



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Participación de las interneuronas colinérgicas estriatales en la selección de estrategias durante tareas dirigidas a metas

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

JUAN PABLO BECCARIA

Director de Tesis: Dr. Juan Belforte

Lugar de Trabajo: Grupo de Neurociencia de Sistemas, IFIBIO "Houssay", FMED, UBA

Buenos Aires, 2020

Resumen

Participación de las interneuronas colinérgicas estriatales en la selección de estrategias durante tareas dirigidas a metas

Para su supervivencia los animales deben realizar diariamente una serie de acciones para alcanzar diferentes objetivos, ya sea asegurarse alimento, localizar su madriguera o doctorarse. Las acciones requeridas pueden ser más o menos complejas y deben ejecutarse en un determinado orden constituyéndose así diferentes estrategias para alcanzar el objetivo deseado. Sabemos que el proceso de selección de la estrategia correcta para alcanzar un objetivo, en un determinado contexto, requiere la participación de la corteza prefrontal y los ganglios de la base, sin embargo desconocemos aún muchos aspectos fundamentales de dicho proceso. El estriado es el principal núcleo de entrada de la información proveniente de la corteza a este circuito y su actividad está estrechamente controlada por una diversidad de interneuronas locales. En este aspecto, las interneuronas colinérgicas estriatales (ICE) juegan un rol causal regulando la flexibilidad cognitiva, por lo que son percibidas como elementos cruciales para una migración flexible entre comportamientos en condiciones ambientales cambiantes. Nuestro grupo previamente ha demostrado que la ablación de las ICE lleva a una emisión exacerbada de conductas espontáneas, perseverantes, que alcanzan a afectar la forma en que los individuos interactúan con sus pares. En este trabajo de tesis, nos preguntamos si la aparición de comportamientos perseverantes inducidos por la ablación de las ICE se ve reflejada en una incapacidad para selección de estrategias durante la resolución de problemas de navegación espacial dirigidos a metas. Para hacerlo, lesionamos selectivamente las ICE usando el sistema transgénico Cre/LoxP combinado con administración intraestriatal de toxina diftérica. Animales lesionados y control fueron expuestos a diferentes pruebas conductuales y evaluamos la progresión de las estrategias utilizadas. En ambas pruebas, los animales control modifican a lo largo de los días la estrategia mediante la cual completan la prueba. Sin embargo, los animales lesionados fallaban al adaptar comportamiento, sugiriendo que las ICE son necesarias para migrar entre estrategias de resolución en busca de optimizar la relación costo-beneficio.

Además, teniendo en cuenta que se si las interneuronas colinérgicas estriatales son capaces de señalar la competencia entre estrategias de exploración en una dado contexto ambiental, nos propusimos estudiar sus niveles de actividad a través de la cuantificación de los niveles de marca de pS6rp mediante IHC en dos pruebas comportamentales con requerimientos crecientes de toma de decisión y novedad. Los animales expuestos a contextos que requieren de toma de decisión presentaron niveles más bajos de actividad de sus ICE que sus compañeros de camada enfrentados a contextos de ausencia de decisión. Este resultado sugiere que las ICE modifican su patrón de actividad en contextos que propician la toma de decisión y la selección de estrategias.

Finalmente, para determinar si el efecto en la selección de estrategias provocado por la lesión de las ICE es exclusivo de tareas dirigidas a metas de navegación espacial, evaluamos el desempeño de animales con lesión selectiva de las ICE y animales control en una tarea de condicionamiento operante

de libre elección entre dos opciones y estudiamos su comportamiento mediante un análisis multivariado no supervisado. Encontramos que el grupo control puede ser clasificado en dos *grupos* que alcanzan niveles equivalentes de eficiencia en la tarea pero valiéndose de estrategias de resolución diferentes. En cambio, el grupo con lesión de las ICE constituyó un grupo considerablemente más homogéneo significativamente enriquecido en una de las estrategias descriptas. Este resultado indica que el rol de las ICE en selección de estrategias podría no estar solo limitado a tareas de navegación espacial. Por lo tanto proponemos que las ICE participarían en la selección de estrategias especialmente cuando existen diferentes estrategias viables para alcanzar la meta deseada.

Palabras clave: estriado, selección de estrategias, flexibilidad cognitiva, enfermedad neuropsiquiátrica, modelo animal, comportamiento, Síndrome de Tourette.

Abstract

Role of striatal cholinergic interneurons in strategy selection during goal-directed tasks

Assimilation of novel strategies into a consolidated action repertoire is critical for behavioral adaptation. This includes processes like decision making, planning actions and selection of strategies that require complex cortico-basal ganglia-cortical processing. The striatum is the main input nucleus for cortical information to this subcortical loop and its activity is tightly controlled by a diverse population of local interneurons. In this regard, striatum cholinergic interneurons (SCIN), play a causal role in regulating behavioral flexibility, including reversal learning, set-shifting and goal-directed versus habitual response selection. Consequently, SCIN are perceived as crucial elements for flexible switching of behaviors under changing environmental conditions. We have previously shown that SCIN ablation leads to exacerbated spontaneous emission of repetitive behaviors, including social interaction. In this body of work we ask if perseverative behavior induced by SCIN ablation relates to an inability to switch from strategies while solving spatial navigation tasks. To do so, we selectively ablate SCIN using a Cre/loxP transgenic system combined with intrastriatal diphtheria toxin administration. Mice were repeatedly exposed to Barnes and cross mazes. We did not find differences in learning curves between groups. In both tests, control mice change their task-resolution strategy across days. However, lesioned mice fail to adapt their solving strategy suggesting that SCIN are necessary to switch between solving-problem strategies to optimize cost benefit ratios.

Additionally, since it has not been studied whether a differential activation of SCIN exists when animals are required to select between competitive spatial strategies we aimed to study activity levels of SCIN under different degrees of spatial novelty and decision making demands. For that, we subjected C57BL/6 *wt* mice to two mazes with increasing decision-making requirements (Y maze and dual solution cross maze) and evaluated SCIN activation, measured as rpS6 expression levels by IHC. Mice exposed to contexts that require decision making situations present lower levels of SCIN activation compared to control littermates exposed to non-decision conditions. This result suggests that SCIN modify their activity patterns in contexts that propitiate decision making/ strategy selection.

Finally, to determine whether SCIN-associated strategy selection effect is only presents in navigation tasks we subjected lesioned and control mice to a two-alternative free choice operant conditioning task and conducted an unbiased multivariable analysis of mice behavior. For that, we studied 19 behavioral variables and used them in an unsupervised cluster analysis. We found two clusters in the control group, which reached similar task solving efficiencies (i.e., rewards earned) through different task solving strategies. Conversely, lesioned mice constituted a less variable group strongly enriched in a single strategy. These results suggest that SCIN role in strategy selection may not be limited to select strategies during navigational tasks.

Keywords: striatum, cognitive flexibility, neuropsychiatric disease, animal model, behavior, Tourette syndrome.

Índice

Introducción	7
I) Ganglios de la base y los circuitos córticoestriatales	9
II) Interneuronas estriatales	16
III) Aprendizaje	26
IV) Disfunción de las ICE – Buscando causalidad	39
V) Roles biológicos propuestos de las ICE.....	44
Objetivos e hipótesis	50
Materiales y métodos	52
I) Diseño experimental	52
II) Condiciones experimentales	55
III) Animales	55
IV) Cirugía.....	57
V) Restricción de alimento y aislamiento	58
VI) Pruebas conductuales.....	58
VII) Análisis multivariado no supervisado	71
VIII) Fijación transcardíaca y seccionado de tejidos.....	75
IX) Inmunohistoquímica y cuantificación.....	75
X) Estadística	79
Capítulo 1 – Cuantificación de actividad de las ICE mediante el marcador pS6rp	80
Introducción.....	80
Resultados.....	82

Conclusión.....	90
Capítulo 2 – Rol de las ICE en la selección de estrategias de navegación espacial	92
Introducción.....	92
Resultados.....	93
Conclusiones	104
Capítulo 3 –Selección de estrategias en animales control y con lesión de ICE en una tarea operante dirigida a metas.....	106
Introducción.....	106
Resultados.....	108
Conclusión.....	124
Discusión.....	126
Anexo I – Verificación de método de selección de variables del análisis de componentes principales	133
Anexo II – Protocolos de inmunohistoquímica.....	135
Anexo III – Abreviaturas	138
Referencias	139

Introducción

Para adaptarse al ambiente en el que están inmersos, los animales deben aprender, a partir de las claves que perciben del ambiente, a adecuar su comportamiento para optimizar acciones beneficiosas y minimizar aquellas con resultados negativos. Sin embargo, las condiciones ambientales en la naturaleza son fluctuantes, por lo que detectar signos del entorno que les permitan anticiparse a cambios venideros adaptando sus acciones en consecuencia, será siempre una cualidad adaptativa. En este sentido, por ejemplo, si un ratón silvestre se encuentra explorando un determinado territorio, puede encontrar en este una fuente de alimento. La misma puede ser más o menos permanente; un campo de trigo puede ser cosechado, una silo-bolsa dañada puede ser reparada. Si ante esta situación el animal es capaz de detectar que las condiciones del entorno cambiaron, será ventajoso para él relegar la explotación de recursos e invertir tiempo y esfuerzo en la exploración del territorio. Esta exploración buscará obtener la máxima información posible, incluidas fuentes de alimento alternativas. Por el contrario, si percibe que el ambiente se vuelve momentáneamente invariante, será beneficioso explotar aquellos recursos previamente encontrados antes de que las condiciones cambien nuevamente. Así, en un ambiente natural, nuestro ratón se encuentra constantemente sopesando qué estrategia ejecutar, ya sea explorar el ambiente en búsqueda de nuevas oportunidades o explotar un recurso disponible antes de que se agote. Una dada **estrategia**, entendida como la planificación de la serie de acciones destinadas a conseguir determinados objetivos, resultará óptima en un dado contexto espacial y temporal, y será seleccionada durante el proceso de toma de decisiones. La selección de estrategias se verá afectada a lo largo de la vida del animal en base a su experiencia, el conocimiento previo del ambiente y su variabilidad y la efectividad de la misma en la obtención de los recursos buscados. El uso de estrategias no se encuentra solo limitado a la exploración del ambiente y búsqueda de alimento; se ha reportado la existencia de estrategias contrapuestas en funciones cruciales para la supervivencia, tanto para el individuo como para la especie, dispares como son la forma de huir ante depredadores o la búsqueda de pareja (Johansen, Clemens and Nunez, 2008; De Franceschi *et al.*, 2016).

Existe evidencia que relaciona a los **ganglios de la base (GB)** con algunas de las funciones requeridas para una correcta selección de estrategias. Además, algunos desordenes neuropsiquiátricos que afectan el normal funcionamiento de los GB cuentan con alteraciones en la toma de decisiones y la selección de estrategias. Por ejemplo, en el Síndrome de Tourette o

el Trastorno obsesivo-compulsivo, se ha propuesto que las alteraciones reportadas en la conectividad funcional entre la corteza y los GB promoverían el surgimiento de comportamientos repetitivos, estereotipados e inflexibles, déficits en habilidades sociales, dificultades en mantener la atención e incrementos de impulsividad (Gruner and Pittenger, 2017; Morand-Beaulieu *et al.*, 2017). Entrando aún más en detalle, se ha planteado que ciertas **interneuronas presentes en el estriado, principal núcleo de entrada de información a los GB**, también tendrían un rol causal en la selección de conductas esenciales para la correcta adaptación a contextos determinados. En particular, un tipo especial de ellas, las llamadas **interneuronas colinérgicas estriatales** serían cruciales en la detección de eventos salientes - especialmente a aquellos motivacionalmente relevantes- participarían en la selección de conductas que están en conflicto, y en la flexibilidad conductual (Kimura, Rajkowski and Evarts, 1984; Aoki *et al.*, 2015; Matamales, Götz and Bertran-Gonzalez, 2016; Apicella, 2017a). Hasta tal punto esto es así, que se ha propuesto que la pérdida de la integridad de estas y otras interneuronas tendría un rol causal en la etiología del mencionado ST y en los Trastornos del espectro autista (Rapanelli, Frick and Pittenger, 2017). Sin embargo, ninguno de los trabajos realizados hasta la fecha han sido evaluados a la luz de un paradigma que contemple la manera en la que los animales desarrollan y seleccionan las estrategias con las que resuelven las situaciones conflictivas a las que se enfrentan cotidianamente.

1) Ganglios de la base y los circuitos córticoestriatales

Anatomía

Los ganglios de la base (GB) son un conjunto de núcleos subcorticales que participan del circuito que regula, a diversos niveles, el control del movimiento. Está conformado por el cuerpo estriado (dividido en los núcleos caudado y putamen en primates), el globo pálido (GP), el núcleo subtalámico, la sustancia negra parte reticulada (SNr) y el núcleo entopeduncular (EP).

El flujo de la información a través de los GB comienza en el estriado, lugar de acceso de las entradas sinápticas provenientes de la corteza y del tálamo. Las entradas corticales conforman la aferencia principal al estriado (Kemp and Powell, 1971; Smith *et al.*, 2004) y prácticamente todas las regiones corticales proyectan al mismo (Hunnicuttt *et al.*, 2016). En comparación, el tálamo representa una aferencia menor a la cortical, sin embargo, existe una contribución particularmente prominente del núcleo intralaminar, región del tálamo que responde a eventos sensoriales novedosos o salientes (Matsumoto *et al.*, 2001). El blanco principal de todas estas entradas son las neuronas espinosas medianas (NEM), las únicas neuronas de proyección del estriado. Se trata de las neuronas mayoritarias del núcleo, siendo en ratones cercanas al 95% de la población total (Kawaguchi, Wilson and Emson, 1990). Son GABAérgicas y como su nombre indica, presentan una gran número de espinas, estructuras especializadas en el establecimiento de sinapsis activas de tipo excitatorio, y poseen extensos árboles dendríticos, ambas características útiles para el rol anatómico-funcional que realizan como integradoras de la información aferente a los GB (Gerfen and Surmeier, 2011).

Las NEM no son un grupo homogéneo. Existen dos subpoblaciones no superpuestas e igualmente prevalentes (Hersch *et al.*, 1995; Surmeier, Song and Yan, 1996), que se definen a partir de marcadores neurobioquímicos y su conexión. Una expresa mayoritariamente el receptor para dopamina de tipo D1 (también D5; Gerfen *et al.*, 1990), receptor metabotrópico acoplado a proteína G_s y G_{olf} , por lo que, en la mayoría de los casos, la dopamina llevará a la activación de estas neuronas (Gerfen and Surmeier, 2011). Las NEM tipo D1 proyectan de manera directa al EP y a la SNr, núcleos de salida de los GB, constituyendo la llamada **vía directa**. Por el otro lado, la subpoblación restante de NEM expresa mayoritariamente el receptor de dopamina de tipo D2 (también D3 y D4), acoplado a proteína G_o y G_i , de papel principalmente inhibitorio (Gerfen *et al.*, 1990). Sus proyecciones inervan el GP, otro núcleo GABAérgico de los GB, y es éste quién actúa de manera indirecta sobre los núcleos de salida de los GB. Dado que el circuito en el cual están involucradas modula indirectamente al EP y la SNr,

se las denomina NEM de la **vía indirecta** (Gerfen and Surmeier, 2011; esquema en **Figura I1**). La presencia de estos receptores para dopamina es relevante porque existe una importante inervación dopaminérgica en el estriado proveniente de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Estas neuronas tiene su soma en el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés: *ventral tegmental area*) y en la porción compacta de la sustancia negra (SNpc), y proyectan sobre las NEM de la vía directa e indirecta (Gerfen and Surmeier, 2011).

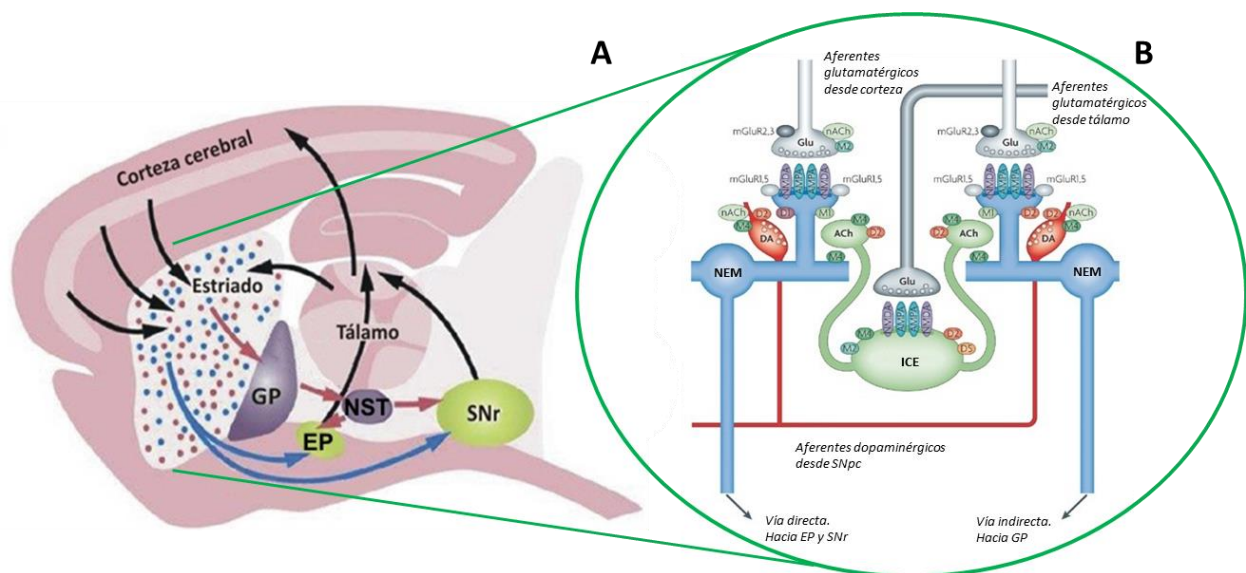


Figura I1: Esquema anatómico-funcional del circuito de los ganglios de la base. **A.** Flechas azules, vía directa. En rojo, vía indirecta. GP: globo pálido e, EP: núcleo entopeduncular, NST: núcleo subtalámico, SNr: sustancia negra parte reticulada. **B.** Esquema del circuito estriatal, destacando neuronas y receptores de interés. ICE: interneuronas colinérgicas estriales, NEM: neuronas espinosas medianas, SNpc: parte compacta de la sustancia negra, Glu: Neuronas glutamatergicas, DA: neuronas dopaminérgicas. ACh: acetilcolina. Adaptación de *Natures reviews*.

Continuando con el recorrido de la información dentro del circuito, los núcleos de salida proyectan a núcleos talámicos que a su vez inervan áreas corticales, como la corteza motora, prefrontal y límbica. De esta manera la información proveniente de la corteza y el tálamo, es transferida a los GB, sitio de selección de los planes motores; y finalmente vuelve al tálamo y a la corteza donde ocurrirá el control directo de la acción a realizar (Cisek and Kalaska, 2010). Es por este flujo de información recurrente que se considera que los GB conforman circuitos de retroalimentación o bucle con la corteza: la información retorna procesada a los sitios en donde se originó. Si bien estos bucles se interpretan más fácilmente en la función motora los GB también participan en el procesamiento de información emocional-afectiva (Para más información, ver **Box 1 - Canales paralelos de procesamiento**)

Tanto por sus características anatómicas como funcionales (que presentaremos a continuación), así como también por conocerse que numerosas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas involucran un mal funcionamiento del circuito estriatal, el estriado es la estructura de los GB que ha despertado el mayor interés de la comunidad científica. En este trabajo de tesis se pondrá especial énfasis en el estudio del mismo.

El estriado recibe información topográficamente ordenada de prácticamente toda la corteza cerebral. Si bien en roedores se visualiza como un núcleo histológicamente homogéneo y sin divisiones, las proyecciones corticales permiten delimitar regiones funcionales o canales de procesamiento diferenciales (Voorn *et al.*, 2004). De esta manera, al estriado se lo ha dividido clásicamente en estriado dorsal y ventral. A su vez, el estriado dorsal puede ser subclasificado en dos regiones: la región dorsolateral (DLS, por sus siglas en inglés, *dorsolateral striatum*), que recibe aferencias preferenciales de cortezas motoras y sensitivas, y el estriado dorsomedial (DMS, por sus siglas en inglés, *dorsomedial striatum*), que procesa información proveniente mayoritariamente de cortezas asociativas (Haber, 2003). El estriado ventral, por otro lado, compuesto principalmente por el núcleo accumbens, recibe inervación preferencial de áreas límbicas, implicadas en el estado emocional y motivacional del animal, como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal medial (mPFC por sus siglas en inglés *medial prefrontal cortex*; análoga funcional de la corteza prefrontal en humanos, Khamassi, 2007).

Fisiología

Estudios realizados en gran diversidad de especies animales, incluyendo ratones y humanos, sugieren que el estriado está funcionalmente implicado en un amplio abanico de procesos, habiéndose propuesto como función más general la de actuar como integrador de la información cognitiva, emocional y motivacional posibilitando la planificación y selección de la acción más efectiva para un contexto dado (Mogenson, Jones and Yim, 1980). Para entender los mecanismos fisiológicos que sugieren este accionar, podemos comenzar haciendo un breve relato de cómo los modelos clásicos describen la actividad dentro de este circuito. Se sugiere acompañar la lectura de los mismos revisando los esquemas en **Figura I2**.

En ausencia de actividad aferente, las NEM se encuentran hiperpolarizadas y con un bajo nivel de actividad. A pesar de que cada NEM recibe alrededor de 5.000-10.000 entradas excitatorias de la corteza cerebral, sólo unas pocas provienen de una misma neurona cortical

(Bolam *et al.*, 2000). 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 cambios significativos en la actividad cortical medida a través de registros de actividad de campo (Mahon, Deniau and Charpier, 2001; Tseng *et al.*, 2001).

El procesamiento de información cortical en los GB ocurre a través de las dos rutas anteriormente descritas desde el apartado anatómico: las vías directa e indirecta (Albin, Young and Penney, 1989). La **vía directa** se origina en las NEM estriatonigrales que proyectan de manera monosináptica a los núcleos de salida. El efecto de la acción de esta vía es una inhibición de los núcleos de salida. A su vez, al ser ellos centros de inhibición tónica del tálamo, el efecto neto de la vía directa es la desinhibición de las proyecciones excitatorias tálamocorticales (**Figura I2, izquierda**). A través de este mecanismo, se propone que la activación de la vía directa resulta en una promoción del movimiento. La **vía indirecta** se origina con las NEM estriatopálidas que proyectan por una vía multisináptica, que involucra al GP y el núcleo subtalámico, a los núcleos de salida. Mediante mecanismos que requieren la de estimulación directa e inhibición de centros inhibitorios, el efecto de la activación de esta vía es la desinhibición de los núcleos de salida de los GB y consecuente inhibición de las proyecciones tálamocorticales (**Figura I2, derecha**). De esta manera, se establece que la activación de la vía indirecta desfavorece la realización de movimientos voluntarios.

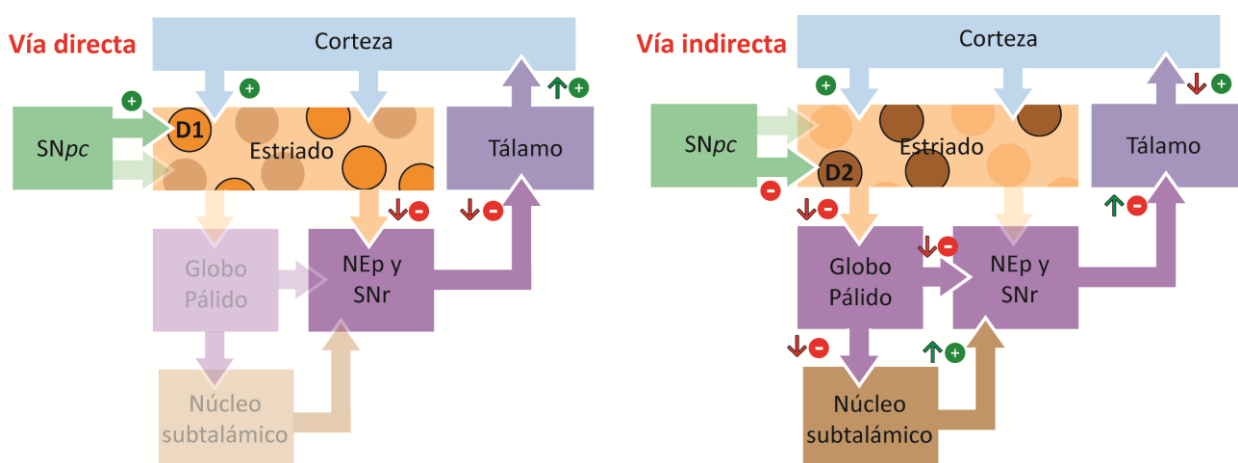


Figura I2: Esquemas funcional de la vía directa (**izquierda**) e indirecta (**derecha**). Los símbolos + y - indican la naturaleza excitatoria o inhibitoria neta de un núcleo sobre la región objetivo. Las flechas ↑ ↓ señalan el efecto activador o represor de las neuronas D1 o D2 sobre esas vías sinápticas.

Si bien el conexionado esquematizado en la **Figura I2** 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, Tokuno and Takada, 2002), proyecciones directas del globo pálido externo (análogo de primates del GP de roedores) a los núcleos de salida (Bolam *et al.*, 1993) y al estriado (Bevan, 1998), y recientemente se han descrito conexiones desde el globo pálido externo hacia la corteza prefrontal (Saunders *et al.*, 2015).

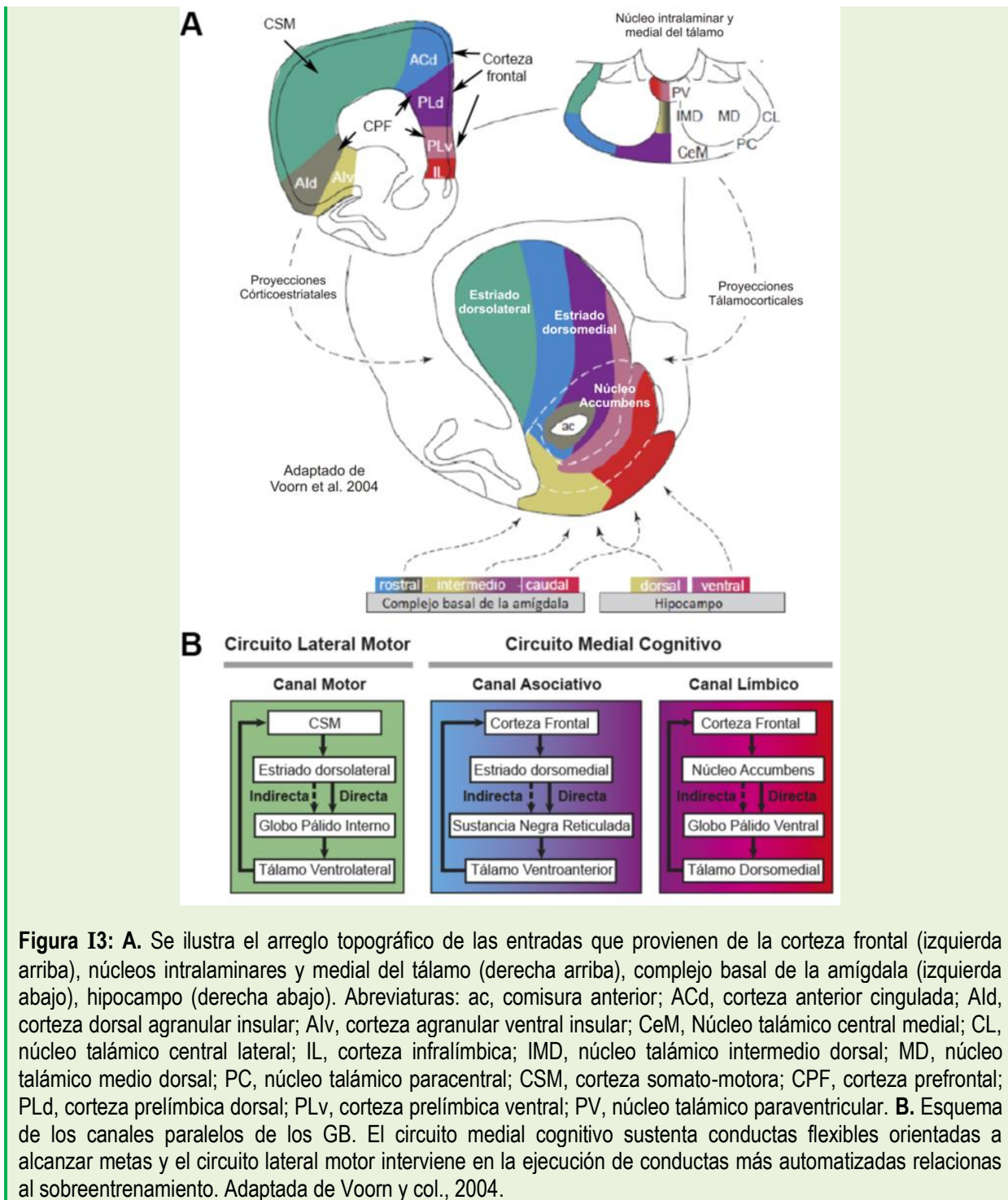
La teoría clásica de la función contrapuesta de las vías estriatales primó fuertemente a finales del siglo pasado y la primera década del actual. Sin embargo, trabajos más recientes, posibles gracias a la invención de nuevas técnicas de registro diferencial de cada vía *in vivo* ponen en juicio este modelo. El grupo de Rui Costa (Cui *et al.*, 2014) encontró, mediante *imaging* de calcio y fotometría con fibra óptica, que neuronas de ambas vías dentro del estriado dorsal presentan transientes de actividad simultáneamente cuando los ratones inician una acción dentro de una tarea, pero no cuando están inactivos. Experimentos similares han replicado este resultado con diversas técnicas, incluso en el estriado ventral (Jin, Tecuapetla and Costa, 2014; electrofisiología *in vivo* con *optotaging*; Barbera *et al.*, 2016; *deep brain calcium imaging*, Natsubori *et al.*, 2017, en núcleo accumbens). Estos estudios demuestran que, frente a la iniciación de un movimiento o incremento en la actividad del animal, ambas vías se encuentran activas, y que esta actividad es menor en momentos de reposo. Sorprendentemente estos resultados son compatibles con propuestas previas, como las de Mink en 1996 o Hikosaka en 1998 quienes, con mucha menos información que con la que contamos en la actualidad, propusieron que mientras se está realizando una determinada acción los ganglios de la base funcionarían como un elemento de selección entre comportamientos que están en competencia. Para hacerlo, la vía directa facilita aquella conducta deseada y las neuronas de la vía indirecta inhiben planes motores inadecuados (revisado por Burke, Rotstein and Alvarez, 2017). Al ser capaces de conciliar los hallados más recientes con la visión tradición, estas propuestas han cobrado especial consideración en los últimos años.

De cualquier forma, por lo analizado, una activación diferencial de una vía por sobre la otra tendrá un efecto sobre la promoción o inhibición del movimiento, y su balance es clave para la conducta del animal. Sin embargo, las aferencias al estriado no se limitan a regiones motoras, el balance de la vía directa e indirecta tendría un rol similar sobre el funcionamiento de otras regiones corticales involucradas en los circuitos asociativo y límbico, facilitando o suprimiendo patrones de activación en dichas cortezas (Voorn *et al.*, 1988; ver **Box 1 –Canales**

paralelos de procesamiento). De acuerdo a alguna hipótesis, se sugiere que las distintas cortezas que proyectan al estriado generan ensambles de posibles acciones o estados de las cuales el estriado selecciona alguna. La opción seleccionada continúa a través del circuito de los GB, y desinhibe el conexionado tálamo-cortical que conducen a la ejecución de la acción seleccionada e inhibe los circuitos que representan las acciones competidoras (Mink, 1996; Humphries, Stewart and Gurney, 2006; Houk *et al.*, 2007; Seo, Lee and Averbeck, 2012).

Box 1 - Canales paralelos de procesamiento

La misma división que destacamos en el apartado anatómico basada en las inervaciones corticales, puede observarse de manera funcional. Se puede afirmar que el estriado dorsal se encuentra históricamente asociado al control del movimiento en un sentido amplio. En particular, estaría implicado en la realización de procedimientos, participaría en la ejecución de conductas repetitivas y sería determinante para la formación de hábitos (Graybiel, 2008). Por otro lado, el estriado ventral está estrechamente vinculado a la señalización de las recompensas. Por este papel es que predomina su actividad en comportamientos que están dirigidos a conseguir una meta, y a través de su funcionamiento incorrecto estaría involucrado en desórdenes como la adicción a drogas de abuso (Haber, 2003; Graybiel, 2008). Los modelos clásicos de organización de los GB sostenían la separación anatómica de los canales córticoestriales donde la distribución topológica de las entradas corticales sugería un procesamiento disociado de la información, restringida a los compartimentos correspondientes. Con posterioridad, una mejor comprensión de la anatomía indicó que áreas corticales funcionalmente relacionadas y anatómicamente interconectadas, proyectan a regiones parcialmente superpuestas del estriado conformando lo que parecería un gradiente dorsolateral a ventromedial (Flaherty and Graybiel, 1994; Haber *et al.*, 2006; Haber and Knutson, 2010, **Figura I3**). 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). Si consideramos al estriado como un todo, esta estructura en su conjunto cuenta con información sumamente completa y diversa tanto del contexto como del estado emocional-motivacional del propio individuo (Balleine and Dickinson, 1998). En este sentido, se propone que el estriado es capaz de participar en la selección de un amplio abanico de acciones que van de lo netamente motor hasta lo puramente cognitivo, funcionando como algo más que un mero “filtro” que convierte información cortical cognitiva, motora o emocional en acciones sino que estaría involucrado en procesos de aprendizaje y memoria por sí mismo (A Pennartz *et al.*, 2009).



Pero si ambas vías reciben información glutamatérgica, y por lo tanto excitatoria, de la corteza y el tálamo, ¿qué lleva a que una se active preferencialmente por sobre la otra?

Si bien las NEM pertenecientes a ambas vías reciben inervación de los mismos sitios, habiendo casos incluso donde una misma proyección axonal de corteza o tálamo contacta

simultáneamente con neuronas de la vía directa y neuronas de la vía indirecta (Doig, Moss and Bolam, 2010), la forma en que estas entradas excitatorias son procesadas por el circuito no es la misma. Para comenzar, la excitabilidad intrínseca entre las NEM es diferente, por lo que, frente a un determinado estímulo es posible que se promueva la actividad de una vía por sobre la otra (Graybiel, 2005; Escande *et al.*, 2016). Además, como se mencionó anteriormente, estas vías cuentan con receptores dopaminérgicos diferentes, haciendo que la dopamina sea facilitadora de la vía directa, y a su vez inhibitoria de la indirecta. Por lo tanto, cambios en los niveles de dopamina en el estriado modularán diferencialmente la actividad de las NEM de la vía directa e indirecta, estableciendo en cada caso un determinado balance entre las mismas. El desbalance patológico entre ambas vías puede tener consecuencias conductuales severas, como ejemplifican la enfermedad de Parkinson (donde ocurre una pérdida de las neuronas dopaminérgicas) con predominio de la vía indirecta, y la corea de Huntington (por degradación de las NEM) con predominio de la vía directa (Galvan *et al.*, 2012; Escande *et al.*, 2016). Sin embargo no es la dopamina el único agente regulador del balance excitación/inhibición, el estriado cuenta con un número reducido, pero fisiológicamente relevante, de interneuronas capaces de regular los niveles de actividad de las NEM estriatales.

II) Interneuronas estriatales

Generalidades

Existen al menos cinco subpoblaciones de interneuronas estriatales, neuronas cuyo árbol dendrítico-axonal se encuentra restringido a esta estructura. El conjunto de las interneuronas representa cerca del 5% de las neuronas del estriado, valor que depende del modelo animal en estudio, tendiendo a su valor mínimo en roedores y máximo en vertebrados superiores como los primates (Tepper *et al.*, 2010). Cuatro de ellas son GABAérgicas, pero diferenciables y bien caracterizadas por la co-expresión de las proteínas parvalbúmina, calretinina, tirosina hidroxilasa y neuropéptido Y. Estas proteínas son frecuentemente utilizadas como marcadores neurobioquímicos de cada grupo en particular. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que estas poblaciones, aparentemente homogéneas, ocultan otras entidades anatómica y electrofisiológicamente independientes (Assous and Tepper, 2018). La población restante de interneuronas, corresponde a las llamadas interneuronas colinérgicas estriatales (ICE) por utilizar acetilcolina (ACh) como neurotransmisor (Kawaguchi *et al.*, 1995).

Al igual que las NEM, casi la totalidad de las poblaciones de interneuronas (con excepción de las neuropéptido Y⁺) reciben, en mayor o menor medida, aferencias glutamatérgicas tanto corticales como talámicas. Tradicionalmente se creía que el rol biológico de estas interneuronas era la de ejercer un control temporal del disparo de las NEM mediante el mecanismo conocido como inhibición anterógrada (*feedforward inhibition*, Assous and Tepper, 2019). Sin embargo, el creciente conocimiento en la especificidad de las conexiones corticales y talámicas con las interneuronas estriatales, el descubrimiento de plasticidad a corto y largo plazo en las mismas (Reynolds, Hyland and Wickens, 2004; Assous *et al.*, 2017; Arias-García *et al.*, 2018) y el intrincado, pero conservado entramado de conexiones interneurona-interneurona (Threlfell *et al.*, 2012; Straub *et al.*, 2016; Assous *et al.*, 2017) sugieren funciones modulatorias más complejas, aún por describir (Assous and Tepper, 2019).

En particular, revisten especial interés las ICE, únicas neuronas estriatales que no sintetizan GABA, y por lo que tanto que no se limitan a ejercer su modulación exclusivamente mediante la inhibición. Además, a pesar de representar un pequeño número, al igual que las demás interneuronas estriatales, gracias a poseer extensas arborizaciones dendrítico-axonales, son capaces de integrar información proveniente de enormes regiones del estriado en simultáneo y de contactar de manera individual un gran número de NEM.

Interneuronas colinérgicas estriatales - Anatomía

Las ICE fueron caracterizadas como tales en ensayos histológicos mediante la detección de colinacetiltransferasa (ChAT, del inglés *choline acetyltransferase*), enzima limitante para la síntesis de ACh y utilizada como marcador celular para este tipo de neurona (Kawaguchi *et al.*, 1995). Desde una perspectiva morfológica, las ICE son neuronas de gran tamaño (soma de 25 μm en roedores vs. 10-15 μm de las NEM, Ouimet, Langley-Gullion and Greengard, 1998; Gonzales and Smith, 2015; **Figura I4**), que cuentan con árbol dendrítico-axonal muy extenso llegando a cubrir 1mm de diámetro (Kimura *et al.*, 1980; Bolam, Wainer and Smith, 1984), lo que le valió descripción inicial de “neuronas gigantes sin espinas” (Grofová, 1979).

Las ICE son las únicas células estriatales no GABAérgicas, y por lo tanto, capaces de ejercer una acción de modulación excitatoria (descartando la modulación dopaminérgica extrínseca). Son entre 1-2% de las neuronas totales del estriado (Phelps, Houser and Vaughn, 1985), y a pesar de la pequeña proporción del total estriatal que estas neuronas representan, son la única fuente de acetilcolina en el estriado (Abudukeyomu *et al.*, 2019). Si bien

recientemente se ha identificado que algunas neuronas colinérgicas de núcleos pedúnculo pontino y laterodorsal tegmental del tronco cerebral proyectan al estriado dorsal (Dautan *et al.*, 2014), a la fecha no se ha profundizado acerca del conexionado sináptico preciso de dichas conexiones ni su rol en la modulación del circuito (Assous and Tepper, 2019), quedando aun por establecerse su importancia incluso a nivel anatómico.

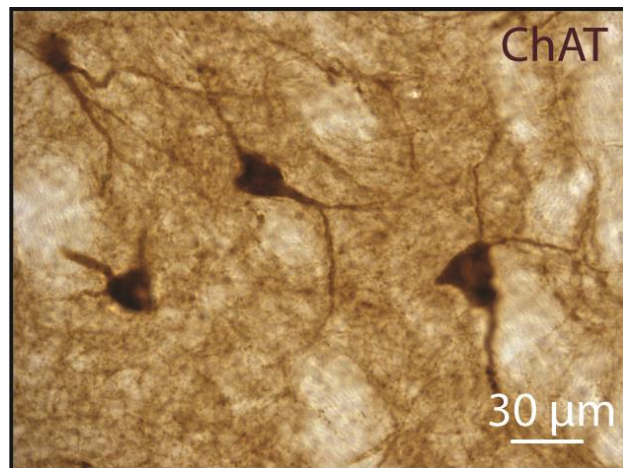


Figura I4: Fotografía de alta magnificación (40X) estriado inmunomarcado con anticuerpo anti-ChAT reveladas mediante reacción de oxidación de DAB.

Se sabe que las ICE, si bien están presentes a lo largo y ancho del estriado, no se encuentran homogéneamente distribuidas. Aunque sutil, existe un significativo gradiente en su densidad, en especial si realizamos un seguimiento a lo largo del eje rostro-caudal. De esta manera, se puede observar una mayor presencia de ICE en la región rostral del estriado y en especial en la subregión lateral del estriado ventral (conocida como *shell*). A su vez, dentro de la región posterior, existe un ligero incremento en la densidad de las ICE en el área dorsolateral (Matamales, Götz and Bertran-Gonzalez, 2016).

Se determinó, mediante estudios inmunohistológicos, que las ICE reciben inervación de neuronas dopaminérgicas provenientes de la SNpc y la VTA (Dimova *et al.*, 1993; Prensa and Parent, 2001), reciben entradas monosinápticas glutamatérgicas de la corteza (Thomas *et al.*, 2000) y del tálamo (Lapper and Bolam, 1992), modulación GABAérgica de otras interneuronas estriatales y de colaterales de las NEM (Sullivan, Chen and Morikawa, 2008) e incluso son moduladas por la propia ACh a partir de autorreceptores presinápticos. Su actividad es mayormente determinada por las entradas excitatorias provenientes de núcleos talámicos mediales (Bradfield and Balleine, 2017).

En cuanto a sus eferencias, la escasa asociación de sus terminales axónicas en sinapsis definidas sugiere un efecto volumétrico importante de ACh en el estriado (Pisani *et al.*, 2007). Por esto, una remoción de las neuronas colinérgicas tendría efectos no solo en las células directamente inervadas, sino también produciría efectos generalizados sobre todo el estriado.

Interneuronas colinérgicas estriatales - Fisiología

Ya en los primeros estudios de electrofisiología *in vivo* del estriado, se identificó un tipo neuronal con un perfil de actividad muy característico. Se trataba de las únicas neuronas con actividad tónica del estriado, por lo cual se las denominó TAN (por sus siglas en inglés, *tonic active neurons*, Crutcher and DeLong, 1984; Kimura, Rajkowski and Evarts, 1984), en clara contraposición con las neuronas que descargaban potenciales de acción de manera esporádica (PAN, *phasic active neurons*) finalmente asociadas a las NEM (frecuencia media de disparo de las TAN 3-10 Hz vs PAM <1Hz, Wilson, Chang and Kitai, 1990; Apicella *et al.*, 2009)

Cierta evidencia correlacional indicaba que las TAN (clasificadas en base a su electrofisiología) correspondía a las ICE (identificadas neurobioquímicamente). La confirmación de esta presunción llegaría de la mano de estudios que combinaron registros electrofisiológicos extracelulares y posterior marcado yuxtacelular. Como resultado de estos trabajos, se logró verificar que las neuronas ChAT positivas presentan propiedades eléctricas de TAN, en todos los casos registrados (Inokawa *et al.*, 2010; Schulz, Oswald and Reynolds, 2011). Por lo tanto, se acepta actualmente en el campo que las TAN corresponden inmunohistoquímicamente a las ICE. Hecha esta salvedad, continuaremos refiriéndonos a ICE siguiendo la perspectiva neurobioquímica.

Las ICE modulan el circuito estriatal fundamentalmente a través de receptores nicotínicos presentes en las NEM o contactos axo-axonicos sobre los terminales glutamatérgicos de corteza y tálamo. Estos poseen receptores presinápticos muscarínicos de tipo M2, por lo cual la acetilcolina reduciría la liberación glutamatérgica de dichos terminales sobre las NEM (Goldberg, Ding and Surmeier, 2012).

En los últimos años, ha crecido el interés por el efecto inhibitorio que las ICE ejercen sobre las NEM mediante la activación de las demás interneuronas. Casi todos los tipos de interneuronas GABAérgicas estriatales cuentan con receptores nicotínicos, y establecen con las ICE circuitos sinápticos de alta velocidad de activación (Assous and Tepper, 2019).

A pesar de recibir un gran número de entradas excitatorias sobre su extenso árbol dendrítico, es sabido que la actividad tónica de las ICE es intrínseca e independiente de las entradas sinápticas (Bennett and Wilson, 1999; Bennett, Callaway and Wilson, 2000). Esta actividad espontánea puede seguir patrones de descarga rítmicos, (ya sea mediante disparo tónico simple o descarga en ráfaga), así como también patrones de descarga irregular. Cualquiera sea el caso, el mecanismo marcapasos presenta las siguientes etapas (**Figura I5**): la

apertura de canales de Na^+ voltaje dependientes desencadena el potencial de acción. Esta despolarización abrupta lleva a la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje dependiente de tipo Cav2 de dos tipos. Las corrientes mediadas por los canales de tipo Cav2.1 ocasiona la apertura de canales de K^+ de tipo BK, calcio y voltaje dependiente. Una vez abiertos, estos canales llevan creación de una corriente neta entrante de K^+ de gran magnitud. En paralelo, la corriente de Ca^{2+} mediada por canales Cav2.2 activa la corriente de K^+ SK, de menor magnitud pero mayor duración (lo que induce un fenómeno de hiperpolarización llamado *medium after-hyperpolarization*). Ambas corrientes hiperpolarizantes logran reducir el potencial de membrana hasta aproximadamente -60mV , lo que lleva a la desactivación de las corrientes de K^+ , y activación de canales catiónicos (HCN). La apertura de estos canales produce una corriente despolarizante (I_h) que conduce el potencial de la célula nuevamente al umbral de activación de canales de Na^+ voltaje dependientes y a que se gatille otro potencial de acción (Bennett, Callaway and Wilson, 2000; Steiner and Tseng, 2010).

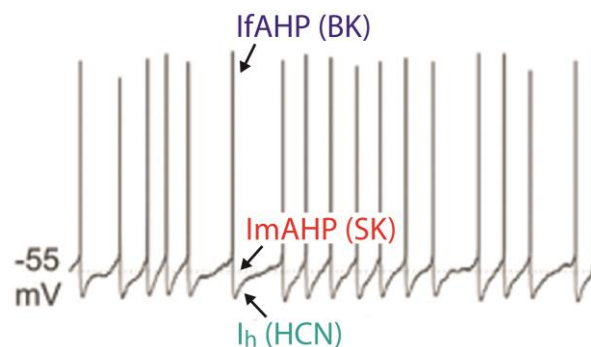


Figura I5: Registro electrofisiológico de una ICE destacando las corrientes principales involucradas en la generación de potenciales de acción espontáneos.

A pesar de ser capaces de presentar potenciales de acción autogenerados, la actividad de las ICE es modulable por sus aferencias. A modo de ejemplo, la activación mediada por receptores muscarínicos interrumpe los patrones de actividad rítmicos volviendo la respuesta menos estereotipada, mientras que entradas GABAérgica provenientes desde la VTA reducen drásticamente la frecuencia de disparo (Ding *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012).

Si bien existe poca literatura acerca de qué codifica la frecuencia de disparo de las ICE, hay evidencia que sugiere que señala aspectos motores de la respuesta conductual, como la iniciación del movimiento o la dirección del mismo (Benhamou, Kehat and Cohen, 2014). Por otro lado, se ha reportado que estas interneuronas modifican su frecuencia de disparo cuando los animales realizan acciones en tareas instrumentales. En general se ha observado

disminuciones en la tasa de disparo ante claves asociadas a recompensas o recompensas que son entregadas de maneras inesperadas; por el contrario, se describió incrementos de actividad frente a movimientos realizados en tareas que requieren de elección entre varias respuestas posibles, como la realización de presiones de palanca en tareas de discriminación (Yarom and Cohen, 2011).

Además de su actividad tónica, otra característica electrofisiológica distintiva de las ICE es su “respuesta de pausa” ante eventos ambientales salientes, tales como **estímulos novedosos, recompensas y estímulos sensoriales contingentes con las mismas** (Kimura, Rajkowski and Evarts, 1984; Apicella *et al.*, 1991; **Figura I6**). La pausa, una disminución sincrónica en la actividad de la mayoría de las ICE, es disparada por aferencias talámicas, en particular las provenientes del complejo parafascicular centromedial (Matsumoto *et al.*, 2001).

Un aspecto destacable de la respuesta de las ICE frente a eventos significativos es su estructura temporal rígida. Independientemente de la modalidad del estímulo sensorial que la desencadene y del tipo y magnitud de la recompensa asociada, la respuesta consiste en una aceleración breve de la descarga de potenciales de acción (solo a veces presente), seguida de una pausa de ~250 milisegundos de duración, que da lugar a un nuevo evento de descarga sincronizada con ICE cercanas, fenómeno conocido como “rebote” (presente en casi todos los eventos de pausa; (Kimura, Rajkowski and Evarts, 1984; Apicella *et al.*, 1991; Aosaki *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 2001; Apicella, 2017a).

Las ICE cuentan con una remarcable sincronía a lo largo y ancho del estriado, no solo en su respuesta de pausa (siendo precisamente esta coordinación lo que vuelve a la pausa un evento tan conspicuo y destacado), sino también en su actividad basal (Raz *et al.*, 1996; Goldberg and Reynolds, 2011). Esto puede sumarse a las mencionadas características anatómicas de las ICE en tanto su gran tamaño y arborización, siendo todos estos factores los que colabora a la robustez y homogeneidad del tono colinérgico.



Figura I6: *Raster plot* de la actividad de una ICE para un mono entrenado en una tarea pavloviana recompensada, donde cada renglón es un ensayo, cada punto negro es un PA de la ICE, la línea roja representa el momento de emisión de un estímulo sonoro, la línea naranja corresponde a la entrega de la recompensa. **A.** Cuando el animal es entrenado en recibir una recompensa 1 segundo después de la llegada de un estímulo, se observa la típica respuesta de pausa frente a un estímulo que anticipa una recompensa, descrita inicialmente por Kimura, 1984. **B.** y **D.** Sin embargo, si la recompensa es entregada de manera inesperadamente prematura o tardía, se manifiesta un nuevo evento de pausa que señala esa incongruencia. **C.** Si los ensayos subsiguientes ocurren con normalidad, la respuesta de pausa exclusivamente asociada al estímulo se restituye inmediatamente (Adaptado de Apicella 2017 a partir de trabajos de Sardo y col., 2000 y Ravel y col., 2001).

La pausa, a diferencia de la actividad tónica, es completamente dependiente de entradas sinápticas (Bennett and Wilson, 1999; Bennett, Callaway and Wilson, 2000). De manera clásica se la consideraba como una respuesta de las ICE frente a entradas glutamatérgicas talámicas y, siendo el tálamo un punto de relevo de la entrada de casi todas las modalidades sensoriales al sistema nervioso central, la pausa sería un nexo entre la actividad de estas interneuronas y la detección de un estímulo saliente (Matsumoto *et al.*, 2001). Pero la pausa no deja de ser una inhibición de la actividad tónica, por lo que resulta llamativo que se deba a estimulación glutamatérgica, lo que sugiere que otros elementos participarían de este fenómeno. De los actores que forman parte del circuito estriatal presentados hasta el momento, varios parecerían estar involucrados, entre ellos las otras interneuronas estriatales y la dopamina. De hecho, se ha reportado que las entradas talámicas que estimulan las ICE activan de manera paralela interneuronas GABAérgicas que inervan, a su vez, a las ICE (Sullivan, Chen and Morikawa, 2008),

realizando, de esta manera, un control temporal de la activación de estas últimas mediante inhibición anterógrada. Además, en ciertas condiciones los eventos de pausa ocurren simultáneamente con cambios fásicos en la actividad de neuronas dopaminérgicas de la SNpc que inervan el estriado (Aosaki *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 2004). De igual forma, la actividad sincrónica de las ICE es suficiente para producir liberación de DA estriatal (Threlfell *et al.*, 2012). Estos casos de modulación cruzada dan ejemplo de la estrecha relación que existe entre los sistemas dopaminérgico y colinérgico en el estriado, quienes a su vez son entendidos como agentes de regulación coordinada de la actividad del circuito córticoestriatal mediante la acción directa sobre las NEM (Lester, Rogers and Blaha, 2010).

Relación de las ICE con la dopamina

Mencionamos recientemente que el fenómeno de pausa de las ICE es dependiente de entradas talámicas. Sin embargo, además de activar a las ICE de manera directa, las aferencias del tálamo en el estriado activan también las terminales dopaminérgicas de las neuronas de la SNpc, llevando a la liberación local de dopamina. Las ICE cuentan con receptores para dopamina de tipo D2 y D5 (Gerfen and Surmeier, 2011), ambos inhibitorios, por lo que esta liberación conduce al silenciamiento de este tipo de interneuronas. Esto explica la dependencia vista en la literatura de la DA para la existencia de la pausa (DeBoer, Heeringa and Abercrombie, 1996; Deng, Zhang and Xu, 2007). Estos incrementos en dopamina suelen darse durante estímulos salientes asociados a recompensas, y ya han sido reconocidos como eventos determinantes para la formación de variados tipos de aprendizajes (para más información ver **Box 2 – Hipótesis de la señal de predicción del error**).

Existen más resultados que abogan por una señalización de eventos conjunta entre el sistema dopaminérgico y el colinérgico. Los terminales dopaminérgicos, tanto en estriado dorsal como ventral, cuentan con receptores muscarínicos M5, receptores metabotrópicos acoplados a proteína G_q, y por lo tanto excitatorios (Cachope *et al.*, 2012; Threlfell *et al.*, 2012). Por ello, descargas masivas de ACh, como las que suelen ocurrir ante los eventos previos y posteriores a la pausa, llevarían a un aumento sincrónico en la transmisión de DA en todo el estriado (Shin *et al.*, 2015). Como ya mencionamos, dado que las neuronas dopaminérgicas inervan a las ICE, algunos autores incluso proponen que esta actividad dopaminérgica producida inicialmente por la propia señalización colinérgica es otro de los posibles generadores de la pausa (Ding *et al.*, 2010; Zhang and Cragg, 2017) (Ding y col. 2010; Zhang y Cragg, 2017).

BOX 2 - Hipótesis de la señal de error en la predicción

Si mencionamos la actividad de la dopamina como posible generadora de la pausa en las ICE, cabe describir cómo es el patrón de respuesta de las neuronas dopaminérgicas frente a estímulos salientes. Un trabajo pionero realizado por Schultz en 1986, midió la actividad unitaria de neuronas dopaminérgicas de la VTA y SNpc en monos mientras eran entrenados en una tarea de condicionamiento clásico y determinó que estas neuronas presentaban un aumento fásico de actividad cuando los animales recibían un estímulo apetitivo inesperado. Por el contrario, estímulos aversivos no producían el mismo efecto. Lo interesante es que luego, en ensayos en los que se asociaba un estímulo sonoro con una posterior entrega de recompensa, el incremento en la actividad neuronal sufría un corrimiento temporal, pasando a ocurrir en el momento del tono y dejando de estar presente al momento en el que finalmente se entregaba la recompensa. De manera contrapuesta, si la recompensa nunca llega, en el momento en el que se esperaba su llegada ocurre una disminución en el disparo de las neuronas dopaminérgicas.

En base a este trabajo, y a sucesivos, el grupo de Schultz desarrolló la hipótesis de que las neuronas dopaminérgicas codificarían con su actividad una **señal de error en la predicción de una recompensa**. Esta establece que las neuronas liberadoras de dopamina no se limitan a señalar la ocurrencia de eventos salientes, sino que funcionan como un elemento de comparación entre lo que el animal espera, en base a su experiencia previa y lo que finalmente ocurre, tanto en tiempo como en magnitud de la recompensa. De esta manera, si la recompensa es mayor a lo esperado, se activan más, si es menor, se activan menos, y si es igual a lo esperado, no modifican su actividad basal. De acuerdo a los autores, esto convertiría a las neuronas dopaminérgicas en excelentes sensores del ambiente, activándose frente a fuentes inesperadas de recursos, señalizando los eventos que sirvan de predictores y respondiendo a estos de manera actualizada a medida que la fuente de recursos va cambiando de valor. Esta señal de error podría ser utilizada por circuitos neuronales para corregir la respuesta generada por el animal, permitiendo procesos de aprendizaje. A partir de lo descrito por este fenómeno, los incrementos de dopamina ocurren en el momento de detección de los estímulos salientes, brindando temporalidad coherente a los modelos que proponen a dopamina como componente central de la modulación de la pausa (Apicella, 2007).

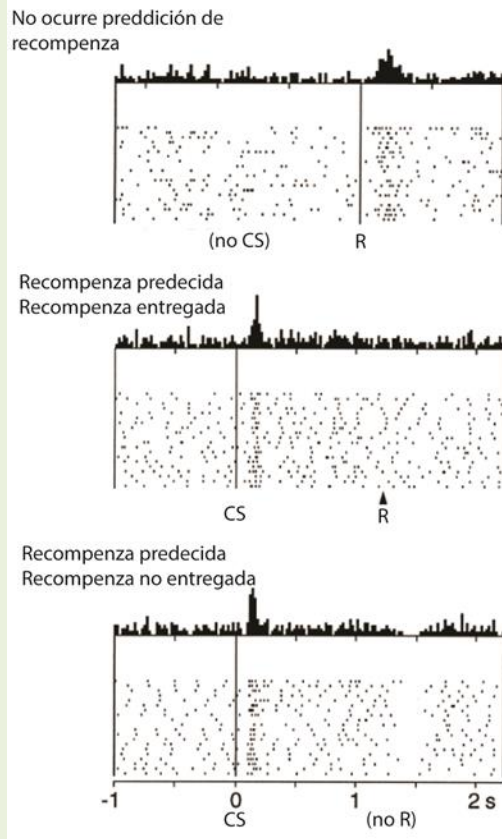


Figura 17: Raster plot de la actividad de neuronas dopaminérgicas en un registro *in vivo* en un mono entrenado a recibir líquido luego de una señal sonora. **Arriba**, ante una recompensa entregada sin señal predictoria (no CS), las neuronas dopaminérgicas aumentan su actividad. **Medio**, estímulo condicionado predice una recompensa (CS), por lo que la señal dopaminérgica se adelanta, pasando a codificar la predicción. Al no haber necesidad de señalar error, las neuronas dopaminérgicas no señalizan la entrega de la recompensa. **Abajo**, CS predice recompensa, y se observa la señal dopaminérgica esperada. Pero al no llegar la recompensa, las neuronas dopaminérgicas manifiestan una caída en su actividad, revelando un proceso interno de expectativa. Modificada de Schultz, 1997.

Fuente: Schultz y col. 1986, 1997.

Existe un marcado paralelismo en las señales generadas por dopamina y las ICE, al menos en ensayos instrumentales recompensados, ya que estas últimas presentan respuestas que se asemejan a las señales de error de predicción de la recompensa. Sin embargo, mientras la respuesta de las ICE es relativamente estereotipada (fenómeno de pausa-rebote), las neuronas dopaminérgicas presentan respuestas en forma de cambios en la frecuencia de disparo que puede tomar valores positivos, negativos de magnitud variable, dependiendo del signo e intensidad de la señal de error (Morris *et al.*, 2004). Otra diferencia entre ambos perfiles de respuesta es que las ICE lo hacen aún ante estímulos neutros y, según si estos resulten finalmente asociados o no a un evento relevante, la respuesta se irá fortaleciendo o desapareciendo con la reiterada presentación de este estímulo (Aosaki *et al.*, 1994). Este efecto puede ser un mecanismo a través del cual las ICE están involucradas en una función atencional, determinando la saliencia de los estímulos, para destacar su importancia o fomentar su omisión. De serlo, será clave en la asociación entre estímulos-respuesta en ensayos de condicionamiento (Apicella *et al.*, 2009).

Las ICE además, responden ante estímulos aversivos con un perfil de actividad diferente al de los apetitivos, algo presente pero sustancialmente menor en respuesta dopaminérgica, donde solo un 15% de las células lo hace y donde la señalización siempre se trata de cambios fásicos de frecuencia de disparo (Schultz, 2002). Esta característica sugiere la capacidad de las interneuronas colinérgicas de detectar entre estímulos motivacionalmente opuestos (Blazquez *et al.*, 2002). Por lo mencionado, las ICE no se limitan a conducir o amplificar señales de estímulos que pueden llegar desde neuronas dopaminérgicas, y tendrían un papel de importancia en sí mismas, del que aún queda mucho por determinar.

De todas formas es abundante la evidencia que relaciona los sistemas dopaminérgico y colinérgico y que refuerzan la idea instalada en la literatura de que es requerida la interacción entre ambos para el procesamiento y aprendizaje de tareas asociadas a recompensas (Zhang and Cragg, 2017). Las variaciones resultantes de acetilcolina y dopamina promoverían cambios plásticos duraderos entre aferencias provenientes de la corteza y las neuronas de salida del estriado, las NEM. De acuerdo a algunos autores, este podría ser el sustento anatómico de la adquisición de conductas orientadas a alcanzar metas y hábitos (Centonze *et al.*, 2003; Yin and Knowlton, 2006; Graybiel, 2008).

III) Aprendizaje

Aprendizajes asociativos

Para su supervivencia, los animales deben realizar diariamente una serie de acciones buscando siempre maximizar los beneficios con el menor riesgo. Para ello necesitan una continua actualización tanto de la información de su estado personal, físico y motivacional, como así también del ambiente que los rodea, sin olvidar experiencias pasadas relevantes en el contexto actual. Cómo es que los animales somos capaces de aprender, es decir, modificar nuestro comportamiento como resultado de la práctica y la experiencia (Hilgard, Atkinson and Atkinson, 1975) y cómo, a su vez, utilizamos los conocimientos aprendidos para tomar decisiones es algo que ha interesado a los científicos de un amplio abanico de disciplinas a lo largo de siglos.



Desde la psicología, se ha planteado teorías del aprendizaje que explican cómo es que los animales promueven aquellas acciones que son beneficiosas y evitan las nocivas mediante el establecimiento de asociaciones. Surgen entonces los llamados **condicionamiento clásico** y **condicionamiento instrumental**. En el primero, descrito inicialmente por Ivan Pavlov en los últimos años del siglo XIX, los animales relacionan estímulos en principio neutros, con

estímulos biológicamente relevante, de manera tal de que los primeros adquieran valor predictivo y sean capaces de despertar respuestas biológicas semejantes a las obtenidas por el estímulo biológico original. Es importante destacar que el condicionamiento clásico no establece la necesidad de acción voluntaria del individuo, muy por el contrario durante el condicionamiento clásico el estímulo biológico ocurre independientemente de la acción del animal, por lo que cambios comportamentales reflejan, presumiblemente, reacciones innatas involuntarias específicas (Dayan and Balleine, 2002).

Por otro lado surge a partir de finales de la década de 1950 una teoría impulsada por el psicólogo norteamericano Burrhus Frederic Skinner denominada **condicionamiento operante**. A partir de esta teoría del aprendizaje, también conocida como aprendizaje instrumental, los individuos modifican la frecuencia con la que realizan una determinada acción a partir de las consecuencias que esta tiene al **operar** sobre el ambiente. De esta manera, si la realización de una determinada acción conlleva consecuencias beneficiosas, tenderá a repetirse, si contrae consecuencias perjudiciales, dejará de ejecutarse. Según esta visión, el tipo de consecuencia que tiene una acción repercute en la probabilidad de que el individuo vuelva a actuar de la misma manera sobre el ambiente (Murphy and Lupfer, 2014). Así, hablamos de refuerzos cuando las consecuencias llevan a que la acción aumente la probabilidad de realizar dicha acción, o castigos, cuando llevan a que disminuya. A su vez, los refuerzos y los castigos pueden ser positivos o negativos. Los refuerzos y castigos positivos son aquellos en los cuales la presencia del estímulo es la que ocasiona el cambio de frecuencia. Dentro de esta categoría se encuentran las fácilmente



reconocibles recompensas, como puede ser la entrega de un alimento apetecible, y lo que comúnmente entendemos por “castigo”, como la administración de una descarga eléctrica. En cambio, los refuerzos y castigos negativos son aquellos donde la interrupción del estímulo es lo que produce los cambios de la frecuencia del comportamiento, como puede ser encontrar una plataforma de escape en el *Morris water maze* o la remoción de agua en un animal privado de bebida, respectivamente. Hay que destacar que el estado motivacional modula el desempeño de los animales en aprendizajes de estos tipos. De esta manera, animales “hambreados” tienen respuestas más conspicuas en ensayos instrumentales recompensados con alimento (Balleine and Dickinson, 1998). Esto se debe a que la valoración que el animal hace de la recompensa no depende solo de esta, en cantidad y calidad, sino también del estado interno del propio animal, su estado motivacional, saciedad, su experiencia con el estímulo, etc. (Schultz, Dayan and Montague, 1997).

Dada la estrecha relación que guardan la acción y el resultado en los condicionamientos operantes, desde su descripción original se ha tratado de minimizar el grado de incerteza, imprecisión e incidencia del sesgo introducido por intervención humana durante la medición de los mismos en animales experimentales. En este sentido, muchos de los ensayos de condicionamiento operante se realizan en cajas automatizadas conocidas como cajas operantes. A partir de las mismas, es posible diseñar protocolos complejos, utilizar estímulos variados recurriendo a múltiples modalidades sensoriales en simultáneo, parear eventos con elevada precisión y minimizar la presencia humana al momento de las pruebas. Debido al éxito de estos dispositivos su uso en la actualidad no se encuentra restringido a tareas de condicionamiento operante, siendo comúnmente encontrados en tareas de condicionamiento clásico, como el condicionamiento por miedo.

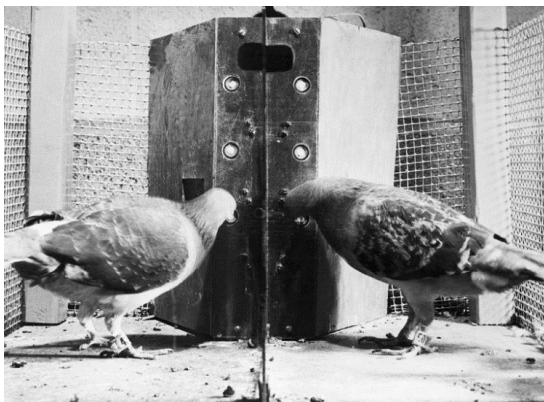


Figura I8: Imagen fotográfica de caja operante utilizada por Skinner en sus experimentos con palomas durante la década del 60', Fuente: Bettmann Archive.

Box 3 – Aprendizaje por refuerzo, modelando los circuitos del refuerzo

El condicionamiento operante es cercano en su proposición a las teorías del control óptimo, proveniente de la ingeniería, y al aprendizaje por refuerzo (*reinforced learning*), de las ciencias de la computación (Dayan and Balleine, 2002). Ambas teorías plantean cómo, sistemas de cualquier tipo ya sean biológicos o computacionales, son capaces de seleccionar sus acciones a fin de maximizar las recompensas y minimizar los castigos. De hecho, Andrew Barto, uno de los padres del aprendizaje por refuerzo, sugiere que el origen de esta teoría proviene de los estudios de Edward Lee Thorndike, psicólogo estadounidense de comienzos de siglo XX. De acuerdo a Thorndike, “dado un abanico de respuestas posibles para una determinada situación, aquellas que estén acompañadas, o seguidas de cerca, de satisfacción para el animal quedarán firmemente conectadas con la situación, de esta manera, cuando la situación vuelva a ser recurrente, la respuesta también será más probable” (Thorndike, 1911). A partir de sus planteos, establece Thorndike lo que define como aprendizaje por ensayo-y-error (*trial-and-error learning*) y formaliza la descripción del concepto de **refuerzo**, elemento necesario para teorías del aprendizaje más modernas. Continuando con lo planteado por Barto, el *reinforced learning* es un intento de estudiar el *trial-by-trial learning* desde el punto de vista de la computación y la inteligencia artificial, en particular. Uno de los muchos modelos planteados por el aprendizaje reforzado, y que merece mención en el contexto de esta tesis, es la arquitectura de actor-crítico (Barto, Sutton and Anderson, 1983; **Figura I9**).

Este modelo propone que el objeto sujeto de aprendizaje, el actor, está inmerso en un ambiente sobre el cual es capaz de ejercer acciones y que, a partir de las mismas pueden ocurrir diferentes resultados futuros. Qué resultados y qué debe hacer para obtener los más ventajosos depende de cada situación. Esta “situación” se lo conoce como *estado* y se lo considera como el conjunto de información que está disponible para el individuo, e incluye, por ejemplo, las claves ambientales, las claves individuales, el tiempo transcurrido desde que ocurrió un determinado evento pasado, etc. A partir de la información disponible en un *estado* dado se puede estimar resultados esperados para las acciones que realiza; el valor que se asigna a ese resultado esperado conforma el crítico, y contra él se comparará todo resultado finalmente obtenido. El repertorio de acciones posibles, se conoce como *política* y el actor debe elegir dentro de ellas cuál ejecutar en ese estado. Ahora bien, los resultados que finalmente ocurran pueden o no corresponderse con las expectativas, pudiendo superarlas o ser insuficientes. A partir de la discordancia entre lo esperado y lo obtenido, se computa una *señal de error en la predicción de la recompensa*, que le indica al individuo que la acción realizada o no está dando los resultados esperados y debe modificarse, o es mucho mejor de lo calculado, y debería repetirse. Esta señal permitirá al *actor* corregir su comportamiento en base a iteraciones hasta alcanzar el máximo beneficio posible.

En paralelo, sus acciones pueden o no hacerlo avanzar hacia otra situación, otro entorno, con información nueva donde las contingencias que aprendió pueden, o no, servir. En este nuevo *estado* el actor deberá re-aprender qué acción es la óptima. De manera equivalente, se propone que una *señal de error de predicción del estado* es computada cada vez que el ambiente cambia, permitiéndole al actor

predecir los cambios de estado que se avecinan y preseleccionar la política correcta para interactuar con el ambiente en el nuevo estado, aumentando la velocidad de adaptación al ambiente (Sutton and Barto, 1998).

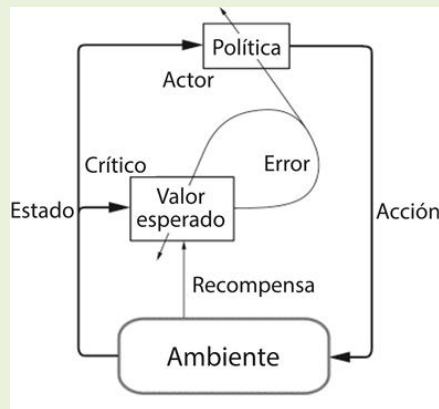


Figura I9: Esquema de la estructura básica del sistema de iteración planteado por el modelo de actor-crítico Adaptado de Sutton and Barto, 1998.

Una posible analogía al funcionamiento de este modelo podría encontrarse en el siguiente ejemplo: todos los días mi perro me pide salir a dar una vuelta. Él (el actor) ya aprendió que cuando tiene la necesidad de hacer pis, agarra su correa (una acción dentro de un abanico de acciones que conforman su política) y eso es una señal para su dueño de que es momento de dar un paseo. Gracias a esto, todos los días su acción y la respuesta que recibe en consecuencia se retroalimentan, incrementando la probabilidad de que vuelva a ocurrir en el futuro. Sin embargo, un día muy muy oscuro, en uno de esos paseos, se largó una tormenta monumental, una de esas que incluyen truenos y relámpagos. Nunca antes fue tan fácil hacerlo volver del parque. Mojarse hasta las orejas no era una de las cosas que esperaba al momento de darme la correa. A partir de ese único evento Pipo aprendió. Ahora sale al balcón antes de ir a buscar su correa. Busca claves (del estado) que le ayuden a predecir si vale la pena o no salir de paseo ese día.

El modelo de actor crítico, el más utilizado de la teoría de aprendizaje reforzado fue propuesto a comienzos de la década del 80'. Sorprendentemente, 15 años después, Schultz y col., describieron mediante registro electrofisiológicos de actividad de neuronas dopaminérgicas en VTA y SNpc de monos la existencia de un cambio en perfil de actividad de estas neuronas que refleja discrepancias entre recompensas esperadas y obtenidas. De acuerdo a los autores, las neuronas dopaminérgicas son excelentes detectores de la fidelidad con la que los eventos ambientales son predichos. Estas neuronas emiten señales positivas (codificada como un incremento en la frecuencia de disparo) si un evento apetitivo es mejor de lo que se había predicho, no emiten señal alguna si un evento es idéntico a lo predicho (no cambio en frecuencia de disparo); o emiten una señal negativa (disminución de frecuencia de disparo) si el evento apetitivo no ocurre, es de menor magnitud (*value discounting*), o si ocurre más tarde de lo esperado (*delay discounting*; Schultz y col. 1997). Al establecer una relación entre lo esperado y lo finalmente recibido, la señal codificada por las neuronas dopaminérgicas del VTA y SNpc podría tratarse del correlato biológico de la señal de predicción de recompensas planteada por los modelos de aprendizaje reforzado.

Bastante evidencia apoya la idea de que el estriado tendría un rol facilitando los dos tipos de aprendizajes asociativos (Balleine, Delgado and Hikosaka, 2007). Sin embargo, el estriado dorsal está especialmente implicado en aprendizajes que involucran condicionamiento clásico (Day y col., 2007), mientras que el estriado dorsal estaría relacionado exclusivamente con el control de aprendizajes instrumentales (Robbins, 2002). A su vez, existe trabajos que proponen que las regiones dorsolateral y ventromedial del estriado dorsal estarían implicadas diferencialmente en dos variantes de aprendizaje instrumental (Liljeholm and O’Doherty, 2012).

Ganglios de la base en tareas dirigidas a metas

Los aprendizajes instrumentales pueden ser divididos en dos grandes grupos; los **dirigidos a metas** son aprendizajes flexibles, fuertemente influenciados por la presencia de recompensa y por el valor de la misma. Además, son susceptibles de devaluación, es decir, pérdida total o parcial del comportamiento adquirido una vez que la recompensa pierde valor relativo (Graybiel, 2008). Por el otro lado se encuentran los **hábitos**, comportamientos fuertemente establecidos, inflexibles, independientes de la presencia de recompensa y por lo tanto insensibles a la devaluación (Graybiel, 2008). Para más información acerca de sus diferencias y clasificación revisar **Box 4- Ganglios de la base en formación de hábitos**.

BOX 4 - Ganglios de la base en formación de hábitos

De manera general podemos pensar que inicialmente todo condicionamiento operante comienza dirigido a metas (comúnmente en el laboratorio mediante la obtención de una recompensa al realizar una acción dada). La repetición de sesiones de entrenamiento, junto con la invariancia en las contingencias lleva a que la resolución de la tarea migre de un aprendizaje dirigido a metas a un hábito con el sobre-entrenamiento. Dado que la fase dirigida a metas y la consolidación en un hábito parecieran ser extremos de un continuo, se debieron fijaron los criterios para su diferenciación experimental. Esto generalmente se logra en base a establecer el valor de la recompensa para el animal, reflejada en su toma de decisiones. De esta forma se desarrollaron la mayoría de las pruebas conductuales que tratan de evidenciar el carácter “dirigido a metas” de una acción mediante la omisión o devaluación de la recompensa. Para hacerlo, en caso de que la recompensa sea alimento, los mecanismos son disminuir la probabilidad de entrega y por lo tanto reducir la contingencia acción-consecuencia (*action-outcome*), o mediante una reducción en su valor, tanto de manera directa, reduciendo la cantidad, o mediante una disminución en su valor relativo, llevando a la saciedad de los animales, retrasando la entrega del alimento, etc. (Balleine, Liljeholm and Ostlund, 2009).

En líneas generales, una tarea en la cual un animal realiza una acción o una serie de acciones con el fin de recibir una recompensa (como abundan en la literatura científica), a menos que se indique lo contrario, corresponde a una acción dirigida a metas. Realizo esta aclaración porque en un gran porcentaje de los trabajos pertinentes a esta área del conocimiento esto no se encuentra aclarado. De igual forma, solo se tiene la certeza de que nos encontramos en la fase habitual de la conducta cuando se realizaron los controles adecuados de devaluación. Por estas dos razones, se conoce abismalmente más acerca de conductas dirigidas a metas que de su contraparte habitual.

Existen estudios que apoyan una supuesta compartimentalización en las subregiones del estriado encargadas de la formación, mantenimiento y expresión de estas dos fases del comportamiento. Así, por ejemplo, varios trabajos encontraron que la lesión del DMS en ratas impide el aprendizaje de tareas instrumentales dirigidas a metas, mientras que lesiones en el DLS disrumpen la formación de hábitos (Yin, Knowlton and Balleine, 2004; Yin *et al.*, 2005, 2009; Yin and Knowlton, 2006). Si bien todavía existen discrepancias y numerosos puntos no han sido resueltos, la visión más consensuada propone un rol paralelo de estas dos regiones durante la adquisición de un aprendizaje dirigido a metas y una competencia entre las mismas para su consolidación como hábito. Alteraciones en la fisiología estriatal podrían acelerar o impedir este procesamiento paralelo y progresivo, resultando en una “sobre-consolidación” de conductas dirigidas a metas, volviéndolas patológicas.

Finalmente, existen pocos trabajos que aborden el rol de las ICE en la transición de conductas dirigida a metas – hábitos. Aoki *et al.* en 2018 inspirados en su trabajo previo, en el que encontraron cambios en flexibilidad cognitiva en una tarea dirigida a metas, abordaron la pregunta de si las ICE tenían un rol en la flexibilidad de conductas habituales. En su estudio, descubrieron que la activación quemogenética de las ICE no afecta la devaluación de una tarea que se volvió habitual pero facilitan su sustitución por otra equivalente (una vez establecido el hábito de apretar una palanca dentro de una caja opérate, hacerlas migrar a otra). Llamativamente, esta resultado se repetía independientemente si la región estimulada era la dorsolateral o la ventromedial. Por el contrario, la lesión selectiva no afectó ni la devaluación ni la sustitución de hábitos. En resumen, la activación de las ICE del estriado dorsal facilitaría la flexibilidad conductual no solo de tareas dirigidas a metas, sino también de hábitos, al permitir la sustitución de hábitos ya formados por otros nuevos, sin favorecer la devaluación de ninguno.

Trabajos en el grupo de Balleine (Revisado por Hart, Leung and Balleine en 2014) han determinado que tanto el estriado dorsal como el ventral están involucrados en los aprendizajes dirigidos a metas. Ellos proponen que si bien el estriado dorsal es necesario, principalmente durante la adquisición de las tareas, también es requerido durante la expresión de lo aprendido; hecho que se evidencia en que animales con lesión pre y post entrenamiento son insensibles a la devaluación tanto de la recompensa como de la contingencia estímulo-refuerzo (Yin *et al.*, 2005; Yin, Knowlton and Balleine, 2005). Por el otro lado, sugieren que estriado ventral no sería

una estructura crítica para la adquisición de tareas dirigidas a metas, sino que intervendría en el nivel de desempeño de la misma. Así, por ejemplo, animales con lesiones en esta subregión son sensibles a devaluación, pero presentaban respuestas de menor magnitud (Balleine and Killcross, 1994).

En particular, hay evidencia que apoya que las ICE son requeridas para la detección de contingencias nuevas en tareas instrumentales dirigidas a metas, como se demuestra en experimentos de lesión selectiva de las ICE (Aoki *et al.*, 2015) o en ratones de edad avanzada en donde ocurre una disminución natural en la densidad de las ICE (Matamales *et al.*, 2016). En este sentido, existen trabajos que proponen que una disminución en la actividad colinérgica estriatal ocasiona incrementos en la capacidad de adaptarse a cambios en reglas establecidas por el contexto. De manera contrapuesta, otros estudios señalan que la pérdida de ICE ocasiona un deterioro en el desempeño conductual en las mismas tareas, producto de la incapacidad de desarrollar conductas flexibles (Okada *et al.*, 2014; Bradfield and Balleine, 2017 vs. Aoki *et al.*, 2015, respectivamente). Sin embargo, en ninguno de los casos, animales con ablación de ICE presentan déficits o mejorías en la adquisición de las tareas dirigidas a metas aprendidas de manera primaria, sino en tareas nuevas o que sufrieron cambios algún tipo de cambio de regla.

Cambiando el enfoque que utilizamos durante esta sección, podemos pasar de preguntarnos *por qué* los animales hacen determinadas acciones a *cómo* resuelven una determinada tarea. Así, puede interesarnos clasificar la conducta de los individuos según qué estrategia utilizan para obtener recursos del ambiente o completar las pruebas a las que son sometidos en el laboratorio. Es interesante destacar que ha cobrado adeptos la idea de que la gran mayoría de los aprendizajes, incluso los más sencillos que históricamente hubieran sido categorizados como simples asociaciones estímulo-respuesta, involucraría elecciones activas, basadas en la experiencia y que derivan en estrategias comportamentales complejas (Durstewitz *et al.*, 2010; Koppe *et al.*, 2017).

Estrategias de resolución de tareas

Cuando hablamos de estrategia podemos entender su acepción más general, es decir un patrón ordenado de acciones destinadas a resolver con una determinada situación (Mintzberg, 1987). Las estrategias pueden ser innatas o adquiridas en base al aprendizaje, existiendo para la mayoría de las situaciones más de una estrategia posible. Así, se han identificado diferentes estrategias para la resolución de laberintos espaciales, cooperación entre pares (Nowak and

Sigmund, 1993) e incluso para sobrellevar situaciones emocionalmente estresantes (Scheier, Weintraub and Carver, 1986; Carver, Scheier and Weintraub, 1989).

Un ejemplo clásico en cuanto a diversidad y divergencias de estrategias puede encontrarse en la resolución de navegación espacial. Navegar en el ambiente, evitando obstáculos y encontrado alimento, congéneres o refugio, es una necesidad de prácticamente todas las especies animales. Existen numerosas tareas de navegación espacial en las cuales, tanto roedores como humanos, deben encontrar la localización de una zona particular en el marco de un espacio más amplio ya sea real o virtual. Así, tareas como el *Morris water maze*, el *Barnes maze*, el *nonmatch-to-place T-maze*, entre otros, han sido clásicamente utilizadas para evaluar funciones cognitivas incluyendo la memoria espacial. La literatura asociada a este tipo de tareas históricamente identificó al menos dos estrategias típicas de resolución. Una está basada en la elaboración de un **mapa cognitivo** en la cual se genera una representación abstracta del ambiente que incluye la posición absoluta del individuo, de la meta que se desea alcanzar y la relación de ambos con los estímulos que se perciben del ambiente. La otra estrategia está sustentada en la **asociación estímulo- respuesta (E-R)** entre una clave específica del ambiente y la respuesta cinética del propio animal, como por ejemplo doblar en una determinada dirección (Kattsoff, 1945; Tolman, 1948; Spence, 1950; Holland, 2008). La creación del mapa, por un lado, es sabido que se encuentra favorecida en ambientes de gran extensión, en aquellos enriquecidos con claves ambientales numerosas y salientes, en especial si estas son distantes. Estos mapas, le confieren al animal la habilidad de planificar trayectorias dentro del ambiente e integrar de manera flexible nueva información. Por el otro lado, las asociaciones E-R, se encuentran principalmente presentes en ambientes reducidos, ausentes de claves o con claves locales fuertes. Este tipo de navegación está estrechamente basada en la *ruta* recorrida en experiencias previas, es un sistema simple en el que es más dificultoso integrar información nueva. A su vez se la propone como una estrategia más “eficiente” en tanto y en cuanto reduce el uso de recursos cognitivos al caracterizarse por ser automatizada y no depender tan críticamente de la atención a claves ambientales (Johnson, van der Meer and Redish, 2007; Vorhees and Williams, 2014).

Estas estrategias reciben distintos nombres según la prueba en la que se observen o fueran descritas y el énfasis que se desee realizar a algún aspecto en particular. En este sentido, se utiliza la terminología *espacial vs serial* especialmente en la literatura de memoria, donde se desea contrastar el tipo memorias involucradas (declarativa o procedural, Sarkisyan and Hedlund, 2009); o puede encontrarse como *alocéntrica vs egocéntrica*, si se pondera la

pregunta acerca de qué tipo de claves se utilizan al momento de la navegación (ambientales o propias, Johnson, van der Meer and Redish, 2007).

La clasificación aquí presentada es perfectamente compatible con las definiciones brindadas en la sección anterior. De esta manera, por ejemplo, un animal en un determinado ambiente, puede realizar una acción dirigida a metas, para lo cual se vale de una estrategia que consiste en la creación de un mapa cognitivo complejo que le permitirá resolver ese ensayo y todos los siguientes dentro de una sesión. Pero, con el paso del tiempo, al realizar la misma acción durante muchos días, esa conducta puede volverse habitual, realizar esa acción independientemente de si la recompensa está presente o no y valerse exclusivamente por claves motoras. Esto es precisamente lo que encontró Hicks en su trabajo de 1964, y donde concluyó que el sobreentrenamiento en un laberinto en cruz DS, tarea diseñada para distinguir la estrategia de navegación dirigida a metas utilizada por el animal, hace que las ratas migren de una estrategia espacial a una E-R (para más información acerca el protocolo de esta prueba, dirigirse a *Materiales y métodos*).

De lo visto en aquel trabajo, se desprende que los aprendizajes basados en mapas cognitivos son aprendizajes menos rígidos, están generalmente presentes en ambientes novedosos, cambiantes, o con escasez de recursos, donde se pondera la exploración por sobre la explotación. En contraparte se encuentran los aprendizajes E-R fácilmente observables en ambientes invariantes o con abundancia de recursos, donde se prioriza la explotación en desmedro de la exploración

Estos cambios o **migraciones** en las estrategias utilizadas son comunes en la vida de todos los animales y frecuentemente encontrados en pruebas comportamentales en el contexto del trabajo en laboratorio. Sin embargo, estas migraciones dependen de la situación en la que ocurren para ser adaptativas. Esto se puede observar, por ejemplo, si analizamos la prueba de Barnes. En ella el animal es expuesto reiteradamente a una plataforma elevada, bien iluminada, sin refugios evidentes, y que resulta marcadamente aversiva. La única opción de escape es encontrar una caja oculta debajo de uno de muchos agujeros que se encuentran en el borde exterior de esta plataforma (**Figura I10**). La posición dentro de la plataforma del agujero que conduce al escape se mantiene constante en relación a las claves distales presentes en la habitación (Sunyer *et al.*, 2007; Ver **Materiales y métodos** para una descripción en detalle). En esta prueba se ha descrito que los animales en los primeros ensayos realizan una búsqueda al azar, siguiendo su impulso natural hacia la exploración de ambientes. Luego de varios ensayos, pero dentro de fases iniciales de la prueba, los animales adoptan una estrategia que consiste en

explorar de manera consecutiva y secuencial, ya sea horaria o anti horaria, los agujeros del borde hasta encontrar el de escape. En esta etapa, por consiguiente, prima una estrategia de resolución serial. Sin embargo, en fases finales, al notar, presumiblemente, que el ambiente es invariante y que las claves ambientales son buenas predictores de la posición del agujero de escape, los animales tienden a adoptar una estrategia espacial (Pompl *et al.*, 1999; O'Leary and Brown, 2013). En este caso, el valor adaptativo residiría en que la dedicación de recursos cognitivos en atender claves salientes se ve devuelta con una menor distancia recorrida y tiempo invertido en territorio hostil.

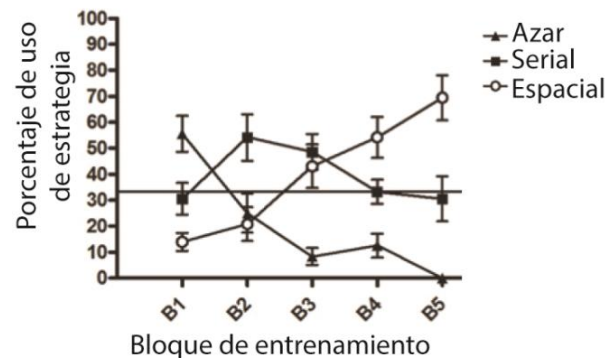


Figura I10: *Izquierda*, fotografía de laberinto de Barnes, ubicado en habitación acondicionada para la realización de la prueba. *Derecha*, porcentaje de elección de estrategias dentro de un laberinto de Barnes. Cada bloque de entrenamiento corresponde a seis ensayos. Adaptado de O'Leary y Brown, 2013.

Otro aspecto del cual se conoce bastante es la dependencia de estructuras anatómicas concretas para la ejecución de estas estrategias. En trabajos donde se realizó una lesión o inactivación farmacológica del hipocampo se afectó la expresión de tareas que requieren de navegación espacial. Por contraparte la ejecución de estrategias procedurales como las E-R requiere de la integridad del estriado (A modo de ejemplo: laberinto de ocho brazos, McDonald and White, 1994; laberinto en cruz, Packard and Mcgaugh, 1996; laberinto de Barnes Harrison *et al.*, 2006; Rueda-Orozco *et al.*, 2008). Sin embargo, esta clasificación, en superficie sencilla, presenta matices habiendo trabajos que plantean que la lesión del estriado ventral impide la adquisición de estrategias espaciales y egocéntricas (De Leonibus, Oliverio and Mele, 2005).

Si nos adentramos en el estudio de la participación de las ICE en la selección y uso estrategias de navegación espacial, encontramos una serie de trabajos que surgieron a comienzos de este siglo en los que se estudió los niveles de ACh en ratas mientras realizaban la tarea laberinto en cruz con dos soluciones (McIntyre, Marriott and Gold, 2003). En los mismos, se describió que los niveles extracelulares de ACh en hipocampo y estriado (y en particular, su

cociente) resulta predictiva de la estrategia a utilizar tanto en animales *naïve* como en animales sobreentrenados. Además, en etapas iniciales del comportamiento los niveles extracelulares de ACh en estriado son bajos incrementándose a medida que la tarea progresa, hecho que correlaciona con la elección de estrategias estriado-dependientes (Chang and Gold, 2003). Si bien los sistemas colinérgicos en hipocampo y en estriado son completamente independientes (al menos desde lo meramente anatómico), pareciera haber una relación entre el nivel de acetilcolina y el peso relativo de la estructura en cuanto al control de la estrategia a utilizar.

En el contexto del trabajo en laboratorio, la **navegación espacial en tareas dirigidas a metas** es una herramienta sumamente útil ya que refleja en simultáneo múltiples aspectos relevantes del aprendizaje desde un punto de vista etológico (Penner and Mizumori, 2012). Dentro de estas pruebas, los animales deben percibir el ambiente, aprender su significado y seleccionar qué hacer basándose en lo que han aprendido. Por esto mismo, las tareas de navegación pueden ser usadas con fines tan diversos como la investigación de aspectos comportamentales y fisiológicos de la percepción sensorial, aprendizaje y toma de decisiones, elección y ejecución de planes motores y consolidación y actualización de memorias (Penner y Mizumori, 2012). Esto permite sortear falencias e interpretaciones artificiales que aprendizajes más sencillos conllevan. Es importante resaltar que en contextos ecológicos reales existen innumerables causas ambientales o internas que propician que los animales realicen ciertas acciones. Desde el punto de vista de quienes llevan a cabo las investigaciones comportamentales controladas en laboratorio es un verdadero desafío la creación condiciones experimentales que disocien claramente aquello que el investigador pretende que el animal haga (y la interpretación que se hace de eso) de aquello que el animal finalmente hace y por qué. Koppe y col. en 2017 escribieron un interesante trabajo en el que abordan estos temas ejemplificando esta problemática en particular utilizando el clásico *T-maze*, laberinto tradicionalmente empleado para evaluar la memoria de trabajo en roedores. De acuerdo a los autores, es posible hacer una reinterpretación de algunos estudios publicados si se toma en cuenta la estrategia de resolución utilizada por los animales. A partir de ese análisis, concluyeron que ciertos déficits reportados podrían explicarse porque la estrategia utilizada por los animales no era la esperada y no por una deficiencia en el aprendizaje y memoria como se propuso en los trabajos originales (Cowen and Mcnaughton, 2007). Puede entonces, alerta Koppe, haber “estrategias alternativas” o errores de diseño que no nos resulten obvios, pero que los animales exploten con el fin de sacar el máximo *provecho* (dicho sea de paso, incluso el concepto de *qué es benéfico* no es ajeno a nuestra perspectiva comparada con la de los animales). Esta alerta reviste especial relevancia cuando se utilizan pruebas comportamentales

para estudiar modelos animales de desórdenes neurológicos o psiquiátricos. En ellas, el repertorio de conductas manifestado por los individuos puede, con suma facilidad, escapar al previamente establecido por los y las investigadores/as sobre todo en tareas puestas a punto con animales control.

Alteraciones en el funcionamiento de los GB y trastornos neuropsiquiátricos

Alteraciones tanto en la selección y el control de conductas dirigidas a metas como en la consolidación de hábitos podrían ser críticas para el desarrollo de diferentes desórdenes psiquiátricos (Winstanley, Eagle and Robbins, 2006). Es así que existen numerosos reportes clínicos mostrando alteraciones funcionales en los ganglios de la base, principalmente en el estriado, en desórdenes como el trastorno obsesivo-compulsivo, el síndrome de Tourette (ST), adicciones a drogas de abuso, trastornos del espectro autista y el déficit de atención con hiperactividad (ADHD, del inglés *attention deficit hyperactivity disorder*; Hyman, Malenka and Nestler, 2006; Ahmari *et al.*, 2013; N.J. *et al.*, 2017). Muchos de estos trastornos son altamente comórbidos y presentan cierta signosintomatología en común (Cabarkapa *et al.*, 2019). Si sumamos el hecho de que en todos los casos la causa fisiopatológica es desconocida, se ha llevado a pensar que probablemente existan factores etiológicos compartidos entre estas entidades médicas. Se ha propuesto, por ejemplo, que el ST y los trastornos del espectro autista estén causados por desbalances en la excitación-inhibición de la vía córticoestriatal y que el origen de dicho desequilibrio sea debido a una disfunción de las interneuronas estriatales seguida de la consecuente desinhibición del área en cuestión (Rapanelli, Frick and Pittenger, 2017). Centrándonos en el ST, existen estudios que reportan una reducción en el número de interneuronas PV⁺ del estriado e ICE a partir del estudio post mortem de cerebros de pacientes con esta enfermedad (Kataoka *et al.*, 2010). Estudios subsiguientes confirmaron estas observaciones al mostrar la existencia de una regulación negativa de un grupo de genes de expresión enriquecida en interneuronas y en especial en las ICE (Lenington *et al.*, 2014) en este desorden en particular.

Sin embargo, un estudio reciente utilizando la técnica de PET realizó un seguimiento de la expresión de un transportador vesicular de acetilcolina. A partir de él, infirieron que la densidad de ICE está conservada en personas con ST al compararlos con los sujetos control (Albin, 2018). Esto ha llevado a los autores a hipotetizar que los datos obtenidos en los estudios post mortem pueden estar relacionados a la enfermedad pero no causados por la ella, como ser

efecto de la medicación. Sin embargo, las diferencias metodológicas y epidemiológicas impiden aún llegar a una conclusión certera al respecto, quedando aún bastante por comprender respecto al rol de las ICE en la fisiopatología del ST.

Si bien el ST es el caso más paradigmático de un desorden posiblemente causado por un desperfecto en la señalización colinérgica en el estriado, el estudio de la disfunción de las ICE reviste una relevancia en sí misma en tanto provee, desde una visión que va desde los elementos más pequeños y sencillos de un sistema hacia los más grandes y complejos (*bottom-up perspective*), un ejemplo de la desregulación del circuito estriatal mediante una falla en sus elementos de control y modulación. Me gustaría enfatizar que no es siempre necesaria la creación de modelos animales que recapitulen de manera completa el cuadro de una dada entidad clínica, siendo que puede resultar interesante el modelado y la búsqueda de relaciones causales entre alteraciones fisiopatológicas puntuales bien definidas y el surgimiento de signos clínicos simples, que podrían emerger en una diversidad de patologías con orígenes diferentes.

IV) Disfunción de las ICE – Buscando causalidad

Experimentos farmacológicos

La literatura que busca dilucidar el rol biológico de las ICE dentro del circuito estriatal cuenta con varios años de historia. Frente a los numerosos experimentos descriptivos, característicos de las décadas pasadas, en los últimos años, amén de los avances técnicos y del conocimiento, fue posible emprender ensayos que permitan demostrar causalidad. Dentro de estos ensayos causales podemos partir de los primeros trabajos que buscaron la inactivación de este tipo celular mediante acción farmacológica hasta llegar a los más recientes que lo hicieron mediante su lesión o inactivación selectiva utilizando técnicas genéticas de vanguardia, como animales transgénicos, DREADDs (*designer receptor exclusively activated*) u optogenética.

Ya desde sus comienzos, los estudios farmacológicos sugirieron un rol de la acetilcolina en la flexibilidad conductual. En tal sentido, se ha visto que el tratamiento con antagonistas de receptores colinérgicos de tipo M1 (comunes en las postsinápsis colinérgica, Breakefield *et al.*, 2008) aplicados en el DMS lleva a peores desempeños durante la fase de reversión en tareas de discriminación (Tzavos, Jih and Ragozzino, 2004). En el mismo sentido, tratamiento con agonistas de receptores tipo M2 (comunes en la presinápsis colinérgica con función de autoreceptor regulador, Breakefield y col. 2008), llevaron resultados similares (Ragozzino *et*

al., 2009). Esto es coherente, siendo que el efecto de los antagonistas postsinápticos impide la acción endógena de acetilcolina y la presencia de agonistas presinápticos gatilla los fenómenos de retroalimentación negativa que conducen a una reducción de la liberación de acetilcolina. De todas formas, debido a la dificultad en la precisión de las dosis, la existencia de receptores colinérgicos en terminales dopaminérgicos e interneuronas GABAérgicas y el posible efecto ubicuo de los tratamientos por efectos de difusión, es que las herramientas farmacológicas son de alcance limitado para establecer a ciencia cierta el rol de las interneuronas colinérgicas en este tipo de tareas. Por esta razón, en los últimos años con el advenimiento de nuevas técnicas se migró a manipulaciones más precisas para responder a estas preguntas.

Experimentos de ablación de ICE

Kaneko *et al.* en 2000 realizaron el primeros trabajos que buscaron explorar el efecto de la eliminación selectiva de las ICE. Utilizando una **ablación unilateral** de las ICE, mediada por inmunotoxina, encontraron que esa lesión provoca desbalances en sistemas dopaminérgicos. Estos se caracterizaban por un incremento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, una consecuente disminución de los receptores D1 y D2, y pérdida de control dopaminérgico en estos sistemas; demostrando este trabajo la importancia del equilibrio acetilcolina-dopamina en la integración sináptica de los ganglios de la base.

Kitabatake *et al.* en 2003 realizaron el primer trabajo fuertemente enfocado en el efecto conductual de la lesión selectiva de las ICE, nuevamente mediante inmunotoxina. La lesión del 80% de estas interneuronas ocasiona una disminución en el desempeño de tareas de carácter procedural y con altos requerimientos de la memoria de trabajo, pero sin déficits en pruebas de destreza motora o de navegación espacial, medido en pruebas como *rotarod* y *Morris water-maze*, respectivamente. Sin embargo ningún otro trabajo posterior que realizó una lesión selectiva de este tipo de interneuronas mediante un método de ablación alternativo y más selectivo produjo fenotipos similares. Una posible explicación se desprende de lo mencionado por Xu *et al.* acerca de la técnica de lesión mediada por inmunotoxina. En su trabajo de 2015, describen que ese procedimiento produce daño inespecífico aún en los controles negativos, dificultando su uso como estrategia de lesión selectiva en modelos de ablación de ICE en ratones.

Ciertos trabajos optaron por la inactivación optogenética y han mostrado que las ICE del núcleo accumbens están involucradas en la señalización de estímulos aversivos y apetitivos.

Esto se ejemplifica con el trabajo de Witten *et al.*, 2010 en 2010, donde encontraron que si bien la inhibición optogenética directa de ICE del núcleo accumbens no resulta aversiva, es capaz de impedir el condicionamiento de preferencia al lugar (*conditioned place preference*) dependiente de cocaína, un aprendizaje muy robusto y duradero. Por otro lado, su inactivación por medio de la activación optogenética de la vía GABAérgica VTA-estriado que, según los autores, genera respuestas que recapitulan la pausa característica de las ICE frente a estímulos salientes, mejora la capacidad de discriminación de los animales en tareas de asociación con estímulos aversivos (*fear conditioning*; Brown *et al.*, 2012).

Recientemente Okada y colaboradores (2014) luego de eliminar selectivamente las ICE del estriado dorsal mediante inmunotoxina, encontraron que los animales se desempeñaban normalmente en una prueba de discriminación del lugar (*place discrimination*) y, sorprendentemente, presentan mejores desempeños durante las fases de aprendizaje de reversión y extinción. Efecto similar fue el que lograron mediante un *knock-down* por expresión viral de un shRNA anti el receptor muscarínico M4, sugiriendo que el efecto de las ICE sobre la flexibilidad podría estar mediada por esa vía. Los autores proponen que la eliminación de estas neuronas genera un aumento en la flexibilidad cognitiva sin afectar el aprendizaje de una tarea de discriminación.

Sin embargo, el año siguiente, Aoki y col. mediante el mismo tipo de lesión describieron que ratas deficientes de este tipo celular en el estriado dorsal manifiestan un incremento el número de errores por perseverancia dentro de una prueba de aprendizaje instrumental operante cuando se modifica la asociación acción-recompensa haciendo relevante una dimensión sensorial diferente (*extradimensional set-shifting*). La modificación de este parámetro es considerado un deterioro de la flexibilidad conductual. A diferencia de trabajos previos (Bradfield y col., 2014) no encontraron que la pérdida de tono colinérgico producido por la lesión produzca cambios en el desempeño general de la reversión (el *número* de errores totales que cometen los animales lesionados es igual al de los controles, lo que se modifica es el *tipo* de error). Por tal motivo, los autores concluyeron que la ablación de las ICE conduce a un cambio en la estrategia que los animales lesionados utilizan para hacer la reversión. Este trabajo es el primer reporte de las ICE modificando estrategia comportamentales, sin embargo, este apartado está pobremente explorado siendo que no utilizaron pruebas específicas para evaluar estrategias, la magnitud del efecto es baja y solo utilizan un paradigma comportamental para demostrarlo. Las diferencias metodológicas y los resultados contrapuestos sobre si las ICE

favorecería o suprimirían la flexibilidad invitan a continuar estudiando el tema para establecer de manera definitiva el rol de las ICE y del estriado en dichos procesos.

A partir de los reportes mostrando reducción en el número de interneuronas ICE y PV⁺ en análisis de cerebros post mortem de pacientes con ST (Kataoka y col., 2010; Lenington y col., 2016) se incrementaron los esfuerzos por intentar dilucidar si estas descripciones eran eventos causales de la fisiopatología de la enfermedad o meros epifenómenos. En post de hacerlo, surgió una marcada preocupación por encontrar un modelo animal que emule esas deficiencias, con foco especial en buscar anomalías comportamentales compatibles con la signosintomatología del ST. Con este lente particular surge el trabajo del grupo de Pittenger (Xu y col. 2015) donde realizaron una lesión selectiva de cerca del 50% de las ICE del DMS o del DLS. En él describen que los animales lesionados presentan un leve déficit de coordinación motora (medida como un peor desempeño en el *rotarod*) y manifiestan estereotipias. Sin embargo, las “conductas estereotipadas” reportadas consisten solamente en un incremento de tiempo de acicalamiento y está solo presente ante la inducción con agente estresores o inyección de anfetamina. Del mismo grupo y con el mismo foco, Rappanelli y col. (2017) realizaron una lesión mediada por toxina diftérica de las ICE, las interneuronas PV⁺ y una delección conjunta. De acuerdo a sus reportes, la lesión de ambas subpoblaciones produce un incremento en el número de movimientos estereotipados, medido como eventos de acicalamiento; y una disminución de la exploración social. Además, tanto la lesión conjunta como la de las interneuronas PV⁺, llevó a incrementos de los comportamientos asociados a ansiedad. Ninguno de los fenotipos mencionados fue hallado en los animales que contaban exclusivamente con lesión de las ICE. Es interesante destacar que los resultados vistos solo fueron encontrados en los animales machos, hecho compatible con la mayor prevalencia en varones de diversas entidades neuropsiquiátricas, como autismo, Tourette. A pesar del interés presente en el campo en encontrar un modelo animal de elevada validez de apariencia con el ST, los mismos autores, a la luz de los resultados, se ven obligados a mencionar que los fenotipos encontrados rememoran más fielmente eventos fenomenológicos presentes en trastornos del espectro autista que aquellos presentes en el ST, a pesar de que la manipulación realizada poco esté relacionado a los primeros. Los estudios del grupo de Pittenger se muestran sesgados hacia la búsqueda de modelos animales, quedando numerosos interrogantes en lo referente a la validez de apariencia de los mismos tanto en el caso de ST como de autismo.

Por el contrario, resultados de nuestro grupo (Martos y col. 2018) sugieren que la lesión exclusiva de las ICE produce un incremento de conductas repetitivas, en particular aquellas

dirigidas hacia objetos, manifestada como una exploración exagerada de objetos ya conocidos; y hacia congéneres, puesta en evidencia por la exploración de manera tipo-compulsiva y en forma de patrones repetitivos, estructurados e invariantes en la que los animales lesionados exploran otros animales previamente explorados. En cambio, no encontramos conductas repetitivas dirigidas hacia el propio individuo (no hay exacerbado acicalamiento, ni comportamientos tipo TIC). Nosotros, a diferencia de Kitabatake y col 2000, no observamos que la lesión ocasione dificultad en la ejecución de tareas que requieran activamente de memoria de trabajo. En nuestro estudio los animales lesionados tampoco ven afectadas sus funciones motoras básicas.

Como se puede observar en este breve repaso, a lo largo de los últimos 20 años se ha intentado mediante muchas y variadas intervenciones observar el efecto del silenciamiento de la actividad colinérgica estriatal. En relación a los apartados técnicos, en la literatura podemos encontrar una gran variedad metodológica, entre la que podemos mencionar surtidos mecanismos de lesión, sitios de inyección con diferentes regiones del estriado como objetivo, heterogéneos grados de degeneración alcanzados, un amplio repertorio de fármacos colinérgicos utilizados, entre otros. Esto, lógicamente, deriva en que existan múltiples observaciones, resultados discordantes y diferentes interpretaciones de los mismos que incluso, puedan llegar a ser incompatibles. Así, existe evidencia contradictoria acerca del efecto que la lesión de las ICE en tareas dirigidas a metas dependientes de flexibilidad conductual, con reportes indicando tanto mejoras como deterioros en el desempeño. En el mismo sentido, trabajos sugieren un rol clave de este subtipo celular para tareas con altas demandas de memoria de trabajo, ejecución de funciones motoras básicas y señalización de eventos salientes apetitivos o aversivos; mientras que otros estudios indican un efecto neutral en estos apartados. De igual forma es remarcable que, a pesar de lo que se especuló a partir de la caracterización inicial de estas interneuronas y la correlación de su actividad con eventos *a priori* relevantes en las tareas conductuales (Kimura 1984, entre muchos otros), los fenotipos encontrados son relativamente sutiles, sin que se observen impedimentos severos en cuanto aprendizaje en diferentes paradigmas conductuales. En líneas generales los animales con inactivación o lesión de las ICE son capaces de aprender prácticamente la totalidad de las tareas a las que son sometidos, con desempeños igualmente satisfactorios. Además, ninguna de las observaciones destacadas hace referencias a limitaciones motoras, lo que fortalece los roles propuestos de las ICE como agentes moduladores de funciones cognitivas-ejecutivas más cercanas al planeamiento y selección de acciones que en su ejecución. Asimismo, es un común denominador de todos estos reportes el hecho de que las ICE no parecen ser necesarias para la

adquisición de aprendizajes primarios sencillos, donde la elección del rumbo conductual a tomar es trivial; sin embargo, cuando múltiples planes motores entran en conflicto, ya sea en los casos de tareas de reversión o contextos sociales de exploración, la señal colinérgica podría ser determinante. Habiendo hecho mención de estas generalidades, pasemos a comentar acerca de aquellos roles postulados para las ICE relevantes en el contexto de nuestro estudio.

V) Roles biológicos propuestos de las ICE

Desde su caracterización inicial a comienzo de la década del 80' las interneuronas colinérgicas estriatales han disfrutado de una marcada popularidad, que poco correlaciona con su escasa abundancia relativa. Sin embargo, a lo largo de estos 40 años múltiples **roles biológicos han sido propuestos** para este subtipo neuronal. Algunos se mantienen hasta la fecha y otros han sido reemplazados por explicaciones superadoras que buscan explicar los datos que año a año se generan.

Rol de las ICE en aprendizajes procedurales

Para comienzos de este siglo, ya era sabida la importancia del estriado en el control y la ejecución de aprendizajes procedurales, es decir, la adquisición de aquellas habilidades motoras que no suelen requerir supervisión consiente o atencional. En este contexto, el grupo de Kitabatake y col. (2003) realiza el primer trabajo que apuntó a la lesión selectiva de las ICE y posterior caracterización conductual. Tras lesionar cerca del 80% de las ICE a lo largo y ancho del estriado, encontraron que la ablación produce déficits en el desempeño en aprendizajes procedurales asociados a tonos y en memoria de trabajo en tareas de navegación sin afectar balance motor ni memoria espacial. A partir de esos resultados, los autores sugirieron que estas interneuronas jugarían un rol central en la regulación de los circuitos involucrados en los aprendizajes procedurales dependientes de recompensa y en memoria de trabajo. Laplante *et al.*, (2012) realizaron una lesión de las ICE del estriado ventral mediante la misma técnica y encontraron igualmente déficits en memoria de trabajo en una tarea de alternancia con retardo en un laberinto de T. Al medir niveles de DA en el la corteza mPFC (estructura históricamente vinculada a esta función ejecutiva) hallaron una reducción en la disponibilidad de la misma que correlaciona con el desempeño alterado, sugiriendo que una alteración del balance dopaminérgico sería el mecanismo a través del cual la lesión de las ICE produce sus efectos.

Como ya se mencionó anteriormente, si bien avanzados en su momento, los estudios con inmunotoxinas han quedado algo desactualizados en cuanto a su abordaje metodológico y posible interpretación de los resultados ya que estudios recientes mostraron que la especificidad inicialmente atribuida a estas toxinas no era tal, habiéndose reportado alteraciones inespecíficas en los animales tratados (Xul y col., 2015)

Rol de ICE en motivación y atención

Que las ICE tengan un rol en el control de la motivación es, probablemente, la primer hipótesis que se ha planteado para este tipo celular. Esta visión surge de las primeras observaciones realizadas en primates, donde se encontró que en tareas de aprendizaje asociativo pavloviano las ICE migran su clásica respuesta de pausa, inicialmente asociada a recompensa, hacia la clave predictora de la misma; pero si luego la recompensa primaria es presentada sin clave predictora, la respuesta ante la recompensa *per se* es restablecida (Sardo *et al.*, 2000, **Figura I6**) Además, se observó que la respuesta de las ICE es independiente de la naturaleza del estímulo obtenido, es decir, responden tanto ante estímulos apetitivos como aversivos. En cambio, prácticamente ninguna neurona presenta cambios de actividad frente a estímulos neutros o asociados a otros aspectos de la conducta (Aosaki y col, 1994). Interpretaciones contemporáneas a estos estudios aseveraban que las ICE responden a eventos de significación motivacional (Apicela, 2002). Sin embargo revisiones más recientes del mismo grupo mencionan la dificultad en discernir entre aquellos efectos causados por aspectos motivacionales de aquellas ocasionados por cambios atencionales.

En este apartado, considero que vale la pena detenernos en el modelo de Gerfen y Surmeier (2011), que plantea detalladamente y desde el punto de vista del mecanismo, integrando gran parte de lo hasta ahora mencionado en esta introducción, el fino control temporal brindado por la señal colinérgica abogando a una función atencional y del control motor. Este modelo propone que, como consecuencia del fenómeno de salva-pausa, existe un incremento transitorio de la concentración de ACh estriatal que tiene un doble efecto sobre las NEM. Inicialmente, y vía receptores M2 presentes en los terminales presinápticos de la vía córticoestriatal, disminuye la probabilidad de liberación de glutamato sobre las dos subpoblaciones de NEMs. Además, vía receptores nicotínicos (receptores inotrópicos), produce una inhibición transitoria de las NEM de las dos vías. Estos efectos son de corta duración manteniéndose en el orden de los pocos milisegundos. Por otro lado tendría un efecto selectivo

sobre las neuronas de la vía indirecta, actuando mediante el receptor de tipo M1, aumentando su capacidad de respuesta frente a entradas corticales pero, debido a la naturaleza metabotrópica del receptor, esta facilitación se extendería en el orden de los segundos. Como resultado del sensado del estímulo y la subsiguiente estimulación talámica ocurre entonces una interrupción momentánea del flujo de la información de la corteza al estriado, un aumento durante un período ventana de la excitabilidad de las neuronas de la vía indirecta y una consecuente interrupción de la promoción de movimiento. De acuerdo a este modelo, ante estímulos novedosos, las interneuronas colinérgicas interrumpen la competencia entre las vías directa e indirecta en la selección de planes motores, favoreciendo a estas últimas, interrumpiendo la conducta en curso permitiendo dirigir la atención a eventos nuevos de potencial valor. Una vez establecida la asociación entre claves ambientales y conducta, la reaparición de las claves evocará la respuesta coordinada de ICE y neuronas dopaminérgicas. En esta instancia las variaciones de acetilcolina y dopamina favorecerían la selección de la conducta adecuada en el contexto actual (Graybiel, 2008). Hay que señalar, sin embargo, que elementos necesarios para la creación de este modelo se basa en resultados obtenidos en registros *ex vivo*, mediante electrofisiología en rebanadas de cerebro, y no ha sido reproducido fehacientemente *in vivo*.

Otra interpretación de los mismos eventos sugiere que la interrupción de la actividad tónica de las ICE que ocurre durante la pausa, ofrece un cese en las señal colinérgica del estriado que lleva a una desinhibición de las terminales córticoestriatales (Kaneko y col. 2000) permitiendo el libre flujo de la información hacia el estriado. Esto ocasionaría mejorías en aprendizajes con altos requerimientos de circuitos motores, como ser los aprendizajes procedurales (Kitabatake y col. 2003).

Volviendo a la disyuntiva motivación-atención, los trabajos que muestran un efecto de la manipulación de la señal colinérgica sobre la flexibilidad conductual podrían arrojar cierta luz al respecto. En estos estudios (ya mencionados en la sección anterior pero que serán nuevamente abordados en el párrafo siguiente) los animales son capaces de aprender a la perfección fases iniciales de las pruebas, mientras que se observa una caída en desempeño cuando es requerido el aprendizaje de una nueva regla (Bradfield, y col 2013; Aoki y col. 2015). En estos casos, puede ser planteado que para que ocurran aprendizajes de nuevas reglas, es requerido que se detecten nuevas claves predatorias de la regla y se lleve a cabo una elección de qué conductas ejecutar en este nuevo contexto. Todo esto, produce una carga cognitiva mayor a la requerida inicialmente, ocasionada por la nueva demanda atencional. De acuerdo a los autores, una falla

en el procesamiento de esta demanda atencional podría ser la causa de los déficits encontrados. Sin embargo, realizar una demostración que permita diferenciar inequívocamente entre los efectos motivacionales y atencionales requiere de un importante planificación y de la elección de paradigmas comportamentales idóneos, y esto es algo que aún queda por saldar (Apicella, 2017).

Rol de las ICE en flexibilidad cognitiva

En los últimos 5 años ha ganado fuerza la hipótesis de que las interneuronas colinérgicas serían elementos esenciales en el correcto funcionamiento de la flexibilidad comportamental ante cambios contextuales. Un trabajo pionero en este sentido es el realizado por el grupo de Balleine (Bradfield y col., 2013), donde producen una disrupción de la señalización colinérgica en ratas (tanto mediante la interrupción de las aferencias del núcleo parafascicular del tálamo al estriado como mediante el uso de agonistas de receptores M2). A partir de estas manipulaciones, encontraron que los aprendizajes dirigidos a metas que son adquiridos primero no se ven afectados, sin embargo, si llevan al animal a una reversión de la contingencia aprendida, los aprendizajes primarios y secundarios interfieren, llevando a malos desempeños en la realización de ambas tareas.

En una línea similar, Aoki y col. (2015) encontraron que la lesión de las ICE en el estriado dorsal, utilizando la técnica de inmunotoxina, lleva a los animales a cometer un mayor número de errores de perseverancia luego de un cambio de regla dentro de la tarea (es decir, tienden a realizar una conducta que realizaban con la regla anterior). Por el contrario, el trabajo de Okada y col. de 2015 apunta en sentido inverso, y sugiere que la ablación selectiva de las ICE del estriado, mediante la misma técnica, ocasiona incrementos en la flexibilidad conductual en ratas cuando se revierte la contingencia en un laberinto en forma de T, haciendo que los animales lesionados logren adaptarse más rápidamente a la nueva contingencia. De cualquier manera, más allá de ciertas discrepancias, el conjunto de estos trabajos sugieren que alteraciones en la transmisión colinérgica lleva a modificaciones en la capacidad de los animales a adaptarse a cambios ambientales (Apicella, 2017). Trabajos recientes proponen que la participación de las ICE en flexibilidad conductual no estaría limitada a la adaptación a cambios en tareas dirigida a meta sino también en hábitos, al permitir la sustitución de hábitos ya formados (Aoki y col., 2018).

Rol de las ICE en señalización del error de predicción de estados

A partir de los ya mencionados resultados encontrados por su grupo (Bradfield y col, 2013), Balleine propone que cuando los animales están realizando una tarea instrumental ya aprendida (en particular una que se compone de diferentes bloques, dentro de los cuales existen asociaciones acción-respuesta propias de cada bloque), ciertas claves ambientales le indican al animal en qué estado de la tarea se encuentra (entendido por estado, un cierto bloque). Las teorías de aprendizaje reforzado basado en modelos (para más información ver **Box 3**) plantean que para poder establecer estas asociaciones clave-ambiental>estado>acción-del-animal>respuesta exitosamente, e incluso predecir estados futuros, es necesaria la creación de modelos del ambiente. Para eso el animal utiliza predicciones hechas en transiciones entre estados pasados y analiza qué predicciones fueron exitosas y cuáles erróneas, valiéndose particularmente de estas últimas, a las que llama *señal de error de predicción de estado*. Siguiendo lo propuesto por Balleine, la actividad de las ICE representaría dicha señal ya que la disminución de la función colinérgica en el DMS lleva a la degradación de aprendizajes de asociación nuevos pero no los previos. La *señal de error de predicción de estado* sería una contraparte a la más conocida *señal de error predicción de recompensas* propias de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (**Box 2** y **Box 3**) y que no es capaz de explicar los desempeños encontrados en tareas de reversión. El trabajo de Stalnaker *et al.*, (2016) aboga a esta misma teoría ya que encuentra que la actividad de las ICE refleja el estado dentro la tarea en la que se encuentra el animal. Hasta tal punto esto sería así que incluso cuando en animal confunde comportamentalmente estados (realiza una acción que debería hacer en otro bloque), la actividad de las ICE acompaña esa equivocación presentando actividad compatible con ese otro estado. A partir de este hallazgo, los autores de este grupo proponen que las ICE señalarían el estado en el que “el animal cree que está” (o *belief state*), elemento necesario para las teorías de aprendizaje reforzado que modelan transiciones entre estados.

Todos los aportes a esta propuesta han sido estudiados en contextos de aprendizaje instrumental donde la definición operacional de “estados” es relativamente sencilla. Hasta la fecha no han sido evaluadas condiciones que podrían considerarse como continuas (y a su vez etológica o realistas) donde los límites entre los estados sean menos definidos y evolucionan a lo largo del aprendizaje.

Rol de las ICE en señalización del error en la predicción de recompensas

La señalización del error en la predicción de la recompensa es un sello distintivo de la actividad de neuronas dopaminérgicas de la SNc y la VTA (Schultz, 1986, Schultz y col. 2011). Sin embargo, trabajos realizados en la última década sugieren que las ICE trabajarían de manera concertada con las entradas dopaminérgicas del cerebro medio en la codificación de esta señal. En particular, esta conclusión surge de encontrar en ensayos de aprendizaje pavloviano recompensado que las ICE modifican su respuesta (en particular el rebote post-pausa) de acuerdo a si la recompensa diferida, en tiempo y forma, de la esperada (Apicella y col 2009, 2011).

Se desprende del análisis de estas secciones que, a lo largo de los años han surgido numerosas funciones propuestas para estas interneuronas estriatales. Muchas, sin embargo, tienen componentes en común o pueden ser caras diferentes de un mismo fenómeno. Una cosa parece ser clara, es cada vez más aceptada y se ha enriquecido de numerosos trabajos la noción de que las ICE funcionan como una conexión entre la representación del contexto y la selección de la acción adecuada para una situación determinada, y por lo tanto, un elemento clave para permitir migración flexible entre comportamientos en condiciones ambientales cambiantes (Apicella, 2017). Sin embargo, si bien se ha aprendido mucho acerca de la función de las ICE en el control de conductas dirigidas a metas, todavía existen importantes discrepancias en el campo, como su rol como agentes promotores y/o facilitadores de la reversión de conductas aprendidas. Creemos que parte de esta problemática podría ser resuelta si se cambia el enfoque a partir del cual se hacen las preguntas. Solemos preguntar *qué* hacen las ICE o *qué* son capaces de hacer los animales con ablación de ICE, pero podríamos preguntarnos acerca del *cómo* hacen lo que hacen. Con ese enfoque cobra un rol preponderante la estrategia con la que los animales resuelven tareas dirigidas. En este sentido, trabajos previos de nuestro laboratorio parecen señalar que ciertas conductas anormales observadas luego de la ablación selectiva de las ICE podrían deberse a un problema en la selección de estrategias.

Objetivos e hipótesis

El objetivo general de esta línea de trabajo es determinar el rol de las interneuronas colinérgicas estriatales en el control de las tareas dirigidas a metas. En particular estamos interesados en comprender mejor su participación en los procesos de selección de estrategias para la resolución de problemas y el mantenimiento de conductas flexibles, siempre considerando su posible participación en procesos fisiopatológicos relacionados a enfermedades psiquiátricas como el síndrome de Tourette y el trastorno obsesivo-compulsivo.

En el marco de esta Tesis de Doctorado nos proponemos alcanzar los siguientes objetivos específicos.

- a) **Establecer si las interneuronas colinérgicas estriatales son capaces de señalar la competencia entre estrategias de exploración en un dado contexto ambiental.** A partir de los reportes preexistentes que proponen que las ICE generan ventanas atencionales frente a eventos contextuales donde se vuelve permisiva la toma de decisión (Gerfen y Surmeier, 2011), hipotetizamos que las ICE modificarán su patrón de actividad de forma tal de reflejar esas situaciones. Utilizaremos un marcador de actividad neuronal indirecta, pero específico de estas interneuronas (nivel de fosforilación de S6rp), para comparar la señal colinérgica bajo diferentes tareas y condiciones ambientales. Esperamos que las ICE señalicen no solo eventos salientes y novedosos en el ambiente sino también se activen bajo situaciones donde el animal deba optar por una estrategia por sobre otra.
- b) **Determinar si las ICE son necesarias para la selección de estrategias durante la resolución de problemas de navegación espacial dirigidos a metas.** Se acepta que el estriado es necesario para el establecimiento de determinadas estrategias en tareas de navegación espacial. Incluso, algunos trabajos clásicos apuntan a que la señal colinérgica tendría también un rol en dicha selección, pero esto no ha sido aún demostrado fehacientemente. En este objetivo nos proponemos evaluar la hipótesis de que las ICE son requeridas para la correcta selección de estrategias, especialmente en condiciones en las que múltiples estrategias de resolución resultan adecuadas. Para ello compararemos el desempeño conductual de ratones genéticamente modificados a los que se les ha eliminado selectivamente las ICE con

animales control en tareas de resolución de estrategias de navegación espacial. Esperamos que los ratones carentes de ICE no puedan seleccionar adecuadamente la estrategia correcta exclusivamente en condiciones de conflicto entre estrategias igualmente válidas.

- c) **Identificar si en una tarea de condicionamiento operante pueden coexistir diferentes estrategias en individuos control, buscando además determinar el rol de las ICE en la aparición de las mismas durante el aprendizaje.** Los paradigmas de condicionamiento operante son habitualmente utilizados en animales para evaluar la capacidad de aprender una asociación entre una determinada acción y su consecuencia. Este aprendizaje es medido por ejemplo a partir de la tasa de obtención de recompensas a lo largo de los días. Sin embargo la presencia de diferentes estrategias capaces de conducir a la obtención de la recompensa mediante diferentes series de acciones no ha sido estudiada. Hipotetizamos que bajo condiciones ambientales poco restrictivas, más de una estrategia sería posible, coexistiendo en la población animales que tiendan a explotar y otros a explorar entre las opciones posibles. Utilizaremos análisis de aglomeramiento (*clustering*) no supervisados para clasificar los animales en base a múltiples parámetros conductuales y exploremos el impacto de la ablación selectiva de las ICE sobre la capacidad de desarrollar diferentes estrategias en comparación con la población control.

Materiales y métodos

1) Diseño experimental

A continuación se describe brevemente el diseño seguido para abordar los tres objetivos fijados en este trabajo. La descripción detallada de los procedimientos se desarrolla más adelante en los apartados correspondientes.

Objetivo 1

Con el objetivo de establecer si las interneuronas colinérgicas estriatales son capaces de señalar la competencia entre estrategias de exploración en un dado contexto ambiental, utilizamos dos cohortes de ratones C57BL6 *wild-type (wt)* y las sometimos a dos pruebas conductuales elegidas para tal fin.

- Una de las cohortes (15 animales machos adultos) fue expuesta al laberinto en forma de Y- variante pS6rp. En este laberinto los animales fueron expuestos a condiciones ambientales invariantes durante 8 días, siendo separados en tres subgrupos diferentes el día 9. Cada subgrupo fue expuesto a condiciones ambientales particulares diseñadas para modificar la actividad de las ICE.
- La cohorte restante (18 animales, 10 machos, 8 hembras) fue privada parcialmente de alimento y entrenada en el laberinto en forma de cruz – variante pS6rp. Todos los animales fueron entrenados durante 8 días en una tarea de navegación dirigida a metas. El día 9 se dividieron en tres subgrupos que fueron sometidos a tratamientos comportamentales que buscaron evaluar el grado de señalización de las ICE ante situaciones novedosas, de selección de estrategias o situaciones control.

En ambos casos los casos, los animales fueron sometidos a eutanasia y perfundidos 30 minutos después de comenzada la última sesión en el día 9. Tejidos obtenidos de esos animales fueron utilizados en ensayos de inmunohistoquímica (IHC) para medición del nivel de marca de pS6rp en las ICE. pS6rp fue utilizado como marcador de actividad específicamente para las ICE basados en literatura reciente que se comenta más abajo en la sección *Inmunohistoquímica y cuantificación*.

Objetivo 2

Para estudiar si las ICE son necesarias para la selección de estrategias durante la resolución de problemas de navegación espacial dirigidos a metas sometimos ratones genéticamente modificados con y sin ablación selectiva de ICE a las pruebas de laberinto de Barnes y laberinto en forma de cruz de dos soluciones (laberinto en cruz DS), dos tareas que se caracterizan por poseer un importante componente de navegación espacial, y por permitir la resolución de las mismas por múltiples estrategias. Contamos con dos grupos experimentales, que fueron logrados a través de cirugía estereotáxica con microinyección intraestriatal de toxina diftérica (grupo lesionado) o solución fisiológica (grupo control). En todos los casos se esperó al menos dos semanas desde el momento de la cirugía para comenzar con las tareas conductuales. Utilizamos para este objetivo un total de 4 cohortes de animales distribuidos de la siguiente forma:

- Cohorte 1: 19 animales macho aislados, privados parcialmente de alimento y entrenados en laberinto en forma de cruz DS.
- Cohorte 2: 18 animales macho aislados, privados parcialmente de alimento y entrenados en laberinto en forma de cruz DS.
- Cohorte 3: 15 animales macho entrenados primero en el laberinto de Barnes y una vez finalizado, se esperó 4 semanas y se los aisló y privó parcialmente de alimento para ser entrenados en el laberinto en forma de cruz DS.
- Cohorte 4: 20 animales entrenados primero en el laberinto de Barnes y una vez finalizado, se esperó 8 semanas y se los aisló y privó parcialmente de alimento para ser entrenados en el laberinto en forma de cruz de una sola solución.

En los casos en la que un mismo grupo debió pasar por más de una prueba, se eligió comenzar por el laberinto de Barnes, ya que el laberinto en forma de cruz requiere de aislamiento y privación parcial de alimento. La privación de alimento, cuando fue necesaria, comenzó una semana antes del inicio de la tarea.

Una vez finalizada las pruebas, los animales fueron sometidos a eutanasia, perfundidos y tejidos de estos ratones fueron utilizados para la determinación del grado de lesión mediante inmunomarcación de ChAT.

Objetivo 3

Con el objetivo de identificar si en una tarea de condicionamiento operante pueden coexistir diferentes estrategias en individuos control, buscando además determinar el rol de las ICE en la aparición de las mismas durante el aprendizaje, utilizamos ratones genéticamente modificados idénticos a los utilizados en el objetivo anterior: lesionados (inyectados con toxina diftérica) y control (inyectados con solución salina) y los sometimos a una prueba de discriminación en condicionamiento operante seguida de devaluación por introducción de un retardo (*delay discounting*). Esta prueba es de particular valor ya que nos permitió estudiar la capacidad de los animales para desarrollar una **estrategia de explotación** que luego es revertida cuando ocurre una **devaluación** de una de las recompensas. Al no existir en la literatura demasiada información acerca del uso de estrategias en este tipo de pruebas, primero nos centramos en una caracterización comportamental utilizando los animales controles.

Al menos 2 semanas luego de la cirugía estereotáxica todos los ratones fueron aislados y privados parcialmente de alimento una semana antes del comienzo de la prueba. Los animales fueron entrenados en cámaras operantes durante 17 días. Una vez finalizada la prueba, los animales fueron sometidos a eutanasia y perfundidos. Tejidos provenientes de estos animales fueron utilizados para pruebas IHC para determinar el grado de lesión igual que en el objetivo 2. En dos de los grupos encontramos que la totalidad de los animales presuntamente lesionados (toxina diftérica⁺) presentaban lesiones que no superaban los criterios de inclusión (ver sección inmunohistoquímica y cuantificación), por lo que esos animales no fueron tenidos en cuenta al momento del análisis de los datos conductuales. Sin embargo, los datos provenientes de animales control de estos dos grupos, al constatarse que no diferían significativamente de los datos de los ratones control de las otras cohortes, fueron incluidos en la caracterización del perfil conductual de esta tarea. El análisis de la conducta en esta prueba fue realizada mediante análisis multivariado no supervisado.

Para estas pruebas utilizamos 4 cohortes de animales. Los animales que cumplieron los criterios de inclusión en relación al grado de lesión fueron los siguientes:

- Cohorte 1: 6 ratones control machos.
- Cohorte 2: 9 ratones control machos.
- Cohorte 3: 19 ratones machos, 12 lesionados, 7 control.
- Cohorte 4: 21 ratones machos. 11 lesionados, 10 control.

II) Condiciones experimentales

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo las normas del SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, RS617/2002 y han sido aprobados por el CICUAL de la Facultad de Medicina UBA (RS2964). Los animales se alojaron en el bioterio del IFIBIO en donde se los mantiene en un ciclo luz-oscuridad 12:12, alimento y agua *ad libitum* (salvo en experimentos específicos), cuentan con climatización frío calor centralizada y supervisión por técnicos capacitados. Todos los animales se destetaron a los 21-28 días del nacimiento y fueron alojados en grupos de 2-5 animales del mismo sexo hasta su utilización según correspondiera. En todos los casos los ratones fueron habituados por al menos una hora a un cuarto adyacente al cuarto conductual antes de comenzar las tareas comportamentales, las cuales fueron realizadas durante la fase diurna del día. Como existen trabajos que sugieren que el uso de estrategias específicas podría estar vinculado a la hora del día (Rueda-Orozco y col., 2008), se procuró acotar el horario de los experimentos que de estas dependan a la franja de 9 a 15 horas, cuando fue posible. Además, se ordenó de manera aleatoria el orden en el que se realizaban las pruebas para cada día a fin de minimizar estos efectos.

III) Animales

Para este trabajo utilizamos ratones criados en el bioterio del IFIBIO-Houssay o adquiridos en Academia Nacional de medicina de Medicina a los 2 meses de edad. Para la caracterización del perfil de actividad de las ICE en situaciones novedosas y contextos relacionados a toma de decisión (**Objetivo 1**), utilizamos ratones C57BL6 *wt*, de tres meses de edad. Para estudiar el efecto de la lesión de las ICE en el desarrollo y migración de estrategias de resolución de tareas dirigidas a metas y de navegación fueron utilizado 127 ratones machos de entre 3 y 8 meses de edad animales de un modelo animal que permite eliminar selectivamente ese tipo celular (**Objetivos 2 y 3**).

Para esto último nos valimos del sistema Cre/loxP para expresar el receptor humano para la toxina diftérica (DTR o *heparin-binding epidermal growth factor* humano - HB-EGF_h) exclusivamente en neuronas que expresen la enzima ChAT. Con ese fin, cruzamos ratones transgénicos homocigotas para la expresión de la enzima recombinada Cre bajo el control del promotor ChAT (B6;129S6-Chat^{tm1(cre)Low}/J: ChAT-Cre, J06410, *The Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA*) con una “línea efectora” homocigota que porta la secuencia codificante para el

receptor HB-EGF_h bajo un promotor fuerte río abajo de una secuencia *STOP* flanqueada por secuencias *LoxP* (iDTR, inducible *diphtheria toxin receptor*, J007900, Jackson Laboratories). De esta manera, hemicingotas para *Cre* recombinasa y heterocingotas para el locus con el alelo modificado *loxP-STOP-loxP DTR* (ChAT-*Cre*^{+/-};DTR^{loxP/wt}, de aquí en más ChAT-DTR), las células ChAT⁺ expresan la recombinasa *Cre*, ocurre un evento de recombinación que remueve el segmento *STOP*, y lleva a la expresión de HB-EGF_h, volviendo a este tipo celular susceptible de lesión ante la presencia extracelular de toxina diftérica (**Figura M1**). La línea efectora iDTR, puede potencialmente expresar el HB-EGF_h en cualquier tipo celular dada la naturaleza ubicua de su promotor (locus Rosa26) quedando la especificidad celular al completo dominio de la línea *Cre*. Este sistema permite controlar tanto la temporalidad como el grado de lesión mediante el esquema de administración de la toxina.

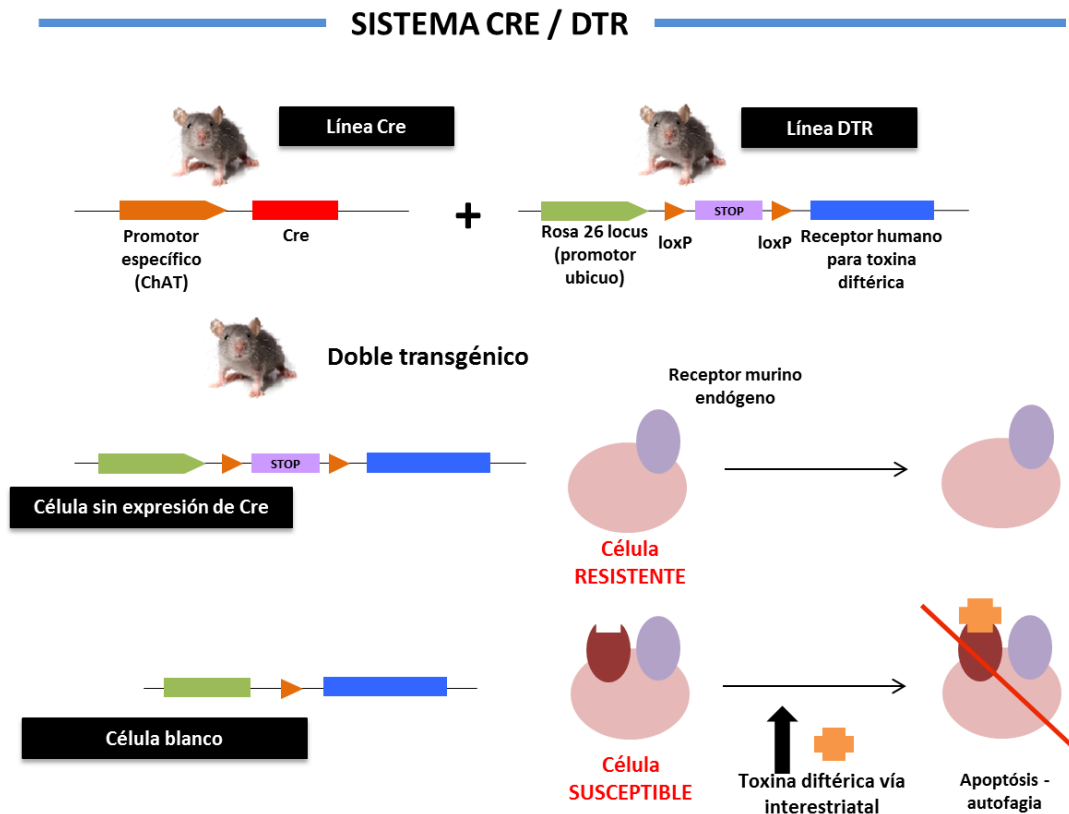


Figura M1: Esquema del modelo animal utilizado en el trabajo. El animal ChAT-DRT posee células ChAT⁺ susceptible de lesión mediante la administración intraestriatal de toxina diftérica.

Como el HB-EGF_{murino} es ~100 menos afín por la toxina que su variante humana, la especie *Mus musculus* es resistente a la toxina diftérica. En teoría, una molécula de la toxina diftérica en el espacio intracelular es suficiente para gatillar la muerte de la célula blanco (Yamaizumi y col., 1978). La línea ChAT-Cre que empleamos ya fue utilizada con éxito por diferentes grupos (Madisen *et al.*, 2010; Rapanelli, Frick and Pittenger, 2017) en incluso fue extensamente caracterizada en nuestro laboratorio en un trabajo previo, del que soy co-autor, en el que caracterizamos exhaustivamente la selectividad anatómica y especificad celular de las lesiones (Martos *et al.*, 2017).

IV) Cirugía

Las ablaciones de las ICE y las inyecciones control fueron realizadas en los animales adultos ChAT-DTR asignados a los **objetivos 2 y 3** de este trabajo. Las cirugías se llevaron a cabo en marco estereotáxico bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (inducción 3%, mantenimiento 0,75-0,5%) siguiendo procedimientos previamente descritos por nuestro grupo (Martos y col., 2017). Los animales fueron montados dentro del marco y se les colocó una inyección subcutánea de anestésico local (solución de *bupivacaína clorhidrato*, 5% m/v, Durocaina, AstraZeneca, 0.1–0.3 ml). Además, se aplicó gel oftálmico para prevenir desecación corneal. Los animales lesionados eran microinyectados con una solución 200 pg/ μ l de toxina diftérica (Sigma-Aldrich #D0564), diluida en solución fisiológica estéril a partir de un stock puro descongelado la mañana misma de la cirugía; los ratones control era inyectados con solución fisiológica estéril. Las microinyecciones fueron realizadas mediante una cánula de 30 gauge de acero inoxidable acoplada a una jeringa Hamilton de 10 uL manipulada por una bomba de microinyección (Bioanalytical Systems), logrando de esta manera fijar un flujo constante de 0,22 μ l/min. Las inyecciones fueron bilaterales con 6 sitios totales. Las coordenadas de las mismas respecto a la posición del bregma de acuerdo al atlas de (Paxinos and Franklin (2011) fueron: posición anterior +1,3 mm eje anteroposterior, +/-1,6 mm lateral (bilateral), microinyectando a dos profundidades (-2,8 y -2,4 mm desde la corteza); posición posterior +0,6 mm del eje anteroposterior, +/-1,8 mm lateral (bilateral), 1 inyección dorsoventral -3mm desde corteza. En los sitios anteriores se inyectó 0,44 μ L por sitio, en los posteriores, 0,73 μ L. Una vez terminada la cirugía, los animales se recuperaron en jaulas con viruta y una manta térmica durante 30 minutos luego de los cuales fueron agrupados jaulas en grupos de 3 a 6 animales. Los animales

se monitorearon luego de la cirugía durante una semana. Se esperó al menos dos semanas antes de dar inicio a las pruebas comportamentales.

V) Restricción de alimento y aislamiento

Para la realización de las pruebas laberinto en cruz y condicionamiento operante – *delay discounting* es aconsejable el uso de animales privados parcialmente de alimento, con el fin de maximizar la motivación de los ratones por la recompensa. Dado que, para hacerlo, debemos entregar cantidades de alimento que son calculadas de manera individual para cada animal, los animales son también aislados antes de comenzar este régimen. Se utilizó para esto las mismas jaulas de ratones estándar con una partición interna de acrílico transparente que la divide en dos. De este modo se colocaron dos animales por cada jaula, y los ratones eran capaces verse y olerse, pero no tocarse. La restricción de alimento comenzó dos días luego de la aislación y se buscó reducir paulatinamente el peso corporal durante los 5 primeros días buscando se minimicen posibles causantes de estrés ocasionados por la restricción y en particular sumados al aislamiento. El peso de los animales era monitoreado diariamente y cualquier cambio brusco del peso era compensado. Una vez que el animal alcanzaba el 80-85% del peso inicial, este porcentaje era mantenido hasta el final de la prueba.

VI) Pruebas conductuales

En el contexto de este trabajo se realizó cuatro pruebas conductuales. Las mismas son el laberinto con forma de Y (*Y-maze*), laberinto en cruz con dos soluciones (*dual-solution cross maze*; laberinto en cruz DS), laberinto de Barnes (*Barnes maze*), y una tarea de condicionamiento operante que incluyó una fase de *discriminación* entre acciones recompensadas y otra de *devaluación* por retardo.

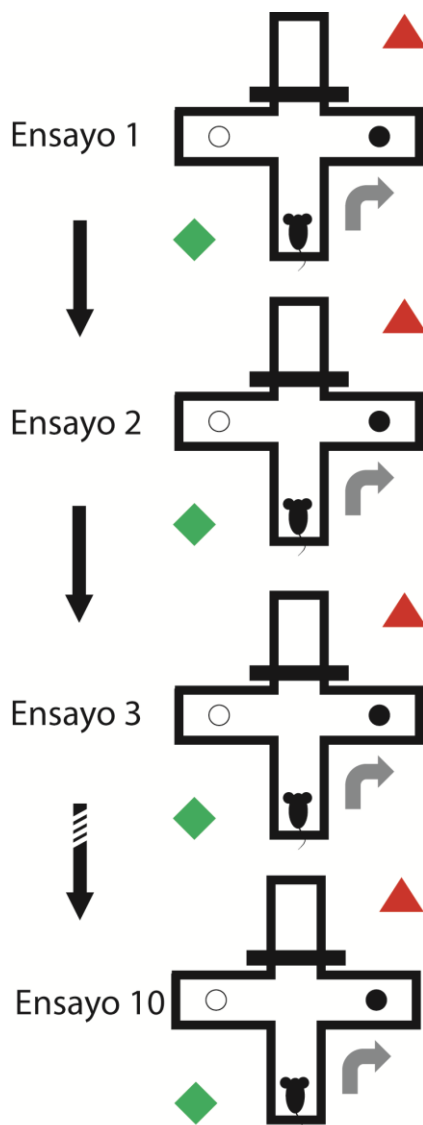
Para el **objetivo 1**, fueron utilizadas el laberinto en cruz y el forma de Y con animales *wt*, ambos en sus versiones para provocar cambios en la marca de pS6rp; para el **objetivo 2**, el laberinto en cruz DS y el laberinto de Barnes con animales ChAT-DTR lesión y control; mientras que el **objetivo 3** la tarea de condicionamiento operante, estos últimos objetivos con animales ChAT-DTR lesión y control. A continuación explicaremos brevemente nociones básicas para comprender las tareas. Para más detalle, por favor recurrir a los **Anexos**.

Laberinto en forma de cruz de dos soluciones

Para esta prueba, seguimos un protocolo similar al utilizado en Middei *et al.*, 2004. Con el objetivo de evaluar la capacidad de los animales en desarrollar estrategias de navegación diferentes, entrenamos a los animales, privados parcialmente de alimento, dentro de un laberinto en forma de cruz. El aparato consiste en un laberinto con dos brazos idénticos entecruzados, dando lugar a 4 brazos simétricos respecto al centro. El mismo posee piso de acrílico blanco y paredes de acrílico transparente que cubren los laterales del mismo, pero que dejan libres los extremos de cada brazo (**Figura M3, izquierda**). El laberinto se encontraba elevado 40 cm del suelo y en el centro de una habitación con claves ambientales salientes e iluminado con una luz tenue (40 lux) El investigador permanecía dentro de la sala durante toda la prueba. El brazo más cercano a donde se encuentra el investigador fue asignado como “brazo sur”, y fue el brazo de partida en todos los ensayos de entrenamiento. El brazo opuesto (brazo norte) se encontraba bloqueado en los ensayos de entrenamiento. Los brazos restantes contenían, en los extremos abiertos, comederos donde la recompensa era entregada en los ensayos exitosos. Tres días antes de que la prueba comience, los animales fueron colocados durante 5 minutos en el laberinto cada día para que se habitúen al mismo. En estas sesiones de exploración, a lo largo de todo el laberinto y dentro de los comederos, se encontraban *pellets* de recompensa (sabor sacarosa, nutricionalmente completos, 14 mg, libres de polvo, #F05684, Bio Serv), para habituar a los animales al sabor de los mismos. En estas sesiones el acceso al brazo norte también se encontraba bloqueado. Una vez superada esta etapa de habituación, comenzaba la fase de entrenamiento que consistía en dieciséis sesiones diarias de 10 ensayos cada una. A la mitad de los animales se les asignó de manera aleatoria el brazo “oeste” como brazo recompensado y a la otra mitad el brazo restante, respetando esta asignación a lo largo de toda la prueba.

En cada ensayo de entrenamiento, los animales fueron colocados en el extremo del brazo sur y debían esperar durante 10 segundos antes de que una pared opaca fuera retirada, permitiendo el acceso al interior del laberinto. Al igual que en las sesiones de exploración, el acceso al brazo norte se encontraba bloqueado. Los animales contaban con 5 minutos por ensayo para tomar una decisión, eligiendo entre el brazo este u oeste, antes de ser retirados por el experimentador. Luego de que un brazo era elegido, se cerraba una puerta que lo confinaba a dicho brazo y no era permitida una acción de corrección. Si el animal elegía un brazo recompensado, ese ensayo era considerado como correcto, y el animal era retirado inmediatamente luego de que consumiera la recompensa; si en cambio un brazo no

recompensado era el elegido, el ensayo era computado como incorrecto y el animal era mantenido en ese brazo durante 15 segundos a modo de penalización. Corrección en la elección no eran permitidas. En ambos casos se procedía luego a un intervalo entre ensayos, donde el animal era llevado y mantenido durante 45 segundos en una jaula con viruta dentro de la misma habitación. Pasado ese tiempo, comenzaba un nuevo ensayo (**Figura M2**). En los días 5, 10, 15 y 20, los ratones eran sometidos a una sesión de prueba (*probe test*). Durante estas sesiones de ensayo único, los animales eran liberados en el brazo norte y ambos brazos, este y oeste, eran recompensados, mientras que el brazo sur estaba bloqueado. Aquellas elecciones dentro del *probe test* que coincidieran con las asignadas como ensayos correctos en los ensayos de entrenamientos, eran computados como “respuestas de estrategia espacial”; cuando no había



coincidencia, eran computadas como “respuestas de estrategia egocéntrica” (Ver **Figura M3, derecha**). Pongamos un ejemplo: si un animal tiene asignado como “lado correcto” en su entrenamiento el lado oeste, si en el *probe test* (en los cuales parte del brazo opuesto del que generalmente sale) también elige el brazo oeste, esto es interpretado como que ese animal se guía por claves ambientales, por lo que se le asigna una “respuesta de estrategia espacial”; si en cambio, se dirige al brazo este, en ese caso, tanto en las sesiones de entrenamiento como en el *probe test* el animal “dobló a la izquierda”, por lo que se considera que siguió claves corporales, y se le asigna una “respuesta egocéntrica”.

Figura M2: esquema de diseño experimental utilizado para los ensayos de entrenamiento durante el laberinto en cruz DS. En cada ensayo el animal era siempre liberado de brazo sur, y no tenía acceso al brazo norte. A cada animal se le asignaba un brazo (este u oeste) como el recompensado. Círculos negros, representan comederos recompensados; círculos blancos, comederos vacíos. Flecha gris, elección esperada para el animal.

Tanto en las sesiones de entrenamiento como en los *probe test* el desempeño de los animales fue computado a mano al momento de la prueba y verificado *off line* posteriormente utilizando los videos de las pruebas, grabados utilizando una cámara cenital. En líneas generales, se contabilizó el número de ensayos correctos, y la estrategia utilizada por cada animal en los ensayos de prueba. Además, se evaluó si el desempeño de los animales durante el aprendizaje era dependiente de la estrategia utilizada. Para hacerlo, se consideró que en una determinada sesión el animal utilizaría preferencialmente la estrategia que manifieste en el siguiente *probe test*. Con esto en mente, se compararon las sesiones con estrategias E-R y espacial tanto para el grupo control como el lesionado.

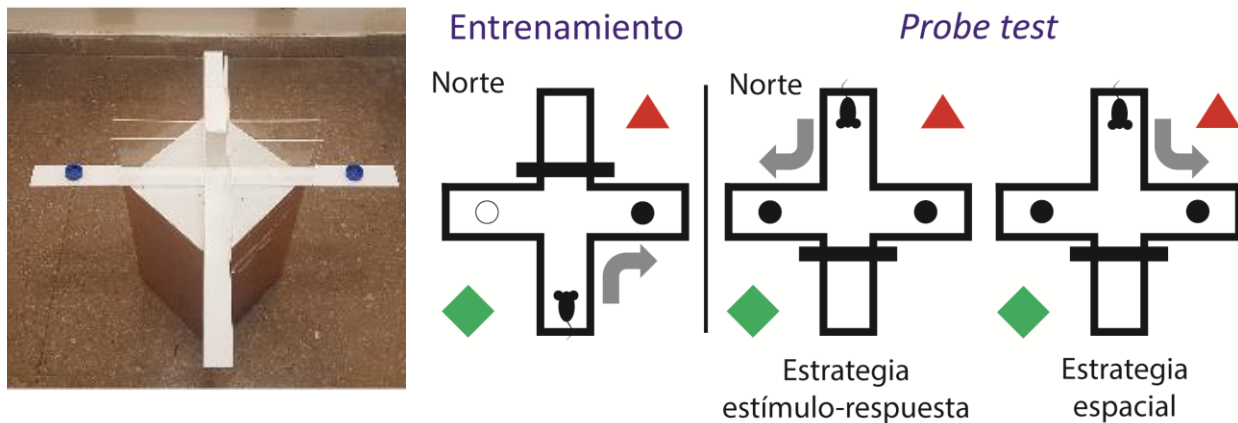
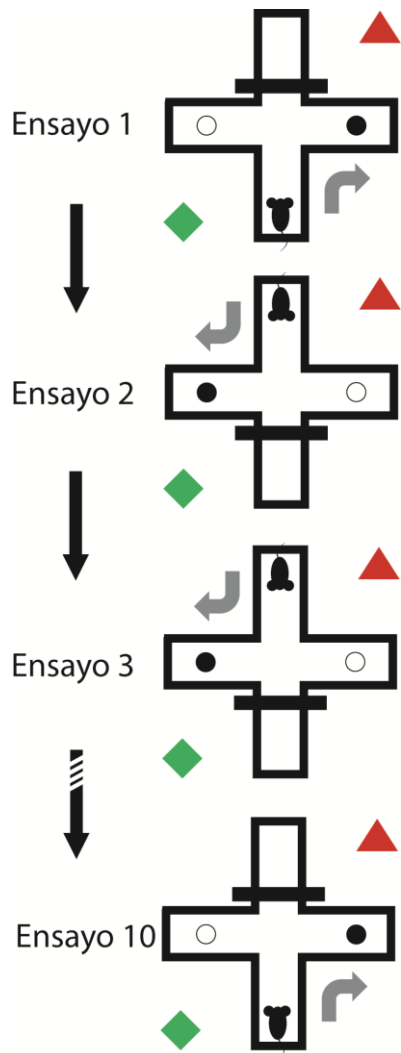


Figura M3: *Izquierda*, fotografía del laberinto utilizado en este trabajo. *Derecha*, esquema de diseño experimental utilizado para el laberinto en cruz DS. Entrenamiento: 16 sesiones diarias de 10 ensayos cada una, interrumpidas por 4 días de ensayos de prueba (*probe test*). Los *probe test* son sesiones de un único ensayo realizadas los días 5, 10, 15 y 20. Círculo lleno negro representa comedero recompensado. Círculo lleno blanco, comedero vacío. Flecha gris, elección esperada para el animal, en caso de seguir la estrategia señalizada debajo.

Laberinto en forma de cruz de una sola solución

Con el fin de evaluar si los animales son capaces de aprender y desarrollar una estrategia egocéntrica se diseñó una variante de laberinto en cruz en la que, a diferencia de la forma tradicional, solo la ejecución de la estrategia egocéntrica lleva completar la tarea de manera exitosa y obtener la recompensa. En la prueba descrita en la sección anterior, los animales antes de comenzar la prueba son asignados a un “brazo correcto”, este u oeste, y pueden llegar al mismo ya sea siguiendo claves espaciales u egocéntricas. En el caso de esta versión

modificada, se les asigna una respuesta “egocéntrica correcta”, es decir “doblar a la derecha” o “doblar a la izquierda” (Similar a versión egocéntrica del laberinto usado en Schreiweis *et al.*,



2014. Los ensayos de entrenamiento comenzaban con la liberación de los animales de manera pseudo-aleatoria desde el brazo sur y otros desde el brazo norte. La recompensa era colocada de manera tal que cumpla la regla asignada inicialmente a cada ratón (Ver **Figura M4**). Esta versión del laberinto no requiere *probe test*, dado que no es necesaria la puesta de manifiesto el uso de estrategias ya que una sola es posible y la selección de la misma coincide con el número de ensayos correctos.

Figura M4: Esquema del diseño del laberinto en forma de cruz de una sola solución, donde solo es recompensado el uso de la estrategia egocéntrica. El animal era liberado en cada ensayo de manera pseudo-aleatoria del brazo norte y sur del laberinto, pero solo era recompensada aquella elección compatible con la regla egocéntrica preestablecida para ese ratón. Círculo lleno negro representa comedero recompensado. Círculo lleno blanco, comedero vacío. Flechas grises, elección esperada para el animal.

Laberinto en forma de cruz con dos soluciones – Variante pS6rp

Para medir el nivel de actividad de las ICE mediante el marcador pS6rp utilizamos una variación de esta prueba comportamental que nos permitía discernir entre diferentes componentes de la misma, maximizando y minimizando, según sea el caso, los momentos de selección de estrategias. Al igual que las otras las pruebas de pS6rp, utilizamos animales *wt*.

Realizamos ocho sesiones de entrenamiento (como ya fue explicado en el apartado de la tarea sin variantes). El **noveno día**, un tercio de los animales fue asignado a algunas de las siguientes sesiones de ensayo único: *grupo familiar*, *probe test*, y *forzado*, (ver **Figura M5**). Se procuró que todos los grupos reciban animales de alto y bajo desempeño en la sesiones de entrenamiento. Durante la novena sesión del *grupo familiar*, al igual que en las ocho sesiones previas, los animales fueron liberados del brazo sur y solo la elección correcta fue la recompensada. En el grupo *probe test*, al igual que en los *probe test* del laberinto en cruz clásico, los animales son liberados del brazo norte y debe elegir entre seguir claves egocéntricas o espaciales; ambos brazos son recompensados. Finalmente, el grupo *forzado* parte del brazo norte pero tanto el brazo sur como el brazo este (compatible con la estrategia espacial) fueron bloqueados y el brazo restante fue recompensado (ensayo similar al utilizado por Pittenger *et al.*, 2006). Este grupo no tiene posibilidad de seleccionar entre estrategias ya que la egocéntrica es la única posible. De esta manera, para el grupo *familiar* la novedad es mínima y las estrategias son congruentes en su respuesta conductual, no compitiendo entre sí, pudiendo coexistir al guiar ambas hacia el mismo brazo. En cambio para el grupo *probe test* las estrategias separan sus trayectorias y los animales deben decidir cuál elegir. Finalmente, el grupo *forzado* es un control de la novedad ya que los animales parten de un contexto nuevo (brazo norte) y las claves locales y espaciales se encuentran dissociadas, pero donde no hay una toma de decisión apreciable y no existe competencia entre las estrategias posibles de ser ejecutadas. Los ratones fueron sometidos a eutanasia 30 minutos luego de comenzada la prueba y los tejidos extraídos fueron sometidos a un ensayo para evaluar actividad de las ICE, como se detalla en la sección *inmunohistoquímica y cuantificación*.

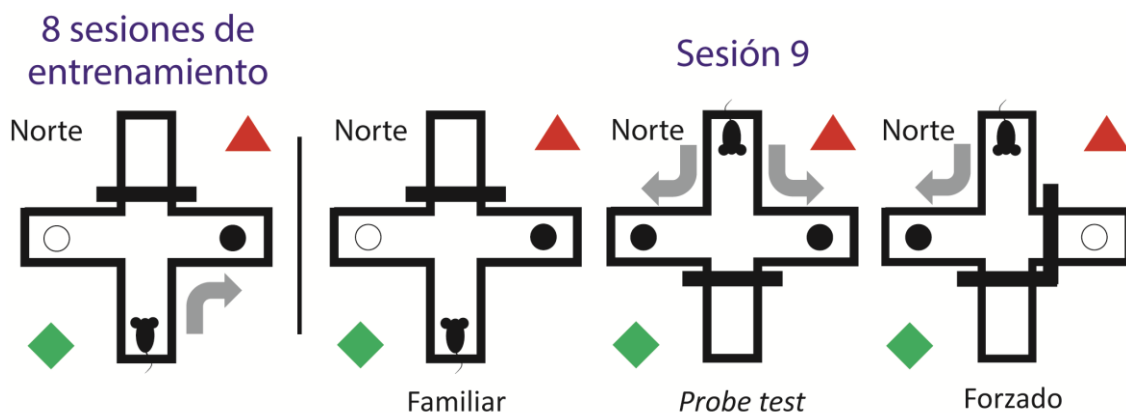


Figura M5: Esquema de diseño de laberinto en forma de cruz, destacando las 3 posibles sesiones 9 para la variante usada en el estudio de actividad de las ICE mediante activación de pS6rp. Círculo lleno blanco, comedero vacío. Flecha gris, elección esperada para el animal.

Laberinto en forma de Y- variante pS6rp

Ratones *wt* fueron sometidos a ocho sesiones diarias de exploración en un laberinto de acrílico de paredes transparentes en forma de Y. El laberinto se encontraba a nivel del suelo, en el centro de una habitación con numerosas claves visuales distales e iluminada con una luz moderada (100 lux; **Figura M6, izquierda**). En una dada sesión, el acceso a uno de los brazos del laberinto no estaba permitido, y la identidad de este brazo era cambiada entre días. A modo de ejemplo, siendo los brazos A-B-C; si un animal el día 1 tenía acceso a los brazos A-B pero no al C (A - B -//- C), el día siguiente sería B - C -//- A y el siguiente C - A -//- B y así sucesivamente. De forma tal que, una vez finalizado los 8 días de entrenamiento, cada animal habría recorrido varias veces todos los brazos (Ver **Figura M6, derecha**, sesiones de entrenamiento) pero nunca había podido explorar los tres simultáneamente. El **noveno día** los animales fueron asignados a tres tratamientos diferentes: grupo *familiar*, *decisión* y *novedad*. En el grupo *familiar* los animales continuaron con sesiones similares a las anteriores con la distribución de brazos permitidos y el no permitido que le hubiera tocado siguiendo la regla antes mencionada. En el grupo *decisión* los animales tenían libre acceso a los tres brazos del laberinto de forma simultánea, por lo que, por primera vez desde que comenzó la prueba una vez alcanzado el centro del laberinto pueden optar entre qué brazo explorar. Finalmente en el grupo *novedad* los animales se enfrentaban a los dos brazos del laberinto que le correspondía para ese día pero cada dos minutos un evento novedoso/saliente ocurría: minuto 0, el suelo de uno de los brazos estaba recubierto con una malla metálica; minuto 2, el experimentador activaba un soplo de aire suave sobre el animal de 5 segundos de duración; minuto 4, dos *pellets* de alimento aparecían en los extremos de los brazos; minuto 6, comenzaba a sonar una clave sonora (alarma de un reloj) durante un minuto (intensidad 80 dB; esquema de las tres sesiones 9 posibles en **Figura M6, derecha**, sesión 9). La idea detrás de la creación de los grupos fue que el grupo *familiar* sea un grupo control, sin novedades ni requerimiento de toma de decisión apreciable o diferente a la de los ocho días previos; el grupo *novedad* sea un control positivo para evaluar el efecto de estímulos que, de acuerdo a la literatura, son llamativos o salientes para los ratones y ha sido reportado que producen la respuesta de pausa en las ICE (Zhang y col., 2017). Por último, el grupo *decisión* era el grupo de mayor interés, donde buscábamos estudiar si existía una activación preferencial de las ICE ante una situación de toma de decisión en que una posible estrategia de exploración espacial puede tomar un rol central en el control de la conducta. Los animales fueron sacrificados 30 minutos luego de comenzada la prueba y los tejidos extraídos

fueron sometidos a un ensayo de nivel de marca pS6rp en las ICE. Parámetros conductuales como distancia total recorrida, tiempo en cada brazo y número de transiciones fue calculado de manera no-supervisada mediante videos de cada sesión filmados con cámara cenital y analizados mediante el software de video *tracking* AnyMaze.

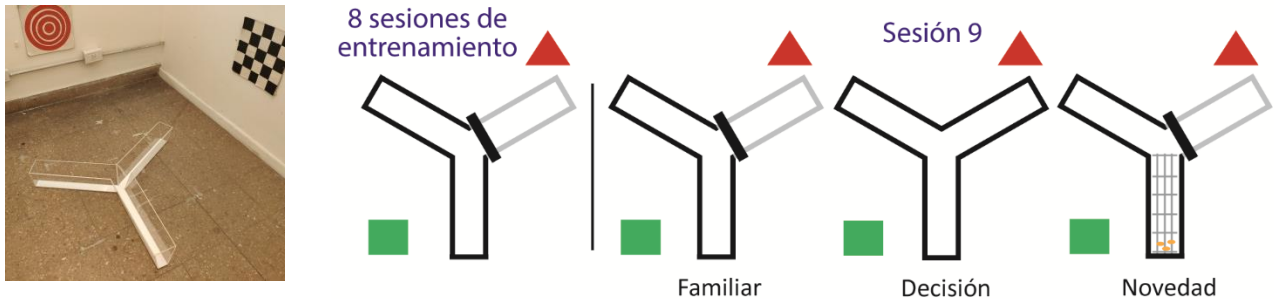


Figura M6: *Izquierda*, fotografía del laberinto ubicado en el cuarto de conducta. *Derecha*, Esquema de diseño del laberinto en forma de Y, destacando las tres variantes de sesión del noveno día.

Laberinto Barnes

Otra prueba que permite discernir entre diferentes estrategias de navegación espacial es el laberinto de Barnes. Para esta prueba, seguimos un protocolo similar al utilizado en Sunyer *et al.*, 2007. El aparato consiste en una plataforma circular de acrílico blanco elevada del suelo, de 90 cm de diámetro. A lo largo de la periferia, la plataforma cuenta con 20 agujeros de 5 centímetros de diámetro, a 2 centímetros del borde y de manera equidistante entre sí (Figura M6, arriba). La plataforma cuenta también con una cortina negra que cuelga del borde, lo que impide ver el piso a través de los agujeros dada la oscuridad que se genera bajo el laberinto. El laberinto se colocó en el centro de una habitación cuadrada debidamente decorada con claves visuales. La plataforma tiene la capacidad de ser girada, y de esta forma desacoplar posibles claves locales (como el olor) con las claves distales (**Figura M7, izquierda**). El laberinto permite colocar una caja de escape debajo de cualquier agujero. Existía una única caja de escape era colocada en un único agujero cuya posición relativa dentro de la sala era mantenida entre ensayos, animales y días. Las condiciones de luz en la habitación eran de 400 lux (registro medido en el centro del laberinto). Al comienzo de cada ensayo, el animal era colocado en el centro de la plataforma dentro de un contenedor opaco. Luego de 10 segundos, el cobertor era retirado y, en simultáneo, se encendía un ruido blanco (85 dB) producido por parlantes y una computadora portátil escondida al costado del laberinto. Este sonido, sumado a la elevada intensidad de luz y a la desprotección de un espacio abierto son condiciones que convierten a la superficie del laberinto en un ambiente ansiogénico y propician la búsqueda de resguardo. Los

ratones contaron con 3 minutos para encontrar el agujero que conduce a la caja de escape. De no lograrlo, eran guiados suavemente por el operador hacia la misma, asegurándose de que el ratón entre a la caja voluntariamente. Al ingresar a la caja de escape, el ruido blanco era apagado y se cubría el agujero de la intensa luz exterior con un plástico opaco. Una vez dentro, eran retenidos durante 1 minuto. Pasado ese tiempo, la caja de escape era retirada, el animal depositado en su jaula donde pasaba los 15 minutos de intervalo entre ensayos. Luego de cada ensayo, la plataforma y caja eran limpiadas con alcohol 10%, la plataforma era girada y la caja de escape era reposicionada en la misma posición relativa del laberinto en relación a la sala. La prueba consistió en 12 sesiones diarias de cuatro ensayos cada una.

Se analizaron los parámetros conductuales latencia a encontrar la caja de escape, número de errores (visitas a agujeros que no son el de escape) y números de errores seriales. Para que un error sea definido como serial, el mismo debe formar parte de un mínimo de tres errores consecutivos hechos sin cambiar de sentido de giro, sin saltarse ni repetir ningún agujero.

El análisis de uso de estrategia consistió en una clasificación no supervisada del patrón con el que los animales exploran la plataforma dentro de alguna de las siguientes categorías: *estrategia espacial*, *estrategia egocéntrica*, *estrategia mixta* y *búsqueda azarosa* (**Figura M7, derecha**, Kesby *et al.*, 2015). Una estrategia es definida como *espacial* si el animal encuentra la caja de escape de manera directa o luego de inspeccionar previamente hasta dos agujeros adyacentes (errores máximos permitidos: 2). Tanto la estrategia serial como la mixta requieren que, de los errores que se cometan, al menos el 60% sean errores seriales. Sin embargo, en la estrategia serial, los animales alcanzan el objetivo como parte de una cadena de errores seriales, mientras que en la estrategia mixta, los ratones alcanzan la caja de escape porque se dirigen a ella de manera directa o llegan luego de visitan hasta 2 agujeros adyacentes a la misma (mismo criterio de alcance del objetivo que la estrategia espacial). Finalmente, todos los patrones de visita que no encajen a los descriptos previamente fueron asignados como búsqueda azarosa. Además se evaluó si había diferencia entre el grupo lesionado y control en la manera en la que ejecutaban las diferentes estrategias. Para hacerlas, se seleccionaron todas las estrategias clasificadas como seriales y se midió la secuencia máxima realizada, como parámetro de “calidad” en el uso de esa estrategia. De manera similar, para los ensayos clasificados como seriales, se comparó la latencia en encontrar el escape.

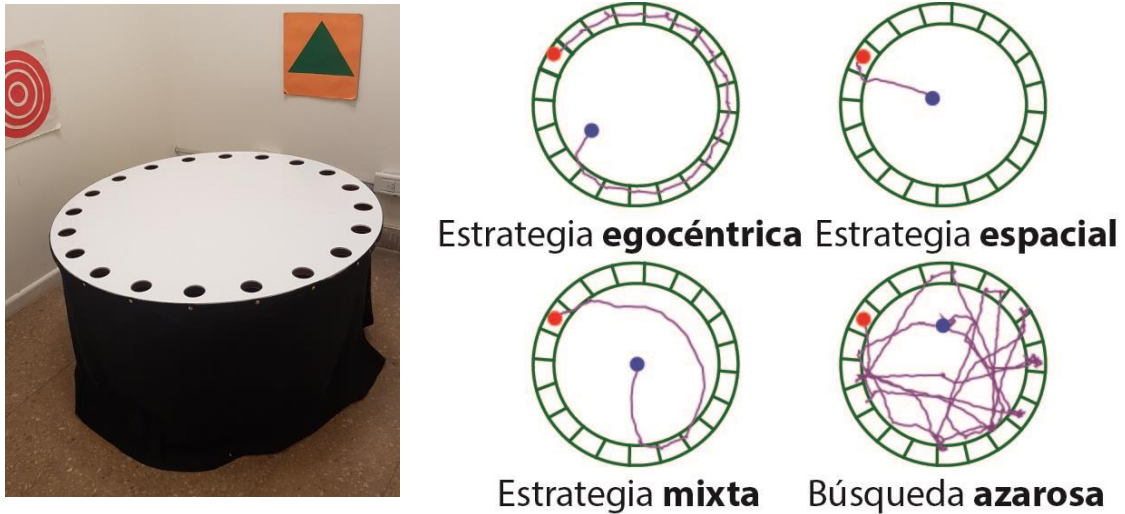


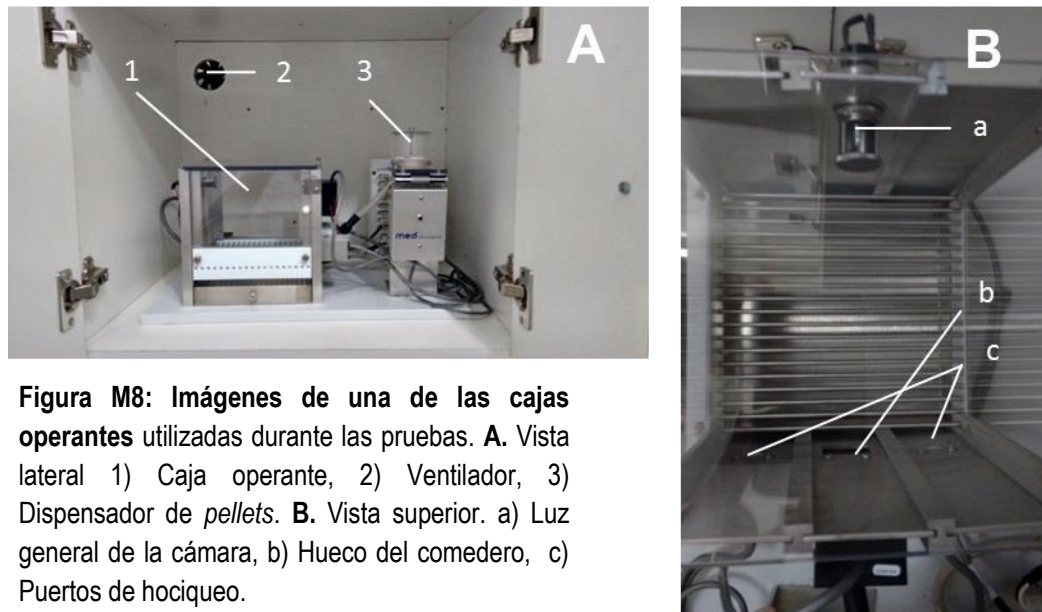
Figura M7: *Izquierda*, fotografía del laberinto dispuesto en la habitación de experimentación. *Derecha*, ejemplos del seguimiento automático realizado por el programa Anymaze. Los patrones fueron categorizados dentro de los cuatro comportamientos contemplados por la tarea. El punto azul señala el comienzo del *tracking*; el punto rojo, el encuentro con la caja de escape.

Prueba de condicionamiento operante - Delay discounting

Para estudiar las hipótesis planteadas en el **objetivo 3** se realizó una prueba de discriminación del valor de la recompensa seguida de una devaluación por introducción de un retardo en la entrega (*delay discounting*). Para hacerlo, utilizamos cuatro cajas operantes automatizadas y controladas por *software* de *MedAssociates* (**Figura M8**) y programamos un protocolo basándonos en los diseños de Adriani and Laviola, 2003. El mismo cuenta de tres fases, que se resumen en la **Figura M9**. Para esta prueba se utilizaron animales aislados y con restricción parcial de alimento como se indica en la sección correspondiente.

El primer día tiene lugar la habituación a la caja operante siguiendo un protocolo que en la literatura se conoce como *magazine training* (MT). El objetivo de esta etapa es que el animal conozca la caja, se habitúe a ella e identifique al comedero central como el sitio de entrega de la recompensa. Se trató de una sesión de 45 minutos de duración que comenzó con la iluminación de los puertos de hociqueo. Cinco segundos luego de iniciada la prueba se entregó un *pellet* de alimento (sabor sacarosa, nutricionalmente completos, 14 mg, libres de polvo, #F05684, Bio Serv). Sólo si el animal recogía el *pellet* (acción que es detectada por interrumpir el sensor infrarrojo del comedero al introducir la cabeza) se habilitaba la entrega de una nueva

recompensa. El tiempo de entrega, que fue 30 a 60 segundos (45 segundos en promedio), fue elegido de manera pseudo-aleatoria, evitando que se repitan consecutivamente intervalos demasiados largos o demasiado cortos. Este procedimiento se repitió hasta finalizar la sesión. Los hociqueos en los puertos laterales no tuvieron consecuencia alguna.



A partir del día siguiente comenzó una **prueba de discriminación**, en donde la realización de hociqueos en uno de los puertos laterales condujo a la entrega de un *pellet* de alimento, mientras que el hacerlo en el otro condujo a la entrega de cinco. Qué puerto se asigna como el de mayor recompensa es determinado por la exploración del animal durante la sesión de MT. Aquel puerto explorado en menor medida, fue asignado como el de entrega de la recompensa de mayor tamaño durante la fase de discriminación. De esta manera, de existir alguna tendencia natural por la exploración de un puerto, esta se ve desfavorecida por asignársele una recompensa menor. La contingencia entre tamaño de la recompensa y puerto se mantuvo para cada animal a lo largo de toda la tarea. Las sesiones durante esta fase comienzan a oscuras, solo se encuentran iluminados los puertos de hociqueo. Cuando el ratón realiza un hociqueo se entrega la recompensa correspondiente en el compartimiento central de manera **inmediata** (**Figura 9**, letras en verde) y se da comienzo a un intervalo entre ensayos. Durante este período ninguna acción del animal tiene consecuencias, aunque se toma registro de las mismas. El intervalo entre ensayos es señalizado mediante el encendido y posterior apagado de la luz

central de la caja y su duración fue de 25 segundos. Una vez finalizado, se da comienzo a un nuevo ensayo. La fase de discriminación consistió en 9 sesiones diarias de 60 minutos o 50 *pellets* entregados, lo que ocurra primero.

Una vez finalizada la fase de discriminación se da lugar a **la fase con retardo (Figura 9, letras en violeta)**. Esta consiste en la incorporación de un retardo en la entrega de la recompensa de mayor tamaño, quedando la recompensa de un *pellet* asociada a una entrega inmediata. Cada día el retardo fue mayor, siendo de 10, 20, 40, 60, 100 y finalizando el séptimo día en 120 segundos. Durante el retardo, se enciende la luz general de la caja, y las acciones del animal no tienen consecuencias, aunque son registradas. Se ha descrito previamente que al experimentar un retardo entre la elección y la entrega del refuerzo positivo, el animal modifica su preferencia, volcándose hacia el puerto instantáneo pero de recompensa menor. Esta fase es utilizada habitualmente para medir el grado de impulsividad de elección, con una manifestación de la impulsividad vista como una preferencia prematura por el puerto de menor valor.

Las pruebas se realizaban de lunes a viernes, pero manteniendo los fines de semana el monitoreo del peso. Se escogió un diseño de distribución aleatorio tanto de las cajas operantes como del horario para descartar sesgos introducidos por algún efecto propio de las cajas como así también fenómenos circadianos. Se incluyeron en el análisis todos los animales aceptados por los criterios de exclusión a partir de IHC, sin embargo, se excluyeron un animal lesionado y uno control por manifestar durante los 10 de los días de la prueba una preferencia del 100% por el puerto de menor recompensa. Si bien es una estrategia sorprendente e interesante, no contó con una representación poblacional suficiente como para ser tomada en cuenta.

A partir de los datos de la conducta, provistos por las cajas, seleccionamos las 19 variables que fueron utilizadas para el análisis multivariado que se describe en la sección siguiente.

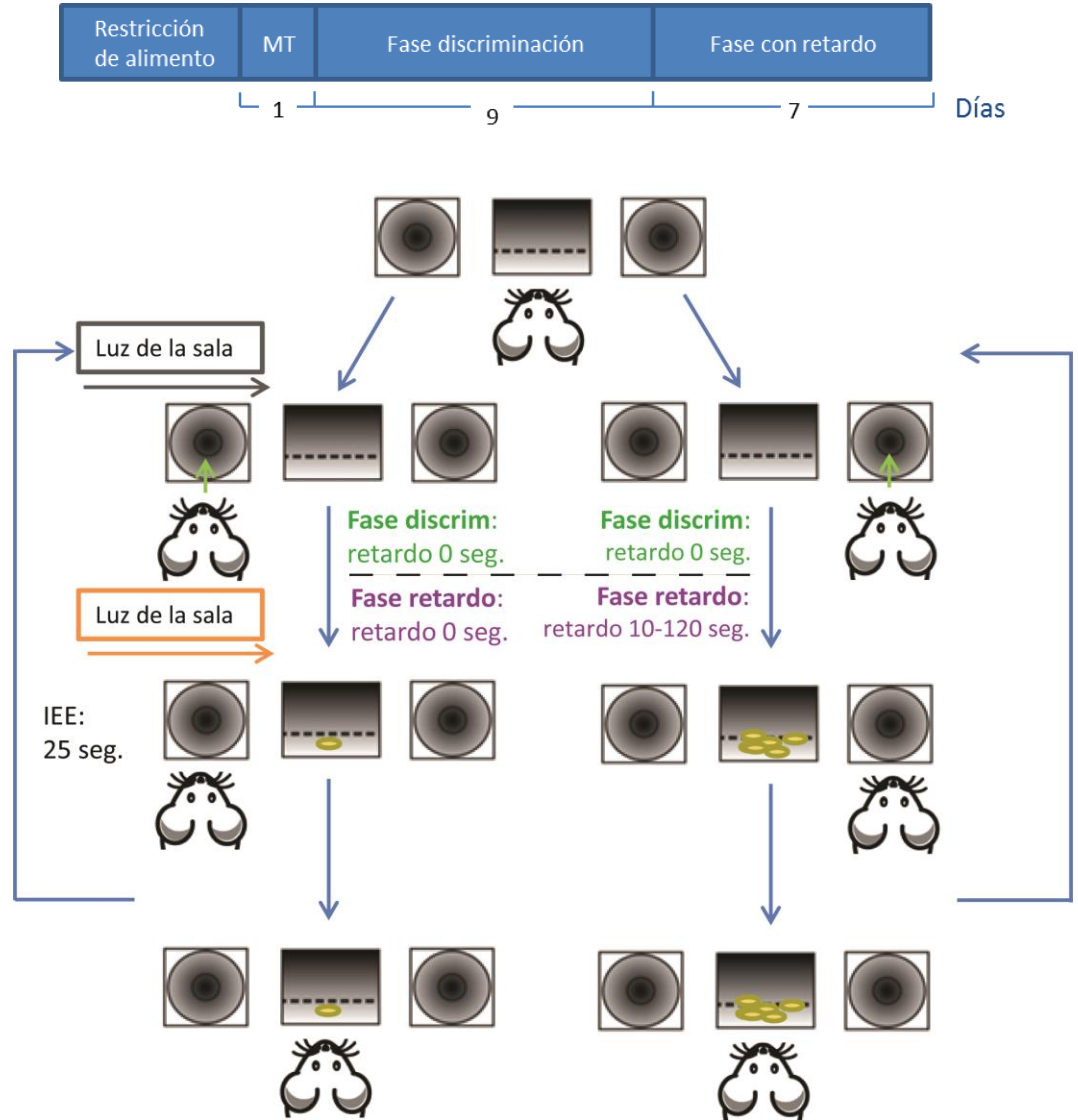


Figura 9: Arriba, esquema de la sucesión temporal de los elementos del experimento de condicionamiento operante, destacando la fase de restricción de alimento, habituación a la caja operante (MT: *magazine training*), fase discriminación, e incorporación del retardo. Abajo, Esquema de acciones realizadas por los animales durante una sesión durante la fase de discriminación y durante la fase de retardo. En el ejemplo, el puerto de la derecha entrega 5 *pellets*. Círculos indican puertos de hociqueo, rectángulo indica comedero, óvalos amarillos señalan *pellets* de alimento. Flechas verdes indican hociqueos, flechas azules, pasos secuenciales del protocolo.

VII) Análisis multivariado no supervisado

Para caracterizar el comportamiento de los animales control y con ablación de las ICE en la tarea de discriminación en condicionamiento operante, emprendimos un análisis multivariado. Seleccionando variables que buscaron cubrir, de manera lo más extensa posible, la conducta de los animal. En la **tabla M1** se detallan las 19 variables biológico-conductuales elegidas, y a continuación detallamos alguna de las variables que requieren explicación:

Tabla M1: Variables biométricas y comportamentales durante la tarea operante seleccionadas para el análisis multivariado. Las variables con asterisco (*) contienen valores que son únicos para cada animal a lo largo de toda la prueba. Las demás variables pueden ser calculadas para cada ensayo durante todo el aprendizaje. En negrita, las pruebas seleccionadas para la creación de dendrogramas a partir de método 1.

Porcentaje de elección de puerto de recompensa mayor
Persistencia en elección inicial
-Tiempo total de sesión
-Tiempo de respuesta
-Usos del puerto de recompensa durante MT *
NP durante TEE
-Número total de veces que va a buscar recompensa
-Peso (g)
-Porcentaje de peso inicial
-Índice de explotación (ensayos win-stay / total)
-Índice de persistencia (Win stay + Lose stay)/total
Preferencia media durante fase de discriminación *
Pendiente del ajuste de la curva de aprendizaje a función $\ln(x)$ *
Memoria 1: analizando primer ensayo día n vs. $(n-1)$
Memoria 2: primer ensayo de día n vs. elección más usada en día $(n-1)$
Latencia media a ir a buscar recompensa
Coefficiente de variación del tiempo en ir a buscar recompensa
Largo total de ráfagas de NP cuando va a buscar recompensa.
Fallas (número de ensayos en los que no busca recompensa)

Porcentaje de elección por el puerto de mayor recompensa: número de ensayos en los que se realizó una elección del puerto que entrega 5 recompensas/ ensayos totales.

Tiempo de respuesta: tiempo promedio desde que comienza el ensayo y el animal realiza un NP.

Índice de explotación: ensayos *win-stay*/ensayos totales. Se denomina ensayo de *win-stay* a aquellos en los que el animal realiza un ensayo exitoso (en este caso ensayos que otorgan la mayor recompensa) y en el ensayo siguiente repite la acción (Koppe y col., 2017).

Índice de persistencia: ensayos (*win-stay + lose-stay*)/ensayos totales. Se denomina ensayo de *lose-stay* a aquellos en los que el animal realiza un ensayo fallido (en este caso ensayos que otorgan la menor recompensa) y en el ensayo siguiente repite la acción (Koppe y col., 2017).

Utilizamos dos variables para cuantificar la memoria entre días consecutivos dentro de la prueba. En ambos casos solo se tuvo en cuenta el primer ensayo de una determinada sesión para evitar incorporar efectos por aprendizajes dentro de la sesión.

Memoria 1: se computó como 1 a los animales que realizaban en el primer ensayo de una sesión la misma elección que realizaron en el primer ensayo de la sesión del día anterior. De realizar un NP en el otro puerto, se asignó 0.

Memoria 2: se computó como 1 a los animales que realizaban en el primer ensayo de una sesión la acción que fue mayoritaria en el ensayo anterior. De realizar un NP en el otro puerto, se asignó 0.

Largo total de ráfagas de NP cuando va a buscar recompensa: los animales muchas veces realizan acciones en “ráfaga”. Esto es utilizado en algunos trabajos como medida de impulsividad de acción o perseverancia. En ocasiones, incluso cuando se entrega una sola recompensa, los animales introducen la cabeza dentro del comedero en una decena de oportunidades.

Una vez definidas, recolectamos el valor de estas variables para todos los animales en diferentes momentos de la prueba. Posteriormente, realizamos un análisis por componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) de todas las variables para el último día de la fase de discriminación. Considerando que el objetivo inicial de esta etapa era caracterizar el perfil comportamental de los animales control, realizamos primero ese análisis con todos los ratones inyectados con solución fisiológica, proveniente de las 4 cohortes de animales que fueron sometidos a esta prueba. Trabajamos con los cuatro CP de mayor *eigenvalue* (que en nuestro caso explican el 75% de la varianza de la población) y a su vez, dentro de cada componente principal (CP), seleccionamos variables, utilizando el *eigenvector*² como medida de contribución de la variable al factor (Abergel *et al.*, 2017).

Para la realización análisis multivariados en conducta de animales es común la utilización de al menos dos métodos alternativos. Construimos, por lo tanto, dendrograma para los datos recogidos a partir del día 9 de tarea de discriminación siguiendo los siguientes métodos de elección de variables:

- Método 1: seleccionamos los 4 factores de mayor *eigenvalue*, y de cada uno tomamos las 2 variables de mayor *eigenvector*².
- Método 2: seleccionamos los 3 factores de mayor *eigenvalue*, y tomamos las variables superen un *eigenvector*² = 0,1, independientemente de a qué factor pertenecen.
- Método 3: se utilizaron las 19 variables.

Realizamos una normalización (min-máx, 0-1) de las variables y a partir de estas confeccionamos dendrogramas jerárquicos aditivos. Los dendrogramas jerárquicos poseen una gran ventaja frente a otros métodos, como por ejemplo *k-means*, y es que no requiere del establecimiento previo de un número específico de grupos (*k*) para la creación del árbol. Al ser una de nuestros objetivos la búsqueda dentro de nuestra población de la existencia o no de grupos diferenciables a partir de su comportamiento, era un requisito la ausencia de grupos impuestos. Además, se aconseja el uso de análisis jerárquicos cuando se utilizan *n* bajos, como es el caso de los análisis comportamentales en animales, quedando el uso de análisis no-jerárquicos para *n*>200 (Dolnicar, 2002). Utilizando la herramienta base del programa *R*, *hclust*, para la creación de los dendrogramas. Para la creación de estos árboles utilizamos *Ward* como método de aglomeración y distancias euclídeas para definir la distancia entre vectores.

A continuación, compramos los árboles obtenido con los 3 métodos de selección de variables. Para comparar dendrogramas utilizamos las funciones incluidas dentro del paquete *dendextend* (Galili, 2015). *Entanlement* y *untangle* son funciones de análisis de dendrogramas que permiten analizar similitudes entre dos de ellos rotando libremente las ramas que conforman un dendrograma, siempre y cuando los lazos entre casos y entre ramas no se rompan. La función *entanglement* enfrenta los dos dendrogramas y une con una línea cada caso con su correlato en el dendrograma de comparación. Luego mide el grado de entrecruzamiento de las líneas resultante, penalizando especialmente los ángulos muy acentuados (situación que se da cuando los corrimientos de casos entre dos dendrogramas son muy marcados). La función *untangle*, itera entre todas las combinaciones permitidas posibles, buscando un *entanglement* mínimo. En conjunto, estas funciones entregan un índice de “enmarañamiento” que va de 0, cuando no haya cruce alguno y todas las líneas sean paralelas (por ejemplo al comparar

cualquier dendrograma contra sí mismo), a 1 cuando un árbol es completamente inverso al otro (fuente: hoja de ayuda de la función *entanglement*, del paquete de R *dendextend*). Para darle al método un asidero estadístico, realizamos permutaciones aleatorias de la posición de los casos dentro del árbol, manteniendo la estructura general del dendrograma intacta, mediante un algoritmo de *bootstrap* diseñado en R. Realizamos un número de 100 iteraciones para cada situación o día estudiado. Analizamos la distribución de los resultados y calculamos los intervalos de confianza en el 95% (IC95) para cada una. Finalmente evaluamos si el dato observado se encontraba incluido dentro de dicho intervalo. El enmarañamiento compara la similitud con la que se ubican los casos en los extremos de los árboles, sin embargo no comprara la topología del árbol en sí misma.

Otra tipo de comparación que utilizamos fue el coeficiente de correlación gamma de Baker (*Baker's gamma correlation coefficient*; Baker, 1974). Este índice es una medida de la similitud entre dos árboles jerárquicos. Se calcula tomando dos casos del primer dendrograma y buscando el nivel más alto dentro del árbol en el cual se lo puede cortar y los elementos siguen perteneciendo a la misma rama. Una vez lo encuentra, contabiliza cuantos grupos (k) quedaron divididos producto de dicho corte. Acto seguido coloca ese valor en una lista para ese primer árbol. Luego, repite el proceso en el segundo árbol y coloca el k obtenido en una lista para el segundo árbol. Habiendo finalizado, toma una nueva pareja de casos. Repite esta acción tantas veces como combinaciones de pareja de elementos hay dentro de un árbol. Finalmente calcula un índice de correlación de Spearman entre ambas listas de k . El índice gamma de Barker puede tomar valores entre -1 y 1, siendo 1 una correlación perfecta, -1 una anti correlación y un valor cercano a 0 indica que los dos árboles no son similares entre sí. Con el fin de realizar comparaciones estadísticas, se realizó un método de aleatorización y muestreo por *bootstrap* equivalente al mencionado para el enmarañamiento. El conjunto de todos los valores de k , al referirse al número de grupos que existen a una determinada altura del árbol, describe cómo las diferentes ramas se insertan dentro del árbol. Por esto, el coeficiente de correlación gamma de Baker no solo compara dos dendrogramas por los casos que se leen en sus extremos, sino la topología general del árbol. Sin embargo, esta prueba no describe el largo de las ramas ni la existencia de grupos (fuente: adaptación del sector de ayuda de la función *cor_bakers_gamma* del paquete *dendexternd* para R).

Para determinar la existencia de grupos significativamente segregados dentro de cada dendrograma, es decir al presencia de subpoblaciones estadísticamente diferentes, se utilizó el paquete *eclust* (Bhatnagar *et al.*, 2018) con la función *fviz_nbclust* que incluye varios métodos

de aproximación al número de grupos ideal. Es común en el campo la utilización de varios de estos métodos en simultáneo, quedando sujeta la determinación del número de grupos a la coincidencia de todos a la vez (o al menos, el número más parsimonioso). Por esta razón utilizamos los métodos *gap statistics* (Tibshirani, Walther and Hastie, 2001) y media de Silhouette (Rousseeuw, 1987).

Finalmente se analizó los datos recogidos a partir del grupo con lesión selectiva de las ICE para evaluar el efecto de la lesión en la clasificación por estrategias. Para hacerlo, agrupamos los datos de los grupos lesionado y control, realizamos una nueva normalización y sometimos los datos a la creación de un dendrograma aditivo jerárquico de manera idéntica a lo realizado con anterioridad.

VIII) Fijación transcárdica y seccionado de tejidos

Al momento de realizar la eutanasia de los animales, los mismos fueron anestesiados con una sobredosis de hidrato de cloral 5% en solución salina y fueron sometidos a una perfusión transcárdica con 10 mL de solución salina fría con heparina (2000 U/l) seguida de 40 mL de solución de paraformaldehído 4% (PFA) en PBS 0,01M. Los cerebros fueron extraídos y post-fijados durante una noche en la misma solución de PFA a 4 °C, seguida de una crioprotección en sacarosa 30% en PBS durante 48 hs. Los cerebros fueron posteriormente cortados en secciones coronales de 30 µm en un micrótopo equipado con platina de congelación (Leica SM2010R). Las secciones se adquirieron de manera seriada y fueron almacenadas en PBS-azida 0,1% para su posterior utilización.

Los animales asignados a ensayos de cuantificación de marca de pS6rp en ICE fueron perfundidos 30 minutos luego de comenzada la prueba comportamental, siguiendo procedimientos idénticos a los descriptos.

IX) Inmunohistoquímica y cuantificación

Para este trabajo se realizaron los siguientes ensayos de inmunohistoquímica en cortes flotantes (*free-floating IHC*):

- IHC de fluorescencia doble anti-ChAT y anti-pS6rp para analizar cambios en la actividad de las ICE mediante la cuantificación de este marcador específico. Fueron sometidos a esta prueba los cortes provenientes de los animales *wt* (**objetivo 1**).
- IHC de fluorescencia doble anti-ChAT y anti-c-Fos, para evaluar cambios en la actividad de las ICE mediante este marcador general. Fueron sometidos a esta prueba los cortes provenientes de los animales *wt* (**objetivo 1**)
- IHC anti-ChAT, revelado con 3,3'-diaminobenzidine (DAB) para verificación del grado de lesión en los animales de los **objetivos 2 y 3**, utilizado con cortes provenientes de animales lesionados y control.

Para cuantificar el grado de fosforilación de la proteína S6rp, realizamos un doble marcado **inmunohistoquímico anti-ChAT y anti-pS6rp**. Para un protocolo detallado, buscar **Anex II**. Se procuró que en cada *well* haya al menos dos cortes de cada uno de los tres tratamientos (*familiar, decisión y novedad*, para el caso de los animales que pasaron por el laberinto Y; *familiar, probe-test, y forzado* para el caso de los animales sometidos al laberinto en cruz), de esta manera podemos realizar comparaciones entre esos tejidos y descartar que efectos cuantitativos que encontremos sea debido a un efecto *well*. Los cortes fueron lavados con buffer fosfato salino 0,01M pH 7,4 (PBS) y posteriormente bloqueados mediante incubación a temperatura ambiente en PBS Tritón X-100 0,1% y BSA 3% bajo agitación por 2 horas. Luego, los cortes fueron incubados *overnight* junto a los anticuerpos primarios anti-ChAT hecho en cabra (1:1000, AB 144P; Millipore) y anti-pS6rp (Ser240/244) hecho en conejo (1:500, AB #2215; Cell Signaling) en PBS-BSA 1% en agitación a 4 °C. El día siguiente, los cortes fueron lavados y luego incubados con anticuerpo secundario anti-cabra biotinilado de caballo (1:400, BA-9500; Vector Laboratories) en PBS-NGS 1% por 2 horas bajo agitación a temperatura ambiente. Más tarde, los tejidos fueron nuevamente lavados y la marca anti-ChAT revelada mediante incubado con el conjugado estreptoavidina-isotiociano de fluoresceína (FITC, 1/400, Ref: 434311, Invitrogen), en PBS-NGS 1%, 2 horas a temperatura ambiente. Luego de los correspondientes lavados, los cortes fueron finalmente incubados para el revelado de la marca anti-pS6rp mediante el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluoróforo Cy3 hecho en cabra (1/400, Code: 111-165-144, CiteAb), 2 horas en PBS-NGS 1%, a temperatura ambiente bajo agitación. Luego de tres lavados, los cortes fueron montados utilizando un medio de montaje para preservar la fluorescencia (Vectashield, Cat: H-1000, Vector Labs). Los cortes fueron montados y almacenados a 4°C hasta ser fotografiados.

Posteriormente, se adquirieron imágenes de estriados completos de estos tejidos en un microscopio de fluorescencia (Zeiss, AxioImager M210, objetivo 20x; cámara Orca-flash4aT, Hamamatsu) controlado por el software de análisis y reconstrucción 3D Neurolucida (MBF, Bioscience, USA). El microscopio cuenta con el complemento Apotome (Zeiss), un dispositivo que utiliza iluminación estructurada para generar secciones ópticas delgadas, similares a las obtenibles mediante microscopía confocal. La utilización del sistema de adquisición automatizado permitió reconstruir imágenes mosaico del estriado completo a 20X. En todos los casos los ajustes de exposición, intensidad de iluminación, sensibilidad de la cámara y rango dinámico de trabajo se mantuvieron constantes para todas las fotografías de una cohorte de animales. Se evitó en todos los casos sobre o subexponer las imágenes. Las correcciones de contraste y brillo fueron aplicadas a la totalidad de la imagen.

Para el análisis cuantitativo de la intensidad de marca anti pS6rp utilizamos un macro del programa ImageJ que, de manera semi-supervisada, detectaba células ChAT⁺ (utilizando un umbral de intensidad para la marca en el canal rojo y un límite en el tamaño mínimo y máximo en el tamaño de la partícula detectada) y determinaba en esos sitios áreas de interés (ROI por sus siglas en inglés, *region of interest*). Dentro de esas ROIs es posible determinar la intensidad de marca promedio en el canal de pS6rp (medido como valor de grises promedio – *mgv* de sus siglas en inglés *mean gray value*) y a su vez determinar la posición X e Y de las mismas dentro de la sección de estriado donde se encuentran. Definimos como *background* la intensidad de marca basal para el canal de pS6rp en el cuerpo caloso (*mgv* del cuerpo caloso). A partir de estos datos determinamos que la marca de pS6rp para cada célula ChAT⁺ es el resultado de la resta del *mgv* de ese ROI menos el *mgv* del *background*. Agradecemos especialmente a Carlos Pretell por la creación y facilitación del macro de detección de ROIs para ImageJ.

En todos los casos, en vistas de que el análisis de la marca de pS6rp que realizamos es un estudio cuantitativo, los tejidos provinieron de animales sacrificados 30 minutos luego del comienzo de la actividad comportamental. Al no existir un criterio unánime dentro de la literatura, habiendo grupos que optan por tiempos cortos (7 minutos, Matamales y col., 2016), medios (20 minutos, Bertran-Gonzales y col. 2012) o más prolongados (de una hora a dos, Knight y col. 2012) realizamos una puesta a punto para determinar, en nuestras condiciones experimentales, cuál era el tiempo óptimo. Realizamos eutanasias de los animales luego de realizar una prueba de exploración en campo abierto (*open field*) y cubriendo el rango desde 15 minutos hasta 1 hora. Utilizamos tejido de estos animales para una prueba de IHC y no encontramos diferencias apreciables en el nivel de marca de pS6rp entre grupos. Por

consiguiente, decidimos fijar el tiempo de espera entre el inicio de la actividad comportamental y la perfusión en 30 minutos, duración que nos era funcional ya que nos permitía invertir ese tiempo para correr la prueba y/o perfundir a otros animales.

La **IHC doble anti-ChAT y anti-c-Fos** siguió un procedimiento similar a la de pS6rp, con los siguientes cambios:

- Bloqueo: NHS 5% + Tritón 0,2% en PBS, 3hs.
- Anticuerpo primario: anti-c-Fos 1/1500 en conejo (#2215, Cell Signaling Technology, Beverly) + anti-ChAT 1/1000 (1:1000, AB 144P; Millipore), en PBS- NHS 1%.

Puede consultarse el protocolo extendido en el **Anexo II**.

En las pruebas lesión de las ICE, el grado de lesión fue confirmado mediante detección por **IHC anti-ChAT** revelado por 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich; para conocer el protocolo en detalle, dirigirse a **Anexo II**)

Brevemente, los cortes fueron lavados con PBS y se procedió a un bloqueo de las peroxidasas endógenas mediante una incubación de 20 minutos en agua oxigenada 3% en PBS. Luego de un lavado, se hizo un bloqueo de 2 horas en BSA 3% - Tritón 0,1% en PBS. Una vez finalizado, se procedió a la incubación *overnight* en PBS con el anticuerpo primario anti-ChAT hecho en cabra (1:1000, AB 144P; Millipore). Al día siguiente, y luego de los correspondientes lavados, se incubó 2 horas con anticuerpo secundario anti-cabra biotinilado hecho en caballo. Posteriormente, y luego de lavar, se incubó los tejidos 2 horas en presencia del complejo avidina-peroxidasa (ABC Kit, PK-6101, Vectastain) en PBS. Luego, los cortes fueron lavados con buffer Tris Buffer pH 7,4 0,25M (TB), libre de sodio para el subsiguiente revelado con por 3,3'-diaminobenzidine en agua oxigenada 0,1% en TB. El revelado fue interrumpido mediante lavados con TB primero, y PBS después. Posteriormente los cortes fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados y dispuestos a secar en un lugar oscuro y fresco. Exceptuando la incubación con anticuerpo primario (4°C, con agitación), todas las demás fueron realizadas a temperatura ambiente en agitación.

72 horas más tarde se realizó una deshidratación seriada en solventes orgánicos (Alcohol 70%, 90%, 100% y xilol) para finalmente ser montados utilizando un bálsamo sintético DPX de base xilol (Alwik). Luego de varios días de secado, los vidrios estaban listos para ser fotografiados. Realizamos fotos color a 20x de estriado completo y septum de todos los

animales mediante un microscopio de luz transmitida (Zeiss AX10, objetivo 20x; cámara color QimagingQlick, Bioscience, USA), de manera similar a lo descrito para fluorescencia.

El grado de lesión fue determinado mediante el conteo de cuerpos celulares ChAT⁺ mediante un macro automatizado no-supervisado del programa FIJI ImageJ. Para este análisis se utilizaron cuatro secciones por animal (coordinadas según atlas de Paxinos: dos cortes +0,7 mm y dos -0,2 mm desde el bregma). Se determinó que aquellos animales que cuenten con una lesión menor al 80% del número de ChAT (respecto al promedio de los ratones control) o presenten un desbalance entre hemisferios, (conteniendo uno de ellos más del 30% de las células ChAT⁺ remanentes) no fueran considerados para los análisis comportamentales. Se realizó también una cuantificación en la región del septum-banda diagonal, una región cercana al estirado con considerable presencia de neuronas ChAT⁺ a modo de control de la especificidad espacial de la manipulación.

X) Estadística

Utilizamos Microsoft Excel para la organización de los resultados y el programa STATISTICA para los análisis estadísticos. Ninguna serie de datos incumplía las asunciones de normalidad, por lo que pruebas estadísticas paramétricas de 2-colas fueron utilizadas en todos los casos. Se fijó $p=0,05$ como umbral de significancia. Se utilizó la prueba de t de *Student* para la comparación de pareja de datos, ANOVA con prueba LSD *post hoc* para múltiples comparaciones y ANOVA de dos vías con medidas repetidas para las curvas de aprendizaje.

Para el análisis estadístico del laberinto en cruz y Barnes, donde una de las variable principales es proporción de uso de estrategias, se utilizó prueba de *chi*-cuadrado para análisis de efectos generales y, en caso de encontrar diferencias, se realizaron comparaciones planeadas mediante la prueba de Barnard. Según se ha propuesto (Mehta and Senchaudhuri, 2003) este *test* cuenta con un poder estadístico mayor que la prueba de *chi* y la prueba exacta de Fisher. En todos los casos, para mayor claridad, la prueba estadística utilizada y el número de animales se encuentra al pie de cada figura. Para el análisis estadístico de comparación entre *clusters* se utilizó el paquete para R, *dendextend* (Galili, 2015).

Capítulo 1 – Cuantificación de actividad de las ICE mediante el marcador pS6rp

Introducción

Existe abundante evidencia que sugiere que la toma de decisiones, un tipo particular de selección de planes motores basada en información externa e interna, requiere de la intervención de la mPFC y del estriado (Redgrave, Prescott and Gurney, 1999; Barraclough, Conroy and Lee, 2004). Esta toma de decisiones involucra en muchos casos la selección de una estrategia preexistente por sobre otra. Esta selección se iniciaría en la mPFC y los GB participarían del proceso retroalimentando dicha corteza de información integrada y procesada (Mink, 1996; Humphries, Stewart and Gurney, 2006; Houk *et al.*, 2007). El estriado en particular, ejercería un rol de filtrado y selección de actividad neuronal en la mPFC de manera análoga a lo que ocurre durante el proceso de selección de un plan motor en el sub-circuito estriatal que recibe información de cortezas motoras (Matsumoto *et al.*, 1999). Dentro del estriado la señal dopaminérgica aportaría la información relativa a la recompensa (mediante la señal de error de predicción de recompensas); y el balance en la actividad de las neuronas de proyección estriatales promovería y/o suprimiría acciones. Se ha propuesto que las ICE jugarían un papel importante en la toma de decisiones, ya sea codificando la significancia o saliencia de estímulos concernientes a la decisión a tomar o bien, codificando el error de predicción de estado. Bajo esta visión, las ICE tienen un rol indirecto sobre la toma de decisiones, siendo incapaces de iniciar este proceso por su cuenta pero participando en el filtrado o selección de las mismas (Cox and Witten, 2019). Sin embargo el rol de las ICE durante el proceso de selección de estrategias dirigidas a metas todavía no es claro.

Antes de abordar cuál sería el rol de las ICE en el proceso de selección de estrategias nos interesó saber si las mismas eran capaces de modificar su actividad tónica basal durante dicho proceso, señalizando de algún modo aspectos de dicha tarea. Como se describió en la introducción general, existe evidencia electrofisiológica que indica que las ICE son capaces de codificar estímulos salientes en contextos de toma de decisiones (Kimura, 1984, Apicella, 1991). Sin embargo, dicha evidencia proviene de estudios realizados en primates y no se concentra específicamente en el proceso de selección de estrategias como los que nos interesan en el contexto de esta tesis.

El abordaje electrofisiológico *in vivo* permite el registro de la actividad neuronal con la ejecución en simultáneo de una tarea comportamental. Sin embargo, dada la baja densidad de ICE y la dificultad de aislar unidades a partir de los registros mediante *clustering*, especialmente en roedores (que si es posible en primates, Yamada *et al.*, 2016; Apicella, 2017) el abordaje electrofisiológico se vuelve impráctico. Para lidiar con este problema, es común recurrir a marcadores inmunohistoquímicos de actividad neuronal, como lo son los mensajeros secundarios de cascadas de señalización o genes de expresión temprana. No obstante, es sabido que los marcadores más populares como c-Fos o Arc (Gaiddon, De Tapia and Loeffler, 1999; Bertran-Gonzalez *et al.*, 2012), responden de manera diferente en cada tipo celular y no existe hasta la fecha una caracterización específica y clara de su uso en las ICE. Realizamos un experimento piloto que sugiere que al menos c-Fos no sería un buen marcador de actividad en las ICE. Determinamos que menos del 5% de las ICE presenta marca c-Fos positiva (superan el valor medio de marca de c-Fos en las ICE más dos desvíos estándar) luego de realizar los tratamientos comportamentales utilizados en este capítulo. Además de su baja presencia, la técnica no fue capaz de resolver entre los diferentes tratamientos evaluados.

El grupo de Balleine, en 2012, describió que las ICE en preparaciones *ex vivo* presentan un nivel de fosforilación en las serinas 240-244 de la proteína ribosomal S6 (pS6rp, una proteína que forma parte del ribosoma y se encuentra en el espacio entre las dos subunidades) que correlaciona con la frecuencia de disparo de potenciales de acción de estas células. De esta manera, por ejemplo, rodajas de cerebros de ratones que fueron sometidas a medios extracelulares con alta concentración de potasio, condición que aumenta la excitabilidad y por lo tanto la frecuencia de disparo, presentaron un incremento en el nivel de marca de pS6rp; por el contrario, ante la modulación con tetrodotoxina (TTX), bloqueante de canales de sodio voltaje-dependientes y, por consiguiente, disruptor de los potenciales de acción, la intensidad de la marca de pS6rp disminuía significativamente (**Figura R1**). Estudios posteriores lograron replicar estos resultados mediante manipulaciones *in vivo*, valiéndose para dicha validación de compuestos farmacológicos (Knight *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta la fecha nunca se ha utilizado la marca de pS6rp como método de medición del nivel de actividad de las ICE ante tratamientos comportamentales.

En este trabajo utilizamos la intensidad de la marca de la forma fosforilada de la proteína S6rp por inmunohistoquímica como medida del grado de activación de las ICE en animales sometidos a tareas comportamentales con diferentes demandas de toma de decisión y novedad.

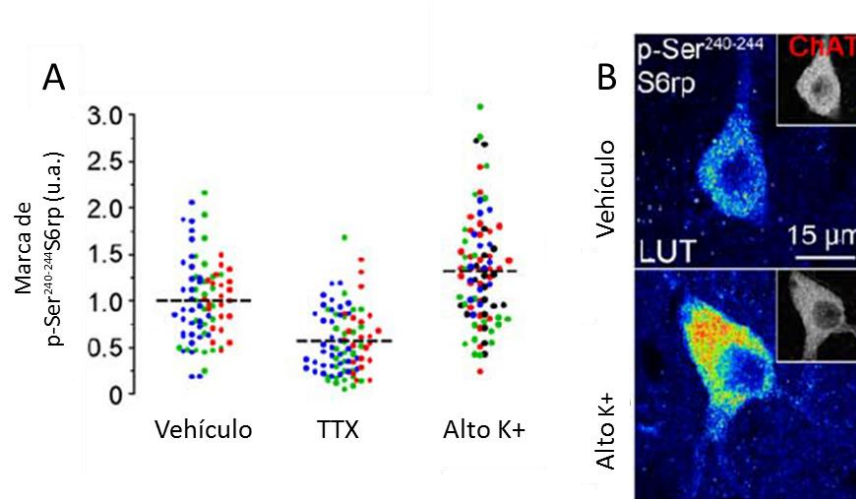


Figura R1: El nivel de marca de pS6rp en las ICE correlaciona positivamente con su frecuencia de disparo. A, marca de pS6rp medida 1 hora después de incubar la rodaja en solución fisiológica (SF), SF+TTX o una solución de alto potasio. **B,** marca de pS6rp observado en células ChAT⁺ en imágenes confocales de alta magnificación. Figura modificada de Beltran-Gonzales y col., 2012

Resultados

Puesta a punto de IHC para cuantificación de nivel de marca del pS6rp

Mediante la puesta a punto de la técnica de IHC doble anti-pS6rp y anti-ChAT fuimos capaces de producir imágenes comparables a las presentadas en el trabajo pionero de Beltrán-Gonzales y col. 2012. En general, observamos que la marca de pS6rp, si bien está presente en otros tipos celulares como ya ha sido reportado (Valjent *et al.*, 2011; Biever *et al.*, 2015), es considerablemente más conspicua en las ICE. Asimismo, el nivel de marca dentro de estas interneuronas es variable, existiendo células con alta y baja marca (**Figura R2 y R3**). El nivel de marca de pS6rp no correlaciona con el nivel de expresión de la enzima ChAT, utilizada para identificar a las neuronas (regresión no significativa; $R=0,02$; $p=0,75$). Una vez conformes con los parámetros de la IHC y las fotos obtenidas, decidimos evaluar si la intensidad de marca de pS6rp podía reflejar cambios en la actividad de las ICE aún de manera indirecta. Así, nuestro primer experimento buscó evaluar si el nivel de fosforilación de S6rp en las ICE se modificaba frente a eventos ambientales capaces de desencadenar la respuesta de pausa en las ICE según estudios previos (Zhang y col., 2017). Además, comenzamos a evaluar si las ICE están involucradas en la toma de decisiones al incluir una condición que permitía la libre elección de los brazos a explorar en el laberinto y la comparamos con una condición de “elección forzada” en la cual no existen brazos alternativos a explorar.

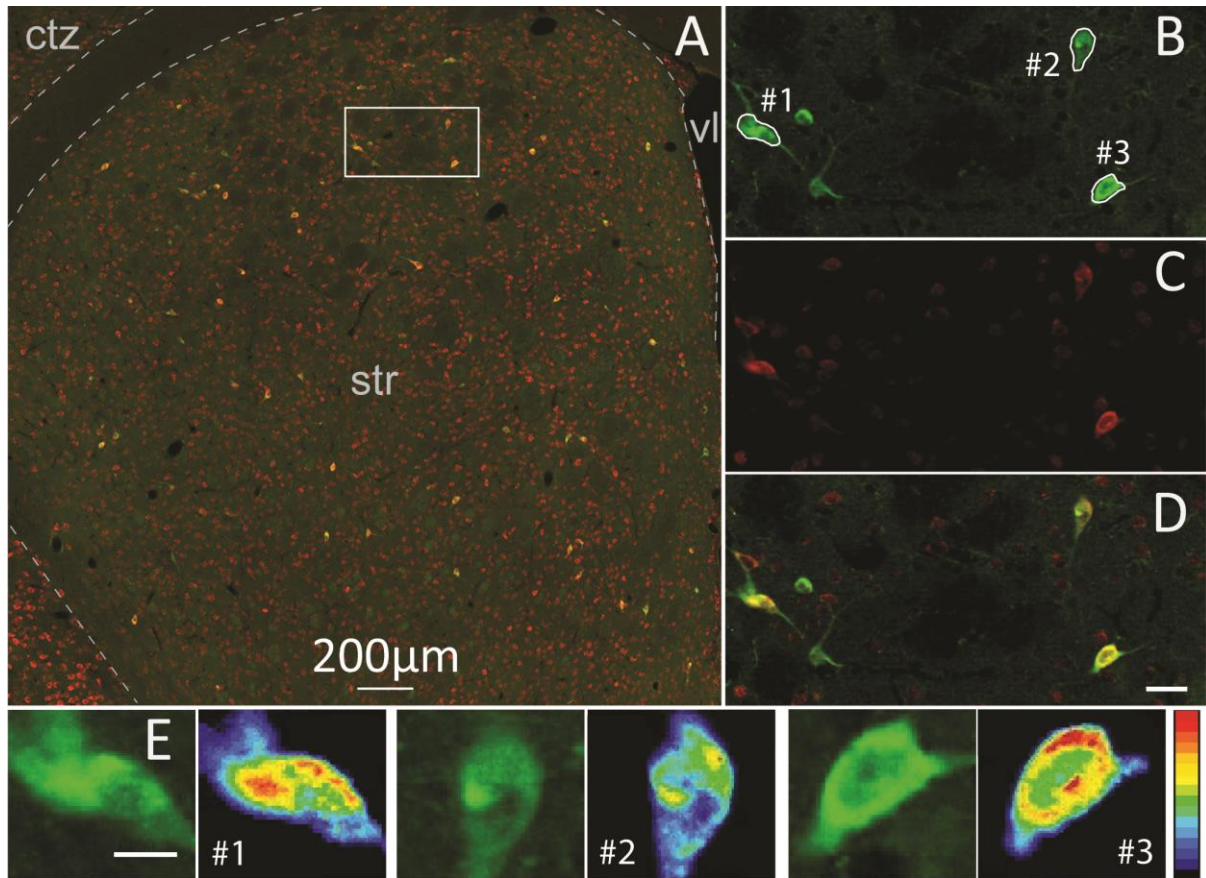


Figura R2: Imágenes representativas de una sección coronal de estriado inmunomarcado anti-ChAT (en verde, ICE) y pS6rp (en rojo). A, imagen de hemiestriado derecho, magnificación 5X. Los *insets* **B, C, D** corresponden a fotografías de alta magnificación del cuadro blanco en A. **B,** canal verde ChAT, **C** canal rojo pS6rp, **D,** *merge*. **E,** magnificación de células señaladas en **B**. Además incluye función de paleta pseudocoloreada (*Lookup table*) del programa ImageJ aplicada el canal pS6rp. Escalas: en baja magnificación, 200 μ m; en alta magnificación B-C 25 μ m, E 10 μ m. Referencias: str: estriado; ctz: corteza; vl: ventrículo lateral.

Cambios en los niveles de marca de pS6rp en animales expuestos a un laberinto en forma de Y

Animales *wt* fueron colocados en un laberinto en Y ubicado en el centro de una habitación con claves distales. Dentro del mismo, pudieron recorrer libremente dos de los tres brazos que lo conforman durante 8 minutos por día, a lo largo de 8 días. Los brazos disponibles para la exploración eran elegidos de manera pseudo-aleatoria y eran diferentes para cada animal. Como resultado, los ratones se familiarizaban con el laberinto completo (la distancia total recorrida disminuye del día 1 al día 8 significativamente; ANOVA de medidas repetidas, $F_{1,9}=5,35$, $p=0,04$.) y con las diferentes perspectivas del ambiente. Sin embargo, nunca tuvieron la oportunidad de decidir qué brazo explorar una vez alcanzado el punto central del laberinto.

Diseñamos 3 sesiones posibles para el día 9 de exposición al laberinto: **grupo familiar**, los animales continuaron con el ya conocido esquema de exploración de dos brazos del laberinto, como los 8 días anteriores; el **grupo novedad**, idéntico al grupo anterior pero en el que se agregó la aparición repetida de estímulos modifican la actividad de las ICE en registros electrofisiológicos *in vivo* (Zhang y col., 2017; para detalles, ver Materiales y métodos); y finalmente el **grupo decisión**, cuyos animales fueron expuestos por primera vez a los tres brazos en simultáneo, donde al llegar desde un dado brazo al centro del laberinto, debieron optar por la exploración de uno de los dos brazos ahora disponibles.

Comenzando el análisis evaluando el efecto de los primeros dos grupos. Al comparar los grupos *familiar* y *novedad* podemos concluir que los estímulos salientes redujeron significativamente los niveles de señal (ANOVA de una vía, diferencias entre tratamientos, **Figura R3, derecha**). Esto sugiere que los cambios en actividad de las ICE inducidos por los estímulos novedosos generan un impacto en la marca de pS6rp. Al analizar el efecto de la toma de decisiones, encontramos que los animales sometidos al tratamiento *decisión* también presentan niveles más bajos de marca de pS6rp que el grupo *familiar*, alcanzando niveles equiparables al grupo *novedad*.

El laberinto en Y es tradicionalmente utilizado para cuantificar la tendencia natural de los animales a maximizar la información que pueden recolectar de un ambiente. Siendo que el índice de alternancia dentro del laberinto difiere significativamente del azar (70.7 ± 2.2 %, prueba de t de una muestra versus 50%, $t_5 = 9.49$ $p = 0,002$), podemos afirmar que los animales asignados al tratamiento *decisión* adoptaron la conducta de alternar entre brazos. De esta manera, los animales de los grupos *decisión* y *familiar* difieren en la complejidad de la estrategia de exploración, siendo que en el grupo *familiar* la máxima eficiencia de exploración es alcanzada al desplazarse de un extremo al otro de lo que puede entenderse como un camino lineal, mientras que para el grupo *decisión* una vez encontrado el sitio central del laberinto se habilita una decisión relacionada a qué brazo explorar a continuación. Las diferencias descritas en los niveles de marca de pS6rp entre los diferentes grupos no pueden ser atribuidas a diferencias en los niveles de actividad motora, siendo que la distancia total recorrida y el número de brazos visitados no difieren entre grupos (**Figura R4**, ANOVA de una vía). Este resultado sugiere que manipulaciones comportamentales sutiles tienen la capacidad de modular el nivel de marca de pS6rp en las ICE del estriado. En particular, en ambientes familiares la actividad de las ICE podría ser modificada por estímulos salientes así como también, por demandas cognitivas que

requieran la toma de las decisiones e incluyan la selección de estrategias de exploración más complejas.

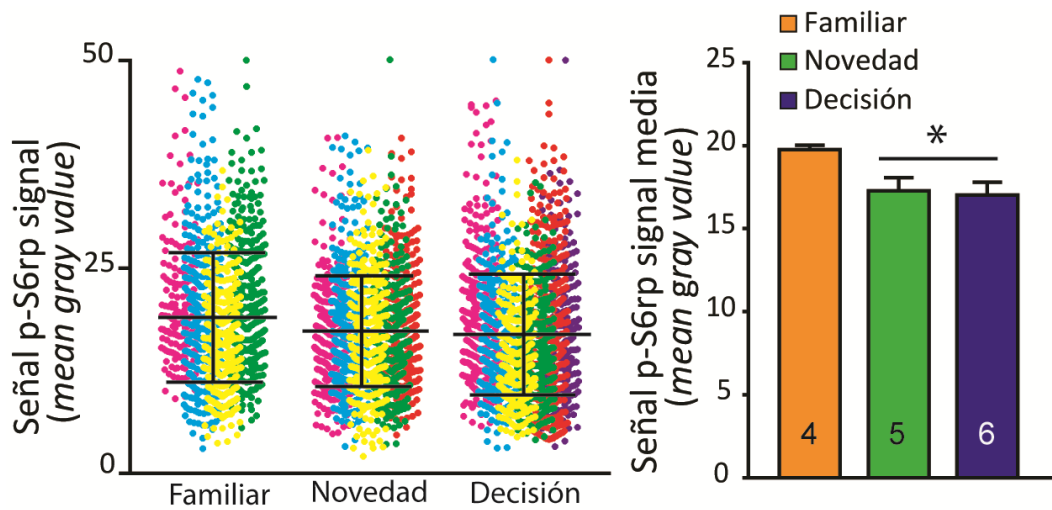


Figura R3: La cuantificación de pS6rp en neuronas ChAT+ estriatales determinó que la tarea comportamental novedosa induce niveles más bajos de intensidad de marca. A, en gráfico de puntos, cada punto corresponde a una neurona ChAT+, cada color corresponde a un animal diferente. B, las barras indican señal de pS6rp media por tratamiento (el número de animales es indicado en cada barra). ANOVA de una vía, $F_{2,12}=4,8$, $p=0,03$; Análisis *post hoc* LSD revela diferencias entre grupo *familiar* vs. grupo *novedad* ($p=0,03$) vs. grupo *decisión* ($0,01$). n de animales se encuentran en la base de cada barra. Barras de error señalan error estándar.

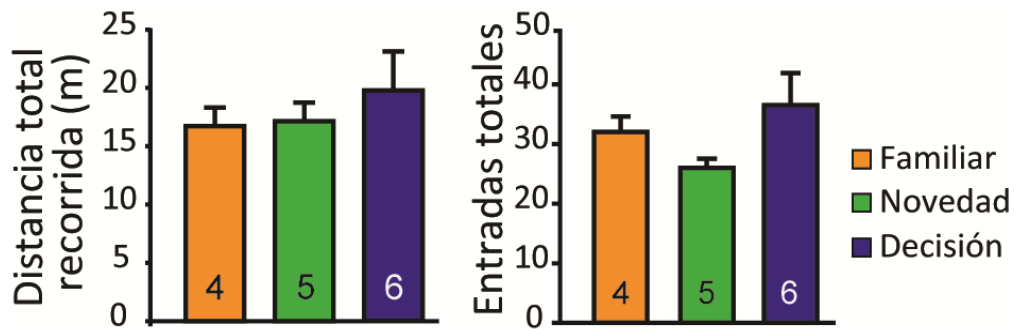


Figura R4: No se observaron diferencias significativas en parámetros comportamentales motores registrados durante el laberinto Y. No se encontraron diferencias en el número de transiciones entre brazos ni en el número de entradas a los brazos entre los tres tratamientos. ANOVA de una vía, no diferencias significativas $F_{2,12}=1,82$, $p=0,2$.

Cambios en la presencia de la forma fosforilada de S6rp como consecuencia de la selección de estrategias en conflicto en un laberinto en cruz de dos soluciones

Para caracterizar en mayor profundidad la respuesta de las ICE durante comportamientos de exploración y selección de estrategias, utilizamos una tarea ampliamente difundida y ya validada para clasificar las estrategias de navegación empleadas durante la resolución de una tarea dirigida a metas, el laberinto en forma de cruz de dos soluciones

(laberinto en cruz DS). En una fase inicial, entrenamos un grupo de 14 animales *wt* durante 8 días para encontrar un *pellet* de alimento ubicado contingentemente en uno de los dos brazos del laberinto (este u oeste, elegido aleatoriamente entre animales). A lo largo de esta fase, todos los animales realizaron la misma actividad siendo liberados en el brazo sur del aparato. A lo largo de las sesiones los animales aprendieron la tarea aumentando paulatinamente el número de elecciones del brazo correcto (recompensado), alejándose del valor inicial cercano al 50% previsto por el azar (**Figura R5**, línea negra). Cabe destacar que durante esta fase tanto la estrategia espacial como una estímulo-respuesta (E-R) constituían estrategias posibles e igualmente efectivas. A su vez, tal como fue planteada la prueba no existieron restricciones ni castigos al cambio de estrategia, pudiendo el animal optar por una u otra durante esta fase sin que ello afecte su desempeño y sin que este cambio pueda ser evidenciado experimentalmente.

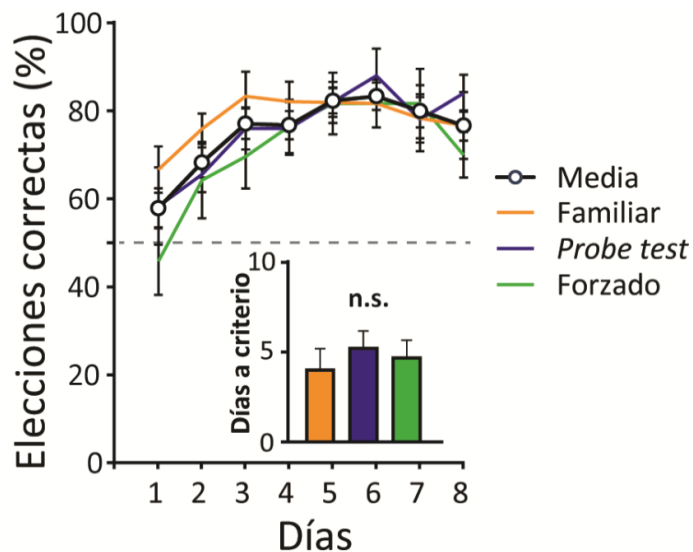


Figura R5: El desempeño de animales asignados a cada tratamiento comportamental era equivalente. Desempeño de los animales *wt* a lo largo de la fase de aprendizaje de 8 días de la tarea laberinto en forma de cruz. Las círculos blancos representan el promedio de todos los animales; los ratones que luego serían asignados a los tratamientos *familiar*, *probe test* y *forzado* al día 9, se encuentran agrupados, mostrando una similar manera de aprender la tarea (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, factor “futuro tratamiento” no significativo, $F_{2,105}=0,68$, $p=0,52$; factor tiempo significativo, $F_{7,105}=1,28$, $p<0,001$; interacción no significativa. *In set*: Días requeridos para superar por dos días consecutivos un porcentaje de elecciones correctas superior al 80%, no difieren entre grupos, ANOVA de una vía, $F_{2,15}=0,80$, $p=0,46$. $n=5$ animales por cada tratamiento.

Luego de 8 días de entrenamiento los animales adquirieron un desempeño estable en la tarea, cercano al 80% de elección por el puerto 5. Se los dividió en diferentes grupos experimentales que el día 9 fueron sometidos a condiciones diferentes, procurando que todos los grupo estén constituido por animales de igual desempeño (**Figura R5**, líneas de colores, ANOVA de medidas repetidas, factor tratamiento no significativo; *inset* muestra días necesarios para adquirir una preferencia superior al 80% durante dos días consecutivos, ANOVA de una vía, diferencias no significativas). Un conjunto de animales fue entrenado siguiendo los mismos lineamientos que se utilizó en los ocho días previos (**Figura R6, grupo familiar**). Otro grupo fue sometido a un ensayo de prueba (**probe test**) para promover la selección de una estrategia para resolver la tarea. En el ensayo de prueba el animal es liberado en el brazo norte y al llegar al centro del laberinto debe, presumiblemente, elegir entre las dos posibles estrategias de resolución de la tarea ya que bajo esta condición son incompatibles entre sí, manifestando a través de su elección la estrategia seleccionada.

A fin de evaluar el impacto de la selección de estrategias sobre las ICE, comparamos el nivel de marca de pS6rp mediante una tinción inmunofluorescente entre estos dos grupos. El nivel de marca de pS6rp fue significativamente menor en el grupo *probe test* comparado al encontrado el *grupo familiar*, el cual no experimentó no conflicto vinculado a la estrategia a seguir (**Figura R6**, ANOVA de dos vías, factor tratamiento significativo, interacciones no significativas). La reducción fue encontrada tanto en la región dorsolateral como en la ventromedial del estriado (**Figura R6**, abajo) y no se observó ninguna diferencia en cuanto al plano coronal estudiado (**Figura R6**, derecha;).

A su vez, esta disminución en el nivel de marca mostró ser independiente de la estrategia utilizada (*mean gray value* (u.a) estrategia E-R= $17,7 \pm 3,4$; estrategia espacial = $14,9 \pm 1,0$, ANOVA de una vía, $F_{1,3}=0,28$, $p=0,63$). Cabe señalar, que al ser todas las elecciones recompensadas, esto no puede deberse a diferencias ocasionadas por la obtención de recompensas. Además, no se encontraron diferencias en la latencia a realizar la elección, duración media del ensayo, o distancia total recorrida (**Figura R7**), lo que indicaría que el efecto en los niveles de marca de pS6rp no se debió a diferencias en niveles generales de motivación o desempeño motor (ANOVA de una vía, no hay diferencias significativas; correlación no significativa)

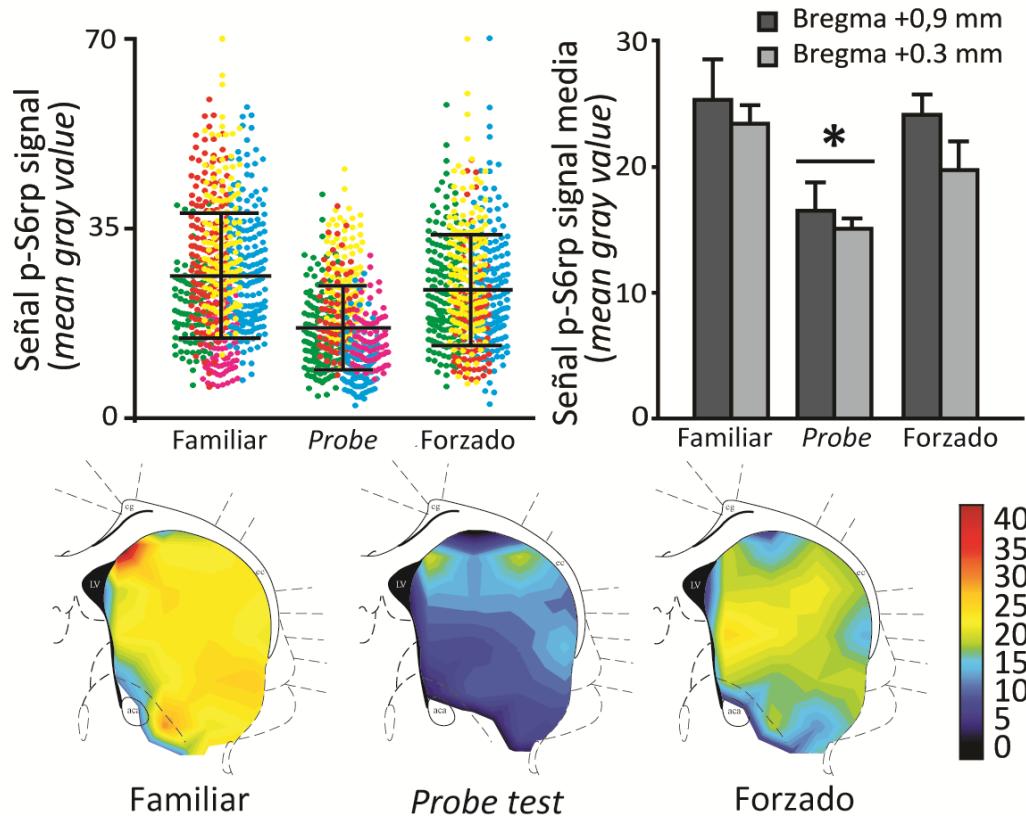


Figura R6: Se observa una caída en la señal pS6rp en neuronas ChAT+ del estriado en animales sometidos a sesiones probe test donde existe una elevada demanda de toma de decisión. Arriba, en gráfico de puntos, cada punto corresponde a una neurona ChAT+, cada color corresponde a un animal diferente. Las barras indican señal de pS6rp media por tratamiento. La reducción en la señal pS6rp fue encontrada tanto en estriado anterior como posterior; ANOVA de dos vías, factor tratamiento significativo, $F_{2,21}=8,02$, $p=0,002$, análisis *post hoc* LSD familiar vs. probe test, $p=0,007$; forzado vs. probe test, $p=0,02$; familiar vs. forzado, $p=0,14$; factor posición no significativo, $F_{1,30}=0,13$; $p=0,14$; interacciones no significativas. Barras de error representan error estandar, $n= 5$ animales para cada tratamiento. Abajo, heat map del nivel de marca anti pS6rp promedio de secciones coronales +0,6 mm del bregma, para cada tratamiento comportamental.

Teniendo en cuenta que los animales que desempeñaron el ensayo de prueba partieron de un brazo novedoso (que además les proveyó una perspectiva nueva del ambiente) y que la actividad de las ICE puede verse afectada por estímulos ambientales salientes, sometimos a un tercer grupo de animales a una versión modificada del ensayo de prueba para descartar que los bajos niveles de marca de pS6rp se deban a un efecto de novedad. Este grupo partió del brazo norte (al igual que el grupo *probe test*) pero no se le permitió decidir entre qué brazos escoger una vez alcanzado el punto central del laberinto. Los niveles de fosforilación de S6rp del **grupo forzado** no difirieron significativamente del grupo *familiar* y fueron significativamente mayores que los observados para el grupo con selección de estrategia (*probe test*; ANOVA de dos vías,

efecto tratamiento significativo, interacción no significativa). Esto sugiere que las diferencias encontradas en el grupo *probe test* surgirían durante el proceso de elección de la estrategia requerida para completar la prueba y alcanzar la meta (**Figuras 6 y 7**, grupo forzado) y no por la exposición a una región novedosa del laberinto y el contexto.

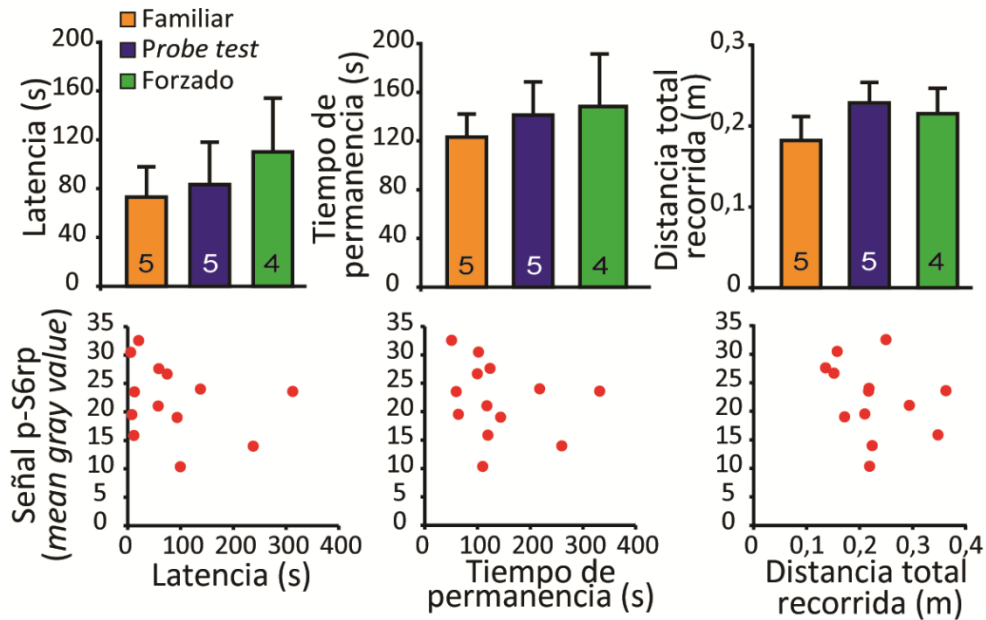


Figura R7: Los animales que recibieron los diferentes tratamientos comportamentales presentan parámetros motores equivalentes dentro de las pruebas. Arriba, Los tratamientos comportamentales no difieren en la latencia a tomar una decisión (ANOVA de una vía, $F_{2,15}=0,29$; $p=0,75$), en tiempo de permanencia en el laberinto (ANOVA de una vía, $F_{2,15}=0,22$; $p=0,8$), ni en la distancia total recorrida dentro del laberinto (ANOVA de una vía, $F_{2,15}=0,68$; $p=0,51$). El número de animales por tratamiento se encuentra dentro de cada barra (uno de los tratamientos cuenta con un animal menos que lo analizado en otras figuras por pérdida del video de ese día de experimento), barras de errores indican error estandar. Abajo, No se encontró una correlación significativa entre el nivel de marca de pS6rp en neuronas ChAT⁺ del estriado y la latencia a entrar en el brazo elegido dentro del laberinto en cruz DS, la permanencia total dentro del aparato, o la distancia total recorrida ($R=0,26$; $p=0,37$; $R=0,23$; $p=0,44$; $R=0,27$; $p=0,36$, respectivamente). Los puntos rojos corresponden a animales de los tres tratamientos.

Conclusión

Estos resultados sugieren que la técnica de medición de nivel de marca de pS6rp en las ICE cuenta con la sensibilidad suficiente para detectar manipulaciones comportamentales que ocurrieron 30 minutos antes de realizar la eutanasia. Además, estos resultados indicarían que la exposición a situaciones no-familiares conduce a descensos de la forma fosforilada de la proteína S6rp. Estos cambios podrían estar ocasionados por un incremento en los componentes novedosos de la tarea, una elevada demandada de toma de decisión o incluso conflicto respecto de la estrategia a utilizar.

En relación a estos experimentos, podría razonablemente argumentarse que en prácticamente todas las condiciones utilizadas los animales realizan toma de decisiones y que esto podría interferir con nuestra interpretación de los resultados. Por ejemplo, en el laberinto en cruz los animales tanto del grupo *familiar* como del *probe test* deben optar por uno de los dos brazos una vez alcanzado el punto central del laberinto. De esta manera si las ICE señalizaran exclusivamente un proceso de toma de sesiones no debería haberse observado una diferencia en los niveles de marca. Es por eso que creemos que las ICE solo son reclutadas durante los procesos de decisión entre estrategias conflictivas pero equi-funcionales. Así, durante el ensayo *familiar* las dos estrategias posibles no entran en conflicto en cuanto a la decisión del brazo a seleccionar. Por el contrario durante el *probe test* ambas estrategias compiten por respuestas opuestas, situación que creemos es señalizada por las ICE y que se evidencia en el cambio de señal en rpS6. Además, los animales fueron expuestos a decisiones equivalentes a la condición *familiar* decenas de veces en el pasado, por lo que especulamos que la carga cognitiva de tal decisión sea menor que la que ocurre durante el *probe test*.

También podría especularse que los animales durante la ejecución del *probe test* no tienen ningún conflicto ya que durante los días previos fueron sobreentrenados y responderían exclusivamente mediante una respuesta egocéntrica asociada al desarrollo de un hábito. Sin embargo, estudios propios muestran que aún en condiciones de sobreentrenamiento, en las que se ha consolidado el establecimiento de una estrategia E-R, los *probe test* presentan latencias más largas que los ensayos diarios, lo que conduce a pensar que los *probe test* siempre incluyen una toma de decisiones adicional asociada al conflicto entre las estrategias que bajo esta condición divergen conductualmente (grupo de animales control en prueba del capítulo 2, latencia promedio de día luego de 15 días de entrenamiento, 14 segundos, latencia en probe test luego de 16 días de entrenamiento, 87 segundos, n=15, prueba de t, diferencias

significativas, $p=0,014$). Por otro lado, se ha reportado que las ICE cambian su nivel de actividad basal cuando se inicia o detiene el movimiento (Benhamou, Kehat and Cohen, 2014), por lo que los cambios en los niveles de marca podrían deberse a diferentes demandas motoras, no obstante, la distancia recorrida dentro del laberinto y el tiempo de permanencia en el mismo es igual entre todos los grupos.

En nuestro reporte, las condiciones de *novedad* y *probe test*, producen descensos del nivel de marca de pS6rp respecto a situaciones equivalentes con menor grado de novedad y toma de decisión como son la *familiar* y la *forzada*. ¿Cómo correlacionaría la actividad neuronal con este descenso? A partir de lo que sabemos de literatura, en experimentos *ex vivo* descensos de pS6rp correlacionan con descensos en la frecuencia de disparo de las ICE (Jesus Bertran-Gonzalez y col. 2012). Sin embargo, trabajos posteriores del mismo grupo, pero fijando diferentes condiciones *in vivo* y posterior registro *ex vivo*, muestra que un descenso en la marca de pS6rp correlacionaría con un aumento de *firing rate* acompañado de una regularización de la actividad por interrupción del perfil de actividad en ráfaga (Matamales y col., 2016). A pesar de ello, no existen a la fecha trabajos que establezcan correlaciones entre la actividad de las ICE *in vivo* y posterior marcado mediante esta tinción. Una de las posibles causas podría deberse a la difícil caracterización de las ICE *in vivo* en roedores.

Si bien aventurarse a concluir acerca de cambios en la frecuencia de disparo o el patrón de actividad de las ICE es arriesgado, los resultados de este capítulo sugieren que las ICE son capaces de señalar, no solo eventos novedosos o salientes, sino también situaciones en las cuales se requiere la toma de decisiones, en particular aquellas relacionadas con la elección de estrategias de navegación espacial. Esto es respaldado además porque animales sometidos a tareas con exigencia motora y carga motivacional equivalente no manifiestan cambios en el nivel de marca.

Capítulo 2 – Rol de las ICE en la selección de estrategias de navegación espacial

Introducción

Como mencionamos anteriormente, en la literatura existe un gran número de trabajos que buscan establecer un rol causal de las ICE en diferentes procesos fisiológicos y relacionarlas con la fisiopatología de diferentes desórdenes. Con ese enfoque hemos publicado previamente (Martos y col. 2017) que la lesión de las ICE ocasiona conductas perseverativas aberrantes, especialmente dirigidas a estímulos ambientales salientes que incluso afectan la vida social normal de los animales.

Asimismo, los resultados provenientes del capítulo anterior parecen indicar que las ICE señalizan situaciones de toma de decisión que incluyen la selección de estrategias en tareas de navegación espacial dirigidas a metas. Si bien es abundante la evidencia que señala que los animales con lesión de colinérgicas mantienen correctos niveles de desempeño en tareas dirigidas a metas, nunca fue evaluada su participación en tareas donde múltiples estrategias de resolución puedan ser elegidas.

Ante este panorama, nos preguntamos si la presencia de estos patrones de actividad perseverante presentes en los animales con **lesión selectiva de las ICE** podrían deberse a que la selección de estrategias se vea afectada. Hipotetizamos que la perseverancia en la exploración de un objeto o de un congénere presente en los animales con ablación de ICE podría ser efecto de una incapacidad de migración de estrategia de exploración del ambiente durante la sesión. Para evaluar formalmente la idea de que las ICE son necesarias para la correcta selección de estrategias en aquellas condiciones en las que existen diferentes “abordajes” de resolución de una tarea, elegimos, pruebas que compartan los siguientes dos requisitos:

- Tener al menos dos estrategias de resolución posibles, siendo todas igualmente ventajosas (o al menos similares).
- Que esté reportado que animales control modifiquen la elección de las estrategias de resolución a lo largo de los días, a partir de información que incorporan del ambiente.

Decidimos que el *laberinto en forma de cruz* y el *laberinto de Barnes* cumplen con ambos requisitos, sumándose, además, la ventaja de que uno es aperitivo y el otro tiene un fuerte componente aversivo.

Resultados

La lesión mediada por toxina diftérica alcanza a más del 95% de las interneuronas colinérgicas del estriado y cuenta con especificidad de región

Las pruebas comportamentales se iniciaron una vez la lesión mediada por toxina diftérica se vuelve estable (Martos y col., 2017). En todos los casos, el grado de lesión fue verificado mediante marcado inmunohistoquímico de la presencia de la enzima ChAT en las células del estriado (**Figura R8**). El análisis *a posteriori* indicó que las lesiones cubrieron completamente el eje antero-posterior del estriado y comprometieron más del 95 % del promedio total de las ICE presentes en los animales control (**Figura R8 D**, ANOVA de medidas repetidas, interacción significativa). Al igual que en estudios previos de nuestro grupo la lesión fue selectiva, sin afectar neuronas colinérgicas de regiones cercanas (**Figura R8 C**, ANOVA de medidas repetidas, interacción significativa). A su vez, en Martos y col. 2017, demostramos que la lesión mediada por toxina diftérica cuenta con especificidad de tipo celular, manteniendo inalterado el número de las demás interneuronas estriatales, así como las neuronas espinosas medianas.

Diferencias en la elección de estrategias en animales con lesión de las ICE y animales control

Dos cohortes de animales fueron privados parcialmente de alimento y entrenados diariamente en un laberinto en cruz DS, prueba ya puesta a punto en el laboratorio para experimentos relatados en el Capítulo 1.

Tanto los animales lesionados como los control lograron aprender la asociación entre elección de brazo y presencia de la recompensa. Sin embargo, el grupo lesión manifestó un desempeño ligeramente menor pero significativo, que se refleja en una reducción en el porcentaje de respuesta correctas promedio (**Figura R9**, ANOVA de dos vías con medidas repetidas, factor tratamiento significativo), alcanzando una diferencia de alrededor del 5% el último día de entrenamiento de la prueba.

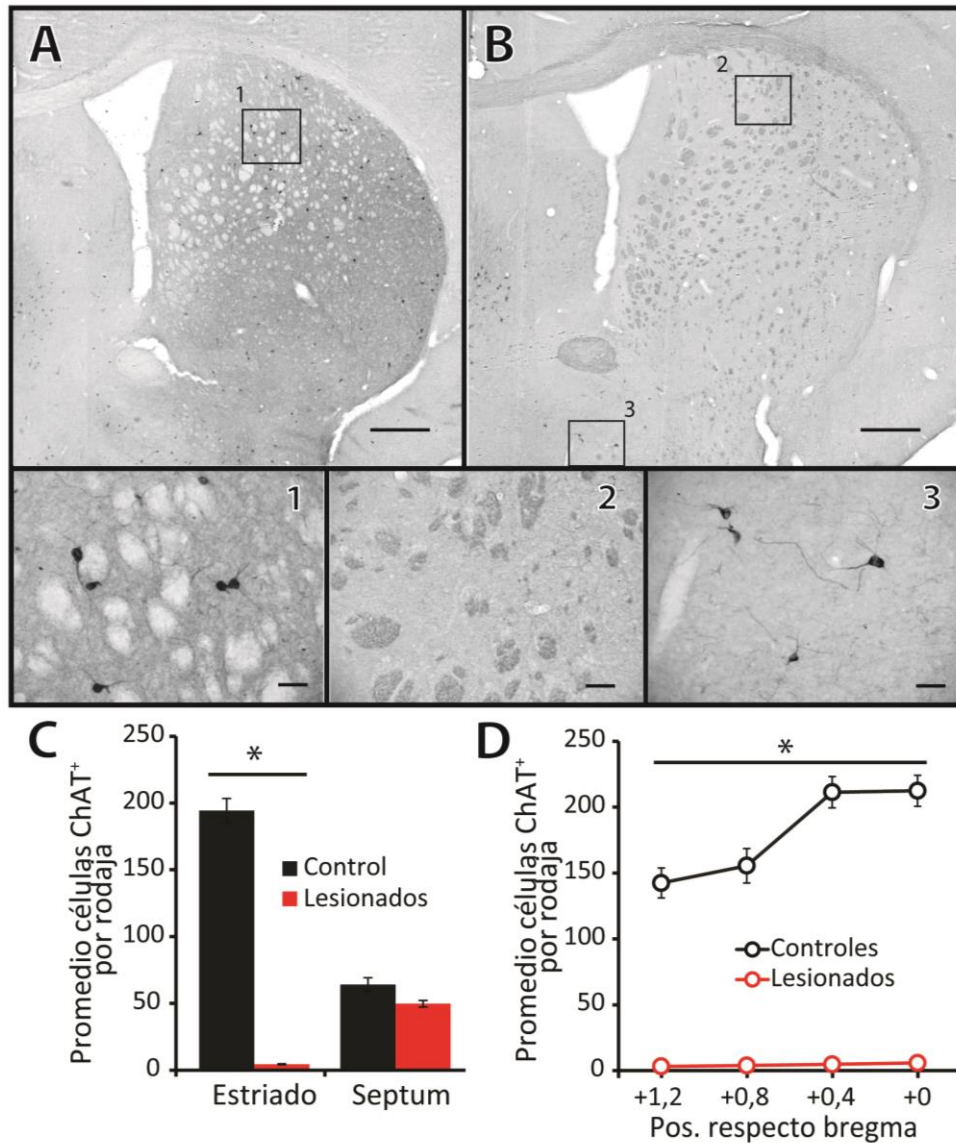


Figura R8: Cuantificación de lesión de ICE mediante IHC anti-ChAT. A-B, reconstrucción en baja magnificación del estriado derecho, construidas a partir de fotos tomadas con objetivo 10X (A) de animal inyectado con solución fisiológica (control); y (B) de animal inyectado con toxina diftérica (lesionado). 1-3, fotografías en alta magnificación de regiones señalizadas en A y B. C, la lesión es específica de la región del estriado, manteniéndose las ICE del septum, intactas. Resultados de la cuantificación automática de número de células en el estriado y septum en cortes de animales lesionados y control (ANOVA de medidas repetidas, interacción significativa, $F_{1,67}=5,44$, $p<0,001$; análisis *post hoc* de Bonferroni, estriado ctl. vs. lesión, $p<0,001$; septum ctr. Vs. lesión $p=0,11$), lesionados $n=43$, controles $n=26$. Se reporta el número promedio de 2-4 regiones de todos los animales lesionados y control usados en los capítulos 2 y 3. D, el alto grado de lesión se encuentra presente a lo largo del eje anteroposterior del estriado. Cuantificación automática de células ChAT⁺ para el *subset* de animales en los que se cuantificaron 4 cortes anteroposteriores (ANOVA de medidas repetidas, interacción significativa, $F_{3,168}=55,5$, $p<0,001$. Análisis *post hoc* de Bonferroni de todas las posiciones lesión vs. control, $p<0,001$), lesionados $n=35$; controles $n=19$. Escalas: en baja magnificación A-B, 500 μm ; en alta magnificación 1-3 50 μm .

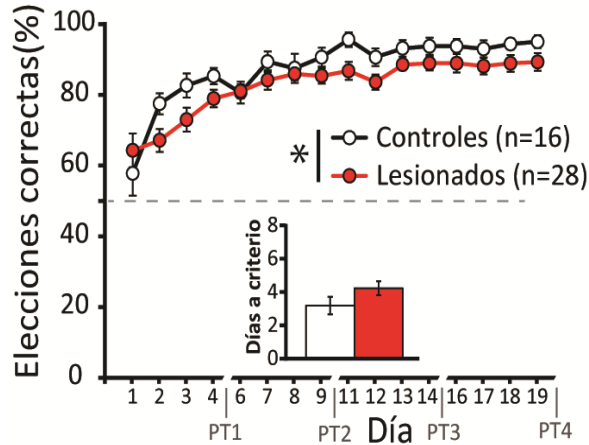


Figura R9: Los animales lesionados presentan un desempeño ligeramente inferior en la prueba de laberinto en forma de cruz. Curva de aprendizaje de los animales con lesión de las ICE (círculos blancos) y control (círculos rojos) en los 16 días de entrenamiento de la prueba *laberinto en forma de cruz*. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción no significativa $F_{15,615}=1,00$, $p=0,46$; factor tratamiento $F_{1,615}=8,65$, $p<0,005$, factor tiempo $F_{15,615}=18,33$, $p<0,001$. Análisis *post hoc* LSD revela que primer día que no muestra diferencias vs. día 19 es el día 7 para ambos grupos, $p=0,20$ y $p=0,12$ para control y lesionado respectivamente. Los días faltantes en el eje x corresponden a los días de *probe test* (PT), señalizados en gris. Inset: No se encontraron diferencias significativas en días a criterio (días transcurridos promedio por grupo hasta alcanzar, durante dos días consecutivos, un desempeño igual o mayor a una elección correcta superior al 80%, prueba *t* de Student, $t_{44}=1,47$, $p=0,15$). Barras de error indican error estándar; número de animales destacado en la leyenda.

Este efecto, si bien estadísticamente significativo es conductualmente poco relevante. No se refleja en el tiempo que necesitan ambos grupos para alcanzar una un desempeño superior al 80% (**Figura R9, inset**), ni tampoco en el “techo” de desempeño de los dos grupos alcanzado en la sesión 7, lo que sugiere una capacidad de aprender la prueba conservada entre grupos.

Con el objetivo de determinar si las ICE son necesarias para la selección normal de la estrategia de resolución en esta tarea, evaluamos los ensayos de prueba que se encuentran intercalados a lo largo del aprendizaje. Con ellos, es posible discriminar la estrategia empleada por los animales a lo largo de todo el proceso de aprendizaje. Inicialmente el grupo control no presenta, en nuestras condiciones experimentales, una preferencia por ninguna de las dos estrategias posibles (**Figura R10, PT1**). Sin embargo, y tal como ya fue reportado en la literatura, a medida que progresa el entrenamiento los ratones desarrollan una preferencia por la

estrategia egocéntrica, como se observa en la **Figura R10** (PT 2 al 4), llegando a alcanzar una preferencia cercana al 90% con 16 de 18 animales eligiendo una estrategia egocéntrica por sobre la espacial el día final de la tarea (izquierda, PT1 vs. 4). En el primer ensayo de prueba los animales lesionados muestran una distribución de estrategias equivalente a la de los controles (**Figura R10, derecha** PT1, 56% vs. 44% de uso de estrategia egocéntrica para control y lesionados, respectivamente). No obstante, a diferencia de lo manifestado por estos últimos, los animales lesionados no cambian su selección de estrategia a lo largo del entrenamiento llegando a finales de la prueba con una proporción similar de animales adoptando cada una de las dos estrategias posibles (**Figura R10** PT 4, animales lesionados, 17 vs. 11, 41% de estrategia egocéntrica). Por lo tanto, al finalizar la prueba existe una diferencia significativa entre los grupos lesionado y control en cuanto a la proporción de animales que utiliza la estrategia egocéntrica (**Figura R10, derecha** PT4).

Considerando que algunos trabajos dentro de la literatura han reportado alteraciones en la flexibilidad conductual luego de lesiones de las ICE, una posible explicación a la falla de migración entre estrategias en los animales lesionados podría ser que los mismos se mantienen invariantes a lo largo de la tarea, y que cada animal persiste en la estrategia inicialmente seleccionada. Sin embargo, el análisis caso a caso indicó que solo 3 de 29 ratones lesionados (10,3%) repiten la estrategia inicial en los cuatro ensayos de prueba y 41,4 % de los lesionados cambia, al menos dos veces a lo largo de la prueba, su estrategia elegida por otra diferente en un *probe test* siguiente. Esto sugiere que el hecho de que los animales lesionados no adopten la estrategia egocéntrica no se debe a que se mantienen perseverantes en el uso de la estrategia espacial.

Para comparar la eficiencia de las estrategias medida como recompensas obtenidas por día, dividimos ambos grupos experimentales de acuerdo a la estrategia usada en el siguiente ensayo de prueba (**Figura R11**). Al hacerlo, no observamos diferencias en el desempeño que pueda ser explicado por la estrategia escogida en ninguno de los dos grupos experimentales. Esto sugiere que ambas estrategias son igualmente eficaces en términos de obtención de recompensas. A su vez, los grupos no presentan diferencias en cuanto a su peso ni al porcentaje de pérdida de peso producto de la privación parcial de alimento (**Figura R12**)

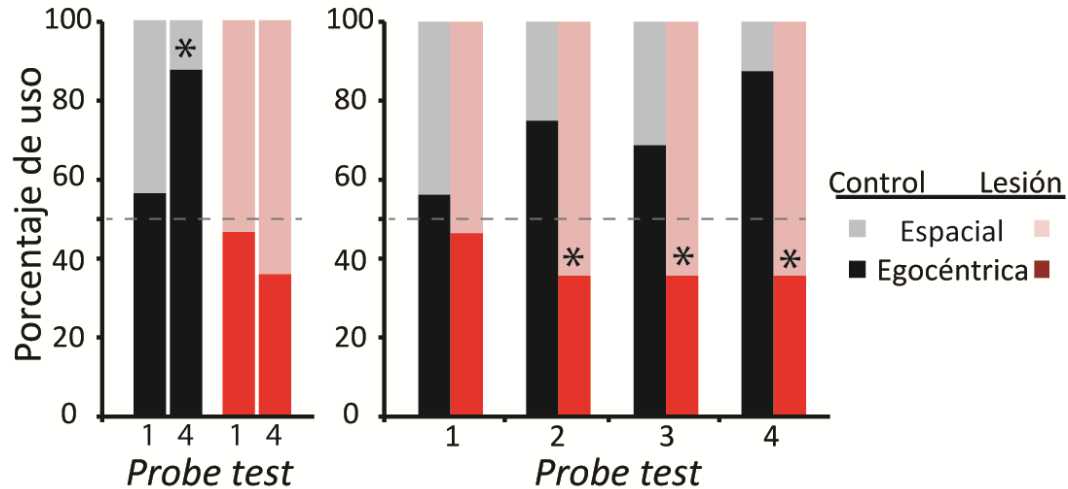


Figura R10: Lesión de las ICE evita el establecimiento de una estrategia de resolución egocéntrica característica del sobreentrenamiento dentro de esta prueba. Izquierda, comparación entre uso de estrategia del grupo control y del grupo lesionado considerando el *probe test* del día 5 y el del día 20 (Controles: $\chi^2=3,89$; $p=0,049$; lesionados: $\chi^2=0,66$, $p=0,42$). Derecha, comparación entre porcentaje de uso de estrategia de resolución espacial y egocéntrica entre los grupos con lesión de las ICE y control para las cuatro sesiones de *probe test*: *probe test* 1 (día 5 de la prueba): $\chi^2=0,39$, $p=0,53$; *probe test* 2 (día 10): $\chi^2=6,29$, $p=0,12$; *probe test* 3 (día 15): $\chi^2=4,45$, $p=0,35$; *probe test* 4 (día 20): $\chi^2= 11,01$ $p<0,001$). Número de animales para grupo control, 16; grupo lesionado 28. Aclaración: las pruebas χ^2 son pareadas, sin corrección por múltiples comparaciones. * $p<0,005$.

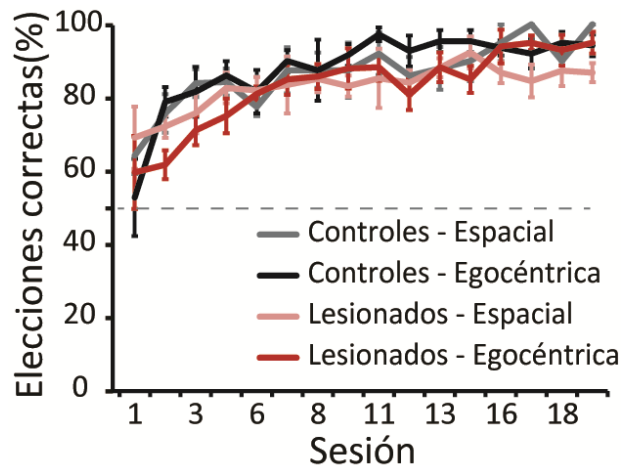


Figura R11: El desempeño de los animales lesionados y control, considerado como porcentaje de elecciones correctas, no se ve afectado por la estrategia utilizada. Curva de aprendizaje para los ratones lesionados y control clasificados según la estrategia manifestada en el *probe test* más cercano. ANOVA de tres vías, interacciones no significativas; factor estrategia no significativo $F_{1,684}<0,01$; $p=0,96$, factor tratamiento significativo $F_{1,648}=14,9$, $p<0,001$. Los puntos de cada curva corresponden a la media de los animales, controles y lesionados, asignados para ese determinado tratamiento. La asignación fue retroactiva, dada la elección manifestada por cada animal en el *probe test*, se consideró que resolvió la tarea utilizando esa misma estrategia en las cuatro sesiones previas. Las barras de error representan error estándar.

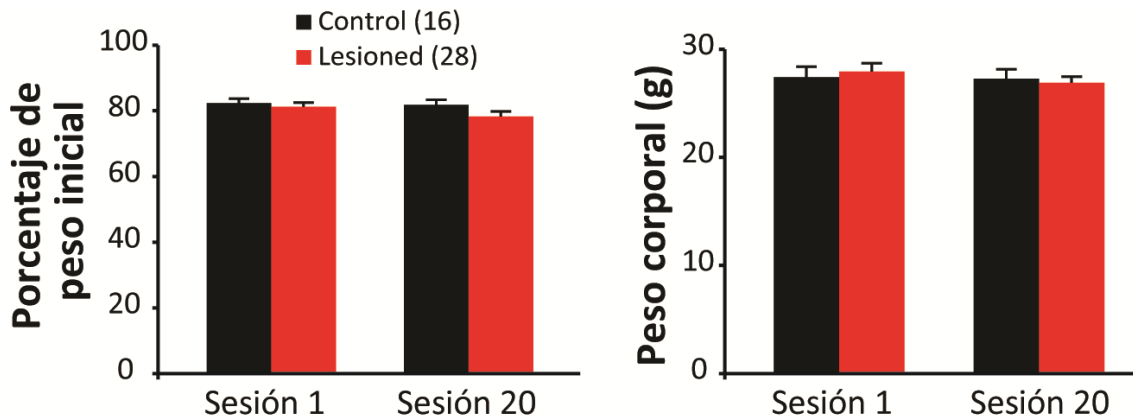


Figura R12: No se observa diferencia de pesos entre los grupos. *Izquierda*, porcentaje de peso respecto al presentado antes del comienzo de la privación parcial de alimento para la sesión 1 y 20 de la prueba laberinto en cruz DS. ANOVA de medidas repetidas, interacción no significativa, $F_{1,42}=1,2$; $p=0,3$; factor tratamiento no significativo, $F_{1,42}=1,1$; $p=0,3$ *Derecha*, peso absoluto de los animales control y con lesión selectiva de las ICE. ANOVA de medidas repetidas, interacción no significativa, $F_{1,42}=0,8$; $p=0,4$; efecto tratamiento no significativo, $F_{1,42}=0,27$; $p=0,6$. n se encuentra aclarado en la figura.

Por otra parte, se encuentra relativamente aceptada la idea en el campo de que el estriado media la adquisición de comportamientos dirigidos a metas que requieren de aprendizajes basados en asociaciones estímulo-respuesta, existiendo reportes donde la lesión del DLS en ratas impide la capacidad de adoptar este tipo de estrategias (Packard y McGaugh 1996). Podría pensarse que la lesión de las ICE afectaría la correcta función del estriado, restringiendo el establecimiento de asociaciones estímulo-respuesta e impidiendo el desarrollo de estrategia egocéntricas. Para evaluar esta posibilidad, una cohorte independiente de animales controles y lesionados fue entrenada para aprender una variante del laberinto llamada *laberinto en cruz de una sola solución*, en donde, a diferencia de la versión original, la ejecución de una estrategia egocéntrica es la única manera de maximizar la obtención de recompensas. Debido a que en el desarrollo de esta prueba los animales son liberados, de manera alternada, del brazo norte y sur del laberinto, y que solo se recompensa aquella elección que siga un determinado giro de la dirección del animal (ej., girar hacia la derecha), solo la estrategia egocéntrica se ve reforzada. Los animales lesionados y control se desempeñaron igualmente bien en esta tarea (**Figura R13**), demostrando que la ablación de las ICE no impide los aprendizajes E-R sino que afecta la capacidad de migrar entre estrategias dentro del laberinto cruz DS.

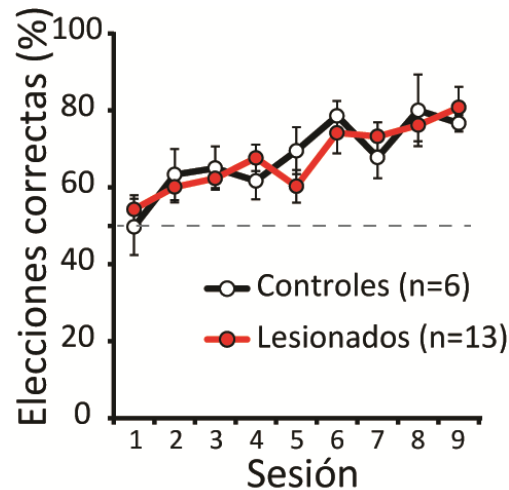


Figura R13: Los animales lesionados son capaces de desarrollar una estrategia egocéntrica. No se observan diferencias significativas entre la curva de aprendizaje de los animales lesionados y control en el laberinto en cruz de una solución modificado. ANOVA de dos vías, interacción no significativa, $F_{8,136}=0,683$ $p=0,71$; factor tratamiento no significativo, $F_{1,136}=0,009$, $p=0,92$).

Efecto de la ablación de las ICE en la selección de estrategias de resolución del laberinto de Barnes

Para verificar que la incapacidad para migrar entre estrategias no es un fenómeno específico de aquella tarea, realizamos una segunda prueba de navegación espacial dirigida a metas con múltiples estrategias de resolución. Sometimos entonces dos cohortes de animales, cada uno con su grupo lesionado y control, al laberinto de Barnes, una prueba comúnmente utilizada para evaluar las funciones cognitivas que se ponen en juego al seleccionar una estrategia de aproximación a una meta. Las estrategias desarrolladas por ratas y ratones al enfrentarse a esta tarea se clasifican comúnmente como: *serial*, *espacial* y *mixta*; existiendo también una aproximación al objetivo mediante búsqueda por azar (para detalles de esta clasificación, dirigirse a *Materiales y métodos - Laberinto de Barnes*). Al analizar los resultados en cuanto al aprendizaje medido como la capacidad de escape, encontramos que ambos grupos experimentales muestran un aprendizaje significativo, que se manifiesta como una disminución en el número de errores cometidos y en la latencia para escapar del laberinto a lo largo de las sesiones (**Figura R14**). La única diferencia entre grupos se encuentra en el día inicial, en que los animales lesionados manifiestan un número incrementado de visitas a agujeros que no conducen al escape. Este aumento recuerda los incrementos en conductas repetitivas perseverantes manifestadas hacia objetos explorables del ambiente manifestada por los

animales con lesión en las ICE, en pruebas como *Hole Board* y *Marble burying*, realizadas y analizadas por nuestro laboratorio en Martos y col., en 2017. Curiosamente, esa diferencia es solo detectable en la sesión 1, presentando en las demás (a pesar de las diferentes estrategias utilizadas ambos grupos) desempeños comparables al del grupo control. De acuerdo al protocolo seguido, de no encontrar el agujero de escape, los ratones eran guiados cuidadosamente hacia el mismo; esto solo fue necesario en unos pocos ensayos exclusivamente concentrados en el día 1 de la prueba y en ambos grupos experimentales por igual.

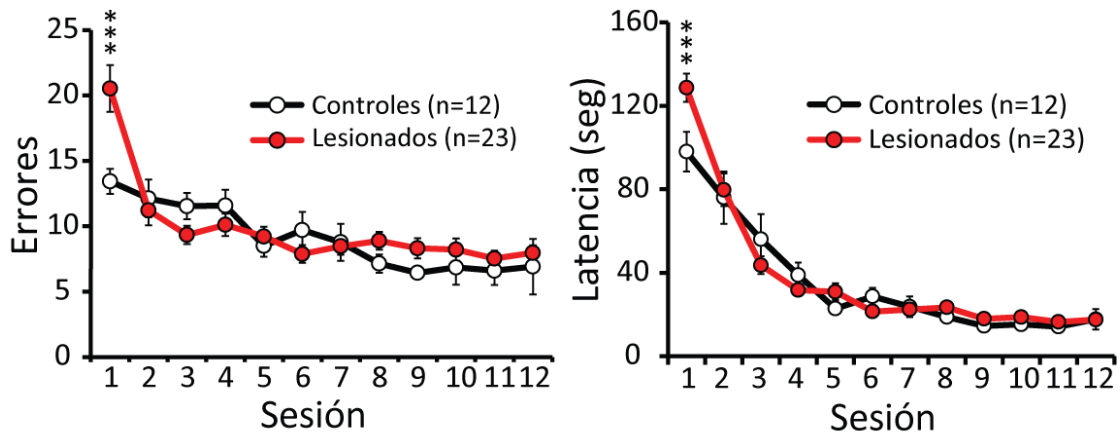


Figura R14: Los animales lesionados parten de un número más elevado de errores y latencia pero logran un número similar al final del aprendizaje. **Izquierda**, visitas a agujeros que no conducen a caja de escape (errores) a lo largo de las 12 sesiones de entrenamiento. ANOVA de dos vías con medidas repetidas (interacción significativa, $F_{11,363}=2,97$, $p<0,001$; análisis *post hoc* por prueba LSD revela diferencias entre grupos sólo al día 1, $p<0,001$). **Derecha**, latencia a encontrar la caja de escape en segundos. ANOVA de dos vías con medidas repetidas (interacción significativa, $F_{11,363}=3,09$, $p<0,001$; análisis *post hoc* por prueba LSD revela diferencias entre grupos sólo al día 1, $p<0,001$). n = número de animales por grupo, reflejado en la leyenda del gráfico; barras de error representan error estándar.

Seleccionamos las condiciones de la prueba (intensidad de luz, tamaño de plataforma, número de agujeros) para promover la aparición dentro de la población control de todas las estrategias posibles descritas para la tarea. A comienzos del entrenamiento, los ratones de ambos grupos buscaron el agujero de escape de manera azarosa (**Figura R15**). Este patrón de exploración fue gradualmente remplazado por búsquedas discretas que encajan en la clasificación de una de las estrategias preestablecidas (**Figura R16**). Dentro de este cambio, destaca la estrategia serial como la más prevalente para ambos grupos experimentales en los primeros 4 días de la prueba (la estrategia serial representa el 72% y el 65% del total de ensayos en el día 4 en controles y lesionados, respectivamente, $\chi^2= 0,55$; $p=0,47$). Tal como fue previamente reportado, (O’Leary y Brown, 2016.), a partir del día 5 los ratones del grupo control

lenta, pero persistentemente, cambian de estrategia de navegación desde una serial a una espacial, que se vuelve predominante desde el día 9 hasta el final de la prueba (**Figura R16 y R17**). En contraposición a esto, los animales lesionados manifiestan el mismo perfil de estrategias seleccionadas a lo largo de toda la tarea y la proporción de las mismas no difiere a lo largo de los días. En resumen, para el día 12, los animales control cambiaron su elección predominante de la estrategia serial hacia una espacial, mientras que los ratones carentes de ICE mantienen aún en la mayoría de los ensayos la estrategia serial favorecida inicialmente.

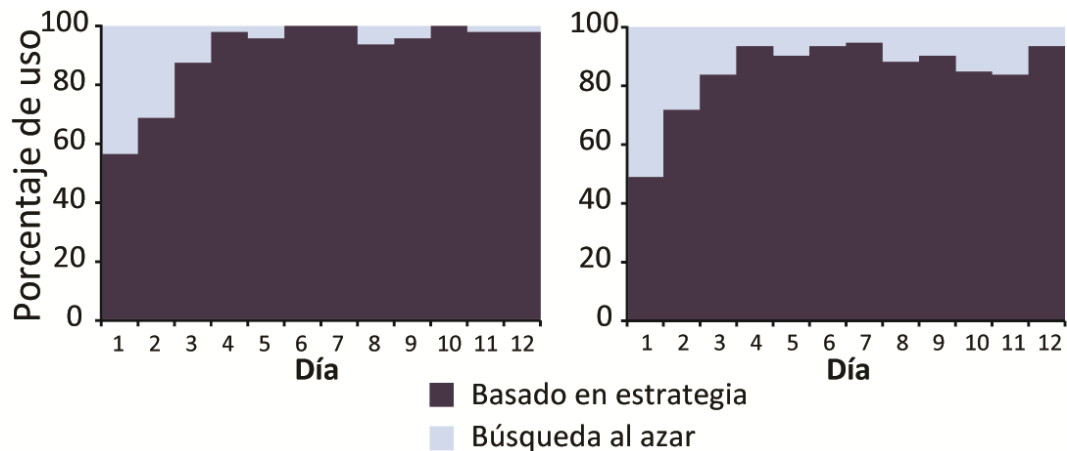


Figura R15: Ambos grupos modifican el uso de estrategias que optimizan el hallazgo de la caja de escape en desmedro de ensayos de búsqueda al azar. Porcentaje de ensayos en los que se utiliza búsqueda al azar o alguna de las tres estrategias de escape para los grupos control (**izquierda**) o lesionado (**derecha**). En ambos casos, ocurre un cambio en la proporción de uso de estrategia ($\chi^2_{11}=126,7$; $p<0,001$; $\chi^2_{11}=131,4$; $p<0,001$, respectivamente. Se realizó prueba de *chi* cuadrado global en cada caso). Cuatro ensayos por animal; 12 animales control, 23 animales lesionados.

La elección de una determinada estrategia puede depender de la capacidad de ejecutarla correctamente, sin embargo, no observamos diferencias significativas entre animales lesionados y control en su desempeño final independientemente de la estrategia utilizada (**Figura R18**). Esto sugiere que la incapacidad de migrar entre estrategias, manifestada por los ratones con ablación de ICE, no es debida a un déficit en su navegación espacial o un desempeño anormalmente superior en la estrategia serial.

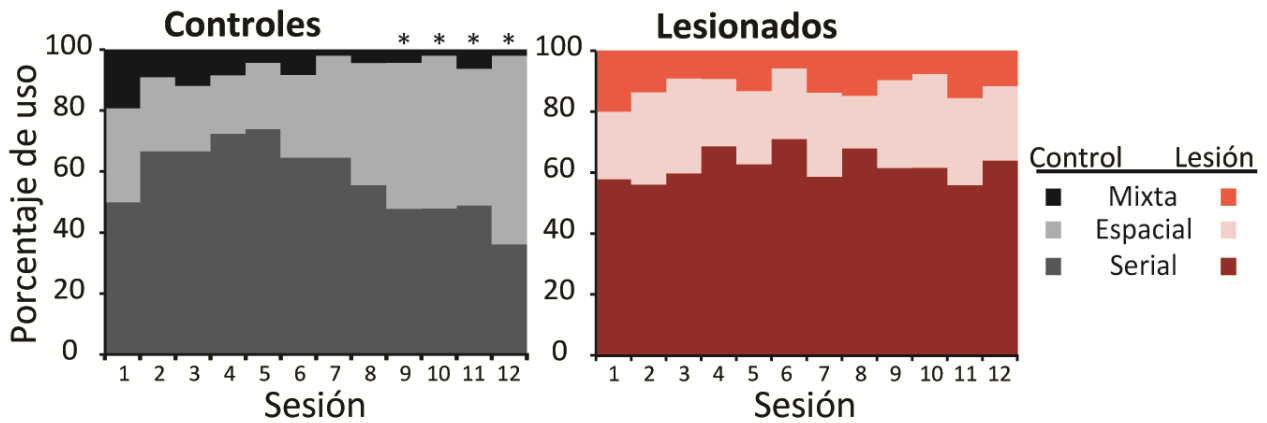


Figura R16: Lesión de las ICE no permite la migración entre estrategias que es posible observar en el grupo control. Izquierda, porcentaje de uso de estrategias mixta, especial y egocéntrica para cada ensayo de los animales control en los 12 días de entrenamiento de laberinto de Barnes. Estos animales modifican la distribución de estrategias que utilizan a lo largo de la prueba (prueba de *chi* cuadrado global, $\chi^2_{22}=52.55$, $p<0,001$). Para evaluar en qué días se presentan los cambios, realizamos comparaciones mediante prueba de Barnard entre pares de días y de a una estrategia por vez. Los ratones control disminuyen la proporción de estrategia egocéntrica e incrementan el uso de la espacial, respecto al perfil manifestado el día 4 (momento en el que se minimiza el uso de búsqueda al azar) a partir del día 9 y hasta el final de la tarea (estrategia serial vs. día 5 para día 9, $p=0,017$; día 10, $p=0,016$; día 11, $p=0,022$; día 12, $p=0,004$; estrategia espacial vs. día 4 para día 9 $p=0,03$; día 10, $p=0,002$; día 11, $p=0,007$; día 12, $p<0,001$; no se encontraron diferencias en cambios de distribución para la estrategia mixta. Los * representan diferencias vs. día 4 tanto para estrategia espacial como egocéntrica, $p<0,05$. Los lesionados no modifican la proporción de estrategia espacial en los días finales de la prueba, *chi* cuadrado para la distribución global: $\chi^2_{22}=19,30$, $p=0,63$. Número de animales para grupo control, 12; grupo lesionado 23.

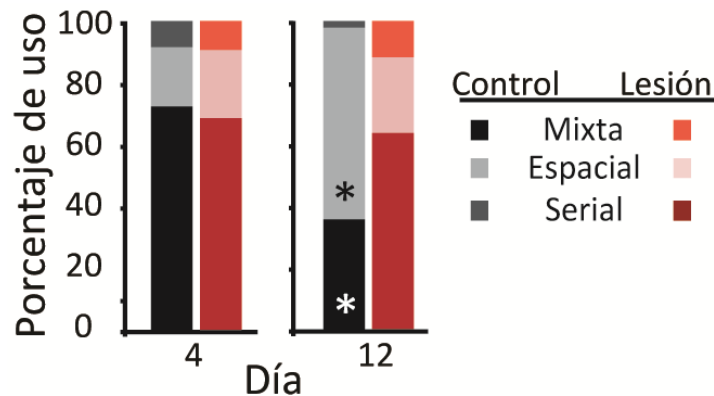


Figura R17: Los animales con delección de las ICE presentan un perfil de estrategia diferente al de los animales control en fases tardías de la prueba. Porcentaje de uso de estrategias en los ensayos de los días 4 y 12. Día 4, no se encuentran diferencias entre el porcentaje de uso de ninguna de las estrategias entre grupo control y lesionado ($\chi^2_2=0,64$, $p=0,72$). Día 12, los animales control presentan un uso de estrategia espacial mayor que la de los animales lesionados, pero exhiben un uso menor de la estrategia egocéntrica ($\chi^2_2=18,89$, $p<0,001$; comparación de a pares mediante prueba de Barnard: estrategia espacial valor estadístico=0,42, $p<0,001$; estrategia serial, valor estadístico=0,34, $p=0,002$; estrategia mixta, no significativa). Cuatro ensayos por sesión por animal; 12 animales control, 23 animales lesionados.

A continuación, analizamos la posibilidad de que los animales lesionados sean inflexibles y no puedan optar por una estrategia diferente a la inicialmente escogida. En este apartado el laberinto de Barnes es particularmente útil, dado que la estrategia utilizada puede ser estudiada en cada uno de los ensayos realizados y en cada uno de los días de la tarea y no requiere de un ensayo de prueba (*probe test*). En este sentido, analizamos la consistencia de la estrategia preferida para un determinado animal en días diferentes de la prueba mediante la comparación de los dos últimos días de entrenamiento. Cuantificamos la fracción de animales que mostraba una consistencia en el primer ensayo (esto es 1er ensayo del día 11 vs. el 1er ensayo del día 12), una consistencia en ensayos consecutivos (estrategia en el último ensayo del día 11 vs. 1er ensayo del día 12), y una consistencia global (estrategia mayoritaria del día 11 vs. la del día 12). No encontramos evidencia de que cada ratón adopte una estrategia como preferida y sea consistente con la misma a lo largo de los días en ninguno de los grupos. Por ejemplo, la consistencia de primer ensayo fue del 50% para los controles y del 30% para los lesionados (6/12 vs. 7/23 respectivamente, prueba *Chi-cuadrado* = 1.29 $p = 0.25$), la consistencia en ensayos consecutivos fue del 50% para los controles, 48% para los lesionados (6/12 vs. 11/23 respectivamente, prueba *Chi-cuadrado* = 0.015 $p = 0.90$) y consistencia en estrategia global fue del 25% para los controles y 13% para los lesionados (3/12 vs 3/23 respectivamente prueba *Chi-cuadrado* = 0.79 $p = 0.37$). Estas consistencias no son diferentes de las que podrían ser encontradas por azar. Cabe destacar que para la evaluación de estrategias individuales utilizamos las estrategias elegidas en los días finales de la prueba presuponiendo que, de haber una estrategia preferida por animal, la misma debería manifestarse más claramente en este estadio de la prueba. En la misma línea, determinamos la estrategia utilizada por cada animal en la última sesión y contabilizamos el número de sesiones consecutivas previas a la de ese día que manifiesta la misma estrategia, a modo de parámetro de persistencia individual hacia el uso de una determinada estrategia. No encontramos diferencias entre ratones control y lesionados, ni midiendo la estrategia global ($2,2 \pm 0,5$ vs. $2,1 \pm 0,5$ días utilizando la misma estrategia global, prueba de t , $t_{33}=0,16$, $p=0,87$) ni contabilizando solo los primeros ensayos de cada día ($0,9 \pm 0,3$ vs. $1,7 \pm 0,7$ días comenzando la sesión con la misma estrategia, prueba de t , $t_{33}=-0,92$, $p=0,36$). Repasando estos resultados, las estrategias individuales son solo mantenidas durante uno o dos días indicando que los ratones no pueden ser segregados de acuerdo a sus estrategias individuales.

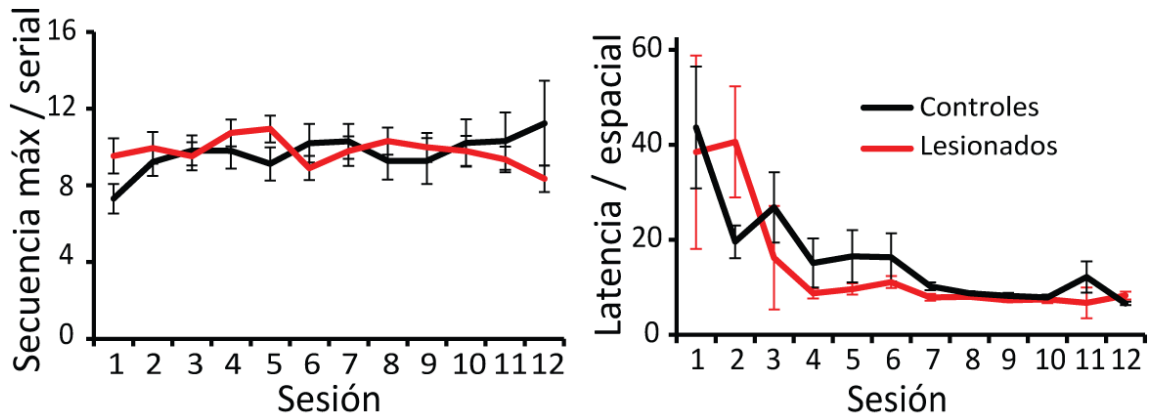


Figura R18: Los animales lesionados y control ejecutan las estrategias serial y espacial de la misma manera. Izquierda, largo de secuencias máximas promedio de ensayos clasificados como seriales para animales control y lesionados (ANOVA de dos vías, interacción no significativa $F_{11,863}=1,08$, $p=0,38$, factores tiempo y tratamiento no significativos, $F_{11,863}=0,348$, $p=0,97$; $F_{1,863}=0,054$ $p=0,82$, respectivamente). Derecha, latencia promedio de los ensayos categorizados como espaciales (ANOVA de dos vías, interacción no significativa, $F_{11,405}=1,31$, $p=0,21$; factor tratamiento $F_{1,405}=0,98$, $p=0,32$; factor tiempo $F_{11,405}=8,79$, $p>0,001$). Los datos representan media \pm error estándar. El n corresponde a los ensayos clasificados como serial o espacial, en cada caso.

Conclusiones

A partir de los experimentos de lesión de ICE en la prueba del laberinto de Barnes y laberinto en cruz DS concluimos que la lesión selectiva de las ICE impide el correcto establecimiento de estrategias de resolución en tareas de navegación en las que existen múltiples soluciones. Mientras que los animales control, con el avance de las sesiones, transicionan de un estado inicial en el que todas las estrategias igualmente elegibles hacia uno más avanzado en el que se selecciona una como la predilecta; los animales con lesión no manifiestan este cambio. Este fenómeno pareciera ser independiente de la naturaleza aversiva o apetitiva de la prueba, siendo en el laberinto en cruz el refuerzo positivo mediante un alimento deseado, y en el Barnes, la tendencia innata de evitar un ambiente potencialmente riesgoso, como refuerzo negativo.

Sin embargo, podría objetarse que la incapacidad de establecer estrategias vistas en el grupo lesionado, se debe a que la lesión de las ICE induce cambios en el balance estriatal que conducen a un impedimento o favorecimiento de estrategias estriado-dependientes. Esto no pareciera ser el caso, ya que los animales lesionados se desempeñan en el laberinto en cruz de una solución (versión egocéntrica) de manera indistinguible a los controles. Además, los resultados encontrados no parecen deberse al tipo de estrategia que se ve favorecida con el

entrenamiento. De esta manera, en el laberinto en cruz DS los animales control optan por una estrategia egocéntrica y en el laberinto Barnes optan por una estrategia espacial; en ambos casos los animales lesionados son incapaces de realizar esos cambios. Finalmente, en nuestra caracterización inicial del modelo (Martos y col., 2017), mostramos que el grupo lesionado muestra medidas de locomoción, balance y aprendizaje motor normales.

Es remarcable que, aún en el grupo de animales control la adopción de estrategias no es el resultado de la suma de preferencias individuales por una estrategia elegida como favorita. En cambio, pareciera haber un perfil de distribución probabilística de estrategias a partir de la cual cada ratón elige y que se actualiza con el paso de los días. Dicho perfil sería el que se va modificando con el entrenamiento en los animales control, y que se ve inalterado en los animales lesionados, y sería candidato a sufrir modulación por parte de las ICE.

Finalmente, si bien de manera poblacional no se observa elección de estrategias por parte del grupo lesionado, los animales con falta de ICE son capaces de ejecutar todas las estrategias contempladas por estas pruebas conductuales. Evidencia de esto son los múltiples ensayos en la que estos animales realizan acciones clasificadas como egocéntricas o espaciales, por un lado; o mixtos, espaciales, serial o mediante búsqueda al azar, por el otro. Además, la manera en la que realizan estos ensayos comparte parámetros de calidad de ejecución con la forma en que lo hacen los animales control. Por este motivo, se descarta que la intervención de las ICE en los déficits descritos sea mediando una falla en la ejecución de las estrategias de resolución.

Capítulo 3 –Selección de estrategias en animales control y con lesión de ICE en una tarea operante dirigida a metas

Introducción

Los resultados obtenidos en los capítulos anteriores sugieren un rol determinante de las interneuronas colinérgicas estriatales en la selección de estrategias de resolución de tareas de navegación dirigidas a metas. A partir de los mismos, nos preguntamos si la incapacidad de transición entre estrategias presente en los animales con lesión selectiva de las ICE puede ser encontrada en conductas dirigidas a metas que excedan los límites de la navegación espacial. Extender estos resultados a otras conductas, más allá de las de navegación espacial, requiere tareas conductuales en las que diferentes estrategias de resolución puedan coexistir. Idealmente en dicha tarea dos estrategias de resolución posibles conviven poblacionalmente y el sesgo en la selección de una sobre la otra ocurre como consecuencia de la experiencia del animal y su interacción con el ambiente. Así nos encontramos con el problema que la literatura que cuente con un enfoque que contemple la estrategia de resolución en tareas dirigidas a metas en roedores es escasa.

Para encarar esta problemática, optamos por una tarea de discriminación mediante aprendizaje operante en la que el animal debe realizar una de dos acciones posibles (hociqueos en un puerto a la izquierda o derecha) para optar por una de las dos recompensas posibles. Estas recompensas solo se diferencian en la magnitud (1 versus 5 *pellets*) pudiendo evaluarse mediante la respuesta del animal la capacidad para establecer una asociación entre cada puerto y su valor (para más detalles dirigirse a *Materiales y métodos – Tarea de discriminación*). En esta prueba, una modificación de la descrita inicialmente por Thiébot *et al.*, en 1985 utilizando ratas y en el contexto de un laberinto en T, el componente de navegación se ve reducido a un mínimo. A su vez, fue adaptada para realizarse en una caja operante y utilizando ratones por Bradshaw and Szabadi, 1992. Clásicamente utilizada como prueba de aprendizaje operante se contabilizan las elecciones del puerto asociado a la mayor recompensa como respuestas correctas. Tanto el grupo de Bradshaw como varios otros (Mitchell, 2016; Mar and Robbins, 2007; Halcomb, Gould and Grahame, 2013; Tedford, Persons and Napier, 2015) que han utilizado esta tarea en los últimos 30 años, describen la existencia de animales que no establecen una marcada preferencia por la recompensa de mayor tamaño. Sin embargo, ningún trabajo hasta la fecha ha explorado esa singularidad, limitándose, en todos los casos, a descartar

todo animal que no ajuste su comportamiento al esperado. En base al análisis de experimentos preliminares y a la utilización de un enfoque diferente en cuanto a lo que busca maximizar un animal en comparación a lo que esperamos antropocéntricamente, decidimos evaluar la existencia de estrategias divergentes en la resolución de esta tarea primero en animales control.

El análisis multivariado es un abordaje conveniente para la caracterización de tareas conductuales y ha sido utilizado en las primeras descripciones de tareas hoy clásicas como el *hole board* para la medición de conductas compulsivas (File, 1983) o el *laberinto en forma de cruz elevado*, como ensayo para medir el conflicto entre exploración y los niveles de ansiedad en ratones (*elevated plus maze*; Lister, 1987). A través del mismo es posible estudiar cuáles de las múltiples variables conductuales que pueden ser medidas en una tarea contribuyen a explicar algún aspecto de la misma. En la primera descripción del laberinto en cruz elevado, por ejemplo, se encontró que medidas como el número de entradas de los animales a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en los mismos co-varían, al igual que lo hacen el tiempo de exploración en los bordes y número de eventos de hociqueo hacia exterior del laberinto (*head-dip*). A su vez, las mediciones de la primera pareja de variables se incrementan ante la administración de agentes ansiolíticos, mientras que las segundas no se ven afectadas. Finalmente, las variables que correlacionan entre sí y describen ciertos aspectos de la conducta, al realizarse un análisis de componentes principales, quedan agrupadas dentro un mismo factor; resultando de esta manera, factores que describen los niveles de ansiedad, otros que describe la exploración y otros la locomoción.

El uso de análisis de aglomeramiento multivariado no supervisado, a su vez, es una herramienta muy útil para el estudio de comportamientos complejos. Un ejemplo de esto, es su uso en la descripción de conductas agresivas asociadas a adicción en ratones (Golden *et al.*, 2017). En esta publicación, se seleccionaron 5 variables conductuales que buscaron reflejar diferentes aspectos del comportamiento y se las utilizó para alimentar dos métodos de creación de *cluster* diferentes. Ya que ambos métodos presentaron dendrogramas similares, los autores concluyeron que en la población existían dos subpoblaciones que presentaban conductas agresivas diferenciables. Al indagar acerca de cómo eran las mismas, midiendo para ello las variables en estudio dentro de cada subgrupo, se descubrió que existía una población de animales de agresividad normal y otra de agresividad compulsiva. Para determinar si en nuestro estudio de aprendizaje por condicionamiento operante emergían subpoblaciones con estrategias diferentes en la población control, decidimos utilizar un análisis de componentes principales y un método no supervisado de aglomeración (*clustering*). A partir de estos

antecedentes, utilizamos 4 cohortes de animales **control para la lesión de ICE** mediante cirugía estereotáctica con solución fisiológica y los sometimos a una prueba de discriminación de dos opciones. Luego de nueve días de entrenamiento, se introdujo un retardo en la entrega de la recompensa de mayor tamaño, siguiendo un esquema de *delay discounting* (como ya fue publicado en Adriani y Laviola, 2003) para evaluar la manera en la que los animales se adaptan a una devaluación en la recompensa. A partir de la conducta manifestada por los animales realizamos un análisis multivariado no supervisado descrito en Materiales y métodos – *análisis multivariado no supervisado*, con el objetivo de identificar si en una tarea de condicionamiento operante pueden coexistir diferentes estrategias en individuos control. Finalmente, realizamos un análisis equivalente para la conducta de los **animales con lesión selectiva de las ICE**, y estudiamos la manera en la que el grupo con ablación se ubica dentro de la población total de animales, para determinar el rol de las ICE en la selección de estrategias durante una tarea de condicionamiento operante dirigida a metas.

Resultados

Clasificación de los animales control en subpoblaciones a partir de la conducta manifestada en la prueba de discriminación

Un primer vistazo a las curvas de desempeño de los animales control indica que son capaces de establecer una preferencia por el puerto de mayor recompensa (P5, **Figura 19 A**, ANOVA de medidas repetidas, factor tiempo significativo), alcanzando para el noveno día de entrenamiento una preferencia del 77,1%, significativamente diferente de la inicial (Análisis *post hoc* LSD, día 1 vs. día 9: $p < 0,001$) y de la elección al azar (prueba de t de una sola muestra vs. 50%, $df=30$, $p < 0,001$). Sin embargo, una mirada más en detalle a las curvas individuales parece señalar que la media poblacional no refleja fielmente el desempeño de los diferentes individuos, habiendo un grupo de animales con una preferencia considerablemente mayor, y otro, con una menor (**Figura R19 B**). Dado que existe alrededor de un 40% de los animales que no consigue superar el 70% de preferencia promedio por la respuesta “correcta”, una visión tradicional de los resultados concluiría que una parte significativa de la población no consigue aprender la tarea, aún luego de 8- 9 días de entrenamiento (**Figura R19 C**). El análisis del histograma construido a partir de la preferencia promedio de los últimos dos días de la prueba parece indicar que la población no se distribuye de manera uniforme, sugiriendo la existencia de dos subpoblaciones con diferente moda; aunque la división entre ambas resulta difícil, al menos utilizando una sola dimensión para clasificarlas.

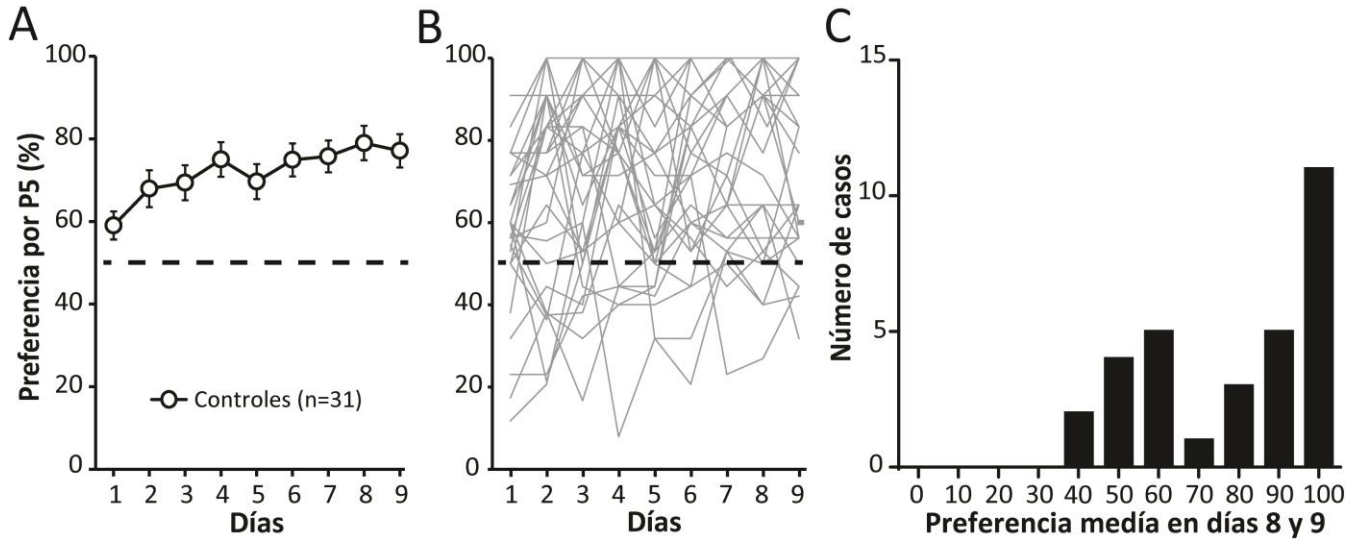


Figura R19: Desempeño de animales control durante la fase de discriminación de la tarea operante. **A**, Desempeño general de los animales control durante la prueba de discriminación, medido como preferencia media por el puerto de mayor recompensa. Línea punteada indica preferencia del 50%, esperable por una elección al azar. ANOVA de medidas repetidas, factor tiempo significativo, $F_{8,240}=4,30$, $p<0,001$. **B**, desempeño individual para los 31 animales control. **C**, histograma de preferencia promedio por el puerto de 5 recompensas para los animales control en los últimos dos días de la prueba de discriminación. Barras de error indican error estándar. Línea punteada indica preferencia del 50%, esperable por una elección al azar.

Teniendo en cuenta que los animales con “mal desempeño” en la tarea se encontraban presentes en los 4 cohortes y no existía ningún vínculo experimental que explicara las diferencias (horario de testeo, caja operante utilizada, etc.) consideramos la posibilidad de que la curva de aprendizaje tradicionalmente utilizada como *output* resulte una herramienta insuficiente para describir el desempeño de estos animales. Así, nos planteamos realizar un análisis multivariado, buscado identificar la existencia de sub-grupos de animales diferenciables, no solo en base a su capacidad de realizar la respuesta “correcta”, sino también en base al patrón de secuencia de acciones que pudieran ser comprendidas como diferentes estrategias de resolución de la tarea. Para hacerlo, seleccionamos variables que reflejen diferentes aspectos de la conducta, evitando sobredimensionar, al menos de manera consiente, algún aspecto en especial. Consideramos que, de haberse consolidado estrategias de resolución a lo largo de la prueba, las mismas deberían estar presentes al día 9, último día de la fase de discriminación. Con esto en mente, comenzamos el estudio de las variables fisiológicas-comportamentales seleccionadas por ese día. La lista de 19 variables puede ser consultada en *Materiales y métodos – Análisis multivariado no supervisado*.

El resultado del análisis de componentes principales para el día 9 arrojó los datos que pueden ser consultados en la **Tabla R1**. Seleccionamos los cuatro componentes de mayor *eigenvalue*, que en conjunto explican cerca del 75% de la varianza total.

A su vez, existen muchas formas de determinar qué variable realiza una mayor contribución para un determinado factor, y por lo tanto colabora en su definición. Decidimos utilizar para esto el cuadrado del *eigenvector* (Abergel *et al.*, 2017). El resultado de este parámetro para los datos provenientes del día se encuentra en la **Tabla R2**.

Tabla R1: resultados del análisis de componentes principales realizado a través del software STATISTICA.

Variable	<i>Eigenvalue</i>	% de la varianza	Acumulativo <i>Eigenvalue</i>	Acumulativo varianza
1	6,958	36,625	6,958	36,625
2	3,963	20,860	10,922	57,485
3	1,872	9,854	12,794	67,340
4	1,349	7,101	14,143	74,441
5	1,059	5,577	15,203	80,019
6	0,927	4,882	16,131	84,901
7	0,767	4,039	16,898	88,941
8	0,529	2,786	17,428	91,727
9	0,418	2,204	17,847	93,932
10	0,353	1,859	18,200	95,791
11	0,304	1,602	18,504	97,393
12	0,166	0,874	18,670	98,267
13	0,116	0,615	18,787	98,882
14	0,096	0,507	18,884	99,389
15	0,067	0,357	18,951	99,746
16	0,036	0,193	18,988	99,939
17	0,007	0,038	18,995	99,978
18	0,004	0,020	18,999	99,998
19	0,0002	0,001	19,000	100,000

Tabla R2: Cuadrado de los *eigenvector* de cada factor brindados por el software STATISTICA.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
1	0,1105	0,0310	0,001	0,0413
2	0,1056	0,0201	0,0012	0,0020
3	0,0741	0,0213	0,1810	0,0041
4	0,0189	0,0782	0,2354	0,0274
5	0,0003	0,0301	0,0417	0,3072
6	0,0153	0,0826	0,0140	0,0100
7	0,0001	0,1572	0,1215	0,0004
8	0,0060	0,0886	0,0313	0,0955
9	0,0015	0,0997	0,0294	0,0550
10	0,1166	0,0215	0,0002	0,0462
11	0,1112	0,0062	0,0066	0,0197
12	0,0844	0,0075	0,0137	0,0764
13	0,0477	0,0013	0,0112	0,0306
14	0,0688	0,0291	0,0673	0,0920
15	0,0648	0,0333	0,0367	0,0910
16	0,0282	0,0933	0,0298	0,0746
17	0,0403	0,0539	0,0468	0,0116
18	0,0643	0,0558	0,0962	0,0121
19	0,0400	0,0887	0,0346	0,0024

Una vez seleccionadas las variables para el análisis, estas fueron usadas para la creación de dendrograma jerárquico aditivo (**Figura R20**). El árbol obtenido pareciera dividir a los animales en dos grandes grupos. Para verificar si estadísticamente existían dos grupos separados utilizamos dos métodos independientes y diseñados específicamente para detectar el número ideal de grupos dentro de un dendrograma: *Gap-statistics*, y media de Silhouette (para más información, *Materiales y métodos – análisis multivariado*).

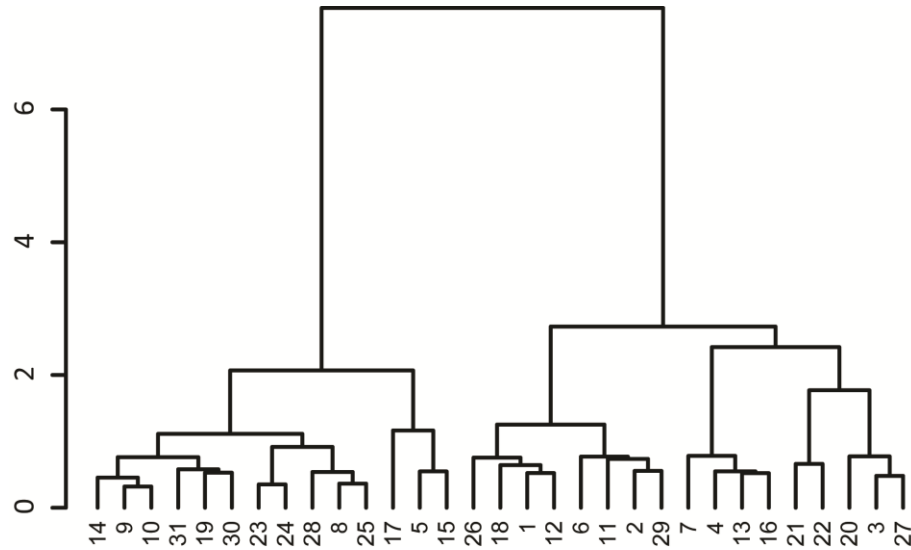


Figura R20: Dendrograma jerárquico aditivo para los datos provenientes de las 8 variables seleccionadas a través del análisis de PCA para el día 9 de la tarea de discriminación. En el extremo de cada rama, se encuentran animales, con un nombre interno que es conservado a lo largo de todo el capítulo.

Los resultados obtenidos por ambos métodos convergen en un número óptimo de dos *clusters*, dividiendo la población de animales en dos subgrupos conteniendo cada uno de ellos aproximadamente al 50% de los animales (**Figura R21 y R24**)

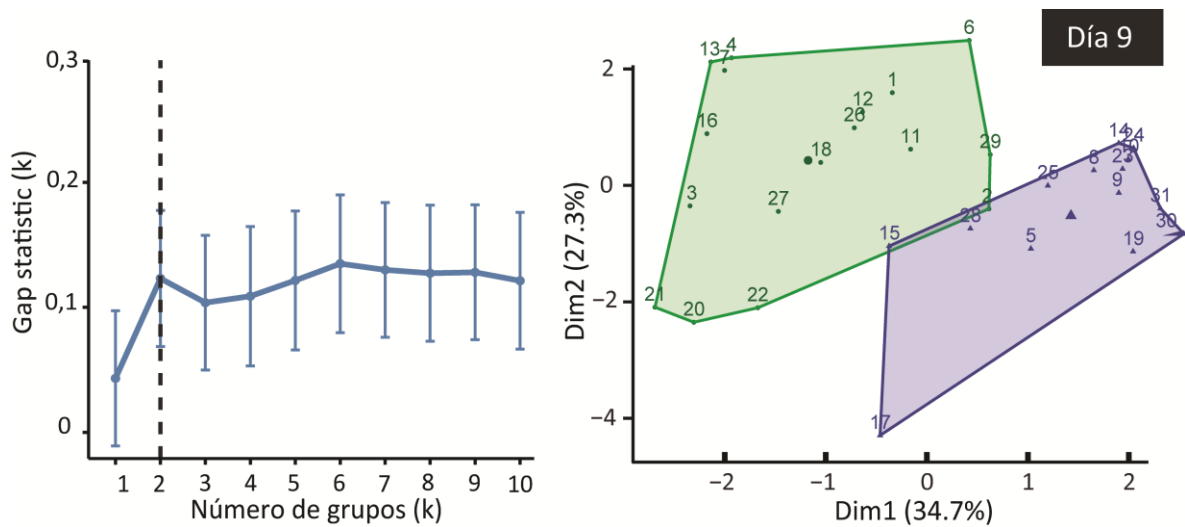


Figura R21: El día 9 la conducta de los animales control puede ser clasificada en dos grupos. **Izquierda,** gráficos del estadístico utilizado por el método *gap statistic* en función del número de grupos por el cual divide los dendrogramas del día 9. La línea punteada representa la elección del número de grupos ideal. **Derecha,** distribución en el espacio formado por los dos primeros componentes principales de los casos que forman los grupos clasificados.

Los animales incluidos en este análisis pertenecen a cuatro cohortes de animales control que fueron caracterizados conductualmente a lo largo de más de 20 meses. Un análisis detallado de los subgrupos mostro que ninguno de ellos esta enriquecido en animales de una cohorte dada. Por esta razón, se descarta un efecto determinado por la camada, como por ejemplo la crianza de los parentales, la época del año, o el cuidado en el bioterio.

Para analizar si los resultados obtenidos dependen del método de selección de variables realizamos comparaciones en paralelo eligiendo variables por medio de criterios alternativos. Este análisis se presenta en la sección **Anexo 1 - Verificación de método de selección de variables del análisis de componentes principales** e indica que los resultados obtenidos son independientes del método empleado para seleccionar las variables, identificándose 2 *clusters* de animales al utilizar cualquiera de los métodos de PCA evaluados (**Figura suplementaria S1**).

A continuación nos preguntamos si estos subgrupos se encontraban presentes desde el inicio del entrenamiento, reflejando características propias de los animales, o si emergían a lo largo del entrenamiento. Para ello comparamos el grado de similitud entre el dendrograma del día 9 y los dendrogramas obtenidos con los parámetros conductuales de los ratones en el día 1 y subsiguientes.

Una herramienta útil para estudiar las similitudes entre dendrogramas, es el grado de enmarañamiento (*entanglement*). Este parámetro compara cuan conservada está la posición de los casos en los extremos de los árboles entre una pareja de dendrogramas. Para hacerlo, une con líneas rectas casos idénticos de cada árbol y mide el mínimo grado de desorden posible en el conjunto de líneas. Para una descripción en mayor profundidad, dirigirse a *Materiales y métodos – análisis multivariado*.

Este índice suele utilizarse de manera descriptiva, como una herramienta visual. Sin embargo, en pos de darle sustento estadístico aplicamos un algoritmo de muestreo con reposición que modifica la posición de los casos de manera aleatoria conservando la topología del árbol permitiendo establecer un intervalo de confianza para las similitudes debidas al azar.

Otro parámetro útil para comparar dendrogramas es el coeficiente de correlación gamma de Baker (*Baker's gamma correlation coefficient*), una medida de la similitud entre dos árboles jerárquicos, (para un detalle de su funcionamiento consultar *Materiales y métodos – Análisis multivariado*). A diferencia del enmarañamiento, este índice tiene en cuenta la forma global de los árboles y no solo la posición relativa de los casos.

Podemos ver los ejemplos del resultado de la aplicación de este algoritmo en la comparación día 1 vs. día 9 y día 8 vs. día 9 en la **Figura R22 A y B**. El elevado grado de enmarañamiento del día 1 con el día 9, sugiere que los dendrogramas no se parecen, difiriendo significativamente uno del otro (IC99% de la distribución al azar=0,24 - 0,38; valor de enmarañamiento día 1 vs. día 9= 0,31).

El análisis sistemático a lo largo de los días mostró que a partir del día 5 los dendrogramas se asemejan al del día 9 no pudiendo las diferencias entre los mismos explicarse por el azar con un error del 5% (**Figura R22 C**). Podemos observar como ejemplo de alta similitud los dendrogramas del día 8 y 9, la estructura de los arboles (bajo enmarañamiento) está sumamente conservada con solo unos pocos animales cambiando de subgrupo (**Figura R22 B**).

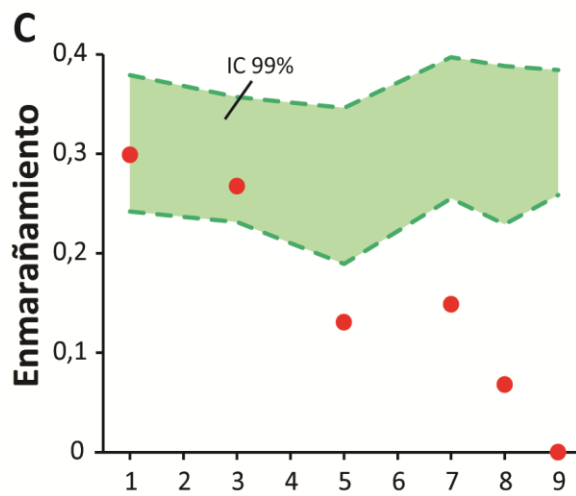
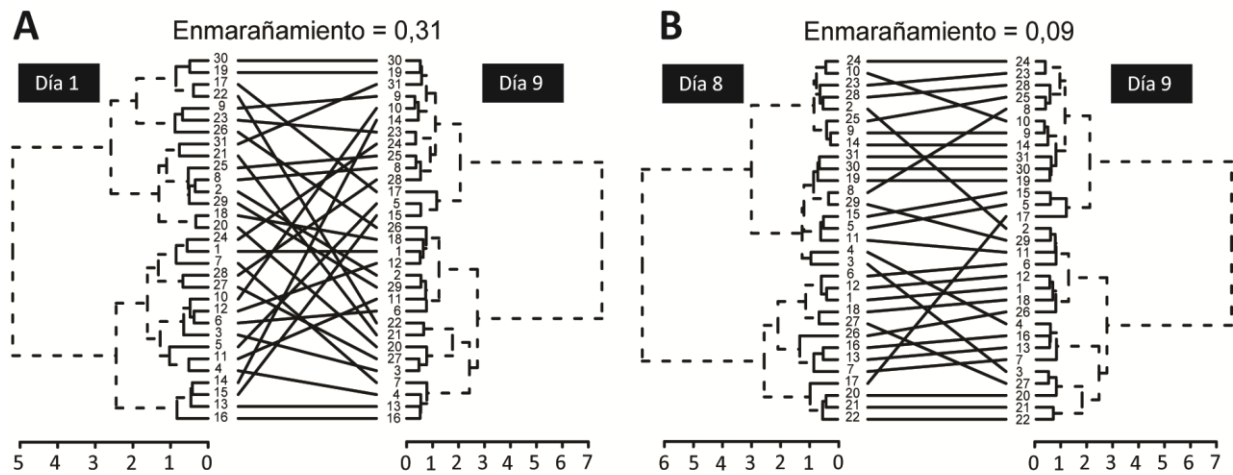


Figura R22: El enmarañamiento se reduce a un mínimo a medida que avanza la prueba. A-B, ejemplos de enmarañamiento entre comparaciones de día 1 vs. Día 9 (A) y día 8 vs. día 9 (B). Líneas punteadas representa ramas del dendrograma que contienen casos en los que hubo cambio de posición entre un día y otro. Líneas negras llenas representan ramas del dendrograma donde no hubo cambio entre días. **C,** el área en verde representa el intervalo de confianza de la distribución por *bootstrap* luego de 100 comparaciones con árboles al azar por día analizado. Con líneas punteadas los máximos y mínimos del intervalo de confianza 99% (IC99%). Los puntos rojos indican el enmarañamiento del dendrograma de ese día vs. el día 9.

Al analizar el grado de similitud de los dendrogramas de los días iniciales con el del día final (día 9) mediante el método de Baker (cabe recordar que analiza la estructura global de los árboles y no solo la ubicación relativa de los casos en cada árbol) obtuvimos el mismo resultado que con el método anterior (**Figura R23**), es decir a partir del día 5 los árboles se asemejan al del día 9 más allá de lo esperable por el azar. De esta manera pudimos demostrar mediante dos métodos estadísticos independientes que a partir del día 5 se consolida una estructura poblacional en cuanto a perfiles de conducta en nuestra tarea.

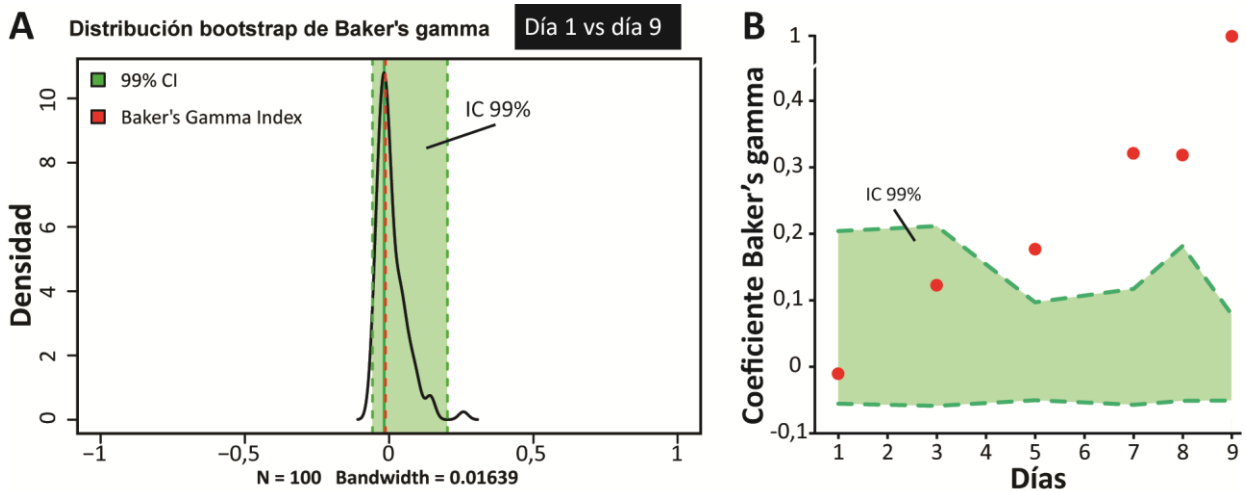


Figura R23: Los dendrogramas aumentan su correlación a medida que se acercan los días comparados. A, ejemplo de medición del índice Baker de gamma día 1 vs. día 9. Línea continua negra representa la distribución de índices gamma de Baker para las 100 iteraciones entre el dendrograma del día 1 permutado al azar vs. día 9. Área verde representa el IC99% de dicha distribución. Línea continua verde, la mediana de la distribución y la línea punteada verde, los extremos máximos y mínimos del IC99%. Línea roja indica el valor del índice gamma de Baker para la comparación entre días. **B**, el área en verde representa el intervalo de confianza de la distribución por *bootstrap* luego de 100 comparaciones con árboles al azar por día analizado. En línea llena verde se indica la mediana, y con líneas punteadas los máximos y mínimos del IC99%. Los puntos rojos indican el índice gamma de Baker vs. el día 9.

Dada la similitud de los dendrogramas de los días previos al 9 a continuación evaluamos la posibilidad de que los dos sub-grupos identificados en el día 9 ya se conformaran en días previos. Para ello empleamos los métodos *Gap-statistics* y media de Silhouette para todos los dendrogramas.

Los días 3, 8 y 9 son los únicos tres días en los que estos algoritmos coinciden en la selección de un número de grupos ideal (k) en un $k=2$, lo que sugiere de dentro de los mencionados dendrogramas se pueden encontrar 2 grupos significativamente definidos (**Tabla R3**).

Sin embargo, los grupos identificados dentro del día 3 no parecieran ser grupos estables, ya que no son encontrados en días posteriores. Además, el alto grado de enmarañamiento y la baja correlación del día 3 con días siguientes aboga a la idea de que el pobre nivel de conservación de la estructura de los árboles colabora con la pérdida de esos sub-grupos (enmarañamiento día 3 vs. día 5 = 0,23; IC95: 0,22 a 0,36; coeficiente de correlación gamma de Baker día 3 vs. día 5: 0,087 IC95%: -0,047 a 0,12). En cambio, como ya vimos, los sub-grupos formados a partir del día 8 son estables y se encuentran conservados en el día 9 **Figura R22 y R23**).

Es remarcable que la población de controles resulta dividida en dos grupos a partir de su comportamiento y que cada grupo cuenta con una cantidad similar de individuos (14 vs. 17).

Tabla R3: aproximación al número de grupos ideales mediante *gap statistics* y media de Silhouette para los seis días evaluados dentro de la prueba de discriminación.

	<i>Gap statistics</i>	Media de <i>Silhouette</i>
Día 1	1	9
Día 3	2	2
Día 5	1	2
Día 7	1	2
Día 8	2	2
Día 9	2	2

Ahora bien, estos dos subgrupos fueron clasificados en base a parámetros conductuales que parametrizan su comportamiento. En caso de existir estrategias diferentes de resolución dentro de esta prueba dirigida a metas de discriminación, las mismas deberían surgir a lo largo del aprendizaje e irse consolidando a medida que la prueba avanza. A su vez, los individuos que las adoptan deberían presentar un perfil que les permita ser distinguidos de sus conspecíficos que optan por otra estrategia. La aparición a lo largo de los días de dos grupos diferenciables a partir de su comportamiento y estables a lo largo de las sesiones es compatible con el surgimiento y la adopción de estrategias de resolución.

Pero ¿son estos grupos dos estrategias de resolución de tareas? De serlo, ¿en qué consiste cada una?

Para caracterizar las presuntas estrategias de resolución, analizamos los valores que presenta cada grupo en algunas de las variables que utilizamos para su clasificación inicial. Para una visualización más clara, en la **Figura R24** se encuentra el dendrograma del día 9, en esta oportunidad coloreado señalizando al **Grupo 1** y el **Grupo 2**.

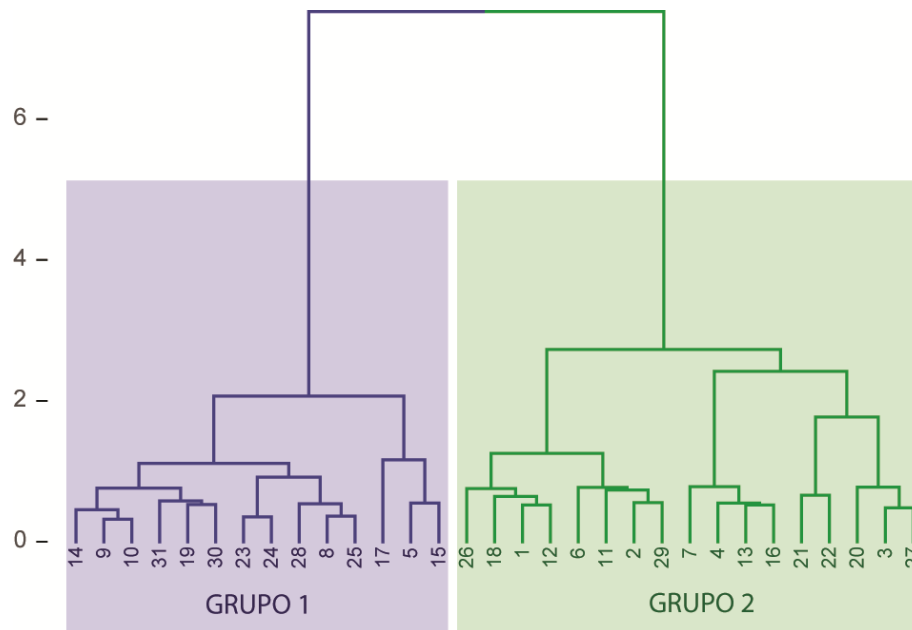


Figura R24: Dendrograma construido a partir de las variables recogidas de la sesión del día 9 de la **tarea de discriminación**. Coloreados se encuentran los grupos clasificados tanto utilizando *gap statistics* como media de Silhouette.

El grupo 1 se caracteriza por presentar una fuerte preferencia por P5 (el puerto que entrega la recompensa más grande). El grupo 2, en cambio, no desarrolla una preferencia por ninguno de los dos puertos en toda la prueba (**Figura R25 A**, ANOVA de medidas repetidas, interacción significativa). Esta diferencia, comienza a ser marcada a partir del quinto día de la prueba. En parte, esa brecha en el nivel de preferencia entre grupos se explica porque los animales que conforman el grupo 1, adoptan una estrategia *win-stay*, que en el contexto de esta tarea, significa elegir preferencialmente y de manera continua P5 (**Figura R25 B**, ANOVA de medidas repetidas, interacción significativa). Los animales del grupo 2, se mantienen en valores de uso de estrategia *win-stay* compatibles con una elección al azar. Realizar más elecciones por el P5, garantiza que el grupo 1 requiera un menor número de ensayos para completar la sesión.

Además, es de esperar que se obtengan más recompensas por unidad de tiempo siendo que se minimiza en número de intervalos entre ensayos. Efectivamente, las sesiones del grupo 1 son siempre más cortas que las del grupo 2 (**Figura R25 C**, ANOVA de medidas repetidas, efecto tratamiento significativo).

Hasta el momento podría plantearse que, como ocurre muchas veces en una prueba de aprendizaje, existe un grupo de animales que es capaz de aprender la asociación deseada (el grupo 1 en nuestro caso) y otro que no. Sin embargo, si bien no manifiesta una preferencia por P5, el grupo 2 muestra signos de aprendizaje que son comparables a los del grupo 1. Por ejemplo, aunque el tiempo de sesión es más largo, producto de tener que realizar más ensayos por sesión, el tiempo de respuesta es igualmente bueno y mejora a lo largo de los días de igual manera en ambos grupos (**Figura R25 D**, ANOVA de medidas repetidas, factor tiempo significativo). Esto refleja que los animales están igualmente motivados a realizar la tarea, a la vez que aprenden que deben realizar NPs en los puertos a fin de recibir alimento. Además, en la caída del tiempo de respuesta observada en todos los animales entran en juego muchos aprendizajes de difícil valoración, más allá de la creciente asociación estímulo-respuesta. Por ejemplo, es posible que los animales pierdan el efecto de ansiedad inicial que les produce ingresar a la caja operante o mejoren su desempeño motor y transiciones entre acciones con mayor facilidad. Otro aprendizaje que realizan los miembros de ambos grupos de igual manera es la inhibición de acciones que no conducen a recompensas. Ambos grupos manifiestan una fuerte tendencia a introducir la cabeza en el puerto de alimento (MP, por *magazine poke*), probablemente producto de que en la sesión 0 de aprendizaje (MT, *magazine training*, ver materiales y métodos) esa acción era recompensada, sin embargo, al comenzar la tarea rápidamente aprenden que la realización de esa acción no conduce a la obtención de recompensas y tienen a reducirla significativamente (**Figura R25 E**). Finalmente, las diferencias observadas en el grado de preferencia o largo de sesión no pueden ser explicadas por diferencias en motivación producto de una diferente pérdida de peso (**Figura R25 F**, ANOVA de medidas repetidas, efecto tratamiento no significativo). En resumen, el grupo 1 está conformado por animales con mejor desempeño en esta tarea desde una visión antropocéntrica, que alcanza elevados niveles de preferencia, maximiza el uso de la estrategia *win-stay*, estrategia que ayuda a estos animales a resolver la tarea en un menor tiempo y maximizar las recompensas por unidad de tiempo. El grupo 2 en cambio, es incapaz de manifestar una preferencia por algún puerto, pero que, sin embargo, muestra signos de interés por completar la tarea.

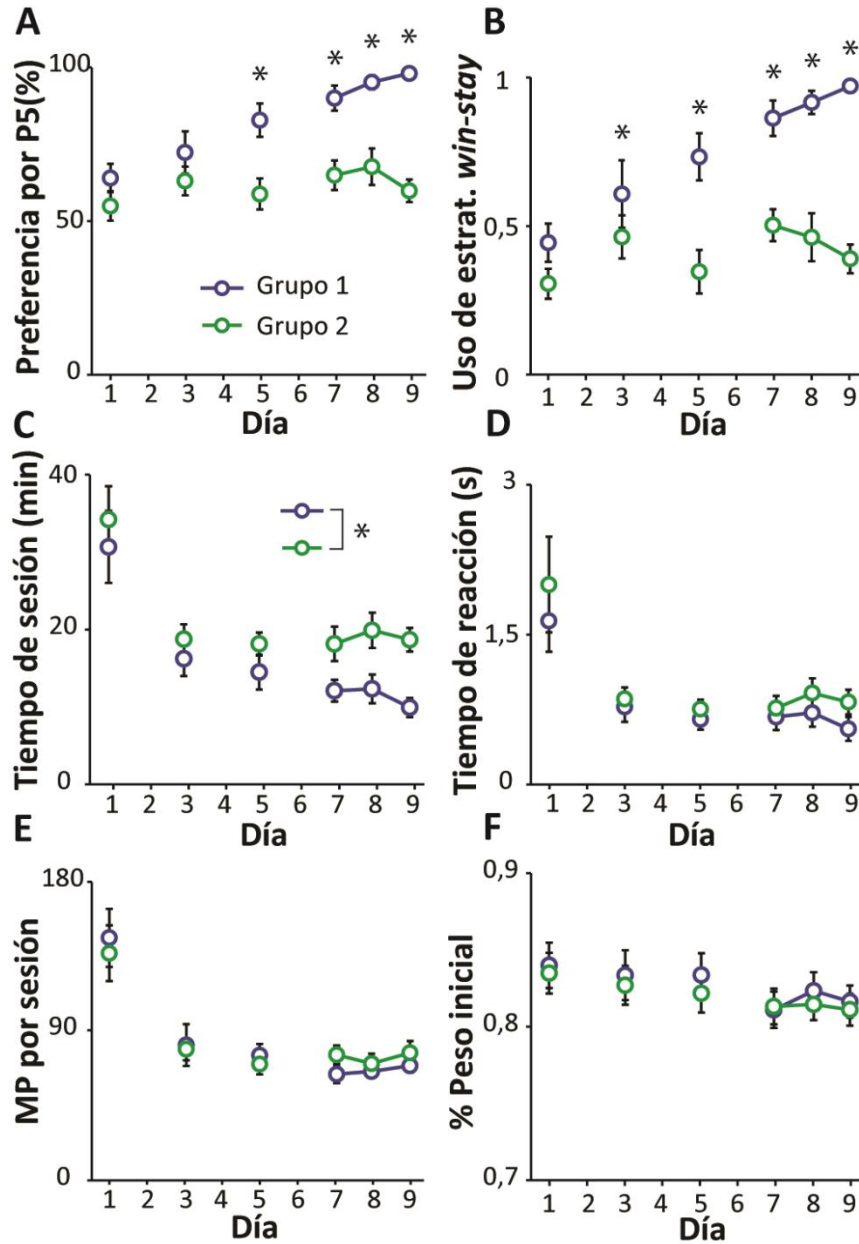


Figura R25: Variables biométricas y comportamentales medidas durante la prueba. **A**, Los animales del grupo 1 desarrollan una mayor preferencia por el puerto que entrega cinco recompensas (P5) vs. grupo 2; ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa, $F_{5,145}=4,59$, $p<0,001$, análisis *post hoc* LSD, día 5, 7, 8 y 9, $p<0,001$. **B**, los animales del grupo 1 manifiestan el uso de estrategia *win-stay*, ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa, $F_{5,145}=3,14$, $p=0,01$, análisis *post hoc* LSD día 3 $p=0,004$; días 5, 7 8 y 9, $p<0,001$. **C**, el tiempo de sesión del grupo 1 es menor al del grupo 2. ANOVA de medidas repetidas, efecto tratamiento, $F_{1,145}=9,96$, $p=0,004$. Interacción n.s. **D**, El tiempo de reacción entre grupos es igual, y disminuye con las sesiones. ANOVA de medidas repetidas, factor tratamiento no significativo, $p=0,12$; factor tiempo significativo, $F_{5,145}=22,453$, $p<0,001$. Interacción n.s. **E**, el número de búsquedas de recompensas al comedero central (MP) es igual entre grupos, y disminuye con las sesiones. ANOVA de medidas repetidas, efecto tratamiento no significativo, $p=0,83$; efecto tiempo significativo, $F_{5,145}<0,001$. Interacción n.s. **F**, el % de peso inicial no difiere entre grupos, pero decae con el transcurso de las sesiones. ANOVA de medidas repetidas, efecto tratamiento no significativo $p=0,48$; efecto tiempo significativo, $F_{5,145}=9,1$, $p<0,001$. Interacción n.s. * $p<0,05$

A pesar de que los animales del grupo 2 completan la tarea dentro de los límites establecidos, muestran un porcentaje de pérdida de peso equivalentes al grupo 1 y consumen todos los *pellets* entregados como recompensas, la falta del desarrollo de preferencia por el P5 podría explicarse a partir de una incapacidad de realizar una correcta valoración de la recompensa. Sin embargo, hay que considerar que las condiciones que presupone este experimento no son comunes en entornos naturales. Los animales raramente encuentran fuentes de recursos fijas e inagotables donde la única opción viable es la explotación. Por lo tanto, alternativamente, podría plantearse que en el contexto en el que se realizó esta prueba, los animales del grupo 2 presentan bajos niveles de explotación, por lo que no establecen una preferencia por P5 por realizan NP exploratorios en el otro puerto. Esta estrategia alternativa de exploración, aunque desventajosa desde nuestro punto de vista como observadores que tenemos la certeza de que los parámetros de la tarea no serán modificados, podría llegar a ser beneficiosa en situaciones donde las condiciones cambian y el P5 deje de ser el puerto energéticamente más redituable.

Para evaluar simultáneamente la capacidad de valorar las recompensas como la elección de acciones que propician la exploración o explotación de recursos, realizamos una devaluación de la recompensa de mayor tamaño mediante la introducción de un retardo en su entrega, que se vuelve mayor con el transcurso de los días (*delay discounting*, ver *Materiales y métodos*).

Llamativamente, los animales del grupo 2 muestran un rápido descenso en la preferencia por el puerto 5, lo que sugiere un correcto sensado del valor de la recompensa y una rápida respuesta ante la pérdida de valor de la misma (**Figura R26**). En contraposición, el grupo 1 manifiesta una mayor dificultad en revertir la conducta, manteniéndose perseverantes en la elección del puerto preferido en la fase anterior pese a que la recompensa obtenida en esta etapa está devaluada.

Estos resultados parecen indicar que la estrategia adoptada por los animales del grupo 1 durante la fase de discriminación les permite alcanzar un elevado desempeño y una eficiente explotación de recursos. En contraposición, la misma estrategia no incluye un correcto reconocimiento del entorno y sus alternativas, lo que resulta en una incrementada dificultad en la migración de acciones ante la llegada de un cambio ambiental. Por el otro lado, los animales del grupo 2 realizarían una explotación más limitada, pero balanceada con una buena exploración del ambiente, lo que se refleja en que ante la incorporación del retardo en la entrega de una de las recompensas, migran con mayor facilidad a la alternativa menor e inmediata gracias a ser ampliamente conocida. Estos resultados son compatibles con la

existencia en la población de dos estrategias, una eficiente en la explotación, pero más inflexible, y una de eficiente en la exploración, altamente flexible, pero de pobre desempeño en condiciones de abundancia de recursos.

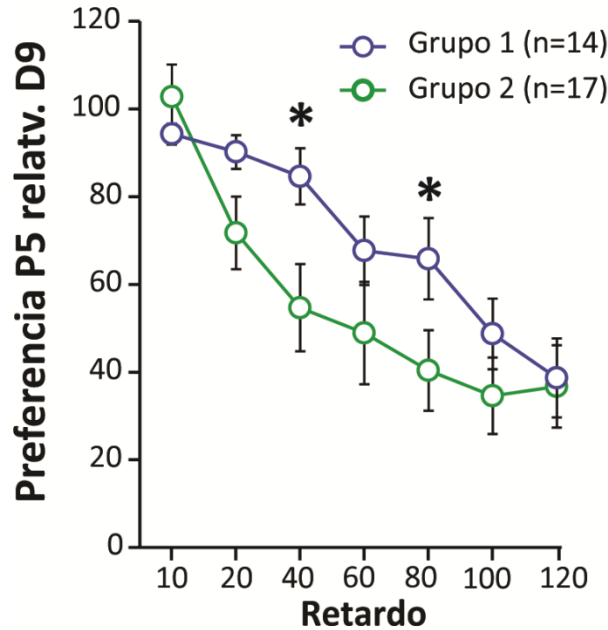


Figura R26: Los grupos 1 y 2 responden diferente a la devaluación por introducción de un retardo de la recompensa grande. Preferencia por el puerto que entrega mayor recompensa (P5), relativizada a la preferencia mostrada por cada animal el último día de la sesión de discriminación, para las sesiones que incluyen un retardo en la entrega de recompensas de tamaño (*delay discounting*). ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción significativa $F_{6;174} = 2,81$; $p=0,01$; análisis *post hoc* LSD, retardo 40 segundos $p=0,016$, retardo 80 segundos $p=0,039$. Círculos de bordes azules representan animales clasificados como grupo 1, $n=14$; círculos de borde verde clasificados como grupo 2, $n=17$. Barras de error señalizan error estándar. $*=p<0,05$.

Efecto de la lesión de las ICE sobre la elección de posibles estrategias de resolución de la tarea de discriminación

Los animales control utilizados a lo largo de este capítulo corresponden a los animales operados en cirugías estereotáxicas e inyectados con solución fisiológica. En las mismas cirugías fueron inyectados animales con toxina diftérica (DT), y los animales de ambos grupos sometidos a la prueba de discriminación en el contexto de caja operante.

Los ratones con lesión selectiva de ICE presentan un mejor desempeño en la tarea de discriminación, que se ve manifestada como una mayor preferencia por el P5 respecto a los animales control a partir del día 5 (**Figura R27**, ANOVA de medidas repetidas, interacción

significativa). Si bien existen varios trabajos en la literatura donde se evalúa el desempeño de animales con lesión selectiva de las ICE en tareas instrumentales dirigidas a metas, prácticamente no existen reportes que muestren mejorías en su desempeño.

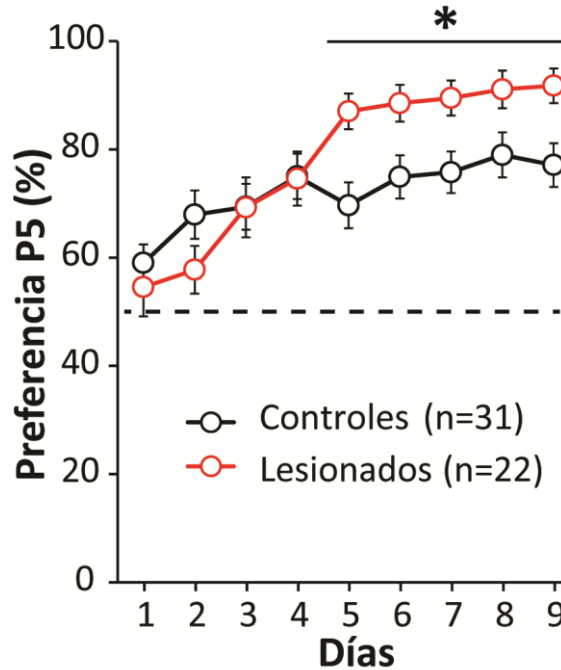


Figura R27: los animales con lesión selectiva de ICE muestran una mayor preferencia por el puerto de mayor recompensa (P5) que los animales control. ANOVA de medidas repetidas, interacción significativa, $F_{8,408}=4,96$, $p<0,001$; análisis *post hoc* LSD, día 6 $p=0,004$, día 7 $p=0,02$, día 7 $p=0,02$, día 8 $p=0,04$, día 9 $p=0,01$. Círculos de bordes negros representan animales control, $n=31$; círculos de bordes rojos, animales lesionados, $n=22$. Barras de error corresponden a error estándar. $*=p<0,05$. Línea de puntos señala preferencia del 50% por P5.

Si evaluamos la manera en que realizan la prueba, incorporando al análisis multivariado los datos provenientes de la conducta de estos animales siguiendo los mismos lineamientos que los utilizados en el análisis anterior, obtenemos nuevamente dos grupos significativamente segregados el día 9 de la fase de discriminación. Los controles se distribuyen de manera muy similar a la encontrada en ausencia de los animales lesionados, a diferencia de dos animales que intercambian grupo (**Figura R28**).

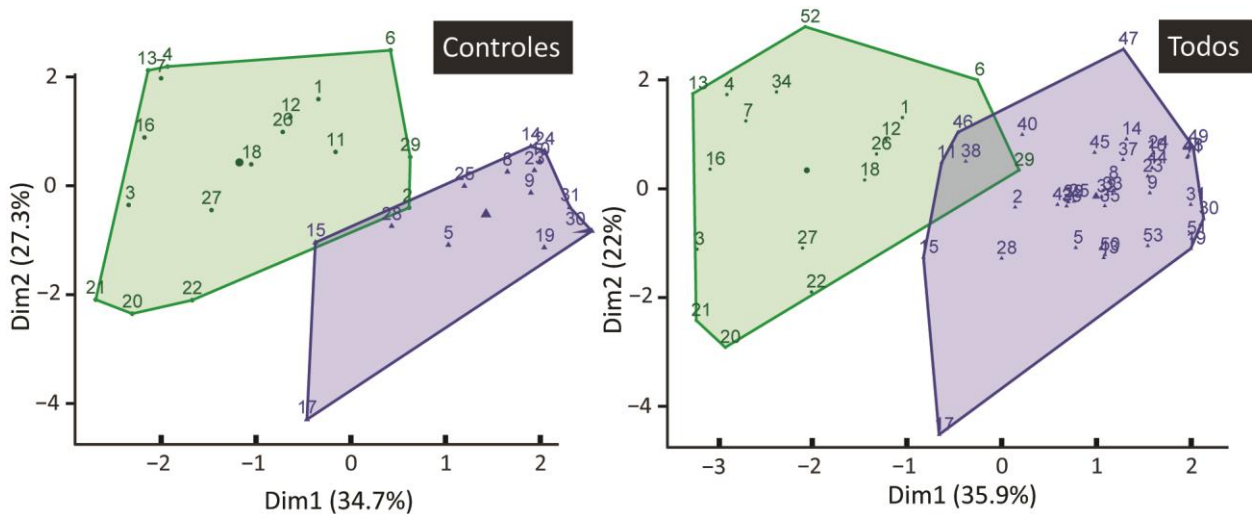


Figura R28: Al incorporar a los animales lesionados al análisis multivariado, continúa la clasificación en dos grupos comportamentales. Distribución de los casos que forman los grupos clasificados mediante *gap-statistics* y media de Silhouette en el espacio formado por los dos CP que presentan mayor contribución de la varianza.

El dendrograma de la **Figura R29**, nos muestra la configuración de los grupos 1 y 2 luego de la inclusión de los animales lesionados. Sorpresivamente, 20 de los 22 animales lesionados son clasificados dentro del grupo 1. La proporción de animales lesionados clasificados en cada grupo es diferente de la encontrada en animales control (relación 20/2 ratones en cada grupo para los lesionados vs. relación 15/16 obtenida en los controles $\chi^2 = 10,37$, $p=0,003$). Así, el 90% de los ratones con ablación e ICE se comportan como los ratones del grupo 1. A partir de estos resultados, es posible proponer que los animales lesionados presentan un sesgo en la selección de estrategias que se refleja en una elección de estrategia de explotación anormalmente elevada respecto a la proporción de uso de la misma estrategia (y en las mismas condiciones experimentales) presentada por los animales control. A su vez, esta clasificación puede explicar la mejoría en el desempleo manifestado por los animales lesionados (**Figura R27**). Mientras cerca del 50% de los ratones del grupo control seleccionan la estrategia de explotación, que en contexto de esta prueba en la que las condiciones ambientales son invariantes es sinónimo de “buen desempeño”, el grupo restante opta por una estrategia centrada en la exploración. Así, el grupo control en conjunto se encuentra compuesto por partes aproximadamente iguales de animales “exploradores” y “explotadores”. El grupo conformado por los animales lesionados, en cambio, es un grupo más homogéneo enriquecido en el uso de la estrategia de exploración, y presenta elevados niveles de preferencia por P5. De ser éste parámetro la única variable de medición del desempeño dentro de la tarea, esta preferencia puede ser interpretada como una mejoría en el desempeño.

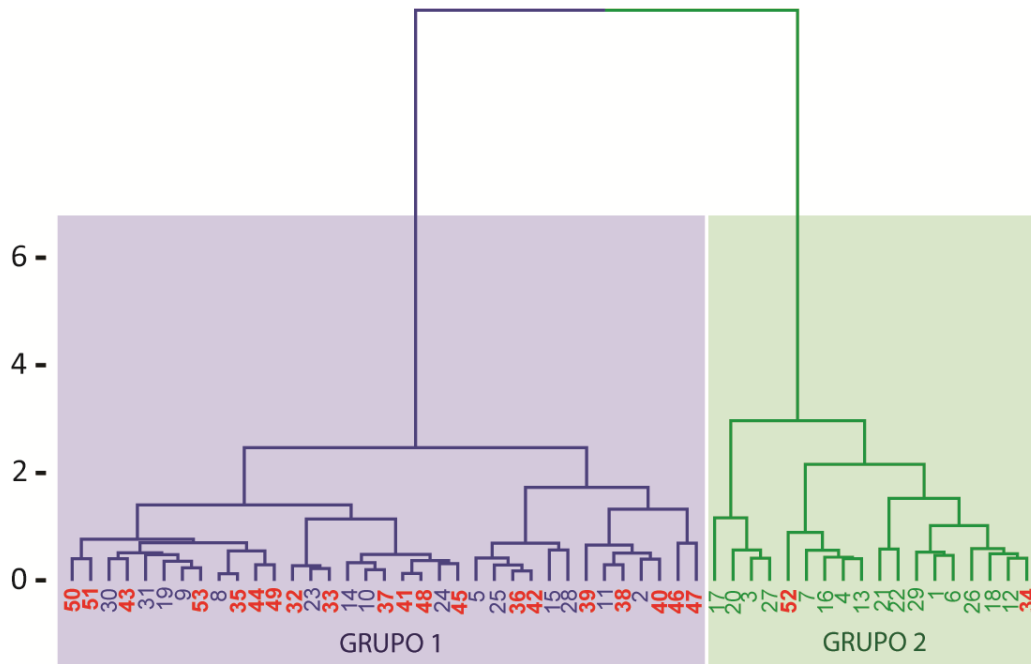


Figura R29: Los animales lesionados se encuentran preferencialmente clasificados en el Grupo 1. Dendrograma construido a partir de las variables provenientes de animales control y lesionados en el día 9 de la prueba de discriminación. En rojo se destacan los animales lesionados.

Conclusión

El análisis multivariado y de aglomeramiento de las variables fisiológicas-conductuales observadas en la población control sugiere la existencia de dos estrategias de resolución de la tarea de discriminación. La primera estrategia optimizaría el número de recompensas obtenidas por unidad de tiempo gracias a la realización persistente de NP en el puerto de mayor recompensa, que minimiza el número de ensayos requeridos para completar la tarea. A su vez, esa persistencia conduciría a una dificultad en la reversión de la preferencia manifestada de manera primaria, resultando poco adaptativa en situaciones en las que ocurre un cambio en la contingencia determinada por las condiciones ambientales. La segunda estrategia, se distingue por la presencia de altos niveles de exploración, manifestada como un elevado índice de alternancia entre los puertos de hociqueo. Si bien esta estrategia requiere de la inversión de un tiempo mayor para completar la tarea, garantiza información actualizada del estado de la recompensa de ambos puertos a la vez. Llegado el caso en el que ocurre un cambio en la contingencia de entrega de recompensas, los animales que utilizarían esta segunda estrategia presentan una ventaja de información y flexibilidad que les permite migrar de puerto con mayor facilidad.

Podría discutirse acerca de la causa por la cual surgen dos estrategias, siendo la tarea planteada una prueba de discriminación en la que se espera que todos los animales opten por obtener la recompensa de mayor tamaño (Adriani y Laviola, 2003). Es probable que las condiciones experimentales que utilizamos no fueran lo suficientemente limitantes como para impedir que emerja una estrategia de exploración del ambiente que fuera compatible con la obtención de suficiente alimento. En nuestras condiciones (en la que la prueba finaliza al conseguir 50 *pellets* o luego de una hora, lo que ocurra primero) un animal que explora alternativamente y sin preferencia ambos puertos puede obtener el número máximo de *pellets* requiriendo aproximadamente el doble de tiempo que un animal con preferencia perfecta por el puerto de cinco recompensas. Sin embargo, aun duplicando el tiempo para obtener los 50 *pellets* los ratones consiguen completar la tarea en mucho menos de una hora, adquiriendo información adicional respecto a la invariancia y disponibilidad de recursos en el ambiente, así como contar con el estado actualizado de las recompensas entregadas en el puerto alternativo. Para corroborar esta hipótesis, podrían ajustarse estas condiciones a fin de volver la estrategia de exploración menos conveniente, por ejemplo limitando el número máximo de ensayos o acortando considerablemente el tiempo de sesión, esperando que frente a estos cambios, se reduzca el número de animales que optan por la exploración.

Gracias al enfoque adoptado en este capítulo fuimos capaces de hacer una distinción entre desempeño y estrategia. Así, lo que podría haber sido entendido, mediante enfoques tradicionales, como una peor *performance* en un subgrupo de animales control, fue interpretado, mediante la utilización de un análisis multivariado, como un uso de una estrategia de resolución alternativa. La lesión selectiva de las ICE presentan un incremento del desempeño en la prueba de discriminación que se refleja como una mayor preferencia por el puerto que entrega la mayor recompensa respecto a los ratones control. Con nuestra visión, esta diferencia puede ser explicada por la prevalencia anormalmente alta de animales clasificados en el grupo 1. Estos resultados sugieren que la falta de ICE conlleva una selección de estrategias alterada en tareas de dirigidas a metas que no dependen de navegación espacial.

Si bien podría haber sido considerado el uso de ratones *wt* para la caracterización de la prueba, se decidió utilizar los animales control de lesión por ser los más semejantes al grupo experimental que se deseaba evaluar. No se descarta repetir la prueba con animales *wt* para confirmar la presencia de los mismos grupos.

Discusión

Una de las propuestas más recientes y extendidas en cuanto al rol de las ICE es su participación en la resolución de tareas que requieren flexibilidad cognitiva. De acuerdo a estas propuestas, las ICE serían elementos necesarios para permitir la re-asociación de la contingencia estímulo-respuesta, permitiendo la resolución de una tarea durante ensayos de reversión comúnmente utilizados para evaluar flexibilidad cognitiva. Sin embargo, han surgido trabajos contrapuestos que indican que su remoción mejora el desempeño en contextos que requieren de comportamientos flexibles. Entendemos que a la luz de nuestros resultados, es posible re-interpretar algunos de estos trabajos.

Una característica general de las tareas de flexibilidad es que funcionan en etapas. El animal es entrenado en una tarea que tiene una regla con determinadas contingencias E-R reforzadas; luego de una determinada cantidad de sesiones de entrenamiento, y cuando el animal ha alcanzado una determinada *performance*, alguna contingencia se invierte o la regla es reemplazada por una nueva. En estas pruebas, en líneas generales, no hay conflictos de uso de estrategias dentro de una fase dada, habiendo siempre una estrategia óptima. Ejemplo de esto es el trabajo de Okada y col. 2015. Ellos entrenaron ratas control y con lesión de las ICE en un laberinto en cruz de solución única, donde la forma de optimizar el número de recompensas obtenida es el uso de una estrategia egocéntrica. En este contexto, solo esa estrategia se ve reforzada, factor que se ve aún más fortalecido por la ausencia de claves visuales distales. Una vez que los animales aprendían la tarea se los sometía a una reversión de la contingencia, pero siempre dentro de la utilización de una estrategia egocéntrica. Con este abordaje, es lógico concluir, al igual que lo hicieron los autores, que las mejorías observadas en los animales lesionados durante la fase de reversión eran debidas a un aumento en la flexibilidad cognitiva.

Sin embargo, también es posible realizar una interpretación de los resultados vistos por Okada a través del “lente” de la selección de estrategias. El aprendizaje inicial en la prueba dependiente de una estrategia egocéntrica ocurre con normalidad en ambos grupos, ya que no hay estrategias en conflicto. Sin embargo, cuando ocurre el cambio de la regla, los animales control pueden detectar esa modificación y experimentar un conflicto. Deben revertir su acción anterior, pudiendo además realizar ensayos de exploración para verificar que la contingencia E-R usada en el pasado perdió resultado. En paralelo, los animales con lesión, al igual que ocurre en nuestra tarea de condicionamiento operante de discriminación, pueden no ser capaces de ejecutar dos estrategias en nuevas condiciones, por una incapacidad en la ejecución de la

estrategia de exploración, reflejándose en un menor número de errores de reversión (por ir a explorar el brazo no recompensado). De ocurrir esto, al igual que ocurre en nuestro paradigma, la limitación en el uso de una estrategia se vería reflejada en una mejoría en el desempeño como la observada.

Por otro lado, se encuentra la concepción de las ICE como elementos necesarios para la *señal de error predicción de estados* (Bradfield y col., 2013). Esta idea nace de un grupo que suele trabajar en tareas de condicionamiento operante, en la que la transición entre estados es discreta. En estos paradigmas, por ejemplo, un animal realiza X presiones de la palanca Y, recibe un *pellet*, suena una chicharra y se transiciona al estado Z. En estas tareas se ha descrito que la falta de señal colinérgica en el estriado interfiere con el reconocimiento de estados. Sin embargo, no todas las tareas o entornos cuentan con condiciones equiparables a las que encontramos en una prueba operante. Tareas comportamentales como las utilizadas en trabajos anteriores de nuestro grupo (Martos y col., 2017) o el laberinto de Barnes, cuentan con ambientes y cursos temporales casi continuos en los que los animales deben actualizar e incrementar la información que colectan del ambiente a lo largo de los días. En cualquier caso, en las condiciones de nuestro trabajo, esperaríamos que, una vez aprendida la tarea, el animal pueda predecir el estado al que lo conducirán sus acciones y por lo tanto la señal de error de predicción de estados sea cercana a cero. Sin embargo es durante estas fases de consistencia e invariancia que los animales lesionados manifiestan claramente su incapacidad de migrar de una estrategia a otra. Si la señal de error en la predicción de estado en estas etapas fuera baja no debería impactar en la conducta, como ocurre al eliminar las ICE. La hipótesis de señal de predicción, tal cual está planteada, es insuficiente para explicar nuestros resultados, fundamentalmente por los requisitos que establece su aplicación, dejando vacante una explicación para los déficits observados en nuestro trabajo y en todos los trabajos donde no exista una clara transición entre estados.

También ha sido propuesto un rol de las ICE en atención a partir de los estudios que destacan la presencia de actividad de pausa ante claves ambientales con capacidad de predecir eventos relevantes en tareas de aprendizaje. Sin embargo, en nuestro trabajo los animales lesionados presentan curvas de aprendizaje que son iguales a la de los animales control e incluso mejorías en el desempeño en una de las pruebas, algo inédito en tareas de aprendizaje instrumental. Estos resultados nos llevan a concluir que, al menos en el contexto de este trabajo, no pareciera haber déficit a nivel de atención de claves ambientales requeridas para la ejecución de tareas.

¿Por qué las estrategias poblacionales no son la suma de estrategias individuales?

Para que en un grupo de animales se observe una estrategia dada en el 70% de los casos pueden ocurrir dos cosas: que el 70% de los animales adopte en el 100% de los ensayos la estrategia A y el otro 30% de los animales adopte la estrategia B; o que el 100% de los animales seleccione la estrategia A en un 70% de los ensayos y la B en el 30% restante. En el primero de los casos cada animal tendría una estrategia individual preferida, mientras que en el segundo todos los animales se comportarían de manera idéntica existiendo un sesgo de 7:3 en la selección de la estrategia A.

Una consistencia que encontramos entre las dos pruebas de navegación espacial es que las estrategias observadas en la población no presentaban un correlato en estrategias individuales. En el *laberinto en forma de cruz*, la determinación de estrategias se realiza mediante un ensayo de prueba, por lo que la estrategia de cada individuo queda determinada a partir de un único ensayo, siendo difícil saber si existe una estrategia individual preferida. De todas formas, no pareciera haber consistencia entre los diferentes *probe test* que realiza un animal a lo largo de toda la prueba sugiriendo que no existen estrategias individuales. En el caso del laberinto de Barnes, donde cada animal exhibe la estrategia usada en varios ensayos por día, es mucho más claro que no existen estrategias individuales.

No obstante, es posible encontrar en los animales control estrategias que se perfilan como las más utilizadas al final de cada una de las pruebas. Si este fenómeno existe, es porque efectivamente ocurre un uso mayor de estas estrategias por parte de cada uno de los individuos. Sin embargo, el uso de una estrategia en un ensayo dado no condiciona el hecho de que la misma se repita en el ensayo siguiente. Por esto, sugerimos que la elección de estrategias en estas pruebas funcionaria mediante la creación de un perfil de distribución probabilística de estrategias que se actualiza con el paso de los días y del cual cada ratón elige cuál utilizar en cada ensayo. A medida que los días pasan, la distribución se vería enriquecida en una de las estrategias, lo que la vuelve más probable de ser elegida, generando el sesgo poblacional observado en los días finales en los animales control.

En las tareas de navegación en el espacio se utilizan estrategias innatas que pueden ser ejecutadas independientemente del grado de uso que las mismas hayan tenido en el pasado. Esto, sumado al hecho de que en las condiciones experimentales utilizadas las dos estrategias de navegación son igualmente eficaces y conducen a la recompensa/escape de manera

equivalente, hace que ninguna de las dos prime fuertemente por sobre la otra. Lo que sí se observa es que, ya sea por una sutil mejora en la eficiencia, ahorro cognitivo o alguna otra razón que podemos especular, una estrategia se vuelve más probable que la otra a lo largo de los días. En conjunto, todos estos factores conducirían a que una estrategia sea más usada, pero no unánimemente elegida por los animales, pudiendo, en algún ensayo utilizarse la otra y ejecutarla de manera perfecta. El caso contrario se puede encontrar en la tarea operante en la que se evidenciaron presuntas estrategias de resolución poblacionales a partir de consistencias en la conducta de animales individuales. Una posible interpretación ante esta discrepancia es que esta segunda tarea implica una condición “menos natural” en la que, si bien los animales poseen las estrategias innatas de explotación y exploración, no cuentan con los procedimientos necesarios para su implementación en este contexto, por lo que deben aprenderlos a través de ensayo-error. En este sentido, por ejemplo, deben aprender a hociquear en cada puerto y asociar las consecuencias que eso tiene, a coordinar sus acciones a los tiempos de los intervalos-entre-ensayo, y que sólo tiene sentido la recolección de alimento en el comedero luego de que una recompensa fue entregada, entre otros aprendizajes. En estos casos, el reiterado uso y ejecución de una estrategia facilitaría su uso en ensayos siguientes, permitiendo que se fije una como estrategia favorita para cada individuo.

¿Cómo afectaría la lesión de las ICE a este modelo?

Tanto en humanos (Milner, 1963; Szczepanski and Knight, 2014) como en modelos animales (Joel, Weiner and Feldon, 1997; Kepecs *et al.*, 2008), se propone a la mPFC como elemento esencial para el control ejecutivo de comportamientos necesarios para valorar reglas y estrategias nuevas. Se ha demostrado que lesiones de la mPFC conducen a una incapacidad en la ejecución de cambios en reglas espaciales (Rich and Shapiro, 2009). La mPFC posee conexiones con regiones límbicas, el hipocampo, los ganglios de la base, entre otras zonas, por lo que es considerada un área de asociación heteromodal (Tirapu *et al.*, 2008). De esta manera, la mPFC mediaría procesos cognitivos de alta jerarquía requeridos para mantener comportamientos voluntarios flexibles (Malagon-Vina *et al.*, 2018). A su vez, el estriado tendría una intervención en la capacidad de aprender cómo adaptar esa selección de acciones con el objetivo de maximizar refuerzos (Graybiel, 2005; Khamassi, 2007). Mediante la activación de la vía directa e indirecta, promovería el plan óptimo y suprimiría planes alternativos, con el fin de ejecutar las respuestas beneficiosas.

Como ya se abordó con anterioridad, la mPFC y el estriado están anatómicamente y funcionalmente organizados conformando circuitos semi-cerrados de información. A su vez, ambas estructuras se encuentran fuertemente interconectadas con el sistema dopaminérgico el cual brindaría la información acerca de la presencia y valor de la recompensa. Si bien el flujo de información a través de estos circuitos es propuesto como requisito para la selección de acciones, se desconocen detalles acerca del mecanismo de cómo esta selección ocurre. Algunas teorías del funcionamiento del sistema mPFC-estriado sugieren que la corteza prefrontal “puede aprender” a realizar determinadas tareas y puede “proponer” acciones apropiadas para realizar en ciertos contextos, mientras que el estriado sesgaría esas decisiones a través de un proceso de selección más estocástico (Gurney, Prescott and Redgrave, 2001). En contraposición, otras teorías sugieren que los ganglios de la base adaptan su actividad a una determinada tarea más rápidamente que la mPFC, por lo que crearían una representación interna de la tarea primero, y sería el estriado el que permite el paso posterior de dicha representación a la mPFC (Frank, Loughry and O’Reilly, 2001; Pasupathy and Miller, 2005). De cualquier forma, parece haber consenso acerca de la necesidad de un trabajo conjunto de ambas estructuras para la correcta selección de acciones y estrategias adecuadas para cada situación o ambiente en particular.

Con esto en mente, y teniendo en cuenta nuestros resultados, podríamos plantear que en ambientes en los cuales el uso de una estrategia determinada implica ventajas muy superiores a las que se predicen para planes alternativos, el proceso de elección es casi trivial y la mPFC sería capaz de ejecutar el plan de acciones en cuestión, seleccionando la estrategia por sí sola (**Figura D1 A**). Esto ya ha sido planteado en circuitos de procesamiento paralelos a este, como es el que involucra a la corteza motora (Klaus, Alves da Silva and Costa, 2019). En cambio, en otra situación, en donde las estrategias son igualmente factibles y ambas se presentan equi-eficientes, la selección a través de mPFC puede no ser suficiente y la información sería transmitida de la corteza al estriado donde se completaría y complementaría mediante un proceso de filtrado de dicha selección. Nosotros proponemos que las ICE son necesarias para que la selección de estrategias ocurra en aquellos casos en los que dos o más estrategias entren en conflicto para la resolución de un problema dirigido a alcanzar una meta. Nos permitimos imaginar un modelo en el cual las entradas de la mPFC al estriado codifiquen posibles estrategias de resolución. Dichas entradas competirían entre sí en el estriado por dominar la salida de los ganglios de la base. La salida de los GB reingresaría a mPFC y regiones corticales relacionadas, reforzando un ensamble neuronal en la mPFC, incrementando su señal por sobre los otros, y volviéndolo más probable de controlar la salida motora y la respuesta conductual.

Las ICE participarían en este filtrado estriatal, probablemente integrando información de otras regiones corticales y del tálamo favoreciendo el flujo de información correspondiente a una estrategia por sobre otra (**Figura D1 C**). Esto no solo sucedería en ambientes nuevos, sino también en tareas que ocurren a lo largo de muchos días. En estos casos, la información cortical y talámica que arriba a las ICE día a día proveería de información respecto a la invariancia/saliencia del ambiente, y otras condiciones críticas para la toma de decisiones, y resultaría en cambios en la actividad de las mismas que podría generar el sesgo en la selección de un canal de información cortical por sobre otro permitiendo la selección de estrategias. Los animales lesionados, al no contar con ICE, perderían la capacidad de ser influenciados por aferencias corticales que proveen y actualizan la información momento a momento, no pudiendo migrar de una estrategia a otra a lo largo de los días de entrenamiento, tal como se observa en los experimentos del objetivo 2 (**Figura D1, D**).

Sin embargo, puede ser objetado que en los numerosos trabajos donde se realizó lesión selectiva de ICE (Kitabatake y col., 2003; Xu y col., 2015; Rappanelli y col., 2017), no han reportado problemas de este tipo. Esta diferencia puede deberse a que la mayoría de las tareas utilizadas en el pasado no incluyen situaciones de conflicto en la estrategia a emplear, por lo que la elección de cuál es la óptima puede ser ejecutada exclusivamente por la corteza, sin requerir la selección mediada por el estriado que ponga de manifiesto la falta de ICE (**Figura D1, B**).

En tareas operantes, como las del objetivo 3, la estrategia es implementada mediante procedimientos que deben ser aprendidos y la corteza no contaría con los planes de acción necesarios para aplicar la estrategia seleccionada (por ejemplo, explotación de recursos). En estas condiciones aquellas acciones que resultan recompensadas, tenderán a repetirse, y de esta manera el forjado de la estrategia surgiría a base del reforzamiento de acciones más sencillas. Podríamos preguntarnos por qué la estrategia de explotación fue la única desarrollada por los animales lesionados. En el caso de ausencia de señal colinérgica, estrategias que requieran de planificación o integración de información de múltiples cortezas podrían no ser ejecutadas. Alternativamente, podría ocurrir que a comienzos de la prueba la estrategia de explotación resultara levemente más ventajosa que la de exploración, especialmente en estos momentos en que aún no se han desarrollado asociaciones fuertes entre lado y recompensa. Esto conduciría a que los procedimientos asociados a la estrategia de explotación se refuercen y al no existir capacidad de filtro en los ratones carentes de ICE se desencadene un proceso de aprendizaje que consolide exclusivamente los procedimientos necesarios para desarrollar la

estrategia de explotación. Sin embargo, los animales control, que cuentan con una actualización constante del medio circundante provista por las diferentes cortezas y la capacidad de migrar entre estrategias con libertad, muestra un subgrupo de animales que optan por desarrollar una estrategia de exploración, fenómeno que no sería encontrado en la población de lesionados.

Para finalizar me gustaría destacar que nuestra propuesta sobre un rol de las ICE en la selección de estrategias no excluye que las mismas ejerzan un rol en otras situaciones ambientales tal y como ha sido propuesto por otros autores.

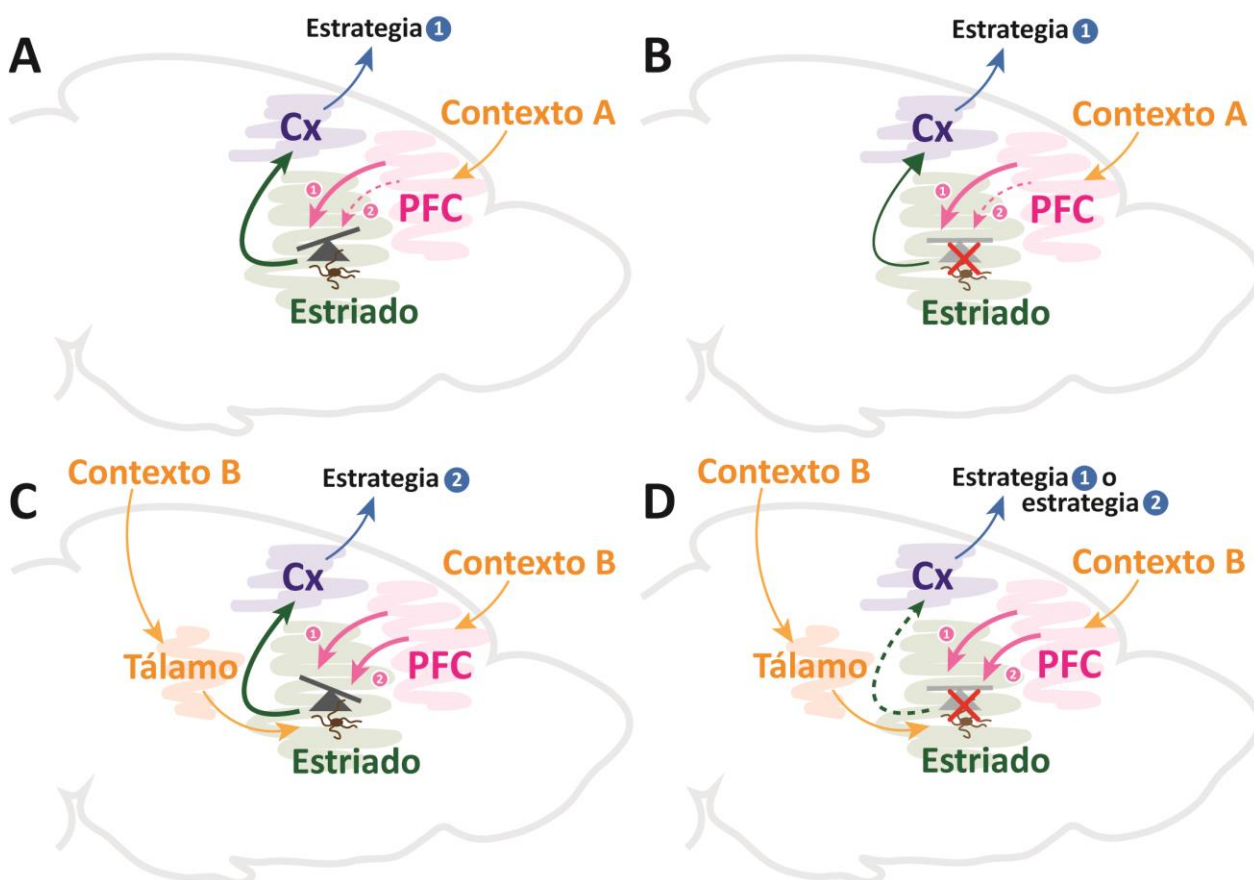


Figura D1: Esquema de posible intervención de las ICE en situaciones de conflicto entre estrategias de resolución de una tarea. **A**, En situaciones sencillas donde existe una estrategia muy superior a otras, la mPFC sería capaz de realizar la selección. De todas formas, envía la información para el procesamiento estriatal, pero la información devuelta por el mismo no es determinante para la selección (**B**). **C**, en otro contexto, donde las estrategias de resolución son igualmente posibles, el procesamiento en la mPFC no es suficiente y se requiere el filtrado estriatal. Información relacionada al uso de ambos planes de acciones llegan al estriado, donde, a partir de la información proveniente del contexto, las ICE favorecen los canales de procesamiento que seleccionan un plan por sobre otro. Es de destacar que la elección de la estrategia ganadora no sería absoluta, sino que seguiría una distribución de probabilidades en la que se una estrategia se ve favorecida. **D**, en ausencia de ICE, podría fallar el procesamiento información contextual que arriba al estriado, lo que conduce a que el animal sea incapaz de “desempatar” entre estrategias equi-probables, resultando las dos igualmente elegidas.

Anexo I – Verificación de método de selección de variables del análisis de componentes principales

Para analizar si los resultados obtenidos en la prueba de condicionamiento operante de discriminación realizada en animales control en el capítulo 3 dependen del método de selección de variables, realizamos comparaciones en paralelo eligiendo variables por criterios alternativos. Los métodos de selección de variables fueron:

- Método 1: seleccionamos los 4 factores de mayor *eigenvalue*, y de cada uno tomamos las 2 variables de mayor *eigenvector*².
- Método 2: seleccionamos los 3 factores de mayor *eigenvalue*, y tomamos las variables superen un *eigenvector*² = 0,1, independientemente de a qué factor pertenecen.
- Método 3: se utilizaron las 19 variables.

En la primera de las verificaciones (que llamaremos **método 2**), en lugar de extraer un número fijo de variables por cada factor del PCA (como ocurre en el método 1), seleccionamos todas aquellas que superen un cierto umbral, independientemente de en qué factor presenten ese valor. Seleccionamos todas las variables con un *eigenvector*² mayor o igual a 0,1. Al hacerlo, quedan seleccionadas 7 variables. Si utilizamos estas variables para construir el dendrograma, resulta un árbol muy similar al formado a partir del método 1. De manera equivalente se vislumbran la aparición de dos grupos, y la posición de cada animal dentro de cada grupo se ve conservada. En la **Figura S1** se puede observar el enmarañamiento entre el dendrograma construido a partir de la selección de variables por el método 1 y por el método 2. El enmarañamiento entre los árboles creados a partir de ambos métodos es de 0,063, por fuera del IC95% 0,273 a 0,336 determinado por el azar, indicando que los dos métodos generan árboles estadísticamente similares. El coeficiente de correlación gamma de Baker para el método 1 y 2 es de 0,65 (IC95% bajo hipótesis nula de no correlación -0,051 a 0,088), por lo que se concluye que los dendrogramas creados por ambos métodos presentan un alto grado de correlación que no es explicado por una distribución al azar. Cabe destacar que el índice de correlación de Baker es sumamente sensible. Un cambio de un único valor dentro de la matriz a partir del cual se forman los dendrogramas arroja niveles de coeficiente de correlación gamma de Baker del aproximadamente 0,75.

Adicionalmente, utilizamos las 19 variables para construir un dendrograma que describa la conducta del día 9 (**método 3**). Sorprendentemente se obtiene un árbol notoriamente similar, en el que solo 3 animales son asignados de manera cruzada a los grupos en los que parece dividirse el árbol. Además, cuenta con un enmarañamiento de 0,092 (IC95% 0,25-0,37), y un coeficiente correlación gamma de Baker de 0,62 (-0,052-0,2013).

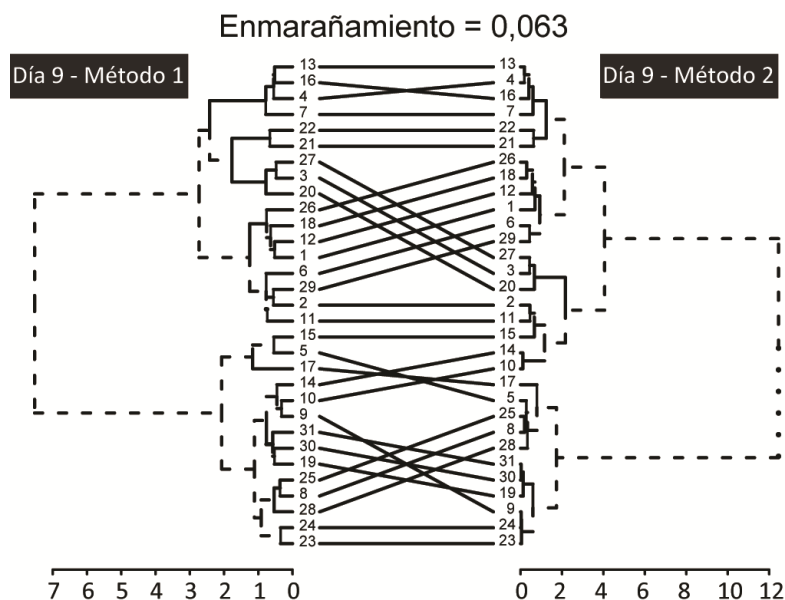


Figura S1: Enmarañamiento entre los días 1 y día 9 planteado utilizando de la función *entanglement* luego de que la función *untangle* encuentre el grado de máxima similitud. Líneas punteadas representa ramas del dendrograma que contienen casos en los que hubo cambio de posición entre un día y otro. Líneas negras llenas representan ramas del dendrograma donde no hubo cambio entre días.

Resumiendo, la elección de variables para un análisis multivariado es siempre tema de discusión. No existe un método inequívoco, sin embargo parece haber consenso en la literatura de que un número excesivamente elevado de variables con un acotado número de casos lleva a una mala interpretación de los resultados. En nuestro caso, el haber utilizado tres métodos diferentes de selección y haber llegado a la formación de árboles similares entre sí, con alto grado de conservación y correlación, sugiere que, tanto el método 1 como el 2 son igualmente buenos. Finalmente, procederemos a la utilización del método 1 para explorar los demás días del aprendizaje durante la prueba de discriminación.

Anexo II – Protocolos de inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica α -ChAT (DAB)

Todos los pasos se realizan en agitador, a una velocidad de entre 60 y 100

Etapa 1: Incubación con Anticuerpo Primario

1. Lavar 1 vez durante 10' en PBS 0.1 M.
2. Bloqueo de Peroxidasa: Incubar los cortes en una solución de Agua Oxigenada 3% en PBS durante 20 minutos a T° ambiente
3. Lavar 1 vez durante 10' en PBS 0.1 M
4. Bloqueo: Incubar los cortes en una solución de BSA 1x + Tritón 0.1% en PBS, durante 2 hs a T° ambiente
5. Trasvasar los cortes a un well conteniendo el Ac 1° (Goat α -ChAT D 1/1000 en **PBS-Timerosal**). Preparar la sn del ac 1° y volcar el total del contenido distribuido entre los distintos wells. Incubar a 4°C ON.
6. Lavado 3 x 10' en PBS

Etapa 2: Incubación con Anticuerpo Secundario

7. Incubar los cortes conteniendo el AC 2° (α - Goat D 1/500 en **PBS- Timerosal**) durante 2 hs a T° ambiente
8. Lavar 3 x 10' en PBS. **Tener la precaución de RECUPERAR el Ac 2° para su reutilización. Marcar en el eppendorf el uso**

Etapa 3: Amplificación y Revelado de la Inmunofijación

9. Amplificación: Se realiza con el complejo Abidina- Biotina (AB). Éste se prepara 45' antes de ser utilizado, una dilución 1/125 en PBS (8 μ L A + 8 μ L B en 1 ml de PBS). Se prepara lo mínimo por well. Incubar los cortes en el ABC durante 2 hs
10. Lavado 3 x 10' en PBS
11. Lavar 1 x 10' en TB 0.25M
12. Revelado: se realiza con DAB. Agregar 5 μ L de Agua Oxigenada por cada 5 mL de DAB. Volcar la sn de DAB en uno o dos wells y colocar los cortes.
Revelar hasta obtener la mayor relación señal específica/background (aprox 40')
13. Lavar 3 x 10' en TB 0.25M
14. Subir al vidrio, dejar secar, deshidratar y montar

Imunohistoquímica c-Fos y α - ChAT

Todos los pasos se realizan en agitador, a una velocidad de entre 60 y 100.

Etapa 1: Incubación con Anticuerpo Primario

1. Lavar 2 vez durante 10' en PBS 0.1 M.
2. Bloqueo: Incubar los cortes en una solución de **NHS 5%** + Tritón **0.2%** en PBS, durante **3 hs** a Tº ambiente.
3. Trasvasar los cortes a un well conteniendo los Ac 1º (ABE 457 Rabbit c-Fos **1/1500 (LA ULTIMA VEZ HICE 1/2000)**, #2215, Cell Signaling Technology, Beverly, MA; + Goat α - ChAT, D **1/1000**, en **PBS - NHS 1%**). Preparar la sn del ac 1º y volcar el total del contenido distribuido entre los distintos wells. Incubar a 4ºC ON.
4. Lavado 3 x 10' en PBS.

Etapa 2: Incubación con Anticuerpo Secundario α - Goat

5. Incubar los cortes conteniendo el AC 2º (horse α - Goat biotinilado, D **1/400**, en **PBS – NHS 1%**) durante 2 hs a Tº ambiente.
6. Lavar 3 x 10' en PBS.

Etapa 3: Revelado con estreptavidina marcada

7. Incubar los cortes con Estreptavidina – FITC* (verde), D **1/400**, en **PBS 1% NGS 1%** durante 2 hs a Tº ambiente, **bajo el resguardo de la luz.**
8. Lavado 3 x 10' en PBS, **bajo el resguardo de la luz.**

Etapa 4: Incubación con Anticuerpo Secundario α - Rabbit

9. Incubar los cortes con Ac 2º (Goat α - Rabbit – CY3* (rojo), D 1/400) en **PBS – NGS 1%**, durante 2 hs a Tº ambiente, **bajo el resguardo de la luz.**
10. Lavado 3 x 10' en PBS, **bajo el resguardo de la luz.**
11. Subir al vidrio, dejar secar (**solo** necesario para el montado) y montar con Vectashield).
12. Conservar **bajo el resguardo de la luz.**

Inmunohistoquímica α -pS6rp y α - ChAT

Todos los pasos se realizan en agitador, a una velocidad de entre 60 y 100.

Etapa 1: Incubación con Anticuerpo Primario

1. Lavar 2 vez durante 10' en PBS 0.1 M.
2. Bloqueo: Incubar los cortes en una solución de BSA 3% + Tritón 0.1% en PBS, durante 2 hs a Tº ambiente.
3. Trasvasar los cortes a un well conteniendo los Ac 1º (Rabbit α -pS6rp **1/500**, #2215, Cell Signaling Technology, Beverly, MA; + Goat α - ChAT, D **1/1000**, en **PBS - BSA 1%**). Preparar la sn del ac 1º y volcar el total del contenido distribuido entre los distintos wells. Incubar a 4ºC ON.
4. Lavado 3 x 10' en PBS.

Etapa 2: Incubación con Anticuerpo Secundario α - Goat

5. Incubar los cortes conteniendo el AC 2º (horse α - Goat biotilado, D **1/400**, en **PBS – BSA 1%**) durante 2 hs a Tº ambiente.
6. Lavar 3 x 10' en PBS.
- 7.

Etapa 3: Revelado con estreptavidina marcada

8. Incubar los cortes con Estreptavidina – FITC* (verde), D **1/400**, en **PBS 1% NGS** (sin BSA!) durante 2 hs a Tº ambiente, **bajo el resguardo de la luz.**
9. Lavado 3 x 10' en PBS, **bajo el resguardo de la luz.**

Etapa 4: Incubación con Anticuerpo Secundario α - Rabbit

10. Incubar los cortes con Ac 2º (Goat α - Rabbit – CY3* (rojo), D 1/400) en **PBS – NGS 1%**, durante 2 hs a Tº ambiente, **bajo el resguardo de la luz.**
11. Lavado 3 x 10' en PBS, **bajo el resguardo de la luz.**
12. Subir al vidrio, dejar secar (**solo** necesario para el montado) y montar con Vectashield).
13. Conservar **bajo el resguardo de la luz.**

Anexo III – Abreviaturas

ACh: Acetilcolina, por sus nombre en inglés, *acetylcholine*.

ChAT: Colinacetiltransferasa, por sus siglas en inglés, *choline acetyltransferase*.

DA: Dopamina.

DLS: Estriado dorsolateral, por sus siglas en inglés, *dorsolateral striatum*.

DMS: Estriado dorsomedial, por sus siglas en inglés, *dorsomedial striatum*.

DTR: Receptor de toxina diftérica, por sus siglas en inglés, *diphtheria toxin receptor*.

EP: Núcleo entopeduncular.

GB: Ganglios de la base.

GP: Globo pálido.

ICE: Interneuronas colinérgicas estriatales.

IHC: Inmunohistoquímica, por sus siglas en inglés, *immunohistochemistry*.

Laberinto en cruz DS: Laberinto en forma de cruz de dos soluciones.

mPFC: Corteza prefrontal medial (por sus siglas en inglés, *medial prefrontal cortex*).

MP: *Magazine poke*, realizar un hociqueo en el comedero en una tarea en caja operante.

MT: *Magazine training*, sesión de la tarea operante donde se entrena a buscar alimento en el comedero.

NEM: Neuronas espinosas medianas.

NP: *Nose poke*, realizar un hociqueo en un puerto en una caja operante.

PV: Parvalbúmina.

ROI: Área de interés, especialmente utilizado este término en análisis de imágenes (*region of interest*).

SNr: Sustancia negra parte reticulada.

ST: Síndrome de Tourette.

VTA: Área tegmental ventral (por sus siglas en inglés *ventral tegmental area*).

Wt: *wild-type*, genotipo salvaje.

Referencias

A Pennartz, C. M. *et al.* (2009) 'Cortico-striatal Interactions during Learning, Memory Processing, and Decision Making'. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3177-09.2009.

Abergel, F. *et al.* (no date) *Econophysics and sociophysics : recent progress and future directions*.

Abudukeyoumu, N. *et al.* (2019) 'Cholinergic modulation of striatal microcircuits.', *The European journal of neuroscience*, 49(5), pp. 604–622. doi: 10.1111/ejn.13949.

Adriani, W. and Laviola, G. (2003) 'Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: Two behavioral features of adolescence in mice', *Behavioral Neuroscience*, 117(4), pp. 695–703. doi: 10.1037/0735-7044.117.4.695.

Ahmari, S. E. *et al.* (2013) 'Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 340(6137), pp. 1234–1239. doi: 10.1126/science.1234733.

Albin, R. L. (2018) 'Tourette syndrome: A disorder of the social decision-making network', *Brain*. Oxford University Press, pp. 332–347. doi: 10.1093/brain/awx204.

Albin, R. L., Young, A. B. and Penney, J. B. (1989) 'The functional anatomy of basal ganglia disorders', *Trends in Neurosciences*, 12(10), pp. 366–375. doi: 10.1016/0166-2236(89)90074-X.

Aoki, S. *et al.* (2015) 'Role of Striatal Cholinergic Interneurons in Set-Shifting in the Rat', *Journal of Neuroscience*, 35(25), pp. 9424–9431. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0490-15.2015.

Aoki, S. *et al.* (2018) 'Cholinergic interneurons in the rat striatum modulate substitution of habits', *European Journal of Neuroscience*, (January), pp. 1–12. doi: 10.1111/ejn.13820.

Aosaki, T. *et al.* (1994) 'Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(6), pp. 3969–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8207500> (Accessed: 10 February 2015).

Apicella, P. *et al.* (1991) 'Neglect of contralateral visual stimuli in monkeys with unilateral striatal dopamine depletion.', *Behavioural brain research*, 46(2), pp. 187–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1786125> (Accessed: 10 February 2015).

Apicella, P. (2007) 'Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to context recognition.', *Trends in neurosciences*, 30(6), pp. 299–306. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.011.

Apicella, P. *et al.* (2009) 'Tonically active neurons in the striatum differentiate between delivery and omission of expected reward in a probabilistic task context.', *The European journal of neuroscience*, 30(3), pp. 515–26. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06872.x.

Apicella, P. (2017a) 'The role of the intrinsic cholinergic system of the striatum: What have we learned

from TAN recordings in behaving animals?', *Neuroscience*. IBRO, 360, pp. 81–94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.060.

Apicella, P. (2017b) 'The role of the intrinsic cholinergic system of the striatum: What have we learned from TAN recordings in behaving animals?', *Neuroscience*. Elsevier Ltd, pp. 81–94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.060.

Arias-García, M. A. *et al.* (2018) 'Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse.', *Brain structure & function*, 223(3), pp. 1229–1253. doi: 10.1007/s00429-017-1536-6.

Assous, M. *et al.* (2017) 'Differential processing of thalamic information via distinct striatal interneuron circuits.', *Nature communications*, 8, p. 15860. doi: 10.1038/ncomms15860.

Assous, M. and Tepper, J. M. (2018) 'Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry', *European Journal of Neuroscience*, 49(January 2018), pp. 593–603. doi: 10.1111/ejn.13881.

Assous, M. and Tepper, J. M. (2019) 'Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry', *European Journal of Neuroscience*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 593–603. doi: 10.1111/ejn.13881.

Baker, F. B. (1974) 'Stability of two hierarchical grouping techniques case I: Sensitivity to data errors', *Journal of the American Statistical Association*. Taylor & Francis Group, 69(346), pp. 440–445. doi: 10.1080/01621459.1974.10482971.

Balleine, B. and Killcross, S. (1994) 'Effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on instrumental action.', *Behavioural brain research*, 65(2), pp. 181–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7718151> (Accessed: 10 February 2015).

Balleine, B. W., Delgado, M. R. and Hikosaka, O. (2007) 'The role of the dorsal striatum in reward and decision-making.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(31), pp. 8161–5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1554-07.2007.

Balleine, B. W. and Dickinson, A. (1998) 'Goal-directed instrumental action: Contingency and incentive learning and their cortical substrates', *Neuropharmacology*, 37(4–5), pp. 407–419. doi: 10.1016/S0028-3908(98)00033-1.

Balleine, B. W., Liljeholm, M. and Ostlund, S. B. (2009) 'The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning', *Behavioural Brain Research*, 199(1), pp. 43–52. doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.034.

Barbera, G. *et al.* (2016) 'Spatially Compact Neural Clusters in the Dorsal Striatum Encode Locomotion Relevant Information', *Neuron*. Cell Press, 92(1), pp. 202–213. doi: 10.1016/j.neuron.2016.08.037.

Barracough, D. J., Conroy, M. L. and Lee, D. (2004) 'Prefrontal cortex and decision making in a mixed-strategy game', *Nature Neuroscience*, 7(4), pp. 404–410. doi: 10.1038/nn1209.

- Barto, A. G., Sutton, R. S. and Anderson, C. W. (1983) 'Neuronlike Adaptive Elements That Can Solve Difficult Learning Control Problems', *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, SMC-13(5), pp. 834–846. doi: 10.1109/TSMC.1983.6313077.
- Benhamou, L., Kehat, O. and Cohen, D. (2014) 'Firing pattern characteristics of tonically active neurons in rat striatum: context dependent or species divergent?', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(6), pp. 2299–304. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1798-13.2014.
- Bennett, B. D., Callaway, J. C. and Wilson, C. J. (2000) 'Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(22), pp. 8493–503. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069957> (Accessed: 10 February 2015).
- Bennett, B. D. and Wilson, C. J. (1999) 'Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(13), pp. 5586–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377365> (Accessed: 10 February 2015).
- Bertran-Gonzalez, J. *et al.* (2012) 'Striatal Cholinergic Interneurons Display Activity-Related Phosphorylation of Ribosomal Protein S6', *PLoS ONE*, 7(12). doi: 10.1371/journal.pone.0053195.
- Bevan, M. D. (1998) 'Selective innervation of neostriatal interneurons by a subclass of neuron in the globus pallidus of the rat', *Journal of Neuroscience*, 18(22), pp. 9438–9452. doi: 10.1523/jneurosci.18-22-09438.1998.
- Bhatnagar, S. R. *et al.* (2018) 'An analytic approach for interpretable predictive models in high-dimensional data in the presence of interactions with exposures', *Genetic Epidemiology*. Wiley-Liss Inc., 42(3), pp. 233–249. doi: 10.1002/gepi.22112.
- Biever, A. *et al.* (2015) 'PKA-dependent phosphorylation of ribosomal protein S6 does not correlate with translation efficiency in striatonigral and striatopallidal medium-sized spiny neurons', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 35(10), pp. 4113–4130. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3288-14.2015.
- Blazquez, P. M. *et al.* (2002) 'A network representation of response probability in the striatum.', *Neuron*, 33(6), pp. 973–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11906702> (Accessed: 10 February 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(C), pp. 73–88. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61339-4.
- BOLAM, J. P. *et al.* (2000) 'Synaptic organisation of the basal ganglia', *Journal of Anatomy*. Wiley-Blackwell, 196(4), pp. 527–542. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x.
- Bolam, J. P., Wainer, B. H. and Smith, A. D. (1984) 'Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy.', *Neuroscience*, 12(3), pp. 711–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6382048> (Accessed: 10 February 2015).

- Bradfield, L. A. and Balleine, B. W. (2017) 'Thalamic control of dorsomedial striatum regulates internal state to guide goal-directed action selection', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 37(13), pp. 3721–3733. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3860-16.2017.
- Bradshaw, C. M. and Szabadi, E. (1992) 'Choice Between Delayed Reinforcers in a Discrete-trials Schedule: The Effect of Deprivation Level', *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 44(1), pp. 1–16. doi: 10.1080/02724999208250599.
- Breakefield, X. O. *et al.* (2008) 'The pathophysiological basis of dystonias.', *Nature reviews. Neuroscience*. Nature Publishing Group, 9(3), pp. 222–34. doi: 10.1038/nrn2337.
- Brown, M. T. C. *et al.* (2012) 'Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to enhance associative learning.', *Nature*, 492(7429), pp. 452–6. doi: 10.1038/nature11657.
- Burke, D. A., Rotstein, H. G. and Alvarez, V. A. (2017) 'Striatal Local Circuitry: A New Framework for Lateral Inhibition', *Neuron*, 96(2), pp. 267–284. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.019.
- Cabarkapa, S. *et al.* (2019) 'Co-Morbid Obsessive-Compulsive Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Neurobiological Commonalities and Treatment Implications.', *Frontiers in psychiatry*. Frontiers Media S.A., 10(JULY), p. 557. doi: 10.3389/fpsy.2019.00557.
- Cachope, R. *et al.* (2012) 'Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: Setting the tone for reward processing', *Cell Reports*, 2(1), pp. 33–41. doi: 10.1016/j.celrep.2012.05.011.
- Carver, C. S., Scheier, M. F. and Weintraub, J. K. (1989) 'Assessing coping strategies: A theoretically based approach.', *Journal of Personality and Social Psychology*. American Psychological Association (APA), 56(2), pp. 267–283. doi: 10.1037//0022-3514.56.2.267.
- Centonze, D. *et al.* (2003) 'Dopamine, acetylcholine, and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity', *Reviews in the Neurosciences*. Freund Publishing House Ltd, pp. 207–216. doi: 10.1515/REVNEURO.2003.14.3.207.
- Chang, Q. and Gold, P. E. (2003) 'Switching memory systems during learning: Changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats', *Journal of Neuroscience*, 23(7), pp. 3001–3005. doi: 10.1523/jneurosci.23-07-03001.2003.
- Cisek, P. and Kalaska, J. F. (2010) 'Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices.', *Annual review of neuroscience*, 33, pp. 269–98. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135409.
- Cowen, S. L. and Mcnaughton, B. L. (no date) 'Selective Delay Activity in the Medial Prefrontal Cortex of the Rat: Contribution of Sensorimotor Information and Contingency'. doi: 10.1152/jn.00150.2007.
- Cox, J. and Witten, I. B. (2019) 'Striatal circuits for reward learning and decision-making', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 482–494. doi: 10.1038/s41583-019-0189-2.
- Crutcher, M. D. and DeLong, M. R. (1984) 'Single cell studies of the primate putamen. I. Functional organization.', *Experimental brain research*, 53(2), pp. 233–43. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6705861> (Accessed: 10 February 2015).

Cui, G. *et al.* (2014) 'Deep brain optical measurements of cell type-specific neural activity in behaving mice.', *Nature protocols*, 9(6), pp. 1213–28. doi: 10.1038/nprot.2014.080.

Dautan, D. *et al.* (2014) 'A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the Brainstem', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 34(13), pp. 4509–4518. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5071-13.2014.

Dayan, P. and Balleine, B. W. (2002) 'Reward, motivation, and reinforcement learning', *Neuron*. Cell Press, pp. 285–298. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00963-7.

DeBoer, P., Heeringa, M. J. and Abercrombie, E. D. (1996) 'Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors.', *European journal of pharmacology*, 317(2–3), pp. 257–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8997608> (Accessed: 12 February 2015).

Deng, P., Zhang, Y. and Xu, Z. C. (2007) 'Involvement of I(h) in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(12), pp. 3148–56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5535-06.2007.

Dimova, R. *et al.* (1993) 'Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum.', *Neuroscience*, 53(4), pp. 1059–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685068> (Accessed: 10 February 2015).

Ding, J. B. *et al.* (2010) 'Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons', *Neuron*, 67(2), pp. 294–307. doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.017.

Doig, N. M., Moss, J. and Bolam, J. P. (2010) 'Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(44), pp. 14610–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1623-10.2010.

Durstewitz, D. *et al.* (2010) 'Abrupt transitions between prefrontal neural ensemble states accompany behavioral transitions during rule learning', *Neuron*, 66(3), pp. 438–448. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.029.

Escande, M. V *et al.* (2016) 'Loss of Homeostasis in the Direct Pathway in a Mouse Model of Asymptomatic Parkinson's Disease.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(21), pp. 5686–98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0492-15.2016.

File, S. E. (1983) 'Variability in behavioral responses to benzodiazepines in the rat', in *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, pp. 303–306. doi: 10.1016/0091-3057(83)90383-0.

Flaherty, A. W. and 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.

- De Franceschi, G. *et al.* (2016) 'Vision Guides Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice', *Current Biology*. Elsevier Ltd., 26(16), pp. 2150–2154. doi: 10.1016/j.cub.2016.06.006.
- 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.
- Frank, M. J., Loughry, B. and O'Reilly, R. C. (2001) 'Interactions between frontal cortex and basal ganglia in working memory: A computational model', *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*. Psychonomic Society Inc., pp. 137–160. doi: 10.3758/CABN.1.2.137.
- Gaiddon, C., De Tapia, M. and Loeffler, J. P. (1999) 'The tissue-specific transcription factor Pit-1/GHF-1 binds to the c-fos serum response element and activates c-fos transcription', *Molecular Endocrinology*. Endocrine Society, 13(5), pp. 742–751. doi: 10.1210/mend.13.5.0275.
- Galili, T. (2015) 'dendextend: An R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 31(22), pp. 3718–3720. doi: 10.1093/bioinformatics/btv428.
- Galvan, L. *et al.* (2012) 'Functional differences between direct and indirect striatal output pathways in Huntington's disease', *Journal of Huntington's Disease*. IOS Press, pp. 17–25. doi: 10.3233/JHD-2012-120009.
- 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: 28 January 2015).
- Gerfen, C. R. and Surmeier, D. J. (2011) 'Modulation of striatal projection systems by dopamine.', *Annual review of neuroscience*, 34, pp. 441–66. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113641.
- Goldberg, J. A., Ding, J. B. and Surmeier, D. J. (2012) 'Muscarinic modulation of striatal function and circuitry', *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 223–241. doi: 10.1007/978-3-642-23274-9_10.
- Goldberg, J. A. and Reynolds, J. N. J. (2011) 'Spontaneous firing and evoked pauses in the tonically active cholinergic interneurons of the striatum.', *Neuroscience*, 198, pp. 27–43. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.067.
- Golden, S. A. *et al.* (2017) 'Compulsive Addiction-like Aggressive Behavior in Mice', *Biological Psychiatry*. Elsevier USA, 82(4), pp. 239–248. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.03.004.
- Gonzales, K. K. and Smith, Y. (2015) 'Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1349, pp. 1–45. doi: 10.1111/nyas.12762.
- Graybiel, A. M. (2005) 'The basal ganglia: learning new tricks and loving it.', *Current opinion in neurobiology*, 15(6), pp. 638–44. doi: 10.1016/j.conb.2005.10.006.
- Graybiel, A. M. (2008) 'Habits, rituals, and the evaluative brain.', *Annual review of neuroscience*, 31, pp.

359–87. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851.

Grofová, I. (1979) 'Extrinsic Connections of the Neostriatum', in *The Neostriatum*. Elsevier, pp. 37–51. doi: 10.1016/b978-0-08-023174-7.50007-2.

Gruner, P. and Pittenger, C. (2017) 'Cognitive inflexibility in Obsessive-Compulsive Disorder', *Neuroscience*. Elsevier Ltd, pp. 243–255. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.07.030.

Gurney, K., Prescott, T. J. and Redgrave, P. (2001) 'A computational model of action selection in the basal ganglia. I. A new functional anatomy', *Biological Cybernetics*. Springer Verlag, 84(6), pp. 401–410. doi: 10.1007/PL00007984.

Haber, S. N. (2003) 'The primate basal ganglia: parallel and integrative networks.', *Journal of chemical neuroanatomy*, 26(4), pp. 317–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729134> (Accessed: 29 January 2015).

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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0271-06.2006.

Haber, S. N. and 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. doi: 10.1038/npp.2009.129.

Halcomb, M. E., Gould, T. D. and Grahame, N. J. (2013) 'Lithium, but not valproate, reduces impulsive choice in the delay-discounting task in mice', *Neuropsychopharmacology*, 38(10), pp. 1937–1944. doi: 10.1038/npp.2013.89.

Harrison, F. E. *et al.* (2006) 'Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze', *Learning and Memory*, 13(6), pp. 809–819. doi: 10.1101/lm.334306.

Hart, G., Leung, B. K. and Balleine, B. W. (2014) 'Dorsal and ventral streams: the distinct role of striatal subregions in the acquisition and performance of goal-directed actions.', *Neurobiology of learning and memory*, 108, pp. 104–18. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.003.

Hersch, S. M. *et al.* (1995) 'Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents', *Journal of Neuroscience*, 15(7 II), pp. 5222–5237. doi: 10.1523/jneurosci.15-07-05222.1995.

Hicks, L. H. (1964) 'Effects of Overtraining on Acquisition and Reversal of Place and Response Learning', *Psychological Reports*, 15(2), pp. 459–462. doi: 10.2466/pr0.1964.15.2.459.

Hikosaka, O. (1998) 'Neural systems for control of voluntary action - A hypothesis', *Advances in Biophysics*. Japan Scientific Societies Press, pp. 81–102. doi: 10.1016/S0065-227X(98)80004-X.

Hilgard, E. R. (Ernest R., Atkinson, R. C. and Atkinson, R. L. (1975) *Introduction to psychology*. Harcourt Brace Jovanovich.

- Holland, P. C. (2008) 'Cognitive versus stimulus-response theories of learning', *Learning and Behavior*, 36(3), pp. 227–241. doi: 10.3758/LB.36.3.227.
- Houk, J. . *et al.* (2007) 'Action selection and refinement in subcortical loops through basal ganglia and cerebellum', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1485), pp. 1573–1583. doi: 10.1098/rstb.2007.2063.
- Humphries, M. D., Stewart, R. D. and Gurney, K. N. (2006) 'A physiologically plausible model of action selection and oscillatory activity in the basal ganglia', *Journal of Neuroscience*, 26(50), pp. 12921–12942. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3486-06.2006.
- Hunnicutt, B. J. *et al.* (2016) 'A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization', *eLife*. eLife Sciences Publications Ltd, 5(November2016). doi: 10.7554/eLife.19103.
- Hyman, S. E., Malenka, R. C. and Nestler, E. J. (2006) 'NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory', *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews, 29(1), pp. 565–598. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009.
- Inokawa, H. *et al.* (2010) 'Juxtacellular labeling of tonically active neurons and phasically active neurons in the rat striatum.', *Neuroscience*, 168(2), pp. 395–404. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.062.
- Jin, X., Tecuapetla, F. and Costa, R. M. (2014) 'Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences', *Nature Neuroscience*, 17(3), pp. 423–430. doi: 10.1038/nn.3632.
- Joel, D., Weiner, I. and Feldon, J. (1997) 'Electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex in rats disrupt performance on an analog of the Wisconsin Card Sorting Test, but do not disrupt latent inhibition: implications for animal models of schizophrenia.', *Behavioural brain research*, 85(2), pp. 187–201. doi: 10.1016/s0166-4328(97)87583-3.
- Johansen, J. A., Clemens, L. G. and Nunez, A. A. (2008) 'Characterization of copulatory behavior in female mice: evidence for paced mating.', *Physiology & behavior*, 95(3), pp. 425–9. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.07.004.
- Johnson, A., van der Meer, M. A. and Redish, A. D. (2007) 'Integrating hippocampus and striatum in decision-making', *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 692–697. doi: 10.1016/j.conb.2008.01.003.
- Kaneko, S. *et al.* (2000) 'Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function.', *Science (New York, N.Y.)*, 289(5479), pp. 633–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915629> (Accessed: 10 February 2015).
- 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. doi: 10.1002/cne.22206.
- Kattsoff, L. O. (1945) 'C. L. Hull. Principles of Behavior .', *The Journal of General Psychology*. Informa UK Limited, 33(2), pp. 293–299. doi: 10.1080/00221309.1945.10544514.

- Kawaguchi, Y. *et al.* (1995) 'Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization.', *Trends in neurosciences*, 18(12), pp. 527–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638293> (Accessed: 10 February 2015).
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J. and Emson, P. C. (1990) 'Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(10), pp. 3421–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1698947> (Accessed: 10 February 2015).
- Kemp, J. M. and Powell, T. P. (1971) 'The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 262(845), pp. 441–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4399123> (Accessed: 25 January 2015).
- Kepecs, A. *et al.* (2008) 'Neural correlates, computation and behavioural impact of decision confidence', *Nature*, 455(7210), pp. 227–231. doi: 10.1038/nature07200.
- Kesby, J. P. *et al.* (2015) 'Spatial cognition in adult and aged mice exposed to high-fat diet', *PLoS ONE*, 10(10), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0140034.
- Kimura, H. *et al.* (1980) 'Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry', *Science*, 208(4447), pp. 1057–1059. doi: 10.1126/science.6990490.
- Kimura, M., Rajkowski, J. and Evarts, E. (1984) 'Tonically discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(15), pp. 4998–5001. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=391620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (Accessed: 10 February 2015).
- Kitabatake, Y. *et al.* (2003) 'Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), pp. 7965–70. doi: 10.1073/pnas.1032899100.
- Klaus, A., Alves da Silva, J. and Costa, R. M. (2019) 'What, If, and When to Move: Basal Ganglia Circuits and Self-Paced Action Initiation', *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews, 42(1), pp. 459–483. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031033.
- Knight, Z. A. *et al.* (2012) 'Molecular profiling of activated neurons by phosphorylated ribosome capture', *Cell*. NIH Public Access, 151(5), pp. 1126–1137. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.039.
- Koppe, G. *et al.* (2017) 'CACNA1C gene regulates behavioral strategies in operant rule learning', *PLoS Biology*, 15(6), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.pbio.2000936.
- Laplante, F. *et al.* (2012) 'Cholinergic depletion in nucleus accumbens impairs mesocortical dopamine activation and cognitive function in rats', *Neuropharmacology*, 63(6), pp. 1075–1084. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.033.
- Lapper, S. R. and Bolam, J. P. (1992) 'Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to

- cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat.', *Neuroscience*, 51(3), pp. 533–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1488113> (Accessed: 10 February 2015).
- Lenington, J. B. *et al.* (2014) 'Transcriptome Analysis of the Human Striatum in Tourette Syndrome.', *Biological psychiatry*. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.018.
- De Leonibus, E., Oliverio, A. and Mele, A. (2005) 'A study on the role of the dorsal striatum and the nucleus accumbens in allocentric and egocentric spatial memory consolidation', *Learning and Memory*, 12(5), pp. 491–503. doi: 10.1101/lm.94805.
- Lester, D. B., Rogers, T. D. and Blaha, C. D. (2010) 'Acetylcholine-Dopamine Interactions in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders', *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 16(3), pp. 137–162. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00142.x.
- Liljeholm, M. and O'Doherty, J. P. (2012) 'contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: An associative account', *Trends in Cognitive Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 467–475. doi: 10.1016/j.tics.2012.07.007.
- Lister, R. G. (1987) 'The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.', *Psychopharmacology*, 92(2), pp. 180–5. doi: 10.1007/bf00177912.
- Madisen, L. *et al.* (2010) 'A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain.', *Nature neuroscience*, 13(1), pp. 133–40. doi: 10.1038/nn.2467.
- Mahon, S., Deniau, J. M. and 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.
- Malagon-Vina, H. *et al.* (2018) 'Fluid network dynamics in the prefrontal cortex during multiple strategy switching', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 9(1). doi: 10.1038/s41467-017-02764-x.
- Mar, A. C. and Robbins, T. W. (2007) 'Delay Discounting and Impulsive Choice in the Rat', *Current Protocols in Neuroscience*, 39(1). doi: 10.1002/0471142301.ns0822s39.
- Martos, Y. V *et al.* (2017) 'Compulsive Social Behavior Emerges after Selective Ablation of Striatal Cholinergic Interneurons', 37(11), pp. 2849–2858. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3460-16.2017.
- Matamales, M. *et al.* (2016) 'Aging-Related Dysfunction of Striatal Cholinergic Interneurons Produces Conflict in Action Selection', *Neuron*. Cell Press, 90(2), pp. 362–373. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.006.
- Matamales, M., Götz, J. and Bertran-Gonzalez, J. (2016) 'Quantitative imaging of cholinergic interneurons reveals a distinctive spatial organization and a functional gradient across the mouse striatum', *PLoS ONE*, 11(6), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0157682.
- Matsumoto, N. *et al.* (1999) 'Nigrostriatal Dopamine System in Learning to Perform Sequential Motor Tasks in a Predictive Manner', *Journal of Neurophysiology*. American Physiological Society, 82(2), pp. 978–998. doi: 10.1152/jn.1999.82.2.978.

- Matsumoto, N. *et al.* (2001) 'Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events.', *Journal of neurophysiology*, 85(2), pp. 960–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160526> (Accessed: 10 February 2015).
- McDonald, R. J. and White, N. M. (1994) 'Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus', *Behavioral and Neural Biology*, 61(3), pp. 260–270. doi: 10.1016/S0163-1047(05)80009-3.
- McIntyre, C. K., Marriott, L. K. and Gold, P. E. (2003) 'Cooperation between memory systems: Acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task', *Behavioral Neuroscience*, 117(2), pp. 320–326. doi: 10.1037/0735-7044.117.2.320.
- Mehta, C. R. and Senchaudhuri, P. (2003) *Conditional versus Unconditional Exact Tests for Comparing Two Binomials*.
- Middei, S. *et al.* (2004) 'Preserved fronto-striatal plasticity and enhanced procedural learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease overexpressing mutant hAPPswe', *Learning and Memory*, 11(4), pp. 447–452. doi: 10.1101/lm.80604.
- Milner, B. (1963) 'Effects of Different Brain Lesions on Card Sorting: The Role of the Frontal Lobes', *Archives of Neurology*, 9(1), pp. 90–100. doi: 10.1001/archneur.1963.00460070100010.
- Mink, J. W. (1996) 'The basal ganglia: Focused selection and inhibition of competing motor programs', *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 50(4), pp. 381–425. doi: 10.1016/S0301-0082(96)00042-1.
- Mintzberg, H. (1987) 'The Strategy Concept I: Five Ps for Strategy', *California Management Review*, 30(1), pp. 11–24. doi: 10.2307/41165263.
- Mitchell, S. H. (no date) 'Assessing delay discounting in mice'. doi: 10.1002/0471142301.ns0830s66.
- Mogenson, G. J., Jones, D. L. and Yim, C. Y. (1980) 'From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system.', *Progress in neurobiology*, 14(2–3), pp. 69–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6999537> (Accessed: 12 January 2015).
- Morand-Beaulieu, S. *et al.* (2017) 'A review of the neuropsychological dimensions of tourette syndrome', *Brain Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/brainsci7080106.
- Morris, G. *et al.* (2004) 'Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons.', *Neuron*, 43(1), pp. 133–43. doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.012.
- Murphy, E. S. and Lupfer, G. J. (2014) 'Basic Principles of Operant Conditioning', in *The Wiley Blackwell Handbook of Operant and Classical Conditioning*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 165–194. doi: 10.1002/9781118468135.ch8.
- N.J., F. *et al.* (2017) 'Basal ganglia structure in Tourette's disorder and/or attention-deficit/hyperactivity disorder', *Movement Disorders*, 32(4), pp. 601–604. doi: 10.1002/mds.26849 LK - <http://sfx.aub.aau.dk/sfxaub?sid=EMBASE&issn=15318257&id=doi:10.1002%2Fmds.26849&atitle=Basal+ganglia+structure+in+Tourette%27s+disorder+and%2For+attention->

deficit%2Fhyperactivity+disorder&stitle=Mov.+Disord.&title=Movement+Disorders&volume=32&issue=4
&spage=601&epage=604&aulast=Forde&aufirst=Natalie+J.&aunit=N.J.&aufull=Forde+N.J.&coden=MOV
DE&isbn=&pages=601-604&date=2017&aunit1=N&aunitm=J.

Nambu, A., Tokuno, H. and Takada, M. (2002) 'Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal "hyperdirect" pathway', *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd, 43(2), pp. 111–117. doi: 10.1016/S0168-0102(02)00027-5.

Natsubori, A. *et al.* (2017) 'Ventrolateral striatal medium spiny neurons positively regulate food-incentive, goal-directed behavior independently of D1 and D2 selectivity', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 37(10), pp. 2723–2733. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017.

Nowak, M. and Sigmund, K. (1993) 'A strategy of win-stay, lose-shift that outperforms tit-for-tat in the Prisoner's Dilemma game', *Nature*, 364(6432), pp. 56–58. doi: 10.1038/364056a0.

O'Leary, T. P. and Brown, R. E. (2013) 'Optimization of apparatus design and behavioral measures for the assessment of visuo-spatial learning and memory of mice on the Barnes maze', *Learning and Memory*, 20(2), pp. 85–96. doi: 10.1101/lm.028076.112.

Okada, K. *et al.* (2014) 'Enhanced flexibility of place discrimination learning by targeting striatal cholinergic interneurons.', *Nature communications*, 5, p. 3778. doi: 10.1038/ncomms4778.

Online, R. and Dolnicar, S. (2002) *A Review of Unquestioned Standards in Using Cluster Analysis for Data-Driven Market Segmentation*. Available at: <http://ro.uow.edu.au/commpapers/273> (Accessed: 5 February 2020).

Ouimet, C. C., Langley-Gullion, K. C. and Greengard, P. (1998) 'Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen.', *Brain research*, 808(1), pp. 8–12. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00724-0.

Packard, M. G. and Mcgaugh, J. L. (1996) *Inactivation of Hippocampus or Caudate Nucleus with Lidocaine Differentially Affects Expression of Place and Response Learning*, *NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY*.

Pasupathy, A. and Miller, E. K. (2005) 'Different time courses of learning-related activity in the prefrontal cortex and striatum', *Nature*, 433(7028), pp. 873–876. doi: 10.1038/nature03287.

Paxinos, G. and Franklin, K. B. J. (no date) *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates*.

Penner, M. R. and Mizumori, S. J. Y. (2012) 'Neural systems analysis of decision making during goal-directed navigation', *Progress in Neurobiology*, pp. 96–135. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.08.010.

Phelps, P. E., Houser, C. R. and Vaughn, J. E. (1985) 'Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses.', *The Journal of comparative neurology*, 238(3), pp. 286–307. doi: 10.1002/cne.902380305.

- Pisani, A. *et al.* (2007) 'Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders.', *Trends in neurosciences*, 30(10), pp. 545–53. doi: 10.1016/j.tins.2007.07.008.
- Pittenger, C. *et al.* (2006) 'Impaired bidirectional synaptic plasticity and procedural memory formation in striatum-specific cAMP response element-binding protein-deficient mice', *Journal of Neuroscience*, 26(10), pp. 2808–2813. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5406-05.2006.
- Pompl, P. N. *et al.* (1999) 'Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: Use in detecting cognitive impairment in the APP(sw) transgenic mouse model for Alzheimer's disease', *Journal of Neuroscience Methods*, 87(1), pp. 87–95. doi: 10.1016/S0165-0270(98)00169-1.
- Prensa, L. and Parent, A. (2001) 'The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), pp. 7247–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549735> (Accessed: 10 February 2015).
- Ragozzino, M. E. *et al.* (2009) 'Acetylcholine activity in selective striatal regions supports behavioral flexibility.', *Neurobiology of learning and memory*, 91(1), pp. 13–22. doi: 10.1016/j.nlm.2008.09.008.
- Rapanelli, M., Frick, L. R. and Pittenger, C. (2017) 'The Role of Interneurons in Autism and Tourette Syndrome', *Trends in Neurosciences*, 40(7), pp. 397–407. doi: 10.1016/j.tins.2017.05.004.
- Raz, A. *et al.* (1996) 'Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates.', *Journal of neurophysiology*, 76(3), pp. 2083–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890317> (Accessed: 10 February 2015).
- Redgrave, P., Prescott, T. J. and Gurney, K. (1999) 'The basal ganglia: A vertebrate solution to the selection problem?', *Neuroscience*. Elsevier Ltd, pp. 1009–1023. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00319-4.
- Reynolds, J. N. J., Hyland, B. I. and Wickens, J. R. (2004) 'Modulation of an afterhyperpolarization by the substantia nigra induces pauses in the tonic firing of striatal cholinergic interneurons', *Journal of Neuroscience*, 24(44), pp. 9870–9877. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3225-04.2004.
- Rich, E. L. and Shapiro, M. (2009) 'Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches', *Journal of Neuroscience*, 29(22), pp. 7208–7219. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6068-08.2009.
- Robbins, T. W. (2002) 'The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry.', *Psychopharmacology*, 163(3–4), pp. 362–80. doi: 10.1007/s00213-002-1154-7.
- Rousseeuw, P. J. (1987) 'Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis', *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20(C), pp. 53–65. doi: 10.1016/0377-0427(87)90125-7.
- Rueda-Orozco, P. E. *et al.* (2008) 'A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats', *Psychopharmacology*, 198(4), pp. 565–576. doi: 10.1007/s00213-007-0911-z.
- Sardo, P. *et al.* (2000) 'Influence of the predicted time of stimuli eliciting movements on responses of

- tonically active neurons in the monkey striatum', *European Journal of Neuroscience*, 12(5), pp. 1801–1816. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00068.x.
- Sarkisyan, G. and Hedlund, P. B. (2009) 'The 5-HT7 receptor is involved in allocentric spatial memory information processing', *Behavioural Brain Research*, 202(1), pp. 26–31. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.011.
- Saunders, A. *et al.* (2015) 'A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex', *Nature*. Nature Publishing Group, 521(7550), pp. 85–89. doi: 10.1038/nature14179.
- Scheier, M. F., Weintraub, J. K. and Carver, C. S. (1986) 'Coping with stress: divergent strategies of optimists and pessimists.', *Journal of personality and social psychology*, 51(6), pp. 1257–64. doi: 10.1037//0022-3514.51.6.1257.
- Schreiweis, C. *et al.* (2014) 'Humanized Foxp2 accelerates learning by enhancing transitions from declarative to procedural performance', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(39), pp. 14253–14258. doi: 10.1073/pnas.1414542111.
- Schultz, W. (2002) 'Getting formal with dopamine and reward', *Neuron*. Cell Press, pp. 241–263. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00967-4.
- Schultz, W., Dayan, P. and 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: 5 January 2015).
- Schulz, J. M., Oswald, M. J. and Reynolds, J. N. J. (2011) 'Visual-induced excitation leads to firing pauses in striatal cholinergic interneurons', *Journal of Neuroscience*, 31(31), pp. 11133–11143. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0661-11.2011.
- Seo, M., Lee, E. and Averbeck, B. B. (2012) 'Action Selection and Action Value in Frontal-Striatal Circuits', *Neuron*, 74(5), pp. 947–960. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.037.
- Shin, J. H. *et al.* (2015) 'Muscarinic regulation of dopamine and glutamate transmission in the nucleus accumbens', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(26), pp. 8124–8129. doi: 10.1073/pnas.1508846112.
- Smith, Y. *et al.* (2004) 'The thalamostriatal system: A highly specific network of the basal ganglia circuitry', *Trends in Neurosciences*, pp. 520–527. doi: 10.1016/j.tins.2004.07.004.
- Spence, K. W. (1950) 'Cognitive versus stimulus-response theories of learning', *Psychological Review*, 57(3), pp. 159–172. doi: 10.1037/h0058250.
- Stalnaker, T. A. *et al.* (2016) 'Cholinergic Interneurons Use Orbitofrontal Input to Track Beliefs about Current State', *Journal of Neuroscience*, 36(23), pp. 6242–6257. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0157-16.2016.
- Steiner, H. and Tseng, K.-Y. (2010) *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Elsevier.
- Straub, C. *et al.* (2016) 'Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum.',

- Neuron*, 92(1), pp. 84–92. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.007.
- Sullivan, M. A., Chen, H. and Morikawa, H. (2008) 'Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(35), pp. 8682–90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2411-08.2008.
- Sunyer, B. *et al.* (2007) 'Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice', *Protocol Exchange*. Springer Nature. doi: 10.1038/nprot.2007.390.
- Surmeier, D. J., Song, W. J. and Yan, Z. (1996) 'Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons', *Journal of Neuroscience*, 16(20), pp. 6579–6591. doi: 10.1523/jneurosci.16-20-06579.1996.
- Sutton, R. S. and Barto, A. G. (1998) 'Reinforcement Learning: An Introduction', *IEEE Transactions on Neural Networks*. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 9(5), pp. 1054–1054. doi: 10.1109/tnn.1998.712192.
- Szczepanski, S. M. and Knight, R. T. (2014) 'Insights into Human Behavior from Lesions to the Prefrontal Cortex', *Neuron*. Cell Press, pp. 1002–1018. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.011.
- Tedford, S. E., Persons, A. L. and Napier, T. C. (2015) 'Dopaminergic lesions of the dorsolateral striatum in rats increase delay discounting in an impulsive choice task', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(4). doi: 10.1371/journal.pone.0122063.
- Tepper, J. M. *et al.* (2010) 'Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons', *Frontiers in Neuroanatomy*. doi: 10.3389/fnana.2010.00150.
- Thiébot, M. H. *et al.* (1985) 'Benzodiazepines reduce the tolerance to reward delay in rats.', *Psychopharmacology*, 86(1–2), pp. 147–52. doi: 10.1007/bf00431700.
- Thomas, T. M. *et al.* (2000) 'Cortical inputs to m2-immunoreactive striatal interneurons in rat and monkey.', *Synapse (New York, N.Y.)*, 37(4), pp. 252–61. doi: 10.1002/1098-2396(20000915)37:4<252::AID-SYN2>3.0.CO;2-A.
- Thorndike, E. L. (1911) *Animal intelligence; experimental studies*. New York,: The Macmillan Company,. doi: 10.5962/bhl.title.55072.
- Threlfell, S. *et al.* (2012) 'Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons', *Neuron*, 75(1), pp. 58–64. doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.038.
- Tibshirani, R., Walther, G. and Hastie, T. (no date) *Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic*.
- Tirapu, J. *et al.* (2008) *Modelos de funciones y control ejecutivo (I)*, *REV NEUROL*.
- Tolman, E. C. (1948) 'Cognitive maps in rats and men', *Psychological Review*, 55(4), pp. 189–208. doi: 10.1037/h0061626.

- 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.
- Tzavos, A., Jih, J. and Ragozzino, M. E. (2004) 'Differential effects of M1 muscarinic receptor blockade and nicotinic receptor blockade in the dorsomedial striatum on response reversal learning.', *Behavioural brain research*, 154(1), pp. 245–53. doi: 10.1016/j.bbr.2004.02.011.
- Valjent, E. *et al.* (2011) 'Haloperidol regulates the state of phosphorylation of ribosomal protein S6 via activation of PKA and phosphorylation of DARPP-32', *Neuropsychopharmacology*, 36(12), pp. 2561–2570. doi: 10.1038/npp.2011.144.
- 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: 10 February 2015).
- Voorn, P. *et al.* (2004) 'Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum', *Trends in Neurosciences*, pp. 468–474. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.006.
- Vorhees, C. V. and Williams, M. T. (2014) 'Assessing spatial learning and memory in rodents', *ILAR Journal*. Oxford University Press, 55(2), pp. 310–332. doi: 10.1093/ilar/ilu013.
- Wilson, C. J. (1993) 'The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons', *Progress in Brain Research*, 99(C), pp. 277–297. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61352-7.
- Wilson, C. J., Chang, H. T. and Kitai, S. T. (1990) 'Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum', *Journal of Neuroscience*, 10(2), pp. 508–519. doi: 10.1523/jneurosci.10-02-00508.1990.
- Winstanley, C. A., Eagle, D. M. and Robbins, T. W. (2006) 'Behavioral models of impulsivity in relation to ADHD: translation between clinical and preclinical studies.', *Clinical psychology review*, 26(4), pp. 379–95. doi: 10.1016/j.cpr.2006.01.001.
- Witten, I. B. *et al.* (2010) 'Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning.', *Science (New York, N.Y.)*, 330(6011), pp. 1677–81. doi: 10.1126/science.1193771.
- Xu, M. *et al.* (no date) 'Targeted ablation of cholinergic interneurons in the dorsolateral striatum produces behavioral manifestations of Tourette syndrome'. doi: 10.1073/pnas.1419533112.
- Yamada, H. *et al.* (2016) 'Characteristics of fast-spiking neurons in the striatum of behaving monkeys', *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd, 105, pp. 2–18. doi: 10.1016/j.neures.2015.10.003.
- Yarom, O. and Cohen, D. (2011) 'Putative cholinergic interneurons in the ventral and dorsal regions of the striatum have distinct roles in a two choice alternative association task.', *Frontiers in systems neuroscience*, 5, p. 36. doi: 10.3389/fnsys.2011.00036.
- Yin, H. H. *et al.* (2005) 'The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning.', *The European*

journal of neuroscience, 22(2), pp. 513–23. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x.

Yin, H. H. *et al.* (2009) 'Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill.', *Nature neuroscience*, 12(3), pp. 333–41. doi: 10.1038/nn.2261.

Yin, H. H. and Knowlton, B. J. (2006) 'The role of the basal ganglia in habit formation.', *Nature reviews Neuroscience*, 7(6), pp. 464–76. doi: 10.1038/nrn1919.

Yin, H. H., Knowlton, B. J. and Balleine, B. W. (2004) 'Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning.', *The European journal of neuroscience*, 19(1), pp. 181–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14750976> (Accessed: 12 February 2015).

Yin, H. H., Knowlton, B. J. and Balleine, B. W. (2005) 'Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning.', *The European journal of neuroscience*, 22(2), pp. 505–12. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04219.x.

Zhang, Y.-F. and Cragg, S. J. (2017) 'Pauses in Striatal Cholinergic Interneurons: What is Revealed by Their Common Themes and Variations?', *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11(October), pp. 1–8. doi: 10.3389/fnsys.2017.00080.