



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DE LA CO-LIBERACIÓN DOPAMINA/GLUTAMATO
EN LA CORTEZA PREFRONTAL Y SU PARTICIPACIÓN DURANTE
LA INICIACIÓN DE SECUENCIAS DE ACCIONES MEDIANTE
OPTOGENÉTICA**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO
EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

JOSÉ LUIS PÉREZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR

ASESOR INTERNO

DRA. MARÍA ISABEL MARTÍNEZ GARCÍA

PUEBLA, PUEBLA. JUNIO DE 2016

Este trabajo de tesis de licenciatura se realizó en el Laboratorio BL-202 (Sub-Circuitos Neuronales) adscrito al Departamento de Neuropatología Molecular de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en el Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, número 04510, Ciudad de México.

Este proyecto de tesis de licenciatura estuvo bajo la dirección del Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar, Investigador Titular A, SNI 1.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco infinitamente a mi madre Edith y mi padre José Luis, por compartir conmigo la felicidad generada en este camino que he forjado profesionalmente, por su apoyo total en cada decisión que me he propuesto, por ser un gran pilar de mi vida y sobre todo por el amor hacia mí y lo que soy.

Mi agradecimiento y admiración al Dr. Fatuel, por permitirme comenzar a construir la historia optogenética del BL-202, por creer en mí y saber guiarme, aprovechando mis fortalezas y trabajando en mis debilidades.

A mis hermanos Eduardo y Karla por compartir la felicidad y tristeza, por cada risa y tontería que me anima en momentos de estrés, por todas las locuras y anécdotas vividas cada día.

Sin duda, mi abuelo Liberio ha sabido transmitir en cada historia su experiencia, mi abuela Yolanda me ha enseñado la bondad, a ellos gracias por creer en mí.

La universidad fue una experiencia gratificante, llena de emociones y aspiraciones, agradezco a Ana Silvia, Rosalía, Monserrat, Hiram, Iván Ramos, Héctor Iván, Felipe, Angélica y Lisset, por las tardes de café, por las horas de pláticas y apoyo, porque juntos crecimos profesionalmente y aprendimos uno del otro académicamente.

A la Dra. Yazmín por hacer ameno el ambiente del laboratorio y siempre sacarnos una sonrisa todas las tardes.

Dejar la ciudad de Puebla significó alejarme de la familia y amigos, sin embargo en la ciudad de México conocí grandes amistades. Gracias a Edgar, Yuri y Josué por el apoyo incondicional, juntos iniciamos con la aventura optogenética en el BL-202. A Nisa que me transmite su alegría y gusto por la ciencia, a Iván por su polifacética y sincera amistad, a Argelia por contagiarme la felicidad en momentos complicados, a ellos tres gracias por el apoyo incondicional y las pláticas siempre en compañía de una taza de café. Agradezco a Carlitos, por su amistad honesta, por no abandonarme en situaciones complejas, por las pláticas disparatadas acompañadas de risa y drama. A Kathia y Asaí, por su crítica constructiva y su responsabilidad que contagia.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

En primer lugar, agradezco al Dr. Fatuel por enseñarme en especial la optogenética y la electrofisiología, por asesorarme y guiarme en cada experimento y análisis de datos.

Agradezco al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, técnico académico del laboratorio que me ayudó en la generación y mantenimiento de la línea de ratones transgénicos TH-Cre, me enseñó los principios básicos de las técnicas de biología molecular, pero en especial a la amistad que se forjó en esta estancia por el BL-202.

Agradezco a la Dra. Elvira Galarraga Palacio por permitirme usar el *set-up* de electrofisiología, indispensable para el desarrollo de esta tesis de licenciatura y a su técnico de laboratorio Dagoberto Tapia Ramírez, por el asesoramiento en la técnica de inmunofluorescencia.

Gracias a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por la obtención de imágenes de microscopía confocal y el asesoramiento prestado en este servicio, así como la crítica constructiva hacia este trabajo.

De igual manera agradezco a la Biol. Ariadna Aparicio Juárez y a la M. en I.B.B. Gabriela Xochitl Ayala Méndez por su participación en la reproducción y mantenimiento de las cepas de ratones transgénicos.

A la Dra. María Isabel Martínez García por el asesoramiento en la realización del protocolo de tesis hasta el examen profesional y sus valiosos consejos.

A mi comisión revisora, Dr. I. Daniel Limón Pérez de León, Dr. Enrique Soto Eguibar y Dr. Victorino G. S. Alatraste Bueno por su contribución a la mejora de esta tesis de licenciatura y su valiosa crítica al trabajo en cada seminario.

Esta tesis de licenciatura fue realizada con el apoyo de ciencia básica CONACYT 220412 (2015-2018) y PAPIIT DGAPA, UNAM IA200815 (2015-2016),

*A mis padres Edith y José Luis,
el motor de mi vida*

*A Eduardo y Karla,
mis cómplices de vida*

*A mis abuelos y tíos,
experimentados consejeros*

A Tere, mi amiga eterna

*A todos los integrantes
del BL-202*

A mi pequeña Frit

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Co-liberación de neurotransmisores _____	2
1.2 Co-liberación de las neuronas dopaminérgicas _____	3
1.3 Tipos neuronales del área tegmental ventral que proyectan a la corteza prefrontal ____	5
1.4 La corteza prefrontal y su modulación por dopamina _____	6
1.5 La corteza prefrontal y su participación durante la iniciación de secuencias de acciones _____	7
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. HIPÓTESIS.....	9
5. OBJETIVO GENERAL _____	10
5.1 Objetivos particulares _____	10
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	11
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
7.1 Animales. _____	12
7.2 Genotipificación _____	12
7.3 Cirugía estereotáxica y sistema de transfección _____	13
7.4 Preparación <i>ex vivo</i> y electrofisiología _____	15
7.5 Estimulación optogenética <i>ex vivo</i> _____	17
7.6 Farmacología _____	18
7.7 Funcionalidad del circuito ATV→CPF _____	18
7.8 Manipulación optogenética durante la iniciación o realización de secuencias de acciones _____	19
7.9 Campo abierto. _____	21
7.10 Inmunofluorescencia _____	21
7.12 Análisis de datos _____	22
8. RESULTADOS	23
8.1 Expresión de las opsinas ChR2-eYFP y Arch3.0-eYFP en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral _____	23

8.2 Excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas infectadas con AVV1.1-DIO-ChR2-eYFP	25
8.3 Inervación de la corteza prefrontal por axones dopaminérgicos del área tegmental ventral	27
8.4 Potenciales postsinápticos excitatorios evocados en la corteza prefrontal por la activación de axones dopaminérgicos provenientes del área tegmental ventral	29
8.5 El potencial de reversión de las corrientes postsinápticas evocadas por la activación optogenética de los axones provenientes del área tegmental ventral en la corteza prefrontal revierte cerca del potencial de reversión de corrientes postsinápticas mediadas por receptores glutamatérgicos	31
8.6 El circuito $ATV \rightarrow CPF$ es necesario para la apropiada iniciación de secuencias de acciones	33
8.7 Inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ en la prueba de campo abierto para evaluar el efecto de la inhibición de este circuito sobre la movilidad horizontal	36
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIÓN	43
REFERENCIAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Circuito ATV→CPF	6
Figura 2. Transfección de neuronas dopaminérgicas	15
Figura 3. Estimulación optogenética de neuronas TH Cre / ChR2 eYFP	17
Figura 4. Activación optogenética de los axones TH/ChR2-eYFP en la corteza prefrontal	18
Figura 5. Tarea conductual de secuencias de acciones.	21
Figura 6. Expresión de la opsina ChR2-eYFP o Arch3.0-eYFP en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral	24
Figura 7. Activación de neuronas dopaminérgicas TH Cre que expresan la opsina ChR2-eYFP <i>ex vivo</i>	26
Figura 8. Inervación de la corteza prefrontal por axones dopaminérgicos del área tegmental ventral.	28
Figura 9. Corrientes postsinápticas evocadas en la corteza prefrontal por la activación optogenética de los axones dopaminérgicos provenientes del área tegmental ventral	30
Figura 10. El potencial de reversión de las corrientes evocadas por estimulación optogenética de los axones del área tegmental ventral en la corteza prefrontal es similar al potencial de reversión de corrientes postsinápticas mediadas por receptores glutamatérgicos.	32
Figura 11. El circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ es necesario para la apropiada iniciación de secuencias de acciones.	35
Figura 12. Inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ durante la prueba de campo abierto.	37

ABREVIATURAS

Arch3.0-eYFP

ATV

ChR2-eYFP

CPF

eYFP

NAcc

TH

TH-Cre

Archaeorhodopsin3.0-eYFP

Área tegmental ventral

Channelrhodopsin2-eYFP

Corteza prefrontal

Proteína amarilla fluorescente

Núcleo accumbens

Tirosina hidroxilasa

Tirosina hidroxilasa- Cre recombinasa

RESUMEN

El principio de Dale establece que una neurona diferenciada sintetiza, almacena y libera un sólo tipo de neurotransmisor en todas sus terminales axonales. En la actualidad, este principio es cuestionado, debido a que se han identificado neuronas que liberan más de un neurotransmisor. Dentro del sistema nervioso central, las neuronas que se han identificado con la capacidad de co-liberar dos neurotransmisores, son las neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas. En el caso de las neuronas dopaminérgicas, la co-liberación ha sido documentada en la proyección que existe del ATV al NAcc. Debido a que las neuronas dopaminérgicas del ATV también proyectan a la corteza, existe la posibilidad de que dicha co-liberación sea un proceso que suceda en esta estructura. Para valorar esta posibilidad, nos planteamos evaluar dos hipótesis 1) los axones dopaminérgicos que inervan a la CPF provenientes del ATV liberan glutamato y, 2) la funcionalidad de estos axones regulan la iniciación de secuencias de acciones. Se decidió evaluar estas dos hipótesis en la CPF, dado que esta estructura recibe una mayor densidad de axones dopaminérgicos provenientes del ATV en comparación con otras cortezas, y porque se ha sugerido que delimita el inicio/terminación de secuencias de acciones.

Para evaluar las hipótesis planteadas, se realizaron dos experimentos 1) Se determinó si los axones dopaminérgicos del ATV que inervan a la CPF liberan glutamato. Se utilizaron ratones transgénicos que expresan de manera específica a la opsina ChR2-eYFP en neuronas del ATV bajo el promotor de la enzima tirosina hidroxilasa (TH-Cre), expresando esta opsina en neuronas de naturaleza dopaminérgica. Esta metodología permitió activar específicamente a los axones dopaminérgicos del ATV que inervan a la CPF, evaluando la posible liberación de glutamato por estos axones y, 2) utilizando los mismos ratones transgénicos en experimentos *in vivo*, se realizaron manipulaciones de pérdida de la función, inhibiendo selectivamente a estos axones por medio de la expresión de la opsina Arch3.0-eYFP, mientras los animales iniciaban secuencias de acciones. Como resultado de la evaluación de la primera hipótesis, identificamos corrientes postsinápticas evocadas por la foto-estimulación selectiva de los axones dopaminérgicos del ATV en la CPF, observando que i) estas corrientes fueron bloqueadas por un antagonista selectivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos y ii) el potencial de reversión de las corrientes postsinápticas evocadas corresponden a un potencial cercano de inversión de corrientes postsinápticas glutamatérgicas. Con respecto a la segunda hipótesis, nuestros resultados muestran que la inhibición de los axones del ATV en la CPF en ventanas de tiempo y estados conductuales específicos, retrasan la iniciación de secuencias de acciones. Por lo que, a partir de estos resultados, concluimos que los axones de las neuronas del ATV que inervan a la CPF son capaces de liberar glutamato, y que el apropiado funcionamiento de esta sinapsis es necesaria para la iniciación de secuencias de acciones. Dichas conclusiones son importantes para la interpretación de la función del circuito ATV→CPF y su participación en la iniciación de secuencias de acciones.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Co-liberación de neurotransmisores

El potencial de acción que se propaga por el axón hasta llegar al sitio donde se encuentran las terminales sinápticas que contienen al neurotransmisor y a la maquinaria proteica para la liberación del mismo, permite que se lleve a cabo la liberación de neurotransmisores de la neurona presináptica. Las vesículas que se encuentran en la terminal presináptica viajan hacia el sitio activo de la terminal presináptica para ser liberadas, esto con ayuda de la proteína sinaptobrevina que se une con la syntaxina, una proteína de la membrana plasmática. Cuando el potencial de acción llega a la terminal presináptica, ocurre una despolarización de la membrana que abre canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje. El Ca^{+2} que entra a la terminal presináptica genera un cambio conformacional de la sinaptotagmina y la vesícula se fusiona con la membrana plasmática, liberando su contenido. El neurotransmisor que se libera al espacio sináptico se une a receptores postsinápticos y ejerce un efecto en la neurona postsináptica (Bargas y Galarraga, 2009).

Dentro de los conceptos básicos de la neurobiología, se establece que una neurona diferenciada tiene la habilidad de sintetizar y almacenar un sólo tipo de sustancia transmisora en sus terminales axonales, y que dicha sustancia al ser liberada en el espacio sináptico, interacciona con receptores específicos en una neurona postsináptica, modulando su actividad eléctrica y química. Este concepto es conocido como el principio de Dale (Burnstock, 1976). No obstante, en la actualidad se han identificado diferentes tipos neuronales capaces de co-liberar más de un neurotransmisor en sus botones axonales (Jonas et al., 1998; Gutiérrez et al., 2003; Noh et al., 2010; Tecuapetla et al., 2010; Stuber et al., 2010), cuestionando la vigencia de este principio.

En el sistema nervioso periférico, se han documentado varios casos de co-liberación, por ejemplo, se ha establecido que el trifosfato de adenosina (ATP) y el neuropéptido Y (NPY) se liberan junto con la noradrenalina (NA) en los nervios

simpáticos (Fried et al., 1986). Otro ejemplo, es la co-liberación del polipéptido vasoactivo intestinal y el ATP junto con la acetilcolina (Ach) en los nervios parasimpáticos (Dowdall et al., 1974). Específicamente, con respecto a la co-liberación de dos neurotransmisores, se ha documentado que las interneuronas de la médula espinal co-liberan ácido γ -aminobutírico (GABA) y glicina (Jonas et al., 1998).

En el sistema nervioso central, también se han documentado casos de co-liberación. Se sabe que las neuronas del hipotálamo lateral co-liberan trifosfato de adenosina (ATP) y ácido γ -aminobutírico [(GABA) (Jo y Role, 2002)], las fibras musgosas del hipocampo co-liberan GABA y glutamato (Gutiérrez et al., 2003), las células amacrinas co-liberan GABA y acetilcolina [(Ach) (Lee et al., 2010)] y las neuronas dopaminérgicas del ATV co-liberan dopamina y glutamato (Tecuapetla et al., 2010; Stuber et al., 2010). En cada una de estas sinapsis, la co-liberación tiene un papel específico que incorpora las funciones de ambos neurotransmisores co-liberados, interactuando temporalmente para atender funciones más allá de lo que se describe como función de un sólo neurotransmisor (Birgner et al., 2010; Fortin et al., 2012).

1.2 Co-liberación de las neuronas dopaminérgicas

La importancia de estudiar la co-liberación de neuronas dopaminérgicas, proviene de que el inapropiado funcionamiento de éstas neuronas está asociado a varias neuropatologías como la enfermedad de Parkinson, las adicciones, la depresión, la esquizofrenia y las conductas compulsivas (Krishnan et al., 2007; Cao et al., 2010; Chaudhury et al., 2013). En este contexto, el estudio de la co-liberación procedente de neuronas dopaminérgicas es importante para entender los procesos en los cuales se involucran las funciones de la dopamina (Schultz, 1998; Fukuda et al., 2001; Sesack y Carr, 2002). Los primeros datos que documentan la co-liberación de dos neurotransmisores por parte de neuronas dopaminérgicas datan desde 1998, cuando se demostró por primera vez que las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio tenían la capacidad de liberar glutamato en sus terminales axonales (Sulzer et al., 1998; Joyce y Rayport, 2000). A favor de esta evidencia, también se demostró la

presencia del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 en estas neuronas (Dal Bo et al., 2004; Méndez et al., 2008; Birgner et al., 2010; Fortin et al., 2012). Sin embargo, a pesar de que estas publicaciones sugirieron la liberación de glutamato por parte de neuronas dopaminérgicas, dichos estudios fueron realizados en cultivos celulares, generando la discusión de si esto realmente sucedía en animales *in vivo*. Para resolver esta discusión, se requirieron otras técnicas experimentales para argumentar la liberación de glutamato por parte de neuronas dopaminérgicas *in vivo*. Primero, se empezó por utilizar la estimulación extracelular de neuronas dopaminérgicas del ATV, lográndose evocar respuestas postsinápticas mediadas por glutamato en neuronas del NAcc (Chuhma et al., 2004) y en la CPF (Lavin et al., 2005). Sin embargo, estos experimentos aún dejaban abierta la posibilidad de que las respuestas postsinápticas se debían a los fenómenos de liberación polisináptica (por activación de fibras de paso), y que las respuestas registradas en el NAcc, no provenían directamente de la activación de las neuronas dopaminérgicas del ATV. Por lo que, la evidencia definitiva se estableció con técnicas de optogenética [combinando la expresión de una proteína-canal en neuronas dopaminérgicas y sus axones denominada *Channelrhodopsin2* (ChR2-eYFP), esta opsina proviene de un alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel et al., 2003). Dicha opsina de expresión transmembranal, permite su activación por medio de pulsos de luz a 473 nm, haciendo posible la despolarización de la membrana celular, controlando la actividad eléctrica de la neurona o axón que la expresa, (Boyden et al., 2005)]. Utilizando esta técnica, y por medio de la foto-activación de la opsina ChR2-eYFP previamente expresada en axones dopaminérgicos del ATV que inervan el NAcc, se lograron evocar corrientes postsinápticas excitatorias mediadas por glutamato en las neuronas espinosas medianas del NAcc, cuando se activó selectivamente a los axones dopaminérgicos por medio de luz (Tecuapetla et al., 2010; Stuber et al., 2010). En el mismo año, se demostró que la supresión selectiva del gen que codifica para el transportador vesicular de glutamato de tipo 2 en neuronas dopaminérgicas, eliminaba la presencia de estas respuestas postsinápticas, sugiriendo que dicho transportador participa en la liberación de glutamato de axones dopaminérgicos (Hnasko et al., 2010). Sin embargo, cuando se realizaron estos mismos

experimentos para evaluar si las neuronas dopaminérgicas también liberaban glutamato en el estriado dorsal, dicho proceso no fue observado (Stubert et al., 2010). Por lo tanto, el descubrimiento de la liberación de glutamato proveniente de neuronas dopaminérgicas en el NAcc (cuya co-liberación ocurre a través de microdominios vesiculares independientes para dopamina y glutamato, Zhang et al., 2015) y la evidencia de que dicho proceso no ocurre en el estriado dorsal, demostró que no todas las estructuras postsinápticas de las neuronas dopaminérgicas presentan la co-liberación dopamina/glutamato.

1.3 Tipos neuronales del área tegmental ventral que proyectan a la corteza prefrontal

El sistema dopaminérgico tiene un papel importante en procesos de recompensa, motivación, aprendizaje, memoria y movimiento. Su mal funcionamiento está asociado a trastornos como la esquizofrenia, adicciones y trastornos del estado de ánimo como la depresión (Grace, 1991; Krishnan et al., 2007; Cao et al., 2010; Chaudhury et al., 2013). En particular, el sistema dopaminérgico que proyecta a la corteza surge de la región A10 del ATV [(ver, **Figura 1**) (Yamaguchi et al., 2011)]. La región A10 del cerebro medio contiene neuronas dopaminérgicas altamente concentradas en tres núcleos mediales del ATV [núcleo linear caudal (CLi), núcleo interfascicular (IF) y el núcleo de rafe rostral linear (RLi)], y dos núcleos cerebromediales laterales [núcleo parabraquial pigmentado (PBP) y núcleo paranigral (PN)] (Oades y Halliday, 1987; Swanson, 1982; Yamaguchi et al., 2011).

Aunque la mayor población de neuronas que conforman el ATV son de naturaleza dopaminérgica (~70-80%), el ATV está constituido por una población de neuronas GABAérgicas (20-30%) y glutamatérgicas [(~2-3%) (Hur y Zaborszky, 2005; Kawano et al., 2006; Ford et al., 2006; Margolis et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007, 2011; Nair-Roberts et al., 2008; Li et al., 2013)]. Dentro de las neuronas dopaminérgicas, se ha identificado una población de neuronas dopaminérgicas que expresan un marcador celular específico de neuronas glutamatérgicas (esto con base a la presencia del ARNm para la TH y el transportador vesicular de glutamato de tipo 2). Esta población de neuronas dopaminérgicas/glutamatérgicas durante el nacimiento,

representan el 24-27% de las neuronas dopaminérgicas del ATV (Yamaguchi et al., 2011).

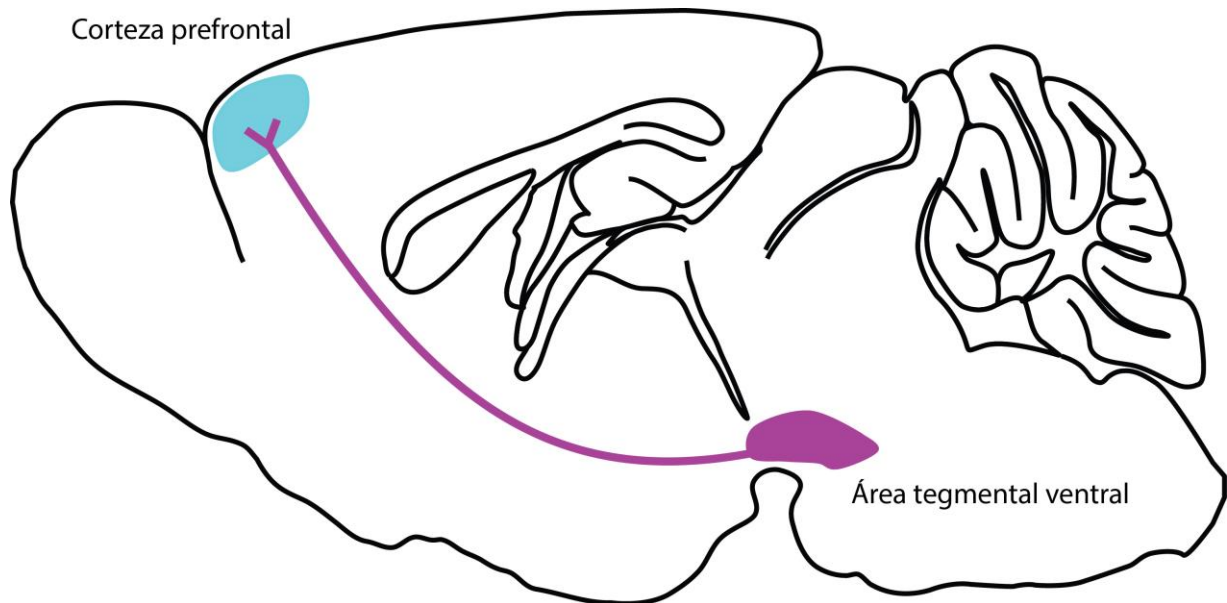


Figura 1. Circuito ATV→CPF. El ATV es un núcleo preferentemente dopaminérgico que proyecta hacia la CPF, formando el sistema mesocortical.

1.4 La corteza prefrontal y su modulación por dopamina

La CPF es una estructura integradora que recibe inervaciones del ATV y envía proyecciones al NAcc y el ATV, formando un mecanismo regulatorio de retroalimentación (Nestler y Carlezon, 2006). Funciones como el aprendizaje, la toma de decisiones y la memoria de trabajo, están bajo el control de la CPF. Cuando se compara la densidad de la inervación dopaminérgica con las diferentes cortezas, la CPF es la que recibe la inervación más densa proveniente de neuronas dopaminérgicas del ATV (Sesack y Carr, 2002). Se sugiere que los axones dopaminérgicos que inervan a la CPF modulan la funcionalidad de esta estructura (Robbins y Arnsten, 2009), por ejemplo, la alteración en la liberación de dopamina sobre la CPF está relacionada con el déficit en la memoria de trabajo (Lapiz y Morilak, 2006; Nelson et al., 2011), y se sabe que los niveles de catecolaminas (dopamina y noradrenalina) en la CPF se ven incrementados en tareas conductuales que involucran eventos novedosos y de recompensa (Mingote et al., 2004).

1.5 La corteza prefrontal y su participación durante la iniciación de secuencias de acciones

La CPF es una región clave que está involucrada en la planificación y automatización de comportamientos secuenciales en busca de un objetivo, tales como tocar un instrumento, tomar un objeto o caminar hacia un sitio específico (Fujii y Graybel, 2003). Una secuencia de acciones dirigida a un objetivo, refleja la necesidad inmediata a la resolución de nuevos problemas (Neuringer y Jensen, 2010). A través del proceso de aprendizaje de secuencias de acciones, se observa la interdependencia de las acciones, ya que una acción se vuelve más dependiente de las acciones anteriores e independiente de los estímulos del entorno, hasta que una secuencia de acciones es expresada como una unidad integrada por varias acciones (Dezfouli y Balleine, 2012). Durante tareas para el estudio de secuencias de acciones en primates no humanos, algunas neuronas de la CPF muestran respuestas fásicas en su actividad al iniciar y terminar una secuencia de acciones (Fujii y Graybel, 2003; Jin y Costa, 2010), y además, esta estructura cortical contiene neuronas que muestran una actividad preparatoria en la tasa de disparo para la iniciación de secuencias de acciones (Shima et al., 2007).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La liberación de glutamato y dopamina se propone como una coincidencia que modula la plasticidad sináptica, y por ende, los procesos que involucran dichas sinapsis (por ejemplo, memoria y aprendizaje; Schultz, 1998; Wickens, 2000; Redgrave et al., 2010; Yagishita et al., 2014). Fue desde los años 90's, cuando se sugirió por vez primera la existencia de la co-liberación de dopamina y glutamato en neuronas dopaminérgicas (Kaneko et al., 1990; Sulzer et al., 1998). Sin embargo, solo veinte años después con técnicas de optogenética, electrofisiología y deleciones genéticas, esta co-liberación quedó funcionalmente establecida en animales adultos (Tecuapetla et al., 2010; Stuber et al., 2010; Zhang et al., 2015, Kabanova et al., 2015). Especial interés para esta tesis, es el hecho que dichas neuronas dopaminérgicas del ATV también proyectan a la CPF, y que el proceso de co-liberación de dopamina y glutamato se ha sugerido específicamente en la CPF (Lavin et al., 2005). La CPF es una estructura involucrada en procesos cognitivos como la toma de decisiones, la memoria de trabajo y la iniciación/selección de estrategias de comportamiento (Redgrave et al., 2010). Dados estos antecedentes, es fundamental responder las siguientes preguntas, ¿los axones dopaminérgicos de las neuronas del ATV que inervan a la CPF son capaces de liberar glutamato?, y de ser así, ¿cuál es la contribución de estas sinapsis durante la iniciación/realización de secuencias de acciones?

3. JUSTIFICACIÓN

Las neuronas dopaminérgicas del ATV proyectan y modulan a la CPF. Además, una población de neuronas dopaminérgicas del ATV libera glutamato en el Nacc, gracias a que poseen el transportador vesicular de glutamato de tipo 2, cuya delección afecta la actividad motora (Birgner et al., 2010; Fortin et al., 2012). Se sabe que la CPF está implicada en la iniciación/terminación de una secuencia de acciones, por lo tanto, la sinapsis ATV→CPF es un blanco de investigación para elucidar si está proyección libera glutamato y evaluar su necesidad durante la iniciación de secuencias acciones.

4. HIPÓTESIS

Los axones dopaminérgicos provenientes del área tegmental ventral liberan glutamato en la corteza prefrontal, modulando la iniciación de secuencias de acciones.

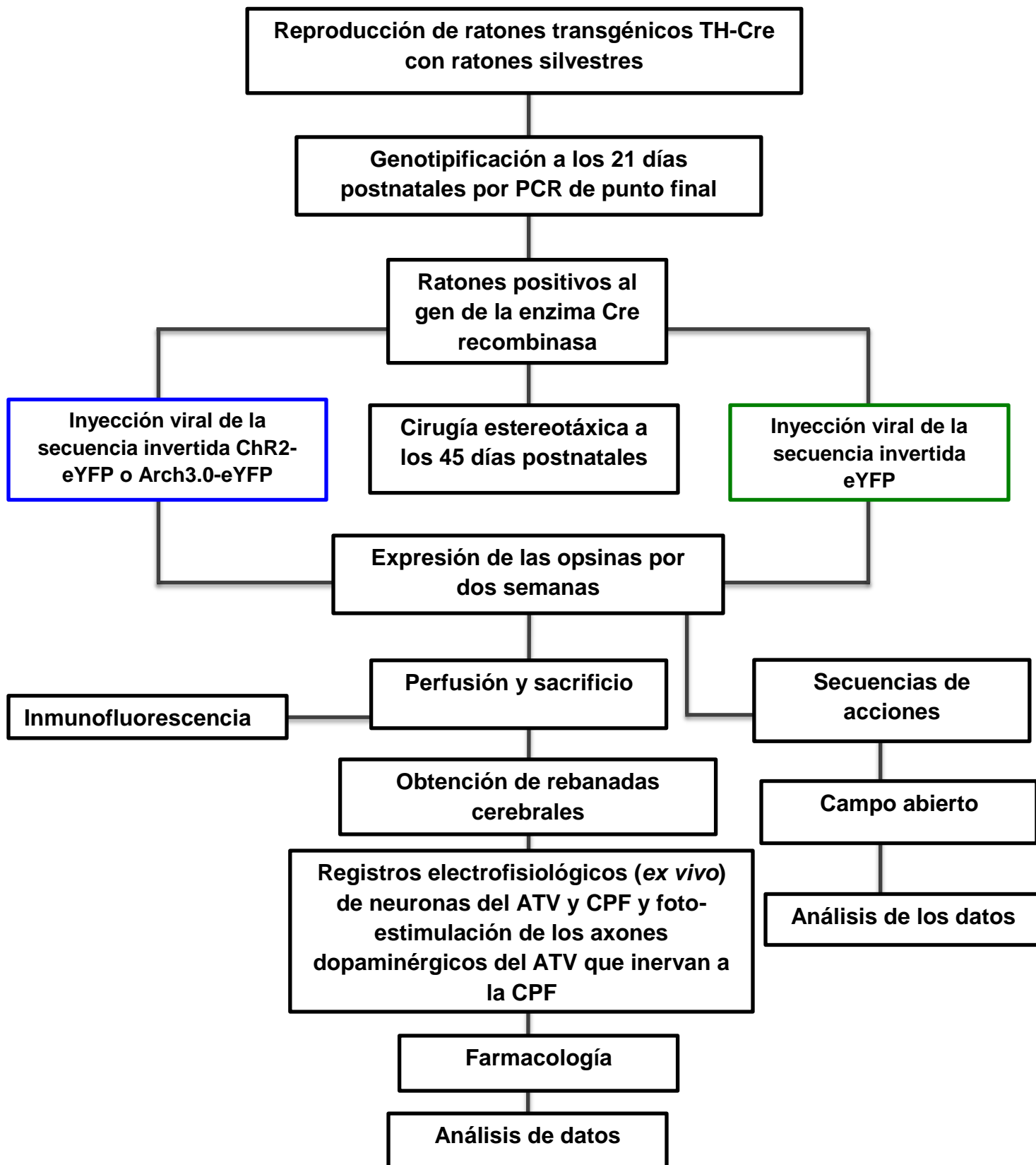
5 OBJETIVO GENERAL

Identificar si las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral liberan glutamato en la corteza prefrontal y evaluar la funcionalidad de estas sinapsis durante la iniciación de secuencias de acciones.

5.1 Objetivos particulares

1. Expresar a la proteína ChR2-eYFP o Arch3.0-eYFP de manera específica en las neuronas dopaminérgicas del ATV por medio de vectores virales.
2. Identificar anatómicamente las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas del ATV que inervan a la CPF.
3. Establecer la liberación de glutamato proveniente de axones dopaminérgicos del ATV que expresan ChR2-eYFP por medio de la técnica de fijación de voltaje y optogenética *ex vivo*, foto-activando a estos axones que inervan la CPF.
4. Establecer una tarea de condicionamiento operante para evaluar la funcionalidad de esta proyección (ATV→CPF) durante la iniciación y realización de secuencias de acciones.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Animales. Para la expresión selectiva de proteínas sensibles a luz (opsinas) en las neuronas dopaminérgicas del ATV, se utilizaron ratones transgénicos (C57BL/6), hembras y machos adultos que expresan la proteína Cre recombinasa en función del promotor para la enzima tirosina hidroxilasa [(TH-Cre) (Tg(Th-cre)¹²Gsat; *Gene Expression Nervous System Atlas*)]. El uso de estos animales, nos permitió la expresión específica de opsinas gracias a que la enzima Cre recombinasa sólo se expresa bajo el promotor de la enzima tirosina hidroxilasa. La secuencia de la opsina contenida en el vector viral reconoce el gen exógeno mediante cuatro regiones llamadas sitios *loxP* e invierte la secuencia flanqueada por estas regiones para llevar a cabo la recombinación del material genético.

Para determinar la liberación de glutamato en la CPF proveniente de los axones de neuronas dopaminérgicas del ATV, se utilizaron animales de 6-10 semanas de edad. Para evaluar la participación de la proyección ATV→CPF en la iniciación de secuencias de acciones, se utilizaron animales de 8-10 semanas de edad. Todos los animales utilizados fueron producto de la cruce de ratones transgénicos TH-Cre y ratones silvestres C57BL/6. Los animales fueron alojados en el Bioterio durante su reproducción y en el vivario del Instituto de Fisiología Celular en condiciones de temperatura (22°C) y humedad controladas, agua y comida *ad libitum* y un ciclo luz/oscuridad de 12/12 h durante la fase de experimentación. Para la presente tesis, todos los procedimientos se realizaron de acuerdo al protocolo N° FTA03-14 aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.2 Genotipificación. Para identificar a cada integrante de la camada de ratones, se realizó una genotipificación a los 21 días postnatales. Se procedió a destetar a la camada y realizar el sexado de cada ratón. Después, a cada ratón se le colocó un arete metálico numerado en la oreja derecha. La genotipificación se inició con la obtención de la muestra (punta de la cola) para extraer el ácido desoxirribonucleico

(ADN). La extracción del ADN de cada muestra, se llevó a cabo por medio de un kit de extracción de ADN (*Thermo SCIENTIFIC*). La amplificación de la secuencia para la enzima Cre recombinasa se realizó con un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) con los siguientes cebadores: iniciador antisentido: CACTCATGGAAAATAGCGATC e iniciador sentido: ATCTCCGGTATTGAAACTCCAGCGC (Sigma-Aldrich, México). Al obtener el material amplificado, los productos de la PCR se revelaron de acuerdo a su tamaño molecular con una electroforesis en gel de agarosa (*Low EEO, USBiological Life Sciences*) a 85 V por 40 minutos. La lectura del gel se efectuó por medio de un transiluminador de luz ultravioleta para determinar que ratones son positivos al gen de la enzima Cre-recombinasa.

7.3 Cirugía estereotáxica y sistema de transfección. Para manipular selectivamente la liberación del transmisor en los axones de las neuronas dopaminérgicas dentro de la CPF tanto *ex vivo* como *in vivo*, se expresó la opsina excitatoria ChR2-eYFP o la opsina inhibitoria Arch3.0-eYFP en neuronas TH-Cre del ATV (ver más adelante) en experimentos independientes.

La cirugía de transfección se realizó en un cuarto de cirugía con un sistema de aire acondicionado independiente, con presión negativa conectado a filtros HEPA. Para iniciar la cirugía, los animales fueron colocados en una cámara de inducción de anestesia (*E-Z Anesthesia*), basada en la inhalación combinada de isoflurano (3%) y oxígeno medicinal (1 LPM). Posteriormente, el animal fue retirado de la cámara de anestesia y colocado en una máscara de inducción de anestesia, donde se rasuró la zona cefálica y se posicionó en el sistema estereotáxico (*KOPF Instruments*) que contiene una plataforma reguladora de temperatura (*TCAT-2LV Controller, Physitemp*) para evitar la hipotermia. Se esterilizó con yodo toda la zona cefálica, se hizo una sola incisión con el bisturí para abrir la piel sobre el cráneo. Posteriormente, se limpió con agua oxigenada diluida (10%) todo el tejido conectivo que estaba adherido al cráneo, por último, se limpió la zona con agua salina isotónica. Se alineó el cráneo del animal utilizando como referencia bregma y lambda (de acuerdo al atlas del cerebro de ratón, Paxinos, 2001). Posteriormente, utilizando bregma como

referencia, se midieron las coordenadas -3.1 mm anteroposterior y \pm 0.4 mm mediolateral para ubicar el ATV, se marcaron los sitios de referencia con un colorante, y utilizando un taladro de dentista (*marathon SDE-H355PI*), se realizaron trépanos en la zona marcada para tener acceso al tejido cerebral. Finalizando este proceso, el experimentador se colocó una bata y gorro quirúrgico por razones de bioseguridad para la inyección del vector viral y así, llevar a cabo la transfección. Se cargó 1 μ L del vector viral (virus adenoasociado del serotipo 1 para la opsina ChR2-eYFP y serotipo 5 para la opsina Arch3.0-eYFP utilizados en este estudio, obtenidos de UPPEN; ver, <https://www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore>) en una micropipeta de borosilicato (Drummond scientific, 25 μ m) la cual fue estirada y cortada en un estirador de pipetas (*SUTTER Instrument*) para conseguir puntas de aproximadamente 25 μ m de diámetro que fueron acopladas a un inyector (*Nanoject II Drummond Scientific*) que previamente fue instalado en el sistema estereotáxico. La micropipeta se ubicó por encima del tejido cerebral, bajando -4.5 mm dorsoventral a partir del contacto con el cerebro, sitio específico para realizar la inyección del vector viral en el ATV del ratón (ver **Figura 2**). Se inyectaron 500 μ L del vector viral en intervalos de 4.6 nL cada 5 segundos, dejando la micropipeta dentro del cerebro durante 20 min antes de retirarla una vez terminada la inyección, esto para permitir la difusión del vector viral. Se retiró la micropipeta y se procedió a infectar el hemisferio contrario. Terminando el proceso de transfección, se suturó la zona cefálica (cuando el animal estuvo destinado a registros *ex vivo*) o se prosiguió a implantar fibras ópticas en la CPF para la realización de los experimentos de inhibición optogenética *in vivo*. Se implantaron fibras ópticas de 200 μ m de diámetro en la CPF hechas manualmente (Sparta et al., 2012). Las coordenadas para la implantación de fibras fueron: +1.9 mm anteroposterior y \pm 0.8 mm mediolateral, bajando -1.8 mm dorsoventral, y por medio de un sistema de rotación propio del estereotáxico que permite girar su eje longitudinal, definimos la posición de las fibras ópticas con un ángulo de 15° y -15° bilateralmente, sitio específico de la CPF (corteza prelímbica e infralímbica; ver **Figura 11**). Posterior a la cirugía, el animal estuvo en proceso de recuperación y observación post-cirugía constante por tres días.

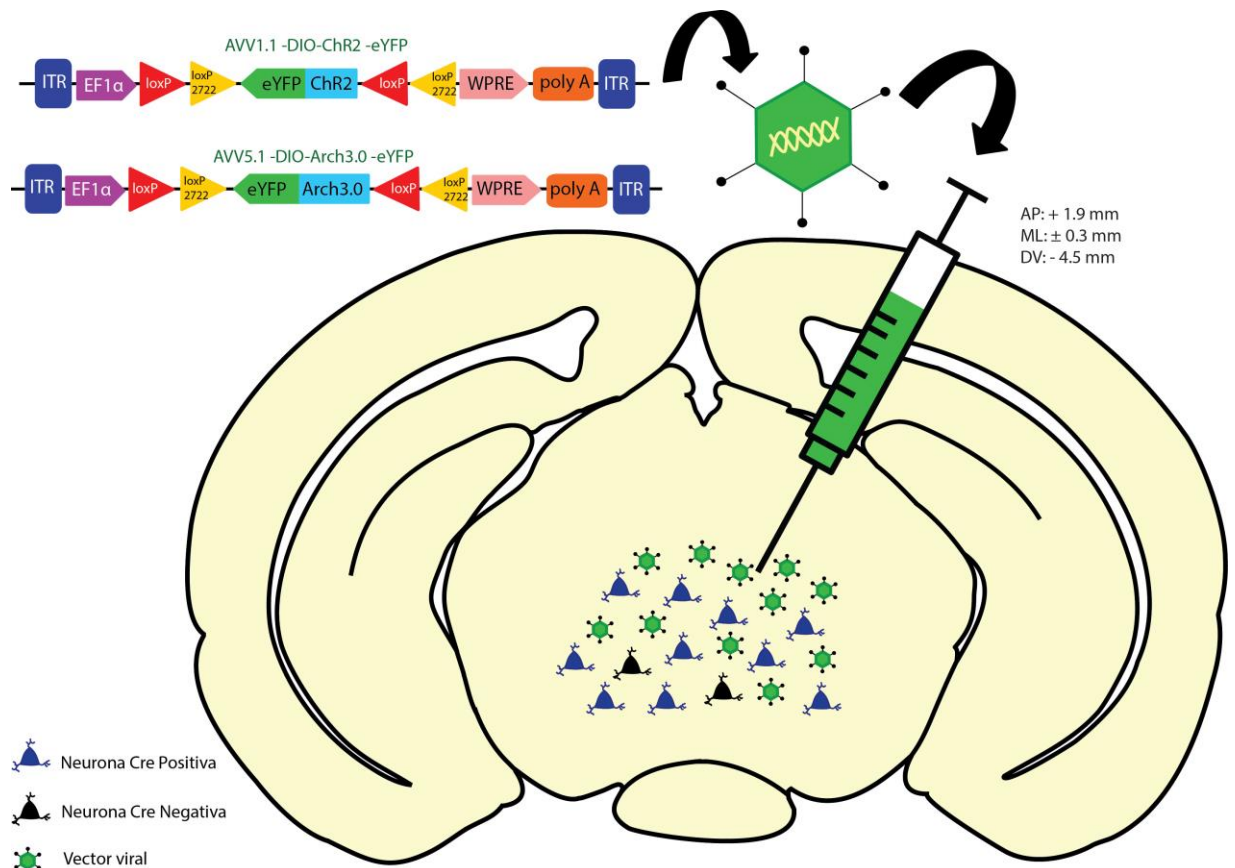


Figura 2. Transfección de neuronas dopaminérgicas. Se representa la secuencia del constructo que contiene el gen para las opsinas ChR2-eYFP y Arch3.0-eYFP, cuyas secuencias se encuentran insertadas en un adenoasociado (AAV). Por medio de cirugía estereotáxica, estos adenoasociados infectan a las neuronas cre positivas para permitir la inserción del constructo al genoma de la neurona y de esta manera expresar las opsinas.

7.4 Preparación ex vivo y electrofisiología. Ratones transgénicos que previamente fueron transfectados como se describió en el párrafo anterior (para la expresión de ChR2-eYFP en el ATV y sus proyecciones hacia la CPF), fueron anestesiados a las dos semanas de transfección con ketamina/xilacina (95 mg/1 mg, respectivamente) por vía intraperitoneal y colocados en una mesa quirúrgica en posición decúbito supino para realizar una perfusión con una solución de sacarosa que contenía (en mM): 234 sucrosa, 7 dextrosa, 28 NaHCO₃, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 1.44 NaH₂PO₄, ácido bórico y piruvato, burbujeada con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ y un pH de 7.3. Una vez perfundido el animal, se prosiguió a extraer el cerebro para obtener rebanadas coronales, ya sea del ATV o de la CPF según el experimento del día (utilizando un vibratomo; *Lancer 1000*). Las rebanadas que se obtuvieron fueron de 250 μm de grosor, siendo colectadas en una cámara de estabilización que contenía

una solución externa (en mM: 128 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 10 Glucosa y 2 CaCl₂ con un pH de 7.3 y oxigenada a 95% de O₂ y 5% de CO₂ a pH 7.3) a temperatura ambiente alrededor de 30 minutos antes de su posicionamiento para registros. Después del proceso de incubación, se seleccionó una de las rebanadas y se colocó en el sistema de electrofisiología *in vitro*, visualizando a las neuronas con un objetivo de inmersión de 40X con iluminación infrarroja e iluminación fluorescente conectada a una cámara y un monitor. Se registraron neuronas transfectadas con ChR2-eYFP del ATV (ver **Figura 3**) o neuronas de la CPF, realizando el acceso al interior de la célula luego de haber formado un gigasello [(el sello en la modalidad de fijación de voltaje, previamente compensado la diferencia del potencial entre la solución contenida en la micropipeta de registro (en mM: 130 de gluconato de potasio, 10 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 2 Na⁺-ATP, 0.3 Na⁺-GTP a pH 7.3) y la solución externa; también se compensó la resistencia del electrodo (3-6 MΩ), previo a la formación del sello]. Los registros de fijación de corriente y de fijación de voltaje en la configuración de célula completa se hicieron usando un amplificador *Axoclamp-2B* (*Axon Instruments*) que fue conectado a un osciloscopio y controlado por un ordenador equipado con una tarjeta de conversión analógica digital (Labview, National Instruments). Los registros electrofisiológicos de fijación de corriente se realizaron con el potencial de membrana en reposo de las neuronas. Cuando los registros se realizaron en la modalidad de fijación de voltaje, se ajustó un potencial de fijación a -60 mV.

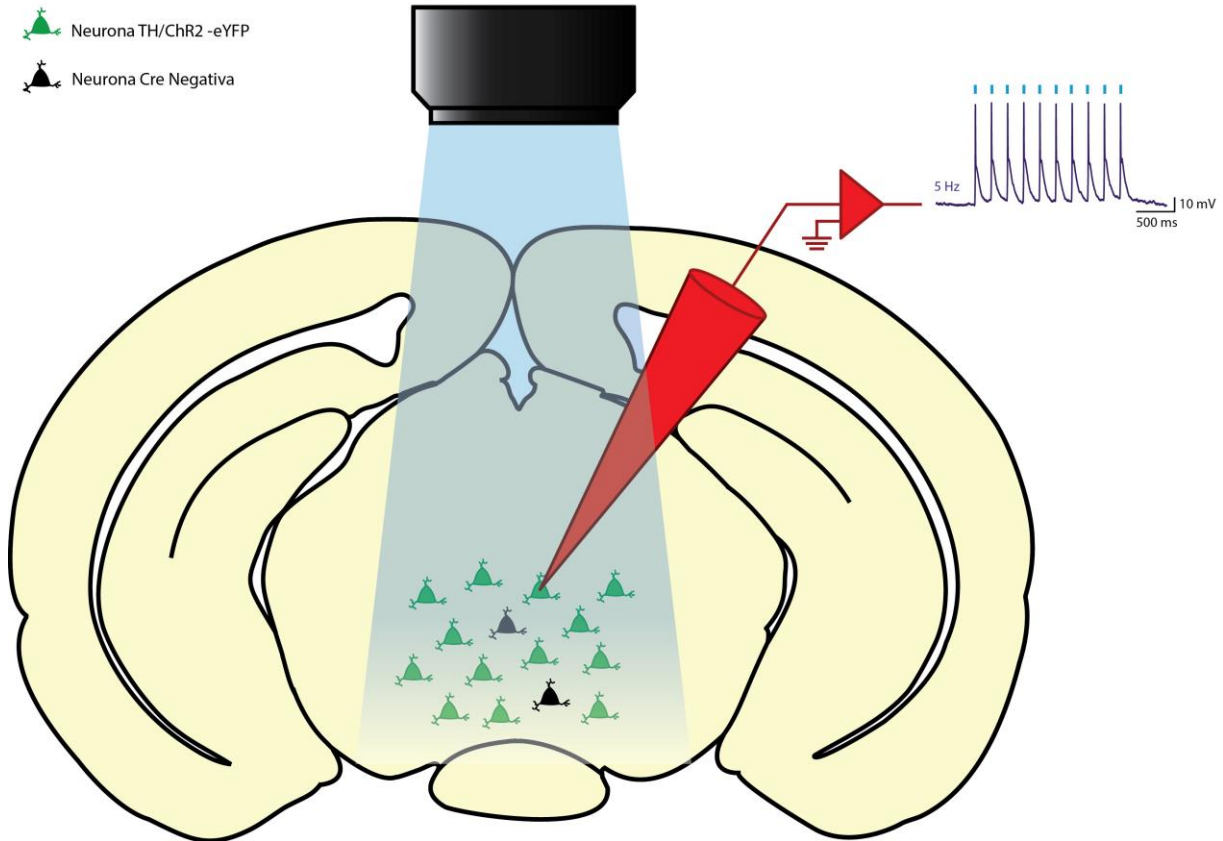


Figura 3. Estimulación optogenética de neuronas TH Cre / ChR2 eYFP. Por medio de estimulación optogenética se activan a las opsinas ChR2 previamente expresadas en neuronas Cre positivas, manipulando de manera específica su actividad eléctrica.

7.5 Estimulación optogenética ex vivo. Una vez obtenido el acceso al interior de la célula, se realizó la estimulación optogenética, ya sea de las neuronas del ATV (ver **Figura 3**) o de los axones dopaminérgicos transfectados con la opsina ChR2-eYFP provenientes del ATV→CPF (ver **Figura 4**) con luz azul, derivada de una lámpara de fluorescencia, controlando la vía de paso de la luz con un obturador de alta resolución (*Lambda LS; SUTTER Instrument*), y utilizando un filtro previamente diseñado para iluminar en el rango de 470 ± 10 nm, (Nikon B-2A). La intensidad de luz utilizada en estos experimentos fue de 1 a 3 mW (la intensidad fue registrada con un medidor de poder de luz; *Thorlabs PM100D*). Como protocolo de estimulación, se utilizaron pulsos de 10-20 ms, los cuales produjeron una despolarización neuronal (en el caso del ATV), o para evocar corrientes postsinápticas en las neuronas de la CPF (en el caso de la foto-activación de axones del ATV→CPF).

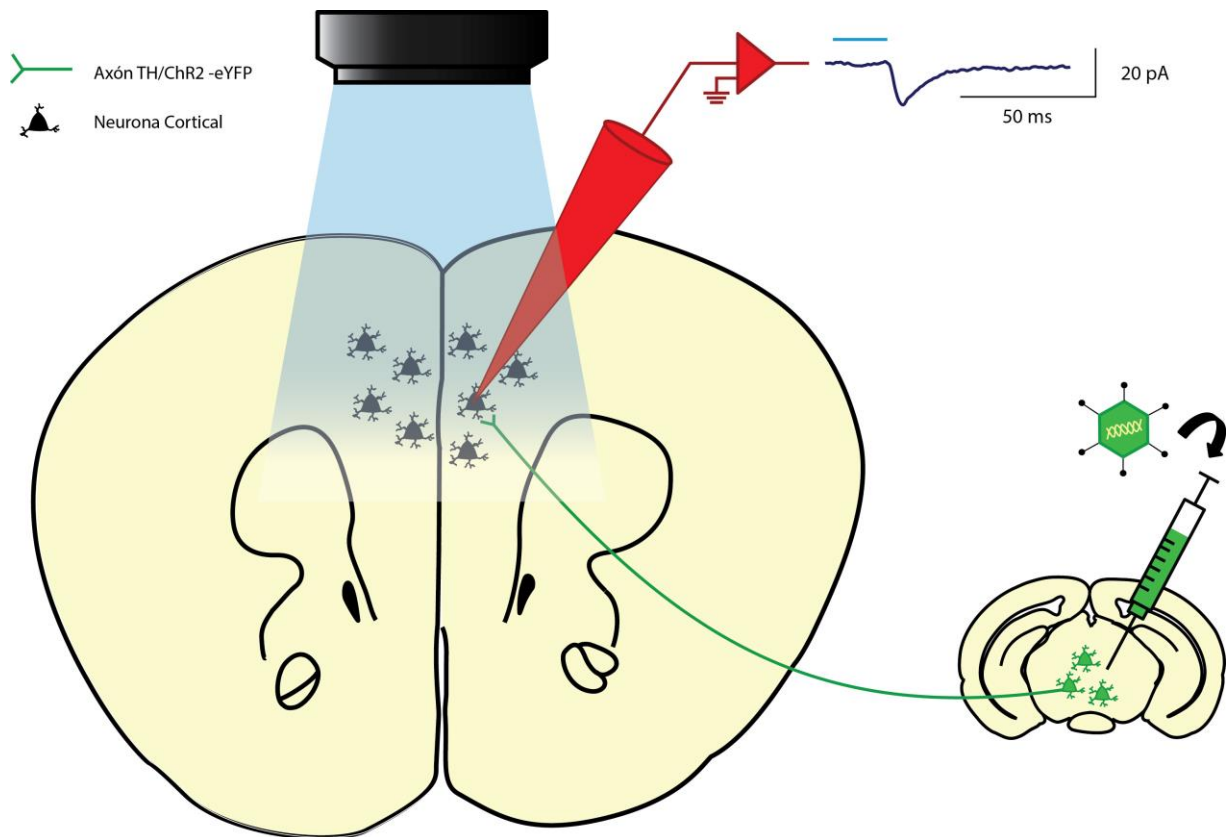


Figura 4. Activación optogenética de los axones TH/ChR2-eYFP en la corteza prefrontal. Las neuronas dopaminérgicas TH/ChR2-eYFP del área tegmental ventral medial inervan a la corteza prefrontal. En el panel superior de la derecha se representan una corriente postsináptica evocada en neuronas piramidales al foto-estimular a los axones TH/ChR2-eYFP provenientes del ATV.

7.6 Farmacología. Después de evocar corrientes postsinápticas en neuronas de la CPF por medio de la foto-estimulación de los axones dopaminérgicos que provienen del ATV→CPF, se comprobó si las corrientes postsinápticas generadas eran de naturaleza glutamatérgica, aplicando a la perfusión el antagonista glutamatérgico 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) a una concentración saturada (10 μ M; Ross et al., 2014), un antagonista de receptores inotrópicos de tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico).

7.7 Funcionalidad del circuito ATV→CPF. Para evaluar la contribución de la proyección ATV→CPF, realizamos inhibiciones optogenéticas de los axones dopaminérgicos provenientes del ATV en la CPF. Las inhibiciones optogenéticas

fueron realizadas en dos ventanas temporales, mientras los animales realizaban la iniciación o realización de secuencias de acciones (ver **Figura 11**).

7.8 Manipulación optogenética durante la iniciación o realización de secuencias de acciones. Se entrenaron a los animales para auto-iniciar secuencias de acciones de manera ordinal (donde la acción es presionar una palanca) y de esta manera obtener una recompensa (sacarosa al 10%). A lo largo del entrenamiento los animales fueron privados de agua por 8 horas antes de cada sesión de entrenamiento. Su peso fue mantenido alrededor del 80-85% con respecto a su peso inicial, controlando la ingesta de alimento. En la primera sesión, el animal fue colocado en una caja de comportamiento operante que consta de un comedero y una palanca situada en la zona izquierda (*MED associates*). Durante esta primera sesión de entrenamiento, se colocó una jeringa con sacarosa al 10% en una bomba que liberó aleatoriamente sacarosa (20-25 μ L; recompensa), cuya finalidad era que el ratón asociara que en el comedero había recompensas (ver **Figura 5**). Al día siguiente, al animal se le presentó una palanca. En esta sesión, si el animal presionaba la palanca, recibía una recompensa, dejando la opción de conseguir 15 recompensas o dejar pasar media hora para terminar la sesión. En la sesión posterior, se estableció que el animal recibiera una recompensa cada vez que presionara la palanca, terminando la sesión si el animal recibía 30 recompensas (reforzamiento continuo de 30 presiones) o si la sesión llegaba a los 30 min. Posteriormente, los animales fueron sometidos a 12 sesiones con razón fija de 8 presiones para que el animal recibiera una recompensa, finalizando la sesión cuando el animal recibió 30 recompensas o 30 minutos transcurridos. Este número de sesiones en razón fija de 8 presiones (12 sesiones) fue elegido con el objetivo de alcanzar un desempeño óptimo para que el animal auto-iniciara secuencias al presionar la palanca de manera estable. Previo a las manipulaciones optogenéticas *in vivo*, los animales fueron habituados a la conexión con fibras ópticas para la iluminación de los axones que previamente habían sido transfectados como se describió previamente (ver apartado 6.3 de la metodología). Después de la aclimatación, los animales fueron foto-estimulados en cada sesión de razón fija de 8 presiones durante dos ventanas temporales 1) durante la iniciación de secuencia de

acciones (ver **Figura 11D, E, F**) o 2) durante la primera presión de la secuencia de acciones (ver **Figura 11G, H, I**). Para activar la iluminación durante la primera ventana temporal, se tomó como ventaja el caminar estereotipado que los animales habían desarrollado al dirigirse del comedero hacia la palanca, por lo que, colocando un sensor infrarrojo en esta vía, cada que el animal rompía este sensor después de haber consumido una recompensa (detectado por la medición en la cantidad de lengüetazos realizados), se generaba un pulso TTL acoplado a un láser (*CNI Lasers*), que conectado a las fibras ópticas implantadas en la CPF, enviaron pulsos de luz dentro del cerebro (un pulso de luz verde de 5 segundos en cada ensayo que recibió estimulación). Entonces, siguiendo este protocolo descrito, cada animal tuvo ensayos con iluminación y sin iluminación durante la misma sesión. La segunda ventana temporal de estimulación se llevó a cabo usando como generador del pulso TTL la primera presión de la secuencia de presiones en la palanca, activando la iluminación. La foto-estimulación fue aleatoria, y se adjuntó el número de estimulaciones para cubrir el 50% de ensayos con estimulación *versus* el otro 50% sin estimulación.

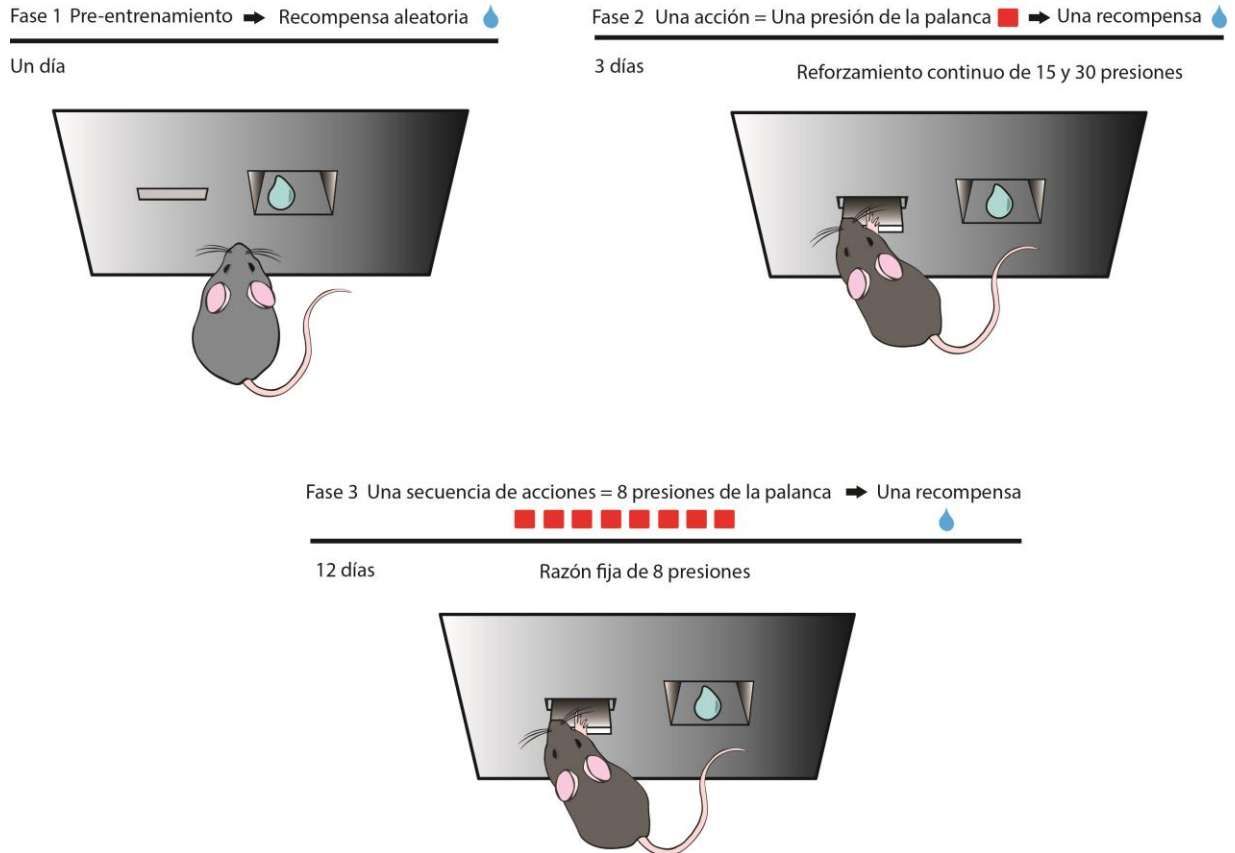


Figura 5. Tarea conductual de secuencias de acciones. Para establecer una tarea específica en el estudio de secuencias de acciones se entrenaron ratones en tres fases, la primer fase consistió en que el ratón asociará que existe una recompensa, en la fase 2 se estableció la relación palanca-recompensa y en la última fase el ratón asoció que al presionar 8 veces la palanca se le otorga una recompensa. Esta conducta permite estudiar la iniciación de secuencias de acciones.

7.9 Campo abierto. Para evaluar los posibles efectos de las manipulaciones optogenéticas sobre la motricidad (midiendo el desplazamiento horizontal), se evaluaron los movimientos del animal en la prueba de campo abierto durante ensayos en los que recibió inhibición optogenética *versus* un periodo de un segundo antes de la estimulación (ver **Figura 12**). Para esto, el ratón fue colocado en una caja de campo abierto de acrílico de 40 cm x 40 cm, con una altura de 31 cm. La sesión tuvo una duración de diez minutos presentando una estimulación cada minuto (un pulso de luz verde de 5 segundos).

7.10 Inmunofluorescencia. El circuito ATV→CPF fue analizado con la técnica de imagen de inmunofluorescencia para observar los cuerpos celulares del ATV y sus

axones sobre la CPF. Ratones transgénicos que previamente fueron transfectados como se describió en el apartado 6.1 (para la expresión de ChR2-eYFP o Arch3.0-eYFP en el ATV y sus proyecciones hacia la CPF), fueron anestesiados a las dos semanas de transfección con ketamina/xilacina (95 mg/1 mg, respectivamente) por vía intraperitoneal y colocados en una mesa quirúrgica en posición decúbito supino para realizar una perfusión con solución salina isotónica y paraformaldehído al 4%. El cerebro fue removido de la cavidad craneal y almacenado en un frasco con paraformaldehído al 4% por 24 h. Posteriormente, el cerebro fue lavado 5 veces con PBS 0.1 M, pH 7.3 y se procedió a realizar cortes coronales de 50 μ m del ATV y de la CPF. Las rebanadas se colocaron en una solución bloqueante de albúmina sérica bovina y PBS 0.1 M con Tritón al 0.3% por 40 min a temperatura ambiente. Después se hicieron 3 lavados por 5 min en PBS 0.1 M, pH 7.3. La reacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo con un anticuerpo primario policlonal conejo anti-tiroxina hidroxilasa (*AB152, Merck Millipore*) en una dilución 1:500 en PBS 0.1 M, pH 7.3 y Tritón al 0.3% dejándose en agitación moderada por 12 h a temperatura ambiente. Terminando esta reacción, se hicieron 3 lavados por 5 min en PBS 0.1 M con pH de 7.3. Luego se adicionó el anticuerpo secundario burro contra conejo (*711-165-152, Jackson ImmunoResearch*) en una dilución 1:500 en PBS 0.1 M, pH 7.3 y Tritón al 0.3 % con una incubación de 2 h a temperatura ambiente en agitación moderada. Se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron los últimos 3 lavados por 5 min en PBS 0.1 M, pH 7.3. Se procedió a montar los cortes en portaobjetos, se colocaron gotas de un medio de montaje para preservar la fluorescencia de las rebanadas (*Vectashield*) que contiene DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), un marcador fluorescente que se une a regiones enriquecidas en adenina y timina en las secuencias de ADN. Las muestras se cubrieron y almacenaron a 4°C.

7.12 Análisis de datos. Los datos se compararon contra su propio control (en el mismo experimento se tomó un tiempo de registro como referencia), la estadística que se realizó fue la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis dado que compara dos muestras relacionadas sin asumir distribución normal y determina si las poblaciones de datos comparables provienen o no de una misma distribución. La significancia de los datos se aceptó con un valor $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Expresión de las opsinas ChR2-eYFP y Arch3.0-eYFP en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral.

Para poder manipular específicamente los axones dopaminérgicos del ATV en la CPF, necesitábamos de una estrategia que nos permitiera expresar opsinas microbianas específicamente en estos axones. Para este fin, se seleccionó el uso de la línea de ratones transgénicos TH-Cre (F112). Para evaluar la especificidad de esta línea, determinamos en el cerebro de un animal para expresar ChR2-eYFP y un animal para expresar Arch3.0-eYFP, la proporción de neuronas transfectadas (expresando la proteína amarilla fluorescente eYFP; proteína reportera acoplada a la expresión de la opsina) que fueron inmunopositivas a la marca para la enzima tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante para la síntesis de dopamina y en este caso marcador celular específico para determinar si una neurona es de naturaleza dopaminérgica). En la **Figura 6A** se observa el esquema general de transfección en el cerebro de un ratón TH-Cre. Una vez transfectado el animal para la expresión de la opsina, se permitió que esta proteína se expresará por al menos 2 semanas, posteriormente se obtuvieron rebanadas coronales de 50 μm , de las cuales el 30% (una rebanada cada 150 μm) fueron montadas (cubiertas con *Vectashield* para observarlas al microscopio; **Figura 6B**) para tomar imágenes por medio de microscopía de fluorescencia y observar el sitio de infección de la opsina, o consignadas a inmunomarcaje para detectar a la enzima TH (**Figura 6C**), en este caso reveladas con un anticuerpo secundario que emite en el espectro rojo a una longitud de onda de 570 nm, (para más detalles, ir a la metodología) para evaluar la co-localización de ambas señales en estas neuronas. Posteriormente, al realizar un conteo de las neuronas inmunopositivas para la marca de la transfección (expresando la opsina) y la presencia de la enzima TH en las neuronas del ATV, cuantificamos la expresión de ChR2-eYFP en 104 neuronas, de las cuales 100 presentaron ambas marcas, representando el 96.15% de colocalización para ambas proteínas: la opsina microbiana (verde) y la marca para TH (rojo); y el 100% de

colocalización en un ratón TH-Cre cuando evaluamos la expresión de la opsina Arch3.0-eYFP y el inmunomarcaje para la enzima TH (**Figura 6D**). Estos datos nos permitieron concluir que la línea TH-Cre (FI12) tiene un alto grado de especificidad para expresar opsinas microbianas en neuronas dopaminérgicas del ATV.

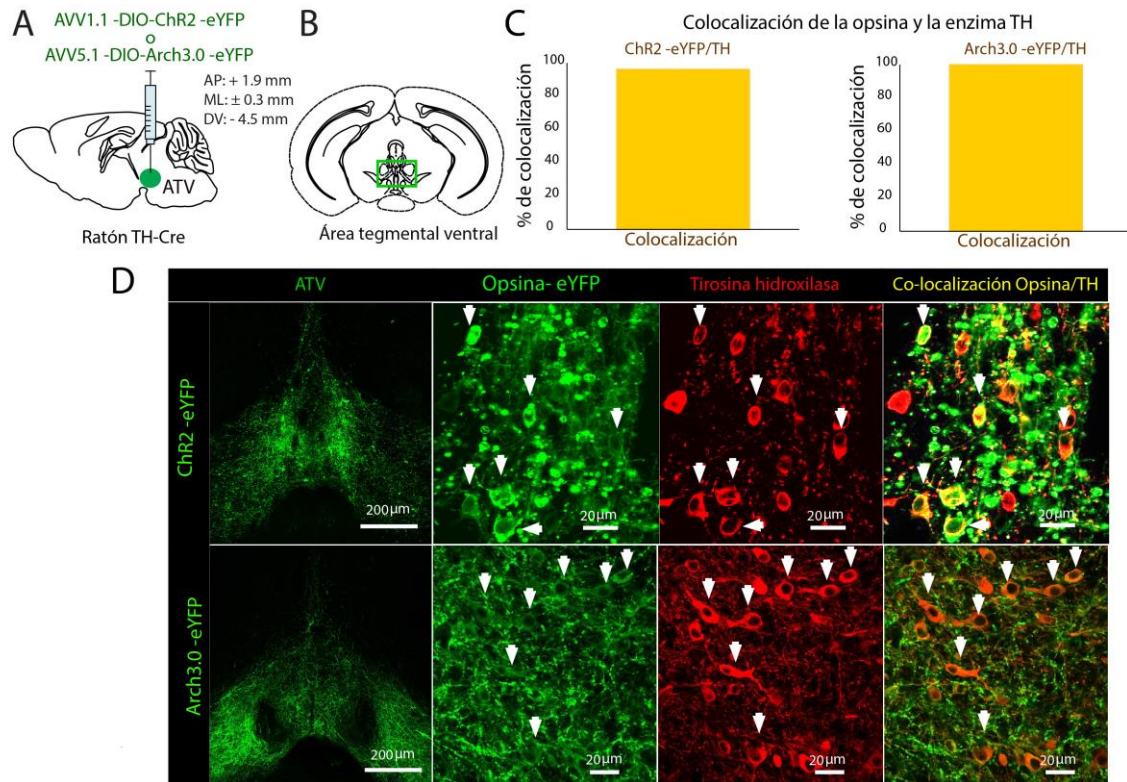


Figura 6. Expresión de la opsina ChR2-eYFP o Arch3.0-eYFP en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral

(A) Representación esquemática del sitio de inyección del AAV1.1 en el área tegmental ventral.
 (B) Esquema gráfico de una rebanada coronal del área tegmental ventral en ratón.
 (C) Porcentaje de neuronas que co-localizan para ambas marcas (Opsina: ChR2-eYFP o Arch3.0-eYFP y enzima tirosina hidroxilasa: TH).
 (D) Primer panel superior a la izquierda: fotomicrografía confocal de una rebanada coronal tomada con un objetivo 10X mostrando un acercamiento a 20X de la zona transfectada en el ATV con las opsinas microbianas (primer recuadro verde en B). Sigüentes tres paneles de izquierda a derecha muestran la expresión de la proteína amarilla fluorescente (eYFP; proteína reportera de la expresión de la opsina ChR2), mismo campo presentando marca para la enzima TH, y colocalización de ambas marcas. Las flechas en el panel de la derecha resaltan a las neuronas co-localizando ambas marcas (eYFP y TH). El tiempo de expresión de ambas opsinas fue de 14 días.

8.2 Excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas infectadas con AVV1.1-DIO-ChR2-eYFP.

Una vez verificada la expresión de la opsina ChR2-eYFP en neuronas del ATV, realizamos experimentos de electrofisiología de fijación de corriente *ex vivo* en neuronas previamente transfectadas (**Figura 7**). Esto, con la finalidad de evaluar la activación funcional de la ChR2-eYFP para controlar el disparo de las neuronas TH-Cre/ChR2-eYFP del ATV. Para este fin, obtuvimos rebanas coronales del ATV de ratones TH-Cre de 6 semanas de edad previamente infectados (dos semanas antes) con el vector viral AVV1.1-DIO-ChR2-eYFP para la expresión de la opsina ChR2-eYFP (**Figura 7A, B, C**). Identificamos a las neuronas dopaminérgicas por su localización anatómica y la fluorescencia emitida, ya que la expresión de la opsina es específica en neuronas TH-Cre (**Figura 7B**). Por medio de la foto-estimulación con pulsos de luz azul a una longitud de onda de 473 nm, se lograron evocar potenciales de acción en las neuronas registradas en respuesta a estos estímulos generados a diferentes frecuencias, que van de los 5 Hz a los 50 Hz (ver **Figura 7D, E, F**). Al cuantificar la fidelidad de las neuronas dopaminérgicas para generar potenciales de acción en función de las frecuencias de estimulación, observamos que, sólo cuando utilizamos frecuencias por debajo de los 20 Hz, la fidelidad para seguir los pulsos de luz fue del 96.66% (**Figura 7G**). Estos resultados muestran que por debajo de los 20 Hz es posible activar a la opsina ChR2-eYFP expresada en neuronas TH-Cre/ChR2-eYFP del ATV con una alta probabilidad.

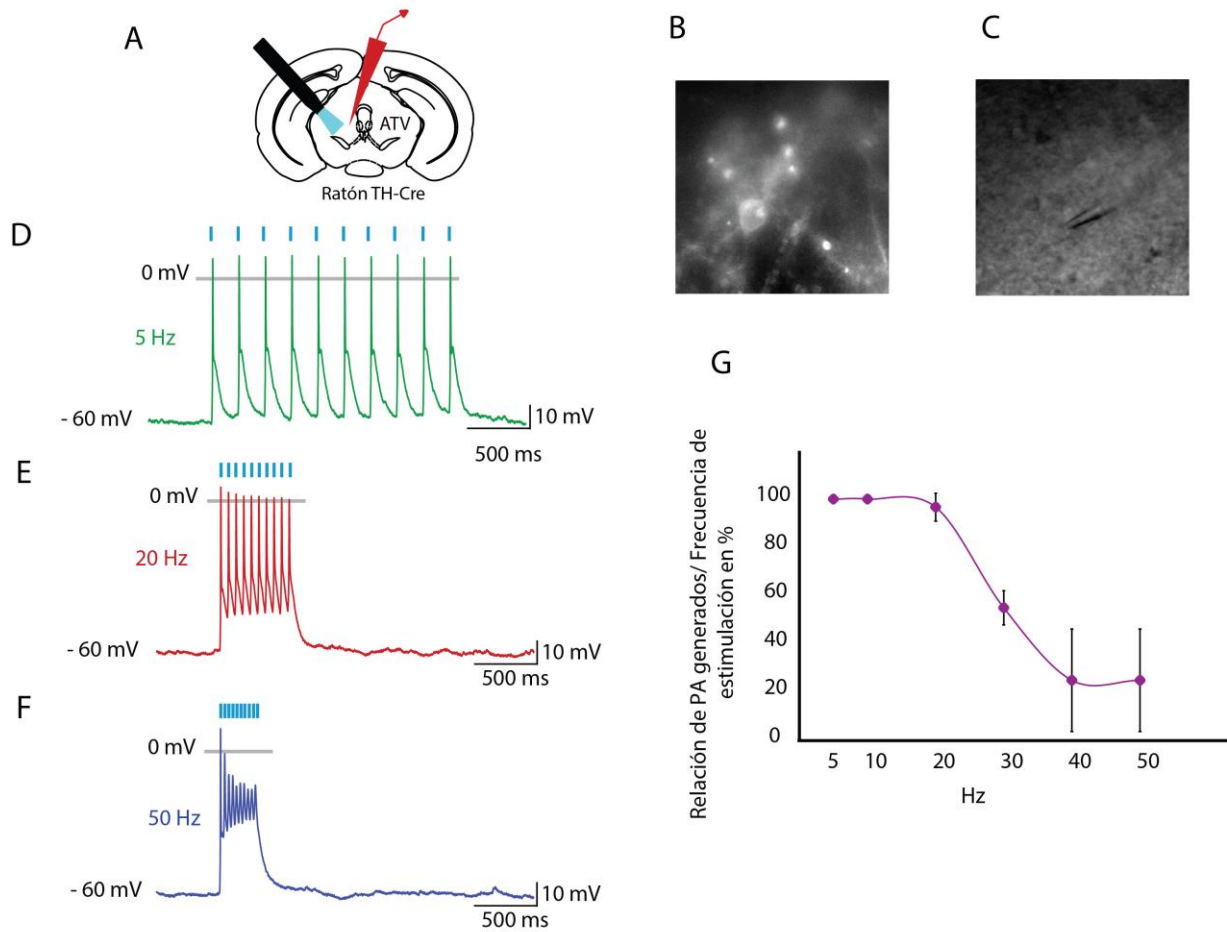


Figura 7. Activación de neuronas dopaminérgicas TH Cre que expresan la opsina ChR2-eYFP *ex vivo*

(A) Representación gráfica de la zona de registro electrofisiológico y ubicación de la fluorescencia para la estimulación optogenética de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral.

(B, C) Imagen de microscopía de fluorescencia de una neurona que expresa ChR2-eYFP a 40X y la zona de inserción de la micropipeta para el registro electrofisiológico a 10X.

(D, E, F) Estimulación optogenética de neuronas TH-Cre/ChR2-eYFP con pulsos de luz azul a diferentes frecuencias de estimulación.

(G) Probabilidad de generación de potenciales de acción evocados por la estimulación optogenética.

8.3 Inervación de la corteza prefrontal por axones dopaminérgicos del área tegmental ventral

Después de evaluar la funcionalidad de la activación de la ChR2-eYFP por medio de pulsos de luz azul, procedimos a corroborar que las neuronas del ATV envían sus proyecciones a la CPF. Para este fin, de igual manera como lo describimos para la **Figura 2 y 6**, transfectamos ratones adultos TH-Cre a las 6 semanas de edad para expresar la opsina ChR2-eYFP o Arch3.0-eYFP (**Figura 8A**), obteniendo cortes coronales de la CPF de 50 μm (**Figura 8B**), a los cuales les realizamos un inmunomarcaje para la enzima TH, y posteriormente identificamos si los axones dopaminérgicos provenientes del ATV en la CPF expresaron la opsina ChR2-eYFP o Arch3.0-eYFP, derivada de la transfección viral en el ATV, revelado por la colocalización de ambas marcas (**Figura 8B, C**).

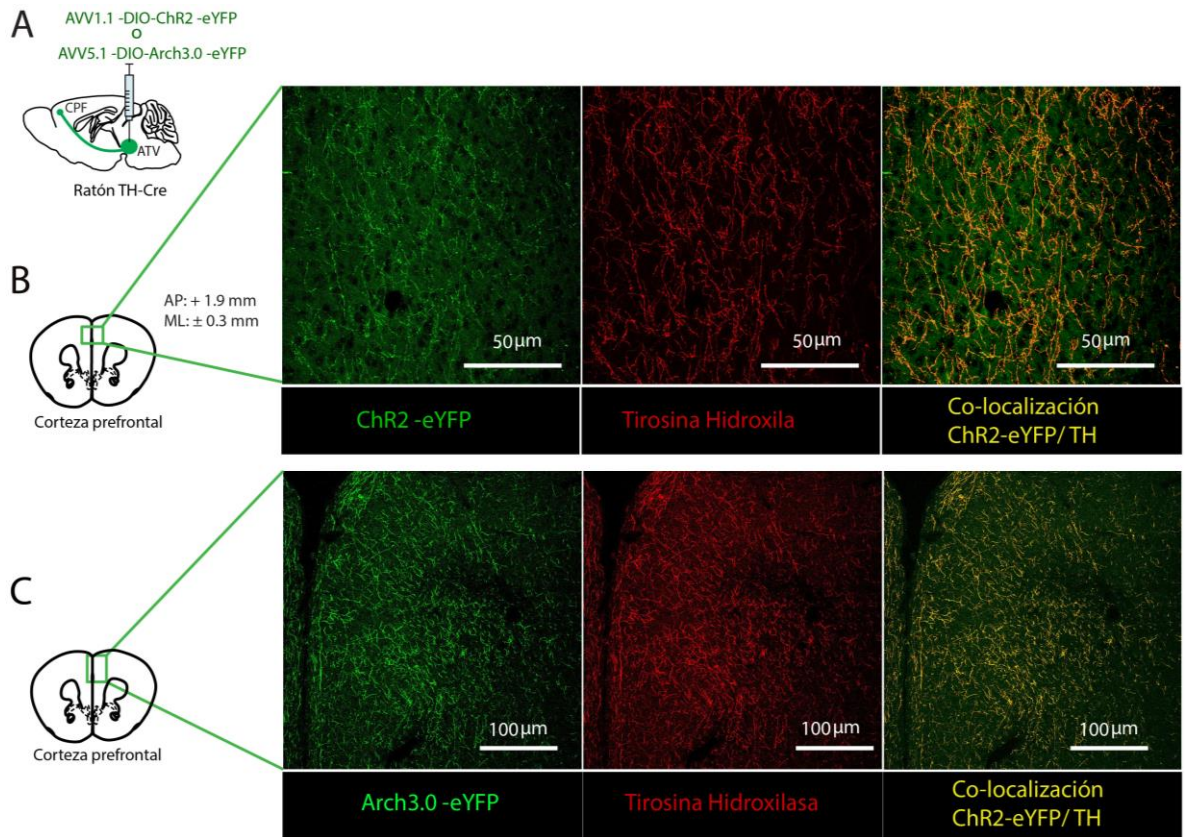


Figura 8. Inervación de la corteza prefrontal por axones dopaminérgicos del área tegmental ventral.

(A) Representación de la zona de infección del área tegmental y su proyección hacia corteza prefrontal.

(B) Representación gráfica de un corte coronal que indica la zona de inervación por axones dopaminérgicos provenientes del área tegmental ventral. Imágenes de microscopía confocal a 10X de una rebanada coronal de ratón TH-Cre que muestran a los axones dopaminérgicos procedentes del área tegmental ventral. Estos axones expresan la opsina ChR2-eYFP, son inmunopositivos para la enzima tiroxina hidroxilasa y co-localizan ambas señales ChR2-eYFP/TH.

(C) Imágenes tomadas en microscopía confocal a 20X de un corte coronal de ratón TH-Cre, cuyos axones expresan la opsina Arch3.0-eYFP, son inmunopositivos para la enzima TH y co-localizan ambas señales.

8.4 Potenciales postsinápticos excitatorios evocados en la corteza prefrontal por la activación de axones dopaminérgicos provenientes del área tegmental ventral.

Después de haber confirmado la inervación de axones dopaminérgicos del ATV en la CPF, realizamos experimentos de electrofisiología *ex vivo* con la técnica de fijación de corriente para observar el disparo de las neuronas de la CPF y fijación de voltaje en la configuración de célula completa en las mismas neuronas (**Figura 9**). Para estos experimentos, como ya previamente describimos, transfectamos ratones adultos TH-Cre de 6 semanas de edad con la opsina ChR2-eYFP y obtuvimos rebanadas coronales de la CPF para registros de rebanada *ex vivo*. Una vez que se realizó el acceso al interior de la célula, le inyectamos pulsos de corriente positiva y/o negativa de 100 pA para caracterizar la relación corriente-voltaje (I-V) de la célula registrada (**Figura 4A, B**), obteniendo una resistencia de entrada de 166.43 MΩ. Después de haber caracterizado la relación I-V, procedimos a foto-estimular a los axones circundantes de la célula registrada con pulsos de luz azul de 473 nm, cada pulso tuvo una duración de 10-20 milisegundos en intervalos de 5-10 segundos (**Figura 9C**) manteniendo el potencial de mantenimiento a -60 mV. Siguiendo este procedimiento, en 3 células de 24 neuronas registradas (n=10 ratones) observamos corrientes postsinápticas evocadas por el pulso de luz (promedio de la amplitud 13 ± 0.93 pA, 84 trazos, n=3 células **Figura 9E**). De estos casos, en una de estas células, teniendo las corrientes postsinápticas (condición control; **Figura 9E**), logramos perfundir en la solución de registro, el antagonista CNQX (10 μM) específico para receptores ionotrópicos de tipo AMPA, bloqueando la señal evocada por la foto-estimulación (promedio de la amplitud control 27.88 ± 1.9 pA, promedio de amplitud bloqueada 1.22 ± 0.7 pA, **Figura 9F, I**) y de manera importante, para corroborar el efecto del antagonista, recuperamos dicha señal al realizar un lavado (promedio de la amplitud recuperada 16.55 ± 0.86 , **Figura 9G, I**). Estos resultados muestran que la activación selectiva de los axones del circuito ATV→CPF son capaces de evocar corrientes postsinápticas excitatorias sensibles al antagonista de receptores a glutamato y, que dicho bloqueo de la señal no fue consecuencia de una

pérdida de la señal coincidente con la perfusión del antagonista, ya que se pudieron lavar dichos efectos cuando se quitó el antagonista.

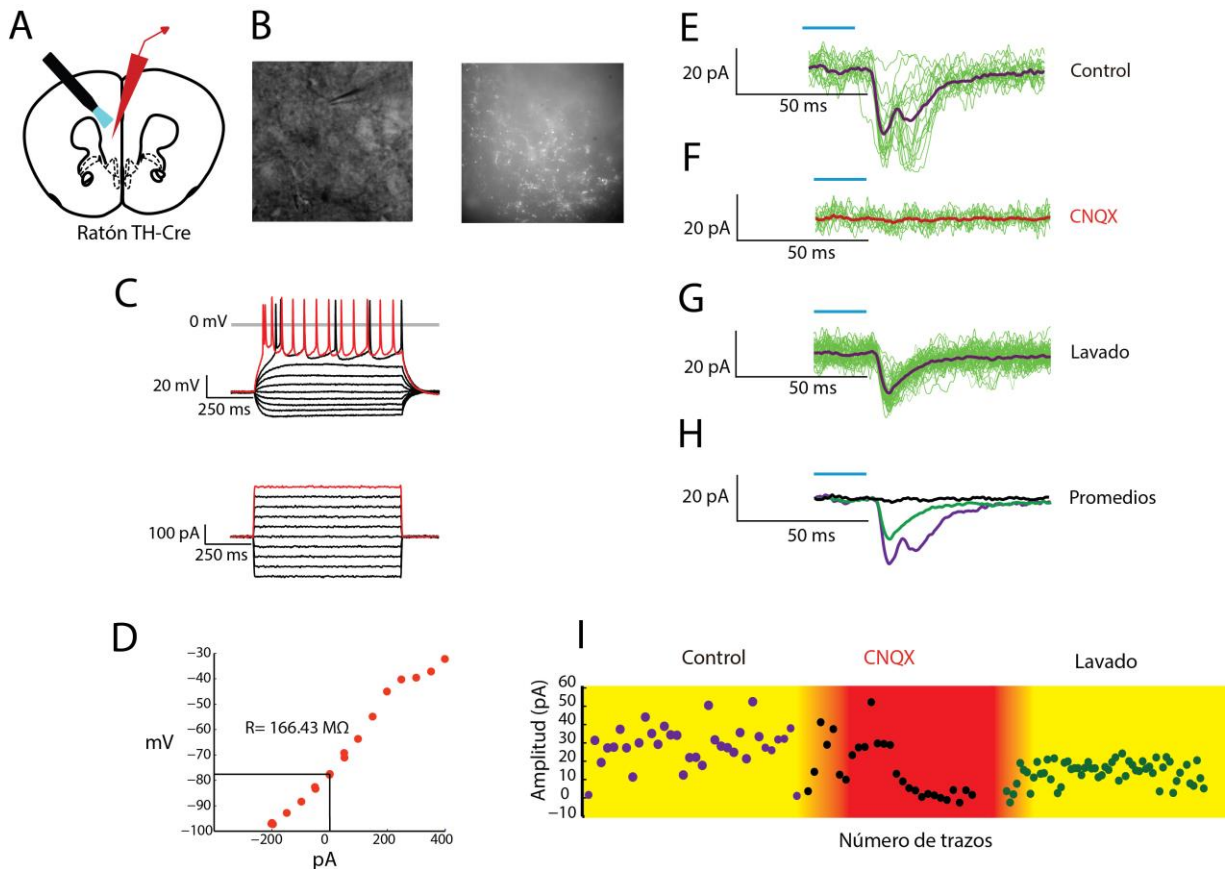


Figura 9. Corrientes postsinápticas evocadas en la corteza prefrontal por la activación optogenética de los axones dopaminérgicos provenientes del área tegmental ventral

(A, B) Representación gráfica de la zona de registro y fotomicrografía a 10X mostrando la micropipeta sobre la neurona registrada y la zona de registro que muestra la fluorescencia de los axones dopaminérgicos infectados con ChR2-eYFP. (C) Propiedades de disparo de una neurona cortical con la técnica de fijación de corriente. (D) Curva corriente-voltaje (IV), de la cual se calcula la resistencia de la neurona cortical mostrada en A. (E) Corriente postsináptica evocada por la estimulación optogenética con un pulso de luz de 20 ms a 473 nm de los axones dopaminérgicos provenientes del ATV en la CPF. (F) Bloqueo de la corriente postsináptica por el antagonista CNQX de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA. (G) Lavado y recuperación de la corriente postsináptica generada por la activación optogenética de axones dopaminérgicos provenientes del ATV en la CPF. (H) Promedios de las corrientes postsinápticas control (morado), el bloqueo por CNQX (negro), el lavado, recuperación de la señal (verde). (I) Cinética del bloqueo por CNQX de las corrientes postsinápticas presentadas en E-H. Primero se observa la amplitud del pico de las corrientes postsinápticas generadas por la luz azul (control), seguidas de la perfusión del CNQX, y después el lavado para la recuperación de la señal.

8.5 El potencial de reversión de las corrientes postsinápticas evocadas por la activación optogenética de los axones provenientes del área tegmental ventral en la corteza prefrontal revierte cerca del potencial de reversión de corrientes postsinápticas mediadas por receptores glutamatérgicos.

Como alternativa para evaluar si las corrientes postsinápticas evocadas al activar los axones del ATV→CPF en efecto corresponden a la liberación de glutamato, proseguimos a evaluar el potencial de reversión de dichas corrientes postsinápticas. Para esto, realizamos registros como los descritos en la Figura 9, utilizando la técnica de fijación de voltaje. Una vez obtenidas las corrientes postsinápticas evocadas por estimulación optogenética, se varió manualmente el voltaje de mantenimiento de -70 mV a 0 mV y luego a +30 mV (**Figura 10C, D, E**) para calcular la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias evocadas (-70 mV= -15 ± 1.33 pA, 60 trazos; 0 mV= -4 ± 0.98 pA, 32 trazos; +30 mV= 18 ± 2.96 pA, 53 trazos). Con estas amplitudes construimos la curva corriente-voltaje realizando un ajuste lineal que cruza por los tres puntos. Observamos que el cruce del ajuste intercepta el eje del voltaje en -11 mV, valor cercano al potencial de reversión de receptores ionotrópicos de tipo glutamatérgico [**Figura 10B**; Burnashev et al., 1992 (-1.24 ± 1.82 mV); Koh et al., 1995 (-4 ± 2.6 mV); Otis et al., 1995 (-10.17 ± 5.68 mV); Noda et al., 2000 (-10 mV); Suzuki et al., 2008 (-4.32 ± 2.13 mV)].

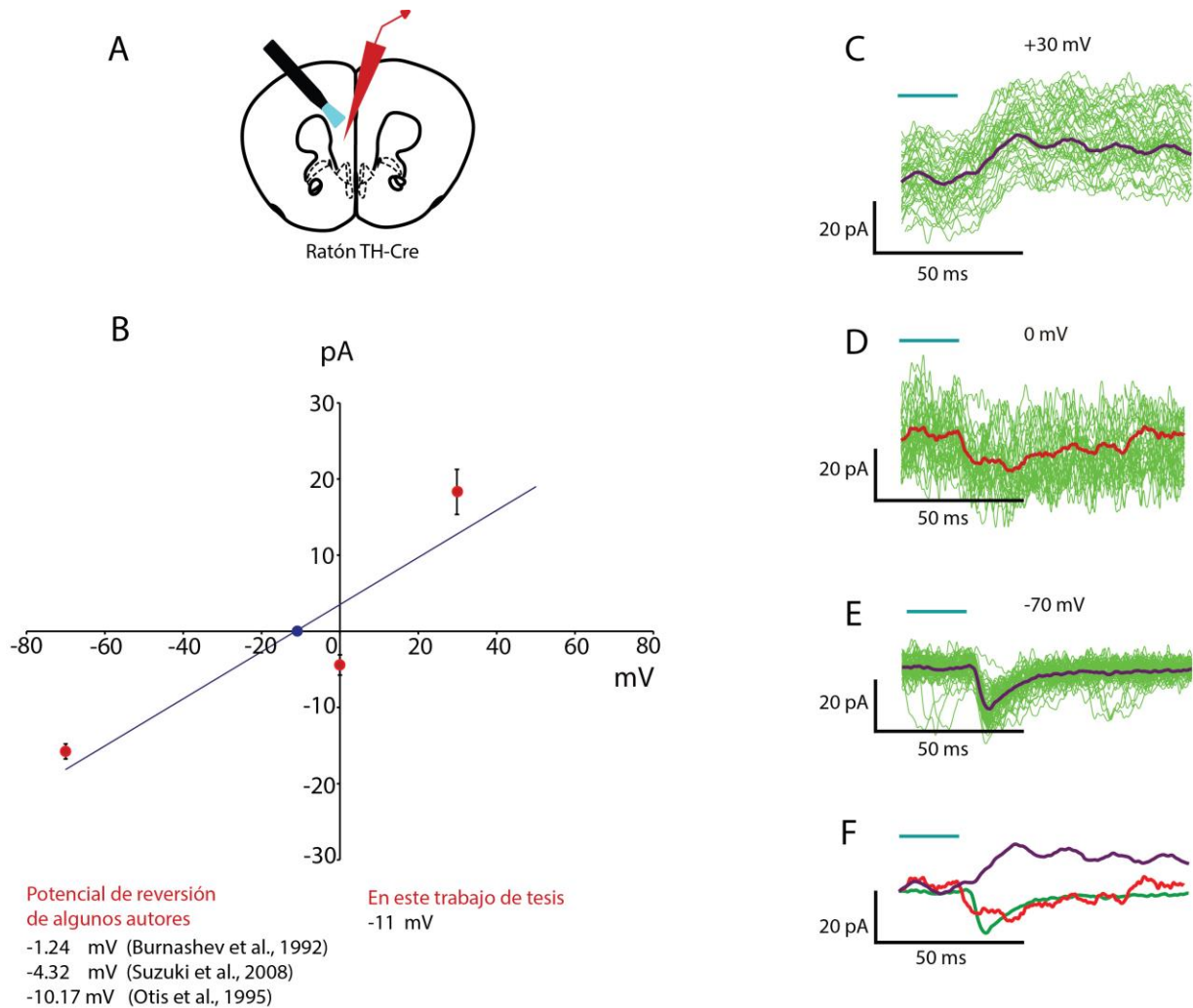


Figura 10. El potencial de reversión de las corrientes evocadas por estimulación optogenética de los axones del área tegmental ventral en la corteza prefrontal es similar al potencial de reversión de corrientes postsinápticas mediadas por receptores glutamatergicos.

(A) Representación gráfica de la zona de registro de la neurona cortical y estimulación optogenética para la evocación de potenciales postsinápticos excitatorios.

(B) Datos experimentales y ajuste lineal de los mismos, para evaluar el potencial de reversión de las corrientes postsinápticas mostradas en C-F.

(C, D, E) Variación del voltaje de mantenimiento de la neurona registrada que demuestra la reversión en la dirección de las corrientes postsinápticas en -11 mV. Las corrientes son evocadas por un pulso de luz azul representado por la barra azul encima de cada panel.

(F) Promedio de las corrientes postsinápticas presentadas en C-E.

8.6 El circuito ATV→CPF es necesario para la apropiada iniciación de secuencias de acciones.

Los datos de los experimentos *ex vivo*, nos hicieron suponer que el circuito $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ tuviese una funcionalidad a nivel conductual, por lo tanto, para poner a prueba la participación de este circuito en animales *in vivo*, decidimos evaluar la participación del mismo en ratones adultos TH-Cre, mientras iniciaban/realizaban secuencias de acciones (ver **Figura 11**), conducta que ha sido estrechamente vinculada al apropiado funcionamiento de la CPF (Fujii y Graybel, 2003; Shima et al., 2007). Dentro de las funciones atribuidas a la CPF, se encuentra el establecimiento del inicio y terminación de secuencias de acciones (Fujii y Graybel, 2003), así como el de contener actividad preparatoria para la realización de secuencias de movimientos (Shima et al., 2007). Por lo tanto, en la presente tesis decidimos realizar un experimento de pérdida de la función para preguntarnos si los axones que conectan el ATV con la CPF, son requeridos para la apropiada iniciación de secuencias de acciones. Para este fin, infectamos ratones TH-Cre para expresar la opsina inhibitoria de actividad neuronal: Arch3.0-eYFP (esta opsina es una bomba de protones que al ser foto-estimulada a 568 nm cambia de conformación proteica, permitiendo la salida de protones al exterior de la célula, y por ende, hiperpolarizando el potencial de membrana) y de esta manera bloquear/disminuir la funcionalidad de dichos axones en dos diferentes ventanas temporales de la iniciación/realización de secuencias de acciones. Para realizar este experimento, utilizamos a los ratones hembras y machos TH-Cre de ocho semanas de edad previamente infectados en el ATV con Arch3.0-eYFP o sólo la proteína reportera eYFP (como experimentos control), con fibras ópticas implantadas en la CPF (**Figura 11B, C**). Primero, estudiamos la iniciación de secuencias de acciones (**Figura 11D**), midiendo la latencia promedio que los animales tomaban para iniciar una secuencia de acciones (donde la acción es presionar una palanca), y diseñamos el experimento para que en la mitad de ensayos donde los animales iniciaban secuencias de acciones, éstos debían cruzar por un sensor infrarrojo para foto-estimular a los axones dopaminérgicos que inervan a la CPF antes de iniciar una secuencia de acciones (**Figura 11E**). Con este

experimento, observamos que la inhibición de los axones del ATV en la CPF retrasaron la iniciación de secuencias de acciones (latencia para iniciar una secuencia de acciones del grupo que recibió inhibición optogenética $ATV_{axones/Arch3.0-eYFP} \rightarrow CPF = 10 \pm 1$ segundos, $n=6$, *versus* latencia para iniciar una secuencia de acciones del grupo control, $ATV_{axones/eYFP} \rightarrow CPF = 4 \pm 1$ segundos, $n=3$; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis). Este efecto, se observó sin afectar el número promedio de presiones durante los ensayos sin inhibición *versus* los ensayos con inhibición ($ATV_{axones/Arch3.0-eYFP} \rightarrow CPF = 5 \pm 0.6$ presiones, $n=6$, *versus* $ATV_{axones/eYFP} \rightarrow CPF = 6 \pm 0.6$ presiones, $n=3$; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis; **Figura 11F**).

Adicionalmente, como experimento control de la temporalidad de la manipulación optogenética, también estudiamos qué es lo que sucedía si se inhibían a los axones del $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ durante la realización de secuencias de acciones (**Figura 11G, H, I**). Cuando inhibimos a los axones una vez que la secuencia de acciones ya había iniciado (esto es durante la primera presión de la secuencia de acciones), observamos que en este caso la latencia del grupo experimental no fue diferente de la latencia del grupo control ($ATV_{axones/Arch3.0-eYFP} \rightarrow CPF = 2 \pm 0.58$ segundos, $n=6$, *versus* $ATV_{axones/eYFP} \rightarrow CPF = 1.1 \pm 0.3$ segundos, $n=3$; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis; **Figura 11H**) observando también, que el número de presiones no cambió en presencia de la inhibición optogenética ($ATV_{axones/Arch3.0-eYFP} \rightarrow CPF = 5.56 \pm 0.70$ presiones, $n=6$, $ATV_{axones/eYFP} \rightarrow CPF = 4.91 \pm 1.35$ presiones, $n=3$; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis; **Figura 11**).

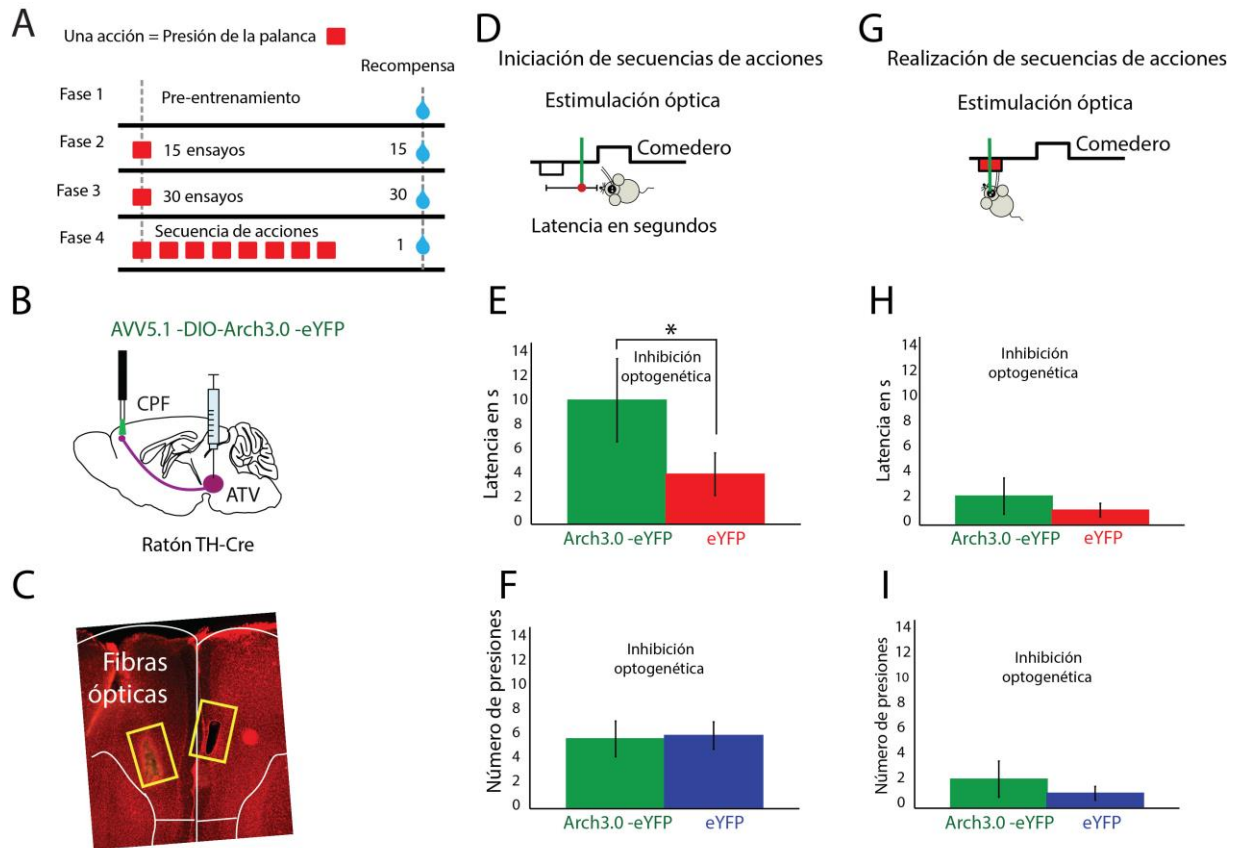


Figura 11. El circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ es necesario para la apropiada iniciación de secuencias de acciones.

- (A) Representación gráfica de la tarea de condicionamiento operante en la iniciación y realización de secuencias de acciones, fases representan etapas de entrenamiento.
- (B) Representación gráfica del sitio de infección con AVV5.1-DIO-Arch3.0-eYFP en el área tegmental ventral e implantación de fibras ópticas en corteza prefrontal.
- (C) Microfotografía tomada a 10X en la corteza prefrontal de un animal después de haber concluido la fase 4 de experimentación, mostrando las marcas en donde estuvieron implantadas las fibras.
- (D) Representación gráfica de la inhibición optogenética durante la iniciación de secuencias de acciones, esto es cuando el animal cruza el sensor infrarrojo entre el comedero y la palanca.
- (E) Latencia para el inicio de secuencias de acciones, cuando se inhibe al circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ y su experimento control.
- (F) Número de presiones durante la inhibición optogenética como se describe en D.
- (G) Inhibición optogenética durante la realización de secuencias de acciones, en este caso la inhibición empieza sólo después de que el animal haya iniciado la secuencia de presiones, es decir, la primera presión de la secuencia activa la inhibición optogenética.
- (H, I) Latencia y número de presiones respectivamente, durante la inhibición optogenética como se describe en G.

8.7 Inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ en la prueba de campo abierto para evaluar el efecto de la inhibición de este circuito sobre la movilidad horizontal.

Para evaluar si el incremento en la latencia al iniciar secuencias de acciones durante la inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ es debido a un decremento general en la locomoción de los animales, realizamos la misma inhibición optogenética de este circuito en la prueba de campo abierto a los mismos animales presentados en los datos de la **Figura 11 (Figura 12)**. Realizamos un análisis de vídeo que nos permite seguir el centro de masa de cada animal (**Figura 12A**), calculando las coordenadas en X y Y a lo largo tiempo. Siguiendo este procedimiento, presentamos la inhibición optogenética por 5 segundos (igual que las manipulaciones optogenéticas durante el inicio secuencias de acciones), una vez cada minuto, por 10 ensayos (**Figura 12B**). De este análisis, obtuvimos la distancia que el animal recorría antes y durante la inhibición optogenética, dichos ensayos fueron alineados al momento de la inhibición optogenética para ambos grupos (el grupo transfectado con Arch3.0-eYFP, **Figura 12C**; y el grupo control transfectado solo con eYFP, **Figura 12D**). De estos experimentos, observamos que la inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$, disminuye el movimiento horizontal de los animales con inhibición optogenética de manera transitoria (hasta por 2 segundos), mientras que en el grupo control, la actividad motora no tuvo cambios ($n=5$; $p<0.05$, Kruskal-Wallis). Juntos, estos datos sugieren que la inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ en la prueba de campo abierto decrementa transitoriamente la distancia recorrida de los animales.

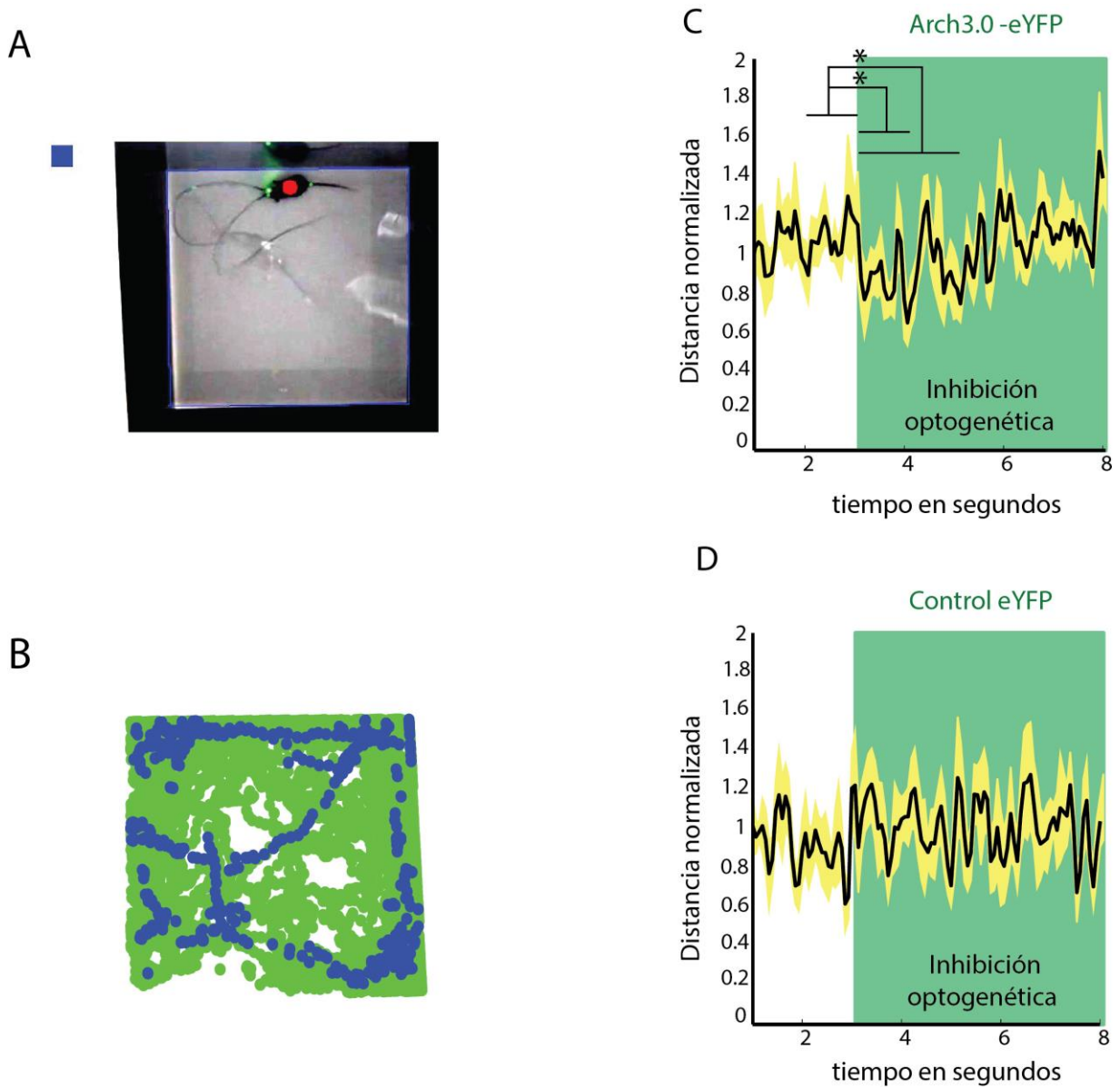


Figura 12. Inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ durante la prueba de campo abierto.

(A) Vista superior de un animal caminando y recibiendo inhibición optogenética en el campo abierto.
 (B) Cada punto representa la posición del animal por *frame* a lo largo de 10 minutos.
 (C y D) Distancia normalizada en la prueba de campo abierto durante la inhibición del circuito $ATV_{axones} \rightarrow CPF$ (C) y su respectivo grupo control (D).

9. DISCUSIÓN

A pesar de que existe una amplia documentación mostrando la proyección de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral a la corteza prefrontal (ATV→CPF) y al *núcleo accumbens* (ATV→NAcc) (Lammel et al., 2012; Kabanova et al., 2015), pocos trabajos se han enfocado en identificar si estas terminales son capaces de liberar glutamato en la CPF (Lavin et al., 2005; Yamaguchi et al., 2011; Kabanova et al., 2015; Mingote et al., 2015). En el 2005, Lavin y cols. reportaron que la estimulación eléctrica del ATV en ratas era capaz de evocar potenciales postsinápticos en la CPF, observando que estos potenciales desaparecían cuando eliminaban a las neuronas dopaminérgicas del ATV, sugiriendo que dicha despolarización podría ser debida a la liberación de glutamato por parte de las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas del ATV a la CPF. En el 2011, Yamaguchi y cols. utilizaron marcadores retrógrados que fueron inyectados en la CPF e hibridación *in situ* en cortes de cerebro de rata, identificando una población de neuronas del ATV que co-expresa el transportador vesicular de glutamato de tipo 2 y la tirosina hidroxilasa, y sugiriendo que el 27% de las neuronas dopaminérgicas del ATV, podrían co-liberar dopamina y glutamato en la CPF. Sin embargo, esta hipótesis sólo fue validada hasta el 2015. En este año, Kabanova y cols. demostraron que una población específica de neuronas dopaminérgicas del ATV medial libera glutamato en la CPF, importante para esta tesis, ya que estos autores describen que la liberación de glutamato sucedía exclusivamente sobre interneuronas GABAérgicas de la CPF, postulando el sub-circuito $ATV \rightarrow CPF_{\text{Interneuronas GABAérgicas}} \rightarrow CPF_{\text{Neuronas piramidales}}$, y sugiriendo que este sub-circuito controla la inhibición sobre las neuronas piramidales de proyección. El trabajo de Kabanova y cols. (2015) pareció establecer la funcionalidad de la co-liberación dopamina-glutamato en la CPF, sin embargo el mismo año Mingote y cols. reportaron que dicha co-liberación era inexistente en la CPF (Mingote et al., 2015). En este contexto, nuestros hallazgos toman relevancia debido a que, además de identificar la liberación de glutamato por parte de los axones dopaminérgicos del ATV en la CPF, también identificamos que dicha proyección conecta, no sólo con las interneuronas GABAérgicas de la CPF, sino

también con las neuronas piramidales, controlando directamente su excitabilidad (**Figura 9**). Las diferencias en los resultados de los trabajos publicados y este trabajo de tesis se podrían explicar por la diferencia en estrategias experimentales. Kabanova y cols. (2015) utilizaron una estrategia para eliminar una población específica de neuronas del ATV (bloqueando durante el desarrollo la señalización de Sonic Hedgehog), argumentando que esta población de neuronas, es la que proyecta a la CPF y libera glutamato. Por otro lado, Mingote y cols. (2015) utilizaron un ratón transgénico que expresa la Cre recombinasa en función del promotor para la expresión de transportador vesicular de dopamina. Nosotros en este trabajo de tesis, utilizamos un ratón transgénico que expresa la Cre recombinasa en función del promotor para la expresión de la tirosina hidroxilasa (enzima necesaria para la síntesis de dopamina). Las diferencias en el uso de animales transgénicos para demostrar la co-liberación, podría explicar el que Kabanova y cols. (2015) y nosotros, sí hayamos encontrado la liberación de glutamato por parte de los axones dopaminérgicos en la CPF, mientras que Mingote y cols. (2015) no la encontraron. Un argumento a favor de Mingote y cols. (2015), es que la línea de ratones transgénicos que ellos utilizaron es más específica que la línea que nosotros utilizamos. Recientemente, se reportó que ratones transgénicos que expresan la Cre recombinasa en función del promotor para la enzima tirosina hidroxilasa, pueden expresar la Cre recombinasa en neuronas que no sintetizan la tirosina hidroxilasa en edad adulta (Lammel et al., 2015). Para evaluar si este era el caso en la línea de ratones transgénicos que nosotros utilizamos en esta tesis (línea F112 TH-Cre), evaluamos por medio de inmunofluorescencia, si nuestra línea expresaba las opsinas utilizadas en neuronas que no presentaran marca para la tirosina hidroxilasa (**Figura 6**). Esta medición de colocalización opsina-tirosina hidroxilasa, nos reportó un 98% de colocalización, haciendo muy poco probable que la línea de ratones transgénicos que nosotros utilizamos sea inespecífica. Por otro lado, a diferencia del trabajo de Kabanova y cols. (2015), una de las aportaciones de este trabajo, es el hecho que nosotros identificamos que la liberación de glutamato también sucede sobre las neuronas piramidales de la CPF y no sólo sobre las interneuronas de la CPF como lo han descrito con base en sus resultados publicados.

¿Para qué sirve que los axones dopaminérgicos sean capaces de liberar glutamato?

Mediante experimentos de electrofisiología y optogenética *in vitro*, este trabajo de tesis muestra que los axones dopaminérgicos del ATV son capaces de liberar glutamato en la CPF (**Figura 9**). Sin embargo, la funcionalidad de este transmisor (glutamato) *in vivo* aún no es clara. Actualmente, la hipótesis más aceptada, es que el glutamato liberado por neuronas dopaminérgicas mantiene la sobrevivencia y establecimiento de las vías dopaminérgicas a lo largo del neurodesarrollo, y en la edad adulta contribuye al control motor.

Como se ha mencionado en esta tesis, el transportador vesicular de glutamato de tipo 2 es un marcador celular específico de neuronas glutamatérgicas que se expresa en regiones dopaminérgicas del cerebro medio (Bourque y Trudeau, 2000., Dal Bo et al., 2004., Chuhma et al., 2004, 2009). Hay estudios que reportan una alta expresión del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 en el mesencéfalo ventral de embriones de ratón de 12 y 14 días postnatales (Dal Bo et al., 2008; Birgner et al., 2010). Además, se ha documentado la expresión embrionaria y perinatal del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Dal Bo et al., 2008; Méndez et al., 2008; Birgner et al., 2010). Considerando estos reportes y la demostración de que el glutamato puede regular positivamente el crecimiento y ramificación de neuronas dopaminérgicas (Schmitz et al., 2013), la hipótesis más plausible, es que una de las funciones del glutamato liberado por neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, sea la de promover el crecimiento y la conectividad de estas neuronas durante el desarrollo (Koos et al., 2011). En concreto, un trabajo del 2009 indica que la delección del gen para la expresión del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 en neuronas dopaminérgicas causa alteraciones morfológicas y funcionales que son compatibles con el reducido desarrollo axonal (Bérubé-Carrière et al., 2009) y además, estos ratones muestran un número reducido de neuronas tirosina hidroxilasa positivas en el ATV, con una densidad disminuida de axones terminales positivos a la marca de la tirosina hidroxilasa en el NAcc (Fortin et al., 2012). Igualmente, en cultivos de

neuronas dopaminérgicas de estos ratones knockout para el transportador vesicular de glutamato de tipo 2, se mostró una reducción en el crecimiento axonal (Fortin et al., 2012), compatible con la posibilidad de que la liberación de glutamato contribuya al crecimiento de estas neuronas. Sin embargo, se requiere de trabajo adicional para determinar si la liberación de glutamato induce el crecimiento a través de la auto-activación de los receptores de la misma o por medio de la activación de receptores de glutamato en las células diana. Estudios electrofisiológicos han mostrado que la estimulación eléctrica del ATV induce corrientes postsinápticas excitatorias en las neuronas espinosas del NAcc (Chuhma et al., 2009) y en neuronas de la CPF (Lavin et al., 2005). La misma estimulación eléctrica en ratones knockout al transportador vesicular de glutamato tipo 2, redujo la evocación de potenciales de acción provocados en el NAcc (Hnasko et al., 2010; Fortin et al., 2012). Esta disminución en los potenciales evocados podría resultar de la reducción del número de neuronas dopaminérgicas y reducción del crecimiento axonal.

Funcionalidad de la liberación de glutamato de los axones dopaminérgicos del área tegmental ventral en la corteza prefrontal sobre el control motor.

La funcionalidad del glutamato en el sub-circuito VTA→CPF sobre el control motor, se ha estudiado a partir de la delección específica del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 en las neuronas dopaminérgicas, observando que en dichos animales se presentan déficits específicos en pruebas que evalúan la motricidad. 1) Cuando estos animales fueron evaluados en un ambiente novedoso, se observó que su desplazamiento horizontal decreció hasta en el 30% (Fortin et al., 2012). Sin embargo, en este mismo trabajo, cuando se midieron secuencias de movimiento, no observaron que disminuyera la locomoción general, ni la cantidad de veces que el animal presentaba una posición vertical sobre sus dos patas traseras. En el mismo trabajo, se evaluó si dichos animales mostraban déficits crudos de control motor y coordinación, utilizando la prueba del cilindro giratorio, observando que los animales knockout al transportador vesicular de glutamato de tipo 2 se caen más rápido del cilindro giratorio en comparación con animales control. Los mismos ratones knockout fueron expuestos a pruebas de nado forzado por varios ensayos, mostrando una

disminución en la latencia a quedar inmóviles en el primer ensayo, argumentando que podrían presentar una menor motivación a escapar de la prueba de nado forzado (Bigner et al., 2010, Fortin et al., 2012). En nuestro caso el análisis de locomoción general (prueba de campo abierto; **Figura 12**), mostró que la inhibición optogenética del circuito $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$, decremento la distancia recorrida, lo cual, podría argumentar un decremento general en la locomoción, pero la posibilidad de que esto sea efecto de un decremento en la motivación para moverse no queda descartada.

Necesidad de circuito $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ para la apropiada iniciación de secuencias de acciones

Dado que no existe un animal transgénico que nos permita eliminar el transportador vesicular de glutamato de tipo 2 únicamente en las neuronas dopaminérgicas que proyectan a la CPF, en la presente tesis nos centramos en evaluar la participación del circuito $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ en una conducta asociada al funcionamiento apropiado de la CPF. Debido a que la CPF ha sido implicada en la iniciación/selección y terminación de secuencias de acciones (Fujii y Graybel, 2003), en la presente tesis decidimos inhibir con una alta resolución temporal a los axones del ATV en dos periodos de tiempo específicos, mientras los animales iniciaban o realizaban una secuencia de acciones (**Figura 11**). De este experimento concluimos que la apropiada funcionalidad del circuito $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ es necesaria para poder iniciar apropiadamente una secuencia de acciones. Esta conclusión se sustenta en que, la inhibición optogenética de los axones del $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ específicamente durante la iniciación, incrementa la latencia para iniciar una secuencia de acciones (**Figura 11E**). Dicho efecto, es específico sobre la iniciación, porque la misma manipulación optogenética no afectó el número de presiones dentro de las secuencias realizadas (**Figura 11F**), ni tampoco afectó la iniciación cuando la inhibición optogenética de estos axones se realizó en una ventana temporal distinta (no hubo un efecto sobre la iniciación cuando se inhibieron los axones del circuito $ATV_{\text{dopamina-glutamato}} \rightarrow CPF$ una vez que la secuencia de acciones ya había iniciado; **Figura 11H-I**). Por lo tanto, el presente trabajo además de demostrar la liberación de glutamato por parte de los axones del circuito $ATV \rightarrow CPF$, también demuestra que el circuito $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ es necesario para la apropiada iniciación de secuencias de acciones. Una posibilidad

para explicar estos resultados, es que esta conexión $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ este definiendo cuando empezar apropiadamente una secuencia de acciones (Jin y Costa, 2015) y la inhibición de esta conexión, bloquea la apropiada iniciación. Esta idea es consistente con lo que observamos en la prueba de campo abierto (**Figura 12**) demostrando que el circuito $ATV_{\text{axones}} \rightarrow CPF$ está estrechamente vinculado al control de motor en general, pero que bajo ciertas demandas sólo participa durante la iniciación y no durante la realización de una secuencia de acciones.

10. CONCLUSIÓN

Los experimentos mostrados en esta tesis, demuestran que los axones dopaminérgicos del circuito $ATV \rightarrow CPF$, son capaces de liberar glutamato, y que el apropiado funcionamiento de esta sinapsis es necesaria para la iniciación de secuencias de acciones. Dichas conclusiones son importantes para la interpretación de la función del circuito $ATV \rightarrow CPF$ y su participación en la iniciación de secuencias de acciones.

REFERENCIAS

- Bargas J y Galarraga E (2009) *Biología Funcional de los animales II*. Capítulo 3. Transmisión sináptica, Ed. Siglo XXI Editores, México, D.F. Págs.100-110
- Bérube-Carrière, N., Guay, G., Fortin, G.M., Kullander, K., Olson, L., Wallén-Mackenzie, A., Trudeau, L.E., Descarries, L., 2012. Ultrastructural characterization of the mesostriatal dopamine innervation in mice, including two mouse lines of conditional VGLUT2 knockout in dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.* 35, 527–538.
- Birgner C, Nordenankar K, Lundblad M, Mendez JA, Smith C, Le Grevès M, Galter D, Olson L, Fredriksson L, Trudeau LE, Kullander K y Wallén-Mackenzie (2010) VGLUT2 In Dopamine Neurons Is Required For Psychostimulant-Induced Behavioral Activation. *PNAS*, vol 107, 389-394.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, Genetically-targeted Optical Control Of Neural Activity, *Nature Neuroscience* 8(9):1263-1268.
- Bourque M-H y Trudeau LE (2000) GDNF Enhances The Synaptic Efficacy Of Dopaminergic Neurons In Culture. *Eur J Neurosci* 12:3172-3180.
- Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg P.H. y Sakmann B. (1992) Divalent Ion Permeability of AMPA Receptor Channels Is Dominated by the Edited Form a Single Subunit. *Neuron*, Vol.8, 189-198.
- Burnstock G: Do Some Nerve Cells Release More Than One Transmitter? *Neuroscience* 1976, 1:239-248.
- Cao, J.L., Covington 3rd, H.E., Friedman, A.K., Wilkinson, M.B., Walsh, J.J., Cooper, D.C., Nestler, E.J., Han, M.H., 2010. Mesolimbic Dopamine Neurons In The Brain Reward Circuit Mediate Susceptibility To Social Defeat And Antidepressant Action. *J. Neurosci.* 30, 16453e16458.
- Chaudhury, D. et al. Rapid Regulation Of Depression-related Behaviours By Control Of Midbrain Dopamine Neurons. *Nature* 493, 532–536 (2013).
- Chuhma N, Zhang H, Masson J, Zhuang X, Sulzer D, Hen R y Rayport S (2004) Dopamine Neurons Mediate A Fast Excitatory Signal Via Their Glutamatergic Synapses. *J. Neurosci.* 24(4):972–981.
- Chuhma N, Choi WY, Mingote S y Rayport S (2009) Dopamine Neuron Glutamate Cotransmission Frequency-Dependent Modulation In The Mesoventromedial Projection. *Neurosci* 164, 1068–1083.

- Dal Bo G, St-Gelais F, Danik M, Williams S, Cotton M y Trudeau LE (2004) Dopamine Neurons In Culture Express VGluT2 Explaining Their Capacity To Release Glutamate At Synapses In Addition To Dopamine. *J. Neurochem* 88, 1398–1405.
- Dal Bo G., Bérubé-Carrière N., Méndez J.A., Leo D., Riad M., Descarries L., Lévesque D. y Trudeau, L.E. (2008) Enhanced Glutamatergic Phenotype Of Mesencephalic Dopamine Neurons After Neonatal 6-Hydroxydopamine Lesion. *Neuroscience* 156, 59–70.
- De Bruin J.P., Feenstra M.G.P., Broersen L.M., Van Leeuwen M., Arens C., De Vries S. y Joosten R.N. (2000) Role Of The Prefrontal Cortex Of The Rat In Learning And Decision Making: Effects Of Transient Inactivation. *Progress in Brain Research*, Vol 125, 103-113.
- Dezfouli A y Balleine B.W. (2012) Habits, Action Sequences, And Reinforcement Learning. *Eur J Neurosci*; 35(7): 1036–1051.
- Dowdall M.J., Boyne A.F. y Whittaker V.P. (1974) Adenosine Triphosphate A Constituent Of Cholinergic Synaptic Vesicles. *J. Biochem.* 140,1-12.
- Ford, C.P., Mark, G.P., Williams, J.T., 2006. Properties And Opioid Inhibition Of Mesolimbic Dopamine Neurons Vary According To Target Location. *J. Neurosci.* 26, 2788e2797.
- Fortin GM, Bourque MJ, Mendez JA, Leo D, Nordenankar K, Birgner C, Arvidsson E, Rymar VV, Bérubé-Carrière N, Claveau AM, Descarries L, Sadikot AF, Wallén-Mackenzie A y Trudeau LE (2012) Glutamate Corelease Promotes Growth And Survival Of Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* 32(48):17477–17491.
- Fried G., Terenius L., Brodin E., Efendic S., Dockray G., Fahrenkrug J., Goldstein M. y Hokfelt T. (1986). Neuropeptide Y, Enkephalin And Noradrenaline Coexist In Sympathetic Neurons Innervating The Bovine Spleen. *Biochemical and Immunohistochemical Evidence. Cell Tissue Res.*, 243, 495-508.
- Fujii N y Graybiel AM (2003) Representation Of Actions Sequence Boundaries By Macaque Prefrontal Cortical Neurons. *Science* 301, 1246.
- Fukuda M, Edwards C y Eidelberg D (2001) Functional Brain Networks In Parkinson's Disease. *Parkinsonism And Related Disorders* 8, 91-94.

- Grace AA (1991) Phasic Versus Tonic Dopamine Release And The Modulation Of Dopamine System Responsivity: A Hypothesis For The Etiology Of Schizophrenia. *Neurosci* Vol. 41, N°1, pp. 1-24.
- Gutiérrez R, Romo-Parra H, Maqueda J, Vivar C, Ramírez M, Morales MA y Lamas M (2003) Plasticity Of The GABAergic Phenotype Of The “Glutamatergic” Granule Cells Of The Rat Dentate Gyrus. *J. Neurosci*, 23(13):5594 –5598.
- Hnasko TS, Chuhma N, Zhang H, Goh GY, Sulzer D, Palmiter RD, Rayport S y Edwards RH (2010) Vesicular Glutamate Transport Promotes Dopamine Storage And Glutamate Corelease In Vivo. *Neuron* 65, 643–656.
- Hur EE y Zaborszky L (2005) Vglut2 Afferents To The Medial Prefrontal And Primary Somatosensory Cortices: A Combined Retrograde Tracing In Situ Hybridization. *J Compar Neurol* 483:351–373.
- Jin X y Costa R.M. (2010) Start/stop Signals Emerge In Nigrostriatal Circuits During Sequence Learning. *Nature* 466, 457–462.
- Jin X, Costa RM (2015) Shaping Action Sequences In Basal Ganglia Circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 33 , 188–196.
- Jo Y-W y Role L.W. (2002) Cholinergic Modulation Of Purinergic And GABAergic Co-Transmission at In Vitro Hypothalamic Synapses. *J. Neurophysiol* 88: 2501–2508.
- Jonas P, Bischofberger J y Sandkühler (1998) Corelease Of Two Fast Neurotransmitters At A Central Synapse. *Science*. 281(5375):419-24.
- Joyce MP y Rayport S (2000) Mesoaccumbens Dopamine Neuron Synapses Reconstructed In Vitro Are Glutamatergic. *Neurosc*, Vol. 99, No. 3, 445–456.
- Kabanova A, Pabst M, Lorkowski M, Braganza O, Boehlen A, Nikbakht N, Pothmann L, Vaswani A. R., Musgrove R, Di Monte D.A., Sauvage M, Beck H y Blaess S. (2015) Function And Developmental Origin Of A Mesocortical Inhibitory Circuit. *Nature Neurosc.*
- Kaneko T, Akiyama H, Nagatsu I, Mizuno N (1990) Immunohistochemical Demonstration Of Glutaminase In Catecholaminergic And Serotonergic Neurons Of Rat Brain. *Brai Res* 507:151–154.
- Kawano M, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H y Hisano S (2006) Particular Subpopulations Of Midbrain And Hypothalamic

Dopamine Neurons Express Vesicular Glutamate Transporter 2 In The Rat Brain. *J Compar Neurol* 498:581–592.

- Krishnan V., Han M.H., Graham D.L., Berton O., Renthal W., Russo S.J., Laplant Q., Graham A., Lutter M., Lagace D.C., Ghose S., Reister R., Tannous P., Green T.A., Neve R.L., Chakravarty S., Kumar A., Eisch A.J., Self D.W., Lee F.S., Tamminga C.A., Cooper D.C., Gershenfeld H.K. y Nestler, E.J. (2007) Molecular Adaptations Underlying Susceptibility And Resistance To Social Defeat In Brain Reward Regions. *Cell* 131, 391e404.
- Koh, D.S, Geiger J.R.P., Jonas, P. y Sakmann, B. (1995) Ca⁺²-permeable AMPA and NMDA Receptor Channels In Basket Cells of Rat Hippocampal Dentate Gyrus. *J Physiology*, 485, 282-402.
- Koos, T., Tecuapetla, F., Tepper, J.M., 2011. Glutamatergic Signaling By Midbrain Dopaminergic Neurons: Recent Insights From Optogenetic, Molecular And Behavioral Studies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 393–401.
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K y Malenka RC (2012) Input-specific Control Of Reward And Aversion In The Ventral Tegmental Area. *Nat*, vol 491.
- Lammel S, Steinberg EE, Földy C, Wall NR, Beier K, Luo L, Malenka RC (2015) Diversity of transgenic mouse models for selective targeting of midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 85, 429-438.
- Lapid MD, Morilak DA. 2006. Noradrenergic Modulation Of Cognitive Function In Rat Medial Prefrontal Cortex As Measured By Attentional Set Shifting Capability. *Neuroscience* 137:1039–1049.
- Lavin A, Nogueira L, Lapish CC, Wightman RM, Phillips PE y Seamans JK (2005) Mesocortical Dopamine Neurons Operate In Distinct Temporal Domains Using Multimodal Signaling. *J Neurosci.* 25: 5013-5023.
- Lee S, Kim K y Zhou ZJ (2010) Role Of ACh-GABA Cotransmission In Detecting Image Motion And Motion Direction. *Neuron*, 68(6): 1159–1172.
- Li X., Qi J., Yamaguchi T., Wang H.L. y Morales, M. (2013) Heterogeneous Composition Of Dopamine Neurons Of The Rat A10 Region: Molecular Evidence For Diverse Signaling Properties. *Brain Struct. Funct.* 218, 1159–1176.
- Margolis E.B., Lock H., Hjelmstad G.O., y Fields H.L. (2006) The Ventral Tegmental Area Revisited: Is There An Electrophysiological Marker For Dopaminergic Neurons? *J. Physiol.* 577, 907–924.

- Mingote S, De Bruin J.P. y Feenstra M.G. (2004). Noradrenaline And Dopamine Efflux In The Prefrontal Cortex In Relation To Appetitive Classical Conditioning. *J. Neurosci.* 24, 2475–2480.
- Mingote S, Chuhma N, Kusnoor SV, Field B, Deutch AY, Rayport S. (2015) Functional Connectome Analysis of Dopamine Neuron Glutamatergic Connections in Forebrain Regions. *J. Neurosci.* 9;35 (49):16259-71.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(24):13940-5.
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological Estimates Of Dopaminergic, GABAergic And Glutamatergic Neurons In The Ventral Tegmental Area, Substantia Nigra And Retrорubral Field In The Rat. *Neuroscience*; 152(4):1024-31.
- Nelson A.J., Cooper M.T., Thur K.E., Marsden C.A. y Cassaday H.J. (2011) The Effect Of Catecholaminergic Depletion Within The Prelimbic And Infralimbic Medial Prefrontal Cortex On Recognition Memory For Recency, Location, And Objects. *Behav Neurosci* 125:396–403.
- Nestler E.J. y Carlezon W.A. (2006) The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit In Depression. *Biol. Psychiatry* 59, 1151e1159.
- Neuringer A. y Jensen G. (2010) Operant Variability And Voluntary Action. *Psychological review.* 2010; 117(3):972–93.
- Noda M, Nakanishi H, Nabekura J y Akaike N (2000) AMPA–Kainate Subtypes of Glutamate Receptor in Rat Cerebral Microglia. *Journal of Neuroscience*, 20(1):251–258.
- Oades, R.D., Halliday, G.M., 1987. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res.* 434, 117e165.
- Otis T.S., Raman, I.M. y Trussell, L.O. (1995) AMPA Receptors With High Ca²⁺ Permeability Mediate Synaptic Transmission In The Avian Auditory Parthway. *J Physiology* 482.2, 309-315.
- Paxinos, G y Franklin K.B.J (2001) *The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates.* Segunda Edición. Editorial Academic Press.

- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, DeLong MR y Obeso JA (2010) Goal-directed And Habitual Control In The Basal Ganglia: Implications For Parkinson's Disease. *Nat Rev Neurosci* 11(11): p. 760-72.
- Robbins T.W y Arnsten A.F. (2009) The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 267–287. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135535.
- Ross AE, Nguyen MD, Privman E, Venton BJ. (2014) Mechanical stimulation evokes rapid increases in extracellular adenosine concentration in the prefrontal cortex. *J Neurochem*; 130(1):50-60.
- Schultz, W (1998) Predictive Reward Signal Of Dopamine Neurons. *J Neurophysiol.* Vol. 80 n° 1, 1-27.
- Schmitz, Y., Castagna, C., Mrejeru, A., Lizardi-Ortiz, J.E., Klein, Z., Lindsley, C.W., Sulzer, D., 2013. Glycine Transporter-1 Inhibition Promotes Striatal Axon Sprouting Via NMDA Receptors In Dopamine neurons. *J. Neurosci.* 33, 16778–16789.
- Sesack SR y Carr DB (2002) Selective Prefrontal Cortex Inputs To Dopamine Cells: Implications For Schizophrenia. *Physiology And Behavior* 77, 513–517.
- Shima K, Isoda M, Mushiake H y Tanji J (2007) Categorization Of Behavioural Sequences In The Prefrontal Cortex. *Nature*, Vol 445.
- Sparta D.R., Alice M Stamatakis A.M., Jana L Phillips J.L., Nanna Hovelso N., Ruud van Zessen R. y Stuber G.D. (2011) Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits. *Nature Methods*, Vol. 7, N°1, 12-23.
- Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH y Bonci A (2010) Dopaminergic Terminals In The Nucleus Accumbens But Not the Dorsal Striatum Corelease Glutamate. *J Neurosci* 30(24):8229–8233.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T y Rayport S (1998) Dopamine Neurons Make Glutamatergic Synapses In Vitro. *J Neurosci* 18(12):4588–4602.
- Suzuki T, Kodama S, Hoshino C, Izumi T y Miyakawa H (2008) A plateau potential mediated by the activation of extrasynaptic NMDA receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Europ J Neurosc*, Vol. 28, 521–534.

- Swanson L.W. (1982) The Projections Of The Ventral Tegmental Area And Adjacent Regions: A Combined Fluorescent Retrograde Tracer And Immunofluorescence Study In The Rat. *Brain Res. Bull.* 9, 321–353. doi:10.1016/0361-9230(82)90145-9.
- Tecuapetla F, Patel JC, Xenias H, English D, Tadros I, Shah F, Berlin J, Deisseroth K, Rice ME, Tepper JM y Koos TG (2010) Glutamatergic Signaling By Mesolimbic Dopamine Neurons In The Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 30(20):7105–7110.
- Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies G, Urakubo H, Ishii S y Kasai H (2014) A Critical Time Window For Dopamine Actions On The Structural Plasticity Of Dendritic Spines. *Science* 345, 1616.
- Yamaguchi T, Sheen W y Morales M (2007) Glutamatergic Neurons Are Present In The Rat Ventral Tegmental Area. *Eur J Neurosci* 25(1): 106–118.
- Yamaguchi T, Wang HL, Li X, Ng TL y Morales M (2011) Mesocorticolimbic Glutamatergic Pathway. *J. Neurosci.*, 31(23):8476–8490.
- Wickens, J (1993) *A Theory Of The Striatum*. 1a Edición. Editorial Pergamon Press. Pag 44.
- Zhang S, Qi J, Li X, Wang HL, Britt JP, Hoffman AF, Bonci A, Lupica CR y Morales M (2015) Dopaminergic And Glutamatergic Microdomains In A Subset Of Rodent Mesoaccumbens Axons. *Nature* (3):386-392.