



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS CIRCUITOS ESTRIATALES A LA
GENERACIÓN DE COMPORTAMIENTOS COMPULSIVOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

KATHIA ITZEL RAMIREZ ARMENTA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR

Instituto Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Angélica Zepeda Rivera

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. José Bargas Díaz

Instituto de Fisiología Celular

CIUDAD DE MÉXICO. MARZO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Subcircuitos Neuronales adscrito al departamento de Neuropatología Molecular de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través la beca doctoral número: 584044 y de los proyecto con clave: 220412, 2022 y 154039. Además de los donativos por parte del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA), mediante los proyectos: IA200815, IN2266517 y IN203420; el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado y la fundación Marcos Moshinsky.

AGRADECIMIENTOS

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

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

A los miembros del jurado para la obtención del grado, Dr. Ranier Gutiérrez, Dr. Luis Carrillo, Dra. Violeta López Huerta, Dr. Vladimir Orduña y Dr. Francisco Sotres por sus observaciones y comentarios al proyecto.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, por la asesoría técnica y académica brindada durante el desarrollo de los proyectos de maestría y doctorado.

Al Biol. Hector Alatraste, M.C. Anil Verma, Dr. Asai Sánchez y al Dr. Edgar Díaz por la asesoría técnica y la discusión de datos que enriquecieron el desarrollo de este proyecto.

A la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, con especial atención a la Dra. Ruth Rincón y la Dra. Yazmín Ramiro, por el asesoramiento y las facilidades brindadas para la utilización de los equipos a su cargo.

Al personal del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, por el asesoramiento y las facilidades brindadas para la reproducción y mantenimiento de las líneas utilizadas en este proyecto.

Al Taller de Mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo en el mantenimiento y reparación de equipos utilizados durante la realización de este proyecto.

A la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular por las facilidades brindadas para la utilización de los equipos a su cargo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Alteraciones en el Control del Movimiento: Compulsiones	2
Modelos Animales para el Estudio del Fenómeno Compulsivo	3
El Acicalamiento Excesivo como Modelo de Compulsiones	4
Compulsiones y Secuencias de Orden Serial	5
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	7
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	8
General.....	8
Específicos	8
METODOLOGÍA	9
Modelo de Estudio	9
Caracterización Conductual	9
Expresión de Indicadores de Calcio (GCaMP) e Implante de Endoscopios.....	10
Adquisición y Análisis de Eventos de Calcio en Libre Movimiento durante el Acicalamiento	10
Protocolo y Análisis de los Efectos de la Inhibición Optogenética en Campo Abierto	11
Registros Electrofisiológicos	12
Paradigma de Condicionamiento Instrumental de Orden Serial	12
Protocolo de Inhibición Optogenética durante Secuencias en Orden Serial	14
Corroboración Anatómica	14
RESULTADOS	15
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN ESTRIATAL A LA GENERACIÓN DE CONDUCTAS COMPULSIVAS EN EL MODELO DE ACICALAMIENTO EXCESIVO: Sapap3 KO	15
Los sujetos Sapap3 KO presentan acicalamiento excesivo y locomoción decrementada.....	15
Los sujetos Sapap3 KO muestran una mayor frecuencia de eventos de menor amplitud en células estriatales.	16
La proporción de células estriatales relacionadas con la conducta de acicalamiento esta incrementada en el ratón Sapap3 KO.	18
La inhibición estriatal incrementa el fenotipo de acicalamiento en el modelo de compulsiones: Sapap3-KO	21

La inhibición específica de las neuronas de la vía indirecta reduce el acicalamiento excesivo en el modelo Sapap3 KO	24
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN ESTRIATAL SOBRE EL APRENDIZAJE Y EJECUCIÓN DE CADENAS DE SECUENCIAS DE ACCIONES EN MODELO DE COMPULSIONES: SAPAP3 KO	26
Los sujetos deficientes de la proteína Sapap3 presentan un déficit en el aprendizaje de secuencias de orden serial.....	27
Los sujetos Sapap3 KO alteran el orden serial de la cadena al interrumpir las secuencias individuales.	29
La inhibición de la actividad estriatal corrige los déficits observados en el aprendizaje de secuencias de orden serial guiadas por retracción.....	34
La inhibición estriatal general durante el aprendizaje de secuencias autoiniciadas reduce la presentación consecutiva de errores, mientras que la inhibición de la vía estriato-palidal reduce el desempeño general de los animales Sapap3 KO.	39
Inhibición de la actividad estriatal y vía específica de los animales Sapap3 KO durante la ejecución de secuencias de orden serial: Protocolos Tardíos.....	42
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Los sujetos Sapap3 KO muestran grooming excesivo y locomoción decrementada.....	16
Figura 2. Los sujetos Sapap3 KO presentan eventos de calcio de menor amplitud	17
Figura 3. La proporción de neuronas estriatales asociadas a la conducta de acicalamiento esta incrementada en los sujetos Sapap3 KO.....	27
Figura 4. Verificación electrofisiológica del protocolo de inhibición optogenética en el modelo Sapap3 KO	29
Figura 5. Inhibición de la actividad estriatal incrementa la conducta de acicalamiento en ratones Sapap3 KO	30
Figura 6. Inhibición específica de las neuronas de la vía indirecta reduce el acicalamiento excesivo en el ratón Sapap3 KO.....	32
Figura 7. Los sujetos Sapap3-KO presentan un déficit en el aprendizaje de secuencias de acciones en orden serial	35
Figura 8. Los sujetos Sapap3 KO interrumpen la ejecución de cadenas de secuencias de orden serial.....	37
Figura 9. Los sujetos Sapap3 KO presentan un deficit en el aprendizaje y ejecución de secuencias guiadas por retracción y autoiniciadas	40
Figura 10. La inhibición optogenética estriatal corrige los déficits observados durante el aprendizaje de secuencias motoras en serie	44
Figura 11. La inhibición de la vía indirecta afecta el aprendizaje de secuencias autoiniciadas.....	48
Figura 12. Inhibición estriatal durante la ejecución de secuencias guiadas por retracción: Protocolo Tardío	45
Figura 13. Inhibición estriatal durante la ejecución de secuencias autoiniciadas: Protocolo Tardío	54

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización del Decaimiento y Amplitudes de la Señal de Calcio	64
Anexo 2. Actividad Estriatal durante el inicio del acicalamiento excluyendo eventos sobrelapados	65
Anexo 3. Caracterización Conductual por Sesión Individual durante el Aprendizaje de Secuencias Guiadas por Retracción	66
Anexo 4. Caracterización Conductual por Sesión Individual durante el Entrenamiento Intercalado de Secuencias Guiadas por Retracción y Autoiniciadas	68
Anexo 5. Representación de la posición anatómica de las fibras ópticas utilizadas en la manipulación vía específica	68
Anexo 6. Carátula Artículo I: Optogenetic inhibition of indirect pathway neurons in the dorsomedial striatum reduces excessive grooming in Sapap3 KO mice.....	69
Anexo 7. Carátula Artículo II: The contribution of Premotor Cortical-Striatal Projections to the Execution of Serial Order Sequences	70
Anexo 8. Carátula Artículo III: Contribution of Striatal Circuits to Learning of Serial Order Sequences in the Sapap3 KO mice	71

LISTA DE ABREVIATURAS

A2a Cre	Línea transgénica de ratón para la expresión específica de la enzima Cre bajo el promotor del Receptor a Adenosina Tipo 2
AAV1	Virus Adeno-asociado (por sus siglas en inglés: <i>Adeno-associated virus</i>) Serotipo 1
AAV2	Virus Adeno-asociado Serotipo 2
AAV5	Virus Adeno-asociado Serotipo 5
ACC	Corteza Cingulada Anterior
AP	Anteroposterior
Arch	Arqueo-rodopsina
Cx-Str-Th	Circuitos Cortico-Estriatal-Talámico
D1 Cre	Línea transgénica de ratón para la expresión específica de la enzima Cre bajo el promotor del Receptor a Dopamina Tipo 1.
D2	Receptor a Dopamina Tipo 2
DAT-KD	Línea transgénica de ratón con supresión de los genes para el Transportador a Dopamina (por sus siglas en inglés: <i>Dopamine-transporter knockdown</i>)
DIO	Sistema de Marco de Lectura Abierto Inverso Doblemente Floxeado (por sus siglas en inglés: <i>double-floxed inverse open reading frame</i>)
Dlgap	Proteína Asociada a Discos (por sus siglas en inglés: <i>disks large-associated protein</i>)
DV	Dorsoventral
eYFP	Proteína Fluorescente Amarilla (por sus siglas en inglés: <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
GCampP	Indicador de calcio genéticamente codificado.
Gkap	Proteína Asociada a Guanilato Kinasa (por sus siglas en inglés: <i>guanylate kinase-associated protein</i>)
GS	Serie de Acicalamiento (por sus siglas en inglés: <i>grooming series</i>).
5-HT2c	Receptor a Serotonina tipo 2C
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina.
M1	Corteza Motora Primaria
M2	Corteza Motora Secundaria o Premotora
mGluR5	Receptor Metabotrópico a Glutamato Tipo 5
ML	Mediolateral
MSN	Neuronas Espinosas Medianas (por sus siglas en inglés: <i>Medium Spiny Neurons</i>).
OCD/TOC	Trastorno Obsesivo Compulsivo
OFC	Corteza Orbitofrontal
IOFC	Corteza Orbitofrontal Lateral
Sapap3	Proteína Asociada a Proteína Asociada a Sinapsis 90-Isoforma 3 (por sus siglas en inglés: <i>Synapse-Associated Protein 90-Associated Protein</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central

RESUMEN

El control del movimiento se ha relacionado principalmente con la actividad de los circuitos cortico-estriatales-talámicos. Alteraciones en los patrones de actividad de estos núcleos se asocian a deficiencias en la capacidad de los individuos para iniciar, ejecutar y transitar entre programas motores secuenciales. Las compulsiones son un ejemplo de alteraciones en el control de conductas motoras y son definidas como una serie de acciones que el individuo repite de manera estereotipada a pesar de las consecuencias negativas. Estas son un rasgo característico de pacientes diagnosticados con trastorno obsesivo compulsivo (OCD). Para el estudio de este fenómeno se ha propuesto al ratón Sapap3 KO que presenta conductas de acicalamiento compulsivo y respuesta a fármacos utilizados en la terapéutica del OCD.

Estudios previos en el modelo de compulsiones Sapap3 KO han sugerido que detrás de la generación de complejas secuencias de movimientos repetitivas se encuentran alteraciones en la actividad cortico-estriatal. Por lo tanto, el presente proyecto se enfocó a estudiar la contribución específica de los circuitos estriatales al desarrollo y control de conductas secuenciales compulsivas a través de dos capítulos principales. El primero de ellos, a través de imagenología de calcio en libre movimiento, evidenció un incremento del número de neuronas moduladas durante el acicalamiento excesivo en estos sujetos. Contrario a lo esperado, la inhibición optogenética de la actividad estriatal general incrementó la aparición de episodios compulsivos. Además, y por primera vez, se demostró que la inhibición optogenética específica de la vía estriato-palidal reduce el fenotipo compulsivo en el ratón Sapap3 KO. El capítulo dos, se centró en el estudio de la contribución estriatal al aprendizaje y ejecución de secuencias seriadas. Primeramente, se diseñó y estandarizó un programa de entrenamiento que permitiera, en su etapa final, el estudio de la estructuración y ejecución de secuencias en serie. Posteriormente, se evidenció que los sujetos Sapap3 KO presentan un déficit en el aprendizaje de secuencias de orden serial, caracterizado por la terminación anticipada de la serie. Este fenotipo es revertido por la inhibición optogenética estriatal y vía específica (estriato-palidal). De igual manera, se documentó que este modelo presenta alteraciones en los mecanismos de aprendizaje por reforzamiento positivo/castigo que pueden ser aminorados tras la inhibición estriatal general.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una hiperactividad estriatal durante la generación de compulsiones y proponen al circuito estriato-palidal como un nodo para la regulación de conductas compulsivas en el modelo Sapap3 KO.

INTRODUCCIÓN

La selección de acciones, así como el aprendizaje y el control motor son elementos clave para la sobrevivencia de los organismos. El desarrollo de acciones secuenciales se ha relacionado con la participación activa de los circuitos cortico-estriatales-talámicos (Cx-Str-Th) (Barnes et al., 2005; Cui et al., 2014; DeLong, 1990; Díaz-Hernández et al., 2018; Mushiake et al., 1990). Las compulsiones son un ejemplo de los déficits en el control de conductas secuenciales y son definidas como una serie de acciones que el individuo repite de manera estereotipada a pesar de las consecuencias negativas. Estas se presentan en un amplio grupo de desórdenes del Sistema Nervioso Central (SNC) y son un rasgo característico de pacientes diagnosticados con trastorno obsesivo compulsivo (OCD)(American Psychiatric Association, 2013).

Estudios en pacientes con OCD han reportado alteraciones morfológicas en el circuito Cx-Str-Th e hiperactividad en estas regiones durante paradigmas de provocación sintomática (J. Y. Rotge et al., 2009; Shaw et al., 2015). Estas alteraciones sugieren su participación clave en la generación y regulación de conductas compulsivas. En los últimos años, se han desarrollado una serie de modelos animales para estudiar la fisiopatología que subyace este tipo de comportamientos (Greer & Capecchi, 2002; Shmelkov et al., 2010; Welch et al., 2007). El modelo de ratón Sapap3 KO presenta una delección constitutiva de la proteína asociada a Sap90/PSD95 tipo 3 (Dlgap, Sapap3 o Gkap), la cual participa de manera indirecta en el anclaje de receptores glutamatérgicos en membranas postsinápticas. Esta proteína se encuentra particularmente expresada en el estriado y la deficiencia constitutiva de ella se ha asociado a un fenotipo de acicalamiento excesivo que genera lesiones en los animales (Welch et al., 2004, 2007). La reconstitución estriatal de esta isoforma o el tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, como la fluoxetina, reduce el fenotipo compulsivo (Burguière et al., 2013; Mahgoub et al., 2016; Welch et al., 2007).

Por tanto, este proyecto fue dividido en dos capítulos: El primero buscó explorar, a partir de la conducta de acicalamiento excesivo, la contribución de las neuronas estriatales a la generación de compulsiones en el modelo Sapap3 KO. Examinamos la actividad neuronal durante el comportamiento de acicalamiento mediante imagenología de calcio en ratones en libre movimiento. Además, probamos los efectos de la inhibición optogenética de las neuronas estriatales y vía específica sobre el fenotipo de acicalamiento. El segundo capítulo evaluó los déficits en la ejecución de secuencias de orden serial en el modelo de compulsiones Sapap3 KO y cómo la manipulación optogenética de las neuronas estriatales en este modelo afecta el aprendizaje y ejecución de secuencias en serie.

ANTECEDENTES

Alteraciones en el Control del Movimiento: Compulsiones

En los individuos, la generación de patrones de movimiento es un mecanismo de gran importancia para asegurar su supervivencia. Desórdenes asociados al control del movimiento voluntario se han relacionado principalmente con alteraciones en los patrones normales de actividad de los circuitos cortico-estriato-talámicos (Albin et al., 1989; Barnes et al., 2005; Cui et al., 2014; DeLong, 1990; Díaz-Hernández et al., 2018; Mushiake et al., 1990). Un ejemplo particular de alteraciones en la generación y control de patrones de movimiento es el fenómeno de las compulsiones.

Las compulsiones se definen como conductas repetitivas que los individuos se sienten impulsados a realizar a pesar de las consecuencias negativas, pudiendo ser en respuesta a una obsesión o de acuerdo con asociaciones que deben aplicarse de manera rígida (American Psychiatric Association, 2013). Sin embargo, se ha sugerido que estas conductas frecuentemente son realizadas sin una razón identificable y sin resistencia (Denys, 2014; Starcevic et al., 2011). Este fenómeno consume una gran cantidad de tiempo (por ejemplo, más de una hora al día), afecta la calidad de vida del sujeto y causa un deterioro clínicamente significativo en áreas sociales u ocupacionales. Además, no son atribuibles a los efectos fisiológicos de una sustancia (American Psychiatric Association, 2013).

Las compulsiones son un rasgo característico de varios trastornos y es distintivo de los pacientes diagnosticados con trastorno obsesivo compulsivo (TOC) (American Psychiatric Association, 2013; Fava et al., 2014). Tradicionalmente, estas se han clasificado en diversos tipos de acuerdo con la naturaleza de las acciones realizadas y se han definido 6 distintas dimensiones: 1) Agresión/Revisión-Comprobación, 2) Compulsiones Sexuales, Morales o Religiosas, 3) Simetría/Orden/Contabilización, 4) Limpieza/Descontaminación, 5) Acumulación y, 6) Otros, como necesidad de tocar superficies y rituales alimentarios (Goodman et al., 1989). La heterogeneidad de las conductas compulsivas se ha relacionado con diversos factores como variaciones genéticas, exposición ambiental, sexo, estado fisiológico, entre otros (Mitra & Bult-Ito, 2021).

Estudios de resonancia magnética en pacientes con TOC, han reportado alteraciones morfológicas importantes, particularmente, incremento en la superficie de los núcleos caudado y lenticular, así como de cortes prefrontales y de áreas talámicas; se ha sugerido que dichas alteraciones morfológicas correlacionan con la intensidad de los síntomas

compulsivos (Radua et al., 2010; J. Y. Rotge et al., 2009; Shaw et al., 2015). Así mismo, durante esquemas de provocación sintomática en estudios de resonancia magnética funcional, se han demostrado alteraciones en los patrones de actividad de regiones como la corteza orbitofrontal, insular, anterior del cíngulo, los ganglios basales y la amígdala en pacientes con trastorno obsesivo compulsivo (Breiter & Rauch, 1996; J.-Y. Rotge et al., 2008). En línea con lo anterior, se ha observado que la hiperactivación de la corteza insular y del núcleo lenticular es reducida en algunos pacientes tras el tratamiento (Lázaro et al., 2008). Estas alteraciones sugieren un papel clave de los circuitos cortico-estriatal-talámicos en la generación y regulación de conductas compulsivas.

Modelos Animales para el Estudio del Fenómeno Compulsivo

Se han utilizado modelos animales de TOC para comprender la fisiología que subyace a las conductas compulsivas, a menudo mediante la cuantificación de diversas conductas innatas o inducidas como el enterramiento, la excavación, el escalamiento, la masticación y/o el acicalamiento excesivo; estos modelos pueden clasificarse según su origen, ya sea genético o farmacológico (Alonso et al., 2015). Como ejemplo de los modelos de origen genético se encuentran: el ratón *Hoxb8lox*, con mutaciones sin sentido en los genes del desarrollo *Hoxb8* (Greer & Capecchi, 2002); el ratón *5-HT2c*, que presenta la delección del gen que codifica para el receptor de serotonina 2C (Chou-Green et al., 2003); y el ratón *DAT-KD*, con una expresión reducida del transportador presináptico de dopamina (Berridge et al., 2005).

Se ha sugerido que para denominar modelo de un fenómeno de interés, los sujetos deben presentar síntomas análogos a aquellos observados en la enfermedad/fenómeno que se pretende modelar (validez aparente), además los tratamientos efectivos en la patología modelada deben de reducir dichos síntomas en el animal (validez predictiva); por último las regiones anatómicas así como mecanismos involucrados detrás de los síntomas en el modelo deben de ser similares a aquellos responsables en pacientes humanos con la enfermedad (validez de constructo) (Alonso et al., 2015; McKinney & Bunney, 1969). Uno de los modelos animales que recrea el fenómeno de compulsiones cumpliendo los tres criterios antes mencionados es el modelo *Sapap3 KO* (Welch et al., 2007).

Los ratones *Sapap3-KO* presentan una delección constitutiva de la proteína 3 asociada a *Sap90 / Psd95* (*Dlgap3* o *Gkap*). Esta proteína participa indirectamente en la asociación de receptores glutamatérgicos en la membrana postsináptica (Takeuchi et al., 1997; Welch et al., 2004). La expresión de *Sapap3* se encuentra en varias regiones del cerebro como la

neocorteza, el hipocampo, el cerebelo y el cuerpo estriado; la mayor expresión de esta proteína se encuentra en este último (Welch et al., 2004). Los ratones que carecen de esta proteína presentan un acicalamiento excesivo que genera lesiones en la cara y el cuerpo de estos sujetos (validez aparente). El fenotipo compulsivo se reduce cuando Sapap3 se reconstituye en el cuerpo estriado o cuando los sujetos reciben tratamiento con fluoxetina (validez predictiva) (Burguière et al., 2013; Mahgoub et al., 2016; Welch et al., 2007). Además, estudios recientes han demostrado alteraciones en la actividad cortico-estriatal *in vitro* y durante la expresión del acicalamiento en este modelo (validez de constructo) (Burguière et al., 2013; Corbit et al., 2019; Hadjas et al., 2020; Ramírez-Armenta et al., 2021). La relación entre las alteraciones en la actividad neuronal y la presentación del acicalamiento excesivo como fenotipo compulsivo se detalla en el siguiente segmento.

El Acicalamiento Excesivo como Modelo de Compulsiones

La evidencia experimental ha demostrado, desde hace varias décadas, que el comportamiento innato de acicalamiento observado en roedores está representado en la actividad estriatal. Se ha demostrado que las neuronas estriatales incrementan su tasa de disparo durante la secuencia de acicalamiento y son sensibles a la fase de la secuencia que se ejecuta (Aldridge et al., 2004; Berridge & Whishaw, 1992). Entonces, el acicalamiento, conducta innata y habitual en los roedores, se transforma en excesiva y perjudicial en los sujetos Sapap3 KO, lo que nos permite vincularlo a la definición operacional del fenómeno compulsivo: comportamiento repetitivo, estereotipado y funcionalmente perjudicial para quien lo ejecuta. Además, al ser representado por la actividad de las neuronas estriatales de manera innata, sugiere que esta transición al fenómeno compulsivo se encuentra relacionada con la actividad de este núcleo y las aferencias que lo inervan.

En relación con las alteraciones en la actividad de circuitos cortico-estriatales y la generación de fenotipos compulsivos, estudios anteriores han demostrado que la activación optogenética repetida de las entradas de la corteza orbitofrontal (OFC) al cuerpo estriado específicamente, genera episodios de acicalamiento excesivo en ratones silvestres (Ahmari et al., 2013). Además, se ha sugerido que una reducción en la actividad estriatal, inducida por la activación de entradas corticales específicas, reduce el fenotipo de acicalamiento excesivo observado en el modelo Sapap3-KO durante la presentación de un estímulo condicionado (Burguière et al., 2013).

Estudios con registros electrofisiológicos *in-vitro* en el modelo de compulsiones Sapap3 KO, han demostrado alteraciones en la fuerza sináptica (incrementada o deprimida) de las entradas del cíngulo anterior (ACC), OFC, de la corteza motora (M1) y premotora (M2) hacia al estriado (Corbit et al., 2019; Hadjas et al., 2020). Además se sugiere un desbalance en la actividad de los subcircuitos estriatales tras la estimulación eléctrica *in-vitro* en el modelo Sapap3 KO (Ade et al., 2016). Algunos autores explican este desequilibrio por alteraciones en la señalización del receptor mGluR5 (Ade et al., 2016; Glorie et al., 2020), altamente expresado en el cuerpo estriado (Conn et al., 2005; Ferré et al., 2002). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que las alteraciones en los patrones de actividad estriatal contribuyen a la generación de episodios compulsivos y, que estos pueden ser estudiados a través de la conducta de acicalamiento excesivo.

Compulsiones y Secuencias de Orden Serial

Se ha sugerido que las alteraciones en los circuitos cortico-estriatales están involucradas en la generación de complejas secuencias repetitivas de movimientos observadas en pacientes con trastorno obsesivo compulsivo (Graybiel & Rauch, 2000; Laplane et al., 1989). En línea con lo anterior, se ha propuesto que el fenómeno compulsivo resultaría de una disrupción de la actividad supresora de regiones prefrontales (particularmente de la corteza orbitofrontal) y de la función de “filtrado” del núcleo estriado. La consecuencia sería la ejecución autosostenida y reverberante de secuencias motoras automáticas (Baxter et al., 1987, 1992; S R Chamberlain et al., 2005).

Por otra parte, se ha establecido que para generar un patrón secuencial se requiere la imposición de un esquema general que, a pesar de un amplio rango y variedad de elementos, determina la secuencia de actos específicos (Lashley, 1951). Lesiones en la corteza orbitofrontal medial afectan la habilidad de seleccionar las acciones más adecuadas cuando se comparan consecuencias diferencialmente valuadas (Wood & Ahmari, 2015), lo que sugiere una participación clave de esta región en los procesos de selección de acciones basados en las consecuencias. Además, estudios previos han observado que la corteza prefrontal muestra una activación co-temporal con todos los segmentos de una secuencia, y la fuerza de representación de un segmento dado es específica a su posición en la cadena de ejecución (Averbeck et al., 2002; Fujii & Graybiel, 2003; Sakamoto et al., 2020).

Con respecto a la contribución de las cortezas motoras a la ejecución de secuencias motoras, se ha reportado que la corteza motora suplementaria participa en el desempeño de secuencias específicas de movimientos, sugiriendo que las neuronas de la corteza premotora participan de manera específica y diferencial en secuencias guiadas visualmente con respecto a aquellas que deben realizarse sin una guía sensorial (Mushiake et al. 1990; Mushiake et al. 1991). Adicionalmente, las neuronas de la corteza motora suplementaria se activan durante secuencias con movimientos en un orden específico, lo que pareciera indicar que estas células contribuyen a la planeación y codificación de múltiples movimientos futuros (Tanji & Shima 1994).

Por último, la secuencia de acicalamiento se ha descrito como una secuencia de orden serial que los individuos realizan de manera habitual (Berridge & Whishaw, 1992). Se ha demostrado que el estriado está implicado en la secuenciación y ejecución de la conducta de acicalamiento, particularmente es necesario para la implementación del patrón en el desarrollo de dicha conducta. Esta estructura cuenta con dos subcircuitos principales de salida de información denominados: vía directa o estriato-nigral y vía indirecta o estriato-palidal (DeLong, 1990; Gerfen, 1984). Se ha documentado que estas poblaciones neuronales interactúan de manera particular en la regulación de la actividad motora (Cui et al., 2014; Freeze et al., 2013; Jin et al., 2014; Kravitz et al., 2010). De manera general, se ha propuesto que lesiones en el estriado dorsal producen déficits en el correcto desarrollo de la sintaxis de la conducta de acicalamiento en rata (Aldridge & Berridge, 1998; Cromwell & Berridge, 1996). Lo que sugeriría que en los animales Sapap3 KO que muestran alteraciones en los patrones de actividad estriatal durante la conducta de acicalamiento pudieran presentar alteraciones en el aprendizaje y ejecución de otro tipo de conductas de orden serial.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la contribución específica de los circuitos estriatales a la generación de conductas compulsivas?

HIPÓTESIS

La actividad de las vías estriatales está alterada en animales compulsivos en comparación con animales control. Específicamente, la actividad de la vía directa requerida para la apropiada transición y terminación de acciones se encuentra incrementada.

Las vías estriatales tienen una contribución específica durante la realización de secuencias, específicamente la vía directa permite el inicio y el mantenimiento del programa motor mientras que la vía indirecta permite la apropiada supresión de acciones necesarias para seleccionar una acción. La desregulación de estos mecanismos propicia la generación de las conductas compulsivas.

OBJETIVOS

General

Estudiar la contribución vía específica de los ganglios basales a la generación de conductas compulsivas en un modelo de compulsiones y compararlo contra animales control.

Específicos

- Establecer la línea transgénica Sapap3 KO y verificar su fenotipo compulsivo.
- Registrar la actividad estriatal durante la generación de conductas compulsivas en el modelo Sapap3 KO.
- Manipular optogenéticamente la actividad estriatal y vía específica, de los sujetos Sapap3 KO para evaluar sus efectos sobre el fenotipo compulsivo.
- Implementar un paradigma conductual de orden serial para evaluar posibles déficits en el aprendizaje de secuencias motoras.
- Manipular optogenéticamente la actividad estriatal y vía específica para restablecer déficits observados en el modelo Sapap3 KO durante el aprendizaje de un paradigma de orden serial.

METODOLOGÍA

Modelo de Estudio

El estudio de la fisiología que subyace las conductas compulsivas se ha basado en la utilización de modelos animales, frecuentemente a través del análisis del fenotipo de acicalamiento excesivo. En este proyecto se utilizó el modelo Sapap3 KO que presenta conductas de acicalamiento excesivo y fue adquirido de los laboratorios Jackson (B6.129-Dgap3tm1Gfng/J, Stock No: 008733). Se utilizaron ratones hembra y macho de entre 8 y 12 semanas de edad, de los genotipos Sapap3 KO y Sapap3 +/- con fondo génico C57BL/6J. Para el estudio de la actividad estriatal vía específica se generaron ratones dobles transgénicos A2a-Cre Sapap3 KO (Vía Estriato-Palidal / Vía Indirecta) y D1 Cre Sapap3 KO (Vía Estriato-Nigral / Vía Directa) derivados de la cruce de sujetos Sapap3 KO y Sapap3 +/- con animales de las líneas A2a Cre y D1 Cre por al menos 6 generaciones.

Los animales se mantuvieron en cajas individuales en ciclos de 12h luz/oscuridad con acceso ad libitum a agua y comida hasta el inicio de los experimentos. Todos los procedimientos se realizaron en conformidad con la norma oficial (NOM-062-ZOO-1999) y aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (Protocolo: FTA121-17).

Caracterización Conductual

Los sujetos fueron introducidos en una arena de campo abierto (40x 40 x 30 cm) y grabados desde la vista superior a una tasa de 75 cuadros por segundo, por un periodo máximo de 30 min. Los episodios de acicalamiento fueron determinados manualmente por un observador experto y se definieron desde el momento en que el sujeto levanta una o algunas extremidades para posteriormente iniciar cualquiera de las fases de acicalamiento descrito por Aldridge y colaboradores (Aldridge & Berridge, 1998) hasta el momento en que estas hacen contacto con el suelo. La probabilidad de ocurrencia fue estimada en un periodo de 15 segundos compuesto por tres periodos de 5 segundos (como se describe en la sección de inhibición optogenética). Cada periodo fue dividido en ventanas de 1 segundo y se determinó de manera binaria si, en estas, había o no eventos de acicalamiento. Posteriormente se determinó la probabilidad de ocurrencia por segundo por grupo.

El desplazamiento horizontal fue determinado primeramente, mediante el seguimiento e identificación de las coordenadas del punto central del cuerpo del ratón utilizando el software Bonsai (Lopes et al., 2015). Posteriormente, el desplazamiento fue definido como

la suma de distancias euclidianas de la posición del centroide entre cuadros de video. El movimiento generado durante los episodios de acicalamiento y extensión fue sustraído para solo cuantificar la distancia derivada de la actividad locomotriz.

Expresión de Indicadores de Calcio (GCaMP) e Implante de Endoscopios

Los sujetos Sapap3 KO y Sapap3 +/- fueron anestesiados utilizando isoflurano al 1-2% antes de remover una región del cráneo de ~ 0.5 mm x 0.5 mm para permitir la inyección viral. Se administraron 600 nL del indicador de calcio GCaMP6s (AAV1.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40 (Addgene#100845-AAV1), Titter: $>10^{13}$ vg/mL, dilución 1:8) en el estriado dorsomedial (Coordenadas desde Bregma (mm), AP: 0.3; ML: 1.8; DV: 2.3-2.6). La inyección se llevó a cabo a través de pipetas de vidrio acopladas a un sistema de inyección en pulsos de 9.2 nL cada 5s (Nanoject II, Drummond Scientific). Una semana después de la infección viral, un endoscopio (Lens Probe, 0.5 mm de diámetro, -8.4 mm, Q<0.25, Inscopix) fue implantado 100 micras arriba del sitio de inyección y fue fijado al cráneo con resina acrílica (Lang Dental Manufacturing, Co.). Dos a tres semanas posteriores a la infección, la base metálica para acoplar el microscopio miniatura fue implantada, adecuando la distancia necesaria para obtener una imagen en foco.

Adquisición y Análisis de Eventos de Calcio en Libre Movimiento durante el Acicalamiento

Tres días después del implante de la base metálica para el acople del microscopio miniatura, los sujetos fueron habituados al experimentador por 2 a 7 días (15-40 min/día). La adquisición de la señal de calcio fue llevada a cabo a través de un microscopio miniatura de campo fluorescente (Miniscope, Labmaker UG) en libre movimiento a 10 cuadros por segundo (Sesiones de 31 ± 1.8 min por 2.9 ± 0.4 días consecutivos). Los eventos de acicalamiento fueron determinados de manera manual utilizando videos grabados desde una vista inferior a 40 cuadros por segundo en una arena acrílica transparente (20 cm x 30 cm x 25 cm). La alineación de los eventos de acicalamiento con respecto a la señal de calcio se realizó por la identificación del cuadro más cercano de la señal de calcio con respecto al inicio de los eventos (Máximo error de alineamiento: 50ms ($0.55 \text{ ms} \pm 0.09$)).

Los videos extraídos del miniscope fueron corregidos por movimiento utilizando el plugin TurboReg-ImageJ. Las regiones de interés fueron asignadas utilizando el algoritmo Minipipe reportado por Lu y colaboradores (Lu et al., 2018). Las señales de cambio de fluorescencia fueron transformadas en actividad neuronal deconvolucionada utilizando el método "*constrained-foops*" (Pnevmatikakis et al., 2016). Para evaluar si existían diferencias en la actividad estriatal, se analizaron las amplitudes de los picos y los eventos

acumulados de las señales deconvolucionadas utilizando la función “*findpeaks*” de MatLab. Para evaluar la actividad estriatal relacionada con la conducta de acicalamiento, el z-score fue alineado al inicio de los eventos de acicalamiento. Para definir una célula modulada, se calculó la media del periodo basal (-6 a -2s antes del inicio) y del periodo de interés (0-4 sec) para cada evento y, posteriormente se aplicó una prueba pareada Wilcoxon. La pendiente de los datos fue utilizada para definir una célula como positiva o negativamente modulada. La actividad de una serie de grooming (definidas como eventos de acicalamiento consecutivos con un intervalo menor a 3 s) fue comparada entre grupos comparada por serie y la frecuencia media fue reportada.

Expresión de Opsinas para Inhibición Optogenética

Los sujetos fueron anestesiados utilizando isoflurano al 1-2% antes de remover dos regiones del cráneo de ~ 0.5 mm x 0.5 mm para permitir la inyección viral. Se administraron 500 nL de la opsina inhibitoria Arch3.0 (AAV5-hSyn-eArch3.0-eYFP o AAV5-hSyn-eYFP, titter >10¹²; AAV5-EF1a-DIO-eArch3.0-eYFP o AAV2-EF1a-DIO-eArch3.0-eYFP, titter: >10¹² vg/mL, UNC Vector Core) en el estriado dorsomedial (Coordenadas desde Bregma (mm), AP: 0.5; ML: 1.8; DV: 2.1). La inyección se llevó a cabo de manera bilateral a través de pipetas de vidrio acopladas un sistema de inyección en pulsos de 9.2 nL cada 5s (Nanoject II, Drummond Scientific). Posteriormente, se implantaron fibras ópticas (300 µm, ~3.0 mm de longitud) 100 micras sobre los sitios de inyección y fueron fijadas al cráneo utilizando resina acrílica (Lang Dental Manufacturing, Co.).

Protocolo y Análisis de los Efectos de la Inhibición Optogenética en Campo Abierto

Para evaluar los efectos de la inhibición optogenética durante el grooming y la actividad locomotriz, los sujetos fueron colocados en una arena de campo abierto (40 cm x 40 cm x 30 cm) y un pulso de luz continua de 5 s fue aplicado cada 35 s (18-20 mW, 500 nm, 15 pulsos). El periodo de inhibición fue dividido en ventanas de un segundo donde de manera binaria se asignó si existía o no eventos de acicalamiento. La suma de ventanas de acicalamiento fue determinada para el periodo de 5 s previo, durante la inhibición y 5 s después. La media de cada periodo fue reportada para cada animal. La probabilidad de ocurrencia fue estimada por segundo a lo largo del periodo de 15 s (abarcando periodo basal, inhibición, posterior). Esta medición fue normalizada a los 5 s antes del inicio del pulso.

El desplazamiento horizontal fue determinado como se describió anteriormente (sección: caracterización conductual) y fue cuantificado en ventanas de un segundo normalizadas respecto el valor de desplazamiento de un segundo antes del inicio del pulso. Se

clasificaron en ensayos rápidos y lentos en función de un umbral de desplazamiento en el segundo antes de inicio del pulso. El índice de movimiento se determinó como el ratio entre la media del desplazamiento horizontal calculado durante los 5s de inhibición con respecto al periodo basal (1s).

Registros Electrofisiológicos

Para corroborar la inhibición de la actividad estriatal se transfectaron 600 nL de AAV5-hSyn-eArch3.0-eYFP en el estriado dorsomedial de un animal Sapap3 KO (sección: Expresión de Opsinas). Tres semanas posteriores a la infección, un arreglo de electrodos móviles (16 microfibras, Innovative Neurophysiology Inc.) acoplados a una fibra óptica (200 μ m, ThorLabs, Inc.) fue colocado 100 micras arriba del sitio de inyección. Una semana después, los sujetos fueron colocados en la arena de campo abierto y el protocolo de inhibición descrito anteriormente fue aplicado mientras se registró la actividad estriatal (30 kHz, filtro pasabajas 750 Hz, CerePlex Direct, Blackrock Microsystems). Las unidades fueron sorteadas utilizando el software Offline Sorter (Plexon, Inc.). Para definir células moduladas, se alineó la actividad de estas al inicio de los 15 pulsos de luz y se calculó el histograma peri-evento para cada unidad (ventanas fijas de 100 ms). Posteriormente se comparó la distribución de 3s antes del inicio del pulso.

Paradigma de Condicionamiento Instrumental de Orden Serial

Se adaptó el paradigma conductual desarrollado durante el proyecto de maestría el cual se llevó a cabo en cajas de entrenamiento (Med-Associates, Inc; # MED-307A-CT-B1) equipadas con dos palancas, un receptáculo para recepción de comida y 2 sensores infrarrojos para la detección de diferentes eventos durante cada sesión.

El programa de entrenamiento consistió en 6 fases consecutivas, siendo la última aquella donde es posible hacer la distinción entre realizar transiciones entre secuencias guiadas por estímulos externos de aquellas que se realizan de manera autónoma. A continuación, se describe cada una de las fases:

- 1) Pre-Entrenamiento: Dirigido a que el animal explore la caja de entrenamiento y localice el sitio donde se entregarán las recompensas. Consiste en una sesión de 30 min donde cada 30 s, de manera aleatoria, se le entregará un comprimido de 14 mg de sacarosa (recompensa).

- 2) Reforzamiento Continuo: En esta fase se presentará una palanca la cual debe ser presionada para obtener el reforzador. Consiste en 3 sesiones donde cada presión origina una recompensa, la sesión termina cuando el sujeto obtenga 15 recompensas o, en su caso, transcurran 30 min. En una cuarta sesión se expone la segunda palanca.
- 3) Secuencias de Razón Fija: Para obtener recompensa el animal debe de presionar 8 veces consecutivas la palanca expuesta, esta se presenta de manera alternada. En esta fase debe realizar 30 secuencias en cada palanca para finalizar la sesión.
- 4) Secuencias de Razón Fija con Castigo: Consiste en la tarea descrita anteriormente, pero con la restricción de que el animal no puede visitar el sitio de entrega de recompensas hasta haber terminado la secuencia de 8 presiones. En el caso contrario, la palanca será retraída, la luz se apagará por 10 s y el ensayo será reiniciado. Para finalizar la sesión debe completar 30 ensayos en cada palanca.
- 5) Cadenas de Secuencias Guiadas por Estímulo: En esta fase el animal debe de realizar 2 secuencias de 4 presiones en cada palanca para obtener el reforzador. Se presenta la primera palanca e inmediatamente cuando se completan las 4 presiones esta se retrae y se expone la segunda palanca para que el animal pueda terminar las 4 presiones restantes y así generar un reforzador. Las visitas al sitio de entrega de recompensas antes de terminar la cadena de secuencias son castigadas a través del tiempo fuera descrito con anterioridad. La sesión termina cuando se consiguen 60 recompensas o transcurren 60 min.
- 6) Cadenas de Secuencias Guiadas por Estímulo y Autoiniciadas: Es la última fase del entrenamiento, se compone de 3 repeticiones Cadenas Guiadas por Estímulo y, 3 repeticiones de cadenas de secuencias donde las palancas se exponen al mismo tiempo y se mantienen expuestas durante la realización de la tarea, igualmente se necesitan 4 presiones en cada palanca antes de recibir la recompensa, pero el sujeto es libre de decidir cuantas presiones realizar antes de transitar a la segunda secuencia. Son acreedoras de castigo las secuencias interrumpidas por visitas al sitio de entrega de recompensa o por presionar la siguiente palanca antes de terminar la primera secuencia. La sesión termina cuando se consiguen 60 recompensas o transcurren 60 min.

Protocolo de Inhibición Optogenética durante Secuencias en Orden Serial

La inhibición optogenética se realizó durante las tres primeras sesiones de Secuencias Guiadas por Estímulo y, posteriormente en las primeras sesiones de Secuencias Libres de Estímulo (aunque en estas se intercalaban sesiones Guiadas por Estímulo, estas últimas no fueron inhibidas en este momento). Estas sesiones tuvieron una duración de 30 minutos sin límite de reforzadores, donde los ratones fueron implantados con un par de fibras que recibían el haz de un láser de 556 nm (Single Longitudinal Mode Laser, #MSL-FN-556, CNI) y cuyo paso estaba mediado por un obturador controlado automáticamente desde el equipo. Los pulsos de inhibición (7 segundos, 20-30 mW, 556 nm) se desencadenaban de manera aleatoria con una probabilidad del 50% una vez que el sujeto cruzaba un sensor infrarrojo en el camino a la primera palanca.

Para evaluar los efectos de la inhibición optogenética en fases posteriores del entrenamiento, se implementaron tres protocolos de manipulación que se presentaron en sesiones independientes con una probabilidad de 0.5 en ambos tipos de secuencias. 1) Protocolo de Inicio: Se replicó el protocolo utilizado durante la fase de aprendizaje modificando la duración del pulso de 7s a 2s. 2) Protocolo Primera Presión: La primera presión de la subsecuencia uno desencadenaba la inhibición por 2 s. 3) Protocolo Transición: Consistía en inhibir la actividad antes de la transición entre palancas, específicamente, el pulso de luz iniciaba tras la tercera presión de la primera secuencia.

Corroboración Anatómica

Se verificó la expresión del indicador de calcio y la opsina Arch 3.0 en sitio de implante de endoscopio, las fibras ópticas y el optrodo de registro en todos los sujetos utilizados. Primeramente, los sujetos fueron anestesiados con una dosis de ketamina/xilacina (95 mg/1mg, i.p.) para posteriormente ser perfundidos con amortiguador de fosfatos (PBS 0.1M) seguido de paraformaldeído al 4% (PFA). Los cerebros se mantuvieron en PFA al menos 12 horas antes de ser seccionados en un vibramicrotomo (Lancer Microtome Series 1000 Sectioning System) para obtener cortes coronales de 100 μ m. Para el montaje de las muestras se utilizó el medio Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich,81381). Los cortes fueron visualizados a través de un microscopio confocal (LSM710, Zeiss) para determinar el área de infección y, la localización del endoscopio, electrodo y fibras ópticas.

RESULTADOS

CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN ESTRIATAL A LA GENERACIÓN DE CONDUCTAS COMPULSIVAS EN EL MODELO DE ACICALAMIENTO EXCESIVO: Sapap3 KO

Los sujetos Sapap3 KO presentan acicalamiento excesivo y locomoción decrementada

La línea Sapap3 KO fue establecida en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular para su reproducción y cuidado. La verificación del fenotipo de acicalamiento excesivo, característico de este modelo de compulsiones, se realizó utilizando ratones Sapap3 KO y Sapap3 +/+ de 2 a 4 meses de edad que fueron colocados en una arena de campo abierto por 30 min (**Figura 1A**). El fenotipo fue corroborado por el incremento en la frecuencia de episodios de acicalamiento (Mann-Whitney $p < 0.002$; **Figura 1B**, Panel superior) y en la duración de estos, cuando se compara con sujetos Sapap3 +/+ (Kolmogorov-Smirnov $p < 0.013$; **Figura 1B**, Panel inferior). Como parte de la caracterización de esta conducta repetitiva, se calculó la probabilidad de observarla a lo largo de la sesión a través de la cuantificación de “ventanas de acicalamiento” (ventanas de 1s con valores binarios en función si contenían o no periodos de acicalamiento). Como parte de la caracterización del fenotipo compulsivo, se cuantificó la probabilidad de observar eventos de acicalamiento segundo a segundo. Se confirmó el acicalamiento excesivo mediante el incremento en la probabilidad de acicalamiento por la comparación de las distribuciones probabilidad de cada grupo (Kolmogorov-Smirnov $p < 0.005$; **Figura 1C**). Además, se observó que los animales deficientes de la proteína presentaban una reducción en la frecuencia de aparición de otras conductas naturales como el *rearing* (Mann-Whitney $p < 0.05$; **Figura 1D**). Estudios anteriores han reportado la reducción en la locomoción de animales Sapap3 KO, en este estudio, se demostró una reducción substancial en el desplazamiento horizontal de los sujetos Sapap3 KO cuando se compara con sus controles (Mann-Whitney $p < 0.001$; **Figura 1E**). Además, se corroboró que esta reducción se mantiene a lo largo de la sesión al medir el desplazamiento en bloques de 5 min (Mann-Whitney $p < 0.05$; **Figura 1F**). No fue posible encontrar una correlación entre la reducción del desplazamiento horizontal y el incremento en el acicalamiento observado en el modelo (Correlación de Pearson $p > 0.05$; **Figura 1G**). Estos resultados confirman el acicalamiento excesivo y una reducción en el desplazamiento general en el modelo Sapap3 KO.

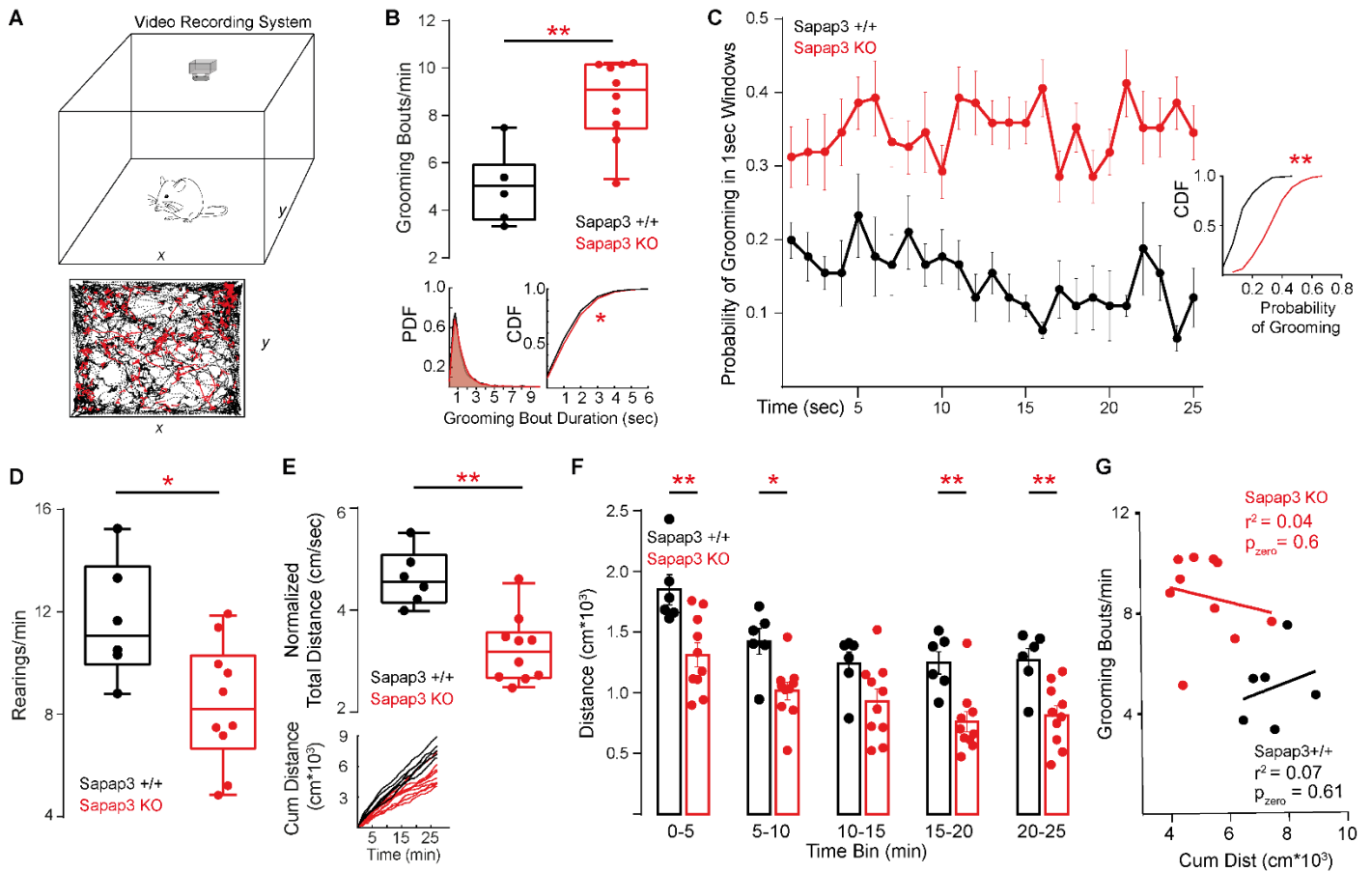


Figura 1. Los sujetos Sapap3 KO muestran grooming excesivo y locomoción decrementada. **A.** Esquema de la configuración del campo abierto, el inserto es un ejemplo representativo del seguimiento de un ratón, los puntos rojos representan los periodos de acicalamiento. **B.** Panel Superior: Acicalamiento por minuto (Rojo: Sapap3-KO: n=10; Negro: Sapap3^{+/+}: n=6; Mann-Whitney U, p<0.01). Paneles Inferiores: Función de densidad de probabilidad y densidad acumulada para la duración del acicalamiento. (Kolmogorov-Smirnov test p<0.05) **C.** Panel Izquierdo: Probabilidad de acicalamiento. Panel Derecho: Función de la densidad acumulada para las probabilidades de cada grupo (Kolmogorov-Smirnov test, p<0.01). **D.** Eventos de *rearing* por minuto (Mann-Whitney U, p<0.05). **E.** Distancia total normalizada a la duración de la sesión (Mann-Whitney test p<0.01). Inserto: Desplazamiento acumulado por individuo. Los periodos de movimiento relacionado con episodios de acicalamiento o *rearing* fueron substraidos. **F.** Distancia horizontal por bloques de 5 min (Mann Whitney U for each block, *p<0.05 and ** p<0.01). **G.** Correlación entre la distancia acumulada y el número de eventos de acicalamiento por minuto (Sapap3^{+/+} R: 0.07, p=0.61. Sapap3-KO, R 0.04, p=0.6).

Los sujetos Sapap3 KO muestran una mayor frecuencia de eventos de menor amplitud en células estriales.

Estudios anteriores han relacionado la actividad estriatal en la generación de comportamientos compulsivos (Ahmari et al., 2013; Burguière et al., 2013; Lázaro et al., 2008; J. Y. Rotge et al., 2009). Solo un estudio ha medido de manera directa la actividad estriatal relacionada a las compulsiones presentadas en el modelo Sapap3 KO

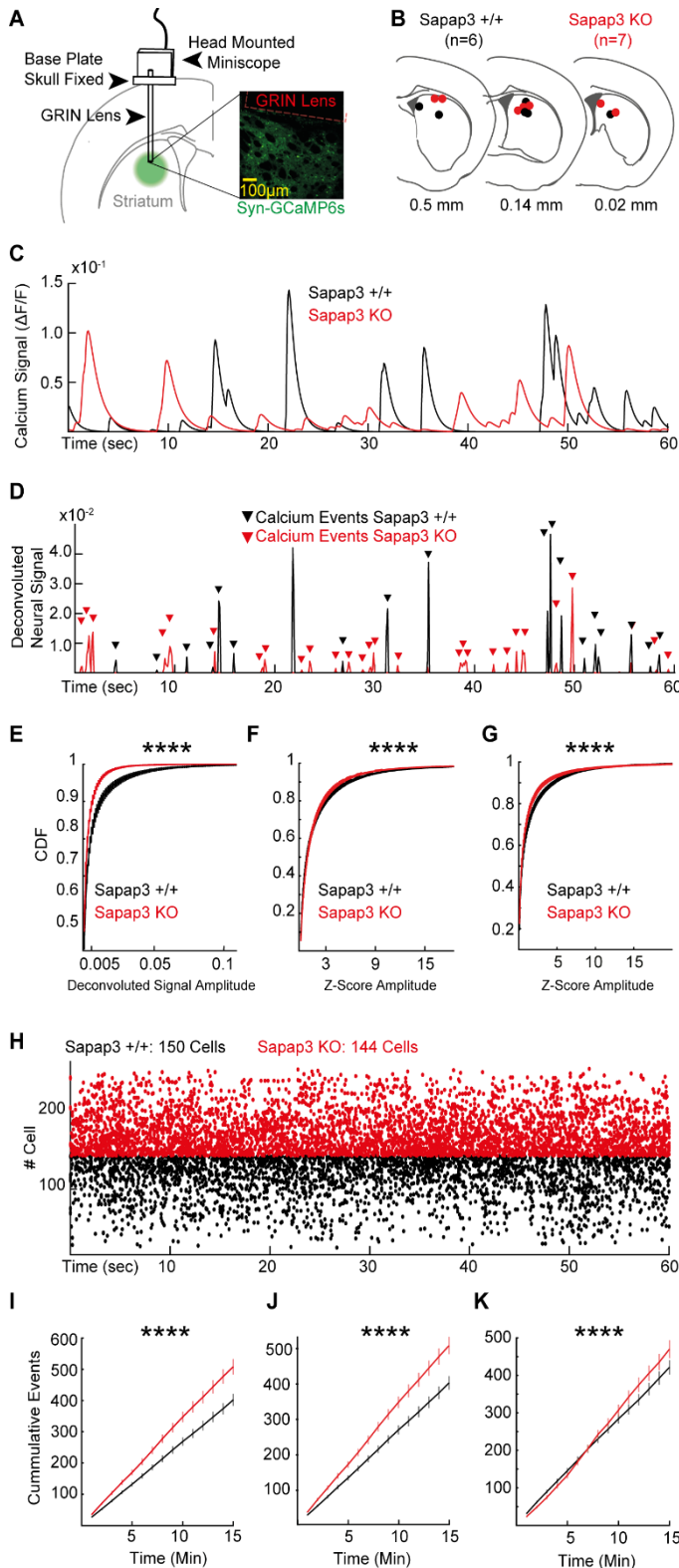


Figura 2. Los sujetos Sapap3 KO presentan eventos de calcio de menor amplitud. **A.** Diagrama representativo de la infección de GCaMP6s, la localización del endoscopio en el DMS y el microscopio miniatura. **B.** Esquema que muestra la localización de las puntas de los endoscopios para cada grupo (Negro: Sapap3 +/+ n=6; Rojo: Sapap3 KO n=7). **C.** Señal de calcio (DF/F) de una célula representativa de cada grupo. **D.** Señal neuronal deconvolucionada para los trazos en **C**, los triángulos representan los eventos detectados. **E.** Función de la distribución acumulada (CDF) de la amplitud de la señal de calcio (Negro: Sapap3 +/+ 150 células (6 ratones), Rojo: Sapap3 KO 144 células (7 ratones). Datos de 3 sesiones por animal). **F.** CDF para el Z-Score de la señal en **E**. **G.** CDF para el Z-Score de la primera sesión de cada sujeto (Negro: Sapap3 +/+ 112 células, Rojo: Sapap3 KO 98 células) [E-G ****, Kolmogorov-Smirnov $p < 0.0001$]. **H.** Raster para los eventos de calcio en un periodo representativo para todas las células de **E**. **I.** Eventos acumulados a lo largo de la sesión de los datos en **E**. **J.** Igual que **I** para **F**. **K.** Igual que **I** para **G**. (I-K, **** Two-way ANOVA, $p < 0.001$).

y, se ha sugerido un fenómeno de hiperactividad durante compulsiones que son evocadas por estímulos condicionados (Burguière et al., 2013). Por lo tanto, caracterizamos la actividad estriatal de los sujetos Sapap3 KO a través de imagenología de calcio en el

estriado dorsomedial utilizando micro-endoscopios mientras los animales se encontraban en campo abierto (**Figura 2A y 2B**). La señal de calcio (dF/F; **Figura 2C**) y la señal deconvolucionada (**Figura 2D**) fue obtenida para células individuales de tres sesiones por animal. El **Anexo 1A**, muestra la determinación del decaimiento de la señal de calcio en cada sesión, el cual no muestra una diferencia significativa entre grupos. Además, se corroboró que la amplitud de los eventos de calcio no fuera diferente entre las 3 sesiones seleccionadas antes de realizar el análisis (**Anexo 1B**, Kolmogorov-Smirnov $p > 0.05$). Las distribuciones acumuladas de las amplitudes de los eventos de calcio muestran una mayor proporción de eventos de amplitud menor cuando se compara con animales control (Kolmogorov-Smirnov $p < 0.001$; **Figura 2E**). El hallazgo se conserva cuando la señal deconvolucionada es transformada a Z-Score (Kolmogorov Smirnov $p < 0.001$; **Figura 2F**) o cuando solo se analiza la primera sesión de registro para cada animal (Kolmogorov-Smirnov $p < 0.001$, **Figura 2G**). Además, se observó que los sujetos Sapap3 KO mostraron un mayor número de eventos acumulados a lo largo de la sesión (Two-Way ANOVA $p < 0.0001$; **Figura 2I-K**).

La proporción de células estriatales relacionadas con la conducta de acicalamiento esta incrementada en el ratón Sapap3 KO.

El control motor de las conductas innatas y estereotipadas de acicalamiento se ha relacionado con la actividad de neuronas estriatales (Aldridge & Berridge, 1998; Berridge & Whishaw, 1992; Kalueff et al., 2015). Para evaluar si existe una alteración en la actividad estriatal del ratón Sapap3 KO, donde esta conducta se encuentra exacerbada, registramos a través de imagenología de calcio en libre movimiento y alineamos la señal al inicio de los episodios de acicalamiento (**Figura 3A y 3B**). De manera importante, el ratón Sapap3 KO mostró una mayor proporción de células moduladas cuando se comparó contra sus controles (Sapap3-KO: Células Moduladas Positivamente: 10/68; Células Moduladas Negativamente: 8/68; Sapap3 +/-: Células Moduladas Positivamente: 1/111; Células Moduladas Negativamente: 9/111; Chi cuadrada $p < 0.001$; **Figura 3C**). Cuando se comparó la proporción de células moduladas positiva y negativamente de manera independiente, solo la comparación de células activadas resultó significativa (Fisher test $p < 0.001$, **Figura 3C Inserto**). Dado que una proporción de eventos de acicalamiento caía dentro de las ventanas de comparación (-7 a -2s) del evento consecutivo, se decidió reevaluar los datos excluyendo estos eventos que se sobreponían en el periodo basal (**Anexo 2A**), como resultado se corroboró la proporción mayor de células relacionadas con la conducta de acicalamiento en los sujetos Sapap3-KO (**Anexo 2B**, Chi cuadrada $p < 0.01$).

Además, se observó una aparente acumulación de transitorios de calcio después del inicio del acicalamiento y, dado que podría relacionarse con eventos de acicalamiento que se presentan de manera consecutiva, analizamos los patrones de actividad cuando existían series de eventos de acicalamiento (**GS**: una serie fue definida como un grupo consecutivo de eventos de acicalamiento con un intervalo menor a 3s entre eventos individuales, **Figura 3D**). Encontramos que las GS tenían una mayor duración (Kolmogorov Smirnov $p < 0.001$, **Figura 3E**) y contenían un mayor número de eventos individuales (Mann-Whitney $p < 0.05$; Kolmogorov-Smirnov, $p < 0.0001$, **Figura 3F**) en los animales Sapap3 KO. Consistente con la idea de una hiperactividad estriatal durante el acicalamiento excesivo (Burguière et al., 2013), observamos una mayor frecuencia de eventos de calcio durante las GS cuando se comparó contra animales control (Mann Whitney U, $p < 0.0001$; **Figura 3G**). Este fenómeno fue observado aun cuando los eventos se dividieron en periodos de 1s a lo largo de la serie (Mann-Whitney, $p < 0.0001$; **Figura 3H**).

En conjunto, estas observaciones acompañadas del incremento en la proporción de células moduladas sugieren que un incremento en la actividad del estriado dorso-medial podría subyacer el fenotipo de acicalamiento excesivo observado en el modelo Sapap3 KO.

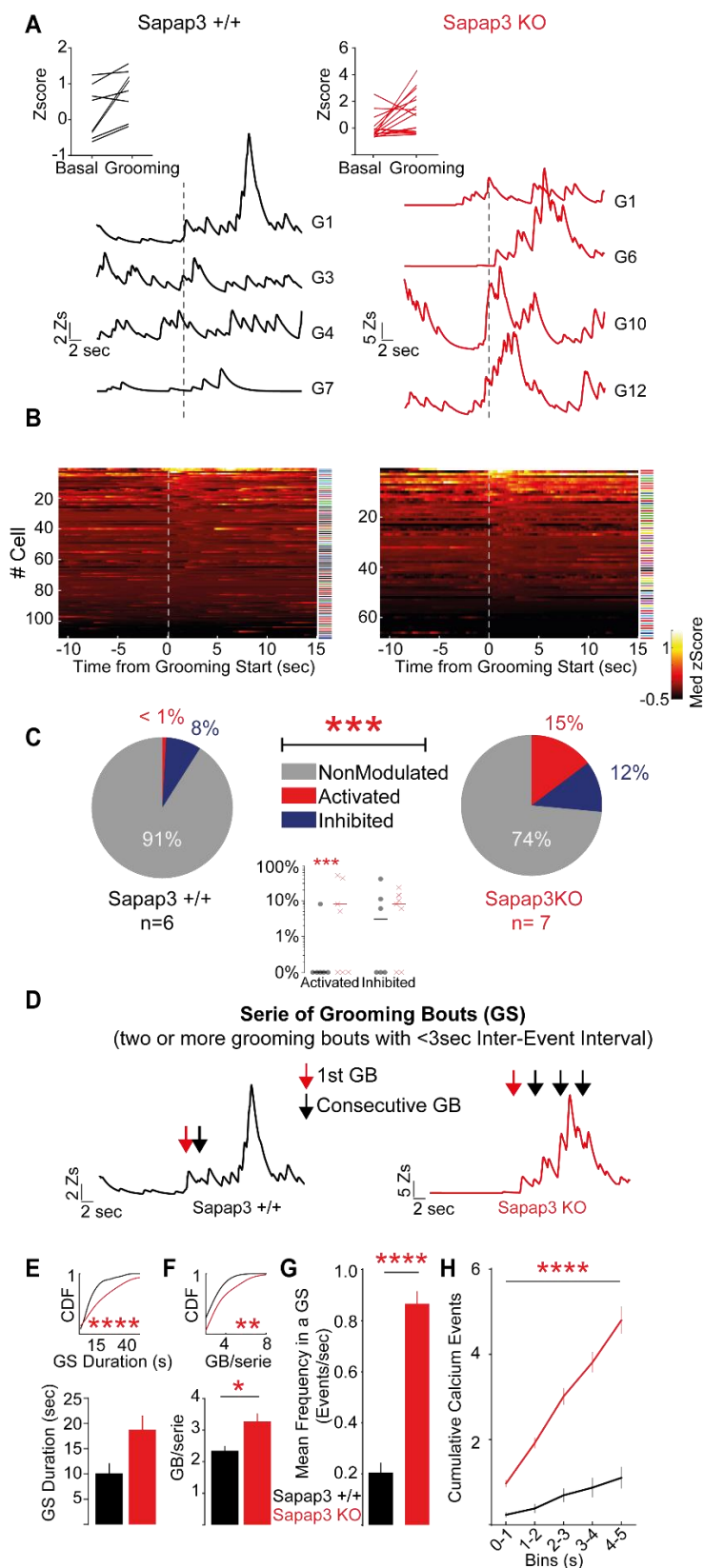


Figura 3. La proporción de neuronas estriales asociadas a la conducta de acicalamiento esta incrementada en los sujetos Sapap3 KO. **A.** Ejemplo representativo de los trazos de calcio durante diferentes eventos de acicalamiento para una célula modulada de cada grupo. Los insertos muestran la comparación pareada entre la actividad basal y durante el periodo de interés para cada evento registrado. **B.** Mapa de color para las neuronas estriales alineado al inicio del acicalamiento (median z-score). El código de color en las columnas del lado derecho a cada panel ilustra las neuronas de cada animal. **C.** Proporción de células moduladas (Sapap3^{+/+} Negativamente: 9; Positivamente: 1; No moduladas: 101 Células; Sapap3-KO Negativamente: 8; Positivamente: 10, No moduladas: 58 Células; Chi-square, $p < 0.001$). Inserto: Proporciones individuales de las células moduladas (Negro: Sapap3 +/+ (6 ratones), Rojo: Sapap3 KO (7 ratones)). Cada punto representa un animal, las líneas horizontales representan la media de cada grupo. **D.** Representación temporal de un ejemplo del patrón de actividad durante una serie de eventos de acicalamiento. Las flechas rojas indican el primer grooming de la serie, las flechas negras indican los eventos consecutivos. **E.** Duración de las series (Sapap3-KO: $n = 32$ GS, Sapap3^{+/+}: $n = 20$ GS; Mann-Whitney U, $p > 0.05$). Inserto: función de la distribución acumulada para la duración de las GS (Kolmogorov Smirnov test, $p < 0.0001$) **F.** Eventos de acicalamiento por serie (U-Mann Whitney, $p < 0.05$). Inserto: función de la distribución acumulada del número de eventos por serie (Kolmogorov Smirnov test, $p > 0.05$). **G.** Frecuencia promedio durante las GS (Mann-Whitney U, $p < 0.0001$). **H.** Eventos acumulados de calcio durante las GS en periodos de 1s (Mann-Whitney U, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.0001$).

La inhibición estriatal incrementa el fenotipo de acicalamiento en el modelo de compulsiones: Sapap3-KO

Dado el incremento en la proporción de células moduladas por el inicio del acicalamiento en el ratón Sapap3 KO, hipotetizamos que una reducción en la actividad estriatal pudiera disminuir el fenotipo compulsivo. Para probar esta hipótesis, llevamos a cabo una serie de experimentos de inhibición optogenética de la actividad estriatal y vía específica mientras evaluábamos la probabilidad de acicalamiento. Primeramente, corroboramos la inhibición de la actividad estriatal mediada por el protocolo de inhibición optogenética a través del registro electrofisiológico de un individuo Sapap3-KO en libre movimiento al cual se le implantó un electrodo acoplado a una fibra óptica en el estriado dorso-medial (**Figura 4A**). Tras el registro en tres posiciones que cubrieron la distribución anatómica del eje dorsoventral de la región de interés, se logró identificar unidades que reducían su actividad tras el inicio del pulso de inhibición (**Figura 4B**), las cuales representaron alrededor del 25% de las células registradas (**Figura 4C, 4D y 5C**).

Una vez evaluados los efectos del protocolo de inhibición sobre la actividad estriatal de los sujetos Sapap3 KO, se procedió a expresar la opsina Archeorhodopsin3.0 y a implantar fibras ópticas de manera bilateral en el estriado dorso-medial (**Figura 5A**, panel izquierdo; **Figura 5B**). Se cuantificó el acicalamiento antes, durante y después del pulso de luz en ventanas de un segundo, denominadas “ventanas de acicalamiento” (**Figura 5A**, panel derecho).

Contrario a nuestra hipótesis, la inhibición general de las neuronas estriatales incrementa el fenotipo de acicalamiento (Friedman Test, $p < 0.01$, Comparaciones múltiples de Dunn, $p < 0.05$ **Figura 5D**, Panel Izquierdo). Este efecto solo pudo observarse en sujetos deficientes de la proteína Sapap3 y no en sujetos controles que expresan solo eYFP o en ratones C57BL/6J que expresan Arch3.0 (Friedman Test $p > 0.05$; Comparaciones múltiples de Dunn, $p > 0.05$; **Figura 5D**, Panel Central y Derecho). Para confirmar este efecto, se calculó la probabilidad de encontrar ventanas de acicalamiento y se observó un incremento significativo durante los últimos 3s del pulso de inhibición (Two-way ANOVA, $p < 0.001$; **Figura 5F**).

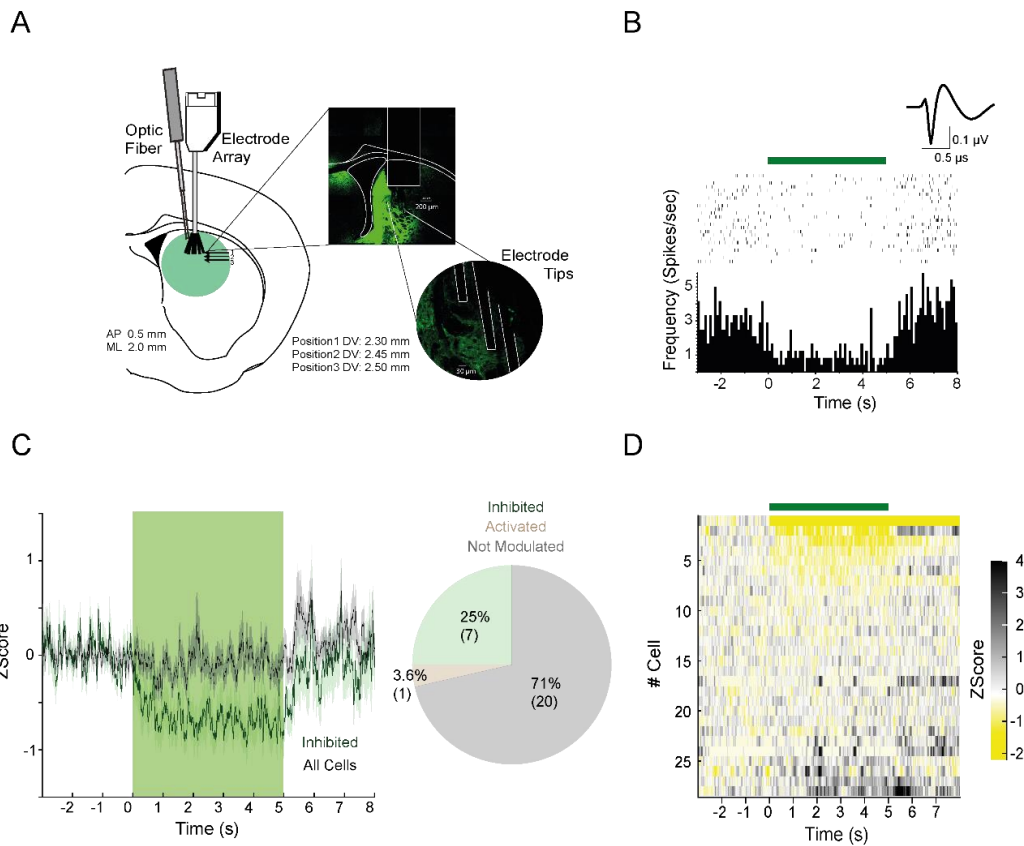


Figura 4. Verificación electrofisiológica del protocolo de inhibición optogenética en el modelo Sapap3-KO. A. Representación esquemática de las coordenadas del implante del optrodo de registro y manipulación (Panel derecho). Fotomicrografía de la posición del optrodo con respecto a la expresión del constructo Arch3.0-eYFP, el acercamiento ilustra la posición de las puntas de registro (Panel izquierdo). **B.** Histograma perievento de la actividad de una neurona representativa tras el inicio de los pulsos de inhibición. El inserto representa la forma de la espiga de la neurona en cuestión. **C.** Promedio en z-score de la actividad de neuronas inhibidas y de la población registrada durante el pulso de luz. Inserto: Proporciones de neuronas moduladas por el pulso de luz. **D.** Mapa de color del promedio en Z-score de actividad neuronal para cada neurona registrada.

Además, evaluamos el efecto de la inhibición optogenética de la actividad estriatal sobre la locomoción (desplazamiento horizontal) en campo abierto en los animales Sapap3 KO (**Figura 5G**). Se observó una reducción en el desplazamiento durante el pulso de luz cuando fue comparado contra los sujetos que solo expresaron la proteína fluorescente (Two-way ANOVA $p < 0.05$; **Figura 5H**).

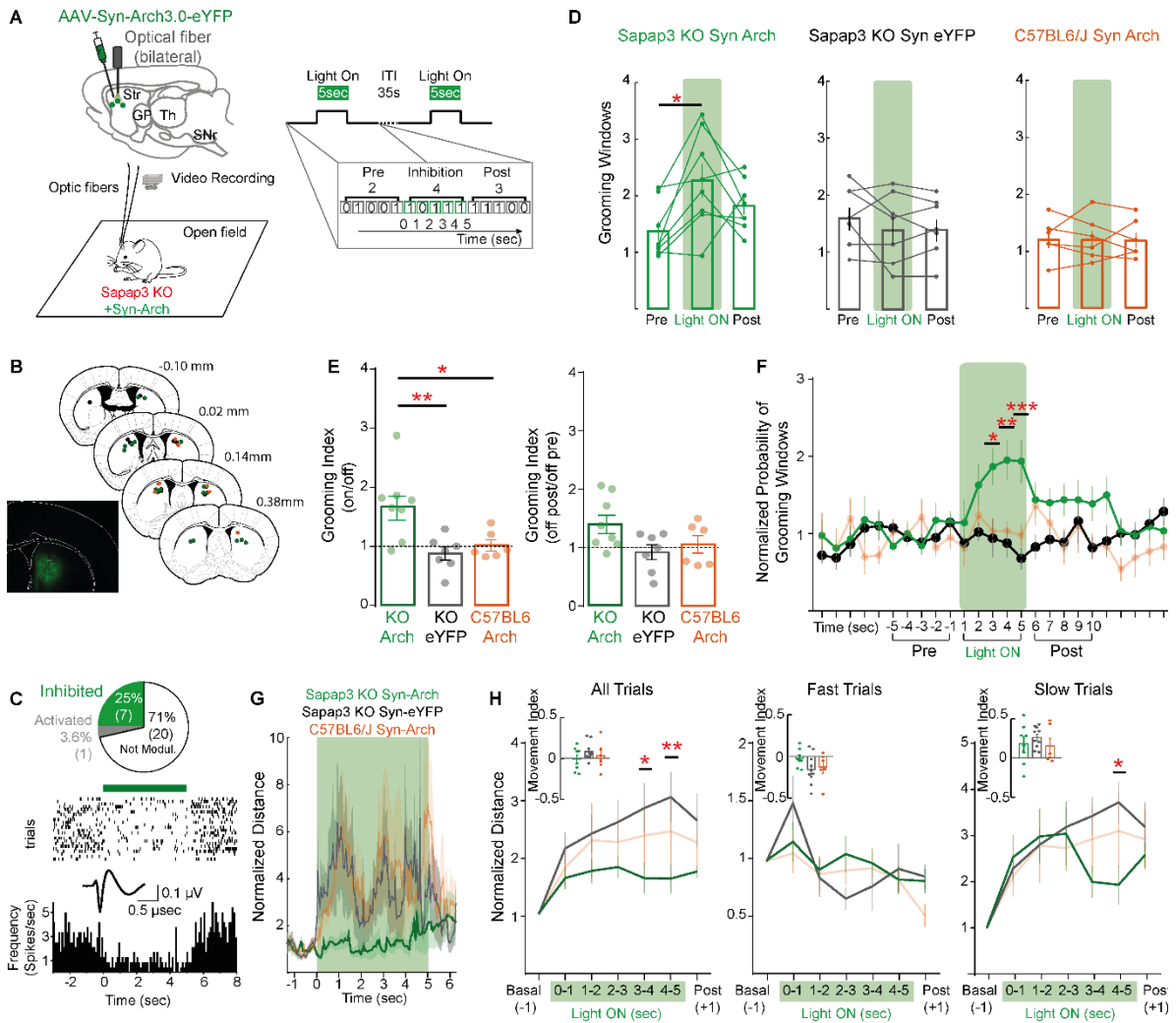


Figura 5. Inhibición de la actividad estriatal incrementa la conducta de acicalamiento en ratones Sapap3 KO.

A. Diagrama representativo del *set-up* experimental y el método de análisis: Los efectos optogenéticos fueron evaluados de manera binaria en ventanas de 1s que contienen o no eventos de acicalamiento durante los periodos de interés. **B.** Localización de las fibras ópticas para cada grupo experimental. Inserto: Microfotografía de un animal representativo expresando Syn-Arch 3.0. **C.** Corroboración de la inhibición a través del registro electrofisiológico de la actividad estriatal en un sujeto Sapap3 KO. Panel superior: Proporción de células moduladas. Panel Central: Raster plot de la inhibición inducida por la activación de la luz para una neurona representativa. **D.** Promedio de ventanas de acicalamiento en cada periodo por grupo experimental (Sapap3-KO Syn Arch: 8 ratones, Friedman test $p < 0.01$; Comparaciones múltiples de Dunn: $p < 0.05$; Sapap3- KO Syn eYFP: 7 ratones; C57BL/6 Syn Arch: 6 ratones, Friedman test $p > 0.05$; Comparaciones múltiples de Dunn: $p > 0.05$). **E.** Grooming Index for ON/OFF and OFF Post/ OFF Pre periods (Syn Arch vs. Syn eYFP, Kruskal-Wallis Test con Comparaciones multiples de Dunn, $p < 0.01$). **F.** Cuantificación de la probabilidad de acicalamiento en ventanas de un Segundo, normalizadas a los 5 s previos a la inhibición (Two-way ANOVA $p < 0.05$). **G.** Ejemplo representativo de la inhibición sobre el desplazamiento normalizado para cada grupo (Media \pm Error Estándar). **H.** Cuantificación del desplazamiento normalizado a 1 s antes del inicio del pulso para todos los ensayos, ensayos rápidos y lentos. (Two-Way ANOVA, Post Hoc Sidak $*p < 0.05$, $**p < 0.01$). Insertos: Índice de movimiento fue calculado mediante la división del promedio de desplazamiento durante el pulso entre la media de desplazamiento en el periodo basal.

La inhibición específica de las neuronas de la vía indirecta reduce el acicalamiento excesivo en el modelo Sapap3 KO

Dado que el núcleo estriado es una estructura altamente heterogénea, surge la pregunta si la inhibición de la población celular más prominente, las neuronas espinosas medianas, tendrían el mismo efecto que la inhibición general. Para esto, se generaron animales dobles transgénicos que permitieron expresar de manera vía específica (A2a Cre Sapap3 KO y D1 Cre Sapap3 KO) la opsina inhibitoria Arch3.0 (Figura 6A y 6B). La inhibición de las neuronas estriato-palidales (vía indirecta) reduce los episodios de acicalamiento durante el pulso de inhibición (Wilcoxon Test, $p < 0.05$; Figura 6C; ratio ON/OFF: Mann-Whitney, $p < 0.05$; Figura 6D, panel izquierdo). Lo anterior no fue observado en los sujetos A2aCre/D1Cre Sapap3 KO que solo expresaban la proteína fluorescente o en los sujetos cuya vía directa (D1 Cre Sapap3 KO) fue inhibida (Wilcoxon Test, $p < 0.05$, Figura 6C panel central y derecho), sugiriendo una regulación específica de la conducta de acicalamiento por las neuronas estriatales de la vía indirecta. Además, fue observado un incremento en los eventos de acicalamiento después de la inhibición de la vía directa (Mann-Whitney, $p < 0.05$, Figura 6D panel derecho). Estos efectos diferenciales entre la inhibición de las vías estriatales fueron confirmados cuando se calculó la probabilidad de acicalamiento (Two-way ANOVA, $p < 0.01$, Figura 6E).

En términos del desplazamiento horizontal, la inhibición de ambas vías incrementa la actividad locomotriz (Mann-Whitney, $p < 0.05$; Figura 6F panel izquierdo). De manera importante, la inhibición de la vía directa resultó en un fuerte incremento en el índice de movimiento cuando los animales estaban en reposo o poco movimiento (Mann-Whitney, $p < 0.05$; Figure 6F Inserto, panel izquierdo). Para corroborar que este fenómeno, se inhibieron las vías directa e indirecta de animales silvestres en la misma región estriatal (C57BL6/J cruzados con la línea A2a Cre o D1 Cre, Figura 6G). La comparación de los índices de movimiento entre animales silvestres y Sapap3 KO indican que existe un desbalance en la vía directa que origina cambios en el desplazamiento de los ratones Sapap3 KO (Mann-Whitney, $p < 0.05$; Figure 6G, barras azules).

En resumen, la inhibición optogenética sobre las neuronas de la vía indirecta reducen el acicalamiento excesivo. La inhibición de ambas vías incrementa la locomoción, particularmente la inhibición de la vía directa revela un rol no canónico en el control de la locomoción del modelo Sapap3 KO.

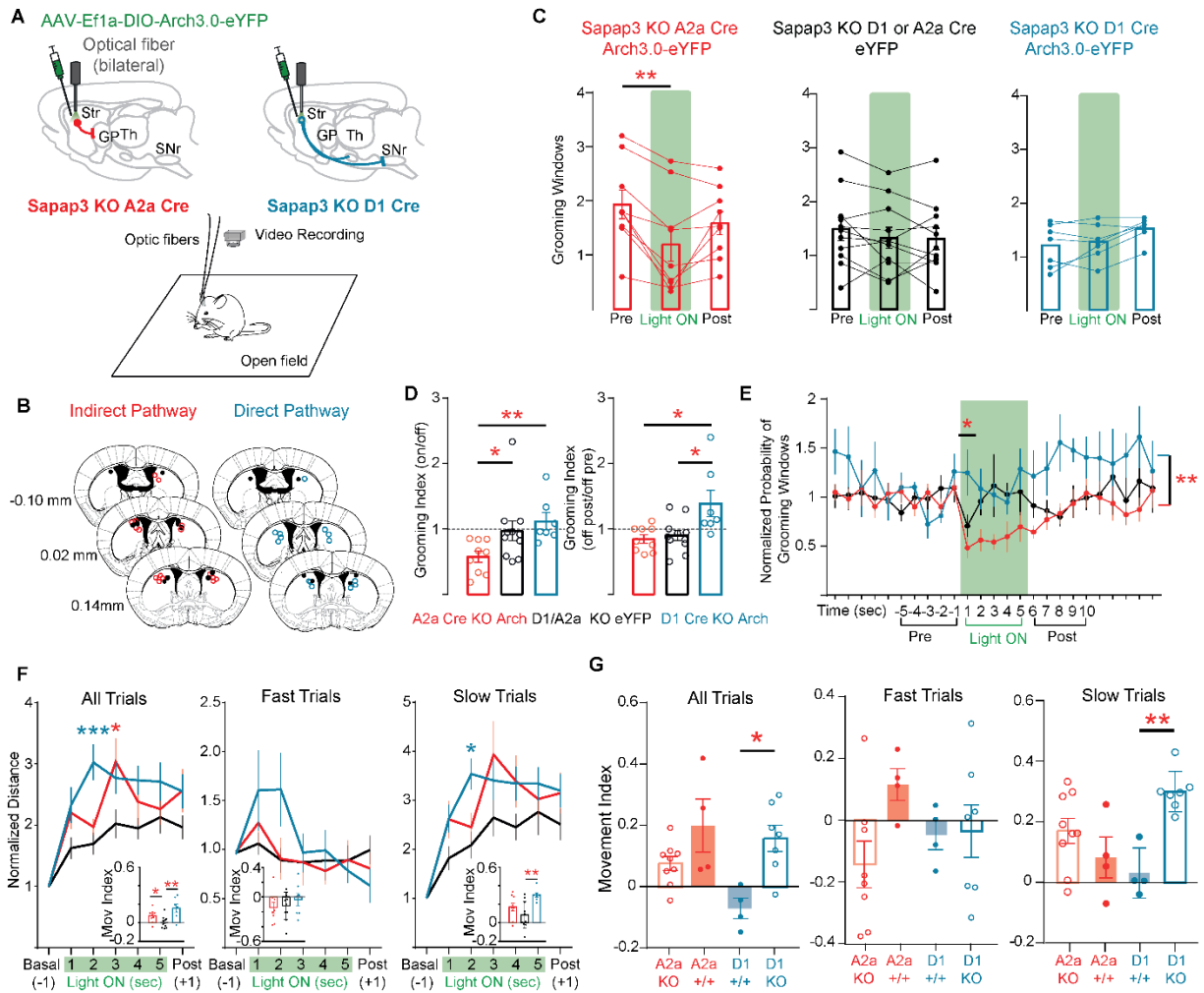


Figura 6. Inhibición específica de las neuronas de la vía indirecta reduce el acicalamiento excesivo en el ratón Sapap3 KO. **A.** Esquema de los grupos de animales generado para inhibir la vía indirecta (rojo) y directa (azul) en el campo abierto. **B.** Diagrama representativo de la localización de las puntas de las fibras ópticas (Azul: Sapap3 KO D1 Cre Arch-eYFP; Rojo: Sapap3 KO A2a Cre Arch-eYFP; Negro: Sapap3 KO A2a Cre/D1 Cre eYFP). **C.** Ventanas de acicalamiento en cada periodo de 5s para los grupos controles y experimentales (A2a-Cre Sapap3-KO Arch: 9 ratones, Friedman Test $p < 0.01$, Dunn's multiple comparison $p < 0.01$; D1-Cre Sapap3-KO Arch: 7 ratones, Friedman Test $p > 0.05$, Dunn's multiple comparison $p > 0.05$; A2a/D1 Cre Sapap3 eYFP: 11 ratones, Friedman Test $p > 0.05$, Dunn's multiple comparison $p > 0.05$). **D.** Índice de acicalamiento para los periodos ON/OFF y OFF Post/ OFF periods (Kruskal-Wallis $p < 0.01$, Dunn's multiple comparison $*p < 0.05$, $**p < 0.01$). **E.** Probabilidad normalizada de ventanas de acicalamiento (Two-way ANOVA, $p < 0.01$, Post hoc Sidak $*p < 0.05$). **F.** Cuantificación del desplazamiento normalizado a 2s antes del inicio del pulso para todos los ensayos, ensayos rápidos y lentos (Two-Way ANOVA, Sidak Post Hoc $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$). Insertos: Índice de Movimiento para todos los ensayos, ensayos rápidos y ensayos lentos (Mann-Whitney U, $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$). **G.** Comparación entre índices de movimiento entre A2a- or D1-Cre Sapap3-KO y las líneas A2a- or D1-Cre lines (Mann-Whitney U, $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$).

En resumen, los hallazgos presentados en este capítulo aportan una base fisiológica para explicar los mecanismos que subyacen las conductas compulsivas en sujetos Sapap3 KO. Una hiperactivación estriatal durante los episodios de acicalamiento excesivo, los cuales pueden ser reducidos a través de la inhibición específica de las neuronas de la vía estriato-palidal de los ganglios basales. Los hallazgos de este capítulo fueron publicados en:

Ramírez-Armenta, K. I., Alatraste-León, H., Verma-Rodríguez, A. K., Llanos-Moreno, A., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2021). Optogenetic inhibition of indirect pathway neurons in the dorsomedial striatum reduces excessive grooming in Sapap3-knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 47(2):477-487 (Caratula; **Anexo 6**).

CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN ESTRIATAL SOBRE EL APRENDIZAJE Y EJECUCIÓN DE CADENAS DE SECUENCIAS DE ACCIONES EN EL MODELO DE COMPULSIONES: SAPAP3 KO

Los sujetos deficientes de la proteína Sapap3 presentan un déficit en el aprendizaje de secuencias de orden serial.

Una de las hipótesis que subyace la generación de conductas compulsivas es la pérdida de la sensibilidad a los vínculos acción-consecuencia, relacionándolo con una disfunción entre los sistemas que controlan la capacidad de adaptación a conductas dirigidas a objetivos y la generación de conductas habituales (Everitt & Robbins, 2005; Fava et al., 2014; Robbins et al., 2012). Una aproximación metodológica para evaluar la participación de estos sistemas es mediante la utilización de paradigmas de comportamiento operante, donde las consecuencias dependen de la conducta del sujeto. Por lo tanto, a partir de un paradigma conductual que implementamos en el laboratorio evaluamos el aprendizaje y ejecución de acciones en serie basadas en dos modalidades: 1) acciones en serie guiadas por estímulos externos y 2) acciones en serie encadenadas de manera autónoma [**Figura 7A**; (Sánchez-Fuentes, Ramirez-Armeneta et al., 2021) (Carátula; **Anexo 7**)]. Para lograr que los animales realicen secuencias de acciones en serie, después de un periodo de pre-entrenamiento inicial, los sujetos son sometidos a tres sesiones que tienen como finalidad que el sujeto aprenda a generar una secuencia compuesta por 4 presiones en una primera palanca seguidas de 4 presiones en una segunda palanca que terminan en la liberación de un reforzador (**Figura 7A**). El punto clave de esta modalidad es que la primera palanca se retrae cuando el sujeto completa cuatro presiones, indicando que debe transitar a la segunda palanca que solo es expuesta cuando la condición anterior se cumple. Posterior al periodo de aprendizaje guiado, los sujetos pasan a una siguiente etapa que involucra la ejecución de la secuencia antes mencionada con la diferencia de que en esta etapa habrá ensayos en los que ambas palancas estarán expuestas de manera simultánea y el sujeto debe de realizar la secuencia de manera autónoma (*Self-Paced Sequences*). Estas secuencias se alternaban en bloques de 3 ensayos con respecto a las secuencias guiadas por retracción de la palanca. Durante todo el entrenamiento el desempeño de los sujetos fue monitoreado a partir del radio obtenido por el número de reforzadores obtenido dividido entre el número de intentos totales que realizó cada sujeto (**Figura 7B**).

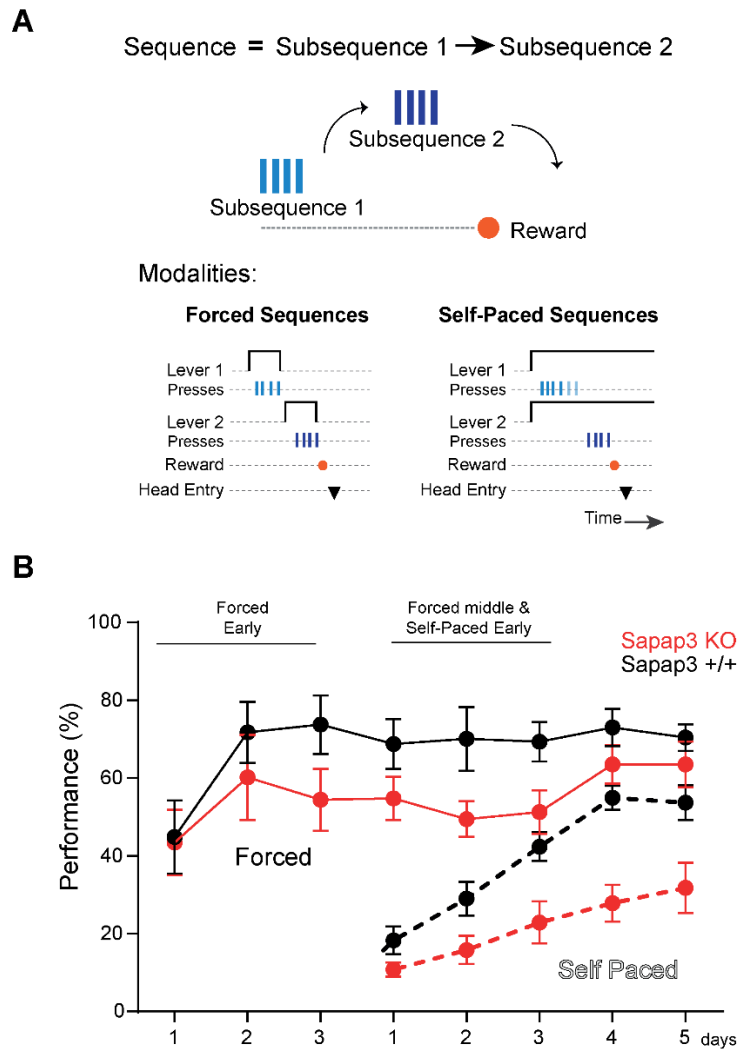


Figura 7. Los sujetos Sapap3-KO presentan un déficit en el aprendizaje de secuencias de acciones en orden serial. A. Diagrama representativo del paradigma de orden serial: Secuencias Guiadas por Retracción= Forced Sequences; Secuencias Autoiniciadas= Self-Paced Sequences. **B.** Desempeño de los sujetos a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Líneas Continuas: Desempeño en secuencias guiadas por retracción. Líneas Discontinuas: Desempeño en secuencias autoiniciadas. (Negro: Sapap3 +/+, 9 ratones; Rojo: Sapap3 KO, 12 ratones).

Los sujetos Sapap3 KO alteran el orden serial de la cadena al interrumpir las secuencias individuales.

El desarrollo de secuencias de orden serial, dada la composición de estas, da lugar a una diversidad de formas de ejecución que el sujeto puede realizar durante el proceso de aprendizaje. Estas alternativas de ejecución se caracterizan por la interrupción del desarrollo de la secuencia en el orden correcto y, por tanto, imposibilitan la obtención de la recompensa (**Figura 8B-E**; Paneles Superiores). La ejecución de las alternativas representadas en los paneles B-E de la figura 8, es seguida de la retracción de la palanca disponible y de la suspensión de la iluminación en la caja operante; después de 10 segundos, se permite la ejecución de un nuevo ensayo. La acción descrita anteriormente se ha propuesto como un castigo al propiciar la disminución de ejecución de estas alternativas erróneas e incrementar el número de reforzadores obtenidos (Sánchez-Fuentes et al., 2021).

Al evaluar el desempeño de los sujetos Sapap3 KO durante el aprendizaje (primeros 100 ensayos \approx 3 sesiones) de las secuencias guiadas por retracción, se observó que estos sujetos presentan una tendencia a interrumpir la ejecución de la subsecuencia 2 generando visitas anticipadas al sitio de liberación de la recompensa (Mann-Whitney, $p < 0.01$; **Figura 8E**). Este fenómeno es evidenciado de igual manera si se analizan las sesiones de manera individual (**Anexo 3**, panel D; Mann-Whitney $p < 0.01$). Además, se demostró durante los primeros ensayos que ambos grupos interrumpen la secuencia; sin embargo, los sujetos control a lo largo del entrenamiento empiezan a completar ensayos a diferencia de los animales Sapap3 KO que se mantienen interrumpiendo la serie (**Figura 8F**, Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$). Lo anterior sugiere un déficit en la ejecución de acciones en orden serial, al presentar una mayor variabilidad en las respuestas, favoreciendo las formas erróneas (**Figura 8G**, Mann-Whitney $p < 0.05$). En resumen, los individuos Sapap3 KO sobre seleccionan la terminación anticipada de la secuencia para visitar el comedero para la colección de la recompensa que aún no se ha liberado (**Figura 8E**), obteniendo menos secuencias completas (**Figura 8F**) y mostrando una mayor variabilidad en sus acciones (**Figura 8G**). En consecuencia, presentan una menor acumulación de reforzadores a lo largo del aprendizaje de este tipo de secuencias (**Figura 8H**, Two-way ANOVA, $p < 0.01$).

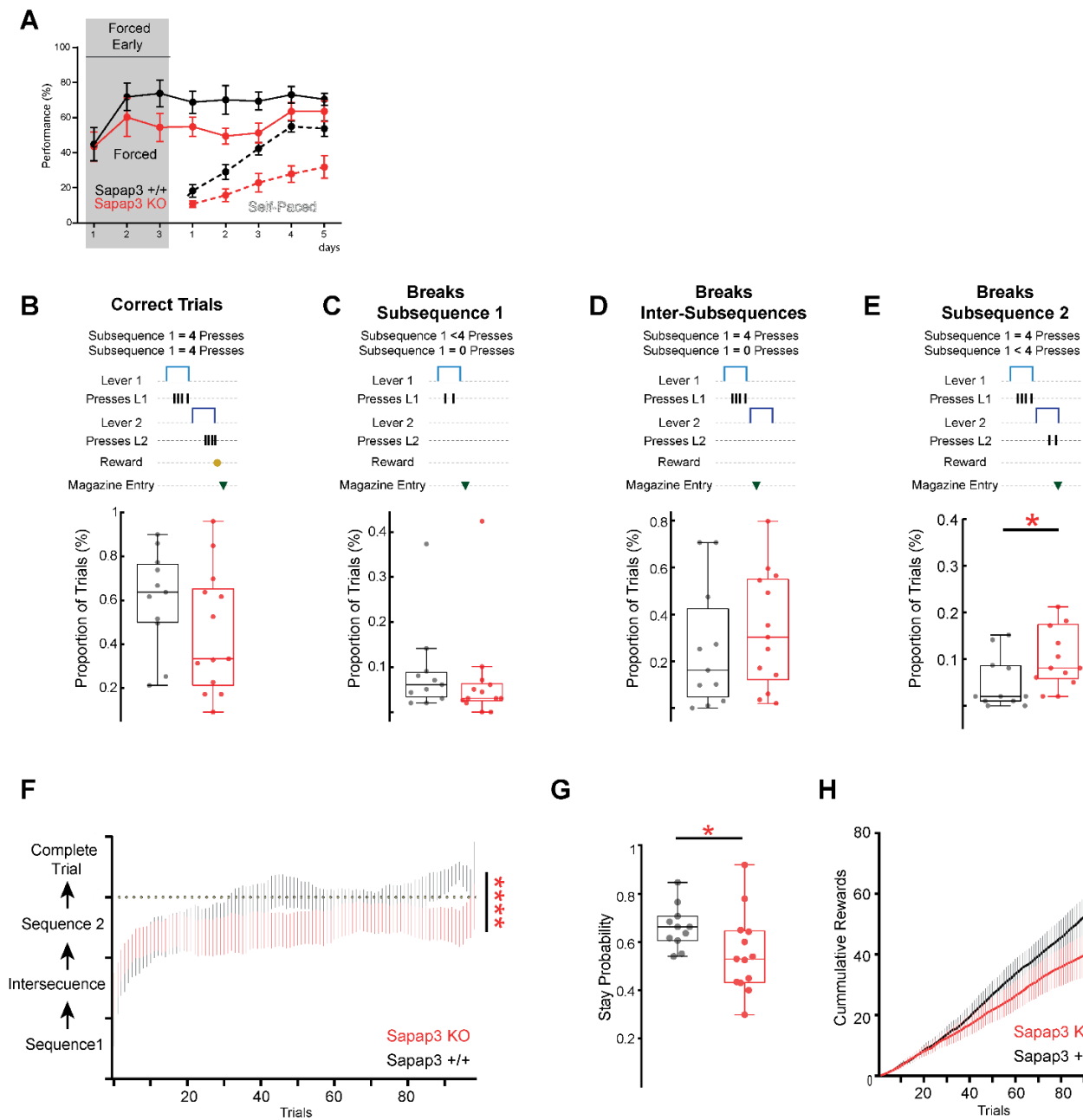


Figura 8. Los sujetos Sapap3 KO interrumpen la ejecución de cadenas de secuencias de orden serial.

A. Tomado de Figura 7B, el sombreado representa las sesiones de donde provienen los datos analizados en esta figura (Sapap3 +/+ : 11 ratones, Sapap3 KO: 13 ratones). **B.** Diagrama de un ensayo correcto (Panel Superior). Proporción de ensayos correctos para las primeras 100 repeticiones de secuencias guiadas por retracción (Panel Inferior). **C.** Diagrama de un ensayo incorrecto donde no se culmina la primera secuencia porque se intercala una visita al comedero (Aborto Subsecuencia1 = *Break Subsequence 1*; Panel Superior). Proporción de ensayos para esta categoría (Panel Inferior). **D.** Diagrama de un ensayo incorrecto donde se interrumpe la serie al terminar la primera secuencia y realizar una visita al comedero (Entrada al comedero Inter-Subsecuencia = *Break Inter-Subsequence*; Panel Superior). Proporción de ensayos para esta categoría (Panel Inferior). **E.** Diagrama de un ensayo incorrecto donde no se culmina la segunda secuencia porque se intercala una visita al comedero (Aborto Secuencia 2 = *Break Subsequence 2*; Panel Superior). Proporción de ensayos para esta categoría (Panel Inferior). **F.** Representación gráfica del tipo de ensayo en función de su posición en la secuencia completa a lo largo de los primeros 100 ensayos para cada uno de los grupos (Kruskall-Wallis test, $p < 0.01$; Error Estándar de la Media; Suavizado: 5 Ensayos; Sapap3 +/+ Negro ($n=11$); Sapap3 KO Rojo ($n=13$)). **G.** Probabilidad de mantenerse realizando el mismo ensayo en dos ensayos consecutivos (Mann-Whitney

$p < 0.05$). **H.** Recompensas acumuladas a lo largo de los primeros 100 ensayos para cada grupo experimental (Two-way ANOVA, $p < 0.01$).

Una vez que se introdujo el entrenamiento en secuencias guiadas, se sometió a los sujetos a un esquema donde se presentaron de manera intercalada ensayos guiados y ensayos donde el sujeto debe definir de manera autónoma el orden y la duración/longitud (tiempo/número de presiones) de los elementos individuales en la secuencia (Autoiniciados = *Self-Paced*; **Figura 9A**). Los bloques Guiados o Autoiniciados se mantenían hasta que se obtuvieran 3 ensayos correctos del tipo de ensayo en cuestión, por tanto, si se tienen en cuenta las alternativas erróneas de ejecución para cada tipo, cada bloque podía tener más de 3 ensayos.

En línea con los déficits encontrados durante el aprendizaje de los ensayos guiados por retracción, en esta fase intermedia que corresponde a los datos de las sesiones 4-6, en este mismo tipo de ensayos; los sujetos Sapap3 KO presentaron un desempeño más bajo con respecto a sus controles (Mann-Whitney $p < 0.05$, **Figura 9B**, inferior izquierda). Este bajo desempeño estuvo acompañado de una tendencia en el incremento de ensayos caracterizados por la interrupción de la primera subsecuencia (*Breaks S1*: Mann-Whitney $p = 0.06$; **Figura 9B**, inferior derecha; **Anexo 4C**, panel central). Cuando se analiza el avance en la ejecución de secuencias guiadas (*Subsequence 1* → *Intersequence* → *Subsequence 2* → *Complete Trial*) no hubo diferencias (**Figure 9C**, Kruskal Wallis test, $p > 0.05$). Dejando de existir una diferencia en el número de recompensas que se acumulan a lo largo de los ensayos con respecto al grupo control (**Figura 9E**, Two way ANOVA $p > 0.05$). No obstante, los sujetos Sapap3 KO se mantuvieron con una menor probabilidad de realizar un mismo tipo de ensayo consecutivamente (ej. presentar un ensayo correcto después de otro; **Figura 9D**, Mann-Whitney $p < 0.05$). Sugiriendo una desregulación en los mecanismos detrás de incorporar la información de ensayos anteriores.

Por otro lado, en la ejecución de las secuencias autoiniciadas, durante las primeras sesiones donde se actualizaba la contingencia y el sujeto debía realizar la secuencia en el orden correcto y, definir la longitud de las subsecuencias individuales, los animales Sapap3 KO presentaron una menor proporción de ensayos correctos con respecto a los sujetos control (**Figura 9F**, inferior izquierda; Mann Whitney $p < 0.05$). Al analizar las alternativas de errores para este tipo de secuencias, se observó una tendencia a incrementar los inicios erróneos (característicos de las secuencias autoiniciadas cuando se acumularon los primeros 100 ensayos (**Figura 9F**, inferior derecha; Mann Whitney $p = 0.05$), con diferencias significativas al comparar sesiones individuales (**Anexo 4F**, panel derecho).

De manera relevante, al igual que en los ensayos guiados, en las secuencias autoiniciadas los sujetos KO también abortaron la ejecución de la primera subsecuencia (*Breaks S1*, **Figura 9F**, panel intermedio; **Anexo 4C** panel derecha). El hecho de que las interrupciones se caractericen por la posterior visita al comedero y no por iniciar anticipadamente la segunda subsecuencia (**Anexo 4G**, panel derecho; *Breaks S1 by Press in L2*), probablemente evidencia que el abortar la serie por visitar el comedero se convirtió en una compulsión.

Al analizar el avance en la secuencia de orden serial a lo largo de los diferentes ensayos, los animales sapap3 KO presentaron un déficit al quedarse en las primeras partes de la secuencia, posiblemente derivado del incremento en los inicios erróneos y abortos en la secuencia (**Figura 9G**, Kruskal Wallis $p < 0.05$; **Anexo 4**, paneles extrema derecha; Mann Whitney $*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

Para evaluar si el incremento en la proporción de los inicios erróneos se daba no solo de manera general a lo largo del desarrollo de la sesión si no que era una conducta repetitiva y estereotipada, similar a lo observado en los sujetos con trastorno obsesivo compulsivo, se determinó su probabilidad de mantenimiento, definida como el número de pares de ensayos con inicio erróneo seguido de otro inicio erróneo dividida entre el número de inicios erróneos. Se observó que, efectivamente, los sujetos Sapap3 KO presentaban con una mayor probabilidad el repetir un inicio erróneo después de haberse equivocado de la misma manera en el ensayo anterior (**Figura 9H**, derecha; Mann Whitney $p < 0.01$). Dado que los ensayos erróneos son inmediatamente castigados con la retracción de las palancas y la suspensión de la iluminación de la caja operante por 10 segundos, la repetición consecutiva del mismo tipo de ensayo sugeriría posibles déficits en la asimilación de consecuencias negativas en este modelo. Además, se determinó que los sujetos Sapap3 KO presentan una menor probabilidad de realizar dos ensayos correctos consecutivos (**Figura 9H**, centro; Mann Whitney $p < 0.01$), sugiriendo también un déficit en la incorporación de la información obtenida en ensayos anteriores también en contextos positivos (como lo es la colección de un reforzador) explicando la menor acumulación de reforzadores observada en los sujetos Sapap3 KO (**Figura 9I**, Two-way ANOVA $p < 0.01$).

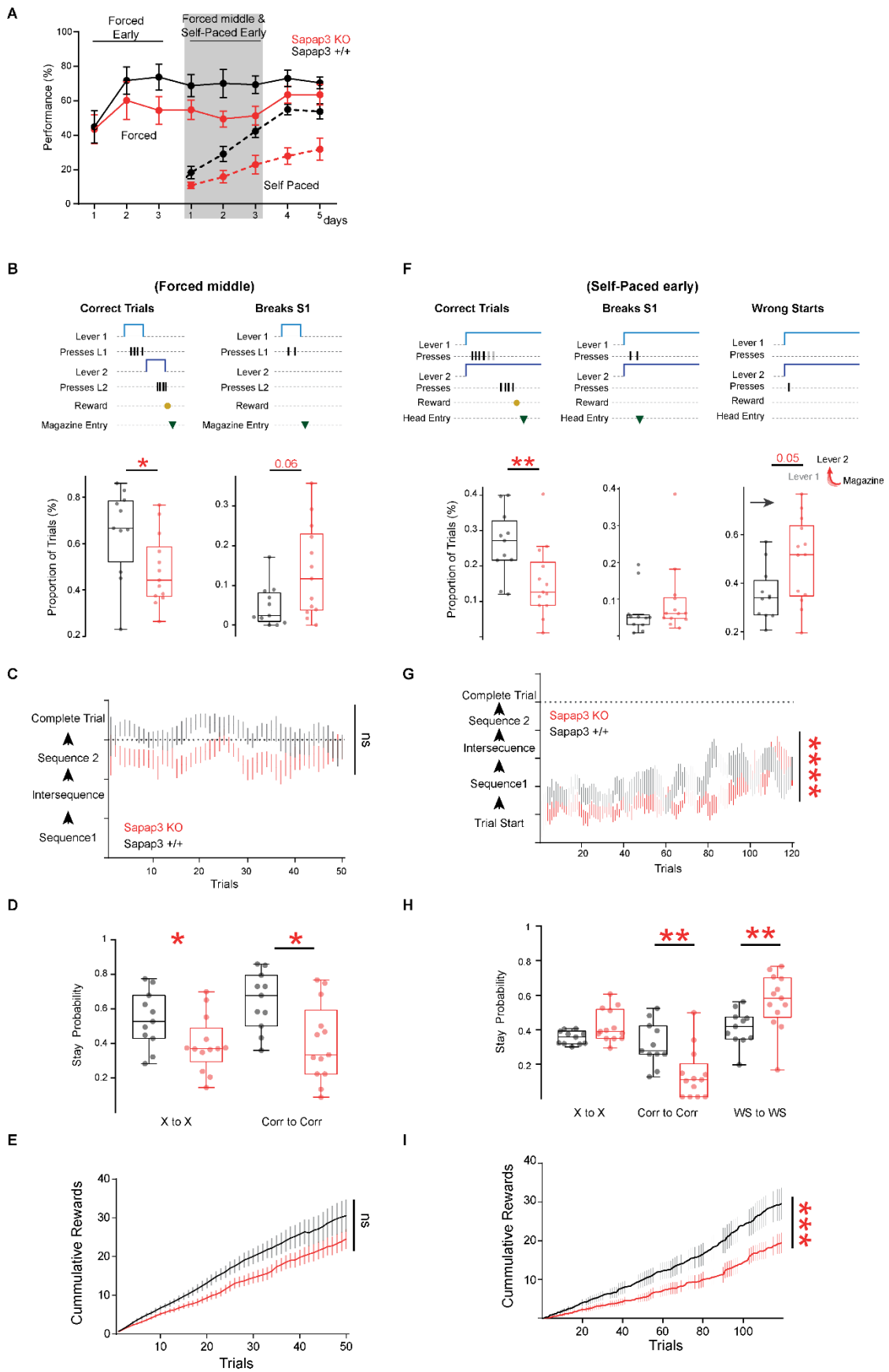


Figura 9. Los sujetos Sapap3 KO presentan un deficit en el aprendizaje y ejecución de secuencias guiadas por retracción y autoiniciadas. **A.** Tomado de Figura 7B, el sombreado representa las sesiones de donde provienen los datos analizados en esta figura (Sapap3 +/-: 11 ratones, Sapap3 KO: 13 ratones). **B.** Diagrama de un ensayo correcto y un aborto de secuencia 1 (Panel Superior). Proporción de ensayos correctos para las primeras 3 sesiones intercaladas para los ensayos guiados por retracción (Panel Inferior; Mann-Whitney * $p < 0.05$). **C.** Representación gráfica del tipo de ensayo en función de su posición en la secuencia completa a lo largo de los ensayos correspondientes para las primeras 3 sesiones (Kruskall-Wallis test, $p > 0.05$; Error Estándar de la Media; Suavizado: 5 Ensayos; Sapap3 +/- Negro (n=11); Sapap3 KO Rojo (n=13)). **D.** Probabilidad de mantenerse el mismo tipo de ensayos de manera general (X a X; Izquierda) y repetir un ensayo correcto en dos ensayos consecutivos (Corr a Corr; Derecha). **E.** Recompensas acumuladas a lo largo de las primeras tres sesiones intercaladas para ensayos guiados por retracción (Two-way ANOVA, $p > 0.05$). **F-I.** Igual a **B-E** para las primeras sesiones de secuencias autoiniciadas (*Self-Paced*).

En resumen, la caracterización de los sujetos Sapap3 KO durante la adquisición/ejecución de secuencias de acciones mostró que los animales de este genotipo presentan déficits definidos por la interrupción temprana de las secuencias (**Figuras 8E, 9B, 9F y Anexo 4C y 4F**) y, reflejados en la estructuración serial de las secuencias (**Figura 8F y 9G**). Así mismo se documentó una alteración en los mecanismos de retroalimentación de los ensayos anteriores (Correctos y Erróneos; **Figuras 9D y 9H**), siendo evidente que los reforzadores parecen no seleccionar las acciones a ejecutar mientras que los castigos si sobre seleccionan la ejecución de secuencias específicas de movimiento. De manera importante, ambos la ruptura temprana y los inicios erróneos podrían definirse como compulsiones.

La inhibición de la actividad estriatal corrige los déficits observados en el aprendizaje de secuencias de orden serial guiadas por retracción.

En línea con la hipótesis de la existencia de una desregulación en la actividad estriatal detrás de los déficits observados en el modelo Sapap3 KO, dados nuestros datos presentados en el capítulo 1 y, los estudios que demuestran la participación de esta estructura en el aprendizaje de acciones dirigidas a objetivos y en los procesos de selección y ejecución de patrones motores (Jin et al., 2014; Kim et al., 2017; Yin et al., 2006), se hipotetizó que la manipulación de la actividad neuronal del estriado mejoraría el desempeño de los sujetos deficientes de la proteína Sapap3 KO.

Para evaluar esta hipótesis se valoró el desempeño de los sujetos durante el aprendizaje de secuencias guiadas por retracción y se observó que los animales Sapap3 KO, cuya actividad en el estriado dorso medial fue inhibida en las primeras sesiones en el 50% de los ensayos (Inhibición optogenética por 7s, 550nm, activada por la ruptura de un haz infrarrojo previo al inicio de la ejecución; **Figura 10A-C**), presentaban un desempeño similar al grupo de animales Sapap3 +/-, que diferían del grupo control (**Figura 10A,**

Kruskall-Wallis $p < 0.001$; Comparación múltiple de Dunn: Sapap3 +/+ vs Sapap3 KO Arch $p > 0.05$; Sapap3 +/+ vs Sapap3 KO eYFP $p < 0.05$; Sapap3 KO Arch vs Sapap3 eYFP $p = 0.08$).

Analizando los efectos durante el entrenamiento, observamos que la inhibición optogenética de la actividad estriatal, a pesar de no mejorar en línea el desempeño de los animales (Comparando ensayos con luz vs ensayos sin luz (ON/OFF); **Figura 10D**, panel derecho), si reduce las interrupciones en la parte final de la serie (**Figura 10D**, panel derecho; Mann Whitney $p < 0.05$), déficits observados en el modelo Sapap3 KO durante el aprendizaje de secuencias guiadas por retracción (**Figura 8E**). Al analizar los eventos de manera acumulada (sin separar en ensayos inhibidos/no inhibidos), se observa como los sujetos cuya actividad estriatal fue inhibida terminan con mayor frecuencia las secuencias de orden serial comparada con el grupo Sapap3 KO que solo expresa la proteína reportera (**Figura 10E**, Two-way ANOVA: Sapap3 KO Arch vs Sapap3 KO eYFP $p < 0.005$; Sapap3 KO eYFP vs Sapap3 +/+ $p < 0.005$; Sapap3 KO Arch vs Sapap3 +/+ $p > 0.05$). Para corroborar que los efectos derivados de la inhibición no sean producto de una diferencia en el desempeño durante las fases previas al entrenamiento se cuantificó el número promedio de presiones por secuencia en la fase inmediata anterior (reforzamiento continuo 8). Se determinó que antes de que iniciara la fase de concatenación de subsecuencias en orden serial, no existía diferencia entre grupos (**Figura 10E**, inserto; Mann Whitney $p < 0.05$).

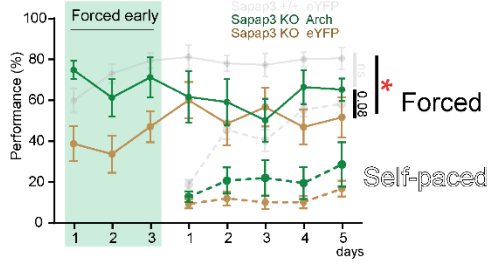
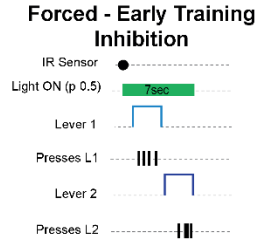
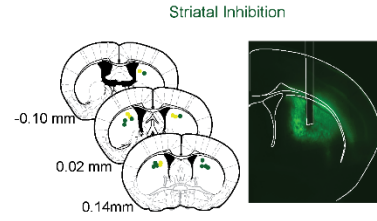
Las observaciones anteriores sugieren un mecanismo en el que los efectos observados tendrían influencia no directamente en el ensayo en el que se presenta el pulso de luz, sino que actúan en términos de la historia de aprendizaje. Como un acercamiento a esta hipótesis, se determinaron los efectos sobre la probabilidad de repetir el mismo tipo de ensayo de manera consecutiva. A partir de este análisis podemos sugerir que los sujetos Sapap3 KO mejoran su desempeño al incrementar la repetición de ensayos correctos tras un ensayo correcto (**Figura 10F**, Mann-Whitney $p < 0.05$). En línea con los datos anteriormente descritos, se evidenció que la inhibición general de la actividad estriatal incrementa el número de recompensas que los sujetos Sapap3 KO pueden acumular a lo largo de los primeros 100 ensayos comparados con el grupo control, asemejándose a los animales no deficientes de la proteína Sapap3 KO (**Figura 10G**, Two-way ANOVA, $p < 0.005$).

Para determinar si hay una contribución específica de los dos subcircuitos de proyección del estriado en los efectos observados de la inhibición general del estriado, se repitió el protocolo de inhibición utilizando sujetos A2a Cre Sapap3 KO y D1 Cre Sapap3 KO para la

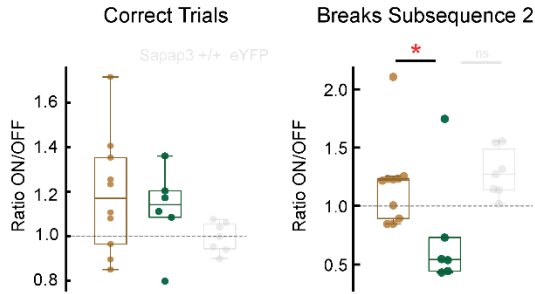
manipulación específica de la vía indirecta y directa, respectivamente (**Anexo 5A-B**). El desempeño de los sujetos fue determinado para cada uno de los grupos sin encontrar diferencias significativas (**Anexo 5C**, Kruskal-Wallis $p>0.05$). Sin embargo, solo la inhibición de la vía estriato-palidal redujo las interrupciones en la parte final de la ejecución de las secuencias guiadas por retracción, déficit en los animales Sapap3-KO (**Figura 10H**, derecha; Mann-Whitney $p<0.05$), sin afectar la proporción de ensayos correctos (**Figura 10H**, izquierda; Mann-Whitney $p>0.05$).

La inhibición de poblaciones estriatales específicas, a diferencia de la inhibición general, no produce una mejora en el desempeño de los sujetos reflejada a lo largo de los primeros 100 ensayos de secuencias guiadas por retracción (**Figura 10I**; Kruskal-Wallis test $p>0.05$). Además, se corroboró que los sujetos dobles transgénicos de cada uno de los grupos experimentales no presentaban diferencias en el protocolo previo al de la manipulación optogenética (**Figura 10I**, Inserto; Mann-Whitney $p>0.05$).

En línea con la hipótesis de la contribución de la inhibición en términos del historial de ensayos y no en línea, se evidenció que la manipulación vía específica no incrementa la probabilidad de repetir ensayos correctos, ni se reduce la probabilidad de repetir intentos erróneos. Lo que sugiere que los efectos sobre las interrupciones en la parte final de la secuencia, observados al inhibir la vía estriato-palidal (**Figura 10H**, panel derecho) tienen una acción aguda/transitoria al presentarse exclusivamente en ensayos inhibidos (en línea). Por último, al contrario de lo observado tras la inhibición general, el número de recompensas acumulado a lo largo de los ensayos no se incrementa con respecto a sus controles (**Figura 10K**).

A**B****C****D**

Striatal Inhibition (Forced early)

**H**

Pathway Specific Inhibition (Forced early)

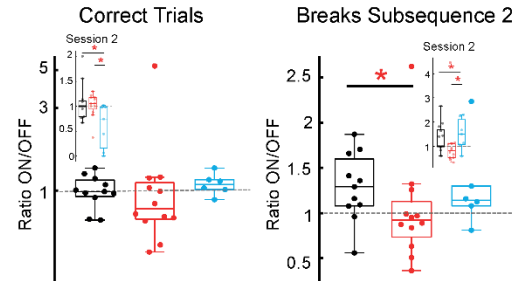
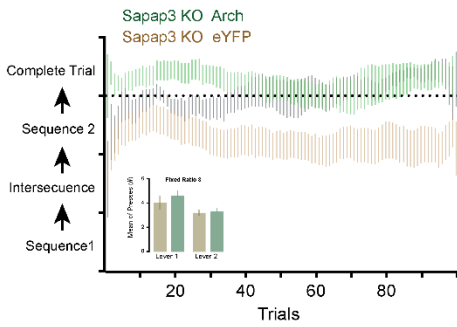
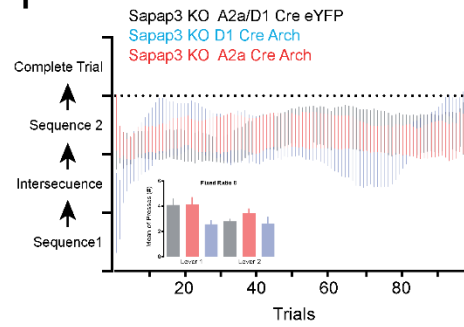
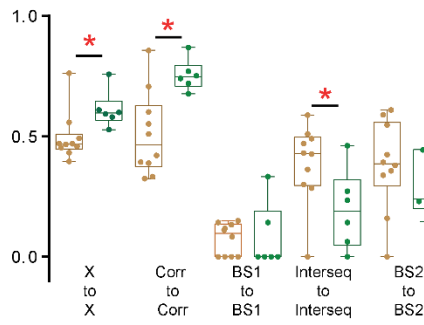
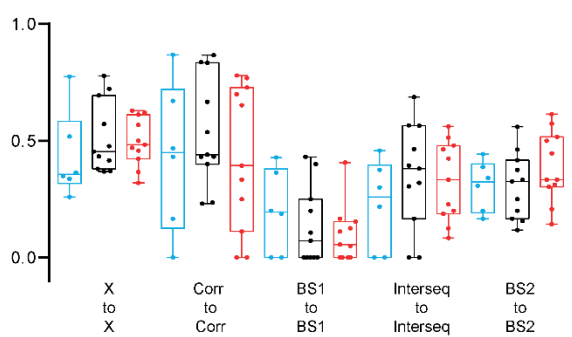
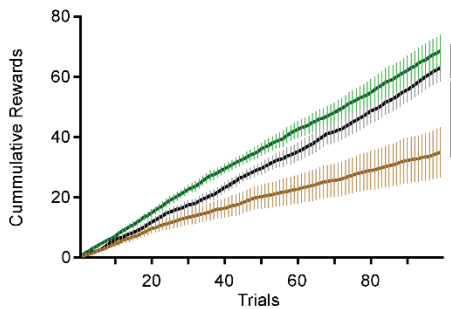
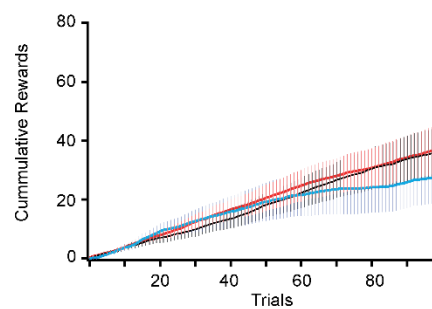
**E****I****F****J****G****K**

Figura 10. La inhibición optogenética estriatal corrige los déficits observados durante el aprendizaje de secuencias motoras en serie. **A.** Desempeño de los sujetos a lo largo de las sesiones de entrenamiento, el sombreado representa las sesiones inhibidas analizadas en esta figura. Líneas continuas: secuencias guiadas por retracción. Líneas discontinuas: secuencias autoiniciadas. (Gris: Sapap3 +/- eYFP, 7 ratones; Verde: Sapap3 KO Arch, 6 ratones; Café: Sapap3 KO eYFP, 9 ratones; Kruskal-Wallis $p < 0.001$; Comparación múltiple $p < 0.01$). **B.** Diagrama ilustrativo del protocolo inhibición. El pulso de luz era iniciado cuando el sujeto cruzaba el sensor infrarrojo en su camino a la palanca uno. **C.** Panel Izquierdo: Localización de las fibras ópticas para cada uno de los animales que componen los grupos experimentales Sapap3 KO Arch (círculos verdes) y Sapap3 KO eYFP (círculos amarillos). Panel Derecho: Fotomicrografía que ilustra la transfección viral AAV-Syn-Arch 3.0 para un sujeto Sapap3 KO representativo. **D.** Panel derecho: Radio ON/OFF de la proporción de ensayos correctos (Mann-Whitney $p > 0.05$); Panel Izquierdo: Radio ON/OFF de la proporción de interrupciones en la secuencia dos (Mann-Whitney, $p < 0.01$). **E.** Representación gráfica del tipo de ensayo en función de su posición en la secuencia completa a lo largo de los ensayos correspondientes para las primeras 3 sesiones inhibidas (Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$; Error Estándar de la Media; Suavizado: 5 Ensayos). Inserto: Promedio de presiones por secuencia para cada una de las palancas por grupo (Mann-Whitney, $p > 0.05$). **F.** Probabilidad de mantenerse el mismo tipo de ensayos de manera general (X a X), repetir un ensayo correcto (Corr a Corr), repetir una interrupción en secuencia uno (BS1 a BS1), repetir una interrupción inter-secuencia (Inter a Inter) o repetir una interrupción en secuencia dos (BS2 a BS2) en dos ensayos consecutivos (Mann-Whitney, $p < 0.05$). **G.** Recompensas acumuladas a lo largo del aprendizaje de las secuencias guiadas por reforzador donde se inhibió la actividad estriatal (Two way ANOVA, $p < 0.001$). **H.** Similar a **D** para la inhibición vía específica (Negro: A2a/D1 Sapap3 KO eYFP, 11 ratones; Rojo: A2a Sapap3 KO Arch, 12 ratones; Azul: D1 Sapap3 KO Arch, 6 ratones). Inserto: Determinación del radio ON/OFF de la proporción de cada tipo de ensayos para sesiones particulares (Mann-Whitney $p < 0.05$). **I.** Similar a **E** para los grupos de inhibición vía específica (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$; Error Estándar de la Media; Suavizado: 5 Ensayos). Inserto: Número promedio de presiones por secuencia para cada grupo (Mann-Whitney $p > 0.05$). **J.** Similar a **F** para la inhibición vía específica (Mann-Whitney, $p > 0.05$). **K.** Similar a **G**, reforzadores acumulados a lo largo de los primeros 100 ensayos (Two-way ANOVA, $p > 0.05$).

La inhibición estriatal general durante el aprendizaje de secuencias autoiniciadas reduce la presentación consecutiva de errores, mientras que la inhibición de la vía estriato-palidal reduce el desempeño general de los animales Sapap3 KO.

Para evaluar si la inhibición de la actividad estriatal tenía un efecto sobre los déficits observados en el modelo Sapap3 KO durante la ejecución de secuencias de orden serial autoiniciadas (**Figura 9**) se diseñó un protocolo de manipulación optogenética durante las tres primeras sesiones de entrenamiento intercalado. En estas sesiones, a pesar de que se encontraban ensayos guiados por retracción y autoiniciados, solo se inhibió esta última categoría (**Figura 11A-B**). A diferencia de los efectos de la manipulación durante el aprendizaje de secuencias guiadas, no se observó diferencia en el desempeño de los sujetos Sapap3 KO cuya actividad estriatal fue inhibida durante la realización de secuencias seriales autoiniciadas cuando se comparó con el grupo Sapap3 KO eYFP control (**Figura 11A**, Kruskal-Wallis test $p < 0.05$; Comparación múltiple de Dunn: Sapap3 KO Arch vs Sapap3 KO eYFP $p > 0.05$, Sapap3 KO Arch vs Sapap3 +/+ $p > 0.05$; Sapap3 KO eYFP vs Sapap3 +/+ $p < 0.01$).

Cuando se analizan los datos procedentes a los primeros 100 ensayos, en términos de proporción de ensayos inhibidos vs proporción de ensayos control, se observa que no existen afectaciones transitorias para el radio ON/OFF de ensayos correctos (**Figura 11C**, panel izquierdo; Mann-Whitney $p > 0.05$). Si se analiza exclusivamente la primera sesión, se observa que, en línea con lo observado en las secuencias guiadas por retracción, la inhibición general incrementa la proporción de ensayos correctos con respecto a sus controles (**Figura 11C**, panel izquierdo: Inserto; Mann-Whitney $p < 0.05$). Durante esta modalidad, los inicios erróneos surgen como una acción repetitiva observada en el modelo Sapap3 KO (**Figura 9F**, panel izquierdo), en el análisis de los efectos transitorios, este déficit no se ve corregido por la inhibición (**Figura 11C**, panel derecho, Mann-Whitney $p > 0.05$), salvo en una sesión específica (**Figura 11C**, panel derecho: Inserto; Mann-Whitney $p < 0.05$).

Al analizar el avance en las secuencias de orden serial durante los primeros 100 ensayos, los sujetos Sapap3 KO cuya actividad estriatal fue inhibida optogenéticamente, presentan un mayor avance en las secuencias con respecto a sus controles (**Figura 11D**, Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$; Sapap3 KO Arch vs Sapap3 eYFP $p < 0.01$). Estas observaciones, aunadas al panel C de esta figura, sugieren que, si bien los efectos no suceden de manera aguda, estos pudieran estar relacionados con la experiencia adquirida a lo largo de los ensayos.

De acuerdo con la hipótesis de que el déficit observado en los animales podría estar relacionado con el historial de ensayos y los efectos que el castigo tiene para moldear la conducta de los sujetos, se observó que la inhibición estriatal si reduce la probabilidad de mantener los inicios erróneos de manera consecutiva (**Figura 11E** WS to WS, Mann-Whitney $p < 0.05$), lo que fortalece el argumento que la actividad del estriado contiene una alteración de los mecanismos que dictan el aprendizaje por castigo en los sujetos Sapap3 KO. Con respecto a la asociación positiva mediada por el reforzamiento de ensayos correctos, no se observó que la inhibición propiciara la presentación consecutiva de estos ensayos (**Figura 11E**, corr to corr; Mann-Whitney $p > 0.05$), contrario a lo observado en los ensayos guiados por retracción (**Figura 10F**, corr to corr). Sin embargo, a pesar de reducir la presentación consecutiva de inicios erróneos, la inhibición general no genera un incremento en el número de reforzadores acumulados a lo largo de las primeras tres sesiones (**Figura 11F**; Two-way ANOVA, Sapap3 KO Arch vs Sapap3 KO eYFP $p > 0.05$; Sapap3 Arch vs Sapap3 +/+ eYFP y Sapap3 KO eYFP vs Sapap3 +/+ eYFP $p < 0.01$).

Por otra parte, se evaluaron los efectos de la inhibición vía específica sobre el desempeño de los sujetos durante el aprendizaje de secuencias de orden serial autoiniciadas. La inhibición de las vías directa e indirecta propicia una reducción en la proporción de ensayos correctos cuando se compara con una condición de no cambio (valor de 1 para el radio ensayos con luz/ ensayos sin luz; **Figura 11G**, panel izquierdo, Mann-Whitney $###p > 0.001$, $## p < 0.01$). Además, al inhibir la vía estriato-palidal se observó una tendencia a incrementar las interrupciones en la primera parte de la serie con respecto al grupo control (**Figura 11G**, panel central; Mann-Whitney $p = 0.07$). A diferencia de la inhibición general, la inhibición vía específica no muestra un efecto sobre la probabilidad de mantenimiento, sugiriendo que los efectos observados en términos de proporción se dan de manera transitoria (**Figura 11I**; Mann-Whitney $p > 0.05$). Por otra parte, y relacionado a la reducción en la proporción de ensayos correctos, la inhibición específica de la vía estriato-palidal, también impacta la conducta al reducir el número de reforzadores acumulados a lo largo de los ensayos (**Figura 11J**; Two-way ANOVA A2a/D1 Cre Sapap3 KO eYFP vs A2a Cre Sapap3 KO $p < 0.01$). Las observaciones anteriores sugieren que a la actividad de la vía indirecta es requerida para el correcto aprendizaje de secuencias autoiniciadas.

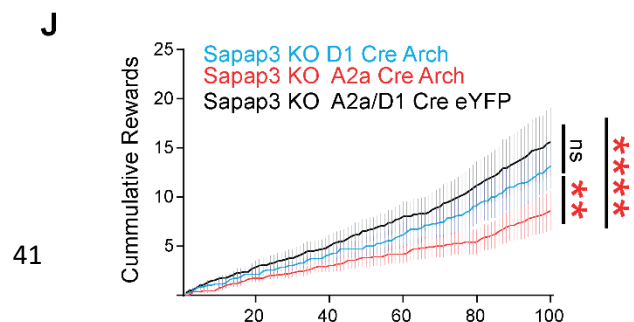
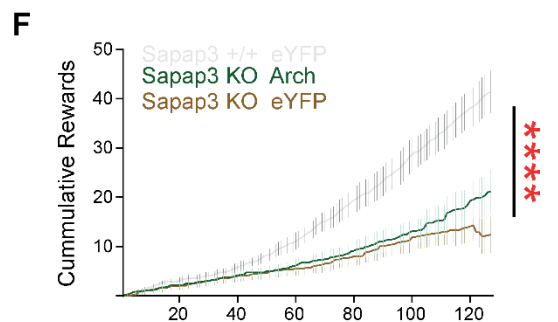
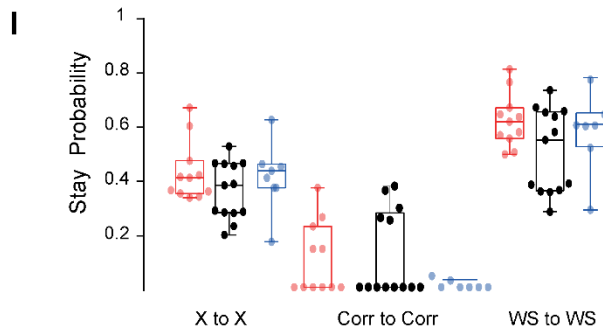
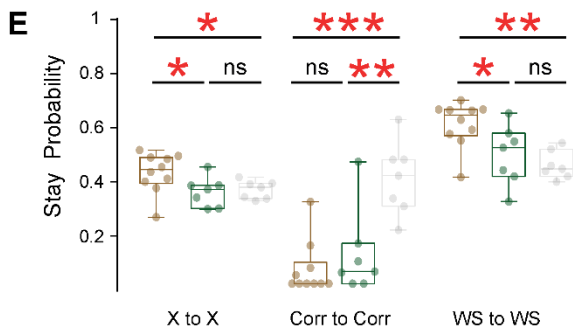
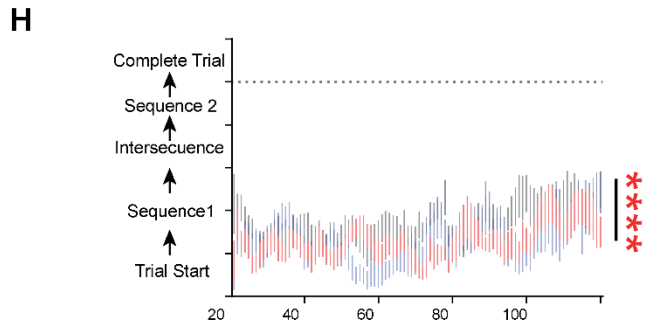
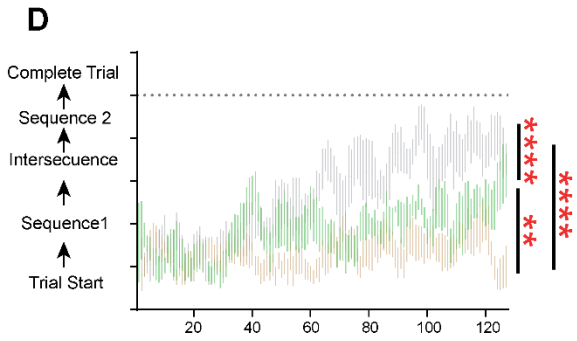
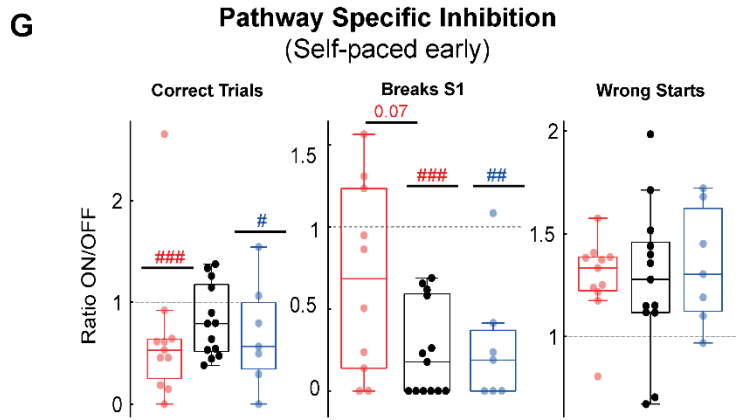
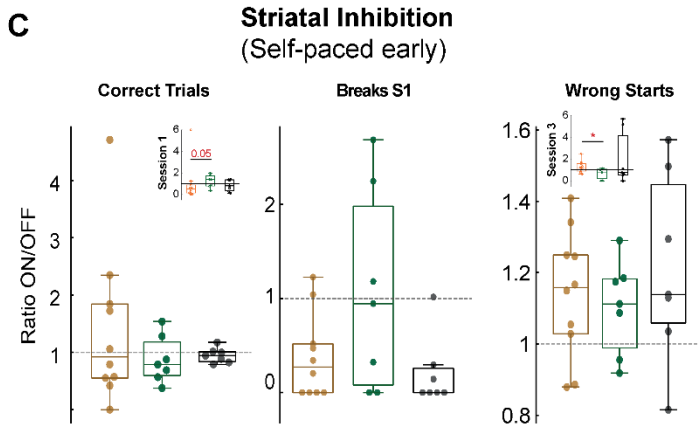
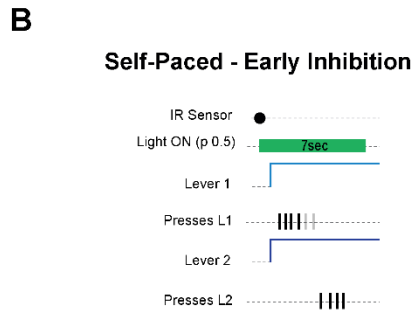
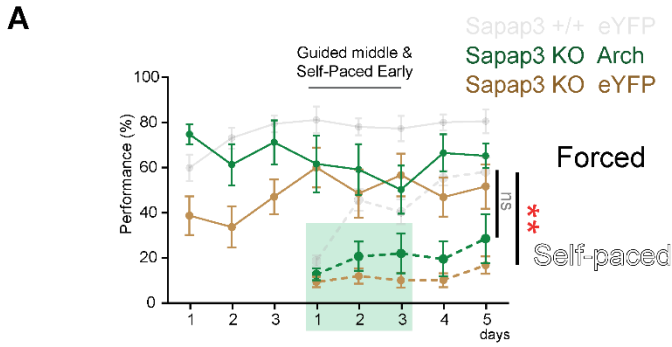


Figura 11. La inhibición de la vía indirecta afecta el aprendizaje de secuencias autoiniciadas.

A. Desempeño de los sujetos a lo largo de las sesiones de entrenamiento, el sombreado representa las sesiones inhibidas analizadas en esta figura. Líneas continuas: secuencias guiadas por retracción. Líneas discontinuas: secuencias autoiniciadas. (Gris: Sapap3 +/- eYFP, 7 ratones; Verde: Sapap3 KO Arch, 6 ratones; Café: Sapap3 KO eYFP, 9 ratones; Kruskall-Wallis $p < 0.001$; Comparación múltiple $p < 0.01$). **B.** Diagrama ilustrativo del protocolo inhibición. El pulso de luz era iniciado cuando el sujeto cruzaba el sensor infrarrojo en su camino a la palanca uno exclusivamente en los ensayos autoiniciados. **C.** Radio ON/OFF de la proporción de ensayos correctos (Panel izquierdo; Mann-Whitney $p > 0.05$). Inserto: Proporción ON/OFF de la sesión 1 de entrenamiento (Mann-Whitney, $p = 0.07$); Radio ON/OFF de la proporción de interrupciones en la secuencia uno (Panel central; Mann-Whitney, $p > 0.05$) y, de la proporción de inicios erróneos (Panel derecho; Mann-Whitney $p > 0.05$). Inserto: Proporción ON/OFF de la sesión 3 de entrenamiento (Mann-Whitney $p < 0.05$). **D.** Representación gráfica del tipo de ensayo en función de su posición en la secuencia completa a lo largo de los ensayos correspondientes para las primeras 3 sesiones inhibidas (Kruskall-Wallis test, $p < 0.0001$; Error Estándar de la Media; Suavizado: 5 Ensayos). **E.** Probabilidad de mantenerse el mismo tipo de ensayos de manera general (X a X), de repetir un ensayo correcto (Corr a Corr) o, de repetir un inicio erróneo (WS a WS) (Mann-Whitney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$). **F.** Recompensas acumuladas a lo largo del aprendizaje de las secuencias guiadas por reforzador donde se inhibió la actividad estriatal (Two way ANOVA, $p < 0.001$). **G.** Similar a **C** para la inhibición vía específica (Negro: A2a/D1 Sapap3 KO eYFP, 11 ratones; Rojo: A2a Sapap3 KO Arch, 12 ratones; Azul: D1 Sapap3 KO Arch, 6 ratones) (Mann-Whitney $p = 0.07$; # $p < 0.05$ en comparación contra un valor de uno). **H.** Similar a **D** para los grupos de inhibición vía específica (Kruskall-Wallis test, $p < 0.05$; Error Estándar de la Media; Suavizado: 5 Ensayos). **I.** Similar a **E** para la inhibición vía específica (Mann-Whitney, $p > 0.05$). **J.** Similar a **F**, reforzadores acumulados a lo largo de los primeros 100 ensayos (Two-way ANOVA, $p < 0.05$).

Inhibición de la actividad estriatal y vía específica de los animales Sapap3 KO durante la ejecución de secuencias de orden serial: Protocolos Tardíos.

Para evaluar si los fenotipos observados durante el aprendizaje de secuencias de orden serial se mantenían a lo largo del tiempo, se evaluó el desempeño de los sujetos en una fase posterior del entrenamiento (**Figura 12A**). Se diseñó una serie de protocolos de inhibición optogenética que se presentaron en sesiones independientes con una probabilidad de 0.5 en ambos tipos de secuencias; el primero de ellos consistió en replicar el protocolo de inhibición utilizado durante la fase de aprendizaje (protocolo de inicio: *Onset*) modificando la duración del pulso de luz a 2 segundos, este era iniciado cuando el ratón rompía el sensor infrarrojo de camino a la primera palanca. El segundo de ellos consistió en inhibir la actividad tras realizar la primera presión en la primera palanca (Protocolo primera presión: *First Press*) y, por último, el tercero consistió en inhibir la actividad antes de la transición entre palancas (Protocolo Transición: *Switch*; **Figura 12B**).

Al analizar solo las secuencias guiadas por retracción, se determinó que el protocolo de inhibición previo al inicio (*Onset*), a pesar de no presentar un efecto de manera aguda en términos de Radio ON/OFF (**Figura 12C**; Mann-Whitney $p > 0.05$), asemeja los efectos observados durante el protocolo temprano, donde se incrementa la repetición de la acción previa, lo que no sucede en los protocolos restantes (**Figura 12D**, panel izquierdo;

Friedmann test $p < 0.05$, comparación múltiple de Dunn $**p < 0.01$). En línea con los resultados descritos, la inhibición previa al inicio de la serie incrementa la repetición de ensayos correctos, a diferencia de la inhibición durante la transición entre subsecuencias, que reduce la probabilidad de mantenerse realizando ensayos correctos (**Figura 12D**; panel central; Friedman test $p < 0.05$, comparación múltiple de Dunn, $**p < 0.01$). Lo anterior se confirma al comparar estos datos contra el grupo control (**Figura 12D**, panel central; Mann-Whitney Sapap3 KO Syn eYFP vs Sapap3 KO Syn Arch *Onset* $p = 0.07$, Sapap3 KO Syn eYFP vs Sapap3 KO Syn Arch *Switch* $p < 0.05$). Además, de manera particular, solo la inhibición previa al inicio de la secuencia reduce la probabilidad de repetir los rompimientos en la parte final de la serie (**Figura 12D**, panel derecho; Entre protocolos: Friedmann test $p < 0.05$, comparación múltiple de Dunn $**p < 0.01$; Contra grupo control: Mann-Whitney $p < 0.05$). Lo que sugiere que la actividad estriatal previa al inicio de la secuencia podría estar relacionada con la acción que se demostró que se sobre selecciona por los animales Sapap3 KO (Break-S2, **Figura 8E**).

La inhibición de la vía estriato-palidal, a pesar de no mostrar efectos agudos (**Figura 12E**; Mann-Whitney $p > 0.05$), reduce particularmente las interrupciones en la parte final de la secuencia cuando se utiliza el protocolo previo al inicio de la secuencia (**Figura 12F**, panel derecho; Mann-Whitney $**p < 0.01$). Estos hallazgos fortalecen el argumento de que la vía indirecta es un nodo de control de acciones repetitivas observadas en el modelo de compulsiones Sapap3 KO. Por otra parte, la inhibición de la vía estriato-nigral previa al inicio reduce la repetición de ensayos independientemente del tipo (**Figura 12H**, panel izquierdo; Mann-Whitney $p < 0.05$), particularmente los ensayos correctos (**Figura 12H**, panel central; Mann-Whitney $p = 0.06$).

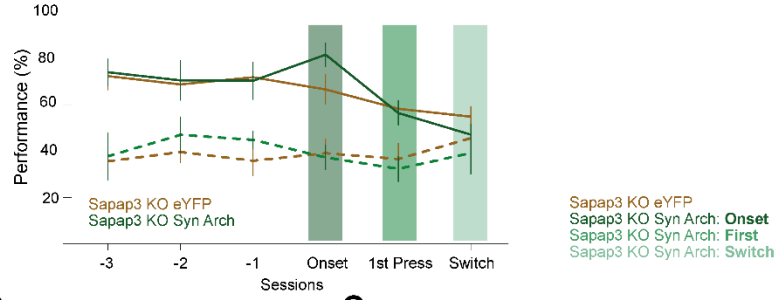
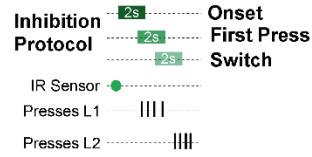
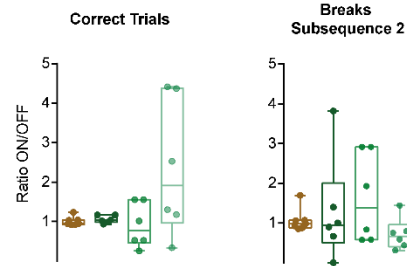
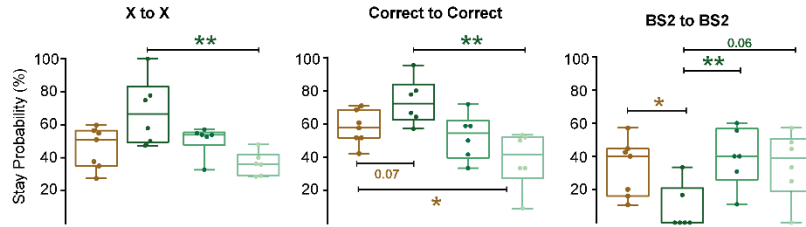
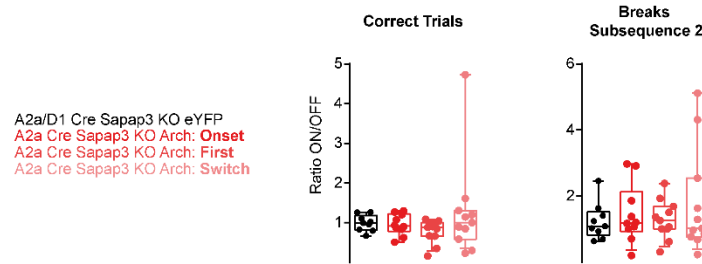
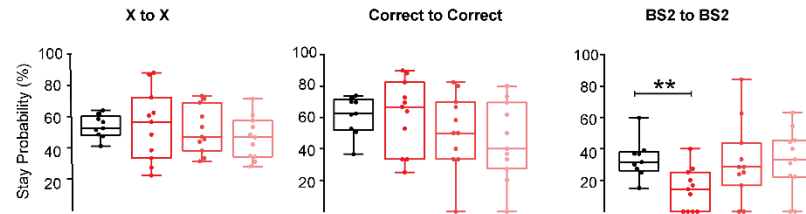
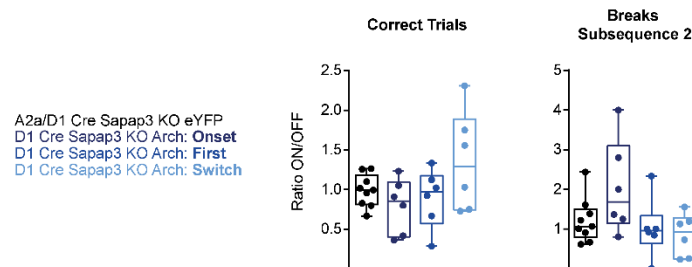
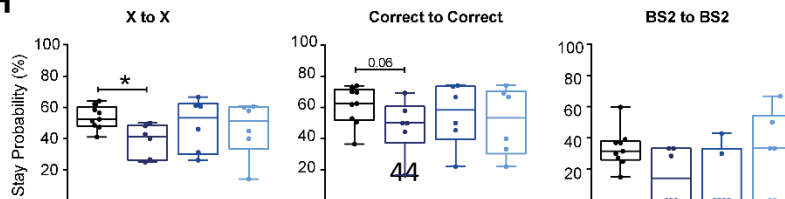
A**B****C****D****E****F****G****H**

Figura 12. Inhibición estriatal durante la ejecución de secuencias guiadas por retracción: Protocolo Tardío. A. Desempeño de los sujetos durante las sesiones de inhibición en fases posteriores, el sombreado representa las sesiones inhibidas analizadas en esta figura. Líneas continuas: secuencias guiadas por retracción. Líneas discontinuas: secuencias autoiniciadas. Protocolo Antes de Iniciar: *Onset*; Protocolo Inicio: *First Press*; Protocolo Transición: *Switch* (Café: Sapap3 KO eYFP, 7 ratones; Verde: Sapap3 KO Arch, 6 ratones; Two-Way ANOVA $p>0.05$). **B.** Diagrama ilustrativo de los protocolos de inhibición utilizados (2s de duración, un protocolo por sesión con una probabilidad del 50%). *Onset*: El pulso de luz era iniciado cuando el sujeto cruzaba el sensor infrarrojo en su camino a la palanca uno. *First Press*: El pulso de luz inicia tras la ejecución de la primera presión de la primera subsecuencia. *Switch*: El pulso de luz inicia tras la tercera presión de la primera subsecuencia. **C.** Radio ON/OFF de la proporción de ensayos correctos (Panel izquierdo; Entre Protocolos: Friedmann test, $p>0.05$; Comparación múltiple de Dunn *Onset* vs *Switch* $p>0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $p>0.07$). Radio ON/OFF de la proporción de interrupciones en la subsecuencia 2 (Panel derecho; Entre Protocolos: Friedmann test, $p>0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $p>0.05$). **D.** Probabilidad de mantenerse el mismo tipo de ensayos de manera general (X to X), de repetir un ensayo correcto (Correct to Correct) o, de repetir una interrupción en la secuencia 2 (BS2 to BS2) (Verde: Comparación entre Protocolos: Friedmann test, $**p<0.01$; Café: Comparación vs Grupo Control: Mann-Whitney, $*p<0.05$). **E.** Similar a **C.** para la inhibición específica de la vía indirecta (Entre Protocolos: Friedmann test, $p>0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $p>0.05$). **F.** Similar a **D** para la inhibición de la vía indirecta (Entre Protocolos: Friedmann test, $p>0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $**p<0.01$). **G.** Similar a **C** y **E** para la inhibición específica de la vía directa (Entre Protocolos: Friedmann test, $p>0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $p>0.05$). **H.** Similar a **D** y **F** para la inhibición de la vía directa (Entre Protocolos: Friedmann test, $p>0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $*p<0.05$).

Por último, se analizó el desempeño de los sujetos durante la realización de secuencias autoiniciadas mientras la actividad estriatal general era inhibida con los protocolos de inhibición optogenética anteriormente descritos (**Figura 13A**, líneas discontinuas). Se observó que la proporción de ensayos correctos es reducida cuando se inhibe la actividad estriatal antes del inicio de la ejecución de la serie autoiniciada (**Figura 13B**, panel izquierdo, Sapap3 KO Syn eYFP vs Sapap3 KO Syn Arch: *Onset* $p<0.05$). Este fenómeno puede explicarse por el incremento en la proporción de inicios erróneos (**Figura 13B**, panel central, Sapap3 KO Syn eYFP vs Sapap3 KO Syn Arch: *Onset* $p<0.05$). Sin embargo, se observó una reducción de los rompimientos en la parte final de la serie como fenómeno adicional en este protocolo de inhibición (**Figura 13B**, panel derecho, Sapap3 KO Syn eYFP vs Sapap3 KO Syn Arch $p<0.01$).

En términos de la probabilidad de mantenimiento consecutivo de acciones (ensayos) específicas, la inhibición de la actividad estriatal en todos los protocolos muestra una tendencia a reducir la repetición del mismo tipo de ensayo en intentos consecutivos (**Figura 13C**, panel extremo izquierdo; Mann Whitney $*p<0.05$) durante la ejecución de secuencias autoiniciadas. Particularmente, los protocolos que implican la inhibición estriatal una vez iniciada la ejecución de la secuencia (*First Press* y *Switch*) propician una reducción en la probabilidad de mantener realizando ensayos correctos de manera consecutiva (**Figura 13C**, panel izquierdo; Mann-Whitney $*p<0.05$). La repetición consecutiva de inicios

erróneos no se ve afectada por la manipulación de la actividad estriatal, mientras que solo el protocolo de inhibición durante la transición entre subsecuencias propicia una reducción en la repetición de interrupciones en la parte final de la serie autoiniciada (**Figura 13C**, panel extremo derecho; Mann-Whitney $*p < 0.05$).

La inhibición de la vía estriato-palidal en las fases tempranas de la serie (Protocolo: *Onset* y Protocolo: *First Press*) propicia una reducción en el desempeño de los sujetos (**Figura 13D**, panel izquierdo; Mann-Whitney $*p < 0.05$). Los efectos observados con estos protocolos, a su vez, difieren de la inhibición realizada durante la transición entre subsecuencias (**Figura 13D**, panel izquierdo; Friedmann test $p < 0.05$, Comparación múltiple de Dunn $*p < 0.05$). Inhibir la actividad de la vía indirecta previo el inicio de la ejecución de secuencias incrementó los inicios erróneos cuando se comparó contra el grupo control (**Figura 13D**, panel central; Mann-Whitney $p < 0.001$). En línea con los efectos observados durante la manipulación general de la actividad estriatal, la inhibición previa al inicio reduce las interrupciones en la parte final de la serie control (**Figura 13D**, panel derecho; Mann-Whitney $p < 0.05$). Es importante resaltar que solo la manipulación de la vía estriato-palidal en los sujetos Sapap3 KO A2a afecta la ejecución de la segunda secuencia lo que no sucede de manera aguda tras la manipulación momento antes de transitar a la parte final de la serie (**Figura 13D**, panel derecho; Friedmann test $p < 0.05$, Comparación múltiple de Dunn, Protocolo *Onset* vs Protocolo *Switch* $p < 0.05$). Adicionalmente, no fueron observados efectos sobre la probabilidad de mantenimiento durante la ejecución de secuencias autoiniciadas tras la inhibición de la vía indirecta (**Figura 13E**, Mann-Whitney $p < 0.05$; Friedmann test $p > 0.05$, Comparación Múltiple de Dunn $p < 0.05$).

Por último, la inhibición de la vía estriato-nigral previa al inicio incrementa la proporción de inicios erróneos en los bloques de secuencias autoiniciadas (**Figura 13F**, panel central; Mann-Whitney $p < 0.01$), sin afectar la probabilidad de mantenimiento de este tipo de ensayos (**Figura 13G**, panel central derecho; Mann-Whitney $p > 0.05$). Sin embargo, la inhibición de esta subpoblación neuronal reduce la probabilidad general de que los sujetos repitan de manera consecutiva la acción previamente elegida (**Figura 13G**, panel extremo izquierdo; Mann-Whitney $p < 0.05$).

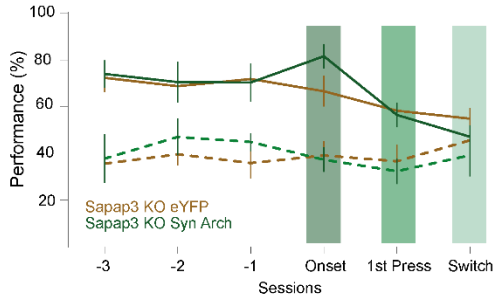
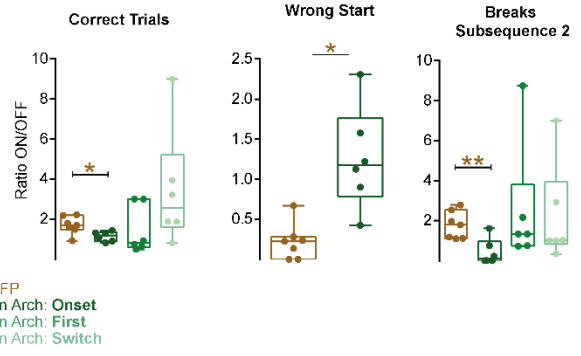
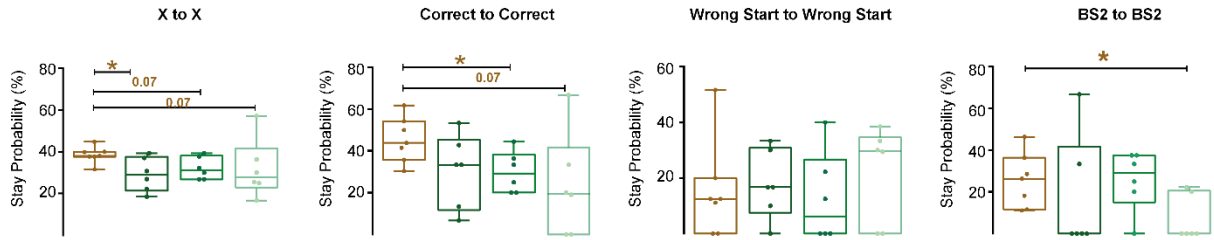
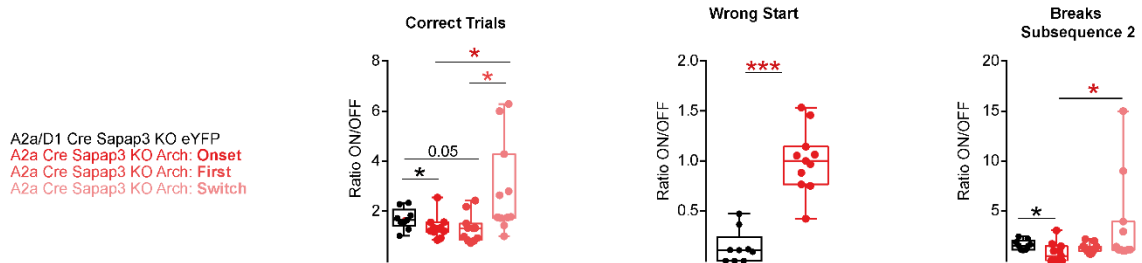
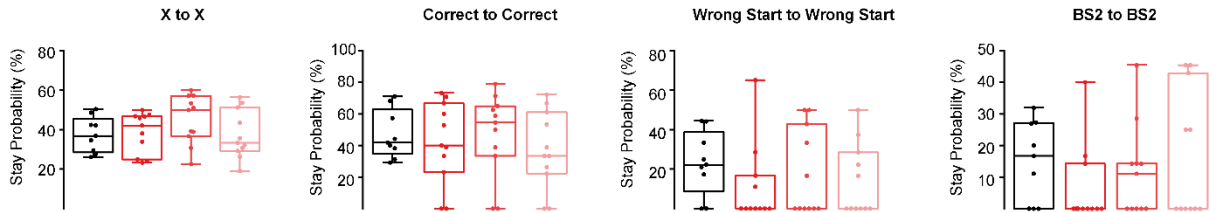
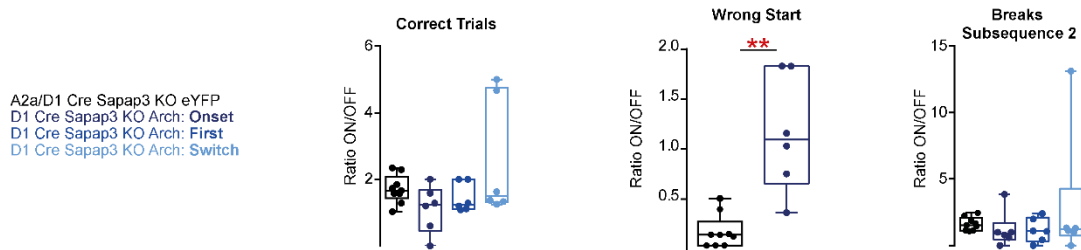
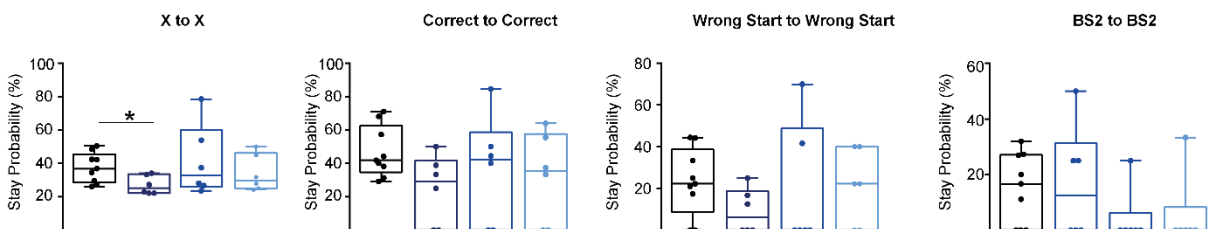
A**B****C****D****E****F****G**

Figura 13. Inhibición estriatal durante la ejecución de secuencias autoiniciadas: Protocolo Tardío. **A.** Desempeño de los sujetos durante las sesiones de inhibición en fases posteriores, el sombreado representa las sesiones inhibidas analizadas en esta figura. Líneas continuas: secuencias guiadas por retracción. Líneas discontinuas: secuencias autoiniciadas. Protocolo Antes de Iniciar: *Onset*; Protocolo Inicio: *First Press*; Protocolo Transición: *Switch* (Café: Sapap3 KO eYFP, 7 ratones; Verde: Sapap3 KO Arch, 6 ratones; Two-Way ANOVA $p > 0.05$). **B.** Radio ON/OFF de la proporción de ensayos correctos (Panel izquierdo; Entre Protocolos: Friedmann test, $p > 0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $*p < 0.05$). Radio ON/OFF de la proporción de inicios erróneos (Panel central; Mann-Whitney $p < 0.05$). Radio ON/OFF de la proporción de interrupciones en la subsecuencia 2 (Panel derecho; Entre Protocolos: Friedmann test, $p > 0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $**p < 0.01$). **C.** Probabilidad de mantenerse el mismo tipo de ensayos de manera general (X to X), de repetir un ensayo correcto (Correct to Correct), de repetir un inicio erróneo (Wrong start to wrong start) o, de repetir una interrupción en la secuencia 2 (BS2 to BS2) (Comparación entre Protocolos: Friedmann test, $p > 0.05$; Café: Comparación vs Grupo Control: Mann-Whitney, $*p < 0.05$). **D.** Similar a **B** para la inhibición específica de la vía indirecta (Entre Protocolos: Friedmann test, $p < 0.05$, Comparación múltiple de Dunn $*p < 0.05$, $*p < 0.01$; Contra grupo control: Mann-Whitney $p < 0.05$). **E.** Similar a **C** para la inhibición de la vía indirecta (Entre Protocolos: Friedmann test, $p > 0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $p > 0.05$). **F.** Similar a **B** y **D** para la inhibición específica de la vía directa (Entre Protocolos: Friedmann test, $p > 0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $**p < 0.01$). **G.** Similar a **C** y **E** para la inhibición de la vía directa (Entre Protocolos: Friedmann test, $p > 0.05$; Contra grupo control: Mann-Whitney $*p < 0.05$).

La estandarización de la tarea conductual utilizada en este capítulo dio lugar a la siguiente publicación indexada:

Sánchez-Fuentes A., Ramírez-Armenta K.I., Verma-Rodríguez A.K., Díaz-Hernández E., Aguilar-Palomares A., Ramírez-Jarquín J.O., Tecuapetla F. The Contribution of Premotor Cortico-Striatal Projections to the Execution of Serial Order Sequences. DOI: 10.1523/ENEURO.0173-21.2021

La posterior implementación de esta en los sujetos deficientes de la proteína Sapap3 y los hallazgos descritos detalladamente en este capítulo forman parte de un tercer producto de publicación que se encuentra en preparación (Carátula, **Anexo 8**).

DISCUSIÓN

Capítulo I. Estudio de la Contribución Estriatal a la Generación de Conductas Compulsivas en el Modelo de Acicalamiento Excesivo: Sapap3 KO

En el presente estudio, se utilizó la conducta de acicalamiento excesivo como un acercamiento al estudio de la contribución de los circuitos estriatales a la generación de conductas compulsivas. Se confirmó el fenotipo de acicalamiento excesivo reportado previamente para el modelo Sapap3-KO (Burguière et al., 2013; Mahgoub et al., 2016; Manning et al., 2019; Welch et al., 2007). Además, nuestro estudio aporta a la caracterización del modelo que la duración promedio de un evento de acicalamiento es mayor en el Sapap3 KO.

Varios estudios han evaluado los efectos de la delección de la proteína Sapap3 sobre la locomoción con resultados contradictorios (Boom et al., 2019; Hadjas et al., 2020; Welch et al., 2007). En este trabajo, observamos una clara reducción de la locomoción que no se correlaciona con la intensidad del fenotipo de acicalamiento. Esta falta de correlación entre el acicalamiento y otras conductas se ha reportado anteriormente para el fenómeno de acicalamiento y la ansiedad (Boom et al., 2019; Manning et al., 2019), así como para el acicalamiento y el desempeño en el condicionamiento operante (Manning et al., 2019), lo que apoya la idea de que pudieran ser mecanismos independientes los que gobiernan estos fenómenos.

Durante los registros de imagenología de calcio de la actividad estriatal a nivel de célula única en ratones Sapap3-KO en libre movimiento, se observó que las señales de calcio eran más pequeñas en amplitud con respecto al grupo control. Lo anterior, corrobora los hallazgos *in vitro*, que sugieren una alteración en las corrientes postsinápticas en neuronas espinosas medianas (MSN, por sus siglas en inglés) mediada por receptores AMPA en ratones Sapap3-KO después de la estimulación cortical (Chen et al., 2011; Hadjas et al., 2019; Wan et al., 2011; Welch et al., 2007). Este proyecto se enfocó en estudiar la región posterior del estriado (según Matamales et al. 2016, el rango de coordenadas anatómicas que cubre el estriado posterior es de 0,5 mm a -1,5 mm), ya que se ha asociado con la flexibilidad conductual y la transición de conductas dirigidas a objetivos a conductas habituales (Matamales et al., 2020; Yin et al., 2006), además de recibir entradas de OFC y M2, regiones que han sido implicadas en la generación de compulsiones (Radua et al., 2010; J.-Y. Rotge et al., 2008; Shaw et al., 2015) .

La proporción de neuronas moduladas durante el inicio y mantenimiento del acicalamiento fue mayor en los sujetos deficientes de la proteína Sapap3 comparada con animales control. Este hallazgo coincide con estudios que reportan la modulación de la actividad en varias regiones del cerebro, incluido el núcleo caudado, durante los protocolos de provocación sintomática en pacientes con TOC (Radua et al., 2010; Rauch et al., 1994; J. Y. Rotge et al., 2009). Por ejemplo, se ha demostrado la activación del núcleo caudado durante la provocación de conductas de descontaminación (Mataix-Cols et al., 2004). Nuestros resultados sugieren que la actividad sostenida de las células estriatales durante la serie de acicalamiento puede estar detrás del mantenimiento de las secuencias motoras compulsivas.

Contrario a nuestra hipótesis inicial, basada en la activación de las células del estriado durante los eventos de acicalamiento en el modelo de compulsiones, la inhibición de la actividad del estriado exacerbó el fenotipo de acicalamiento. Una posible explicación es que este protocolo de inhibición afecta no solo a las neuronas de proyección, si no que inhibe la actividad de las interneuronas estriatales, cuyo papel clave en la regulación de la actividad estriatal ya se ha demostrado (Silberberg & Bolam, 2015; Tepper et al., 2018). Por ejemplo, estudios anteriores han sugerido que las interneuronas de parvalbúmina contribuyen a la generación de respuestas compulsivas (Burguière et al., 2013; Corbit et al., 2019; Hadjas et al., 2020). Es importante destacar que, aunque no se observó una relación entre el acicalamiento y la locomoción en el Sapap3-KO sin inhibición de la luz al inhibir las neuronas del estriado dorso-medial de manera inespecífica, se observó una relación entre estos dos parámetros ya que el aumento del acicalamiento correspondió a los segundos en los que se la locomoción se encontró decrementada. Por tanto, se sugiere una relación entre estos dos parámetros en el Sapap3-KO mediada por la actividad del núcleo estriado. Es importante tener en cuenta que en los grupos control (Sapap3-KO eYFP y C57BL6/J Arch) el acicalamiento y la locomoción no se vieron afectados.

La reducción en el fenotipo de acicalamiento observada durante la inhibición específica de las neuronas de la vía indirecta podría explicarse a la luz de estudios que analizan los efectos de los fármacos utilizados para tratar las conductas compulsivas en pacientes con TOC. Los principales agentes farmacológicos utilizados para tratar el TOC son inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS). Estudios anteriores han demostrado que los ISRS, como la fluvoxamina, aumentan la disponibilidad de los receptores D2, así como su afinidad de unión, lo que se ha asociado con la eficacia del tratamiento (Ducasse et al., 2014; Moresco et al., 2007). Como los receptores D2 están relacionados con la disminución de la excitabilidad neuronal y se utilizan como marcador de las neuronas de la vía indirecta

en el cuerpo estriado (Surmeier et al., 1996), la reducción de los episodios de acicalamiento observados durante la inhibición de esta vía puede explicar en parte los efectos observados durante el tratamiento del TOC. Además, esta contribución específica de la vía podría estar relacionada con el hecho de que en este modelo se han descrito déficits cortico-estriatales específicos (p. Ej., Alteración en la interacción de las entradas cortico-estriatales; (Corbit et al., 2019; Hadjas et al., 2020; Simon et al., 2010)), quizás específicamente en neuronas de la vía indirecta. Los estudios de resonancia magnética funcional han demostrado la activación de la corteza orbitofrontal lateral (IOFC) durante las tareas de provocación sintomática en pacientes con TOC (J.-Y. Rotge et al., 2008; Simon et al., 2010), y se ha sugerido que la inhibición de la actividad estriatal mediante la activación de las terminales de IOFC reduce el comportamiento de aseo excesivo en un paradigma de condicionamiento clásico (Burguière et al., 2013). En otro estudio, las neuronas espinosas del medio estriado mostraron una respuesta aumentada a la activación optogenética in vitro de los terminales M2 en el cuerpo estriado en los ratones Sapap3-KO, lo que sugiere una desregulación de la actividad en el circuito cortico-estriatal (Corbit et al., 2019). Se necesitan estudios más detallados para dilucidar la contribución de circuitos cortico-estriatales-talámico específicos a la generación de conductas compulsivas.

Finalmente, la inhibición de las neuronas estriatales de la vía directa aumentó la locomoción en campo abierto de los animales Sapap3-KO, lo cual no pudo observarse en animales control, lo que indica que ambas vías estriatales están desreguladas en estos ratones. Las alteraciones observadas en los circuitos cortico-estriatales reportadas en este modelo podrían impactar en el procesamiento y selección de programas motores, funciones asociadas al núcleo estriado (Kim et al., 2017; Schmidt et al., 2013), el cual se ha sugerido estar alterado en pacientes con TOC (Ahmari & Dougherty, 2015; Saxena et al., 2001). Otra explicación de los efectos conductuales inducidos por la inhibición optogenética podría ser que las alteraciones de la frecuencia de activación neuronal podrían generar patrones patológicos en el cuerpo estriado (Grover et al., 2021).

En resumen, los ratones Sapap3-KO presentan, además de un fenotipo de acicalamiento excesivo, disminución de la locomoción y eventos de calcio más pequeños que los sujetos Sapap3 +/+. Además, la inhibición optogenética del cuerpo estriado (DMS) aumenta el acicalamiento excesivo y reduce la locomoción general en el modelo de compulsiones: Sapap3 KO. De manera importante, solo la inhibición específica de las neuronas estriato-palidales disminuye el fenotipo de acicalamiento observado en los ratones Sapap3 KO. Es importante destacar que la inhibición específica tanto de la vía directa como de la indirecta aumenta la locomoción en los ratones Sapap3 KO, lo que sugiere una contribución

particular de esta última en el control de la locomoción en este modelo. La reducción de los fenotipos patológicos observados en el modelo Sapap3 KO (acicalamiento excesivo y locomoción decrementada) mediante la inhibición de la vía indirecta sugiere que los tratamientos que alivian los síntomas compulsivos en pacientes con TOC podrían funcionar a través de esta población estriatal.

Capítulo 2: Estudio de la Contribución Estriatal sobre el Aprendizaje y Ejecución de Secuencias de Orden Serial en Modelo de Compulsiones: Sapap3 KO.

Partiendo de las hipótesis donde la pérdida de sensibilidad a los vínculos acción-recompensa y las alteraciones en los procesos de selección de acciones subyacen la generación de conductas compulsivas (Everitt & Robbins, 2005; Fava et al., 2014; Robbins et al., 2012), implementamos el paradigma conductual de secuencias de orden serial reportado por Sánchez-Fuentes y colaboradores (Sánchez-Fuentes et al., 2021) en el modelo de compulsiones Sapap3 KO. Dicho paradigma nos permitió estudiar el aprendizaje y ejecución de conductas seriales dirigidas a objetivos en dos modalidades: 1) secuencias guiadas por estímulos externos y, 2) secuencias autodeterminadas por el individuo.

Se observó que los sujetos Sapap3 KO, durante el desarrollo de secuencias de orden serial guiadas por el estímulo de retracción, presentan una tendencia a interrumpir la ejecución en la parte final de la secuencia, generando visitas anticipadas al sitio de liberación de la recompensa, lo que propicia una reducción en la acumulación de reforzadores comparados con sujetos control. En relación directa con este hallazgo, se ha demostrado que, lesiones en el estriado dorsal de ratas causa una reducción (mayor al 50%) en la tasa de terminación de una secuencia de orden serial innata (Cromwell & Berridge, 1996). Así mismo, se ha reportado que manipulaciones optogenéticas de la actividad de neuronas estriatales, propician alteraciones en la estructura de secuencias de palanqueo (Geddes et al., 2018; Sánchez-Fuentes et al., 2021; Tecuapetla et al., 2016). Los animales Sapap3 KO, cuya actividad en el estriado dorso-medial fue inhibida redujeron particularmente las interrupciones en la parte final de la serie, presentando un desempeño similar al grupo de animales Sapap3 +/- . La reducción de este patrón conductual específico fue confirmado al inhibir exclusivamente la actividad de neuronas de la vía estriato-palidal. Estudios previos han reportado que la activación de las neuronas de la vía indirecta en animales control, propicia rompimientos anticipados de las secuencias que se están ejecutando (Geddes et al., 2018; Tecuapetla et al., 2016). Por tanto, estos resultados sugieren una alteración en

los patrones de actividad estriatal, particularmente de la vía indirecta (hiperactivación), que subyacen los déficits observados en el desarrollo de secuencias de orden serial en el modelo Sapap3 KO, caracterizados por la terminación anticipada repetitiva de dichas secuencias.

Con respecto a la ejecución de secuencias autoiniciadas, se observó que los sujetos Sapap3 KO presentaban con una mayor probabilidad la repetición de un inicio erróneo después de haberse equivocado de la misma manera en el ensayo anterior. Estos resultados coinciden con reportes en los que pacientes diagnosticados con OCD presentan una mayor tendencia a permanecer eligiendo la misma acción tras una consecuencia negativa en tareas de “elección de un/dos paso/s” o de “cambio intradimensional” con respecto a individuos sanos (Castro-Rodriguez et al., 2020; Samuel R. Chamberlain et al., 2007; Voon et al., 2015). En este trabajo se demostró que solo la inhibición estriatal general, y no vía específica, reduce la probabilidad de presentar inicios erróneos de manera consecutiva. Es importante hacer hincapié que los efectos no se observaron de manera transitoria (solo en ensayos inhibidos) si no en términos del historial de ensayos. Los resultados expuestos fortalecen el argumento de que el modelo de compulsiones Sapap3 KO también presenta alteraciones en los mecanismos de aprendizaje por asociación negativa similar a los observados en los individuos con OCD, y que estos pueden ser aminorados tras la manipulación de la actividad estriatal.

Con respecto a los efectos de la inhibición estriatal y vía específica en periodos posteriores del entrenamiento, solo la inhibición previa al inicio de la secuencia de orden serial guiada y autoiniciada, reduce la probabilidad de rompimientos en la parte final de la serie. Lo que sugiere que la actividad estriatal previa al inicio de la secuencia podría estar relacionada con la acción que se demostró que se sobre selecciona por los animales Sapap3 KO. Se ha reportado que la actividad estriatal observada previa al inicio de una secuencia autoiniciada aprendida está relacionada con la ejecución de un patrón conductual específico (Jin & Costa, 2010), lo que permitiría hipotetizar que al reducir la actividad previa al inicio de una secuencia en ratones Sapap3 KO, permitiría la selección de otros patrones motores que compiten con el que se repite en mayor proporción.

En términos de la contribución vía específica en periodos posteriores, la inhibición de la vía estriato-palidal durante la fase tardía del entrenamiento, nuevamente reduce particularmente las interrupciones en la parte final de la secuencia cuando se utiliza el protocolo previo al inicio. Estos hallazgos fortalecen el argumento de que la vía indirecta surge como un nodo de control de acciones repetitivas observadas en el modelo de

compulsiones Sapap3 KO. La inhibición de la vía estriato-nigral previa al inicio de reduce la repetición de ensayos independientemente del tipo, particularmente los ensayos correctos, lo que coincide con la literatura que reporta la repetición consecutiva de la misma acción tras la activación optogenética (Tecuapetla et al., 2016).

CONCLUSIONES

- Se implementó y verificó el fenotipo de acicalamiento excesivo reportado para el modelo de compulsiones Sapap3 KO. Se confirmó el incremento en el número y la duración de los episodios de acicalamiento, así como el decremento en la actividad locomotriz de los sujetos Sapap3 KO.
- Se demostró que la proporción de neuronas estriatales asociadas a la conducta de acicalamiento esta incrementada en los sujetos Sapap3 KO. Además, se evidenció un fenómeno de acumulación de actividad durante la generación de eventos de acicalamiento en serie.
- Se evidenció que la inhibición optogenética específica de la vía estriato-palidal en sujetos Sapap3 KO reduce el fenómeno de acicalamiento exacerbado característico del modelo. Por el contrario, la inhibición general del estriado propicia el incremento de estas conductas compulsivas.
- Se implementó un paradigma de orden serial para el aprendizaje de acciones en secuencia y, se observó que el modelo Sapap3 KO presenta un déficit en desarrollo de secuencias en serie, caracterizado por la compulsión de terminar anticipadamente las secuencias de orden serial.
- Se observó que la manipulación optogenética estriatal y vía específica (estriato-palidal) corrige los déficits durante el aprendizaje de secuencias guiadas. Lo anterior resalta la importancia de la vía indirecta en los fenotipos observados en el modelo de compulsiones Sapap3 KO.
- Se documentó que los sujetos Sapap3 KO presentan alteraciones en mecanismos de aprendizaje por reforzamiento/castigo que pueden ser aminorados tras la inhibición estriatal general. Los resultados anteriores sugieren un complejo mecanismo detrás de las alteraciones en el desarrollo de acciones dirigidas a objetivos.

REFERENCIAS

- Ade, K. K., Wan, Y., Hamann, H. C., O'Hare, J. K., Guo, W., Quian, A., Kumar, S., Bhagat, S., Rodriguiz, R. M., Wetsel, W. C., Conn, P. J., Dzirasa, K., Huber, K. M., & Calakos, N. (2016). Increased Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling Underlies Obsessive-Compulsive Disorder-like Behavioral and Striatal Circuit Abnormalities in Mice. *Biological Psychiatry*, *80*(7), 522–533. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.04.023>
- Ahmari, S. E., & Dougherty, D. D. (2015). Dissecting OCD Circuits: From Animal Models to Targeted Treatments. *Depression and Anxiety*, *32*(8), 550–562. <https://doi.org/10.1002/da.22367>
- Ahmari, S. E., Spellman, T., Douglass, N. L., Kheirbek, M. A., Simpson, H. B., Deisseroth, K., Gordon, J. A., & Hen, R. (2013). Repeated Cortico-Striatal Stimulation Generates Persistent OCD-Like Behavior. *Science*, *340*(6137), 1234–1239. <http://science.sciencemag.org/content/340/6137/1234.abstract>
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, *12*(10), 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Aldridge, J. W., & Berridge, K. C. (1998). Coding of Serial Order by Neostriatal Neurons : A “ Natural Action ” Approach to Movement Sequence. *Journal of Neuroscience*, *18*(7), 2777–2787.
- Aldridge, J. W., Berridge, K. C., & Rosen, A. R. (2004). Basal ganglia neural mechanisms of natural movement sequences. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *82*(8–9), 732–739. <https://doi.org/10.1139/y04-061>
- Alonso, P., López-Solà, C., Real, E., Segalàs, C., & Menchón, J. M. (2015). Animal models of obsessive–compulsive disorder: Utility and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *11*, 1939–1955. <https://doi.org/10.2147/NDT.S62785>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- Averbeck, B. B., Chafee, M. V., Crowe, D. A., & Georgopoulos, A. P. (2002). Parallel processing of serial movements in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(20), 13172–13177. <https://doi.org/10.1073/pnas.162485599>
- 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>
- Baxter, L. R. J., Phelps, M. E., Mazziotta, J. C., Guze, B. H., Schwartz, J. M., & Selin, C. E. (1987). Local cerebral glucose metabolic rates in obsessive-compulsive disorder. A comparison with rates in unipolar depression and in normal controls. *Archives of General Psychiatry*, *44*(3), 211–218. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1987.01800150017003>
- Baxter, L. R. J., Schwartz, J. M., Bergman, K. S., Szuba, M. P., Guze, B. H., Mazziotta, J. C., Alazraki, A., Selin, C. E., Ferng, H. K., & Munford, P. (1992). Caudate glucose metabolic rate changes with both drug and behavior therapy for obsessive-

- compulsive disorder. *Archives of General Psychiatry*, 49(9), 681–689.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820090009002>
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology*, 3(1), 4.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-4>
- Berridge, K. C., & Whishaw, I. Q. (1992). Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. *Experimental Brain Research*, 90(2), 275–290.
<https://doi.org/10.1007/BF00227239>
- Boom, B. J. G. Van Den, Mooij, A. H., Misevičiūtė, I., & Denys, D. (2019). Behavioral flexibility in an OCD mouse model : Impaired Pavlovian reversal learning in SAPAP3 mutants. *Genes, Brain, and Behavior*, 18(4), 12557–12557.
<https://doi.org/10.1101/435172>
- Breiter, H. C., & Rauch, S. L. (1996). Functional MRI and the Study of OCD: From Symptom Provocation to Cognitive-Behavioral Probes of Cortico-Striatal Systems and the Amygdala. *NeuroImage*, 4(3), S127–S138.
<https://doi.org/10.1006/nimg.1996.0063>
- Burguière, E., Monteiro, P., Feng, G., & Graybiel, A. M. (2013). Optogenetic Stimulation of Lateral Orbitofronto-Striatal Pathway Suppresses Compulsive Behaviors. *Science (New York, N. Y.)*, 340(6137), 1243–1246. <https://doi.org/10.1126/science.1232380>
- Castro-Rodrigues, P., Akam, T., Snorasson, I., Camacho, M., Paixão, V., Barahona-Corrêa, B., Dayan, P., Simpson, H. B., Costa, R. M., & Oliveira-4 Maia, A. J. (2020). Explicit knowledge of task structure is the primary determinant of human model-based action. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.06.20189241>
- Chamberlain, S R, Blackwell, A. D., Fineberg, N. A., Robbins, T. W., & Sahakian, B. J. (2005). The neuropsychology of obsessive compulsive disorder: the importance of failures in cognitive and behavioural inhibition as candidate endophenotypic markers. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(3), 399–419.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.11.006>
- Chamberlain, Samuel R., Fineberg, N. A., Menzies, L. A., Blackwell, A. D., Bullmore, E. T., Robbins, T. W., & Sahakian, B. J. (2007). Impaired cognitive flexibility and motor inhibition in unaffected first-degree relatives of patients with obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Psychiatry*, 164(2), 335–338.
<https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.2.335>
- Chen, M., Wan, Y., Ade, K., Ting, J., Feng, G., & Calakos, N. (2011). Sapap3 deletion anomalously activates short-term endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(26), 9563–9573.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1701-11.2011>
- Chou-Green, J. M., Holscher, T. D., Dallman, M. F., & Akana, S. F. (2003). Compulsive behavior in the 5-HT2C receptor knockout mouse. *Physiology & Behavior*, 78(4–5), 641–649. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00047-7)
- Conn, P. J., Battaglia, G., Marino, M. J., & Nicoletti, F. (2005). Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(10), 787–798. <https://doi.org/10.1038/nrn1763>
- Corbit, V. L., Manning, E. E., Gittis, A. H., & Ahmari, S. E. (2019). Strengthened Inputs from Secondary Motor Cortex to Striatum in a Mouse Model of Compulsive

Behavior. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 39(15), 2965–2975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1728-18.2018>

- Cromwell, H. C., & Berridge, K. C. (1996). Implementation of action sequences by a neostriatal site: A lesion mapping study of grooming syntax. *Journal of Neuroscience*, 16(10), 3444–3458. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-10-03444.1996>
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2014). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494(7436), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11846>
- 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)
- Denys, D. (2014). Compulsivity and free will. *CNS Spectrums*, 19(1), 8–9. <https://doi.org/10.1017/S1092852913000412>
- Díaz-Hernández, E., Contreras-López, R., Sánchez-Fuentes, A., Rodríguez-Sibrían, L., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2018). The Thalamostriatal Projections Contribute to the Initiation and Execution of a Sequence of Movements. *Neuron*, 100(3), 739–752. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.052>
- Ducasse, D., Boyer, L., Michel, P., Loundou, A., Macgregor, A., Micoulaud-Franchi, J.-A., Courtet, P., Abbar, M., Leboyer, M., & Fond, G. (2014). D2 and D3 dopamine receptor affinity predicts effectiveness of antipsychotic drugs in obsessive-compulsive disorders: a metaregression analysis. *Psychopharmacology*, 231(18), 3765–3770. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3516-3>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481–1489. <https://doi.org/10.1038/nn1579>
- Fava, L., Bellantuono, S., Bizzi, A., Cesario, M. L., Costa, B., De Simoni, E., Di Nuzzo, M., Fadda, S., Gazzellini, S., Iacono, A. Lo, & others. (2014). Review of Obsessive Compulsive Disorders Theories. *Global Journal of Epidemiology and Public Health*, 1, 1–13. <http://www.savvysciencepublisher.com/jms/index.php/gjeph/article/view/152>
- Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueño, J., Gutiérrez, M. A., Casadó, V., Fuxe, K., Goldberg, S. R., Lluís, C., Franco, R., & Ciruela, F. (2002). Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11940 LP – 11945. <https://doi.org/10.1073/pnas.172393799>
- 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>
- Fujii, N., & Graybiel, A. M. (2003). Representation of action sequence boundaries by macaque prefrontal cortical neurons. *Science (New York, N. Y.)*, 301(5637), 1246–1249. <https://doi.org/10.1126/science.1086872>
- Geddes, C. E., Li, H., & Jin, X. (2018). Optogenetic Editing Reveals the Hierarchical Organization of Learned Action Sequences. *Cell*, 174(1), 32-43.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.012>

- Gerfen, C. R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, *311*, 461–464. <https://doi.org/10.1038/311461a0>
- Glorie, D., Verhaeghe, J., Miranda, A., Kertesz, I., wyffels, L., Stroobants, S., & Staelens, S. (2020). Progression of obsessive compulsive disorder-like grooming in Sapap3 knockout mice: A longitudinal [¹¹C]ABP688 PET study. *Neuropharmacology*, *177*, 108160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108160>
- Goodman, W. K., Price, L. H., Rasmussen, S. A., Mazure, C., Fleischmann, R. L., Hill, C. L., Heninger, G. R., & Charney, D. S. (1989). The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. I. Development, use, and reliability. *Archives of General Psychiatry*, *46*(11), 1006–1011. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1989.01810110048007>
- Graybiel, A. M., & Rauch, S. L. (2000). Toward a Neurobiology Review of Obsessive-Compulsive Disorder Dysfunction of the basal ganglia and associated cor. *Neuron*, *28*(4), 343–347.
- Greer, J. M., & Capecchi, M. R. (2002). Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*, *33*(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00564-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00564-5)
- Grover, S., Nguyen, J. A., Viswanathan, V., & Reinhart, R. M. G. (2021). High-frequency neuromodulation improves obsessive–compulsive behavior. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01173-w>
- Hadjas, L. C., Lüscher, C., & Simmler, L. D. (2019). Aberrant habit formation in the Sapap3-knockout mouse model of obsessive-compulsive disorder. *Scientific Reports*, *9*(1), 12061. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48637-9>
- Hadjas, L. C., Schartner, M. M., Cand, J., Creed, M. C., Pascoli, V., Lüscher, C., & Simmler, L. D. (2020). Projection-specific deficits in synaptic transmission in adult Sapap3-knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, *45*(12), 2020–2029. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0747-3>
- Jin, X., & Costa, R. M. (2010). Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature*, *466*(7305), 457–462. <https://doi.org/10.1038/nature09263>
- 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>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2015). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(1), 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Kim, H. F., Amita, H., & Hikosaka, O. (2017). Indirect Pathway of Caudal Basal Ganglia for Rejection of Valueless Visual Objects. *Neuron*, *94*(4), 920–930. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.033>
- 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.
- Laplane, D., Levasseur, M., Pillon, B., Dubois, B., Baulac, M., Mazoyer, B., Dinh, S. T., Sette, G., Danze, F., & Baron, J. C. (1989). Obsessive-compulsive and other behavioural changes with bilateral basal ganglia lesions: A neuropsychological, magnetic resonance imaging and positron tomography study. *Brain*, *112*(3), 699–

725. <https://doi.org/10.1093/brain/112.3.699>
- Lashley, K. (1951). The problem of serial order in behavior. *1951*, 7, 112–147. <https://doi.org/10.1093/rfs/hhq153>
- Lázaro, L., Caldú, X., Junqué, C., Bargalló, N., Andrés, S., Morer, A., & Castro-Fornieles, J. (2008). Cerebral activation in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder before and after treatment: A functional MRI study. *Journal of Psychiatric Research*, 42(13), 1051–1059. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2007.12.007>
- Lopes, G., Bonacchi, N., Frazão, J., Neto, J. P., Atallah, B. V., Soares, S., Moreira, L., Matias, S., Itskov, P. M., Correia, P. A., Medina, R. E., Calcaterra, L., Dreosti, E., Paton, J. J., & Kampff, A. R. (2015). Bonsai: an event-based framework for processing and controlling data streams . In *Frontiers in Neuroinformatics* (Vol. 9, p. 7). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fninf.2015.00007>
- Lu, J., Li, C., Singh-Alvarado, J., Zhou, Z. C., Fröhlich, F., Mooney, R., & Wang, F. (2018). MIN1PIPE: A Miniscope 1-Photon-Based Calcium Imaging Signal Extraction Pipeline. *Cell Reports*, 23(12), 3673–3684. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.062>
- Mahgoub, M., Adachi, M., Suzuki, K., Liu, X., Kavalali, E. T., Chahrour, M. H., & Monteggia, L. M. (2016). MeCP2 and histone deacetylases 1 and 2 in dorsal striatum collectively suppress repetitive behaviors. *Nature Neuroscience*, 19(11), 1506–1512. <https://doi.org/10.1038/nn.4395>
- Manning, E. E., Dombrowski, A. Y., Torregrossa, M. M., & Ahmari, S. E. (2019). Impaired instrumental reversal learning is associated with increased medial prefrontal cortex activity in Sapap3 knockout mouse model of compulsive behavior. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(8), 1494–1504. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0307-2>
- Mataix-Cols, D., Wooderson, S., Lawrence, N., Brammer, M. J., Speckens, A., Phillips, M. L., D., M.-C., S., W., N., L., M.J., B., A., S., & M.L., P. (2004). Distinct neural correlates of washing, checking, and hoarding symptom dimensions in obsessive-compulsive disorder. *Archives of General Psychiatry*, 61(6), 564–576. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.6.564> LK - <http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=0003990X&id=doi:10.1001%2Farchpsyc.61.6.564&atitle=Distinct+neural+correlates+of+washing%2C+checking%2C+and+hoarding+symptom+dimensions+in+obsessive-compulsive+disorder&stitle=Arch.+Gen.+Psychiatry&title=Archives+of+General+Psychiatry&volume=61&issue=6&spage=564&epage=576&aualast=Mataix-Cols&aufirst=David&aunit=D.&aufull=Mataix-Cols+D.&coden=ARGPA&isbn=&pages=564-576&date=2004&aunit1=D&aunitm=>
- Matamales, M., McGovern, A. E., Mi, J. D., Mazzone, S. B., Balleine, B. W., & Bertran-Gonzalez, J. (2020). Local D2- to D1-neuron transmodulation updates goal-directed learning in the striatum. *Science*, 367(6477), 549 LP – 555. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5751>
- McKinney, J., & Bunney, W. (1969). Animal model of depression: I. review of evidence: implications for research. *Archives of General Psychiatry*, 21(2), 240–248. <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.1969.01740200112015>
- Mitra, S., & Bult-Ito, A. (2021). Bidirectional Behavioral Selection in Mice: A Novel Pre-clinical Approach to Examining Compulsivity. *Frontiers in Psychiatry*, 12(September),

1–18. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.716619>

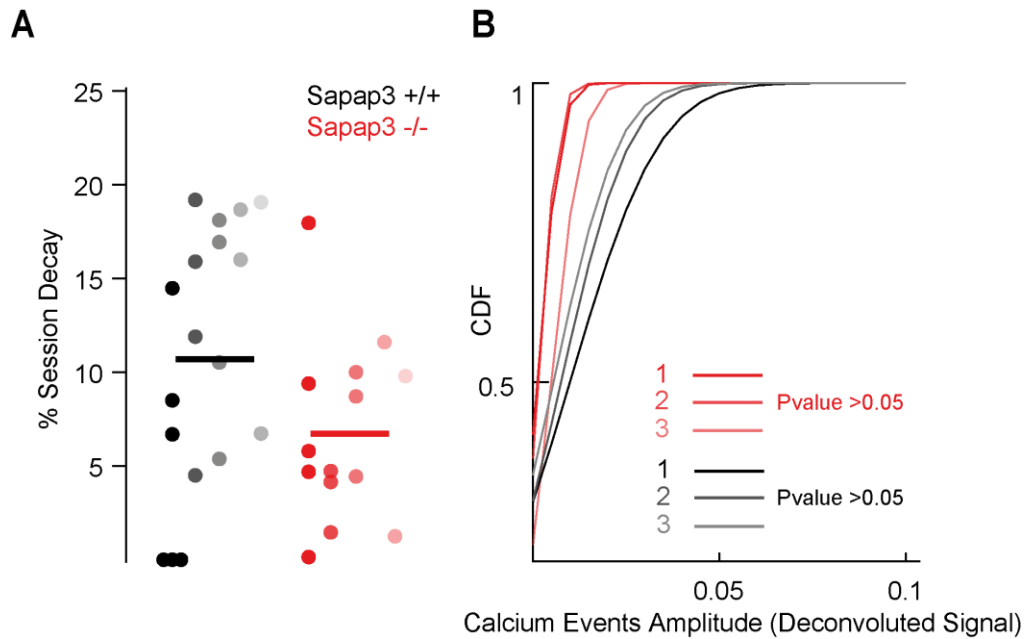
- Moresco, R. M., Pietra, L., Henin, M., Panzacchi, A., Locatelli, M., Bonaldi, L., Carpinelli, A., Gobbo, C., Bellodi, L., Perani, D., & Fazio, F. (2007). Fluvoxamine treatment and D2 receptors: A pet study on OCD drug-naïve patients. *Neuropsychopharmacology*, *32*(1), 197–205. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301199>
- Mushiake, H., Inase, M., & Tanji, J. (1990). Selective coding of motor sequence in the supplementary motor area of the monkey cerebral cortex. *Experimental Brain Research*, *82*(1), 208–210. <https://doi.org/10.1007/BF00230853>
- Pnevmatikakis, E. A., Soudry, D., Gao, Y., Machado, T. A., Merel, J., Pfau, D., Reardon, T., Mu, Y., Laceyfield, C., Yang, W., Ahrens, M., Bruno, R., Jessell, T. M., Peterka, D. S., Yuste, R., & Paninski, L. (2016). Simultaneous Denoising, Deconvolution, and Demixing of Calcium Imaging Data. *Neuron*, *89*(2), 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.037>
- Radua, J., van den Heuvel, O. A., Surguladze, S., & Mataix-Cols, D. (2010). Meta-analytical Comparison of Voxel-Based Morphometry Studies in Obsessive-Compulsive Disorder vs Other Anxiety Disorders. *Archives of General Psychiatry*, *67*(7), 701–711. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.70>
- Ramírez-Armenta, K. I., Alatríste-León, H., Verma-Rodríguez, A. K., Llanos-Moreno, A., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2021). Optogenetic inhibition of indirect pathway neurons in the dorsomedial striatum reduces excessive grooming in Sapap3-knockout mice. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01161-9>
- Rauch, S. L., Jenike, M. A., Alpert, N. M., Baer, L., Breiter, H. C. R., Savage, C. R., & Fischman, A. J. (1994). Regional Cerebral Blood Flow Measured During Symptom Provocation in Obsessive-Compulsive Disorder Using Oxygen 15—Labeled Carbon Dioxide and Positron Emission Tomography. *Archives of General Psychiatry*, *51*(1), 62–70. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1994.03950010062008>
- Robbins, T. W., Gillan, C. M., Smith, D. G., de Wit, S., & Ersche, K. D. (2012). Neurocognitive endophenotypes of impulsivity and compulsivity: towards dimensional psychiatry. *Trends in Cognitive Sciences*, *16*(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.11.009>
- Rotge, J.-Y., Guehl, D., Dilharreguy, B., Cuny, E., Tignol, J., Bioulac, B., Allard, M., Burbaud, P., & Aouizerate, B. (2008). Provocation of obsessive-compulsive symptoms: a quantitative voxel-based meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *33*(5), 405–412. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2527721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rotge, J. Y., Guehl, D., Dilharreguy, B., Tignol, J., Bioulac, B., Allard, M., Burbaud, P., & Aouizerate, B. (2009). Meta-Analysis of Brain Volume Changes in Obsessive-Compulsive Disorder. *Biological Psychiatry*, *65*(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.019>
- Sakamoto, K., Saito, N., Yoshida, S., & Mushiake, H. (2020). Dynamic axis-tuned cells in the monkey lateral prefrontal cortex during a path-planning task. *Journal of Neuroscience*, *40*(1), 203–219. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2526-18.2019>
- Sánchez-Fuentes, A., Ramírez-Armenta, K., Verma-Rodríguez, A. K., Díaz-Hernández, E., Aguilar-Palomares, A., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2021). The

contribution of Premotor Cortico-striatal Projections to the Execution of Serial Order Sequences. *ENEURO*, 8(5), ENEURO.0173-21.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0173-21.2021>

- Saxena, S., Bota, R. G., & Brody, A. L. (2001). Brain-behavior relationships in obsessive-compulsive disorder. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*, 6(2), 82–101.
- Schmidt, R., Leventhal, D. K., Mallet, N., Chen, F., & Berke, J. D. (2013). Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nature Neuroscience*, 16(8), 1118–1124. <https://doi.org/10.1038/nn.3456>
- Shaw, P., Sharp, W., Sudre, G., Wharton, A., Greenstein, D., Raznahan, A., Evans, A., Chakravarty, M. M., Lerch, J. P., & Rapoport, J. (2015). Subcortical and cortical morphological anomalies as an endophenotype in obsessive-compulsive disorder. *Molecular Psychiatry*, 20(2), 224–231. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.3>
- Shmelkov, S. V., Hormigo, A., Jing, D., Proenca, C. C., Bath, K. G., Milde, T., Shmelkov, E., Kushner, J. S., Baljevic, M., Dincheva, I., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D., Ninan, I., Lee, F. S., & Rafii, S. (2010). Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. *Nature Medicine*, 16(5), 598–602. <https://doi.org/10.1038/nm.2125>
- Silberberg, G., & Bolam, J. P. (2015). Local and afferent synaptic pathways in the striatal microcircuitry. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, 182–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.05.002>
- Simon, D., Kaufmann, C., Müsch, K., Kischkel, E., & Kathmann, N. (2010). Fronto-striato- limbic hyperactivation in obsessive-compulsive disorder during individually tailored symptom provocation. *Psychophysiology*, 47(4), 728–738. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2010.00980.x>
- Starcevic, V., Berle, D., Brakoulias, V., Sammut, P., Moses, K., Milicevic, D., & Hannan, A. (2011). Functions of compulsions in obsessive-compulsive disorder. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 45(6), 449–457. <https://doi.org/10.3109/00048674.2011.567243>
- Surmeier, D. J., Song, W. J., & Yan, Z. (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *Journal of Neuroscience*, 16(20), 6579–6591. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-20-06579.1996>
- Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M., & Takai, Y. (1997). SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(18), 11943–11951. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.18.11943>
- 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>
- Tepper, J. M., Koós, T., Ibanez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T. W., & Assous, M. (2018). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 91. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00091>
- Voon, V., Baek, K., Enander, J., Worbe, Y., Morris, L. S., Harrison, N. A., Robbins, T. W., Rück, C., & Daw, N. (2015). Motivation and value influences in the relative balance of goal-directed and habitual behaviours in obsessive-compulsive disorder. *Translational Psychiatry*, 5(August). <https://doi.org/10.1038/tp.2015.165>

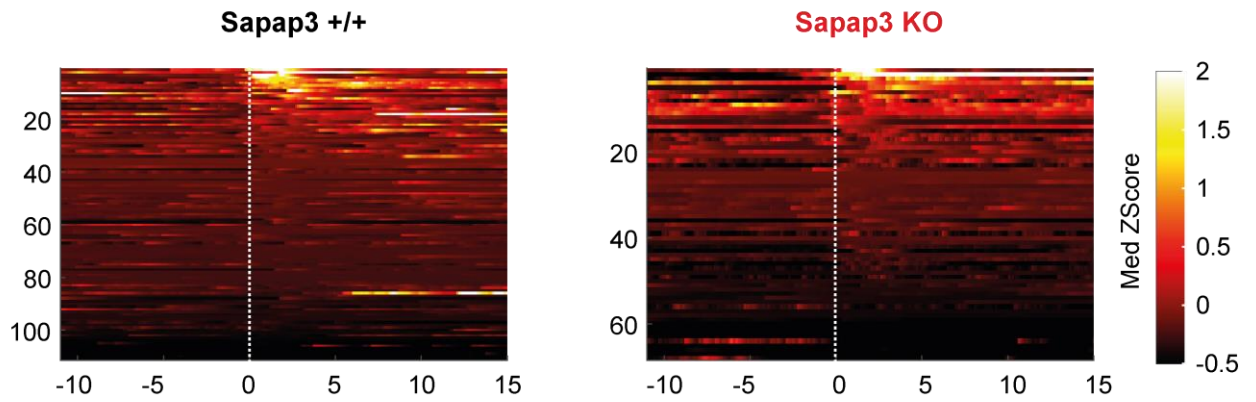
- Wan, Y., Feng, G., & Calakos, N. (2011). Sapap3 Deletion Causes mGluR5-Dependent Silencing of AMPAR Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 31(46), 16685 LP – 16691. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2533-11.2011>
- Welch, J. M., Lu, J., Rodriguiz, R. M., Trotta, N. C., Peca, J., Ding, J.-D., Feliciano, C., Chen, M., Adams, J. P., Luo, J., Dudek, S. M., Weinberg, R. J., Calakos, N., Wetsel, W. C., & Feng, G. (2007). Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature*, 448(7156), 894–900. <https://doi.org/10.1038/nature06104>
- Welch, J. M., Wang, D., & Feng, G. (2004). Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 472(1), 24–39. <https://doi.org/10.1002/cne.20060>
- Wood, J., & Ahmari, S. E. (2015). A framework for understanding the emerging role of corticolimbic-ventral striatal networks in OCD-associated repetitive behaviors. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9(DEC), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00171>
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2006). Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research*, 166(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.012>

ANEXOS



Anexo 1. A) Porcentaje de decaimiento de la señal para cada sesión (Negro: Sapap3 +/-; Rojo: Sapap3 KO; $p > 0.05$, U-Mann-Whitney; La degradación de los colores representa sesiones consecutivas). Las líneas horizontales representan los valores medios de cada grupo. **B)** Función de la distribución acumulada (Cumulative Distribution Function: CDF) para las amplitudes de la señal deconvolucionada de tres sesiones consecutivas incluidas en la figura 2 para los sujetos que se registraron por más de una sesión (Sapap3 +/-: 4 ratones, Sapap3-KO: 3 ratones; $p > 0.05$, Kolmogorov-Smirnov).

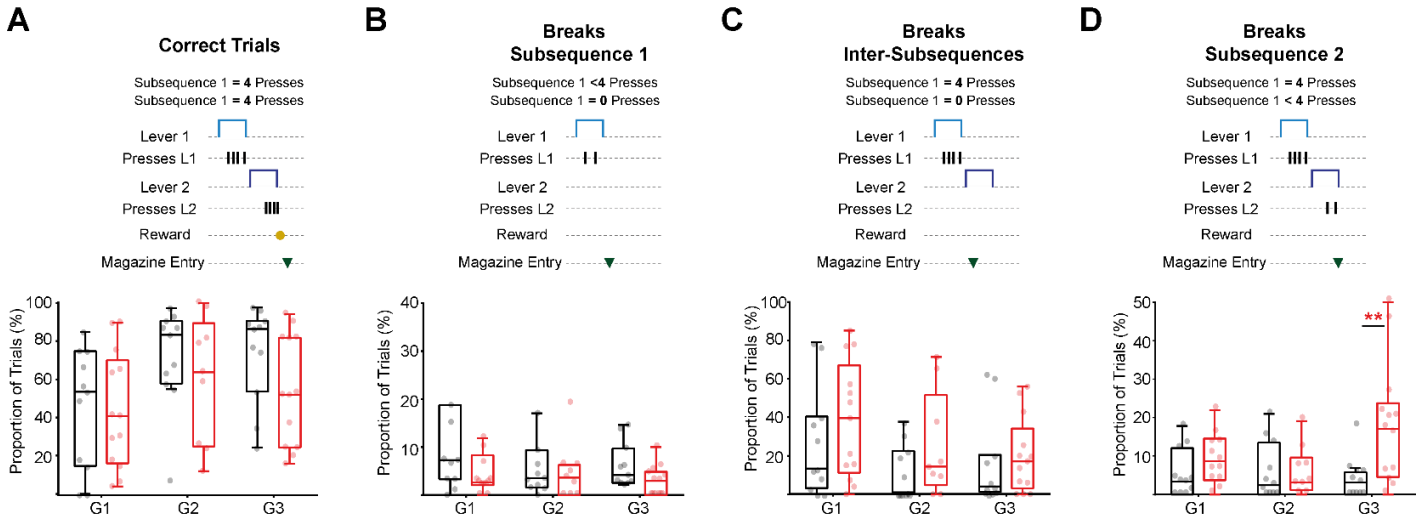
A



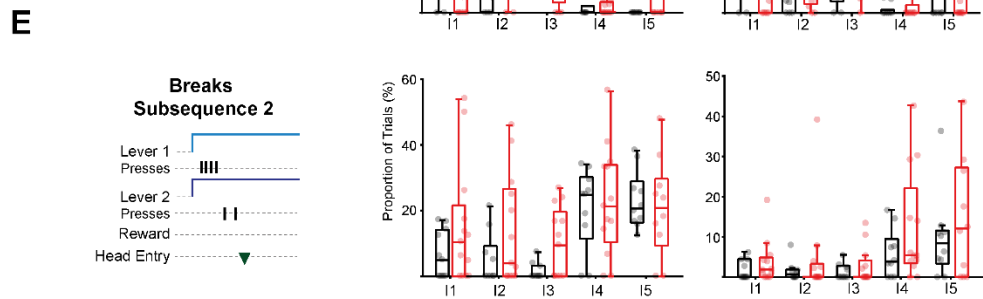
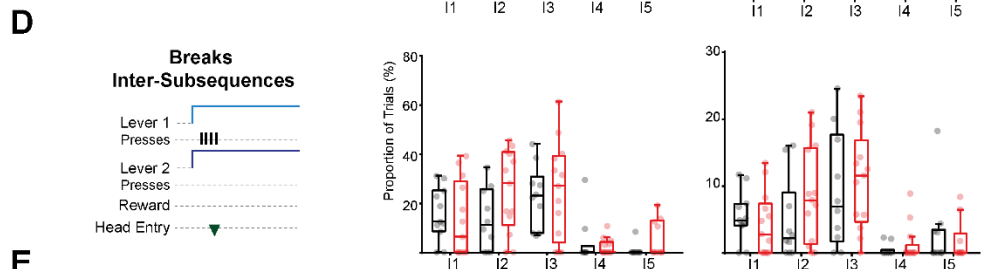
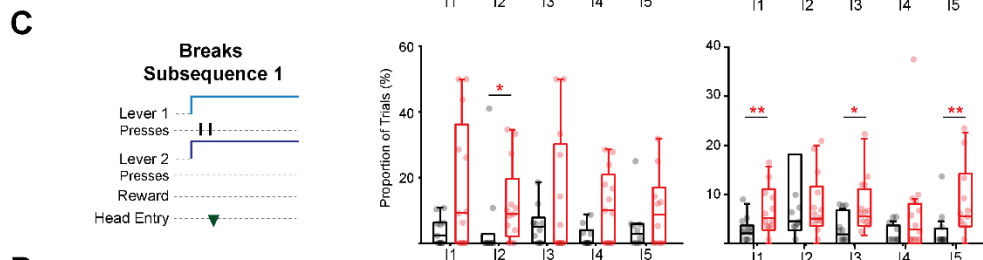
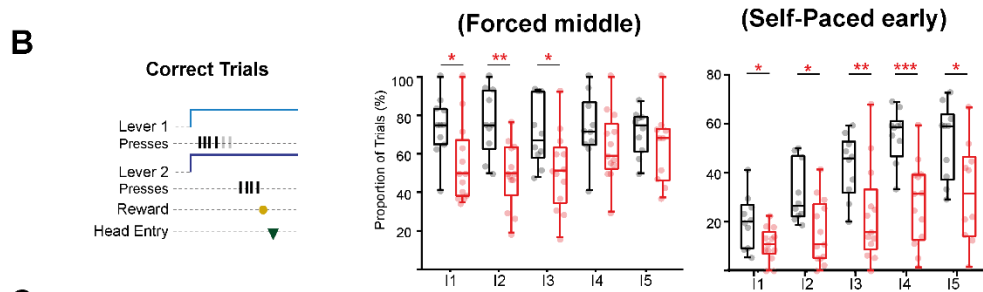
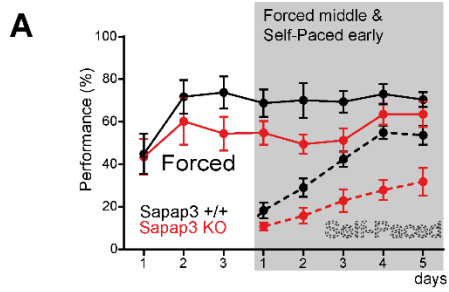
B



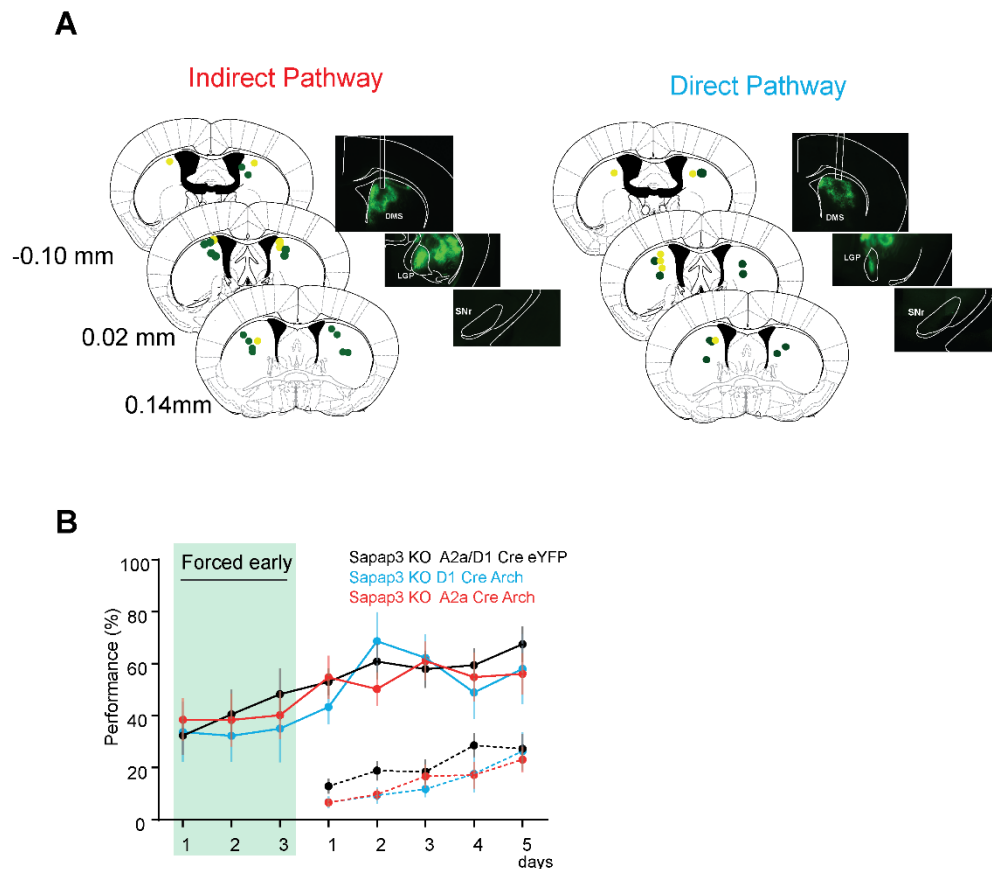
Anexo 2. A. Mapa de color de las neuronas estriatales alineado al inicio del acicalamiento (Mediana z-score). **B.** Proporción de células moduladas (Sapap3^{+/+} Negativamente: 8; Positivamente: 2; No moduladas: 101 Células; Sapap3-KO Negativamente: 4; Positivamente: 9, No moduladas: 55 Células; Chi-square, $p < 0.01$).



Anexo 3. A. Diagrama de un ensayo correcto (Panel Superior). Proporción de ensayos correctos para las primeras 3 sesiones de secuencias guiadas por retracción (Panel Inferior). **C.** Diagrama de un ensayo incorrecto donde no se culmina la primera secuencia porque se intercala una visita al comedero (Aborto Subsecuencia1; Panel Superior). Proporción de ensayos para esta categoría (Panel Inferior). **D.** Diagrama de un ensayo incorrecto donde se interrumpe la serie al terminar la primera secuencia y realizar una visita al comedero (Entrada al comedero Inter-Subsecuencia; Panel Superior). Proporción de ensayos para esta categoría (Panel Inferior). **E.** Diagrama de un ensayo incorrecto donde no se culmina la segunda secuencia porque se intercala una visita al comedero (Aborto Secuencia 2; Panel Superior). Proporción de ensayos para esta categoría (Panel Inferior).



Anexo 4. B. Diagrama representativo de un ensayo correcto (izquierda). Proporción de ensayos correctos para las primeras 5 sesiones de secuencias guidas por retracción y autoiniciadas (centro y derecha respectivamente; U-Mann Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **C.** Diagrama representativo de un aborto en la primera subsecuencia (izquierda). Proporción de abortos en subsecuencia uno para las primeras 5 sesiones de secuencias guidas por retracción y autoiniciadas (centro y derecha respectivamente; U-Mann Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **D.** Diagrama representativo de un rompimiento Inter-secuencia (Izquierda). Proporción de abortos en subsecuencia uno para las primeras 5 sesiones de secuencias guidas por retracción y autoiniciadas (centro y derecha respectivamente; U-Mann Whitney, $p > 0.05$). **E.** Diagrama representativo de un aborto en la segunda secuencia. Proporción de abortos en subsecuencia dos para las primeras 5 sesiones de secuencias guidas por retracción y autoiniciadas (centro y derecha respectivamente; U-Mann Whitney, $p > 0.05$). **F.** Diagrama representativo donde un sujeto inicia en la subsecuencia errónea (Wrong-Start, izquierda). Proporción de inicios erróneos para las primeras 5 sesiones de secuencias autoiniciadas (derecha; U-Mann Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **G.** Diagrama representativo de un ensayo donde el sujeto interrumpe la primera secuencia al presionar la segunda palanca (Breaks S1 by Press L2; Izquierda). Proporción de ensayos en esta categoría (derecha; U-Mann Whitney * $p < 0.05$).




Anexo 5. A. Diagrama representativo de la localización de las puntas de las fibras ópticas para cada uno de los animales que componen los grupos A2a Cre Sapap3 KO Arch (puntos verdes) y A2a Cre Sapap3 KO eYFP (puntos amarillos) [Paneles Derecha]; Fotomicrografías representativas de la transfección viral de un animal A2a Cre Sapap3 KO Arch: 1: Localización de la fibra óptica en el estriado y expresión de la opsina con marcador fluorescente. 2: Marca fluorescente de las proyecciones hacia el globo pálido externo provenientes de las neuronas estriatales. 3: Ausencia de marca en la sustancia nigra pars reticulata, lo que confirma la expresión en neuronas estriato-palidales [Paneles Izquierda]. **B.** Similar a **A**, para la localización de las fibras ópticas de los grupos D1 Cre Sapap3 KO Arch (puntos verdes) y D1 Cre Sapap3 KO eYFP (puntos amarillos). Fotomicrografías representativas de la expresión viral en el estriado, globo pálido y sustancia nigra pars reticulata en un animal D1 Cre Sapap3 KO Arch representativo. **C.** Desempeño de los grupos antes mencionados a lo largo del aprendizaje de secuencias guidas por retracción y autoiniciadas.

ARTICLE



Optogenetic inhibition of indirect pathway neurons in the dorsomedial striatum reduces excessive grooming in Sapap3-knockout mice

Kathia I. Ramírez-Armenta¹, Hector Alariste-León¹, Anil K. Verma-Rodríguez¹, Argelia Llanos-Moreno¹, Josué O. Ramírez-Jarquín¹ and Fatuel Tecuapetla¹ 

© The Author(s), under exclusive licence to American College of Neuropsychopharmacology 2021

Excessive grooming of Sapap3-KO mice has been used as a model of obsessive-compulsive disorder (OCD). Previous studies suggest that dysregulation of cortico-striatal circuits is critically important in the generation of compulsive behaviors, and it has been proposed that the alteration in the activity patterns of striatal circuitry underlies the excessive grooming observed in Sapap3-KO mice. To test this hypothesis, we used in-vivo calcium imaging of individual cells to record striatal activity in these animals and optogenetic inhibition to manipulate this activity. We identified striatal neurons that are modulated during grooming behavior and found that their proportion is significantly larger in Sapap3-KO mice compared to wild-type littermates. Inhibition of striatal cells in Sapap3-KO mice increased the number of grooming episodes observed. Remarkably, the specific inhibition of indirect pathway neurons decreased the occurrence of grooming events. Our results indicate that there is striatal neural activity related to excessive grooming engagement in Sapap3-KO mice. We also demonstrate, for the first time, that specific inhibition of striatal indirect pathway neurons reduces this compulsive phenotype, suggesting that treatments that alleviate compulsive symptoms in OCD patients may exert their effects through this specific striatal population.

Neuropsychopharmacology (2022) 47:477–487; <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01161-9>

INTRODUCTION

The performance of sequential actions has been linked to the active participation of cortico-basal ganglia-thalamic loops. Disorders that affect these loops result in aberrant phenotypes related to the generation and control of motor behaviors [1–5]. Compulsions are an example of deficits in the control of sequence behaviors and are defined as a series of actions that an individual repeats despite negative consequences. They are a characteristic feature of various disorders and a hallmark symptom of patients diagnosed with obsessive-compulsive disorder (OCD) [6, 7]. Studies with OCD patients have reported morphological alterations in cortico-striatal-thalamic circuits [8–10] and hyperactivation of these regions during symptomatic provocation paradigms. These alterations suggest a key role for these circuits in the generation and regulation of compulsive behaviors [11–13]. Animal models of compulsivity have been used to understand the physiology that underlies compulsive behaviors, often through the quantification of excessive grooming [14–16]. Sapap3-KO mice carry a constitutive deletion of the Sap90/Psd95 associated protein 3 (Dlgap3 or Gkap). This protein indirectly participates in the association of glutamatergic receptors in the postsynaptic membrane [15, 17]. Sapap3 expression is found in several brain regions included the neocortex, hippocampus, cerebellum, and striatum, with the highest expression being found in the striatum [18]. Mice lacking this protein display excessive grooming that generates lesions on the face and body

of the animals (construct validity). This is reduced when Sapap3 is reconstituted into the striatum or when mice are treated with fluoxetine (predictive validity) [15, 19, 20].

Experimental evidence has shown that the innate grooming behavior observed in mice is represented in the striatal activity [21, 22]. Repeated optogenetic activation of orbitofrontal cortex (OFC) inputs to the striatum has been shown to generate episodes of excessive grooming in wild-type mice [23]. Consistent with striatal involvement, it has been suggested that a reduction in striatal activity, induced by activation of specific cortical inputs, reduces the excessive grooming phenotype observed in the Sapap3-KO during the presentation of a conditioned stimulus [19]. Furthermore, alterations in the synaptic strength (enhancement or depressing) of anterior cingulate (ACC), OFC, motor (M1) and premotor (M2) cortico-striatal inputs in Sapap3-KO mice have been demonstrated [24, 25]. Additional evidence for involvement of striatal activity in the excessive grooming of Sapap3-KO mice, is an imbalance in basal ganglia subcircuits after in vitro cortico-striatal stimulation [26]. Some authors attribute this imbalance to alterations in mGluR5 signaling [26, 27], a receptor which is highly expressed in the striatum [28, 29]. These findings support the hypothesis that alterations in striatal activity patterns contribute to the generation of compulsive episodes. To test this hypothesis, we examined the contribution of striatal neurons to the generation of compulsions using the excessive grooming behavior observed in the Sapap3-KO. We examined neural activity during the grooming

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CDMX, México. [✉]email: fatuel@fcunam.mx

Received: 20 February 2021 Revised: 7 August 2021 Accepted: 13 August 2021
Published online: 20 August 2021



Anexo 6. Carátula Artículo I: Optogenetic Inhibition of Indirect Pathway Neurons in the Dorsomedial Striatum Reduces Excessive Grooming in Sapap3-KO mice, derivado de los resultados del capítulo 1.

Sensory and Motor Systems

The Contribution of Premotor Cortico-Striatal Projections to the Execution of Serial Order Sequences

Asai Sánchez-Fuentes, Kathia I. Ramírez-Armenta, Anil Kumar Verma-Rodríguez, Edgar Díaz-Hernández, Antonio Aguilar-Palomares, Josué O. Ramírez-Jarquín, and  Fatuel Tecuapetla

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0173-21.2021>

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

Abstract

Striatal activity is necessary to initiate and execute sequences of actions. The main excitatory input to the striatum comes from the cortex. While it is hypothesized that motor and premotor cortico-striatal projections are important to guide striatal activity during the execution of sequences of actions, technical limitations have made this challenging to address. Here, we implemented a task in mice that allows for the study of different moments to execute a serial order sequence consisting of two subsequences of actions. Using this task, we performed electrophysiological recordings in the premotor (M2) and primary motor (M1) cortices, and state-dependent optogenetic inhibitions of their cortico-striatal projections. We show that while both M2 and M1 contain activity modulations related to the execution of self-paced sequences, mainly, the premotor cortico-striatal projections contribute to the proper execution/structuring of these sequences.

Key words: action sequences; cortico-striatal; motor cortex; optogenetics; premotor cortex; synapses

Significance Statement

It is currently hypothesized that synapses from the primary motor (M1) and premotor (M2) cortices that innervate the striatum may guide the proper execution of sequences. Here, we evaluated this hypothesis by training animals to execute self-paced sequences: performing recordings in M2-M1 or manipulating their cortico-striatal projections during the execution of these sequences. We show that both, M2-M1 cortico-striatal projections contribute to sequence initiation, however sequence execution is predominantly influenced by M2. Remarkably the contribution of the cortico-striatal projections from M2 is mainly before the initiation of the sequence working to sustain the structure of the sequences, mainly during the beginning. These findings may have implications for pathologic conditions where the self-paced generation of sequences of actions is impaired.

Introduction

In everyday life, we continuously move between sequences of motor actions. One of the main proposed drivers involved in the learning and execution of motor sequences are cortico-striatal projections. The study of action sequences in relation to cortico-striatal function has become increasingly important since the discovery

that symptoms in patients with Parkinson's disease and obsessive-compulsive disorder maybe be caused by disruptions to cortico-striatal projections (Graybiel, 1998; Redgrave et al., 2010; Burguière et al., 2013).

The striatum, the primary input to basal ganglia (BG), is a subcortical structure whose activity is necessary to initiate and execute a sequence of actions (Cui et al., 2013;

Received April 17, 2021; accepted August 8, 2021; First published August 31, 2021.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: A.S.-F. and F.T. designed research; A.S.-F., K.I.R.-A., E.D.-H., A.A.-P., and J.O.R.-J. performed research; A.S.-F., K.I.R.-A., A.K.V.-R., E.D.-H., and A.A.-P. analyzed data; A.S.-F. and F.T. wrote the paper.

September/October 2021, 8(5) ENeuro.0173-21.2021 1–22

Anexo 7. Carátula Artículo II: The Contribution of Premotor Cortico-Striatal Projection to the Execution of Serial Order Sequences, derivado de la implementación del paradigma conductual utilizado en el capítulo 2.

Contribution of Striatal Circuits to Learning of Serial Order Sequences in the Sapap3 KO mice.

Kathia I. Ramírez-Armenta, Asai Sánchez-Fuentes, Josué O. Ramírez-Jarquín and Fatuel Tecuapetla

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito exterior s/n, 04510, CDMX, México.

Contact information: fatuel@ifc.unam.mx

Anexo 8. Carátula Artículo III: Contribution of Striatal Circuits to Learning of Serial Order Sequences in the Sapap3 KO mice, derivado de los hallazgos del capítulo 2.