

Tesis Doctoral

# Rol de la dopamina en la maduración postnatal del sistema córticoestriatal y conductas dependientes del mismo

Braz, Bárbara Yael

2016-03-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Braz, Bárbara Yael. (2016-03-29). Rol de la dopamina en la maduración postnatal del sistema córticoestriatal y conductas dependientes del mismo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Braz, Bárbara Yael. "Rol de la dopamina en la maduración postnatal del sistema córticoestriatal y conductas dependientes del mismo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-29.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Rol de la dopamina en la maduración postnatal del sistema  
córtecoestriatal y conductas dependientes del mismo**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

BÁRBARA YAEL BRAZ

Director de Tesis: Dr. M Gustavo Murer

Director Asistente: Dr. Juan Belforte

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales,

Grupo de Neurociencia de Sistemas, IFIBIO "Houssay", FMED, UBA

Buenos Aires, 2016

# Rol de la dopamina en la maduración postnatal del sistema córticoestriatal y conductas dependientes del mismo

## RESUMEN

Los ganglios de la base (BG) son núcleos subcorticales interconectados con la corteza cerebral que están involucrados en el control motor voluntario y distintos aspectos de la conducta y el aprendizaje. La dopamina es un regulador clave del flujo de información desde la corteza al estriado, el principal núcleo de entrada de los BG. Algunas de las alteraciones conductuales observadas en desórdenes neuropsiquiátricos tales como el síndrome de Tourette, el trastorno de déficit de atención con hiperactividad y el desorden obsesivo compulsivo, son atribuidas a alteraciones madurativas de los circuitos córticoestriatales y su modulación dopaminérgica. Sin embargo, poco se sabe acerca del desarrollo funcional de estos circuitos y del rol de la dopamina en este proceso.

El objetivo general de esta tesis es estudiar los mecanismos postnatales de la maduración del sistema córticoestriatal y su conexión con la adquisición de conductas normales y patológicas. Nuestra hipótesis es que las neuronas dopaminérgicas son importantes durante el desarrollo postnatal para el desarrollo funcional y anatómico de la conectividad córticoestriatal, y que alteraciones en este proceso dan lugar a condiciones neuropsiquiátricas.

En este trabajo encontramos que la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas ocasiona déficits duraderos en el balance entre la búsqueda de recursos, tanto nutricionales como sociales, y el aprovechamiento de los mismos. Estos déficits emergen temprano en el desarrollo y empeoran en la vida adulta, en particular aquellos relacionados a la exploración global de ambientes complejos. Por otro lado, estudios electrofisiológicos *in vivo* y reconstrucciones morfológicas de las neuronas de proyección estriatales revelaron alteraciones córticoestriatales asociadas al fenotipo comportamental. Más específicamente, en los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas se observó una reducción de la conectividad funcional córticoestriatal que afecta las entradas provenientes de la corteza prelímbica más marcadamente que las provenientes de la corteza cingular y motora. La atenuación en la conectividad observada para los inputs prelímbicos es más marcada en el adulto lesionado respecto del juvenil, se relaciona con una mayor susceptibilidad por sufrir procesos de depresión sináptica córticoestriatal, y se asocia a una contracción del árbol dendrítico de las neuronas de proyección estriatales, sin cambios en la densidad de espinas dendríticas.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la idea de que las neuronas dopaminérgicas son esenciales durante el desarrollo postnatal para la maduración funcional y estructural del sistema córticoestriatal. Desde una perspectiva *bottom-up*, nuestros hallazgos sugieren que condiciones neuropsiquiátricas presumiblemente relacionadas a alteraciones dopaminérgicas tempranas podrían presentar alteraciones en el reclutamiento de los circuitos córticoestriatales durante tareas de exploración y sociales.

**Palabras Clave:** Dopamina, Corteza Frontal, Estriado, Neurodesarrollo, Enfermedades Neuropsiquiátricas, Modelos Animales, Electrofisiología *in vivo*.

## **Role of dopamine in the maturation of the corticostriatal system and exploratory and social behaviors.**

### **ABSTRACT**

Basal Ganglia (BG) comprise multiple subcortical nuclei involved in voluntary motor control and several aspects of behavior and learning. Dopamine is a key regulator of cortical information flow through the striatum, which is the main input nucleus of the BG. Some of the behavioral alterations observed in neuropsychiatric disorders such as Tourette syndrome, Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and Obsessive Compulsive Disorder have been attributed to developmental alterations in dopaminergic and corticostriatal circuits function. However, little is known about the functional development of these circuits and dopamine involvement in it.

The general aim of this thesis is to study corticostriatal postnatal maturation and its connection with the acquisition of normal and pathological behaviors. Our hypothesis is that dopaminergic neurons activity is important during infancy and adolescence for the functional and anatomical development of corticostriatal connectivity, and that alterations in this process may lead to neuropsychiatric conditions.

We found that early postnatal dopaminergic lesions cause long-lasting deficits in exploitation of shelter, social and nutritional resources, and an imbalanced exploratory behavior, where non-directed local exploration is exacerbated while sophisticated search behaviors involving sequences of goal directed actions are degraded. Importantly, some behavioral deficits do not diminish after adolescence but instead worsen or mutate, particularly, those related to the exploration of wide and spatially complex environments. *In vivo* electrophysiological recordings and morphological reconstructions of striatal medium spiny neurons reveal corticostriatal alterations associated to the behavioral phenotype. More specifically, we found an attenuation of corticostriatal functional connectivity affecting medial prefrontal inputs more markedly than cingulate and motor inputs. The reduction of prefrontostriatal inputs is more marked in adult lesioned mice compared to juvenile mice, and is related to an increase of corticostriatal long term depression. Moreover, these changes are accompanied by a contraction of the dendritic arbor of striatal projection neurons without changes in spine density.

Thus, dopaminergic neurons are essential during postnatal development for the functional and structural maturation of corticostriatal connections. From a bottom-up viewpoint of neuropsychiatric disease modelling, our findings suggest that neuropsychiatric conditions presumably linked to developmental alterations of the dopaminergic system should be evaluated for deficits in foraging decision making, alterations in the recruitment of corticostriatal circuits during foraging and social tasks, and structural disorganization of the frontostriatal connections.

**Key words:** Dopamine, Frontal Cortex, Striatum, Neurodevelopment, Neuropsychiatric disorders, Animal Models, *in vivo* Electrophysiology.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mis directores Gustavo Murer y Juan Belforte, gracias por enseñarme tanto, por la paciencia y sobre todo por su gran calidad humana.

A Gregorio Galiñanes quien me enseñó muchísimo, me brindó su consejo durante los primeros años de doctorado y por ayudarme con la realización de algunos de los experimentos presentados en esta tesis.

A Irene Taravini, gracias por colaborar conmigo y por enseñarme tan pacientemente.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por la buena onda diaria, por las valiosas contribuciones que hacen en el día a día y que facilitan enormemente el trabajo diario y por hacer que el ambiente laboral sea tan ameno.

Gracias a mi familia y amigos por su apoyo incondicional en cada instancia. Los quiero muchísimo!!

# ÍNDICE

<b>Introducción .....</b>	<b>7</b>
<b>I) Circuitos córticoestriatales y ganglios de la base .....</b>	<b>7</b>
I.I) Ganglios de la base: generalidades .....	7
I.II) Microcircuito estriatal y su regulación por dopamina.....	10
I.III) Canales paralelos de los ganglios de la base y su rol en la conducta .....	14
I. IV) Rol de las neuronas dopaminérgicas en la conducta .....	19
<b>II) Plasticidad córticoestriatal.....</b>	<b>31</b>
Depresión y potenciación de largo término córticoestriatal.....	31
<b>III) Maduración del sistema córticoestriatal .....</b>	<b>38</b>
III. I) Maduración del sistema córticoestriatal y rol de la dopamina .....	38
III. II) Patologías asociadas al neurodesarrollo de los GB .....	44
III. III) Lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas .....	48
<b>Objetivos e Hipótesis .....</b>	<b>52</b>

<b>Resultados .....</b>	<b>57</b>
I) Conducta: Alteraciones en el balance exploración/explotación .....	57
II) Plasticidad córticoestriatal .....	76
III) Conectividad córticoestriatal.....	81
IV) Morfología de las neuronas de proyección estriatales .....	90
<b>Discusión .....</b>	<b>95</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>108</b>
1. Lesión dopaminérgica neonatal.....	108
2. Tests comportamentales .....	109
3. Experimentos electrofisiológicos.....	114
4. Llenado intracelular con lucifer yellow y determinación de la estructura dendrítica de las neuronas de proyección estriatales. ....	119
5. Histología e inmunohistoquímica .....	120
6. Análisis estadístico .....	122
<b>Referencias .....</b>	<b>123</b>

# INTRODUCCIÓN

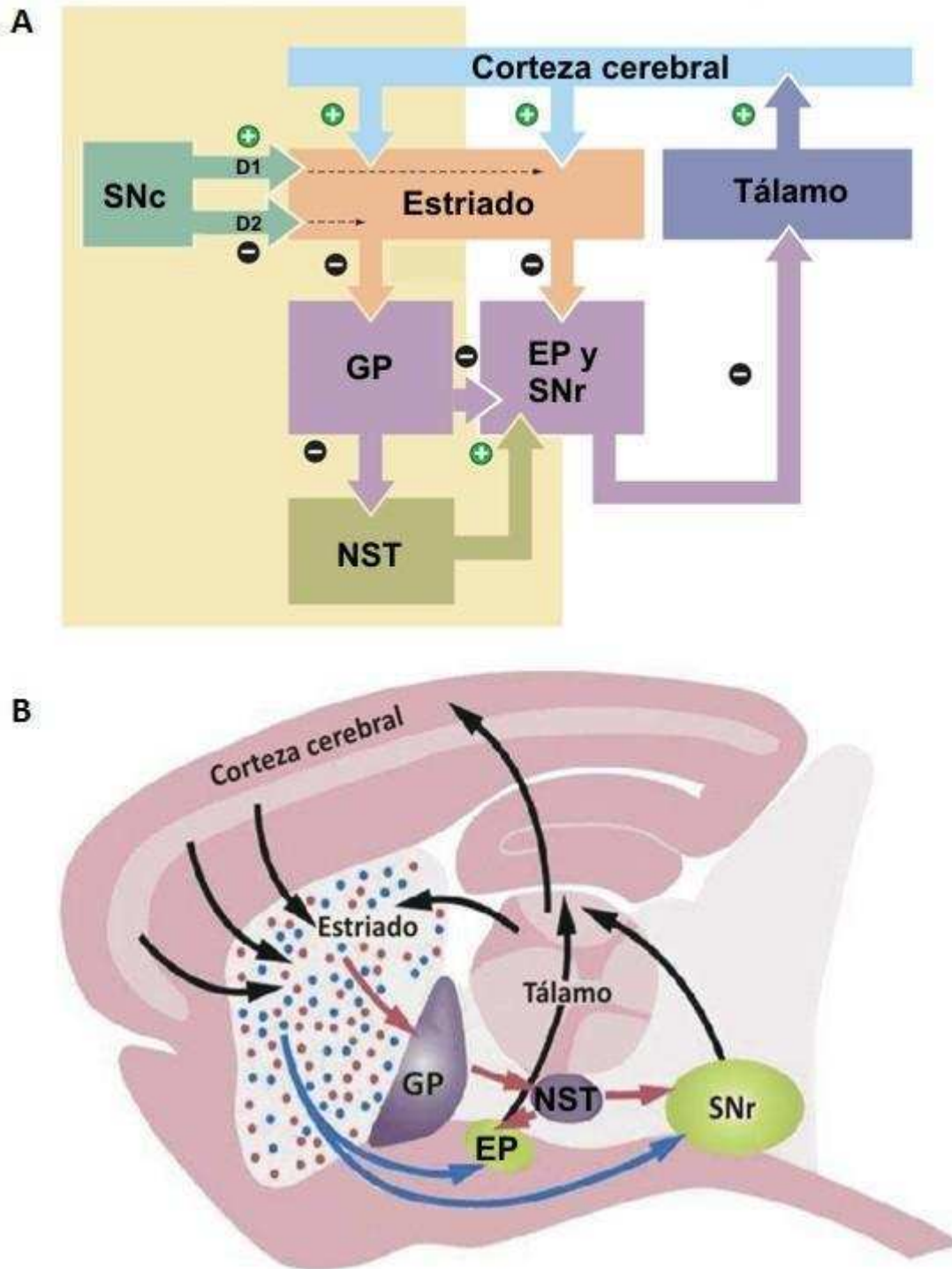
## **I) Circuitos córticoestriatales y ganglios de la base**

*Mejor conocidos por sus funciones motoras, los circuitos de los ganglios de la base (GB) sustentan formas de condicionamiento instrumental que modelan conductas orientadas a alcanzar metas y hábitos (Yin & Knowlton 2006; Graybiel 2008; Pennartz et al. 2009). Están involucrados no sólo en la expresión de conductas a través del control del movimiento, sino también en los procesos cognitivos, motivacionales y emocionales que llevan a su ejecución. Fallas en el funcionamiento de estos circuitos dan origen a diversas condiciones neuropsiquiátricas, tales como la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourette, el desorden obsesivo-compulsivo, el déficit de atención con hiperactividad y el abuso de drogas. En esta sección nos enfocaremos en describir el conexionado de los ganglios de la base y su rol en la conducta. Nos centraremos en el circuito córticoestriatal y su regulación por la dopamina, el cual será objeto principal de estudio en este trabajo.*

### **I.1) Ganglios de la base: generalidades**

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que procesan información proveniente de la corteza cerebral y modulan la actividad de ésta a través de circuitos de retroalimentación tálamo-corticales (figura I.1).





**Figura I.1:** **A.** Esquema de las vía directa e indirecta. **B.** Esquema de un corte sagital de cerebro de ratón indicando las estructuras que forman los ganglios de la base. Las neuronas estriatales medianas (NEM) que constituyen la vía directa se conectan directamente con los núcleos de salida (EP: núcleo entopeduncular en roedores, homólogo del globo pálido interno de los primates; SNr: sustancia negra parte reticulada). Por otro lado, las NEM que forman la vía indirecta se conectan con los núcleos de salida a través de los núcleos intermedios (globo pálido externo -GP- y núcleo subtalámico -NST-).

Los GB están formados por un *núcleo principal de entrada* constituido por el estriado dorsal (caudado y putamen en primates) y el núcleo accumbens, los *núcleos intermedios* que incluyen al globo pálido (globo pálido externo en primates) y núcleo subtalámico (NST), y los *núcleos de salida*, que incluyen al núcleo entopeduncular (globo pálido interno en primates) y la sustancia negra parte reticulada (SNr). Además, la porción compacta de la sustancia negra (SNc) y el área tegmental ventral (ATV) cumplen un rol clave en la regulación de los GB liberando dopamina (DA) en el estriado dorsal y núcleo accumbens.

El estriado es el núcleo principal de entrada de los ganglios de la base. Recibe proyecciones glutamatérgicas desde prácticamente toda la corteza cerebral y desde núcleos intralaminares y específicos del tálamo (figura I.1, ver sección I.II la figura I.3). Este núcleo es particular en cuanto a su carencia de neuronas glutamatérgicas (ver descripción del microcircuito estriatal en la sección siguiente). La mayoría de sus células son GABAérgicas, incluyendo el tipo principal de neuronas de proyección estriatales llamadas neuronas espinosas medianas (NEM). Las NEM se caracterizan por su alta densidad de espinas y pueden ser divididas en dos subtipos de acuerdo a sus proyecciones axonales y sus patrones de expresión génica (Gerfen et al. 1990; Smith et al. 1998).

El procesamiento de información cortical en los GB ocurre a través de dos rutas: las vías directa e indirecta (Albin et al. 1989). La **vía directa** se origina en las NEM estriatonigrales (dNEM) que proyectan de manera monosináptica a los núcleos de salida (EP y SNr) y expresan principalmente el receptor de dopamina D1 (D1R). A su vez, éstos proyectan hacia el tálamo y éste a la corteza cerebral (figura I.1). El efecto neto de esta vía es la desinhibición de las proyecciones excitatorias tálamocorticales. La **vía indirecta** se origina con las NEM

estriatopalidales (iNEM) que expresan principalmente el receptor de dopamina D2 (D2R) y proyectan por una vía multisináptica, que involucra al GP y el NST, a los núcleos de salida (EP y SNr) (figura I.1). El efecto de la activación de esta vía es la inhibición de las proyecciones tálamocorticales.

Si bien el conexionado esquematizado en la figura I.1 muestra la descripción clásica del funcionamiento de los ganglios de la base, el panorama es bastante más complejo: por ejemplo, existen proyecciones directas de la corteza al núcleo subtalámico (formando la vía hiperdirecta) (Nambu et al. 2002), proyecciones directas del globo pálido externo a los núcleos de salida (Bolam et al. 1993) y al estriado (Bevan et al. 1998), y recientemente se han descrito conexiones desde el globo pálido externo hacia la corteza prefrontal (Saunders & Sabatini).

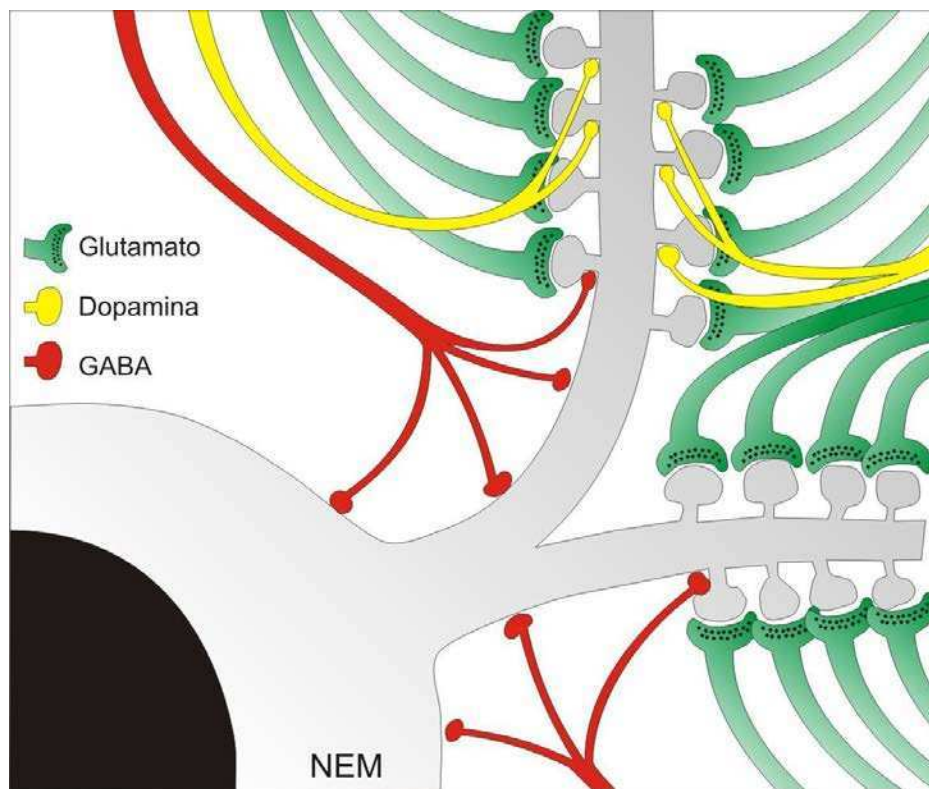
## **I.II) Microcircuito estriatal y su regulación por dopamina**

Como adelantamos en la sección anterior, el estriado está constituido aproximadamente por un 95 % de NEM. El 5 % restante corresponde a interneuronas que, a pesar de ser pocas en número, ejercen una fuerte influencia en la regulación de la actividad a nivel local. Entre un 0.5 y un 1 % corresponde a interneuronas colinérgicas y un 3-4% corresponde a distintos tipos de interneuronas GABAérgicas.

Las NEM reciben terminaciones glutamatérgicas en la cabeza y botones dopaminérgicos en el cuello de sus espinas dendríticas (figura I.2) (Bolam et al. 2000). Las NEM también reciben inputs inhibitorios de las interneuronas GABAérgicas, estratégicamente localizados en la zona perisomática (figura I.2), y de las interneuronas colinérgicas (Tepper et al. 2010). Finalmente,

las NEM se conectan entre sí a través de colaterales inhibitorios que llegan a porciones distales del árbol dendrítico (Wilson & Groves 1980).

A pesar de que cada NEM recibe alrededor de 5.000-10.000 inputs excitatorios de la corteza cerebral, sólo unos pocos provienen de una misma neurona cortical. Cada axón córticoestriatal inerva una región vasta del estriado pero establece muy pocos contactos con cada NEM (Zheng & Wilson 2002).



**Figura 1.2:** Esquema del microcircuito estriatal.

Por ello, la activación de una NEM requiere de una descarga altamente sincronizada de un gran número de neuronas corticales (Wilson 1993). Mediante registros *in vivo* de actividad cortical y de potencial de membrana de las NEM en simultáneo, se demostró que la descarga de

potenciales de acción de las NEM ocurre durante despolarizaciones fuertes del potencial de membrana que coinciden con potenciales corticales de gran amplitud (Mahon et al. 2001; Tseng et al. 2001). Durante las fases profundas del sueño o bajo anestesia, la corteza presenta oscilaciones de onda lenta, de alta amplitud y baja frecuencia (1 Hz) y, bajo esta condición fisiológica, el potencial de membrana de las NEM varía desde un estado hiperpolarizado (-90 a -70 mV) a uno más despolarizado (-60 a -40 mV), llamados estados *down* y *up* respectivamente. Por otro lado, durante el estado de vigilia las fluctuaciones del potencial de membrana de las NEM son menos estereotipadas, tendiendo las NEM a permanecer en el estado *up* (Kasanetz et al. 2002; Mahon et al. 2006; Sippy et al. 2015).

Es importante destacar que las transiciones entre estados cambian las propiedades de las conductancias intrínsecas y sinápticas de las NEM. En el estado *down*, los potenciales excitatorios postsinápticos son mediados por receptores glutamatérgicos de tipo AMPA. En los estados *up*, los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA también están activos posibilitando la generación de potenciales excitatorios postsinápticos más lentos que se suman más fácilmente. La transición al estado *up* produce un cambio en la fuente dominante del flujo de calcio que pasa a ser la mediada por receptores NMDA en lugar de los AMPA permeables al calcio (Carter & Sabatini 2004). Adicionalmente, las NEM expresan canales de calcio de tipo L (Cav1.3), que están activos en el estado *up* (Carter & Sabatini 2004) y son requeridos para la inducción de depresión de largo término (Choi & Lovinger 1997; Kreitzer & Malenka 2005).

La DA juega un rol fundamental en la función normal de los GB. El estriado está densamente inervado por fibras dopaminérgicas que se originan en la SNc y el VTA. Una fibra dopaminérgica hace contactos sinápticos sobre el cuello de las espinas dendríticas de muchas NEM a lo largo

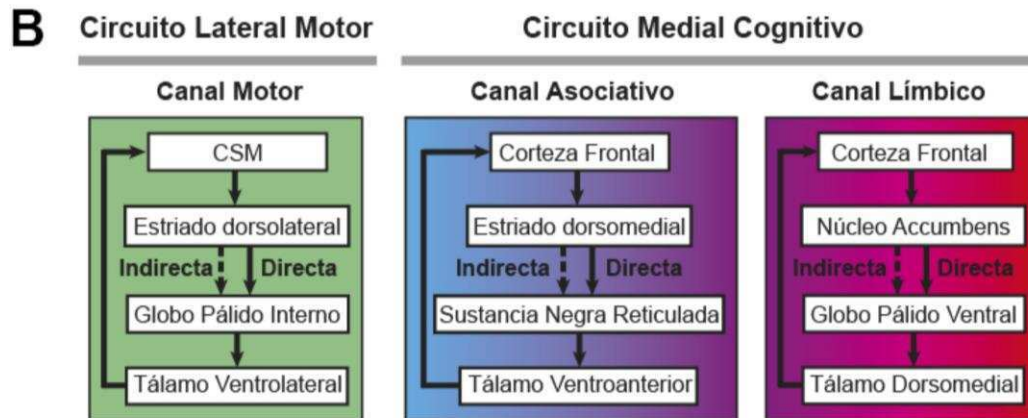
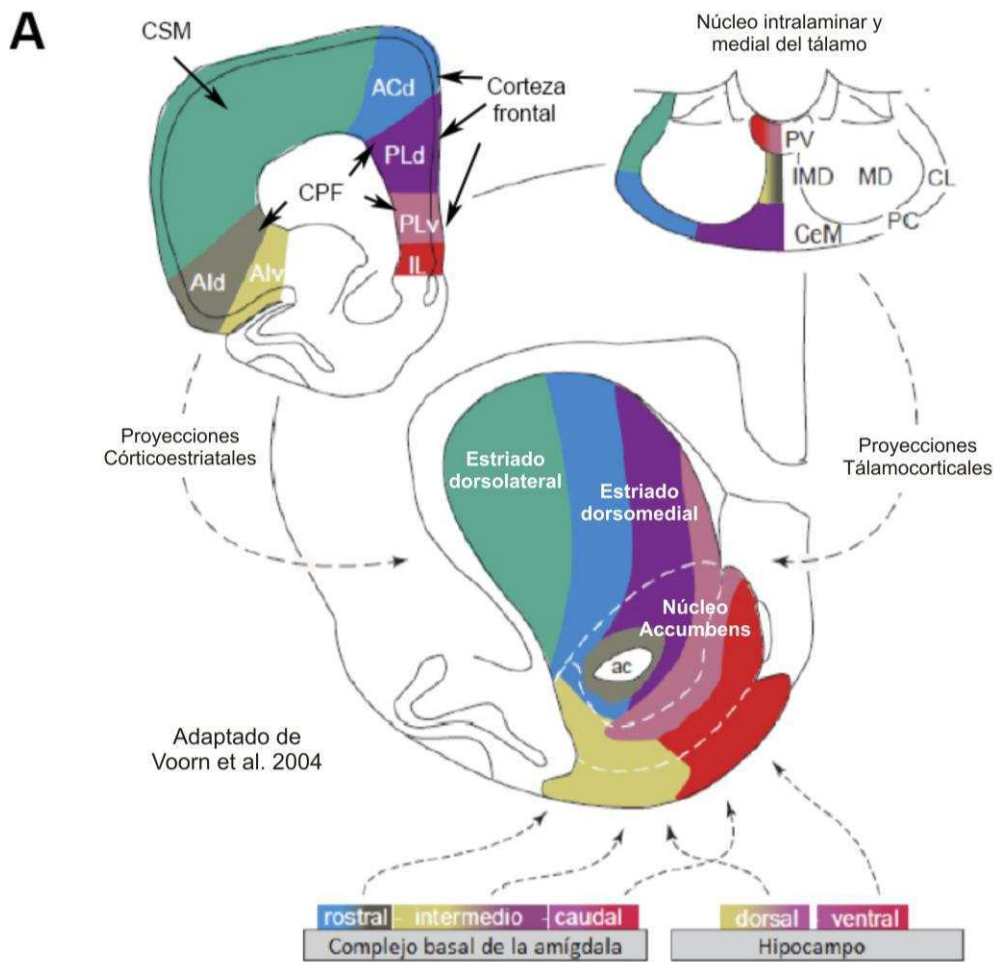
de una amplia región del estriado (figura 1.2) (Bolam et al. 2000). Además, a través de varicosidades sin clara relación con sitios postsinápticos, cada fibra dopaminérgica libera DA a distancia de los receptores postsinápticos, teniendo efectos de transmisión "por volumen" (Bergstrom et al. 2011; Dreyer 2014). Las NEM estriatales exhiben numerosas conductancias iónicas que influyen sobre las propiedades de disparo y muchas de estas conductancias son sensibles a neuromoduladores como la DA y acetilcolina (ACh). Las dNEM expresan el D1R, cuya activación reduce las corrientes de sodio (Schiffmann et al. 1995; Surmeier et al. 1992) y activa las corrientes mediadas por canales Kir (Pacheco-Cano et al. 1996) lo cual reduce su excitabilidad. Sin embargo, los D1R también incrementan una corriente mediada por canales de calcio tipo L (Carter & Sabatini 2004; Surmeier et al. 1995) y bloquean una conductancia de potasio que está activa en los estados *up* (Nisenbaum et al. 1998), dando lugar a un incremento de la tasa de disparo cuando estas neuronas se despolarizan (Hernández-López et al. 1997). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de los D1R actúa como filtro para limitar las transiciones hacia el estado *up*, pero una vez alcanzado el estado *up*, los D1R facilitan el disparo de potenciales de acción de las NEM.

En contraste, los D2R, que se expresan en altos niveles en las iNEM, inhiben el disparo de potenciales de acción. A pesar de que reducen las corrientes mediadas por Kir (Uchimura & North 1990), que deberían facilitar las transiciones hacia el estado *up*, también inhiben las corrientes mediadas por canales de tipo L reduciendo la frecuencia de disparo en el estado despolarizado (Hernandez-Lopez et al. 2000).

En conjunto, estos datos son consistentes con la visión clásica de que la DA excita a las dNEM e inhibe a las iNEM vía receptores D1 y D2 respectivamente (Gerfen et al. 1990).

### **I.III) Canales paralelos de los GB y su rol en la conducta**

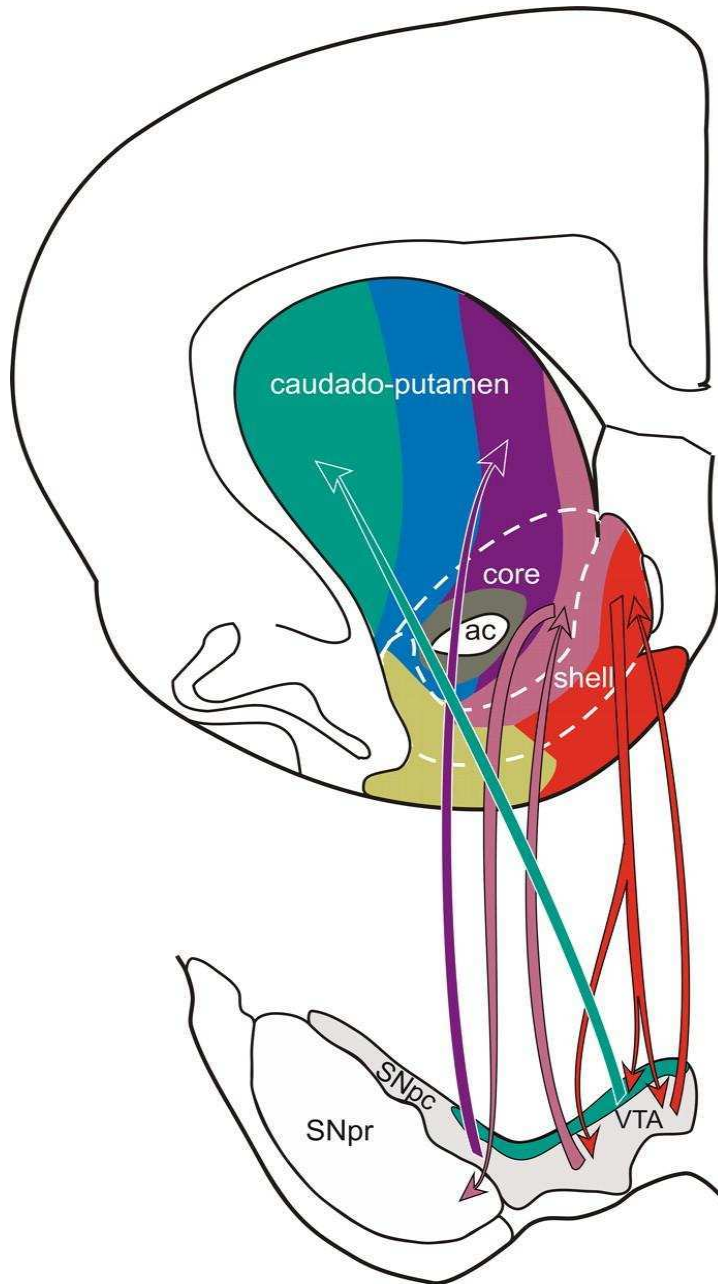
Una característica ampliamente aceptada acerca de las proyecciones que recibe el estriado es la organización topográfica de las mismas, es decir, que ciertas zonas de la corteza y del tálamo proyectan preferencialmente a determinadas áreas del estriado. En la figura I.3A, se muestra el arreglo topográfico de los aferentes estriatales que se originan en la corteza frontal, el tálamo y otras estructuras tales como el hipocampo y la amígdala. Este arreglo topográfico da origen a los **canales paralelos de los GB**, organizados en forma de bucles en los que la corteza envía información hacia el estriado y éste la transmite río abajo en los circuitos de los GB y de vuelta a la corteza (figura I.3B).



**Figura 1.3:** **A.** Se ilustra el arreglo topográfico de las entradas que provienen de la corteza frontal (izquierda arriba), núcleos intralaminares y medial del tálamo (derecha arriba), complejo basal de la amígdala (izquierda abajo), hipocampo (derecha abajo). Abreviaturas: ac, comisura anterior; ACd, corteza anterior cingulada; Ald, corteza dorsal agranular insular; Alv, corteza agranular ventral insular; CeM, Núcleo talámico central medial; CL, núcleo talámico central lateral; IL, corteza infralímbica; IMD, núcleo talámico intermedio dorsal; MD, núcleo talámico medio dorsal; PC, núcleo talámico paracentral; CSM, corteza somato-motora; CPF, corteza prefrontal; PLd, corteza prelímbica dorsal; PLv, corteza prelímbica ventral; PV, núcleo talámico paraventricular. **B.** Esquema de los canales paralelos de los GB. El circuito medial cognitivo sustenta conductas flexibles orientadas a alcanzar metas y el circuito lateral motor interviene en la ejecución de conductas más automatizadas relacionadas al sobreentrenamiento.



Los modelos clásicos de organización de los GB sostenían que la separación anatómica de los canales córticoestriatales se conserva en las siguientes estaciones de relevo sináptico, incluyendo los núcleos de salida y sus proyecciones a neuronas tálamo-corticales, formándose un bucle cerrado (figura 1.3B) (Alexander et al. 1990). Con posterioridad, una mejor comprensión de la anatomía indicó que áreas corticales funcionalmente relacionadas y anatómicamente interconectadas, proyectan a regiones parcialmente superpuestas del estriado (Flaherty & Graybiel 1994; Haber et al. 2006; Haber & Knutson 2010). Además, aunque las proyecciones corticales están dirigidas preferencialmente a una determinada región estriatal, las dendritas y axones de las neuronas ubicadas río abajo del estriado usualmente cruzan de un canal a otro (François et al. 1994). Otro mecanismo propuesto de interacción entre canales plantea la existencia de circuitos espirales entre el estriado y SNc (red estriato-nigro-estriatal) que permitirían conectar de manera "ascendente" las regiones ventromediales con las dorsolaterales del estriado (figura 1.4). Este mecanismo, originalmente descrito en monos (Haber et al. 2000), también ha sido extendido a roedores (Ikemoto 2007).



Extraído de Pennartz et al., 2009

**Figura 1.4:** Representación esquemática de hemisecciones frontales a nivel del estriado y del mesencéfalo. Se esquematiza la organización topográfica de las proyecciones axonales provenientes del mesencéfalo a distintas zonas del estriado y las proyecciones que hacen el recorrido en sentido inverso. Se puede observar la organización en "espiral" que permite transferir información de regiones ventromediales a dorsolaterales del estriado vía las conexiones estriato-nigrales y nigro-estriatales. Abreviaturas: ac, comisura anterior; SNpr, sustancia nigra parte reticulada; SNpc, sustancia nigra parte compacta; VTA, área tegmental ventral.

En lo que respecta a la función de estos canales en la conducta, de modo muy general, se ha descrito un **circuito medial cognitivo** que involucra la corteza frontal, estriado dorsomedial y núcleo accumbens (figura 1.3), zonas desde el rojo al azul), y un **circuito lateral motor** que involucra la corteza sensorimotora y el estriado dorsolateral (figura 1.3, zona verde). ***Actualmente se acepta que los distritos estriatales cognitivo y motor cumplen un rol importante en distintas fases del aprendizaje instrumental.*** Este tipo de aprendizaje consta de dos etapas. La primera involucra la asociación entre una acción determinada y su consecuencia, por ejemplo, la posibilidad de alcanzar una recompensa. En esta etapa las conductas se caracterizan por ser flexibles y se las denomina **conductas dirigidas a metas**. La segunda etapa se caracteriza por la automatización de la conducta, la cual es disparada por ciertas claves ambientales y es ejecutada aunque no se obtenga la recompensa. Un ejemplo cotidiano es el hecho de entrar a una habitación a oscuras (clave ambiental) y apretar la perilla de la luz (acción) aún sabiendo que el foco está quemado. Este tipo de conducta se denomina **hábito**.

Mediante estudios con lesiones químicas y bloqueos farmacológicos ha sido posible estudiar el rol de las regiones del estriado en cada fase del aprendizaje. El distrito medial cognitivo establece las asociaciones entre conducta y consecuencia, y sustenta conductas flexibles orientadas a obtener metas, mientras el distrito motor aprende asociaciones entre la conducta y claves ambientales que predicen la obtención de recompensa y sustenta un desempeño conductual más automatizado, en alguna medida independiente de la obtención de la recompensa (o hábito) (Everitt & Robbins 2005; Yin & Knowlton 2006; Graybiel 2008). Se ha propuesto que el aprendizaje orientado a metas se convierte en un hábito con el sobreentrenamiento y que cada fase del aprendizaje está asociada con cambios plásticos en distintos

distritos estriatales. Por ejemplo, durante el aprendizaje de la tarea conocida como rotarod acelerado (durante la cual los roedores deben caminar sobre un cilindro horizontal que acelera) las conexiones entre la corteza frontal y el estriado sufren un proceso plástico de potenciación de largo término (del inglés *long term potentiation*, LTP) (Yin et al. 2009). Al igual que con otras tareas, durante la adquisición del rotarod acelerado se reconocen dos fases, una rápida, durante la cual el desempeño mejora rápidamente, y otra en la cual el incremento del rendimiento es más lento y se logra cuando el entrenamiento se extiende por un tiempo prolongado. Los cambios en el distrito medial “cognitivo” del estriado ocurren en la fase rápida de aprendizaje, y los cambios en el distrito lateral “motor” ocurren asociados a la mejora lenta adicional del desempeño que se obtiene con sobre-entrenamiento (Yin et al. 2009). Ha sido propuesto que la interacción entre los canales cognitivo y motor posibilita el pasaje de una fase a otra del aprendizaje y que las conexiones espirales ascendentes que vinculan al estriado con las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas podrían ser el sustrato anatómico de esta interacción (Voorn et al. 2004). Mecanismos similares podrían estar involucrados en la adquisición de conductas adictivas como el abuso de drogas (Belin & Everitt 2008).

#### **I. IV) Rol de las neuronas dopaminérgicas en la conducta**

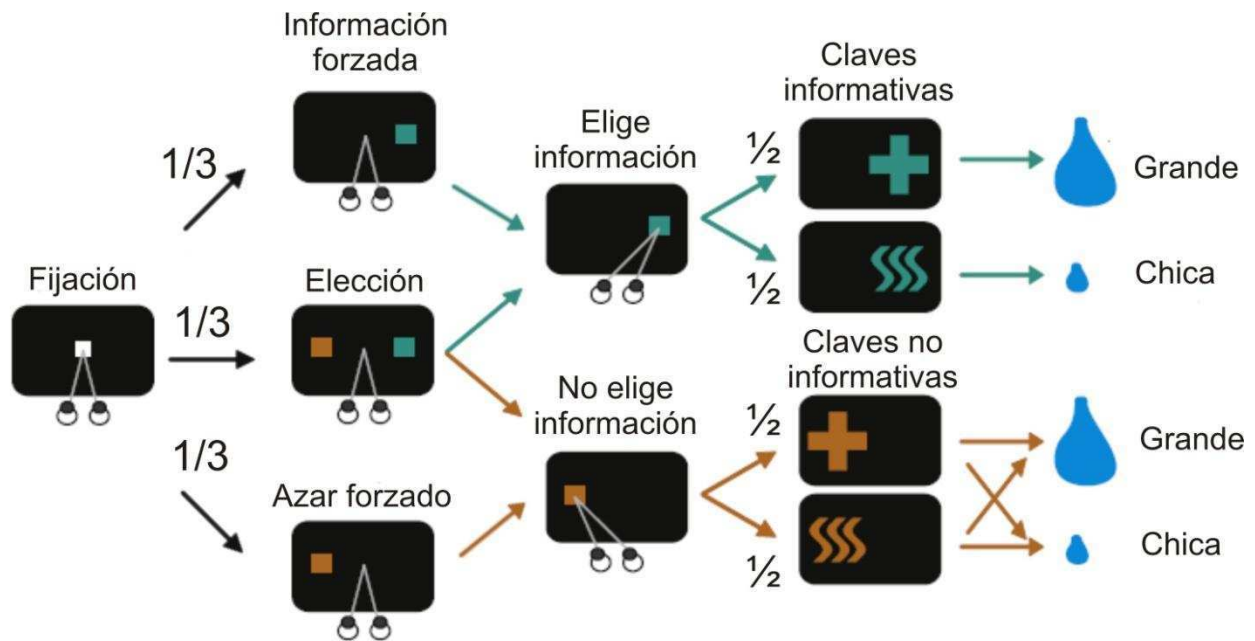
La actividad de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, además de ser importante en la ejecución de acciones motoras, como lo evidencian los severos déficits motores resultantes de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en pacientes con la enfermedad de Parkinson, también tiene un papel primordial en distintos tipos de aprendizaje. Sin embargo, persiste un debate sobre su rol en la conducta y el aprendizaje. Mientras algunas teorías destacan el rol de la

dopamina en el aprendizaje instrumental propiamente dicho, otras enfatizan un rol más general relacionado con aspectos motivacionales del comportamiento.

Es bien sabido que **la dopamina cumple un rol fundamental en la adquisición de conductas dirigidas a metas**, que, como mencionamos en la sección anterior, involucran el establecimiento de una asociación entre una acción determinada y la posibilidad de alcanzar una recompensa. **Las neuronas dopaminérgicas codifican distintos aspectos de las recompensas** lo cual es clave para la adquisición de dichas conductas. En registros electrofisiológicos en animales despiertos y realizando tareas de tipo instrumental, se observó que las neuronas dopaminérgicas son activadas por la presencia de la recompensa o por estímulos que la predicen, y que estas respuestas se incrementan cuando el valor de la recompensa aumenta (Tobler et al. 2005). Además codifican una predicción de error de la recompensa (Schultz et al. 1997; Montague et al. 2004), es decir, cuando una recompensa, o una clave que predice la recompensa, tiene más valor que el esperado, las neuronas dopaminérgicas aumentan su frecuencia de disparo; si tiene el mismo valor que el esperado tienen muy poca o nula respuesta; y si tiene menor valor que el esperado, se inhiben. Diversas teorías han intentado explicar el aprendizaje y la toma de decisiones en humanos, y distintos síntomas de desórdenes neuropsiquiátricos, inspirándose en la idea de que estas neuronas pueden codificar un rango completo de experiencias recompensantes. Sin embargo, su actividad ha sido estudiada casi exclusivamente para formas básicas de recompensa, como ser agua y comida. Menos se conoce sobre cómo estas neuronas procesan recompensas abstractas y cognitivas. Un trabajo reciente realizado en monos mostró que las neuronas dopaminérgicas también codifican la expectativa de conseguir información (Bromberg-Martin & Hikosaka 2009).

En este trabajo se entrenó a los monos a realizar una *tarea de elección de información* (ver esquema de la tarea en figura I.5). A lo largo del entrenamiento, los animales reciben tres tipos de trials. En aquellos con "información forzada", una señal (verde en la figura I.5) anticipa que una clave informará con anticipación la magnitud de la recompensa que van a recibir ("clave informativa"). En los trials que no permitirán acceder a información anticipada ("azar forzado"), los animales ven una señal distinta (naranja en la figura I.5), y a continuación una "clave no informativa" respecto al tamaño de la recompensa que recibirán. El tercer tipo de trials permite a los animales elegir con la mirada una de las dos señales iniciales. Es decir, el animal puede elegir entre realizar ensayos donde contará con información anticipada sobre la magnitud de la recompensa que recibirá, o carecer de dicha información. A lo largo de las sesiones de entrenamiento, cuando se presenta la opción de elegir, los monos muestran una preferencia mayor al 80% por acceder a la clave informativa, lo cual no puede ser explicado por una diferencia en la cantidad de recompensa que obtendrían si escogieran la clave no informativa. Se realizaron registros de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (de SNpc y VTA) y se observó que éstas aumentan su tasa de disparo con la señal que anticipa el acceso a la información y se inhiben con la señal que anticipa que no habrá información anticipada. En resumen, los monos prefieren recibir información acerca de la recompensa futura, incluso aunque esa información no les permita influir sobre lo que ocurrirá, y su preferencia comportamental está representada en la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Entonces, ***las mismas neuronas que señalan recompensas básicas tales como la comida o el agua también señalan recompensas cognitivas como la información.***

Además de las recompensas, **estímulos visuales y auditivos intensos inducen activación de neuronas dopaminérgicas, y estas respuestas se incrementan si el estímulo es novedoso** (Ljungberg et al. 1992). Las respuestas varían de acuerdo a la intensidad del estímulo (Schultz 1998).



**Figura 1.5:** Esquema de la tarea de elección de información. A lo largo del entrenamiento los animales reciben trials con información forzada (señal verde) donde se presentará otra clave que predice el tamaño de la recompensa (clave informativa). En los trials con azar forzado, la señal anaranjada indica que los animales verán una clave "no informativa" respecto al tamaño de la recompensa. En trials donde pueden elegir entre ensayos con o sin información anticipada, los animales prefieren recibir la clave informativa (adaptado de Bromberg-Martin & Hikosaka, 2009).

Las respuestas a estímulos salientes, como ser estímulos novedosos y valores imprevistos de recompensas, podrían sustentar un **rol del sistema dopaminérgico mesencefálico en la**

***codificación de los aspectos motivacionales de la conducta.*** La motivación puede ser definida como los procesos que impulsan las acciones, mantienen su actividad en proceso, y regulan su patrón (Salamone et al. 2014). La motivación involucra funciones sensoriales, motoras, cognitivas y emocionales (Salamone et al. 2014). En la literatura, se han hecho distinciones entre distintos aspectos motivacionales de la conducta, muchos de los cuales son diferencialmente afectados por manipulaciones en la transmisión dopaminérgica (Figura I.6). Las conductas impulsadas por la motivación ocurren temporalmente en fases: existen secuencias de comportamientos que llevan al organismo a estar en proximidad espacial con el objeto meta (conducta de aproximación) o incrementar las chances de encontrarse con ese objeto (conducta de búsqueda o *seeking*), y conductas que involucran la interacción directa con el estímulo motivacional u objeto meta (consumatorios o *taking*). Desde una perspectiva cualitativa, la motivación tiene aspectos direccionales (para orientar la conducta hacia el estímulo relevante o para alejarse de él) y activacionales (por ejemplo, velocidad, vigor, persistencia, esfuerzo)(revisado en Salamone et al., 2014). Más recientemente, se ha enfatizado la distinción cualitativa entre "*liking*", esto es la reacción hedónica a un estímulo, y "*wanting*" (también llamado prominencia incentiva -"incentive salience") que es el deseo por un estímulo, la tendencia a consumirlo o perseguirlo (Berridge 2013). Estas distinciones son altamente relevantes para caracterizar los efectos de la dopamina sobre los aspectos motivacionales de la conducta. Como veremos después, los tratamientos que afectan la transmisión dopaminérgica tienen efecto sobre las conductas de aproximación y de búsqueda, como así también en los aspectos activacionales y el "*wanting*", y un menor efecto en las conductas consumatorias y el "*liking*" (figura I.6).



<b>Fases temporales de la conducta motivada</b>		<i>Efecto de manipular la transmisión dopaminérgica</i>
Búsqueda	Consumación	Afecta las conductas de búsqueda.
<b>Aspectos cualitativos de la conducta motivada</b>		<i>Efecto de manipular la transmisión dopaminérgica</i>
<i>Wanting</i>	<i>Liking</i>	Afecta el <i>wanting</i> pero no el <i>liking</i> .

**Figura 1.6:** Resumen de las fases temporales y los aspectos cualitativos de la conducta motivada y los efectos de manipular la transmisión dopaminérgica sobre los mismos (adaptado de John D Salamone & Correa, 2012).

Como mencionamos antes, **el sistema dopaminérgico ha sido implicado en los aspectos activacionales de la motivación.** Distintos trabajos han demostrado que la administración de antagonistas dopaminérgicos en bajas dosis, así como también la infusión de antagonistas en el núcleo accumbens o lesiones dopaminérgicas en dicho núcleo, no generan déficits en aspectos fundamentales de la motivación por la comida y el reforzamiento, pero reduce la tendencia de los animales a trabajar para conseguir la recompensa apetitiva, es decir, estos están dispuestos a realizar un menor esfuerzo para conseguir la recompensa. Una de las tareas que han sido utilizadas para estudiar este efecto consiste en ofrecer a los animales (previamente privados de comida) la elección entre apretar una palanca para recibir un tipo de comida preferida versus consumir una menos preferida pero disponible libremente (Salamone et al. 2007). En condiciones control, las ratas entrenadas consiguen la mayor parte de su comida apretando la palanca. Dosis bajas o moderadas de antagonistas dopaminérgicos de receptores D1 o D2

producen una alteración sustancial de la respuesta ya que incrementan el consumo de la comida menos preferida y reducen la obtención de la preferida (Salamone et al. 1991). En contraste, si previamente los animales son saciados, lo que constituye una devaluación de la recompensa, el consumo se reduce en igual medida para ambos tipos de comida. Otra prueba que ha sido desarrollada para estudiar la toma de decisiones en base al esfuerzo requerido consiste en un laberinto en forma de T que ofrece dos opciones, un brazo con mayor cantidad de recompensa que presenta una barrera (en ciertas condiciones) y uno con menor recompensa que no presenta ninguna barrera (Salamone et al. 1994). Cuando la barrera esta puesta en su lugar, en condiciones control los animales prefieren realizar un mayor esfuerzo, eligiendo el brazo con la barrera, para obtener la recompensa de mayor tamaño. La administración de antagonistas dopaminérgicos o depleción de dopamina en el núcleo accumbens disminuye la elección por el brazo que requiere un mayor esfuerzo. Sin embargo, este tratamiento no afecta la preferencia por el brazo con mayor recompensa cuando no está presente la barrera. Según esta visión, las manipulaciones dopaminérgicas no alteran la preferencia basada en la magnitud de la recompensa, no afectan la discriminación, la memoria y la adquisición del aprendizaje instrumental, pero sí reducen la activación comportamental y causan que los animales cambien su elección y elijan la alternativa que requiere un menor esfuerzo.

Por otro lado, **la transmisión dopaminérgica es importante para la codificación del "wanting" o prominencia incentiva.** Según la hipótesis de la prominencia incentiva (revisado en Berridge, 2013), los procesos de codificación de las recompensas pueden ser disociados en dos componentes separados, "wanting" (o prominencia incentiva) y "liking", los cuales son

representados por sistemas neurales diferentes. La palabra "*liking*" hace referencia a los procesos que subyacen la evaluación hedónica que típicamente produce placer de forma consciente. Por "*wanting*" nos referimos a los procesos que motivan las conductas dirigidas a metas. La prominencia incentiva integra, por un lado, el estado neurobiológico del animal (por ejemplo, si tiene hambre o está saciado, lo cual varía independientemente del aprendizaje), y por el otro, las asociaciones previas entre una clave y la recompensa, es decir, un estímulo condicionado (EC) o incondicionado (EI), respectivamente. Dos características reconocibles de la prominencia incentiva son:

(1) El "*wanting*" dirigido hacia un EI disparado por la presentación del EC correspondiente. Un encuentro con un EC usualmente dispara un pulso de motivación elevada para obtener o consumir más EI.

(2) El "*wanting*" dirigido hacia el EC, es decir, la atracción hacia un EC aunque no esté presente el EI. Un EC usualmente dispara una respuesta comportamental de acercamiento a dicho estímulo.

Existen muchas evidencias en la literatura que apoyan la idea de que la transmisión dopaminérgica es importante para la codificación del "*wanting*" o prominencia incentiva. Un aumento en la transmisión dopaminérgica produce una potenciación de la prominencia incentiva disparada por la presentación de un EC. Por ejemplo, la inyección de anfetamina en el accumbens en ratas incrementa la habilidad de un EC para incrementar la respuesta instrumental para obtener una recompensa de solución de sacarosa (Wyvell & Berridge 2000). Este mismo efecto se ve en animales con sensibilización a la anfetamina, que consiste en la administración de esta droga por varios días consecutivos y cuyo efecto es un progresivo

aumento de la respuesta comportamental a la misma dosis de droga con respecto al día anterior (Wyvell & Berridge 2001). En estos animales sensibilizados a la droga se observa un aumento en el "wanting" disparado por la presentación de la clave asociada a la recompensa aunque los animales sean testeados en ausencia de la misma. Por otro lado, la administración de anfetamina no afecta el "*liking*" evaluado mediante un test que estima el impacto hedónico de la sacarosa midiendo las reacciones afectivas disparadas por la infusión oral del estímulo gustativo (por ejemplo, protrusión rítmica de la lengua). El "*liking*" tampoco es afectado por administración de antagonistas dopaminérgicos o lesiones completas de las neuronas dopaminérgicas (Berridge et al. 1989; Berridge & Robinson 1998).

Como mencionamos anteriormente, **el sistema dopaminérgico es un componente esencial de los circuitos que promueven las conductas de búsqueda**. Si se reduce experimentalmente la función dopaminérgica en el núcleo accumbens en ratas mediante inyecciones locales de antagonistas dopaminérgicos, se producen déficits en distintos componentes de la conducta de búsqueda de recompensas: la latencia a iniciar conductas de aproximación se incrementa mientras que la velocidad de aproximación, la capacidad de hallar la recompensa y la habilidad para consumirla no se alteran (Nicola 2011). En monos, la administración de anfetamina, una droga que aumenta la transmisión dopaminérgica, aumenta la conducta de búsqueda de comida en un paradigma de reforzamiento pero no modifica el consumo de la misma (Foltin 2001).

En ambientes naturales, el sistema dopaminérgico jugaría un rol importante en las conductas de búsqueda de recursos. Dado que estas conductas implican un gasto energético, la codificación neural del esfuerzo, velocidad y persistencia (aspectos activacionales de la

conducta) por parte del sistema dopaminérgico, es altamente adaptativa para la toma de decisiones en base a un análisis costo/beneficio que posibilite a los organismos explotar apropiadamente los recursos del ambiente. Recientemente se ha sugerido que los GB cumplen un rol importante en procesos de toma de decisión que involucran la opción de explotar una recompensa inmediatamente disponible o emprender la búsqueda de mejores posibilidades (*foraging*). Estas ideas surgen de la ecología comportamental e intentan identificar los sustratos neuronales que subyacen a la explotación óptima del ambiente, que tiene un fuerte impacto en la aptitud evolutiva, con lo cual se supone que deben haber jugado un rol clave en la evolución de los circuitos de toma de decisión. Las fuentes de recurso están distribuidas de forma heterogénea en el ambiente en forma de "parches", lo cual fuerza a los animales a decidir si quedarse en un determinado parche o salir en busca de otro con más cantidad de recurso. Un estudio reciente extiende estas ideas a humanos mediante un juego de video, donde la recompensa es monetaria y el costo de abandonar la fuente actual de recursos para acceder a otra potencialmente más rica se simula con un tiempo de espera, en lugar del desplazamiento físico desde un parche a otro (Kolling et al. 2012). Tanto en ratones (Kvitsiani et al. 2013), monos (Hayden et al. 2011) como humanos (Kolling et al. 2012), la decisión de dejar el parche actual recluta cambios de actividad neuronal en las cortezas anterior del cíngulo, orbitofrontal y prefrontal (Pearson et al. 2014). Si bien los mecanismos que subyacen este tipo de decisiones no se conocen bien, los modelos más difundidos proponen que la información relativa al valor estimado de cada parche y el costo de viajar de un parche a otro se integran en una única *variable de decisión* que es contrastada contra un umbral, y que de éste cómputo resulta la decisión de persistir o no en el parche actual (Hayden et al. 2011). En un trabajo reciente

realizado en monos, se encontró que la corteza cingular anterior (CCA) codifica esta *variable de decisión* (Hayden et al. 2011). En este estudio los monos realizaron una tarea de *foraging* virtual en la que debían elegir entre dos targets. Un target corresponde a quedarse en el parche y su elección posibilita conseguir una recompensa (jugo) que se va acabando cada vez que dicho target es elegido (es decir, que el valor de quedarse en el parche disminuye con el tiempo). El segundo target permite la opción de irse del parche a otro potencialmente más rico, y su elección introduce un retraso en la entrega de la recompensa (este retraso es el costo de irse del parche actual). Los monos tienden a dejar el parche cuando el jugo del mismo se reduce, y dicha decisión está favorecida cuando el segundo target indica un costo menor. Las neuronas de la CCA disparan durante cada decisión secuencial de quedarse en un parche e incrementan su tasa de disparo hasta llegar a un umbral que señala la decisión de irse del parche. Este resultado sugiere que estas neuronas de la CCA codifican la variable de decisión requerida por el *foraging*. Ahora bien, la codificación de una variable de decisión involucra la integración de información acerca del costo de irse y el beneficio de quedarse. Los autores del trabajo especulan que esta información podría ser provista por las neuronas dopaminérgicas, ya que estas codifican parámetros que tienen que ver con las recompensas y con la búsqueda de información.

En resumen, la actividad de las neuronas dopaminérgicas es importante para la adquisición de conductas dirigidas a metas y para la ejecución conductas exploratorias, aunque todavía persiste un debate sobre su rol específico en la conducta y el aprendizaje. Mientras que algunas teorías sugieren que la dopamina cumple un rol general relacionado con aspectos motivacionales del comportamiento, otras enfatizan un rol relacionado a la codificación de

señales más específicas necesarias para el aprendizaje como la predicción de error de recompensa.

Además de su relevancia en la función del cerebro adulto, como veremos más adelante, la dopamina cumple funciones importantes en la maduración de los circuitos de los GB. Sin embargo, poco se conoce acerca de cómo los efectos madurativos de la dopamina influyen sobre la motivación y el aprendizaje. Desde esta perspectiva, alteraciones tempranas en la transmisión dopaminérgica podrían tener efectos duraderos sobre la conducta, relevantes para comprender desórdenes neuropsiquiátricos como el trastorno de déficit de atención e hiperactividad y el síndrome de Tourette.

## **II) Plasticidad córticoestriatal**

*De modo muy general, los fenómenos de plasticidad sináptica consisten en cambios en la forma en que se conectan las poblaciones neuronales entre sí en relación con procesos madurativos o del aprendizaje. Los cambios plásticos en las sinapsis incluyen, entre otras cosas, modificaciones en la expresión de receptores, en la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores, y en la morfología y número de las sinapsis, que se reflejan en un cambio de la eficacia con que se transmite información a través de redes de neuronas. Se asume que cambios en la eficacia de las sinapsis córticoestriatales median los fenómenos de aprendizaje en los que están involucrados los GB. En esta sección nos centraremos en los mecanismos de plasticidad de las sinapsis córticoestriatales.*

### **Depresión y potenciación de largo término córticoestriatal**

La forma de plasticidad más caracterizada en las sinapsis córticoestriatales es la depresión de largo término (*long term depression*, LTD). Los estudios iniciales realizados en rodajas utilizaron protocolos intensos para activar las aferencias de las NEM, como la estimulación a alta frecuencia (*high frequency stimulation*, HFS), y mostraron principalmente inducción de LTD. Con posterioridad se reportaron los efectos de protocolos que repiten patrones temporales de la activación pre y postsináptica (*spike timing dependent plasticity*, STDP) y se describieron tanto LTD como LTP dependiendo de la organización temporal de los estímulos.

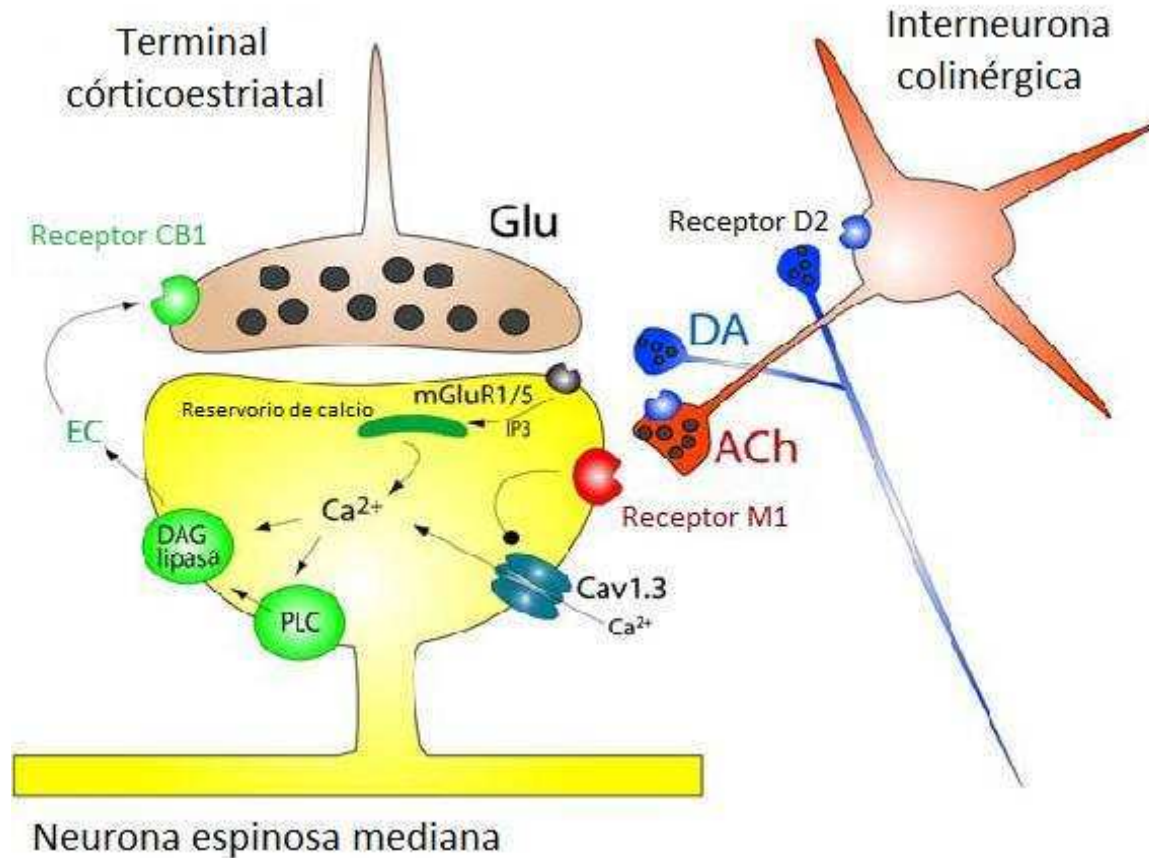


En relación con la HFS-LTD, estudios *ex vivo*, mostraron que la estimulación a alta frecuencia de aferentes excitatorias al estriado lleva a una reducción duradera de su fuerza sináptica (P Calabresi et al. 1992; Lovinger et al. 1993; Walsh 1993). La LTD inducida por HFS se expresa a través de la reducción presináptica de la liberación de glutamato (Choi & Lovinger 1997). Además, la LTD estriatal inducida por HFS requiere de la activación de receptores de dopamina D2, receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) tipo I acoplados a Gq, canales de calcio tipo L y activación de receptores de endocannabinoides CB1, pero no requiere de receptores NMDA (revisado en Kreitzer & Malenka, 2008).

Hay evidencia abundante proveniente de estudios en rodajas sobre la necesidad de dopamina para que ocurra HFS-LTD en sinapsis córticoestriatales, en particular, a través de la estimulación de receptores D2 (P Calabresi et al. 1992; Tang et al. 2001). La activación de receptores D2 incrementa la producción de endocannabinoides (Giuffrida et al. 1999), los cuales son liberados desde las NEM y activan receptores CB1 en la presinapsis excitatorias (Ronesi et al. 2004) reduciendo la liberación de glutamato por neuronas corticales. La activación de receptores mGluR y canales de calcio tipo L, también llevan a la producción y liberación de endocannabinoides (revisado en López de Maturana & Sánchez-Pernaute, 2010).

Un aspecto importante de la HFS-LTD es que ocurre en una gran mayoría o todas las NEM, a pesar de que solo la mitad de ellas expresa en receptor D2. Esto se ha explicado invocando un rol para las interneuronas colinérgicas estriatales (figura I.7). Estas interneuronas son inhibidas por dopamina a través de receptores D2 y a su vez son capaces de actuar sobre todas las NEM mediante receptores para acetilcolina M1. Así, la falta de acción de la acetilcolina sobre

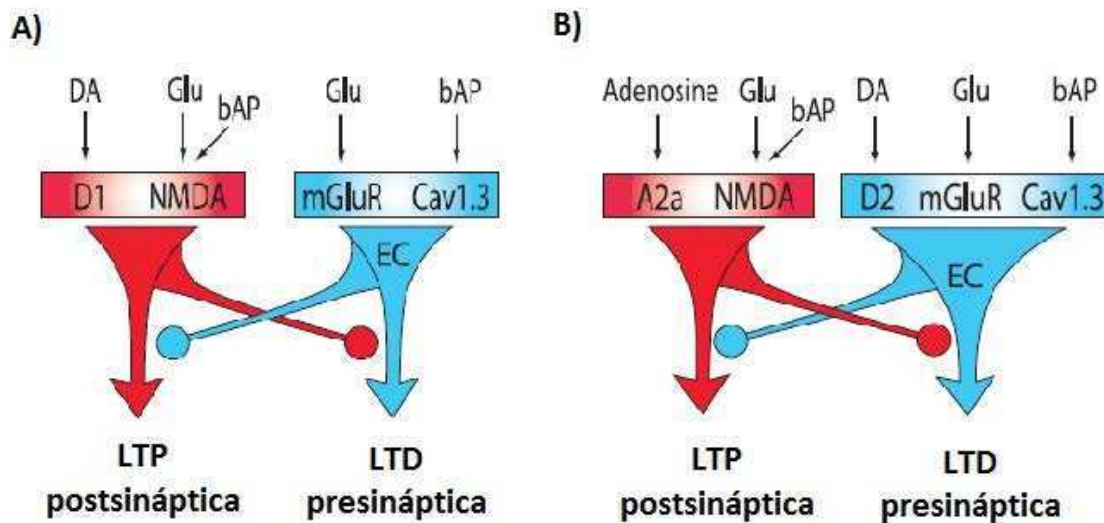
receptores M1 favorecería la activación de canales voltaje-dependientes de calcio y sería indispensable para la HFS-LTD en rodajas (Wang et al. 2006).



**Figura 1.7:** Mecanismo propuesto para la HFS-LTD mediado por interneuronas colinérgicas (adaptado de Wang y col., 2006).

Más recientemente se popularizó el uso de protocolos de inducción de plasticidad basados en regular el intervalo que transcurre entre la activación de la neurona pre y post-sináptica (STDP). Estos protocolos revelaron una gran complejidad en las bases de la LTD y LTP en distintos tipos de neuronas estriatales (Figura 1.8). En particular, existen dos poblaciones de NEM que pueden distinguirse porque expresan distintos receptores para dopamina (Gerfen et al. 1990), y los

mecanismos que subyacen a la LTD y LTP inducidas con protocolos de STDP, son diferentes en cada subpoblación (Kreitzer & Malenka 2007; Shen et al. 2008).



**Figura 1.8:** Mecanismos de la STDP-LTD y STDP-LTP en NEM que poseen el receptor D1 (A) o el receptor D2 (B) según Shen y col., 2008. bAP: potencial de acción retropropagado

Cabe notar que, a diferencia de lo observado con la HFS-LTD, algunas formas de STDP parecen no requerir dopamina. A pesar de que la dependencia dopaminérgica en la inducción de la LTD córticoestriatal fue considerada importante, trabajos recientes muestran que es posible inducir LTD en presencia de antagonistas del receptor D2 mediante la aplicación de agonistas de los receptores mGluR 1 (Kreitzer & Malenka 2005) o mediante la activación de canales de calcio tipo L en combinación con actividad postsináptica moderada (Adermark & Lovinger 2007). Estos resultados sugieren que el rol de los receptores D2 sería modular el proceso de LTD aumentando la probabilidad de que ésta ocurra (Lovinger 2010).

Es notable el hecho de que los diversos mecanismos que intervienen en el proceso de LTD tienen en común la síntesis de endocannabinoides. La activación de los receptores CB1 por sí

sola no es suficiente para producir un fenómeno de LTD, sino que se necesita que las sinapsis aferentes estén activas. Esto otorga a la LTD mediada por endocannabinoides propiedades computacionales importantes como detección de coincidencia y especificidad sináptica (Heifets & Castillo 2009).

Existen otras formas de LTD córticoestriatal que pueden ser inducidas por aplicación de distintos neuromoduladores. La aplicación exógena de opioides y la liberación endógena de estos en preparaciones *ex vivo* inducen LTD de los inputs excitatorios en el estriado dorsal en ratas y ratones (Atwood et al. 2014). La activación de receptores serotoninérgicos 5-HT(1b) en rodajas de ratón y rata mediante la aplicación de serotonina o la liberación endógena de este neurotransmisor, resulta en la inducción de LTD corticoestriatal (Mathur et al. 2011). Esta LTD inducida por serotonina es mediada presinápticamente, depende de cAMP y es mutuamente oclusiva con la LTD dependiente de endocannabinoides, es decir que comparten mecanismos (Mathur et al. 2011).

Por el contrario, la inducción y expresión de LTP en el estriado está menos caracterizada. Estudios hechos *ex vivo* indican que una forma de LTP dependiente de receptores NMDA puede ser obtenida con estimulación de alta frecuencia en ausencia de magnesio extracelular (P. Calabresi et al. 1992; Kerr & Wickens 2001). Los receptores de dopamina D1 han sido implicados en LTP estriatal (Calabresi et al. 2000; Kerr & Wickens 2001) y se ha reportado que la depleción de dopamina bloquea la LTP (Centonze et al. 1999). También se ha visto que la inducción de LTP córticoestriatal por HFS y bajo magnesio es dependiente de BDNF (Jia et al. 2010). Recientemente se ha descrito que es posible inducir LTP córticoestriatal en rodajas mediante la estimulación de las aferentes excitatorias con protocolos de ráfagas de pulsos a

frecuencia theta (5-11 Hz, theta-burst stimulation, TBS) (Hawes et al. 2013). Esta forma de plasticidad es más fisiológica dado que ocurre a una concentración de magnesio normal en el líquido cefalorraquídeo y, además, el patrón de estimulación corresponde a patrones de actividad reportados *in vivo* que son relevantes durante el aprendizaje (DeCoteau et al. 2007). La LTP inducida con este tipo de protocolos es dependiente de NMDA, mGluR1, receptores de acetilcolina muscarínicos M1, requiere activación de PKC, PKA, ERK (Hawes et al. 2013) y la liberación actividad dependiente de BDNF mediada por receptores NMDA presinápticos (Park et al. 2014).

Los trabajos mencionados hasta el momento se refieren a estudios *ex vivo*, pero ha sido posible inducir procesos de plasticidad *in vivo*, ya sea potenciación como depresión (Charpier & Deniau 1997; Reynolds et al. 2001; Stoetzner et al. 2010; Reynolds & Wickens 2000). Como mencionamos anteriormente, numerosos experimentos realizados en rodajas muestran que diversas formas de LTD son dependientes de dopamina (Tang et al. 2001; Wang et al. 2006; Shen et al. 2008; Lovinger 2010). Sin embargo, en estudios realizados *in vivo* en nuestro laboratorio, observamos que la LTD inducida por HFS no requiere dopamina (Galiñanes y col., datos no publicados), hecho que remarca la importancia de realizar estudios en el animal intacto (estos resultados se describen en la siguiente sección, ver figura 1.9). Es posible que, protocolos como la HFS que buscan inducir una LTD máxima, en un contexto de conexionado intacto, la elevada concentración de moduladores locales y la presencia de actividad espontánea, no responda a las mismas reglas que en rodajas.

Por último, existe abundante evidencia que apoya la idea de que los fenómenos de plasticidad corticoestriatal serían importantes para la adquisición de distintos tipos de conductas mediadas

por estos circuitos (ver sección I.III). Menos se conoce sobre la contribución de estos fenómenos a dar forma al conexionado córticoestriatal durante el desarrollo postnatal, tema que abordaremos en esta tesis.

## **II) Maduración del sistema córticoestriatal**

*Del apartado anterior se desprende que, dependiendo del patrón de estimulación pre y postsináptica, la presencia de moduladores como acetilcolina y dopamina, la activación de canales de calcio voltaje-dependientes y receptores mGluR, y tal vez otros factores, distintas formas de plasticidad afectan de manera más o menos específica a distintas subpoblaciones de NEM. Estos fenómenos de plasticidad no solo son importantes durante el aprendizaje en el animal adulto, sino que podrían participar además en dar forma al conexionado córticoestriatal durante el desarrollo. En esta sección, describiremos los procesos plásticos que ocurren a lo largo de la maduración del sistema córticoestriatal y cómo la dopamina interviene en dicho proceso, analizaremos patologías presumiblemente asociadas a fallas en el neurodesarrollo de estos circuitos y, por último, nos referiremos al modelo de lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas que es objeto de estudio de este trabajo.*

### **III. I) Maduración del sistema córticoestriatal y rol de la dopamina**

El proceso madurativo del sistema córticoestriatal involucra, la llegada de los axones corticales, la expresión de espinas en las neuronas de proyección estriatales, y el establecimiento de las sinapsis córticoestriatales seguido de un proceso de podado de conexiones. En roedores, en la primera semana postnatal la mayoría de las aferentes estriatales ya están presentes (Wise et al. 1979; Voorn et al. 1988; Olson et al. 1972). Sin embargo, las NEM no tienen espinas en este período de tiempo y pocas sinapsis están presentes (Hattori & McGeer 1973). Hacia el final de

la segunda semana postnatal, ocurre la aparición de espinas dendríticas en las NEM junto con un aumento en el número de sinapsis asimétricas (glutamatérgicas) y simétricas (GABAérgicas y dopaminérgicas) (Hattori & McGeer 1973). Durante la tercera semana postnatal, la densidad de sinapsis simétricas y asimétricas se incrementa dramáticamente (Butler et al. 1998) en todo el estriado. Aproximadamente en la cuarta semana de vida (específicamente entre el día postnatal 18 y 25), la densidad de ambos tipos de sinapsis decae rápidamente en el estriado dorsolateral, mientras que se mantiene sin cambios en el estriado dorsomedial, y estos niveles se conservan en el adulto (Butler et al. 1998). De acuerdo a estudios de microscopía electrónica, las sinapsis excitatorias son estructuralmente inmaduras antes del día postnatal 21 lo que sugiere que las propiedades funcionales de las sinapsis todavía no han terminado de madurar antes de esa edad (Sharpe & Tepper 1998; Tepper et al. 1998).

Con respecto a la maduración de las propiedades electrofisiológicas de las NEM, las propiedades intrínsecas como la resistencia de entrada, el potencial de reposo y la duración del potencial de acción están bien desarrolladas al final de la tercera semana postnatal. Las propiedades que dependen de las entradas aferentes como el patrón de actividad espontánea y la respuesta a estimulación eléctrica de entradas corticales o talámicas maduran una o dos semanas después. La actividad espontánea de las NEM es escasa o nula en las primeras dos semanas de vida. En la tercera semana postnatal, las NEM presentan actividad rítmica, pero recién en la cuarta semana los estados up y down tienen un aspecto maduro. Esto evidencia que las sinapsis córticoestriatales alcanzarían plena madurez aproximadamente en la cuarta semana de vida (Tepper et al. 1998).



En relación a los cambios plásticos observados para el distrito dorsolateral, se observó que la probabilidad de liberación córticoestriatal de glutamato disminuye durante la infancia. Este mecanismo presináptico fue interpretado como un fenómeno fisiológico de LTD de las sinapsis córticoestriatales durante el desarrollo (Choi & Lovinger 1997; Tang et al. 2001). Este proceso fisiológico de depresión córticoestriatal madurativa sería dependiente de endocannabinoides (Ade & Lovinger 2007) y de dopamina, ya que no fue observado en ratones carentes de receptor D2 ni en ratas con lesión de neuronas dopaminérgicas inducida con la toxina 6-hidroxidopamina (Tang et al. 2001). Es importante destacar que la inervación dopaminérgica del estriado y expresión de receptores para DA en el mismo también muestran una fuerte maduración postnatal, paralela a la de las sinapsis córticoestriatales, alcanzando propiedades adultas hacia la cuarta semana postnatal (Tepper et al. 1990; Broaddus & Bennett 1990). Estos resultados indican que la dopamina podría moldear el conexionado córticoestriatal a través de la regulación de la eficacia sináptica córticoestriatal.

Un estudio de electrofisiología *in vivo* de nuestro laboratorio proveyó evidencia adicional que soporta esa hipótesis. Galiñanes y col. (2009) demostraron que la sincronización córticoestriatal madura marcadamente durante la adolescencia en ratones y que la destrucción neonatal de neuronas dopaminérgicas que inervan la corteza prefrontal y el estriado retrasa la dicha maduración. Una observación importante de este trabajo fue que la actividad espontánea en el estriado dorsolateral disminuye normalmente con la edad, pero se mantiene muy elevada en ratones adultos que sufrieron una lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas (figura 1.9B). Una reducción de la actividad espontánea durante el desarrollo podría reflejar una mejor calidad de la relación señal-ruido en la respuesta de neuronas estriatales a sus entradas

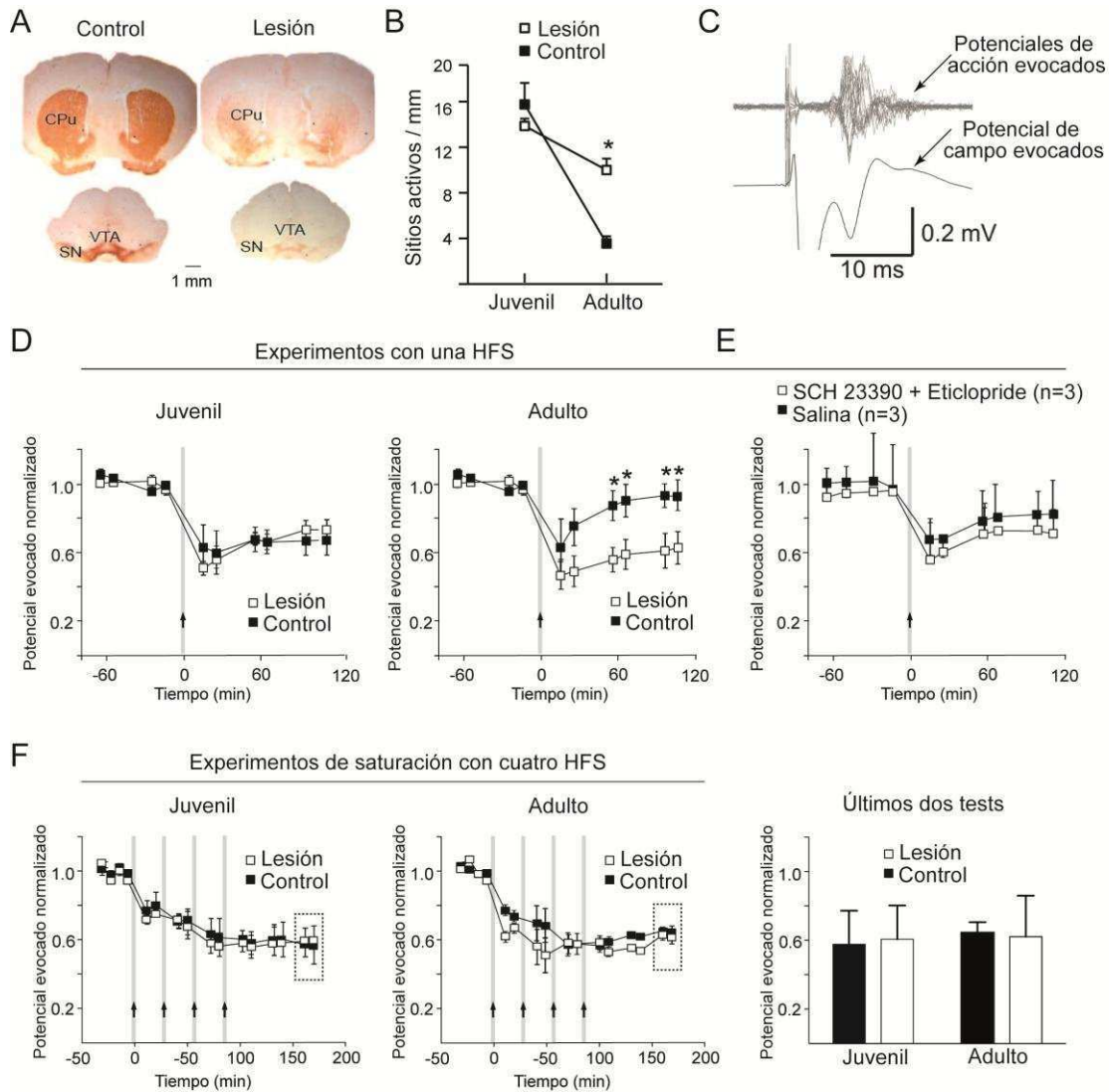
sinápticas en el adulto. Entonces, la falta de DA durante el desarrollo podría derivar en una red estriatal con menor selectividad en el procesamiento de información cortical.

En conjunto con los resultados descritos arriba relativos a la existencia de una forma madurativa de LTD córticoestriatal, la hipótesis que guió el trabajo del laboratorio en años recientes fue que una forma de LTD del desarrollo (Tang et al. 2001) podría ser responsable de la reducción de la actividad espontánea de las neuronas estriatales que ocurre durante la adolescencia normal en ratones (Galiñanes et al. 2009). En esta dirección, se observó que la HFS-LTD es regulada durante el desarrollo postnatal de manera dependiente de las vías dopaminérgicas. En animales juveniles (pre-adolescentes) control y lesionados, un intento de inducción de plasticidad mediante HFS *in vivo* produce un fenómeno de depresión cuya magnitud y duración es igual en ambos grupos (figura 1.9D). En cambio, en animales adultos, el grupo control presenta una depresión transitoria luego de un intento de inducción de plasticidad mientras que los lesionados tienen un perfil de respuesta similar al del grupo juvenil (figura 1.9D). Nuestra interpretación de estos resultados fue que la acumulación de eventos de LTD durante el desarrollo lleva a la transmisión córticoestriatal cerca de su piso de eficacia, y en consecuencia es más difícil inducir LTD en el adulto. Por otro lado, la disminución de la eficacia sináptica córticoestriatal se relacionaría con la disminución en la actividad espontánea estriatal que ocurre normalmente con la edad. Por el contrario, en ausencia de dopamina, la menor acumulación de LTD durante el desarrollo derivaría en una mayor actividad espontánea estriatal y un mayor margen de eficacia sináptica que reducir induciendo LTD en el adulto.

Una predicción de esta hipótesis es que sucesivos intentos para inducir LTD córticoestriatal no tendrían efecto en el animal adulto ya que la transmisión córticoestriatal estaría cerca de un

piso, mientras que sí lo tendrían en el animal lesionado. Durante mi tesis de licenciatura, estudiamos esta posibilidad mediante un protocolo "de saturación" que consistió en la aplicación sucesiva de inducciones HFS con el fin de llegar a la máxima depresión córticoestriatal posible. Contrariamente a lo que esperábamos, todos los grupos independientemente de la edad y lesión llegaron al mismo piso de transmisión córticoestriatal (figura I.9F). Sin embargo, los adultos con lesión neonatal lo hicieron luego del primer o segundo episodio de HFS mientras que los controles requirieron tres o cuatro inducciones antes de alcanzar su piso, sugiriendo una mayor susceptibilidad a la HFS luego de la lesión.

Tal como veremos más adelante, durante esta tesis abordamos nuevamente estas preguntas ya que diferencias en la susceptibilidad a sufrir procesos de LTD podrían resultar en una disminución de la fuerza con la que se conecta la corteza con el estriado, hecho de interés ya que pacientes con desórdenes neuropsiquiátricos presuntamente asociados a un estado hipodopaminérgico durante el desarrollo pueden mostrar déficit en el conexionado córticoestriatal.



**Figura 1.9.** **A.** Cortes coronales de cerebro de ratón que muestran la inmunoreactividad de tirosina hidroxilasa como marcador de las neuronas dopaminérgicas (SN y VTA) y sus proyecciones (CPu) en un ratón control y otro que sufrió una lesión neonatal de las neuronas dopaminérgicas. **B.** Sitios activos que presentan actividad espontánea por mm de recorrido del electrodo a través del estriado. Existe una disminución de la actividad espontánea con la edad en animales controles, que no ocurre en animales con lesión (ANOVA dos vías, test de Tukey  $*p < 0.0005$ ). **C.** Se midieron potenciales de campo local estriatales para evaluar la conectividad córticoestriatal. La amplitud de dichos potenciales correlaciona con la descarga de potenciales de acción por neuronas estriatales. **D.** Efectos de una HFS cortical sobre la respuesta de campo córticoestriatal. Se observa LTD en todos los grupos excepto los adultos normales, que solo sufren una depresión transitoria córticoestriatal (ANOVA 2 vías de medidas repetidas, test de Tukey  $*p < 0.05$ ). **E.** La HFS-LTD córticoestriatal es independiente de dopamina in vivo, como demuestran experimentos de farmacología en ratones jóvenes donde la administración conjunta de antagonistas D1 (SCH23390) y D2 (Eticlopride) no impide la LTD. Los datos de B-E fueron obtenidos por Galiñanes y col. y en parte publicados en Galiñanes y col. 2009. **F.** Protocolo de saturación de la LTD córticoestriatal con cuatro HFS. La edad y lesión no modifican el grado máximo de depresión que se puede alcanzar en el protocolo de saturación (ANOVA de dos vías el tiempo recuadrado con línea punteada). Datos correspondientes a la tesis de licenciatura de Bárbara Braz.

### **III. II) Patologías asociadas al neurodesarrollo de los GB**

Existe evidencia que sugiere que ciertas condiciones neuropsiquiátricas, como el trastorno de déficit de la atención con hiperactividad (TDAH) y el síndrome de Tourette (ST) pueden deberse a alteraciones tempranas en el funcionamiento de los circuitos córticoestriatales y alteraciones en la función dopaminérgica (Graybiel 2008). Estos desórdenes comienzan a expresarse durante la infancia y los síntomas pueden persistir en la adolescencia tardía o en el adulto.

El ST se caracteriza por la presencia de tics motores y fonológicos, y la expresión repetitiva de conductas inapropiadas en el contexto en el que se presentan. Típicamente comienza alrededor de los 7 años de edad con tics que involucran los músculos de los ojos y rostro, cuello y hombros. Las vocalizaciones frecuentemente comienzan 1 o 2 años después de que comiencen los síntomas motores. Si bien no se conoce su etiología, distintos estudios sugieren que existen alteraciones en los circuitos córticoestriatales y en la transmisión dopaminérgica. Estudios de imágenes muestran la existencia de una disminución volumétrica en el núcleo caudado de niños y adultos con ST (Castellanos et al. 1996). Además, estudios neuropatológicos han reportado que existe una disminución en el nivel de inmunoreactividad para dinorfina A en las proyecciones estriatales hacia el globo pálido (Haber et al. 1986). Por otro lado, la mayoría de los pacientes (>80%) reportan reducción significativa de los síntomas cuando se les administra haloperidol o antipsicóticos que bloquea selectivamente los D2R (Shapiro et al. 1989) lo que es consistente con la idea de que alteraciones en la transmisión dopaminérgica estarían involucradas en la aparición de los síntomas.

El TDHA es un desorden clínicamente heterogéneo que comienza temprano en la infancia y se caracteriza por la presencia de alteraciones en la atención, hiperactividad e impulsividad. De

acuerdo a la prevalencia de los signos conductuales, el TDHA puede ser clasificado en subtipo inatento, impulsivo/hiperactivo o combinado (DSM IV). Su impacto en la sociedad es enorme en términos de costo y estrés para el grupo familiar, ya que genera resultados académicos y vocacionales adversos para los pacientes. En la adolescencia, la hiperactividad e impulsividad pueden disminuir pero, en la mayoría de los casos persisten alteraciones de la conducta o el desempeño social (Biederman & Faraone 2005; Wilens et al. 2009; Klein et al. 2012).

La etiología del TDHA no ha sido aclarada. Una hipótesis muy difundida es la *teoría del déficit de dopamina*. Esta teoría postula que un estado hipodopaminérgico instaurado de forma temprana en la vida del paciente, resultante de factores genéticos predisponentes combinados con factores ambientales y psicosociales adversos, estaría relacionada con la aparición del TDHA. Dentro de las evidencias que apoyan esta hipótesis (Liston et al. 2011) podemos citar: 1) anomalías en los circuitos fronto-estriatales (que están modulados por DA), en particular, una disminución en el tamaño de sus componentes y una disminución en su activación durante tareas conductuales; 2) la administración de psicoestimulantes que aumentan la transmisión dopaminérgica, reduce los síntomas de hiperactividad, falta de atención e impulsividad; 3) una disminución en la actividad dopaminérgica en el caudado de pacientes con TDHA (Volkow et al. 2007); 4) estudios genéticos detectaron la asociación del TDHA con variantes alélicas de genes relacionados a la función dopaminérgica, tales como el receptor de dopamina D4 (D4R) y el transportador de dopamina.

No se trata de la única teoría sobre el origen del TDHA. Otra muy difundida pone el foco en la corteza prefrontal. Las evidencias que la soportan incluyen la existencia de alteraciones morfológicas y funcionales detectadas en estudios de imágenes funcionales realizados en

pacientes (Konrad & Simon B. Eickhoff 2010), la presencia de déficit cognitivos en los pacientes que son tradicionalmente asociados a la función prefrontal (Barkley 1997), y el hecho que drogas que selectivamente aumentan la transmisión noradrenérgica (que es más relevante en la corteza prefrontal que en el estriado) también muestran eficacia sobre los síntomas de los pacientes (Arnsten 2011).

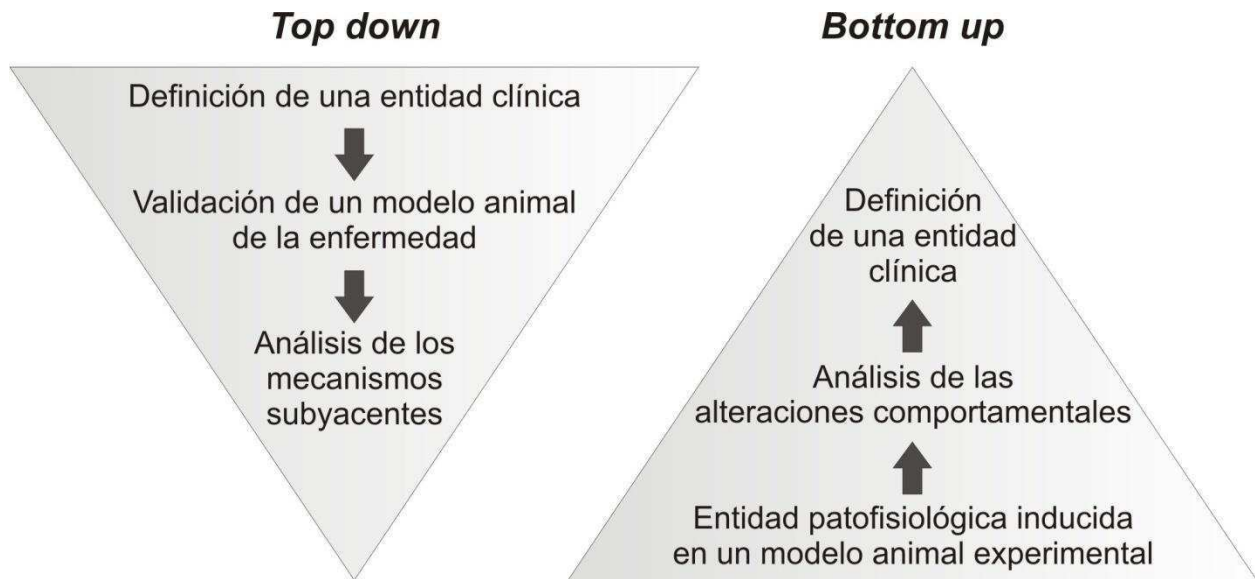
En este contexto se han propuesto que el déficit de atención estaría relacionado con una disfunción de circuitos prefrontoestriatales, que ocasionaría déficits en la capacidad de suprimir pensamientos o acciones inapropiadas ("behavioral inhibition"), mientras que los síntomas de hiperactividad e impulsividad se relacionarían con alteraciones en los circuitos mesocorticolímbicos, responsables del procesamiento de la recompensa y la novedad/prominencia de los eventos ambientales (Liston et al. 2011).

Existen altos niveles de comorbilidad entre TDHA, TS y el trastorno obsesivo compulsivo (TOC). Por ejemplo, el 50% de los pacientes con TS son diagnosticados también como TDHA (Comings & Comings 1987; Bruun & Budman 1992), y un 60% como TOC (Pauls et al. 1986; Pauls et al. 1991). Esto ha llevado a pensar que no se trata de entidades completamente independientes, sino que compartirían mecanismos etiopatogénicos que resultan en diferentes expresiones clínicas según cómo se combinan en un paciente dado y cómo interaccionan con el tiempo y el ambiente (Hyman 2010). Es importante destacar que los manuales de diagnóstico como las distintas versiones del DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) establecen criterios operativos para clasificar a los pacientes de acuerdo con sus alteraciones conductuales, y no sobre la base de las alteraciones biológicas subyacentes a las mismas. La naturaleza heterogénea de los síntomas y los altos niveles de comorbilidad hacen muy difícil

validar modelos animales de estas condiciones psiquiátricas en base a los criterios establecidos en manuales como el DSM-IV, es decir, siguiendo una aproximación **top down** (ver figura I.10). En este tipo de aproximaciones, se intenta establecer un modelo animal de una entidad clínica mediante el estudio de la *validez de apariencia*, es decir, analizando si el modelo exhibe fenotipos análogos a los síntomas humanos. En esta clase de estudios también es importante el estudio de la *validez predictiva*, es decir, si los tratamientos que se utilizan para mejorar los síntomas en humanos tienen un efecto análogo en la conducta del animal propuesto como modelo.

Como dijimos antes, no es posible establecer con certeza si desórdenes neuropsiquiátricos como el TDHA constituyen entidades clínicas únicas y diferentes de otros trastornos como el TS y TOC. Además, se conoce muy poco acerca de los mecanismos etiológicos de estos desórdenes. Debido a esto, se ha propuesto la necesidad de modelar síntomas específicos o conjuntos de síntomas, en lugar de síndromes completos (Fernando & Robbins 2011). Aproximaciones que contemplan dilucidar las manifestaciones comportamentales resultantes de distintos mecanismos etiopatogénicos ayudarían a definir fenotipos intermedios y a comprender su contribución en desórdenes neuropsiquiátricos diversos (Gottesman & Gould 2003). En este contexto, el estudio del impacto de una manipulación biológica puntual sobre la conducta y la fisiología de circuitos, es decir una aproximación **bottom up**, resultaría ventajoso para entender las bases biológicas asociadas a grupos de síntomas (ver figura I.10).





**Figura I.10.** Aproximaciones top down y bottom up para el establecimiento de modelos animales de patologías neuropsiquiátricas.

### III. III) Lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas

En 1972, Breese y Taylor lesionaron las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas administrando intracerebralmente la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en roedores neonatos, dado que este período es crítico para el desarrollo de neuronas catecolaminérgicas (Breese & Traylor 1972). Un tiempo después, se logró la lesión específica de las neuronas dopaminérgicas mediante el pretratamiento de los animales neonatos con desipramina, un bloqueante de la recaptación de noradrenalina para prevenir la lesión de neuronas noradrenérgicas (Smith et al. 1973).

La administración de 6-OHDA de forma intracerebroventricular en ratones neonatos produce la muerte de una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas que proyectan al estriado, con un efecto menos marcado para las que proyectan a la corteza prefrontal y el núcleo accumbens. Se

ha reportado que la mayor pérdida de neuronas, mayor al 80%, se da en la SNc que es la zona que proyecta preferencialmente al estriado dorsal (M E Avale et al. 2004). Las neuronas de la ATV, que proyectan preferencialmente a la corteza prefrontal y el accumbens, son menos sensibles a la toxina ya que muestran un grado de lesión del 34% (M E Avale et al. 2004).

Acompañando la pérdida de neuronas dopaminérgicas ha sido descrita la existencia de cambios compensatorios. Se produce un aumento del contenido estriatal de serotonina y de la innervación serotoninérgica al estriado proveniente del rafe dorsal (Berger et al. 1985; María Elena Avale et al. 2004; Breese et al. 2005). Además, se han reportado mecanismos compensatorios que actúan en sentido de la transmisión dopaminérgica estriatal tales como un aumento en los niveles de mensajero de la enzima tirosina hidroxilasa (que interviene en la síntesis de DA) en las neuronas dopaminérgicas remanentes, pérdida de autorreceptores D2 (están presentes en las terminales dopaminérgicas estriatales y su activación inhibe la liberación de dopamina), disminución de la actividad del transportador de dopamina (cuya acción disminuye la DA en el espacio sináptico) y cambios en la sensibilidad de receptores D1 y D2 postsinápticos estriatales (Davids et al. 2003).

Con respecto al impacto conductual de este tratamiento, mientras que la lesión bilateral de las vías nigroestriatales en roedores adultos produce un severo cuadro de aquinesia, adipsia y afagia y por lo tanto ha sido utilizada como modelo de la enfermedad de Parkinson (Ungerstedt 1971), cuando es efectuada en ratones neonatos no produce ninguna de estas alteraciones neurológicas. En contraste, los roedores con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas presentan un aumento de la actividad locomotora alrededor de los 30 días de edad que luego se normaliza en el adulto (Shaywitz, Yager, et al. 1976; María Elena Avale et al. 2004). Además,

lactan de manera normal y luego del destete se alimentan y toman agua por sí mismos de la misma manera que los ratones control, aunque presenta un leve retraso en la tasa de crecimiento y un menor tamaño corporal (Shaywitz, Yager, et al. 1976; María Elena Avale et al. 2004). El período de hiperactividad observado en este modelo ocurre a una edad que corresponde a la preadolescencia en humanos y revierte de forma dosis-dependiente con la administración de psicoestimulantes como la anfetamina y el metilfenidato (Davids et al. 2003; M E Avale et al. 2004; Shaywitz, Klopper, et al. 1976). Además, los animales lesionados presentan déficits de aprendizaje y memoria, ya que fallan en tareas de discriminación espacial y respuestas operantes (Archer et al. 1988; Nemirovsky et al. 2009). Por estas características, desde una perspectiva *top down* se ha propuesto a la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas como un modelo animal de "disfunción cerebral mínima" (Shaywitz, Yager, et al. 1976), entidad clínica que con la aparición de sucesivas ediciones del DSM fue desplazada por el TDAH, con validez de apariencia, dado que reproduce aspectos clave de la conducta de los pacientes, y con validez predictiva, porque responde a tratamientos farmacológicos de modo similar que los pacientes. Sin embargo, el modelo carece de validez de construcción dado que no hay reportes de pérdidas de neuronas dopaminérgicas en pacientes con TDAH, aunque se presume que los pacientes con TDAH se encuentran en un estado hipodopaminérgico ya que muestran una disminución en la actividad dopaminérgica en el núcleo caudado (Volkow et al. 2007) y responden a drogas que incrementan la transmisión dopaminérgica (Biederman & Faraone 2005).

Aunque la presencia de hiperactividad juvenil, déficits de aprendizaje y reversión de síntomas por psicoestimulantes son argumentos fuertes para validar el modelo en el contexto del TDAH,

en la literatura existen datos incongruentes con su similitud con el TDAH. Por ejemplo, algunos estudios mostraron persistencia de ciertas formas de hiperactividad (Miller et al. 1981; Luthman et al. 1997) y déficit de aprendizaje (Archer et al. 2002) en el adulto. Otros estudios describen al modelo como hipoquinético (Kostrzewa et al. 2006) o muestran que algunos tipos de aprendizaje están preservados (Levine et al. 1980; Pearson et al. 1984). Así, surge que no se ha caracterizado el déficit cognitivo de base que afecta algunos tipos de aprendizaje (Moy 1995) ni existen hipótesis que conecten la hiperactividad con dichos déficits (Heffner & Seiden 1983; Pearson et al. 1984).

Por todo esto pensamos que un abordaje de tipo *bottom-up* del modelo de lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas sería de gran interés para comprender cómo se establecen las conductas patológicas en diversos desórdenes neuropsiquiátricos, entre ellos, el TDHA.

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Esta tesis de doctorado se enmarca en el **objetivo general de esclarecer los mecanismos postnatales de la maduración del sistema córticoestriatal y su conexión con la adquisición de conductas normales y patológicas**. Un desafío de la investigación en el campo es abordar con modelos animales cómo contribuyen distintos neuromoduladores y circuitos en la generación de los síntomas presentes en desórdenes conductuales como el TDAH, ST y TOC (Fernando & Robbins 2011). La hipótesis general detrás de esta línea de investigación es que durante la infancia y la adolescencia el conexionado funcional y anatómico de los circuitos córticoestriatales adquiere las propiedades del sistema adulto. De estas propiedades dependerían aspectos clave del comportamiento, como ser el interés por lo novedoso, la capacidad de persistir en la búsqueda de un objetivo, la adquisición de conductas orientadas a conseguir metas (Graybiel 2008; Berridge 2013; Ding & Gold 2013; Pearson & Platt 2013). La dopamina cumpliría un rol central en la maduración del conexionado córticoestriatal (Tang et al. 2001; Galiñanes et al. 2009) de modo que alteraciones tempranas en la neurotransmisión dopaminérgica podrían contribuir a la aparición de TDAH, TS y TOC.

La alta comorbilidad que existe entre estos desórdenes ha llevado a pensar que no se trata de entidades completamente independientes, sino que compartirían mecanismos etiopatogénicos (Hyman 2010). La naturaleza heterogénea de los síntomas y los altos niveles de comorbilidad hacen muy difícil validar modelos animales en base a estudios de tipo *top down* y en años recientes se ha destacado la importancia de las aproximaciones de tipo *bottom up* para entender las bases biológicas de grupos de síntomas en lugar de modelar un síndrome entero (Fernando & Robbins 2011). El **objetivo de esta tesis fue examinar los efectos de la lesión**

**neonatal de neuronas dopaminérgicas desde una perspectiva *bottom-up*** para buscar comprender cómo luciría una condición neuropsiquiátrica relacionada a un estado hipodopaminérgico de aparición temprana, tanto desde la perspectiva comportamental como anátomofuncional.

En línea con ideas recientes acerca del rol de la dopamina en orientar la conducta hacia estímulos salientes y la búsqueda de información como instancias activacionales que permiten el aprendizaje (Salamone et al. 2014), **el primer objetivo específico fue analizar conductas de exploración y explotación de ambientes novedosos y diversos en cuanto a la complejidad y grado de incertidumbre de los estímulos disponibles**, antes que el desempeño en paradigmas tradicionales de aprendizaje. Dado que la información en sí misma ha sido propuesta como una forma de recompensa, *nuestra hipótesis fue que la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas determina la adquisición de una estrategia anormal de explotación / exploración que se manifiesta de manera variable según las características del ambiente que el animal enfrenta y la edad del animal*. Esto es importante ya que en los citados desórdenes neuropsiquiátricos los síntomas mutan según cambian el entorno y la edad (Hyman 2010). Para desafiar esta hipótesis analizamos la conducta de animales con lesión y sus respectivos controles, a distintas edades, en ambientes simples (ej., campo abierto tradicional) y complejos (ej., laberintos), en presencia o ausencia de estímulos salientes (objetos, congéneres), para inducir estrategias variadas de exploración y explotación.

Distintas evidencias apuntan a la existencia de alteraciones en los circuitos córticoestriatales asociativos en los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas. En primer lugar, estos animales muestran una depleción dopaminérgica máxima en el estriado dorsomedial

(Galiñanes et al. 2009). Por otro lado, las decisiones de *foraging* involucran actividad neuronal en los circuitos córticoestriatales asociativos (Daw et al. 2006; Hayden et al. 2011). Por último, pacientes con TDAH y desórdenes relacionados muestran alteraciones funcionales en estos circuitos (Konrad & Simon B Eickhoff 2010; Liston et al. 2011). Dado que la dopamina es un modulador clave de la plasticidad córticoestriatal, nos propusimos estudiar las capacidades plásticas de los circuitos que involucran a la corteza medial prefrontal y el estriado dorsomedial. Registros electrofisiológicos *in vivo* hechos en el laboratorio mostraron que es posible inducir HFS-LTD en los animales adultos con lesión mientras que los adultos control solo muestran una depresión transitoria, sin diferencias en el grupo juvenil (figura I.9D). La aplicación sucesiva de HFS genera una LTD máxima que es igual en todos los grupos independientemente de la lesión y la edad (figura I.9F). Estos resultados sugirieron la *hipótesis de que los animales adultos con lesión dopaminérgica neonatal son más susceptibles a sufrir procesos de LTD córticoestriatal*. **Entonces, el segundo objetivo específico que nos planteamos fue estudiar en mayor detalle las diferencias en la susceptibilidad a sufrir procesos de LTD córticoestriatal en animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.** Estudiamos la LTD córticoestriatal *in vivo* mediante un protocolo de dos inducciones de plasticidad separadas por una hora y media a modo de ver los efectos a largo plazo de cada inducción y evidenciar en mayor medida las diferencias de susceptibilidad entre los grupos.

Si extendemos estas ideas a procesos de LTD córticoestriatal fisiológicos, una predicción sería que una mayor acumulación de eventos de depresión determinaría una menor conectividad córticoestriatal en los animales más susceptibles. Siguiendo estas ideas, **como tercer objetivo nos propusimos estudiar la existencia de alteraciones en la conectividad de los circuitos**

**córticoestriatales en animales juveniles y adultos con lesión dopaminérgica neonatal.** *Nuestra hipótesis fue que la lesión dopaminérgica neonatal disminuye la conectividad funcional de los circuitos que unen la corteza prefrontal con el estriado medial y que esta desconexión es más prominente en los animales adultos con lesión.* Realizamos registros electrofisiológicos *in vivo* de potencial de campo estriatal evocado por distintas intensidades de estimulación en la corteza prefrontal, y estudiamos el patrón de respuesta en animales adultos y juveniles. Pensamos que cambios en la conectividad y en la plasticidad de los circuitos córticoestriatales asociativos podrían subyacer a la adquisición de estrategias de exploración y explotación anormales en estos animales.

Por último, **nos propusimos estudiar las alteraciones morfológicas de las neuronas de proyección estriatales inducidas por la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.** Distintos estudios han reportado cambios morfológicos en las NEM como consecuencia de lesiones nigroestriatales en el adulto, como depleción de espinas dendríticas, que puede o no estar acompañada de contracción del árbol dendrítico (Wang et al. 2006; Villalba et al. 2009; Zhang et al. 2013; Suárez et al. 2014). También que la dopamina y otros factores liberados por neuronas dopaminérgicas promueven modificaciones dendríticas en las NEM (Fasano et al. 2013). Además, diversos estudios muestran que el núcleo caudado humano se reduce de tamaño durante la adolescencia (Castellanos 2002), fenómeno que ha sido hipotéticamente atribuido a fenómenos de podado sináptico (Toga et al. 2006), y depende en parte de factores genéticos relacionados con la neurotransmisión dopaminérgica (Durston et al. 2005). La trayectoria de los cambios morfológicos que ocurren en el caudado durante la adolescencia difiere entre sujetos control y aquellos que recibieron el diagnóstico de TDHA (Castellanos



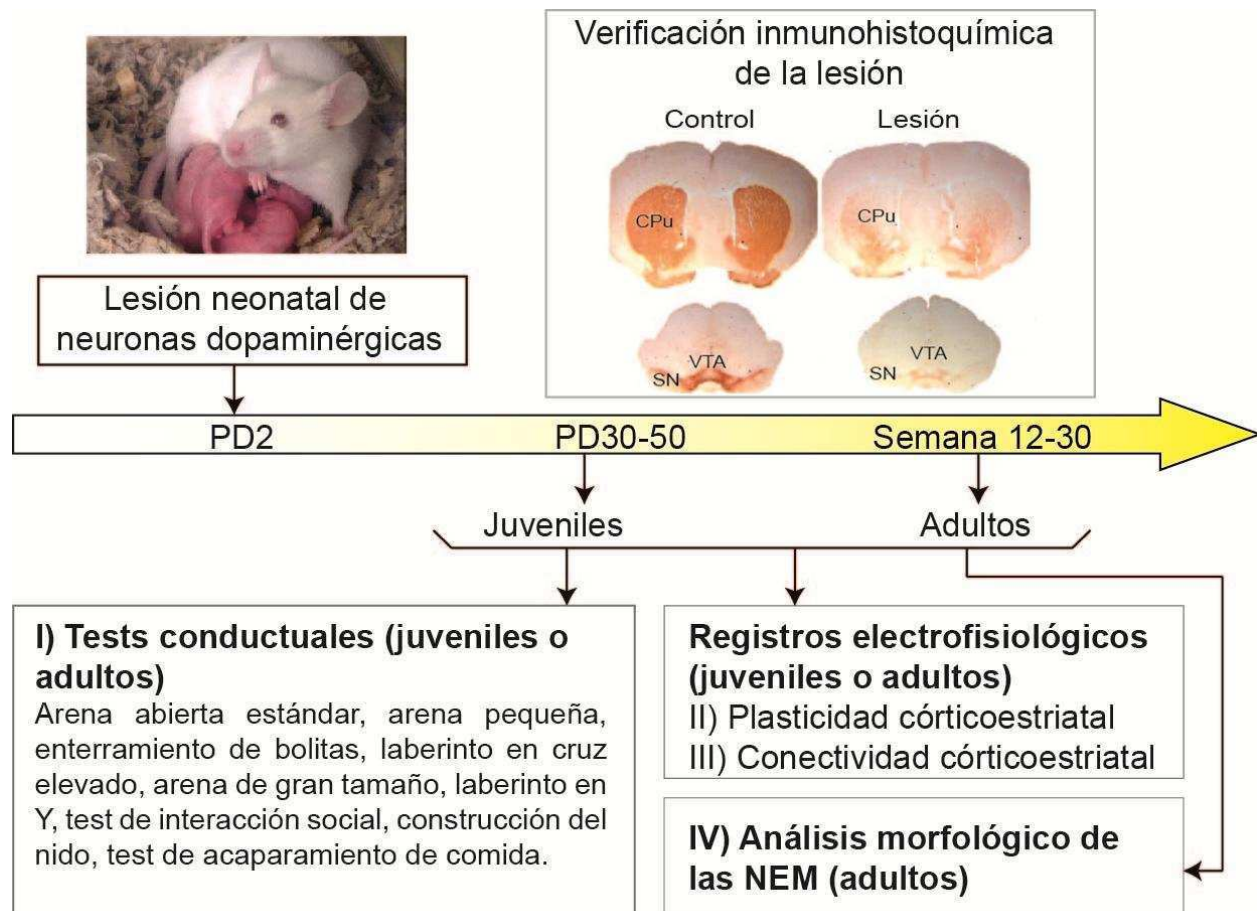
2002). *Nuestra hipótesis es que un déficit temprano en la transmisión dopaminérgica resulta en un deterioro del desarrollo dendrítico en las neuronas de proyección estriatales.*

## RESULTADOS

### **I) Conducta: Alteraciones en el balance exploración/explotación en animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.**

Ratones CF1 macho de dos días de edad fueron pretratados con desipramina para proteger las terminaciones noradrenérgicas, anestesiados en hielo triturado e inyectados con 6-OHDA o vehículo en ambos ventrículos laterales tal como se describe en detalle en la sección *Métodos*. Los test conductuales fueron realizados una vez alcanzada la edad adulta (12-30 semanas de edad) o durante la juventud (día postnatal 30 al 50) según se describe a continuación. La edad de los ratones juveniles corresponde a la preadolescencia y adolescencia, según la literatura correspondiente a roedores. Al igual que otras especies, los ratones atraviesan un periodo donde se incrementan la atracción por lo novedoso, la toma de riesgos y la sociabilidad, en coincidencia con la pubertad, que se extiende aproximadamente desde el día postnatal 40 hasta la octava semana de vida (Spear 2000).

Abordamos inicialmente el comportamiento del adulto (secciones I.I y I.II), ya que los datos fisiológicos del laboratorio indicaban alteraciones de la actividad córticoestriatal durante este período de la vida (Galiñanes y col., 2009; ver introducción sección III.I), sin un claro correlato conductual en la literatura. Luego nos interesamos por determinar si los déficit observados en adultos emergían temprano durante la juventud (sección I.III).



**Figura R.1. Esquema del abordaje experimental.** En el día postnatal dos (PD2), se realizó la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas mediante la inyección intraventricular de 6-OHDA. Cuando los animales alcanzaron la edad juvenil (PD30-50) o adulta (semana 12 a 30) se dividieron en grupos independientes y se analizó la conducta en una batería de tests comportamentales (sección I), se realizaron registros electrofisiológicos para estudiar la plasticidad (sección II) y la conectividad córticoestriatal (sección III) o se efectuó el análisis morfológico de las NEM mediante la inyección del colorante lucifer yellow (sección IV). Al finalizar los experimentos, los animales fueron sacrificados y se analizó el grado de lesión mediante inmunohistoquímica contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH), clave para la síntesis de dopamina. Se muestran secciones coronales a la altura del estriado (arriba) y del mesencéfalo (abajo) para animales control y con lesión. Se observa una marca de intensidad muy reducida en los animales con lesión. Referencias: CPu: caudado-putamen, SN: sustancia negra parte compacta, VTA: área tegmental ventral.

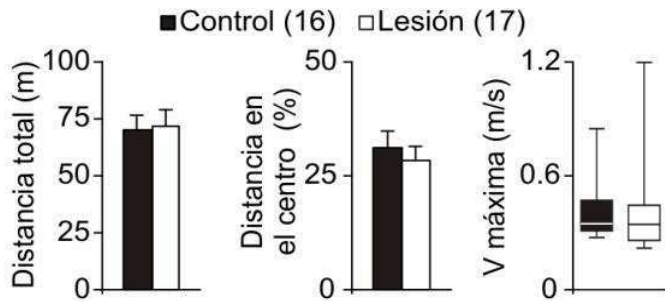
***1.1) Alteración de la conducta exploratoria dependiente del contexto en animales adultos con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.***

La lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas con la toxina 6-OHDA produce un fenotipo hiperlocomotor en el período juvenil que revierte espontáneamente en el adulto, probablemente debido a mecanismos compensatorios (Shaywitz, Yager, et al. 1976; María Elena Avale et al. 2004; Galiñanes et al. 2009). Desde una perspectiva top-down, este fenotipo fue considerado como de validez de apariencia para TDAH (Shaywitz, Yager, et al. 1976; María Elena Avale et al. 2004). Sin embargo, ciertas formas de hiperactividad pueden persistir en el adulto, especialmente luego de una denervación dopaminérgica neonatal extensa (Miller et al. 1981; Luthman et al. 1997). Teniendo en cuenta esto, y considerando que en diversas condiciones neuropsiquiátricas los síntomas se presentan, exacerban o mutan de acuerdo al contexto y la edad, nos preguntamos si los animales adultos que sufrieron una lesión dopaminérgica neonatal exhiben hiperactividad y comportamientos repetitivos en condiciones y contextos diferentes al campo abierto estándar, pudiendo deberse a algo más que una mera activación motora.

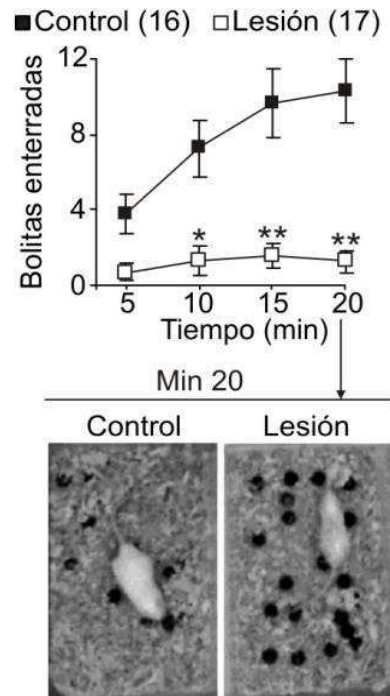
Los animales fueron sometidos a una batería de test conductuales luego del alcanzar la adultez (a partir de las 12 semanas de edad). De acuerdo a lo esperado, cuando fueron testeados en una arena abierta de tamaño estándar (40 x 40 cm), no mostraron hiperactividad (figura R.2A). Sin embargo, en una arena pequeña (15 x 20 cm) diseñada para estudiar comportamientos repetitivos, los animales con lesión presentaron un incremento en la actividad exploratoria vertical (figura R.2B, RM-ANOVA).

La hiperactividad contexto dependiente que observamos podría reflejar alteraciones de la actividad exploratoria o conductas perseverantes extendidas más allá de la actividad exploratoria. Para estudiar conductas perseverantes analizamos la conducta de acicalamiento o *grooming*, que es un tipo de perseverancia auto-dirigida, y el enterramiento de bolitas, que evalúa la perseverancia dirigida hacia objetos, cuantificando el número de objetos extraños (bolitas) enterrados por el animal en un tiempo dado. La conducta de *grooming* ocurre de forma espontánea en ratones y se incrementa notablemente con la aplicación de agua sobre el pelaje del animal. Los animales con lesión presentaron un nivel de *grooming* espontáneo normal (figura R.2B) pero los niveles de *grooming* inducido mediante la aplicación de dos pulverizaciones de agua se encontraron reducidos en este grupo experimental (figura R.2B). Por otro lado, en una jaula estándar con 20 bolitas apoyadas sobre una cama de viruta, los animales con lesión presentaron una marcada disminución en la conducta de enterramiento (figura R.2C).

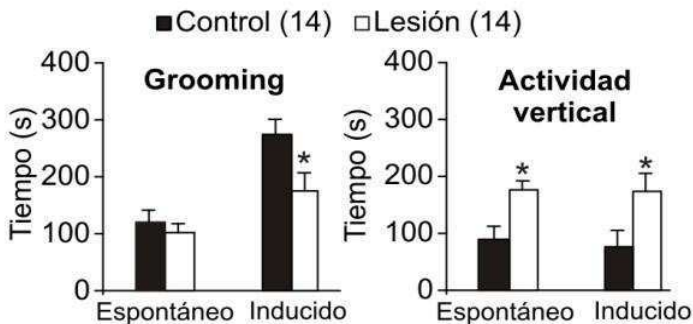
### A. Arena abierta estándar



### C. Enterramiento de bolitas



### B. Arena pequeña

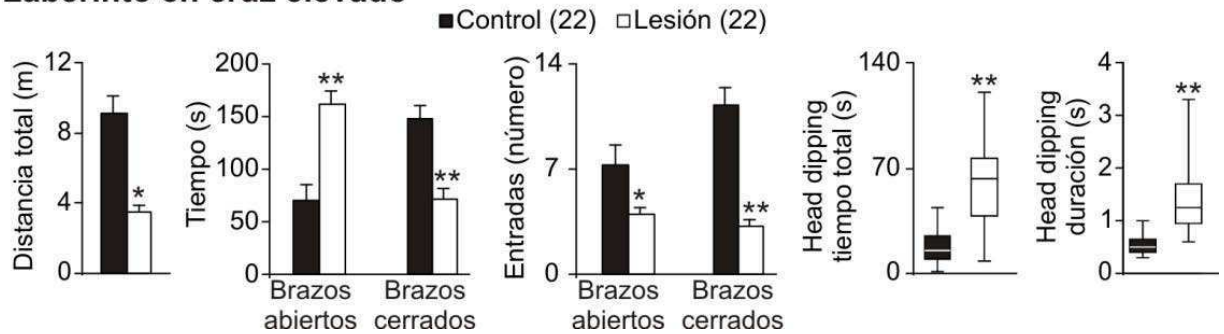


**Figura R.2. Los animales adultos con lesión neonatal no presentan déficits motores ni un exceso de comportamientos repetitivos anómalos generalizados. A. Arena abierta estándar.** Los animales fueron expuestos a una arena novedosa de 40 x 40 cm durante 30 minutos. No observamos diferencias en la distancia total recorrida ( $t$  test,  $p=0.9$ ), distancia en el centro ( $t$  test,  $p=0.6$ ) y la velocidad máxima (Mann-Whitney,  $p=0.5$ ). **B. Arena pequeña.** Los animales fueron expuestos a una arena de 15 x 20 cm y se cuantificó el grooming y la actividad exploratoria vertical durante 15 minutos en la condición espontánea y por otros 15 minutos luego de aplicar dos pulverizaciones de agua en el lomo de los animales para inducir el grooming. Los animales con lesión mostraron un nivel normal de grooming espontáneo pero una menor inducción de grooming en respuesta a la pulverización de agua (RM ANOVA, interacción:  $p=0.01$ ,  $*p<0.05$  Tukey post hoc). Además, mostraron un incremento en la actividad vertical en ambas condiciones (RM ANOVA, efecto del tratamiento:  $*p<0.001$ ). **C. Enterramiento de bolitas.** Los animales fueron colocados en una jaula estándar con 5 cm de viruta en el fondo y 20 bolitas distribuidas en forma de grilla durante 30 min. Se cuantificó el número de bolitas enterradas al final del test. Los animales con lesión mostraron menores niveles de enterramiento a lo largo del tiempo (RM ANOVA, interacción:  $p<0.001$ , Tukey post hoc  $*p<0.05$   $**p<0.001$ ). Se muestran fotos representativas al finalizar el test.

La exploración y las conductas perseverantes pueden ser modificados por la ansiedad. Sin embargo, los animales lesionados presentaron parámetros normales relacionados a la ansiedad

en la arena abierta estándar, como ser, el porcentaje de la distancia recorrida correspondiente a la zona central "ansiogénica" de la arena (figura R.2A). Además, en el test del laberinto en cruz elevado los animales con lesión no mostraron un fenotipo consistente con cambios en los niveles de ansiedad (figura R.3). Se trata de una tarea que evalúa el conflicto entre explorar un ambiente novedoso y los niveles de ansiedad que genera la exposición a un ambiente abierto sin refugios. Para ello, este laberinto posee dos brazos sin paredes (brazos abiertos), y dos con paredes (brazos cerrados), siendo los primeros más ricos en información pero potencialmente más peligrosos y ansiogénicos. Como se esperaba los animales control ingresaron más veces a los brazos cerrados permaneciendo más tiempo en los mismos. Sin embargo, los animales lesionados pasaron más tiempo en los brazos abiertos, pero entraron menos veces a dichos brazos. Este patrón no se condice con un incremento en las conductas relacionadas con la ansiedad así como tampoco como con una reducción de las mismas. Por ejemplo, el tratamiento farmacológico con ansiolíticos aumenta la cantidad de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Pellow & File 1986; Lister 1987) mientras que protocolos crónicos de estrés producen una disminución en sentido opuesto (D'Aquila et al. 1994; Hata et al. 2001). Un análisis detallado de las conductas durante la tarea mostró que, los animales con lesión recorrieron una menor distancia total en el laberinto en cruz elevado, y durante su permanencia en los brazos abiertos mostraron conductas de exploración exacerbadas. En particular, invirtieron más tiempo en conductas de exploración local denominadas *head dippings* (figura R.3), lo cual podría explicar el incremento en la permanencia en dichos brazos. Analizados en su conjunto los resultados sugieren que el fenotipo no se debería a cambios en la ansiedad sino a una alteración en el patrón de exploración.

### Laberinto en cruz elevado



**Figura R.3. Los niveles de ansiedad en los animales adultos con lesión fueron normales en un laberinto en cruz elevado.** Los animales con lesión recorrieron una menor distancia (Mann-Whitney  $U=53$ ,  $**p<0.001$ ), pasaron más tiempo en los brazos abiertos (RM ANOVA, interacción:  $p<0.001$ , Tukey post hoc  $**p<0.001$ ), entraron un menor número de veces a los brazos del laberinto (RM ANOVA, interacción:  $p=0.002$ , Tukey post hoc  $*p<0.05$   $**p<0.001$ ) y exhibieron más (Mann-Whitney,  $**p<0.001$ ) y más largos head dippings (Mann-Whitney,  $**p<0.001$ ).

En resumen, especulamos que los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas presentan una conducta exploratoria anormal que se manifiesta de diferentes maneras según el contexto, más que un fenotipo hiperlocomotor, conductas repetitivas estereotipadas o cambios en las conductas relacionadas a la ansiedad.

Para evaluar en más profundidad el efecto del contexto sobre la actividad exploratoria, expusimos a los animales a una arena abierta de gran tamaño (1,25 metros de diámetro). En este tipo de arena los animales control exhiben una estrategia exploratoria dual, que involucra la exploración global de la arena mediante la locomoción, y la realización de conductas de exploración local que incluyen movimientos de la cabeza sin desplazamiento corporal. Los animales con lesión tardaron diez veces más en salir del primer cuadrante de la arena (se considera que salieron del primer cuadrante cuando exploran un cuarto de la arena, en general recorriendo la periferia) y cinco veces más en recorrer la arena en su totalidad (figura R.4A) respecto a los controles. Además, la distancia recorrida por los animales lesionados fue

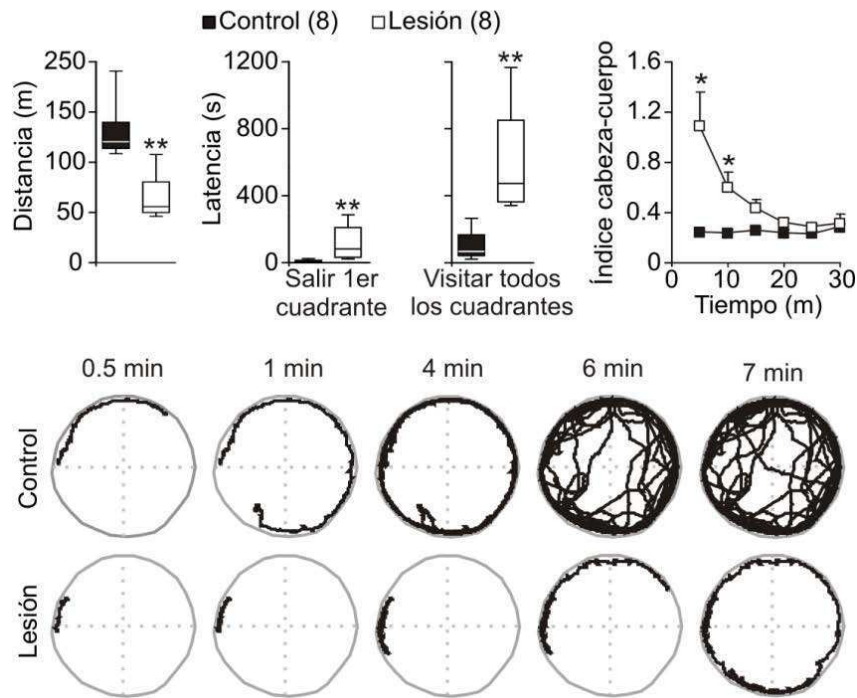


significativamente menor (figura R.4A) y exhibieron una exploración local incrementada durante los primeros diez minutos de la prueba, medida como la distancia recorrida por la cabeza en relación al cuerpo (figura R.4A). Estos resultados son sorprendentes en relación a la conducta observada en la arena de tamaño tradicional y sugieren que los animales con lesión presentan una estrategia exploratoria desbalanceada, en la cual se favorece la exploración local por sobre la exploración global del ambiente.

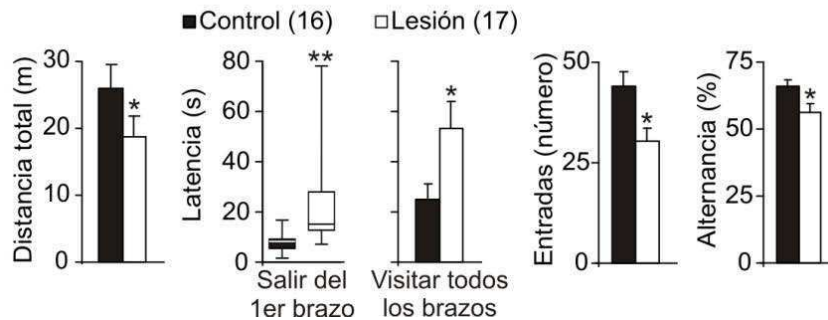
Para corroborar la existencia de un déficit de exploración de ambientes novedosos que podrían esconder mucha información, expusimos a los animales a un laberinto en forma de Y o *Y maze*, un test que evalúa la tendencia natural de los animales a alternar la exploración de los brazos del laberinto con el objetivo de maximizar la búsqueda de información. Entonces, si un animal comienza explorando el brazo A y luego explora el B, para maximizar la búsqueda de información el brazo siguiente a explorar sería el C, en cuyo caso el animal deberá recurrir a su memoria de trabajo para recordar qué brazos visitó con anterioridad. En este laberinto, los animales control mostraron un patrón de exploración que se aleja de la elección al azar de los brazos, representada en un índice de alternancia superior al 50% (figura R.4B). Los ratones lesionados presentaron un menor número de visitas a los brazos del laberinto, permanecieron más tiempo en el brazo inicial y tardaron más en visitar los tres brazos. Esta prueba también reveló un déficit en la alternancia espontánea en los animales lesionados respecto de los controles. Si bien, esto podría ser interpretado como un déficit en la memoria de trabajo, también podría estar relacionado a la mayor carga de memoria resultante del mayor tiempo que estos animales pasan en cada brazo. Estos resultados son consistentes con la idea de que

los animales con lesión presentan una alteración en el patrón exploratorio de ambientes espacialmente complejos que demandan estrategias especiales de exploración.

### A. Arena de gran tamaño



### B. Laberinto en Y



**Figura R.4. Déficits en la exploración global del ambiente y exacerbación de conductas exploratorias locales en los animales con lesión. A. Arena de gran tamaño.** Los animales con lesión recorrieron una menor distancia total (Mann-Whitney,  $**p < 0.001$ ), y tardaron más tiempo en salir del primer cuadrante (Mann-Whitney,  $**p < 0.001$ ) y en visitar todos los cuadrantes (Mann-Whitney,  $**p < 0.001$ ). Los animales con lesión presentaron un incremento en la exploración local en la forma de un incremento en la distancia recorrida por la cabeza en relación al cuerpo (RM ANOVA, interacción:  $p < 0.001$ , Tukey post hoc  $*p < 0.05$   $**p < 0.001$ ). Se muestran ejemplos representativos de las trayectorias recorridas a distintos tiempos. Las líneas punteadas indican la posición de los distintos cuadrantes. **B. Alternancia espontánea en un laberinto en forma de Y.** La distancia total recorrida en el laberinto fue menor (t test,  $*p = 0.01$ ) mientras que la latencia en salir del primer cuadrante (Mann-Whitney,  $**p < 0.001$ ) y en visitar todos los brazos (Mann-Whitney,  $*p = 0.032$ ) fue mayor en los animales lesionados.

***I.II) Déficit en la explotación de oportunidades como consecuencia de la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.***

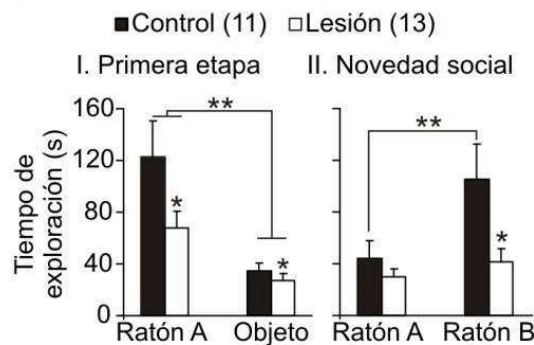
La utilización óptima de las oportunidades presentes en el ambiente, ya sea recursos de tipo social, nutricional o refugio, depende de la toma de decisiones de forrajeo o *foraging* (Cohen et al. 2007; Adams et al. 2012). Las **decisiones de *foraging*** involucran la elección entre explotar un recurso local o buscar un recurso alternativo en otro lugar. Los animales con lesión neonatal podrían tener déficits en la toma de decisiones de *foraging*, dado que fallan en buscar refugio en ambientes potencialmente riesgosos (como el laberinto en cruz elevado), ocultar objetos extraños, y explorar de manera eficiente arenas amplias y ambientes que generan incertidumbre respecto a los recursos que podrían contener, como el Y maze (figura R.2-4). Para investigar si los animales con lesión neonatal presentan alteraciones en el balance entre exploración y explotación, estudiamos su desempeño en una serie de tests de diseño etológico que evalúan conductas sociales, la construcción del nido y el aprovechamiento de recursos nutricionales, en ambientes que imponen una carga exploratoria variada (Deacon 2012).

Estudiamos conductas sociales en un test de interacción social de dos etapas (20 minutos de duración cada una) que se realizó en una caja con tres compartimentos: un compartimento central que conecta con otros dos, cada uno de los cuales contiene una pequeña jaula que encierra un objeto o un estímulo social dependiendo de la etapa del test. Los animales fueron habituados a la caja vacía durante 15 minutos el día anterior. Durante las dos etapas del testeo, se cuantifica el tiempo que los animales pasan realizando conductas exploratorias dirigidas hacia los estímulos presentados en cada compartimento. En la primera etapa, en la que se cuantificó la interacción de los animales con un estímulo social (ratón A) en relación a un objeto

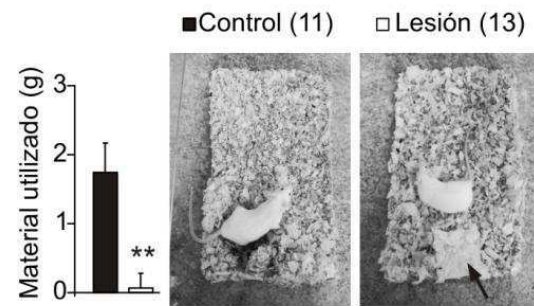
novedoso, los animales con lesión mostraron una disminución significativa en la conducta exploratoria dirigida hacia el estímulo social (figura R.5A, izquierda). En la segunda etapa, en la cual se evalúa la interacción con el ratón A versus un segundo ratón B que se coloca en el lugar que ocupaba el objeto, los animales control exploraron más al ratón B mientras que los animales con lesión fallaron en discriminar al estímulo social novedoso y exploraron a ambos estímulos por igual (figura R.5A, derecha). Estos resultados son consistentes con la existencia de un déficit en la explotación de oportunidades sociales, donde la adquisición deficitaria de información social durante la primera etapa impide una correcta discriminación en la segunda. Cabe mencionar que en nuestro caso el déficit de memoria de trabajo detectado en el Y maze podría haber contribuido a los resultados obtenidos en la segunda etapa del test.

La construcción del nido es una conducta conectada a la explotación de recursos naturales para asegurar refugio, facilitar la conservación de calor y promover las conductas sociales (Deacon 2012). Para minimizar el efecto de deficiencias en la exploración, este test fue realizado en jaulas individuales de iguales características a la jaula donde los animales están acostumbrados a vivir. El material provisto para la realización del nido fue un cuadrado de algodón prensado de aproximadamente 3 gramos cuyo remanente se pesó a la mañana siguiente. Los animales control construyeron el nido usando casi la totalidad del algodón provisto mientras que los animales con lesión no habían construido un nido definido a la mañana siguiente dejando gran cantidad de material sin utilizar (figura R.5B). Esto es consistente con la idea de un déficit en la explotación de recursos primarios por parte de los animales con lesión, no atribuible a la carga exploratoria que impone el ambiente .

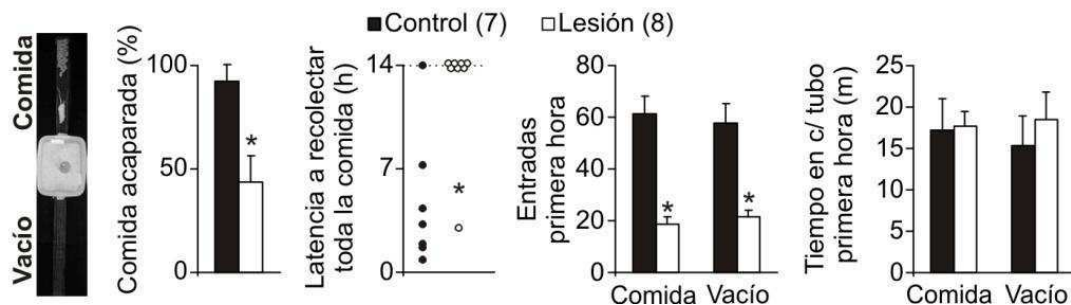
### A. Test de interacción social



### B. Construcción del nido



### C. Conducta de acaparamiento



**Figura R.5. Reducción en la explotación de oportunidades por parte de los animales adultos con lesión.**

**A. Test de interacción social.** Los animales con lesión mostraron menores niveles de exploración dirigida hacia el ratón A en la primera etapa (izquierda; RM ANOVA, factor tratamiento:  $*p=0.046$ , factor cámara:  $**p<0.001$ ) respecto de los controles. En la etapa de novedad social, los animales lesionados fallaron en reconocer al ratón nuevo (ratón B) y exploran a ambos por igual (derecha, RM ANOVA, interacción:  $p=0.007$ ; Tukey post hoc  $*p<0.05$   $**p<0.001$ ).

**B. Construcción del nido.** Los animales lesionados usaron menor cantidad del material provisto (flecha) para la hacer el nido (t test,  $**p=0.001$ ).

**C. Conducta de acumulación de comida.** Foto de la caja experimental: es una caja similar a la que los animales utilizan para vivir adaptada para conectarse con dos tubos de malla metálica de 50 cm. Desde izquierda a derecha: los animales lesionados recolectaron la mitad de la comida (t test,  $*p=0.009$ ) en toda la noche mientras que los animales controles recolectaron la totalidad de la misma en aproximadamente cuatro horas (Mann-Whitney,  $*p=0.01$ ). Además, los animales con lesión realizaron un menor número de entradas a cada tubo (RM ANOVA, efecto del tratamiento:  $*p<0.001$ ) pero pasaron el mismo tiempo en cada tubo al igual que los animales controles (RM ANOVA).

Para evaluar de manera más directa el balance exploración/explotación adaptamos un test que examina la conducta de acaparamiento de comida (Deacon 2012) pero utilizando un ambiente más complejo para incrementar la necesidad de exploración (figura R.5C). Los animales fueron

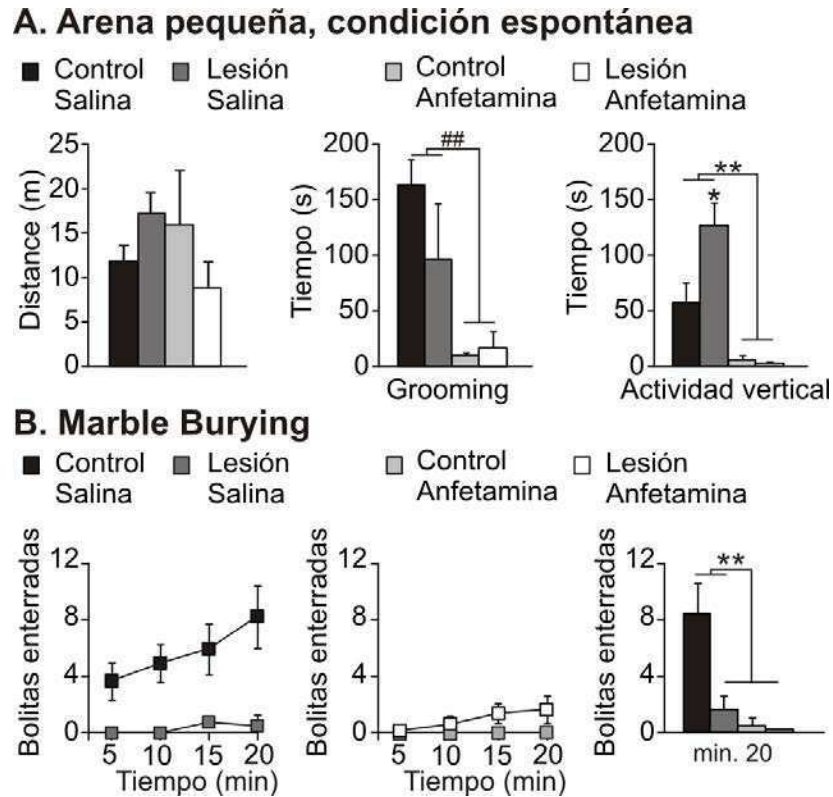
colocados en una jaula modificada para permitir su conexión con dos tubos de 50 cm de largo hechos de malla metálica, que se extienden en direcciones opuestas desde la caja. Luego de 24 horas de habituación a la caja central, se conectaron los tubos, uno de ellos cargado con 100 gramos de pellets regulares en su extremo y el otro vacío, y se examinó la conducta durante una noche entera bajo vigilancia por videocámara bajo luz infrarroja. En su versión estándar el test no incluye el tubo vacío, éste fue agregado para incrementar la carga de incertidumbre del ambiente y las necesidades de exploración espacial. Los animales control trasladaron toda la comida hacia la jaula central aproximadamente en las primeras cuatro horas de la tarea, mientras que los animales lesionados solo acapararon  $36 \pm 13$  gramos a lo largo de las 14 horas de la tarea (figura R.5C). Por otra parte, los animales control y lesionados pasaron la misma cantidad de tiempo en los tubos cargado y vacío indicando que los animales con lesión hacen un uso menos eficiente de su tiempo en el tubo con comida. Finalmente, los controles realizaron un mayor número de entradas a los tubos lo cual sugiere que son más eficientes en mantener actualizado su mapa cognitivo del ambiente.

Como conclusión de esta sección, podemos decir que en la adultez los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas presentan déficits en las conductas exploratorias necesarias para adquirir información en ambientes complejos y en la explotación de recursos sociales, nutricionales y de refugio. Además, observamos que los síntomas presentes en los animales con lesión son dependientes del contexto al igual que en pacientes que sufren desórdenes neuropsiquiátricos. Por ejemplo, el fenotipo de hiperactividad de los animales con lesión sólo se observa en una arena pequeña y no en ambientes más complejos en los cuales toma la forma de conductas exacerbadas de exploración local como *head dippings*.

### ***I.III) Alteraciones del neurodesarrollo versus falta aguda de dopamina como causa de los déficits conductuales***

Distintas evidencias experimentales sugieren que los déficits conductuales de los animales adultos que sufrieron la lesión neonatal se deben a alteraciones del neurodesarrollo más que a una deficiencia dopaminérgica aguda durante el testeo comportamental. En primer lugar, la lesión bilateral de las vías nigroestriatales en roedores adultos o la administración aguda de antagonistas de receptores para DA producen un cuadro severo de aquinesia, adipsia y afagia (Ungerstedt 1971), mientras que la misma lesión efectuada en el neonato no produce ninguna de estas alteraciones. Además, los animales con lesión neonatal dopaminérgica son relativamente insensibles a los antagonistas de receptores para DA (Duncan et al. 1987), sugiriendo que su conducta es menos dependiente de la DA remanente en su SNC. Por otro lado, estudiamos los efectos de la anfetamina, una droga que incrementa la transmisión dopaminérgica, sobre el fenotipo de los adultos con lesión neonatal (figura R.6). Testeamos a los animales en una arena pequeña y en el test de enterramiento de bolitas diez minutos después de la administración de anfetamina (4 mg/kg) o vehículo. En una arena pequeña, tanto controles como lesionados mostraron una disminución en el tiempo que pasaron realizando conductas de grooming y de actividad vertical (figura R.6A), probablemente debido a que se exacerbaron otras conductas estereotipadas como el hociqueo o *sniffing*. La dosis de anfetamina utilizada no incrementó la actividad horizontal en este ambiente en nuestras condiciones experimentales (fig R.6A). En el test de enterramiento de bolitas, el tratamiento con anfetamina no tuvo un efecto sobre la conducta de los animales lesionados y ocasionó una disrupción de la conducta de los controles (fig R.6A). Estos resultados argumentan en contra de

la posibilidad de que el déficit comportamental de los animales lesionados esté relacionado a una disminución de los niveles de dopamina durante la ejecución de la tarea.



**Figura R.6. La administración de anfetamina no revierte los déficits comportamentales en los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas. A. Arena pequeña, condición espontánea.** Los animales fueron inyectados con salina o anfetamina (4 mg/kg, i.p.) y colocados en una arena pequeña diez minutos después de la inyección. Una semana después, los animales fueron retesteados y aquellos que recibieron salina o anfetamina en el primer test fueron inyectados con anfetamina y salina respectivamente. Se utilizó una dosis de anfetamina que no incrementó la actividad horizontal (izquierda). Tanto los animales control y como los lesionados mostraron una reducción en el grooming (centro) y la actividad vertical (derecha) luego de la administración de anfetamina. **B. Enterramiento de bolitas.** El tratamiento con salina y anfetamina se realizó del mismo modo que en A. El tratamiento con anfetamina no tuvo un efecto sobre la conducta de los animales lesionados y ocasionó una interrupción de la conducta de los controles. ANOVA de tres vías, SS tipo I (diseño de cuadrados latino), efecto no significativo del día de testeo, ##  $p < 0.001$  efecto del tratamiento, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$  comparaciones de Tukey luego de una interacción significativa. Dado que no hubo efecto del día, los datos fueron promediados sin tener en cuenta este factor ( $n=8$  para cada tratamiento).



#### ***1.IV) El déficit en el balance exploración/explotación emerge temprano y empeora con la edad***

Los resultados presentados en la sección anterior contrastan con la percepción general de este modelo animal en la literatura, que enfatiza la desaparición del fenotipo conductual luego de la adolescencia en sintonía con su valoración *top down* como modelo de TDAH. Dado que en estudios previos no se ha examinado tan extensivamente el fenotipo de exploración/explotación inducido por la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas, nos preguntamos si los déficits que observamos en los animales adultos emergen durante el período juvenil.

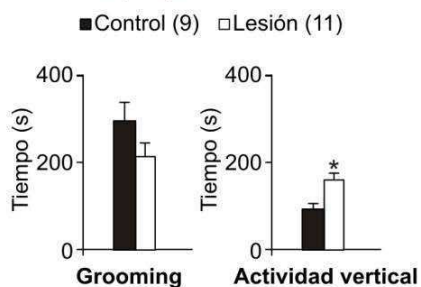
Los animales juveniles (día postnatal 30 a 50) depletados de dopamina neonatalmente mostraron una exploración vertical exacerbada en una arena pequeña (figura R.7A) al igual que los animales adultos. Con respecto a las conductas perseverantes, los animales juveniles también presentaron un fenotipo similar al de los animales adultos. No observamos cambios en los niveles de *grooming* espontáneo (figura R.7A) en una arena pequeña, y en el test de enterramiento de bolitas los animales lesionados no mostraron interés en enterrar bolitas (figura R.7B).

En lo referente a las conductas exploratorias, en una arena circular de gran tamaño los animales juveniles lesionados presentaron un leve incremento en la exploración local durante los primeros cinco minutos de la tarea, pero exhibieron una exploración global normal contrariamente a lo observado en la edad adulta (figura R.7C). En contraste, en un laberinto en forma de Y, donde la estrategia de exploración es cognitivamente más demandante, los animales juveniles lesionados exhibieron déficits en la navegación cualitativamente similares a

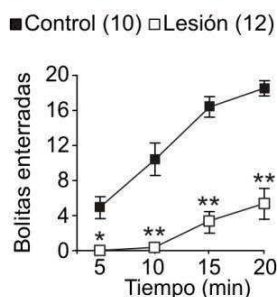
los observados en los animales adultos. Sin embargo a diferencia de los adultos, no encontramos diferencias en la alternancia en el laberinto en forma de Y (figura R.7D). La disociación que observamos en los animales juveniles, entre la navegación y la alternancia, sugiere que la deficiencia en la alternancia observada en los animales adultos lesionados representa un déficit en la memoria de trabajo.

Finalmente, en los test de construcción del nido (figura R.7E) y de acaparamiento de comida (figura R.7F), los animales juveniles lesionados mostraron déficits cualitativamente similares a los observados en la adultez.

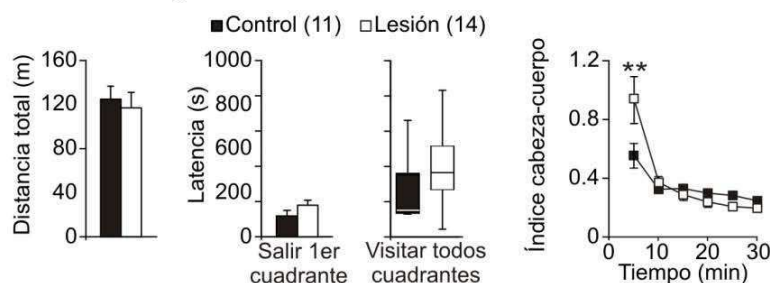
### A. Arena pequeña



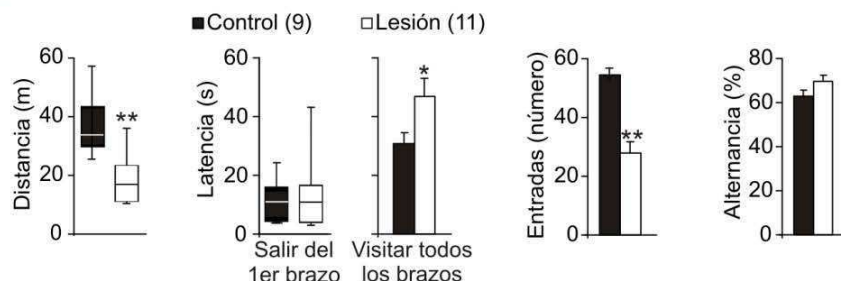
### B. Enterramiento de bolitas



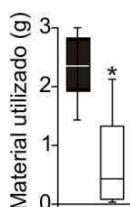
### C. Arena de gran tamaño



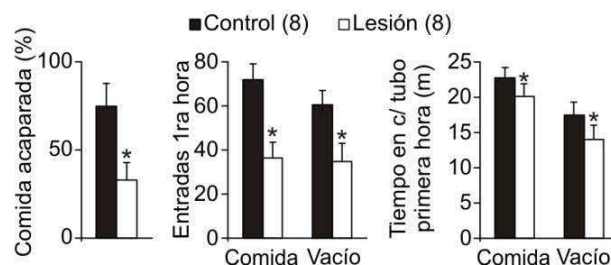
### D. Laberinto en forma Y



### E. Construcción del nido



### F. Conducta de acaparamiento



**Figura R.7. Los déficits en las conductas de exploración y explotación emergen tempranamente. A. Arena pequeña.** Los animales juveniles lesionados mostraron un incremento en la actividad vertical espontánea (t test,  $*p=0.004$ ) y niveles normales de grooming espontáneo. **B. Enterramiento de bolitas.** Los animales juveniles con lesión mostraron menores niveles de enterramiento a lo largo del tiempo (RM ANOVA, interacción:  $p<0.001$ , Tukey post hoc  $*p<0.05$   $**p<0.001$ ). **C. Arena de gran tamaño.** No observamos diferencias en la distancia total recorrida (t test,  $p=0.7$ ), en la latencia a salir del primer cuadrante (t test,  $p=0.2$ ) o en la latencia a visitar todos los cuadrantes (Mann-Whitney,  $p=0.1$ ). Los animales juveniles lesionados mostraron un incremento en la exploración local en los primeros 5 minutos del test (RM ANOVA, interacción:  $p<0.001$ , Tukey post hoc  $*p<0.05$ ).

**D. Laberinto en Y.** La distancia total recorrida por los animales con lesión fue menor (Mann-Whitney,  $**p<0.001$ ) y la latencia a visitar todos los brazos del laberinto fue mayor en este grupo (t test,  $*p=0.047$ ). El número de entradas a los brazos fue menor en los animales con lesión (t test,  $p<0.001$ ), y no hubo diferencias en la alternancia entre grupos (t test,  $p=0.1$ ). **E. Acaparamiento de comida.** De izquierda a derecha: Los animales con lesión acapararon menor cantidad de comida (t test,  $*p=0.009$ ), visitaron menor número de veces los tubos (RM ANOVA, efecto tratamiento:  $*p=0.007$ , efecto tubo:  $p=0.02$ ). El tiempo de permanencia en los tubos fue menor en los animales con lesión y ambos grupos tuvieron preferencia por el brazo cargado con comida (RM ANOVA, efecto tratamiento:  $*p=0.006$ , efecto tubo:  $p=0.031$ ).

Como conclusión, podemos decir que la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas induce alteraciones en el balance exploración/exploración que emergen temprano, y persisten y empeoran en la adultez. Al igual que en los adultos, los síntomas de los ratones juveniles variaron según el ambiente al que estuvo expuesto el animal, y fueron más evidentes en los ambientes más demandantes. Finalmente, al igual que en pacientes con desórdenes neuropsiquiátricos, los síntomas mutaron con la edad y el contexto. Así, el laberinto en forma de Y demuestra un desorden de memoria de trabajo en el adulto que no se presentó en el ratón juvenil, y la arena de gran tamaño muestra un desempeño de exploración global normal en el juvenil y alterado en el adulto.

Finalmente, mientras que aquí observamos un déficit amplio en la capacidad de explotar recursos y buscar información, que no solo no disminuye sino que aumenta con la edad, la literatura enfatiza déficits limitados al aprendizaje e hiperactividad que disminuyen con la edad y sugiere la existencia de validez de apariencia en relación con TDAH. Este contraste remarca la importancia de aplicar aproximaciones *bottom-up* al análisis de modelos animales potencialmente útiles para el estudio de condiciones neuropsiquiátricas.

## II) Plasticidad córticoestriatal

***Aumento en la susceptibilidad a sufrir procesos de depresión sináptica córticoestriatal en el animal adulto con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.***

Como mencionamos anteriormente (página 53 y 54), distintos factores sugieren que los déficits comportamentales observados en los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas se relacionan con alteraciones en los circuitos córticoestriatales asociativos. Además, se ha reportado que una forma de LTD madurativa regula hacia abajo la conectividad córticoestriatal durante el desarrollo (Tang et al. 2001), que la actividad estriatal disminuye normalmente con la edad (Galiñanes et al. 2009), y que ambos fenómenos son alterados por la destrucción neonatal de neuronas dopaminérgicas (Tang et al. 2001; Galiñanes et al. 2009).

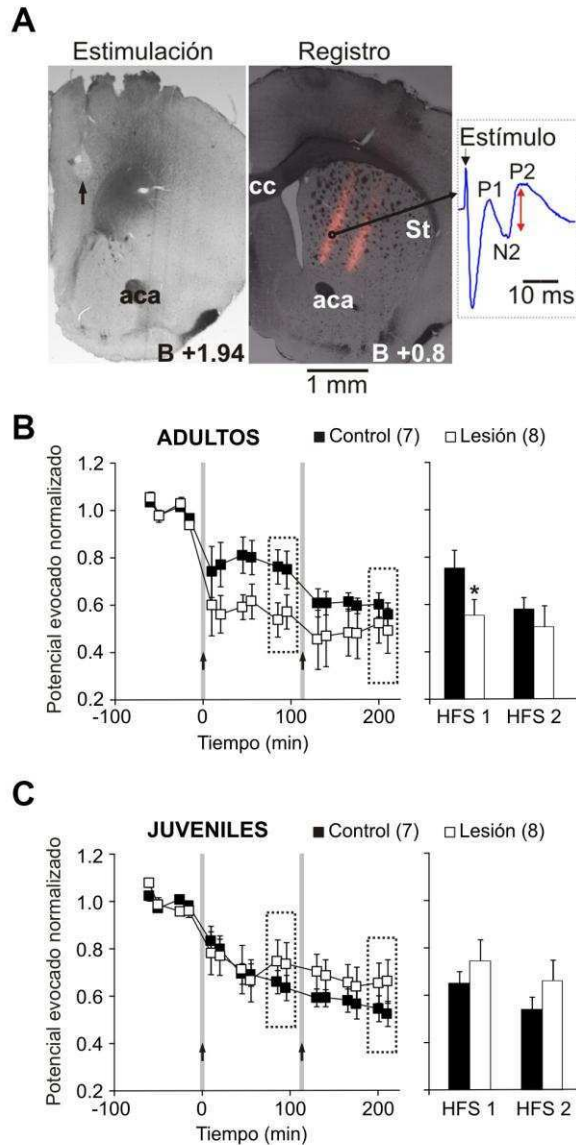
En línea con estas ideas y teniendo en cuenta que la dopamina es un neuromodulador clave de la plasticidad córticoestriatal, nos propusimos estudiar la LTD córticoestriatal mediante electrofisiología *in vivo* en animales anestesiados con uretano. Realizamos registros extracelulares de potenciales de campo estriatal evocados por estimulación de la corteza prelímbica a través de un multielectrodo localizado en el estriado dorsomedial (figura R.8A), donde la estimulación de la prelímbica evoca respuestas de gran amplitud en el animal anestesiado (Galiñanes et al. 2011). La estimulación de la prelímbica provoca una respuesta de campo estriatal bien caracterizada (figura R.8A) cuya amplitud está linealmente relacionada con

la de los potenciales postsinápticos excitatorios y las respuestas de potenciales de acción (PA) poblacionales de las NEM (Galiñanes et al. 2011)(ver también figura I.9).

Registros electrofisiológicos *in vivo* hechos en el laboratorio mostraron que es posible inducir HFS-LTD en presencia de antagonistas de receptores de dopamina de tipo D1 y D2 y en animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas. En este modelo en particular, vimos que la aplicación de una HFS ocasiona una depresión transitoria en los animales adultos control mientras que en el adulto lesionado induce plasticidad de largo término (figura I.9). Durante mi tesis de licenciatura estudiamos el efecto *in vivo* de un protocolo de saturación de la LTD córticoestriatal que consistió en la aplicación de cuatro HFS sucesivas, y observamos que la depresión máxima obtenida no depende de la lesión ni la edad. Así, estos resultados (resumidos en la figura I.9) sugirieron que los animales adultos lesionados son más susceptibles a sufrir HFS-LTD, ya que alcanza con una sola inducción para obtenerla. Cabe observar que las diferencias de susceptibilidad no resultaron evidentes al utilizar el protocolo de saturación por cuatro HFS, probablemente porque durante el corto intervalo entre inducciones (30 min) se manifiestan solo los efectos de depresión de corta duración que no mostraron diferencias entre animales control y lesionados. Dada esta aparente discrepancia, en este trabajo estudiamos la LTD córticoestriatal mediante un protocolo de dos inducciones de plasticidad separadas por 105 minutos, con la expectativa de minimizar las desventajas del protocolo anterior y evidenciar en mayor medida las diferencias de susceptibilidad entre los grupos experimentales.

En los animales adultos con lesión neonatal la máxima depresión de la transmisión prefrontoestriatal se alcanzó luego de la primera HFS, careciendo de efecto depresor el segundo episodio de HFS. En cambio, en los adultos control se necesitaron las dos inducciones

para alcanzar el mismo grado de depresión obtenido con una HFS en los lesionados (figura R.8B). En conjunto con nuestros datos previos, esto demuestra que los animales adultos con lesión dopaminérgica neonatal son más susceptibles a sufrir LTD. Por otro lado, corroborando los datos previos del laboratorio (figura I.9) en el grupo juvenil no observamos diferencias en la susceptibilidad a la HFS ni en el grado máximo de depresión (figura R.8C).



**Figura R.8. Los animales adultos con lesión dopaminérgica neonatal son más susceptibles a sufrir HFS-LTD.** **A.** Secciones histológicas representativas mostrando la localización de los electrodos de estimulación cortical (izquierda) y de registro estriatal (derecha), y un trazo representativo de la respuesta evocada por estimulación cortical (aca: comisura anterior; St, estriado; cc: cuerpo calloso). La flecha señala la localización de la punta del electrodo de estimulación. La amplitud del potencial de campo evocado fue medida entre los picos N2 y P2. **B-C.** Utilizamos un protocolo de dos inducciones de alta frecuencia (flechas) separadas por 105 minutos y evaluamos la respuesta estriatal evocada por estimulación en la corteza prelímbica, antes y después de cada inducción. Se muestra el potencial de campo evocado normalizado en función del tiempo para los adultos (B) y juveniles (C). Los gráficos de barra corresponden al promedio de los bloques con recuadro punteado. Los animales adultos con lesión son más susceptibles a sufrir HFS-LTD ya que con una inducción de alta frecuencia alcanzan la depresión máxima mientras que los controles necesitan dos HFS para llegar al mismo grado de depresión (RM ANOVA, interacción  $p=0.02$ , Comparaciones de tukey  $*p<0,05$ ). No se observaron diferencias en el grupo juvenil (RM ANOVA.).



Como conclusión de esta parte, podemos decir que nuestros datos previos no publicados y los presentados en este capítulo muestran que la LTD posee componentes independientes de la inervación dopaminérgica *in vivo* y que los animales adultos que sufrieron la lesión dopaminérgica neonatal son más susceptibles a sufrirla. En este contexto, la mayor susceptibilidad a sufrir LTD en este grupo podría ser consecuencia de la mayor actividad neuronal que muestran los adultos con lesión (figura I.9B), ya que la LTD es dependiente de actividad a través de la estimulación de mGluR y canales de calcio tipo L (sección II de la introducción). Es interesante observar que los ratones control y con lesión neonatal no difieren en sus niveles de actividad espontánea estriatal ni tampoco en su susceptibilidad a sufrir LTD cuando son jóvenes (Galiñanes y col 2009; ver figura I.9).

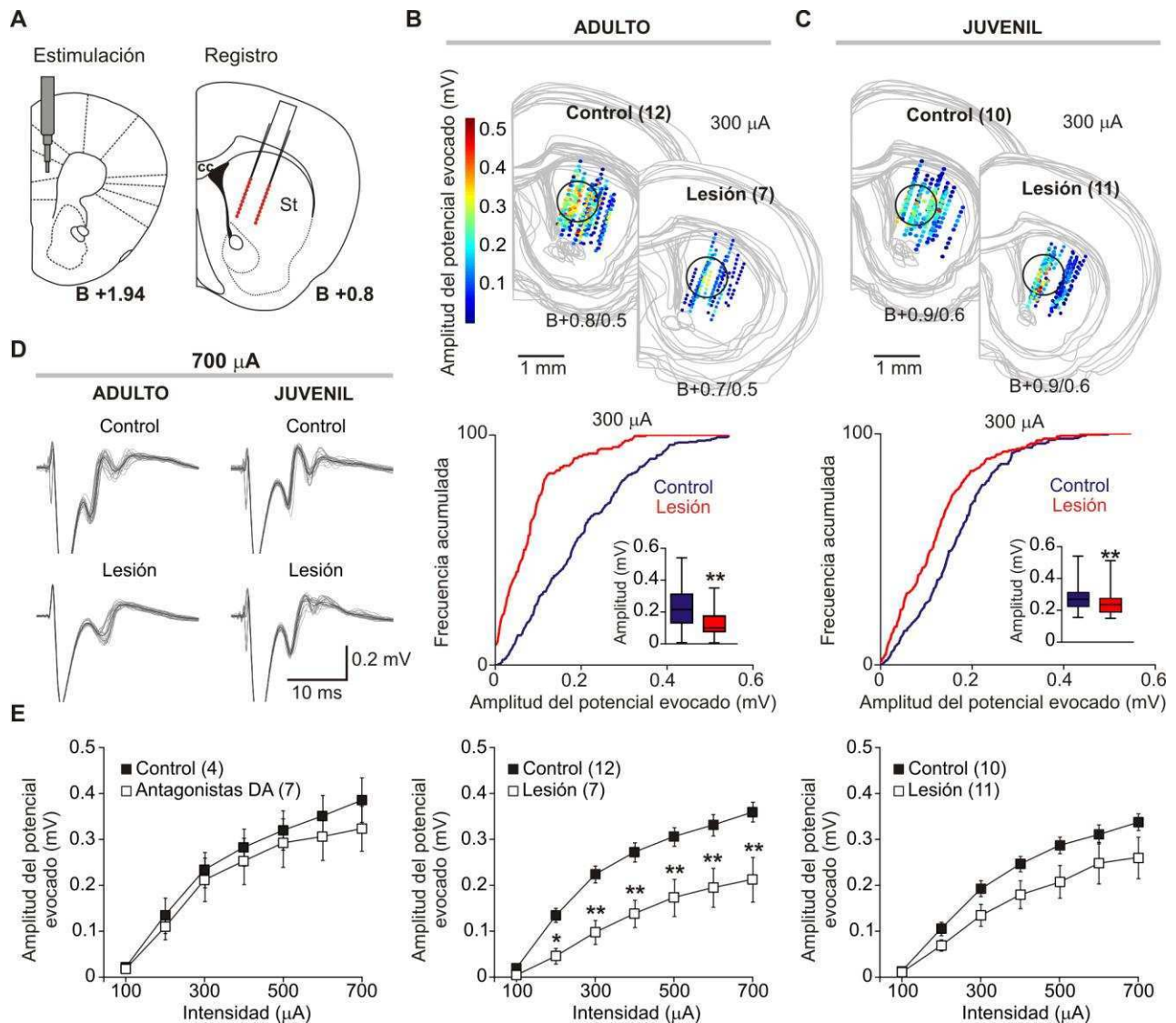
En el contexto de estos resultados es que, en el siguiente capítulo, nos preguntamos si la conectividad funcional prefrontoestriatal se encuentra reducida en ratones con lesión dopaminérgica neonatal.

### III) Conectividad córticoestriatal

#### ***Conectividad funcional prefrontoestriatal reducida en animales con lesión dopaminérgica neonatal.***

En la sección anterior, estudiamos la HFS-LTD córticoestriatal mediante un protocolo de dos inducciones de plasticidad buscando saturar la respuesta. En concordancia con resultados previos, encontramos que luego de la adolescencia los animales con lesión se vuelven más susceptibles a sufrir procesos de HFS-LTD. Extendiendo estas ideas a procesos madurativos de plasticidad, si los animales lesionados son más susceptibles a sufrir procesos de depresión esto traería como consecuencia una disminución en la fuerza con la que se conecta la corteza prefrontal con el estriado dorsomedial.

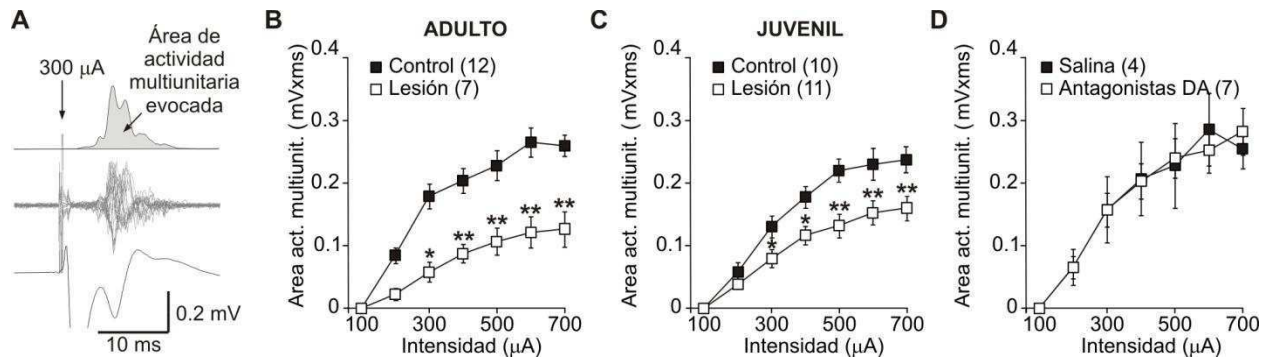
Para analizar esta posibilidad, estudiamos la conectividad funcional córticoestriatal *in vivo*, realizando registros extracelulares de potenciales de campo estriatales evocados por estimulación de la prelímbica con la misma configuración de electrodos que en la sección anterior (figura R.9A).



**Figura R.9. Desconexión funcional córticoestriatal en animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.** A. Diagrama esquemático de la posición de los electrodos de estimulación en corteza prelámbica y de registro estriatal (St, estriado; cc: cuerpo calloso). B. Conectividad córticoestriatal en adultos. Arriba: reconstrucción topográfica de todos los sitios de registro. Los colores representan la amplitud del potencial de campo evocado por una intensidad de estimulación cortical de 300  $\mu$ A. Centro: Distribución de frecuencias acumuladas y box and whisker plots de la amplitud del potencial de campo evocado inducido por estímulos de 300  $\mu$ A aplicados a la corteza prelámbica (Kolmogorov-Smirnov test  $**p < 0.001$ ). Abajo: La amplitud de la respuesta de campo estriatal (promedio de los canales contenidos en el círculo mostrado en la parte superior) en función de la intensidad de estimulación está reducida en el adulto con lesión (RM-ANOVA, interacción:  $p < 0.001$ , Tukey post hoc  $*p < 0.05$   $**p < 0.001$ ). C. Conectividad córticoestriatal en animales juveniles. Paneles de arriba, centro y abajo como en B. D. Trazos representativos de respuestas de campo máximas evocadas a 700  $\mu$ A de intensidad de corriente (20 trazo individuales superpuestos en gris, trazo promedio en negro). E. La amplitud de la respuesta estriatal no es afectada por la administración de antagonistas de receptores dopaminérgicos (Eticlopride 0.25 mg/kg más SCH23390 0.25 mg/kg, i.p.) (RM ANOVA).

En registros realizados en adultos, observamos menores respuestas estriatales evocadas en los animales con lesión, como indican el corrimiento hacia la izquierda de la distribución de frecuencias de las amplitudes de los potenciales de campo evocados y la reducción del 42 % de la respuesta máxima alcanzada en el área estriatal donde éstas son de mayor amplitud (figura R.9B). El grupo juvenil presentó alteraciones menos marcadas. Observamos un pequeño pero significativo corrimiento hacia la izquierda de la distribución de frecuencia de la amplitud de las respuestas, pero no encontramos diferencias significativas en la respuesta máxima entre controles y lesionados (figura R.9C). Además, tanto los animales juveniles como los adultos mostraron una disminución en la respuesta de PA poblacionales evocados por estimulación en la corteza prelímbica (figura R.10B-C). Considerando que las respuestas de potencial de campo suelen reflejar fenómenos subumbrales además de la descarga de potenciales de acción, nuestros resultados sugieren una alteración más profunda de la conectividad funcional en los adultos.

Para determinar si una reducción en la activación de receptores de dopamina (DAR) durante los registros podría *per se* provocar déficits funcionales similares a los inducidos por la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas, evaluamos el efecto de la administración aguda de antagonistas de DAR en la respuesta estriatal en animales control (figura R.9E). El bloqueo agudo de DAR no modificó la respuesta de campo estriatal (figura R.9E) ni la respuesta de PA poblacionales en animales adultos control (figura R.10D). Este resultado indica que las alteraciones fisiológicas observadas en los animales con lesión no pueden atribuirse a la falta de dopamina endógena actuando sobre los DAR en el momento del registro, sino a cambios de larga duración inducidos por la lesión.

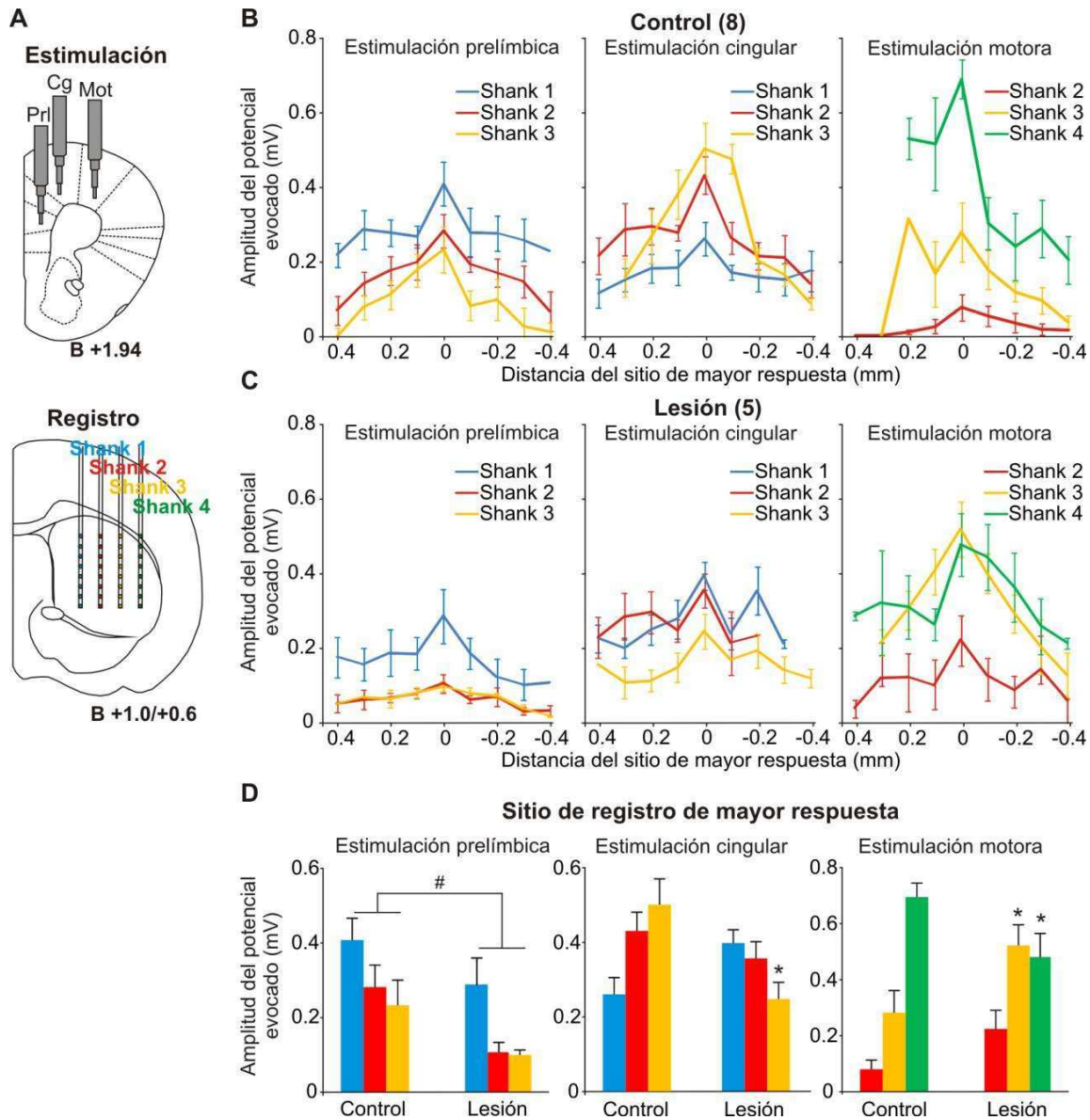


**Figura R.10. Disminución en la respuesta de PA poblacionales evocados en animales con lesión neonatal de dopamina.** A. Respuesta evocada representativa de campo (abajo) de potenciales de acción (centro) y área de actividad multiunitaria (arriba) para un animal control a 300 μA. B-D. Área de actividad multiunitaria en función de la intensidad de estimulación para animales con o sin lesión neonatal de neuronas dopaminérgica adultos (B) y juveniles (C) (RM-ANOVA, interacción:  $p < 0.001$ , Tukey post hoc  $*p < 0.05$   $**p < 0.001$ ) y para animales adultos con o sin administración de antagonistas dopaminérgicos (Eticlopride 0.25 mg/kg más SCH23390 0.25 mg/kg, i.p.) (RM ANOVA).

En conclusión, la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas induce alteraciones tempranas en la conectividad prefrontoestriatal que evolucionan hacia una marcada desconexión funcional en el adulto.

Estudios en roedores (Kasnetz et al. 2008; Haber et al. 2006) y primates (Haber & Knutson 2010) mostraron que las proyecciones córticoestriales funcionalmente relacionadas se solapan parcialmente. Esta integración córticoestriatal podría ser crucial para la toma de decisiones (Haber & Knutson 2010). Para evaluar si la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas afecta la integración córticoestriatal, junto con Gregorio Galiñanes realizamos registros electrofisiológicos extracelulares *in vivo* utilizando un multielectrodo (32 sitios distribuidos en cuatro patas -"shanks"-) que abarca la mayor parte del estriado dorsal, y registramos la respuesta estriatal de campo evocada por estimulación de las cortezas prelímbica, cingulada y motora (figura R.11A). En animales control, la estimulación de la corteza

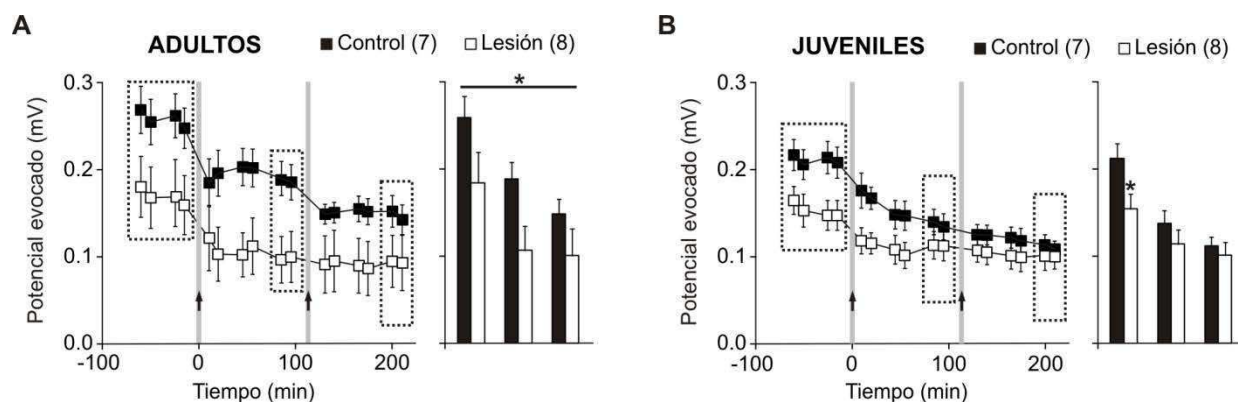
prelímica y cingulada evoca respuestas claras en las tres patas más mediales con una topografía que recapitula la anatomía de las proyecciones córticoestriatales (figura R.11B) (Mailly et al. 2013). De modo inverso, la respuesta a la estimulación de la corteza motora es máxima en la pata más lateral y despreciable en la pata más medial (figura R.11B). Este patrón organizado está degradado en los animales con lesión. Este grupo presenta una atenuación en las respuestas a la estimulación en la corteza prelámbica a lo largo de toda el área de proyección de esta corteza (figura R.11D). Con respecto a las cortezas motora y cingulada, si comparamos el perfil de las respuestas máximas para los dos grupos (figura R.11D) observamos que éste se encuentra alterado en los animales con lesión. Por ejemplo, los sitios del multielectrodo en donde se encuentra la respuesta máxima en el control son la pata 3 para la corteza cingular (amarillo en la figura R.11D) y la pata 4 para la corteza motora (verde en la figura R.11D), mientras que los máximos respectivos se encuentran en las patas 1 y 3 en el animal lesionado. En resumen, los animales lesionados presentan una desconexión de las entradas que provienen de la corteza prelámbica y una representación estriatal distorsionada de las provenientes de las cortezas motora y cingulada (figura R.11C).



**Figura R.11. Desorganización del patrón de respuesta a los inputs corticales en animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.** A. Diagrama esquemático de la posición de los electrodos de estimulación cortical y de registro estriatal (cuatro patas, ocho canales por pata, separación entre canales: 100 $\mu$ m). B-C. Amplitud del potencial de campo evocado por estimulación en la corteza prelímbica, cingulada y motora (700  $\mu$ A) en diferentes regiones estriatales (patas), en controles (B) o en lesionados (C). Las respuestas de diferentes animales fueron alineadas al sitio de máxima respuesta dentro de cada pata. Las distancias positivas corresponden a una ubicación dorsal respecto del máximo. D. Respuestas máximas en cada pata evocadas por estimulación (700  $\mu$ A) de cada área cortical en animales controles y lesionados. En los animales con lesión las respuestas a la corteza prelímbica están reducidas en todas las patas (ANOVA de dos vías, interacción n.s., # $p$ <0.05 efecto tratamiento). El patrón de respuesta a las corteza cingulada y motora está degradado, el shank donde se encuentra el sitio de mayor respuesta en el control se ubica en una posición diferente en el animal lesionado (ANOVA de dos vías, Tukey post hoc luego de una interacción significativa \* $p$ <0.05 control vs lesión).

Es habitual mostrar los efectos de protocolos que inducen plasticidad sináptica (i.e., HFS) como cambio porcentual respecto a las mediciones basales de conectividad, tal como hicimos en el capítulo RII. Sin embargo, aquí observamos niveles de conectividad basal reducidos en los animales lesionados. Por ello nos preguntamos si las diferencias en la magnitud de la conectividad córticoestriatal que observamos en el presente capítulo, se observan también a lo largo de las curvas de plasticidad obtenidas en la sección anterior. En la figura R.12 se muestran los datos de la figura R.8 expresados como amplitud absoluta del potencial de campo estriatal evocado. De acuerdo a lo esperado, observamos una amplitud menor en los animales adultos lesionados respecto de los controles, tanto para las respuestas basales como para las respuestas posteriores a la primer y segunda HFS (figura R.12A). Por otro lado, encontramos diferencias más moderadas en los animales juveniles, en línea con lo observado en los experimentos del presente capítulo (figura R.12B). Así, los animales lesionados podrían saturar su respuesta al protocolo de HFS luego de la primera inducción porque ya alcanzaron un piso de conectividad prefrontoesrriatal, de modo que nuestros datos podrían subestimar la mayor susceptibilidad a la LTD que reportamos en el capítulo precedente.





**Figura R.12. Inducción de HFS-LTD expresada en términos absolutos.** Se muestran los datos de la figura R.8 expresados en valores de amplitud absoluta de la respuesta estriatal evocada para los animales adultos (A) y juveniles (B). Observamos una reducción en la amplitud a lo largo de toda la curva para los animales adultos con lesión respecto de los controles (ANOVA de dos vías de medidas repetidas para los datos recuadrados con una línea de puntos; interacción no significativa; efecto de la lesión  $*p < 0.05$ ). Encontramos diferencias más moderadas en el grupo juvenil ya que las curvas sólo difieren en la línea de base (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, interacción significativa, test de tukey para comparaciones post hoc  $*p < 0.05$  control vs. lesión).

En conjunto, los resultados de los experimentos de electrofisiología son consistentes con la idea de que la dopamina moldea los circuitos córticoestriatales durante la adolescencia y que un estado hipodopaminérgico temprano en el desarrollo postnatal lleva a alteraciones en las propiedades plásticas y en la conectividad de estos circuitos que aparecen en la infancia y progresan hacia la adultez. Los distintos canales córticoestriatales no son afectados de igual manera por la lesión de neuronas dopaminérgicas. Los canales más mediales sufren una desconexión marcada en el adulto que correlaciona con una mayor susceptibilidad a sufrir procesos de depresión, en sintonía con la denervación dopaminérgica que en este modelo animal afecta más marcadamente al estrido dorsomedial. Los canales más laterales no presentan una desconexión evidente pero sí se observa una desorganización en el patrón de respuesta como consecuencia de la lesión. Por último, es importante destacar que las

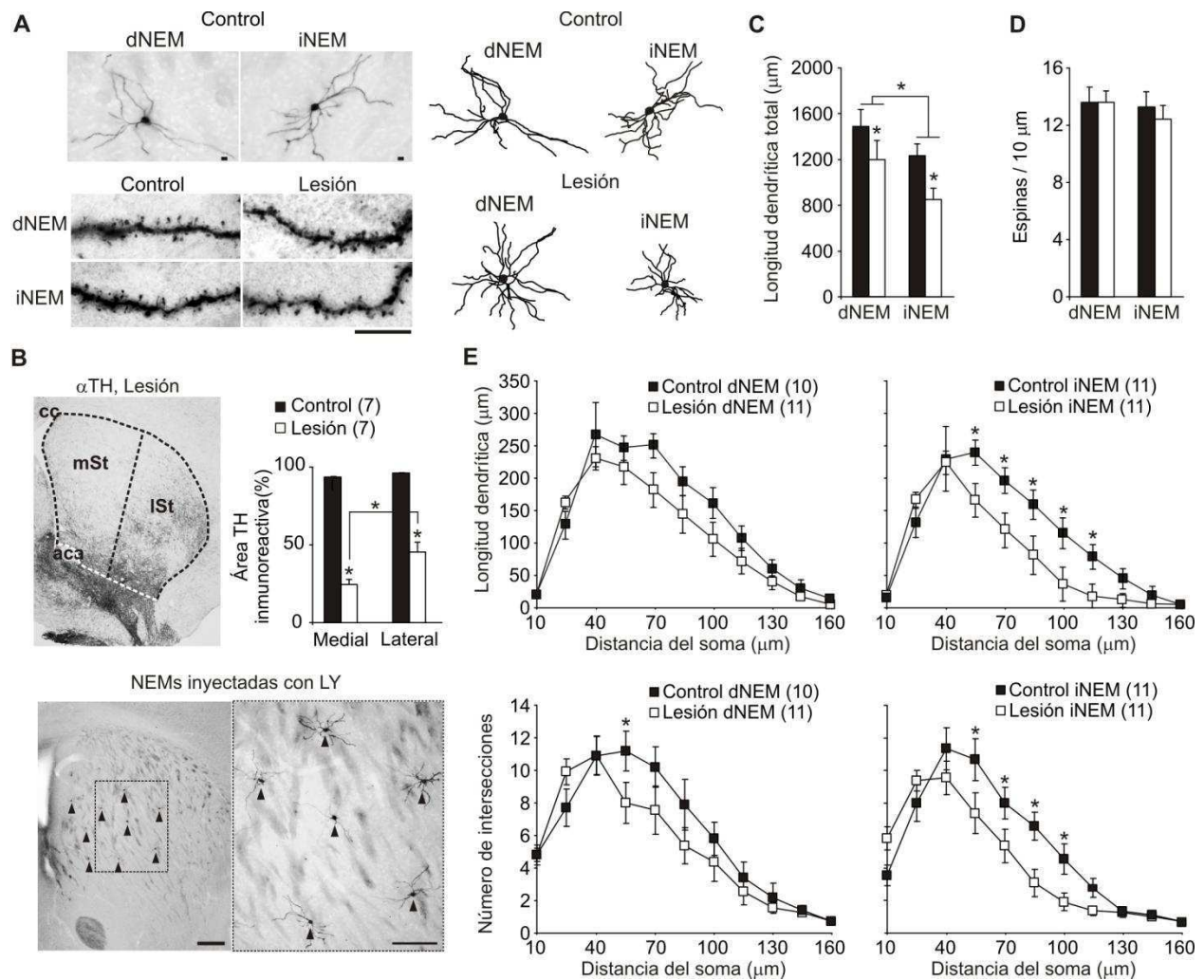
alteraciones fisiológicas córticoestriatales que empeoran en el adulto ocurren en paralelo con la aparición de ciertos déficits conductuales que no están presentes en los juveniles, como por ejemplo, déficits en la memoria de trabajo y alteraciones en la exploración de ambientes complejos.

#### **IV) Morfología de las neuronas de proyección estriatales**

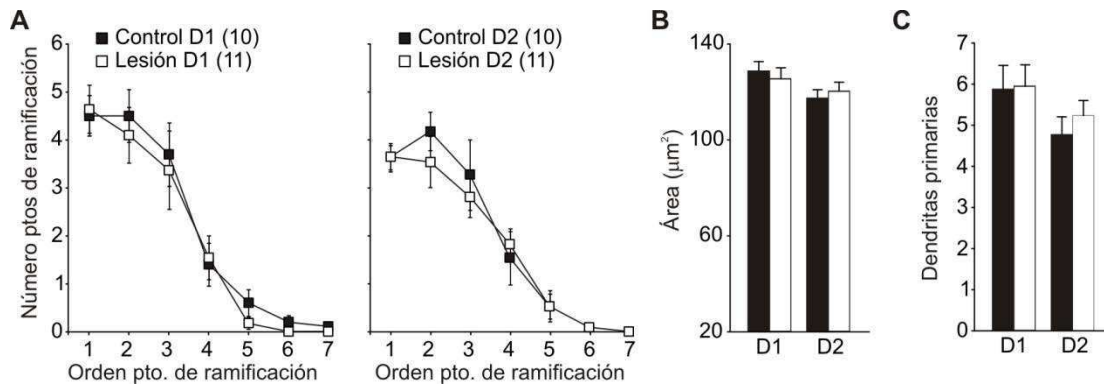
Que los déficit conductuales, la mayor susceptibilidad a sufrir depresión córticoestriatal y la atenuación de la conectividad córticoestriatal fueran más marcados en los animales adultos con respecto a los juveniles, y que no fueran revertidos/reproducidos por tratamientos farmacológicos agudos que afectan la neurotransmisión dopaminérgica, sugiere que la lesión induce alteraciones córticoestriatales progresivas. Es sabido que la dopamina regula la morfología de las dendritas y espinas de las NEM (Fasano et al. 2013) y que la lesión de neuronas dopaminérgicas en el adulto produce alteraciones dendríticas de las NEM (Deutch et al. 2007; Day et al. 2008). También que la LTD se acompaña de cambios morfológicos en las sinapsis (Wang et al. 2007; Hawes et al. 2015). Por otro lado, durante la adolescencia, el volumen del núcleo caudado humano decrece (Castellanos & Tannock 2002) a través de un proceso que es regulado por el transportador de dopamina y los receptores de dopamina de tipo D4 (Durston et al. 2005), hecho que ha sido especulativamente atribuido al podado sináptico (Toga et al. 2006). En consecuencia, buscamos un posible correlato morfológico de la disminución de la conectividad funcional observada en los adultos con lesión neonatal.

Usamos ratones BAC transgénicos adultos que nos permitieron visualizar las NEM de la vía directa e indirecta (dNEM e iNEM) (Shuen et al. 2008) para marcarlas mediante una inyección intracelular de Lucifer Yellow y posteriormente reconstruir su árbol dendrítico. Marcamos NEM localizadas en el estriado dorsomedial (figura R.13A-B), donde la depleción de las terminales dopaminérgicas es máxima en este modelo animal. Luego reconstruimos a las neuronas marcadas en dos dimensiones usando un sistema semiautomático de morfometría (Mercator Pro). Observamos que la longitud dendrítica total de ambos tipos de NEM se encuentra

significativamente reducida en los animales con lesión neonatal (figura R.13C), sin que ocurran cambios en la densidad de espinas dendríticas (figura R.13D).



**Figura R.13. Contracción del árbol dendrítico de las neuronas espinosas medianas en animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.** **A.** Microfotografías representativas de NEM de la vía directa e indirecta, imágenes de alta magnificación de dendritas y ejemplos de reconstrucciones de árboles dendríticos (escala: 10  $\mu$ m). **B.** Secciones estriatales con tinción inmunohistoquímica contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH) de un animal lesionado representativo (aca: comisura anterior; mSt: estriado medial; ISt: estriado lateral; cc: cuerpo calloso, escala: 100  $\mu$ m). En los animales con lesión, el porcentaje de área inmunoreactiva para TH fue menor en el mSt comparado con el ISt (RM ANOVA, interacción:  $p=0.001$ ; Tukey post hoc  $*p<0.05$ ). Grilla de NEM inyectadas con Lucifer yellow (LY) y con tinción inmunohistoquímica contra dicho colorante (derecha). **C-D.** Los animales con lesión muestran una reducción en la longitud dendrítica total en ambos tipos de NEM (C, ANOVA de dos vías, efecto tratamiento:  $*p=0.009$ ; efecto tipo neuronal:  $*p=0.02$ ) sin cambios en la densidad de espinas dendríticas (D, ANOVA de dos vías). **E.** Análisis de Sholl: longitud dendrítica a distintas distancias del soma (panel superior) y número de intersecciones del árbol dendrítico con círculos concéntricos alrededor del soma (panel inferior). La longitud dendrítica distal está reducida en las iNEM (RM ANOVA, interacción:  $p<0.001$ , Tukey post hoc  $*p<0.05$ ) pero no en las dNEM, mientras que hubo una reducción en el número de intersecciones en ambos tipos (RM ANOVA, Tukey post hoc  $*p<0.05$  luego de una interacción significativa).



**Figura R.14. La lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas no afecta el número de ramificaciones y el tamaño del cuerpo celular de las NEM. A.** Números de puntos de ramificación para cada orden de los mismos para las NEM de la vía directa (izquierda) e indirecta (derecha). **B.** Área del cuerpo celular. **C.** Número de dendritas primarias.

Además realizamos un análisis de Sholl del árbol dendrítico, consistente en contar el número de intersecciones de las dendritas de la célula en estudio con una serie de círculos concéntricos de diámetro creciente y centro en el soma. El análisis también permite estimar la longitud dendrítica dentro de los anillos delimitados por dichos círculos. El análisis de Sholl de los árboles dendríticos reveló que en las iNEM, las dendritas localizadas a más de 55 µm del soma mostraron una reducción en la longitud (figura R.13E arriba derecha) y del número de intersecciones (figura R.13E abajo derecha) en los animales con lesión neonatal. Un menor número de intersecciones también fue detectado en las dNEM, pero el análisis de Sholl no reveló cambios en la longitud dendrítica, sugiriendo un efecto menos robusto en las dNEM en los animales lesionados (figura R.13E, arriba y abajo a la izquierda).

Por otro lado, el número de dendritas primarias, de puntos de ramificación en las dendritas y el área del cuerpo celular, no fueron afectadas por la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas (figura R.14).

En conclusión, la longitud y complejidad del árbol dendrítico se hayan reducidas en las NEM de los animales con lesión dopaminérgica neonatal, siendo más marcado el efecto en las iNEM, sin cambios en la densidad de espinas dendríticas.

## Discusión

*Los resultados obtenidos en esta tesis son compatibles con la hipótesis de trabajo que supone que durante la infancia y adolescencia ocurren cambios en la función y anatomía del conexionado córticoestriatal, y que la dopamina cumple un rol central en la maduración de estos circuitos. Alteraciones tempranas en la transmisión dopaminérgica dan lugar a déficits conductuales, que emergen en el período juvenil y empeoran en el animal adulto, y están acompañados por alteraciones en la plasticidad y conectividad córticoestriatal, y en la morfología de las neuronas de proyección estriatales. Los déficits conductuales son compatibles con un rol activacional de la conducta de la dopamina y el conexionado córticoestriatal, que afecta la explotación y exploración de manera dependiente del contexto y la edad. Observamos una distorsión en el patrón de respuesta estriatal a las entradas corticales, y en particular, una desconexión córticoestriatal que involucra la corteza prefrontal medial, que comienza en el período juvenil y se hace muy evidente en el animal adulto. Los cambios morfológicos en las neuronas de proyección estriatales incluyen una disminución en el largo total y en la complejidad del árbol dendrítico, sin cambios en la densidad de espinas.*

### **Impacto de la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas sobre la fisiología córticoestriatal.**

Los circuitos córticoestriatales sufren cambios importantes durante las primeras semanas de vida y la dopamina cumple un rol clave durante esta etapa. En roedores, la segunda y tercera semana postnatal de vida es un período de rápido crecimiento de las sinapsis excitatorias sobre



las NEM, un proceso que es dirigido por la liberación de glutamato desde los axones corticales y que es modulado positivamente por la dopamina y otros neuromoduladores (Kozorovitskiy et al. 2012; Kozorovitskiy et al. 2015). En el laboratorio abordamos esta problemática desde la perspectiva de la conectividad funcional entre corteza y estriado mediante estudios *in vivo*. Resultados previos del laboratorio en conjunto con los presentados en esta tesis muestran que la proyección dopaminérgica nigroestriatal promueve la maduración del sistema córticoestriatal en el paso de la infancia a la adultez. La lesión temprana de neuronas dopaminérgicas ocasiona un retraso en la maduración de la sincronización córticoestriatal (Galiñanes et al. 2009), un aumento en la susceptibilidad a sufrir procesos de LTD córticoestriatal, una disminución en la conectividad de los circuitos que unen a la corteza prefrontal con el estriado dorsomedial, y una desorganización del patrón de respuesta para canales córticoestriatales más laterales.

Con respecto al efecto de la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas sobre las propiedades plásticas del sistema córticoestriatal, en concordancia con resultados presentados en mi tesis de licenciatura, encontramos que los animales adultos con lesión son más susceptibles a sufrir LTD, ya que con un sólo intento de inducción de plasticidad el sistema alcanza el grado máximo de depresión mientras que los adultos controles necesitan dos intentos. Por otro lado, los animales juveniles no presentan diferencias en las capacidades plásticas de este circuito. Extrapolando estos resultados a procesos de LTD fisiológica, especulamos que una mayor susceptibilidad a sufrir procesos de LTD determinaría una mayor acumulación de eventos de depresión sináptica a lo largo de la vida en los animales con lesión. Teniendo esto en cuenta nuestra hipótesis fue que la conectividad en los animales lesionados se encuentra reducida. En concordancia con estas ideas, mediante registros electrofisiológicos de potencial de campo

evocado por estimulación cortical, mostramos que, como consecuencia de la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas, existe una reducción de la conectividad entre el estriado dorsomedial y la corteza prefrontal (figura R.9). Esta desconexión emerge en el período juvenil y se acentúa en el adulto (figura R.9), y no es reproducida por la administración aguda de antagonistas de receptores para dopamina, lo cual es coherente con la idea de que la maduración funcional córticoestriatal continúa luego de la infancia y la actividad de las neuronas dopaminérgicas moldea la conectividad córticoestriatal tanto en etapas tempranas del desarrollo postnatal como durante la adolescencia.

La reducción en la conectividad que observamos para las entradas de la corteza prelímbica al estriado dorsomedial no es algo que ocurre de manera generalizada para todas las entradas corticales. Testeando la respuesta de cortezas más laterales sobre el estriado dorsolateral observamos una distorsión del patrón de respuesta a distintas zonas de la corteza. Esta distorsión fue vista como un cambio en el patrón espacial de la respuesta más que como cambios en la fuerza de las conexiones. Es posible que la mayor distorsión observada en el conexionado prefrontoestriatal se relacione con que la mayor depleción de fibras dopaminérgicas ocurre en el estriado dorsomedial en este modelo animal. Dado que los distintos distritos estriatales presentan propiedades estructurales y funcionales diferentes (Voorn et al. 2004), maduran de forma distinta a lo largo del desarrollo postnatal (Butler et al. 1998) y tienen un rol definido en la adquisición de conductas (Yin et al. 2009), cabría esperar que los déficit tempranos de la transmisión dopaminérgica se manifiesten de distintas maneras según cuáles sean los territorios estriatales involucrados.

Como correlato morfológico de una disminución en la conectividad frontoestriatal en los animales lesionados encontramos una contracción del árbol dendrítico de las iNEM y, en menor medida, de las dNEM. Si bien no observamos cambios en la densidad de espinas dendríticas, el hecho de que exista una disminución en la longitud total del árbol dendrítico de las NEM implica que el número total de espinas disponibles en cada NEM es menor como consecuencia de la lesión. Esto podría explicar el hecho de que las NEM de los animales lesionados respondan menos a estímulos en la corteza prefrontal. Resta determinar si los cambios estructurales que subyacen a esta desconexión funcional se encuentran en otros niveles, como por ejemplo cambios morfológicos en las aferencias córticoestriales o en las interneuronas estriales.

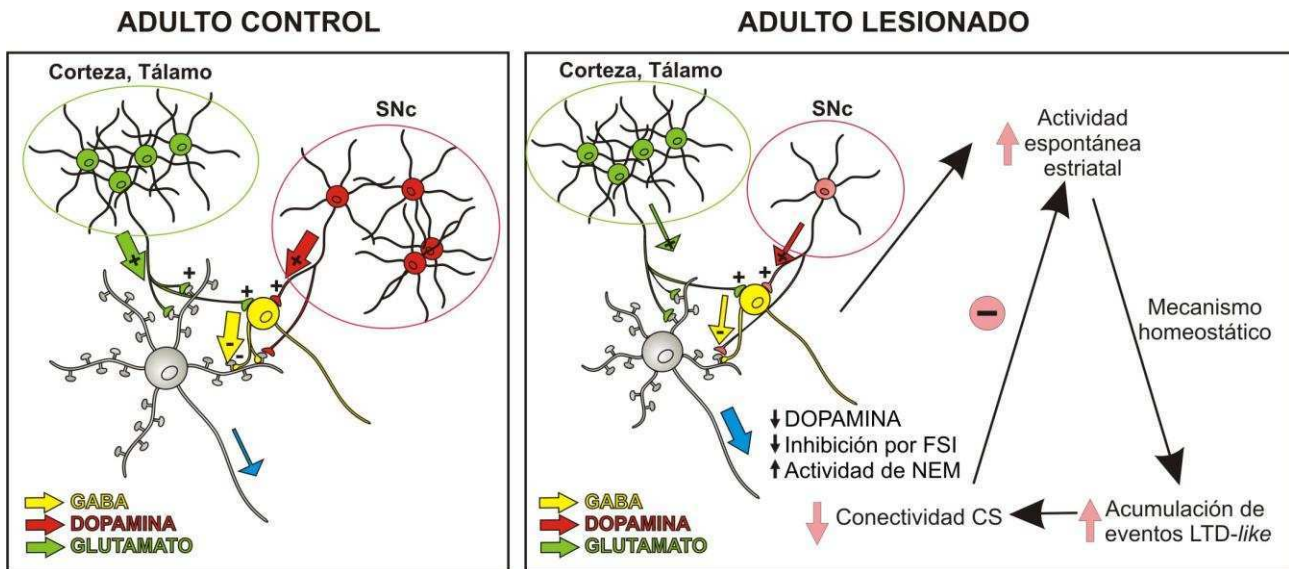
A diferencia de nuestro modelo, la lesión nigroestriatal inducida en el adulto produce depleción de espinas acompañada o no por una contracción dendrítica (Wang et al. 2006; Villalba et al. 2009; Zhang et al. 2013; Suárez et al. 2014). Cabe destacar que los modelos de lesión dopaminérgica del adulto están enfocados en los circuitos dorsolaterales motores del estriado y causan un síndrome parkinsoniano (acinesia principalmente), a diferencia de lo que observamos en esta tesis. Mientras que distintos factores pueden ser responsables de las diferencias observadas (por ejemplo, la extensión de la lesión o el territorio estriatal afectado), lesiones tempranas podrían disparar compensaciones que están disponibles sólo en ciertas etapas del desarrollo pero no luego de que el circuito ha completado su maduración. Además de los efectos directos de la dopamina en la formación de espinas (Fasano et al. 2013), efectos tróficos mediados por la actividad de los bucles corteza - GB - corteza (Kozorovitskiy et al. 2012) y factores neurotróficos expresados por las neuronas dopaminérgicas, como el BDNF (brain-derived neurotrophic factor), podrían moldear la conectividad córticoestriatal a lo largo del

desarrollo postnatal. Entonces, múltiples mecanismos podrían contribuir a las alteraciones de la conectividad córticoestriatal observadas como consecuencia de lesiones dopaminérgicas tempranas.

La reducción en la conectividad observada en los adultos con lesión contrasta con resultados previos del laboratorio que muestran que la actividad espontánea estriatal se mantiene elevada en este grupo mientras que en el adulto normal esta reducida, sin diferencias en el grupo juvenil (figura I.9). Surge el interrogante acerca de cómo es posible que en los animales adultos con lesión la conectividad córticoestriatal esté reducida y la actividad espontánea este aumentada. En este contexto, una mayor susceptibilidad a sufrir procesos de LTD en el animal adulto lesionado podría representar un mecanismo homeostático que actúa en sentido de compensar aumentos en la actividad espontánea estriatal (figura D.1). Planteamos que los niveles de actividad espontánea estriatal alcanzados durante el desarrollo podrían depender de la actividad de las interneuronas estriatales y que dicho proceso estaría modulado por dopamina. En particular, pensamos que las interneuronas estriatales de descarga rápida (fast spiking interneurons o FSI) podrían tener un papel crucial en la regulación de la actividad estriatal en el desarrollo. Se sabe que estas interneuronas regulan marcadamente a las NEM, que son más excitables que éstas, y que su actividad está regulada de manera positiva por la dopamina (Bracci et al. 2002). En este sentido, planteamos que el número y/o la actividad de las FSI podría estar reducido en los animales adultos con lesión lo que explicaría los mayores niveles de actividad estriatal en este grupo. Un mecanismo semejante se ha propuesto para el ratón knockout para Sapap 3 propuesto como un modelo animal de TOC, el cual presenta elevados niveles de actividad espontánea estriatal y una disminución en el número de FSI

(Burguière et al. 2013), una conectividad córticoestriatal reducida (Welch et al. 2007), y un aumento en la expresión de LTD (Chen et al. 2011). Además, se ha descrito que el número de interneuronas estriatales GABAérgicas y colinérgicas se encuentra reducido en el cerebro de pacientes que sufrieron TS (Kataoka et al. 2010). En el futuro sería conveniente evaluar si un déficit temprano en el número o la función de interneuronas estriatales resulta en cambios de actividad estriatal y alteraciones de la plasticidad y conectividad semejantes a los descritos en esta tesis.

Por último, un aumento en los niveles de serotonina que ocurre de modo compensatorio a la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas (Berger et al. 1985; Avale et al. 2004; Breese et al. 2005) podría facilitar la ocurrencia de procesos de depresión ya que se observó que la aplicación de serotonina o un aumento en la liberación endógena de este neurotransmisor resulta en la inducción de LTD (Mathur et al. 2011).

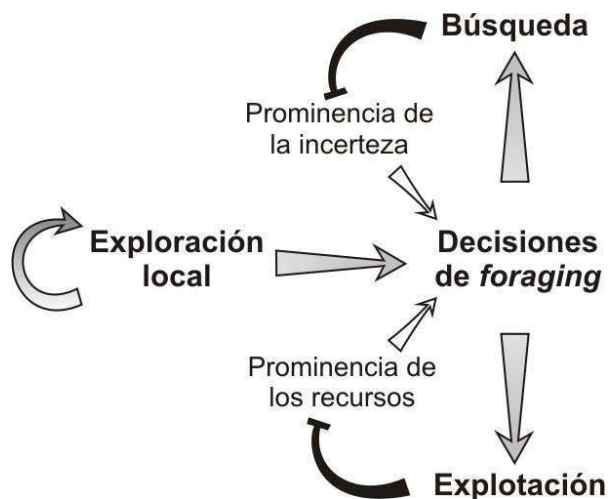


**Figura D1. Modelo propuesto sobre un mecanismo homeostático que relacionaría a la conectividad corticoestriatal con la actividad espontánea estriatal.** Una disminución en los niveles de dopamina durante el desarrollo ocasionaría una disminución en la actividad de las FSI, generando un aumento de la actividad espontánea estriatal. Una mayor acumulación de eventos de LTD durante el desarrollo actuaría como mecanismo homeostático para reducir la fuerza de las entradas excitatorias y compensar el aumento en la actividad espontánea del estriado.

### Déficit en la toma de decisiones de *foraging* en animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas.

En la naturaleza, los animales que enfrentan ambientes novedosos tienen que decidir entre explotar los recursos que están inmediatamente disponibles o buscarlos en nuevas locaciones (Adams et al. 2012; Cohen et al. 2007). Los procesos de búsqueda pueden involucrar secuencias sofisticadas de acciones dirigidas a metas que podrían depender de mecanismos de control cognitivos comparables a aquellos involucrados en la explotación de recursos (Cohen et al. 2007; Daw et al. 2006; Hayden et al. 2011). Por otra parte, estudios recientes han mostrado que la información actúa como reforzador positivo para los animales y que las neuronas dopaminérgicas codifican información anticipatoria acerca de la recompensa como si fuera la

recompensa primaria (Bromberg-Martin & Hikosaka 2009). Entonces, *explotación y búsqueda* parecen estar gobernadas por un mismo impulso, la *prominencia de recompensas primarias* (por ejemplo, comida) o *abstractas* (por ejemplo, información) (Hayden et al. 2011; Pearson & Platt 2013). ***Los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas parecen tener una deficiencia general en el procesamiento de la prominencia, ya que fallan tanto en explotar como en buscar información en ambientes novedosos*** (ver figura D.2). Esto puede apreciarse mejor en el test empleado para evaluar la conducta de acaparamiento, el cual fue adaptado para incrementar la búsqueda de información con la incorporación de un tubo vacío, en el cual los animales tienen la posibilidad de explorar pero donde no existen recursos que explotar. En este test, los animales controles son más eficientes en acaparar los pellets de comida y también en mantener actualizada la información acerca del ambiente. A pesar de que los mecanismos últimos que subyacen a una deficiencia en el procesamiento de la prominencia permanecen inciertos en este modelo animal, los animales con lesión exhiben una desorganización en la topografía funcional córticoestriatal que afecta de forma más marcada a las proyecciones que provienen de la corteza prefrontal medial que a las de las áreas frontales laterales. Además, las alteraciones en la conectividad córticoestriatal son más prominentes en adultos que en juveniles lo cual ocurre en paralelo con la acentuación de los déficits conductuales.



**Figura D2.** Un déficit en el procesamiento de la prominencia podría explicar por qué los animales con lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas fallan en explotar los recursos disponibles y explorar ambientes complejos. La elección entre quedarse explotando los recursos locales o ejecutar conductas de búsqueda de información depende de la prominencia de los recursos locales (por ejemplo, comida) y la prominencia de la incerteza relativa a las oportunidades existentes en otras locaciones. Estas señales podrían moldear los circuitos córticoestriatales involucrados en las decisiones de foraging durante el desarrollo postnatal. Un déficit en la toma de decisiones de foraging inducido por la lesión dopaminérgica podría ocasionar que sean menos probables las transiciones desde la exploración local, hacia las actividades de explotación y búsqueda.

La lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas ha sido evaluada en la literatura como un modelo de TDAH desde una perspectiva *top-down*. Además de hiperactividad, este modelo exhibe déficits de aprendizaje en tareas en las que intervienen distintos sustratos neurales, tales como el condicionamiento operante (Heffner & Seiden 1983) y el *Morris water-maze* (Archer et al. 1988). Extraordinariamente, el aprendizaje no está completamente impedido en los animales con lesión neonatal. A pesar de que, en general, los animales lesionados tienen un menor desempeño respecto a los controles, en algunas tareas no muestran discapacidades (Levine et al. 1980) o se desempeñan mejor que los controles por medio del uso de estrategias novedosas (Pearson et al. 1984). Además, los animales con lesión exhiben una motivación normal (Moy 1995; Pearson et al. 1984) incluyendo un desempeño normal en tareas de auto-



estimulación cerebral (Takeichi et al. 1986; Stellar et al. 1988). Estos estudios no proveyeron una hipótesis clara acerca de las alteraciones cognitivas que subyacen a los déficits de aprendizaje (Moy 1995), o que relacione los déficits de aprendizaje con la hiperactividad (Heffner & Seiden 1983; Pearson et al. 1984). Una deficiencia en el procesamiento de la prominencia, que resultaría en una reducción en el interés por explorar y por buscar información en ambientes complejos, muy probablemente afectaría muchos tipos de aprendizaje independientemente de los sustratos neurales requeridos para cada tarea específica.

La hiperactividad de los animales con lesión dopaminérgica neonatal toma la forma de diferentes comportamientos exploratorios locales adaptados a cada contexto (por ejemplo, exploración vertical, movimientos laterales de la cabeza, *head dippings* en los brazos abiertos de un laberinto en cruz elevado). Sin embargo, en ambientes complejos como el laberinto en Y, donde los roedores realizan rutinas de búsqueda muy especializadas, la distancia total recorrida es menor en los animales con lesión, lo que descarta una forma general de hiperactividad en este modelo. ***Proponemos que los animales con lesión neonatal tienen un déficit para realizar transiciones desde modos de exploración local a modos de búsqueda global.*** La decisión de iniciar una búsqueda está dirigida principalmente por la posibilidad de encontrar una fuente de recursos más rica en otras partes del ambiente y se piensa que depende de la codificación de la prominencia incentiva llevada a cabo por la dopamina y otros neuromoduladores (Berridge & Robinson 1998; Cohen et al. 2007; Adams et al. 2012). Probablemente, una deficiencia en atribuir prominencia a la información podría producir síntomas sólo en ambientes con alta

incerteza, donde las estrategias requeridas de exploración especializada serían reemplazadas por conductas exploratorias menos eficientes.

Es improbable que el síndrome comportamental inducido por la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas esté relacionado a una transmisión dopaminérgica deficiente durante el testeo comportamental. El bloqueo agudo de receptores dopaminérgicos en adultos induce acinesia y rigidez en lugar de un desbalance en la exploración y explotación. Por otra parte, los animales con lesión neonatal dopaminérgica son relativamente insensibles a antagonistas de receptores dopaminérgicos (Duncan et al. 1987). Finalmente, nuestros datos sugieren que la administración de psicoestimulantes no revierte el fenotipo de los adultos con lesión (ver figura R.6). Nuestros datos previos y los presentados en esta tesis indican que la lesión dopaminérgica neonatal resulta en una disminución de la conectividad prefrontoestriatal que se exagera con al edad y no puede ser reproducida por el bloqueo agudo de receptores para dopamina, sugiriendo un posible mecanismo para explicar el origen de las alteraciones conductuales observadas. De hecho, encontramos que algunas alteraciones conductuales emergen o se exageran en la adultez. Los adultos con lesión usan estrategias de búsqueda subóptimas en ambientes relativamente simples y muestran una alternación deficiente en el laberinto en Y, lo cual es indicativo de un déficit en la memoria de trabajo, y estos déficits no están presentes en los animales juveniles. Es importante destacar que, la conectividad prefrontoestriatal podría ser crucial para la memoria de trabajo y la toma de decisiones. Mientras que la corteza prefrontal contiene los mecanismos que mantienen la memoria de trabajo, los circuitos de los ganglios de la base podrían ser responsables de la actualización de esos contenidos (Chatham et al. 2014). Por otra parte, decisiones binarias como aquellas involucradas en conductas de *foraging*

podrían ser implementadas por un mecanismo estriatal de barrera (“*thresholding*”), donde la decisión ocurre cuando la actividad local supera cierto umbral (Hayden et al. 2011; Ding & Gold 2013). Entonces, proponemos que la persistencia y empeoramiento de algunos síntomas en los animales con lesión neonatal podrían resultar de alteraciones progresivas en las conexiones entre las áreas frontales asociativas y el estriado dorsomedial.

Desde una perspectiva *top down*, las alteraciones conductuales obtenidas en el modelo de lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas presentan cierto paralelismo con los síntomas presentes en pacientes con TDAH incluyendo hiperactividad dependiente del contexto y déficits en la memoria de trabajo, conductas sociales y aprendizaje. Por otra parte, los pacientes con TDAH presentan alteraciones en la conectividad funcional entre las cortezas frontales asociativas y el núcleo caudado, y una reducción en el volumen de este núcleo (Konrad & Simon B Eickhoff 2010; Liston et al. 2011). Sin embargo, no ha sido reportado que ocurra una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas en estos pacientes. En este sentido, la etiología del TDAH es muy poco conocida al igual que para otros desórdenes como el TS y el TOC, aunque se piensa que comparten mecanismos etiopatogénicos (Hyman 2010) y que estarían relacionados con alteraciones tempranas en el funcionamiento de los circuitos córticoestriatales y alteraciones en la función dopaminérgica (Graybiel 2008). En este sentido las aproximaciones de tipo *top down* presentan muchas limitaciones para el establecimiento de modelos animales de enfermedades neuropsiquiátricas como las mencionadas. Debido a esto, se ha destacado la importancia de modelar síntomas específicos o conjuntos de síntomas, en lugar de síndromes completos (Fernando & Robbins 2011). En este contexto, estudios de tipo *bottom up*, como el realizado en esta tesis, resultan ventajosos para entender las bases

biológicas asociadas a grupos de síntomas. Nuestros hallazgos sugieren que el TDAH y otras condiciones neuropsiquiátricas presumiblemente relacionadas con alteraciones tempranas del sistema dopaminérgico deberían ser evaluadas para determinar si presentan alteraciones en la toma de decisiones de *foraging*.

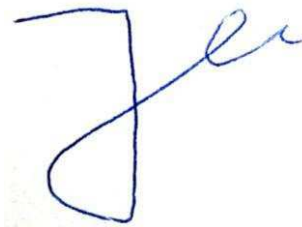
**En resumen, déficits en las decisiones de *foraging* y alteraciones en la conectividad frontoestriatal emergen como fenotipos intermedios para una función dopaminérgica deficiente durante etapas tempranas del desarrollo.**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Braz' with a stylized flourish.

Bárbara Braz

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'G. Murer' with a stylized flourish.

Gustavo Murer

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Juan Belforte' with a stylized flourish.

Juan Belforte

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Lesión dopaminérgica neonatal**

Para realizar la lesión dopaminérgica neonatal se utilizó la droga 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Esta droga es una toxina específica de neuronas catecolaminérgicas ya que es sustrato de los mecanismos de recaptación presinápticos de dopamina y noradrenalina. Dado que esta droga podría afectar también a las neuronas noradrenérgicas, para obtener una lesión específica de las neuronas dopaminérgicas se administró desipramina (DMI), un inhibidor de la recaptación de noradrenalina.

La implementación del modelo experimental fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Avale y colaboradores (2004a). Se utilizó la cepa exocriada de ratones CF1 proveniente del bioterio central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Las crías fueron obtenidas por exocria con apareos poligámicos. Los animales se mantuvieron en un bioterio con un ciclo de luz oscuridad 12:12, temperatura controlada (18 ~ 20°C) y acceso libre a agua y alimento, y el cuidado de los animales se realizó de acuerdo a regulaciones institucionales (IACUC, RS2964/2010, Universidad de Buenos Aires) y gubernamentales (SENASA, RS617/2002, Argentina).

La lesión fue realizada en el día postnatal 2 y se utilizaron sólo las crías macho (de aproximadamente 2 gramos de peso). Los animales recibieron una dosis subcutánea de 20 mg/kg de DMI y fueron colocados nuevamente en las jaulas con las madres. Después de media hora, se retiraron las crías y, luego de ser anestesiadas por frío en hielo triturado, se efectuaron bilateralmente dos inyecciones intraventriculares de vehículo (grupo control: ácido ascórbico

0,1%) o de una solución de 6-OHDA (grupo lesionado: 6-OHDA-HBr 12,5 µg/1,5 µl, MP Biomedicals). Los animales se asignaron al azar a los grupos control o lesionado.

Las inyecciones se realizaron bajo la lupa y se utilizó un dispositivo que consistió en una aguja 30 G (tipo Carpule) acoplada a una jeringa (Hamilton) cuyo émbolo es desplazado mediante una bomba de micro-infusión (Bee, Bioanalytical Systems) a una velocidad de 1,25 µl/min. Los sitios de inyección se determinaron a partir del *lamda* (1,5 mm anterior) y de la línea media (0,6 mm lateral) mediante una grilla milimetrada que fue colocada en uno de los oculares de la lupa y la aguja fue introducida de manera manual. Una vez finalizada la cirugía, los ratones se recuperaron de la anestesia en frío y fueron devueltos a las jaulas con las madres (más del 90 % de supervivencia). Las crías fueron destetadas alrededor del día postnatal 24 y se los ubicó en grupos de 4 a 6 animales por caja hasta el día de los experimentos electrofisiológicos o conductuales.

## **2. Test comportamentales**

Los animales con lesión de neuronas dopaminérgicas y sus respectivos controles fueron sometidos a una batería de test comportamentales entre los 30 y 50 días de vida (animales juveniles) o luego de alcanzar la adultez (entre las 12 y 30 semanas de vida). Todos los test comportamentales, excepto por el laberinto en forma de Y, fueron realizados durante la fase de luz. Todas las sesiones fueron grabadas a través de una cámara montada arriba de la arena (a menos que se indique lo contrario) y la posición del ratón fue determinada de forma automatizada mediante un software de rastreo automático (ANY-maze). Todos los animales

fueron movidos desde el bioterio hacia una habitación adyacente al cuarto de conducta una hora antes del testeo. Todos los hallazgos fueron confirmados en al menos dos cohortes separadas de animales. Todos los laberintos y cajas comportamentales se limpiaron cuidadosamente con alcohol 10 % entre sujetos y desinfectado al finalizar el día.

**Actividad locomotora en una arena abierta estándar.** La actividad locomotora horizontal fue evaluada en una arena abierta (40 cm x 40 cm) durante 30 minutos. Las mediciones utilizadas para evaluar la actividad locomotora incluyeron la distancia recorrida en la periferia y el centro. La arena fue colocada en el centro de una habitación (2 x 1.8 m) homogéneamente iluminada a 100 lux.

**Grooming y actividad vertical.** Estas conductas fueron evaluadas en una caja de acrílico pequeña (15 a 20 cm) con un espejo inclinado a 45° debajo del piso transparente, para permitir una vista detallada de la conducta del animal. Todas las sesiones fueron grabadas a través de una cámara montada en uno de los lados de la caja experimental y los videos fueron puntuados posteriormente por un observador ciego al tratamiento, mediante el programa Any-maze. Durante una primera etapa, la conducta fue evaluada en condiciones espontáneas durante 15 minutos. Durante una segunda etapa (también de 15 minutos de duración), la conducta de grooming fue inducida mediante la dos pulverizaciones de agua en el tronco del animal.

**Enterramiento de bolitas.** Cada animal fue transferido individualmente a una caja conteniendo 20 bolitas homogéneamente distribuidas sobre una capa de viruta limpia de aproximadamente 5 cm de espesor. Las bolitas enterradas fueron contadas cada 5 minutos a partir de las grabaciones (duración total: 20 minutos). Se consideró como enterrada a toda bolita cubierta con viruta en tres cuartas partes.

**Laberinto en cruz elevado.** Las conductas relacionadas con manifestaciones de ansiedad fueron evaluadas mediante un laberinto en cruz elevado que consta de dos brazos abiertos (30 x 6 x 0.3 cm) y dos brazos cerrados (30 x 6 x 15 cm) con paredes opacas, elevados 40 cm del piso. La duración total del test fue 5 minutos. El laberinto fue situado en el centro de una habitación homogéneamente iluminada (2 x 1.8; 100 lux). Al comienzo del testeo, cada animal fue colocado en el centro del laberinto con la cabeza orientada hacia el brazo abierto situado en dirección opuesta al investigador. Los *head dippings* (conducta exploratoria caracterizada por movimientos de la cabeza hacia afuera de los brazos abiertos) fueron contabilizados mediante el software Any-maze por un investigador ciego al tratamiento.

**Arena de gran tamaño.** La actividad locomotora fue evaluada en una arena circular de 1.25 m de diámetro durante 30 minutos. La arena fue colocada en el centro de una habitación homogéneamente iluminada a 100 lux. La posición de la cabeza y del centro del cuerpo del animal fue determinado mediante el software Any-maze, y se cuantificó la distancia recorrida en la periferia, en el centro y la distancia total. Además, evaluamos la distancia recorrida por la cabeza del animal relativa a la recorrida por el cuerpo, como índice de la actividad exploratoria local  $((\text{distancia}_{\text{cabeza}} - \text{distancia}_{\text{cuerpo}}) / \text{distancia}_{\text{cuerpo}})$ .

**Alternancia espontánea en un laberinto en forma de Y.** Se utilizó un laberinto hecho de plexiglass transparente con tres brazos del mismo tamaño (40 x 4.5 x 12 cm) separados por 120°. El laberinto fue cubierto con una tapa de acrílico transparente para prevenir escapes, y se ubicó en una habitación iluminada en forma difusa (5 lux) con claves visuales para permitir la orientación espacial. Cada animal fue colocado al final de uno de los brazos con la cabeza orientada hacia el centro del laberinto y se les permitió explorar el mismo durante 8 minutos.



Se determinó la posición del animal mediante el programa Any-maze y se cuantificaron las entradas a cada brazo. La conducta de alternancia fue definida como la entrada consecutiva a cada uno de los tres brazos del laberinto sin repetición (tripleto). Definimos como porcentaje de alternancia al número total de tripletes dividido por el número total de tripletes posibles (número total de entradas menos dos) por cien. Todos los experimentos fueron realizados durante el inicio de la fase de oscuridad (6:00 p.m. a 8:00 p.m.) para maximizar la conducta exploratoria.

**Conducta de acaparamiento.** Para evaluar directamente el balance entre exploración y explotación, adaptamos un test diseñado originalmente para analizar la conducta de acaparamiento (Deacon 2012) e incrementamos la carga exploratoria. Se utilizó un dispositivo compuesto por una caja central similar a la caja en la que los animales viven pero modificada para conectarse con dos tubos de malla metálica ubicados en direcciones opuestas (50 cm de largo y 5 cm de diámetro). Los animales fueron habituados de manera individual a la caja central sin los tubos 24 horas antes del testeo (los orificios fueron cubiertos con tapas), con libre acceso al agua y pellets de alimento. Al comienzo de la fase nocturna (6:00 p.m. a 7:00 p.m.), los pellets fueron removidos, las cajas fueron transferidas al cuarto de testeo (cuatro cajas por test) y se conectaron los tubos. A uno de los tubos se lo dejó vacío y el otro se llenó con 100 g de pellets. El test se realizó en oscuridad total y todas las sesiones fueron grabadas durante 14 horas bajo iluminación infrarroja. Al final de cada test, se pesó la comida remanente. A partir de los videos, se cuantificó el tiempo de permanencia y el número de entradas a cada tubo (utilizando el software Any-maze) durante la primer hora del test debido a que posteriormente ambos tubos se encuentran vacios para algunos de los animales control.

**Interacción social.** Este test se realizó en una caja experimental de tres compartimentos, uno central vacío (20 x 20 cm) que conecta con otros dos de igual tamaño que contienen una jaula pequeña y cilíndrica (8 cm de diámetro) en cual se colocó un ratón demostrador o un objeto. Un día antes del testeo, los animales fueron habituados a los tres compartimentos de la caja experimental durante 15 minutos. El día del testeo, los animales fueron restringidos a explorar el compartimento central por 5 minutos en cada etapa. Luego, se quitaron las divisiones y se permitió a los animales explorar la caja en su totalidad durante 15 minutos. En una primera etapa, se colocó un objeto en la jaula de un compartimento y un animal desconocido (ratón A) en la jaula del otro. Los animales tienen la tendencia natural a explorar el estímulo social por sobre un objeto novedoso. En una segunda etapa (novedad social), el objeto fue reemplazado por un animal nuevo (ratón B). Los animales tienden a explorar en mayor medida el animal nuevo (ratón B) por sobre el que conocieron en la etapa previa (ratón A). La conducta de exploración dirigida hacia el demostrador u objeto fue cuantificada a partir de la observación de los videos por un experimentador ciego al tratamiento utilizando el programa Any-maze. Los animales demostradores (machos de la cepa 129Sv/Ev de 3-5 meses de edad) fueron exhaustivamente habituados a las jaulas en forma previa al testeo.

**Test de construcción del nido.** Cada animal fue transferido individualmente a una jaula conteniendo viruta limpia durante 8 horas aproximadamente, y 1 hora antes del principio de la fase oscura se colocó un cuadrado de algodón prensado (2.8 g Ancare, Bellmore, NY). A la mañana siguiente, se pesaron los restos del algodón provisto (de más de 0.1 g).

**Efecto de la anfetamina sobre las conductas de grooming, actividad vertical y el enterramiento de bolitas.** Ocho animales control y ocho con lesión neonatal fueron utilizados

para cada test. Diez minutos antes del test, la mitad de los animales controles y de los animales con lesión fueron inyectados con solución salina y la otra mitad con anfetamina (4 mg/kg). La dosis de anfetamina utilizada no tuvo efecto sobre la actividad horizontal en una arena abierta (datos no mostrados) o en una arena pequeña utilizada para medir la conducta de grooming y la actividad vertical. Una semana después, los animales fueron retesteados pero aquellos que recibieron solución salina fueron inyectados con anfetamina y viceversa (diseño de cuadrado latino).

### **3. Experimentos electrofisiológicos**

Todos los registros electrofisiológicos se realizaron bajo anestesia con uretano (1,2 g/kg intraperitoneal). Se inyectó de forma subcutánea un anestésico local en la zona superior de la cabeza (0,05 ml de clorhidrato de bupicaína 0,5% s.c.) y se administró otro anestésico local (clorhidrato de lidocaína 2% en gel) en el canal auditivo del animal. Aproximadamente 20-30 minutos después se colocó al ratón en un marco estereotáxico y se utilizó una manta térmica controlada por retroalimentación (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá) para regular la temperatura corporal del ratón alrededor de los 37°C. Durante el experimento, el nivel de anestesia se verificó testeando el reflejo nociceptivo de retirada del miembro trasero y la visualización del electrocorticograma de la corteza prefrontal, y para mantener el animal en un plano de anestesia regular se administraron dosis suplementarias de uretano (aproximadamente 0,3 g/kg subcutáneo cada 2-3 horas).

## **Estimulación eléctrica cortical y electrocorticograma**

En todos los experimentos, se utilizó un macroelectrodo bipolar concéntrico (SNE-100, Better Hospital Equipment, EEUU; diámetro del contacto externo 0,25 mm, diámetro del contacto interno 0,1 mm, separación entre contactos 0,75 mm, exposición de cada contacto 0,25 mm) para estimular eléctricamente la corteza medial prefrontal (2 mm anterior al bregma, 0,5 lateral y 2,1 ventral; Franklin y Paxinos, 2001). Para estudiar las respuestas estriatales evocadas por estimulación de diferentes áreas corticales (ver figura R.11), colocamos electrodos de estimulación adicionales (todos en la misma posición anteroposterior: 2.0 mm anterior a bregma) en las cortezas cingular (0.8 mm lateral, 1.2 mm ventral) y motora primaria (1.6 mm lateral, 1.1 mm ventral). Pulsos constantes de corriente (0.3 ms de duración a 0.1 Hz, 100-700 mA, 20 pulsos a cada intensidad; Iso-flex y Master 8, AMPI, Jerusalem, Israel) fueron aplicados para estudiar la conectividad sináptica corticoestriatal a través del análisis de los potenciales de campo estriatal evocados (figura R.8 y R.9) y la actividad multiunitaria de potenciales de acción (Figura R.10). Para estudiar la LTD corticoestriatal analizamos la amplitud de la respuesta de campo (pulsos de 0.3 ms de duración a 0.1 Hz y 350  $\mu$ A) antes y después de dos inducciones de estimulación de alta frecuencia (figura R.8; en cada inducción se aplicaron cuatro trenes de 1 s de duración a 100 Hz separados 10 s entre sí; 700  $\mu$ A).

El electrocorticograma se registró mediante un macroelectrodo de las mismas características que los utilizados para la estimulación eléctrica, situado en algunos experimentos en la región motora de la corteza frontal (2 mm anterior a bregma, 1.6 mm lateral, 1.1 mm ventral) o en la corteza somatosensorial primaria (2 mm anterior a bregma, 2 mm lateral, 2 mm ventral). La señal de este electrodo (ver figura M.1) permitió obtener un registro diferencial de la actividad

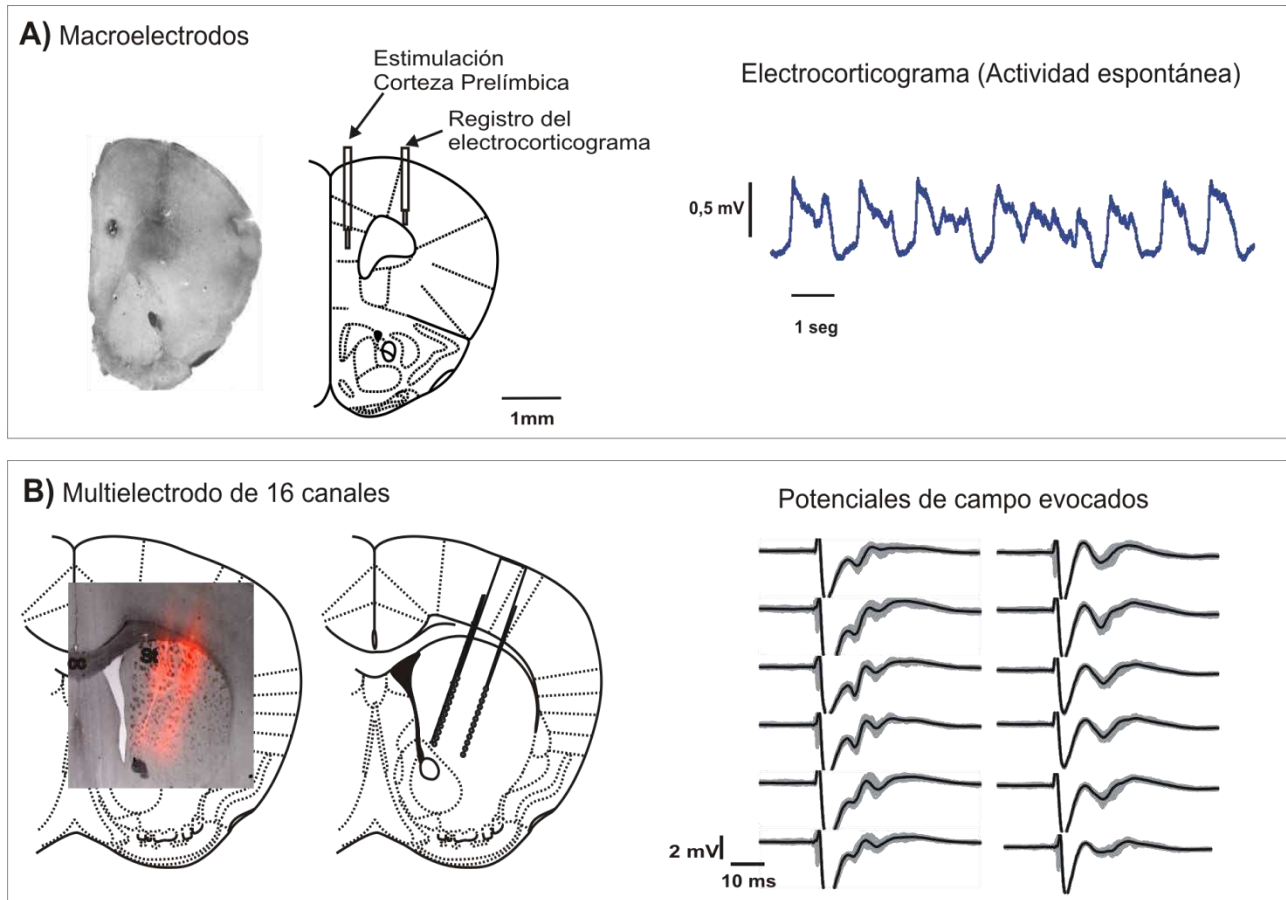
de campo cortical (ECoG. Filtros: 0,1-300 Hz; amplificador: Lab1, Akonic, Buenos Aires, Argentina).

### **Potenciales de campo estriatal evocados**

Simultáneamente con el electrocorticograma, realizamos registros de la actividad electrofisiológica extracelular con un multielectrodo de 24 canales distribuidos en dos patas separadas entre sí por 500  $\mu\text{m}$  con 12 contactos cada una y con una separación vertical entre contactos de 100  $\mu\text{m}$  (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI). Este electrodo fue implantado en la región dorsomedial de la porción rostral del estriado (ángulo de 20° en el plano coronal, 0,6 ~ 0,9 mm anterior al bregma, 2,2-2,7 mm lateral y 3-3,4 mm ventral). El área (400  $\mu\text{m}^2$ ) y la impedancia de los contactos (alrededor de 0,8 M $\Omega$ ) del multielectrodo permite registrar el potencial de campo local estriatal con suficiente estabilidad para realizar registros de varias horas.

Registramos potenciales de campo evocados debido a que son muy estables en el tiempo y a que evidencias de nuestro laboratorio sugieren un origen local de los mismos y que su amplitud refleja la transmisión sináptica corticoestriatal (Galiñanes et al. 2011). Las respuestas estriatales de campo evocadas por estimulación de la corteza prelímbica se reducen hasta un 90 % por infusión de CNQX (antagonista de receptores AMPA) cerca del electrodo de registro. La amplitud de las respuestas de campo local y los potenciales post sinápticos despolarizantes (*depolarizing post synaptic potentials*, dPSPs) registrados en las NEM se incrementan en paralelo al incrementarse la corriente de estimulación (Galiñanes et al. 2011). Por otra parte, la amplitud de las respuestas de campo evocadas correlacionan con la magnitud de la actividad multiunitaria de potenciales de acción (Galiñanes et al. 2011). Finalmente, las respuestas

estriatales evocadas muestran muchas de las propiedades básicas conocidas de la transmisión corticoestriatal, incluyendo facilitación por pulsos pareados, incremento luego del bloqueo local de receptores GABA, organización topográfica y plasticidad de largo término.



**Figura M.1: Verificación histológica y trazos representativos de los registros electrofisiológicos.** A) y B): A la izquierda se muestran microfotografías de cortes coronales donde se pueden observar las marcas de los electrodos sobre el tejido, y a la derecha se muestran esquemas del atlas de ratón representativos de los sitios de registro de interés. Se muestran trazos representativos de la actividad electrofisiológica registrada.

En los experimentos diseñados para estudiar la respuesta estriatal a la estimulación de distintas áreas corticales (ver figura R.11) utilizamos un multielectrodo de cuatro patas con 8 contactos

en cada una (200  $\mu\text{m}$  separación entre contactos, 400  $\mu\text{m}$  de separación entre patas; NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI), el cual nos permitió incrementar el área estriatal mapeada. El multielectrodo fue implantado en el estriado dorsal con un ángulo de 20° respecto del eje medio-lateral (pata más medial: 1.0 mm anterior a bregma, 1.5 mm lateral, 3.7 ventral; pata más lateral: 0.6 anterior a bregma, 2.8 mm lateral, 3.7 mm ventral). La señal proveniente de los multielectrodos fue referenciada a un tornillo implantado en el hueso occipital, amplificada, filtrada y digitalizada (10 kHz). La señal fue filtrada en dos bandas: banda pasa bajos (5-300 Hz) y banda pasa altos (300-3000 Hz) para obtener, respectivamente, actividad de potencial de campo estriatal y actividad multiunitaria de potenciales de acción, ambas derivadas de un mismo contacto de registro.

#### **Análisis de los datos.**

Los potenciales estriatales evocados fueron analizados con rutinas de Matlab hechas personalmente. La estimulación a la corteza prefrontal medial resulta en una respuesta de potencial de campo estriatal cuya forma es positiva-negativa-positiva (P1-N2-P2) (Galiñanes et al. 2011). La amplitud de la respuesta evocada fue determinada mediante la diferencia de voltaje entre el valle N2 y el pico P2 (ver figura R.8A). Para medir la amplitud de los potenciales evocados, la señal registrada fue filtrada digitalmente (*8 pole butterworth filter*, línea de corte pasa-bajos en 300 Hz). Para cada trial individual el voltaje y la latencia de los puntos N2 y P2 fueron determinados semiautomáticamente mediante la detección respectiva del mínimo y máximo local del potencial de campo evocado. Para cuantificar la respuesta de los potenciales de acción (ver figura R.10), los trials fueron rectificadas, suavizados y promediados, permitiendo la computación del área y la latencia del pico de la respuesta multiunitaria de

potenciales de acción (Galiñanes et al. 2011). Las curvas estímulo respuesta (figuras R.9 y R.10) fueron construidas realizando el promedio de la señal registrada en los canales contenidos en círculo mostrado en la figura R.9B-C. Las curvas espaciales de las amplitudes de respuesta evocada por estimulación de distintas áreas corticales (figura R11) fueron construidas alineando las respuestas obtenidas en distintos animales respecto del sitio de máxima respuesta en cada shank del multielectrodo.

#### **4. Llenado intracelular con lucifer yellow y determinación de la estructura dendrítica de las neuronas de proyección estriatales.**

Realizamos reconstrucciones morfológicas de NEM de la vías directa e indirecta utilizando animales doble transgénicos *Drd1a*-tomato y *Drd2*-eGFP (Suárez et al. 2014). En el segundo día postnatal los animales recibieron inyecciones de 6-OHDA o vehículo como se detalló anteriormente. La confirmación del doble genotipo fue realizada utilizando PCR en PD21-24. En la semana 12, los animales fueron perfundidos y utilizando un vibrátomo se realizaron rodajas coronales de tejido de 200  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$  de grosor, alternadamente de desde Bregma +1.2 a +0.2. Las rodajas de 200 $\mu\text{m}$  fueron utilizadas para llenado intracelular de NEM. Los cuerpos celulares de las NEM fueron visualizados a 10x. En cada slice, las neuronas de la vía directa (dNEM, positivas para tomato) de un hemisferio y las neuronas de la vía indirecta del otro (iNEM, positivas para EGFP) se llenaron iontoforéticamente con una solución de Lucifer Yellow al 8% (LY; Sigma, L0259; en TB 0.05%) utilizando corriente hiperpolarizante (corriente continua, 10-20  $\mu\text{A}$ , por 10-12 minutos). La separación entre NEM inyectadas fue de 400  $\mu\text{m}$



aproximadamente para prevenir la superposición de los árboles dendríticos (ver figura R.13B). Los cuerpos celulares inyectados estuvieron situados a una profundidad de 10-12  $\mu\text{m}$  de la superficie de la rodaja. Luego de las inyecciones, el LY fue detectado utilizando inmunohistoquímica colorimétrica (ver siguiente sección) permitiendo la reconstrucción morfológica del árbol dendrítico utilizando microscopía de luz transmitida. A este punto, las dNEM e iNEM son indistinguibles entre sí y por ello utilizamos la posición en uno u otro hemisferio para diferenciarlas (los hemisferios fueron contrabalanceados). Los árboles dendríticos fueron dibujados en dos dimensiones a un aumento de 100x utilizando el software Mercator, y el largo dendrítico total, el área del soma y los puntos de ramificación fueron determinados. Las espinas dendríticas se contaron en segmentos del árbol dendrítico de ~50-100  $\mu\text{m}$  de longitud localizados preferencialmente en dendritas de tercer a quinto orden. En algunos casos, las NEM tuvieron pocas ramificaciones (particularmente en los animales con lesión) por lo cual empleamos dendritas de segundo orden. El análisis de Sholl (número de dendritas que intersecan círculos concéntricos alrededor del soma distanciados entre sí por 15  $\mu\text{m}$ ) fue realizado mediante una reconstrucción en dos dimensiones del árbol dendrítico utilizando Fiji ImageJ.

## **5. Histología e inmunohistoquímica.**

Al final de cada experimento, los animales recibieron una dosis letal de uretano y fueron perfundidos transcardíacamente con 10 ml de solución salina salina fría con heparina al 0.04% (Heparina sódica, Laboratorios Duncan, 5000 UI/ml) seguido de 20 ml de paraformaldehído

(PFA) al 4% en PBS 0.1 M (excepto para los experimentos de llenado intracelular con LY en los que utilizamos 80 ml de solución de PFA). Los cerebros fueron removidos, y sumergidos toda la noche en la misma solución de PFA posteriormente se colocaron en una solución de sacarosa al 30% (en PBS 0.1 M) a 4°C por 24-72 h. Secciones coronales de 30  $\mu$ m fueron cortadas con un micrótopo de congelación para la identificación de la posición de los electrodos de registro y estimulación y para la verificación de la lesión de neuronas dopaminérgicas mediante inmunohistoquímica contra la enzima tirosina hidroxilasa (Galiñanes et al. 2009). La cuantificación de la lesión fue realizada de acuerdo a Galiñanes et. al., 2009.

La localización de los electrodos de estimulación fue realizada mediante la examinación visual del daño mecánico ocasionado por los mismos utilizando un microscopio de luz transmitida a baja magnificación. En orden de determinar la localización de los sitios de registro estriatal, antes de cada experimento electrofisiológico el multielectrodo fue sumergido en una solución del colorante fluorescente 1,19-dioctadecil-3,3,39,39-tetrametilindocarbocianina perclorato (Dil; 100 mg/ml en acetona; Molecular Probes) y se dejó secar por 30 minutos antes de utilizar. Este colorante permite determinar la posición del multielectrodo mediante la detección del material fluorescente depositado en el tejido (figura R.8A). En todos los casos, las secciones de interés fueron microfotografiadas para la posterior reconstrucción de la posición final de los sitios de registro (ver figura R.9B-C).

Luego de las inyecciones de LY, cada rodaja de tejido de 200  $\mu$ m fue incubada individualmente con una solución de anticuerpo anti-LY durante 5-7 días a 4°C (1:100000; en PBS 0.1 M, sacarosa 5%, BSA 2% y tritón-X100 10%;(Elston et al. 2001)) y luego se utilizó un protocolo

estándar con avidina-biotina. Finalmente, las secciones fueron montadas en una solución conteniendo PB 0.1 M, glicerol 50% y azida de sodio 0.01 M, y se conservaron a 4°C.

## **6. Análisis estadístico**

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Sigmaplot 11.0. Los tests estadísticos empleados se detallan en el epígrafe de cada una de las figuras. Los contrastes post hoc para los ANOVA de dos vías y ANOVA de dos vías de medidas repetidas se realizaron luego de una interacción significativa.

## REFERENCIAS

- Adams, G.K. et al., 2012. Neuroethology of decision-making. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(6), pp.982–989. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2012.07.009>.
- Ade, K.K. & Lovinger, D.M., 2007. Anandamide regulates postnatal development of long-term synaptic plasticity in the rat dorsolateral striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(9), pp.2403–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329438> [Accessed December 28, 2015].
- Adermark, L. & Lovinger, D.M., 2007. Combined activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission is sufficient to induce striatal long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(25), pp.6781–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581965> [Accessed December 22, 2015].
- Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, 12(10), pp.366–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2479133> [Accessed June 24, 2015].
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D. & DeLong, M.R., 1990. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. *Progress in brain research*, 85, pp.119–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2094891> [Accessed July 8, 2015].
- Archer, T. et al., 1988. Neonatal 6-hydroxydopamine-induced dopamine depletions: motor activity and performance in maze learning. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 31(2), pp.357–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3149743> [Accessed January 5, 2016].
- Archer, T., Palomo, T. & Fredriksson, A., 2002. Functional deficits following neonatal dopamine depletion and isolation housing: circular water maze acquisition under pre-exposure conditions and motor activity. *Neurotoxicity research*, 4(5-6), pp.503–522. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12754163> [Accessed February 1, 2016].
- Arnsten, A.F.T., 2011. Catecholamine Influences on Dorsolateral Prefrontal Cortical Networks. *Biological Psychiatry*, 69(12), pp.e89–e99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3145207&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed January 8, 2016].
- Atwood, B.K., Kupferschmidt, D. a & Lovinger, D.M., 2014. Opioids induce dissociable forms of long-term depression of excitatory inputs to the dorsal striatum. *Nature neuroscience*, 17(4), pp.540–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561996>.

- Avale, M.E. et al., 2004. Elevated serotonin is involved in hyperactivity but not in the paradoxical effect of amphetamine in mice neonatally lesioned with 6-hydroxydopamine. *Journal of Neuroscience Research*, 78(2), pp.289–296.
- Avale, M.E. et al., 2004. The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Molecular psychiatry*, 9(7), pp.718–726.
- Barkley, R.A., 1997. Attention-deficit/hyperactivity disorder, self-regulation, and time: toward a more comprehensive theory. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*, 18(4), pp.271–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276836> [Accessed February 1, 2016].
- Belin, D. & Everitt, B.J., 2008. Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron*, 57(3), pp.432–41. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089662730701032X> [Accessed September 14, 2015].
- Berger, T.W. et al., 1985. Hyperinnervation of the striatum by dorsal raphe afferents after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats. *Brain research*, 336(2), pp.354–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3924346> [Accessed January 5, 2016].
- Bergstrom, B.P. et al., 2011. Functional reorganization of the presynaptic dopaminergic terminal in parkinsonism. *Neuroscience*, 193, pp.310–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3171576&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed January 31, 2016].
- Berridge, K.C., 2013. Computation of Reward Motivation. , 35(7), pp.1124–1143.
- Berridge, K.C. & Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research. Brain research reviews*, 28(3), pp.309–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858756> [Accessed September 28, 2015].
- Berridge, K.C., Venier, I.L. & Robinson, T.E., 1989. Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behavioral neuroscience*, 103(1), pp.36–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2493791> [Accessed December 18, 2015].
- Bevan, M.D. et al., 1998. Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(22), pp.9438–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801382> [Accessed January 15, 2016].

- Biederman, J. & Faraone, S. V., 2005. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*, 366(9481), pp.237–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023516> [Accessed February 22, 2015].
- Bolam, J.P. et al., 1993. Convergence of synaptic terminals from the striatum and the globus pallidus onto single neurones in the substantia nigra and the entopeduncular nucleus. *Progress in brain research*, 99, pp.73–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509081> [Accessed January 15, 2016].
- Bolam, J.P. et al., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy*, 196 ( Pt 4, pp.527–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1468095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2015].
- Bracci, E. et al., 2002. Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *Journal of neurophysiology*, 87(4), pp.2190–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929936> [Accessed January 13, 2016].
- Breese, G.R. et al., 2005. The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: A model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Research Reviews*, 48(1), pp.57–73.
- Breese, G.R. & Traylor, T.D., 1972. Developmental characteristics of brain catecholamines and tyrosine hydroxylase in the rat: effects of 6-hydroxydopamine. *British journal of pharmacology*, 44(2), pp.210–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1666100&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 5, 2016].
- Broaddus, W.C. & Bennett, J.P., 1990. Postnatal development of striatal dopamine function. I. An examination of D1 and D2 receptors, adenylate cyclase regulation and presynaptic dopamine markers. *Brain research. Developmental brain research*, 52(1-2), pp.265–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2331795> [Accessed February 1, 2016].
- Bromberg-Martin, E.S. & Hikosaka, O., 2009. Midbrain dopamine neurons signal preference for advance information about upcoming rewards. *Neuron*, 63(1), pp.119–26. Available at: <http://www.mendeley.com/catalog/midbrain-dopamine-neurons-signal-preference-advance-information-about-upcoming-rewards/> [Accessed June 25, 2015].
- Bruun, R.D. & Budman, C.L., 1992. The natural history of Tourette syndrome. *Advances in neurology*, 58, pp.1–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1414612> [Accessed January 5, 2016].
- Burguière, E. et al., 2013. Optogenetic stimulation of lateral orbitofronto-striatal pathway suppresses compulsive behaviors. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6137), pp.1243–6. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3876800&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed October 29, 2015].

Butler, A.K., Uryu, K. & Chesselet, M.F., 1998. A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *Developmental neuroscience*, 20(2-3), pp.253–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9691199> [Accessed December 28, 2015].

Calabresi, P. et al., 2000. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(22), pp.8443–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069952> [Accessed December 23, 2015].

Calabresi, P. et al., 1992. Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *The European journal of neuroscience*, 4(10), pp.929–935. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106428> [Accessed December 23, 2015].

Calabresi, P. et al., 1992. Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(11), pp.4224–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1359031> [Accessed December 22, 2015].

Carter, A.G. & Sabatini, B.L., 2004. State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*, 44(3), pp.483–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504328> [Accessed November 11, 2015].

Castellanos, F.X. et al., 1996. Brain morphometry in Tourette's syndrome: the influence of comorbid attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurology*, 47(6), pp.1581–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8960751> [Accessed January 5, 2016].

Castellanos, F.X., 2002. Developmental Trajectories of Brain Volume Abnormalities in Children and Adolescents With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *JAMA*, 288(14), p.1740. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=195386> [Accessed November 3, 2015].

Castellanos, F.X. & Tannock, R., 2002. Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(8), pp.617–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154363> [Accessed April 4, 2015].

- Centonze, D. et al., 1999. Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP. *Journal of neurophysiology*, 82(6), pp.3575–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601483> [Accessed December 23, 2015].
- Charpier, S. & Deniau, J.M., 1997. In vivo activity-dependent plasticity at cortico-striatal connections: evidence for physiological long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), pp.7036–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 23, 2015].
- Chatham, C.H., Frank, M.J. & Badre, D., 2014. Corticostriatal output gating during selection from working memory. *Neuron*, 81(4), pp.930–942. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.002>.
- Chen, M. et al., 2011. Sapap3 Deletion Anomalously Activates Short-Term Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience*, 31(26), pp.9563–9573. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715621> [Accessed February 1, 2016].
- Choi, S. & Lovinger, D.M., 1997. Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), pp.2665–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2015].
- Cohen, J.D., McClure, S.M. & Yu, A.J., 2007. Should I stay or should I go? How the human brain manages the trade-off between exploitation and exploration. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1481), pp.933–942.
- Comings, D.E. & Comings, B.G., 1987. Tourette's syndrome and attention deficit disorder with hyperactivity. *Archives of general psychiatry*, 44(11), pp.1023–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3479057> [Accessed January 5, 2016].
- D'Aquila, P.S., Brain, P. & Willner, P., 1994. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & behavior*, 56(5), pp.861–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7824585> [Accessed February 1, 2016].
- Davids, E. et al., 2003. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. , 42, pp.1–21.
- Daw, N.D. et al., 2006. Cortical substrates for exploratory decisions in humans. *Nature*, 441(7095), pp.876–9. Available at:



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2635947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 30, 2015].

Day, M. et al., 2008. Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(45), pp.11603–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3235729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 7, 2016].

Deacon, R., 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (59), p.e2607. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3369766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 9, 2015].

DeCoteau, W.E. et al., 2007. Oscillations of local field potentials in the rat dorsal striatum during spontaneous and instructed behaviors. *Journal of neurophysiology*, 97(5), pp.3800–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329629> [Accessed November 28, 2015].

Deutch, A.Y., Colbran, R.J. & Winder, D.J., 2007. Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism & related disorders*, 13 Suppl 3, pp.S251–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18267246> [Accessed January 7, 2016].

Ding, L. & Gold, J.I., 2013. The Basal Ganglia's Contributions to Perceptual Decision Making. *Neuron*, 79(4), pp.640–649. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3771079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 18, 2015].

Dreyer, J.K., 2014. Three mechanisms by which striatal denervation causes breakdown of dopamine signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(37), pp.12444–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209283> [Accessed January 31, 2016].

Duncan, G.E. et al., 1987. Behavioral and neurochemical responses to haloperidol and SCH-23390 in rats treated neonatally or as adults with 6-hydroxydopamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 243(3), pp.1027–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3121842> [Accessed January 8, 2016].

Durston, S. et al., 2005. Differential effects of DRD4 and DAT1 genotype on fronto-striatal gray matter volumes in a sample of subjects with attention deficit hyperactivity disorder, their unaffected siblings, and controls. *Molecular psychiatry*, 10(7), pp.678–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15724142> [Accessed December 2, 2015].

- Elston, G.N., Benavides-Piccione, R. & DeFelipe, J., 2001. The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), p.RC163. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511694> [Accessed January 11, 2016].
- Everitt, B.J. & Robbins, T.W., 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience*, 8(11), pp.1481–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nn1579> [Accessed July 10, 2014].
- Fasano, C. et al., 2013. Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spiny neurons through both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology*, 67, pp.432–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231809> [Accessed January 7, 2016].
- Fernando, a B.P. & Robbins, T.W., 2011. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Annual review of clinical psychology*, 7, pp.39–61.
- Flaherty, A.W. & Graybiel, A.M., 1994. Input-output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(2), pp.599–610. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507981> [Accessed October 21, 2015].
- Foltin, R.W., 2001. Effects of amphetamine, dexfenfluramine, diazepam, and other pharmacological and dietary manipulations on food “seeking” and “taking” behavior in non-human primates. *Psychopharmacology*, 158(1), pp.28–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685381> [Accessed December 10, 2015].
- François, C. et al., 1994. Topographic distribution of the axonal endings from the sensorimotor and associative striatum in the macaque pallidum and substantia nigra. *Experimental brain research*, 102(2), pp.305–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705508> [Accessed October 20, 2015].
- Galiñanes, G.L., Braz, B.Y. & Murer, M.G., 2011. Origin and properties of striatal local field potential responses to cortical stimulation: Temporal regulation by fast inhibitory connections. *PLoS ONE*, 6(12).
- Galiñanes, G.L., Taravini, I.R.E. & Murer, M.G., 2009. Dopamine-dependent periadolescent maturation of corticostriatal functional connectivity in mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(8), pp.2496–2509.
- Gerfen, C.R. et al., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4986), pp.1429–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147780> [Accessed September 20, 2015].

- Giuffrida, A. et al., 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature neuroscience*, 2(4), pp.358–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204543> [Accessed December 3, 2015].
- Gottesman, I.I. & Gould, T.D., 2003. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American journal of psychiatry*, 160(4), pp.636–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668349> [Accessed January 2, 2015].
- Graybiel, A.M., 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annual review of neuroscience*, 31, pp.359–387.
- Haber, S.N. et al., 1986. Gilles de la Tourette’s syndrome. A postmortem neuropathological and immunohistochemical study. *Journal of the neurological sciences*, 75(2), pp.225–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2428943> [Accessed January 5, 2016].
- Haber, S.N. et al., 2006. Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(32), pp.8368–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899732> [Accessed October 21, 2015].
- Haber, S.N., Fudge, J.L. & McFarland, N.R., 2000. Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(6), pp.2369–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704511> [Accessed September 7, 2015].
- Haber, S.N. & Knutson, B., 2010. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), pp.4–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3055449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 10, 2014].
- Hata, T. et al., 2001. Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. *Japanese journal of pharmacology*, 85(2), pp.189–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286402> [Accessed February 1, 2016].
- Hattori, T. & McGeer, P.L., 1973. Synaptogenesis in the corpus striatum of infant rat. *Experimental neurology*, 38(1), pp.70–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4120090> [Accessed December 28, 2015].
- Hawes, S.L. et al., 2015. Multimodal Plasticity in Dorsal Striatum While Learning a Lateralized Navigation Task. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

- Neuroscience*, 35(29), pp.10535–49. Available at:  
<http://www.jneurosci.org/content/35/29/10535.long> [Accessed February 1, 2016].
- Hawes, S.L. et al., 2013. Sensitivity to theta-burst timing permits LTP in dorsal striatal adult brain slice. *Journal of neurophysiology*, 110(9), pp.2027–36. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4073966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 23, 2015].
- Hayden, B.Y., Pearson, J.M. & Platt, M.L., 2011. Neuronal basis of sequential foraging decisions in a patchy environment. *Nature neuroscience*, 14(7), pp.933–939. Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2856>.
- Heffner, T.G. & Seiden, L.S., 1983. Impaired acquisition of an operant response in young rats depleted of brain dopamine in neonatal life. *Psychopharmacology*, 79(2-3), pp.115–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6405418> [Accessed January 8, 2016].
- Heifets, B.D. & Castillo, P.E., 2009. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology*, 71, pp.283–306. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4454279&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 23, 2015].
- Hernandez-Lopez, S. et al., 2000. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC[ $\beta$ 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(24), pp.8987–95. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124974> [Accessed November 12, 2015].
- Hernández-López, S. et al., 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(9), pp.3334–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096166> [Accessed November 11, 2015].
- Hyman, S.E., 2010. The diagnosis of mental disorders: the problem of reification. *Annual review of clinical psychology*, 6, pp.155–179.
- Ikemoto, S., 2007. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain research reviews*, 56(1), pp.27–78. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2134972&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 22, 2015].
- Jia, Y., Gall, C.M. & Lynch, G., 2010. Presynaptic BDNF promotes postsynaptic long-term potentiation in the dorsal striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the*

*Society for Neuroscience*, 30(43), pp.14440–5. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2972744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 23, 2015].

Kasanetz, F. et al., 2008. Functional integration across a gradient of corticostriatal channels controls UP state transitions in the dorsal striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(23), pp.8124–9. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2430370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 7, 2016].

Kasanetz, F., Riquelme, L.A. & Murer, M.G., 2002. Disruption of the two-state membrane potential of striatal neurones during cortical desynchronisation in anaesthetised rats. *The Journal of physiology*, 543(Pt 2), pp.577–89. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2290508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 15, 2016].

Kataoka, Y. et al., 2010. Decreased number of parvalbumin and cholinergic interneurons in the striatum of individuals with Tourette syndrome. *The Journal of comparative neurology*, 518(3), pp.277–91. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2846837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 18, 2016].

Kerr, J.N. & Wickens, J.R., 2001. Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. *Journal of neurophysiology*, 85(1), pp.117–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152712> [Accessed December 23, 2015].

Klein, R.G. et al., 2012. Clinical and Functional Outcome of Childhood ADHD 33 Years Later. *Arch Gen Psychiatry*, 69(12), pp.1295–1303.

Kolling, N. et al., 2012. Neural Mechanisms of Foraging. *Science*, 336(6077), pp.95–98.

Konrad, K. & Eickhoff, S.B., 2010. Is the ADHD brain wired differently? A review on structural and functional connectivity in attention deficit hyperactivity disorder. *Human Brain Mapping*, 31(6), pp.904–916.

Konrad, K. & Eickhoff, S.B., 2010. Is the ADHD brain wired differently? A review on structural and functional connectivity in attention deficit hyperactivity disorder. *Human brain mapping*, 31(6), pp.904–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20496381> [Accessed September 2, 2015].

Kostrzewa, R.M. et al., 2006. Proposed animal model of severe Parkinson's disease: neonatal 6-hydroxydopamine lesion of dopaminergic innervation of striatum. *Journal of neural*

- transmission. Supplementum*, (70), pp.277–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017542> [Accessed February 1, 2016].
- Kozorovitskiy, Y. et al., 2012. Corrigendum: Recurrent network activity drives striatal synaptogenesis. *Nature*, 489(7415), pp.326–326.
- Kozorovitskiy, Y. et al., 2015. Neuromodulation of excitatory synaptogenesis in striatal development. *eLife*, 4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551563> [Accessed November 16, 2015].
- Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C., 2005. Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(45), pp.10537–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280591> [Accessed November 11, 2015].
- Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C., 2007. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature*, 445(7128), pp.643–647. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287809> [Accessed October 12, 2015].
- Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C., 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), pp.543–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2724179&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed June 9, 2015].
- Kvitsiani, D. et al., 2013. Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature*, 498(7454), pp.363–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4349584&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed January 31, 2016].
- Levine, T.E. et al., 1980. Effects of neonatal and adult 6-hydroxydopamine treatment on random-interval behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 12(2), pp.281–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7375490> [Accessed January 8, 2016].
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), pp.180–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110839> [Accessed December 8, 2015].
- Liston, C. et al., 2011. Atypical prefrontal connectivity in attention-deficit/hyperactivity disorder: Pathway to disease or pathological end point? *Biological Psychiatry*, 69(12), pp.1168–1177. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.03.022>.

- Ljungberg, T., Apicella, P. & Schultz, W., 1992. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *Journal of neurophysiology*, 67(1), pp.145–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1552316> [Accessed November 28, 2015].
- López de Maturana, R. & Sánchez-Pernaute, R., 2010. Regulation of corticostriatal synaptic plasticity by G protein-coupled receptors. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9(5), pp.601–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20632967> [Accessed December 22, 2015].
- Lovinger, D.M., 2010. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology*, 58(7), pp.951–961. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849868&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed October 22, 2015].
- Lovinger, D.M., Tyler, E.C. & Merritt, A., 1993. Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *Journal of neurophysiology*, 70(5), pp.1937–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7905031> [Accessed December 22, 2015].
- Luthman, J. et al., 1997. Functional changes induced by neonatal cerebral 6-hydroxydopamine treatment: Effects of dose levels on behavioral parameters. *Behavioural Brain Research*, 82(2), pp.213–221.
- Mahon, S. et al., 2006. Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(48), pp.12587–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135420> [Accessed November 11, 2015].
- Mahon, S., Deniau, J.M. & Charpier, S., 2001. Relationship between EEG potentials and intracellular activity of striatal and cortico-striatal neurons: an in vivo study under different anesthetics. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 11(4), pp.360–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278199> [Accessed November 11, 2015].
- Mailly, P. et al., 2013. The rat prefrontostriatal system analyzed in 3D: evidence for multiple interacting functional units. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(13), pp.5718–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536085> [Accessed January 7, 2016].
- Mathur, B.N. et al., 2011. Serotonin induces long-term depression at corticostriatal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(20), pp.7402–11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3113491&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed December 23, 2015].

- Miller, F.E. et al., 1981. Magnitude and duration of hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine is related to the extent of brain dopamine depletion. *Brain Research*, 229(1), pp.123–132.
- Montague, P.R., Hyman, S.E. & Cohen, J.D., 2004. Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature*, 431(7010), pp.760–767. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15483596> [Accessed February 17, 2015].
- Moy, S.S., 1995. Impaired acquisition and operant responding after neonatal dopamine depletion in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 52(2), pp.433–441.
- Nambu, A., Tokuno, H. & Takada, M., 2002. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neuroscience research*, 43(2), pp.111–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067746> [Accessed January 15, 2016].
- Nemirovsky, S.I. et al., 2009. Reward-seeking and discrimination deficits displayed by hypodopaminergic mice are prevented in mice lacking dopamine D4 receptors. *Synapse (New York, N.Y.)*, 63(11), pp.991–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19598175> [Accessed July 3, 2015].
- Nicola, S.M., 2011. NIH Public Access. , 30(49), pp.16585–16600.
- Nisenbaum, E.S. et al., 1998. Selective blockade of a slowly inactivating potassium current in striatal neurons by (+/-) 6-chloro-APB hydrobromide (SKF82958). *Synapse (New York, N.Y.)*, 29(3), pp.213–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9635891> [Accessed November 11, 2015].
- Olson, L., Seiger, Å. & Fuxe, K., 1972. Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: Highly fluorescent islands in developing and adult rats. *Brain Research*, 44(1), pp.283–288. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689937290385X> [Accessed December 28, 2015].
- Pacheco-Cano, M.T. et al., 1996. Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs(+)-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Experimental brain research*, 110(2), pp.205–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8836685> [Accessed November 11, 2015].
- Park, H., Popescu, A. & Poo, M., 2014. Article Essential Role of Presynaptic NMDA Receptors in Activity-Dependent BDNF Secretion and Corticostriatal LTP. *Neuron*, 84(5), pp.1009–1022. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.045>.
- Pauls, D.L. et al., 1991. A family study of Gilles de la Tourette syndrome. *American journal of human genetics*, 48(1), pp.154–63. Available at:



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 5, 2016].

Pauls, D.L. et al., 1986. Gilles de la Tourette's syndrome and obsessive-compulsive disorder. Evidence supporting a genetic relationship. *Archives of general psychiatry*, 43(12), pp.1180–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3465280> [Accessed January 5, 2016].

Pearson, D.E. et al., 1984. Radial arm maze performance in rats following neonatal dopamine depletion. *Developmental Psychobiology*, 17(5), pp.505–517. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6434359> [Accessed January 8, 2016].

Pearson, J.M. & Platt, M.L., 2013. Dopamine: Burning the Candle at Both Ends. *Neuron*, 79(5), pp.831–833. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3844548&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 7, 2016].

Pearson, J.M., Watson, K.K. & Platt, M.L., 2014. Decision making: The neuroethological turn. *Neuron*, 82(5), pp.950–965. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.037>.

Pellow, S. & File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 24(3), pp.525–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2871560> [Accessed February 1, 2016].

Pennartz, C.M. a et al., 2009. Corticostriatal Interactions during Learning, Memory Processing, and Decision Making. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(41), pp.12831–12838.

Reynolds, J.N. & Wickens, J.R., 2000. Substantia nigra dopamine regulates synaptic plasticity and membrane potential fluctuations in the rat neostriatum, in vivo. *Neuroscience*, 99(2), pp.199–203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938425> [Accessed December 23, 2015].

Reynolds, J.N.J., Hyland, B.I. & Wickens, J.R., 2001. A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature*, 413(6851), pp.67–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544526> [Accessed October 12, 2015].

Ronesi, J., Gerdeman, G.L. & Lovinger, D.M., 2004. Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(7), pp.1673–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973237> [Accessed December 22, 2015].

- Salamone, J.D. et al., 2007. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology*, 191(3), pp.461–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17225164> [Accessed December 4, 2015].
- Salamone, J.D. et al., 1991. Haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion suppress lever pressing for food but increase free food consumption in a novel food choice procedure. *Psychopharmacology*, 104(4), pp.515–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1780422> [Accessed December 4, 2015].
- Salamone, J.D. et al., 2014. Neurobiological basis of motivational deficits in psychopathology. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, pp.1225–1238. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25435083>.
- Salamone, J.D. & Correa, M., 2012. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*, 76(3), pp.470–85. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4450094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 24, 2015].
- Salamone, J.D., Cousins, M.S. & Bucher, S., 1994. Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Behavioural brain research*, 65(2), pp.221–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7718155> [Accessed November 6, 2015].
- Saunders, A. & Sabatini, B.L., Cre Activated and Inactivated Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Neuronal Anatomical Tracing or Activity Manipulation. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, 72, pp.1.24.1–1.24.15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131660> [Accessed July 3, 2015].
- Schiffmann, S.N., Lledo, P.M. & Vincent, J.D., 1995. Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. *The Journal of physiology*, 483 ( Pt 1, pp.95–107. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1157874&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2015].
- Schultz, W., 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of neurophysiology*, 80(1), pp.1–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9658025> [Accessed July 24, 2015].
- Schultz, W., Dayan, P. & Montague, P.R., 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5306), pp.1593–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054347> [Accessed January 5, 2015].

- Shapiro, E. et al., 1989. Controlled study of haloperidol, pimozide and placebo for the treatment of Gilles de la Tourette's syndrome. *Archives of general psychiatry*, 46(8), pp.722–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2665687> [Accessed January 5, 2016].
- Sharpe, N.A. & Tepper, J.M., 1998. Postnatal development of excitatory synaptic input to the rat neostriatum: an electron microscopic study. *Neuroscience*, 84(4), pp.1163–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9578403> [Accessed January 15, 2016].
- Shaywitz, B. a, Klopfer, J.H., et al., 1976. Paradoxical response to amphetamine in developing rats treated with 6-hydroxydopamine. *Nature*, 261(5556), pp.153–155.
- Shaywitz, B. a, Yager, R.D. & Klopfer, J.H., 1976. Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4224), pp.305–308.
- Shen, W. et al., 2008. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5890), pp.848–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2833421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 7, 2015].
- Shuen, J. a et al., 2008. Drd1a-tdTomato BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(11), pp.2681–2685.
- Sippy, T. et al., 2015. Cell-Type-Specific Sensorimotor Processing in Striatal Projection Neurons during Goal-Directed Behavior. *Neuron*, 88(2), pp.298–305. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4622932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 6, 2015].
- Smith, R.D., Cooper, B.R. & Breese, G.R., 1973. Growth and behavioral changes in developing rats treated intracisternally with 6-hydroxydopamine: evidence for involvement of brain dopamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 185(3), pp.609–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4145870> [Accessed January 5, 2016].
- Smith, Y. et al., 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, 86(2), pp.353–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9881853> [Accessed July 23, 2015].
- Spear, L., 2000. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 24(2), pp.115–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199278> [Accessed February 1, 2016].

- Stellar, J.R., Waraczynski, M. & Bruno, J.P., 1988. Neonatal dopamine depletions spare lateral hypothalamic stimulation reward in adult rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 30(2), pp.365–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3174768> [Accessed January 8, 2016].
- Stoetzner, C.R., Pettibone, J.R. & Berke, J.D., 2010. State-dependent plasticity of the corticostriatal pathway. *Neuroscience*, 165(4), pp.1013–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2814943&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 23, 2015].
- Suárez, L.M. et al., 2014. L-DOPA treatment selectively restores spine density in dopamine receptor d2-expressing projection neurons in dyskinetic mice. *Biological Psychiatry*, 75(9), pp.711–722. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.006>.
- Surmeier, D.J. et al., 1992. Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), pp.10178–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=50301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2015].
- Surmeier, D.J. et al., 1995. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14(2), pp.385–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531987> [Accessed November 11, 2015].
- Takeichi, T. et al., 1986. Roles of catecholamine terminals and intrinsic neurons of the ventral tegmentum in self-stimulation investigated in neonatally dopamine-depleted rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 24(4), pp.1101–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086902> [Accessed January 8, 2016].
- Tang, K. et al., 2001. Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), pp.1255–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=14741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 22, 2015].
- Tepper, J.M. et al., 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in neuroanatomy*, 4, p.150. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3016690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2015].
- Tepper, J.M. et al., 1998. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Developmental neuroscience*, 20(2-3), pp.125–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9691188> [Accessed January 15, 2016].

- Tepper, J.M., Trent, F. & Nakamura, S., 1990. Postnatal development of the electrical activity of rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Brain research. Developmental brain research*, 54(1), pp.21–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2364542> [Accessed January 31, 2016].
- Tobler, P.N., Fiorillo, C.D. & Schultz, W., 2005. Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), pp.1642–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761155> [Accessed August 31, 2015].
- Toga, A.W., Thompson, P.M. & Sowell, E.R., 2006. Mapping brain maturation. *Trends in neurosciences*, 29(3), pp.148–59. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3113697&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed January 7, 2016].
- Tseng, K.Y. et al., 2001. Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), pp.6430–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487667> [Accessed November 11, 2015].
- Uchimura, N. & North, R.A., 1990. Actions of cocaine on rat nucleus accumbens neurones in vitro. *British journal of pharmacology*, 99(4), pp.736–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1917561&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed November 12, 2015].
- Ungerstedt, U., 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 367, pp.95–122. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4332694> [Accessed January 5, 2016].
- Villalba, R.M., Lee, H. & Smith, Y., 2009. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Experimental Neurology*, 215(2), pp.220–227. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2680135&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed January 8, 2016].
- Volkow, N.D. et al., 2007. Depressed dopamine activity in caudate and preliminary evidence of limbic involvement in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Archives of general psychiatry*, 64(8), pp.932–940.
- Voorn, P. et al., 2004. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), pp.468–474.

- Voorn, P. et al., 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience*, 25(3), pp.857–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3405431> [Accessed December 28, 2015].
- Walsh, J.P., 1993. Depression of excitatory synaptic input in rat striatal neurons. *Brain research*, 608(1), pp.123–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8495336> [Accessed December 22, 2015].
- Wang, X., Yang, Y. & Zhou, Q., 2007. Independent expression of synaptic and morphological plasticity associated with long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(45), pp.12419–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989307> [Accessed February 1, 2016].
- Wang, Z. et al., 2006. Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron*, 50(3), pp.443–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675398> [Accessed December 22, 2015].
- Welch, J.M. et al., 2007. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature*, 448(7156), pp.894–900. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2442572&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed January 7, 2016].
- Wilens, T.E. et al., 2009. Presenting ADHD symptoms, subtypes, and comorbid disorders in clinically referred adults with ADHD. *The Journal of clinical psychiatry*, 70(11), pp.1557–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2948439&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed January 7, 2016].
- Wilson, C.J., 1993. The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Progress in brain research*, 99, pp.277–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8108553> [Accessed January 15, 2016].
- Wilson, C.J. & Groves, P.M., 1980. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *The Journal of comparative neurology*, 194(3), pp.599–615. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7451684> [Accessed January 31, 2016].
- Wise, S.P., Fleshman, J.W. & Jones, E.G., 1979. Maturation of pyramidal cell form in relation to developing afferent and efferent connections of rat somatic sensory cortex. *Neuroscience*, 4(9), pp.1275–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/492537> [Accessed December 28, 2015].

- Wyvell, C.L. & Berridge, K.C., 2001. Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered “wanting” for sucrose reward. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), pp.7831–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567074> [Accessed December 18, 2015].
- Wyvell, C.L. & Berridge, K.C., 2000. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or response reinforcement. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(21), pp.8122–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050134> [Accessed August 24, 2015].
- Yin, H.H. et al., 2009. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature Neuroscience*, 12(3), pp.333–341. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2774785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 21, 2015].
- Yin, H.H. & Knowlton, B.J., 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(6), pp.464–476.
- Zhang, Y. et al., 2013. Aberrant restoration of spines and their synapses in L-DOPA-induced dyskinesia: involvement of corticostriatal but not thalamostriatal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(28), pp.11655–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3724545&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 8, 2016].
- Zheng, T. & Wilson, C.J., 2002. Corticostriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations. *Journal of neurophysiology*, 87(2), pp.1007–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826064> [Accessed November 11, 2015].