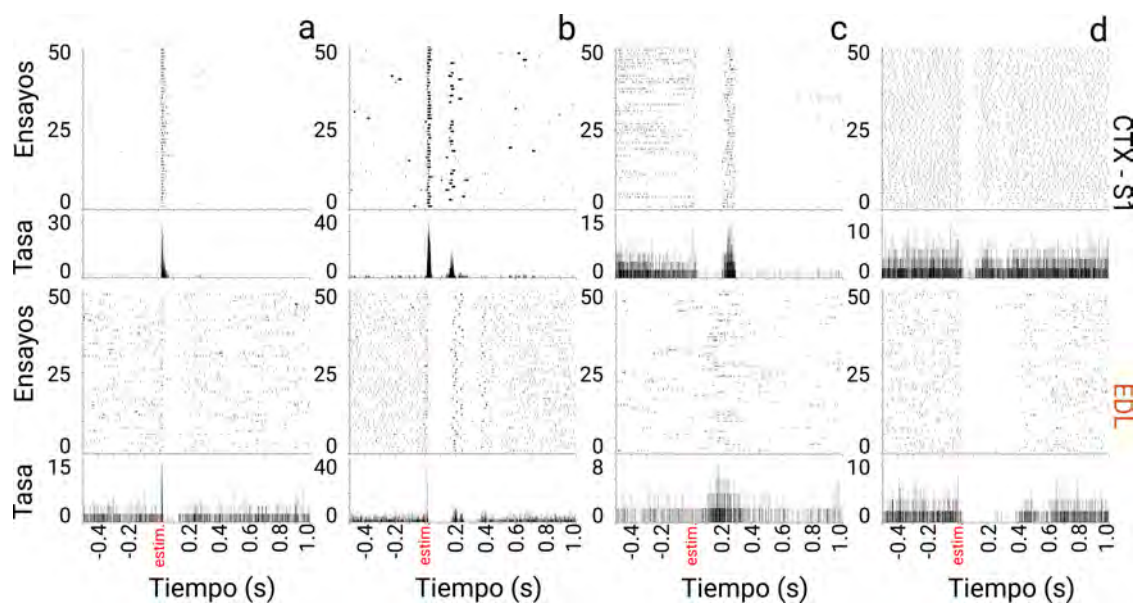


Figura 12. Respuesta arquetípica de la Ctx S1 y EDL. Rasters plots y tasas de disparo (histograma debajo de cada raster plot) de ocho neuronas representativas en la Ctx S1 (fila superior) y EDL (fila inferior) alineadas al momento del estímulo mecánico (línea roja).

Para poder evaluar la actividad neuronal de ambas estructuras a nivel poblacional, se realizó un análisis en el que se tomaron en cuenta solamente las células que cambiaron significativamente su tasa de disparo entre 100 y 300 ms después de la estimulación (CTX S1, 216 células, 40%; EDL, 240 células, 35.45%). La tasa de disparo normalizada a valores Z, tomando 1 segundo antes y 2 s después del inicio de la estimulación. La información se expresó en una matriz de colores, en donde los colores claros y oscuros representan mayores y menores tasas de disparo respectivamente (Figura 13). En ambas estructuras se observaron los estímulos mecánicos son representados en respuestas poblacionales caracterizadas por un grupo de un primer grupo de células responden con latencias cortas (~30 ms; parte superior de los gráficos), seguidos por una activación secuencial que de otras células que se extiende por varias decenas de milisegundos. Este tipo de activación – conocida como paquetes de información (Luczak, Mcnaughton, & Harris, 2015) - ha sido descrita previamente para cortezas auditivas y somatosensoriales, pero no se había descrito para la región sensorial del estriado.

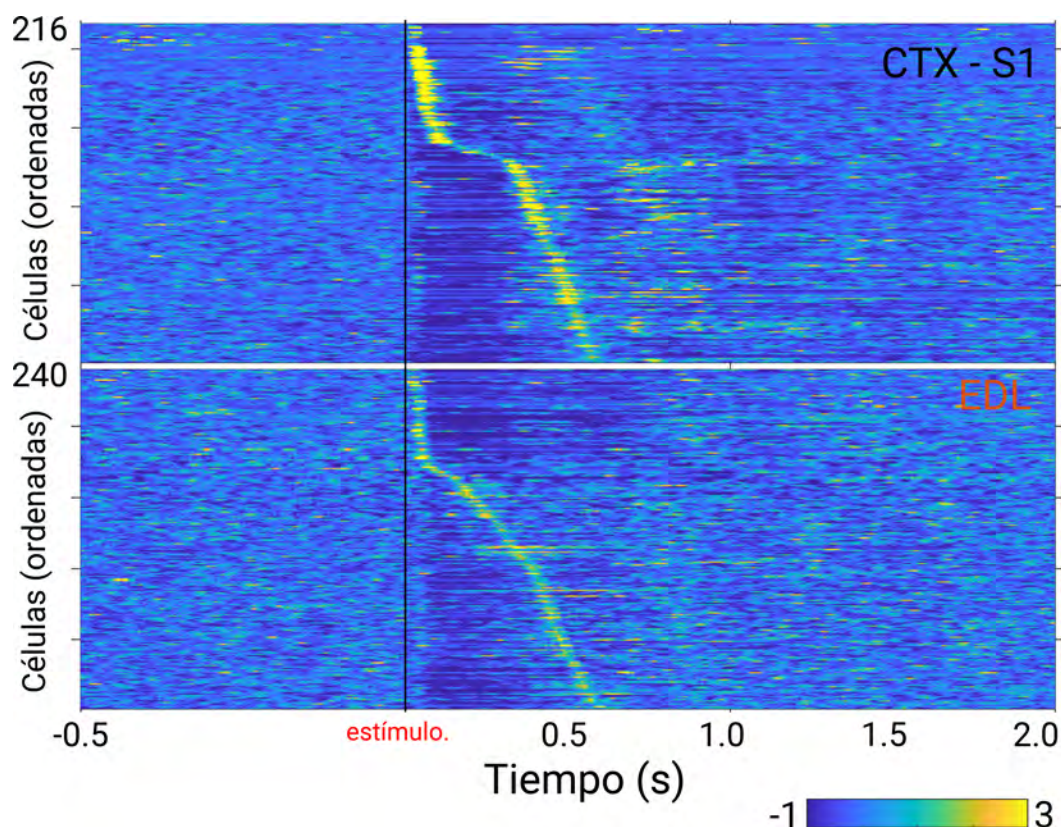


Figura 13. Respuesta poblacional de la Ctx S1 y EDL. Tasa de disparo en puntajes Z, alineadas al estímulo mecánico y ordenadas al momento en el que tuvieron su mayor tasa de disparo. En el panel superior es la actividad poblacional de la Ctx S1 y el panel inferior es la actividad poblacional del EDL. Mientras más cálidos sean los colores mayor es la actividad neuronal y mientras más fríos menor es la actividad neuronal.

Para determinar si como lo sugiere la literatura previa (Erro, Lanciego, & Gime, 2002), el origen de las representaciones sensoriales en el estriado podría estar en una proyección directa desde el VPL, se realizó una comparación de latencia de las respuestas en S1 y el EDL (ver métodos). Como se observa en la Figura 14 a-b, la distribución de las latencias de respuesta en S1 y el DLS fueron muy similares. De forma importante, se puede observar que en ambas estructuras una gran cantidad de neuronas presentaron latencias de respuestas muy cortas, alrededor de 19 ms, lo que sugiere que ambas estructuras podrían recibir una proyección común, potencialmente del VPL. Para una mejor apreciación de la respuesta rápida, se insertó una ampliación de la distribución de las latencias cortas tomando solamente los primeros 60 ms. Después, la distribución de las latencias fue normalizada al pico máximo de la distribución para cada región (Figura 14 c).

La distribución de las latencias se sobrepuso en ambas regiones, lo cual confirmaría aún más la existencia de una entrada directa, VPL-EDL.

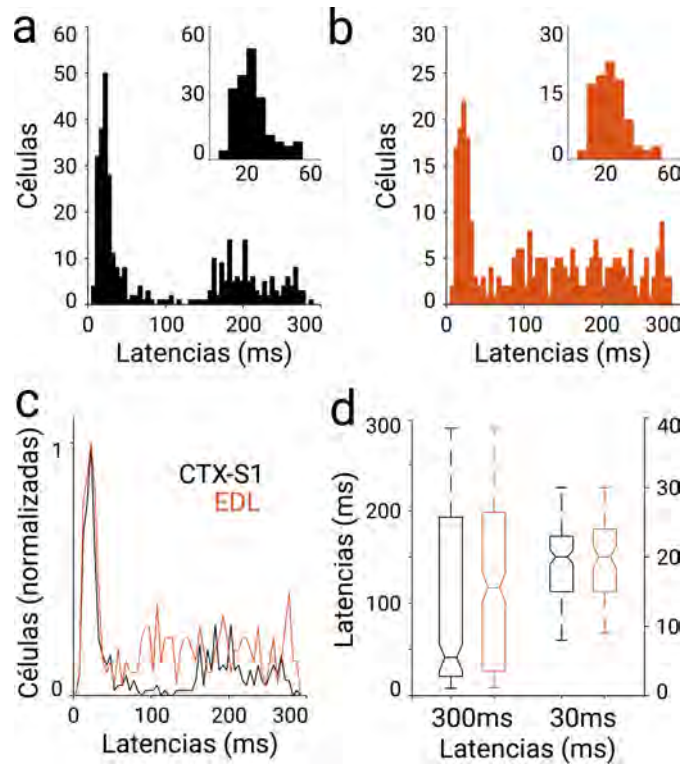


Figura 14. Latencia de respuesta en la Ctx S1 y EDL. Histograma que muestra la latencia de respuesta para todas las células registradas en S1 a) y EDL b) para mejor apreciación se insertó una visualización de los primeros 60 ms en la parte superior de cada histograma. c) Sobrelapación de las latencias normalizadas de la Ctx S1 (línea negra) y EDL (línea naranja). d) Comparación de las medianas de latencias para la población entera de células (izquierda) y para las células con latencias cortas de 30 ms (derecha).

La estimulación mecánica en trenes evoca PCP en la Ctx S1 y el EDL en un modelo de animal anestesiado por uretano.

Pudiendo constatar que el modelo de estimulación mecánica en animal anestesiado con uretano evocó representaciones sensoriales en la Ctx S1 y el EDL, utilizamos este modelo para implementar un protocolo de estimulación sensorial repetida con la finalidad de determinar si era posible evocar plasticidad de corto plazo en estas condiciones. Se registraron 656 células de la CTX S1 (capa IV y V) y 579 células del EDL de los mismos 12 animales reportados anteriormente. Los estímulos mecánicos fueron aplicados en trenes de cinco pulsos (3.3 Hz, ver métodos). En la figura 15 se muestran rasters plots representativos de la actividad neuronal en S1 y el DLS evocada por los trenes de estimulación. Como puede observarse, la estimulación repetida provocó cambios evidentes en las respuestas de algunas neuronas

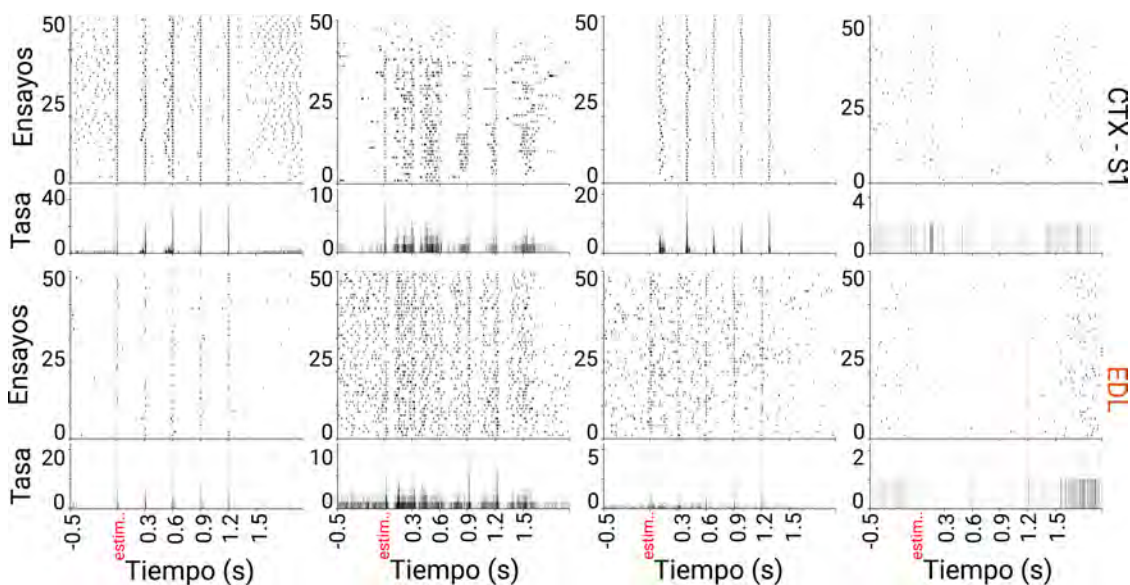


Figura 15. Respuesta neuronal de la Ctx S1 y EDL ante estímulos repetidos. Rasters plots y tasas de disparo (histograma debajo de cada raster plot) de ocho neuronas representativas en la Ctx S1 (fila superior) y EDL (fila inferior) alineadas al momento de cada estímulo mecánico (línea roja).

Para tener una idea de la dinámica poblacional evocada por los trenes de estimulación, la actividad de disparo de cada célula se transformó en valores Z y se alineó al primer estímulo del tren de estímulos, después estos valores

se graficaron ordenados por el momento en que cada célula alcanzó su máxima tasa de disparo entre el primer y el segundo estímulo del tren (Figura 16). Se observó que ante el primer estímulo ambas estructuras evocaron la respuesta arquetípica descrita en la figura 13; sin embargo, la respuesta evocada en los estímulos subsecuentes no presenta el mismo patrón de disparo poblacional. Mostrando que en un modelo de animal anestesiado con uretano podemos evocar PCP con estimulación mecánica repetida en la CTX S1 y EDL. Los análisis específicos de plasticidad para cada célula se presentan más adelante.

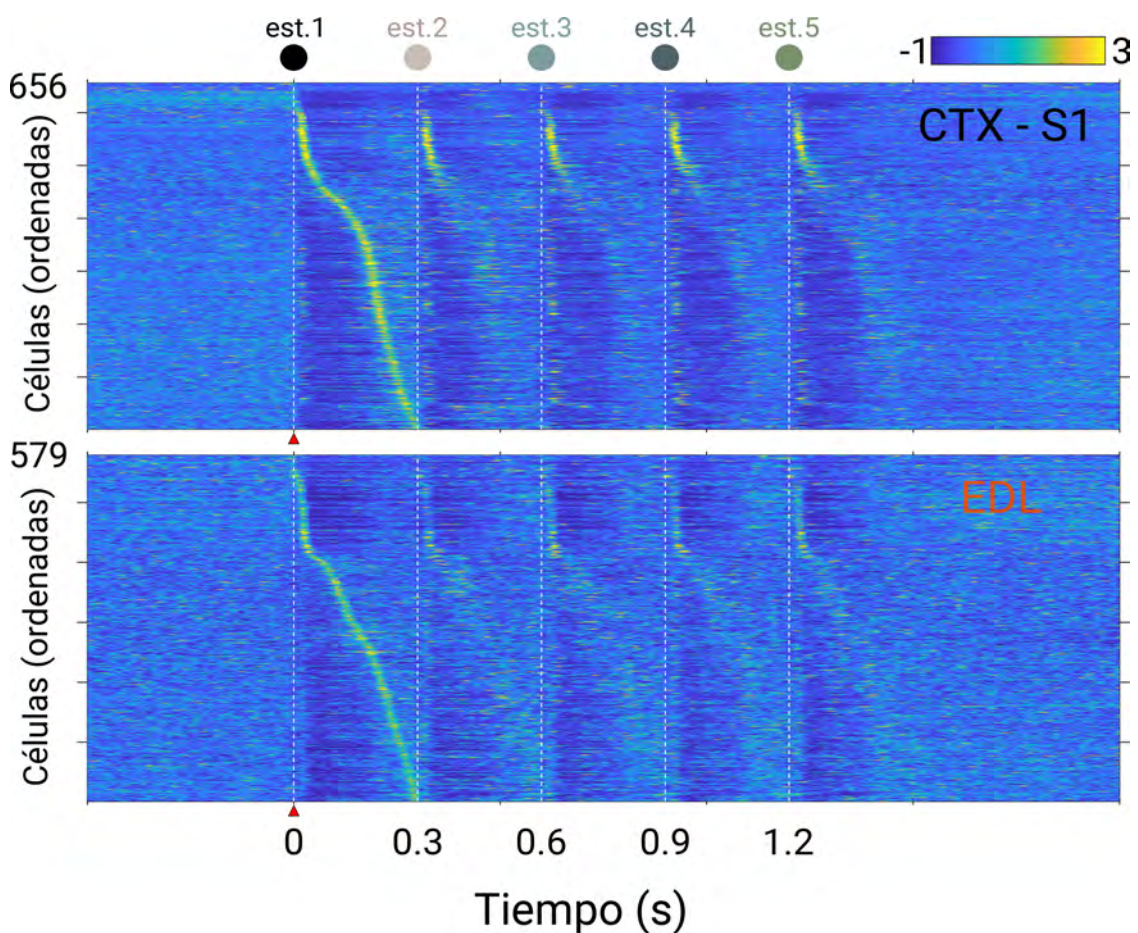


Figura 16. Actividad poblacional ante estimulación mecánica repetida. Tasa de disparo en puntajes Z, alineada al estímulo mecánico y ordenadas al momento en el que tuvieron su mayor tasa de disparo. Los círculos de colores ubicados en la parte superior de En el panel superior es la actividad poblacional de la Ctx S1 y el panel inferior es la actividad poblacional del EDL. Mientras más cálidos sean los colores mayor es la tasa de disparo y mientras más fríos menor es la tasa de disparo, mostrado en la barra de colores

Estimulación específica de en la vía cortico-tálamo-estriatal evoca PCP

Con el fin de determinar la contribución específica de las vías cortico y tálamo estriatales en las respuestas evocadas en el EDL ante la estimulación mecánica, se implementó un modelo de estimulación optogenética en donde fuera posible estimular específicamente el VPL, S1 o directamente sus terminales en el EDL. Para esto se inyectó el virus “rAAV5 /CamKII-hchR2(H134R)-EYP-WPRE-PA” en S1 (Figura 17a) o el VPL (Figura 17b) de ratas para expresar la proteína Channelrhodopsin-II (hchR2).

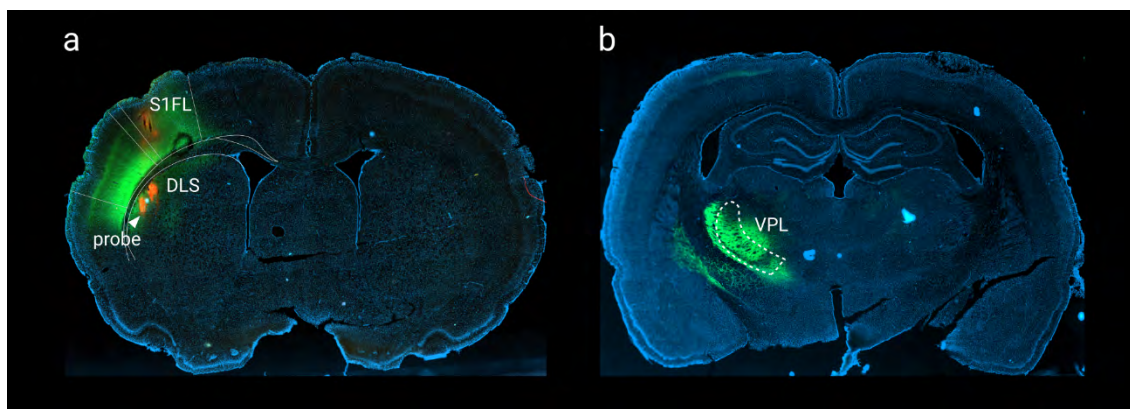


Figura 17. Histología. Expresión de la proteína EYFP en color verde en la a)Ctx S1 y el b) VPL, lo cual confirma la expresión de hchR2.

Un mes después de la infección se llevaron a cabo los registros electrofisiológicos. En un primer experimento se estimuló directamente el VPL y se registró la actividad evocada en S1 y el EDL. Después, estimulamos directamente las terminales del VPL en el EDL mientras registrábamos el EDL. En la figura 16 se muestran rasters plots representativos de neuronas registradas en S1 (figura 18a) y el EDL (figura 18b) que respondieron ante la estimulación óptica en el VPL (1 estímulo de 5ms cada 5 segundos). También se muestra la actividad desencadenada por la estimulación de las terminales del VPL en el EDL en una neurona representativa (figura 16c). Note como la estimulación de las terminales evoca respuestas robustas, similares a las desencadenadas por ambas, la estimulación mecánica y del VPL. Estos resultados confirman la existencia de la proyección directa VPL-EDL.

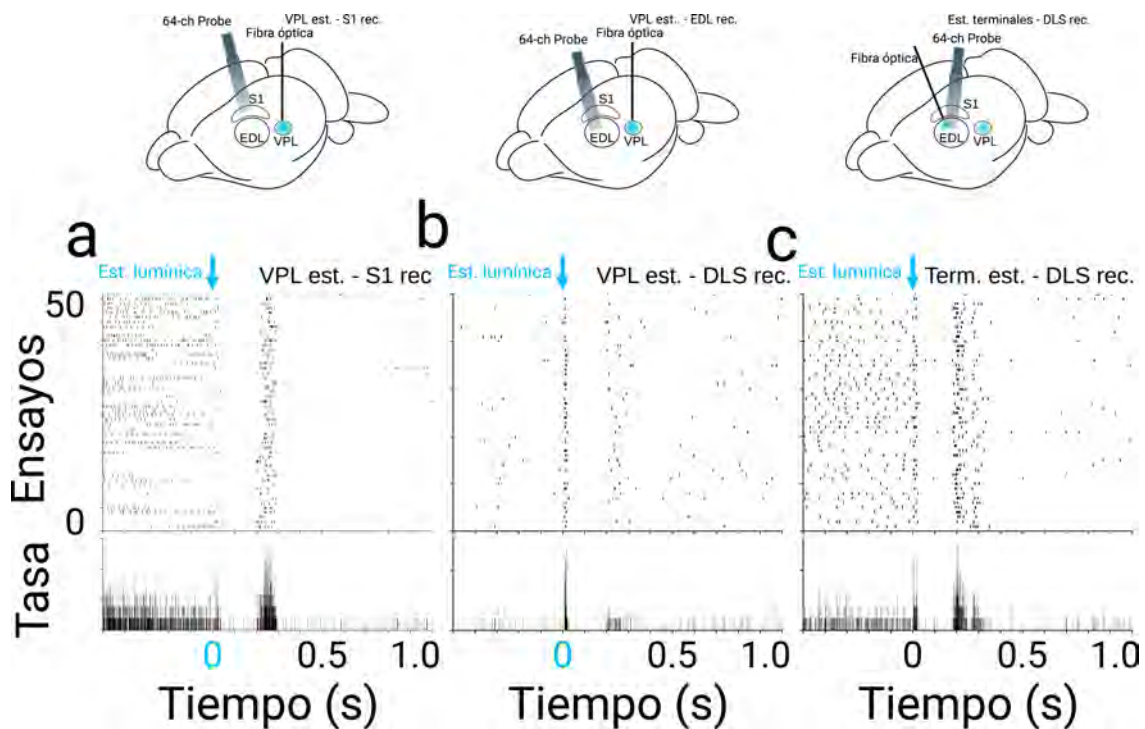


Figura 18 Actividad neuronal evocada por la estimulación lumínica. En la parte superior se esquematizan las estimulaciones y registros que se llevaron a cabo. La fila inferior muestra rasters plots representativos de neuronas aisladas, registradas en la Ctx S1 ante la estimulación directa del núcleo VPL a). Neuronas aisladas, registradas en el EDL estimulando directamente el núcleo del VPL b) y estimulando las fibras del VPL.

Al igual que con la estimulación mecánica, graficamos las respuestas poblacionales en S1 (188 neuronas) y el DLS (131 neuronas) ante la estimulación óptica del VPL. La estimulación directa del VPL produjo patrones respuestas similares a los provocados por la estimulación mecánica de las patas delanteras contralaterales al sitio de registro caracterizada por una amplia distribución de latencias de respuesta que se expandió por varias decenas de milisegundos (Figura 19, panel superior y medio). Después, para confirmar la presencia de la proyección VPL-EDL, realizamos el mismo procedimiento, pero en las neuronas registradas en el EDL durante la estimulación de las terminales del VPL (199 neuronas; Figura 19 panel inferior). En este caso también se observó una población de neuronas que respondieron con latencias cortas seguidas de otro grupo de células que se activó de forma secuencial cubriendo decenas de milisegundos posteriores.

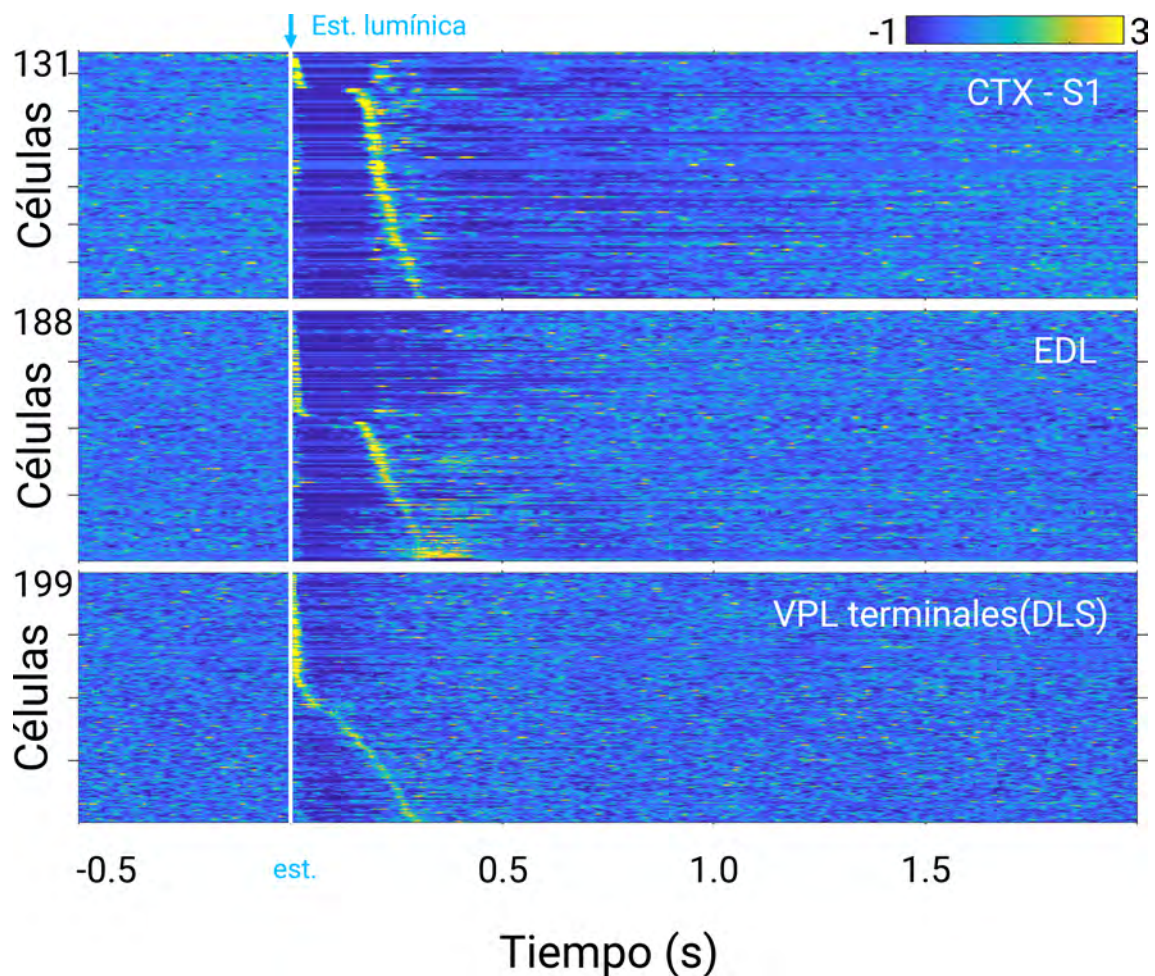


Figura 19. Respuesta poblacional de la Ctx S1 y EDL estimulación lumínica. Tasa de disparo en puntajes Z, alineadas al estímulo mecánico y ordenadas al momento en el que tuvieron su mayor tasa de disparo. Se estimuló lumínicamente el núcleo del VPL y se registraron las neuronas de la Ctx S1 (panel superior) y el EDL (panel intermedio). En el panel inferior se registraron las neuronas del EDL ante la estimulación de las terminales del VPL.

Después, se analizaron las latencias de respuesta en el DLS y S1 ante la estimulación óptica en el VPL o sus terminales y se compararon con las latencias de respuesta ante la estimulación mecánica (Fig. 20 a-b). Como se esperaba, las latencias provocadas por los estímulos ópticos fueron más cortas que las producidas por la estimulación mecánica (figura 20 a-b recuadro superior). Aquí también, una subpoblación de neuronas en DLS presentó latencias cortas superpuestas con las latencias registradas en S1 (figura 20 a). Note como la estimulación de las terminales produjo las latencias de respuesta más cortas.

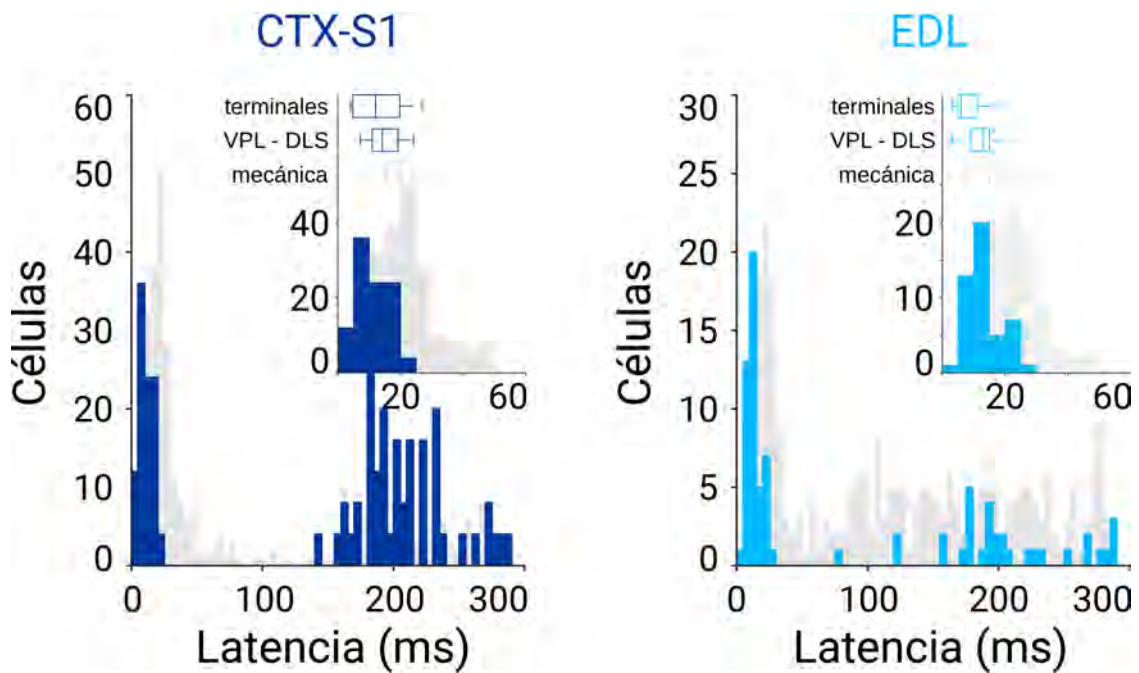


Figura 20 Comparación de latencias ante estímulos luminicos y mecánicos. Histograma de la respuesta de latencia de todas las células registradas en Ctx S1 a) y b) EDL. Para mejor apreciación se insertó una visualización de los primeros 60 ms en la parte superior de cada histograma. Para comparar la distribución de latencias evocadas por estimulación mecánica es graficada en color gris claro tanto en la figura a y b. Las gráficas de caja y bigote indican la mediana y percentiles de 25 y 75 de las latencias evocadas por la estimulación mecánica, la estimulación luminica del núcleo del VPL y las terminales del VPL.

Los experimentos anteriores sugieren importantemente la existencia de la proyección directa entre el VPL y el EDL. Además, también indican que sería posible utilizar este modelo para el estudio de la contribución específica de la vía S1-DLS y VPL-DLS en procesos plásticos. Sin embargo, estos resultados aún podrían estar empañados por la posibilidad de que la estimulación óptica directamente en el DLS (o S1) pudiera estar provocando en si misma estas respuestas. Con el objetivo de descartar esta posibilidad, se realizaron registros en animales no infectados en donde se llevaron a cabo los mismos procedimientos de estimulación óptica que en los experimentos anteriores. Esto es, registramos S1 y el DLS e iluminamos estas mismas regiones. En la figura 21 se muestran los rasters plots de neuronas representativas en S1 (Figura 21c) y el EDL (Figura 21d), en donde se compara la actividad provocada por un solo estímulo somático en la pata contralateral al sitio de registro (flecha y línea naranja) y la estimulación óptica (flecha y línea azul).

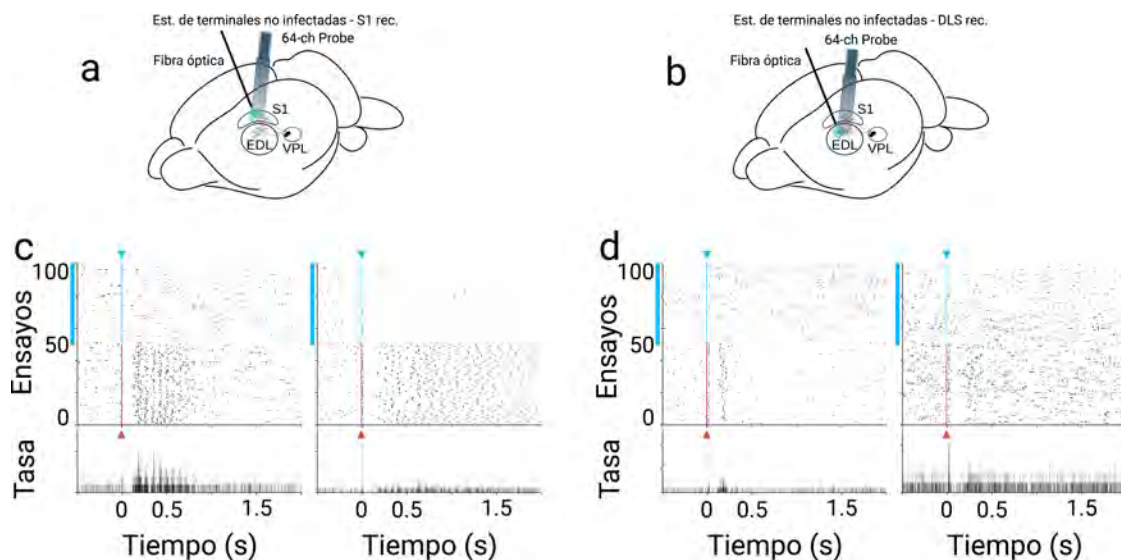


Figura 21 Controles de registros electrofisiológicos con optogenética. Se esquematizan los experimentos que se llevaron a cabo para verificar que la actividad neuronal sea evocada por, la expresión de hchR2 y la estimulación lumínica. a) VPL sin infección de hchR2, estimulación lumínica de las terminales cortico-talámicas y registro de la población neuronal de la Ctx S1. b) VPL y Ctx S1 sin infección de hchR2, estimulación lumínica de las de VPL y Ctx S1, registro del EDL. c) Rasters plots de neuronas representativas de la Ctx S1 a) y el EDL b) se compara la actividad evocada de la estimulación lumínica (línea azul) y la estimulación mecánica (línea roja)

Los gráficos de la actividad poblacional desencadenada en S1 y el EDL por los estímulos únicos y en tren se muestran en la figura 22. Estos resultados demuestran que sin la expresión hchR2 en el VPL (o S1) la estimulación óptica no produjo respuestas significativas. En conjunto, todos los datos anteriores confirman que en este modelo es posible estudiar las propiedades plásticas de las proyecciones S1-EDL y VPL-EDL

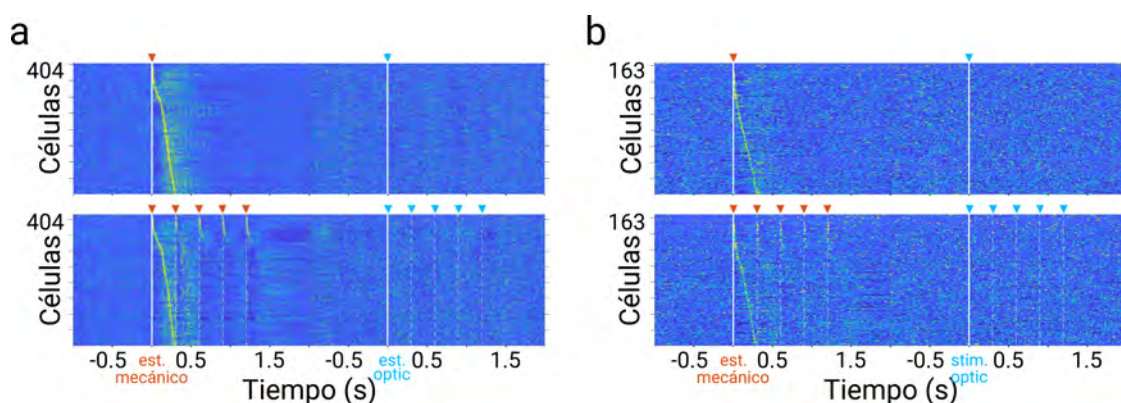


Figura 22. Controles de actividad poblacional optogenética. Tasa de disparo en puntajes Z, alineada a cada estímulo mecánico (flechas naranjas) y lumínico (flechas azules) ordenadas al momento en el que tuvieron su mayor tasa de disparo. Actividad poblacional de la Ctx S1 a) y EDL b). Se compara la actividad ante estímulos mecánicos y estímulos lumínicos. En los paneles superiores se observa la actividad poblacional ante un solo estímulo y en los paneles inferiores ante la estimulación repetida.

Sabiendo que la estimulación específica de la vía cortico-tálamo-estriatal, evoca patrones de activación similares a la estimulación mecánica, aplicamos un protocolo de estimulación repetida con optogenética idéntico al que utilizamos en los experimentos con estimulación mecánica (ver en métodos). Al igual que los estímulos mecánicos, la estimulación optogenética repetida del VPL, produjo respuestas complejas en S1 (Figura 23 a) y EDL (Figura 23 b), en ambas estuvieron compuestas de una primera respuesta rápida, seguida de un silenciamiento y una segunda respuesta en cada uno de los estímulos del tren. Con el fin de estimular específicamente las proyecciones cortico y tálamo estriatales, se infectó el VPL (figura 23 c) y la Ctx S1 (figura 23 d) y se estimuló y registró el EDL.

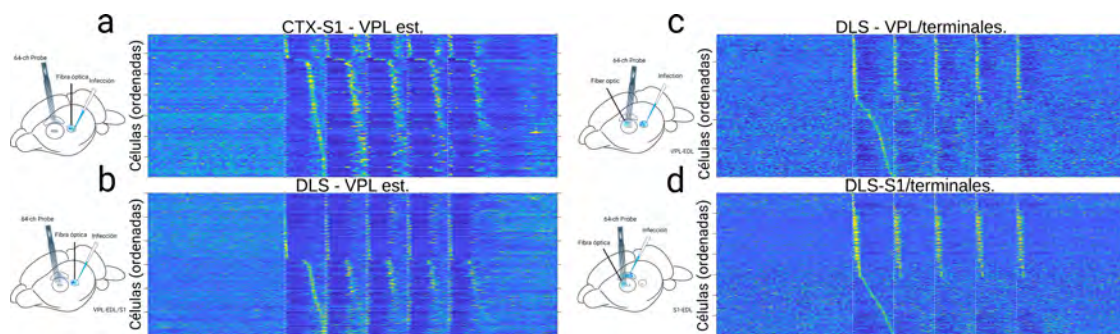


Figura 23. Actividad poblacional ante estimulación mecánica repetida. Tasa de disparo en puntajes Z, alineada a cada estímulo lumínico y ordenadas al momento en el que tuvieron su mayor tasa de disparo. Infección y estimulación lumínica del núcleo VPL se registró la Ctx S1 a) y el EDL b). c) Infección del VPL, estimulación de las terminales talámicas y registro de la actividad poblacional del EDL. d) Infección de la Ctx S1, estimulación de las terminales corticales y registro de la poblacional del EDL.

En conjunto, los experimentos anteriores indican que la estimulación óptica en el VPL evoca respuestas similares a la estimulación mecánica. También hemos confirmado la existencia de la vía directa de VPL a EDL. Finalmente, ante una estimulación en tren en las vías cortico y tálamo estriatales pudo evocarse respuestas que asemejan plasticidad de corto plazo, sin embargo, para poder constatar ello y saber qué tipo de plasticidad se está evocando, realizamos los siguientes análisis.

PCP en la vía cortico-estriatal y tálamo-estriatal

Como se mencionó en las secciones anteriores, en una gran proporción de las células registradas pudieron observarse alguno (o los tres) de los siguientes componentes provocados por la estimulación en tren: un primer componente (respuesta rápida), un silenciamiento y un segundo componente (respuesta tardía). Sin embargo como se observa en el histograma representativo de la figura 24, ante la estimulación en tren, tanto en el primer componente (círculos rojos) como en el segundo componente (círculos azules) pueden mostrar facilitación o depresión de corto plazo.

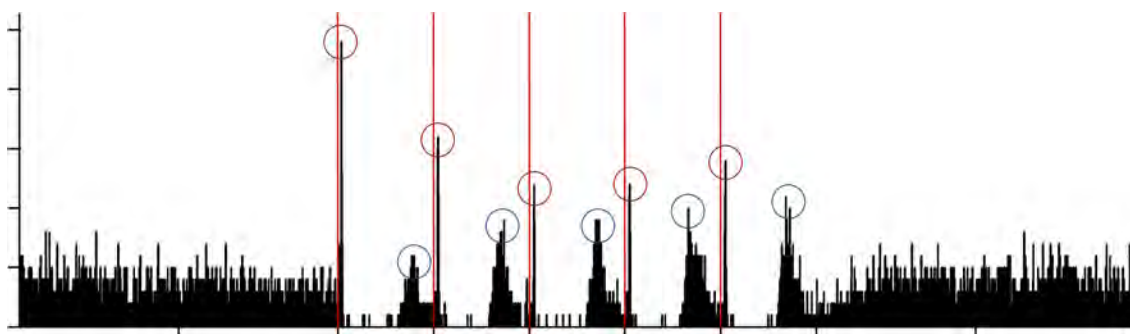


Figura 24 Primer y segundo componente evocado por la estimulación repetida. Se muestra un histograma representativo de la actividad evocada ante estímulos repetidos, el cual está conformado por dos componentes. Los círculos azules muestran el primer componente que es una respuesta de latencia corta y los círculos azules muestran el segundo componente el cual corresponde a una segunda respuesta con latencia tardía.

Para poder identificar qué tipo de plasticidad de corto plazo se evocó por la estimulación repetida se analizó la actividad provocada en el EDL, 747 neuronas registradas ante estímulos mecánicos en 14 animales, 300 neuronas de 4 animales cuando se estimuló el núcleo del VPL, 440 neuronas en 5 animales ante la estimulación de las terminales de VPL y 347 neuronas de 7 animales al estimular las terminales de S1. De estas neuronas se analizó la amplitud del primer y segundo componente de cada respuesta, tomado una ventana de tiempo de 15 a 20ms y de 100 a 300 ms.

PCP de las neuronas que respondieron al primer componente

Para este análisis primero separamos a las neuronas en dos categorías, aquellas que respondieron significativamente ante el primer estímulo del tren (promedio de valor $Z > 2.1$; entre 15 y 20 ms después del primer estímulo del tren). Del total de neuronas analizadas para el primer componente fueron significativas ante estímulos somáticos el 18%, ante estímulos ópticos en VPL el 26%, 47% estimuladas ópticamente en las terminales de VPL y 29% en las terminales de S1 (figura 23).

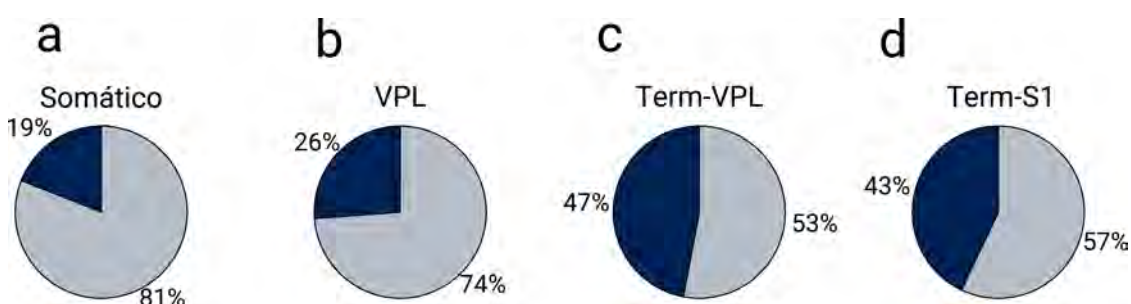


Figura 25. Porcentajes de neuronas que respondieron en el primer componente. Se muestra el total de neuronas que respondieron significativamente (azul oscuro) y las que no respondieron significativamente (gris). Neuronas que respondieron en el EDL ante estímulos somáticos a), estimulación directa del núcleo VPL b), estimulación de las terminales del VPL c) y estimulación de las terminales de la Ctx S1 d).

Después, comparamos la amplitud del primer componente provocado por el primer estímulo del tren contra las amplitudes provocadas por los estímulos 2do, 3er, 4to y 5to, para las células significativas (Figura 26 a – d) y las no significativas (Figura 26 e – h). De forma interesante, para las células significativas, es decir aquellas que presentaron una respuesta mayor a 2.1 en valores Z en el primer estímulo del tren, se observó que los siguientes estímulos del tren evocaron una clara depresión de corto plazo. Este efecto fue consistente en todos los tipos de estimulación, mecánica, directamente en el VPL o en las terminales del VPL o S1. Por el contrario, el mismo análisis realizado con las neuronas que no fueron significativas (aquellas en las que el primer estímulo no evocó respuestas mayores a 2.1 en el valor Z), arrojó que al comparar la respuesta del primer estímulo con las subsecuentes se presentó una facilitación significativa para los protocolos mecánico y de estimulación de las terminales del VPL. Mientras que para la estimulación directa en VPL y en las terminales de S1

se observaron resultados heterogéneos (Figura 26 f y h). La comparación estadística de estos resultados fue realizada con la prueba Kruskal-Wallis y Bonferroni como prueba post hoc.

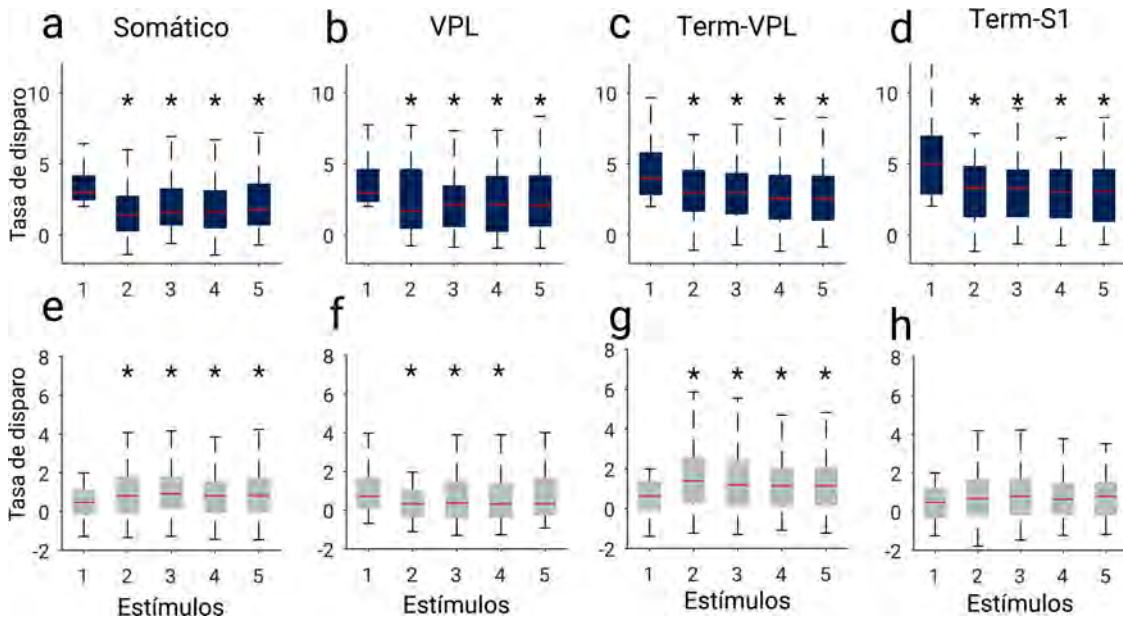


Figura 26 Plasticidad de corto plazo en el primer componente. Las gráficas superiores (a-d) muestran la distribución y cambio en la tasa de disparo al analizar el primer componente de las neuronas del EDL que fueron significativas ante estímulos somáticos. Valores de p mostrados en tabla 1 (anexos). a), estimulación directa del núcleo VPL b), estimulación de las terminales del VPL c) y estimulación de las terminales de la Ctx S1 d). Las gráficas inferiores (e-h) muestran la distribución y cambio en la tasa de disparo de las neuronas del EDL que no fueron significativas ante estímulos somáticos. Valores de p mostrados en tabla 2 (anexos) e), estimulación directa del núcleo VPL f), estimulación de las terminales del VPL g) y estimulación de las terminales de la Ctx S1 h).

PCP de las neuronas que respondieron al segundo componente

Para el análisis del segundo componente se siguió la misma estrategia que en el análisis para el primer componente, excepto que en este caso las amplitudes fueron evaluadas entre 100 y 200 ms después de cada estímulo. Las neuronas significativas fueron: 39% ante estímulos somáticos, el 30% de estimulación óptica en VPL, 35% de las estimuladas en terminales de VPL y terminales de S1 el 31% (figura 27).

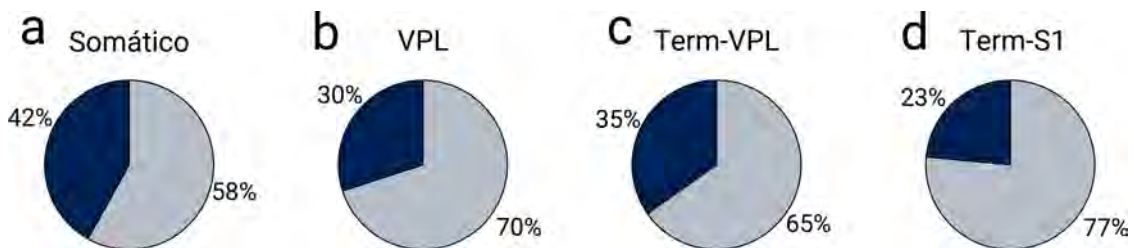


Figura 27. Porcentajes de neuronas que respondieron en el segundo componente. Se muestra el total de neuronas que respondieron significativamente (azul oscuro) y las que no respondieron significativamente (gris). Neuronas que respondieron en el EDL ante estímulos somáticos a), estimulación directa del núcleo VPL b), estimulación de las terminales del VPL c) y estimulación de las terminales de la Ctx S1 d).

Al igual que en el primer componente, se observó que la estimulación en trenes produjo depresión de corto plazo para las neuronas significativas (Figura 28 a – d). Después, se llevó a cabo el mismo análisis con las neuronas que no fueron significativas y se observa que al comparar la respuesta del primer estímulo con las subsecuentes hay una facilitación significativa en todos los protocolos de estimulación (Figura 28 e – f). Sin embargo, en el caso de la estimulación mecánica y de las terminales de S1, el último estímulo de la secuencia produjo una marcada depresión.

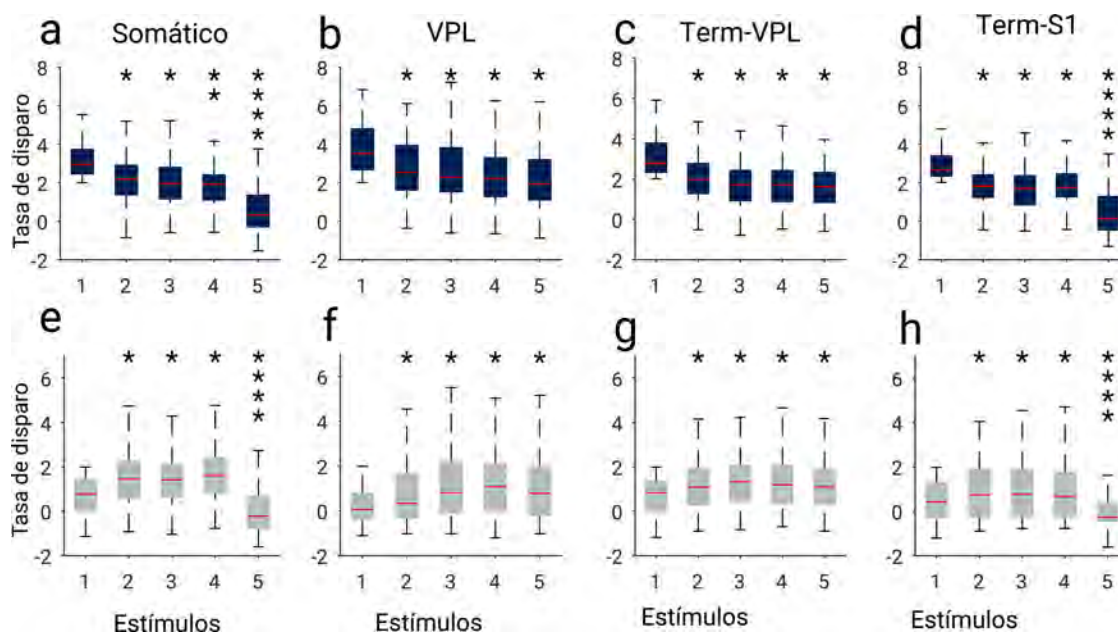


Figura 28. Plasticidad de corto plazo en el segundo componente. Las gráficas superiores (a-d) muestran la distribución y cambio en la tasa de disparo de las neuronas del EDL que fueron significativas al analizar el segundo componente ante estímulos somáticos u ópticos. Valores de p mostrados en tabla 3 (anexos) a), estimulación directa del núcleo VPL b), estimulación de las terminales del VPL c) y estimulación de las terminales de la Ctx S1 d). Las gráficas inferiores (e-h) muestran la distribución y cambio en la tasa de disparo de las neuronas del EDL que no fueron significativas ante estímulos somáticos u ópticos. Valores de p mostrados en tabla 4 (anexos). e), estimulación directa del núcleo VPL f), estimulación de las terminales del VPL g) y estimulación de las terminales de la Ctx S1 h).

En conjunto, estos resultados indican que, 1) la estimulación mecánica en tren produce ambos tipos de plasticidad, facilitación y depresión de corto plazo. 2) La estimulación específica de las terminales del VPL o la en el EDL también produce los dos tipos de plasticidad. 3) La estimulación de las terminales del VPL parece ser la más efectiva para producir representaciones sensoriales en el EDL. 4) Las representaciones sensoriales en el EDL pueden dividirse en un componente de latencia corta y otro de latencia larga, y ambos pueden expresar ambos tipos de plasticidad de corto plazo. Estos resultados también demuestran el alto nivel de complejidad en la representación de información somatosensorial de las extremidades en el EDL.

DISCUSIÓN

En este trabajo se exploró qué tipo de PCP se evoca en el EDL ante la estimulación mecánica repetida de las patas delanteras y la estimulación específica de las vías cortico y tálamo estriatales. Los resultados obtenidos muestran que, los estímulos mecánicos en un modelo de animal anestesiado con uretano evocan respuestas neuronales en la Ctx S1 y el EDL. Estas representaciones sensoriales son consistentes con las ya reportadas en la corteza auditiva también en animales anestesiados con uretano (Mochol et al., 2015). Al analizar la actividad neuronal se encontraron respuestas arquetípicas (figura 12) y “paquetes poblacionales” (figura 13) en la Ctx S1 y EDL. Estos paquetes se conforman de tres fases de la actividad neuronal claramente distinguibles; el primero es una respuesta de latencia corta, el segundo es un silencio y el tercero una respuesta de latencia larga (100-300 ms) o “rebote” de la respuesta. Se ha propuesto que esta organización puede ser provocada ante estímulos sensoriales en distintas cortezas (corteza auditiva, visual, olfativa y somatosensorial), se cree que son importantes para el procesamiento de información sensorial las cuales podrían formar respuestas más complejas (Derdikman, Hildesheim, Ahissar, Arieli, & Grinvald, 2003; Luczak, McNaughton, et al., 2015). Estos primeros resultados constituyen una base sólida para poder afirmar la fiabilidad del modelo de estimulación mecánica en animal anestesiado con uretano, y la fiabilidad para registrar representaciones somatosensoriales de las patas delanteras en la Ctx S1 y el EDL.

Dado que se encontraron respuestas trifásicas tanto en la CtxS1 y como en el EDL se analizó la latencia de la actividad neuronal en ambas estructuras ante la estimulación mecánica, no se observaron diferencias en la latencia a la primer respuesta (menor a 30 ms) (figura 14), sugiriendo que la información sensorial provocada por la estimulación mecánica de las patas delanteras no solo llega al EDL mediante la ya descrita proyección canónica VPL-CtxS1-EDL (Kandel E, Schwartz J, Jessell, T, 2013; Purves, 2016), sino que también hay una proyección funcional directa del VPL al EDL, consistente con la evidencia anatómica ya previamente descrita (Erro, 2001).

Sabiendo que el modelo de animal anestesiado con uretano evoca representaciones robustas en la CtxS1 y el EDL con un solo estímulo, se implementó un protocolo de estimulación mecánica repetida (Tren 5 pulsos; 3.3 Hz) en las patas delanteras para evocar PCP ya que al estimular en una rápida sucesión de estímulos, la segunda respuesta puede ser mayor o menor que la primera (Sciamanna et al., 2015) por lo cual hipotetizamos que se encontrarán cambios en las respuestas subsecuentes al primer estímulo del tren. Se encontró que la estimulación mecánica repetida evoca las tres respuestas arquetípicas previamente descritas en ambas estructuras (figura 15) y que el protocolo de estimulación mecánica aparentemente evoca PCP en neuronas aisladas (figura 15) y a nivel poblacional (figura 16).

Dado que las proyecciones cortico (Kreitzer & Malenka, 2005) y tálamo estriatales (Matsumoto, N, Minanimoto, T, 2001) están involucradas en el procesamiento e integración de información somatosensorial, se manipularon específicamente las vías mediante técnicas optogenéticas. Lo primero que se observó es que al estimular la proyección tálamo estriatal con un solo estímulo óptico en el VPL y registrar S1 y el EDL evoca respuestas neuronales y al estimular las terminales de VPL y registrar el EDL también hay evocación de respuesta. Segundo, estimulando directamente la CtxS1 y registrando el EDL, como al estimular las terminales corticales y registrando el EDL con un solo pulso hay evocación de actividad neuronal en el EDL, mostrando así que el modelo de estimulación óptica es un modelo homólogo al de estimulación mecánica y que de esta manera podemos identificar específicamente las contribuciones de cada vía. Sabiendo que podemos manipular específicamente tálamo estriatales y cortico estriatales, se estimuló específicamente el núcleo del VPL y se registraron las neuronas de S1 y el EDL (figura 18a-b) mostrando así un grupo de neuronas que responden con latencia corta y también al estimular directamente las terminales del VPL hacía el EDL (figura 18c), por lo cual al comparar las latencias de respuesta se encuentra un solapamiento de las neuronas en la CtxS1 y en el EDL demostrando así una proyección directa del VPL hacía el EDL. Sin embargo para poder demostrar de una forma contundente que la activación de estas vías se debía a la estimulación específica de las terminales de la CtxS1 y el VPL, se realizaron controles experimentales en los cuales no se infectaron con

hchR2 sin embargo se estimuló y registro las terminales cortico y tálamo estriatales, se mostró que no hay evocación de respuesta ante los estímulos lumínicos, con lo cual demostramos que la activación específica de las neuronas que expresan hchR2 es la que evoca las respuestas neuronales en la CtxS1 y el EDL.

La similitud de la respuesta neuronal entre la estimulación mecánica y optogenética en las vías cortico y tálamo estriatales, permitió medir qué tipo de PCP es desencadenado por trenes de estímulos con alta especificidad. Primero se identificó la estructura que conforma la respuesta neuronal, la cual está compuesta por un primer componente con una latencia rápida y un segundo componente con una latencia tardía, ambos componentes muestran PCP (figura 24). Trabajos previos en experimentos *in vitro* han reportado que, al estimular la vía cortico-estriatal se observa un efecto de facilitación y depresión de corto plazo según la frecuencia a la fueron estimuladas las fibras (Ding J, Peterson JD, 2008; Ellender et al., 2013) . Por otro lado experimentos *in vitro* donde se exploró la contribución de la vía tálamo-estriatal, específicamente de los núcleos intralaminares conformados por el núcleo parafascicular y el núcleo centromedial, los cuales se sabe que proyectan directamente al EDL (Steiner, H.& Tseng, 2017) se observó que al estimular el núcleo parafascicular hay un efecto de depresión y al estimular el núcleo centromedial hay un efecto de facilitación (Ding J, Peterson JD, 2008; Ellender et al., 2013; Sciamanna et al., 2015), mostrando que las respuestas probocadas son diversas dependiendo el núcleo que se estimule. Al analizar la respuesta desencadenada del primer y segundo componente se mostró que las neuronas que incrementaron su tasa de disparo significativamente en el primer estímulo del tren, en ambos componentes presentan depresión de corto plazo en los 4 estímulos subsecuentes del tren de estimulación. Sin embargo, las neuronas que no incrementaron significativamente su tasa de disparo en el primer estímulo del tren de estimulaciones repetidas, en los cuatro estímulos subsecuentes del tren, presentan facilitación de corto plazo (Figura 26 y Figura 28). Los resultados obtenidos muestran que ante la estimulación de las fibras cortico-estriatales y tálamo estriatales se observa un efecto de depresión de corto plazo en el EDL consistente con trabajos previos en las proyecciones cortico-estriatales. Sin

embargo, como el tipo de plasticidad que se observa en la proyección tálamo-estriatal es diverso y dependería posible ente del núcleo de donde provengan las proyecciones, en este experimento se estimularon las fibras provenientes del VPL, mostrando que al ser estimuladas repetidamente el EDL presenta depresión de corto plazo. Es importante denotar que en ambas proyecciones esta plasticidad dependería potencialmente de las neuronas que incrementan su tasa de disparo significativamente. Literatura previa reporta que al inhibir FSI también se altera el tiempo de activación de las neuronas estriatales de la vía directa e indirecta cuales están relacionadas con la formación de hábitos (Hare et al., 2017), si al aplicar estímulos repetidos encontramos que una población de neuronas están incrementando su tasa de disparo y son las mismas que presentan depresión de corto plazo, podrá ser que al estar codificando estímulos sensoriales, genere un cambio en su dinámica para poder llevar a cabo procesos mayores como la formación de un hábito.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que, 1) el modelo *in vivo* que presentamos muestra evidencia electrofisiológica de su fiabilidad para generar actividad neuronal y plasticidad neuronal de corto plazo en el circuito cortico-tálamo-estriatal; 2) el VPL envía proyecciones directas al EDL provocadas por la estimulación somatosensorial (incluso antes que esta información llegue a CtxS1), lo que sugiere que mostrando así el papel que juega el VPL participa en la representación estriatal de estímulos somatosensoriales; 3) la activación repetida de la vía CtxS1-EDL y VPL-EDL induce ambos tipos de PCP (facilitación y depresión); 4) el tipo de PCP generado en el EDL puede ser distinguido según la respuesta al primer estímulo; es decir, si se incrementa la actividad neuronal en el primer estímulo de un tren se verá un efecto de depresión de corto plazo en los estímulos subsecuentes; mientras que, la ausencia incremento de actividad neuronal en el primer estímulo, se traduce en facilitación de corto plazo. Lo que demuestra que la facilitación y la depresión de corto plazo en los estímulos subsecuentes dependen de la respuesta al estímulo inicial. Este trabajo da pie a indagar más acerca de los mecanismos que subyacen a la plasticidad neuronal desencadenada por la integración de las vías cortico y tálamo estriatales.

ANEXOS

Tabla 1	
1er COMPONENTE Neuronas significativas	
NumdeEst vs Numero de estímulo	<i>p</i>
ESTIMULACIÓN MECÁNICA	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	0.3216
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN VPL	
1 vs 2	0.0041
1 vs 3	0.0009
1 vs 4	0.0004
1 vs 5	0.0027
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	1.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales VPL	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	0.2651
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	0.4900
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales S1	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	1.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000

Tabla 2	
1er COMPONENTE Neuronas NO significativas	
NumdeEst vs Numero de estímulo	<i>p</i>
ESTIMULACIÓN MECÁNICA	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	0.6290
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	1.0000
3 vs 4	0.2879
3 vs 5	0.9789
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN VPL	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0039
1 vs 4	0.0061
1 vs 5	0.1872
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	0.8801
2 vs 5	0.0538
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales VPL	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0001
1 vs 5	1.0000
2 vs 3	0.4039
2 vs 4	0.4523
2 vs 5	1.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales S1	
1 vs 2	0.1293
1 vs 3	0.9222
1 vs 4	0.3297
1 vs 5	0.1248
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	1.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000

Tabla 3	
2do COMPONENTE Neuronas significativas	
NumdeEst vs Numero de estímulo	<i>p</i>
ESTIMULACIÓN MECÁNICA	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	0.0115
2 vs 5	0.0000
3 vs 4	0.8657
3 vs 5	0.0000
4 vs 5	0.0000
ESTIMULACIÓN VPL	
1 vs 2	0.0019
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	0.3195
2 vs 5	0.0516
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	0.5580
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales VPL	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	0.2742
2 vs 5	0.0764
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales S1	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	0.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	0.0000
4 vs 5	0.0000

Tabla 4	
2do COMPONENTE Neuronas NOsignificativas	
NumdeEst vs Numero de estímulo	<i>p</i>
ESTIMULACIÓN MECÁNICA	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	0.3586
2 vs 5	0.0000
3 vs 4	0.1517
3 vs 5	0.0000
4 vs 5	0.0000
ESTIMULACIÓN VPL	
1 vs 2	0.0005
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	0.2263
2 vs 4	0.0752
2 vs 5	1.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales VPL	
1 vs 2	0.0000
1 vs 3	0.0000
1 vs 4	0.0000
1 vs 5	0.0001
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	1.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	1.0000
4 vs 5	1.0000
ESTIMULACIÓN Terminales S1	
1 vs 2	0.0036
1 vs 3	0.0007
1 vs 4	0.0028
1 vs 5	0.0000
2 vs 3	1.0000
2 vs 4	1.0000
2 vs 5	0.0000
3 vs 4	1.0000
3 vs 5	0.0000
4 vs 5	0.0000

Anexo 2

Técnica	Ventajas	Limitaciones
Manipulaciones optogenéticas	<ul style="list-style-type: none"> • Permite la manipulación de eventos bien definidos en tiempo de células específicas de tejido vivo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las herramientas de optogenética no pueden activar varios subtipos dentro de la población que se ha diseñado genéticamente.
Modelo <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Los experimentos <i>in vivo</i> permiten tener una aproximación más real al fenómeno natural que se estudia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Demasiados parámetros que no poder controlarse todos al mismo tiempo.
Arreglo de multielectrodos	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar registrar poblaciones neuronales. • Dejan una huella mínima lo que minimiza el daño neuronal e incorporar características estructurales que facilitan la entrada a través del tejido cerebral. • Otro beneficio es que las silicon probes debido a su dimensión permite un acercamiento a las neuronas objetivo lo más cerca posible y, por lo tanto, mejore la relación señal / ruido de la actividad registrada o el 	<ul style="list-style-type: none"> • A pesar de poder aislar neuronas únicas y poder distinguirlas según sus características como la frecuencia de disparo y la forma del disparo, no es posible poder escoger una neurona específica para poder registrarla. • Se ha reportado con un aumento de la inmunoreactividad a GFAP, como células positivas para IBA-1 con el aspecto morfológico de microglia reactiva.

	<p>objetivo a una región muy específica para ser estimulada.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se pueden tener varios sitios de grabación espaciados de manera precisa en pequeños volúmenes. 	
<p>Uretano</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Produce una anestesia quirúrgica de larga duración. • Se ha reportado que estas dosis la actividad cortical presenta oscilaciones de alto voltaje a frecuencias de ~1 Hz. • Las estimulaciones sensoriales producen respuestas robustas en regiones corticales primarias 	<p>El uretano es carcinogénico. Es para experimentos agudos.</p>

REFERENCIAS

- Alloway, K. D., Smith, J. B., & Watson, G. D. R. (2014). Thalamostriatal projections from the medial posterior and parafascicular nuclei have distinct topographic and physiologic properties. *Journal of Neurophysiology*, *111*, 36–50. <https://doi.org/10.1152/jn.00399.2013>
- Bargas, J., Galarraga, E., & Aceves, J. (1991). Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Research*, *539*(1), 159–163. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90700-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90700-6)
- Barroso-Flores J., Herrera-Valdez MA., Galarraga E., Bargas J. (2017). Models of Short-Term Synaptic Plasticity. *The plastic brain. Bernardi, R., Eugénin, J., Muller, K.* The plastic brain (pp. 41-52). Springer Nature.
- Barnes, T. D., Kubota, Y., Hu, D., Jin, D. Z., & Graybiel, A. M. (2005). Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature*, *437*(7062), 1158–1161. <https://doi.org/10.1038/nature04053>
- Brown, L. L. (1992). *Somatotopic organization in rat striatum : Evidence for a combinational map.* *89*(August), 7403–7407.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B. & Bernardi, G. (1996). The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunction of the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, *19*(1), 19-24.
- Carelli, R. M., & West, M. O. (1991). Representation of the body by single neurons in the dorsolateral striatum of the awake, unrestrained rat. *Journal of Comparative Neurology*, *309*(2), 231–249. <https://doi.org/10.1002/cne.903090205>
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández -Cruz A, Galarraga E, D.-C. R. B. J. (2012). Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>.

- Carrillo-Reid, L., Lopez-Huerta, V.G., Garcia-Munoz, M., Theiss, S. & Arbuthnott, G.W. (2015). *Cell Assembly Signatures Defined by Short-Term Synaptic Plasticity in Cortical Networks*, *International Journal of Neural Systems* 25 (7), 1-18.
- Carrillo-Reid, L., Miller, J. -e. K., Hamm, J. P., Jackson, J., & Yuste, R. (2015). Endogenous Sequential Cortical Activity Evoked by Visual Stimuli. *Journal of Neuroscience*, 35(23), 8813–8828.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5214-14.2015>
- Carrillo-Reid, Luis, Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., & Bargas, J. (2008). Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), 1435–1450.
<https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>
- Castle, M., Aymerich, M. S., Sanchez-Escobar, C., Gonzalo, N., Obeso, J. A., & Lanciego, J. L. (2005). Thalamic innervation of the direct and indirect basal ganglia pathways in the rat: Ipsi- and contralateral projections. *Journal of Comparative Neurology*, 483(2), 143–153.
<https://doi.org/10.1002/cne.20421>
- Centonze, D., Picconi, B., Gubellini, P., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2001). Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *European Journal of Neuroscience*, 13(6), 1071–1077. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01485.x>
- Chapin J K, Waterhouse, B. D. & W. D. J. (1981). *Differences in Cutaneous Sensory Response Properties of Single Somatosensory Cortical Neurons in Awake and Halothane Anesthetized Rats I*. 6, 63–70.
- Contreras, E. J. B., Gomez, A., Schjetnan, P., Muhammad, A., Bartho, P., Mcnaughton, B. L., ... Luczak, A. (2013). Article Formation and Reverberation of Sequential Neural Activity Patterns Evoked by Sensory Stimulation Are Enhanced during Cortical Desynchronization. *Neuron*, 79(3), 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.013>

- Cowan, R.L. & Wilson C.J. (1994). Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neuron in the rat medial agranular cortex. *Journal of neurophysiology*, *71*(1), 17-32.
- Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D., Trojanowski, J. Q., ... Vinogradov, S. (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*, *134*(6), 1591–1609.
<https://doi.org/10.1093/brain/awr039>
- Deisseroth, K. (2011). *Optogenetics*. *8*(1), 26–29.
<https://doi.org/10.1038/NMETH.F.324>
- Derdikman, D., Hildesheim, R., Ahissar, E., Arieli, A., & Grinvald, A. (2003). *Imaging Spatiotemporal Dynamics of Surround Inhibition in the Barrels Somatosensory Cortex*. *23*(8), 3100–3105.
- Deschênes M., Moore J. & Kleinfeld D., *Sniffing and whisking in rodents*.
Current Opinion in Neurobiology, *22* (2), 243-250.
- Ding J, Peterson JD, S. D. (2008). *Corticostriatal and thalamostriatal synapses have distinctive properties*. *28*(25), 6483–6492.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0435-08.2008.Corticostriatal>
- Doing, N.M. & Bolam, P. (2001). Microcircuits of the striatum. Kultas-Ilinsky, K. & Ilinsky, I.A. *Basal ganglia and thalamus in health and movement disorders* (pp.127). New York, E.U.A.: Springer.
- Ebbesen, C. L., & Brecht, M. (2017). Motor cortex - To act or not to act? *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(11), 694–705.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.119>
- Erro, E., Lanciego, J. L., & Giménez-Amaya, J. M. (2002). Re-examination of the thalamostriatal projections in the rat with retrograde tracers. *Neuroscience Research*, *42*(1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(01\)00302-9](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(01)00302-9)
- Erro, E., Lanciego, J.L., Arribas, J. & Giménez-Amaya J.M (2001). Striatal input from the ventrobasal complex of the rat thalamus. *Histochem Cell Biol*,

- 115(April), 447–454. <https://doi.org/10.1007/s004180100273>
- Ellender, T. J., Harwood, J., Kosillo, P., Capogna, M., & Bolam, J. P. (2013). Heterogeneous properties of central lateral and parafascicular thalamic synapses in the striatum. *Journal of Physiology*, *591*(1), 257–272. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.245233>
- Erro, M. E., Lanciego, L., & Gimenez-Amaya, J.M. (2002). *Re-examination of the thalamostriatal projections in the rat with retrograde tracers*. *42*, 45–55.
- Eugenín, J., & Editors, K. J. M. (2017). *The Plastic Brain* (Vol. 1015). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2>
- Fino, E., Vandecasteele, M., Perez, S., Saudou, F. & Venance Laurent. (2018). *Region-specific and state-dependent action of striatal GABAergic interneurons*. *Nature communication*, *9*(1), 1-17.
- Flaherty, A. W., & Graybiel, A. M. (1991). Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *Journal of Neurophysiology*, *66*(4), 1249–1263. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.66.4.1249>
- Gerfen CR, P. R. and H. N. (2014). *GENSAT BAC Cre-recombinase driver lines to study the functional organization of cerebral cortical and basal ganglia circuits*. *80*(6). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.016>.GENSAT
- Gouvêa, T. S., Monteiro, T., Motiwala, A., Soares, S., Machens, C., & Paton, J. J. (2015). Striatal dynamics explain duration judgments. *ELife*, *4*(December2015), 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.11386>
- Graybiel, A. M. (2000). The basal ganglia. *Current Biology : CB*, *10*(14), R509-11. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)80019-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(95)80019-X)
- Graybiel, Ann M. (2008). Habits, Rituals, and the Evaluative Brain. *Annual Review of Neuroscience*, *31*(1), 359–387. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851>
- Graybiel, Ann M, & Grafton, S. T. (2018). *The Striatum: Where Skills and Habits Meet*. 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021691>

- Hare, J. K. O., Li, H., Kim, N., Gaidis, E., Ade, K., Beck, J., ... Calakos, N. (2017). *Striatal fast-spiking interneurons selectively modulate circuit output and are required for habitual behavior*. 1–26.
- Hazan, L. (2006). *Klusters , NeuroScope , NDManager : A free software suite for neurophysiological data processing and visualization*. 155, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.017>
- Hintiryan, H., Foster, N. N., Bowman, I., Bay, M., Song, M. Y., Gou, L., ... Dong, H. W. (2016). The mouse cortico-striatal projectome. *Nature Neuroscience*, 19(8), 1100–1114. <https://doi.org/10.1038/nn.4332>
- Hoover, J.E., Hoffer, Z.S. & Alloway, K.D. (2003). Projections from primary somatosensory cortex to the neostriatum: the role somatotopic continuity in corticostriatal convergence. *Journal of neurophysiology*, 89(3), 1576–87.
- Hunnicutt, B. J., Jongbloets, B. C., Birdsong, W. T., Gertz, K. J., Zhong, H., & Mao, T. (2016). A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *ELife*, 5(November2016), 1–32. <https://doi.org/10.7554/eLife.19103>
- Jędrzejewska-Szmek, J., Damodaran, S., Dorman, D. B., & Blackwell, K. T. (2017). Calcium dynamics predict direction of synaptic plasticity in striatal spiny projection neurons. *European Journal of Neuroscience*, 45(8), 1044–1056. <https://doi.org/10.1111/ejn.13287>
- Jog, M. S., Kubota, Y., Connolly, C. I., Hillegaart, V., & Graybiel, A. M. (1999). Building neural representations of habits [In Process Citation]. *Science*, 286(5445), 1745–1749.
- Jun Ding, Jayms D. Peterson, and D. J. S. (2012). *Corticostriatal and Thalamostriatal Synapses Have Distinctive Properties*. 28(505), 24–36. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0435-08.2008>.Corticostriatal
- Kandel E, Schwartz J, Jessell, T, S. S. & H. A. (2013). *Principles of neural science*.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J. & Emson, P.C. (1989). Intracellular recording of

identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *Journal Neurophysiology*, 62(5),1052-68.

- Kevin D. Alloway, Li Lou, F. N.-O. and S. C. (2002). Topography of cortical projections to the dorsolateral neostriatum in rats: multiple overlapping sensorimotor pathways. *European Signal Processing Conference, 2002-March*(March), 33–48. <https://doi.org/10.1002/cne>
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2005). *Dopamine Modulation of State-Dependent Endocannabinoid Release and Long-Term Depression in the Striatum*. 25(45), 10537–10545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2959-05.2005>
- Luczak, A., McNaughton, B. L., & Harris, K. D. (2015). in the cortex. *Nature Publishing Group, 16*(12), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrn4026>
- Luczak, A., McNaughton, B. L., & Harris, K. D. (2015). Packet-based communication in the cortex. *Nature Reviews Neuroscience, 16*(12), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrn4026>
- Markram H., Gupta, A., Uziel, A., Wang, Y. & Tsodyks M. (1998). *Information processing with frequency-dependent synaptic connections. Neurobiology of learning and memory, 70*(1-2), 101-112. DOI: 10.1006/nlme.1998.3841
- Matsumoto, N, Minanimoto, T, G. A. & K. M. (2001). Neurons in the Thalamic CM-Pf Complex Supply Striatal Neurons With Information About Behaviorally Significant Sensory Events. *Journal of Neurophysiology, 85*(2), 960–976.
- Mello, G. B. M., Soares, S., Paton, J. J., Mello, G. B. M., Soares, S., & Paton, J. J. (2015). Article A Scalable Population Code for Time in the Striatum Article A Scalable Population Code for Time in the Striatum. *Current Biology, 25*(9), 1113–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.036>
- Minamimoto, T., Hori, Y., & Kimura, M. (2009). *Roles of the thalamic CM – PF complex — Basal ganglia circuit in externally driven rebias of action. 78, 75–79*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.08.013>

- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., & Watanabe, M. (2003). Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre- Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *European Journal of Neuroscience*, *17*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02698.x>
- Mochol, G., Hermoso-mendizabal, A., Sakata, S., Harris, K. D., & De, J. (2015). *Stochastic transitions into silence cause noise correlations in cortical circuits*. *112*(11), 3529–3534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410509112>
- Motanis, H., Seay, M. J., & Buonomano, D. V. (2018). Short-Term Synaptic Plasticity as a Mechanism for Sensory Timing. *Trends in Neurosciences*, *41*(10), 701–711. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.08.001>
- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews*, *20*(1), 91–127. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00007-C](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00007-C)
- Purves, D. (2016). Neuroscience. In *Sinauer Associates*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-89230-4>
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., ... Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(11), 760–772. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>
- Reiner, A., Jiao, Y. U. N., & Mar, N. D. E. L. (2003). *Differential Morphology of Pyramidal Tract-Type and Intratelencephalically Projecting-Type Corticostriatal Neurons and Their Intrastratial Terminals in Rats*. *440*(August 2002), 420–440. <https://doi.org/10.1002/cne.10541>
- Rueda-Orozco, P. E., & Robbe, D. (2015). The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nature Neuroscience*, *18*(3), 453–462. <https://doi.org/10.1038/nn.3924>
- Sciamanna, G., Ponterio, G., Mandolesi, G., Bonsi, P., & Pisani, A. (2015). Optogenetic stimulation reveals distinct modulatory properties of thalamostriatal vs corticostriatal glutamatergic inputs to fast-spiking interneurons. *Scientific Reports*, *5*(June), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep16742>

- Smith, Yolanda, Dinesh, Raju, Nanda, Bijili, Pare, Jean-Francois, Galvan, A. (2010). The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Changes*, 38(3), 319–335. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125627>.Brain
- Smith, J. B., Mowery, T. M., & Alloway, K. D. (2012). Thalamic POM projections to the dorsolateral striatum of rats: potential pathway for mediating stimulus-response associations for sensorimotor habits. *Journal of Neurophysiology*, 108(1), 160–174. <https://doi.org/10.1152/jn.00142.2012>
- Smith, Jared B, Mowery, T. M., & Alloway, K. D. (2019). *Thalamic POM projections to the dorsolateral striatum of rats : potential pathway for mediating stimulus – response associations for sensorimotor habits*. 160–174. <https://doi.org/10.1152/jn.00142.2012>
- Spencer, H.J. (1976). Antagonism of cortical excitation of striatal neurons by glutamic acid diethyl ester: evidence for glutamic acid as an excitatory transmitter in the rat striatum. *Brain research*, 102 (1), 91-101.
- Steiner, H.& Tseng, K. (2017). *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00052-0>
- Vanduffel, W., & Arsenault, J. T. (2016). Should I Stay or Should I Go? *Neuron*, 91(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.012>
- West, M. O., Carelli, R. M., Pomerantz, M., Cohen, S. M., Gardner, J. P., Chapin, J. K., & Woodward, D. J. (1990). A region in the dorsolateral striatum of the rat exhibiting single-unit correlations with specific locomotor limb movements. *Journal of Neurophysiology*, 64(4), 1233–1246. <https://doi.org/10.1152/jn.1990.64.4.1233>
- Wilson, C. J., & Kawaguchi, Y. (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *The Structure of Large-Scale Synchronized Firing in Primate Retina*, 16(7), 2397–2410. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90211-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90211-0)
- Yamanaka, K., Hori, Y., Minamimoto, T., Yamada, H., Matsumoto, N., Enomoto,

- K., ... Kimura, M. (2018). Roles of centromedian parafascicular nuclei of thalamus and cholinergic interneurons in the dorsal striatum in associative learning of environmental events. *Journal of Neural Transmission*, 125(3), 501–513. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1713-z>
- Yin, H. H. (2017). The Basal Ganglia in Action. *Neuroscientist*, 23(3), 299–313. <https://doi.org/10.1177/1073858416654115>
- Zheng, T. & Wilson, C. (2002). Corticostriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations. *Journal of neurophysiology*, 87(2), 1007-17.
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short -Term Synaptic Plasticiry. *Annual Review of Physiology*, 64, 355–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>