



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA EN PSICOLOGÍA

LA CORTEZA PREMOTORA PROYECTA
PREFERENTEMENTE SOBRE LAS NEURONAS DE LA
VÍA ESTRIATONIGRAL DE LOS GANGLIOS BASALES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA
PRESENTA:
JOSÉ ANTONIO AGUILAR PALOMARES

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR: DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR

COMITÉ: DR. VICTOR MANUEL MAGDALENO MADRIGAL

DR. ALEJANDRO VALDÉS CRUZ

DR. EDUARDO ALEJANDRO ESCOTTO CORDOVA

DRA. LILIA MESTAS HERNANDEZ



Ciudad de México

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Sólo dame un punto de apoyo

y yo moveré el mundo.

-Arquímedes

Índice

Agradecimientos	1
Abreviaturas	3
Resumen.....	5
1. Introducción	6
2. Antecedentes.....	7
2.1 El estriado y los Ganglios Basales	7
2.2 Las vías directa e indirecta de los ganglios basales	7
2.3 La proyección corticoestriatal.....	9
2.4 Cortezas específicas pueden inervar regiones específicas del estriado	10
2.5 La proyección corticoestriatal y su relación con diversas patologías	11
2.6 Contribución de las vías a la generación de movimientos o acciones	12
3. Planteamiento del problema	12
4. Pregunta de investigación	13
5. Hipótesis.....	13
6. Objetivo general.....	13
6.1 Objetivos particulares.....	13
7. Materiales y Métodos.....	14
7.1 Animales	14
7.2 Expresión Viral.....	15
7.3 Cirugía Estereotáxica.....	15
7.4 Marcaje de las neuronas estriatonigrales versus estriatopalidales en un mismo animal.....	16
7.5 Registro de célula entera en la configuración de fijación de voltaje/corriente ..	17

7.6	Activación selectiva de los axones corticales en el Str	18
7.7	Verificación Anatómica.....	19
8.	Resultados.....	20
8.1	Comparación de las conexiones sinápticas entre corteza premotora al estriado (M2→Str) versus las de la corteza prelímbica al estriado (PL→Str).....	20
8.2	Comparación de las conexiones sinápticas de M2 sobre las neuronas de proyección del estriado: neuronas estriatonigrales (M2→dMSN) versus estriatopalidales(M2→iMSN)	23
8.3	Las conexiones M2→Str son glutamatérgicas	25
9.	Discusión	26
9.1	Similitudes y diferencias de las proyecciones de las cortezas premotora y prelímbica sobre las neuronas del estriado	26
9.2	La corteza premotora proyecta preferentemente sobre las neuronas de la vía directa.....	27
9.3	Relevancia de la inervación preferencial de la corteza premotora (M2) a la vía directa.....	28
10.	Conclusiones.....	30
	Referencias	31

Agradecimientos

En mi juventud caótica nunca tuve un camino fijo, conforme fui creciendo fue tomando forma hasta el punto de la culminación de esta formación en mi vida. Entre a la licenciatura en psicología sin saber que quería dedicarme realmente a esto, avancé en la carrera sin rumbo hasta que encontré mi amor por el mundo de las neurociencias al punto en donde no visualizo un futuro sin dedicarme a esto, ojalá al pasar de los años esto siga con el mismo fervor que ahora.

Este camino no hubiera sido posible sin mi madre, Rosa María, gracias porque absolutamente todo lo que soy ahora es gracias a ti. Gracias por tus noches de desvelo para trabajar, gracias por tus esfuerzos por guiarme desde que era un niño, gracias por el amor incondicional, gracias porque no importa si sigo siendo el niño de 8 años que dormía contigo o si soy el de 26 años que está terminando una licenciatura, sé que siempre estarás ahí para mí. Gracias por confiar siempre en mí, por impulsarme a alcanzar mis metas, gracias por haber sacrificado tantas cosas en tu vida que ni siquiera podría contarlas para que ahora yo pueda estar en este punto de mi vida. Ojalá la vida me alcance para regresarte aunque sea la mitad de todo lo que hiciste y seguirás haciendo por mí. Siempre serás mi ejemplo de dedicación, pasión y perseverancia en absolutamente todo lo que haga. Te amo.

A mi padre Efrén: gracias por siempre apoyarme en absolutamente todo lo que estuvo en tus manos, gracias por no hacerme a un lado cuando las adversidades de la vida siempre fueron más grandes de lo que yo pudiera imaginar. Gracias por los consejos, por escuchar, por intentar guiarme aún cuando mi vida era un desastre, gracias por jamás perder la esperanza en mí. Sobre todo, gracias por enseñarme que no importan los errores que se cometan en el pasado, siempre se puede comenzar de nuevo. Te amo.

A mi hermano Carlos: gracias por ser mi amigo, por acompañarme en este camino, por aconsejarme y enseñarme a no cometer errores; gracias por enseñarme que no importa la distancia, siempre se puede contar con alguien importante.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar: gracias por guiarme en este arduo camino, lleno de piedras y altibajos, por la paciencia, la formación, la confianza y por enseñarme a trabajar como un verdadero científico. Siempre estaré agradecido con usted por abrirme las puertas del mundo de la ciencia.

A todos los miembros del BL-202: por ayudarme aún en la más mínima cosa, por guiarme e instruirme en esta formación en el mundo de la ciencia. En particular, gracias a Asai, a Edgar y a Rubén, sin su apoyo y enseñanza este trabajo no hubiera sido posible, gracias por motivarme cuando sentía que no podía, gracias por enseñarme que ser compañeros de trabajo no está peleado con ser amigos, de verdad, muchísimas gracias.

A mis familia de otra sangre: Ashley, Erick, Javier, Omar y Farid, gracias por acompañarme en mi vida, por los momentos inolvidables y risas interminables, gracias porque a pesar del paso de los años en el fondo seguimos siendo los de 15 años que no paraban de disfrutar la vida. Gracias por enseñarme que a veces la verdadera familia proviene de personas de otra sangre. Los amo.

A mis amigos Juan Carlos, Jorge (Negro), Jorge (Blanco), Paco, Alberto y Jesús: gracias por siempre estar ahí, en mis momentos buenos y malos, por aguantarme en las fiestas, por los consejos, por no dejarme solo cuando más lo estaba. Espero siempre podamos tener esas pláticas infinitas que sólo con ustedes puedo tener. Los quiero a todos.

Abreviaturas

AP	Eje Antero-Posterior
Ca ²⁺	Calcio
ChR2	Channelrhodopsine-2
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina
DLS	Estriado Dorsolateral
DMS	Estriado Dorsomedial
dMSN	Neuronas Espinosas Medianas de la vía directa
DV	Eje Dorsal-Ventral
eYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
GB	Ganglios Basales
GFP	Green Fluorescent Protein
Gpe	Globo Pálido Externo
Gpi	Globo Pálido Interno
iMSN	Neuronas Espinosas Medianas de la vía indirecta
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LM	Eje Lateral-Medial
M1	Corteza Motora Primaria
M2	Corteza Premotora
MSN	Neuronas Espinosas Medianas
Na ⁺	Sodio
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos

PFA	Paraformaldehído
PFC	Corteza Prefrontal
PL	Corteza Prelímbica
PSC	Corriente Postsináptica
RB	Retrobeads Rojos
SNc	Sustancia <i>Nigra Pars Compacta</i>
SNr	Sustancia <i>Nigra Pars Reticulata</i>
STN	Núcleo Subtalámico
Str	Cuerpo Estriado

Resumen

El movimiento es vital para la supervivencia y el desarrollo de los animales, esto involucra actividad neuronal específica en regiones cerebrales como en el núcleo estriado (Str), el cual, recibe la mayor aferencia de información proveniente de la corteza. En particular, la corteza premotora (M2) envía información al Str está involucrada en la planeación de acciones motoras, la corteza prelímbica (PL) provee actividad relacionada con la selección de estrategias para obtener una recompensa. Dentro del Str existen dos tipos de neuronas de proyección: las neuronas de la vía directa o estriatonigral y las de la vía indirecta o estriatopalidal. Estas vías se reconocen con funciones opuestas para generar movimientos y cooperativas para el inicio de acciones; esta funcionalidad de las vías plantea que deben existir entradas específicas que activen las neuronas del Str ante la preparación de la ejecución de acciones.

Para responder a esta hipótesis en este trabajo de tesis se planteó como principal objetivo el determinar si existe una innervación preferencial de la proyección corticoestriatal (M2 y PL) sobre las neuronas de las vías estriatales; para este fin, expresamos una opsina en neuronas corticales que nos permitió la activación de las sinapsis corticoestriatales que permitiéndonos medir la corriente postsináptica en las neuronas de las diferentes vías del estriado.

Como hallazgos primero identificamos la conectividad sináptica, tanto de M2 como de PL sobre las neuronas del Str, observando que al variar los parámetros de activación existen diferencias particulares. Segundo y como punto central de esta tesis, identificamos que la proyección corticoestriatal de M2 tiene una innervación preferencial sobre las neuronas espinosas medianas de la vía directa.

Estos resultados avanzan el conocimiento de frontera y aportan a la interpretación de las acciones de las neuronas corticales premotoras sobre las neuronas de las diferentes vías del estriado. Neuronas cuyo inapropiado funcionamiento está detrás de parecimientos como la enfermedad de Parkinson.

1. Introducción

Los seres vivos tienen la necesidad de moverse dentro de su ambiente para realizar acciones como alimentarse para asegurar su supervivencia. Para que esto se lleve a cabo se requiere la participación de diversas estructuras cerebrales, entre estas el cuerpo estriado (Str), el cual, recibe entradas sinápticas provenientes de la corteza y el tálamo (Gerfen, 2006).

Dentro del Str se ha descrito la existencia de neuronas de proyección que envían sus axones a dos principales áreas del cerebro, al globo pálido externo (Gpe), o al globo pálido interno (Gpi) y/o a la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr), constituyendo la vía estriatopalidal (vía indirecta Str→Gpe) y la vía estriatonigral (vía directa Str→Gpi/SNr) (Gerfen, 2006; Shepherd, 2013). Las neuronas de la vía estriatopalidal también denominadas de la vía indirecta (iMSN: *indirect medium spiny neurons*) expresan receptores a dopamina tipo D2 y a adenosina tipo 2A. Las neuronas estriatales de la vía estriatonigral, también denominadas de la vía directa (dMSN: *direct medium spiny neurons*) expresan receptores a dopamina tipo D1 (Gerfen, 1990). Las iMSN frenan mientras que las dMSN facilitan la ejecución de movimientos (Gerfen, 2006; Kravitz et al., 2010)

La principal entrada de excitación al Str proviene de la corteza, es sabido que cortezas particulares participan en procesos específicos de la generación de acciones (Wall et al., 2013; Rock et al., 2016). Por ejemplo, la corteza premotora guía la planeación de acciones (Baker & Ragozzino, 2014; Li et al., 2015) mientras que la corteza prelímbica selecciona estrategias para obtener objetivos (Gremel & Costa, 2013).

Trabajos previos han propuesto que la afección en las sinapsis corticoestriatales están detrás de patologías como la enfermedad de Parkinson, Tourette, Autismo, trastorno depresivo mayor o trastorno obsesivo compulsivo (Albin et al., 1989; Gerfen, 2006; Gittis & Kreitzer, 2012; Nelson & Kreitzer, 2014; Wichmann & DeLong, 1996).

Dadas estas implicaciones es crucial identificar si existe una inervación específica sobre las neuronas de las vías de salida del estriado (Kiritani et al., 2012; Rock et al., 2016).

2. Antecedentes

2.1 El estriado y los Ganglios Basales

Los ganglios de la base o ganglios basales (GB) se componen de estructuras subcorticales que procesan señales provenientes de la corteza y la envían hacia el tálamo, el cual, en turno regresa a la corteza. Los GB están conformados por el cuerpo estriado (Str), la parte interna del globo pálido (Gpi), la parte externa del globo pálido (Gpe), la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr), la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y el núcleo subtalámico (STN) (**Figura 1**) (Gerfen, 2006).

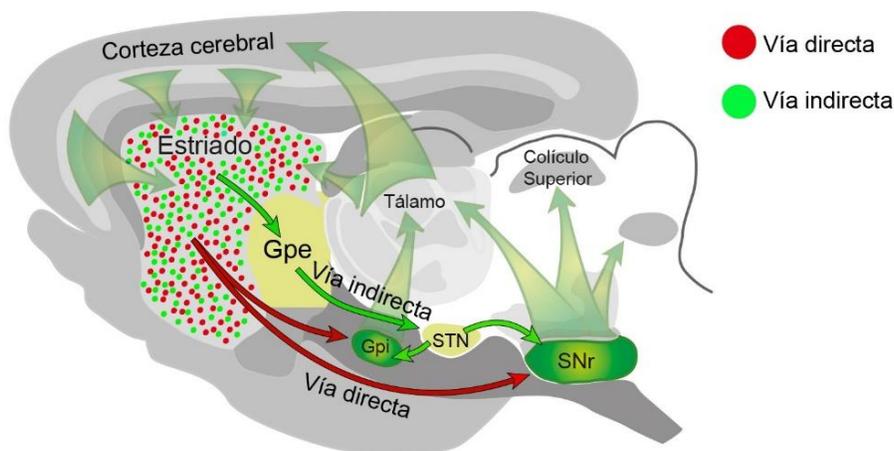


Figura 1. Diagrama de circuitos de los Ganglios Basales. El estriado recibe entradas excitatorias provenientes de la corteza cerebral y el tálamo y envía sus proyecciones al globo pálido interno (Gpi) y/o a la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) (Vía directa), o al globo pálido externo (Vía indirecta). La salida de los ganglios basales inerva al tálamo. En rojo se muestra la vía directa y en verde se muestra la vía indirecta (Esquema modificado de Gerfen, 2006).

Se ha descrito que las conexiones dentro de los GB integran la información proveniente de la corteza y el tálamo, y contribuyen a la generación apropiada de procesos motores, cognitivos y emocionales (Lanciego, J., Luquin, N. and Obeso, 2012)

2.2 Las vías directa e indirecta de los ganglios basales

El Str es el núcleo subcortical más grande de los GB y la mayor entrada de información que tiene este núcleo proviene de corteza (Shepherd, 2013). Esta información es codificada por las neuronas espinosas medianas que se ubican en el Str

(95% del total de neuronas) las cuales se clasifican en dos tipos, dependiendo de a qué estructura proyectan o qué tipo de receptores expresan, las de la vía directa (dMSN) o las de la vía indirecta (iMSN); el resto de células (5% del total de neuronas) ubicadas en el Str son interneuronas (Gerfen et al., 1990; Freeze et al., 2013).

Las dMSN expresan el receptor a dopamina tipo D1 y proyectan hacia el Gpi y/o a la SNr, que son los núcleos de salida de los GB. Las iMSN expresan el receptor a dopamina tipo D2 o a adenosina tipo 2A y proyectan hacia el Gpe, haciendo relevos sinápticos antes de llegar a los núcleos de salida de los GB (**Figura 1**) (Gerfen et al., 1990; Gerfen, 2006; Freeze et al., 2013).

La caracterización de estos dos tipos de neuronas en el Str es muy importante para los modelos funcionales de los GB. El modelo clásico de procesamiento de información en estas vías postula que la activación de las células corticales produce liberación de Glutamato el cual activa a las MSN estriatales. Las MSN son de naturaleza GABAérgica por lo que al activarse tienen una acción inhibitoria sobre las neuronas del Gpi/SNr o del GPe, que también son GABAérgicas, lo que provoca la desinhibición de sus proyecciones en las células postsinápticas, concluyendo en una desinhibición o activación de las células glutamatérgicas del tálamo que envían información de vuelta hacia la corteza (**Figura 2**) (Albin et al., 1989; Gerfen et al., 1990; Freeze et al., 2013).

El modelo clásico sostiene que la activación de ambas vías tiene efectos contrarios en la generación de movimientos. La activación de la vía directa promueve el movimiento (bajo la premisa de reforzamiento), mientras que, la activación de la vía indirecta inhibe la generación de movimientos (con base en aversión) (DeLong, 1990; Kravitz et al., 2010, 2012). Por el contrario, un modelo posterior al modelo clásico, el modelo de cooperación, propone que las vías estriatales se coactivan al momento de la ejecución de un movimiento cooperando en la generación de acciones (Jin et al., 2014; Tecuapetla et al., 2016).

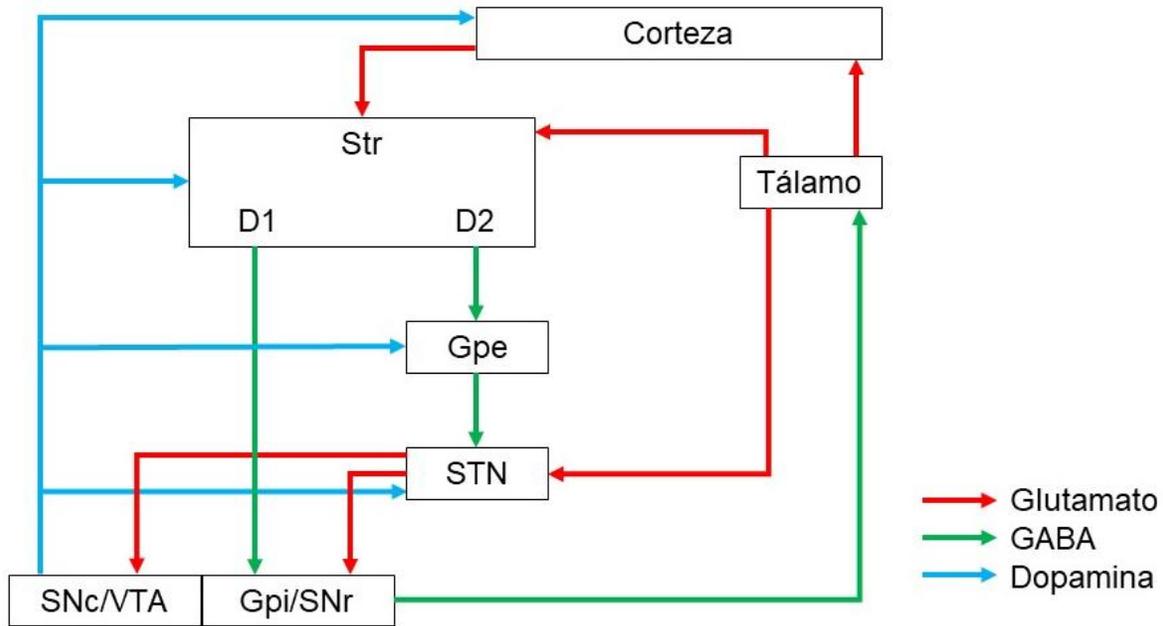


Figura 2. Representación de las proyecciones estriales y su integración dentro de los ganglios basales. La activación de neuronas estriales de la vía directa (D1) inhibe directamente a las neuronas del globo pálido interno/sustancia *nigra pars reticulata* (Gpi/SNr) provocando la desinhibición del tálamo que en turno activa a la corteza. Por el contrario, la activación de las neuronas estriales de la vía indirecta inhiben a las neuronas del globo pálido externo (Gpe) provocando la desinhibición de las neuronas del núcleo subtalámico (STN) activando sus protecciones hacia el Gpi y la SNr, lo que provoca la inhibición del tálamo (Esquema modificado de Redgrave et al., 2010).

2.3 La proyección corticoestriatal

La corteza cerebral tiene una conexión funcional con el Str a través de las neuronas piramidales corticales de naturaleza glutamatérgicas inervan al Str (Kress et al., 2013; Shepherd, 2013).

Específicamente, la corteza prelímbica (PL) forma parte del área prefrontal en roedores y ampliamente relacionada en la realización de conductas guiadas por motivación y en la generación de emociones (Bicks et al., 2015). La corteza premotora (M2) forma parte del área frontal en roedores (su equivalente en primates es la corteza motora pre-suplementaria), a la cual, se le atribuyen aspectos de planificación motora (Wise, 1985; Barthas & Kwan, 2017).

Experimentos previos señalan que si se lesiona M2 en un ratón que ya ha aprendido una tarea, su desempeño en esta no se ve afectado por lo que se propone

que M2 no es necesaria para el desarrollo de una tarea adquirida, sin embargo, es necesaria si se pretende que el ratón adquiriera una tarea nueva (Gremel & Costa, 2013). La lesión de M2 perjudica el aprendizaje serial (Yin, 2010) y, junto con el estriado dorsolateral (DLS), tienen un papel fundamental en la formación de hábitos (Yin et al., 2004).

Por otro lado, la lesión de la corteza PL genera un déficit en la actualización de la relación acción-consecuencia (Corbit & Balleine, 2003); el DMS en conjunto con PL permiten la adaptación de respuesta a cambios en el ambiente (Baker & Ragozzino, 2014).

En un trabajo previo en el que se marcó de manera retrograda a las neuronas corticales desde el Str reveló que aproximadamente un 60% de las entradas sinápticas al Str son de origen corticoestriatal (Wall et al., 2013) provenientes principalmente de las cortezas somatosensorial y motora (Lee et al., 2019) y de estructuras prefrontales y límbicas a compartimentos estriatales específicos (ver **Figura 3**).

2.4 Cortezas específicas pueden inervar regiones específicas del estriado

(Redgrave et al., 2010; Lanciego, J., Luquin, N. and Obeso, 2012).

Las manipulaciones de la actividad neuronal dentro del DLS ha demostrado su participación en la generación de hábitos, en el aprendizaje, en el inicio de secuencias de movimientos y en modificar la probabilidad de acertar o errar en un movimiento (Yin, Knowlton, & Balleine, 2004; Rothwell et al., 2015; Tecuapetla et al., 2016).

Por otro lado, las lesiones en el DMS afectan la capacidad de generar acciones dirigidas a objetivos o acciones moduladas por la expectativa de una recompensa (Yin et al., 2005; Lex & Hauber, 2010).

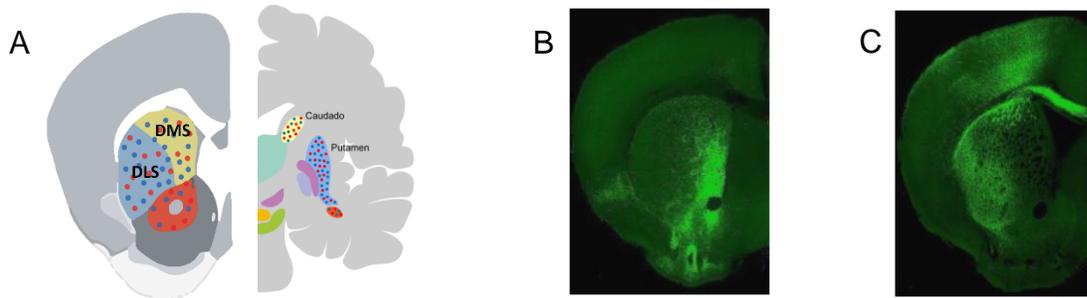


Figura 3. Sitios de registro dentro del estriado dadas las proyecciones de PL y M2.

(A) División de los compartimentos en el cuerpo estriado en roedores y su equivalencia con primates (*Esquema modificado de Nelson & Kreitzer, 2014; Florio et al., 2018*).

(B) Proyecciones axonales provenientes de corteza PL hacia el estriado.

(C) Proyecciones axonales provenientes de corteza M2 hacia el estriado.

(B) y **(C)** son imágenes tomadas del *Allen Brain Atlas*.

2.5 La proyección corticoestriatal y su relación con diversas patologías

Actualmente se piensa que la enfermedad de Parkinson es causada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio y sus proyecciones axonales hacia el Str y la corteza (Gerfen, 2006; Obeso et al., 2017; Lara-González et al., 2019). Los modelos actuales postulan que la deficiencia de dopamina resulta en cambios postsinápticos en las neuronas estriatales y en sus sinapsis corticales, conduciendo a un aumento en la actividad de las iMSN y una disminución de la actividad de las dMSN desregulando la salida de los GB (DeLong, 1990; Gerfen, 2006; Kreitzer & Malenka, 2008).

Las afectaciones de la enfermedad de Huntington se observan principalmente en las partes frontales y motoras de la corteza y el Str afectándose las sinapsis corticoestriatales (Eidelberg & Surmeier, 2011; Shepherd, 2013). Específicamente, en la corteza son afectadas las neuronas piramidales de las capas medias y profundas (Cudkowicz & Kowall, 1990) las cuales presentan actividad electrofisiológica anormal (Cummings et al., 2009) mientras que en el Str se observa una pérdida selectiva de las iMSN además de alteraciones de transmisión de glutamato y dopamina (Deng et al., 2004; André et al., 2011).

En otro ejemplo de consecuencias de alteraciones en las sinapsis corticoestriatales, el trastorno obsesivo compulsivo está asociado con la conectividad corticoestriatal. Estudios de imágenes en humanos sugieren hiperactividad en circuitos

corticoestriatales que involucran las áreas orbitofrontal, prefrontal, cingulada anterior y sus proyecciones hacia el cuerpo estriado (Graybiel & Rauch, 2000; Harrison et al., 2009; Shepherd, 2013).

2.6 Contribución de las vías a la generación de movimientos o acciones

La optogenética permite el estudio de actividad específica de neuronas gracias a la introducción de genes exógenos que codifican proteínas sensibles a la luz (Buchen, 2010; Pastrana, 2011; Zhang et al., 2011; Häusser, 2014).

En el caso de las vías estriatales, la activación optogenética de las dMSN en el DLS fortalece el aprendizaje dirigido a objetivos, mientras que la activación de las iMSN apoya la formación de hábitos (Rothwell et al., 2015; Vicente et al., 2016). En otro estudio se mostró que la activación de la vía directa o indirecta dentro del DMS tiene implicaciones en el control motor, la activación de la vía directa incrementó los movimientos finos mientras que la activación de la vía indirecta provocaba inmovilidad en los animales (Kravitz et al., 2010).

No obstante, trabajos realizando inhibiciones optogenéticas de una o ambas vías de proyección interrumpen los movimientos contraversivos mientras que favorecen movimientos ipsiversivos (Tecuapetla et al., 2014), de igual manera, la inhibición optogenética de la actividad de una o ambas vías antes del inicio de una secuencia de acciones motoras aumentó la latencia para iniciar estas mismas, sin embargo, la inhibición de las vías durante la ejecución de acciones tiene efectos opuestos sobre la ejecución, concluyendo que la actividad de ambas vías es necesaria para el inicio de una acción, mientras que durante la ejecución contribuyen de manera opuesta (Tecuapetla et al., 2016).

3. Planteamiento del problema

La actividad de las neuronas del estriado está relacionada con la generación de movimientos, el aprendizaje y la selección de acciones. Comprender la conectividad cortico-estriatal es fundamental para entender como la comunicación entre estas dos

estructuras interactúan para generar conductas y movimientos en condiciones normales o patológicas. Por lo tanto, la caracterización de las proyecciones de la corteza sobre los diferentes tipos neuronales del estriado es crucial para el entendimiento de la neurobiología del movimiento, el aprendizaje y la selección de acciones.

4. Pregunta de investigación

¿Existe una conectividad diferencial de las cortezas premotora (M2) y prelímbica (PL) sobre las neuronas espinosas medianas del estriado?

5. Hipótesis

- Las neuronas de proyección corticoestriatal de M2 y PL inervan de manera diferencial a las neuronas espinosas medianas del estriado.
- Las neuronas de proyección corticoestriatal de M2 inervan de manera específica a las vías de proyección estriatal.

6. Objetivo general

- Determinar si las sinapsis de neuronas corticoestriatales inervan de manera diferencial a las neuronas espinosas medianas del estriado.

6.1 Objetivos particulares

- Caracterizar la conectividad funcional de las cortezas M2 y PL sobre las neuronas espinosas medianas del estriado.
- Caracterizar la conectividad funcional de la corteza M2 las neuronas espinosas medianas del estriado de la vía directa *versus* de la vía indirecta.

7. Materiales y Métodos

7.1 Animales

Para llevar a cabo los experimentos de este proyecto se utilizaron ratones transgénicos Emx1-Cre y ratones de la cruce de dos líneas de ratones transgénicos: Emx1-Cre x BACD2 (**Figura 5**). La línea Emx1-Cre expresa la enzima Cre recombinasa en células glutamatérgicas de la corteza cerebral mientras la línea BACD2 expresa GFP en las neuronas estriatales que expresan receptor a dopamina tipo D2. La cruce de estas dos líneas nos dio ratones dobles transgénicos Emx1-Cre/BACD2.

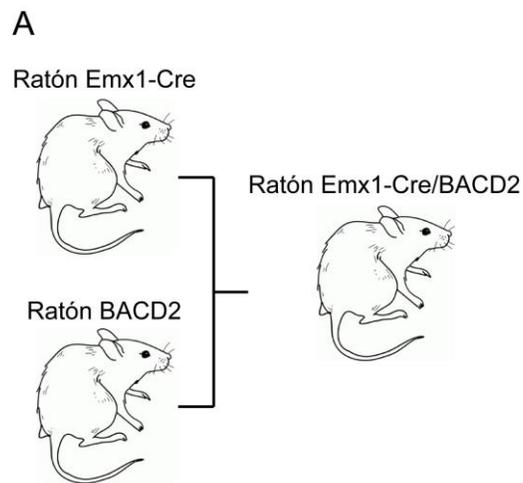


Figura 4. Esquema de cruce del ratón transgénico Emx1-Cre y ratón transgénico BACD2 para obtener el doble transgénico Emx1-Cre/BACD2

Para el primer grupo experimental se usaron 5 ratones WT y para el segundo grupo experimental se usaron 4 ratones doble transgénicos, todos de sexo indistinto de entre 21 y 60 días de edad. Los animales fueron mantenidos en un cuarto con temperatura a 22°C bajo ciclos de luz oscuridad (12h/12h), agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos desarrollados se hicieron bajo la aprobación del protocolo FT-2019 aprobado por el comité de manejo de animales del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

7.2 Expresión Viral

Para poder activar selectivamente los axones de cortezas específicas (M2 o PL) se utilizó un vector viral adenoasociado del serotipo 1 para expresión de la opsina *Channelrodhopsin2* acoplada a la proteína reportera eYFP (*AAV-DIO-ChR2-eYFP*; *UPENN Vector Core*). ChR2 es excitada con luz azul (470 nm) (**Figura 5**).

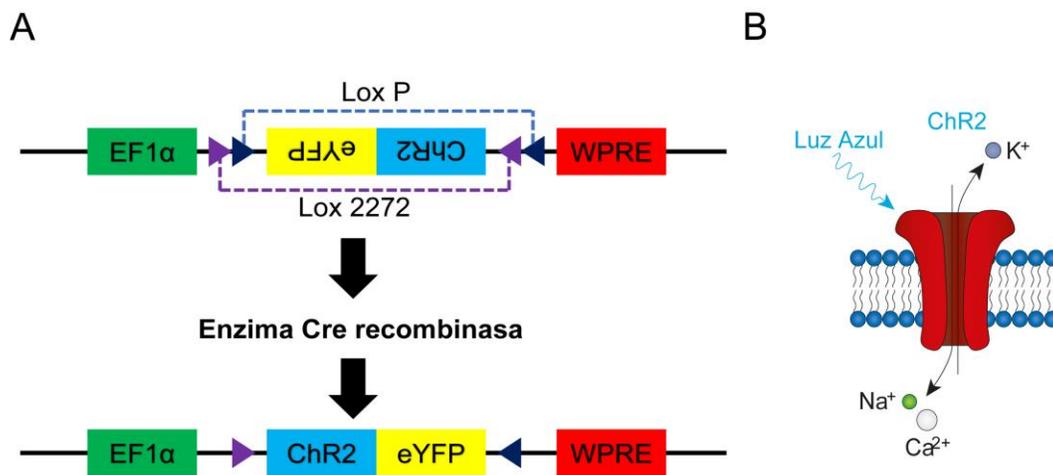


Figura 5. Representación funcional de *Channelrodhopsin2*.

(A) Esquema del constructo contenido en el vector viral para expresar ChR2 (Esquema modificado de Smedemark-Margulies & Trapani, 2013).

(B) Representación del funcionamiento de ChR2 (Esquema modificado de Häusser & Smith, 2007).

Para marcar las neuronas de la vía directa (que proyectan hacia SNr) se utilizaron retrobeads rojos (RB; Lumafleur Inc.) los cuales son microesferas de fluoróforos que funcionan como marcador retrogrado que se excita con luz verde (520 nm).

7.3 Cirugía Estereotáxica

Para la cirugía se indujo anestesia con isoflurano y oxígeno (4% en 0.5 L/ min inicialmente y 1.5% en 0.5 L/ min para el desarrollo de la cirugía) manteniendo una frecuencia respiratoria de 1/seg. El procedimiento se realizó sobre una plancha térmica para regular la temperatura del animal.

Inicialmente se limpió y depiló la zona cefálica para después colocarlo sobre el aparato estereotáxico, posteriormente se expuso el cráneo del animal y se limpió con

agua oxigenada (10%). Una vez que el cráneo quedó completamente alineado, usando como referencia los puntos de bregma y lamda, se realizaron trépanos e inyecciones de manera unilateral utilizando un taladro dental. Las coordenadas con respecto a Bregma para las inyecciones en M2 fueron: Eje Antero-Posterior (AP)= -2.34 mm, Eje Lateral-Medial (LM)= -1.3 mm y Eje Dorsal-Ventral (DV)= -0.6 mm; para las inyecciones en PL fueron: AP= -2.34 mm, LM= -0.3 mm y DV= -1 mm y para las inyecciones en SNr fueron: AP=+3.1 mm, LM= -1.3 mm y DV= -4 mm.

Se inyectaron 500 nL de ChR2-eYFP en M2 o PL y 400 nL de RB en SNr (**Figura 6**). Todas las inyecciones fueron realizadas con una micropipeta de borosilicato acoplada a un nano-inyector (*Nanoject II Drummond Scientific*) a una velocidad de inyección de 23 nL/s. Después de cada inyección se dejó la pipeta dentro del tejido para permitir la difusión del virus durante 10 minutos. Una vez finalizadas las inyecciones se suturó la piel que cubre al cráneo del animal y se dejó de 2 a 3 semanas de recuperación y expresión del virus para posteriormente hacer los registros en rebanada.

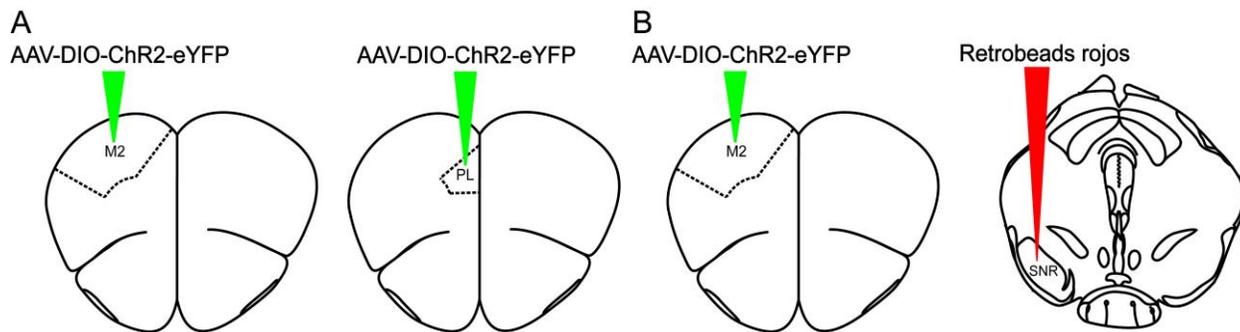


Figura 6. Esquemas representativos de los sitios de inyección.

(A) Sitios de inyección de ChR2 para M2 y PL utilizados en el primer grupo experimental.

(B) Sitio de inyección de ChR2 para M2 y RB en SNr para el segundo grupo experimental.

7.4 Marcaje de las neuronas estriatonigrales versus estriatopalidales en un mismo animal

El marcaje de las neuronas pertenecientes a la vía estriatonigral se logró mediante la inyección de RB en la SNr para marcar de manera retrograda las células del Str que proyectan hacia esta estructura. El marcaje de las neuronas pertenecientes a la vía estriatopalidal se logró mediante el uso de la línea de ratones transgénicos BACD2 los

cuales expresan la proteína reportera GFP bajo el promotor del receptor de dopamina D2 de manera constitutiva (**Figura 7**).

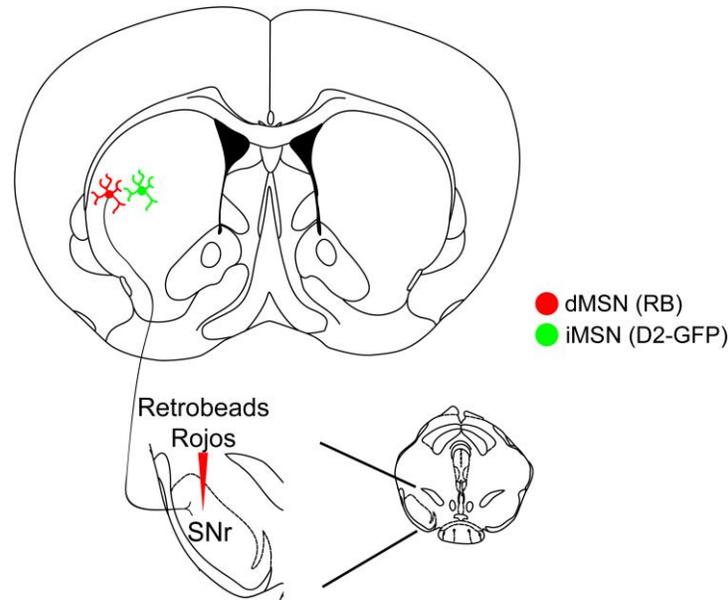


Figura 7. Esquema de doble marca de MSN en una misma rebanada. El marcaje de las dMSN (rojo) se logra por los RB que son tomados por las terminales sinápticas en SNr y viajan de manera retrograda para marcar el soma de la neurona y el marcaje de las iMSN (verde) en el mismo animal se logra mediante la expresión de la proteína reportera GFP.

7.5 Registro de célula entera en la configuración de fijación de voltaje/corriente

Para extraer el cerebro de los animales se preparó una solución que emula al líquido cefalorraquídeo (LCR) que contiene (en mM) sacarosa 240, glucosa 9.9, NaHCO₃ 27.99, KCl 5, NaH₂PO₄ 0.55, MgCl₂ 6.40, Piruvato 3.7 y Ácido Ascórbico 0.99 para, la cual se dejó enfriar y se burbujeó con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Con esta solución se procedió a hacer una perfusión intracardiaca y posteriormente se extrajo el cerebro, colocándolo en un vibratomo (Pelco, 3000) con el que se obtuvieron rebanadas coronales de 200-300 μ m de grosor a la altura del Str. Las rebanadas se transfirieron a una solución de registro, la cual contenía (en mM) NaCl 125, NaHCO₃ 26, Glucosa 15, KCl 3, NaH₂PO₄ 1.25, CaCl₂ 2.6 y MgCl₂ 1.3. Para lograr los registros electrofisiológicos se utilizó una solución interna con la que se llenó a la micropipeta de registro (capilares de borosilicato) que contenía (en mM) KMeSO₃ 120, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA/KOH 10, CaCl₂ 1, Na₂ATP 2.41, NaGTP 1.14, Biocitina 3.18.

Se realizaron registros en la configuración de célula completa, por medio de la técnica fijación de voltaje y fijación de corriente. En la técnica de fijación de voltaje se fijó un potencial de mantenimiento para las células registradas de -80 mV, una vez que se logró el acceso, se cambió a la técnica fijación de corriente en la cual se inyectaron pulsos cuadrados de corriente para identificar el disparo neuronal.

Para los registros en que se expresó ChR2 en la corteza PL se procedió a registrar en el estriado dorso medial (DMS) mientras que para la expresión de ChR2 en corteza M2 se registró en el estriado dorso lateral (DLS) (**Figura 3**).

7.6 Activación selectiva de los axones corticales en el Str

Una vez aplicado el protocolo de fijación de corriente, regresamos a fijación de voltaje para aplicar pequeños pulsos de luz azul, utilizando un LED adaptado a la vía de iluminación del microscopio de registro (**Figura 8B**) [470 nm, variando el tiempo del pulso (1-20 ms) o la intensidad de la luz (0-12 mW); intervalo entre pulso 5 segundos], esto para describir si la célula registrada tenía una entrada sináptica excitatoria proveniente de los axones de las neuronas de la corteza que previamente fueron transfectadas con ChR2.

Para evidenciar el potencial de inversión de las corrientes post sinápticas registradas, se varió el potencial de mantenimiento (-80 mV a +40 mV) mientras se mantenía una estimulación constante de un pulso de 1 ms con una potencia máxima del LED (**Figura 8C**).

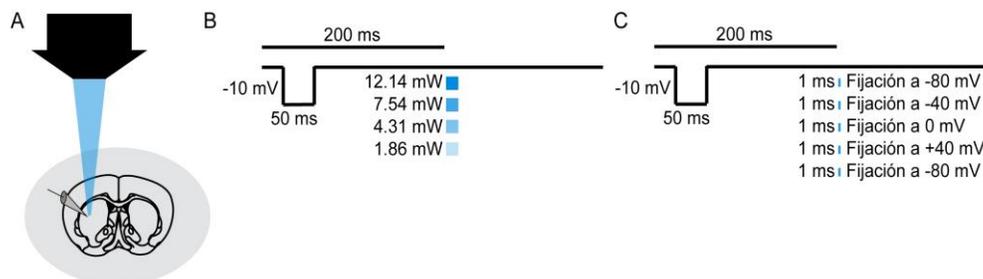


Figura 8. Diseño experimental para registros electrofisiológicos en rebanadas.

(A) Esquema del registro en donde la estimulación con luz se restringe al estriado.

(B) Esquema de la metodología de la estimulación y registros de neuronas del Str usando fijación de voltaje para el primer grupo experimental.

(C) Esquema de la metodología de la estimulación y registros variando el potencial de mantenimiento para estimar el potencial de inversión de las corrientes sinápticas.

7.7 Verificación Anatómica

Una vez terminados los protocolos establecidos se dejó dializar la célula con biocitina (contenida en la solución interna) para su posterior revelado por inmunohistoquímica. Para identificar a las neuronas registradas cada célula registrada se incubó en PFA al 4%, posteriormente se hicieron 3 lavados con buffer de fosfato (PBS al 0.1M, 7.3 pH), posteriormente, se incubó a la rebanada por 24h con el anticuerpo secundario CY5 que reconoce biocitina (Sigma-Aldrich) en agitación constante. Posterior a las 24h se retiró el anticuerpo secundario y se procedió a realizar otros 3 lavados con PBS. Una vez finalizados los lavados se procedió a montar las rebanadas procesadas en portaobjetos con medio de montaje (Mowiol) y se llevaron a microscopía lográndose su reconstrucción por medio de imagenología confocal (LSM700, Zeiss).

8. Resultados

8.1 Comparación de las conexiones sinápticas entre corteza premotora al estriado (M2→Str) versus las de la corteza prelímbica al estriado (PL→Str)

Para responder a la pregunta de si existían diferencias entre las entradas sinápticas excitatorias provenientes tanto de corteza M2 como de PL al estriado se inyectó ChR2-eYFP en la corteza y se identificó a las fibras marcadas en el estriado (**Figura 9**).

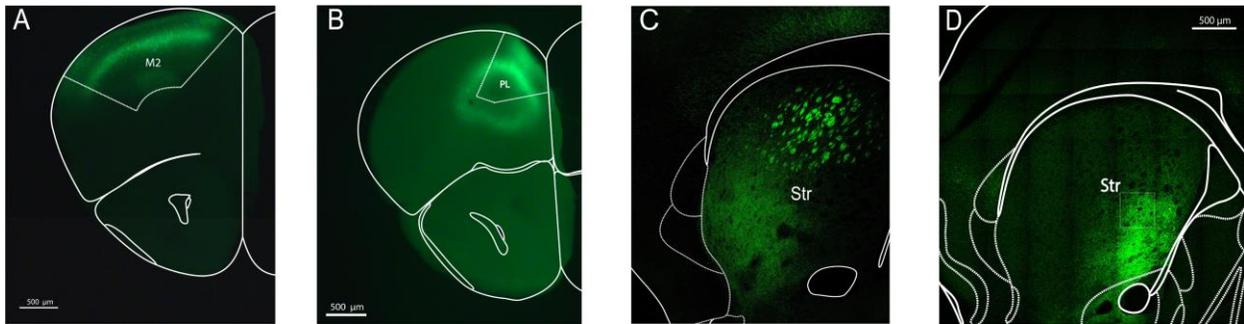


Figura 9. Fotomicrografías de sitios de inyección de ChR2-eYFP en corteza premotor (M2) o corteza prelímbica (PL) y sus axones al estriado (Str).

(A) y (B) Ejemplo de marca de inyección de ChR2 en M2 o PL respectivamente.

(C) y (D) Proyecciones de A y B respectivamente al estriado. Note que las proyecciones M2→Str se ubican en la parte más lateral/dorsal del estriado mientras que las proyecciones PL→Str se ubican en la parte más medial (con respecto a la línea media del estriado).

Una vez identificada la marca de la proyección de ChR2-eYFP de M2 al estriado dorsolateral (DLS) y de PL al estriado dorsomedial (DMS) procedimos a registrar en dos grupos experimentales las posibles diferencias en conexión funcional entre estas cortezas.

El primer parámetro estimado fue la probabilidad de obtener una corriente postsináptica (PSC) por la activación de los axones que expresaban ChR2 en neuronas de M2 versus PL (**Figura 10**). Esta probabilidad mostró no ser diferente (M2→Str n=7/10 *versus* PL→Str n=8/11, $p>0.05$, Chi-square test).

Posteriormente analizamos: 1) la amplitud promedio, 2) la amplitud máxima (detectada en alrededor de 10 ensayos por registro) y 3) la amplitud en función de la intensidad de luz.

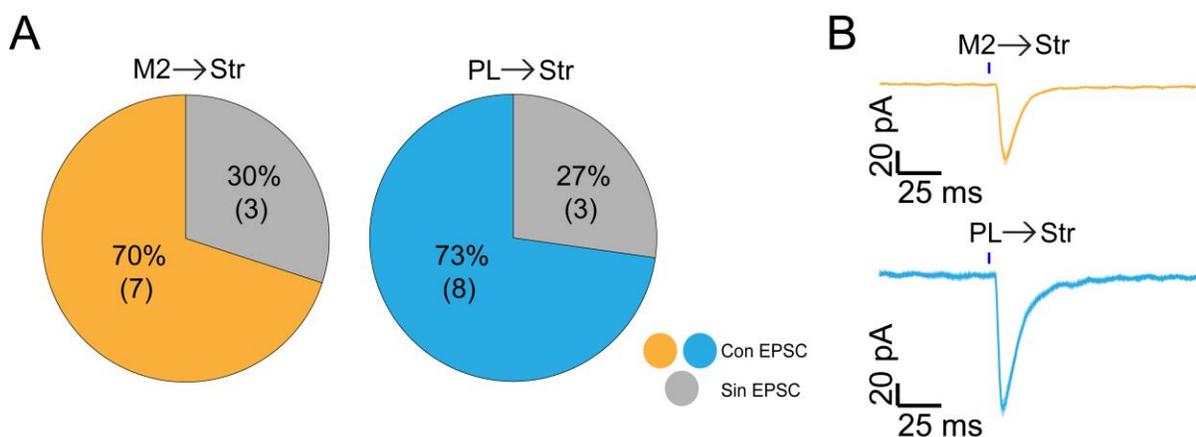


Figura 10. Probabilidad de encontrar conectividad de M2→Str versus PL→Str.

(A) Probabilidad de encontrar corrientes postsinápticas. La conectividad se asignaba como existente si la estimulación evocaba una corriente postsináptica. Esta estimación se realizó con pulsos de luz de 1 ms y 12.14 mW de intensidad de luz.

(B) Ejemplo de una corriente postsináptica para M2→Str y para PL→Str.

Los paneles A-B de la **Figura 11** muestran la ubicación aproximada de registro para las células M2→Str y para las células PL→Str respectivamente.

La amplitud promedio de las corrientes postsinápticas (PSC) registradas mostró una tendencia a ser mayor en PL pero no fue significativa (M2→Str, amplitud promedio=52±15 pA, n=7 versus PL→Str=95±38 pA, n=8, $p>0.05$ prueba U de Mann-Whitney; **Figura 11C**) de igual manera se analizó la amplitud máxima de los ensayos por neurona registrada (M2→Str, amplitud promedio=87±21 pA, n=7 versus PL→Str=137±46 pA, n=8, $p>0.05$ prueba U de Mann-Whitney; **Figura 11D**).

Posteriormente se analizó la amplitud de las PSC en función de la intensidad de luz en cada uno de los grupos, de lo cual no encontramos diferencias en función de la intensidad de luz (M2→Str: 12.14mW=52±15, n=7; 7.54mW=56±14 pA, n=7; 4.31mW=64±15 pA, n=6, 1.86mW=45±11 pA, n=6; $p>0.05$ Kruskal-Wallis test; **Figura 11E**), (PL→Str: 12.14mW =95±38 pA, n=8; 7.54mW=143±53 pA, n=5; 4.31mW=137±45 pA, n=5; 1.86mW=91±30, n=5; $p>0.05$, Kruskal-Wallis test; **Figura 11F**).

De estos mismos datos se comparó el promedio de las amplitudes de las PSC en función de la intensidad de la luz entre los grupos (M2 vs PL), sin embargo, no se encontraron diferencias entre grupos (M2→Str: 12.14mW=52±15, n=7, versus PL→Str: 12.14mW =95±38 pA, n=8; M2→Str: 7.54mW=56±14 pA, n=7, versus PL→Str: 7.54mW=143±53 pA, n=5; M2→Str: 4.31mW=64±15 pA, n=6, versus PL→Str: 4.31mW=137±45 pA, n=5; M2→Str: 1.86mW=45±11 pA, n=6, versus PL→Str: 1.86mW=91±30, n=5; p>0.05, prueba U de Mann-Whitney)

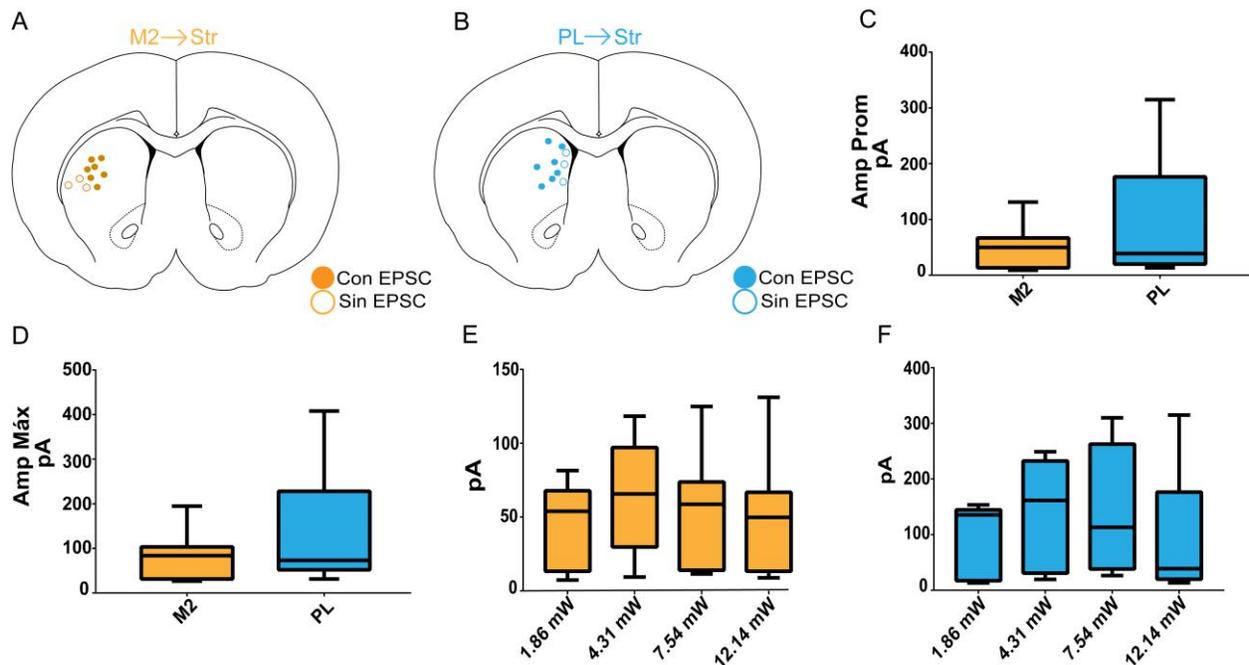


Figura 11. Corrientes postsinápticas evocadas en el estriado por la activación de axones de corteza premotora (M2→DLS) versus prefrontal (PL→DMS).

(A) y (B) Ubicación de células registradas para M2 o PL.

(C) Promedio de amplitud de las PSC para M2→Str versus PL→Str (p= 0.095).

(D) Amplitud máxima de las PSC para M2→Str versus PL→Str (p=0.69).

(E) y (F) Amplitud promedio de las PSC por cada variación en la intensidad del pulso de luz para M2→Str y PL→Str respectivamente.

8.2 Comparación de las conexiones sinápticas de M2 sobre las neuronas de proyección del estriado: neuronas estriatonigrales (M2→dMSN) versus estriatopalidales(M2→iMSN)

Para determinar si las proyecciones de M2→Str presentan una invasión preferencial sobre las neuronas de la vía directa o indirecta realizamos un segundo set de experimentos en el cual el objetivo fue realizar un registro pareado por rebanada, una neurona de la vía directa y una de la vía indirecta. La **figura 13** muestra el sitio de inyección en la corteza de ChR2-eYFP y sus proyecciones al estriado.

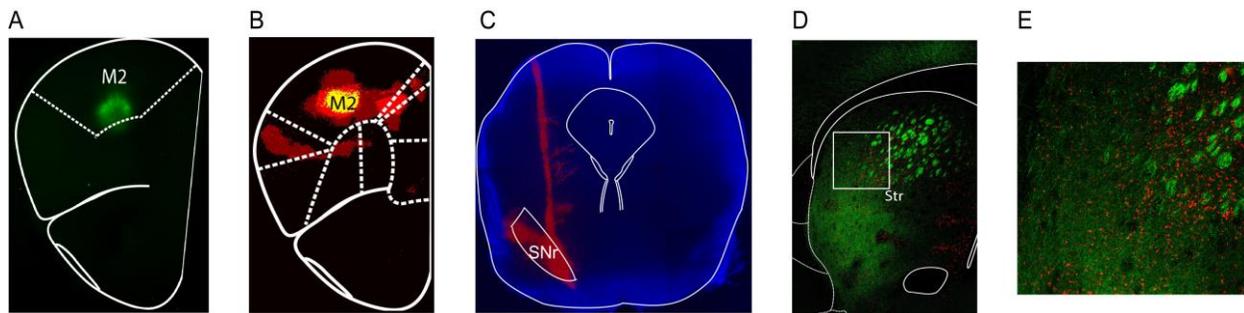


Figura 12. Sitios de inyección para M2 y sus axones en el Str y la marca de RB.

(A) Ejemplo de la marca de inyección de ChR2-eYFP en la corteza M2.

(B) Promedio de inyecciones de 4 animales como en A, amarillo representa la zona con mayor frecuencia de marca.

(C) Ejemplo de la marca de inyección de Retrobeads rojos a nivel de la sustancia *nigra pars reticulata*.

(D) y (E) Ejemplo del marcaje de ambas neuronas de proyección en el estriado (Str) de vías en una misma rebanada.

Una vez verificada la estrategia para marcar a las neuronas de ambas vías en una misma rebanada estriatal (**Figura 12**), se procedió a realizar registros electrofisiológicos in vitro. La **figura 13A** muestra la posición de los registros realizados. En total se registraron 6 pares de células en 6 rebanadas distintas, en cada rebanada se registró una neurona de la vía directa (dMSN; marcada con Retrobeads) y una neurona de la vía indirecta (iMSN; marcada con GFP) (**Figura 13B**). El registrar a las neuronas de manera pareada por rebanada permitió la comparación de invasión cortical en la misma muestra. La **Figura 13C** muestra un ejemplo representativo del registro de corrientes postsinápticas por la activación de axones corticales de M2 en uno de estos pares. El orden de registro estuvo invertido en la mitad de los pares muestreados.

El análisis de la amplitud de las corrientes postsinápticas evocadas por la estimulación con luz mostro una conexión mayor sobre las neuronas de la vía directa [M2→dMSN mean=298+/-103 versus M2→iMSN=35+/-9 pA; 12.14mW/1ms n=6, p<0.05 prueba de Wilcoxon; **Figura 13D**).

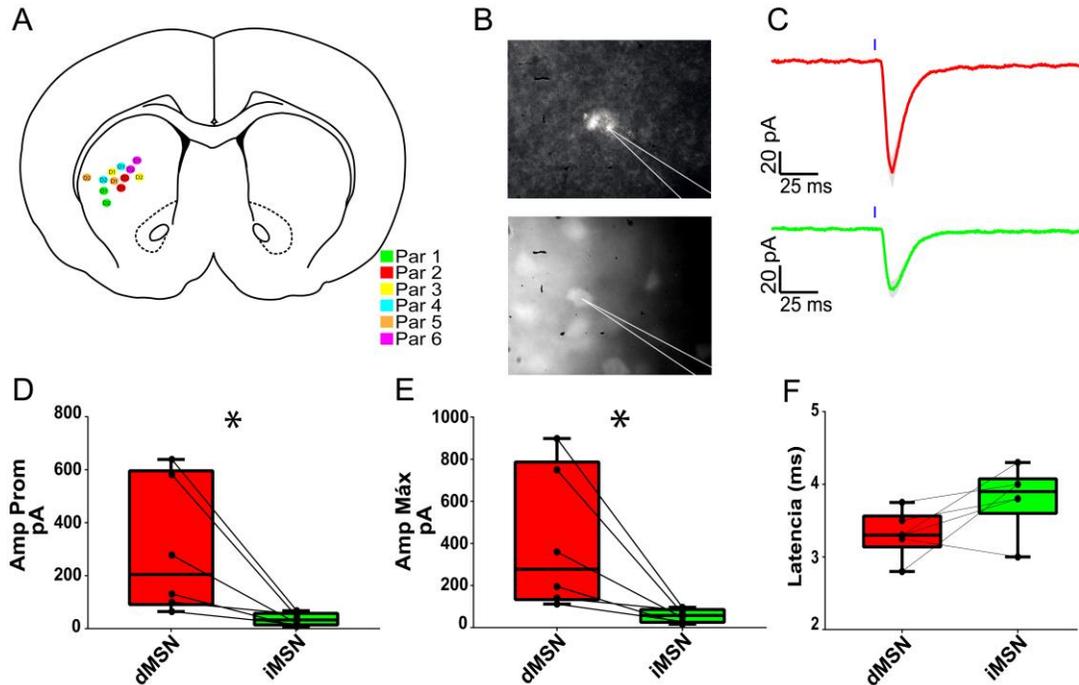


Figura 13. La corteza premotora (M2) inerva preferencialmente a las neuronas de la vía directa.

(A) Ubicaciones de los pares de células registradas para los datos en D-F.

(B) Fotos representativas de una célula registrada de la vía directa [dMSN, estriatonigral (arriba)] y una de la vía indirecta [iMSN, estriatopalidal (abajo)].

(C) Trazos representativos de corrientes postsinápticas para dMSN (rojo) e iMSN (verde).

(D) Amplitud promedio para las dMSN versus iMSN (Wilcoxon test, p=0.0313*).

(E) Amplitud máxima para las células dMSN versus iMSN (Wilcoxon test, p=0.0313*).

(F) Latencia de aparición de las PSC para las células dMSN y iMSN.

Consistente con el análisis de la amplitud promedio, la amplitud máxima mostró la misma diferencia, observando que la corteza M2 inerva con una mayor amplitud a las neuronas de la vía directa (M2→dMSN amplitud máxima=408+/-137 pA versus M2→iMSN =56+/-12 pA, *p<0.05 prueba de Wilcoxon; **Figura 13E**).

La latencia (definida como el tiempo transcurrido entre la aplicación del pulso de luz y el cambio en la amplitud de la corriente registrada con respecto a la basal), no mostró diferencias significativas (M2→dMSN=3.3+/-0.1 ms versus M2→iMSN=3.8+/-0.1 ms, n=6, p>0.05 prueba de Wilcoxon; **Figura 13F**).

8.3 Las conexiones M2→Str son glutamatérgicas

Para verificar que las interacciones sinápticas registradas correspondiesen a conexiones glutamatérgicas (además de que los experimentos fueron hechos en animales Emx1-Cre) en algunos experimentos determinamos el potencial de inversión de las PSC evocadas (**Figura 14 A-B**) y/o utilizamos CNQX, un antagonista de los receptores AMPA de glutamato (**Figura 14 C-E**).

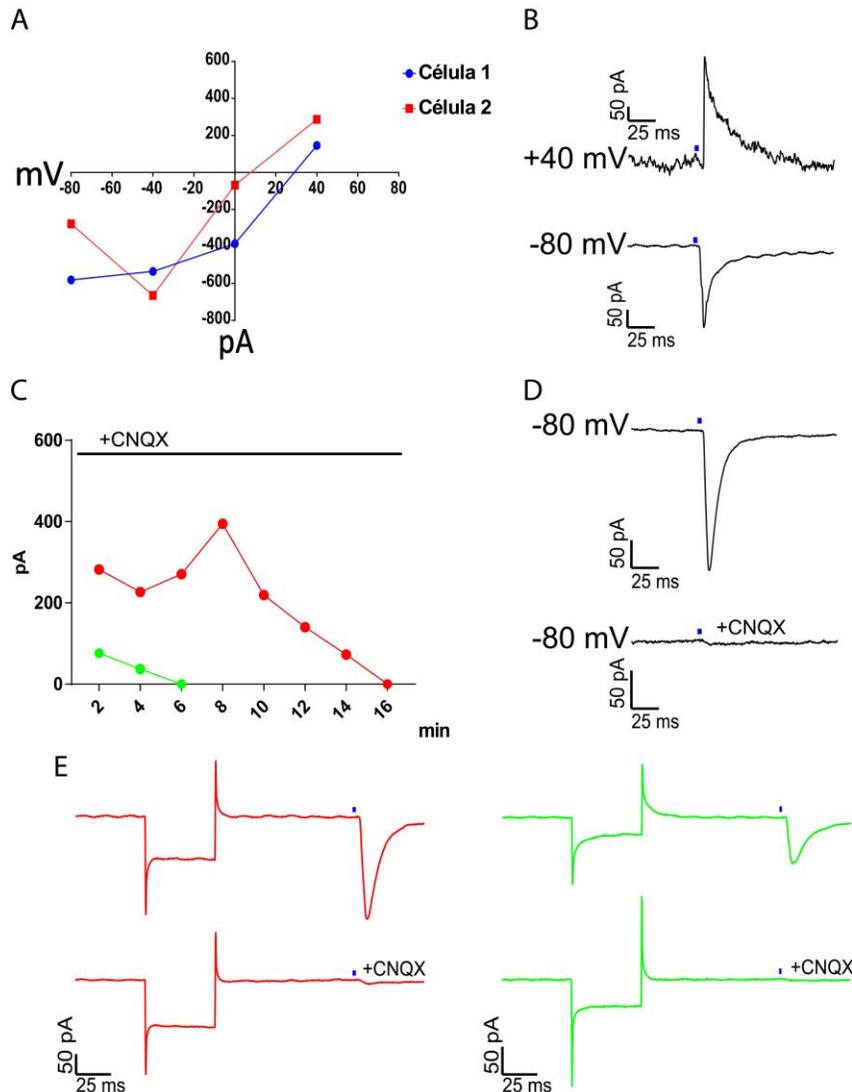


Figura 14. Evidencia de que la transmisión sináptica registrada es glutamatérgica.

(A) Muestra la inversión de las PSC de un par de células registradas al llevar el potencial de mantenimiento de la célula de -80mV a +40 mV.

(B) Ejemplo de las PSC registradas en **A**.

(C) Gráfico que muestra el registro de 2 células a las cuales se les aplico CNQX a lo largo del tiempo del registro (donde 0 marca el momento en el que se comenzó a perfundir CNQX).

(D) Ejemplo un EPSC registrado (arriba) y su bloqueo con CNQX (abajo).

(E) Registros de las células presentadas en **C** y su bloqueo con CNQX.

9. Discusión

De los resultados obtenidos se identificó que 1) las proyecciones corticoestriatales de M2(ChR2)→DLS y de PL(ChR2)→DMS presenta una probabilidad de conectividad similar, 2) que cada grupo de sinapsis tiene particularidades evidenciadas por incrementar la intensidad o el tiempo de pulso de estimulación con luz y 3) las entradas sinápticas provenientes de M2 hacia el DLS son más grandes sobre la vía directa (dMSN) *versus* la vía indirecta (iMSN).

9.1 Similitudes y diferencias de las proyecciones de las cortezas premotora y prelímbica sobre las neuronas del estriado

En el primer experimento comparamos la probabilidad de la conectividad entre la corteza M2→Str (DLS) y PL→Str (DMS) observando una probabilidad similar (**Figura 10**). El análisis de las corrientes postsinápticas evocadas sobre las neuronas estriatales no mostró diferencia en la amplitud promedio (**Figura 11C**) ni en la amplitud máxima (**Figura 11D**). Estos datos plantean un modelo de especialización tanto en la región de inervación al estriado como en la microcircuitería que inervan. Por ejemplo, en trabajos previos se han observado diferencias entre la inervación/contribución de M2→Str y de PL→Str (Wall et al., 2013; Guo et al., 2015), en estos estudios se han caracterizado las entradas de capas específicas de estas cortezas hacia las vías directa e indirecta del estriado, concluyendo que las cortezas M2 y PL contribuyen de manera diferencial entre ellas y también hacia ambas vías de información en el estriado (**Figura 15**). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestros resultados no podrían concluir que la inervación de estas cortezas específicas hacia el Str no es diferencial ya que muestran una tendencia a tener una mayor fuerza de conexión de PL→Str, sin embargo, una explicación a que los análisis estadísticos no hayan mostrado significancia podría ser el número de células registradas por grupo, esto haría imposible que se determinara una similitud de conexión entre las cortezas hacia el Str por lo que se recomendaría aumentar el número de muestras para cada grupo en un siguiente estudio.

Los análisis presentados al comparar la amplitud neta de las corrientes postsinápticas en función de la intensidad de luz no mostraron diferencias intragrupo (**Figura 11 E-F**).

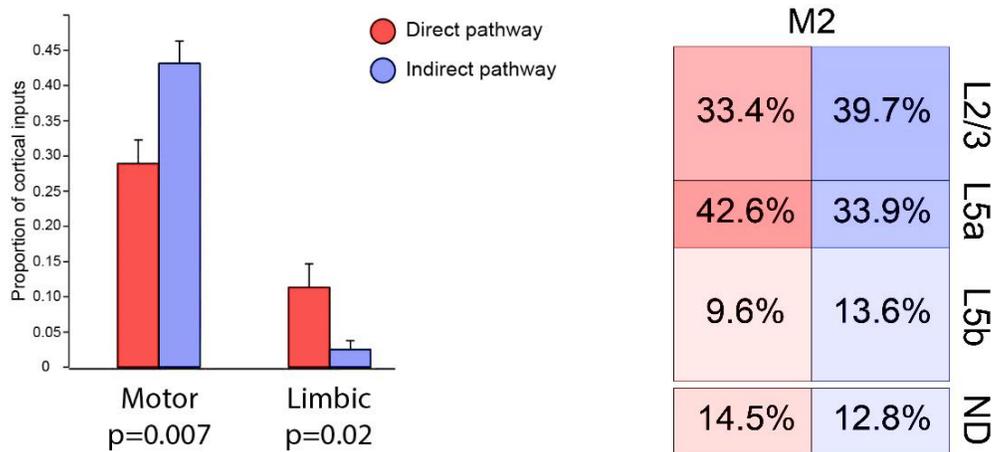


Figura 15. La inervación de las cortezas hacia el estriado es diferencial. Los cuadros en azul muestran la proporción de inervación hacia las iMSN y los cuadros rojos muestran la proporción de inervación hacia las dMSN (tomada de Wall et al., 2013).

9.2 La corteza premotora proyecta preferentemente sobre las neuronas de la vía directa

En el segundo experimento realizado se buscaba la caracterización de las entradas corticales provenientes de la corteza premotora (M2) hacia las neuronas de la vía directa *versus* las de la vía indirecta. Inicialmente se analizó el promedio y la amplitud máximas de las corrientes postsinápticas registradas para ambos tipos celulares (**Figura 13D y 13E**). En ambos casos se realizó un análisis pareado por muestra observando una conexión más fuerte de M2 hacia las neuronas dMSN.

Este hallazgo concuerda con un antecedente anatómico en el que se identificó una mayor inervación de M2 sobre la vía directa, específicamente de la capa 5a (**Figura 15**) (Wall et al., 2013). Sugiriendo que nuestras conexiones registradas M2→Str pueden venir preferentemente de capa 5a.

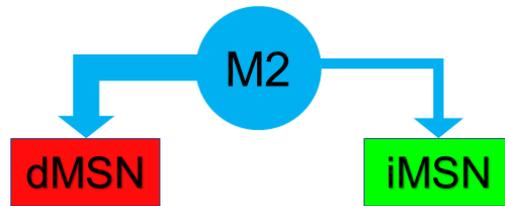


Figura 17. La corteza M2 inerva mayormente sobre las dMSN.

Resumen de los resultados de la comparación de la inervación de M2 hacia las neuronas de la vía directa (dMSN) *versus* las de la vía indirecta (iMSN), el grosor de la flecha hace referencia a la proporción de la inervación.

De igual manera, una tentativa explicación a la entrada diferencial de las dMSN *versus* iMSN podría darse por las características anatómicas de las células de cada vía. Un trabajo publicado previamente sostiene que las dMSN presentan una mayor densidad de ramificaciones dendríticas primarias en comparación con las iMSN, lo que introduce la posibilidad de que las dMSN tengan una mayor capacidad de recibir sinapsis glutamatérgicas que las iMSN (Gertler et al., 2008).

9.3 Relevancia de la inervación preferencial de la corteza premotora (M2) a la vía directa

Canónicamente se ha descrito que la corteza M2 tiene implicaciones en planificación motora, tareas dirigidas a objetivos y aprendizaje (Jin et al., 2014; Tecuapetla et al., 2016; Vicente et al., 2016), por lo que nuestros resultados tienen implicaciones directas a estos postulados. Sabemos que el modelo clásico de los GB propone que la vía directa promueve la generación de movimientos por lo que podríamos inferir que una inervación más fuerte de M2 a las dMSN podría participar en la preparación o planificación del movimiento a realizar y así comenzar a ejecutar una acción. Esta contribución preferencial también podría dar explicación a que la corteza M2 es necesaria para la adquisición de nuevas tareas pero no para tareas ya adquiridas por los animales, por lo que en el aprendizaje una mayor inervación de M2→dMSN también podría ser requerida para el aprendizaje y planeación de tareas nuevas (Rock et al., 2016; Barthas & Kwan, 2017; Chuhma et al., 2018).

Un trabajo publicado previamente ha descrito que esta proyección se modifica en tareas de adquisición y concatenación de acciones secuenciales sugiriendo que la sinapsis de M2→dMSN se fortalece durante el transcurso del entrenamiento conductual y esta sinapsis presenta una activación persistente a medida que se realizan rutinas conductuales (Rothwell et al., 2015). Nuestros hallazgos enfatizan la relevancia de la inervación preferencial de las sinapsis M2→dMSN sobre las funciones atribuidas a las sinapsis provenientes de M2. Sinapsis que se propone sufren alteraciones en patologías del control motor (Berardelli et al., 1999; Day et al., 2006) y/o de la cognición (Graybiel & Rauch, 2000; Foerde et al., 2008; Harrison et al., 2009)

10. Conclusiones

Este trabajo de tesis muestra que las neuronas de proyección corticoestriatal glutamatergica inervan de manera diferencial a las neuronas espinosas medianas dentro del estriado:

1. La proyección glutamatergica de M2 y PL a las MSN no presentan diferencias particulares en su inervación estriatal.
2. Las proyecciones de la corteza M2 presentan una mayor fuerza de conexión sináptica sobre las neuronas de la vía directa versus las de la vía indirecta en el estriado dorsolateral.

Referencias

- Albin, R. L., Young, A. B., Penney, J. B., Roger, L. A., & Young, B. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366–375. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- André, V. M., Fisher, Y. E., & Levine, M. S. (2011). Altered balance of activity in the striatal direct and indirect pathways in mouse models of Huntington's disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(JUNE 2011), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00046>
- Baker, P. M., & Ragozzino, M. E. (2014). Contralateral disconnection of the rat prelimbic cortex and dorsomedial striatum impairs cue-guided behavioral switching. *Learning and Memory*, 21(8), 368–379. <https://doi.org/10.1101/lm.034819.114>
- Barthas, F., & Kwan, A. C. (2017). Secondary Motor Cortex: Where 'Sensory' Meets 'Motor' in the Rodent Frontal Cortex. *Trends in Neurosciences*, 40(3), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.11.006>
- Berardelli, A., Noth, J., Thompson, P. D., Bollen, E. L. E. M., Currà, A., Deuschl, G., Van Dijk, J. G., Töpper, R., Schwarz, M., & Roos, R. A. C. (1999). Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Movement Disorders*, 14(3), 398–403. [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(199905\)14:3<398::AID-MDS1003>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1531-8257(199905)14:3<398::AID-MDS1003>3.0.CO;2-F)
- Bicks, L. K., Koike, H., Akbarian, S., & Morishita, H. (2015). Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. *Frontiers in Psychology*, 6(NOV), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>
- Buchen, L. (2010). Neuroscience: Illuminating the brain. *Nature*, 465(7294), 26–28. <https://doi.org/10.1038/465026a>
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1022–1030. <https://doi.org/10.1038/nn.3743>
- Chuhma, N., Mingote, S., Yetnikoff, L., Kalmbach, A., Ma, T., Ztaou, S., Sienna, A. C., Tepler, S., Poulin, J. F., Ansorge, M., Awatramani, R., Kang, U. J., & Rayport, S. (2018). Dopamine neuron glutamate cotransmission evokes a delayed excitation in lateral dorsal striatal cholinergic interneurons. *ELife*, 7, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.39786>
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2003). The role of prelimbic cortex in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research*, 146(1–2), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.023>
- Cudkovicz, M., & Kowall, N. W. (1990). Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Annals of Neurology*, 27(2), 200–204. <https://doi.org/10.1002/ana.410270217>
- Cummings, D. M., André, V. M., Uzgil, B. O., Gee, S. M., Fisher, Y. E., Cepeda, C., & Levine, M. S. (2009). Alterations in cortical excitation and inhibition in genetic mouse models of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 29(33), 10371–10386. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1592-09.2009>
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C. A., Shering, A. F., Wokosin, D., Iljic, E., Sun, Z., Sampson, A. R., Mugnaini, E., Deutch, A. Y., Sesack, S. R., Arbuthnott, G. W., & Surmeier, D. J. (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nature Neuroscience*, 9(2), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nn1632>
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V)
- Deng, Y. P., Albin, R. L., Penney, J. B., Young, A. B., Anderson, K. D., & Reiner, A. (2004). Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: A quantitative immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 27(3), 143–164. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.02.005>
- Eidelberg, D., & Surmeier, D. J. (2011). Brain networks in Huntington disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(2), 484–492. <https://doi.org/10.1172/JCI45646.484>

- Florio, T. M., Scarnati, E., Rosa, I., Di Censo, D., Ranieri, B., Cimini, A., Galante, A., & Alecci, M. (2018). The Basal Ganglia: More than just a switching device. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *24*(8), 677–684. <https://doi.org/10.1111/cns.12987>
- Foerde, K., Poldrack, R. A., Knowlton, B. J., Sabb, F. W., Bookheimer, S. Y., Bilder, R. M., Guthrie, D., Granholm, E., Nuechterlein, K. H., Marder, S. R., & Asarnow, R. F. (2008). Selective Corticostriatal Dysfunction in Schizophrenia: Examination of Motor and Cognitive Skill Learning. *Neuropsychology*, *22*(1), 100–109. <https://doi.org/10.1037/0894-4105.22.1.100>
- Freeze, B. S., Kravitz, A. V., Hammack, N., Berke, J. D., & Kreitzer, A. C. (2013). Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *Journal of Neuroscience*, *33*(47), 18531–18539. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1278-13.2013>
- Gerfen, C., Engber, T., Mahan, L., Susel, Z., Chase, T., Monsma, F., Sibley, D. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, *250*(1986), 1429–1432. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2147780>
- Gerfen, C. R. (2006). Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, *9*(2), 157–158. <https://doi.org/10.1038/nn0206-157>
- Gertler, T. S., Chan, C. S., & Surmeier, D. J. (2008). Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *Journal of Neuroscience*, *28*(43), 10814–10824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2660-08.2008>
- Gittis, A. H., & Kreitzer, A. C. (2012). Striatal microcircuitry and movement disorders. *Trends in Neurosciences*, *35*(9), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.008>
- Graybiel, A., & Rauch, S. (2000). Toward a Neurobiology of Obsessive-Compulsive Disorder. *Neuron*, *28*, 343–347. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00113-6)
- Gremel, C. M., & Costa, R. M. (2013a). Orbitofrontal and striatal circuits dynamically encode the shift between goal-directed and habitual actions. *Nature Communications*, *4*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms3264>
- Gremel, C. M., & Costa, R. M. (2013b). Premotor cortex is critical for goal-directed actions. *Frontiers in Computational Neuroscience*, *7*(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00110>
- Guo, Q., Wang, D., He, X., Feng, Q., Lin, R., Xu, F., Fu, L., & Luo, M. (2015). Whole-brain mapping of inputs to projection neurons and cholinergic interneurons in the dorsal striatum. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123381>
- Haber, S. N. (2016). Corticostriatal circuitry. *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical, Second Edition*, 1721–1741. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3474-4_135
- Harrison, B. J., Soriano-Mas, C., Pujol, J., Ortiz, H., López-Solà, M., Hernández-Ribas, R., Deus, J., Alonso, P., Yücel, M., Pantelis, C., Menchon, J. M., & Cardoner, N. (2009). Altered corticostriatal functional connectivity in obsessive-compulsive disorder. *Archives of General Psychiatry*, *66*(11), 1189–1200. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.152>
- Häusser, M. (2014). Optogenetics: The age of light. *Nature Methods*, *11*(10), 1012–1014. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3111>
- Häusser, M., & Smith, S. L. (2007). Neuroscience: Controlling neural circuits with light. *Nature*, *446*(7136), 617–619. <https://doi.org/10.1038/446617a>
- 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>
- Jin, X., Tecuapetla, F., & Costa, R. M. (2014). Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nature Neuroscience*, *17*(3), 423–430.

<https://doi.org/10.1038/nn.3632>

- Kiritani, T., Wickersham, I. R., Seung, H. S., & Shepherd, G. M. G. (2012). Hierarchical connectivity and connection-specific dynamics in the corticospinal-corticostriatal microcircuit in mouse motor cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(14), 4992–5001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4759-11.2012>
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, *466*(7306), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kravitz, A. V., Tye, L. D., & Kreitzer, A. C. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience*, *15*(6), 816–818. <https://doi.org/10.1038/nn.3100>
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, *60*(4), 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>
- Kress, G. J., Yamawaki, N., Wokosin, D. L., Wickersham, I. R., Shepherd, G. M. G., & Surmeier, D. J. (2013). Convergent cortical innervation of striatal projection neurons. *Nature Neuroscience*, *16*(6), 665–667. <https://doi.org/10.1038/nn.3397>
- Lanciego, J., Luquin, N. and Obeso, J. (2012). Functional Neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Lara-González, E., Duhne, M., Ávila-Cascajares, F., Cruz, S., & Bargas, J. (2019). Comparison of Actions between L-DOPA and Different Dopamine Agonists in Striatal DA-Depleted Microcircuits In Vitro: Pre-Clinical Insights. *Neuroscience*, *410*, 76–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.058>
- Lee, C. R., Yonk, A. J., Wiskerke, J., Paradiso, K. G., Tepper, J. M., & Margolis, D. J. (2019). Opposing Influence of Sensory and Motor Cortical Input on Striatal Circuitry and Choice Behavior. *Current Biology*, *29*(8), 1313-1323.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.028>
- Lex, B., & Hauber, W. (2010). The role of dopamine in the prelimbic cortex and the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Cerebral Cortex*, *20*(4), 873–883. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp151>
- Li, N., Chen, T. W., Guo, Z. V., Gerfen, C. R., & Svoboda, K. (2015). A motor cortex circuit for motor planning and movement. *Nature*, *519*(7541), 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature14178>
- Nelson, A. B., & Kreitzer, A. C. (2014). Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction. *Annual Review of Neuroscience*, *37*(1), 117–135. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013916>
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross, G. W., Langston, J. W., ... Stoessl, A. J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, *32*(9), 1264–1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>
- Pastrana, E. (2011). Optogenetics: Controlling cell function with light. *Nature Methods*, *8*(1), 24–25. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.323>
- Petreaanu, L., Mao, T., Sternson, S. M., & Svoboda, K. (2009). The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature*, *457*(7233), 1142–1145. <https://doi.org/10.1038/nature07709>
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M. R., & Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(11), 760–772. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>
- Rock, C., Zurita, H., Wilson, C., & Apicella, A. J. (2016). An inhibitory corticostriatal pathway. *ELife*, *5*(MAY2016), 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.15890>

- Rothwell, P. E., Hayton, S. J., Sun, G. L., Fuccillo, M. V., Lim, B. K., & Malenka, R. C. (2015). Input- and Output-Specific Regulation of Serial Order Performance by Corticostriatal Circuits. *Neuron*, *88*(2), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.035>
- Shepherd, G. M. G. (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(4), 278–291. <https://doi.org/10.1038/nrn3469>
- Smedemark-Margulies, N., & Trapani, J. G. (2013). Tools, methods, and applications for optophysiology in neuroscience. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *6*(JUNE), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00018>
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q., & Costa, R. M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell*, *166*(3), 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.032>
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G. P., Mainen, Z. F., & Costa, R. M. (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nature Communications*, *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5315>
- Vicente, A. M., Galvão-Ferreira, P., Tecuapetla, F., & Costa, R. M. (2016). Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies. *Current Biology*, *26*(7), R267–R269. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.036>
- Wall, N. R., DeLaParra, M., Callaway, E. M., & Kreitzer, A. C. (2013). Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron*, *79*(2), 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.014>
- Wichmann, T., & DeLong, M. R. (1996). Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology*, *6*(6), 751–758. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80024-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80024-9)
- Wise, S. P. (1985). The Primate Premotor Cortex: Past, Present, and Preparatory. *Annual Review of Neuroscience*, *8*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.08.030185.000245>
- Yin, H. H. (2010). The sensorimotor striatum is necessary for serial order learning. *Journal of Neuroscience*, *30*(44), 14719–14723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3989-10.2010>
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2004). *Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning*. *19*, 181–189. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.03095.x>
- Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *European Journal of Neuroscience*, *22*, 513–523. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-301-1_4
- Zhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L. E., Tsunoda, S., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle, J., Magnuson, J., Hegemann, P., & Deisseroth, K. (2011). The microbial opsins family of optogenetic tools. *Cell*, *147*(7), 1446–1457. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.004>