



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Biología Experimental

**“Monitoreo de la actividad neuronal por medio de GECl en animales *in vivo*
durante la realización de secuencias de acciones.”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Carlos Iván Linares García

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Fernando Peña Ortega
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dra. Yazmín Ramiro Cortés
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

CD. MX.

MARZO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Biología Experimental

**“Monitoreo de la actividad neuronal por medio de GECl en animales *in vivo*
durante la realización de secuencias de acciones.”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Carlos Iván Linares García

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Fernando Peña Ortega
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dra. Yasmín Ramiro Cortés
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

MARZO, 2019



Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 14 de enero de 2019, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno, **LINARES GARCÍA CARLOS IVÁN** con número de cuenta **308501854** con la tesis "**Monitoreo de la actividad neuronal por medio de GECI en animales *in vivo* durante la realización de secuencias de acciones**", realizada bajo la dirección del **DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR**.

Presidente: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
Vocal: DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL
Secretario: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
Suplente: DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO
Suplente: DR. JOSÉ GERARDO ROJAS PILONI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de febrero de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos institucionales.

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad de formar parte del programa, que fomentaron mi crecimiento como persona y científico.

El desarrollo de este proyecto fue gracias al apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Ciencia Básica 220412, fronteras de la ciencia 2022 y Beca Nacional CONACyT para estudios de posgrado 620172. Así como los donativos por parte del programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT-DGAPA) IA200815 y IN226517.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar por la confianza, apoyo y asesoría para desarrollar este ambicioso proyecto. Gracias por fomentar mi crecimiento personal, académico y sobretodo profesional.

Al Comité tutor conformado por la Dra. Yazmín Ramiro Cortés y el Dr. Fernando Peña Ortega por su apoyo y asesoría durante el desarrollo del proyecto.

Agradecimientos a título personal:

A los miembros del jurado para la obtención del grado Dr. José Bargas Díaz, Dr. José Gerardo Rojas Piloni, Dra. Tatiana Fiordelicio Coll, Dr. Fernando Peña Ortega y al Dr. Pavel Ernesto rueda Orozco por sus observaciones y comentarios que contribuyeron al proyecto.

A la Dra. Yazmin Ramiro, por su apoyo incondicional al proyecto y hacia mi persona. Sin su apoyo, consejos académicos y personales la realización de este proyecto no habría sido posible.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquin por su asesoría en el mantenimiento y reproducción de las líneas de ratones transgénicos, y por su apoyo personal durante el desarrollo del proyecto.

A la M. en IBB Gabriela Xochitl Ayala Méndez, a la Biol. Ariadna Aparicio Juaréz, Dra. Claudia Rivera Cerecedo y al Dr. Héctor Malagón Rivero por su asesoría, apoyo, mantenimiento y reproducciones de los ratones transgénicos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

A mi padre por su apoyo constante en todos los aspectos de mi vida. Sin tu ayuda esto no habría sido posible gracias por enseñarme el camino. A mi madre por enseñarme a trabajar con ahínco y perseverancia; por enseñarme a vivir. A mi hermana Evelyn quien sin duda alguna sin ella y su constante apoyo no sería la persona en la que me he convertido. Gracias por acompañarme y ser el faro que mantiene mi viaje en bote seguro, feliz y sin tormentas. A Oscar por su incondicional apoyo en todo momento, por las risas y por enseñarme que se quiere a través de las acciones. A Javier por convertirte en un pilar más de mi vida, por el apoyo constante e incondicional, por ser mi cuñado y mi Shifu. A Mariela por sus buenos deseos siempre y por su enseñanza de querer seguir adelante.

A mis abuelos y a Zui, porque en el desarrollo de este trabajo me dieron una de las lecciones más fuertes que he vivido. Me enseñaron a vivir. Los llevo en mis acciones día a día.

A mi familia San German, Alex, Pancho, José, Alondra y a la Sra. Ana María, quien sin su apoyo todos estos años no habría conseguido esta meta. Gracias por considerarme parte de ustedes y por compartir tanto.

A mis amigos de la licenciatura Gaona, Yara, Valeria, Cristina, Charly, Eli, Armando, Maricela, Cisne y Ameyalli por compartir la pasión por la biología, por las risas y memorias juntos.

A la familia Cisneros por su apoyo durante mi carrera universitaria, gracias por creer en mí y apoyarme en un momento complicado de mi formación.

A mi familia Calmecac. Al shifu Miguel Angel, Dante Corona, Jorge Carrillo y Javier Velarde por su apoyo incondicional y por enseñarme a vivir a través de valores como el respeto, coraje, disciplina, generosidad, lealtad, honestidad, humildad y gratitud. A mis compañeros de clase por apoyarme y compartir tanto todo este tiempo. Valentina, Rodrigo, Mine, Julio, Tania, Sebastián, Paola, los Rocha, Arturo, Gerry, Lalo, Marco y Pablo Lozano. A todos.

A mis compañeros del laboratorio que se convirtieron en una gran familia. A Jose Luis por su constante apoyo, por las largas y múltiples platicas que tuvimos, por ser mi confidente y soporte durante este periodo. A Nisa por permitirme ser parte de tu vida y convertirte en una hermana más, gracias por las múltiples platicas y apoyo constante. A Carlitos por iniciar este proyecto juntos, compartir tanto y siempre estar al pendiente de mí. A Héctor por ser mi compañero de experimentos y aprender juntos sobre head-fix, imagenología de calcio y neurociencias. A kathia por su constante apoyo, por siempre creer y confiar en mis capacidades más allá de lo que yo creía. A Argelia por apoyarme y ser la hermana molestona que siempre lograba hacerme reír. A Edgar por siempre hacerme mantener los pies en la realidad y apoyarme a seguir adelante en momentos complicados. A Asai por compartir dentro y fuera del laboratorio experiencias inolvidables. A Rubén por ser un ejemplo a seguir como científico, pero sobre todo como persona. A Fabiola por compartir y transmitir su motivación hacia las neurociencias y la vida. A Anil por contagiar su constante entusiasmo a las neurociencias. A Yiatziri por hacerme reír. A Gerry por ser compañero de esta travesía. A Milo por las risas y las pláticas. Gracias a ustedes por verme y permitirme verlos crecer personal y profesionalmente en el mundo de las neurociencias.

Siempre he creído que el éxito no se debe únicamente al esfuerzo individual sino al trabajo y apoyo de muchas e increíbles personas. El pequeño éxito que esto representa se los debo a todos ustedes. Gracias.

A la memoria de Paz, Tony, Yola y Zui.

While I thought that I was learning how to live,

I have been learning how to die

- Leonardo da Vinci

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	4
Objetivo general:	4
Objetivos particulares:.....	4
ANTECEDENTES	5
Secuencias motoras.....	5
Modelos de aprendizaje y realización de secuencias motoras	6
Sustratos fisiológicos de la generación de secuencias de acciones.	7
Codificación de secuencias de acciones en la corteza cerebral.....	7
Ganglios basales	9
Secuencias motoras - circuito corticoestriatal.....	11
Modelos funcionales de los ganglios basales	12
Planteamiento del problema.....	15
Pregunta experimental.....	16
Hipótesis	16
METODOLOGIA	17
Modelo de estudio.....	17
Implementación de estrategia para entrenar ratones, en tareas de condicionamiento operante en cabeza fija.	18
Descripción del entrenamiento en ratones a desarrollar secuencias de acciones guiadas.	20
GCaMP como reportero de la actividad neuronal.....	22
Implante de microendoscopios y transfección de GCaMP6f.....	22
Adquisición de transitorios de neuronas estriatales por GCaMP6f.....	23
Alineamiento de las señales de calcio con las señales de la conducta.	25
Determinación de neuronas moduladas durante la conducta.....	25
RESULTADOS	28
Capítulo I: Los ratones son capaces de concatenar dos secuencias de acciones en una cadena rápida.....	28
Capítulo II: Optimización de la expresión de GCaMP6f en neuronas estriatales para la imagenología de calcio.	32

Capitulo III: Actividad de las neuronas del estriado dorsal durante la realización de una cadena de dos secuencias de acciones	34
Las neuronas estriatales de las vías de los ganglios basales se modulan diferencialmente durante la realización de una cadena de secuencias de acciones.	36
Capitulo IV: No se encontró diferencias en las proporciones de neuronas reclutadas de la vía directa versus indirecta durante la fase temprana del aprendizaje a realizar la cadena de secuencias de acciones.....	40
No se encontró diferencias en las proporciones de neuronas reclutadas de la vía directa versus indirecta durante la realización de secuencia individuales antes de aprender a hacer cadenas de secuencias. ...	43
Comparación de la modulación de las vías a lo largo del aprendizaje a realizar una cadena de dos secuencias de acciones.	44
DISCUSIÓN.....	46
Los animales concatenaron dos secuencias de acciones en una cadena de secuencias	46
Imagenología de calcio por medio de GCaMP6f, microendoscopios, y microscopia fotónica.	47
La modulación de las vías estriatales es diferencial durante la ejecución de la cadena de secuencias de acciones en la fase tardía.....	48
La modulación reportada poblacionalmente es la representación de lo observado en los animales individuales.....	49
La modulación de las vías estriatales no es diferencial durante las fases tempranas de la concatenación.	50
Reclutamiento diferencial de las vías a lo largo del aprendizaje a realizar cadenas de secuencias..	51
CONCLUSIONES	52
ANEXOS.....	53
LITERATURA CITADA	55

Lista de figuras

Figura 1. Los registros electrofisiológicos de actividad unitaria en la corteza muestran regiones específicas relacionadas con la ejecución de secuencias de acciones.....	8
Figura 2. Esquema de la anatomía y las vías de los ganglios basales	10
Figura 3. Los registros electrofisiológicos de actividad unitaria en el núcleo caudado muestran actividad anticipatoria a la ejecución de una acciónc	11
Figura 4. Experimentos en el estriado de ratones donde se ejemplifica a los modelos funcionales de las vías de los ganglios basales.....	13
Figura 5. Cortes sagitales de cerebros de ratones transgénicos que muestran la especificidad de las líneas usadas para marcar la vía directa o indirecta del estriado.	17
Figura 6. Implementación del equipo para el desarrollo de secuencias de acciones por ratones con cabeza fija	19
Figura 7. Descripción general del entrenamiento de sujetos experimentales a desarrollar secuencias de acciones.	21
Figura 8. Gcamp6f como reportero de actividad neuronal.	23
Figura 9. Extracción de ROIs por CNMF-E.	24
Figura 10. Análisis de la actividad neuronal registrada.....	26
Figura 11. Modulación binaria. Ejemplos de vectores para la categorización de tipos de modulación de las neuronas.	27
Figura 12. Los ratones son capaces de desarrollar cadenas de secuencias de acciones en condiciones de cabeza fija.	29
Figura 13. Medición de parámetros en la ejecución de secuencias individuales y cadena de secuencias de acciones.	31

Figura 14. Estandarización de la expresión del sensor de calcio GCaMP6f-Syn en el estriado dorsal de ratones(C57BL/6J).	33
Figura 15. Actividad estriatal en la cadena de secuencias de acciones.	35
Figura 16. Sitios de registro de neuronas de la vía indirecta (A2a-Cre GCaMP) y vía directa (D1-Cre GCaMP).....	36
Figura 17. Actividad de neuronas durante la realización de cadenas de secuencias fase tardía. ..	37
Figura 18. Proporción de neuronas moduladas en fase tardía de la realización de cadenas de secuencias de acciones para la vía directa y la vía indirecta.	39
Figura 19. Actividad de neuronas durante realización de cadenas de secuencias fase temprana. 40	
Figura 20. Proporción de neuronas moduladas en la secuencia de acciones en cadena temprana para la vía directa y la vía indirecta.	42
Figura 21. Actividad de neuronas durante la secuencia de acciones en cadena temprana.....	43
Figura 22. Proporción de neuronas moduladas durante la realización de secuencias individuales 44	
Figura 23. Proporción de neuronas moduladas y por categoría en tres etapas del aprendizaje a realizar cadenas de secuencias de acciones.....	45
Figura 24. Conclusión gráfica de la ejecución de cadena de secuencias de acciones.	52
Figura 25. Conclusión gráfica del estudio.	53
Figura 26. Circuito sensor de lengüetazos y bomba peristáltica.....	54
Figura 27. Comparación del sensor de calcio con el control eyfp.....	54

Resumen

La actividad de las neuronas del núcleo estriado, principal núcleo de entrada de los ganglios basales, codifican información relevante para la generación de secuencias de acciones. El estriado cuenta con dos tipos de neuronas de proyección conocidas como neuronas de la vía directa e indirecta. La excitación optogenética de las neuronas de la vía directa produce un incremento en la generación de movimiento, mientras que la activación optogenética de la vía indirecta disminuye la generación del movimiento. Esto sugiere que la vía directa es necesaria para la generación del movimiento mientras que la vía indirecta es necesaria para frenarlo. Con el fin de evaluar estas posibilidades, en este trabajo de tesis nos preguntamos: ¿Cómo se modulan las neuronas de las vías de los ganglios basales al concatenar dos secuencias de movimientos en una cadena de acciones?

Para contestar esta pregunta registramos la actividad de las neuronas estriatales por medio de imagenología de calcio en tres etapas en las que ratones aprendieron a realizar una cadena de dos secuencias de acciones.

Como resultados de este trabajo encontramos:

1. La actividad de las neuronas de la vía directa versus indirecta es diferente durante la ejecución de una cadena de dos secuencias de acciones, una mayor proporción de neuronas de la vía directa es modulada para la realización de la cadena mientras que la vía indirecta mostro un mayor número de neuronas moduladas durante la transición entre las dos secuencias de acciones.
2. La proporción de neuronas por vía se reclutó de manera diferencial durante el aprendizaje a realizar una cadena de dos secuencias de acciones. La vía directa mostro el reclutamiento de una mayor proporción de neuronas durante la fase temprana a realizar una cadena de acciones y un incremento en neuronas reclutadas a lo largo de la cadena, mientras que la vía indirecta mostro un incremento de neuronas reclutadas a lo largo del aprendizaje durante la transición entre secuencias de acciones.

Estos resultados sugieren que la vía indirecta podría estar dirigiendo el cambio de secuencias de acciones mientras que la vía directa contribuye con mayor importancia a la ejecución de la cadena de secuencias de acciones y es más relevante en la fase temprana de concatenación de dos secuencias.

Abstract

Neuronal activity of striatum, which is the main basal ganglia input, codifies information about the execution of action sequences. Striatum have two types of projection neurons; direct and indirect pathway neurons. It has been shown that the optogenetic activation of the direct pathway induces the movement while the optogenetic activation of the indirect pathway reduces or stop movements; suggesting an antagonist role for both pathways. In this work, with the goal to go deeper into this scheme we postulate the next questions: How does the pathways of the basal ganglia are modulated at the concatenation of two sequences in one chain of actions?

To answer this, we record the activity of striatal neurons of both pathways, through calcium imaging and micro-endoscopic lenses, in three epochs of a behavioral task where mice learn to execute single sequences of actions and chain of sequences of actions.

As results of this work we found:

1. The neuronal activity of the direct pathway versus the indirect is different during the execution of a chain of two sequences of actions. A higher proportion of direct pathway neurons are recruited for the execution of the chain while a higher proportion of neurons of the indirect pathway were modulated at the transition between sequences of actions.
2. The proportion of neurons within the pathways was differently recruited along the learning and execution of chain of sequences of actions. The direct pathway showed a higher proportion of neurons modulated during the early phase of concatenation of sequences of actions and an increment in the neurons recruited during the whole chain, while the indirect pathway showed an increment in the amount of neurons recruited through the learning in the transition between sequences of actions.

This results suggest that the indirect pathway could be orchestrating the transition between sequences while the direct pathway contributes the most in the whole execution of the chain and importantly during the concatenation of sequences.

INTRODUCCIÓN

Los subcircuitos que interconectan a la corteza, los ganglios basales y el tálamo constituyen parte de los substratos fisiológicos para la selección, iniciación, término y ejecución de acciones motoras (Cui et al., (2013); DeLong, 1990; Fujii & Graybiel, 2003; Jin & Costa, 2015; Mink, 1996; Shima & Tanji, 2000). Los ganglios basales contienen dos vías de interconexión, la vía estriatonigral o vía directa y la vía estriatopallidal o vía indirecta (Gerfen et al., 1990,1984). Actualmente se ha documentado que ambas vías se co-activan durante la iniciación de movimientos naturales (Barbera et al., 2016; Klaus et al., 2017; Tecuapetla et al., 2014) y durante la iniciación de secuencias de acciones (Jin et al., 2014). Estos hallazgos se contraponen al modelo clásico de funcionamiento de estas vías, el cual postula que la actividad de la vía directa facilita el movimiento mientras que la activación de la vía indirecta lo decrementa (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Durieux., 2012; Kravitz et al., 2010).

Dada la contraposición entre hallazgos experimentales que apoyan el modelo de activación concurrente y al modelo clásico de activación opuesta, surgen cuestionamientos acerca de la contribución de las vías directa e indirecta de los ganglios basales a la generación de movimientos. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis, monitoreamos la actividad de las neuronas estriatales que originan a estas vías durante el inicio y transición entre dos secuencias motoras dentro de una cadena de secuencias y durante el aprendizaje de la misma.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Registrar la actividad de las neuronas de las vías estriatales de los ganglios basales *in vivo* en la concatenación de dos secuencias en una sola cadena de acciones.

Objetivos particulares:

- Implementar una tarea conductual en la que los animales ejecuten y desarrollen secuencias de acciones en cadena.
- Analizar la actividad neuronal de los sub-circuitos de las vías estriatales durante la ejecución de secuencias individuales y al concatenar dos secuencias en una sola cadena de acciones.

ANTECEDENTES

Secuencias motoras

Una acción puede ser definida como el proceso de realizar uno o varios movimientos para lograr un objetivo (Grammont, 2010). Para el caso de una acción compuesta por un movimiento, un ejemplo es la contracción o relajación de los músculos con el objetivo de cerrar o abrir los ojos. Para una acción compuesta de varios movimientos un ejemplo sería tocar el piano, lo cual involucra varias secuencias de movimientos. Una secuencia de movimientos es la ejecución en serie de múltiples comandos motores (Kandell et al., 2000).

Del repertorio de conductas motoras de los organismos algunas son innatas, es decir, para desarrollarse no necesitan de un aprendizaje directo con el medio, dado que se preestablecen durante el desarrollo (Grillner, 2003). Un ejemplo es la capacidad de las especies precociales de tener locomoción e incluso dirigir y mantener la vista hacia ciertos objetivos poco tiempo después de haber nacido (Kehmeier et al., 2011; Starck & Ricklefs, 1998; Vallortigara, 2012). Este tipo de conductas se explican a través de generadores centrales de patrones (CPGs por sus siglas en inglés).

Los CPGs son circuitos neuronales que contienen la capacidad de activar patrones motores para generar desde un movimiento simple hasta una serie de movimientos estereotipados, como el caminar (Grillner, 2003).

Debido a la gran variabilidad de programas y respuestas motoras que existen, su ejecución no se puede explicar únicamente a través de los CPGs, tiene que existir una interacción con el medio que de una retroalimentación al sistema para refinar las respuestas motoras. Un ejemplo de esto se puede observar en el canto de las aves. Las aves son capaces de generar sonidos a modo de balbuceos, similares a los de humanos, y necesitan de la enseñanza activa por parte de un tutor para poder refinar la conducta a una secuencia motora estereotipada que produce un canto específico (Aronov et al., 2008). Una secuencia de acciones podría definirse como conductas estereotipadas con un inicio y un fin; las cuales pueden ser originadas de

manera innata (Grillner, 2003) o refinando la conducta (Aronov et al., 2008).

Modelos de aprendizaje y realización de secuencias motoras

En la actualidad se plantean dos modelos en los cuales se representa como se lleva a cabo el aprendizaje y la realización de secuencias motoras. En el primer modelo se ve al movimiento como una respuesta consecuente de las entradas sensoriales a manera de estímulo y respuesta (“Model free”) (Haith & Krakauer, 2013; Sutton & Barto, 1998). El segundo plantea que el mejoramiento de una acción motora está dado por un modelo interno del ambiente que es actualizado con base en predicciones y errores, al cual se le denomina aprendizaje basado en actualizaciones de un modelo (“Model based”) (Haith & Krakauer, 2013; Shadmehr & Krakauer, 2008).

Se ha propuesto que la ejecución de secuencias de acciones puede ser codificadas de dos maneras. La primera es llamada de ejecución serial: los elementos de una secuencia se realizan de manera ordinal; el primer movimiento genera el consecuente y así sucesivamente para cada uno de los elementos de una serie. Como ejemplos de este modelo se ha observado que la actividad de las neuronas de núcleos motores de aves siguen de manera serial a cada uno de los componentes del canto (Long et al., 2010) y en registros del núcleo estriado, en ratas, se ha documentado en secuencias de acicalamiento (Aldridge & Berridge, 1998). El segundo modelo plantea una estructuración jerárquica: La secuencia motora se divide en fragmentos de información o sub-secuencias. Estos fragmentos pueden ser unidos de múltiples formas para generar una secuencia. La actividad estriatal ha sido propuesta como la que codifica a las secuencias motoras de manera jerárquica (Jin & Costa, 2010, 2015). Al manipular las vías del estriado, en una tarea de secuencias de palanqueo, se ha reportado en ratones, que a pesar de modificar parámetros como el tiempo a iniciar o el número de abortos en la secuencia, no se reduce el número de elementos que componen la secuencia, como si la ejecución de secuencias estuviera codificada en módulos de información (Tecuapetla et al., 2016).

Sustratos fisiológicos de la generación de secuencias de acciones.

Actualmente, se reconocen a los circuitos que interconectan a la corteza cerebral, los ganglios basales y el tálamo son necesarios para la realización de secuencias motoras (Fujii & Graybiel, 2003; Graybiel, 1998; Jin & Costa, 2010, 2015; Parker et al., 2016; Tecuapetla et al., 2016; Turner et al., 1999).

Cuando la actividad neuronal que se encarga del procesamiento de los comandos motores es desregulada, repercute en patologías que pueden incapacitar el apropiado funcionamiento del individuo. Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson y/o en trastornos compulsivos, se observan afectaciones en la habilidad de iniciar movimientos o transitar entre ellos (DeLong, 1990; Müller et al., 1997).

En estudios realizados en modelos murinos de la enfermedad de Parkinson se ha observado un desbalance de la actividad de las neuronas que conforman las vías de los ganglios basales, con un decremento e incremento de la actividad basal para la vía directa e indirecta respectivamente; y una pérdida de la organización espaciotemporal de la actividad selectiva a tipos de acciones (Parker et al., 2018).

En el síndrome obsesivo compulsivo se han observado alteraciones en el circuito cortico estriatal. Específicamente en un modelo de compulsiones en ratones, en donde se elimina la proteína SAPAP 3 (Knock out), la activación de las aferencias de las neuronas de la corteza orbitofrontal al estriado produce una disminución de conductas compulsivas (Burguière et al., 2013).

Codificación de secuencias de acciones en la corteza cerebral

Se ha documentado que existen diferentes estructuras corticales que codifican parámetros de la motricidad. Se ha observado actividad anticipatoria a la ejecución de movimientos en: área motora suplementaria (SMA)(Lang et al., 1991), la corteza motor primaria (M1)(Georgopoulos & Grillner, 1989), parietal (Crammond & Kalaska, 1989) y la corteza prefrontal medial (PFCm) (Funahashi & Kubota, 1994).

En el área motora suplementaria, en una tarea conductual en donde primates no humanos ejecutaron diferentes secuencias de acciones que involucraban empujar (*Push*), jalar (*Pull*) o girar (*Turn*) una palanca, se encontró actividad preparatoria específica a un tipo de secuencia de acciones, a un momento u orden específico de la secuencia y a movimientos específicos; evidenciando que existe información neuronal que codifica diferentes tipos de acciones motoras (**Figura 1A**) (Shima & Tanji, 2000). En corteza prefrontal, en un estudio en el que se instruyó a primates no humanos a realizar una serie de movimientos sacádicos, se encontró a través de registros extracelulares neuronales un incremento en la actividad en el inicio y final de la secuencia de acciones. Evidenciando que existe información en la actividad neuronal que delimita a las secuencias motoras (**Figura 1B**) (Fujii & Graybiel, 2003).

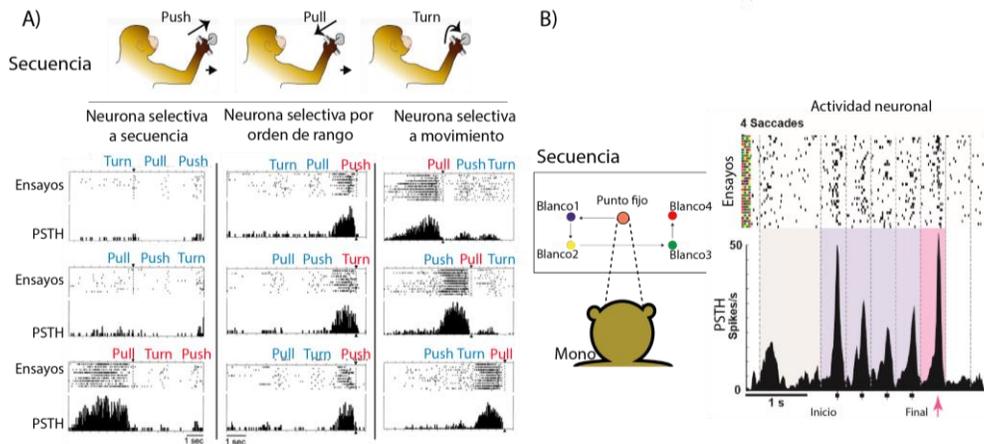


Figura 1. Los registros electrofisiológicos de actividad unitaria en la corteza muestran regiones específicas relacionadas con la ejecución de secuencias de acciones. A) El diagrama superior representa a un mono realizando diferentes secuencias motoras. Los gráficos inferiores son histogramas peri-estimuló (PSTH) de la actividad unitaria registrada de tres neuronas, cada columna muestra la actividad de la misma neurona, alineada al inicio de tres diferentes secuencias motoras. Note que la neurona de la columna izquierda muestra actividad preparatoria a una secuencia motor específica (*Pull-Turn-Push*). La neurona de la columna de en medio se activa al final de la secuencia independientemente del tipo de secuencia y la neurona de la derecha muestra actividad específicas a un solo tipo de movimiento (*Pull*) (Shima & Tanji 1994). **B)** El diagrama de la derecha representa a un mono realizando una secuencia de sacadas. A la derecha se muestra el PHST de la actividad unitaria de una neurona de la corteza prefrontal mientras el mono realizaba diferentes secuencias sacadicas. Note que la actividad de la neurona demarca el inicio y final de la ejecución de las secuencias (ensayos; el color al inicio de cada ensayo indica la dirección de las sacadas), independientemente de la secuencia de movimientos sacadicos. (Fujii & Graybiel 2003).

Ganglios basales

Los ganglios de la base o ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales que reciben conexiones sinápticas tanto de la corteza como del tálamo. Se postula que la integración de estas entradas dentro del estriado (principal núcleo de entrada a los ganglios basales) permite la apropiada selección de acciones (Hikosaka et al., 2000; Mink, 1996; Redgrave et al., 2010). En primates los ganglios basales están compuestos por siete núcleos principales: caudado, putamen, globo pálido externo, globo pálido interno, sustancia nigra *pars compacta*, *pars reticulata* y el núcleo subtalámico. En roedores el núcleo caudado y putamen están fusionados denominándose núcleo estriado o neostriado. En el estriado existen diferentes tipos de neuronas donde el 98% por su anatomía son espinosas medianas de tipo GABAérgico; el resto está compuesto por interneuronas GABAérgicas y colinérgicas (Chang & Kita, 1992; Chang & Kitai, 1982; Kemp & Powell, 1971)(**Figura 2**).

El núcleo estriado recibe aferencias de distintos núcleos. Por parte de la corteza cerebral y del tálamo recibe aferencias glutamatérgicas (Gerfen, 1984; Webster, 1961), del área tegmental ventral y de la sustancia nigra *pars compacta* recibe entradas dopaminérgicas (Swanson, 1982), del núcleo raphe recibe entradas serotoninérgicas (Lavoie & Parent, 1961) y del tallo cerebral recibe entradas colinérgicas (Hallanger & Wainer, 1988).

Las dos vías de proyección que interconectan a los ganglios basales se originan a partir de distintas poblaciones neuronales dentro del estriado. A estas dos vías se les conocen como los sub-circuitos de la vía directa y la vía indirecta (Albin et al., 1989; DeLong, 1990) (**Figura 2**). La vía directa está conformada por neuronas que conectan directamente desde el estriado a los núcleos de salida de los ganglios basales: el GPi y la SNr. La vía indirecta va a los núcleos de salida a través de relevos sinápticos en el GPe y el núcleo subtalámico.

Las neuronas de la vía directa expresan dinorfina, sustancia P, y receptores tipo D1 mientras que las de la vía indirecta expresan receptores a dopamina D2, encefalina y receptores a adenosina a2a (Anderson & Reiner, 1990; Gerfen et al., 1990; Lei et al., 2004) .

Se ha observado que la actividad neuronal del núcleo estriado está relacionada con diversas cualidades motoras y cognitivas como: aprendizaje por recompensa (Daw, 2003; Schultz et al., 1997), comportamiento exploratorio (Sridharan, Prasanth, & Chakravarthy, 2006), comportamiento dirigido a objetivos (Hart et al., 2018; Shan et al., 2014), actividad anticipatoria a la ejecución de acciones (Schultz & Romo, 1992), memoria de trabajo (O'Reilly & Frank, 2006), estimación temporal (Buhusi & Meck, 2005; Malapani et al., 1998) ejecución y selección de acciones (Jin & Costa, 2015; Redgrave et al., 2010; Tecuapetla et al., 2016; Wickens, 1997).

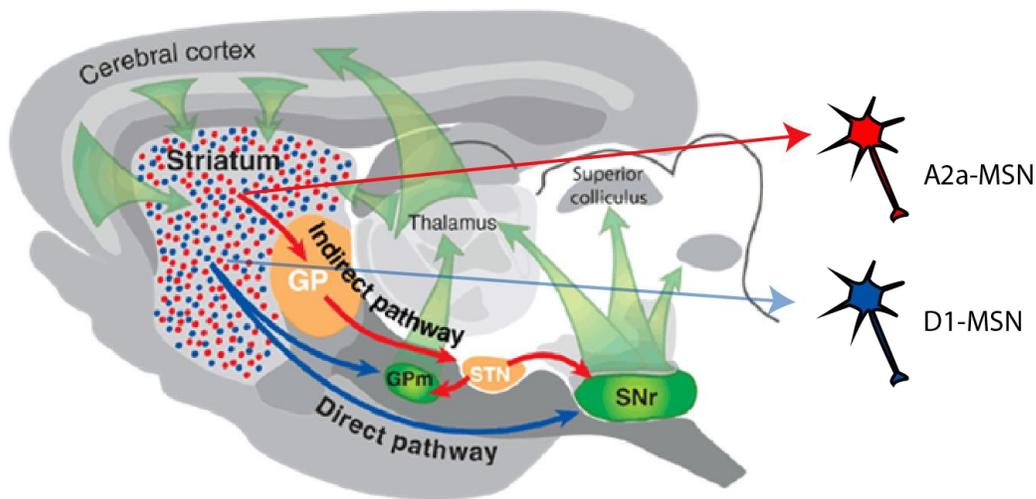


Figura 2 Esquema de la anatomía y las vías de los ganglios basales. La corteza cerebral de distintas áreas manda proyecciones hacia el estriado el cual está compuesto de predominantemente neuronas espinosas medianas GABAérgicas, de las cuales existen dos tipos, las de la vía directa que mandan proyecciones hacia el globo pálido interno (GPi) y sustancia nigra pars reticulata (SNr) mientras que la vía indirecta manda sus proyecciones al globo pálido externo (GPe). El STN proyecta hacia el GPi y SNr; Los núcleos de salida de los ganglios basales mandan sus proyecciones al Tálamo el cual a su vez manda proyecciones de regreso hacia la corteza cerebral y el núcleo estriado (Imagen tomada de Gerfen 2006).

Secuencias motoras - circuito corticoestriatal.

En trabajos de registro de la actividad neuronal del núcleo estriado del Dr. Shultz y el Dr. Romo encontraron que existe actividad eléctrica que precede al movimiento. Esta se relacionó a una actividad similar observada en diferentes cortezas sugiriendo que podría estar codificando parámetros de la preparación de la ejecución motora (**Figura 3**)(Schultz & Romo, 1992).

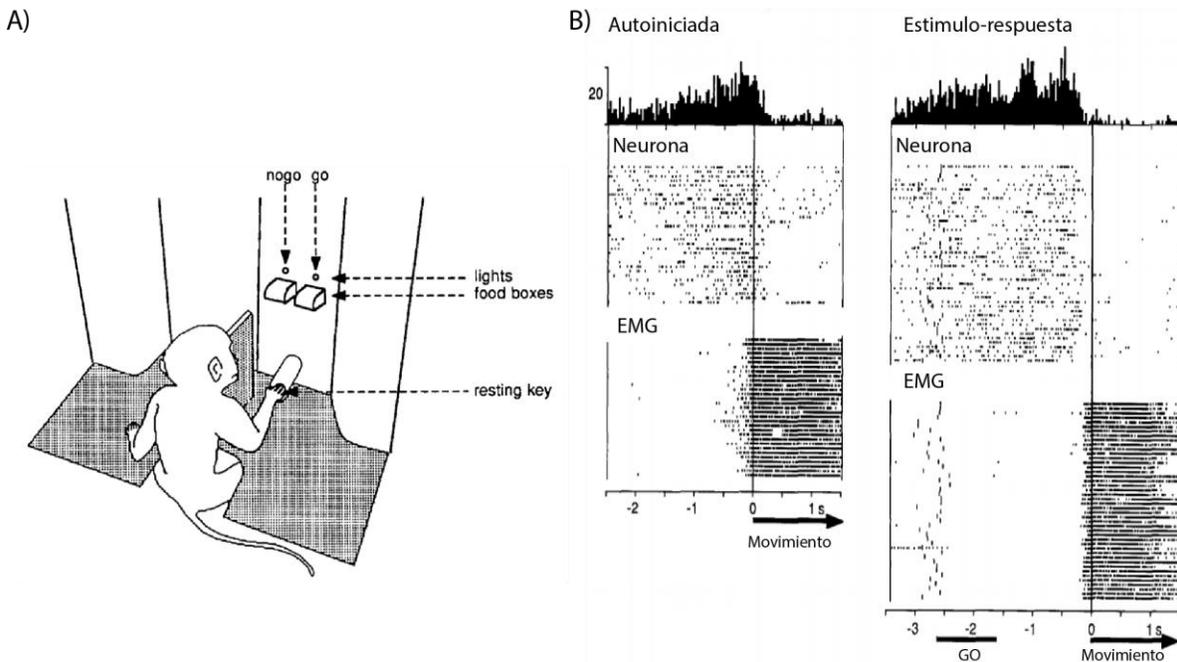


Figura 3. Los registros electrofisiológicos de actividad unitaria en el núcleo caudado muestran actividad anticipatoria a la ejecución de una acción.

A) Esquema de un mono entrenado fijar la mano en una posición por algunos segundos antes de tomar un reforzador ("food boxes") de manera autoiniciada o ante una señal "Go" (estimulo-respuesta). **B)** PHST de la actividad unitaria de dos neuronas registradas en el núcleo caudado, alineadas al momento de iniciar el movimiento para tomar el reforzador (el movimiento se midió por medio de un electromiograma: EMG). Modificado de Schultz & Romo 1992.

En experimentos en roedores se encontró que la eliminación de los receptores NMDA en el estriado disminuye la variabilidad en la realización de secuencias de acciones. Sugiriendo que es menos probable que los animales puedan seleccionar un adecuado programa motor. Lo cual apoya la idea de que las conexiones cortico-estriatales son necesarias para la apropiada selección y aprendizaje de acciones (Jin & Costa, 2010, 2015).

De la misma manera en la que se sugiere que se debe dar una selección del engrama para el aprendizaje y ejecución de una secuencia de acciones, se propone que debe de existir una selección opuesta mediada por una depresión sináptica para aquellos engramas que no son adecuados para la ejecución de una secuencia de acciones determinada (Groszer et al., 2008; Gerdeman et al., 2002). Por ejemplo, en animales a los que se les elimina el gen FoxP2 en el estriado son incapaces de generar secuencias de acciones. Esta incapacidad se asocia con alteraciones de la depresión de largo plazo en las sinapsis cortico estriatales (French et al., 2011; Haesler et al., 2007). Evidenciando que la plasticidad del circuito corticoestriatal tiene un papel importante para generar secuencias de acciones motoras.

Modelos funcionales de los ganglios basales

Los modelos actuales que explican el funcionamiento de las vías de los ganglios basales se pueden categorizar en dos: el modelo de activación antagónica y el modelo de activación concurrente.

El modelo de activación antagónica propone que las vías del estriado en cuanto a su función motora son opuestas. Esta propuesta se basa en experimentos en donde se sobre activa a las vías por medio de optogenética o farmacología (Durieux & Schiffmann, 2012; Kravitz et al., 2010), encontrando que la activación de la vía directa potencia la locomoción mientras que la activación de la vía indirecta lo decremента (**Figura 4A**).

El modelo concurrente propone que ambas vías son necesarias durante el inicio de una ejecución motora. Esta propuesta se basa en experimentos de registros de actividad neuronal, en donde se encontró que ambas vías se activan al inicio de la

ejecución de movimientos aprendidos (Cui et al., 2013) (**Figura 4B**) y movimientos naturales (Tecuapetla et al., 2014). En estudios recientes se ha encontrado que los ensambles espaciotemporales de ambas vías del estriado codifican conductas motrices específicas, habiendo una relación espaciotemporal y concurrente de las vías para la realización de secuencias motoras (Barbera et al., 2016; Klaus et al., 2017; Parker et al., 2018).

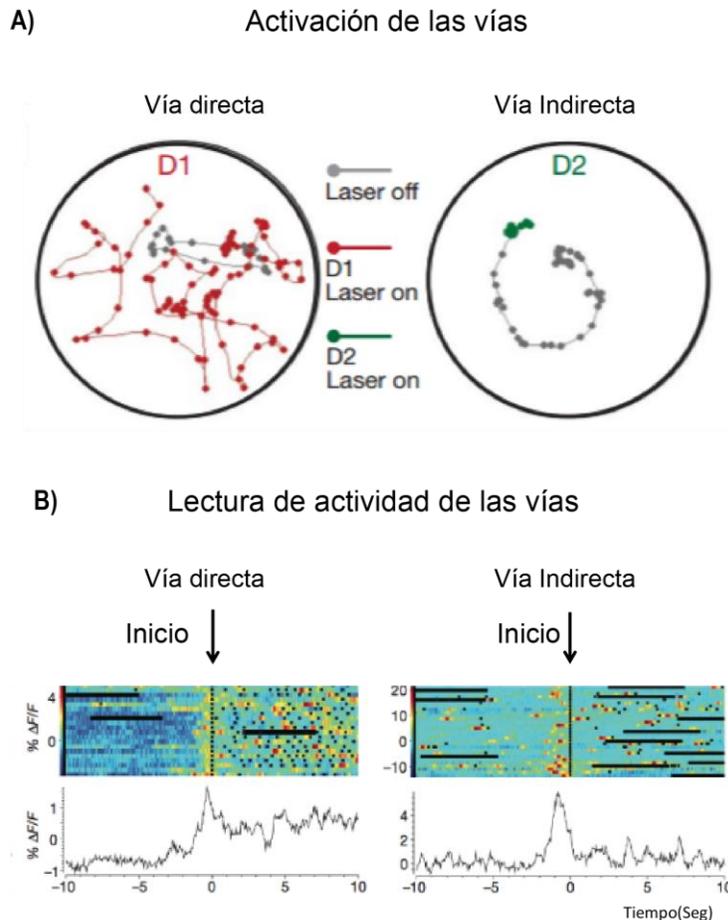


Figura 4. Experimentos en el estriado de ratones donde se ejemplifica a los modelos funcionales de las vías de los ganglios basales. A) Desplazamiento de un animal al activar a la vía directa (izquierda) o activando la vía indirecta (derecha) por medio de optogenética (Kravitz et al 2010). **B)** Experimentos de registro de actividad neuronal por imagenología de calcio mostrando que existe actividad concurrente de las vías al inicio de presionar una palanca (Cui et al 2013).

Un tercer modelo en donde se reconcilian las dos propuestas es el de selección e inhibición de programas motores (Mink, 1996). Se propone que las vías de los ganglios basales pueden estar seleccionando programas motores competitivos; promoviendo los programas motores deseados a través de la activación de la vía directa e inhibiendo los no deseados a través de la vía indirecta. En este esquema la actividad concurrente de las vías podría tener una funcionalidad opuesta al seleccionar e inhibir los programas motores; sin embargo, existe muy poca evidencia en favor de esta propuesta (Kim et al., 2017).

Como resumen de ambos modelos el de activación antagónica y el de activación concurrente, el incremento de la vía directa está asociada a la facilitación de los movimientos (Jin & Costa, 2015; Kravitz et al., 2010), por lo que dicha actividad puede estar permitiendo la iniciación/ejecución de secuencias de acciones. Sin embargo, para el caso de la contribución de la vía indirecta, desde el punto de vista del modelo antagónico versus el de activación concurrente, el escenario es más complejo. Esto debido a que al activar a esta vía se observa que la locomoción decremента (Kravitz et al., 2010) pero también se ha observado que al activarla los animales abortan la ejecución de una secuencia motora sin decrementar la locomoción (Tecuapetla et al., 2016). Además, cuando solo se registra la actividad de ambas vías se observa una co-activación cuando los animales inician acciones condicionadas (Cui et al., 2013) y cuando realizan movimientos naturales (Tecuapetla et al., 2014).

Planteamiento del problema

Se ha demostrado que la participación de las vías de los ganglios basales contribuye al control motor en diferentes aspectos: el inicio y ejecución de secuencias motoras (Jin et al., 2014; Rueda-Orozco & Robbe, 2015; Tecuapetla et al., 2016), incremento y decremento de la movilidad (Durieux & Schiffmann, 2012; Kravitz et al., 2010), codificación de la velocidad de los movimientos (Rueda-Orozco & Robbe, 2015; Yttri & Dudman, 2016), tiempo a iniciar y a abortar una secuencia (Tecuapetla et al., 2016) y codificación espaciotemporal en movimientos naturales (Barbera et al., 2016; Klaus et al., 2017; Parker et al., 2018). No obstante, aún no queda claro cuál es la participación de cada una de las vías para la realización de programas motores que incluyan cadenas de secuencias de acciones. Mientras que, en los experimentos de activación de las vías se muestra un efecto antagónico; los experimentos de lectura de la actividad neuronal muestran una co-activación de las vías para iniciar los movimientos. El esquema se vuelve más complejo cuando la estimulación en diferentes compartimentos del estriado propicia efectos contrarios sobre el inicio de acciones (Carvalho Poyraz et al., 2016; Tecuapetla et al., 2016). Por lo que se necesitan estudios que nos ayuden a entender cuál es la contribución de ambas vías en la generación de secuencias motoras en cadena.

En el presente trabajo proponemos registrar la actividad de las neuronas estriatales durante la generación de cadenas de dos secuencias de acciones y en su aprendizaje. Esto con la finalidad de evaluar cómo se modulan las dos vías de los ganglios basales en la generación de una cadena de secuencias de acciones y profundizar en el entendimiento sobre su papel en el control motor.

Pregunta experimental

¿Cómo se modula la actividad de las neuronas estriatales de las vías de los ganglios basales al concatenar dos secuencias en una cadena de acciones?

Hipótesis

Dado que se sugiere la actividad de la vía indirecta contribuye a disminuir a los movimientos, y la actividad de la vía directa contribuye a facilitar los movimientos:

- 1) La vía indirecta se activará preferentemente durante la transición entre las dos secuencias que conforman una cadena de secuencias de acciones.
- 2) La vía directa se activará preferentemente durante el inicio de una cadena de acciones.

METODOLOGIA

Todos los experimentos presentados se realizaron bajo el protocolo aprobado por la comisión de manejo de animales experimental del instituto de Fisiología Celular (CICUAL: FTA2017).

Modelo de estudio.

Para este estudio se trabajó con ratones silvestres y transgénicos de la cepa C57BL/6J de entre 2-4 meses de edad de ambos sexos. Con DNA de tejido de cola se realizó PCR en busca de la Cre-recombinasa, con el fin de identificar a los ratones transgénicos. Los animales utilizados para marcar a la vía directa fueron animales D1-Cre; línea EY217 (**Figura 5A**) y la vía indirecta animales A2a-Cre: línea KG139 (**Figura 5B**).

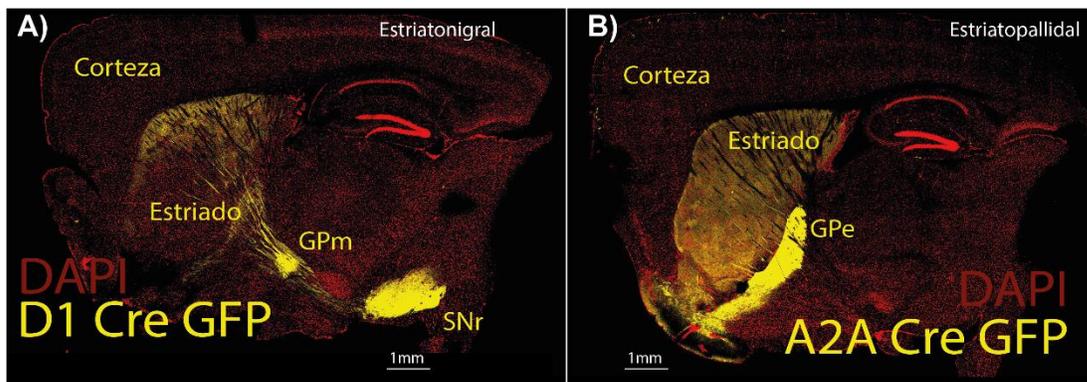


Figura 5 Cortes sagitales de cerebros de ratones transgénicos que muestran la especificidad de las líneas usadas para marcar la vía directa o indirecta del estriado. A) Corte sagital del cerebro de un ratón D1 Cre cruzado con la línea AI35 la cual expresa GFP en todas las neuronas que contienen Cre. Note a la marca en el estriado y sus proyecciones al globo pálido interno (aquí abreviado como GPm) y hacia sustancia nigra (SNr) (<http://www.gensat.org/ShowFounderLineImages.jsp?gensatFounderLine=EY217>). **B)** Similar a A, en este caso para un animal A2A Cre. Notese la marca en el estriado y sus proyecciones hacia el globo pálido externo (GPe) (http://www.gensat.org/creGeneView.jspfounder_id=64231&gene_id=93&backcrossed=false)(Imágenes tomadas de Tecupetla et al 2016).

Una vez que los animales tuvieron dos meses de edad se realizó una cirugía esterotáxica para la expresión del sensor de actividad neuronal, implantación del micro-endoscopio e implantación de una barra de acero inoxidable en el cráneo, se profundizará más adelante sobre el protocolo de dicha cirugía.

Para el sensor de actividad neuronal se inyectó un vector viral (AAV1.Syn.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40), el cual contenía una secuencia flex que se expresó solo en neuronas que contenían a la Cre recombinasa. Es decir, solo en neuronas de la vía directa (ratones D1-Cre) o en neuronas de la vía indirecta (ratones A2a-Cre).

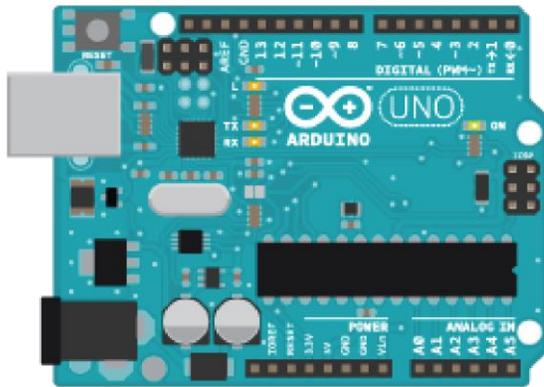
Implementación de una estrategia para entrenar ratones, en tareas de condicionamiento operante en cabeza fija.

En el desarrollo de una estrategia para entrenar ratones en tareas de condicionamiento operante en cabeza fija, se construyó una caja de entrenamiento. Se utilizó el microprocesador Arduino para la ejecución y programación de la tarea conductual, el cual permite la salida y entrada de señales digitales y analógicas (**Figura 6A**). Para la adquisición de los datos se utilizó la interfaz Martin 0.1.

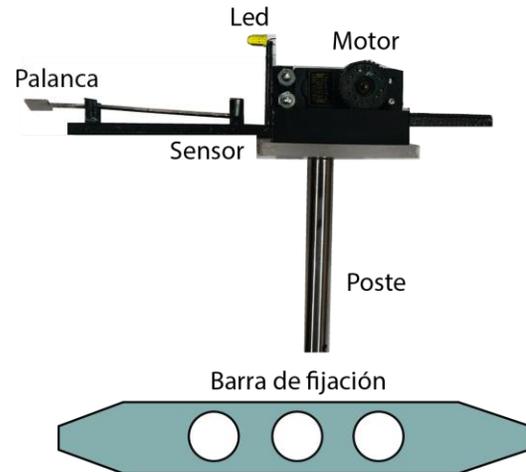
El hardware de la caja de entrenamiento consistió en un sistema de palancas con sensores infrarrojos para el registro de las presiones (**Figura 6B; palanca y sensor**), servomotores para la exposición y retracción de palancas (100ms) (**Figura 6B; motor**), LEDs que indicaban que palanca está activa y en posición para ser presionada (**Figura 6B; LED**), una bomba peristáltica para la presentación de la recompensa, sensor de lengüetazos por medio de un circuito abierto, (**Anexo; Figura 25**) y barras de acero inoxidable para condiciones de cráneo fijado (**Figura 6B; Barra**).

La disposición espacial del sistema fue con los ratones fijos dentro de un tubo frente al sistema de palancas a lado izquierdo y derecho. El dispensador de recompensas a la altura del hocico y lo suficientemente alejada para que los ratones pudieran hacer lengüetazos y obtener reforzador (**Figura 6C**).

A)



B)



C)

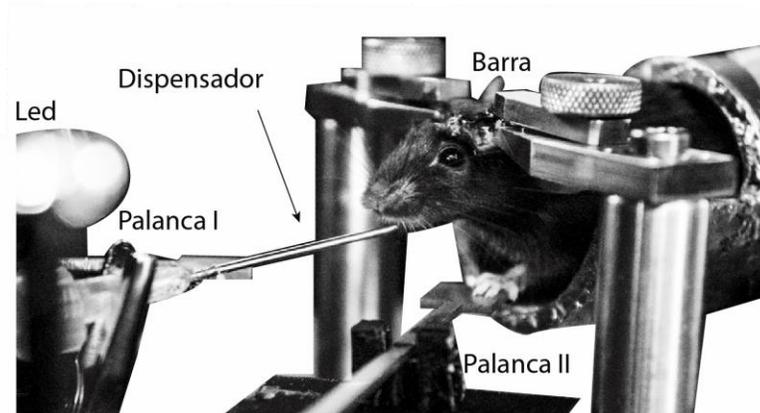


Figura 6. Implementación del equipo para el desarrollo de secuencias de acciones por ratones con cabeza fija. A) Microprocesador Arduino que manda las instrucciones a los componentes de la caja y recibe información acerca de los sensores **B)** Sistema de una palanca con poste ajustable de altura, servomotor para la exposición y retracción, LED asociado y sensor infrarrojo para la detección. Parte inferior, placa de cabeza fija la cual se implanta en el cráneo del animal para mantenerlo fijo. **C)** Esquema general del funcionamiento de la caja. Dos palancas con motores asociados y sensor infrarrojo para detectar las presiones. Dos LEDs para indicar la palanca activa. Dispensador de recompensa con sensor para monitorear los lengüetazos del animal. Tubo para el cuerpo en donde se encuentra al animal fijado.

Descripción del entrenamiento en ratones a desarrollar secuencias de acciones guiadas.

El entrenamiento de los ratones a desarrollar una cadena de secuencias de acciones constó de cuatro etapas. De la etapa 2 a la 4 hubo dos sesiones por día, la primera en la palanca izquierda y la segunda en la palanca derecha. Cada sesión duró 30 minutos o con un número fijo de reforzadores de 45 a 75 por sesión. A continuación, se detalla a cada una de las etapas:

Etapas 1: Habitación (5 sesiones).

Esta etapa consistió en acostumar a los ratones al sistema en cráneo fijo (Guo et al., 2014) (**Figura 7A**).

Etapas 2: Pre entrenamiento (2 sesiones)

Los animales fueron expuestos a una palanca. Durante estas sesiones cada presión liberó una recompensa (10 microlitros de suplemento alimenticio Ensure al 50%). (**Figura 7A**).

Etapas 3: Secuencias de acciones (15 sesiones).

Se entrenó a los animales a realizar series de presiones en un tiempo límite para obtener una recompensa, presentándoles primero la palanca izquierda y después la derecha. 3 sesiones: 8 presiones en 12 segundos, 3 sesiones 4 presiones en 8 segundos, 3 sesiones 4 presiones en 4 segundos. Cuando los animales no cumplían lo que se les requería las palancas se retrajeron por 10 segundos (tiempo fuera). (**Figura 7B**).

Etapas 4: Cadenas de secuencias de acciones (8 sesiones).

Esta etapa se dividió en dos partes. En la primera los animales tuvieron que presionar cuatro veces en la palanca izquierda seguido de dos presiones en la palanca derecha con un tiempo límite de ocho segundos para obtener un reforzador (4-2P/8seg). La siguiente parte consistió en que los animales presionaran cuatro veces en la palanca izquierda seguido de cuatro presiones en la palanca derecha en un tiempo límite de ocho segundos (4-4P/8seg). Las sesiones de entrenamiento

de esta etapa fueron de una hora o hasta que el animal consiguió un límite de recompensas (**Figura 7B**).

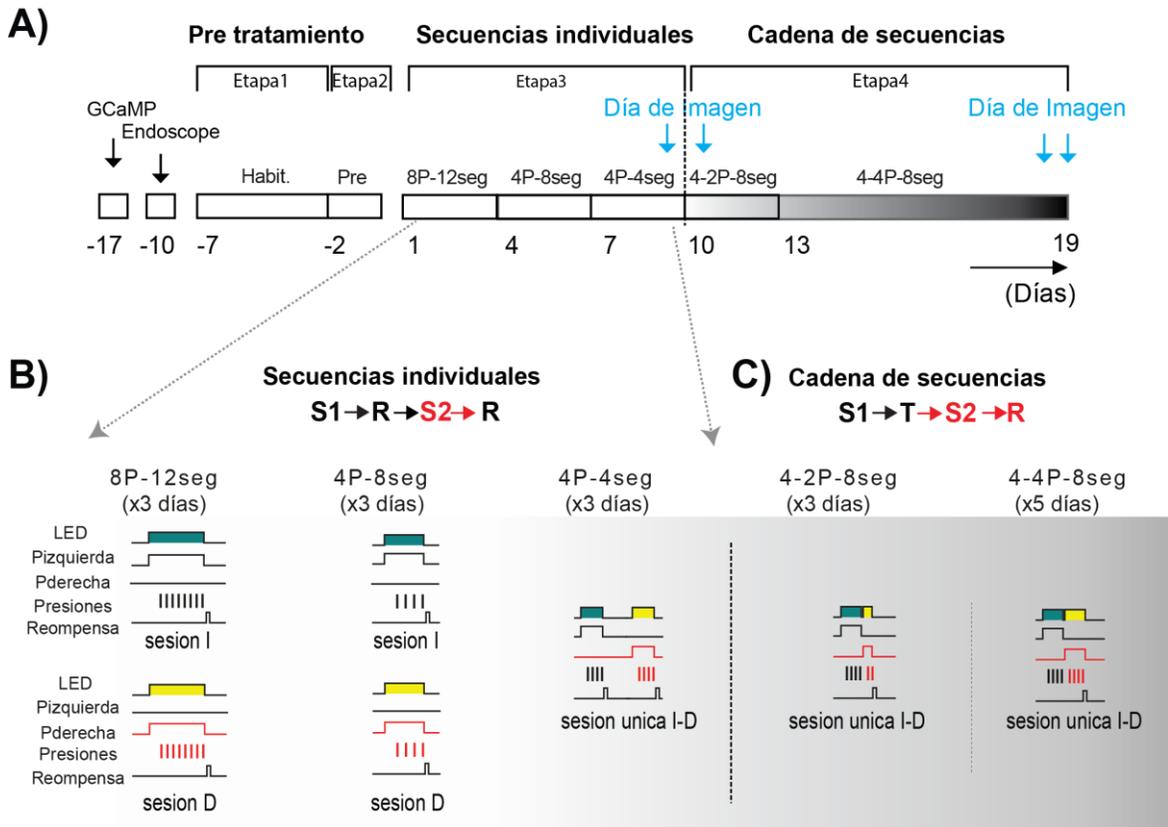


Figura 7. Descripción general del entrenamiento de sujetos experimentales a desarrollar secuencias de acciones. **A)** Línea del tiempo del protocolo de entrenamiento, cirugías y días de registro de los ratones experimentales. **B)** Imagen representativa de la tarea conductual en sus distintas etapas de desarrollo. 8P/12seg, 8 presiones en un tiempo límite de doce segundos, dos sesiones por día, izquierda y derecha. 4P/8seg, 4 presiones en un tiempo límite de ocho segundos, dos sesiones por día, izquierda y posterior derecha. 4P/4seg, 4 presiones en un tiempo límite de cuatro segundos, una sesión por día. 4-2P/8seg cuatro presiones izquierdas seguido de dos presiones derecha para obtener un reforzador en un tiempo límite de ocho segundos, tres sesiones. 4-4P/8seg Secuencias en cadena cuatro presiones izquierdas seguido de cuatro presiones derecha para obtener un reforzador en un tiempo límite de ocho segundos.

GCaMP como reportero de la actividad neuronal

Para registrar la actividad neuronal utilizamos la proteína indicadora de calcio genéticamente codificada (GECI; por sus siglas en inglés, GCaMP6f)(Chen et al., 2013). La GCaMP6f está constituida por una proteína fluorescente cpEGFP y una calmodulina que actúa como agente quelante de Calcio unida al péptido M13 (**Figura 8A**). Al incrementar el calcio intracelular en una neurona que exprese GCaMP6f la calmodulina sufre un cambio conformacional afectando a la cpEGFP, aumentando la fluorescencia de GCaMP6f. Por lo tanto, al medir el cambio en fluorescencia de las neuronas conGCaMP6f obtenemos información directa de su actividad.

Implante de microendoscopios y transfección de GCaMP6f.

Para la visualización de GCaMP6f se realizaron dos procedimientos quirúrgicos con diferencia de 7 días. En el primer procedimiento se inyectó 500nl del vector viral AAV1.Syn. Flex.GCaMP6f. WPRE.SV40, en una dilución 1:8 por medio de un microinyector (Nanoject 2.0; Drummond scientific) y pipetas de borosilicato de 50µm de diámetro (**Figura 8B**). Las coordenadas de inyección se ilustran en la Figura 8E. Después de siete días de expresión se realizó el segundo procedimiento donde se implanto un microendoscopio de 500um de diámetro y 8.4 mm de largo (GRIN lens Inscopix) dentro del estriado dorsal (**Figura 8D**).

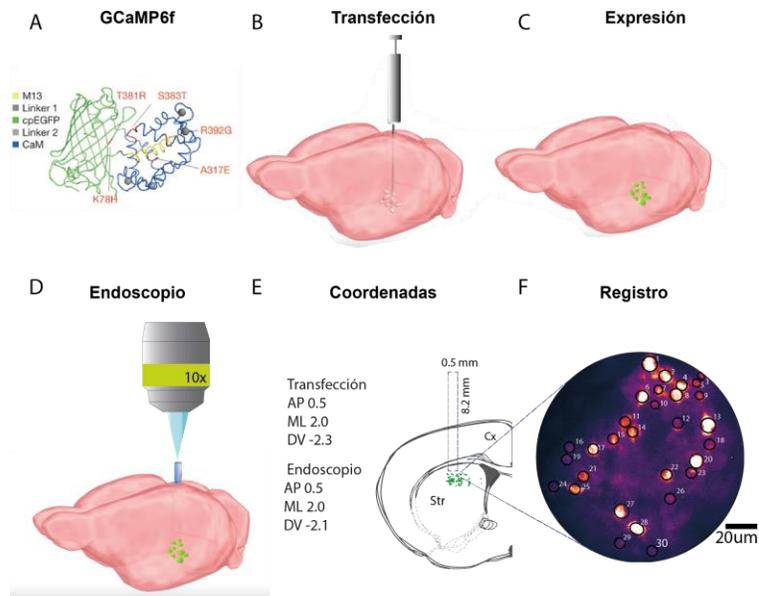


Figura 8. GcamP6f como reportero de actividad neuronal. **A)** Estructura proteica del GECI GCaMP6f (Chen et al 2013) **B)** Cirugía para la transfección del vector viral con el GECI GCaMP6f. **C)** 7 días de expresión de GCaMP6f. **D)** Representación del endoscopio implantado para el registro en las neuronas transfectadas (Figura modificada de Inscopix inc) **E)** Coordenadas de transfección e implante del endoscopio. **F)** Vista obtenida con microscopia confocal y microendoscopio de neuronas que expresan GCaMP6f dentro del estriado dorsal.

Adquisición de transitorios de neuronas estriatales por GCaMP6f

Para el análisis de la actividad neuronal, se obtuvieron videos de los cambios en fluorescencia de GCaMP6f por medio de microscopia confocal (Microscopio Zeiss LSM 710 Confocal, ZEISS Microscopy) con un objetivo de 10X (EC Plan-Neofluar 10X/0.3, ZEISS Microscopy) con la apertura del "pinhole" ajustada para tener un plano focal de 10 micras. Con una longitud de onda de excitación de 488nm y un rango de obtención de la emisión de 500nm a 600nm. Con una resolución de 330 por 330pixeles y un tamaño de imagen de $\sim 450\mu\text{m}^2$. El poder del láser en la parte externa del microendoscopio fue de $\sim 0.1\text{mw}$. La tasa de adquisición fue a 4Hz en los primeros animales y 10Hz para los últimos. **(Figura 9A)**. Cada animal tuvo 1-4 sesiones de registro. Cada sesión de registro consistió en dos a tres videos de 15 minutos que se concatenaron por sesión individual.

Se corrieron experimentos control para descartar que estas condiciones pudiesen dar falsos positivos de cambio en fluorescencia por movimiento (ver: anexos **Figura 26**).

A cada sesión de registro se le corrigió aberraciones de movimiento a través del software Image J -TurboReg. La selección de neuronas se realizó por medio del algoritmo CNMF-E (Pnevmatikakis et al., 2016; Zhou et al., 2016). Dicho algoritmo funciona de manera semiautomatizada, requiere de parámetros definidos como el tamaño estimado máximo-mínimo de un soma neuronal, tasa de adquisición y un umbral de correlación de pixeles (**Figura 9B**). Al proporcionarles estos parámetros el algoritmo trabaja de manera semi-automatizada con correlaciones temporales y espaciales de pixeles para generar las regiones de interés óptimas por neurona. Se iteró cinco veces para confirmar que las señales que se adquirieron fueran correctamente seleccionadas. Por este medio se calculó el ruido de fondo de la imagen el cual se subtrae de la señal original y se obtuvo los transitorios de calcio para cada una de las neuronas registradas (**Figura 9D, E y F**).

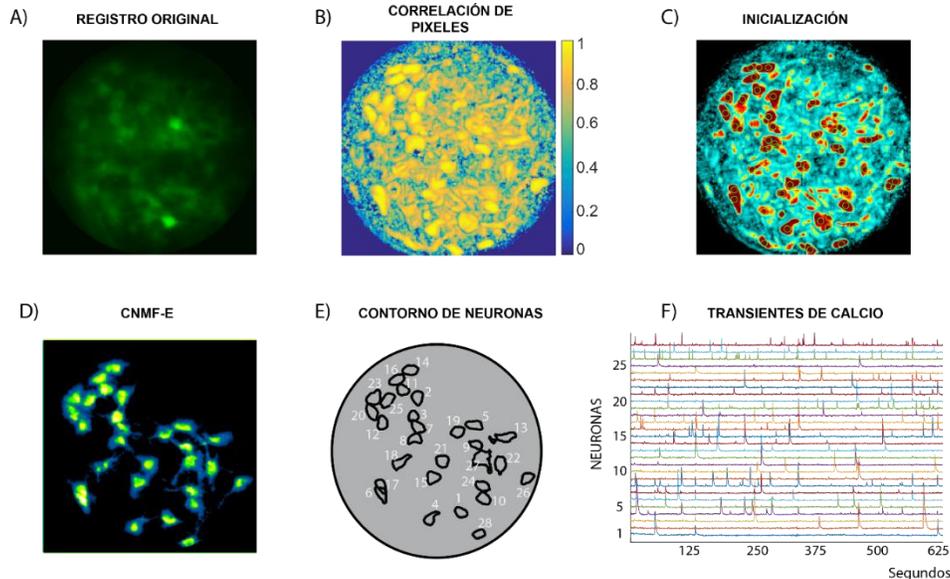


Figura 9. Extracción de ROIs por CNMF-E. A) Registro original obtenido con microscopia confocal y endoscopios en neuronas estriatales. **B)** Cálculo de los parámetros iniciales, en este caso índice de la correlación de pixeles. **C)** Inicialización, regiones de interés calculadas en una aproximación rápida con los parámetros iniciales. **D)** Regiones de interés posterior a la iteración y análisis de componentes espaciales y temporales. **E)** Número y contorno de neuronas calculadas. **F)** Transientes de calcio de las neuronas calculadas.

Alineamiento de las señales de calcio con las señales de la conducta.

Los transitorios de calcio por neurona se alinearon a eventos conductuales. Para alinear ambas señales (conducta y registro) y debido a que una de las preguntas que planteamos es si la activación de calcio sucedía antes del palanqueo, se realizó un remuestreo de la señal de calcio (por aproximación de la fracción racional) **(Figura 10A y B)**. Se realizó esto con el fin de obtener más puntos de la señal de calcio con una tasa de adquisición de 4Hz o 10Hz y compararla con el registro conductual 9 KHz.

Determinación de neuronas moduladas durante la conducta

Las neuronas registradas fueron categorizadas como moduladas de acuerdo a una métrica de área bajo la curva de la Característica Operativa del Receptor (auROC). Para esto se tomó la fluorescencia por ensayo de cada neurona, construyendo una distribución de los ensayos. Se tomó la fluorescencia promedio en un tiempo basal de -4 a -2 segundos antes de que los animales iniciaran el palanqueo y se comparó con los valores de fluorescencia por ventanas de tiempo de 200ms movibles cada 20ms durante la realización de las cadenas de secuencias **(Figura 10C)**. Se tomaron como unidades moduladas a las neuronas con valores por arriba de 0.55, o por debajo de 0.45 de auROC y con un valor de significancia $p < 0.05$ en una prueba de permutación **(Figura 10D)** (Britten et al., 1992; Cohen et al., 2012; Xu 2006).

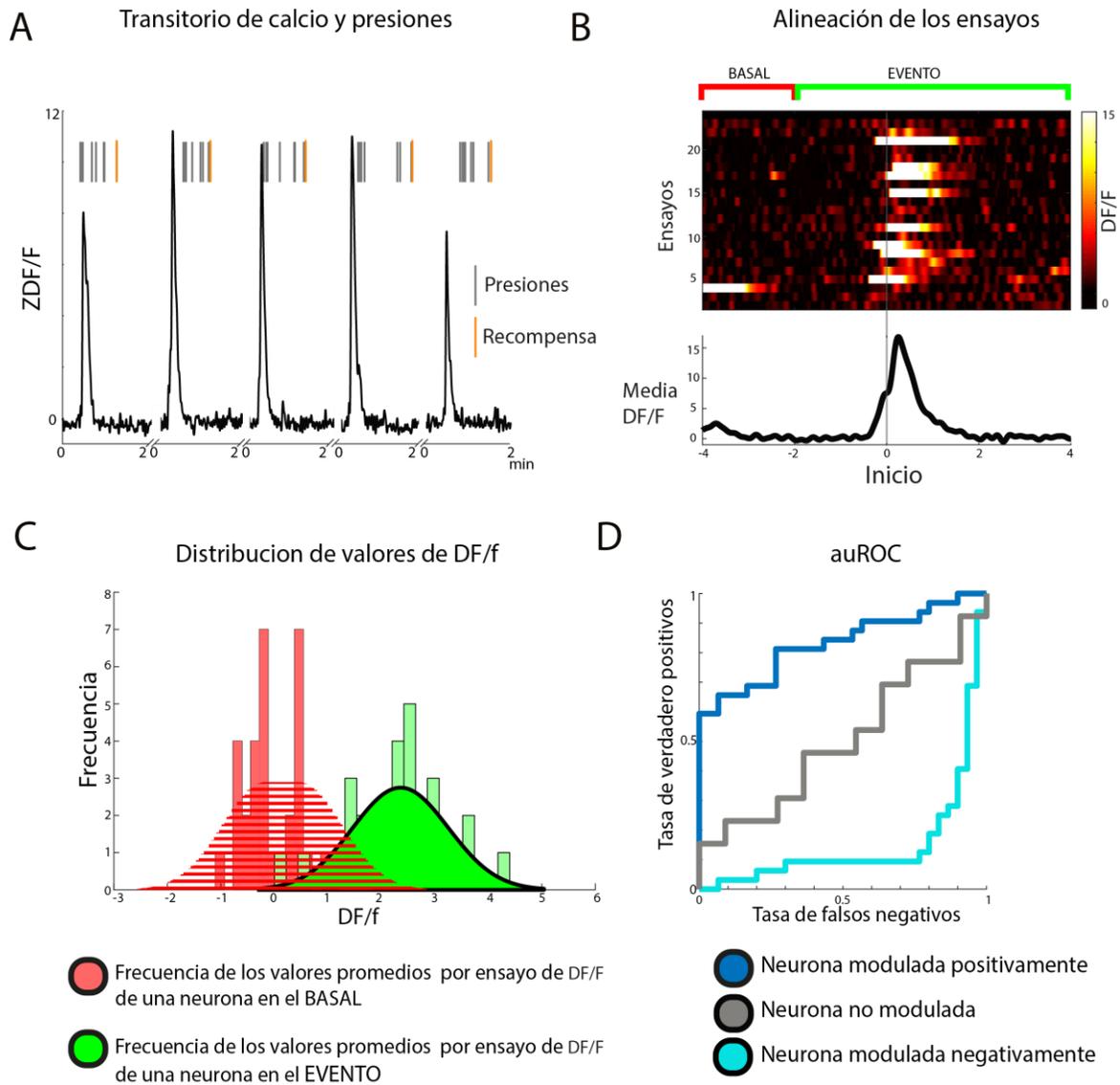


Figura 10. Análisis de la actividad neuronal registrada. A) Transitorio de calcio en cinco secuencias de presiones. **B)** Alineación del registro de una neurona en todos los ensayos al inicio de una secuencia. **C)** Distribución de los valores fluorescencia por ensayo de la basal y el evento a comparar. **D)** Métrica de área bajo la curva de auROC en tres ejemplos para determinar si la neurona fue modulada positivamente o negativamente.

Se utilizó un método de categorización binaria de la actividad neuronal posterior al análisis de auROC. Este consistió en alinear los registros de calcio al inicio-final de la secuencia uno (Evento 1 y 2) y secuencia dos (Evento 3 y 4) (**Figura 11 A**). Se tomó 500ms antes y después de cada evento y se evaluó si la neurona se moduló para cada periodo de tiempo. Si el valor de fluorescencia promedio de todos los ensayos conductuales fue mayor o menor a dos desviaciones estándar con respecto

a la basal de cada neurona entonces se tomó como neurona modulada en ese bin de tiempo. Si la neurona se moduló por arriba de la basal se colocó en un vector un 1 y un -1 si la neurona se moduló por debajo de la basal. Es decir, si la neurona se moduló positivamente para el inicio de la secuencia uno, el vector de modulación para esa neurona sería (1,0,0,0,0,0,0). Se construyó una matriz de vectores y se definieron cinco categorías de neuronas: inicio, transición, final, límites y cadena (Figura 11B).

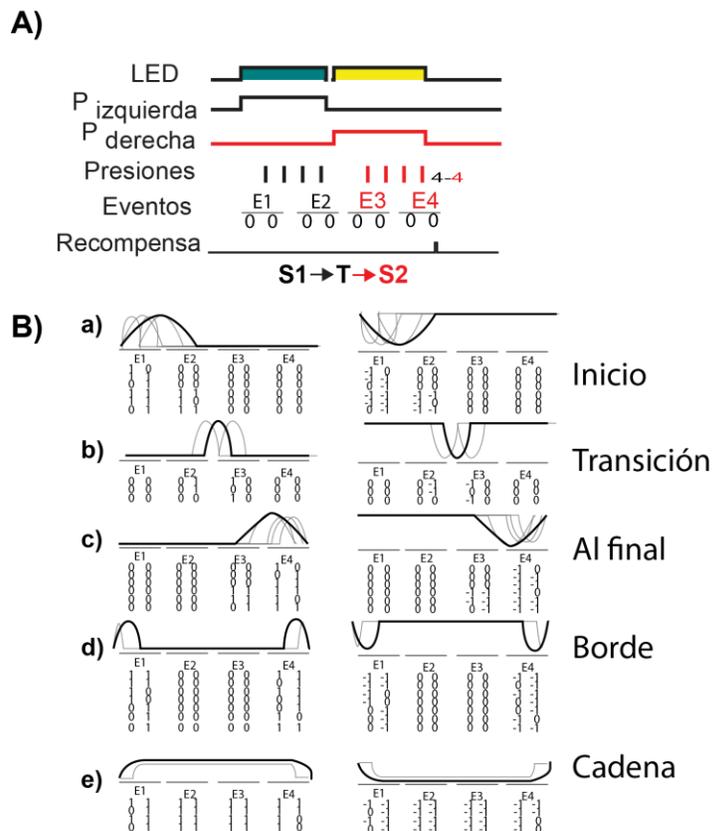


Figura 11. Modulación binaria. Ejemplos de vectores para la categorización de tipos de modulación de las neuronas. A) Tarea conductual de realización de cadenas de acciones **Ba)** Modulación de inicio de la cadena **Bb)** Modulación de transición de la secuencia **Bc)** Modulación de final de la cadena **Bd)** Modulación a los límites de la cadena **Bg)** Modulación durante toda la cadena.

RESULTADOS

Con el fin de facilitar la lectura de los resultados, este apartado se presenta en 4 capítulos. Capítulo I: Datos conductuales que muestran que los ratones son capaces de aprender y realizar una cadena de dos secuencias de acciones en condiciones de cráneo-fijo. Capítulo II: Datos de la optimización de la expresión de GCaMP6f en neuronas estriatales para la imagenología de calcio. Capítulo III: Monitoreo de la actividad de las vías estriatales en la realización de cadenas de secuencias de acciones (fase última del entrenamiento). Capítulo IV: Datos de la modulación de la actividad de neuronas estriatales de las dos vías. Esto durante dos fases del aprendizaje a realizar cadenas de secuencias, i) cuando se realizaron secuencias individuales, ii) primer día en que los animales realizaron la cadena de secuencias.

Capítulo I: Los ratones son capaces de concatenar dos secuencias de acciones en una cadena rápida.

En el entrenamiento de los animales a realizar secuencias de acciones (**Figura 12A**), la figura 12B muestra el progreso de los animales a realizar presiones en secuencias cada vez más rápidas. Nótese que en las primeras etapas (8P/12seg, 4P/8seg) hubo dos sesiones al día, mientras que en las fases tardías (4-2P/8seg, 4-4P/8seg) las dos secuencias se intercalaron en una sola cadena. La figura 12C muestra histogramas de frecuencias de los intervalos en la secuencia 1 (gris) y en la secuencia 2 (rojo) (n=23 animales); ilustrando que el tiempo para realizar las secuencias se acorto conforme avanzo el entrenamiento (Tiempo promedio en realizar una secuencia: 8P/12s= 5.9 ± 1.6 , 4P/8seg= 2.9 ± 1.5 , 4P/4seg= 1.63 ± 0.7 , 4-2P/8seg= 1.29 ± 0.96 , 4-4P/8seg= 1.62 ± 0.89 ; $p < 0.0001$ (1vs2,3,4,5), $p < 0.0001$ (2vs3,4,5), $p < 0.05$ (3vs4), $p < 0.05$ (4vs5), Kruskal-Wallis, **Figura 12D**). De la misma manera, los ratones realizaron con mayor rapidez la cadena de acciones (Intervalo de presiones 4P/4seg = 0.93 ± 0.29 , 4-2P/8seg= 0.68 ± 0.28 , 4-4P/8seg= 0.49 ± 0.1 , $p < 0.05$ (3 vs 4,5), $p < 0.05$ (4 vs 3,5) Kruskal-Wallis, **Figura 12D**).

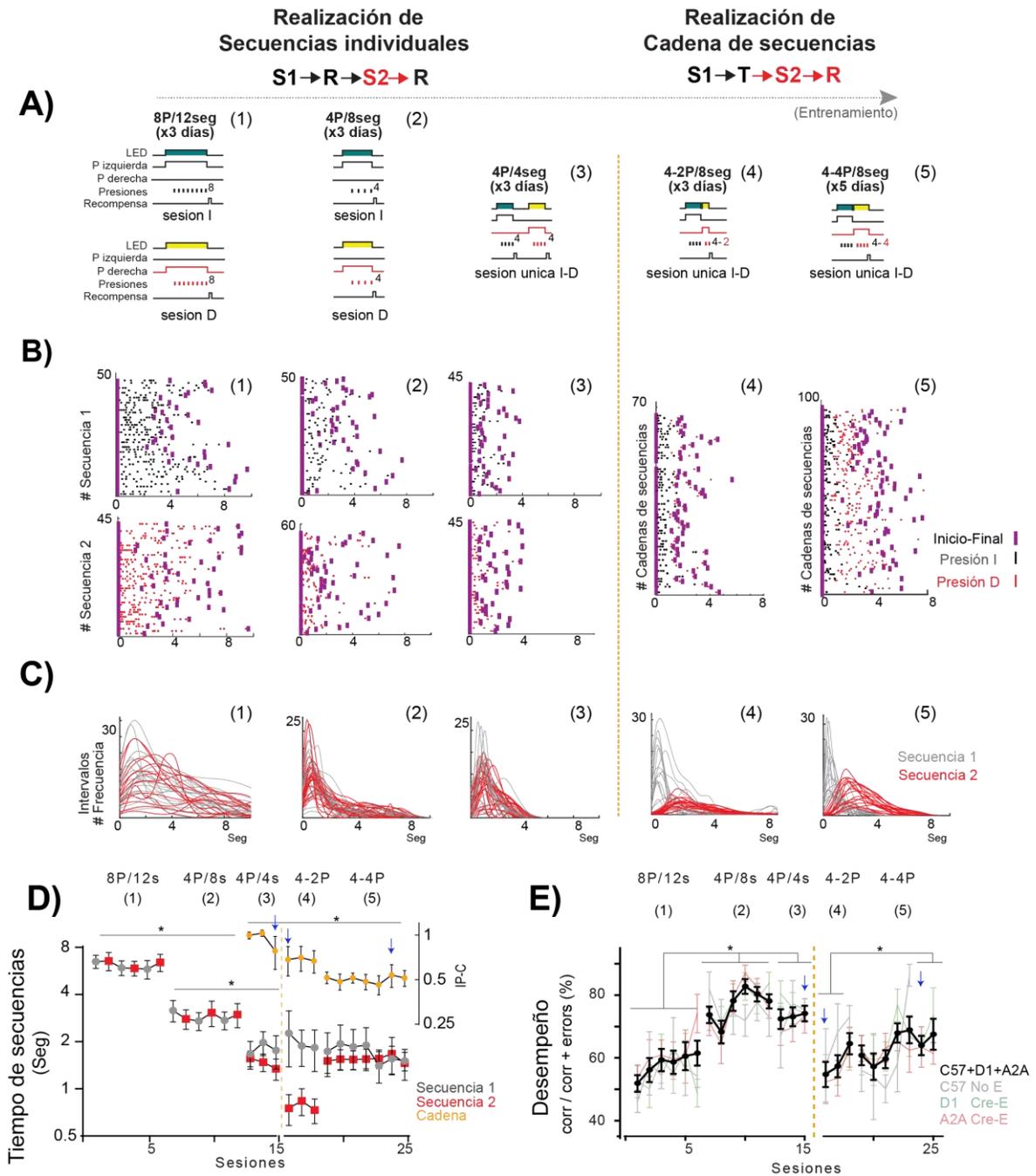


Figura 12. Los ratones son capaces de desarrollar cadenas de secuencias de acciones en condiciones de cabeza fija. A) Esquema de la tarea conductual en sus distintas etapas **B)** Gráfico de presiones en secuencia; ejemplos representativos de la realización de secuencias- cadenas en la última sesión de cada etapa. Gris, secuencia izquierda, rojo, secuencia derecha **C)** Ajuste kernel de la distribución de las presiones al final de cada etapa conductual de 23 ratones. **D)** Gráfico que muestra el tiempo de ejecución durante el entrenamiento de los ratones en las distintas etapas conductuales, en flechas azules se muestran los días de registro. **E)** Gráfico que muestra el desempeño conductual en la tarea medido como el número de ensayos correctos, entre el número de intentos, en flechas azules los días de registro E: animales con endoscopio, No E: animales que no tuvieron endoscopios.

El desempeño (medido como el número de secuencias correctas entre el número de intentos totales) también mejoró en el desarrollo de secuencias de acciones rápidas y en cadena de secuencia comparando las primeras dos etapas iniciales del desarrollo de secuencias de acciones y cadena de secuencias (Número de secuencias correctas entre el número de intentos totales: 8P/12s= 0.51 ± 0.1 , 4P/4s= 0.76 ± 0.1 , $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis; 4-2P/8seg= 0.58 ± 0.1 , 4-4P/8seg= 0.68 ± 0.1 , $p < 0.05$, U Mann Whitney, **Figura 12E**).

En las etapas en donde se hicieron los registros se realizó la cuantificación de distintas métricas como: La latencia iniciar, que es el tiempo que tardaron los animales iniciar las secuencias una vez que se les presentó la palanca para presionar, el tiempo de ejecución de las secuencias y cadena, el tiempo a transitar de la secuencia uno a la dos y el intervalo temporal de las presiones. Para el caso de la latencia a iniciar no se encontraron diferencias significativas al comparar la última sesión de 4P/4seg contra la primera sesión de 4P-2P/8seg y la última de 4P-4P/8seg, ($n=21$, 8 ± 5.9 seg para 4P/4seg, $n=17$ 11 ± 7 seg para 2P/8seg, $n=17$ 13 ± 6 seg para 4P-4P/8seg, $p > 0.05$, Kruskal-Wallis) (**Figura 13A**). En el tiempo total de la ejecución de la cadena, se encontró una disminución significativa en el tiempo de la realización de la cadena (4-2P/8seg) versus la realización de las dos secuencias de manera individual 4p/8seg, pero no para los tiempos de la cadena comparando la fase temprana versus la tardía (datos: **Figura 13B**).

Sorprendentemente lo que si observamos es que los animales hicieron más rápido el cambio entre secuencias, disminuyendo el tiempo de transición ($n=21$, 10 ± 2 seg para 4p-4seg, $n=17$ 3.6 ± 0.8 seg para 4p-4seg, $n=17$ 1.6 ± 0.2 seg para 4p-4seg, $p < 0.05$, Kruskal-Wallis) (**Figura 13C**).

Para los intervalos entre presiones de las secuencias realizadas no se encontró diferencias significativas en la manera que presionaban en las etapas evaluadas ($n=42$, 0.38 ± 0.2 seg para 4P-4seg, $n=33$ 0.38 ± 0.1 seg para 4P-4seg, $n=30$ 0.4 ± 0.1 seg para 4P-4seg, $p > 0.05$, Kruskal-Wallis) (**Figura 13D**).

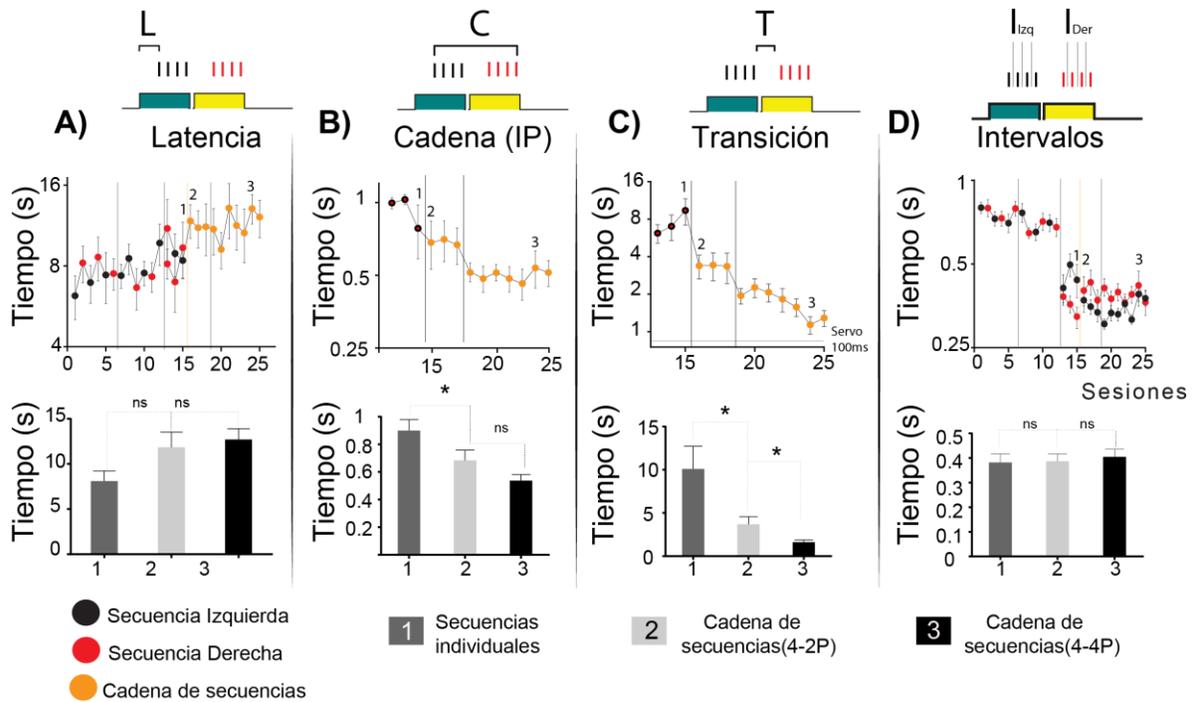


Figura 13. Medición de parámetros en la ejecución de secuencias individuales y cadena de secuencias de acciones. **A)** Latencia a iniciar las secuencias o cadena, panel inferior comparación de las tres etapas de registro. **B)** Tiempo en desarrollar la secuencia o la cadena en el intervalo entre presiones promedio, panel inferior comparación de las tres etapas de registro. **C)** Tiempo a transitar de una secuencia a otra, panel inferior comparación de las tres etapas de registro **D)** Intervalos entre presiones de cada una de las secuencias, panel inferior comparación de las tres etapas de registro.

Como resumen de este capítulo, los animales son capaces de realizar cadenas de secuencias en cabeza fija. El desempeño mejoró y el tiempo de la ejecución de secuencias se aceleró conforme avanzó en el entrenamiento. La latencia para iniciar no mostró diferencias. Las cadenas de acciones cada vez fueron más rápidas como resultado de la aceleración de la transición y no del acortamiento de los intervalos entre presiones.

Capítulo II: Optimización de la expresión de GCaMP6f en neuronas estriatales para la imagenología de calcio.

Para obtener registros funcionales de la actividad neuronal en la tarea conductual se realizaron experimentos de diferentes diluciones del vector viral para la expresión de GCaMP6f. El número de células expresando GCaMP6f en las diferentes diluciones no mostro diferencias (Media por cuadrante: No dilución= 4.3 ± 2 , 1:1= 4.9 ± 3 , 1:2= 4.8 ± 3 , 1:8= 4.6 ± 2 ; n=175 células promedio por condición, $p > 0.05$, ANOVA; **Figura 14G**).

La estimación de la intensidad de fluorescencia se realizó tomando regiones de interés de las neuronas y normalizado los valores de fluorescencia al valor más alto de intensidad de todas las neuronas analizadas. En las diferentes diluciones se encontró que las diluciones presentaron una menor intensidad de la marca comparado con la condición no diluida (Media de intensidad por célula, No dilución= 68.7%, dilución 1:1= 42.4%, dilución 1:2= 32.7%, dilución 1:8= 44.25%; n=46 células promedio por condición $p < 0.05$, prueba ANOVA; **Figura 14H**).

Para valorar si las diferentes diluciones repercutían en la calidad de la imagenología de calcio in vivo, en una serie de animales inspeccionamos los transitorios de calcio en animales tratados con diferentes diluciones e implantados con endoscopios para visualizar a las neuronas estriatales. De este set de experimentos observamos que la dilución 1:8 mostro la más alta probabilidad de registro in vivo (evaluado como proporción de animales presentando imagen con transitorios de calcio) (**Figura 14I**).

Como resumen de este capítulo, la dilución 1:8 del vector viral GCaMP6f presento mejores condiciones de registro. Razón por la que se utilizó en los siguientes experimentos de registro en las vías de los ganglios basales.

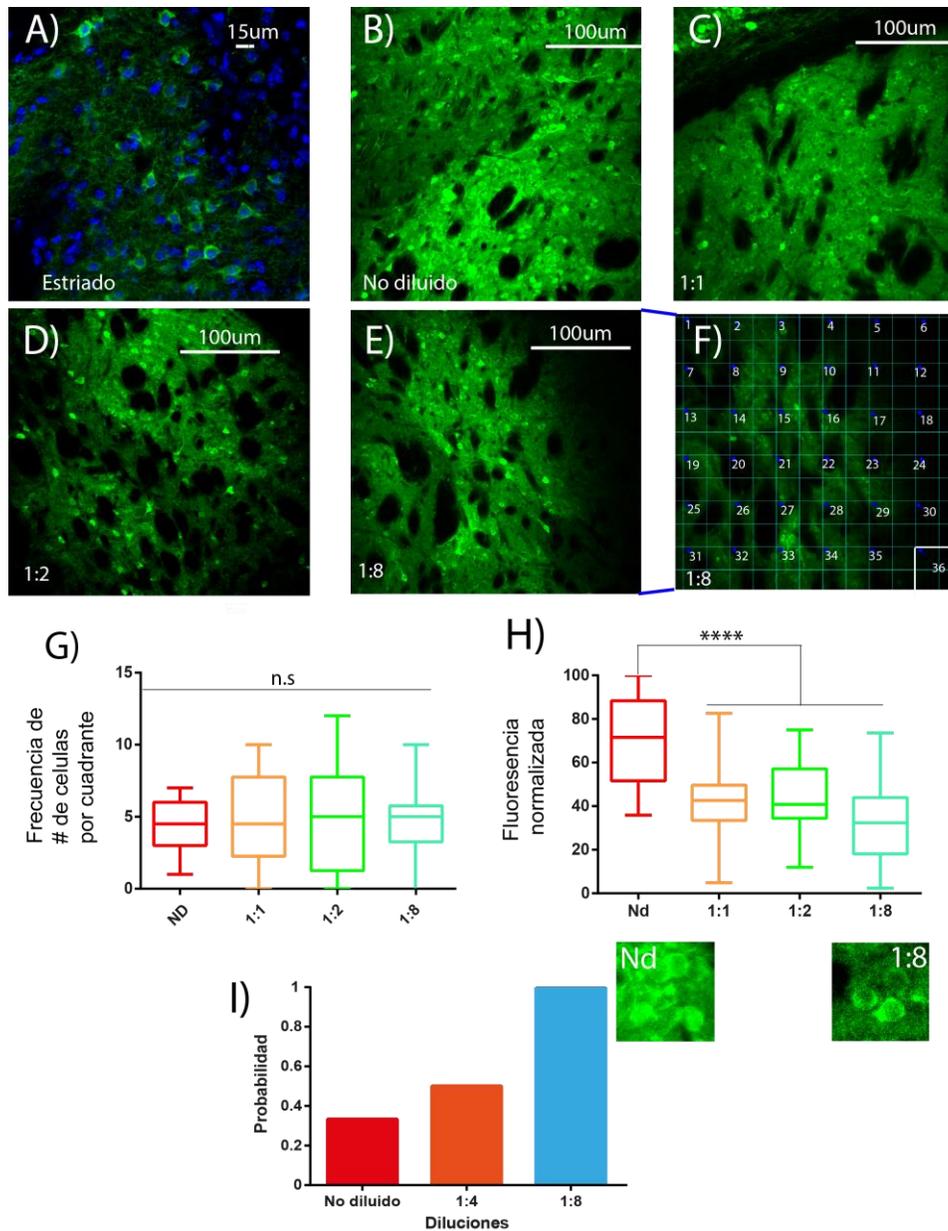


Figura 14. Estandarización de la expresión del sensor de calcio GCaMP6f-Syn en el estriado dorsal de ratones(C57BL/6J). **A)** Expresión de GcaMP6f en el estriado dorsal de ratones en verde y en azul núcleos marcados con intercalador de DNA Hoechst. **B) C) D) E)** Expresión de GcaMP6f en distintas diluciones, No Diluido, 1:1, 1:2 y 1:8 respectivamente. Inserto representativo de donde se realizó conteo celular por cuadrante (Dimensiones de 607x607µm por 6.3µm en el eje Z con 28 imágenes por dilución). **F)** Imagen representativa de los 36 cuadrantes creados para hacer el conteo celular, en dilución 1:8 **G)** Media y error del conteo de células por cuadrante de las distintas diluciones. **H)** Valor de fluorescencia normalizado al valor más alto de intensidad. **I)** Probabilidad de obtener imagen funcional en las distintas diluciones.

Capítulo III: Actividad de las neuronas del estriado dorsal durante la realización de una cadena de dos secuencias de acciones

Con los parámetros obtenidos en la fase de optimización, realizamos imagenología de calcio *in vivo* en neuronas estriatales pertenecientes a las vías de los ganglios basales, vía directa y vía indirecta. Durante la ejecución cadenas de secuencias de acciones (fase 4-4P/8 segundos), colectando datos de un total de 14 animales (**Figura 15A**). De estos animales registramos un total de 390 neuronas. Al comparar la actividad basal de las neuronas (4 segundos previos al inicio de la cadena o secuencia) contra ventanas de tiempo durante la realización de cadenas de acciones, el 68 % mostraron ser moduladas (265 neuronas, **Figura 15B**). La figura 15C muestra el valor de modulación con respecto a la basal por ventana de tiempo, de cada una de estas neuronas moduladas a lo largo de la realización de la cadena de secuencias. La Figura 15D muestra ejemplos representativos de los diferentes tipos de modulación que presentaron distintas neuronas: de manera descendente una unidad que se activó al inicio, otra durante la transición de una secuencia a otra, una que se activa al final de la cadena, una que se modula en los límites de la cadena y finalmente una neurona que se modula durante toda la cadena de acciones (**Figura 15Di-Dv**). Del lado derecho de cada uno de estos ejemplos representativos se muestran los ensayos individuales de cada ejemplo.

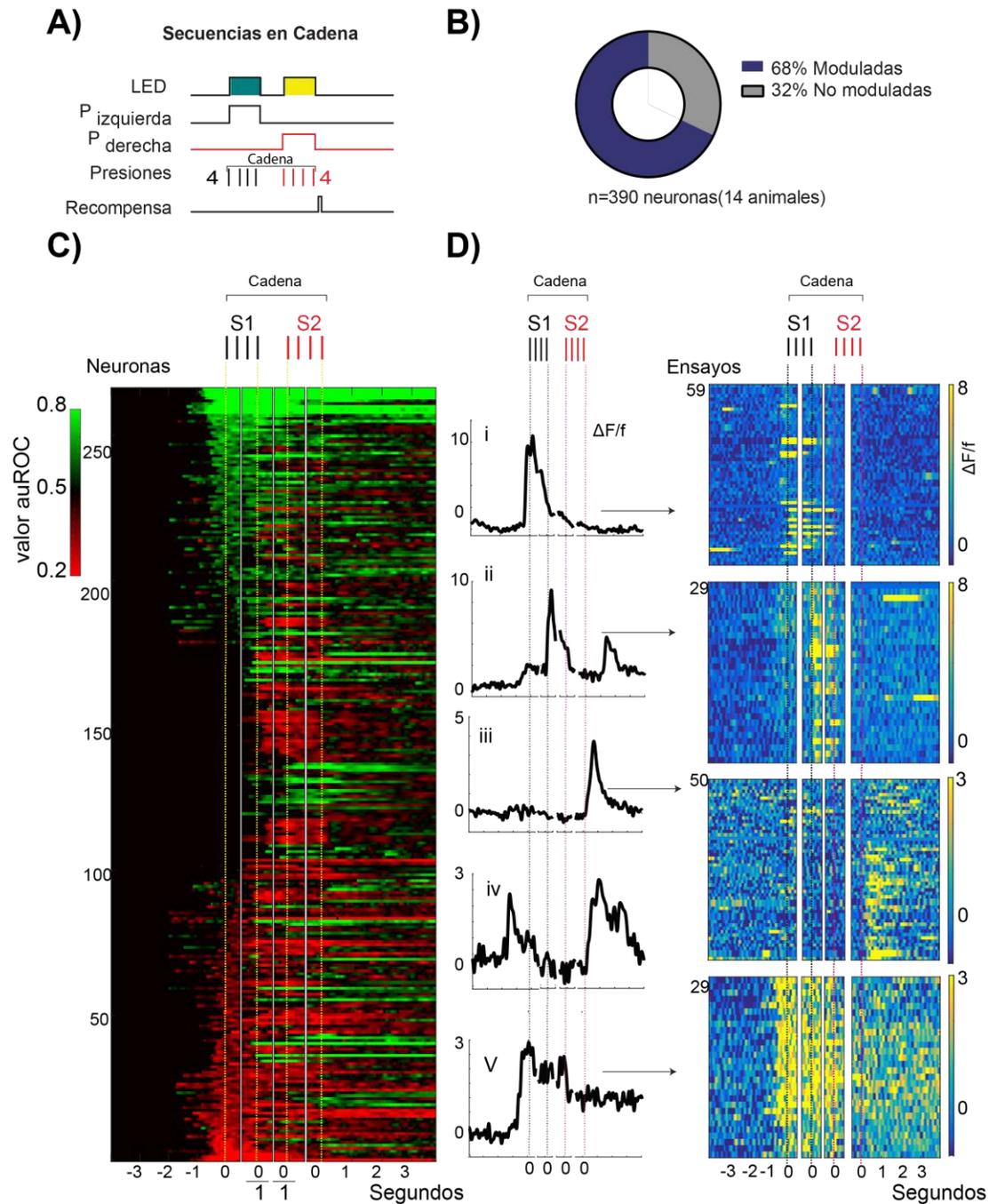


Figura 15. Actividad estriatal en la cadena de secuencias de acciones. **A)** Esquema conductual de la cadena de secuencias de acciones. **B)** Porcentaje de neuronas estriatales moduladas por auROC (n=14 animales). **C)** Valores de la auROC de neuronas estriatales en la cadena de secuencias de acciones. **D)** Ejemplos de diferentes neuronas moduladas a lo largo de la cadena de secuencias de acciones, de manera descendente se observan neuronas de inicio, transición, final, límites, y de cadena. Lado derecho ensayos individuales correctos que componen al promedio presentado a la izquierda.

Las neuronas estriatales de las vías de los ganglios basales se modulan diferencialmente durante la realización de una cadena de secuencias de acciones.

Con el fin de dilucidar la actividad de las neuronas estriatales de cada una de las vías durante la realización de una cadena de acciones, se registró su actividad por medio de GCaMP6f y endoscopios en 6 ratones A2A-Cre GCaMP y 8 D1-Cre GCaMP. La figura 16 muestra fotos coronales representativas de un ratón A2a-Cre y un D1-Cre. Las figuras 16B y D muestran en donde se ubicaron los endoscopios de registro en los animales mencionados para cada línea.

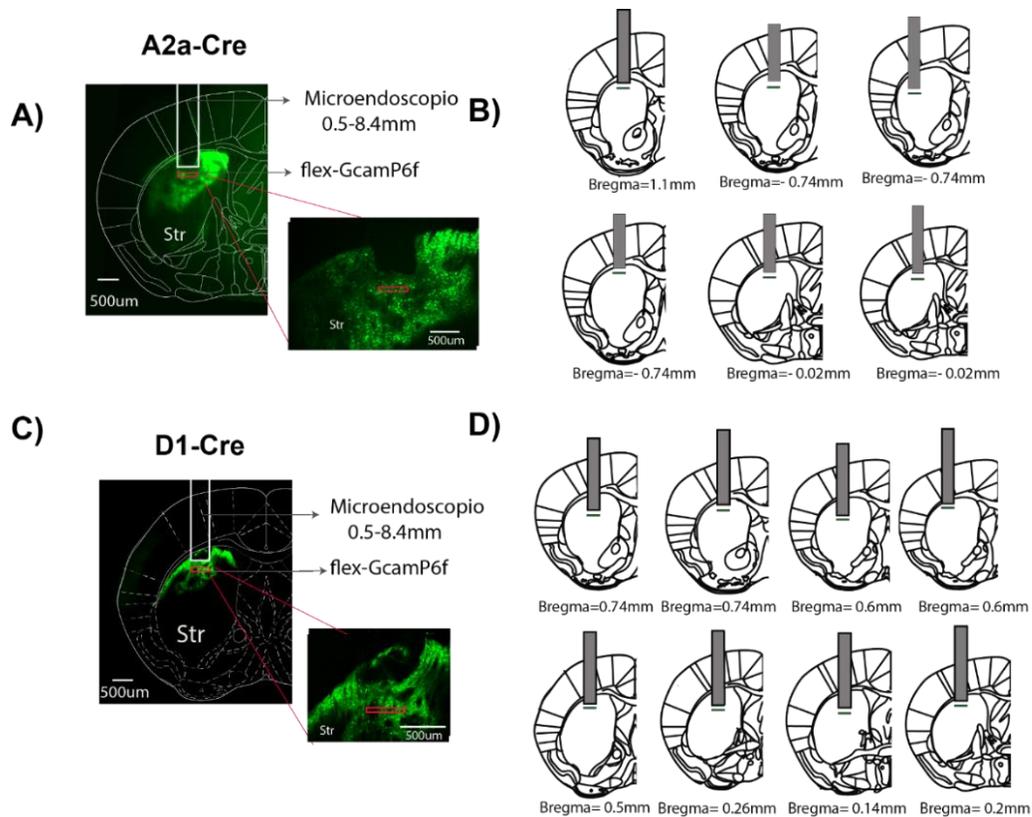


Figura 16. Sitios de registro de neuronas de la vía indirecta (A2a-Cre GCaMP) y vía directa (D1-Cre GCaMP). **A)** Corte coronal de ratón A2a-Cre en donde se muestra el sitio de transfección y la marca dejada por el endoscopio. **B)** Sitios de registro de 6 animales a2- Cre. **C)** Corte coronal de ratón D1-Cre en donde se muestra el sitio de transfección y la marca dejada por el endoscopio. **D)** Sitios de registro de 8 animales D1-Cre.

De las neuronas registradas, el 46% (133/288 dSPN) y el 66% (67/102 iSPN) de la vía directa e indirecta fueron moduladas respectivamente y con categorización binaria durante la realización de la cadena de secuencias de acciones (ver métodos) (**Figura 17B**). Dentro de la clasificación binaria se observó categorías que se comparten entre las vías, difiriendo en la composición de neuronas que compone a cada una de las categorías (**Figura 17C-D**).

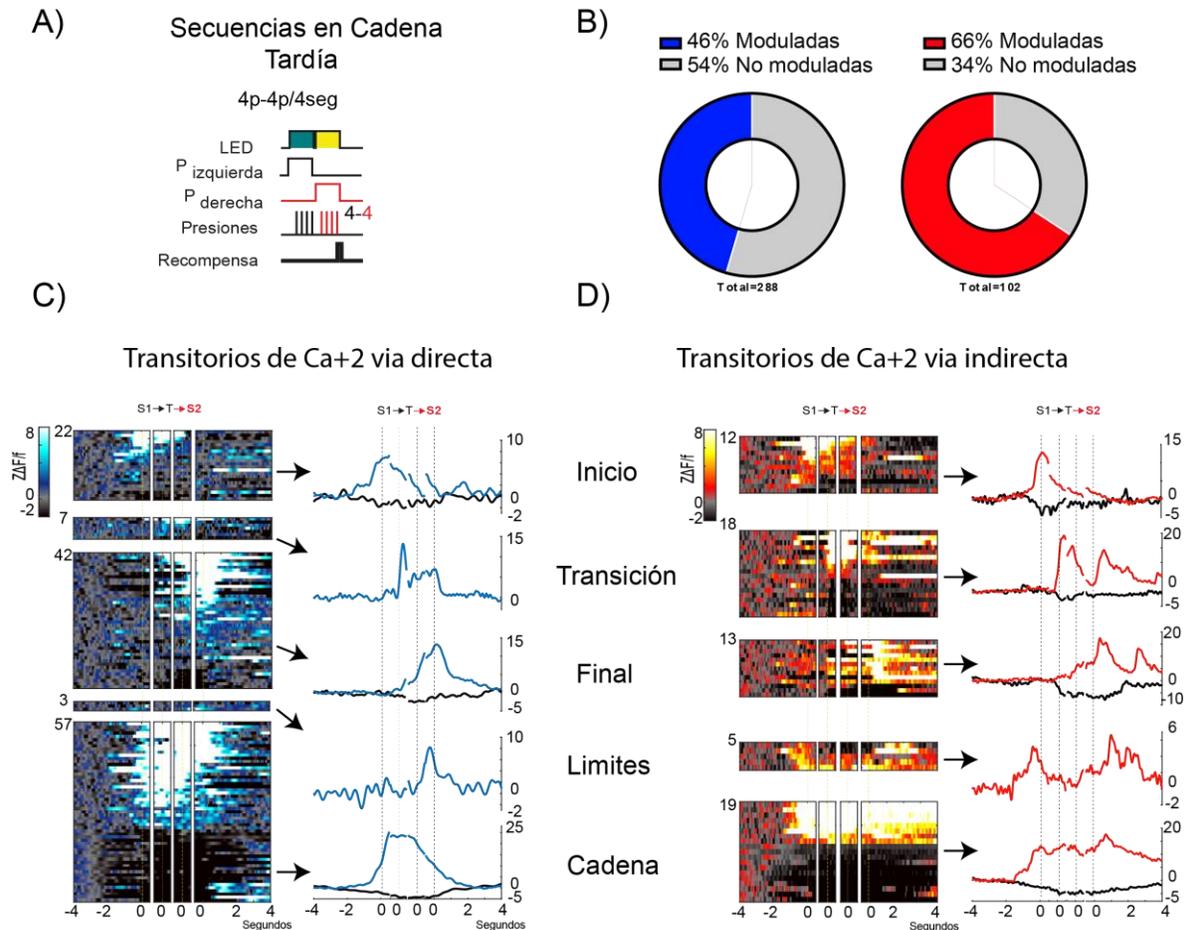


Figura 17 Actividad de neuronas durante la realización de cadenas de secuencias, fase tardía. A) Etapa conductual en la cadena de secuencias de acciones. **B)** Porcentaje de neuronas moduladas para cada una de las vías. **C)** Transitorios de calcio para neuronas moduladas de la vía directa clasificadas como neuronas de inicio, transición, final y de cadena. Panel derecho es el promedio de todas las unidades que forman la categoría. **D)** Transitorios de calcio para neuronas moduladas de la vía indirecta clasificadas como neuronas de inicio, transición, final, límites y de cadena. Panel derecho es el promedio de todas las unidades que forman la categoría.

Se comparó el número de neuronas totales poblacionales en cada categoría contra la media de las proporciones de la categoría por animal. Del total de neuronas registradas para la vía directa se encontró al inicio el 17% de neuronas moduladas y 14% la media por animal, en la transición un total 5% contra un 10% por animal, en el final el 32% contra el 37% por animal, en los límites un total y media por animal del 2% y en la cadena un total del 43% contra el 36% por animal. No se encontraron diferencias significativas al comparar ambas proporciones ($p=0.52$, χ^2) (**Tabla 1. D1-Cre**). En el caso de las neuronas de la vía indirecta se registró un total y media por animal para la categoría de inicio del 18%, un total y media por animal del 27% para la categoría de transición, un total del 19% y una media por animal del 20% para la categoría de final, en la categoría de límites un total del 8% contra un 7% por ratón, y para la categoría de cadena un total y media por animal del 28%. No se encontraron diferencias significativas al comparar ambas proporciones ($p=0.99$, χ^2) (**Tabla 1. A2a-Cre**).

D1-cre		Ratones registrados								Proporción % (Figura 18)	Media de proporciones por animal %	
		1	2	3	4	5	6	7	8			Total
Categorías	Inicio	4	5	4	6	1	2	0	0	22	17	14
	Transición	1	1	0	1	1	1	1	1	7	5	10
	Final	6	7	10	9	3	2	3	2	42	32	37
	Límites	0	0	1	1	1	0	0	0	3	2	2
	Cadena	13	14	14	9	4	1	1	1	57	43	36
	Total	24	27	29	26	10	6	5	4	131		

A2a-Cre		Ratones registrados						Proporción % (Figura 18)	Media de proporciones por animal %	
		1	2	3	4	5	6			Total
Categorías	Inicio	1	5	1	1	2	2	12	18	18
	Transición	2	3	1	5	2	5	18	27	27
	Final	0	2	4	2	3	2	13	19	20
	Límites	0	2	1	1	0	1	5	8	7
	Cadena	4	2	2	8	3	0	19	28	28
	Total	7	14	9	17	10	10	67		

Tabla 1 Número de neuronas por ratón registrado para ambas vías en la ejecución de cadena de secuencias de acciones (etapa tardía).

La comparación estadística por vía y por categoría se presenta en la Figura 18. La comparación de la distribución de proporciones por vías mostro ser diferente ($p < 0.05$, χ^2). Resaltando como las principales diferencias la proporción de neuronas que se modularon durante la transición (vía directa 5% contra vía indirecta 27% $p < 0.05$, prueba de Fisher; 7/131 vía directa, 18/67 vía indirecta) y durante la ejecución de la cadena (vía directa 28/% contra vía indirecta 43%, $p < 0.05$, prueba de Fisher, 19/67 vía indirecta; 57/131 vía directa). Nótese que, en las categorías de inicio, final y de limites no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$, prueba de Fisher).

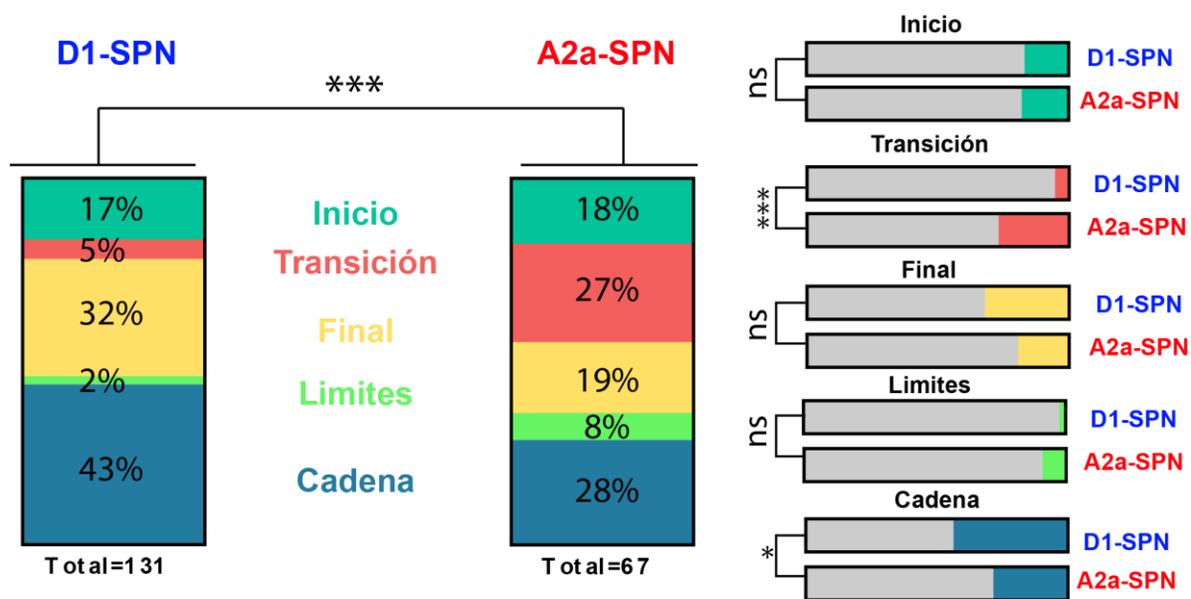


Figura 18 Proporción de neuronas moduladas en la fase tardía de la realización de cadenas de secuencias de acciones para la vía directa y la vía indirecta.

Capitulo IV: No se encontraron diferencias en las proporciones de neuronas reclutadas de la vía directa versus indirecta durante la fase temprana del aprendizaje a realizar la cadena de secuencias de acciones.

Siguiendo la misma metodología descrita para la sección anterior se identificó que el 66% de las neuronas para ambas vías (22/33 vía directa y 40/81 vía indirecta) mostraron modulaciones y clasificación binaria durante la realización de la cadena en el primer día de concatenación de secuencias (**Figura 19B**).

De manera importante se identificaron neuronas de ambas vías en las categorías de inicio, transición, final y cadena. Sin embargo, para la categoría de límites únicamente en la vía indirecta hubo neuronas modulándose (**Figura 19C-D**).

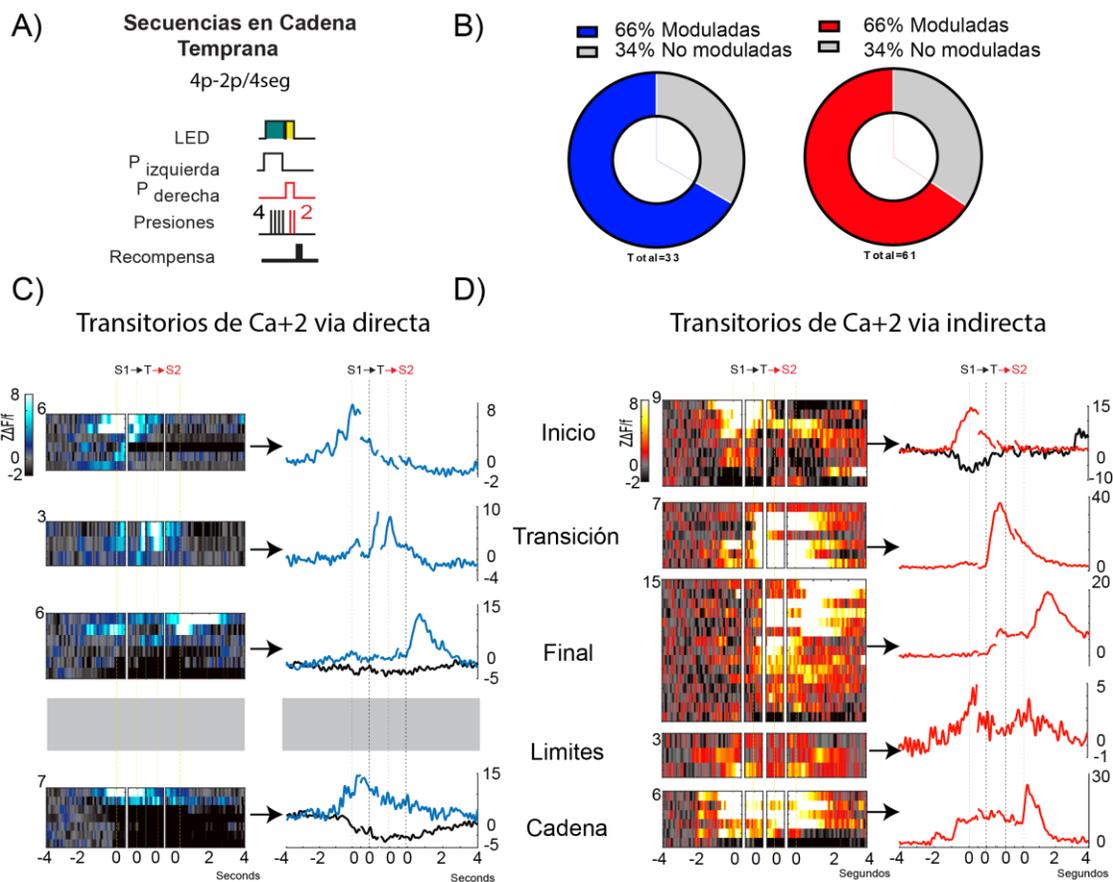


Figura 19. Actividad de neuronas durante realización de cadenas de secuencias, fase temprana. A) Etapa conductual en la cadena de secuencias de acciones temprana. **B)** Porcentaje de neuronas moduladas y no moduladas para cada una de las vías. **C)** Transitorios de calcio para neuronas moduladas de la vía directa clasificadas como neuronas de inicio, transición, final, límites y de cadena **D)** Transitorios de calcio para neuronas moduladas de la vía indirecta clasificadas como neuronas de inicio, transición, final, límites y de cadena.

Se comparó para el primer día de la cadena el número de neuronas poblacionales por categoría contra la media de las proporciones de la categoría por animal. Del total de neuronas registradas para la vía directa se encontró al inicio el 27% de neuronas moduladas y 30% la media por animal, en la transición un total 14% contra un 13% por animal, en el final el 27% contra el 26% por animal y en la cadena un total del 32% contra el 30% por animal. No se encontraron diferencias significativas al comparar ambas proporciones ($p=0.96$, Chi^2) (**Tabla 2. D1-Cre**). En el caso de las neuronas de la vía indirecta se registró un total y media por animal para la categoría de inicio del 23%, un total del 18% y media por animal del 15% para la categoría de transición, un total del 38% y una media por animal del 35% para la categoría de final, en la categoría de límites un total del 8% contra un 10% por ratón, y para la categoría de cadena un total del 15% y media por animal del 17%. No se encontraron diferencias significativas al comparar ambas proporciones ($p=0.94$, Chi^2) (**Tabla 2. A2a-Cre**).

D1-cre		Ratones registrados				Total	Proporción % (Figura 20)	Media de proporciones por animal %
		1	2					
Categorías	Inicio	4	2			6	27	30
	Transición	1	2			3	14	13
	Final	2	4			6	27	26
	Límites	0	0			0	0	0
	Cadena	2	5			7	32	30
	Total	9	13			22		

A2a-Cre		Ratones registrados				Total	Proporción % (Figura 20)	Media de proporciones por animal %
		1	2	3	4			
Categorías	Inicio	1	4	2	2	9	23	23
	Transición	0	2	2	3	7	18	15
	Final	1	2	7	5	15	38	35
	Límites	1	1	0	1	3	8	10
	Cadena	1	3	1	1	6	15	17
	Total	4	12	12	12	40		

Tabla 2. Número de neuronas en las categorías por ratón registrado para ambas vías.

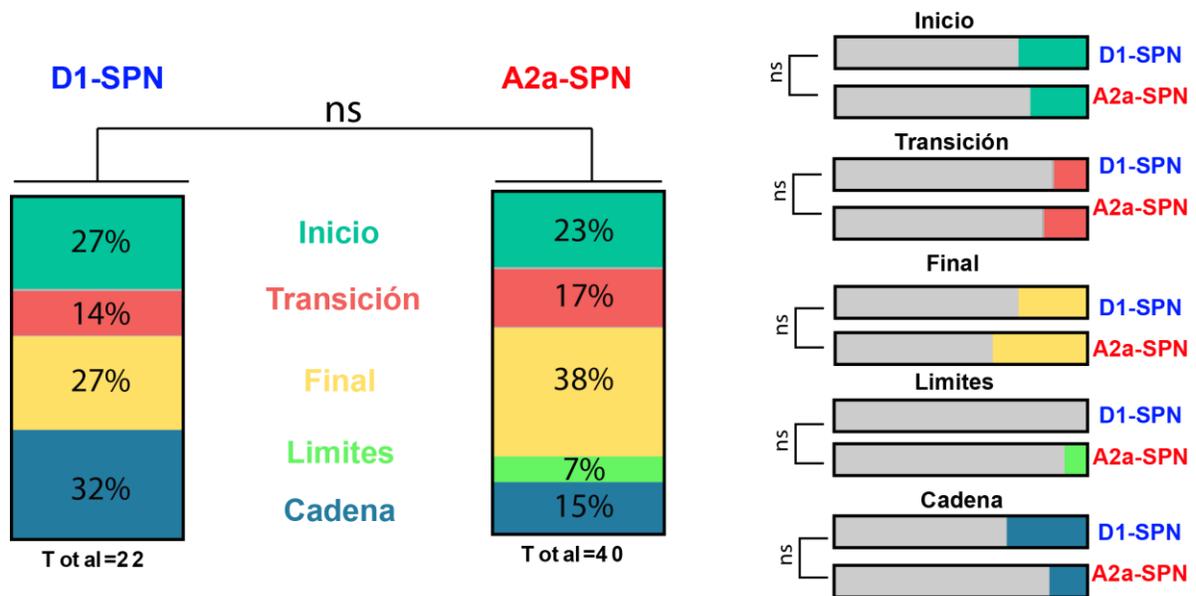


Figura 20. Proporción de neuronas moduladas en la secuencia de acciones en cadena temprana para la vía directa y la vía indirecta.

La comparación de las proporciones para las vías en la cadena de secuencias de acciones temprana no mostro ser diferente ($p > 0.05$, Chi^2). De manera importante ambas vías se modularon de manera similar en la transición (vía directa 14% contra vía indirecta 17%, $p > 0.05$, prueba de Fisher, 3/33 vía directa; 7/61 vía indirecta). La categoría de cadena tampoco mostró diferencias significativas en la proporción de neuronas moduladas (vía directa 32% contra vía indirecta 15%, $p > 0.05$, prueba de Fisher, 7/22 vía directa; 6/40 vía indirecta).

No se encontraron diferencias en las proporciones de neuronas reclutadas de la vía directa versus indirecta durante la realización de secuencia individuales antes de aprender a hacer cadenas de secuencias.

Siguiendo la misma metodología descrita para la sección anterior, durante la realización de secuencias individuales (4P/4Seg), previo al entrenamiento a realizar cadenas de secuencias de presiones se identificó que el 36% y el 46% de las neuronas de la vía directa e indirecta respectivamente (12/37 vía directa y 34/64 neuronas) mostraron modulaciones y clasificación binaria durante la realización de las secuencias individuales (**Figura 21B**). En esta etapa del aprendizaje la proporción de las categorías existentes no mostró diferencias significativas (Para la vía directa contra la indirecta, inicio 50% vs 38%; Final 33% vs 35%; Cadena 17% vs 27%; $p > 0.05$, χ^2) (**Figura 22**).

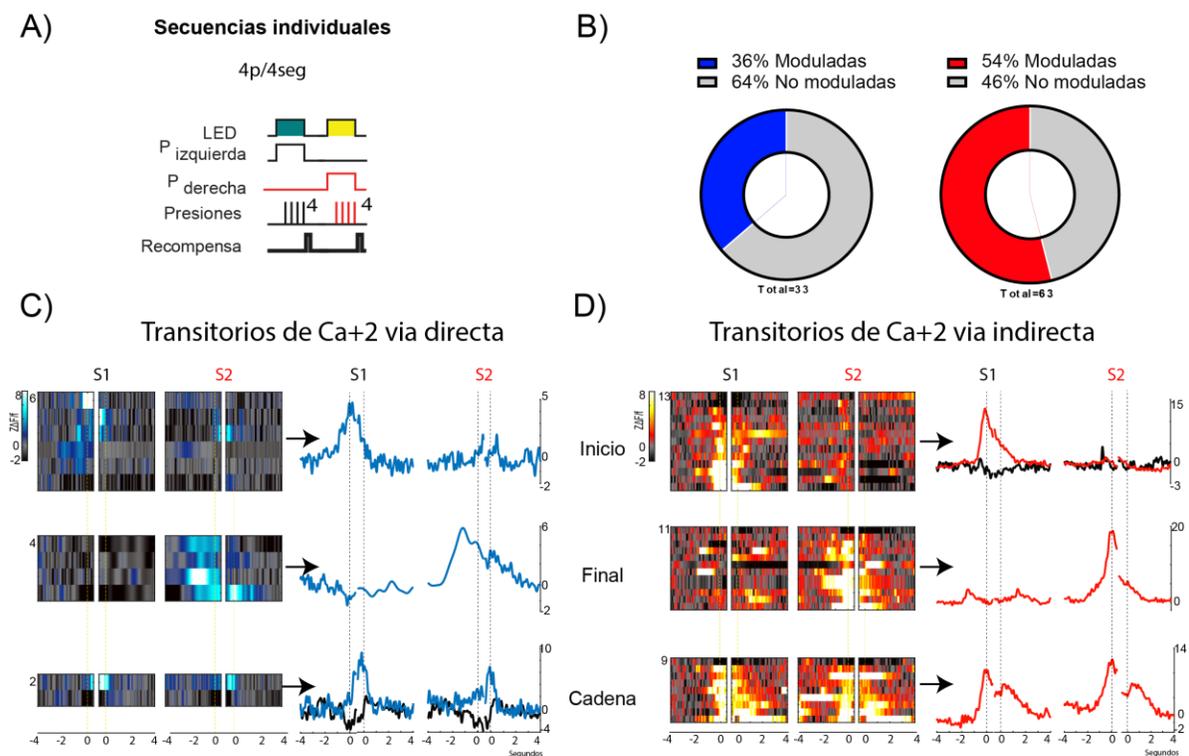


Figura 21. Actividad de neuronas durante la realización de secuencias individuales. **A)** Etapa conductual en la cadena de secuencias de acciones temprana. **B)** Porcentaje de neuronas no moduladas y moduladas, para cada una de las vías. **C)** Transitorios de calcio para neuronas moduladas de la vía directa clasificadas como neuronas de inicio, final y cadena. **D)** Transitorios de calcio para neuronas moduladas de la vía indirecta clasificadas como neuronas de inicio, final y de cadena.

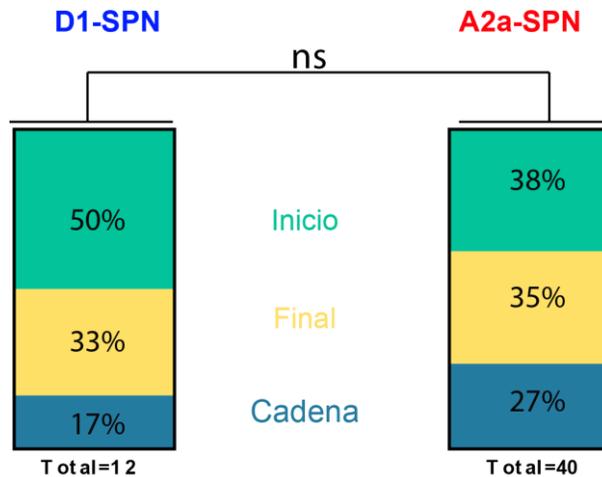


Figura 22. Proporción de neuronas moduladas durante la realización de secuencias individuales.

Comparación de la modulación de las vías a lo largo del aprendizaje al realizar una cadena de dos secuencias de acciones.

Para responder si las vías se modularon de manera diferencial a lo largo del entrenamiento a realizar cadenas de secuencias se realizó la comparación de las proporciones de neuronas moduladas por vía a lo largo de las tres etapas de registro (1: secuencias independientes; 2: fase temprana del aprendizaje a realizar cadenas de secuencias; 3: fase tardía de la realización de cadenas de secuencias). De esta comparación identificamos que la vía directa tuvo cambios significativos en el número de neuronas moduladas a lo largo de las tres etapas de registro [(1) 36%, (2) 66% vs (3) 45%, $p < 0.05$, Chi^2] (**Figura 23A**), pero no la vía indirecta [(1) 54%, (2) 66% vs (3) 66% $p > 0.05$, Chi^2] (**Figura 23D**). La comparación de las proporciones por categoría no mostro diferencias en la comparación para la vía directa ($p > 0.05$, Chi^2) (**Figura 23B**), pero si para la vía indirecta del día de secuencias individuales a la fase temprana del aprendizaje a realizar cadenas de secuencias ($p < 0.05$, Chi^2) (**Figura 23E**). Finalmente, al hacer una comparación de la proporción de neuronas moduladas dentro de cada una de las categorías se encontró que los mayores cambios para la vía directa en las tres etapas de registro fueron en el Inicio [(1) 50% vs (2) 27% vs (3) 17% $p < 0.05$, Chi^2 Cochran-Armitage] y Cadena [(1) 17% vs (2) 32% vs (3) 43% $p < 0.05$, Chi^2 Cochran-Armitage] (**Figura 23C**). Mientras que para

la vía indirecta fue en la etapa de inicio [(1) 38% vs (2) 23% vs (3) 18% $p < 0.05$, χ^2 Cochran-Armitage] y transición [(1) 0% vs (2) 17% vs (3) 27% $p < 0.05$, χ^2 Cochran-Armitage] (**Figura 23F**).

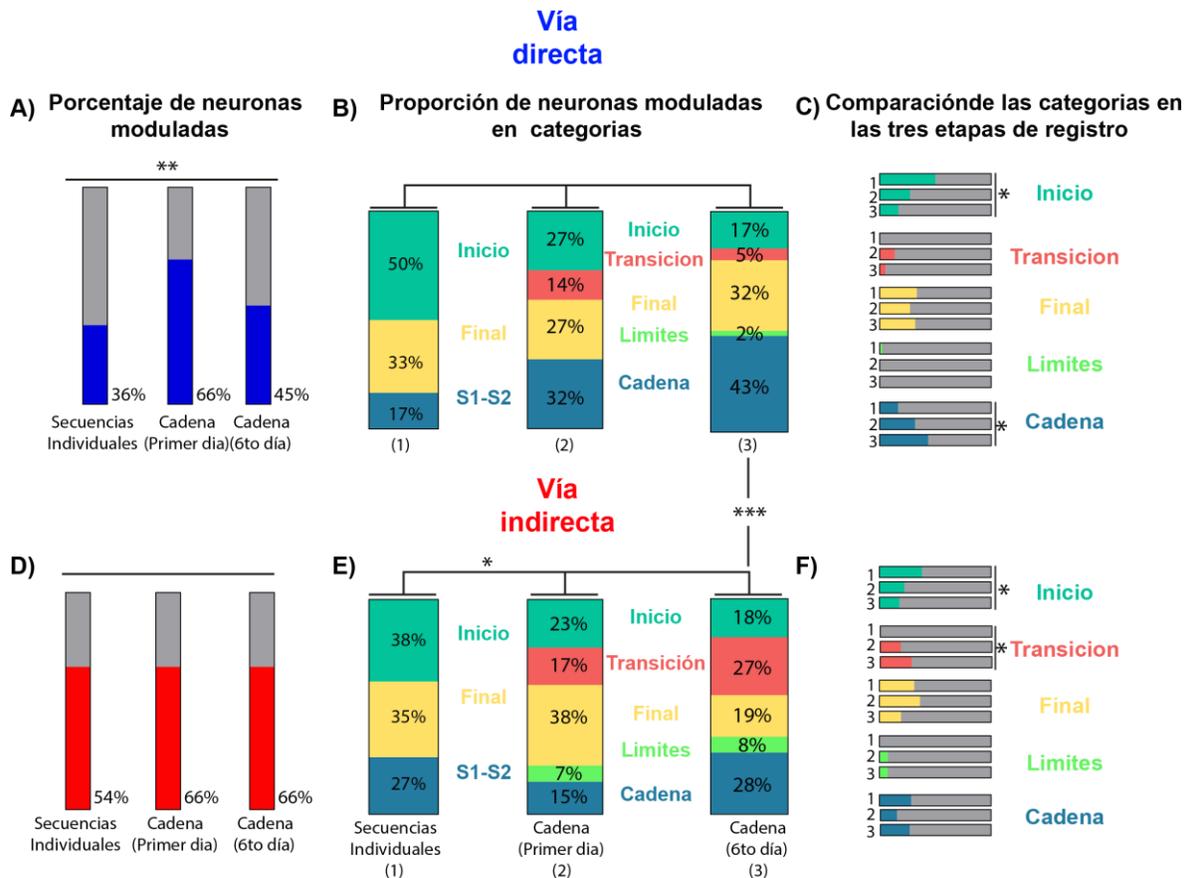


Figura 23 Proporción de neuronas moduladas por categoría en tres etapas del aprendizaje al realizar cadenas de secuencias de acciones. A) Número de neuronas reclutadas para la vía directa 1: la ejecución de secuencias independientes; 2: fase temprana del aprendizaje al realizar cadenas de secuencias; 3: fase tardía de la realización de cadenas de secuencias. **B)** Proporción de neuronas para todas las categorías de la vía directa **C)** Comparación por categoría para las proporciones de neuronas moduladas en las tres etapas de registro de la vía directa. **D-F)** similar a A-C en este caso para neuronas de la vía indirecta.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo de tesis muestran que los ratones en condiciones de cabeza fija son capaces de realizar una cadena de dos secuencias de acciones (**Figura 12-13**) y que es posible monitorear la actividad neuronal de las vías estriatales, por medio del sensor de calcio GCaMP6f, endoscopios y microscopia confocal (**Figuras 14-19**), a lo largo del aprendizaje y ejecución de una cadena de dos secuencias de acciones (**Figuras 17-23**). Específicamente al medir la actividad de neuronas individuales de las vías estriatales identificamos que la proporción de neuronas que participan por vía y sus categorías de modulación son diferentes una vez que los animales ya realizan de manera estereotipada la cadena de secuencias de acciones (fase tardía de cadenas de secuencias; **Figura 17-18**), pero que esta diferencia entre vías no existió ni en la fase temprana de la cadena (**Figura 19-20**) ni cuando los animales realizaban secuencias independientes antes de concatenarlas en cadena (**Figura 21-22**). De manera importante también reportamos que la vía directa tiene un mayor reclutamiento de neuronas en la fase temprana de concatenación de dos secuencias de acciones (**Figura 23**) y que a lo largo del aprendizaje a realizar una cadena de secuencias de acciones la vía directa reclutó un mayor número de neuronas durante la transición y la vía directa durante la ejecución completa de la cadena de secuencias (**Figura 23**).

Los animales concatenaron dos secuencias de acciones en una cadena de secuencias

Los resultados obtenidos de la conducta muestran que los ratones son capaces de realizar cadenas de secuencias de acciones, en condiciones de cabeza fija, y van mejorando su desempeño conforme avanza el entrenamiento (**Figura 12-13**). De manera muy importante identificamos que la latencia para iniciar, fue de alrededor de diez segundos. Esto a pesar de que la exposición de las palancas junto con la señal de los LEDs fue un estímulo que pensamos les indicaría cuando empezar, los animales esperaban estos 10 segundos antes de comenzar a presionar. Este resultado es muy importante, ya que al esperar tanto tiempo para iniciar nos permite

argumentar que los animales decidían cuando iniciar, en oposición a solo esperar el estímulo externo que les decía cuando empezar. Esto nos permite decir que los datos aquí presentados, en lo que respecta al inicio, muestran actividad estriatal detrás de una auto-iniciación de acciones, en oposición a acciones estímulo-respuesta (Kandell et al., 2002).

Para poder evaluar si los animales realmente concatenaron dos secuencias de acciones dentro de una sola cadena cuantificamos la manera en que presionaban. De estas mediciones observamos que a lo largo del entrenamiento los animales realizaron la cadena de secuencia de acciones cada vez más rápido. Esta reducción en tiempo no se debió a una modificación en la manera en la que presionaban (el intervalo de presiones no cambio; **Figura 13D**), sino a una disminución en el tiempo para transitar de la primera secuencia a la segunda (De 4 segundos en la fase temprana del entrenamiento a 1.2 segundos en la fase tardía; **Figura 13C**). Esta aceleración en la transición entre acciones ha sido previamente documentada como un argumento de concatenación de acciones (Jin et al., 2014).

Imagenología de calcio por medio de GCaMP6f, microendoscopios, y microscopia fotónica.

La adquisición de transitorios de calcio como reportero de la actividad de las neuronas estriatales ha sido ampliamente documentado *ex vivo* por el grupo del Dr. Bargas (García-Vilchis et al., 2018; Pérez-Ortega et al., 2016). Sin embargo, *in vivo* solo en los últimos años ha sido abordado (Barbera et al., 2016; Klaus et al., 2017; J. G. Parker et al., 2018). El presente trabajo constituye, dada la literatura revisada, una de las primeras aproximaciones a la imagenología de calcio en cabeza fija de neuronas del estriado mientras los animales desarrollan una conducta operante por medio de microendoscopios y microscopia confocal. La decisión de utilizar microscopia confocal se basó en que este tipo de microscopia nos permitió adquirir un plano focal de alrededor de 20 micras, incrementando la probabilidad de detectar un mayor número de neuronas en comparación a haber usado microscopia de dos fotones (plano focal de una micra) (datos de comparación no mostrados). Una

posibilidad para explicar por qué obtuvimos mejor probabilidad de registro utilizando el vector viral de GCaMP6f diluido pudiera ser que al transfectar un menor número de partículas virales por neurona el rango de detección de cambios en fluorescencia se podría haber visto favorecido (ver **Figura 14**). Esto aunado a un mayor plano focal en microscopia confocal nos inclinó a desarrollar este estudio con confocal.

La modulación de las vías estriatales es diferencial durante la ejecución de la cadena de secuencias de acciones en la fase tardía.

Durante la ejecución de la cadena de secuencias en la etapa tardía, se encontró una mayor proporción de neuronas de la categoría de transición para la vía indirecta que para la vía directa, sin embargo, hubo una mayor participación en la ejecución de la cadena para la vía directa que para la vía indirecta. La diferencia dentro de estas categorías concuerda con lo que esperado dentro de las hipótesis (Jin & Costa, 2015; Tecuapetla et al., 2016) y sugiere un papel diferencial en la manera en la que las neuronas de las vías estriatales se activan para codificar parámetros de la cadena de secuencias de acciones (**Figura 24**). La vía indirecta podría estar dirigiendo el cambio entre los componentes de la cadena mientras que la vía directa podría preferentemente guiar los parámetros de la ejecución de la cadena. No obstante, para fortalecer estas sugerencias se necesitan más análisis y/o experimentos para poner a prueba la causalidad de esta actividad (e.g. regresiones lineales de la actividad neuronal versus parámetros conductuales como la latencia a iniciar o a transitar).

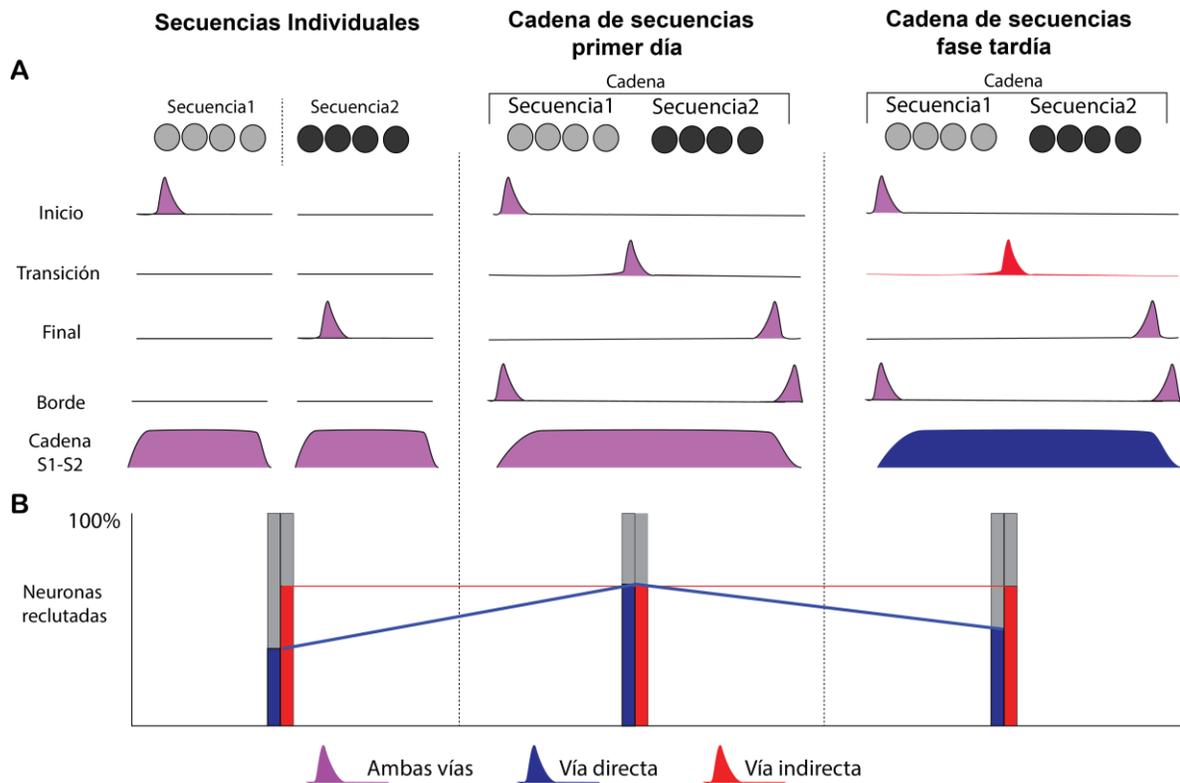


Figura 24. Conclusión gráfica de la ejecución de cadena de secuencias de acciones.

Las vías no se modulan de manera diferente cuando son cadenas simples, el cambio ocurre cuando se concatena dos secuencias en una cadena en la etapa tardía. La vía directa tiene una mayor proporción de modulación en la ejecución general de la cadena y la vía indirecta en la transición.

La modulación reportada poblacionalmente es la representación de lo observado en los animales individuales.

Se comparó la proporción de neuronas moduladas poblacionalmente contra lo observado en los animales individuales. Esto con el fin de evaluar si las proporciones reportadas en las poblaciones de las vías se representaban por animal. No se encontraron diferencias significativas para ninguna de las vías al comparar la media de las proporciones por animal. Al haber una representación de lo observado poblacional con lo individual se refuerza el argumento de que las proporciones encontradas y la diferencia en las vías se deben a un fenómeno fisiológico de las mismas en la ejecución de cadena de secuencias de acciones en la etapa tardía y no a una sobre representación de alguna de las categorías por la variabilidad de los animales registrados.

De la misma manera para la etapa de cadena de acciones primer día, no se encontraron diferencias significativas en la comparación poblacional contra la individual. Reforzando que para las vías no existen diferencias en la etapa temprana de la realización de cadenas de acciones.

La modulación de las vías estriatales no es diferencial durante las fases tempranas de la concatenación.

La modulación de las vías estriatales no es diferencial durante las fases tempranas de la concatenación de la cadena, pero cada vía si detecta al inicio de la concatenación: la vía directa reclutando más neuronas, la vía indirecta modificando la modulación de las neuronas reclutadas. Este hallazgo es muy relevante al compararlo con antecedentes previos. De estudios sabíamos que la actividad de las neuronas estriatales de proyección se modula principalmente durante las fases de cambios en la contingencia de acciones y su consecuencia (Atallah et al., 2014). Nuestros resultados muestran evidencia de cómo las neuronas de las diferentes vías se reclutan o modulan diferencialmente para detectar los cambios de fase en el aprendizaje de cadenas de secuencias.

Una de las principales diferencias entre la ejecución de cadena de secuencias de acciones entre la fase temprana versus tardía se observó en los parámetros conductuales analizados: el tiempo de transición entre una secuencia y otro decremento para la etapa tardía. Esto correlaciona con la observación del incremento en el número de neuronas moduladas en la transición para la vía indirecta. En estudios previos se ha observado que al dañar la funcionalidad del receptor NMDA en el núcleo estriado los animales no son capaces de organizar bien las secuencias (Jin & Costa, 2010). Por lo que, probablemente en un mecanismo similar, la actividad durante la transición de la vía indirecta puede estar regulando el cambio entre secuencias de acciones en una cadena. En algunos estudios se ha documentado actividad de transición cuando se cambia de un tipo de secuencia a otra, en la corteza motora suplementaria en primates (Shima & Tanji, 2000) y en el “High vocal center” (HVC) en aves (Fujimoto & Watanabe, 2011). El HVC contiene

neuronas de proyección, estructura análoga al estriado en roedores. Esta evidencia me permite especular que las proyecciones de las cortezas premotoras al estriado pudieran estar comandando información sobre la transición de secuencias de acciones preferentemente sobre la vía indirecta de los ganglios basales. No obstante experimentos adicionales son necesarios para probar esta especulación.

Reclutamiento diferencial de las vías a lo largo del aprendizaje a realizar cadenas de secuencias.

La proporción de neuronas moduladas dentro de las vías fue diferente en el aprendizaje al realizar cadenas; la vía directa mostró cambios en las neuronas reclutadas en las tres etapas de registro en comparación con la vía indirecta que se mantuvo constante (**Figura 23 A y D**). No obstante, ambas vías se reclutaron o modularon de manera diferencial durante la fase temprana del aprendizaje a realizar cadenas de secuencias. La vía directa mostró un incremento en la proporción de neuronas moduladas durante la cadena hacía la última etapa de registro, mientras que las neuronas de la vía indirecta incrementaron el número de neuronas reclutadas para la transición. Ambas vías mostraron un incremento durante el inicio (**Figura 23 C y E**). El hallazgo de un incremento en la proporción de neuronas de ambas vías durante el inicio, concuerda con la actividad concurrente de las vías previamente reportada (Barbera et al., 2016; Cui et al., 2013; Klaus et al., 2017; J. G. Parker et al., 2018; Tecuapetla et al., 2014). Sin embargo y pese a que hubo co-activación de ambas vías en la transición de una secuencia a otra, la proporción de neuronas reclutadas fue diferente, sugiriendo un papel diferencial para las vías durante la transición. En el modelo de inhibición competitiva de las vías de proyección del estriado (Mink, 1996), se propone a la actividad de la vía indirecta funciona como inhibidora de los programas motores competitivos para ejecutar una acción. Nuestros datos, al mostrar que ambas vías se co-activan en el inicio y que la vía indirecta se modula preferencialmente en el cambio de una secuencia a otra sugieren: 1) Durante el inicio la vía indirecta podría estar inhibiendo los programas competitivos mientras que la vía directa selecciona el programa a ejecutar; 2) Durante la transición la vía indirecta podría estar guiando el cambio de una

secuencia a otra. Como pregunta abierta queda el responder porque la vía directa presenta una mayor modulación a lo largo del aprendizaje de la cadena.

CONCLUSIONES

- Se implementó una tarea de condicionamiento operante en condiciones de cabeza fija que nos permite estudiar el aprendizaje y ejecución de dos secuencias de acciones en una cadena y la transición entre secuencias.
- Se optimizó un método para el registro de transitorios de calcio de las neuronas estriatales durante distintas épocas de la tarea conductual.
- Se identificaron características que distinguen la modulación y reclutamiento entre vías estriatales a lo largo del aprendizaje, y al realizar una cadena de dos secuencias de acciones.

1) La proporción de neuronas de las vías y sus categorías de modulación son diferentes cuando los animales ejecutan de manera estereotipada una cadena de secuencias de acciones (fase tardía). Refutando una de las hipótesis planteadas, la vía directa presenta una mayor proporción de neuronas modulada durante la realización de toda la cadena de secuencias y no durante el inicio. Aceptando una de las hipótesis planteadas la vía indirecta muestra una mayor proporción de neuronas moduladas durante la transición entre las dos secuencias de acciones (**Figura. 25A**).

2) A lo largo del aprendizaje a realizar la cadena secuencias de acciones, la vía directa presenta un mayor reclutamiento de neuronas en la fase temprana de concatenación (primer día, **Figura.25B**).

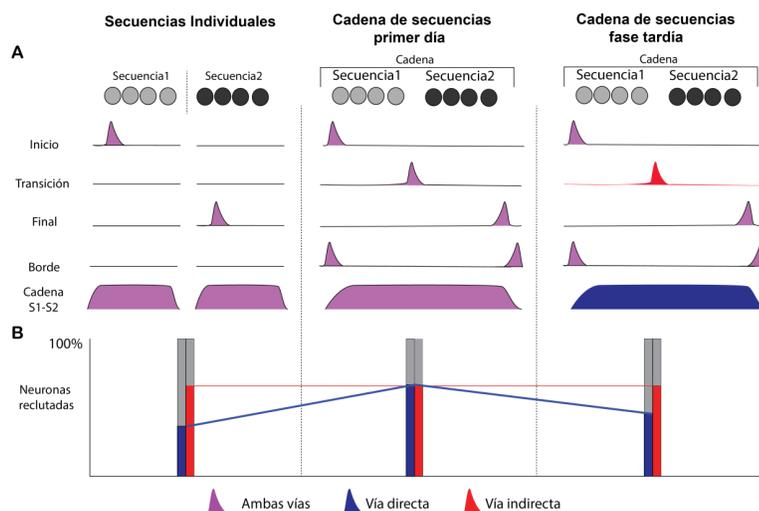


Figura 25. Conclusión gráfica del estudio

ANEXOS

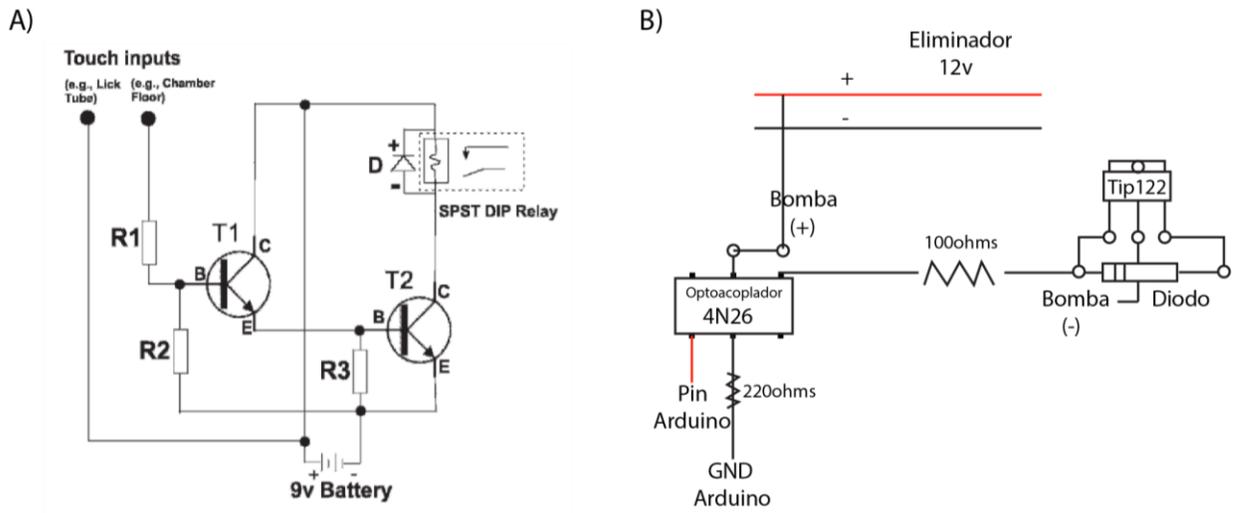


Figura 25. Circuito sensor de lengüetazos y bomba peristáltica

A) Circuito detector de lengüetazos. R1 y R2 resistencias de 10megaohms. T1 y T2 transistores 1N4004. Diodo(D), relevador de 14 pines SPST y pila de 9 volts (Slotnick, 2009). **B)** Circuito para la activación de bomba peristáltica.

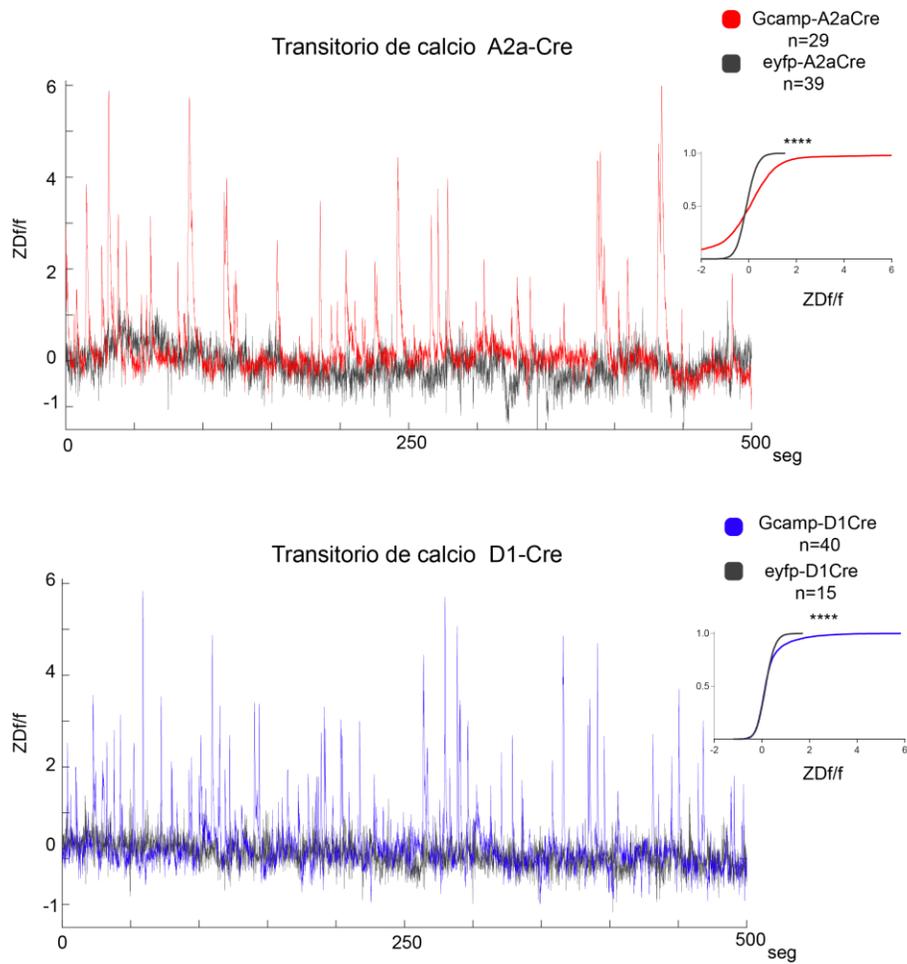


Figura 26. Comparación del sensor de calcio con el control eyfp.

Trazo promedio de neuronas registradas para la vía indirecta y vía directa comparadas con controles de animales A2a-Cre y D1-Cre transfectados con eyfp cre dependiente. Las señales para cada vía son significativamente diferentes comparadas con su control, al comparar la distribución acumulada de los cambios en fluorescencia ($p < 0.0001$, Kolmogorov-Smirnov).

LITERATURA CITADA

- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, *12*(10), 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Aldridge, J. W., & Berridge, K. C. (1998). Coding of Serial Order by Neostriatal Neurons: A “Natural Action” Approach to Movement Sequence. *The Journal of Neuroscience*, *18*(7), 2777 LP-2787. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/18/7/2777.abstract>
- Anderson, K. D., & Reiner, A. (1990). Extensive co-occurrence of substance P and dynorphin in striatal projection neurons: An evolutionarily conserved feature of basal ganglia organization. *Journal of Comparative Neurology*, *295*(3), 339–369. <https://doi.org/10.1002/cne.902950302>
- Aronov, D., Andalman, A. S., & Fee, M. S. (2008). A Specialized Forebrain Circuit for Vocal Babbling in the Juvenile Songbird. *Science*, *320*(5876), 630 LP-634. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/320/5876/630.abstract>
- Atallah, H. E., McCool, A. D., Howe, M. W., & Graybiel, A. M. (2014). Neurons in the Ventral Striatum Exhibit Cell-Type-Specific Representations of Outcome during Learning. *Neuron*, *82*(5), 1145–1156. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.021>
- Barbera, G., Liang, B., Zhang, L., Gerfen, C. R., Culurciello, E., Chen, R., ... Lin, D.-T. (2016). Spatially Compact Neural Clusters in the Dorsal Striatum Encode Locomotion Relevant Information. *Neuron*, *92*(1), 202–213. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.08.037>
- Britten, K. H., Shadlen, M. N., Newsome, W. T., & Movshon, J. A. (1992). The analysis of visual motion: a comparison of neuronal and psychophysical performance. *The Journal of Neuroscience*, *12*(12), 4745 LP-4765. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/12/12/4745.abstract>
- Buhusi, C. V., & Meck, W. H. (2005). What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*, 755. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1764>
- Burguière, E., Monteiro, P., Feng, G., & Graybiel, A. M. (2013). Optogenetic Stimulation of Lateral, *340*(June), 1243–1247.
- Carvalho Poyraz, F., Holzner, E., Bailey, M. R., Meszaros, J., Kenney, L., Kheirbek, M. A., ... Kellendonk, C. (2016). Decreasing Striatopallidal Pathway Function Enhances Motivation by Energizing the Initiation of Goal-Directed Action. *The Journal of Neuroscience*, *36*(22), 5988–6001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0444-16.2016>
- Chang, H. T., & Kita, H. (1992). Interneurons in the rat striatum: relationships between parvalbumin neurons and cholinergic neurons. *Brain Research*, *574*(1–2), 307–311. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90830-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90830-3)
- Chang, H. T., & Kitai, S. T. (1982). Large neostriatal neurons in the rat: An electron microscopic study of gold-toned Golgi-stained cells. *Brain Research Bulletin*, *8*(6), 631–643. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90091-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90091-0)
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., ... Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, *499*, 295. Retrieved

from <http://dx.doi.org/10.1038/nature12354>

- Cohen, J. Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B. B., & Uchida, N. (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature*, *482*, 85. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature10754>
- Crammond, D. J., & Kalaska, J. F. (1989). Neuronal activity in primate parietal cortex area 5 varies with intended movement direction during an instructed-delay period. *Experimental Brain Research*, *76*(2), 458–462. <https://doi.org/10.1007/BF00247902>
- Cui, Guohong Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, *494*, 238. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature11846>
- Daw, N. D. (2003). Reinforcement learning models of the dopamine system and their behavioral implications. *Science*, (August), 175. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.94.6376&rep=rep1&type=pdf>
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, *13*(7), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V)
- Durieux, P. F., & Schiffmann, S. N. (2012). Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions, *31*(3), 640–653. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.400>
- French, C. A., Jin, X., Campbell, T. G., Gerfen, E., Groszer, M., Fisher, S. E., & Costa, R. M. (2011). An aetiological Foxp2 mutation causes aberrant striatal activity and alters plasticity during skill learning. *Molecular Psychiatry*, *17*, 1077. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2011.105>
- Fujii, N., & Graybiel, A. M. (2003). Representation of action sequence boundaries by macaque prefrontal cortical neurons. *Science*, *301*(5637), 1246–1249. <https://doi.org/10.1126/science.1086872>
- Funahashi, S., & Kubota, K. (1994). Working memory and prefrontal cortex. *Neuroscience Research*, *21*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)90063-9)
- García-Vilchis, B., Suárez, P., Serrano-Reyes, M., Arias-García, M., Tapia, D., Duhne, M., ... Galarraga, E. (2018). Differences in synaptic integration between direct and indirect striatal projection neurons: Role of CaV3 channels. *Synapse*, *0*(0), e22079. <https://doi.org/10.1002/syn.22079>
- Georgopoulos, A. P., & Grillner, S. (1989). Visuomotor coordination in reaching and locomotion. *Science*, *245*(4923), 1209 LP-1210. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/245/4923/1209.abstract>
- Gerfen, C. R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, *311*, 461. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/311461a0>
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and

- striatopallidal neurons. *Science*, 250(4986), 1429 LP-1432. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/250/4986/1429.abstract>
- Graybiel, A. M. (1998). The Basal Ganglia and Chunking of Action Repertoires, *136*(70), 119–136.
- Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 573. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1137>
- Groszer, M., Keays, D. A., Deacon, R. M. J., Bono, J. P. De, Prasad-mulcare, S., Gaub, S., ... Ox, O. (2008). Report Impaired Synaptic Plasticity and Motor Learning in Mice with a Point Mutation Implicated in Human Speech Deficits, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.060>
- Guo, Z. V., Hires, S. A., Li, N., O'Connor, D. H., Komiyama, T., Ophir, E., ... Svoboda, K. (2014). Procedures for behavioral experiments in head-fixed mice. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088678>
- Haesler, S., Rochefort, C., Georgi, B., Licznarski, P., Osten, P., & Scharff, C. (2007). Incomplete and Inaccurate Vocal Imitation after Knockdown of FoxP2 in Songbird Basal Ganglia Nucleus Area X. *PLOS Biology*, 5(12), e321. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050321>
- Haith, A. M., & Krakauer, J. W. (2013). Model-Based and Model-Free Mechanisms of Human Motor Learning BT - Progress in Motor Control. In M. J. Richardson, M. A. Riley, & K. Shockley (Eds.) (pp. 1–21). New York, NY: Springer New York.
- Hallanger, A. E., & Wainer, B. H. (1990). Ascending projections from the pedunculo-pontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 274(4), 483–515. <https://doi.org/10.1002/cne.902740403>
- Hart, G., Bradfield, L. A., & Balleine, B. W. (2018). Prefrontal cortico-striatal disconnection blocks the acquisition of goal-directed action. *The Journal of Neuroscience*. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/early/2018/01/04/JNEUROSCI.2850-17.2017.abstract>
- Hikosaka, O., Takikawa, Y., & Kawagoe, R. (2000). Role of the Basal Ganglia in the Control of Purposive Saccadic Eye Movements. *Physiological Reviews*, 80(3), 953–978. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.953>
- Jin, X., & Costa, R. M. (2010). Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature*, 466, 457. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09263>
- Jin, X., & Costa, R. M. (2015). Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.011>
- Jin, X., Tecuapetla, F., & Costa, R. M. (2014). Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nature Neuroscience*, 17, 423. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3632>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). Principles of neural science. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Kehmeier, S., Schloegl, C., Scheiber, I., & Weiß, B. (2011). Early development of gaze following into distant space in juvenile Greylag geese (*Anser anser*). *Animal cognition* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1007/s10071-011-0381-x>

- Kemp, J. M., & Powell, T. P. S. (2011). The Termination of Fibres from the Cerebral Dendritic Nucleus : Cortex Spines a Study and in Thalamus Upon the. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 262(845), 429–439. Retrieved from <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/262/845/429.abstract>
- Kim, H. F., Amita, H., & Hikosaka, O. (2017). Indirect Pathway of Caudal Basal Ganglia for Rejection of Valueless Visual Objects. *Neuron*, 94(4), 920–930.e3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.033>
- Klaus, A., Martins, G. J., Paixao, V. B., Zhou, P., Paninski, L., & Costa, R. M. (2017). The Spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space. *Neuron*, 96(4), 949. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.031>
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466, 622. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09159>
- Lang, W., Cheyne, D., Kristeva, R., Beisteiner, R., Lindinger, G., & Deecke, L. (1991). Three-dimensional localization of SMA activity preceding voluntary movement. *Experimental Brain Research*, 87(3), 688–695. <https://doi.org/10.1007/BF00227095>
- Lavoie, B., & Parent, A. (2018). Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 299(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/cne.902990102>
- Lei, W., Jiao, Y., Del Mar, N., & Reiner, A. (2004). Evidence for Differential Cortical Input to Direct Pathway versus Indirect Pathway Striatal Projection Neurons in Rats. *The Journal of Neuroscience*, 24(38), 8289 LP-8299. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/24/38/8289.abstract>
- Long, M. A., Jin, D. Z., & Fee, M. S. (2010). Support for a synaptic chain model of neuronal sequence generation. *Nature*, 468, 394. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09514>
- Malapani, C., Rakitin, B., Levy, R., Meck, W., Deweer, B., Dubois, B., & Gibbon, J. (1998). *Coupled Temporal Memories in Parkinson's Disease: A Dopamine-Related Dysfunction*. *Journal of cognitive neuroscience* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1162/089892998562762>
- Mink, J. W. (1996). THE BASAL GANGLIA: FOCUSED SELECTION AND INHIBITION OF COMPETING MOTOR PROGRAMS. *Progress in Neurobiology*, 50(4), 381–425. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(96\)00042-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00042-1)
- Müller, N., Putz, A., Kathmann, N., Lehle, R., Günther, W., & Straube, A. (1997). Characteristics of obsessive–compulsive symptoms in Tourette's syndrome, obsessive–compulsive disorder, and Parkinson's disease. *Psychiatry Research*, 70(2), 105–114. [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(97\)02658-9](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(97)02658-9)
- O'Reilly, R. C., & Frank, M. J. (2006). Making Working Memory Work: A Computational Model of Learning in the Prefrontal Cortex and Basal Ganglia. *Neural Computation*, 18(2), 283–328. <https://doi.org/10.1162/089976606775093909>
- Parker, J. G., Marshall, J. D., Ahanonu, B., Wu, Y.-W., Kim, T. H., Grewe, B. F., ... Schnitzer, M. J. (2018). Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature*,

557(7704), 177–182. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0090-6>

- Parker, P. R. L., Lalive, A. L., Kreitzer, A. C., Parker, P. R. L., Lalive, A. L., & Kreitzer, A. C. (2016). Pathway-Specific Remodeling of Thalamostriatal Synapses in Parkinsonian Mice. *Neuron*, *89*(4), 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.038>
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., ... Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology of Disease*, *91*, 347–361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023>
- Pnevmatikakis, E. A., Soudry, D., Gao, Y., Machado, T. A., Merel, J., Pfau, D., ... Paninski, L. (2016). Simultaneous Denoising, Deconvolution, and Demixing of Calcium Imaging Data. *Neuron*, *89*(2), 285–299. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.11.037>
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., ... Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*, 760. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2915>
- Rueda-Orozco, P. E., & Robbe, D. (2015). The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nature Neuroscience*, *18*, 453. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nn.3924>
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*, *275*(5306), 1593 LP-1599. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/275/5306/1593.abstract>
- Schultz, W., & Romo, R. (1992). Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. *Experimental Brain Research*, *91*(3), 363–384. <https://doi.org/10.1007/BF00227834>
- Shadmehr, R., & Krakauer, J. W. (2008). A computational neuroanatomy for motor control. <https://doi.org/10.1007/s00221-008-1280-5>
- Shan, Q., Ge, M., Christie, M. J., & Balleine, B. W. (2014). The Acquisition of Goal-Directed Actions Generates Opposing Plasticity in Direct and Indirect Pathways in Dorsomedial Striatum. *The Journal of Neuroscience*, *34*(28), 9196 LP-9201. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/34/28/9196.abstract>
- Shima, K., & Tanji, J. (2000). Neuronal Activity in the Supplementary and Presupplementary Motor Areas for Temporal Organization of Multiple Movements. *Journal of Neurophysiology*, *84*(4), 2148–2160. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.4.2148>
- Slotnick, B. (2009). A SIMPLE 2-TRANSISTOR TOUCH OR LICK DETECTOR CIRCUIT. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *91*(2), 253–255. <https://doi.org/10.1901/jeab.2009.91-253>
- Sridharan, D., Prasanth, P. S., & Chakravarthy, V. S. (2006). THE ROLE OF THE BASAL GANGLIA IN EXPLORATION IN A NEURAL MODEL BASED ON REINFORCEMENT LEARNING. *International Journal of Neural Systems*, *16*(02), 111–124. <https://doi.org/10.1142/S0129065706000548>

- Starck, J., & Ricklefs, R. E. (1998). *Avian growth and development. Evolution in the altricial precocial spectrum. Patterns of development: The altricial-precocial spectrum.*
- Sutton, R. S., & Barto, A. G. (1998). Reinforcement Learning : An Introduction.
- 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 Research Bulletin, 9*(1–6), 321–353. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90145-9)
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q., & Costa, R. M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell, 166*(3), 703–715. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.06.032>
- Tecuapetla, F., Matias, S., Dugue, G. P., Mainen, Z. F., & Costa, R. M. (2014). Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nature Communications, 5*, 4315. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5315>
- Turner, K. M., Science, P., Hikosaka, O., Nakahara, H., Rand, M. K., Sakai, K., & Lu, X. (1999). Parallel neural networks for learning, *2236*(99), 464–471.
- Vallortigara, G. (2012). Core knowledge of object, number, and geometry: A comparative and neural approach. *Cognitive Neuropsychology, 29*(1–2), 213–236. <https://doi.org/10.1080/02643294.2012.654772>
- Webster, K. E. (1961). Cortico-striate interrelations in the albino rat. *Journal of Anatomy, 95*(Pt 4), 532–544.3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1244066/>
- Wickens, J. (1997). Basal ganglia: structure and computations. *Network: Computation in Neural Systems, 8*(4), R77–R109. https://doi.org/10.1088/0954-898X_8_4_001
- Xu, K.-M. (2006). Using the Bootstrap Method for a Statistical Significance Test of Differences between Summary Histograms. *Monthly Weather Review, 134*(5), 1442–1453. <https://doi.org/10.1175/MWR3133.1>
- Yttri, E. A., & Dudman, J. T. (2016). Opponent and bidirectional control of movement velocity in the basal ganglia. *Nature, 533*, 402. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature17639>
- Yuste, R., MacLean, J. N., Smith, J., & Lansner, A. (2005). The cortex as a central pattern generator. *Nature Reviews Neuroscience, 6*, 477. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1686>
- Zhou, P., Resendez, S. L., Rodriguez-Romaguera, J., Jimenez, J. C., Neufeld, S. Q., Stuber, G. D., ... Paninski, L. (2016). Efficient and accurate extraction of in vivo calcium signals from microendoscopic video data. <https://doi.org/10.7554/eLife.28728>