



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**EVALUANDO LA CONTRIBUCIÓN DE LAS NEURONAS
COLINÉRGICAS DEL ESTRIADO EN LA RELACIÓN ACCIÓN-
CONSECUENCIA POR MEDIO DE OPTOGENÉTICA.**

Tesis que para obtener el título de
BIÓLOGO.

PRESENTA:

HECTOR ALATRISTE LEÓN.

TUTOR:

DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR.



PUEBLA, PUEBLA. SEPTIEMBRE DE 2016

*“Del concierto de impulsos eléctricos del cerebro,
surge todo aquello que nos hace ser quienes somos”.*

Gero Miesenböck

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Neuropatología Molecular, Laboratorio BL-202, bajo la tutoría del Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar.

Financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACYT CB-2013-01**, Proyecto: 220412 y Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica **PAPIIT-DGAPA UNAM**, Proyecto: IA200815.

Agradezco al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, técnico académico del laboratorio por su asesoría técnica en el uso de animales transgénicos usados en el presente trabajo.

A Argelia Itzel Llanos Moreno por su ayuda en el entrenamiento de animales.

A la Dra. Elvira Galarraga Palacio por permitir el uso del sistema de registro electrofisiológico bajo su cargo.

A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por la obtención de imágenes de microscopia confocal.

A la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo, al Dr. Héctor Malagón Rivero miembros de Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, a la Biol. Ariadna Aparicio Juárez y a la M. en I.B.B. Gabriela Xochitl Ayala Méndez por su asesoría en el manejo de animales.

Al Ing. Manuel Ortínez Benavides e Ing. Aurey Galván Lobato por la ayuda técnica en herramientas para implementar los aparatos de entrenamiento.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. GANGLIOS BASALES Y NÚCLEO ESTRIADO	2
1.2. LA INTERNEURONA GIGANTE COLINÉRGICA ESTRIATAL	4
1.3. EL PAPEL FUNCIONAL DE LAS NEURONAS COLINÉRGICAS ESTRIATALES	8
1.4. ACCIONES DIRIGIDAS HACIA UN OBJETIVO O EN BUSCA DE UNA CONSECUENCIA	10
1.5. LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS ESTRIATALES EN EL CONTROL DE ACCIONES DIRIGIDAS A UNA CONSECUENCIA	11
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVO	13
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	14
6. MÉTODOS	15
6.1. SUJETOS EXPERIMENTALES	15
6.2. PROCEDIMIENTOS DE COMPORTAMIENTO	16
6.2.1. <i>Pre-entrenamiento (formando la asociación comedero-reforzador)</i>	16
6.2.2. <i>Reforzamiento continuo (formando la relación acción-reforzador)</i>	16
6.2.3. <i>Razón Variable (formando la relación acción-consecuencia)</i>	17
6.2.4. <i>Prueba de Devaluación</i>	18
6.2.5. <i>Degradación de la contingencia</i>	18
6.2.6. <i>Prueba de la degradación de la contingencia</i>	19
6.3. ESTRATEGIA DE INHIBICIÓN DE LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS DEL ESTRIADO DORSOMEDIAL	21
6.3.1. VERIFICACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA	21
6.3.2. VERIFICACIÓN POR ELECTROFISIOLOGÍA	22
6.4. ESTRATEGIA DE EXPRESIÓN POR INFECCIÓN VIRAL EN ANIMALES CHAT-CRE E IMPLANTACIÓN DE FIBRAS ÓPTICAS	23
6.5. FOTO-INHIBICIÓN OPTOGENÉTICA EN EL ENTRENAMIENTO EN DEGRADACIÓN DE LA CONTINGENCIA	26
6.5.1. VERIFICACIÓN ANATÓMICA DE LA EXPRESIÓN DE <i>ARCHAERHODOPSIN-3.0</i> E IMPLANTACIÓN DE FIBRAS ÓPTICAS EN ANIMALES CHAT-CRE	28
6.6. COMPORTAMIENTO MOTOR EN LIBRE MOVIMIENTO	28
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
7. RESULTADOS	30

7.1.	ENTRENAMIENTO DE LOS ANIMALES A REALIZAR ACCIONES DIRIGIDAS A UN OBJETIVO _____	30
7.2.	ENTRENAMIENTO EN LA DEGRADACIÓN DE UNA CONTINGENCIA _____	32
7.3.	LA DEGRADACIÓN DE LA CONTINGENCIA SUCEDIÓ CUANDO SE UTILIZÓ SACAROSA COMO REFORZADOR _____	34
7.4.	VERIFICACIÓN DE LA FOTO-INHIBICIÓN ESPECIFICA DE LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS DEL ESTRIADO DORSOMEDIAL _____	36
7.5.	ENTRENAMIENTO DE LOS ANIMALES CHAT-CRE EXPRESANDO LA OPSINA ARCH3.0-EYFP EN LAS INTCHS ESTRIATALES A REALIZAR ACCIONES EN BUSCA DE UNA CONSECUENCIA _____	39
7.6.	CONTRIBUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS SOBRE LA FLEXIBILIDAD CONDUCTUAL EN EL PARADIGMA DE DEGRADACIÓN DE LA CONTINGENCIA _____	41
7.7.	EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN OPTOGENÉTICA DE LAS INTCHS SOBRE LA MOTRICIDAD EN LA PRUEBA DE CAMPO ABIERTO _____	43
8.	DISCUSIÓN _____	45
8.1.	LA SENSIBILIDAD POR LA SACAROSA DE LOS ANIMALES CHAT-CRE EVOCA EL COMPORTAMIENTO DE ACCIONES DIRIGIDAS A CONSECUENCIAS _____	45
8.2.	LA INTCHS CONTROLAN LA FLEXIBILIDAD ADAPTATIVA PARA DETECTAR UN CAMBIO DE CONTINGENCIA _____	47
9.	CONCLUSIÓN _____	49
10.	REFERENCIAS _____	50

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ORGANIZACIÓN DE LOS CIRCUITOS DE LOS GANGLIOS BASALES EN ROEDORES.	3
FIGURA 2. RECONSTRUCCIÓN ANATÓMICA DE LA INTERNEURONA COLINÉRGICA Y TRES TIPOS DE INTERNEURONAS GABAÉRGICAS DEL ESTRIADO.	5
FIGURA 3. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS IN VITRO DE LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS ESTRIATALES.	7
FIGURA 4. ACTIVIDAD NEURONAL DE LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS RELACIONADA A UNA RECOMPENSA.	9
FIGURA 5. ESQUEMA DE LAS CONDUCTAS DIRIGIDAS A UNA CONSECUENCIA EN CONDICIONAMIENTO OPERANTE.	11
FIGURA 6. ENTRENAMIENTO EN ACCIONES DIRIGIDAS A OBJETIVOS Y ENTRENAMIENTO EN DEGRADACIÓN DE LA CONTINGENCIA.	20
FIGURA 7. ESTRATEGIAS DE EXPRESIÓN DE OPSINAS E IMPLANTACIÓN DE FIBRAS ÓPTICAS.	25
FIGURA 8. FOTO-INHIBICIÓN OPTOGENÉTICA.	27
FIGURA 9. ADQUISICIÓN DE LA TAREA Y PRUEBA DE DEVALUACIÓN.	31
FIGURA 10. ENTRENAMIENTO EN EL PROTOCOLO DE DEGRADACIÓN DE LA CONTINGENCIA.	33
FIGURA 11. SENSIBILIDAD DE LA TAREA EN DEGRADACIÓN DE LA CONTINGENCIA POR SACAROSA Y PELLETS.	35
FIGURA 12. VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA OPSINA ARCH3.0 EN EL SISTEMA COLINÉRGICO ESTRIATAL.	37
FIGURA 13. INHIBICIÓN EX VIVO DE NEURONAS COLINÉRGICAS ESTRIATALES.	38
FIGURA 14. ADQUISICIÓN DE LA RELACIÓN ACCIÓN- CONSECUENCIA Y PRUEBA DE DEVALUACIÓN EN ANIMALES CHAT-CRE:ARCH3.0-EYFP Y ANIMALES CHAT-CRE:EYFP.	40
FIGURA 15. INHIBICIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO ESTRIATAL DURANTE LA DEGRADACIÓN DE LA CONTINGENCIA.	42
FIGURA 16. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN OPTOGENÉTICA DE LAS INTCHS SOBRE LA MOTRICIDAD EN LA PRUEBA DE CAMPO ABIERTO.	44

RESUMEN

El núcleo estriado integra las entradas sinápticas que provienen de la corteza, del tálamo y del mesencéfalo. Está críticamente involucrado en el control motor y el aprendizaje de conductas habituales y/o dirigidas a una consecuencia. El estriado está constituido predominantemente por neuronas de proyección, de naturaleza GABAérgica, y una pequeña proporción de interneuronas Colinérgicas. Estas interneuronas colinérgicas (IntChs) proporcionan la principal fuente de acetilcolina al estriado. Sabemos que las IntChs son importantes para el aprendizaje mediado por reforzadores y la selección de acciones guiadas por estímulos relevantes. Recientemente las IntChs han cobrado importancia al proponerse que estas controlan mecanismos de flexibilidad y/o adaptación del comportamiento. La flexibilidad en el comportamiento permite a los animales adaptarnos a los cambios en las contingencias que suceden en el ambiente, una capacidad crucial para la supervivencia de los organismos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la contribución de las IntChs del estriado durante el cambio en la contingencia entre una acción y su consecuencia, para esto entrenamos animales a realizar acciones en busca de una consecuencia. Una vez aprendida esta acción, inhibimos optogenéticamente la actividad de las IntChs durante el cambio de la contingencia. Nuestros resultados muestran que la inhibición de las IntChs durante el cambio en la contingencia bloquea la sensibilidad de los sujetos a detectar el cambio en la contingencia entre una acción y su consecuencia, efectos que no se observaron en experimentos control. Estos resultados indican que las IntChs controlan la adaptabilidad a un cambio de contingencia, permitiéndonos concluir que la actividad de estas interneuronas estriatales está directamente ligada al control de los mecanismos que permiten la detección de cambios en las contingencias.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores retos en el área de la biología es comprender las estrategias adaptativas producidas por la disyuntiva entre cada acción y su consecuencia, en donde la habilidad de adaptarse es crucial para la supervivencia de cada organismo. Las acciones guiadas por una consecuencia están vinculadas a los procesos adaptativos al ambiente cambiante, en donde la capacidad de adaptación constituye entrar en un estado de alerta (atención) y explorar nuevas condiciones en el medio, atendiendo a los cambios de contingencia entre acciones y su consecuencia. En estudios recientes se ha propuesto que las acciones en busca de una consecuencia se codifican en la actividad neuronal del estriado dorsomedial (Yin *et al.*, 2005), recientemente se ha propuesto que el estriado dorsomedial modula el proceso de aprendizaje y que la actividad de las neuronas colinérgicas de esta parte del cerebro participa en la integración de un nuevo aprendizaje con los adquiridos anteriormente (Bradfield *et al.*, 2013).

El estriado constituye el principal núcleo que recibe el mayor número de entradas sinápticas de los ganglios basales (GB), asociados principalmente al control de movimientos voluntarios y procesos cognitivos (Alexander *et al.*, 1986). El interés por entender su funcionamiento parte de la necesidad de entender la actividad de los circuitos neuronales que se ve afectada en enfermedades neurodegenerativas, teniendo como consecuencia un descontrol de los movimientos voluntarios, por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourette o trastorno obsesivo compulsivos en los cuales se desarrollan comportamientos que interfieren con la ejecución de acciones voluntarias. En este contexto el estudio de los GB ha mostrado que la actividad de este sistema es necesaria para la realización de acciones tanto habituales como en busca de una consecuencia (Redgrave *et al.*, 2010).

1.1. Ganglios basales y núcleo estriado

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales que se encuentran interconectados formando circuitos (Alexander *et al.*, 1986), en roedores este grupo está constituido por el núcleo estriado (el cual en primates se identifica como los núcleos caudato y putamen), el núcleo subtalámico, la *substantia nigra* la cual se subdivide en *pars reticulata* y *pars compacta*, el globo pálido externo y globo pálido medial o núcleo entopeduncular (globo pálido interno en primates).

En las neuronas de proyección del estriado se originan las dos vías de interconexión de los núcleos de los GB, la vía directa y la vía indirecta. En la vía directa las neuronas GABAérgicas de proyección estriatales conectan directamente con los núcleos de salida de los GB, el globo pálido medial y *substantia nigra pars reticulata*, a su vez estos núcleos envían proyecciones de naturaleza GABAérgica hacia el tálamo, el cual envía proyecciones Glutamatérgicas hacia el mismo estriado y/o la corteza motora. Por otro lado en la vía indirecta las neuronas GABAérgicas de proyección estriatales conectan con el globo pálido externo, el cual en turno envía proyecciones GABAérgicas hacia el núcleo subtalámico, el cual a su vez envía proyecciones Glutamatérgicas hacia los núcleos de salida de los GB, el globo pálido medial y la *substantia nigra pars reticulata* (Albin *et al.*, 1989; Gerfen, 2006; Redgrave *et al.*, 2010; **Figura 1**). Aunque se maneja que ambas vías trabajan en oposición, recientemente las investigaciones sobre estas vías, han mostrado que tanto la vía directa y la vía indirecta se activan durante la iniciación de movimientos naturales y movimientos asociados durante aprendizajes (Jin *et al.*, 2014; Tecuapetla *et al.*, 2014).

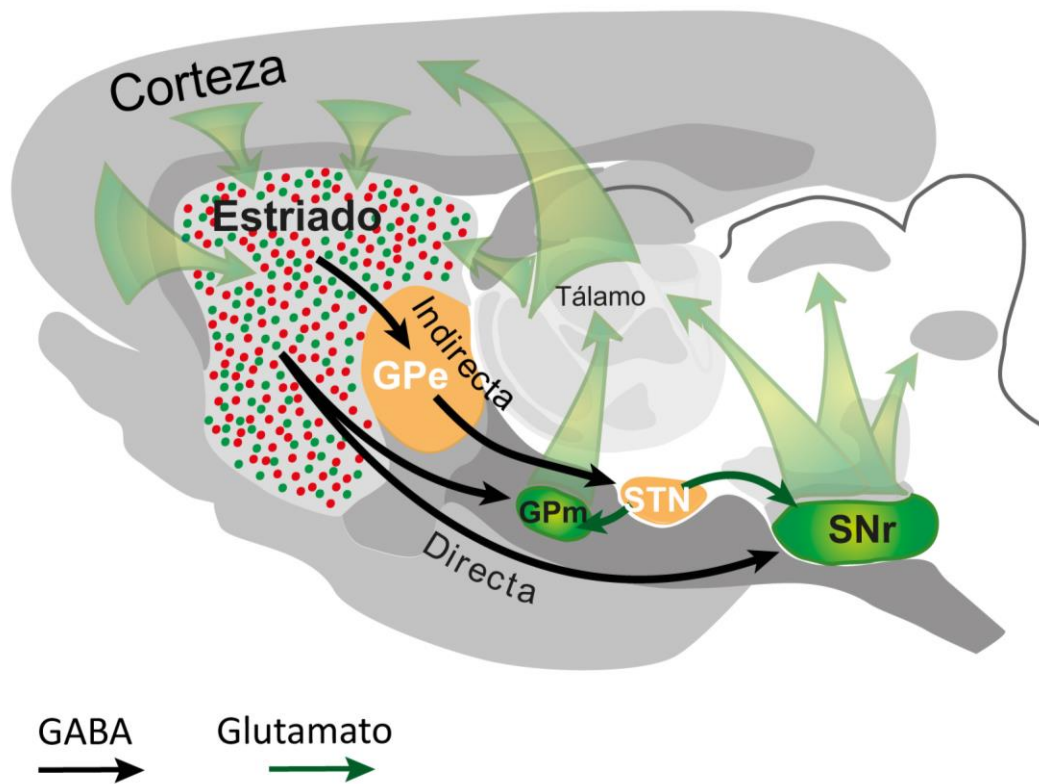


Figura 1. Organización de los circuitos de los Ganglios Basales en roedores. Proyecciones neuronales GABAérgicas (flechas negras), proyecciones neuronales excitatorias Glutamatérgicas (flechas verdes). Abreviaturas de los Ganglios Basales en roedor; Globo pálido externo (GPe), globo pálido medial (GPm), Núcleo subtalámico (STN). *Substantia nigra pars reticulata* (SNr) (Imagen modificada de Albin, 1989; Gerfen 2006; Redgrave *et al.* 2010).

El estriado de roedor cuenta con un promedio de 2.79 millones de neuronas, mucho más neuronas en comparación con el número de neuronas que contienen los núcleos de salida de los GB (GPm: 46,000 y SNr: 26,300 número de neuronas) (Ookschoot, 1996). Este núcleo está compuesto por neuronas de proyección de naturaleza GABAérgica (95%) (conocidas como neuronas espinosas medianas) que proyectan sus axones fuera del estriado conformando las vías directa e indirecta; y un menor porcentaje de neuronas locales que no abandonan el núcleo estriado denominadas interneuronas (5 al 10%) (Graveland y Difiglia, 1985; Tepper y Bolam, 2004), de estas un pequeño porcentaje de interneuronas, del 3 al 10%, son de naturaleza GABAérgica y únicamente ~3% son interneuronas colinérgicas que sintetizan y liberan en sus terminales sinápticas el neurotransmisor acetilcolina (Bolam *et al.*, 1984; Sorimachi y Kataoka, 1975; Tepper y Bolam, 2004). El estriado recibe entradas sinápticas de corteza, el

tálamo y el mesencéfalo, dichas entradas son las encargadas de iniciar la actividad de las vías directa e indirecta (Gerfen, 2006) de las interneuronas GABAérgicas (Koós y Tepper, 1999) y de modular la actividad de las neuronas colinérgicas que presentan actividad marcapaso (Koos y Tepper, 2002; Reynolds y Wickens, 2004).

1.2. La interneurona gigante colinérgica estriatal

El sistema colinérgico se encuentra dividido en dos sistemas de organización; una compuesta por las interneuronas colinérgicas (IntChs) y otro sistema colinérgico que está constituido por axones provenientes de neuronas del mesencéfalo (Guo *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2002). Las IntChs estriatales poseen amplias ramificaciones axonales, las cuales tienen una enorme inervación en todo el estriado, emitiendo de tres a cuatro dendritas que llegan a ramificar hasta un milímetro de diámetro (Wilson *et al.*, 1990) (**Figura 2**). Son las neuronas más grandes dentro del estriado con un diámetro del soma de entre 18.3 a 35 μm , clasificándola por sus características morfológicas como interneurona gigante colinérgica estriatal (Bolam *et al.*, 1984; Guo *et al.*, 2015). Las IntChs se encuentran inervadas por entradas sinápticas de neuronas GABAérgicas de proyección, de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo e interneuronas GABAérgicas. A su vez las IntChs conectan sinápticamente sobre las neuronas espinosas medianas modulando su actividad (Tepper y Bolam, 2004; Zhou *et al.*, 2002), además de modular pre-sinápticamente a las entradas corticales (Pisani *et al.*, 2000), evidenciando que las IntChs juegan un papel importante en modulación de las funciones estriatales.

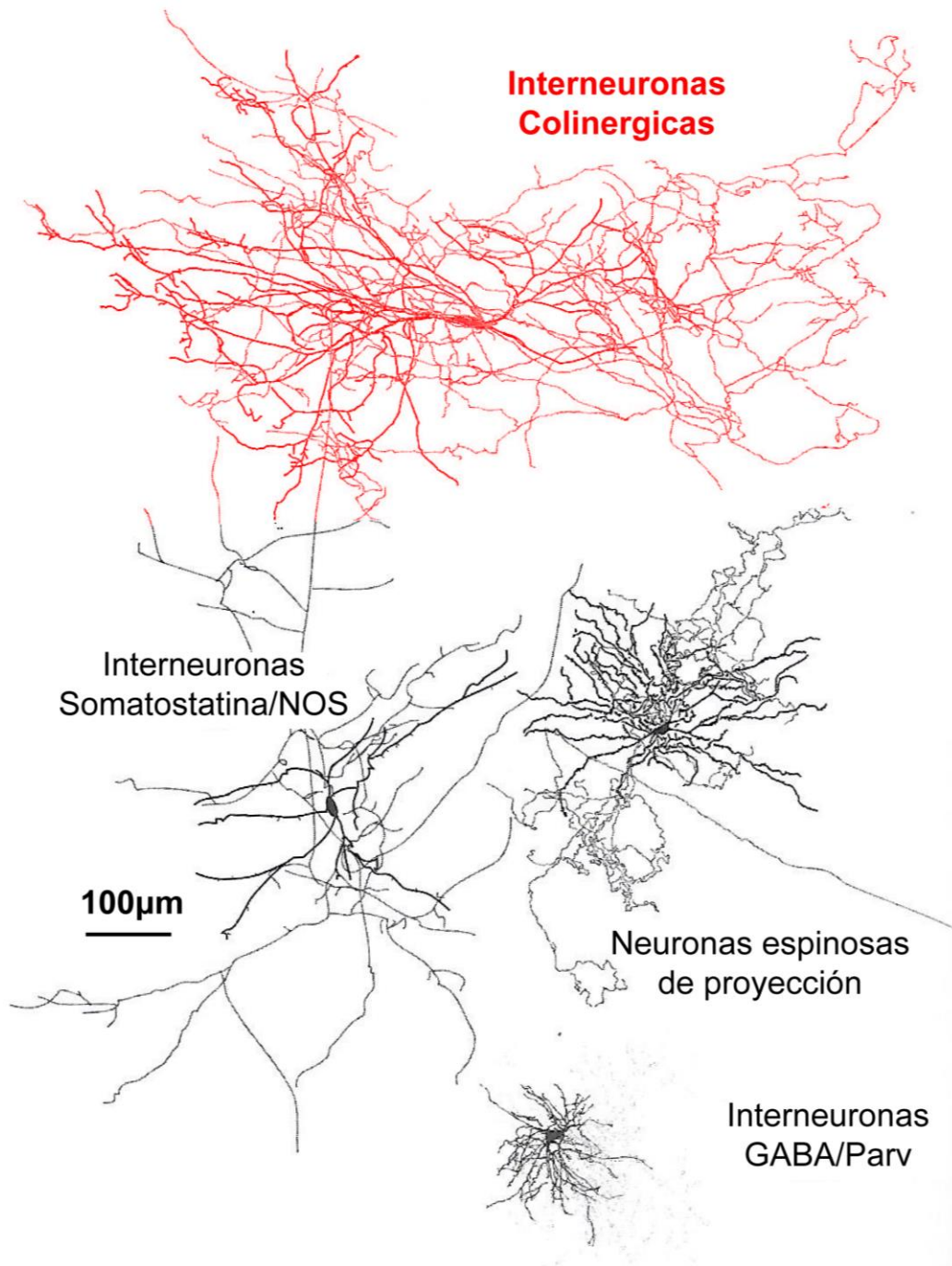


Figura 2. Reconstrucción anatómica de la interneurona colinérgica y tres tipos de interneuronas GABAérgicas del estriado. Nótese la arborización axonal de la interneurona colinérgica (resaltado en rojo, línea delgada) (modificado de Kawaguchi, 1993; Koos y Tepper, 1999); Abreviaturas, NOS: óxido nítrico sintetasa, Parv: Parvalbumina).

Las IntChs del estriado se pueden caracterizar por su peculiar apariencia como ya lo hemos visto, pero también, por sus propiedades fisiológicas. En estudios electrofisiológicos se ha encontrado que a diferencia de las neuronas espinosas medianas, las cuales requieren un gran número de entradas sinápticas para presentar actividad, las IntChs tienen la capacidad de presentar potenciales de acción de manera espontánea, incluso en la ausencia de entradas sinápticas, esto debido a los mecanismos que interactúan sobre su actividad característica, como: A) una conductancia continua de parte de los canales de Na^+ , los cuales se activan en un rango de voltaje sub-umbral durante la fase despolarizante en el intervalo entre espigas, B) una hiperpolarización activada por las corrientes de K^+ , que rápidamente pueden amplificar la hiperpolarización de la neurona en respuesta a una entrada sináptica inhibitoria y C) la presencia de corrientes I_h , donde la hiperpolarización de la neurona causa la activación de canales que permiten la entrada de corrientes catiónicas (Bennett y Wilson, 1999; Wilson, 2005) (**Figura 3**). De experimentos *in vitro* se ha observado que las IntChs exhiben un disparo tipo ráfaga (*bursting* en inglés) lenta y regular con potenciales de acción prolongados y una respuesta después de su hiperpolarización característica de lo que se ha denominado neuronas tónicamente activas en registros *in vivo* (*TANs* en inglés) (Bennett y Wilson, 1999), llevando a teorizar que se trata de las mismas neuronas (**Figura 3B y Figura 4B**).

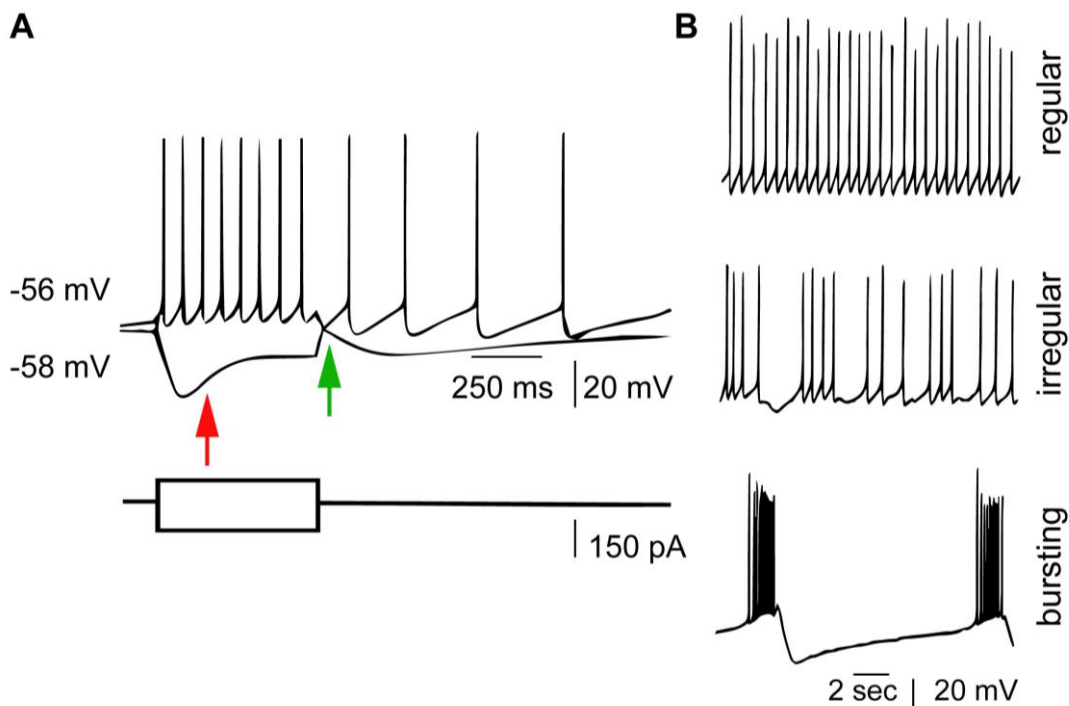


Figura 3. Características electrofisiológicas *in vitro* de las interneuronas colinérgicas estriatales. **A)** cambios de voltaje en respuesta a la inyección de pulsos cuadrados de corriente despolarizante e hiperpolarizante mostrando la actividad característica de las IntChs, note que durante la inyección de corrientes negativas el voltaje inicialmente es hiperpolarizado seguido inmediatamente de una ligera despolarización (flecha roja), también obsérvese la respuesta hiperpolarizante al finalizar la inyección de corriente despolarizante (flecha verde). **B)** Diferentes patrones de disparo de la actividad rítmica y espontánea de las IntChs en ausencia de algún tipo de estímulo por entradas sinápticas (modificado de Bennett y Wilson, 1999).

La acetilcolina que es liberada por las IntChs modula la actividad de las neuronas espinosas medianas de proyección a través de los receptores muscarínicos de tipo M1 y M4 los cuales están acopladas a proteínas G, quienes regulan conductancias excitatorias o inhibitorias (Ford *et al.*, 2016). Al mismo tiempo está acetilcolina puede modular las entradas sinápticas al estriado por medio de la activación de receptores M2-M3 y receptores nicotínicos (nAChR; ionotrópico) en las sinapsis Glutamatérgicas (Koos y Tepper, 2002; Pisani *et al.*, 2007), y a través de la activación de los receptores nAChR y M4 que está acoplado a una proteína G del tipo Gi/o modula la entrada de corrientes catiónicas en las terminales dopaminérgicas, facilitando o disminuyendo respectivamente la liberación de dopamina provenientes de neuronas del mesencéfalo (Rice y Cragg, 2004).

1.3. El papel funcional de las neuronas colinérgicas estriatales

El balance de dopamina-acetilcolina interviene en la modulación de las funciones estriatales, en neuropatologías degenerativas asociadas a desórdenes motores como la enfermedad de Parkinson, esta modulación se ve afectada debido a la ausencia de dopamina (Graveland y Difiglia, 1985; Hernández *et al.*, 2015; Wichmann y DeLong, 2003). Se ha observado que la disminución de neuronas dopaminérgicas resulta en una sobreactivación de las neuronas colinérgicas afectando comportamientos asociados a las funciones de los ganglios basales (Nomoto *et al.*, 2000; Redgrave *et al.*, 2010).

Para entender el papel de las IntChs sobre el comportamiento se han diseñado paradigmas experimentales en los cuales se entrenan animales para realizar tareas específicas mientras se registra la actividad de estas interneuronas *in vivo*. Por ejemplo; el equipo de Romo & Schultz, (1990) entrenaron a primates no humanos en un tarea de condicionamiento operante, la tarea consistía en iniciar un ensayo colocando una mano libre sobre una palanca fija, enseguida para asociar un estímulo a la recompensa y desencadenar el movimiento de la mano en la palanca hacia la caja donde se encuentra la recompensa se presentaba un estímulo visual-auditivo al abrir la puerta de la caja que permitía acceder a la recompensa, durante esta tarea se registró la actividad de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, hallando una relación de la actividad dopaminérgica ante la recompensa (**Figura 4A**). Opuesta a la actividad observada por Romo y Schultz, el grupo de Aosaki (1994) hizo registros en el estriado y entrenó primates no humanos a asociar un estímulo auditivo con una recompensa, lo cual consistía en presentar un tono (click) seguido por la liberación de la recompensa (jugo), registrando la actividad de neuronas tipo TANs observaron que la actividad de estas neuronas se pausaba inmediatamente después de la presentación del click que anunciaba la recompensa, concluyendo que las TANs presentan actividad relacionada con la predicción de la recompensa (**Figura 4B**).

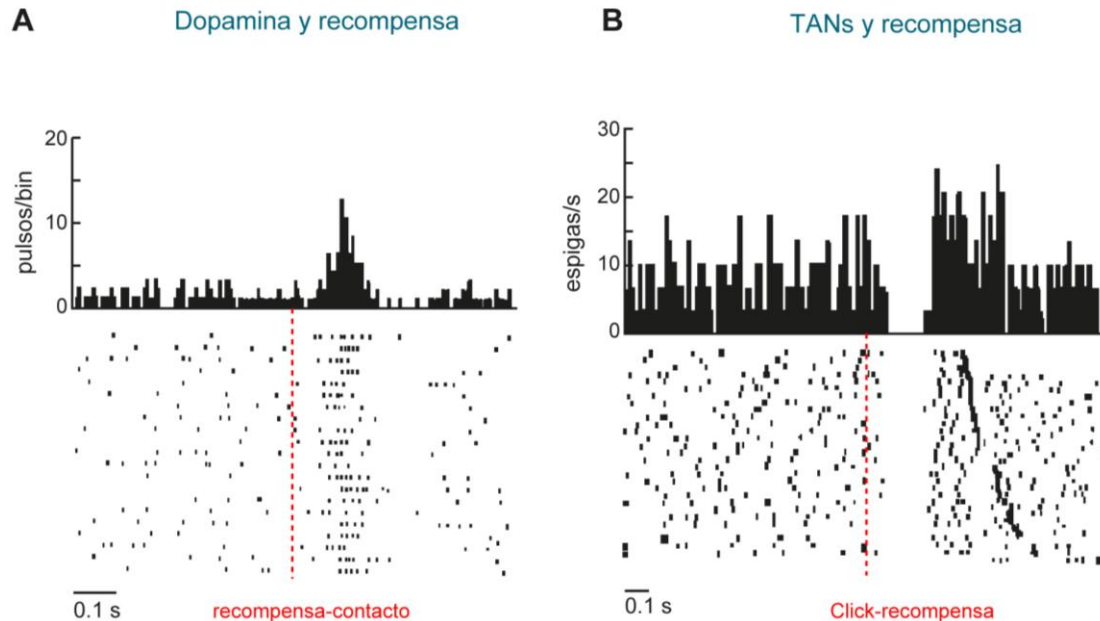


Figura 4. Actividad neuronal de las interneuronas colinérgicas relacionada a una recompensa. **A)** representación gráfica de la actividad (*Raster-plot*) de una neurona dopaminérgica del área tegmental ventral alineadas al momento en que el animal toca la recompensa (línea punteada roja), note el incremento de la actividad en respuesta a tocar la recompensa (modificado de Schultz y Romo, 1990). **B)** Actividad (*Raster-plot*) de una neurona estriatal tipo TAN alineada al estímulo que predice una recompensa (click; línea punteada roja), nótese la pausa de actividad tónica ante el estímulo que predice la liberación de la recompensa (modificado de Aosaki T, 1994).

A partir de estos experimentos se ha observado que las neuronas tónicamente activas del estriado (IntChs) participan durante la ejecución de movimientos y/o acciones motoras asociadas a señales sensoriales en busca de recompensas (Kimura, 1990). por el contrario hay poblaciones neuronales del mismo estriado que se activan y tienen actividad preparatoria durante la ejecución de movimientos aprendidos (Schultz y Romo, 1992). Al mismo tiempo se han identificado TANs, que generan una pausa en la actividad espontánea durante la ejecución de acciones en respuesta a señales sensoriales (Aosaki *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 2001). Desde su descubrimiento estas observaciones en las IntChs junto a la desregulación a la alta del neurotransmisor acetilcolina en ausencia de neuronas dopaminérgicas, son las que han atribuido un papel crucial de las IntChs durante la realización de movimientos, el aprendizaje y memoria en comportamientos dirigidos por consecuencias (Matsumoto *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002).

1.4. Acciones dirigidas hacia un objetivo o en busca de una consecuencia

Los organismos están sujetos a realizar adaptaciones conductuales que les permiten sobrevivir a los constantes cambios ambientales, una importante estrategia adaptativa en organismos superiores es la flexibilidad del comportamiento entre conductas habituales (acciones estímulo-respuesta) y conductas dirigidas hacia consecuencias (acciones guiadas por una consecuencia ya sea una recompensa o un castigo). La conducta habitual está controlada por el aprendizaje de la contingencia (la probabilidad con la que suceda o no un hecho) entre la acción y la recompensa, mientras que la conducta dirigida a una consecuencia consiste de la adquisición del valor incentivo por la recompensa (Balleine y Dickinson, 1998).

En los procesos habituales la flexibilidad y eficiencia de acciones se da a través de la automatización de decisiones recurrentes en forma de reglas o hábitos. El Dr. Dickinson (Balleine y Dickinson, 1998) define las conductas habituales como comportamientos estímulo-respuesta que se producen a pesar de una prueba de sensibilidad a la devaluación (al reducir el valor del reforzador), esto es, en una tarea de condicionamiento operante el animal es sobreentrenado durante varios días a presionar una palanca y liberar una recompensa, después de este entrenamiento se realiza una prueba de devaluación en donde se reducirá el valor relativo por la comida saciando el apetito del animal antes de la prueba, después el animal se presenta a la palanca que tuvo durante el entrenamiento por lo que se espera que los animales habituados continúen presionando a pesar de estar saciados por la recompensa obtenida por la presión de la palanca.

Para los animales es crucial ser capaz de inhibir un hábito, es decir la capacidad de entender un cambio en la contingencia y realizar el cambio entre un comportamiento habitual a comportamientos guiados hacia una consecuencia. Una conducta dirigida hacia un objetivo se define como la conducta en la que se realiza una o varias acciones (secuencias de acciones) en busca de una consecuencia (Balleine y Dickinson, 1998) (**Figura 5**). En una prueba de devaluación, a los animales que se les devalúe la recompensa se espera una disminución en el número de presiones (acción) que originalmente guiaban la consecuencia de obtener la recompensa.



Figura 5. Esquema de las conductas dirigidas a una consecuencia en condicionamiento operante. (modificado de Ashvin, 2013).

1.5. Las interneuronas colinérgicas estriatales en el control de acciones dirigidas a una consecuencia

Como ya se vio, la capacidad de cambiar de estrategias en diferentes contextos es crucial en el comportamiento adaptativo. Una de las estructuras principales que integran la asociación de la relación acción-consecuencia en el comportamiento instrumental dirigido a una consecuencia es el estriado dorsomedial (Yin *et al.*, 2005).

Las investigaciones recientes realizadas con técnicas moleculares de manipulación específica de los sistemas neuronales, muestran que las IntChs son importantes en el comportamiento condicionado de animales hacia reforzadores permitiendo señalar el valor motivacional de estímulos conductualmente relevantes (Witten *et al.*, 2010), posiblemente a través de la regulación de la actividad neuronal de los circuitos de los ganglios basales (English *et al.*, 2011).

Sin embargo, aún desconocemos que procesos celulares median la flexibilidad en el aprendizaje cuando se necesita percibir que hubo un cambio en la contingencia de una acción y su consecuencia. Recientemente se ha sugerido que las IntChs reducen la interferencia entre el nuevo y el aprendizaje existente. Específicamente el grupo del Dr. Balleine (Bradfield *et al.*, 2013) realizaron tres experimentos 1) lesión de las neuronas del núcleo parafascicular del tálamo que se sabe proyectan sobre las IntChs del estriado dorsomedial, 2) inhibición de la actividad de las IntChs, usando infusiones de agonistas de los receptores muscarínicos, y 3) desconexión de las proyecciones sinápticas tálamo parafascicular-estriado, observando que los animales son incapaces de detectar el cambio de contingencia entre una acción y su consecuencia.

Dados los antecedentes presentados se plantea como hipótesis general que las IntChs controlan y/o participan en la detección de cambios en la contingencia entre una acción y su consecuencia. En el presente trabajo de tesis nos dimos a la tarea de evaluar la contribución de las IntChs del estriado dorsomedial sobre la detección de un cambio en la contingencia entre una acción y su consecuencia.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El sistema colinérgico estriatal contribuye en la sensibilidad para identificar el cambio en una contingencia entre una acción y su consecuencia?

3. HIPÓTESIS

La actividad de las interneuronas colinérgicas del estriado dorsomedial es necesaria en la flexibilidad adaptativa de la conducta en sujetos al cambio de contingencia en la relación de una acción y su consecuencia.

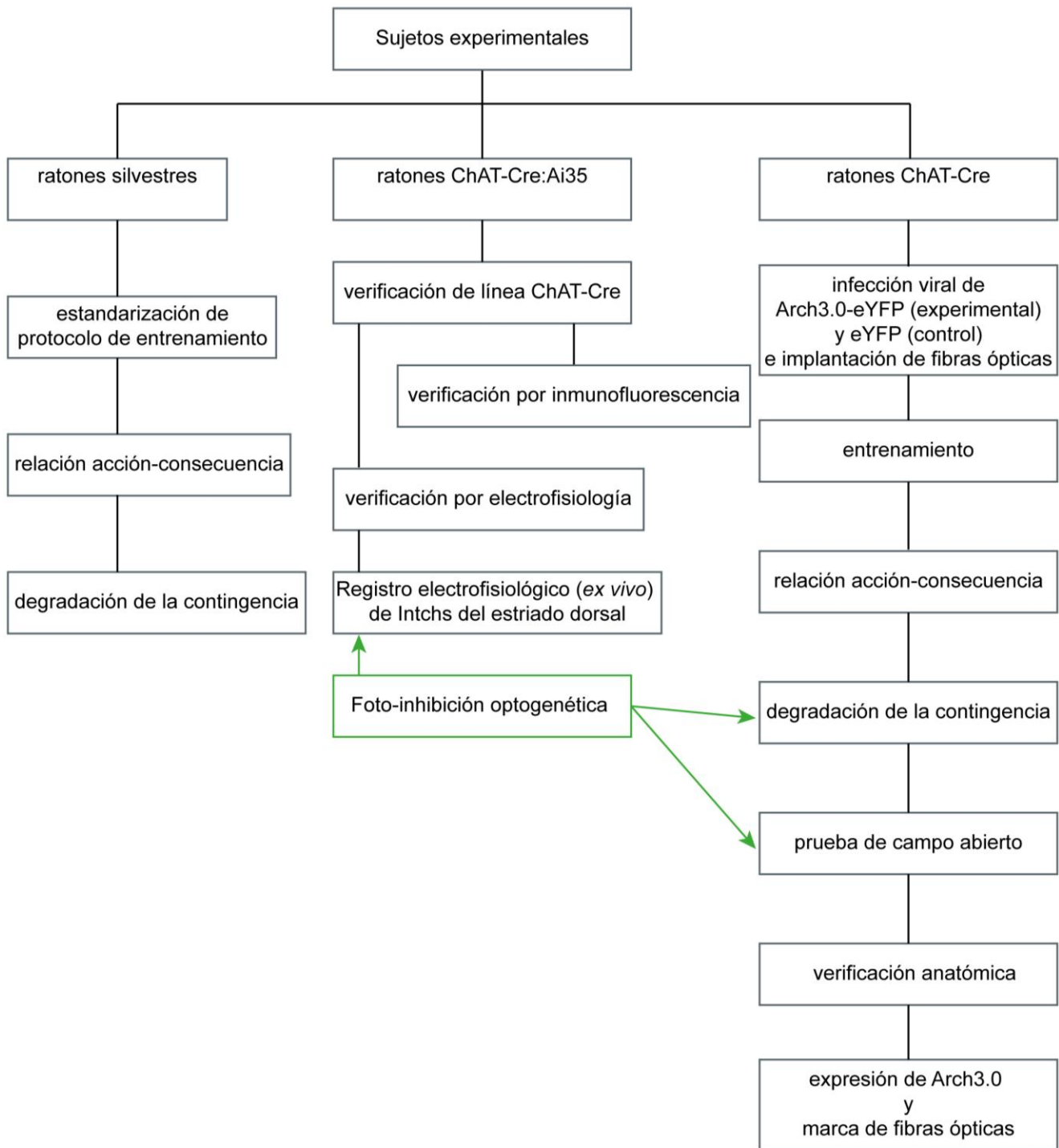
4. OBJETIVO

Evaluar la participación de las interneuronas colinérgicas del estriado en la flexibilidad adaptativa conductual de los sujetos al cambio de contingencia entre una acción y su consecuencia por optogenética.

4.1. Objetivos específicos

1. Implementar una tarea conductual para evaluar el cambio en la contingencia de una acción y su consecuencia.
2. Inhibir la actividad de las neuronas colinérgicas durante el cambio en la contingencia de una acción y su consecuencia.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MÉTODOS

6.1. Sujetos experimentales

Para implementar el protocolo de entrenamiento en acciones dirigidas a consecuencias y entrenamiento de degradación de la contingencia se utilizaron 12 animales (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6J (no transgénicos). En la manipulación del sistema colinérgico se utilizaron 8 animales transgénicos (*Mus musculus*) y 7 animales transgénicos de grupo control de ocho semana de edad expresando la proteína Cre-recombinasa (Cre) bajo el promotor de colinacetiltransferasa ChAT-Cre (ChAT^{cre/-}, Strain Name: STOCK Tg (ChAT-Cre) GM60Gsat/Mmucd, (detalles de la expresión disponibles en: https://www.mmrrc.org/catalog/sds.php?mmrrc_id=17258), ratones transgénicos Ai35 (Strain Name: ss-Arch-EGFP-ER2, (detalles de la expresión disponibles en: <https://www.jax.org/strain/012735>). Y animales doble transgénicos resultado de animales Ai35 que fueron cruzados con animales ChAT^{cre/-}, para inducir la expresión de Archærhodopsin y GFP (Arch-eGFP) en neuronas colinérgicas (animales denominados para este protocolo ChAT-Cre:Ai35).

6.2. Procedimientos de Comportamiento

6.2.1. Pre-entrenamiento (formando la asociación comedero-reforzador)

El primer día todos los ratones estuvieron en una cámara operante por dos sesiones de 30 minutos cada uno, con un intervalo de 30 minutos entre la primera y la segunda sesión, en una de estas sesiones el reforzador fue un comprimido alimenticio denominado *pellet* para el proyecto (14 mg de peso cada uno; *Bio-Serv*) y en la otra una solución de sacarosa al 10 % (0.15 mL por cada reforzador de sacarosa; *SIGMA-Aldrich*). Cada sesión inició cuando la lámpara de la cámara operante se encendía y terminaba cuando la lámpara se apaga. En este entrenamiento los animales recibieron un reforzador en promedio cada minuto, presentándoles un total de 20 reforzadores de pellets o sacarosa. Ninguna palanca fue expuesta durante este entrenamiento (**Figura 6A**).

6.2.2. Reforzamiento continuo (formando la relación acción-reforzador)

Para formar la asociación entre una acción y un reforzador los animales fueron requeridos a presionar una palanca para conseguir el reforzador. Después del día de pre-entrenamiento los animales fueron presentados a una palanca en un programa de reforzamiento continuo (CRF) por dos sesiones al día, en este entrenamiento cada presión de la palanca liberó un reforzador que fue asignado y contrabalanceado. Es decir, la palanca “A” al ser presionada liberaba el reforzador de sacarosa en una de las sesiones y en la otra sesión la palanca “B” al ser presionada liberaba el reforzador de pellet (o viceversa constituyendo grupos experimentales en donde la mitad de los animales tuvieron el orden descrito y la otra mitad el orden contrario). Para cerciorarnos de que los animales adquiriesen

la relación entre presionar la palanca y recibir un reforzador, los animales fueron entrenados por dos días en reforzamiento continuo-15 (CRF-15), este entrenamiento consistió en que la sesión terminaba si el animal conseguía 15 reforzadores (una presión de la palanca guiaba a un reforzador) o si se cumplían 30 minutos en la sesión. Los siguientes dos días los animales fueron entrenados en reforzamiento continuo-30 (CRF-30), sesiones que finalizaban si el animal conseguía 30 reforzadores o si se cumplían 30 minutos en la sesión (**Figura 6A**).

6.2.3. Razón Variable (formando la relación acción-consecuencia)

Para establecer la relación entre una acción (presionar la palanca) y su consecuencia (recibir un reforzador) los animales fueron entrenados a presionar una palanca y conseguir un reforzador con una razón variable (Hammond, 1980). Durante esta fase los animales fueron entrenados en dos sesiones por día, manteniendo el orden del entrenamiento de CRF (acción 1 → reforzador 1 y acción 2 → reforzador 2). Para este entrenamiento en cada sesión los animales recibieron el reforzador con una razón variable de 5 (RR5) por dos días (una razón variable de 5 significa que el animal tenía que presionar la palanca en promedio 5 veces para conseguir un reforzador, es decir, cada acción conduce al reforzador con una probabilidad del 20%). Posteriormente los animales fueron entrenados por dos días en razón variable 10 (RR10; cada presión guiaba al reforzador con una probabilidad del 10%; en promedio realizar 10 presiones conducía a un reforzador) y dos días de razón variable 20 (RR20; cada presión guiaba al reforzador con una probabilidad del 5%; en promedio realizar 20 presiones conducía a un reforzador), todas las sesiones en esta fase terminaron cuando el animal cumplió 30 minutos o cuando obtenían 20 reforzadores (**Figura 6B**).

6.2.4. Prueba de Devaluación

Para evaluar si los animales realizan una acción (presionar una palanca) en busca de su consecuencia (recibir un reforzador), los animales fueron sujetos a una prueba de devaluación. La prueba de devaluación consistió en que al día siguiente de la última sesión en el programa RR20 a cada animal se le dio libre acceso a uno de los reforzadores ya sea a pellets (3gr en una caja Petri) o sacarosa (30 mL en un bebedero) por una hora antes de meterlo a la caja de entrenamiento.

El objetivo de esto fue reducir el valor motivacional asociado al reforzador al cual se le dio libre acceso (Devaluado) sobre el reforzador que no recibió durante esta devaluación (No devaluado). Inmediatamente a la devaluación cada animal fue expuesto por 10 minutos a ambas palancas con las que fue entrenado en razón variable (en este caso la presión de las palancas no libero reforzadores), teniendo como intención el medir cuántas presiones hacia sobre la palanca del reforzador devaluado contra las presiones del reforzador no devaluado. Al siguiente día se realizó la devaluación del reforzador opuesto al devaluado un día antes. Los ratones fueron expuestos nuevamente a ambas palancas para medir el palanqueo como el día anterior (**Figura 6C**).

6.2.5. Degradación de la contingencia

Una vez formada la relación acción-consecuencia procedimos a un entrenamiento en donde se degradase la contingencia entre la acción y uno de los reforzadores, manteniendo la contingencia estable para el otro reforzador. Los animales viniendo del entrenamiento RR20 presentan una contingencia definida por la relación de una acción con una recompensa (probabilidad de recibir un reforzador dada la acción). La degradación de la contingencia (cambio en la contingencia) consistió en que la probabilidad de recibir el reforzador ahora cambio a recibirlo con una probabilidad del 5% si el animal no realizaba ninguna acción, es decir, si

el animal no presionaba la palanca recibía un reforzador (en promedio si el animal no presionaba durante 40 segundos obtenían un reforzador)

Esta fase inicio después del último día de la prueba de devaluación, para recuperar el desempeño de los animales a presionar la palanca, estos fueron re-entrenados durante dos días con el programa de razón variable RR20. Posteriormente cada animal fue expuesto por tres días de entrenamiento al protocolo de degradación de la contingencia (CD) para uno de los reforzadores (degradado) y el otro reforzador se mantuvo RR20 (no degradador), ambos seleccionados aleatoriamente (**Figura 6D**).

6.2.6. Prueba de la degradación de la contingencia

Para evaluar el efecto de la degradación de la contingencia, al siguiente día, después del final del entrenamiento en degradación de la contingencia, los animales fueron expuestos a las dos palancas (la que guiaba al reforzador degradado y al no degradado) por 10 minutos y se registraron las presiones de las palancas sin que ninguna presión liberara algún reforzador (**Figura 6E**).

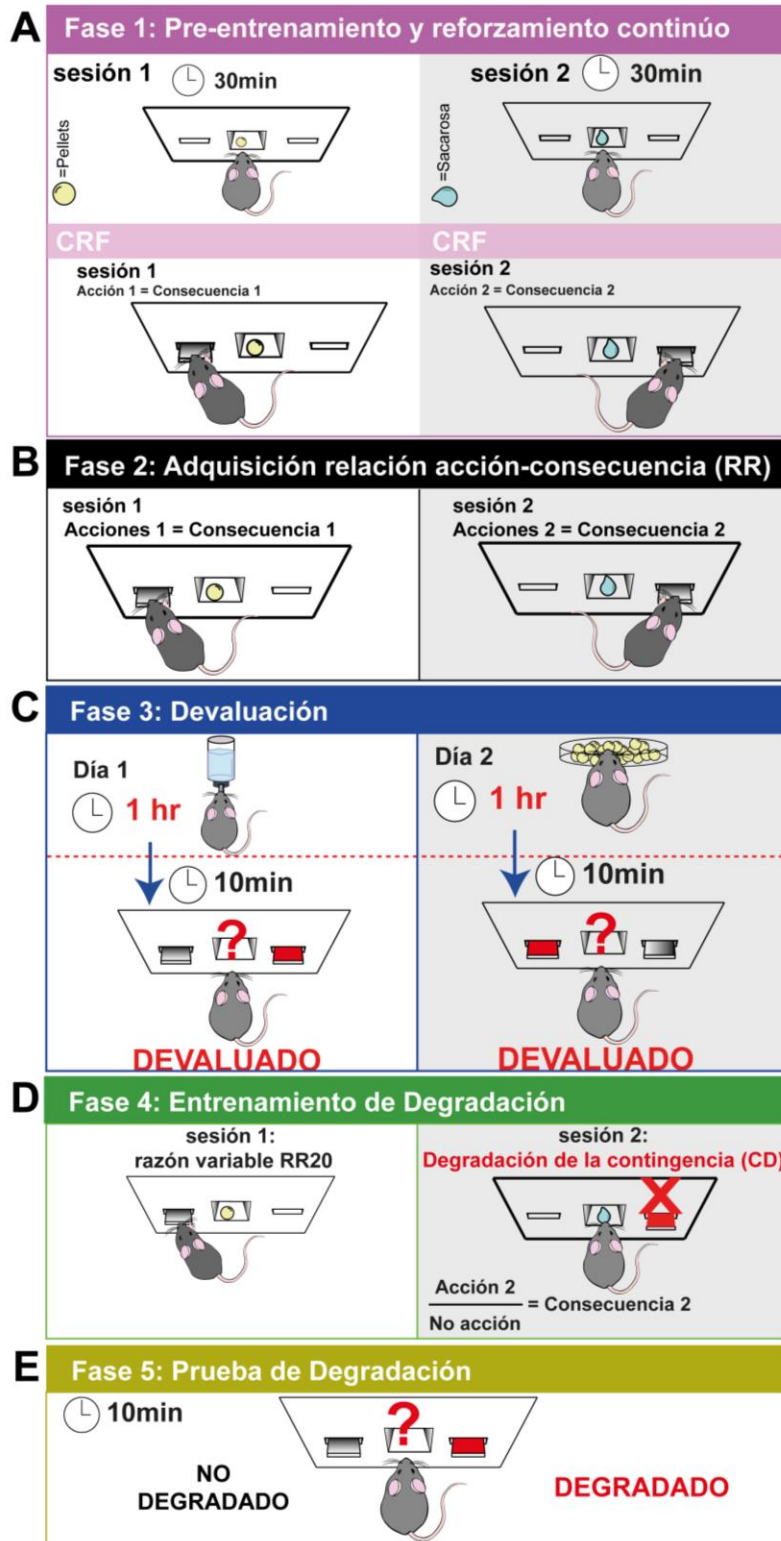


Figura 6. Entrenamiento en acciones dirigidas a objetivos y entrenamiento en Degradación de la Contingencia. A) Pre-entrenamiento de los animales para habituarlos a la cámara operante y reforzamiento continuo **B)** Entrenamiento de animales a adquirir acciones dirigidas a un objetivo (presión de palanca=recompensa). **C)** Prueba de devaluación para evaluar la adquisición de acciones dirigidas a objetivos. **D)** Entrenamiento en degradación de una de las recompensas para evaluar la percepción en el cambio de una contingencia. **E)** Prueba de Degradación de la contingencia para evaluar las presiones de la palanca realizadas en las sesiones en degradación en la contingencia durante el entrenamiento.

6.3. Estrategia de inhibición de las interneuronas colinérgicas del estriado dorsomedial

Para poder realizar la inhibición transitoria y de manera rápida la actividad de las IntChs del estriado se decidió utilizar la expresión de la opsina *Archaeorhodopsin-3.0* (Arch3.0), esta opsina microbial al activarse con luz verde permite el transporte de protones hacia el exterior de la membrana celular hiperpolarizandola e inhibiendo el disparo de las neuronas que la expresan (Chow et al., 2010).

Para lograr la expresión de las opsinas Arch3.0 en las neuronas colinérgicas del estriado se utilizó el sistema condicional *Cre-loxP* y la línea de ratones transgénicos ChAT-Cre (*GENSAT*).

6.3.1. Verificación por inmunofluorescencia

Para observar la especificidad del promotor ChAT de la línea de ratones transgénicos, se cruzaron animales de la línea de ratones Ai35 (línea reportera que además expresa Arch en presencia de Cre) generando animales doble transgénico ChAT-Cre:Ai35. Estos animales doble transgénicos presentan la expresión de la proteína Arch3.0-GFP en las neuronas colinérgicas, permitiendo comparar la marca de la GFP con la marca por inmunofluorescencia contra la enzima ChAT.

Uno de los cerebros de un animal ChAT-Cre:Ai35 fue fijado por perfusión miocárdica con 20-30 ml de una solución de paraformaldeído (PFA) al 4% (7.3-7.4 pH), posteriormente se extrajo y fijó en la misma solución de PFA, después fue lavado en una solución salina tamponada por fosfato (PBS) al 1% mantenido a 4° C por una noche. Se realizaron cortes coronales de 50 µm usando un vibratomo (*TPI Vibratome 1000, sectioning system*) separando las secciones obtenidas en placas multipocillo en solución PBS 1%. En el primer día de tratamiento se realizaron tres lavados por cinco minutos en PBS 1% y al final se adicionó el

anticuerpo primario de anti-ChAT (AG220; Milipore, dilución 1/2500) en PBS 1% con tritón 0.4%, se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. El segundo día, se realizaron cinco lavados por cinco minutos en PBS 1%, al final se adicionó el anticuerpo secundario de *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody*, Alexa Fluor 594 (A-11032; Thermo Fisher Scientific, dilución 1/1000) en PBS 1% con tritón 0.1%, incubado por dos horas a temperatura ambiente. Después se realizaron cinco lavados por cinco minutos en PBS 1%. Se adicionó 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; dilución 1/1000), se enjuagó en PBS 1% y finalmente se montaron las muestras sellándose con esmalte para posteriormente observarlas al microscopio confocal.

6.3.2. Verificación por electrofisiología

Para verificar la especificidad de la línea ChAT-Cre y el efecto de la inhibición por optogenética, se realizaron registros electrofisiológicos en rebanadas de las IntChs del estriado dorsal marcadas por fluorescencia (GFP) en animales ChAT-Cre: Ai35.

Para obtener las rebanadas del estriado los ratones utilizados fueron perfundidos miocárdicamente con 20 a 30 ml de solución de sacarosa (234 mM Sacarosa, 7 mM Dextrosa, 28 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 1.44 mM NaH₂PO₄, 15,0 mM Piruvato; saturado con 95% O₂ / 5% de CO₂; a pH 7.3) (15-30 ml / min) para obtener rebanadas de cortes coronales de 250 µm con un vibratomo (*Lancer 1000*) sobre la misma solución, las rebanadas obtenidas fueron colectadas en una solución externa homogeneizadora (128 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 10 mM Glucosa y 2 mM CaCl₂; saturado con 95% O₂ / 5% de CO₂; pH 7.3) durante 30 min antes de realizar el registro electrofisiológico. En el registro electrofisiológico se utilizó una solución interna (130 mM Gluconato de potasio, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM Na⁺-ATP, 0.3 mM Na⁺-GTP; a pH 7.3) en una micropipeta de registro (electrodo de 3-6 MΩ). Los registros fueron realizados en la configuración de célula completa usando un amplificador Axoclamp-2B (*Axon Instruments*) y

registrando en una computadora con una tarjeta de conversión análogo-digital (*Labview, National Instruments*).

Para probar el protocolo de inhibición optogenética, se inyectaron pequeños pulsos cuadrados de corriente de 2 ms, a 100 pA cada 500 ms generando un tren de potenciales de acción ante cada pulso y foto-estimular con un pulso de luz verde ($\lambda=556$ nm) por 4 segundo.

6.4. Estrategia de expresión por infección viral en animales ChAT-Cre e implantación de fibras ópticas

Para la manipulación optogenética del sistema colinérgico *in vivo*, se realizó la expresión de opsinas por medio de un vector viral dependiente del sistema Cre-loxP, dicho vector viral (virus adeno-asociados serotipo 5, AAV5) contiene la secuencia para la expresión de la opsina *Archaeorhodopsin-3.0* acoplada (como proteína de fusión) a la proteína amarillo fluorescente *eYFP* (rAAV5/Ef1 α -DIO-eArch3.0-eYFP-WPRE; UPENN, *Vector core*) (**Figura 7A**). Para los experimentos control se utilizó un vector viral similar pero que sólo expresó la proteína reportera *eYFP*: pAAV2/1.EF1 α -DIO-EYFP-WPRE (UPENN, *Vector core*) (**Figura 7B**).

Para infectar a las células con el vector viral y expresar la opsina Arch-3.0 en neuronas colinérgicas se micro-inyectaron 500 μ L (1.35×10^{12} moléculas de virus) a 2.6 nL cada 5seg (a una tasa de 23nL/s) bilateralmente en el estriado dorso-medial de animales ChAT-Cre, (Antero-Posterior:-0.1 mm, Medio-Lateral: ± 1.8 mm y Dorso-Ventral: -2.2 mm) (**Figura 7A-B**). Las inyecciones del virus fueron hechas con una pipeta de vidrio con capacidad de 2mL y boquilla < 50 μ m, conectadas a un micro-inyector Nanoject II (*Drummond Scientific Company*). Después la pipeta de micro-inyección se mantuvo en su sitio durante 18 minutos antes de retraerla permitiendo la difusión del virus. Secuencialmente, después de retirar la pipeta, se implantaron bilateralmente fibras ópticas de 300 μ m de diámetro a 100 μ m por encima del punto de la infección viral (Antero-Posterior: -0.1 mm, Medio-Lateral:

± 1.8 mm y Dorso-Ventral: -2.1 mm) (**Figura 7C**), posteriormente se fijaron las fibras ópticas implantadas con una mezcla de metil-metacrilato y acrílico dental al cráneo para evitar la caída de las fibras durante el entrenamiento y la foto-inhibición. El mismo procedimiento fue realizado para expresar sólo la proteína eYFP en el grupo control.

La cirugía estereotáxica fue realizada bajo anestesia usando una mezcla de oxígeno (1 L/min) y 1% de isoflurano (inicialmente al 4%, y posteriormente mantenido durante la intervención en 1 a 1.5%) con el animal montado en un aparato estereotáxico (*David Kopf Instruments*) y un controlador de temperatura corporal (*Physitemp Instruments*).

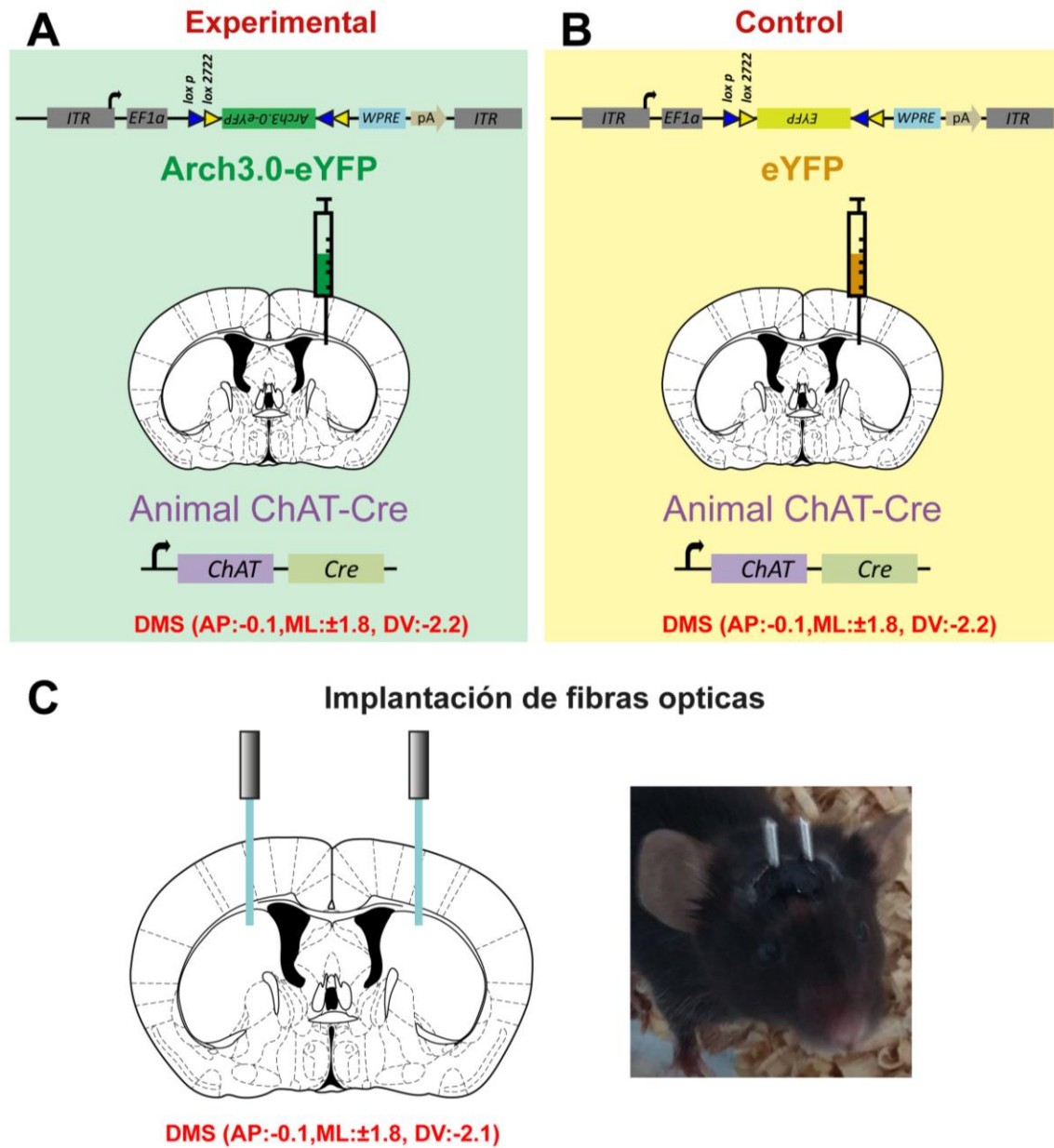


Figura 7. Estrategias de expresión de opsinas e implantación de fibras ópticas. A y B) Infección del vector viral de la opsina Arch3.0-eYFP y de la proteína eYFP en animales ChAT-Cre al estriado dorsomedial. **C)** Implantación de fibras ópticas en el estriado dorsomedial después de la infección viral que permite realizar la foto-estimulación a las IntChs infectadas y fijación de las fibras ópticas al cráneo del animal.

6.5. Foto-inhibición optogenética en el entrenamiento en degradación de la contingencia

Para realizar la foto-inhibición del sistema colinérgico estriatal durante el entrenamiento en degradación de la contingencia y evaluar la contribución de las IntChs sobre la identificación de cambios en la contingencia entre una acción y su consecuencia, los animales ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP (grupo experimental) y los animales ChAT-Cre:eYFP (grupo control) fueron entrenados en los protocolos de entrenamiento de la fase 1 a 3, realizando la foto-inhibición de las IntChs solo durante las sesiones de entrenamiento en degradación de la contingencia (fase 4) **(Figura 8A)**.

La foto-inhibición se realizó con un láser de estado sólido de longitud de onda de 556 nm (*CNI Lasers*), controlando el paso del rayo láser hacia la cabeza del animal por medio de un modulador acústico óptico (*AA OptoElectronic*) mandando pulsos continuos o en trenes generados por una tarjeta Arduino (*Arduino1*) en función del análisis en línea de la posición del animal dentro de la caja de entrenamiento.

Para mandar dichos pulsos se utilizó un *software* de detección de movimiento en línea, el cual se encendía mandando un pulso óptico de 556 nm a una intensidad de 25 mW (pulsos continuos) o 50mW (pulsos en trenes) cada vez que el animal estaba en la zona de la palanca y se apagaba cuando el animal salía de la zona en la que se realizaban las presiones **(Figura 8B)**. Además, al inicio de cada sesión de inhibiciones optogenéticas se habilitaba un controlador (*Shutter controller; SC10*) que permite el paso de los haces de luz provenientes del modulador acústico-óptico guiándolo al divisor del láser para ser conectado a dos fibras ópticas de 300 μm de diámetro y 2 m de largo (*NA 0.48; Doric Lenses*) que se acoplaron a las fibras implantadas en los animales. Las mediciones de la intensidad de salida de luz a través de las fibras ópticas fueron verificadas todos los días de foto-estimulación por medio de un medidor de watts (*Potenciómetro;*

PM100D, Thorlabs). La intensidad de salida fue calculada con el modelo de propagación de luz en tejido cerebral desarrollado en el laboratorio del Dr. Karl Deisseroth (<http://www.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>).

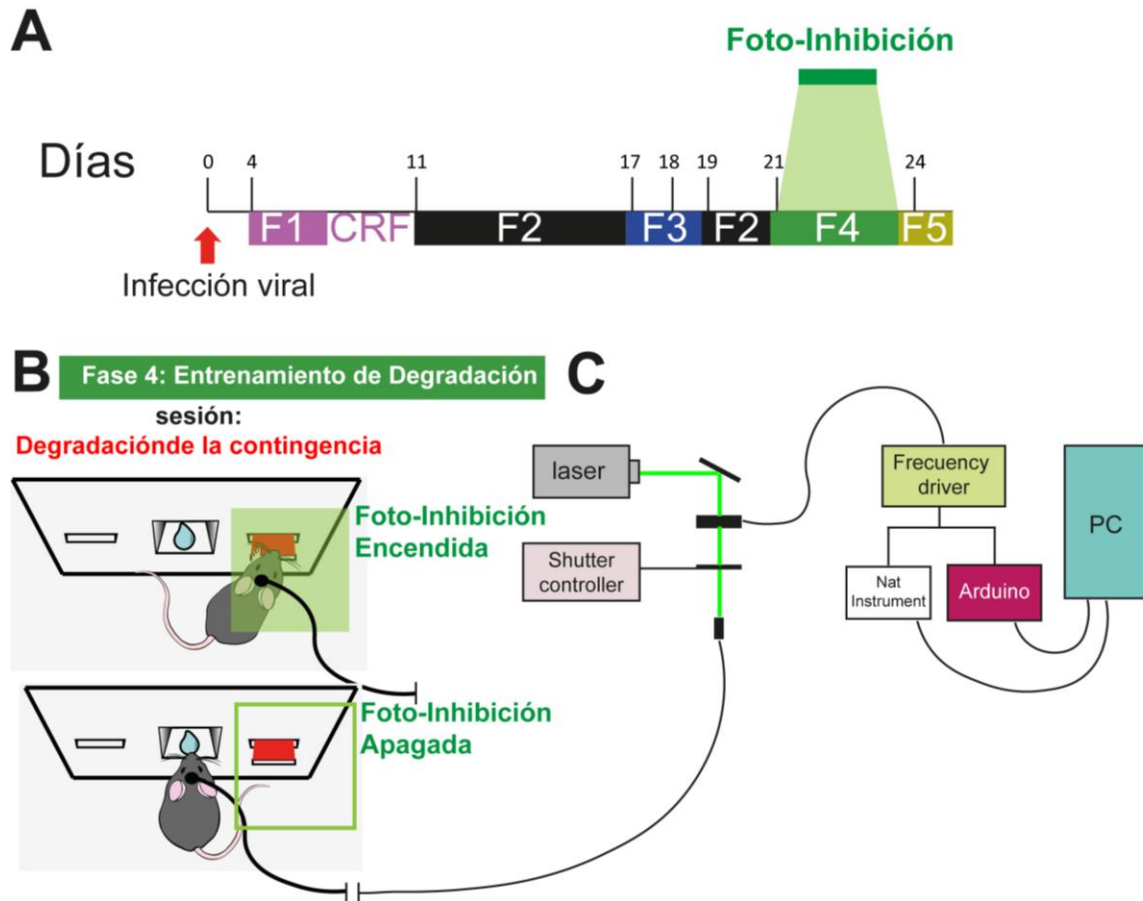


Figura 8. Foto-inhibición optogenética. A) línea temporal utilizada en el entrenamiento de acciones dirigidas a una consecuencia y foto-inhibición hecha durante el entrenamiento en degradación de la contingencia. **B)** Estrategia de inhibición optogenética mediante detección de movimiento (recuadros verdes zona de foto-inhibición; relleno: encendido, vacío: apagado). **C)** Esquema de conexión de los controladores de la foto-inhibición modulada por detección de movimiento.

6.5.1. Verificación anatómica de la expresión de *Archaerhodopsin-3.0* e implantación de fibras ópticas en animales ChAT-Cre

Después de haber completado los experimentos de comportamiento los animales fueron anestesiados con isoflurano e inyectados vía intraperitoneal con 0.2 mL de ketamina/xilacina (5mg/Kg de xilacina; 95 mg/kg ketamina). Inmediatamente fueron perfundidos miocárdicamente con PFA al 4% (7.3-7.4 pH), los cerebros fueron extraídos y fijados en la misma solución de PFA y mantenidos a 4°C durante toda la noche. Después a los cerebros se realizaron cortes coronales de 100 μ m usando un vibratomo (*TPI Vibratome 1000, sectioning system*) separando las secciones obtenidas en placas multipocillo y mantenidas en una solución PBS 1%, después fueron montadas en porta objetos y se realizó un tratamiento de tinción con VECTASHIELD con DAPI (*Vector Laboratories*), después de montar y sellar las secciones, estas fueron seleccionadas para observar imágenes del estriado dorsal usando un microscopio de epifluorescencia (*Leica*) para adquirir cuadrantes que permitieron identificar a las neuronas colinérgicas marcadas por la proteína reportera y ubicar la marca dejada por las fibras ópticas implantadas (**Figura 14A-B**).

6.6. Comportamiento motor en libre movimiento

Para evaluar si la inhibición optogenética tiene un impacto sobre la motricidad de los animales se expuso a los animales a inhibiciones optogenética de las IntChs en la prueba de campo abierto. La prueba de campo abierto evaluó la actividad locomotora espontánea en un plano horizontal de dos dimensiones (en el eje X y eje Y). La cámara de campo abierto consistió de una base (1600 cm²) y cuatro paredes (30cm de altura). En esta prueba el animal recibió un pulso de foto-inhibición cada minuto por cinco segundos en una sesión de 15 minutos. En esta sesión no se libera ningún tipo de recompensa.

6.7. Análisis estadístico

Para comparar el efecto conductual entre sujetos en la asociación de los paradigmas de entrenamiento se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney (asumiendo distribución no paramétrica debido a la reducción de n de nuestros grupos). Para comparar el efecto de la foto-inhibición en la motricidad de los sujetos también se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Todos los datos están representados como la media y el error estándar, la significancia estadística fue aceptada con una $p < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados en GraphPad-Prism 6 y MATLAB R2015a.

7. RESULTADOS

7.1. Entrenamiento de los animales a realizar acciones dirigidas a un objetivo

Para poder poner a prueba si las IntChs del estriado controlan la flexibilidad de los sujetos al cambio de contingencia entre la relación de una acción y su consecuencia, lo primero que hicimos fue implementar un protocolo de entrenamiento que permitiese que los animales generaran una conducta en busca de un objetivo. Para este fin se ha documentado ampliamente que el uso de entrenamientos con horarios de razón variable induce a realizar acciones (que en este caso es presionar una palanca) en busca de una consecuencia, esto consiste en entrenar a los animales en la fase 1 y fase 2 (**Figura 6**).

En la **figura 9A** y **9C** se muestra la progresión en el número de presiones por sesión de un grupo de animales silvestres (C57BL/J6) que pasaron por el entrenamiento de razón variable mostrando que conforme la razón variable incrementó (RR5, RR10, RR20) los animales incrementaron la frecuencia (presiones sobre minutos) con que presionaban la palanca (frecuencias de presiones normalizada a la frecuencia de la última sesión en RR20; $RR5_1 = 42 \pm 6$, $RR5_2 = 46 \pm 5$, $RR10_1 = 77 \pm 11$, $RR10_2 = 75 \pm 4$, $RR20_1 = 96 \pm 3$, $RR20_2 = 103 \pm 3$; $p < 0.0001$; **Figura 9C**).

Una vez que los animales pasaron por la fase 2 de entrenamiento, al día siguiente nos preguntamos si los animales presionaban la palanca en busca de una consecuencia (en este caso en busca del reforzador). Para este fin todos los animales fueron sometidos a una prueba de devaluación (fase 3; **Figura 6C**). De acuerdo al paradigma de devaluación, si la conducta (presionar la palanca) se estaba llevando a cabo en busca de la recompensa entonces los animales deberían presionar menos la palanca devaluada (Balleine y Dickinson, 1998). Consistente con esta teoría lo que observamos fue que los animales presionaron menos la palanca devaluada y más la palanca no devaluada (porcentaje de

presiones en la palanca devaluada=9.4±1.2; porcentaje de presiones en la palanca no devaluada=27.1 ±8.0; p<0.03; n=24; **Figura 9D**), sugiriendo que nuestros animales eran capaces de realizar acciones dirigidas hacia una consecuencia.

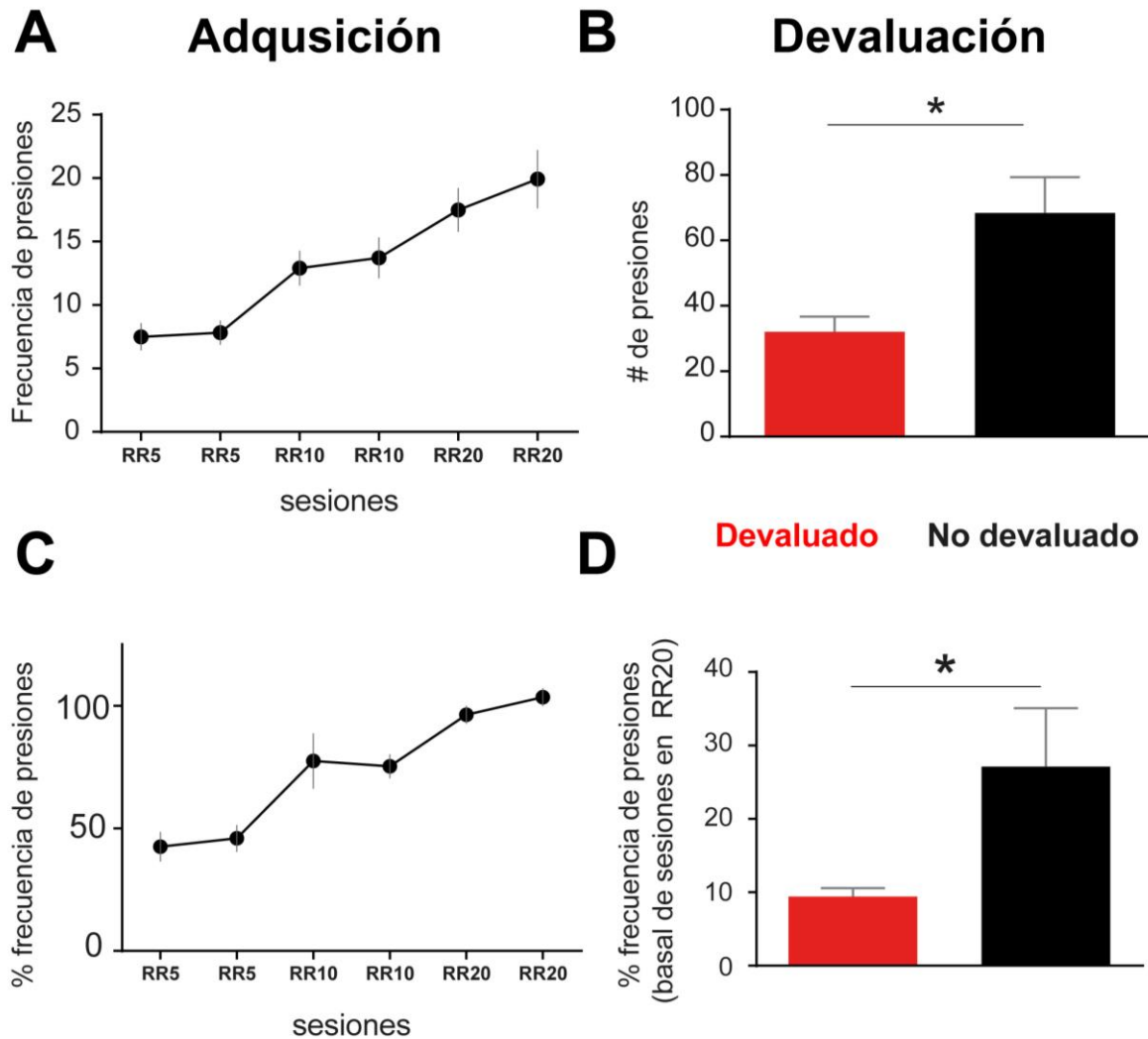


Figura 9. Adquisición de la tarea y prueba de devaluación. **A)** Curva de adquisición de animales demostrando el avance del entrenamiento en tres diferentes condiciones de razón variable (RR) (Los ratones reciben una recompensa cuando presionan 5, 10, 20 veces en promedio respectivamente). **B)** número de presiones en cada una de las palancas expuestas durante la prueba de devaluación. **C y D)** los mismos datos que en A y B, en este caso normalizado a las últimas dos sesiones de RR20 durante la fase de adquisición (*p<0.05; n=24).

7.2. Entrenamiento en la degradación de una contingencia

Se ha documentado que la capacidad adaptativa de un animal a percibir un cambio en la contingencia entre eventos es crucial para la sobrevivencia del individuo (Bradfield *et al.*, 2013). Para evaluar si los animales utilizados en este estudio eran capaces de identificar un cambio en la contingencia, los mismos ratones entrenados a presionar la palanca en busca de una consecuencia fueron pasados a la fase 4 de entrenamiento para degradar la contingencia con que reciben uno de los reforzadores (**Figura 6**). El entrenamiento en la degradación de la contingencia consiste en presentar una nueva contingencia al sujeto entrenado en una contingencia inicial y preguntar si el animal es capaz de identificar esta nueva contingencia (Balleine y Dickinson, 1998).

En el entrenamiento en degradación de la contingencia observamos que las sesiones de los animales que se mantuvieron en razón variable aumentaron la frecuencia de presiones respecto a la basal de presiones durante el reentrenamiento (RR20s durante reentrenamiento= 0.88 ± 0.04 , 1.11 ± 0.04 , RR20s durante la degradación de la contingencia= 1.18 ± 0.08 , 1.37 ± 0.13 , 1.36 ± 0.12 ; $p < 0.03$; $n=6$; **Figura 10A; No degradado**). Mientras que las sesiones que se evaluaron en el protocolo de degradación de la contingencia (CD) mantuvieron constante a la frecuencia de presiones realizadas respecto a la basal (RR20s durante reentrenamiento= 0.93 ± 0.09 , 1.06 ± 0.09 , CD durante la degradación de la contingencia= 1.13 ± 0.15 , 1.05 ± 0.18 , 0.97 ± 0.18 , No significativo; $n=6$; **Figura 10A; Degradado**), notando un ligero cambio conductual sobre la sensibilidad al cambio en la contingencia entre las sesiones en donde tenían que presionar para obtener una recompensa y la nueva contingencia que ahora les daba el reforzador si no presionaban.

Posterior al entrenamiento de la fase 4 evaluamos si los animales habían identificado el cambio en la contingencia del reforzador degradado, para lo cual realizamos una prueba de degradación (**Figura 6E**), de acuerdo con la teoría que

acompaña a esta prueba, los animales que logren identificar la degradación de la contingencia presionaran menos la palanca de las sesiones en degradación (CD) que la palanca que se mantuvo en razón variable (RR20) (Balleine y Dickinson, 1998). De esta prueba observamos una tendencia de los animales a presionar más la palanca no degradada y presionar con menor frecuencia la palanca degradada, aunque no fue estadísticamente diferente (Degradado= 73.4±21.4; No degradado= 133.9±40.8; $p=0.08$; $n=12$; **Figura 10B**).

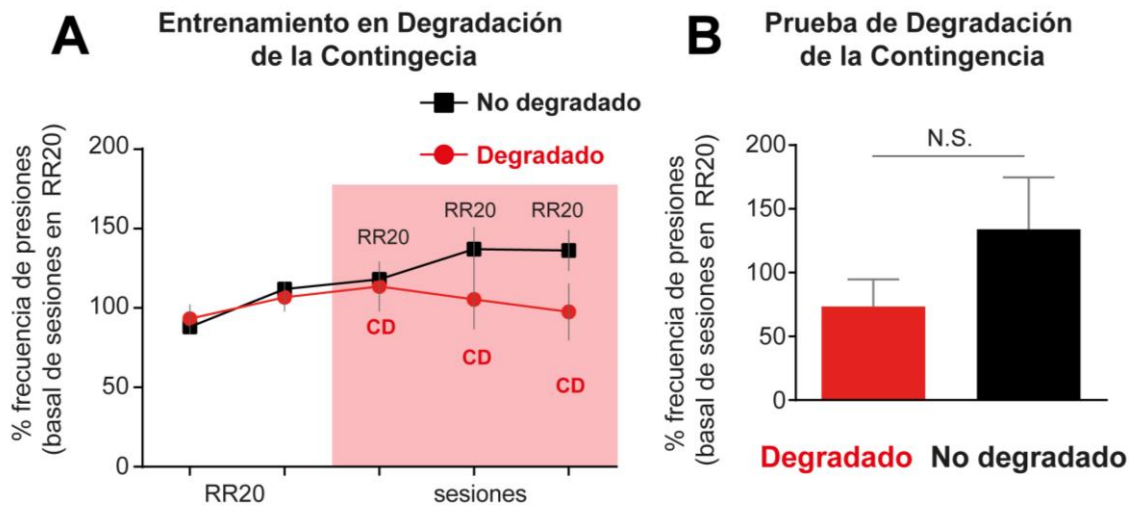


Figura 10. Entrenamiento en el protocolo de degradación de la contingencia. **A)** Frecuencia normalizada de presiones de los animales entrenados en el paradigma de degradación de la contingencia (color rojo, CD: en estas sesiones si los animales dejan de presionar reciben el reforzador) y la otra sesión en no degradado (color negro, sesiones mantenidas en razón variable: RR20). **B)** Prueba de degradación de la contingencia ($p=0.08$; $n=12$). Todos los datos presentados han sido normalizados a la frecuencia de presiones de las dos sesiones de reentrenamiento.

7.3. La degradación de la contingencia sucedió cuando se utilizó sacarosa como reforzador

Durante el entrenamiento en degradación de la contingencia notamos que los animales se mantenían más motivados a presionar la palanca en las sesiones donde trabajan por pellets en comparación a las sesiones donde presionan por sacarosa, por lo que analizamos la sensibilidad por ambos alimentos durante el entrenamiento separando los grupos que fueron sujetos a la degradación de la contingencia para sacarosa y para pellets (**Figura 11A y C**).

Al separar los datos en entrenamiento y prueba de degradación de acuerdo al tipo de reforzador, observamos que los animales que fueron expuestos a la degradación del reforzador para sacarosa sí mostraron un mayor número de presiones por la palanca del reforzador no degradado (Degradado= 31 ± 7.6 , No Degradado= 191 ± 75 ; $p < 0.005$; $n=6$; **Figura 11B**) contrario a los animales a los que se les degradó el reforzador pellet (Degradado= 114 ± 35.5 , No Degradado= 75 ± 15.3 ; no significativo; **Figura 11D**). Estos análisis muestran que los animales sujetos al entrenamiento de degradación de sacarosa sí mostraron una sensibilidad al cambio en la contingencia, por lo que el experimento de inhibición optogenética de las IntChs se decidió realizar con animales sujetos a la degradación de la contingencia del reforzador por sacarosa.

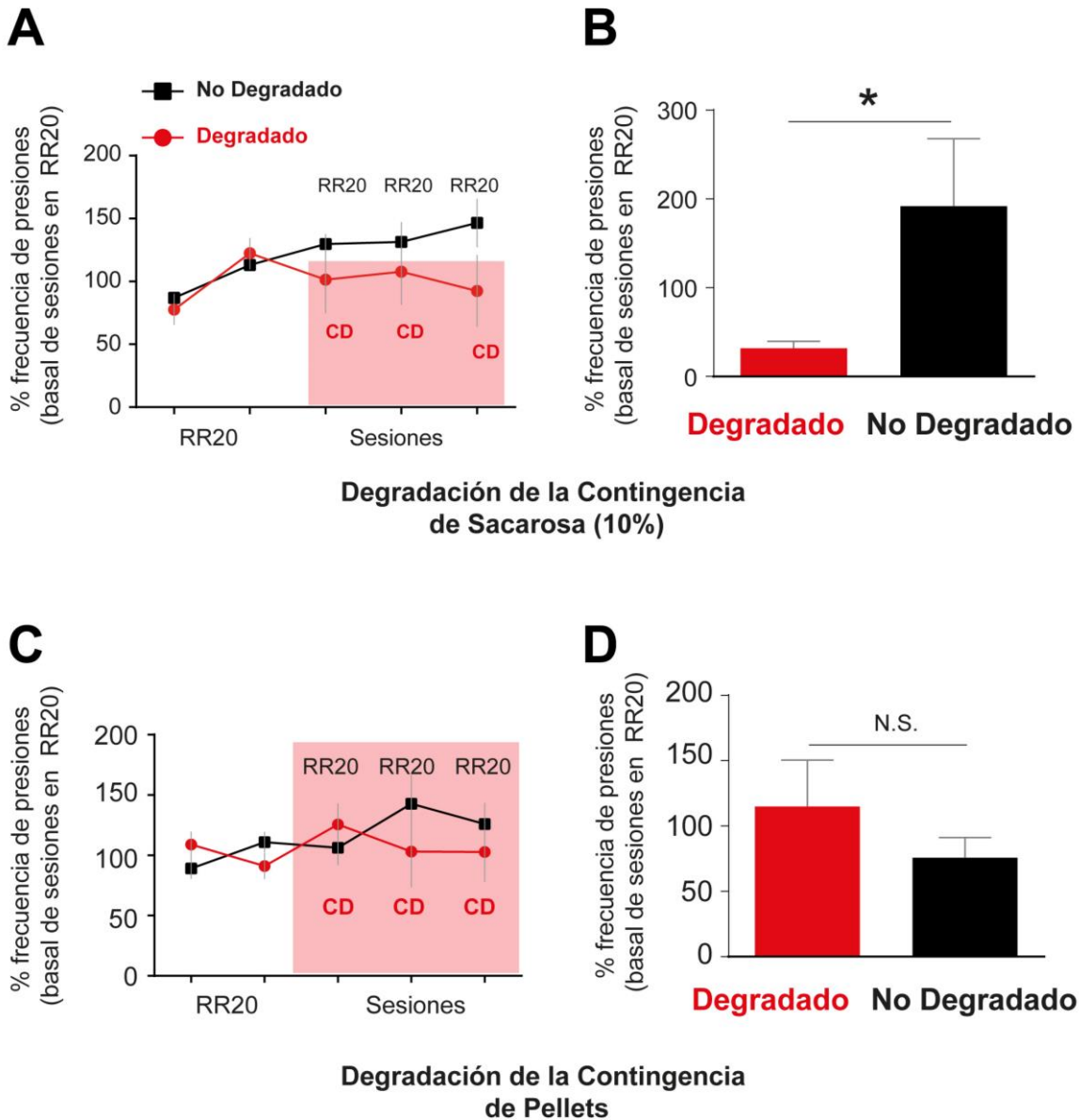


Figura 11. Sensibilidad de la tarea en Degradación de la Contingencia por sacarosa y pellets. **A)** Porcentaje de frecuencia de presiones de las sesiones degradadas por el reforzador de sacarosa (color rojo; sesiones con degradación de la contingencia: CD, color negro; sesiones mantenidas en razón variable: RR20). **B)** Prueba de degradación de contingencia para el reforzador sacarosa (Degradado= 31 ± 7.6 , No Degradado= 191 ± 75 , $p < 0.005$; $n=6$). **C)** Porcentaje de frecuencia de presiones de las sesiones degradadas por el reforzador pellet. **D)** Prueba de degradación de la contingencia (Degradado= 114 ± 35.5 , No Degradado= 75 ± 15.3 ; N.S.; $n=6$).

7.4.Verificación de la foto-Inhibición específica de las interneuronas colinérgicas del estriado dorsomedial

Posterior al establecimiento del protocolo de degradación de la contingencia sobre la conducta de los animales procedimos a implementar un modelo en el que pudiéramos poner a prueba la hipótesis de la presente tesis.

Para esto ocupamos animales transgénicos que presentan la expresión de la opsina Arch3.0 y GFP en todas las neuronas colinérgicas de animales ChAT-Cre, permitiéndonos comparar la marca de la GFP con la marca por inmunofluorescencia contra la enzima ChAT. La co-localización de los marcadores reporteros de GFP de la opsina Arch3.0 de animales ChAT-Cre e inmunofluorescencia anti-ChAT mostraron una alta especificidad de la línea de animales utilizada para la expresión de la opsina en las IntChs del estriado. (Porcentaje de células co-localizando ChAT-GFP y ChAT: $96\pm 1.3\%$; **Figura 12A y B**).

Posteriormente a la verificación de la especificidad de la expresión de Arch3.0 en animales ChAT-Cre. probamos la foto-inhibición optogenética en IntChs, para esto primero realizamos registros electrofisiológicos de neuronas colinérgicas expresando Arch3.0 caracterizando el disparo típico de las IntChs estriatales (Bennett y Wilson, 1999) (**Figura 13A y B**). Simultáneamente se mandó un pulso de luz verde, lo que inhibió la generación de potenciales de acción, manteniendo únicamente una despolarización subumbral sobre la célula registrada (**Figura 13 C**).

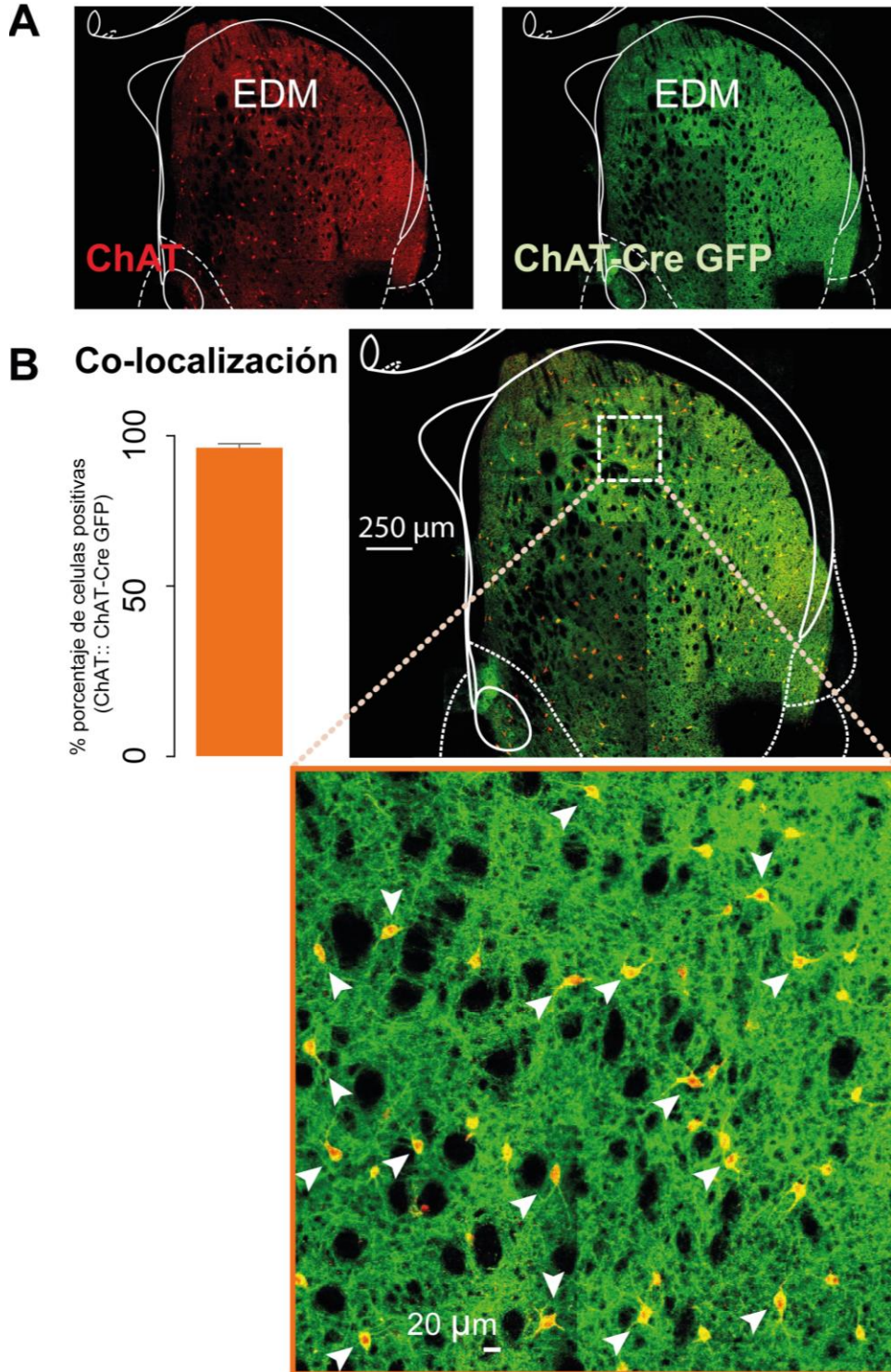


Figura 12. Verificación de la expresión de la opsina Arch3.0 en el sistema colinérgico estriatal. A) Inmunofluorescencia con anticuerpo a colinacetiltransferasa (ChAT: color rojo) y fluorescencia de las proteínas GFP de la opsinas Arch3.0 (ChAT-Cre GFP: color verde). **B y C)** Co-localización y porcentaje de células positivas de las IntChs marcadas con el anticuerpo y que expresan GFP de opsinas Arch3.0 en el estriado (células positivas: 96 ± 1.3). Flechas blancas indicando células colinérgicas expresando Arch3.0-GFP y el marcador anti ChAT.

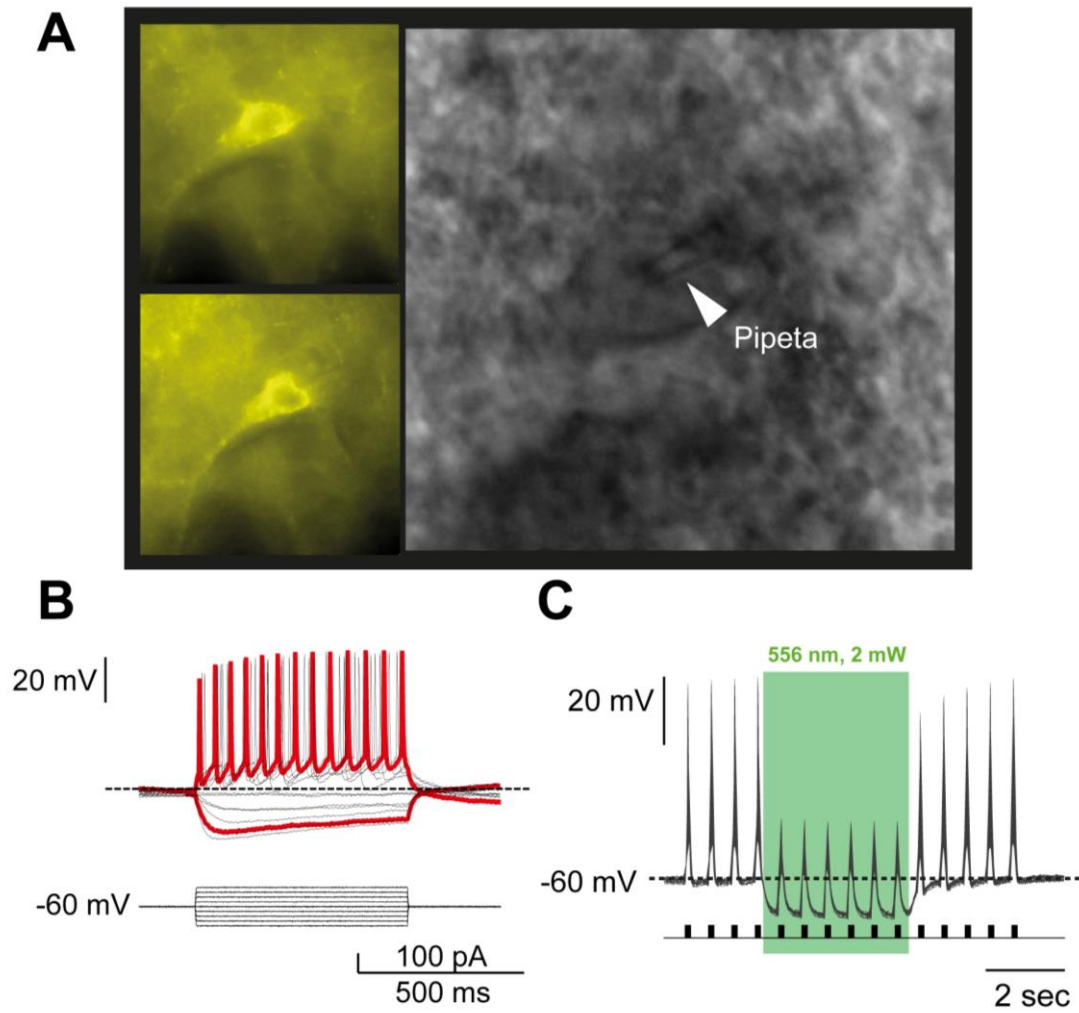


Figura 13. Inhibición *ex vivo* de neuronas colinérgicas estriatales. **A)** Superior izquierda, IntChs antes del registro electrofisiológico visualización de la fluorescencia emitida por GFP; inferior izquierda, IntChs durante el registro electrofisiológico; derecha, imagen con filtro infrarrojo de la IntChs registrada en B y C (flecha blanca indica la perforación de la pipeta de registro en la IntCh, note que la neurona es registrada en una rebanada estriatal de un animal de dos meses de edad). **B)** Respuestas de voltaje ante pulsos de corriente inducidos para caracterizar la actividad de las IntChs. **C)** Inhibición de la actividad eléctrica de la IntChs por optogenética.

7.5. Entrenamiento de los animales ChAT-Cre expresando la opsina Arch3.0-eYFP en las IntChs estriatales a realizar acciones en busca de una consecuencia

Para evaluar la contribución de las IntChs en la flexibilidad del comportamiento en la degradación de la contingencia, animales ChAT-Cre fueron tratados para expresar la opsina Arch3.0 en las IntChs del estriado dorsomedial (ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP; experimental) y animales ChAT-Cre tratados para expresar YFP en las IntChs (ChAT-Cre:eYFP; control), ambos grupos de animales implantados con fibras ópticas (**Figura 14A y B**). Estos animales se entrenaron en la fase 2 para realizar acciones dirigidas a una consecuencia (**Figura 14C**).

Después fueron expuestos a la prueba de devaluación (fase 3) para corroborar que nuestros animales asociaron el entrenamiento de la fase 2. Durante la prueba de devaluación tanto los animales ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP como los animales ChAT-Cre:eYFP mostraron una sensibilidad ante la devaluación estadísticamente significativa, comparado a nivel intragrupal (devaluado contra no devaluado; **Tabla 1; Figura 14D**)

Tabla 1. Animales en prueba de devaluación

	% de frecuencia de presiones		P	n
	Devaluado	No devaluado		
ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP (Experimental)	0.09±0.02	0.29±0.06	<0.02	14
ChAT-Cre:eYFP (Control)	0.08±0.01	0.17±0.02	<0.02	12

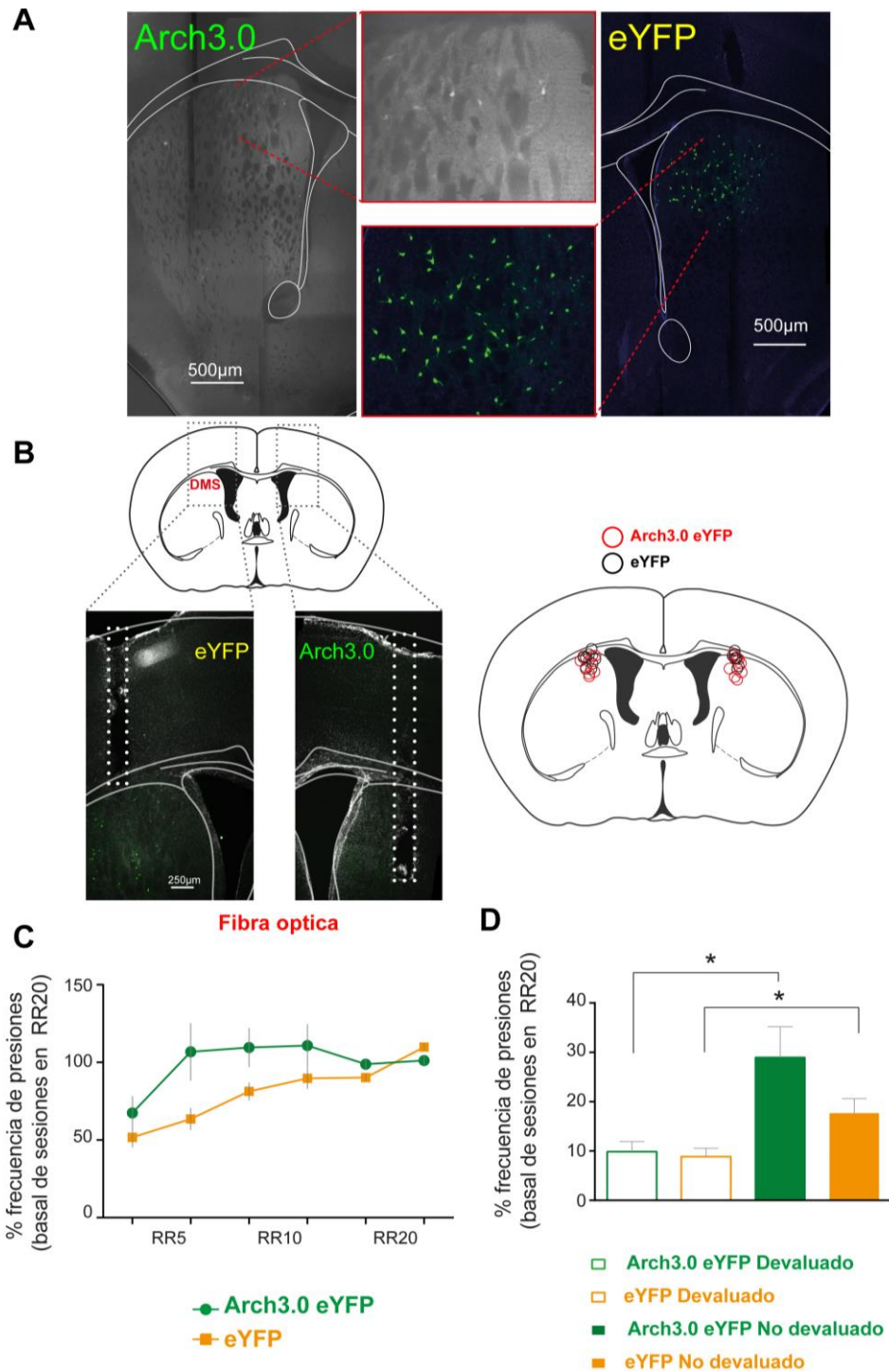


Figura 14. Adquisición de la relación acción- consecuencia y prueba de devaluación en animales ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP y animales ChAT-Cre:eYFP. A) Expresión de Arch3.0-eYFP y eYFP en IntChs por la infección viral. **B)** Evidencia y suma de la localización de las fibras ópticas implantadas en los animales experimentales (líneas punteadas: marca dejada por la fibra óptica **C)** Frecuencia de palanqueos normalizada durante los diferentes días de entrenamiento en razón variable (RR5, RR10, RR10), para animales ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP (verde) y animales control ChAT-Cre:eYFP (amarillo). **D)** Frecuencia de presiones en cada una de las palancas expuestas durante la prueba de devaluación.

7.6. Contribución de la actividad de las interneuronas colinérgicas sobre la flexibilidad conductual en el paradigma de degradación de la contingencia

Para evaluar la contribución de las IntChs del estriado dorsomedial en la flexibilidad adaptativa al cambio en la contingencia entre una acción y su consecuencia, manipulamos la actividad del sistema colinérgico estriatal durante el entrenamiento en degradación de la contingencia.

Una vez que los animales experimental y control pasaron por el entrenamiento de adquisición de la relación acción-consecuencia y la prueba de devaluación (**Figura 14**), los mismos animales fueron entrenados en la fase 4 con foto-inhibición (**Figura 8**). Sorprendentemente los animales ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP durante el entrenamiento de degradación presentaron un incremento de la frecuencia de palanqueo, mientras que los animales control decrementaron la frecuencia del palanqueo (**ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP**: sesión CD₁= 1.53±0.68, sesión CD₂= 1.94±0.91, sesión CD₃= 3.06±2.20; **ChAT-Cre:eYFP**: sesión CD₁= 0.29±0.05, sesión CD₂= 0.32±0.07, sesión CD₃= 0.26±0.01; p<0.05; n=6; **Figura 15A**).

Para determinar si los animales identificaron y asociaron la nueva contingencia, los animales fueron expuestos a la prueba de degradación de la contingencia (**Figura 6E**), comparando el porcentaje de presiones de la palanca degradada contra las presiones en la palanca cuya contingencia no fue degradada (porcentaje de presiones en sesiones degradadas **ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP**= 104±43.2; contra **ChAT-Cre:eYFP**= 13±6.3; p<0.05; n=7 y 6, respectivamente; **Figura 15B**). Estos datos muestran que la inhibición de las IntChs no permitió a los animales identificar la nueva contingencia. Sugiriendo que la actividad del sistema colinérgico del estriado dorsomedial es necesaria en la flexibilidad adaptativa de la conducta para identificar un cambio de contingencia.

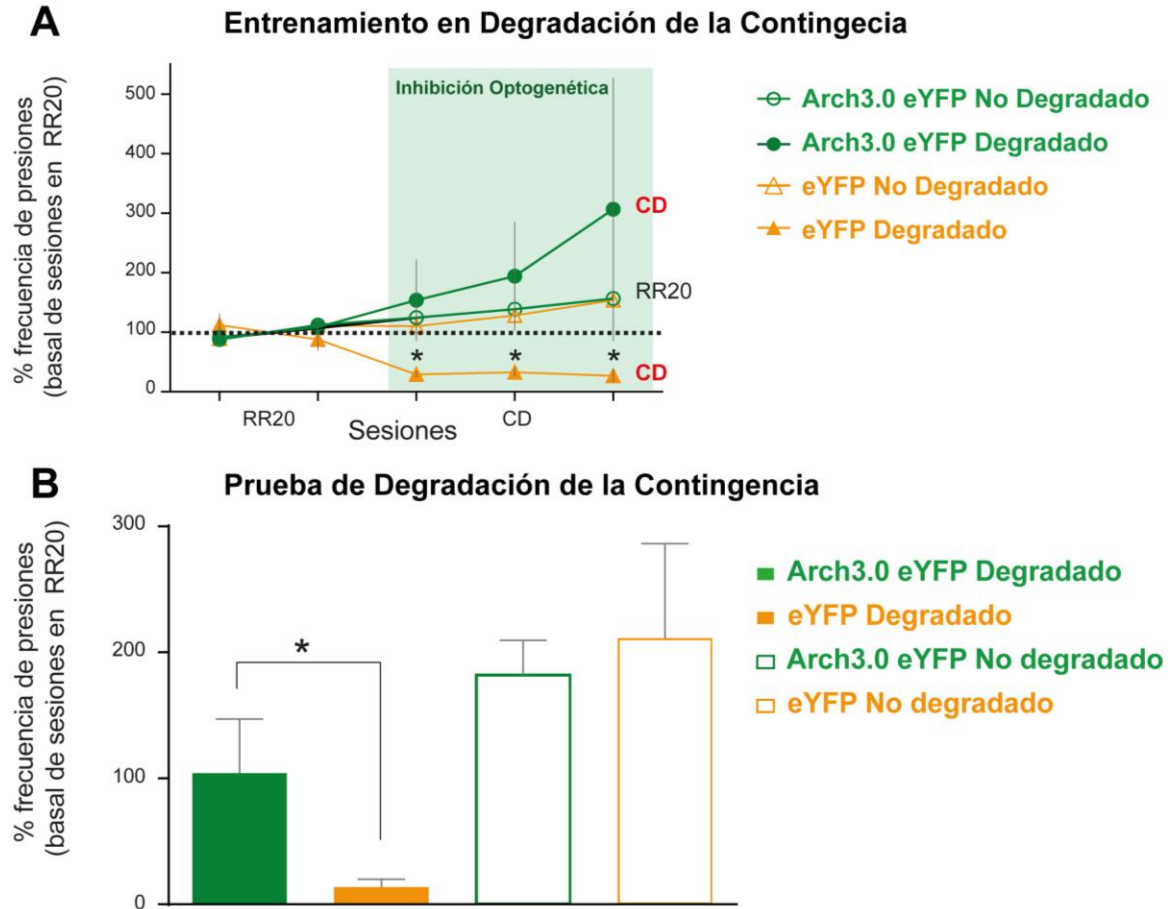


Figura 15. Inhibición del sistema colinérgico estriatal durante la degradación de la contingencia. **A)** Porcentaje de frecuencia de presiones de animales ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP y ChAT-Cre:eYFP entrenados en degradación de la contingencia (símbolos llenos: Degradado) y animales mantenidos en razón variable RR20 (símbolos vacíos: No degradado). **B)** Prueba de degradación de la contingencia, los animales ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP presentan un mayor porcentaje de presiones que los animales ChAT-Cre:eYFP en la palanca del reforzador degradado (* $p < 0.05$, $n = 7$ y 6 , respectivamente).

7.7. Evaluación de la inhibición optogenética de las IntChs sobre la motricidad en la prueba de campo abierto

Por ultimo evaluamos si la foto-inhibición optogenética ocasionó un efecto sobre la motricidad de los animales, por esto se realizó la foto-inhibición de las IntChs durante la prueba de campo abierto tanto en el grupo experimental como en el grupo control (**Figura 16A**). Observando un ligero, pero significativo incremento en la distancia recorrida (cm/fotograma) durante la foto-inhibición para ambos grupos (**ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP**: segundo con foto-inhibición= 120 ± 4.9 ; contra segundo sin foto-inhibición= 99 ± 0.7 ; $p < 0.05$; $n = 9$. **ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP**: segundo con foto-inhibición= 101 ± 3.5 ; contra segundo sin foto-inhibición= 100 ± 0.7 ; $p < 0.05$; $n = 8$) pero que al compararse entre grupos no fue diferente (**ChAT-Cre:Arch3.0-eYFP** contra **ChAT-Cre:eYFP**; no significativo; $n = 9$ y 8 , respectivamente; **Figura 16C**), sugiriendo que el bloqueo para detectar un cambio en la contingencia durante la inhibición optogenética (**Figura 15A**) es explicado por la inhibición sobre otros mecanismos de integración, más que por un efecto sobre la conducta motora

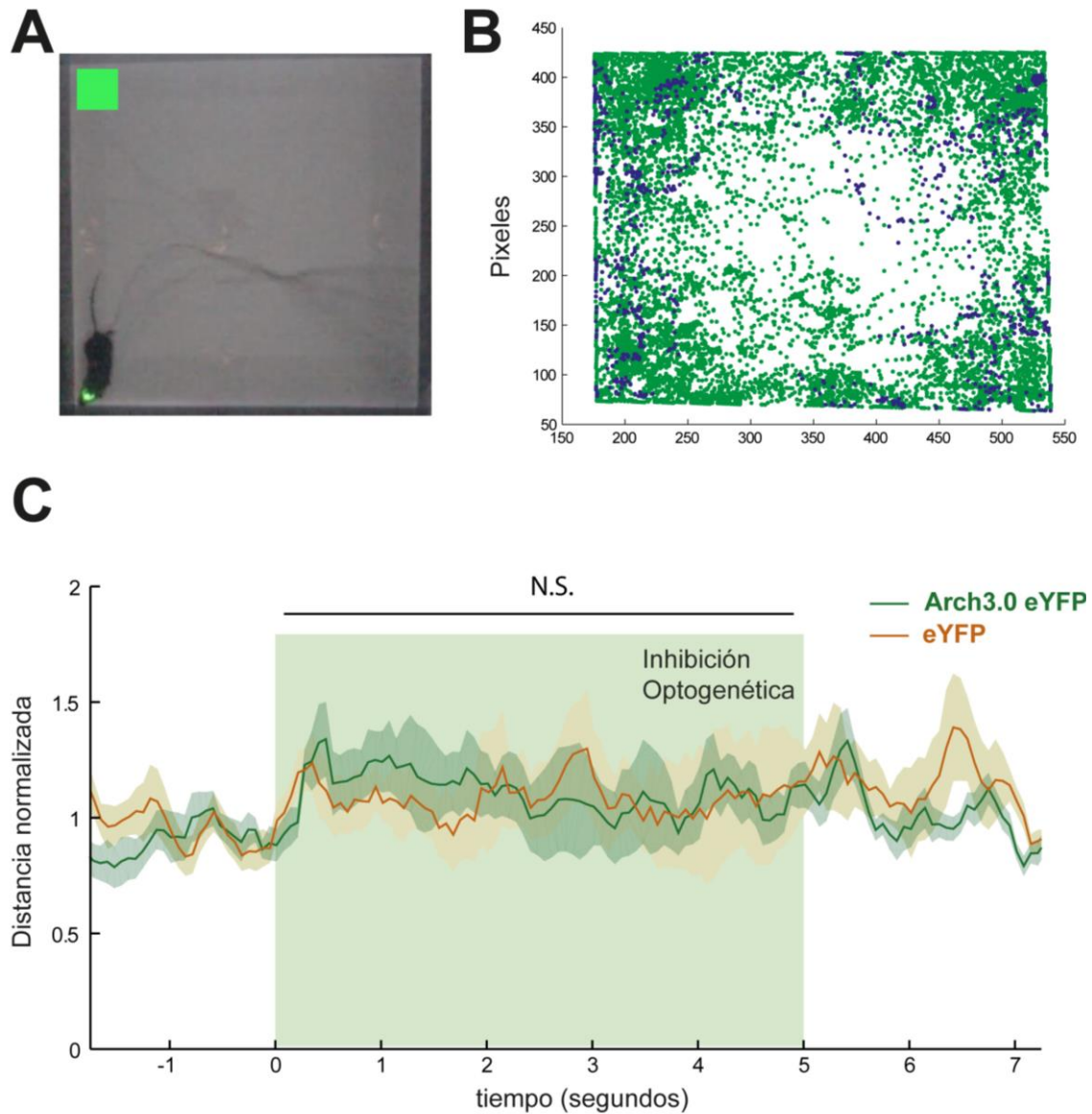


Figura 16. Evaluación de la inhibición optogenética de las IntChs sobre la motricidad en la prueba de campo abierto. **A)** vista del plano de análisis de la prueba de campo abierto (cuadro verde indica el momento de la foto-inhibición). **B)** Análisis de detección de movimiento durante los periodos de foto-inhibición (puntos verdes: momentos periódicos donde no hubo foto-inhibición; puntos azules: momentos periódicos donde se foto-inhibió). **C)** Distancia de movimiento durante los 5 segundos de foto-inhibición (No significativo; n= 9, 8 (Arch3.0-eYFP y eYFP, respectivamente)).

8. Discusión

En el presente trabajo de investigación observamos que la foto-inhibición de las IntChs en el estriado dorsomedial durante una nueva contingencia (donde la probabilidad de realizar una acción se cambia ahora a no realizar la acción y eso conduce a la consecuencia) bloqueó a que el animal pudiese identificar que hubo un cambio de la contingencia. Dicho bloqueo al cambio de contingencia es consistente con los resultados de Bradfield *y cols* (Bradfield *et al.*, 2013), en el que proponen que la actividad de las IntChs del estriado dorsomedial (por medio de experimentos de modulación farmacológica *in vivo*) están críticamente involucradas en la codificación de *novo* aprendizaje. Al mismo tiempo nuestros resultados significan un avance del conocimiento al mostrar por primera vez que la inhibición directa de la actividad de las IntChs (por medio de la expresión selectiva de Arch3.0 en las IntChs) específicamente durante el cambio en la contingencia bloquea la detección al cambio de dicha contingencia. Sugiriendo que la actividad de las interneuronas colinérgicas del estriado dorsomedial juega un papel importante en la flexibilidad adaptativa de la conducta de los sujetos a identificar los cambios entre contingencias en acciones dirigidas a consecuencias.

8.1. La sensibilidad por la sacarosa de los animales ChAT-Cre evoca el comportamiento de acciones dirigidas a consecuencias

Tanto la devaluación instrumental y la degradación de la contingencia son paradigmas capaces de capturar los procesos funcionales que se encuentran en el comportamiento dirigido a consecuencias, estas pruebas se encuentran basadas en el valor que le da el animal a la consecuencia (recompensa) (Balleine y Dickinson, 1998). Uno de los procesos que se encuentran detrás del comportamiento de acciones dirigidas a objetivos o en busca de una consecuencia

se centra en la relación que tiene la representación por parte del individuo hacia la recompensa, en experimentos de degradación de la contingencia este proceso está relacionado a la atribución del valor incentivo hacia el reforzador (Balleine y Dickinson, 1998; Dickinson y Balleine, 1994). En nuestros resultados, observamos como los animales presentaron una insensibilidad en la prueba de degradación hacia el reforzador pellet en comparación con el reforzador sacarosa. Para encontrar una explicación realizamos una revisión del valor nutricional de la recompensa de pellets y de sacarosa, notando un valor energético mayor en el reforzador pellets comparado con sacarosa, sugiriendo que nuestros animales pudiesen haber asignado diferentes valores a cada reforzador utilizado (un mayor valor al reforzador pellet lo cual afectaría la sensibilidad durante la prueba de degradación, por supuesto las diferencias en el valor hedónico de un reforzador sobre el otro no pueden ser descartadas. Una segunda hipótesis para explicar la diferencia entre pellets contra sacarosa podría basarse en que nuestros animales experimentales estuvieran sujetos a niveles de estrés que afectaran diferencialmente el realizar una acción por el reforzador pellets (mayor motivación; frecuencia más alta de presiones) comparado con el reforzador sacarosa (menor motivación: menor frecuencia de presiones), guiando a que los sujetos cambiaran su conducta de realizar acción dirigidas hacia una consecuencias a realizar acciones de manera habitual, conforme a la insensibilidad de la devaluación en altos niveles de estrés conduciendo a los sujetos a conductas habituales (Dias-ferreira *et al.*, 2009). Otra hipótesis para explicar esta diferencia en la sensibilidad a la degradación del reforzador pellet, podría deberse al número de veces en que una acción fue realizada para obtener un reforzador (como ya se mencionó en el caso del reforzador pellet los animales realizaban un mayor número de palanqueos consiguiendo más reforzadores pellets que sacarosa). Se ha documentado recientemente que el entrenamiento extensivo en razón variable (8 días de entrenamiento) puede causar la expresión de comportamientos habituales (insensibles a las pruebas de extinción, es decir, a la prueba de devaluación y prueba de degradación) (O'Hare *et al.*, 2016).

8.2. La IntChs controlan la flexibilidad adaptativa para detectar un cambio de contingencia

Los resultados presentados aquí están enfocados a estudiar la función de las interneuronas colinérgicas del estriado dorsomedial y como estas contribuyen sobre la flexibilidad adaptativa que permite al animal detectar el cambio de una contingencia. Nuestros experimentos se diseñaron para inhibir la actividad del sistema colinérgico estriatal, con resolución de milisegundos utilizando inhibiciones optogenéticas, exclusivamente durante los días de entrenamiento en que se degradó (cambio) la contingencia entre una acción y su consecuencia, y así poder evaluar el efecto de esta inhibición exclusiva durante el día de prueba de la degradación de la contingencia. Durante la adquisición de acciones dirigidas a una consecuencia los animales ya expresaban la opsina Arch3.0-eYFP sin mostrar una fase de adquisición diferente a los animales control. En estudios previos enfocados igualmente a estudiar las funciones de las neuronas colinérgicas del estriado se ha demostrado que la lesión selectiva de las IntChs no afecta la fase de adquisición de la relación acción consecuencia (Aoki *et al.*, 2015; Bradfield *et al.*, 2013; Okada *et al.*, 2014); nuestros resultados indican que al igual que lo reportado nuestros animales ChAT-Cre para expresar las opsina Arch3.0-eYFP no afecto la fase de adquisición de la relación acción-consecuencia.

Interesantemente, la eliminación (por lesión) de las IntChs facilitan un nuevo aprendizaje invertido durante la fase de adquisición tanto de una tarea espacial (Okada *et al.*, 2014) como de una tarea de palanqueo (Aoki *et al.*, 2015), pero en la ausencia de las IntChs del estriado dorsomedial los animales no identifican ni el cambio en la contingencia ni una inversión de acciones asociadas a reforzadores contrarios (acción1→reforzador2; accion2→reforzador1) (Bradfield *et al.*, 2013; Okada *et al.*, 2014).

Contribuyendo a los resultados de investigaciones previas, nosotros observamos que en la fase de degradación (cambio) de la contingencia los animales en los

cuales realizamos la inhibición optogenética (ChAT:Arch3.0-eYFP) elevaron la frecuencia de presiones realizadas para obtener la recompensa mientras que los animales control ChAT;eYFP presentaron una menor frecuencias por presionar la palanca comprobando que nuestra manipulación sobre las IntChs bloquea la codificación del cambio en la contingencia consistente con el hecho de bloquear la detección del cambio en la contingencia como muestra la. En conjunto estos datos indican que el momento crucial de la participación de las IntChs para que el animal pueda codificar el cambio de una contingencia es cuando se realiza el aprendizaje de esta nueva contingencia (justo en el cambio de la misma) y específicamente durante la realización de la acción (solo se inhibió a las IntChs durante la realización de la acción;). Contrastando con otras investigaciones donde la actividad de las IntChs se elimina antes del entrenamiento a realizar acciones dirigidas (Aoki *et al.*, 2015; Bradfield *et al.*, 2013; Matamales *et al.*, 2016; Okada *et al.*, 2014).

9. CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada durante esta tesis se respondió de manera positiva concluyendo que la actividad de las neuronas colinérgicas del estriado dorsomedial es necesaria durante la flexibilidad conductual para que un sujeto logre identificar un cambio de una contingencia entre una acción y su consecuencia, capacidad crucial para adaptar el comportamiento del individuo ante un ambiente cambiante.

En nuestro estudio delimitamos la ventana temporal en que la actividad de las IntChs es necesaria en comparación con estudios previos en los cuales se lesiono a las neuronas colinérgicas del estriado o se módulo de manera inespecífica (por farmacología) su disparo para argumentar la necesidad de estas neuronas para una apropiada respuesta de adaptación al cambio en una contingencia (Bradfield *et al.*, 2013). Además, nuestro trabajo también evidencia que la actividad del sistema colinérgico estriatal es necesaria en la flexibilidad a cambios en la contingencia, no como consecuencia de una mala adaptación del microcircuito estriatal por la ausencia de las neuronas colinérgicas sino sólo por la ausencia de su posible modulación sobre los microcircuitos estriatales (Aoki *et al.*, 2015; Bradfield *et al.*, 2013).

10. REFERENCIAS

- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375.
- Alexander, G., DeLong, M., Strick, P., 1986. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 357–381.
- Aoki, S., Liu, A.W., Zucca, A., Zucca, S., Wickens, J.R., 2015. Role of Striatal Cholinergic Interneurons in Set-Shifting in the Rat. *J. Neurosci.* 35, 9424–9431.
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe K., Graybiel, A.M., 1994. Responses of Tonicly Active Neurons in the Primate's Striatum Undergo Systematic Changes during Behavioral Sensorimotor Conditioning. *J. Neurosci.* 14(6), 3969–3984.
- Balleine, B.W., Dickinson, A., 1998. Goal-directed instrumental action: Contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 37, 407–419.
- Bennett, B.D., Wilson, C.J., 1999. Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J. Neurosci.* 19, 5586–5596.
- Bolam, J.P., Wainer, B.H., Smith, A.D., 1984. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12, 711–718.
- Bradfield, L., Bertran-Gonzalez, J., Chieng, B., Balleine, B.W., 2013. The Thalamostriatal Pathway and Cholinergic Control of Goal-Directed Action: Interlacing New with Existing Learning in the Striatum. *Neuron* 79, 153–166.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., Bargas, J., 2009. Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 682–690.

- Chow, B.Y., Han, X., Dobry, A.S., Qian, X., Chuong, A.S., Li, M., Henninger, M.A., Belfort, G.M., Lin, Y., Monahan, P.E., Boyden, E.S., 2010. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463, 98–102.
- Dias-ferreira, E., Sousa, J.C., Melo, I., Morgado, P., Mesquita, A.R., Cerqueira, J.J., Costa, R.M., Sousa, N., 2009. Chronic Stress Causes. *Science* 325, 621–625.
- Dickinson, A., Balleine, B., 1994. Motivational control of goal-directed action. *Anim. Learn. Behav.* 22, 1–18.
- English, D.F., Ibanez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsáki, G., Deisseroth, K., Tepper, J.M., Koos, T., 2011. GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat. Neurosci.* 15, 123–130.
- Ford, C.P., Mamaligas, A.A., Ford, C.P., 2016. Spontaneous Synaptic Activation of Muscarinic Receptors by Striatal Cholinergic Neuron Firing Article Spontaneous Synaptic Activation of Muscarinic Receptors by Striatal Cholinergic Neuron Firing. *Neuron* 1–13.
- Gerfen, C.R., 2006. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 9, 157–158.
- Graveland, G.A., Difiglia, M., 1985. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res.* 327, 307–311.
- Guo, Q., Wang, D., He, X., Feng, Q., Lin, R., Xu, F., Fu, L., Luo, M., 2015. Whole-brain mapping of inputs to projection neurons and cholinergic interneurons in the dorsal striatum. *PLoS One* 10, 1–15.
- Hammond, L.J., 1980. The effect of contingency upon the appetitive conditioning of free-operant behavior. *J. Exp. Anal. Behav.* 34, 297–304.
- Hernández, L.F., Redgrave, P., Obeso, J. a., 2015. Habitual behavior and dopamine cell vulnerability in Parkinson disease. *Front. Neuroanat.* 9, 1–5.
- Jin, X., Tecuapetla, F., Costa, R.M., 2014. Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nat. Neurosci.* 17,

423–30.

- Kimura, M., 1990. Behaviorally contingent property of movement-related activity of the primate putamen. *J. Neurophysiol.* 63, 1277–1296.
- Koos, T., Tepper, J.M., 2002. Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J. Neurosci.* 22, 529–535.
- Koós, T., Tepper, J.M., 1999. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* 2, 467–72.
- Matamales, M., Skrbis, Z., Hatch, R.J., Balleine, B.W., G??tz, J., Bertran-Gonzalez, J., 2016. Aging-Related Dysfunction of Striatal Cholinergic Interneurons Produces Conflict in Action Selection. *Neuron* 90, 362–373.
- Matsumoto, N., Minamimoto, T., Graybiel, A.M., Kimura, M., 2001. Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *J Neurophysiol* 85, 960–976.
- Nomoto, M., Kaseda, S., Iwata, S., Shimizu, T., Fukuda, T., Nakagawa, S., 2000. The metabolic rate and vulnerability of dopaminergic neurons, and adenosine dynamics in the cerebral cortex, nucleus accumbens, caudate nucleus, and putamen of the common marmoset. *J. Neurol.* 247 Suppl , V16–22.
- O'Hare, J.K., Ade, K.K., Sukharnikova, T., Van Hooser, S.D., Palmeri, M.L., Yin, H.H., Calakos, N., 2016. Pathway-Specific Striatal Substrates for Habitual Behavior. *Neuron* 89, 472–479.
- Okada, K., Nishizawa, K., Fukabori, R., Kai, N., Shiota, A., Ueda, M., Tsutsui, Y., Sakata, S., Matsushita, N., Kobayashi, K., 2014. Enhanced flexibility of place discrimination learning by targeting striatal cholinergic interneurons. *Nat. Commun.* 5, 3778.
- Oookschot, D.E., 1996. Total Number of Neurons in the Neostriatal , Pallidal , Subthalamic , and Substantia Nigral Nuclei of the Rat Basal Ganglia : A Stereological Study Using the Cavalieri and Optical Disector Methods 599, 580–599.
- Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J., Surmeier, D.J., 2007. Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci.* 30, 545–553.

- Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Calabresi, P., Bernardi, G., 2000. Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20, RC69.
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M.C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M.R., Obeso, J.A., 2010. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 760–772.
- Reynolds, J.N.J., Wickens, J.R., 2004. The corticostriatal input to giant aspiny interneurons in the rat: A candidate pathway for synchronising the response to reward-related cues. *Brain Res.* 1011, 115–128.
- Rice, M.E., Cragg, S.J., 2004. Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat. Neurosci.* 7, 583–584.
- Romo, R., Schultz, W., 1990. Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements. *J. Neurophysiol.* 63, 592–606.
- Schultz, W., Romo, R., 1992. Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements - I. Preparatory activity in the anterior striatum. *Exp. Brain Res.* 91, 363–384.
- Sorimachi, M., Kataoka, K., 1975. High affinity choline uptake: An early index of cholinergic innervation in rat brain. *Brain Res.* 94, 325–336.
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G.P., Mainen, Z.F., Costa, R.M., 2014. Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat. Commun.* 5, 4315.
- Tepper, J.M., Bolam, J.P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 685–692.
- Wichmann, T., DeLong, M.R., 2003. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991, 199–213.
- Wilson, C.J., 2005. The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron* 45, 575–585.

- Wilson, C.J., Chang, H.T., Kitai, S.T., 1990. Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 10, 508–519.
- Witten, I.B., Lin, S.-C., Brodsky, M., Prakash, R., Diester, I., Anikeeva, P., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., 2010. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* 330, 1677–81.
- Yin, H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., Balleine, B.W., 2005. The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 22, 513–523.
- Zhou, F.M., Wilson, C.J., Dani, J.A., 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.* 53, 590–605.