



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Modulación mediada por recompensas de la actividad neuronal de la banda diagonal de Broca y la corteza visual primaria

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Lic. María Florencia Santos

Directora de tesis: Dra. Camila Lidia Zold

Consejera de estudios: Dra. Haydée Viola

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO, UBA-CONICET)

Buenos Aires, 2025

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN.....	9
I.1. Principios del aprendizaje asociativo.....	9
I.1.A. Aprendizaje de tipo clásico o Pavloviano	10
I.1.B. Aprendizaje de tipo operante o instrumental	11
I.1.C. Aprendizaje por refuerzo (<i>reinforcement learning</i>).....	12
I.1.D. Error de predicción de recompensas: sistema dopaminérgico	15
I.2. Plasticidad sináptica y neuromoduladores	19
I.3. Plasticidad sináptica en cortezas sensoriales primarias	21
I.4. Corteza visual primaria	24
I.4.A. Generalidades.....	24
I.4.B. Plasticidad dependiente de experiencia.....	26
I.4.B.I. Plasticidad durante el desarrollo postnatal: período crítico	26
I.4.B.II. Plasticidad dependiente de la experiencia en V1 durante la adultez.....	27
I.5. <i>Basal Forebrain</i>	34
I.5.A. Núcleos que lo componen y conectividad.....	34
I.5.B. Funciones	37
I.5.B.I. Rol en procesos de sueño, vigilia y atención	38
I.5.B.II. Rol en procesos de plasticidad cortical, aprendizaje y memoria	38
I.5.B.III. Rol de la acetilcolina en la plasticidad sináptica en V1	42
OBJETIVOS	44
MATERIALES Y MÉTODOS	46
M.1. Animales	46
M.2. Restricción de agua.....	46
M.3. Tarea conductual	47
M.4. Microdispositivo para el registro de la señal electrofisiológica	49
M.5. Cirugía estereotáxica para implantar los multielectrodos	51
M.6. Determinación de coordenadas del principal núcleo del BF que proyecta a V1.	
Inyección de marcador retrógrado y ensayo de inmunohistoquímica	52
M.7. Registros electrofisiológicos	55
M.8. Registros conductuales.....	55
M.9. Análisis de datos	56
M.9.A. Análisis del comportamiento: parámetros comportamentales.....	56
M.9.B. Análisis de la señal electrofisiológica	57
M.9.B.I. Detección y clasificación de los potenciales de acción	58
M.9.B.II. Análisis de la actividad neuronal	60
M.10. Estadística	65
M.11. Histología	66
RESULTADOS	68

R.1. Resultados conductuales: desempeño comportamental durante el aprendizaje de una tarea de condicionamiento operante recompensada	69
R.2. El aprendizaje de la tarea comportamental utilizada en esta tesis es capaz de generar en V1 la señal de expectativa temporal a la recompensa.....	77
R.3. El núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca es el principal núcleo del BF que proyecta a V1	84
R.4. Actividad neuronal del HDB durante el aprendizaje de una tarea de condicionamiento operante recompensada	87
R.4.A. Las neuronas del HDB codifican el estímulo visual en ambas etapas del entrenamiento	88
R.4.B. La codificación de la recompensa no se modifica con el aprendizaje	96
R.4.C. Las neuronas del HDB codifican la omisión de la recompensa, y la proporción de células que lo hace aumenta con el aprendizaje	104
R.4.D. Las neuronas del HDB podrían estar codificando un error de predicción de recompensas	113
R.4.E. Señal de expectativa temporal a la recompensa en HDB	117
DISCUSIÓN	125
D.1. Adaptación del protocolo comportamental a una condición <i>head-fixed</i>	125
D.2. El protocolo comportamental en animales <i>head-fixed</i> logra replicar la actividad de expectativa temporal en las neuronas de V1	127
D.3. Propiedades de codificación del HDB durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada	129
D.3.A. Respuestas de corta duración al estímulo visual	130
D.3.B. Codificación de recompensas y su omisión.....	132
D.3.C. Señal de expectativa temporal a la recompensa en HDB	135
D.3.D. ¿Son colinérgicas las neuronas del HDB descritas en esta tesis?	139
CONCLUSIÓN.....	141
BIBLIOGRAFÍA	142

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas y todos quienes me acompañaron, ayudaron e hicieron que este camino de doctorado fuera posible y, sobre todo, disfrutable:

A los animales que participaron en este estudio, pilares fundamentales sobre los que se construye la ciencia.

A mi directora, por su infinita paciencia a lo largo de estos años, por guiarme y por enseñarme todo lo que sé sobre este mundo tan desafiante como fascinante que es la electrofisiología.

A mis compañeros y amigos del GNS. En especial, al grupo Junín, a los de siempre y a quienes siguieron firmes estos últimos años. Un agradecimiento especial a Javi, por haberse convertido en un gran amigo, y ayudarme en todo momento (sobre todo con los códigos de Matlab). Al Chino, por tantas tardes de música y aguante. A Agos, por escucharme y acompañarme siempre que estuve estresada, por ser mi compañera de escritura y alimentarme tan rico siempre.

A Vale y Lula, por la amistad que empezó en la facultad y sigue hasta hoy.

A mis amigas de toda la vida, por bancarme en todas y estar siempre cerca, incluso en la distancia.

A mi familia, por estar siempre.

A Juani, por ser mi compañero de vida y por su amor incondicional.

Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires, por el apoyo institucional que hizo posible esta investigación.

RESUMEN

Título: **“Modulación mediada por recompensas de la actividad neuronal de la banda diagonal de Broca y la corteza visual primaria”**

La corteza visual primaria (V1) constituye el primer nivel de procesamiento cortical de la información visual. Tradicionalmente se la ha considerado un detector pasivo e inmutable de estímulos visuales. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que V1 mantiene una notable plasticidad incluso en la adultez. En particular, se ha observado que, tras el aprendizaje de una asociación entre una clave visual y una recompensa futura, un subgrupo de neuronas de V1 comienza a codificar el intervalo temporal entre ambos eventos, indicando que funciones cerebrales complejas, como la codificación de la expectativa temporal de la recompensa, pueden surgir en etapas tempranas de las vías sensoriales. Por otro lado, se ha demostrado que las proyecciones colinérgicas del *basal forebrain* (BF) son necesarias y suficientes para inducir esta forma de codificación temporal en V1. El BF constituye uno de los sistemas neuromoduladores clave en la regulación de procesos como la atención, el aprendizaje, la memoria y la plasticidad sináptica. Sin embargo, aún se desconoce cómo responden sus neuronas durante el aprendizaje de tareas operantes recompensadas, y de qué manera estas señales pueden interactuar con la actividad de V1.

Esta tesis busca comprender las propiedades de codificación de las neuronas de la banda diagonal de Broca (HDB), uno de los principales núcleos del BF con proyecciones hacia V1, durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada guiada por una clave visual. En esta tesis, registramos la actividad neuronal en V1 y el HDB mientras ratones C57BL/6 aprendían una tarea operante recompensada, y analizamos la respuesta de sus neuronas a distintos eventos relevantes a lo largo del entrenamiento. Nuestros resultados muestran que los animales aprenden exitosamente la tarea, y que en V1 emerge la señal de expectativa temporal a la recompensa previamente reportada en bibliografía. Por su parte, las neuronas del HDB codifican tanto el estímulo visual como la entrega de la recompensa desde las primeras etapas del aprendizaje, y esta codificación se mantiene constante durante el entrenamiento. A medida que progresa el entrenamiento, emergen respuestas asociadas a la omisión de la recompensa, compatibles con una señal de error de predicción, así como una señal de expectativa temporal que refleja el intervalo entre la presentación de la clave visual y el momento de entrega de la recompensa. Esta señal del HDB podría estar

modulando la actividad de las neuronas de V1 que manifiestan un patrón similar de codificación temporal.

Nuestros resultados aportan un avance significativo en la comprensión del rol del HDB en funciones cognitivas, especialmente en el aprendizaje asociativo. Proponemos que las neuronas de esta estructura no sólo codifican y asocian estímulos relevantes mediante señales de refuerzo, sino que además podrían modular dinámicamente el procesamiento sensorial y ajustar las respuestas corticales según el contexto y la experiencia previa. Esto podría lograrse a través de la representación temporal del refuerzo y la codificación de señales de error de predicción, lo que posiciona al HDB como un nodo clave en la integración de información motivacional y temporal durante el aprendizaje.

Palabras clave: condicionamiento operante, recompensa, señal de expectativa temporal, basal *forebrain*, corteza visual primaria, electrofisiología

ABSTRACT

Title: “Reward-mediated modulation of neural activity in the diagonal band of Broca and the primary visual cortex”

The primary visual cortex (V1) constitutes the first cortical stage of visual information processing. Traditionally it has been regarded as a passive and immutable detector of sensory stimuli. However, numerous studies have demonstrated that V1 retains remarkable plasticity even in adulthood. In particular, it has been observed that, following the learning of an association between a visual cue and a future reward, a subset of V1 neurons begins to encode the temporal interval between these two events. This suggests that complex brain functions, such as the encoding of temporal reward expectancy, can emerge at early stages of sensory processing. On the other hand, cholinergic projections from the basal forebrain (BF) have been shown to be both necessary and sufficient to induce this form of temporal coding in V1. The BF constitutes one of the key neuromodulatory systems regulating processes such as attention, learning, memory, and synaptic plasticity. However, it remains largely unknown how BF neurons respond during the learning of operant tasks reinforced by reward, and how these signals might interact with activity in V1.

This thesis aims to understand the coding properties of neurons in the horizontal limb of the diagonal band of Broca (HDB), one of the main BF nuclei projecting to V1, during the learning of a visually guided operant task. We recorded neuronal activity in V1 and the HDB while C57BL/6 mice learned a reward-based operant task, analyzing neuronal responses to various task-relevant events throughout training. Our results show that animals successfully learned the task, and that reward timing activity previously described in V1 emerges during learning. HDB neurons encoded both the visual stimulus and reward delivery from the earliest stages of learning, and this coding remains stable throughout training. As learning progresses, responses associated with reward omission emerge, consistent with a prediction error signal, along with a temporal expectation signal reflecting the time interval between the cue presentation and reward delivery. This HDB signal may modulate the activity of V1 neurons that exhibit a similar temporal coding profile.

Taken together, our results provide significant advances in understanding the role of the HDB in cognitive functions especially associative learning. We propose that neurons in this structure not only encode and associate relevant stimuli via reinforcement signals, but

may also dynamically modulate sensory processing and adjust cortical responses according to context and prior experience. This could be achieved through temporal representation of reinforcement and coding of prediction error signals, positioning the HDB as a key node in integrating motivational and temporal information during learning.

Keywords: operant conditioning, reward, temporal expectancy signal, basal forebrain, primary visual cortex, electrophysiology.

ABREVIATURAS

Ach: acetilcolina

ACP: análisis de componentes principales

BF: *basal forebrain*

ChR2: *channelrhodopsin-2*

CR: *conditioned response*

CS: *conditioned stimulus*

CV: coeficiente de variación

HDB: núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca

IEE: intervalo entre ensayos

LC: *locus coeruleus*

LGN: núcleo geniculado lateral

LTP: potenciación de largo término

LTD: depresión de largo término

MS: núcleo septal medial

NB: núcleo basal de Meynert

NRT: *neural report of time*

PA: potencial de acción

rta: respuesta

SI: sustancia innominada

SNC: sistema nervioso central

SNpc: sustancia negra pars compacta

UR: *unconditioned response*

US: *unconditioned stimulus*

V1: corteza visual primaria

VDB: núcleo ventral de la banda diagonal de Broca

VEP: potencial visual evocado

VTa: área tegmental ventral

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos estamos en constante interacción con el ambiente que nos rodea, y esta interacción depende de nuestros sistemas sensoriales, los cuales nos permiten percibir diversas modalidades sensoriales como la visión, audición, y olfato. La información que recogen nuestros sistemas sensoriales es procesada inicialmente por las cortezas sensoriales primarias y luego transmitida a regiones cerebrales de mayor complejidad, que asignan relevancia funcional a los estímulos y les otorgan un valor predictivo. Así, la asignación de valor funcional y predictivo a los estímulos sensoriales permite guiar la selección de respuestas conductuales apropiadas según el contexto.

Sin embargo, este procesamiento y la interpretación de los estímulos no son estáticos; están influenciados por el aprendizaje, en el cual las experiencias pasadas modifican la forma en que percibimos y respondemos a los estímulos. Los refuerzos juegan un papel clave en este proceso, ya que pueden alterar el significado que atribuimos a los estímulos percibidos por nuestros sistemas sensoriales. Las recompensas, en particular, son poderosos reforzadores que modifican cómo percibimos ciertos estímulos y guían la adaptación de nuestras respuestas conductuales.

Este cambio en la percepción y la toma de decisiones suelen estar mediados por sistemas neuromoduladores, que señalan la llegada de recompensas. Estos sistemas no sólo modulan las áreas cerebrales de alto nivel jerárquico encargadas de asignar valor a los estímulos y generar respuestas, sino que también actúan sobre los detectores primarios de estos estímulos, mejorando la eficiencia perceptual. Así, los sistemas sensoriales y los sistemas de recompensa interactúan constantemente, y los procesos de aprendizaje facilitan la adaptación de nuestras respuestas a lo largo del tiempo.

En esta tesis se profundiza en la interacción entre los sistemas sensoriales y de recompensa, con especial énfasis en el rol de los sistemas neuromoduladores en el proceso de aprendizaje y en la selección de conductas adaptativas.

I.1. Principios del aprendizaje asociativo

Para su supervivencia, los animales deben realizar acciones diarias para maximizar beneficios con el menor riesgo. Esto requiere actualizar información sobre su estado físico y motivacional, el ambiente circundante y experiencias pasadas relevantes. El aprendizaje

permite modificar el comportamiento en función de la experiencia (Hilgard et al., 1975) y utilizar el conocimiento adquirido para la toma de decisiones. Los organismos capaces de aprender y adaptarse tienen mayores oportunidades de obtener alimento y reproducirse. En este marco, desde la psicología se han planteado teorías del aprendizaje que explican cómo es que los animales promueven aquellos comportamientos que son beneficiosos, y evitan los nocivos mediante el establecimiento de asociaciones. Surgen entonces los llamados condicionamiento clásico o Pavloviano y condicionamiento operante o instrumental.

A la vez, en el mundo de la ingeniería y las ciencias de la computación se han desarrollado modelos computacionales y algoritmos que proponen el aprendizaje como consecuencia de la interacción con el entorno. Uno de los marcos teóricos más influyentes en este contexto es el aprendizaje por refuerzo (*reinforcement learning*), cuyo objetivo principal no es modelar directamente el comportamiento animal, sino resolver problemas computacionales mediante algoritmos eficientes que permitan a un agente maximizar una función de recompensa a lo largo del tiempo.

A pesar de esta diferencia de objetivos, existen múltiples correspondencias entre los enfoques computacionales y los hallazgos de la neurociencia. Estos puntos de contacto son especialmente significativos porque revelan principios computacionales que podrían ser compartidos por sistemas artificiales y biológicos. En esta sección, ahondaremos un poco en las principales teorías propuestas y utilizadas en la investigación actual:

I.1.A. Aprendizaje de tipo clásico o Pavloviano

Este tipo de aprendizaje asociativo, descrito inicialmente por Ivan Pavlov en los últimos años del siglo XIX, se basa en el establecimiento de relaciones causales entre estímulos del ambiente. En este proceso, los animales relacionan estímulos inicialmente neutros con otros que tienen un valor biológico intrínseco, como la comida o el agua. Como resultado, el estímulo neutro adquiere un valor predictivo y es capaz de generar respuestas semejantes a las inducidas por el estímulo biológico relevante (Pavlov, 1927). Pavlov denominó estímulos incondicionados a los estímulos biológicamente relevantes (US, *unconditioned stimulus*), ya que evocan respuestas innatas o incondicionadas (UR, *unconditioned response*). En cambio, el estímulo inicialmente neutro es llamado estímulo condicionado una vez establecida la asociación (CS, *conditioned stimulus*), pues tras varias

presentaciones asociadas con el US, adquiere la capacidad de generar la misma respuesta que el estímulo incondicionado de manera aprendida. A su vez, la respuesta que ahora evoca el CS es denominada respuesta condicionada (CR, *conditioned response*).

Es importante destacar que el condicionamiento clásico no requiere una acción voluntaria por parte del individuo. Por el contrario, durante el condicionamiento clásico el estímulo biológico ocurre independientemente del comportamiento del animal, por lo que cambios conductuales reflejan reacciones innatas desencadenadas por el estímulo (Dayan & Balleine, 2002).

I.1.B. Aprendizaje de tipo operante o instrumental

La teoría del condicionamiento operante, también conocido como aprendizaje instrumental, surgió a finales de la década de 1950, impulsada por el psicólogo estadounidense Burrhus Frederic Skinner. Según esta teoría, los individuos modifican la frecuencia con la que realizan una determinada acción en función de las consecuencias que esta tiene. De este modo, si una acción genera un resultado beneficioso, tenderá a repetirse; en cambio, si conlleva consecuencias negativas, dejará de ejecutarse. Según esta visión, la consecuencia que tiene una acción repercute en la probabilidad de que el individuo vuelva a comportarse de la misma manera en aquel ambiente (Murphy & Lupfer, 2014).

En este marco, hablamos de refuerzos cuando una consecuencia aumenta la probabilidad de repetir una acción, y de castigos cuando la reduce. A su vez, tanto los refuerzos como 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 en la acción. En contraste, en los refuerzos y castigos negativos, es la interrupción del estímulo lo que genera la modificación en la conducta. En esta tesis nos centraremos en los refuerzos positivos, como las recompensas. Ejemplos clásicos de una recompensa son un alimento apetecible o agua en animales sedientos.

Es importante destacar que el estado motivacional del individuo modula su desempeño en este tipo de aprendizaje. Por ejemplo, los animales privados de alimento muestran respuestas más pronunciadas en ensayos instrumentales recompensados donde la recompensa es alimento (Balleine & Dickinson, 1998). Esto ocurre porque la valoración de la recompensa no depende solo de su cantidad o calidad, sino también del estado interno

del animal, su nivel de saciedad, su experiencia previa con el estímulo y otros factores motivacionales (Schultz et al., 1997).

Dado que en el condicionamiento operante la relación entre acción y consecuencia es clave, desde sus primeras formulaciones se ha buscado 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 contexto, muchos de los ensayos de condicionamiento operante se llevan a cabo en cajas operantes, dispositivos automatizados que permiten diseñar protocolos complejos, utilizar distintos estímulos de múltiples modalidades sensoriales en simultáneo, parear eventos con alta precisión y minimizar la presencia humana durante las pruebas. Estas fueron creadas por Skinner y su eficacia ha sido tal que su uso en la actualidad no se limita únicamente al condicionamiento operante, sino que también se han incorporado en paradigmas de condicionamiento clásico, como el condicionamiento por miedo.

I.1.C. Aprendizaje por refuerzo (*reinforcement learning*)

El aprendizaje por refuerzo (*reinforcement learning*) es una teoría del aprendizaje desde un enfoque computacional que propone que los sistemas, biológicos o artificiales, pueden aprender a partir de la experiencia con el entorno. Esta teoría plantea la existencia de una selección de acciones a fin de maximizar las recompensas (Sutton & Barto, 1998). El aprendiz no recibe instrucciones sobre qué acciones tomar, sino que debe descubrir cuáles generan la mayor recompensa mediante la experiencia. 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 aprendizaje por refuerzo es un intento de estudiar el aprendizaje

ensayo a ensayo (*trial-by-trial learning*) desde el punto de vista de la computación y la inteligencia artificial, en particular.

Este modelo, que se esquematiza en la **Figura I.1.1**, propone que el sujeto del 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 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 internas del sujeto, 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 no está dando los resultados esperados y debe modificarse, o, por el contrario, que 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 & Barto, 1998).



Figura I.1.1. Esquema de la arquitectura básica del sistema de iteración planteado por el modelo de *reinforcement learning*. Adaptado de Sutton & Barto (1998).

Como mencionamos previamente en esta sección, el aprendizaje por refuerzo es una teoría que no busca replicar o explicar en detalle cómo aprenden los animales. Sin embargo, se observan algunas correspondencias con las teorías de aprendizaje propuestas por la psicología explicadas anteriormente: el condicionamiento clásico y operante. Estos puntos de contacto son especialmente significativos porque revelan principios computacionales fundamentales para el aprendizaje (Sutton & Barto, 1998). La correspondencia entre los algoritmos de predicción y el condicionamiento clásico radica en su propiedad común de predecir estímulos futuros, independientemente de si estos estímulos son recompensantes o aversivos. Por otro lado, el condicionamiento instrumental se relaciona con la teoría de control óptimo (Dayan & Balleine, 2002), en la que se propone al actor interactuando con el entorno para alcanzar un objetivo. En el condicionamiento operante, como fue explicado previamente, el aparato experimental está configurado de manera que un animal recibe algo que le gusta (una recompensa) o algo que le desagrada (un castigo) dependiendo de la acción que haya realizado. El animal aprende a aumentar la probabilidad de emitir conductas que son recompensadas y a reducir aquellas que resultan en castigos.

Otro aspecto interesante del *reinforcement learning* es la creciente evidencia de que el sistema nervioso de los seres humanos y muchos otros animales implementa algoritmos que corresponden de manera sorprendente a los algoritmos de aprendizaje por refuerzo

(Dayan & Niv, 2008; Glimcher, 2011; Ludvig et al., 2011; Niv, 2009; Shah, 2012). Uno de los ejemplos más notables de esta correspondencia se encuentra en el papel de la dopamina, un neurotransmisor fundamental en el procesamiento de recompensas en el cerebro de los mamíferos. Se ha propuesto la teoría del error de predicción de recompensa en la actividad de las neuronas dopaminérgicas, según la cual la actividad de las neuronas dopaminérgicas codifica una señal de error de predicción, es decir, la diferencia entre la recompensa esperada y la realmente obtenida, de manera análoga a los algoritmos computacionales de aprendizaje por refuerzo. Esta idea ha surgido de la convergencia entre la teoría del aprendizaje por refuerzo computacional y los hallazgos experimentales en neurociencia.

Además, una implicancia clave del aprendizaje por refuerzo es la necesidad de resolver el problema de asignación de crédito temporal (*temporal credit assignment*), es decir, identificar qué estímulo o acción previa es responsable de una recompensa que ocurre con cierto retraso. Para lograrlo, el sistema debe mantener activa una representación del evento relevante durante el intervalo que separa el estímulo de la recompensa. Este requisito ha motivado múltiples investigaciones orientadas a identificar mecanismos neuronales capaces de sostener o enlazar la información relevante a lo largo del tiempo.

I.1.D. Error de predicción de recompensas: sistema dopaminérgico

En el SNC de mamíferos, se ha propuesto que el neurotransmisor dopamina señala lo que en la teoría del *reinforcement learning* se denomina error de predicción de recompensa (*reward prediction error*) (Montague et al., 1996). Según esta teoría, una de las funciones de la actividad fásica de las neuronas dopaminérgicas es reflejar la diferencia entre la recompensa esperada, en base a la experiencia previa del animal, y la recompensa realmente obtenida, tanto en términos de tiempo como de magnitud. Los primeros experimentos que demostraron esto fueron realizados en la década de 1980 y principios de la década de 1990 en el laboratorio del neurocientífico Wolfram Schultz.

La dopamina es un neurotransmisor producido por neuronas que se encuentran en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y el área tegmental ventral (VTA), y desempeña un papel fundamental en procesos de motivación, aprendizaje, selección de acciones, diversas formas de adicción y en desórdenes como la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson. En el contexto del aprendizaje, la dopamina es clave en el procesamiento de recompensas en el cerebro de mamíferos. En este sentido, las neuronas dopaminérgicas se caracterizan por

señalizar la presencia de recompensas y actuar como una señal de refuerzo (Olds & Milner, 1954; Steinberg et al., 2013; Tsai et al., 2009).

Los experimentos de Schultz revelaron que las neuronas dopaminérgicas no solo responden a la recompensa en sí. En un experimento clásico, un grupo de monos fue entrenado para apretar una palanca tras la presentación de una clave visual con el fin de obtener una gota de jugo como recompensa. En este experimento observaron que, inicialmente, las neuronas dopaminérgicas responden a la recompensa, pero con el aprendizaje asociativo, dejan de activarse ante la recompensa y comienzan a responder al estímulo que la predice (clave visual) (Ljungberg et al., 1992; Schultz et al., 1993; Schultz, 1998). Además, a medida que avanza el entrenamiento, la respuesta de estas neuronas se ajusta progresivamente al resultado obtenido. Específicamente, cuando la recompensa es mayor a la esperada (error positivo), las neuronas dopaminérgicas se activan (aumenta su frecuencia de disparo, **panel superior de la Figura I.1.2**); cuando la recompensa coincide con la predicción (ausencia de error), las neuronas no muestran respuesta (**panel del medio de la Figura I.1.2**); y cuando la recompensa es menor a la esperada o no se presenta (error negativo), se inhiben (disminución de la frecuencia de disparo, **panel inferior de la Figura I.1.2**) (Ljungberg et al., 1992; Schultz et al., 1993, 1997). De este modo, la respuesta de estas neuronas refleja un error de predicción de recompensa, es decir, la diferencia entre la recompensa obtenida y la recompensa predicha. Este tipo de respuestas no solo ha sido observado en monos, sino también en humanos (Zaghloul et al., 2009) y roedores (Cohen et al., 2012; Pan et al., 2005).

Esta capacidad de las neuronas dopaminérgicas las convierte en sensores del ambiente, ya que se activan ante fuentes inesperadas de recompensa, señalizan eventos predictores y actualizan su respuesta a medida que la fuente de recompensa varía. Esta señal de error de predicción podría ser utilizada por circuitos neuronales para ajustar la respuesta del animal, permitiendo procesos de aprendizaje.

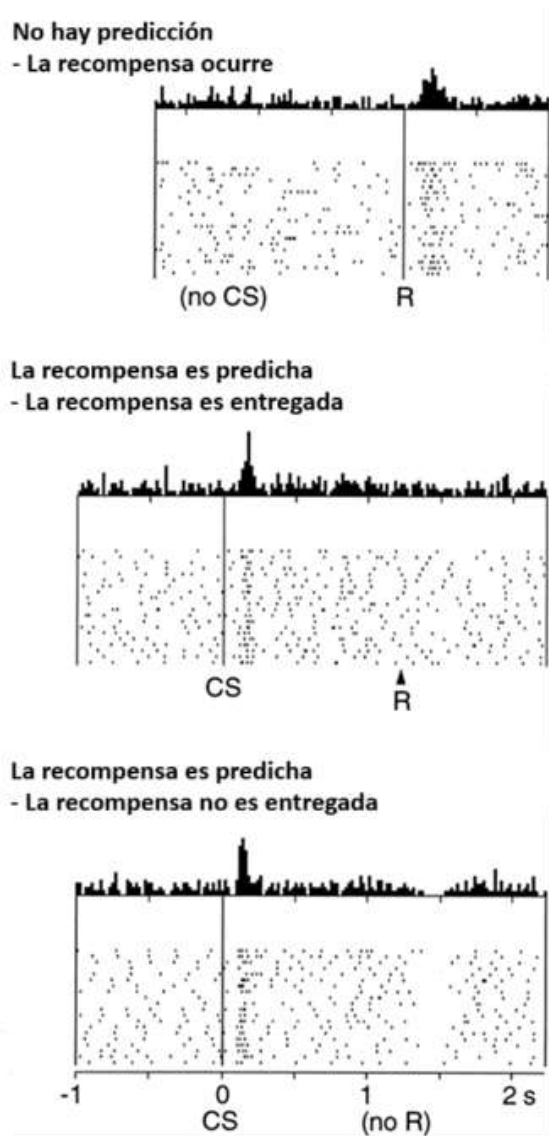


Figura 1.1.2. Las neuronas dopaminérgicas muestran respuestas de error de predicción en el momento en que se entrega la recompensa, así como también respuestas ante la clave visual que la predice. **Arriba:** ante la entrega de una recompensa (R) inesperada (sin señal predictora, sin CS) las neuronas dopaminérgicas aumentan su actividad. **Medio:** las neuronas dopaminérgicas responden al estímulo que predice la recompensa (CS) pero no a la recompensa en sí. **Abajo:** las neuronas dopaminérgicas responden con una excitación al CS que predice la recompensa y con una inhibición cuando la recompensa se omite (no R). En la parte superior de cada uno de estos paneles se muestra el histograma de actividad de las neuronas dopaminérgicas registradas. Debajo se encuentran los *raster plots* donde cada punto representa la ocurrencia de un potencial de acción (cada fila representa un ensayo). Adaptada de Schultz et al. (1997).

La señal de error de predicción de recompensa, generada por las neuronas dopaminérgicas, viaja por sus axones, que se ramifican ampliamente por el cerebro, hasta llegar a distintas regiones como el estriado, la corteza frontal y la amígdala. En el estriado, por ejemplo, estos axones hacen sinapsis con prácticamente todas las neuronas de esa región. Esto significa que una misma señal dopaminérgica, relativamente uniforme, llega e impacta sobre muchos tipos distintos de neuronas. Como resultado, aunque la señal en sí sea parecida en todos lados, puede provocar efectos muy diferentes según el tipo de neurona y la función que cumple cada región del cerebro.

Sin embargo, las señales de error de predicción de recompensa no se limitan a las neuronas dopaminérgicas. También han sido observadas en otras áreas subcorticales y

corticales que procesan recompensas (Schultz, 2016). Por ejemplo, las neuronas de la hipófisis lateral muestran señales bidireccionales de error de predicción de recompensa que tienen una inversión de signo respecto de las respuestas dopaminérgicas (Matsumoto & Hikosaka, 2007). En el estriado y el globo pálido, se han identificado neuronas que codifican errores de predicción positivos y negativos mediante cambios tanto fásicos como tónicos en su actividad (Apicella et al., 2009; Ding & Gold, 2010; Hong & Hikosaka, 2008). Asimismo, en la amígdala se han encontrado neuronas que codifican separadamente errores de predicción asociados a recompensas y castigos (Belova et al., 2007). Por último, en la corteza, en particular en la corteza cingulada anterior, también se han registrado señales neuronales compatibles con errores de predicción de recompensa (Kennerley et al., 2011; Seo & Lee, 2007).

En todos estos casos, las señales de error de predicción de recompensa son bidireccionales, es decir, muestran cambios opuestos ante errores de predicción positivos (la recompensa supera lo esperado) versus negativos (la recompensa no ocurre o es menor a lo esperado). A diferencia de la señal dopaminérgica global, estas respuestas más localizadas no parecerían actuar como una señal de refuerzo difusa que se distribuye ampliamente por el cerebro. En cambio, se postula que estas señales podrían actuar de manera más local, modulando la plasticidad sináptica en neuronas postsinápticas específicas, conectadas directamente a las neuronas que emiten la señal de error.

A modo de conclusión de esta sección resulta relevante destacar que, estas teorías de aprendizaje, y en particular el aprendizaje por refuerzo, comparten un principio común: la interacción continua con el entorno y la constante evaluación de las recompensas como motor de la adaptación del comportamiento. Este proceso, aunque descrito desde perspectivas conductuales y computacionales, tiene una base biológica fundamental que involucra una compleja interacción entre sistemas sensoriales y de recompensa. Las siguientes secciones están dedicadas a explorar los mecanismos neurobiológicos que sustentan este tipo de aprendizaje, enfocándonos en los sistemas sensoriales y de recompensa involucrados en la adaptación de comportamientos.

I.2. Plasticidad sináptica y neuromoduladores

El cerebro tiene la capacidad de adquirir, coordinar y distribuir información sobre el ambiente que nos rodea. Esta información debe ser procesada en milisegundos para generar respuestas inmediatas, pero también puede almacenarse como memorias que perduran durante años. El cerebro humano está compuesto por un enorme número de neuronas, las cuales se comunican entre sí y realizan estas funciones mediante la generación de señales eléctricas y químicas altamente sofisticadas.

El punto de contacto funcional entre neuronas es la sinapsis, una estructura especializada, generalmente localizada en la terminación de una rama axonal, que permite la comunicación entre ellas. La sinapsis transmite información desde el axón de la neurona presináptica hacia una dendrita o el cuerpo celular de la neurona postsináptica. En la mayoría de los casos, esta comunicación ocurre mediante la liberación de un neurotransmisor químico desde la neurona presináptica, en respuesta a la llegada de un potencial de acción, lo que activa receptores específicos en la membrana de las neuronas postsinápticas y genera un flujo de corriente en la misma. En otros casos, la transmisión ocurre a través de sinapsis eléctricas, donde la corriente fluye directamente entre neuronas mediante conexinas, que son canales especializados en la membrana de ambas neuronas que las conectan en uniones estrechas. Así, ambos tipos de sinapsis permiten la comunicación neuronal y constituyen la base estructural de los circuitos sobre los cuales se basa el procesamiento de la información en el cerebro.

Más allá de su función básica de transmisión, las sinapsis han sido propuestas como el sustrato de los cambios duraderos que podrían sustentar el aprendizaje y la memoria. Una de las hipótesis más ampliamente exploradas sugiere que la actividad neuronal generada por una experiencia podría modificar la función de los circuitos cerebrales a través de cambios en la fuerza o eficacia de la transmisión sináptica en sinapsis preexistentes, en un proceso conocido como plasticidad sináptica. La eficacia sináptica se refiere a la fuerza o efectividad con la que el neurotransmisor liberado en una sinapsis influye en la neurona postsináptica, y depende de factores como la cantidad de neurotransmisor liberado, la sensibilidad y densidad de los receptores postsinápticos, así como por la historia previa de actividad sináptica (Bear, 2003; Citri & Malenka, 2008; J.-W. Lin & Faber, 2002; Vilimelis Aceituno et al., 2020).

La transmisión sináptica puede ser tanto potenciada como deprimida por la actividad, y estos cambios abarcan escalas temporales que van desde milisegundos hasta horas, días, e incluso, según se postula, años. Se ha propuesto que las modificaciones en la eficacia sináptica, cuando son de largo término, desempeñan un papel central en la capacidad del cerebro para transformar experiencias transitorias en memorias persistentes (Citri & Malenka, 2008). Al ocurrir de forma coordinada en múltiples neuronas, estas modificaciones permiten el almacenamiento de información y la adaptación del sistema nervioso a un entorno en constante cambio.

A fines de la década de 1940, Donald Hebb propuso que la coincidencia temporal entre la actividad presináptica y el disparo postsináptico podría fortalecer las conexiones sinápticas, sentando las bases para los modelos actuales de plasticidad sináptica dependiente de la actividad y su posible rol como sustrato celular de las memorias asociativas (Hebb, 1949). Esta hipótesis proporcionó un marco conceptual para explicar cómo el cerebro codifica la asociación entre estímulos y entender fenómenos conductuales como el condicionamiento clásico pavloviano (Pavlov, 1927), mencionado anteriormente. Décadas más tarde, fue respaldada experimentalmente con el descubrimiento de la potenciación a largo plazo (LTP), un aumento duradero en la eficacia sináptica tras estimulación repetida (Bliss & Gardner-Medwin, 1973; Bliss & Lomo, 1973). De forma complementaria, se describió la depresión a largo plazo (LTD), una disminución sostenida de la eficacia sináptica que podría contribuir al olvido y a la reorganización de redes neuronales durante el aprendizaje (Abraham & Goddard, 1983).

En muchos casos, estas modificaciones en la eficacia sináptica son el resultado de la acción de un neuromodulador (Frémaux & Gerstner, 2016). Un neuromodulador es un neurotransmisor que ejerce efectos adicionales o distintos de la excitación o inhibición rápida y directa. El cerebro contiene varios sistemas neuromoduladores, formados por grupos de neuronas localizados principalmente en el tronco encefálico, el núcleo pontino y el *basal forebrain* (BF). Estos sistemas utilizan distintos neurotransmisores, como noradrenalina, serotonina, dopamina y acetilcolina. Sus axones se extienden ampliamente hacia muchas regiones del sistema nervioso central (Avery & Krichmar, 2017; Briand et al., 2007) y desempeñan un papel fundamental en la regulación del comportamiento cognitivo.

Un aspecto clave de la neuromodulación es su capacidad para alterar el funcionamiento de los circuitos neuronales y regular procesos como el nivel de alerta, la

atención, la memoria, el estado de ánimo, el sueño, la toma de decisiones y los comportamientos dirigidos a metas. Esto ocurre a través de la interacción con diversas áreas cerebrales, como el hipocampo, el estriado, las cortezas sensoriales, la corteza cingulada anterior y la corteza prefrontal.

Lo relevante aquí es que un sistema neuromodulador puede distribuir una señal de refuerzo y modificar el funcionamiento de sinapsis en múltiples regiones del cerebro esenciales para el aprendizaje. Ya analizamos el caso de la dopamina y cómo la modulación de la plasticidad sináptica a través de este neurotransmisor representa un mecanismo plausible mediante el cual el cerebro podría implementar algoritmos de aprendizaje. Más adelante nos centraremos en otro sistema neuromodulador del SNC, el *basal forebrain* (BF), cuya población de neuronas de proyección colinérgicas desempeña un rol esencial en los procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje.

1.3. Plasticidad sináptica en cortezas sensoriales primarias

Tal como desarrollamos en la sección anterior, la plasticidad sináptica constituye un mecanismo esencial mediante el cual la experiencia modifica la organización funcional del cerebro. Esta capacidad de adaptación, modulada en muchos casos por sistemas neuromoduladores, es especialmente relevante en regiones sensoriales, donde la información proveniente del ambiente es inicialmente procesada. Las cortezas sensoriales primarias, tradicionalmente consideradas como estructuras de procesamiento rígido y especializado, han demostrado ser altamente plásticas bajo ciertas condiciones, tanto durante el desarrollo como en la adultez.

Los procesos de plasticidad sináptica desempeñan un papel fundamental en el desarrollo temprano de algunos circuitos neuronales (Citri & Malenka, 2008). En particular, se ha demostrado que los campos receptivos de algunas cortezas sensoriales se modifican con la experiencia postnatal temprana, durante el llamado período crítico. El período crítico es una ventana temporal durante el desarrollo temprano en la que el cerebro es particularmente sensible a la experiencia sensorial y se observa alta plasticidad sináptica. Existe una creciente evidencia que vincula la plasticidad sináptica con estas formas de plasticidad dependientes de la experiencia en los sistemas sensoriales (Foeller & Feldman, 2004; Karmarkar & Dan, 2006; Malenka & Bear, 2004).

Tradicionalmente, se ha propuesto que las cortezas sensoriales primarias funcionan como detectores de características de bajo nivel, proporcionando representaciones simples del ambiente externo a regiones cerebrales de orden superior, encargadas de interpretar esa información y seleccionar respuestas conductuales adecuadas. Desde esta perspectiva clásica, la plasticidad sináptica en las cortezas sensoriales primarias se consideraba restringida al período crítico, disminuyendo marcadamente en la adultez. Esta rigidez permitiría asegurar una codificación sensorial confiable, estable y reproducible. Así, se creía que las propiedades de las neuronas individuales y los circuitos neuronales en estas áreas eran, en gran medida, inmutables en los mamíferos adultos. Se asumía que una parte de la arquitectura funcional de la corteza ya estaba establecida al nacer, mientras que otras propiedades neuronales eran susceptibles de modificarse únicamente durante un breve período crítico del desarrollo. Entre estas propiedades se encontraba la dominancia ocular en V1, es decir, la preferencia de ciertas neuronas por procesar la información proveniente de uno u otro ojo (Hubel & Wiesel, 1977). Otro ejemplo es el desarrollo del patrón maduro de "barriles" en la corteza somatosensorial, estructuras bien definidas en la corteza de roedores que reflejan la organización topográfica de los bigotes en el hocico y su representación precisa en el cerebro (Fox, 1992).

Bajo este modelo se creía que, una vez finalizado el período crítico, los campos receptivos se volvían definidos y estables, y que los circuitos y propiedades neuronales de la corteza sensorial primaria quedaban esencialmente fijos, sin posibilidad de ser modificados por la experiencia. Se postulaba que, luego del procesamiento sensorial en una corteza primaria, otras regiones cerebrales eran las responsables de almacenar la información en la memoria de trabajo (Fuster & Alexander, 1971; Miyashita & Chang, 1988), otorgarle relevancia funcional y valor predictivo (Gaffan et al., 1988; Rolls, 2000), y desencadenar las respuestas conductuales apropiadas.

No obstante, se reconocía que incluso la corteza adulta debía conservar cierto grado de plasticidad, ya que los adultos son capaces de aprender, lo que implicaría cambios a nivel de las sinapsis individuales y de los circuitos funcionales. Sin embargo, se asumía que estos procesos ocurrían en las áreas sensoriales de orden superior y en las áreas de asociación.

En las últimas décadas, sin embargo, esta visión ha sido revisada. Numerosos estudios han demostrado que las áreas corticales sensoriales primarias no se limitan a actuar como detectores y representar pasivamente las características del mundo exterior. Por el

contrario, se ha evidenciado que incluso en la adultez, las representaciones en estas áreas pueden modificarse con la experiencia, especialmente cuando los estímulos adquieren significado a través del aprendizaje asociativo (McGann, 2015). Este tipo de plasticidad ha sido documentado en diversas cortezas sensoriales primarias: gustativa (Vincis & Fontanini, 2016), somatosensorial (Gdalyahu et al., 2012; Pais-Vieira et al., 2013; Wiest et al., 2010), auditiva (Guo et al., 2019; Ohl & Scheich, 2005; Polley et al., 2004, 2007; Rutkowski & Weinberger, 2005; Suga, 2012; Weinberger, 2015), visual (Gavornik & Bear, 2014b, 2014a; Goltstein et al., 2018; Makino & Komiyama, 2015; Shuler & Bear, 2006) y olfativa (Chen et al., 2011; Li et al., 2008). Además, también se han reportado cambios plásticos en áreas sensoriales subcorticales, como el bulbo olfatorio (Kass et al., 2013; Kay & Laurent, 1999; Ross & Fletcher, 2018).

Si bien se ha investigado ampliamente la plasticidad en diversas modalidades sensoriales, esta tesis se enfoca específicamente en la corteza visual primaria (V1), dado que este sistema ha sido históricamente uno de los modelos más utilizados para estudiar cómo la experiencia modifica los circuitos neuronales y, en consecuencia, las respuestas del cerebro ante estímulos externos. Los estudios del sistema visual en desarrollo han sido fundamentales para comprender cómo los cambios en la actividad neuronal y la conectividad pueden contribuir a los períodos críticos del desarrollo y a la adquisición de habilidades conductuales, sentando las bases para el estudio de otras modalidades sensoriales. De hecho, se ha demostrado que en V1 pueden codificarse funciones cognitivas complejas, tradicionalmente atribuidas a áreas corticales de orden superior o a regiones subcorticales asociadas. Estas observaciones, que detallaremos más adelante, han transformado nuestra comprensión del rol funcional de las cortezas sensoriales primarias en el cerebro adulto.

Debido a esto, a continuación describiremos las características generales de la organización funcional de V1, para luego enfocarnos en los mecanismos de plasticidad que han sido observados en esta área.

I.4. Corteza visual primaria

I.4.A. Generalidades

La corteza visual primaria (V1), ubicada en el lóbulo occipital, es el primer sitio de procesamiento de la información visual en la corteza cerebral, donde se integran las señales provenientes de ambos ojos. Esta área recibe su principal aferencia del núcleo geniculado lateral (LGN) del tálamo, el cual transmite información proveniente de la retina de ambos ojos a través del nervio óptico (**Figura I.4.1**). Estas proyecciones se organizan en capas dentro de la corteza, con las aferencias provenientes del LGN terminando predominantemente en la capa IV de V1 (Callaway, 1998; Lund, 1973).

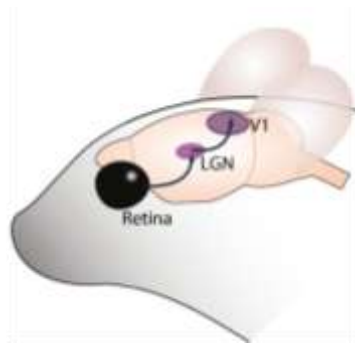


Figura I.4.1. Esquema que representa la ubicación de la corteza visual primaria (V1) en un cerebro de ratón, desde una vista sagital. Se esquematiza la vía visual primaria que conecta la retina (en la parte posterior del ojo) con el núcleo geniculado lateral (LGN) y, de allí, con V1. Adaptado de Hillier et al. (2017).

Las neuronas de V1 codifican diversas propiedades físicas de la información visual, como contraste, orientación y dirección de movimiento, que finalmente conforman nuestra experiencia visual (Hubel & Wiesel, 1959, 1962). Gran parte del conocimiento actual sobre la organización funcional de V1 se originó en los pioneros estudios de Hubel y Wiesel. Mediante registros electrofisiológicos extracelulares en gatos y monos, estos investigadores describieron por primera vez las propiedades de respuesta de neuronas individuales de V1, estableciendo principios fundamentales sobre el procesamiento de la información visual en la corteza (Hubel & Wiesel, 1959, 1962, 1968). Descubrieron que la mayoría de las neuronas corticales en gatos y monos responden a barras o bordes de contraste claro-oscuro, y sólo lo hacen si dichos estímulos son presentados dentro de un rango particular de orientaciones en el campo receptivo de la célula. Dentro de aquel rango, estas neuronas presentan una

orientación preferida, es decir, una orientación a la cual la célula responde de manera más robusta.

La preferencia por la orientación es solo una de las propiedades que definen las características de filtrado de las neuronas en V1. Una fracción considerable de las neuronas de V1 también está sintonizada con la dirección del movimiento del estímulo; por ejemplo, responden de manera mucho más vigorosa cuando un estímulo se desplaza hacia la derecha que cuando lo hace hacia la izquierda. Las neuronas también pueden caracterizarse según su preferencia por la frecuencia espacial (el grado de delgadez o grosor de las variaciones de contraste que caen dentro de sus campos receptivos) y la frecuencia temporal (la velocidad de cambio en el contraste).

Además, Hubel y Wiesel caracterizaron distintos tipos de neuronas en V1, entre ellas las células simples, que responden a bordes con orientación específica en una ubicación definida del campo receptivo, y las células complejas, que muestran una mayor invariancia espacial y responden a estímulos con una orientación particular en múltiples posiciones (Hubel & Wiesel, 1959, 1962).

Otro aspecto clave descrito en sus estudios en gatos y monos fue la organización en columnas de V1. Observaron que las neuronas con preferencias similares de orientación se agrupan en columnas perpendiculares a la superficie cortical, formando una disposición estructural que facilita la representación ordenada de las características visuales del entorno. Adicionalmente, identificaron la presencia de columnas de dominancia ocular, donde las neuronas responden preferentemente a estímulos provenientes de un ojo en particular, reflejando la organización binocular de V1 y su papel en la percepción de la profundidad (Hubel & Wiesel, 1962, 1968). Estas columnas de dominancia ocular se encuentran en la capa IV de V1, mientras que las neuronas en capas superiores e inferiores integran las entradas de ambos ojos (ya que reciben sinapsis de los axones de las neuronas de la capa IV) y responden a estímulos visuales percibidos por cualquiera de ellos, aunque pueden ser activadas en distinto grado por cada ojo.

Luego de una primera instancia de procesamiento, V1 envía proyecciones a múltiples áreas corticales y subcorticales, desempeñando un papel central en la distribución de la información visual. Las vías corticales que se extienden más allá de V1 abarcan áreas visuales y otras regiones de los lóbulos occipital, parietal y temporal. V1 envía proyecciones hacia las áreas visuales secundarias (V2, V3) y, a través de rutas especializadas, hacia las vías

dorsal y ventral: la vía dorsal, que se extiende hacia el lóbulo parietal, se asocia con el procesamiento del movimiento y la localización espacial, mientras que la vía ventral, que se dirige al lóbulo temporal, está involucrada en el reconocimiento de objetos y la percepción de formas y colores (Felleman & Van Essen, 1991; Mishkin & Ungerleider, 1982).

I.4.B. Plasticidad dependiente de experiencia

Más allá de su compleja organización funcional, uno de los aspectos más fascinantes de V1 es su capacidad para reorganizar sus circuitos en respuesta a la experiencia sensorial, tanto en etapas tempranas como en la adultez. En esta subsección, abordaremos la evidencia acumulada sobre la plasticidad dependiente de la experiencia en V1.

I.4.B.I. Plasticidad durante el desarrollo postnatal: período crítico

Históricamente se ha propuesto que la plasticidad del sistema visual, al igual que en otras cortezas sensoriales primarias, se minimiza durante la adultez con el fin de asegurar una codificación sensorial confiable y reproducible (Hubel & Wiesel, 1970). El clásico trabajo de Hubel y Wiesel había establecido que el desarrollo del sistema visual está marcado por un período crítico: una ventana temporal postnatal durante la cual la experiencia sensorial moldea la organización funcional de V1 y luego de la cual la plasticidad del circuito disminuye significativamente.

En este trabajo, se sometió a gatos a privación monocular en distintas etapas del desarrollo postnatal y, mediante registros electrofisiológicos extracelulares en V1, se evaluó la respuesta neuronal a la estimulación del ojo privado y del ojo abierto. Descubrieron que la privación monocular generaba cambios drásticos en la dominancia ocular sólo si ocurría durante una ventana postnatal específica. Mientras que en condiciones normales las neuronas de V1 responden a ambos ojos con distinto grado de preferencia, en animales privados de visión durante el período crítico, la mayoría de las neuronas respondía exclusivamente al ojo abierto. Como resultado, el ojo cerrado perdía su representación cortical y sus columnas de dominancia ocular se reducían o desaparecían. Este cambio resultó irreversible si la privación ocurría dentro del período crítico, evidenciando una reorganización funcional permanente impulsada por la experiencia.

De esta manera, Hubel y Wiesel establecieron que V1 atraviesa un período crítico durante el desarrollo postnatal, en el cual la experiencia sensorial influye profundamente en

la organización de sus conexiones funcionales y que, una vez finalizado este período, la plasticidad se vuelve extremadamente limitada o inexistente. Esta visión predominó durante décadas, reforzando la noción de que la organización funcional de V1 quedaba fijada en la adultez, sin posibilidad de reorganización en respuesta a la experiencia.

I.4.B.II. Plasticidad dependiente de la experiencia en V1 durante la adultez

Trabajos posteriores realizados en roedores, demostraron que V1 de roedores comparte muchas de las características vistas en gatos y monos, incluida la plasticidad relacionada a la dominancia ocular (Domenici et al., 1992; Fagiolini et al., 1994; Gordon & Stryker, 1996; Sawtell et al., 2003). Aunque inicialmente se pensaba que los cambios plásticos ocurrían únicamente en cierta ventana temporal postnatal, estudios posteriores desafiaron esta noción al mostrar que V1 conserva cierto grado de plasticidad en la adultez. Tanto la privación como la experiencia selectiva a estímulos pueden modificar la actividad neuronal en animales adultos. En particular, registros crónicos en roedores mostraron que la plasticidad relacionada a la dominancia ocular no está restringida al período crítico, sino que también ocurre antes y después de este, persistiendo en la adultez (Hofer et al., 2006; Sawtell et al., 2003; Tagawa et al., 2005).

Otros estudios mostraron que la actividad neuronal en V1 puede experimentar cambios plásticos tras la exposición repetida a un estímulo visual en la adultez. En estos trabajos, se presentaba repetidamente un patrón visual con una única orientación a ratones con la cabeza fijada, mientras se registraban VEPs (potenciales visuales evocados) en la región binocular de V1. Se observó una potenciación progresiva y específica de la respuesta evocada al estímulo entrenado, que no se producía ante estímulos con orientaciones diferentes (Cooke & Bear, 2010; Frenkel et al., 2006). Resultados similares se obtuvieron al entrenar a los animales con secuencias espaciotemporales de estímulos compuestas por patrones de barras con distintas orientaciones: la repetición de estas secuencias generó un aumento en la respuesta neuronal a cada elemento, de manera selectiva según el orden de presentación. Además, la omisión de uno de los estímulos tras el entrenamiento evocó una respuesta en la actividad poblacional, lo que sugiere que V1 puede formar representaciones predictivas basadas en experiencias previas y responder activamente incluso ante la ausencia del estímulo esperado (Gavornik & Bear, 2014a).

Asimismo, se demostró que la actividad de V1 se ajusta según la relevancia motivacional de los estímulos, con mayor activación para estímulos de alto valor (Serences, 2008) y que puede ser modulada por procesos atencionales (Ress et al., 2000).

Resulta importante destacar que las modulaciones mencionadas hasta ahora son generalmente interpretadas en el contexto de su rol en el procesamiento visual, es decir, que ayudarían a mejorar la percepción visual y nuestra capacidad de percibir el mundo. Sin embargo, otros trabajos mostraron plasticidad dependiente de experiencia pero relacionada con el procesamiento del significado comportamental que un estímulo visual adquiere en el contexto de una tarea. Un ejemplo de esto fue demostrado en experimentos en los que se entrenó a ratas a asociar una señal visual monocular (presentada exclusivamente al ojo derecho o izquierdo) con la entrega de una recompensa en un momento específico tras la presentación del estímulo. Dependiendo del ojo estimulado, la recompensa se entregaba una vez que los animales realizaban una secuencia corta o larga de lengüeteos (Shuler & Bear, 2006). Lo que se observó es que en las primeras sesiones de entrenamiento, las neuronas de V1 responden con una respuesta de corta duración a la presentación de la clave visual (duración de la clave: 400 ms) (**Figura I.4.2A**). Sin embargo, luego de varios días de entrenamiento, una fracción sustancial de neuronas de V1 pueden reportar cambios en su frecuencia de disparo por segundos una vez finalizado el estímulo visual y la duración de esta respuesta correlaciona con el tiempo de expectativa a la recompensa.

Este tipo de respuesta fue llamada señal de expectativa temporal a la recompensa o "*reward timing activity*" y se vio que puede ser expresada a través de tres tipos de respuesta distintas (**Figura I.4.2B**): un aumento sostenido, o una disminución sostenida de la actividad desde la presentación del estímulo visual hasta el momento esperado de llegada de la recompensa, o un pico de actividad en el momento en que se espera la recompensa. Estas respuestas se presentan tanto en ensayos recompensados como no recompensados, y por lo tanto se trata de una respuesta de expectativa temporal de la recompensa y no de una respuesta a la recompensa *per se* (**Figura I.4.2B**).

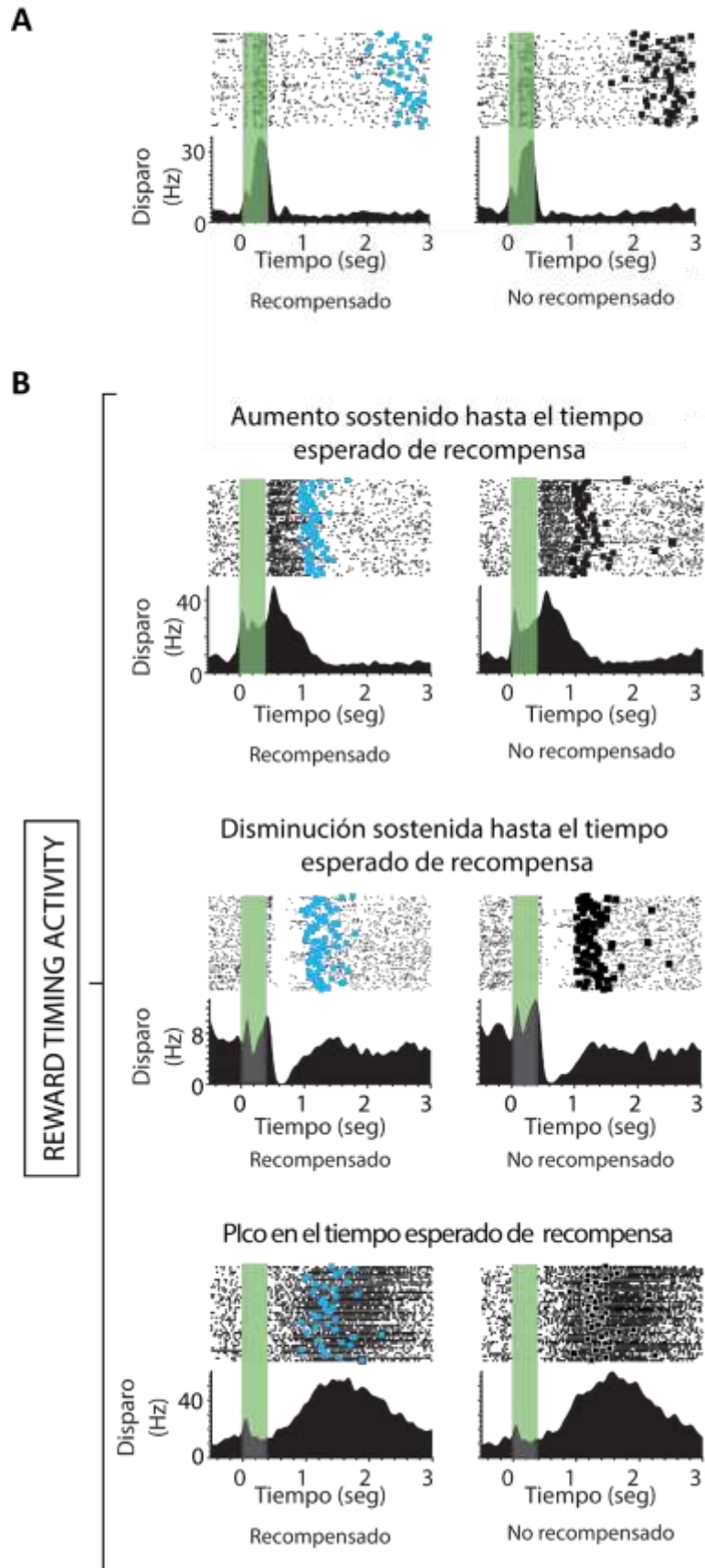


Figura I.4.2. Señal de expectativa temporal de las recompensas asociadas a estímulos visuales en V1. Los animales fueron entrenados a asociar una clave visual con un tiempo de recompensa. **(A)** Al

comenzar el entrenamiento, las neuronas de V1 responden a la presentación del estímulo visual (rectángulo verde). **(B)** Después del entrenamiento, la actividad de las neuronas de V1 evocada por el estímulo visual se extiende hasta el momento esperado de la entrega de la recompensa (cuadrados azules, columna izquierda), incluso en ensayos donde se omite la recompensa (columna derecha, momento en que se habría entregado la recompensa indicado por cuadrados negros). Este tipo de respuesta puede ser de tres tipos distintos: un aumento **(arriba)** o una disminución sostenida **(medio)** hasta el tiempo en que se espera la recompensa, o un pico de actividad en el momento en que espera la recompensa **(abajo)**. Los cuatro paneles corresponden a la actividad de cuatro neuronas ejemplo distintas. En cada panel, en la sección superior se muestra un *raster plot*, en el que los puntos negros representan cada potencial de acción registrado en todos los ensayos de una sesión (filas), y en la sección inferior se muestra el histograma perievento (HPE), que corresponde a la actividad neuronal promedio alineada a la presentación del estímulo visual (tiempo = 0 segundos). Adaptado de Gavornik & Bear (2014b) y Shuler & Bear (2006).

Otra característica interesante de la actividad de expectativa temporal a la recompensa en V1 es que estas respuestas se presentan a la estimulación de sólo uno de los ojos, aún en neuronas que mostraron respuestas de corta latencia binoculares **(Figura I.4.3)**.

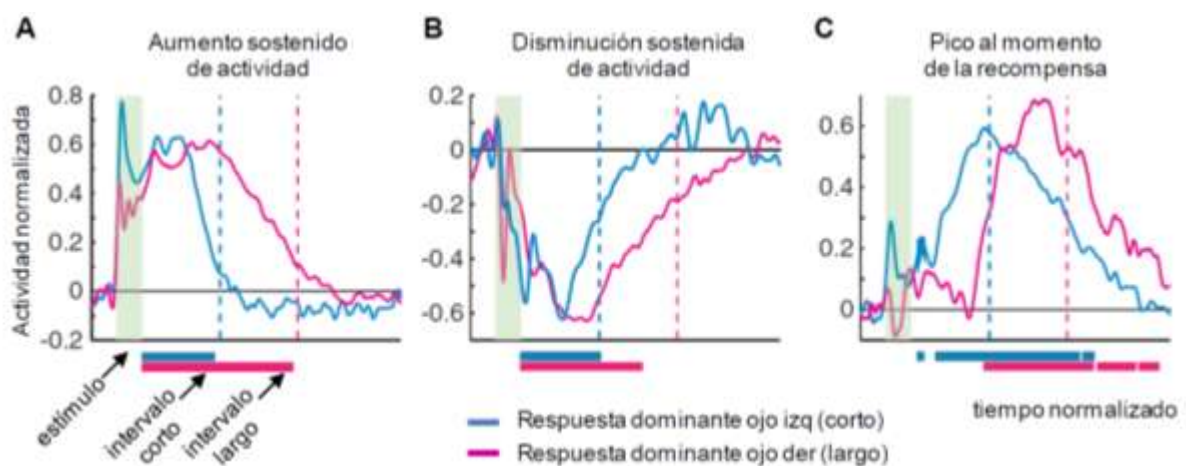


Figura I.4.3. Dos poblaciones de neuronas que reportan tiempos de recompensa diferentes según su dominancia ocular. Intervalo corto: recompensa luego de 'x' lengüeteos. Intervalo largo: recompensa luego de '2x' lengüeteos. **(A)** Promedio de neuronas que mostraron un aumento sostenido de actividad para los dos tiempos entrenados. El trazo azul corresponde a las neuronas con respuesta de larga latencia dominante al ojo izquierdo (intervalo corto), mientras que los trazos rosas lo hacen para las neuronas con respuestas dominantes al ojo derecho (intervalo largo). Las líneas punteadas muestran el momento promedio de obtención de recompensa para ambos

estímulos. Lo mismo se presenta para las neuronas que muestran una inhibición sostenida de actividad **(B)** y una respuesta de pico **(C)**. Adaptado de Shuler & Bear (2006).

La existencia de dos poblaciones de neuronas que reportan el tiempo a la recompensa de manera “ojo-específica” sugiere que los cambios plásticos ocurren localmente en V1. Modelos computacionales han propuesto que las respuestas de expectativa temporal a la recompensa pueden surgir de la interacción en V1 de una entrada sináptica que brinde información acerca del estímulo visual y otra que indique el momento en que el animal recibe la recompensa (Gavornik et al., 2009; Gavornik & Shouval, 2011). Esta señal de recompensa que llega a V1 debería ser global y acotada temporalmente.

Entonces, ¿cuál es la “señal de recompensa” necesaria para codificar la expectativa temporal en V1? Una candidata es la señal de dopamina, sin embargo, V1 recibe una muy pobre inervación dopaminérgica. Por el contrario, V1 está densamente inervada por proyecciones colinérgicas del *basal forebrain* (BF) (Papadopoulos et al., 1989; Robertson et al., 1990; Zilles et al., 1984). El BF proyecta a toda la corteza cerebral y ha sido implicado en la regulación de procesos cognitivos como la atención y el aprendizaje (Hasselmo, 2006; S.-C. Lin et al., 2015; Voytko, 1996). De esta manera, el sistema colinérgico posee varios atributos que lo posicionan como un buen candidato a mediar los cambios plásticos asociados con el aprendizaje por recompensa en V1. Basado en esto, se realizaron experimentos donde se demostró que rodajas aisladas de V1 pueden ser “entrenadas” a reportar intervalos temporales al asociar un pulso de estimulación eléctrica cortical con una activación corta y local de receptores colinérgicos **(Figura I.4.4A)** (Chubykin et al., 2013). Esto demuestra que V1 contiene el circuito necesario para la formación de asociaciones temporales, tal como se había propuesto en los modelos computacionales.

Además, fue demostrado de manera concluyente en estudios *in vivo* que la actividad colinérgica del BF es necesaria y suficiente para inducir en V1 la codificación del intervalo temporal entre un estímulo visual y la llegada contingente de una recompensa (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015). En experimentos en los que se lesionaron selectivamente las proyecciones colinérgicas del BF hacia V1 en ratas, se vio que las neuronas de V1 fueron incapaces de codificar un nuevo intervalo temporal entre una clave visual y la llegada contingente de la recompensa (aunque pueden seguir reportando un intervalo temporal ya aprendido) **(Figura I.4.4B)** (Chubykin et al., 2013). En contraste, las neuronas de los animales

control pudieron aprender un nuevo intervalo, distinto al aprendido inicialmente. Estos experimentos muestran el papel necesario del sistema colinérgico en el desarrollo de la señal de expectativa temporal evocada en V1 por el estímulo visual.

Por otro lado, se mostró *in vivo* que asociar una clave visual con una activación optogenética de las entradas colinérgicas del BF a V1 es suficiente para inducir una respuesta de las neuronas de V1 que se extiende hasta el tiempo de la activación optogenética (Liu et al., 2015). En estos experimentos, se expresa *channelrhodopsin-2* (ChR2) en neuronas colinérgicas del BF y se activan específicamente estas proyecciones hacia V1 mediante fibra óptica implantada en V1 (**Figura I.4.4C**). Luego del condicionamiento optogenético se vio que las respuestas neuronales en V1 mostraban las tres formas de *reward timing activity* reportadas en los experimentos comportamentales (Shuler & Bear, 2006), desde la presentación del estímulo visual hasta la activación optogenética (**Figura I.4.4D**).

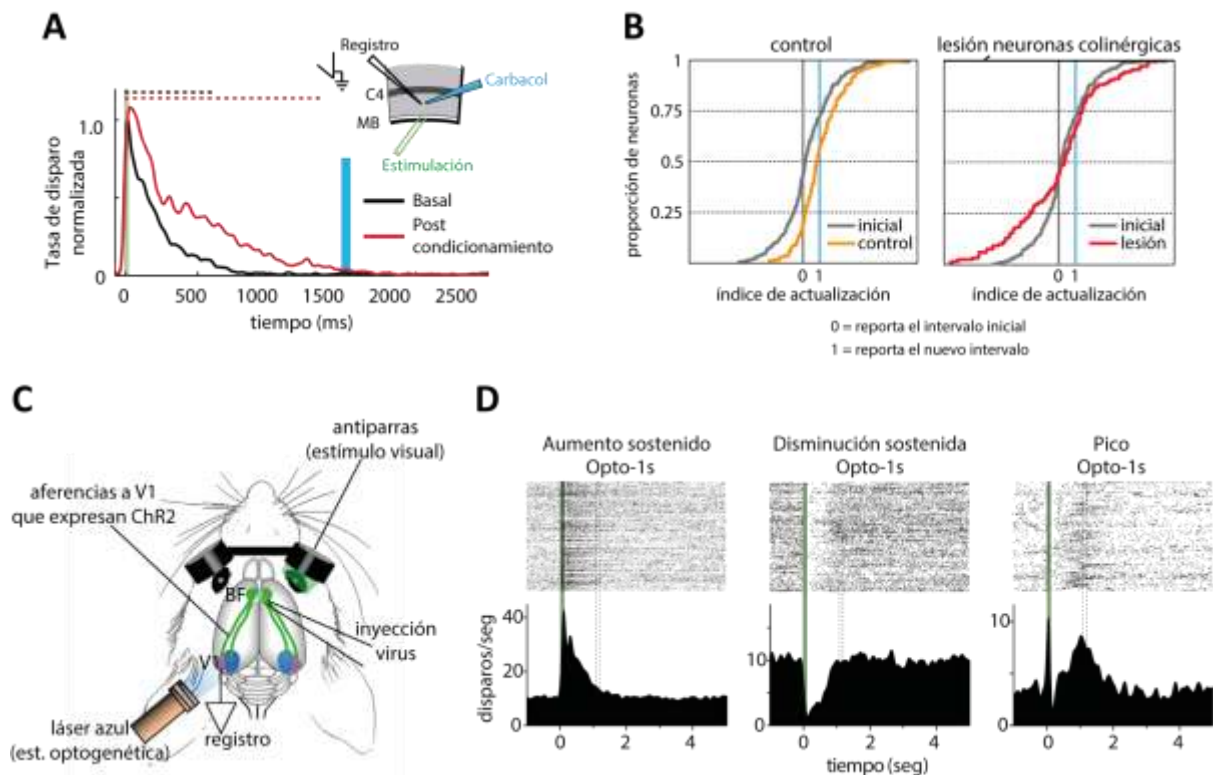


Figura I.4.4. Las proyecciones colinérgicas del BF son necesarias y suficientes para inducir en V1 la señal de expectativa temporal a la recompensa. (A) La asociación repetida de un pulso de estimulación eléctrica de la sustancia blanca con un *puff* de carbacol (un agonista colinérgico, CCh) produjo una actividad persistente evocada en rodajas de V1, aisladas *in vitro*, que coincidió con el intervalo entre los dos estímulos (estimulación eléctrica indicada con línea verde en el tiempo 0,

entrega de CCh indicada por el rectángulo azul, las líneas discontinuas muestran las duraciones promedio de las respuestas puntuadas). **(B)** Intervalo temporal a la recompensa (función de densidad acumulada) reportado por una población de neuronas registradas *in vivo* antes y después de la inyección de salina (izquierda) o una toxina que lesiona a las neuronas colinérgicas que proyectan a V1 (derecha). Se relativizó la respuesta a un primer intervalo de tiempo clave visual-recompensa aprendido (índice de actualización=0). Izquierda: control, se aprende un nuevo intervalo (índice de actualización=1). Derecha: lesión de neuronas colinérgicas de proyección del BF. **(C)** Diseño experimental utilizado en Liu et al., (2015) para la activación optogenética de las terminales colinérgicas a V1. **(D)** *Raster plots* e histogramas perievento de las respuestas evocadas por el estímulo visual (línea verde, tiempo 0 seg) luego del condicionamiento optogenético. Ejemplos de aumento sostenido (izquierda), disminución sostenida (medio) y pico (derecha) que se corresponden con el momento en el que se realizó la activación optogenética (línea punteada, 1seg). Adaptado de Chubykin et al. (2013) y Liu et al. (2015).

Así, la señal de expectativa temporal de la recompensa en V1 y la modulación llevada a cabo por las neuronas del BF se convierte en un gran modelo de estudio ya que ejemplifica una función central del cerebro: predecir el momento de ocurrencia de eventos futuros importantes para la conducta, basándose en experiencias pasadas. En entornos complejos y siempre cambiantes, los animales deben aprender qué acciones tomar, basándose en su experiencia pasada. Sin embargo, para conocer las consecuencias, a veces demoradas, de sus acciones y guiar el comportamiento futuro, es absolutamente necesario que el cerebro represente no sólo las acciones y consecuencias, sino también la información temporal sobre cuándo ocurren (Schultz et al., 1997).

Cómo se procesa esa información temporal en el cerebro es un aspecto aún no del todo comprendido. No existe un único mecanismo o área específica responsable de esta función, sino que el cerebro recurre a una diversidad de mecanismos y áreas para medir el tiempo y procesar patrones temporales. Se ha propuesto que uno de los mecanismos más generales que contribuyen al procesamiento temporal, en distintas áreas y tareas, se basa en propiedades intrínsecas de las neuronas y los circuitos neuronales; es decir, que el cerebro utiliza sus dinámicas celulares y de circuito para resolver una diversidad de cálculos temporales (Buonomano & Maass, 2009; Paton & Buonomano, 2018). En este sentido, se han identificado dinámicas de actividad neuronal a nivel poblacional que permiten una robusta representación temporal en múltiples áreas del cerebro, incluyendo al hipocampo

(MacDonald et al., 2011; Pastalkova et al., 2008), las cortezas prefrontal (J. Kim et al., 2013; Xu et al., 2014), parietal (Janssen & Shadlen, 2005; Leon & Shadlen, 2003) y motora (Lebedev et al., 2008), al cerebelo (Mauk & Buonomano, 2004), y al estriado (Adler et al., 2012; Jin et al., 2009; Matell et al., 2003; Mello et al., 2015).

Tradicionalmente, se asumía que la codificación de la información del “cuándo” (señal de expectativa temporal) de una posible recompensa tenía lugar exclusivamente en áreas del cerebro de alto nivel jerárquico (Egorov et al., 2002; Fuster & Alexander, 1971; Komura et al., 2001; Leon & Shadlen, 2003; Schultz et al., 1997; Watanabe & Funahashi, 2004). No obstante, el hecho de que esta señal también se exprese en V1 resulta de gran relevancia ya que no sólo demuestra presencia de plasticidad en la adultez sino que además desafía la visión clásica del rol de V1. En particular sugiere que este tipo de funciones podrían estar presentes en etapas tempranas del procesamiento sensorial y que los circuitos corticales son, en sí mismos, capaces de codificar información temporal (Chubykin et al., 2013; Goel & Buonomano, 2016; Johnson et al., 2010).

Dada la importancia del BF en la modulación de la señal de expectativa temporal en V1, así como su rol clave en la regulación de funciones cognitivas, en esta tesis nos centraremos en sus propiedades de codificación a lo largo del proceso de aprendizaje. En la siguiente sección, profundizaremos en la caracterización anatómica y funcional de esta región cerebral.

I.5. Basal Forebrain

I.5.A. Núcleos que lo componen y conectividad

El BF es uno de los centros neuromoduladores más importantes y con proyecciones más amplias del cerebro de los mamíferos. Se caracteriza por proyectar hacia toda la corteza cerebral, promover la activación cortical (Jones, 2003, 2004; Moruzzi & Magoun, 1949; Semba, 2000) y regular funciones cognitivas como la atención, el aprendizaje, la memoria y la saliencia motivacional (DeLong, 1971; S.-C. Lin & Nicolelis, 2008; Richardson & DeLong, 1991; Voytko et al., 1994; Voytko, 1996; Wilson & Rolls, 1990). Además, esta región ha sido implicada en diversas enfermedades neurodegenerativas: se ha propuesto que la degeneración del BF es un evento temprano asociado con la enfermedad de Alzheimer

(Grothe et al., 2012; Whitehouse et al., 1982), otras formas de demencia (Cummings & Benson, 1984) y el envejecimiento cognitivo normal (Gallagher & Colombo, 1995).

El BF es una estructura compleja tanto en su anatomía como en su composición neuroquímica; su organización sigue siendo objeto de estudio a medida que se desarrollan y aplican nuevas técnicas, como la identificación de tipos neuronales específicos mediante optogenética (S.-C. Lin et al., 2015; Zaborszky, 2002). No se trata de una estructura monolítica, sino que es una constelación de núcleos discretos que se sitúan cerca de las superficies medial y ventral de los hemisferios cerebrales (Gielow & Zaborszky, 2017; Rye et al., 1984; Zaborszky et al., 2012) (**Figura I.5.1**).

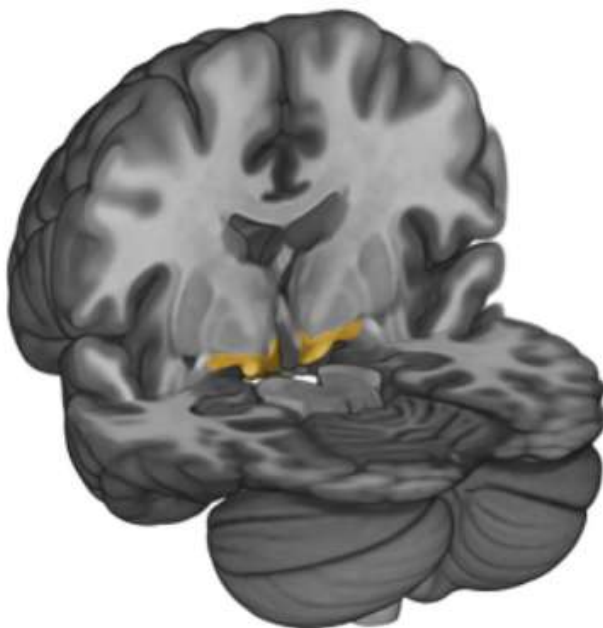


Figura I.5.1. El conjunto de núcleos que conforman el *basal forebrain* se ubica en las superficies medial y ventral de los hemisferios del cerebro. La ubicación aproximada es mostrada en el esquema. Adaptado del capítulo 29 del libro "*Conn's Translational Neuroscience*" (Pessoa, 2017).

Históricamente, la notable pérdida de función colinérgica en la enfermedad de Alzheimer llevó al estudio exhaustivo del sistema colinérgico del BF y su rol en la memoria. Como resultado, las subdivisiones anatómicas de este sistema se han definido en función de la distribución de sus neuronas colinérgicas de proyección. Así, el término "*basal forebrain*" se volvió sinónimo de sistema colinérgico, y los núcleos que lo componen son el núcleo septal medial (MS), los núcleos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca (VDB y HDB, respectivamente), la sustancia innominada (SI) y el núcleo basal de Meynert (NB) (**Figura I.5.2**). Estas regiones dan origen a proyecciones ascendentes que inervan

extensamente toda la corteza cerebral (Zaborszky et al., 2015), el bulbo olfatorio, el hipocampo, el tálamo (Bickford et al., 1994; Gritti et al., 1998; Jourdain et al., 1989; Mesulam et al., 1992; Okoyama et al., 1987; Parent et al., 1988), y la amígdala (Mesulam et al., 1992; Unal et al., 2015), así como también a proyecciones descendentes que inervan el hipotálamo (Gritti et al., 1994) (**Figura I.5.2**).

Sin embargo, otras investigaciones demostraron que las neuronas de proyección del BF también liberan otros neurotransmisores como GABA y glutamato (Brashear et al., 1986; Freund & Gulyás, 1991; Freund & Meskenaite, 1992; Gritti et al., 1993; Henny & Jones, 2008; Hur & Zaborszky, 2005).

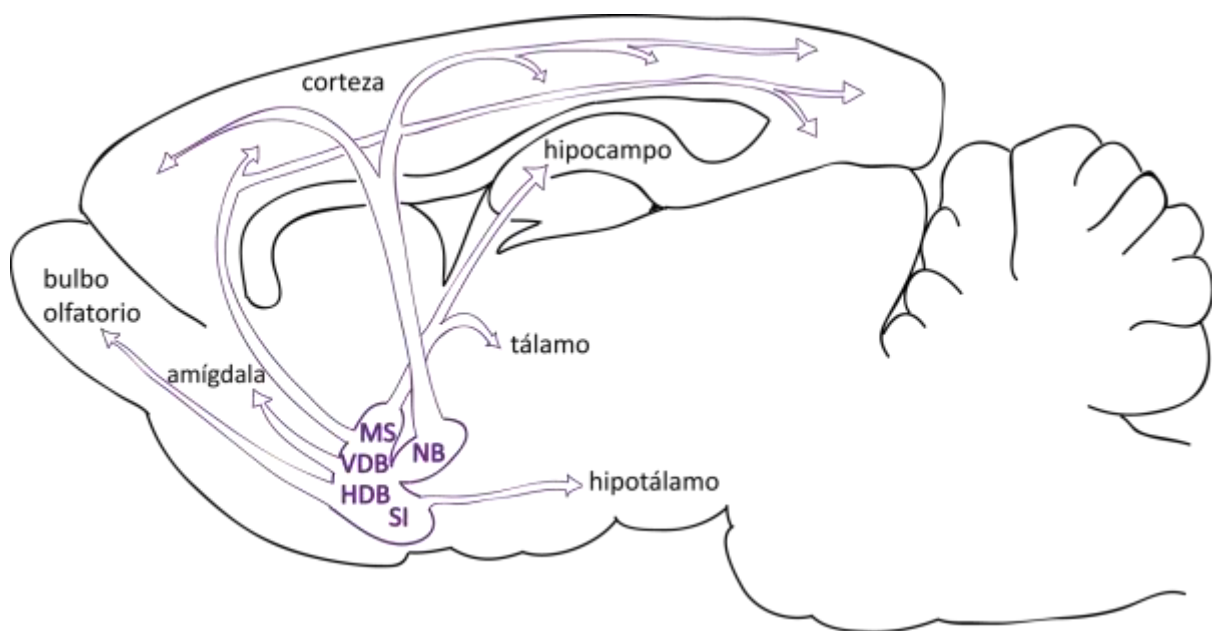


Figura I.5.2. Esquema de las proyecciones colinérgicas del BF. Se esquematiza un corte sagital de cerebro de ratón mostrando la ubicación de los distintos núcleos que componen el BF y las regiones cerebrales a las que proyectan sus neuronas colinérgicas. MS, núcleo septal medial; NB, núcleo basal de Meynert; VDB, núcleo vertical de la banda diagonal; HDB, núcleo horizontal de la banda diagonal; MS, núcleo septal medial; SI, sustancia innominada. Adaptado de Woolf & Butcher, (2011).

Por otro lado, las principales aferencias del BF provienen del *locus coeruleus* (LC) (Zaborszky et al., 1993), de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) y el área tegmental ventral (VTA) (Gaykema & Zaborszky, 1996; Zaborszky & Cullinan, 1996), de varios núcleos del hipotálamo (Cullinan & Zaborszky, 1991; Wu et al., 2004; Zaborszky & Cullinan, 1989), del núcleo accumbens (NAc) (Zaborszky & Cullinan,

1992), de la amígdala (Jolkkonen et al., 2002; Paré & Smith, 1994; Zaborszky et al., 1984), la corteza prefrontal (Zaborszky et al., 1997) y el tálamo (Do et al., 2016; Gielow & Zaborszky, 2017a; Hu et al., 2016) (**Figura I.5.3**).

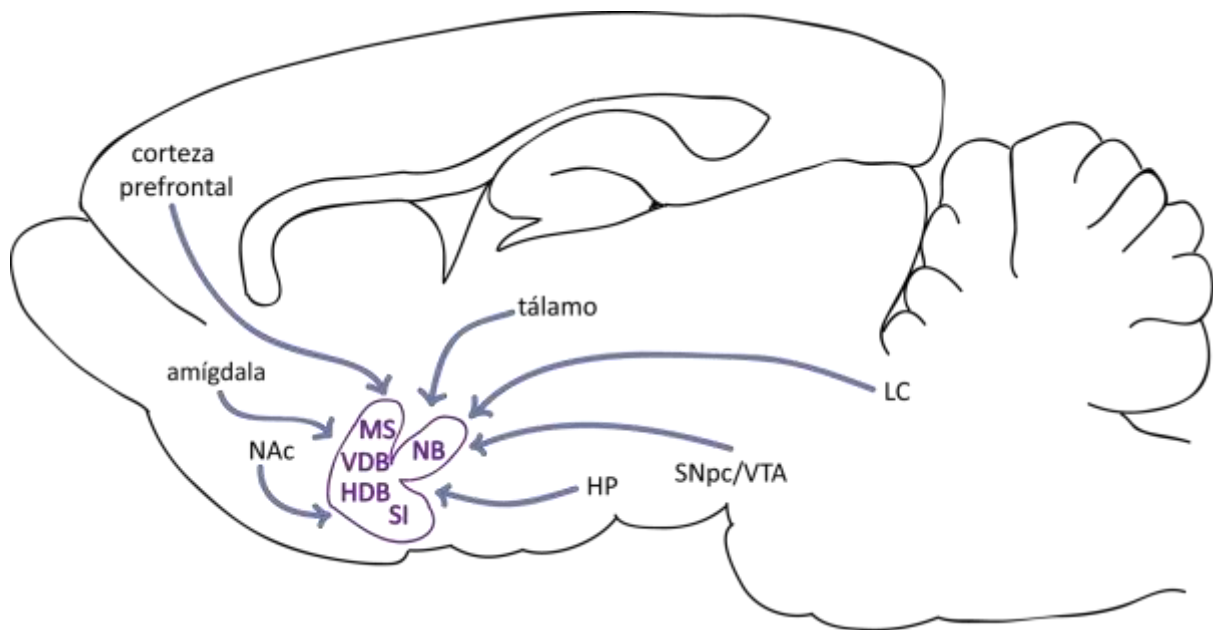


Figura I.5.3 Esquema de las aferencias del BF. Se esquematiza un corte sagital de cerebro de ratón mostrando las principales áreas del cerebro que proyectan hacia el BF. MS, núcleo septal medial; NB, núcleo basal de Meynert; VDB, núcleo vertical de la banda diagonal; HDB, núcleo horizontal de la banda diagonal; MS, núcleo septal medial; SI, sustancia innominada; HP, hipotálamo; SNpc, sustancia negra pars compacta; VTA, área tegmental ventral; LC, *locus coeruleus*. Adaptado de Woolf & Butcher (2011).

I.5.B. Funciones

Si bien se ha identificado que el BF proyecta hacia la corteza a través de distintos tipos neuronales —incluyendo poblaciones GABAérgicas y glutamatérgicas—, el conocimiento sobre la función específica de estas poblaciones no colinérgicas sigue siendo limitado. En contraste, las neuronas colinérgicas han sido objeto de numerosos estudios, tanto por su papel modulador en diversas funciones cognitivas como por su relevancia en modelos de plasticidad cortical y aprendizaje. En esta subsección, revisaremos principalmente las funciones atribuidas a las proyecciones colinérgicas del BF, que constituyen, hasta el momento, la vía mejor caracterizada desde el punto de vista funcional.

I.5.B.I. Rol en procesos de sueño, vigilia y atención

Históricamente el BF ha sido implicado en el control del ciclo sueño-vigilia (Moruzzi & Magoun, 1949; Saper et al., 2010). La actividad neuronal en esta región varía según el estado de sincronización cerebral (Alam et al., 1997; Duque et al., 2000; Hassani et al., 2009; Lee et al., 2004; Szymusiak & McGinty, 1989; Takahashi et al., 2009), y su papel en la regulación del sueño y la vigilia ha sido demostrado mediante estudios de lesiones, estimulación eléctrica y manipulaciones farmacológicas (Kaur et al., 2008; McGinty & Sterman, 1968; Szymusiak & McGinty, 1986). En particular, se ha observado que la estimulación del BF provoca una "desincronización" de la actividad cortical evidente en el electroencefalograma. Las neuronas colinérgicas del BF se encuentran activas durante la vigilia y el sueño REM, y se silencian en el sueño no REM. Por lo tanto, se considera que cumplen un rol central en la promoción de la vigilia y el sueño REM, mientras que su inactividad favorece la aparición del sueño no REM. También, se ha demostrado que las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas de proyección son importantes en el control del ciclo sueño-vigilia (Brown & McKenna, 2015; T. Kim et al., 2015).

Además, se ha observado que las neuronas colinérgicas del BF están involucradas en el control de procesos de alerta (Buzsaki et al., 1988; Richardson & DeLong, 1991) y atención (Everitt & Robbins, 1997; Sarter et al., 2009). Se ha reportado que tareas demandantes de atención llevan a un aumento de acetilcolina en la corteza (Parikh et al., 2007) y que estas tareas se ven afectadas como consecuencia del bloqueo farmacológico o las lesiones del sistema colinérgico (McGaughy et al., 1996, 2002). Se postula que la activación colinérgica induce una activación cortical rápida y una desincronización en las cortezas sensoriales (Buzsaki et al., 1988; Eggermann et al., 2014; Kalmbach et al., 2012; Metherate et al., 1992; Pinto et al., 2013), permitiendo una mayor capacidad de atención y discriminación sensorial.

I.5.B.II. Rol en procesos de plasticidad cortical, aprendizaje y memoria

Varios estudios han establecido que el sistema colinérgico del BF se encuentra involucrado en procesos de plasticidad cortical, aprendizaje y memoria (Q. Gu, 2003; Morishita et al., 2010; Rasmusson, 2000). Las lesiones o las manipulaciones farmacológicas del sistema colinérgico afectan el aprendizaje en tareas de memoria espacial, memoria de trabajo y otras tareas mnemotécnicas (Everitt & Robbins, 1997; McGaughy et al., 2000).

La activación colinérgica puede modificar la fuerza, el signo y los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad sináptica (Z. Gu et al., 2012; Z. Gu & Yakel, 2011; Seol et al., 2007), y de esta manera favorecer la plasticidad de los campos receptivos en cortezas sensoriales (Disney et al., 2007; Froemke et al., 2013; Kilgard & Merzenich, 1998). Se propone que a través de estos mecanismos, las neuronas colinérgicas que proyectan a la corteza sensorial podrían potenciar el aprendizaje y, en consecuencia, mejorar el rendimiento conductual.

En particular, numerosos trabajos han analizado la actividad de las neuronas del BF en animales realizando tareas comportamentales, permitiendo estudiar cuándo se activan estas neuronas durante el comportamiento y qué variables cognitivas señalizan. A continuación desglosaremos esto en más detalle:

Codificación de recompensas

Estudios *in vivo* han demostrado que las neuronas del BF responden ante la presentación de recompensas inesperadas (Santos-Benitez et al., 1995; Wilson & Rolls, 1990). En estos experimentos, sin embargo, no se habían identificado los tipos neuronales específicos involucrados. Trabajos posteriores mostraron que ciertas neuronas no colinérgicas del BF codifican recompensas y saliencia motivacional mediante respuestas fásicas en ráfagas, por lo que han sido denominadas neuronas “codificadoras de saliencia” o “en ráfaga” (Avila & Lin, 2014b, 2014a; S.-C. Lin & Nicolelis, 2008; Manzur et al., 2023). Se ha propuesto que esta señal del BF contribuye a modular la representación cortical de estímulos relevantes y a facilitar la toma de decisiones, actuando como un mecanismo de amplificación de la información más significativa en un momento dado. Dado que la actividad de estas neuronas no muestra una modulación clara entre los estados de sueño y vigilia, se ha sugerido que no pertenecen a la población colinérgica, aunque su identidad neuroquímica aún no ha sido determinada.

Con el desarrollo de la optogenética, fue posible identificar de manera definitiva las neuronas colinérgicas en registros extracelulares. Utilizando esta técnica, se observó que las neuronas identificadas optogenéticamente como colinérgicas responden rápidamente tanto a recompensas como a castigos, con respuestas particularmente intensas frente a recompensas inesperadas. Estas observaciones se realizaron en dos núcleos del BF donde se efectuaron los registros: NB y el HDB (Hangya et al., 2015).

A partir de estos hallazgos, se propuso que el sistema colinérgico del BF emite una señal temporalmente precisa hacia amplias áreas del cerebro, y que, de este modo, podría contribuir al aprendizaje y la plasticidad actuando como una señal de refuerzo o castigo (Hangya et al., 2015). Esta hipótesis ha sido respaldada por otros trabajos que han reportado respuestas similares en las neuronas colinérgicas de los distintos núcleos que conforman el BF: HDB (Harrison et al., 2016; Laszlovszky et al., 2020; Sturgill et al., 2020), SI (Guo et al., 2019) y NB (Laszlovszky et al., 2020).

Codificación de omisión y error de predicción de recompensas

Además de su participación en la codificación de recompensas, algunos estudios han propuesto que las neuronas del BF también pueden codificar la omisión de una recompensa esperada (Robert et al., 2021; Zhang et al., 2019). Aunque esta línea de estudio aún es poco explorada, se ha reportado evidencia de este tipo de codificación en primates (Zhang et al., 2019). Por otro lado, en roedores se propone que esta capacidad de codificar omisiones podría depender del núcleo específico del BF en cuestión, ya que los distintos núcleos pueden diferenciarse en sus patrones de aferencias y eferencias y, en consecuencia, en sus funciones. En Robert et al., (2021), compararon la actividad de neuronas colinérgicas del HDB y de la sustancia innominada (SI), observando respuestas a la omisión exclusivamente en el HDB. Sin embargo, aún hay poca bibliografía al respecto y no queda claro el rol del BF en la codificación de omisiones.

Adicionalmente, trabajos recientes han propuesto que las neuronas colinérgicas del BF, particularmente del HDB, codifican errores de predicción (Hegedüs et al., 2023; Sturgill et al., 2020; Zhang et al., 2019). En estos trabajos, se ha demostrado que cuando se asocian distintas claves con distintas probabilidades de recompensa, estas neuronas responden con mayor intensidad a aquellos estímulos que predicen recompensas de alta probabilidad, mientras que sus respuestas a la recompensa en sí disminuyen cuanto más predecible es dicha recompensa. Se propone que la señal de error de predicción del sistema colinérgico del BF funciona de manera paralela y complementaria a la señal del sistema dopaminérgico de la VTA y SNpc (previamente descrita en la sección I.1.D).

Codificación de estímulos condicionados

En cuanto al rol de las neuronas del BF en procesos de aprendizaje asociativo, estudios previos en monos (Richardson & DeLong, 1990; Wilson & Rolls, 1990) y ratas (Whalen et al., 1994) han demostrado que ciertos subgrupos de neuronas del BF responden tanto a claves asociadas a recompensas como a castigos, lo que sugiere la codificación de la saliencia motivacional de esos estímulos.

Trabajos posteriores en los que se ha podido determinar el tipo neuronal mediante optogenética han demostrado que las neuronas colinérgicas, además de representar una señal de refuerzo que facilita procesos de plasticidad, cumplen un rol importante en tareas de discriminación y aprendizaje al codificar información relacionada al estímulo que predice un refuerzo. Sin embargo, existen inconsistencias respecto a esta propiedad de codificación del BF. Las respuestas de las neuronas colinérgicas del BF a estímulos sensoriales han sido descritas como completamente ausentes (Hangya et al., 2015), presentes únicamente para aquellos que predicen una recompensa (Crouse et al., 2020; Harrison et al., 2016; Kuchibhotla et al., 2017, 2017; Parikh et al., 2007; Robert et al., 2021), o aumentadas tras el aprendizaje por refuerzo, e incluso presentes ante estímulos neutros (Guo et al., 2019).

En tareas de discriminación olfativa, las neuronas colinérgicas del BF muestran habituación durante la exposición pasiva a olores, pero mantienen su respuesta cuando el estímulo predice una recompensa. Tras el aprendizaje, discriminan entre olores reforzados y no reforzados, y su inhibición deteriora el desempeño, lo que evidencia su rol esencial en el aprendizaje asociativo (Zhou et al., 2022). En contraste, las neuronas GABAérgicas del BF participarían en la discriminación innata de olores, pero no en la basada en aprendizaje (De Saint Jan, 2022; Nunez-Parra et al., 2013; Villar et al., 2021; Zhou et al., 2022).

Por último, en relación con otro tipo neuronal del BF, se ha propuesto que la actividad de las neuronas no colinérgicas identificadas como “codificadoras de saliencia” en el estudio de Lin y Nicolelis (2008) no responden a estímulos sensoriales antes del aprendizaje asociativo. No obstante, estas neuronas muestran respuestas cuando el estímulo adquiere un valor motivacional, es decir, cuando se asocia con un evento significativo como una recompensa (Avila & Lin, 2014b, 2014a; S.-C. Lin & Nicolelis, 2008; Manzur et al., 2023).

I.5.B.III. Rol de la acetilcolina en la plasticidad sináptica en V1

El sistema colinérgico, que utiliza la acetilcolina (ACh) como neurotransmisor, es particularmente relevante en procesos de plasticidad en V1 debido a que inerva ampliamente esta región y modula la eficacia sináptica. Se ha demostrado que en V1, la ACh puede inducir mecanismos de potenciación y depresión sináptica a largo plazo (LTP/LTD) a través de receptores muscarínicos, en estudios *in vitro* (Kirkwood et al., 1999; Kojic et al., 2001; Seol et al., 2007). Además, la aplicación de ACh *in vivo* asociada con un estímulo visual es suficiente para cambiar la selectividad de orientación de neuronas de V1 (Greuel et al., 1988) y mejorar la codificación cortical de escenas naturales (Goard & Dan, 2009).

Además de los efectos agudos de la ACh, un gran número de estudios ha demostrado que la activación colinérgica repetida en V1 también puede potenciar la percepción visual. La asociación repetida de un estímulo visual con la liberación de ACh mejora varias capacidades visuales, tales como la sensibilidad al contraste (Hua et al., 2010; Mayer, 1983), la detección de movimiento (Rokem & Silver, 2010), la memoria de trabajo (Bentley et al., 2004; Furey et al., 2000) y la agudeza visual (Kang et al., 2014), tanto en humanos como en animales.

Diversos estudios han sugerido que la proyección colinérgica del BF hacia V1 podría actuar como una señal de refuerzo capaz de facilitar el aprendizaje de asociaciones entre claves visuales y recompensas (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015). En este contexto, se ha observado que ciertas respuestas neuronales en V1 reflejan no solo propiedades físicas del estímulo, sino también su valor adquirido a través de la experiencia. Así, se propone que la inervación colinérgica del BF podría contribuir a este proceso mediante la modulación sináptica dependiente de la actividad reciente, actuando como una señal que favorece la plasticidad en sinapsis previamente activadas. Sin embargo, aún se desconoce cómo se comportan las neuronas del BF durante el aprendizaje de este tipo de tareas. En este trabajo de tesis nos propusimos caracterizar la codificación neuronal en el BF durante el aprendizaje de una tarea en la que una clave visual predice la entrega de una recompensa, con el objetivo de entender cómo estas neuronas responden a estímulos y reforzadores, cómo evolucionan sus respuestas a lo largo del aprendizaje, y cómo podrían relacionarse temporalmente con la codificación en áreas sensoriales como V1. Este enfoque busca aportar al entendimiento de los mecanismos mediante los cuales el cerebro asigna

relevancia a la información sensorial, regula el aprendizaje y guía la conducta basada en predicciones sobre eventos significativos.

OBJETIVOS

El **objetivo general** en el que se enmarca esta tesis es el de estudiar la interacción entre sistemas sensoriales y de recompensa en la formación de comportamientos adaptativos. Estudios previos han demostrado que luego del aprendizaje de una asociación entre una clave visual y una recompensa futura una fracción de las neuronas de V1 pasa de reportar únicamente las características físicas del estímulo a reportar el intervalo temporal entre ambos eventos (Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015). A su vez, se ha demostrado que las proyecciones colinérgicas del BF son necesarias y suficientes para inducir en las neuronas de V1 esta actividad de expectativa temporal a la recompensa (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015). El BF es una de las principales fuentes de neuromodulación cortical y juega un rol fundamental en procesos atencionales, de aprendizaje y plasticidad sináptica. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo evolucionan sus propiedades de codificación durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada y cómo esta actividad estaría induciendo la actividad de expectativa temporal en V1. En esta tesis, llevamos a cabo registros electrofisiológicos en animales durante la realización de una tarea operante recompensada guiada por una clave visual, y analizamos la respuesta de neuronas de V1 y del BF. De esta forma, articulamos nuestro trabajo bajo los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Demostrar que las neuronas de V1 desarrollan señales de expectativa temporal a la recompensa en una tarea operante adaptada para ratones que permanecen con la cabeza fija (*head-fixed*). En los estudios originales que describieron la actividad de estimación temporal en V1 (Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015), se utilizó una tarea comportamental autoiniciada en ratas con libertad de movimiento (*freely moving*). En esta tesis, nos proponemos adaptar dicha tarea para realizarla en ratones y en condiciones *head-fixed*, quitándole el carácter de autoiniciación. Este objetivo busca demostrar que, incluso bajo estas condiciones modificadas, los animales aprenden la tarea y que las neuronas de V1 desarrollan una señal de expectativa temporal similar a la previamente reportada.

Objetivo específico 2: Determinar el rol de las neuronas del BF en la codificación de estímulos visuales durante el aprendizaje de una tarea operante. Aunque diversos estudios

han descripto respuestas sensoriales en neuronas del BF, particularmente en poblaciones colinérgicas, sus resultados son contradictorios. Algunos trabajos no observaron respuestas ante estímulos sensoriales (Hangya et al., 2015), mientras que otros observaron respuestas específicas a sonidos asociados con una recompensa (Crouse et al., 2020; Harrison et al., 2016; Kuchibhotla et al., 2017; Parikh et al., 2007). Estas discrepancias evidencian que aún no está claro cómo las neuronas del BF codifican los estímulos sensoriales y cómo esta codificación evoluciona durante el aprendizaje. Además, la mayoría de los estudios se han enfocado en estímulos auditivos, por lo que se conoce poco sobre su respuesta a estímulos visuales. En este contexto, nos proponemos evaluar la presencia de respuestas a estímulos visuales en las neuronas del BF y caracterizar su evolución a lo largo del aprendizaje. *Nuestra hipótesis de trabajo* es que las neuronas del BF responden al estímulo visual y que dichas respuestas se incrementan a lo largo del aprendizaje a medida que el animal aprende la asociación entre dicho estímulo y la recompensa.

Objetivo específico 3: Determinar de qué manera las neuronas del BF codifican las recompensas y su omisión, y cómo estas señales evolucionan durante el aprendizaje. En animales entrenados, se ha demostrado que las neuronas del BF responden a la recompensa mostrando una mayor respuesta ante aquellas que son más sorprendidas (Hangya et al., 2015, S.-C. Lin & Nicolelis, 2008). Sin embargo, se desconoce si la actividad neuronal cambia gradualmente a lo largo del aprendizaje. *Nuestra hipótesis de trabajo* es que la respuesta de las neuronas del BF evoluciona a lo largo del aprendizaje, disminuyendo la codificación de la recompensa a medida que el animal consolida la asociación estímulo-recompensa.

Además, nos proponemos determinar si estas neuronas del BF codifican la omisión de recompensas esperadas. Este fenómeno ha sido poco explorado (Robert et al., 2021; Zhang et al., 2019) y podría reflejar mecanismos de detección de errores de predicción, relacionados con la capacidad de anticipar la recompensa. *Nuestra hipótesis* es que, si existe una señal de omisión, su aparición será más probable una vez que el animal haya consolidado la expectativa de recompensa.

MATERIALES Y MÉTODOS

M.1. Animales

Se utilizaron ratones macho adultos de la cepa C57BL/6, de aproximadamente 3 meses de edad y un peso corporal de entre 25 y 30 gramos. El uso de animales fue llevado a cabo siguiendo las normas del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, RS617/2002) y regido por las regulaciones de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Res.1369-21). Todos los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO, UBA-CONICET), donde se mantuvieron con acceso a alimento y agua ad libitum, en un ciclo luz:oscuridad de 12:12hs, con climatización frío-calor centralizada y supervisión por técnicos capacitados.

Los animales fueron implantados de forma crónica con electrodos de registro en V1 y HDB. Luego de esto, se los aisló en jaulas individuales. Además, tras una semana de recuperación postquirúrgica, se les dio acceso restringido al agua (1ml de agua por día), controlando que su peso no descendiera por debajo del 80% del valor previo a la cirugía.

En esta tesis fueron utilizados 15 ratones. De los 15 ratones, 4 fueron utilizados para un experimento con marcador retrógrado. Los otros 11 ratones fueron utilizados para los análisis comportamentales e implantados con electrodos. De los 11, 5 fueron utilizados para el análisis de la actividad neuronal en V1 y 6 fueron utilizados para el análisis de la actividad neuronal en el HDB.

M.2. Restricción de agua

Los animales fueron entrenados a aprender una tarea operante recompensada para la cual optamos por utilizar agua como recompensa. Sin embargo, para aumentar su valor, se implementó una restricción hídrica previa.

Los animales fueron sometidos a una cirugía para la implantación crónica de electrodos. Luego de la intervención, se los dejó recuperar durante al menos cinco días, controlando que recuperaran su peso corporal previo a la cirugía. Finalizado este período de recuperación, se inició el protocolo de restricción hídrica necesario para aumentar el valor reforzante del agua durante la tarea. El primer día del protocolo, 48hs antes del inicio del

entrenamiento, se retiró el agua de la jaula. En los días siguientes, se les entregó 1 ml de agua por día. El agua obtenida durante la tarea se complementó con una ración adicional al final del día para alcanzar el volumen diario requerido, controlando que su peso esté por encima del 80% del peso registrado al inicio de la restricción. Además del control de peso, se monitorearon indicadores de deshidratación con el fin de garantizar una buena calidad de vida para los animales.

M.3. Tarea conductual

Una vez recuperados de la cirugía, y antes de empezar el entrenamiento, se habituó a los animales al puesto de conducta donde luego fueron entrenados. Los animales se encuentran con la cabeza fija (*head-fixed*) y sobre un rodillo que les permite moverse libremente (**Figura M.3.1A-C**). El puesto cuenta con un tubo donde los animales pueden lamer para obtener agua; frente al tubo se coloca un haz de luz infrarroja que detecta los lengüeteos o *licks*. La clave visual es presentada a través de unas antiparras/gafas removibles colocadas justo frente a los ojos del animal y se trata de un flash de luz de 100 ms de duración (LED verde). La habituación se realiza mínimo dos días antes de comenzar el entrenamiento y tiene como objetivo que los animales se habitúen a estar con la cabeza fija y a caminar sobre el rodillo. El proceso apunta a que puedan pararse, caminar o correr libremente sobre el rodillo sin perder estabilidad, con el fin último de que se sientan cómodos sobre esa superficie. Luego se busca que se habitúen a la presencia de las antiparras frente a sus ojos. Una vez alcanzado esto, se mantuvo a los animales con acceso restringido al agua por dos días previo a comenzar el entrenamiento

La tarea conductual consiste en un condicionamiento operante y posee un intervalo entre ensayos de 4 segundos (IEE), en el cual el animal no puede realizar lengüeteos o *licks*. Si el animal lengüetea durante el IEE es penalizado mediante el reinicio de dicho intervalo. Transcurridos los 4 segundos, los animales reciben la clave visual, luego de la cual se requiere que realicen un mínimo de cinco *licks* para obtener una gota de agua (5.5 μ l) como recompensa. Solo el 70% de los ensayos correctos (con la secuencia requerida de *licks* completa) son recompensados (**Figura M.3.1D**), en el 30% restante se omite la recompensa. Este tipo de diseño permite diferenciar respuestas de expectativa respecto de respuestas a

la recompensa *per se*. El IEE comienza luego del último *lick*. En el caso de los ensayos correctos no recompensados, el último *lick* es llamado tiempo de abandono.

Si luego de la presentación de la clave visual, existe un intervalo entre *licks* de más de 3 segundos, el ensayo es considerado incorrecto y lo denominamos “secuencia incompleta”. Asimismo, si el animal demora más de 3 segundos en iniciar la secuencia de *licks* tras la presentación de la clave visual, el ensayo también es considerado incorrecto y lo llamamos “sin secuencia” (**Figura M.3.1D**). En ambos casos, el animal queda inhabilitado para recibir recompensa, incluso si posteriormente completa los cinco *licks*, y deberá esperar el IEE para poder recibir nuevamente la clave visual y volver a tener la posibilidad de obtener recompensa.

En cada sesión de entrenamiento, los animales deben completar un mínimo de 50 ensayos no recompensados (presentados de forma pseudoaleatoria). Idealmente, la sesión se prolonga hasta que el animal consume su volumen diario de agua (1 ml). Sin embargo, si el animal deja de realizar la tarea (definido como más de 10 ensayos incorrectos de tipo "sin secuencia" consecutivos), se interrumpe la sesión.

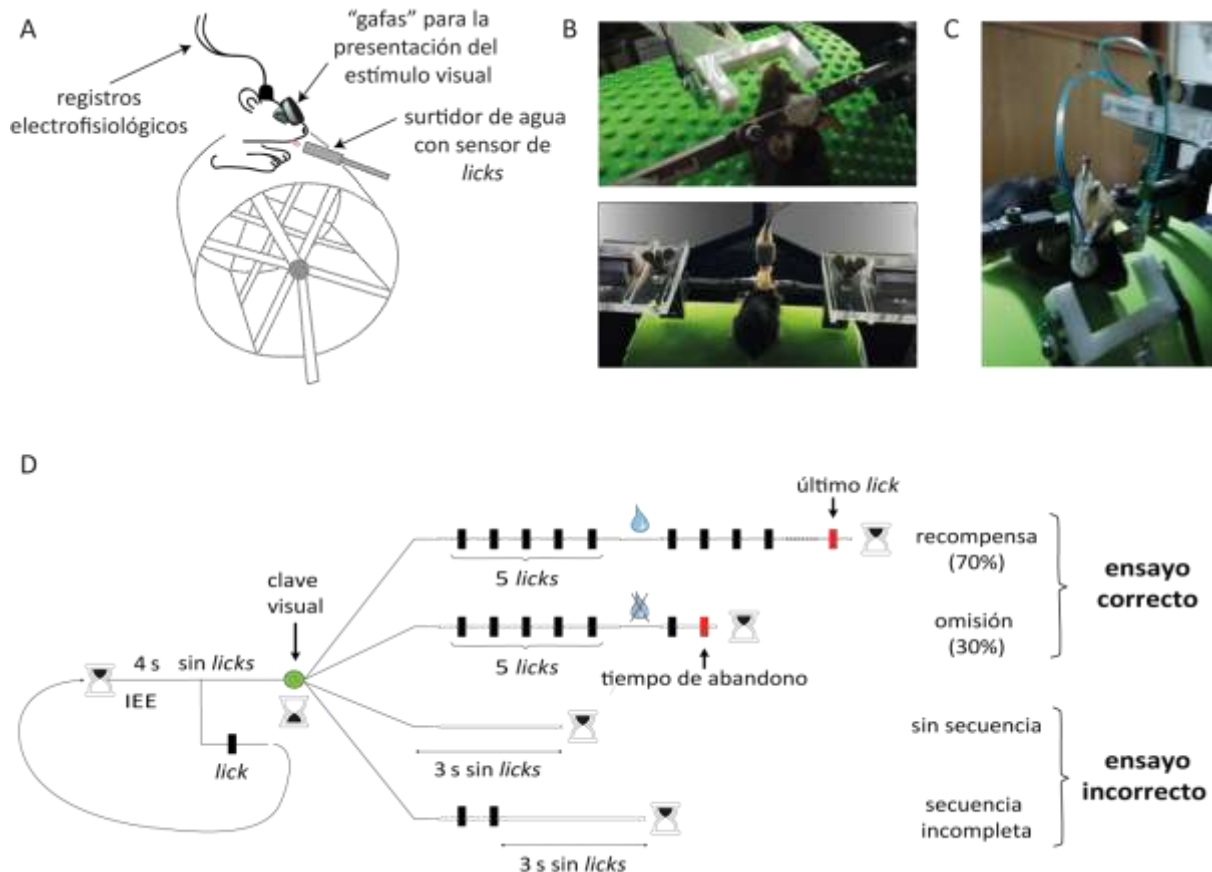


Figura M.3.1. (A) Representación esquemática del puesto de registro. **(B) Arriba:** Vista superior de un ratón con la cabeza fijada, que ilustra el mecanismo de fijación atraumática de la cabeza. **Abajo:** Vista del ratón colocado sobre un rodillo que le permite correr libremente. El animal tiene un implante crónico de tetrodos y se registra su actividad neuronal mientras realiza la tarea de condicionamiento operante. **(C)** Foto que muestra que el estímulo visual es presentado a través de unas antiparras removibles colocadas justo frente a los ojos del animal. Los *licks* fueron detectados por un haz infrarrojo ubicado frente al surtidor de agua. **(D)** Representación esquemática de la tarea operante recompensada.

M.4. Microdispositivo para el registro de la señal electrofisiológica

Los ratones fueron implantados de manera crónica con un microdispositivo de registro para la señal electrofisiológica: un multielectrodo diseñado y construido manualmente por nosotros (**Figura M.4.1**). El micromanipulador contiene una cánula guía sobre la cual se montan los tetrodos y un tornillo que permite el movimiento descendente de la cánula junto con los tetrodos. De esta forma es posible avanzar los electrodos en el eje dorso ventral con alta precisión y registrar a distintas alturas de V1 y HDB en las diferentes sesiones de registro.

Se diseñaron dos multielectrodos distintos para las dos áreas cerebrales a registrar debido a las diferencias en sus coordenadas ventrales. Se utilizaron conectores Omnetics de 16 canales para el electrodo de V1 y de 32 canales para el electrodo del HDB, compatibles con un amplificador Intan de 16 (Intan RHA2116) o 32 (Intan RHD2132) canales, respectivamente.

El multielectrodo de V1 posee cuatro tetrodos dispuestos en una configuración de 2x2, mientras que el del HDB cuenta con ocho tetrodos en una configuración de 2x4. Los tetrodos fueron fabricados con alambre de 99,95% tungsteno de 12 μ m de diámetro (California Fine Wire Company, aislación HML Natrl y dorados a 200-400 k Ω). Cada tetrodo está formado por 4 de estos alambres de tungsteno entrelazados, lo que nos permite registrar un gran número de neuronas por sitio de registro (potenciales de acción extracelulares).

En el caso del multielectrodo de V1, los tetrodos se guiaron y protegieron con cuatro tubos de poliamida (127 μ m de diámetro externo y 90 μ m de diámetro interno), los cuales fueron adheridos en pares a ambos lados de una placa radiográfica de 150 μ m de espesor,

formando la configuración de 2x2. Por otra parte, para el multielectrodo del HDB, se utilizaron ocho tubos de poliamida (los mismos usados para V1) que se pegaron entre sí en una configuración 2x4, de manera que 6mm de estos tubos sobresalen de la cánula guía, conteniendo los tetrodos en su interior. En ambos casos, los tubos de poliamida se fijaron a la cánula guía, lo que permite que los tetrodos se desplacen en el eje dorso ventral al girar el tornillo.

Para conectar los tetrodos al conector, el extremo proximal de cada alambre fue pelado manualmente y enrollado en el conector Omnetics. El extremo distal de los tetrodos se cortó a 2 mm del final de los tubos de poliamida. En el caso de V1, esta sección expuesta de los tetrodos es la que se implantará en el cerebro durante la cirugía. Para el HDB, se implantará el arreglo de poliamidas que guía los 2 mm de tetrodos que sobresalen de las mismas.

Posteriormente, las puntas de los tetrodos fueron recubiertas con una fina película de oro mediante microelectroplateado hasta alcanzar la impedancia deseada (100-200 k Ω). Como referencia se utilizaron dos secciones de alambre de níquel-cromo de 66 μ m enrolladas entre sí (A-M Systems, aislación Formvar). El extremo proximal de estos alambres se conectó al conector en la posición correspondiente a la referencia, mientras que en el extremo distal se fijó una pieza plástica que permite su anclaje al cráneo durante la cirugía. La punta de la referencia fue cortada a 2 mm de dicha pieza para garantizar que, una vez implantado el multielectrodo, quedará dentro del cuerpo calloso.

Para la conexión de tierra, se utilizó un alambre aislado soldado al conector en el pin correspondiente. En el extremo distal, este alambre fue soldado a un pin que se conecta a un tornillo implantado en la parte occipital del cráneo del animal durante la cirugía.

Por último, el día de la cirugía, cada tetrodo fue “pintado” en un colorante fluorescente (Dil: *fluorescent lipophilic cationic indocarbocyanine dye*, tinción de membrana lipofílica, Thermo-Fisher, Estados Unidos) para asegurarnos la visualización histológica del sitio de registro una vez terminado el experimento (Vandecasteele et al., 2012).

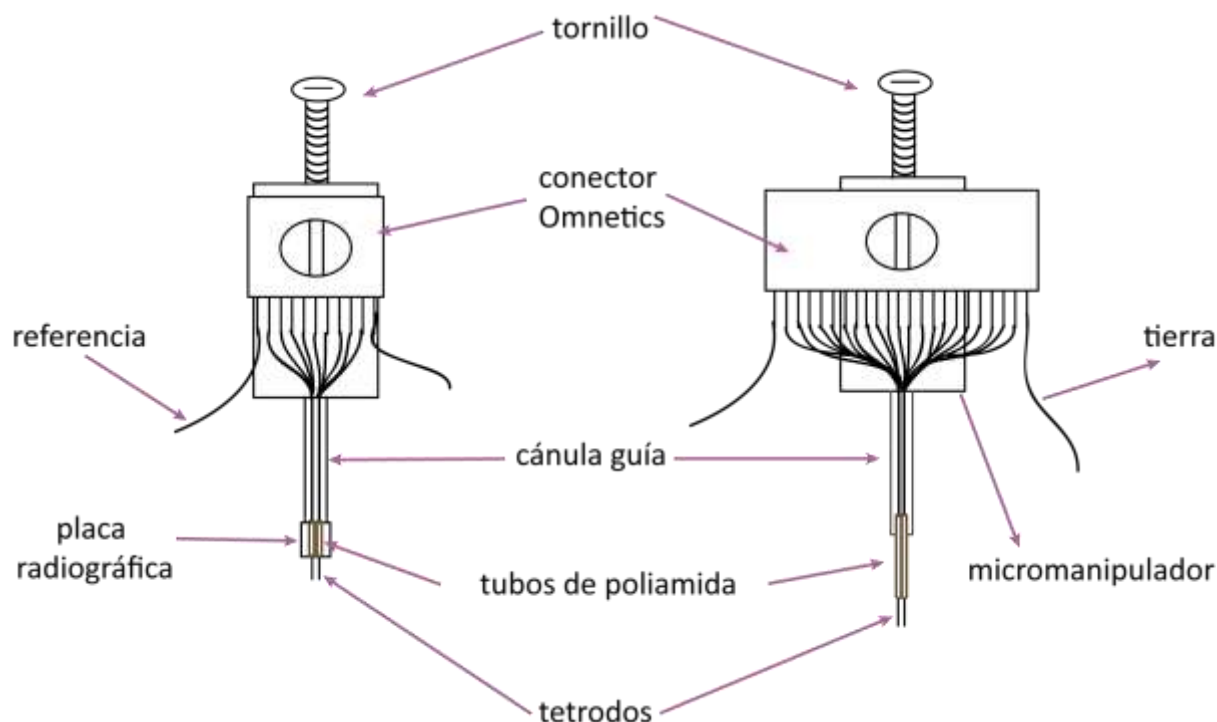


Figura M.4.1. Esquema de los microdispositivos de registro. Multielectrodo para realizar registros extracelulares en V1 (izquierda) y en HDB (derecha).

M.5. Cirugía estereotáxica para implantar los multielectrodos

Los animales fueron implantados con multielectrodos y una placa de acero (que nos permitirá fijar la cabeza de manera atraumática) de manera crónica mediante cirugía estereotáxica. Durante la cirugía, los animales fueron anestesiados con anestesia inhalatoria (Isoflurano al 1,5%) y su temperatura corporal se mantuvo entre 36 y 37°C mediante una manta térmica servo-controlada (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá). Además, durante toda la cirugía, sus ojos fueron humectados con gel oftálmico (Acrylarm - Ácido poliacrílico 0,2%, Laboratorios Poen, Argentina) para evitar que se resequen.

Después de limpiar el área de incisión con antisépticos (tres lavados con iodopovidona y tres con etanol al 70%) y despejar el área mediante el recorte del pelo, se administró un anestésico local (lidocaína) y un antiinflamatorio (dexametasona, 10 mg/kg, i.p.). A continuación, se realizó una incisión longitudinal a lo largo de la cabeza, se expuso el cráneo del animal y se limpió la zona con solución fisiológica. Luego, utilizando un torno de dentista, se realizó una craneotomía en la zona de interés a implantar el electrodo. En animales implantados en la corteza visual primaria (V1), se realizó una craneotomía en

coordenadas estereotáxicas de -2.9 mm AP; ± 2.4 mm L; -0.5 mm V (medido desde la superficie del cerebro), con un ángulo de 10° en el plano coronal. Las coordenadas se establecieron con referencia a bregma, de acuerdo con el atlas The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (2da edición, Paxinos y Franklin, 2001).

Adicionalmente, se colocaron cinco pequeños tornillos metálicos de 3 mm que se fijan al cráneo para servir como soporte del implante. El tornillo ubicado en el hueso occipital, contralateral al hemisferio donde se implantan los tetrodos, se utilizó como tierra. Este tornillo tiene soldado un pin metálico, el cual se conecta al pin hembra del electrodo.

Posteriormente, se removió la duramadre en la craneotomía y se insertaron los electrodos de registro. La zona de la craneotomía fue protegida con una pomada oftálmica estéril (Puralube vet ointment, lubricante ocular). Finalmente, se utilizó acrílico dental autocurable para fijar los multielectrodos y la placa para la fijación de la cabeza, la cual fue colocada hacia el final de la cirugía en la parte posterior del implante.

Al finalizar la cirugía, se administró flunixin (2.5 mg/kg, subcutáneo) como analgésico y antiinflamatorio. Durante los días posteriores, se monitoreó el peso de los animales, la presencia de signos de dolor y el estado del tejido alrededor del implante para evitar posibles infecciones. No se registraron infecciones postquirúrgicas en ninguno de los animales utilizados en este trabajo.

Después de la cirugía, los animales fueron aislados en jaulas individuales, para evitar que otros ratones muerdan el implante. Al cabo de una semana, todos los animales lograron recuperar su peso prequirúrgico y no presentaron alteraciones en sus capacidades sensoriales o motoras.

M.6. Determinación de coordenadas del principal núcleo del BF que proyecta a V1.

Inyección de marcador retrógrado y ensayo de inmunohistoquímica

Para determinar la región del BF que proyecta a V1, inyectamos un marcador retrógrado (microesferas de látex fluorescentes rojas, *retrobeads*, RetroBeads™ - Lumafluor Inc.) en la corteza visual primaria de 4 ratones a través de cirugía estereotáxica. Los animales fueron anestesiados con anestesia inhalatoria (Isoflurano al 1.5%) y colocados en el marco esterotáxico. Dado que los *retrobeads* poseen una baja difusibilidad, realizamos tres inyecciones, una por craneotomía, en V1 a lo largo del eje antero-posterior (AP: -2.7, -

3.16 y -3.64 mm respecto de Bregma; L: 2.7 mm respecto de Bregma; V: 0.5 mm medido desde la superficie del cerebro), en ambos hemisferios. Utilizamos una dilución 1/200, en solución salina, e inyectamos un volumen de 500 nl de solución en cada sitio de inyección.

Para realizar las inyecciones estereotáxicas del marcador retrógrado utilizamos capilares de vidrio graduados. Los capilares fueron preparados a partir de pipetas 1B100F-4 (Kwik-Fil, Borosilicate Glass Capillaries, World Precision Instruments) que fueron estiradas en un puller vertical (NARISHIGE). Luego el capilar fue graduado cada 1 mm (cada mm corresponde a 250 nl) (**Figura M.6.1**).

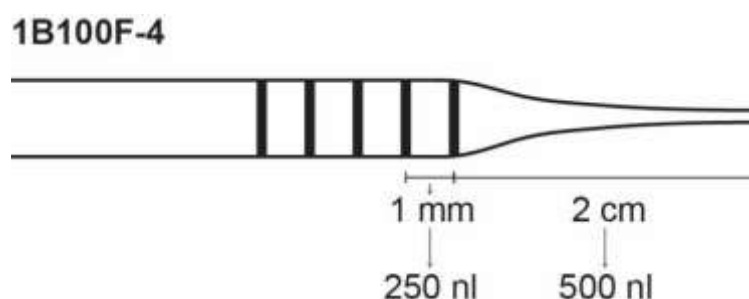


Figura M.6.1. Esquema del capilar utilizado para las inyecciones estereotáxicas de marcador retrógrado. Se esquematiza la punta de la pipeta con la graduación correspondiente. La graduación se realizó cada 1 mm, lo que corresponde a 250 nl de volumen de solución.

La inyección de la solución de *retrobeads* se llevó a cabo mediante un sistema de presión generado con una jeringa de 3 ml. Cada inyección se realizó después de mantener el capilar en la coordenada deseada durante 2 minutos antes de iniciar la administración del marcador. Bajo lupa, se aplica presión sobre el émbolo de la jeringa de forma manual con el fin de realizar una primera inyección de 250 nl. Luego, se espera un minuto y se inyectan los 250 nl de solución restante. Tras la última inyección, se espera 6 minutos y, luego de colocar una gota de solución fisiológica sobre la craneotomía, el capilar se retira lentamente. Este procedimiento se repite en cada una de las craneotomías correspondientes a los sitios de inyección. Finalmente, se procede a suturar y se coloca al animal sobre una manta térmica hasta que se recupera del efecto de la anestesia gaseosa.

Luego de tres semanas para permitir la migración del marcador retrógrado, los animales son sacrificados, los cerebros fijados y se realizan cortes seriados a lo largo de los núcleos que componen al BF con el fin de identificar las neuronas que proyectan hacia V1 y

determinar las coordenadas estereotáticas que se utilizarán en los registros electrofisiológicos.

Además, sobre los mismos cortes realizamos un ensayo de inmunohistoquímica anti-colina acetiltransferasa (ChAT, por sus siglas en inglés, *choline acetyltransferase*), que marcan las neuronas colinérgicas (color verde), facilitando la identificación de los núcleos del BF. El ensayo de inmunohistoquímica se realizó en cortes flotantes (*free-floating* IHC). Los cortes fueron lavados con buffer fosfato salino 0,1M pH 7,4 (PBS) y posteriormente bloqueados mediante incubación a temperatura ambiente en PBS Tritón X-100 0,2% y NHS 5% bajo agitación por 2 horas. Luego, los cortes fueron incubados *overnight* junto al anticuerpo primario anti-ChAT hecho en cabra (1:1000, AB 144P; Millipore) en PBS-NHS 1% en agitación a 4°C. El día siguiente, los cortes fueron lavados y luego incubados con anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra de caballo (1:400, BA-9500; Vector Laboratories) en PBS con 1% de suero de cabra normal durante 2 horas bajo agitación a temperatura ambiente. Más tarde, los cortes fueron lavados nuevamente y la marca anti-ChAT revelada mediante incubado con el conjugado estreptoavidina-isotiociano de fluoresceína (FITC, 1/400, Ref: 434311, Invitrogen), en PBS, 2 horas a temperatura ambiente. Por último, 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 evaluados y fotografiados.

Los cortes fueron observados usando un microscopio Zeiss Axio Imager M2 con software Neurolucida de MFB Bioscience, empleando filtros de fluorescencia adecuados para visualizar la marca del marcador retrógrado, que emite fluorescencia roja, y la señal del anticuerpo anti-ChAT, que fluoresce en verde.

Al colocalizar la marca verde del ensayo de inmunohistoquímica anti-ChAT con la marca roja del marcador retrógrado, se identifica la región del BF que proyecta hacia V1. De esta manera, se determinó que el núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB) es el núcleo del BF que proyecta principalmente a V1 y las coordenadas correspondientes para la implantación de los electrodos.

En animales implantados en el HDB, se realizó el mismo protocolo de cirugía estereotática descrito en la sección anterior (sección M.5), realizando una craneotomía en coordenadas estereotáticas de 0.9 mm AP; ± 1.7 mm L; -5 mm V (medido desde la superficie del cerebro), con un ángulo de 10° en el plano coronal.

M.7. Registros electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos fueron realizados con dos sistemas de adquisición: un Intan RHA2116 de 16 canales (para la señal de V1) y un Intan RHD2132 de 32 canales (para la señal de HDB). La señal es amplificada, digitalizada y enviada a la computadora de registro. Se registró la señal usando un ancho de banda de 0.1 a 3000 Hz, con un filtro *notch* de 50 Hz y se digitalizó la señal a 25 kHz. El software de registro permite ver la señal mientras se registra. Esto permite monitorear la señal antes de comenzar y durante el entrenamiento.

Al finalizar cada sesión, se descendió el arreglo de electrodos mediante la rotación del tornillo que permite el desplazamiento hacia abajo de la cánula guía de los tetrodos. Cada día, los tetrodos se desplazaron aproximadamente 37.5 μm (equivalente a 1/8 de vuelta del tornillo), con el objetivo de registrar nuevas neuronas en la sesión del día siguiente, ya que buscamos que las unidades registradas sesión a sesión sean distintas.

M.8. Registros conductuales

En simultáneo a los registros electrofisiológicos controlamos y registramos el comportamiento de los animales durante la sesión de entrenamiento.

La tarea conductual fue controlada por un microcontrolador (Arduino uno) programado para tal fin. Tal como se describió en la tarea conductual, el puesto de registro contiene un haz de luz infrarrojo que detecta los *licks* que realiza el animal en un tubo que funciona como surtidor de agua. La interrupción de este haz es interpretada por el Arduino como un *lick*. Además, el Arduino fue utilizado para el encendido de la clave visual (LED verde), la apertura y cierre de un solenoide que le entrega agua al animal de manera controlada (resolución temporal del orden de los microsegundos) y para detectar los distintos tipos de ensayos (correctos e incorrectos). Todos los eventos conductuales fueron enviados al amplificador, como una entrada digital TTL, y registrados simultáneamente con la actividad electrofisiológica. Luego, mediante un código de Matlab los eventos registrados y generados por el Arduino fueron traducidos y renombrados según a qué evento correspondiese (encendido de la clave visual, *licks*, entrega de la recompensa, ensayo correcto, ensayo incorrecto).

M.9. Análisis de datos

M.9.A. Análisis del comportamiento: parámetros comportamentales

Para analizar el desempeño comportamental de los animales durante el entrenamiento, definimos y calculamos ciertos parámetros que permiten evidenciar distintos aspectos del aprendizaje:

i) *porcentaje de ensayos correctos*: definido como el porcentaje de ensayos correctos del total de ensayos realizados (correctos + incorrectos).

ii) *porcentaje de ensayos incorrectos "sin secuencia"*: definido como el porcentaje de ensayos incorrectos sin secuencia del total de ensayos realizados.

iii) *porcentaje de ensayos incorrectos "secuencia incompleta"*: definido como el porcentaje de ensayos incorrectos con secuencia incompleta del total de ensayos realizados.

iv) *tiempo a la entrega de la recompensa*: calculado como el tiempo desde que el animal recibe el estímulo visual hasta que da el quinto *lick* (acción que lo lleva a recibir recompensa en el 70% de los casos), en los ensayos correctos recompensados.

v) *coeficiente de variación del tiempo a la recompensa*: calculamos la media del tiempo a la recompensa para cada sesión con su correspondiente desvío estándar, a partir de estos datos se calculó el coeficiente de variación (CV) para cada sesión de entrenamiento ($CV = \text{desvío estándar} / \text{media}$).

vi) *duración de la secuencia de licks*: correspondiente al tiempo que dura la secuencia de cinco *licks*. Se definió como el tiempo transcurrido entre el primer y el quinto *lick* realizados por el animal luego de la presentación de la clave visual. Este parámetro fue calculado en los ensayos correctos.

vii) *coeficiente de variación del intervalo entre licks*: se calcularon los intervalos de tiempo entre cada uno de los cinco *licks* de la secuencia en los ensayos correctos. Para cada ensayo, se obtuvo el promedio de estos intervalos, y luego se calculó la media y su desvío estándar a nivel de sesión. A partir de estos datos, se calculó el coeficiente de variación (CV) del intervalo entre *licks* para cada sesión de entrenamiento ($CV = \text{desvío estándar} / \text{media}$).

viii) *latencia al primer lick*: calculado como el tiempo desde que el animal recibe el estímulo visual hasta que da el primer *lick*. Fue calculado para ensayos correctos.

ix) *tiempo de abandono*: calculado como el tiempo desde que el animal recibe el estímulo visual hasta que da el último *lick*, luego de la secuencia de cinco *licks*, en ensayos correctos no recompensados.

x) *tiempo de abandono/tiempo a la recompensa*: definido como el cociente entre en tiempo de abandono y el tiempo a la entrega de la recompensa.

xi) *tasa de recompensa*: definida como el número de recompensas obtenidas por minuto, durante cada sesión de entrenamiento.

Finalmente, comparamos estos parámetros comportamentales para la etapa inicial y tardía del entrenamiento. Las tres primeras sesiones de entrenamiento fueron clasificadas como etapa inicial, ya que el porcentaje de ensayos correctos no alcanza el 80%. A partir de la cuarta sesión, este porcentaje alcanza o supera el 80%, por lo tanto clasificamos como etapa tardía cuatro sesiones posteriores en las que el desempeño se haya mantenido estable. Los datos correspondientes a las primeras sesiones se promediaron para cada animal, obteniendo un único valor para la etapa inicial por animal; lo mismo fue hecho para las sesiones de la etapa tardía.

M.9.B. Análisis de la señal electrofisiológica

Decidimos utilizar tetrodos para el registro de las neuronas en vez de un único alambre debido a que el tener cuatro contactos muy cercanos entre sí permite utilizar la información de cada uno para mejorar la capacidad de discriminación de la actividad extracelular de varias neuronas registradas en simultáneo (Buzsáki, 2004).

Los tetrodos son llevados a niveles bajos de impedancia (aprox 200 kOhms mediante dorado) y son capaces de registrar los potenciales de acción (PA) de las neuronas circundantes (**Figura M.9.1**). Cada tetrodo está compuesto por cuatro alambres enrollados sobre sí mismos, de manera que sus puntas se encuentran muy próximas entre sí, por lo que reciben señales ligeramente distintas provenientes de una misma neurona. Dicha variabilidad en la señal registrada por cada alambre de un tetrodo permite distinguir con alto grado de diferenciación cuáles de todos los PA registrados corresponden a una neurona única. Este procedimiento comprende la clasificación de PA o espigas (o en inglés “*spike-sorting*”) y permite detectar la actividad de neuronas únicas. Debido a que la amplitud de la

señal registrada depende de la distancia entre la neurona y la punta del alambre, las señales empiezan a ser menos diferenciables entre sí cuando provienen de distancias más lejanas.

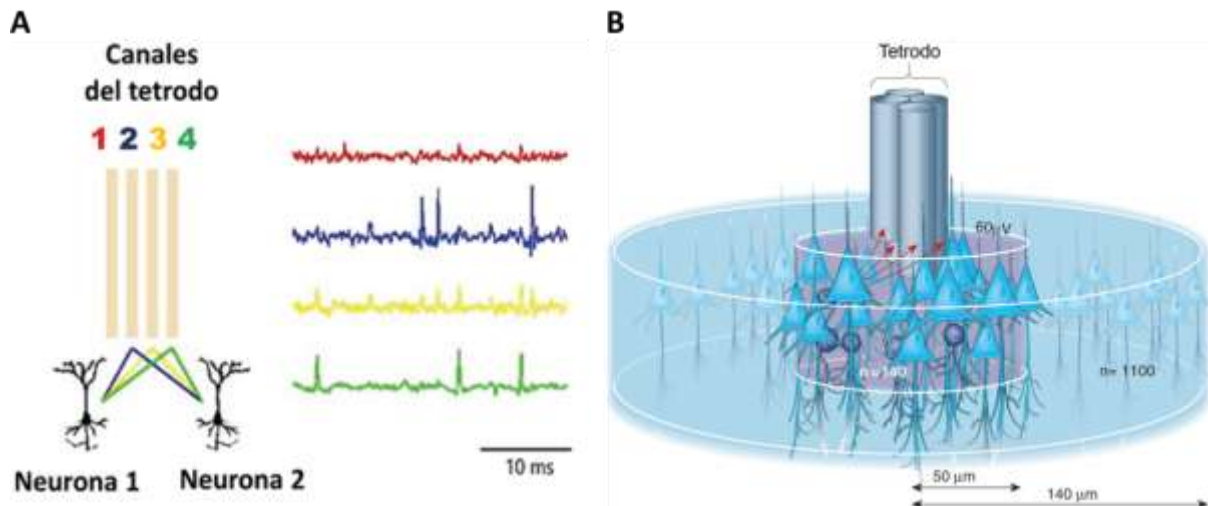


Figura M.9.1. La técnica de tetrodos permite discriminar múltiples neuronas de un mismo sitio de registro simultáneo. (A) Representación esquemática de la separación de los PA de dos neuronas únicas por comparación de amplitudes entre los 4 canales de un tetrodo. **(B)** Esquema del área estimada de registro de un tetrodo. Un tetrodo implantado puede detectar neuronas distantes hasta 140 µm de radio desde el electrodo (radio celeste). Sin embargo, debido a que la amplitud de la señal decrece exponencialmente con la distancia, solo es posible identificar mediante los métodos actuales de clasificación a las neuronas que se encuentran a menos de 50 µm de radio del tetrodo (radio rosa). La distancia entre las puntas de cada alambre y una neurona (triángulo celeste) está indicada en flechas rojas. Esquema extraído de Buzsáki, 2004.

M.9.B.I. Detección y clasificación de los potenciales de acción

Para analizar la actividad de las neuronas es necesario identificar los PA presentes en el registro y clasificarlos en unidades aisladas, que conforman las neuronas putativas. Para ello utilizamos el paquete de análisis *Klusters*, *NeuroScope*, *NDManager* desarrollado en el laboratorio de Buzsáki (Hazan et al., 2006). Este corre bajo el sistema operativo Linux, por lo que emulamos el sistema con la herramienta *Oracle VM Virtualbox* (v 6.0). Los registros obtenidos por el Intan (en archivos de 1 minuto de duración), fueron concatenados y filtrados. Para extraer los PA de la señal cruda obtenida se utilizó un filtro pasa-altos no lineal, que calcula la amplitud del ruido de base a partir de la mediana de la señal. En base a

este parámetro genera un umbral proporcional a este valor según un factor definido por el usuario, en nuestro caso 1.1. Todos los eventos que presenten un máximo o un mínimo y superen el umbral son clasificados como posibles PA de manera automática.

Una vez obtenidos los PA, por medio de un análisis de componentes principales (ACP), para disminuir la dimensionalidad de los datos, y de las amplitudes relativas registradas por cada tetrodo, los PA se asignaron a cada unidad aislada (neurona única putativa) o *cluster* mediante un método semiautomático de clasificación de PA (*Klusters*). Luego se realiza un curado manual utilizando autocorrelogramas, la forma de onda de las espigas y las matrices de correlación entre clusters (**Figura M.9.2**), eliminando eventos correspondientes a ruido y las unidades que no cumplen con los criterios de calidad. Estos criterios incluyen un período que la actividad esté presente durante toda la sesión y que tenga una buena relación señal-ruido. Estos criterios también permiten identificar *clusters* correspondientes a actividad multiunitaria que no serán analizados en esta tesis.

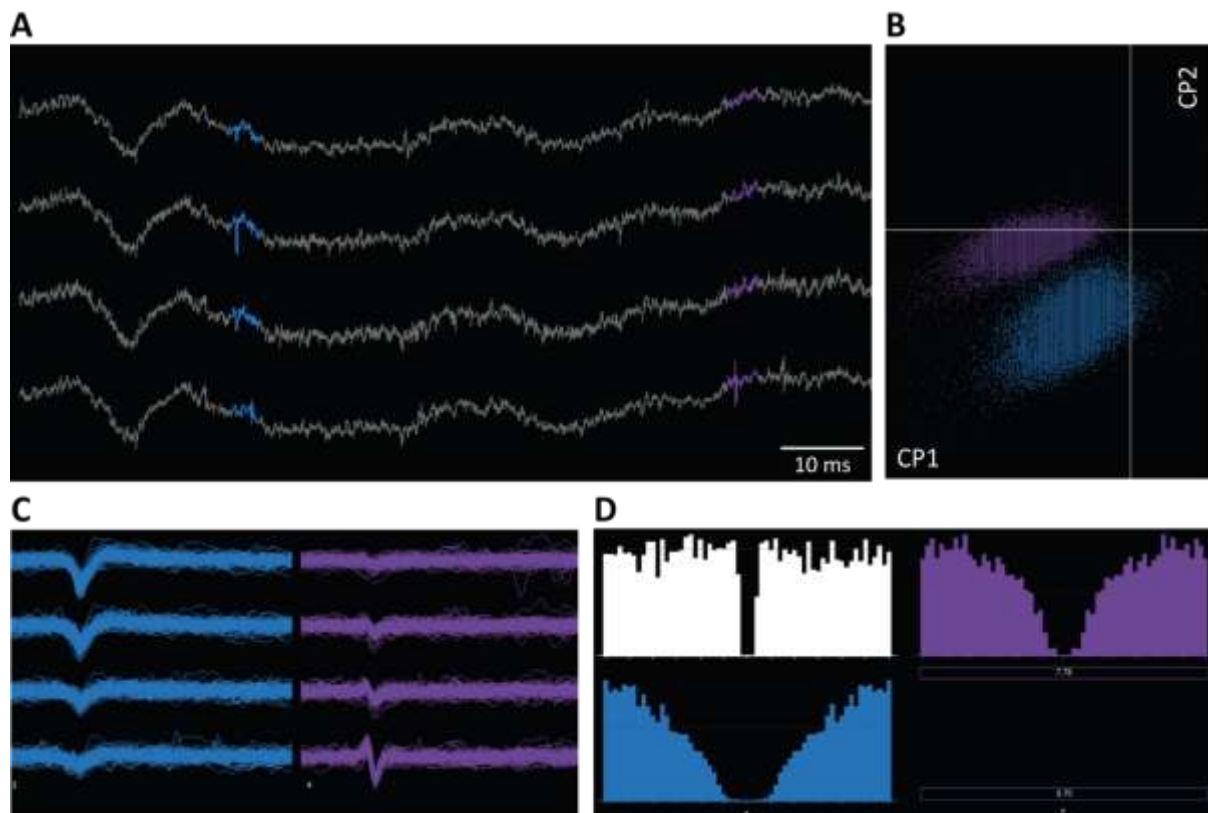


Figura M.9.2. Ejemplo de la separación de *clusters* de dos neuronas del HDB a partir de la señal de un tetrodo. (A) Fragmento representativo de la señal neurofisiológica registrada por un tetrodo en el HDB. Se muestran los cuatro canales de un mismo tetrodo. Los PA de dos neuronas distintas se marcan con distinto color. (B) Gráfico de los PA asignados a dos *clusters* (neuronas únicas putativas)

en función de dos componentes principales (CP). Cada punto corresponde a un potencial de acción. Nótese que ambas nubes de puntos no se superponen. (C) Forma de onda de los PA asignados a los *clusters* de (B) a partir del análisis de CP. (D) Autocorrelograma (color) y correlograma cruzado (blanco) para los *clusters* de (B) (tamaño del bin: 1 ms). Los dos *clusters* presentan un valle marcado en sus autocorrelogramas por lo que se los consideró neuronas únicas. Además el correlograma cruzado entre los dos *clusters* no presenta un valle, por lo que ninguno de los *clusters* está contaminado con PAs provenientes del otro *cluster*. Se utilizó el software de clasificación de espigas llamado *Klusters* (Hazan et al., 2006).

M.9.B.II. Análisis de la actividad neuronal

Histogramas perievento (HPE)

Luego de la separación de neuronas únicas mediante el *Klusters* se analizó si las mismas modulan su actividad frente a distintos eventos relevantes de la tarea de condicionamiento operante. Para ello, primeramente se realizó un análisis exploratorio utilizando el programa Neuroexplorer a partir del cual fue posible visualizar la señal completa registrada por cada electrodo y realizar histogramas perievento (HPE) centrados en cada uno de los eventos de interés: presentación de la clave visual y momento de entrega u omisión de la recompensa. Mediante estos histogramas se realizó una clasificación preliminar de aquellas neuronas que parecían tener respuesta (excitación o inhibición) frente alguno de los eventos.

Para cuantificar y clasificar objetivamente, y de manera automática, las respuestas de las neuronas, escribimos un código de Matlab generado especialmente para nuestros datos. A través del código calculamos la frecuencia de disparo media de la neurona y su desvío estándar durante toda la sesión (utilizando ventanas temporales sin superposición), realizamos HPE para los distintos eventos relevantes de la tarea, y cuantificamos si la respuesta de la neurona en un intervalo temporal de interés difiere de un determinado umbral, para considerarla una modulación significativa al evento de estudio.

Los histogramas de actividad neuronal fueron centrados a los siguientes eventos salientes de la tarea conductual: 1) presentación de la clave visual; 2) momento en que se entrega la recompensa; 3) momento en que la recompensa es omitida, es decir, el quinto *lick* en los ensayos correctos no recompensados. Los mismos fueron contruidos con un

tamaño de bin de 2 ms y desde 2 seg previos al evento correspondiente (tiempo 0 seg) hasta 3 seg post-evento (de -2 a 3 seg). Para cada bin, se contabilizó el número total de potenciales de acción ocurridos en todos los ensayos y se normalizó por el número de ensayos y por la duración del bin, expresando la actividad neuronal como frecuencia de disparo (PA /segundo) (**Figura M.9.3**). El HPE refleja entonces la tasa de disparo promedio de la neurona en función del tiempo respecto al evento, permitiendo identificar modulaciones consistentes de la actividad neuronal. La determinación de respuestas significativas fue realizada en distintos intervalos de interés dependiendo del evento. Dichos intervalos fueron determinados luego de la inspección visual de las respuestas de todas las neuronas.

1. *Presentación del estímulo visual*: intervalo entre 0.08 y 0.2 segundos post-evento.
2. *Entrega de la recompensa*: intervalo entre 0.1 y 0.3 segundos post-evento.
3. *Omisión de la recompensa*: intervalo entre 0.3 y 0.7 segundos post-evento.

En todos los casos, la respuesta se midió en relación a la actividad media de toda la sesión de registro. Se consideró que una neurona presenta una respuesta significativa excitatoria si la actividad media en los intervalos de interés descriptos para cada evento supera la frecuencia media de la sesión en 2 desvíos estándar, y una respuesta significativa inhibitoria si está por debajo de la frecuencia de la sesión en un desvío estándar (**Figura M.9.3**). Cabe destacar que se utilizó un umbral más laxo para detectar inhibiciones, debido a que en muchos casos se observa un efecto piso en la actividad de las neuronas, lo que limita la sensibilidad para detectar reducciones adicionales en la tasa de disparo.

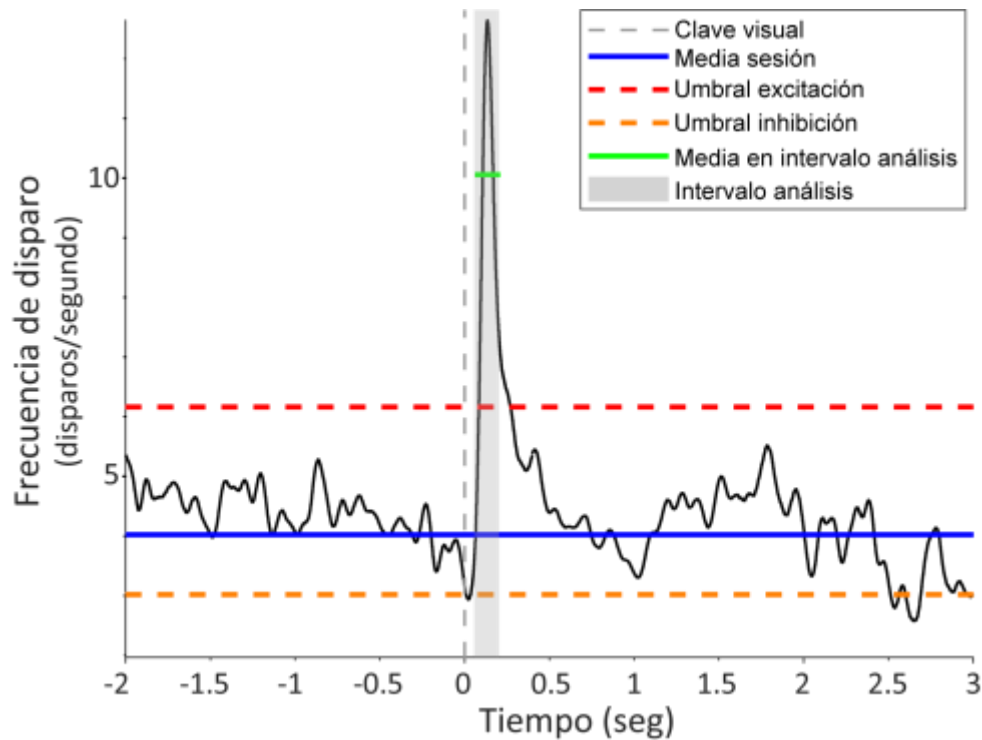


Figura M.9.3. A partir del HPE de la actividad neuronal, es posible determinar si una neurona presenta una respuesta asociada a un evento relevante de la tarea. Este HPE muestra la actividad (frecuencia de disparo, disparos/segundo) de una neurona ejemplo alineada a la presentación de la clave visual (tiempo = 0 s, línea punteada gris). La línea azul indica la frecuencia de disparo media de la neurona en toda la sesión. La línea punteada roja representa el umbral de activación, definido como la media de la sesión más dos desvíos estándar, mientras que la línea punteada naranja corresponde al umbral de inhibición, calculado como la media de la sesión menos un desvío estándar. Finalmente, la línea verde indica la media de la actividad de la neurona en el intervalo de análisis post-evento (recuadro gris), la cual se compara con los umbrales para determinar si la neurona presenta una respuesta significativa a dicho evento. En este ejemplo, la neurona muestra una respuesta excitatoria a la entrega de la recompensa.

Finalmente, realizamos una comparación de la proporción de neuronas con respuesta a cada uno de los eventos arriba descritos en la etapa inicial y tardía del aprendizaje. Los datos correspondientes a las primeras sesiones se integraron obteniendo un único valor para la etapa inicial y lo mismo fue hecho para las sesiones tardías. De esta manera se compararon diferencias poblacionales a lo largo del aprendizaje.

Normalización de la actividad neuronal

La actividad de cada neurona en los HPE fue normalizada según el Z-score:

$$\text{Frecuencia de disparo normalizada (Z-score)} = (\text{FD}_{\text{bin}} - \text{FD}_{\text{sesión}}) / \text{SD}_{\text{sesión}}$$

Donde FD_{bin} es la frecuencia de disparo calculada para cada bin de 2 ms, $\text{FD}_{\text{sesión}}$ es la frecuencia de disparo media de la neurona en toda la sesión y $\text{SD}_{\text{sesión}}$ es el desvío estándar de $\text{FD}_{\text{sesión}}$

De esta forma obtenemos perfiles de actividad normalizada para cada neurona que nos permite realizar un análisis poblacional de la actividad neuronal y comparar respuestas de distintas neuronas.

Cálculo de magnitud y latencia al inicio de la respuesta

Para caracterizar las respuestas de las neuronas del HDB a distintos eventos relevantes de la tarea, calculamos otros parámetros como la magnitud y la latencia de inicio de la respuesta. Para ello, utilizamos un código de Matlab desarrollado específicamente para analizar nuestros datos.

Para cuantificar la magnitud de las respuestas neuronales, se calculó el área bajo la curva (AUC) de los histogramas de frecuencia de disparo normalizada alineados a eventos específicos. Esta medida permite capturar tanto la intensidad como la duración de la respuesta: en el caso de las respuestas excitatorias, el AUC refleja el tamaño del aumento en la tasa de disparo respecto a la línea base y cuánto tiempo se sostiene dicho incremento; mientras que en las respuestas inhibitorias, representa la profundidad y extensión en el tiempo de la disminución en la actividad neuronal por debajo de la línea base. De este modo, el AUC proporciona una medida integral que resume la dinámica temporal de la respuesta sin perder información sobre su valencia o duración.

A partir de los HPE, se determinó el intervalo temporal sobre el cual se calcula el área de cada respuesta neuronal. Este intervalo comienza en el tiempo 0, correspondiente al momento del evento en estudio, y se extiende hasta el primer instante en que la frecuencia de disparo normalizada vuelve a cero. Este punto es identificado automáticamente por el código de MATLAB. De esta manera, el intervalo considerado para el cálculo del área abarca desde la ocurrencia del evento hasta el retorno de la actividad neuronal a su nivel basal.

Para las respuestas excitatorias se consideraron los valores positivos del Z-score, mientras que para las respuestas inhibitorias se utilizaron los valores negativos.

Por otro lado, a partir de los HPE también se determinó el tiempo de inicio de la respuesta de cada neurona ante los distintos eventos, lo que denominamos latencia de la respuesta. La latencia se define como el primer momento en que la actividad neuronal cruza el umbral establecido para detectar una respuesta significativa, indicando así el inicio de dicha respuesta.

Clasificación de respuestas de expectativa temporal a la recompensa

Para clasificar las respuestas extendidas (posiblemente señal de expectativa temporal a la recompensa), tanto en las neuronas de V1 como en las del HDB, utilizamos el siguiente criterio: en los HPE alineados a la presentación de la clave visual, definimos un intervalo temporal que comienza con la presentación de la clave visual y se extiende hasta el 70% del tiempo de obtención de la recompensa promedio en esa sesión. Se considera que una neurona presenta una respuesta extendida significativa cuando, dentro de ese intervalo, la frecuencia de al menos el 60% de los bins del HPE supera la frecuencia media de la neurona en más de 2 desvíos estándar (para respuestas excitatorias) o está por debajo de la media menos un desvío estándar (para respuestas inhibitorias). Evaluamos el cumplimiento de este criterio tanto en los HPE de ensayos correctos recompensados como en aquellos correctos que fueron no recompensados.

Cálculo del reporte de tiempo neuronal

Para determinar la duración de las respuestas extendidas tras la presentación de la clave visual, calculamos un parámetro denominado reporte de tiempo neuronal o *neural report of time* (NRT). El NRT de estas neuronas fue estimado utilizando un código de Matlab en el que a partir de cada HPE alineado a la presentación de la clave visual en ensayos correctos se busca el instante de tiempo en el que la frecuencia normalizada en Z-score vuelve a cero, es decir, el tiempo en que la actividad neuronal regresa a su nivel basal. Esto fue aplicado para las respuestas de excitación o inhibición sostenida, para las respuestas de pico de excitación se buscó el momento de mayor valor de frecuencia de disparo durante el intervalo de respuesta.

Dado que el tiempo promedio de obtención de la recompensa varía entre animales y a lo largo de las sesiones de entrenamiento, relativizamos el valor de NRT de cada neurona al tiempo medio de recompensa del animal del que proviene. La relativización fue realizada de la siguiente manera:

$$\text{NRT}_{\text{neurona}} \text{ relativo} = (\text{NRT}_{\text{neurona}} - \text{TR}_{\text{etapa}}) / \text{TR}_{\text{etapa}}$$

Donde TR_{etapa} es la media del tiempo de recompensa correspondiente a cada animal en la etapa inicial o tardía del entrenamiento.

Análisis de la variación de las respuestas a la recompensa dentro de la sesión experimental

Para evaluar la variación de la respuesta a la recompensa dentro de la sesión experimental dividimos cada sesión en bloques de 15 recompensas. Así, cada sesión de la etapa inicial tiene 7 bloques y cada sesión de la etapa tardía 8 bloques. Para cada neurona con respuesta significativa a la recompensa construimos un HPE alineado a la recompensa para cada bloque y calculamos la frecuencia media de la neurona en el intervalo temporal utilizado para clasificar las respuestas a este evento. Luego, para cada una de esas neuronas, graficamos la frecuencia normalizada en Z-score, calculada en el intervalo temporal para cada bloque, en función del bloque y ajustamos los datos a una regresión lineal. Por último, cuantificamos cuántas neuronas presentaban una pendiente negativa significativa en su regresión lineal, lo que indicaría una disminución de su respuesta a lo largo de la sesión de entrenamiento. Finalmente, calculamos la proporción de neuronas con estas respuestas respecto al total de neuronas con respuesta a la recompensa.

M.10. Estadística

Los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados utilizando GraphPad Prism (v8.0.1) y MATLAB (vR2017b). Para la comparación de dos grupos y una variable utilizamos *two tailed Unpaired Student's t-test* o *two tailed Paired Student's t-test*, según corresponda. Para corroborar que los grupos cumplan con el criterio de normalidad utilizamos *Shapiro-Wilk test* y para analizar la igualdad de varianza (homocedasticidad) utilizamos *Levene test*. En los casos de distribución normal, los resultados son expresados como la media $\pm$ error

estándar. En los casos en los que la distribución no cumple normalidad u homocedacia realizamos *Mann-Whitney test* y los resultados son expresados con la mediana y el rango intercuartílico (Q1-Q3). Para la comparación de proporciones de neuronas entre grupos utilizamos *Fisher's exact test*.

M.11. Histología

Los animales fueron sacrificados para realizar el análisis histológico de la localización de los electrodos en las zonas de registro. Para ello, los animales fueron anestesiados profundamente mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (200 mg/kg) y perfundidos intracardiácamente con 18 ml de solución fisiológica heparinizada (2000 U/L), seguida de 50 ml de paraformaldehído 4% (PFA, Sigma) en PBS a un flujo de 5ml/min. Luego el cerebro fue removido y post-fijado toda la noche en paraformaldehído 4%. Luego se dejó a 4°C en sacarosa al 30% en PBS 0.1 M para crioprotegerlo, hasta que se cortó con micrótopo (Leica SM2010R) en secciones de 30 µm. Por último, se montaron los cortes coronales que contenían las regiones de V1 y HDB para confirmar la posición de los electrodos de registro.

Las imágenes de los cortes que contenían los trazos de los electrodos en las regiones de interés se adquirieron con un microscopio Zeiss Axio Imager M2 con software Neurolucida de MFB Bioscience utilizando luz transmitida y de fluorescencia, para evidenciar el trazo dejado por el Dil con el que teñimos los electrodos antes de ser implantados (**Figura M.11**).

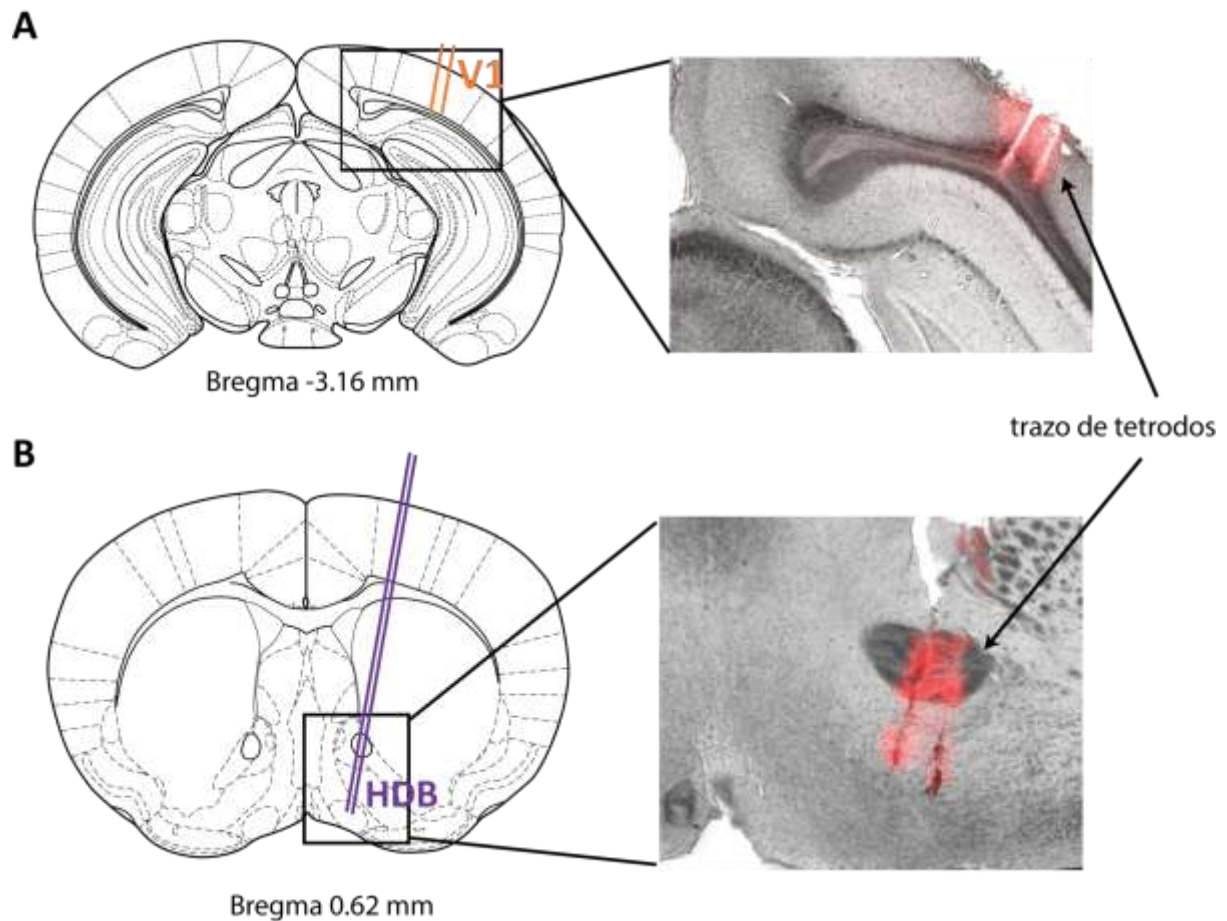


Figura M.11.1. Ejemplos del análisis histológico llevado a cabo para determinar la ubicación de los electrodos en las áreas de registro. Diagrama de un corte coronal de cerebro de ratón ilustrando la localización del arreglo de multielectrodos para V1 (**izquierda, A**) y HDB (**izquierda, B**). Se esquematiza el trazo de dos tetrodos para cada estructura. Microfotografía de un corte coronal de cerebro de ratón en la que se puede ver la correcta ubicación de los electrodos de registro. Se muestra la localización del trazo de 2 de los 4 tetrodos implantados en V1 (**derecha, A**) y 2 de los 8 tetrodos implantados en HDB (**derecha, B**). La visualización fue realizada mediante un microscopio de fluorescencia para detectar la marca del Dil, marca que fluoresce en color rojo con la que teñimos los tetrodos antes de implantarlos. Los diagramas de cortes coronales son adaptaciones del atlas Paxinos y Franklin 2da edición, 2001.

RESULTADOS

V1 es el primer sitio cortical de relevo de la información visual, donde se codifican propiedades básicas de los estímulos visuales como la orientación y dirección de movimiento (Hubel & Wiesel, 1959, 1962). Históricamente se ha considerado a V1, al igual que a toda corteza sensorial primaria, como un detector pasivo e inmutable de estímulos, en el que la experiencia es capaz de modificar las conexiones del circuito únicamente en una pequeña ventana temporal postnatal (Hubel & Wiesel, 1970). Sin embargo, esta visión fue revisada en la última década, al demostrarse que V1 presenta una enorme plasticidad en la adultez, no sólo en el marco del aprendizaje perceptual, sino también en relación con el procesamiento del significado comportamental que un estímulo adquiere en el contexto de una tarea.

En particular, se ha observado que cuando ratas adultas aprenden a asociar un estímulo visual con una recompensa futura, la actividad de una fracción sustancial de neuronas de V1 cambia: dejan de representar únicamente las características físicas del estímulo y comienzan a codificar el intervalo de tiempo desde la clave visual a la recompensa (Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015). Estos resultados desafían la interpretación clásica del rol de V1, al demostrar que funciones cerebrales complejas, como la codificación de la expectativa temporal de una recompensa, puede ocurrir tempranamente en las vías de procesamiento sensorial.

Se ha demostrado, además, que esta modulación de la actividad neuronal en V1 depende de las proyecciones colinérgicas provenientes del BF, las cuales resultan necesarias y suficientes para su generación (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015). Dado que el BF es una estructura clave en la modulación de distintos procesos cognitivos, nos propusimos estudiar, mediante registros electrofisiológicos, sus propiedades de codificación durante el aprendizaje de una tarea en la que una clave visual predice la llegada de una recompensa. Así buscamos comprender cómo las neuronas del BF responden a estímulos visuales y refuerzos y cómo evoluciona esta codificación durante el aprendizaje.

Al estar interesados particularmente en la codificación de la expectativa temporal de recompensa en V1, realizamos una adaptación del protocolo comportamental utilizado en los estudios originales que describieron este tipo de actividad (Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015). En el protocolo original, se entrenaban ratas en una caja comportamental

donde tenían libertad de movimiento. La tarea era autoiniciada, ya que los animales debían ingresar a un puerto para recibir la clave visual y quedar habilitados a obtener la recompensa. En nuestro caso, adaptamos esta tarea para su implementación en ratones y en un puesto de conducta en el que los animales permanecen con la cabeza fija (*head-fixed*). Optamos por esta configuración porque permite un control preciso de los estímulos visuales y facilita registros neuronales estables. Esta configuración reduce la variabilidad comportamental y es compatible con técnicas de registro crónico de alta resolución.

La adaptación del protocolo comportamental requirió un período de rediseño, tanto del puesto de registro como de la tarea. Por un lado, al trabajar en condición *head-fixed*, se eliminó el componente de autoiniciación de la tarea. Por otro lado, fue necesario acondicionar el puesto para permitir la presentación del estímulo visual de forma controlada. Luego de esto, comenzamos con los entrenamientos, durante los cuales registramos la actividad neuronal en V1 y en el BF.

Comenzaremos describiendo la tarea comportamental utilizada en esta tesis y presentando los resultados que demuestran que los animales son capaces de aprenderla. A continuación, analizaremos la presencia de codificación de la expectativa temporal de la recompensa en las neuronas de V1 y, por último, estudiaremos las propiedades de codificación de las neuronas del BF antes y después del aprendizaje de la tarea.

R.1. Resultados conductuales: desempeño comportamental durante el aprendizaje de una tarea de condicionamiento operante recompensada

En esta sección describimos los resultados de una tarea en la que un estímulo visual predice una recompensa futura. En la tarea, se presenta una clave visual y los animales deben realizar una secuencia de lengüeteos o *licks* para recibir una gota de agua como recompensa en el 70% de los ensayos. Dicha tarea comportamental, nos permite estudiar el procesamiento neuronal durante el aprendizaje mediado por recompensa a través del análisis de la actividad de registros electrofisiológicos a lo largo del aprendizaje.

Antes de comenzar el entrenamiento, los ratones son expuestos a un régimen de acceso restringido al agua y son habituados al puesto de conducta en el que se encuentran *head-fixed*. Cada día de entrenamiento, al comenzar la sesión, los animales deben esperar un intervalo de 4 segundos sin lengüetear para recibir la clave visual. Luego de esta señal,

deben realizar una secuencia de al menos cinco *licks* para obtener una gota de agua como recompensa en el 70% de los casos (**Figura R.1.1A**). Si los animales realizan esta secuencia, el ensayo es considerado correcto. Es importante destacar que el 30 % de los ensayos correctos resulta no recompensado, es decir, la recompensa es omitida aún si el animal realizó correctamente la tarea. Incluimos estos ensayos no recompensados para determinar si los cambios en la actividad neuronal se deben a la recompensa en sí o si, por el contrario, reflejan una señal de expectativa de recompensa generada por el estímulo visual.

Por otro lado, si el animal no completa la secuencia de cinco *licks*, el ensayo es considerado incorrecto y lo denominamos “secuencia incompleta”. Asimismo, si el animal demora más de 3 segundos en iniciar la secuencia de *licks* tras la presentación de la clave visual, el ensayo también es considerado incorrecto y lo llamamos “sin secuencia”. En ambos casos, el animal queda inhabilitado para recibir recompensa, incluso si posteriormente completa los cinco *licks*. En todos los casos, es decir luego de un ensayo correcto o incorrecto, el animal debe esperar un intervalo entre ensayos (IEE) de 4 segundos, durante el cual no debe realizar ningún *lick*, para recibir una nueva presentación de la clave visual y volver a tener la posibilidad de obtener recompensa.

Para el desarrollo de esta tesis, 11 ratones fueron entrenados durante al menos 15 días en la tarea previamente descrita. Antes de analizar la actividad neuronal, evaluamos el desempeño comportamental a lo largo del proceso de aprendizaje. Observamos que los animales aprenden la tarea rápidamente, especialmente en los primeros días de entrenamiento. Esto se refleja en un rápido aumento del porcentaje de ensayos correctos durante las primeras sesiones y, por consecuencia, una disminución del porcentaje de ensayos incorrectos de ambos tipos (secuencia incompleta y sin secuencia) (**Figura R.1.1B**). A medida que avanza el entrenamiento, el porcentaje de ensayos correctos por sesión sigue aumentando hasta alcanzar valores cercanos al 90%. Cabe destacar que los ensayos incorrectos de secuencia incompleta son muy pocos desde el inicio del entrenamiento. Esto se debe a que, una vez que los ratones comienzan a lengüetear, suelen iniciar una secuencia motora que involucra varios *licks* consecutivos, generalmente más de cinco.

Consideramos que los animales han aprendido la tarea cuando alcanzan un criterio de al menos un 80% de ensayos correctos. Bajo este criterio, clasificamos como etapa inicial del aprendizaje a las tres primeras sesiones de entrenamiento, en las que el rendimiento aún se encuentra por debajo de ese umbral. Durante esta fase, los animales no han aprendido por

completo todos los aspectos de la tarea. A partir de la cuarta sesión, el porcentaje de ensayos correctos alcanza o supera el 80%. Por ello, seleccionamos cuatro sesiones posteriores en las que el desempeño se haya mantenido estable, y las agrupamos como etapa tardía, correspondiente a un aprendizaje ya consolidado (ya transcurridos al menos 10 días de entrenamiento). Al comparar las sesiones de la etapa inicial con las de la etapa tardía, observamos diferencias significativas en el porcentaje de ensayos correctos (**Figura R.1.1C**). En consecuencia, los distintos parámetros comportamentales y la actividad neuronal, serán analizados a lo largo del aprendizaje comparando estas dos etapas del entrenamiento.

Al comparar el porcentaje de ensayos correctos promedio en ambas etapas del entrenamiento, observamos un aumento significativo en la etapa tardía (etapa inicial = $65.65 \pm 4.72\%$ vs etapa tardía = $92.06 \pm 1.81\%$; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, $*p=0.0004$. **Figura R.1.1D**). Este es un indicador de aprendizaje y muestra que los animales cometen cada vez menos errores y obtienen más recompensas a medida que avanza el entrenamiento.

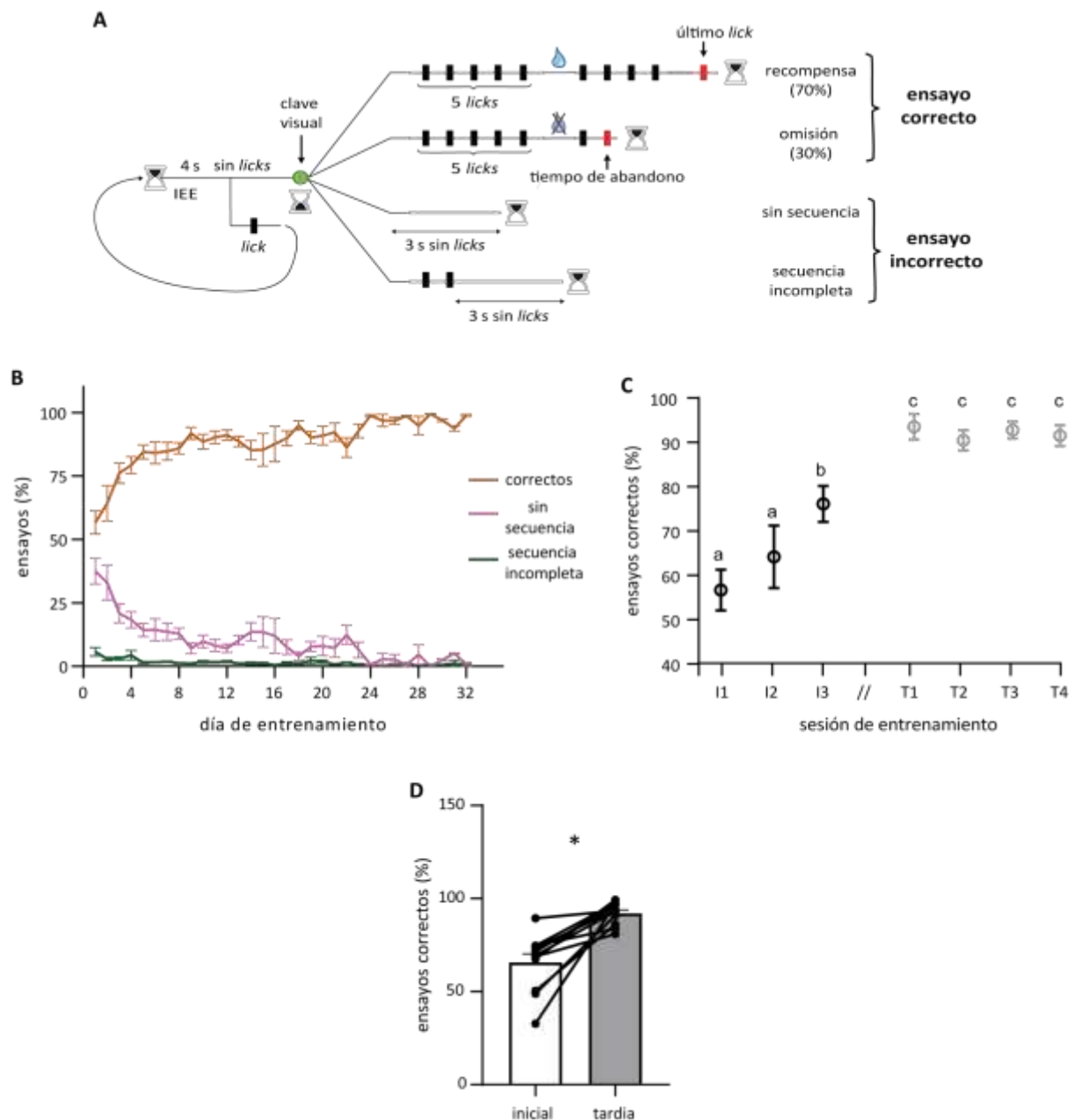


Figura R.1.1. Los animales aprenden la tarea operante recompensada en las primeras sesiones de entrenamiento. (A) Esquema de la tarea comportamental. IEE = intervalo entre ensayos. **(B)** Porcentaje de ensayos correctos e incorrectos (sin secuencia y secuencia incompleta) promedio a lo largo de las sesiones de entrenamiento. **(C)** El porcentaje de ensayos correctos aumenta con el entrenamiento. Se grafica el promedio para cada sesión clasificada como etapa inicial (I1-3) y tardía (T1-4) (*two-way* RM ANOVA, $p < 0.001$; post-hoc *Tukey's test*, letras distintas indican diferencias significativas, $p < 0.05$). **(D)** Porcentaje de ensayos correctos promedio en la etapa inicial y tardía del entrenamiento ($65.65 \pm 4.72\%$ vs $92.06 \pm 1.81\%$; *T-test* de muestras pareadas, $*p=0.0004$). En (B), (C) y (D) se muestra la media $\pm$ error estándar, $n= 11$ ratones.

Además, analizamos otros parámetros comportamentales indicadores de aprendizaje que iremos presentando a continuación: la latencia al primer *lick*, la duración de la secuencia de *licks*, el coeficiente de variación del intervalo entre *licks*, el tiempo de obtención de la recompensa, el coeficiente de variación del tiempo a la recompensa, el cociente entre el tiempo de abandono y el tiempo a la recompensa y, finalmente, la tasa de recompensa.

La latencia al primer *lick*, es decir, el tiempo que tardan los animales en comenzar a lengüetear tras la presentación de la clave visual, es uno de los parámetros que permite caracterizar el desempeño comportamental a lo largo del entrenamiento. Cabe destacar, que la presentación de la clave visual habilita la obtención de la recompensa mediante la realización de la secuencia de *licks*. Así, una menor latencia al primer *lick* indica el aprendizaje de esta asociación y le permite al animal optimizar la tasa de obtención de la recompensa. Como se observa en la **Figura R.1.2A**, este tiempo disminuye significativamente en la etapa tardía del entrenamiento (etapa inicial: 0.98 ± 0.07 segundos vs etapa tardía: 0.57 ± 0.07 segundos; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, $*p=0.0003$. **Figura R.1.2A**). Esto sugiere que los animales aprenden a asociar el estímulo visual con la posibilidad de obtener recompensa.

Por otro lado, analizamos si la duración de la secuencia de *licks* se modifica con el entrenamiento. Este parámetro corresponde al tiempo entre el primer y el quinto *lick*, que tiene una probabilidad del 70% de ser recompensado. Así, nos preguntamos si los animales pueden realizar de forma más rápida la secuencia de *licks* y aumentar la tasa de obtención de recompensas. Como se muestra en la **Figura R.1.2B**, no encontramos un cambio significativo en la duración de la secuencia (etapa inicial = 0.60 ± 0.04 segundos vs etapa tardía = 0.54 ± 0.03 segundos; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, $p > 0.05$. **Figura R.1.2B**). Esto probablemente indica que una vez que los animales comienzan a lengüetear, lanzan una secuencia de acciones estereotipadas y que resulta difícil mejorar este parámetro. Para evaluar esta posibilidad, analizamos el coeficiente de variación del intervalo entre *licks* a lo largo del aprendizaje (**Figura R.1.2C**). Observamos que no hay diferencias significativas en este parámetro en ambas etapas del entrenamiento (etapa inicial: 0.86 ± 0.09 vs etapa tardía: 0.59 ± 0.06 ; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, $p > 0.05$. **Figura R.1.2C**). Sin embargo, podemos ver una tendencia de reducción

de este coeficiente de variación en la etapa tardía, lo cual podría sugerir que la secuencia de *licks* no es una acción del todo estereotipada desde el comienzo de la tarea.

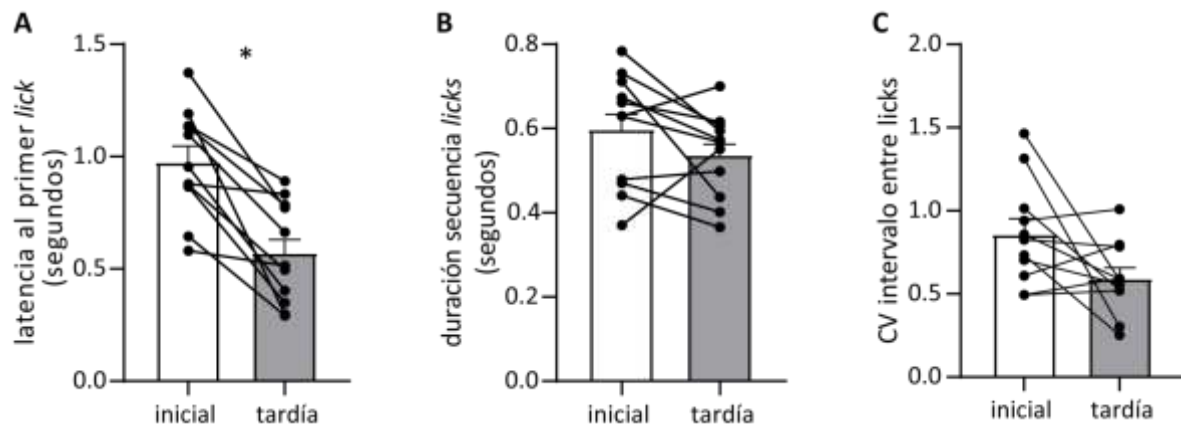


Figura R.1.2. Los animales aprenden a asociar el estímulo visual con la posibilidad de obtener recompensa. (A) La latencia al primer *lick* se reduce significativamente con el entrenamiento (etapa inicial: 0.98 ± 0.07 segundos vs etapa tardía: 0.57 ± 0.07 segundos; *T-test* de muestras pareadas, * $p=0.0003$). Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la duración de la secuencia de *licks* (etapa inicial: 0.60 ± 0.04 segundos vs etapa tardía: 0.54 ± 0.03 segundos; *T-test* de muestras pareadas, $p > 0.05$) **(B)** ni en el coeficiente de variación (CV) del intervalo entre *licks* (etapa inicial: 0.86 ± 0.09 vs etapa tardía: 0.59 ± 0.06 ; *T-test* de muestras pareadas, $p > 0.05$) **(C)**. En todos los gráficos se muestra la media $\pm$ error estándar, $n=11$ ratones.

Asimismo, analizamos el tiempo promedio que tardan los animales en recibir la recompensa. Observamos que el tiempo de obtención de la recompensa tras la clave visual se reduce significativamente en la etapa tardía del entrenamiento (etapa inicial: 1.53 ± 0.1 segundos vs etapa tardía: 1.16 ± 0.08 segundos; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, * $p=0.0007$. **Figura R.1.3A**). Dado que la duración de la secuencia de *licks* prácticamente no se ve afectada (**Figura R.1.2B**), esta reducción se explica en su mayoría por una menor latencia al iniciar la secuencia de *licks* (**Figura R.1.2A**).

Como ya mencionamos, un factor clave que nos interesó analizar en esta tarea es el tiempo de obtención de la recompensa. Hipotetizamos que a lo largo del entrenamiento, los animales realizarían cada ensayo de manera más estereotipada y por lo tanto, el tiempo de obtención de la recompensa sería menos variable. Para analizar esto, calculamos el coeficiente de variación del tiempo a la recompensa. Observamos que este coeficiente disminuye significativamente en la etapa tardía del entrenamiento (etapa inicial: 0.52 ± 0.02

vs etapa tardía: 0.3 ± 0.03 ; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, $*p= 0.0006$. **Figura R.1.3B**). Esto indica que, a medida que los animales se entrenan, su comportamiento se vuelve más regular dentro de cada sesión. Esta menor variabilidad sugiere que los animales realizan una conducta cada vez más estereotipada, como resultado del aprendizaje y del entrenamiento prolongado durante varios días consecutivos.

Tal como explicamos anteriormente, un ensayo correcto sólo es recompensado en el 70% de los casos. En el 30% restante de los ensayos correctos la recompensa es omitida, aún si el animal realizó correctamente la tarea. Por otro lado, es importante destacar que en los ensayos recompensados los animales continúan lengüeteando una vez completada la secuencia de *licks* requerida, para consumir la gota de agua. En cambio, en los ensayos no recompensados, al no recibir agua, los ratones dejan de lengüetear una vez que expira su expectativa temporal de recibir la recompensa. A medida que avanza el entrenamiento, el tiempo que los animales siguen lengüeteando después del quinto *lick* no recompensado (momento en el cual recibirían la recompensa) se acorta y se ajusta al tiempo promedio en el que experimentaron la recompensa durante la sesión. Para cuantificar esto, analizamos la duración de la secuencia de *licks* (incluyendo aquellos que ocurren pasado el quinto *lick*) en los ensayos correctos no recompensados, parámetro que denominamos “tiempo de abandono” (señalado en el esquema de la tarea de la **Figura R.1.1A**). Con el fin de evaluar qué tanto se acerca este tiempo de abandono al tiempo medio de entrega de la recompensa, realizamos el cociente entre ambas variables. Nótese que valores cercanos a 1 indican que los animales poseen una buena estimación temporal del momento en que deberían adquirir la recompensa. La **Figura R.1.3C** muestra que esta relación disminuye significativamente, acercándose a 1 (etapa inicial: 1.61 ± 0.09 vs etapa tardía: 1.38 ± 0.04 ; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, $*p= 0.0089$), evidenciando que han desarrollado una expectativa más cercana al tiempo en el que debería llegar la recompensa.

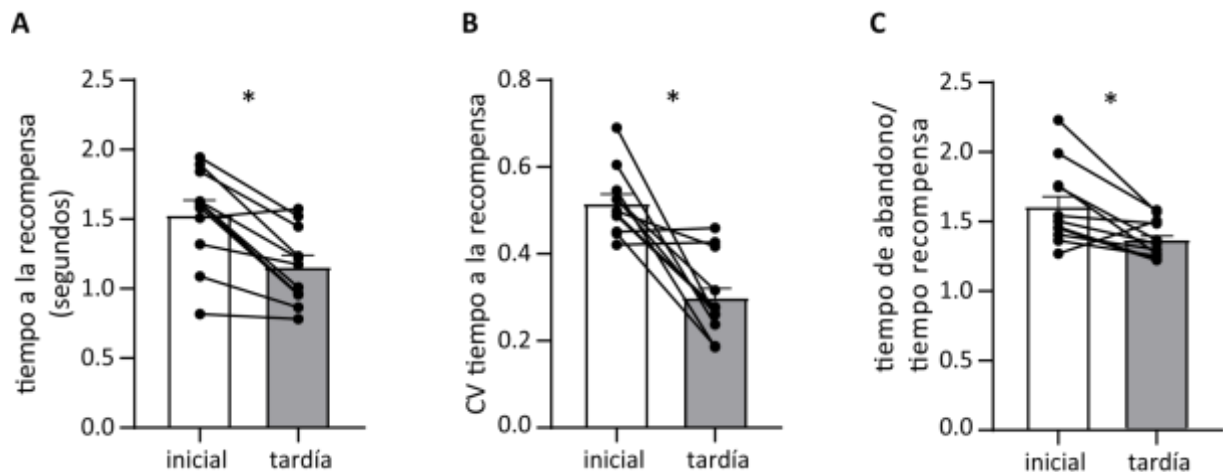


Figura R.1.3. Optimización del comportamiento dirigido a la obtención de recompensas. (A) Con el entrenamiento los animales reducen significativamente el tiempo que les lleva obtener la recompensa (etapa inicial: 1.53 ± 0.1 segundos vs etapa tardía: 1.16 ± 0.08 segundos; *T-test* de muestras pareadas, $*p = 0.0007$). **(B)** El comportamiento se vuelve más regular dentro de cada sesión llevando a la disminución significativa del coeficiente de variación (CV) del tiempo a la recompensa (etapa inicial: 0.52 ± 0.02 vs etapa tardía: 0.30 ± 0.03 ; *T-test* de muestras pareadas, $*p = 0.0006$). **(C)** Mejora en la estimación del momento en que deberían adquirir la recompensa, lo que se evidencia a través de una reducción significativa del cociente entre tiempo de abandono y tiempo a la recompensa (etapa inicial: 1.61 ± 0.09 vs etapa tardía: 1.38 ± 0.04 ; *T-test* de muestras pareadas, $*p = 0.0089$). En todos los gráficos se muestra la media $\pm$ error estándar, $n = 11$ ratones.

Finalmente, todos los parámetros que se modifican con el aprendizaje: la reducción en la latencia al primer *lick*, el tiempo de entrega de la recompensa y el tiempo de abandono conllevan a un aumento significativo de la tasa de recompensa en la etapa tardía del entrenamiento (etapa inicial: 2.85 ± 0.20 vs etapa tardía: 4.15 ± 0.12 recompensas/minuto; media $\pm$ error estándar. *T-test* de muestras pareadas, $*p < 0.0001$, **Figura R.1.4**). En otras palabras, los animales se vuelven más eficientes y logran obtener más recompensas en menos tiempo.

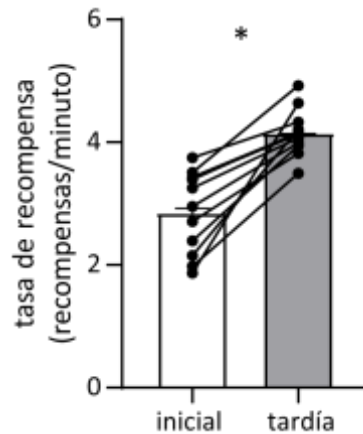


Figura R.1.4. Mayor eficiencia en la obtención de recompensas por sesión a lo largo del aprendizaje. La tasa de recompensa aumenta significativamente en la etapa tardía del entrenamiento (etapa inicial: 2.85 ± 0.20 vs etapa tardía: 4.15 ± 0.12 recompensas/minuto; *T-test* de muestras pareadas, $*p < 0.0001$). Se muestra la media $\pm$ error estándar, $n = 11$ ratones.

En conjunto, estos resultados nos permiten confirmar que los animales son capaces de aprender la tarea y mejorar su desempeño a lo largo del entrenamiento. Dado que nuestro objetivo es analizar las propiedades de codificación del BF y cómo evolucionan durante el aprendizaje, era fundamental verificar que dicho aprendizaje efectivamente ocurriera.

R.2. El aprendizaje de la tarea comportamental utilizada en esta tesis es capaz de generar en V1 la señal de expectativa temporal a la recompensa

Una vez confirmado que los animales son capaces de aprender la tarea y optimizar su conducta en pos de la obtención de recompensas, consideramos fundamental validar que, en el contexto de esta tesis, la asociación entre el estímulo visual y la recompensa induce en V1 la misma actividad de expectativa temporal previamente reportada en la literatura (Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015).

Para ello realizamos registros electrofisiológicos en V1 de 5 animales mientras aprendían la tarea descrita en la sección anterior. La técnica de tetrodos nos permite registrar y aislar de forma *offline* la actividad de múltiples neuronas en una región de interés del cerebro (Buzsáki, 2004) con alta eficiencia.

A modo de resumen metodológico, utilizamos un software desarrollado por el laboratorio de Buzsáki (Hazan et al., 2006) para extraer y analizar las características de los

potenciales de acción extracelulares registrados por los tetrodos. Este software permite agrupar potenciales de acción con características similares en *clusters*, donde cada *cluster* corresponde al conjunto de potenciales de acción provenientes de una misma neurona putativa. Una vez identificadas las neuronas aisladas (*clusters*), analizamos las respuestas de las neuronas de V1 durante las etapas inicial y tardía del entrenamiento.

En estos animales logramos aislar 54 neuronas en la etapa inicial y 76 neuronas en la etapa tardía. Con el objetivo de evaluar la respuesta de las neuronas de V1 a la clave visual, alineamos la actividad de cada neurona al momento en que se presenta el estímulo visual y construimos *raster plots* con sus correspondientes histograma perievento (HPE), como se muestra en la **Figura R.2.1**. En las **Figuras R.2.1A-B** pueden observarse los *raster plots* e HPE centrados en la presentación de la clave visual de cuatro neuronas ejemplo. En el panel superior de estas figuras, se muestra el *raster plot*, donde cada punto negro representa un potencial de acción y cada fila corresponde a un ensayo de la sesión de entrenamiento en la que se registró la actividad de esa neurona. Los ensayos están ordenados temporalmente del primero al último de la sesión y alineados al momento de presentación del estímulo visual (tiempo = 0 segundos, línea verde), en ensayos correctos recompensados y/o no recompensados. Además, en cada ensayo se marca el momento de entrega de la recompensa (símbolo azul) o la omisión de la misma (símbolo rojo). En el gráfico de abajo, se muestra el HPE construido a partir del *raster plot*. Este histograma se construyó dividiendo la ventana temporal analizada en bins de igual tamaño (2ms). Para cada bin, se contabilizó el número total de potenciales de acción ocurridos en todos los ensayos y se normalizó por el número de ensayos y por la duración del bin, expresando la actividad neuronal como frecuencia de disparo (potenciales de acción por segundo). Esto permite visualizar los cambios en la actividad neuronal a lo largo del tiempo, en relación al evento de referencia.

En una primera instancia observamos que, tal como esperábamos, en la etapa inicial las neuronas de V1 muestran respuestas de corta latencia y duración, evocadas por la presentación de la clave visual (**Figura R.2.1A**). Cabe destacar que no hallamos ninguna neurona con respuesta prolongada a la presentación de la clave visual en las primeras tres sesiones de entrenamiento. En contraste, en la etapa tardía, observamos que las neuronas de V1 muestran una respuesta prolongada desencadenada por la clave visual que persiste incluso cuando la clave visual ya no está presente (**Figura R.2.1B**). Estas respuestas son

similares a aquellas previamente descritas en la literatura como respuestas de expectativa temporal a la recompensa (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015; Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015). En nuestros registros observamos los tres tipos de respuestas previamente descritos: aumento (**Figura R.2.1B, arriba**), o inhibición sostenida (**Figura R.2.1B, medio**) hasta el momento en que se espera la recompensa, o un pico de aumento de la actividad en el momento en que se espera la recompensa (**Figura R.2.1B, abajo**). En concordancia con lo propuesto en la literatura, estas respuestas están presentes también en los ensayos correctos no recompensados (**Figura R.2.1B**), lo que sugiere que se trata de una respuesta de expectativa y no una respuesta a la recompensa *per se*.

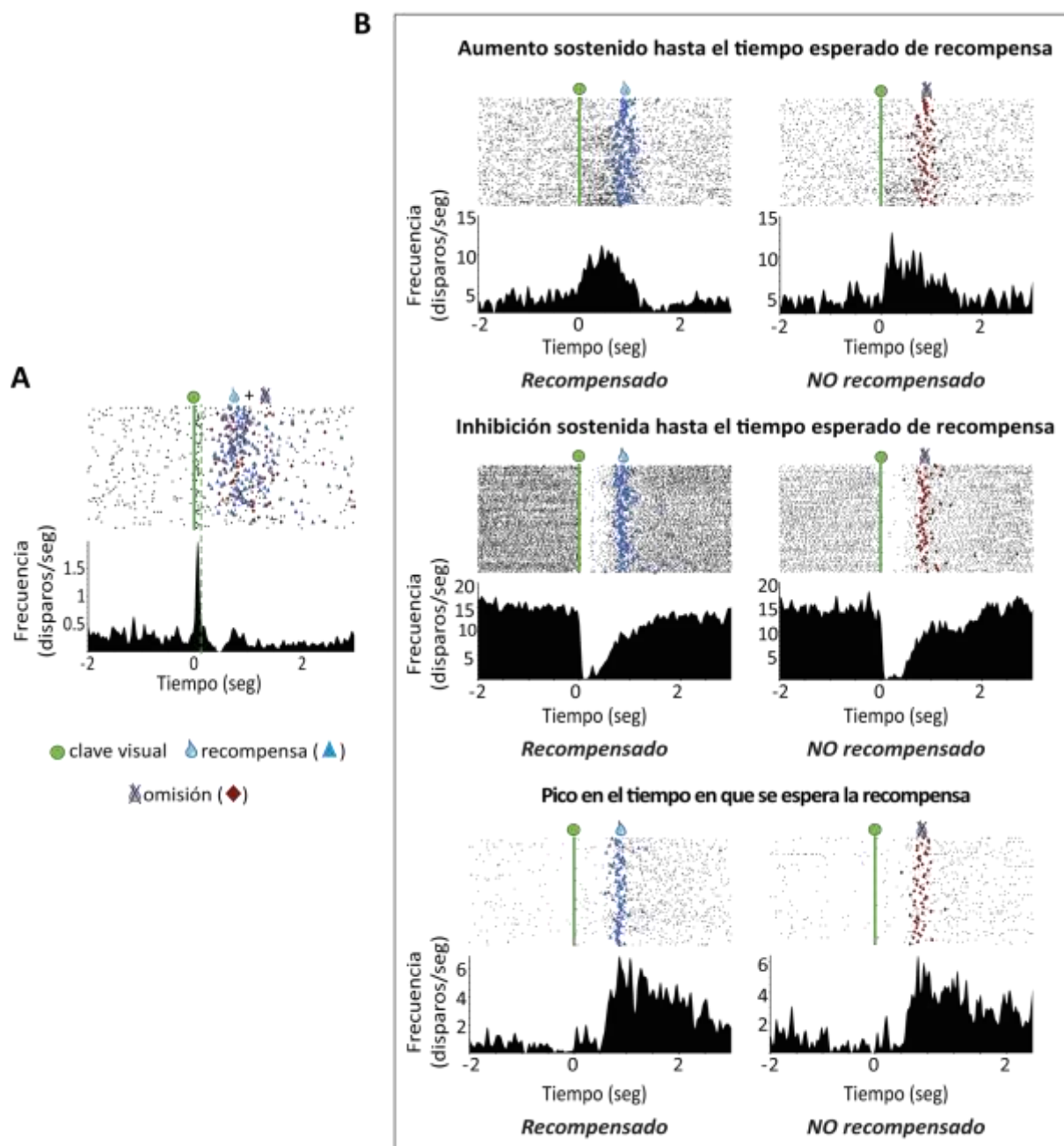


Figura R.2.1. El aprendizaje de la tarea comportamental utilizada en esta tesis induce en V1 una actividad similar a señal de expectativa temporal a la recompensa en la etapa tardía del entrenamiento. (A) Ejemplo representativo de una neurona registrada en la etapa inicial del entrenamiento que muestra una respuesta de corta duración a la clave visual (tiempo = 0 segundos, el inicio se indica con línea llena verde y el fin de la misma con línea punteada verde). **(B)** Ejemplo representativo de una neurona con aumento **(arriba)** o inhibición sostenida **(medio)** hasta el momento en que se espera la recompensa, o pico de excitación en el momento en que se espera la recompensa **(abajo)**. Los tres ejemplos corresponden a neuronas registradas en la etapa tardía del entrenamiento. **Panel superior:** *raster plot*; los puntos negros representan cada potencial de acción de la neurona. **Panel inferior:** histograma perievento (HPE). Actividad neuronal alineada a la presentación de la clave visual (tiempo = 0 segundos, indicado con línea verde) en los ensayos recompensados (izquierda, la entrega de la recompensa se señala con símbolo azul) y no recompensados (derecha, la omisión se señala con símbolo rojo).

Luego, clasificamos, y cuantificamos, de manera automática aquellas neuronas de V1 que presentan respuesta prolongada a la clave visual. Para ello utilizamos el siguiente criterio: definimos un intervalo temporal desde la clave visual hasta el 70% del tiempo promedio de obtención de la recompensa en esa sesión. Consideramos que una neurona presenta una respuesta significativa si, dentro de ese intervalo, la frecuencia de al menos el 60% de los bins del HPE supera la frecuencia media de la neurona en más de 2 desvíos estándar (para respuestas excitatorias) o está por debajo de la media menos un desvío estándar (para respuestas inhibitorias); ver sección Materiales y Métodos. Es importante aclarar que este criterio fue utilizado para clasificar de manera automática únicamente las respuestas sostenidas ya que en nuestros registros encontramos muy pocas neuronas con pico de excitación, las cuales fueron clasificadas manualmente.

Observamos que en la etapa tardía el 32% de las neuronas registradas (24 de 76) exhiben una respuesta similar a la señal de expectativa temporal a la recompensa (**Figura R.2.2A**). Del total de neuronas con respuesta, 33.3% mostraron excitación sostenida (8 de 24), 54.2% mostraron inhibición sostenida (13 de 24) y 12.5% mostraron un pico de excitación (3 de 24). No encontramos neuronas con este tipo de respuestas en la etapa inicial del entrenamiento.

Por otro lado, para poder comparar las respuestas de neuronas con diferente frecuencia de disparo basal, normalizamos la actividad de cada célula utilizando un Z-score

(ver sección Materiales y Métodos). Esto nos permitió promediar la modulación de la actividad de las neuronas durante la tarea, obteniendo así las respuestas poblacionales evocadas por la presentación del estímulo visual (**Figura R.2.2B**). Como se observa en la figura, las respuestas poblacionales de actividad sostenida (tanto excitación como inhibición, curva naranja y azul respectivamente, **Figura R.2.2B**) se prolongan en el tiempo incluso después de finalizada la presentación del estímulo visual (cuya duración se representa entre dos líneas verdes). Por otro lado, la respuesta poblacional caracterizada por un pico de excitación ocurre varios milisegundos después de la clave visual.

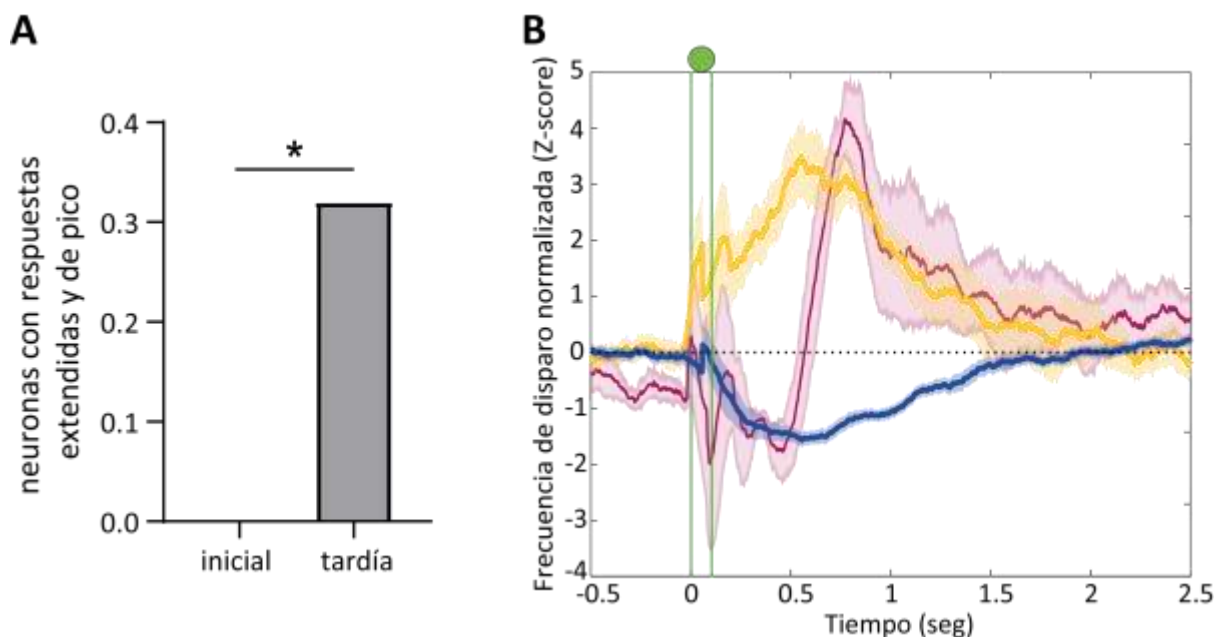


Figura R.2.2. En la etapa tardía del entrenamiento un 32% de las neuronas de V1 muestra actividad similar a señal de expectativa temporal a la recompensa. **(A)** Proporción de neuronas de V1 con actividad similar a señal de expectativa temporal a la recompensa en ambas etapas del entrenamiento (etapa inicial: 0, $n = 0/54$ neuronas vs etapa tardía: 0.32, 24/76 neuronas; *Fisher's exact test*, $*p < 0.0001$). **(B)** Gráfico poblacional promedio de todas las respuestas de tipo excitación sostenida ($n = 8/24$, curva naranja), inhibición sostenida ($n = 13/24$, curva azul) y pico de excitación ($n = 3/24$, curva magenta) en la etapa tardía. Se muestra la media junto con el error estándar (sombra sobre la curva). Las respuestas están alineadas a la presentación de la clave visual (tiempo = 0 segundos, el inicio y fin de la clave se indica con línea verde).

Posteriormente, para confirmar que estas respuestas observadas en V1 corresponden a respuestas de expectativa temporal a la recompensa analizamos qué tan precisamente se

relacionan con el correspondiente tiempo de recompensa asociado a la clave visual. Para ello, determinamos el momento en el que la neurona vuelve a su actividad basal luego de la presentación de la clave visual para las respuestas de excitación o inhibición sostenida, o al momento de mayor valor de frecuencia de disparo en las respuestas de pico de excitación (*neural report of time*, NRT). Dado que el tiempo promedio de obtención de la recompensa varía entre animales y a través de las sesiones, para evaluar qué tanto se aleja la estimación temporal de las neuronas del valor real del tiempo de recompensa, relativizamos el NRT de cada neurona en función del tiempo medio de recompensa del animal del que proviene (ver sección Materiales y Métodos).

En la **Figura R.2.3A** se muestra la curva de probabilidad acumulada de los valores de NRT relativizados al tiempo medio de recompensa de cada animal en la etapa tardía del entrenamiento. Lo que esperamos es que la tendencia central, es decir la mediana, de la distribución de NRT de la etapa tardía sea cercana a cero, lo que indicaría que los NRT reflejan el tiempo medio de recompensa (es decir, el momento en que el animal recibe efectivamente la recompensa). Observamos que la mediana de la distribución de NRT se desvía del cero, con un valor de 0.31 (**Figura R.2.3A-B**). El hecho de que la mediana sea mayor que cero muestra que poblacionalmente las neuronas sobreestiman el tiempo de recompensa. Para que las neuronas puedan aprender con exactitud un intervalo temporal, dicho intervalo debe mantenerse relativamente constante a lo largo de los ensayos y sesiones de entrenamiento. Por lo tanto, uno de los factores que puede influir en esta sobreestimación es la variabilidad en el tiempo de recompensa que observamos entre las sesiones comportamentales para un mismo animal. Otro factor a tener en cuenta es el número relativamente pequeño de neuronas utilizadas para este análisis.

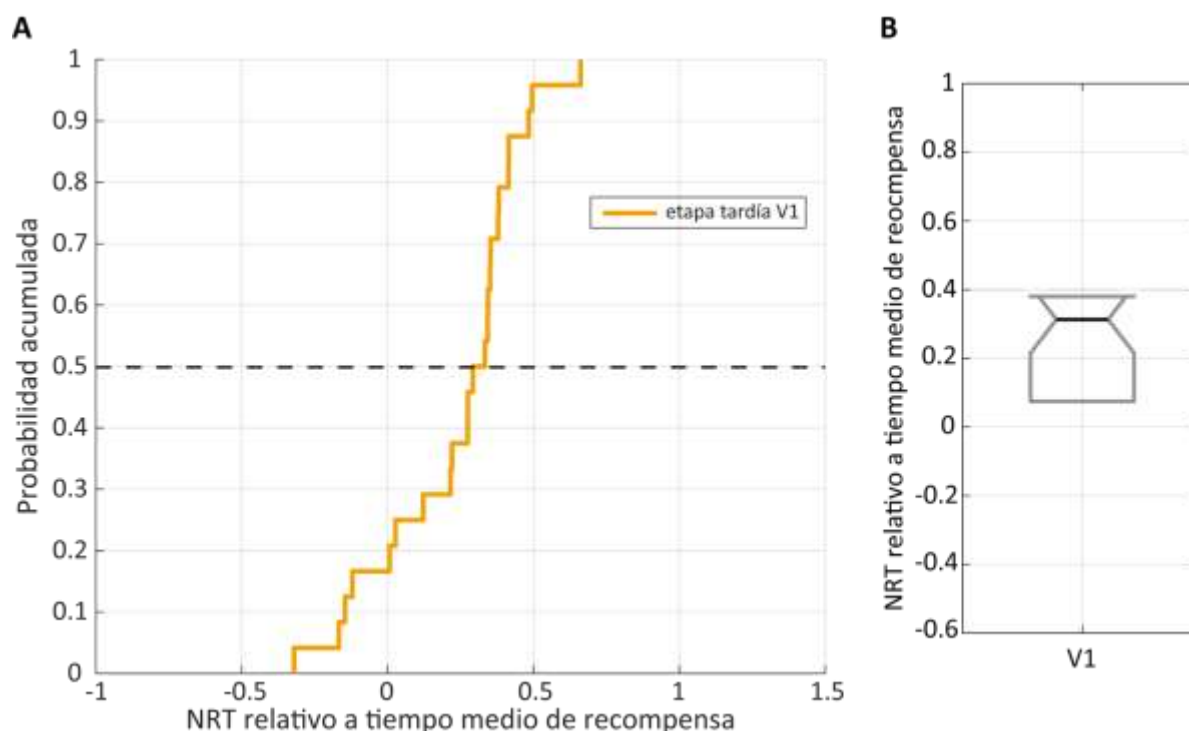


Figura R.2.3. El 32% de las neuronas de V1 expresa el tiempo de expectativa de recompensa. (A) Distribución de probabilidad acumulada de los valores de NRT, relativos al tiempo medio de recompensa de cada animal, calculados para las neuronas que fueron clasificadas con actividad similar a señal de expectativa temporal a la recompensa en V1 en la etapa tardía del entrenamiento. **(B)** Valores de mediana y rango intercuartílico correspondientes a la distribución de los valores de NRT relativos de las neuronas de V1. En **(A)** y **(B)** mediana = 0.31, Q1 = 0.07, Q3 = 0.38, $n = 24/76$ neuronas.

Estos resultados confirman que, tras el aprendizaje de la tarea operante utilizada en esta tesis, se reproduce en V1 la codificación de expectativa temporal descrita en la literatura (Shuler & Bear, 2006). Según estudios previos (Gavornik & Bear, 2014b; Hubel & Wiesel, 1959; Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015), las respuestas cortas observadas en la etapa inicial reflejarían la codificación de las propiedades físicas del estímulo visual, mientras que las respuestas en la etapa tardía estarían reportando el intervalo temporal en el que se espera la recompensa.

Se ha demostrado que las proyecciones colinérgicas del BF son necesarias y suficientes para inducir en V1 la codificación del intervalo temporal entre un estímulo visual y la llegada contingente de una recompensa (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015). Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo responden las neuronas del BF durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada guiada por una clave visual. Por lo tanto, en la siguiente sección

nos centraremos en determinar qué núcleo del BF proyecta principalmente a V1 para luego establecer las propiedades de codificación de estas neuronas del BF y cómo evolucionan durante el aprendizaje.

R.3. El núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca es el principal núcleo del BF que proyecta a V1

En este trabajo, buscamos caracterizar las propiedades de codificación de las neuronas del BF durante el aprendizaje de una tarea en la que una clave visual predice la llegada de una recompensa. Como se mencionó previamente en la introducción (sección I.5), el BF no es una estructura uniforme, sino que está formado por varios núcleos discretos que presentan distintos patrones de conexiones aferentes y eferentes (Gielow & Zaborszky, 2017; Rye et al., 1984; Zaborszky et al., 2012). Esto implica que no todos los núcleos del BF proyectan de manera uniforme hacia las mismas áreas corticales. Dado que nuestro objetivo es estudiar las propiedades de codificación de las neuronas del BF que proyectan a V1, consideramos necesario comenzar determinando con precisión las coordenadas estereotáxicas del o los núcleos que envían proyecciones a esta región.

Para ello, inyectamos una serie de animales (n=4) con un marcador retrógrado fluorescente (*retrobeads*) en V1. Los marcadores retrógrados permiten identificar neuronas que proyectan a un área de interés del cerebro. Se trata de microesferas de látex fluorescentes que son captadas por las terminales axónicas y transportadas de vuelta al soma neuronal, lo que permite identificar las neuronas que proyectan hacia una región específica del cerebro (Katz et al., 1984; Saleeba et al., 2019). Para identificar la región del BF que proyecta a V1, realizamos inyecciones estereotáxicas bilaterales de *retrobeads* en tres sitios distintos a lo largo del eje anteroposterior de V1 (**Figura R.3.1A-B**; ver sección Materiales y Métodos). Luego, esperamos tres semanas para permitir la migración de las partículas fluorescentes desde los axones en V1 hasta los somas de las neuronas que proyectan hacia esta región. Una vez transcurrido este período, sacrificamos a los animales y realizamos cortes seriados a lo largo de los núcleos que componen al BF con el fin de identificar las principales regiones que proyectan a V1.

Para facilitar la identificación de los núcleos del BF, realizamos además un ensayo de inmunohistoquímica anti-colina acetiltransferasa (ChAT, por sus siglas en inglés), a través

del cual se marcan las neuronas colinérgicas en color verde (**Figura R.3.1D-E**). Dado que los núcleos del BF se caracterizan por contener neuronas colinérgicas que proyectan hacia toda la corteza y son núcleos que en cortes histológicos no son fácilmente identificables, utilizamos esta técnica para localizarlos con mayor precisión. Esto nos permitió colocalizar la marca verde del ensayo de inmunohistoquímica anti-ChAT con la marca roja del marcador retrógrado (*retrobeads*) e identificar la región del BF que proyecta hacia V1. Si bien el BF también está compuesto por otros tipos de neuronas como GABAérgicas y glutamatérgicas, elegimos identificar a las colinérgicas debido a que las subdivisiones anatómicas del BF han sido tradicionalmente definidas en base a la distribución de estas neuronas de proyección. Sin embargo, en la **Figura R.3.1B** se observan somas cercanos a los que presentan marca positiva para ChAT que también contienen marca de *retrobeads* (en ausencia de colocalización con marca de ChAT), lo que sugiere que podrían corresponder a otros tipos de neuronas del BF que también proyectan hacia V1.

Nuestros resultados indican que el núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB) es el principal núcleo del BF que proyecta a V1 (**Figura R.3.1C**). En las **Figuras R.3.1D y R.3.1E** se muestra el área correspondiente al HDB, identificada a partir de la marca anti-ChAT, que colocaliza con la marca de los *retrobeads*. Esta información nos permitió determinar las coordenadas correspondientes (ver sección Materiales y Métodos) que nos permitieron implantar electrodos en el HDB, y analizar las propiedades de codificación de estas neuronas que proyectan a V1 durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada guiada por una clave visual.

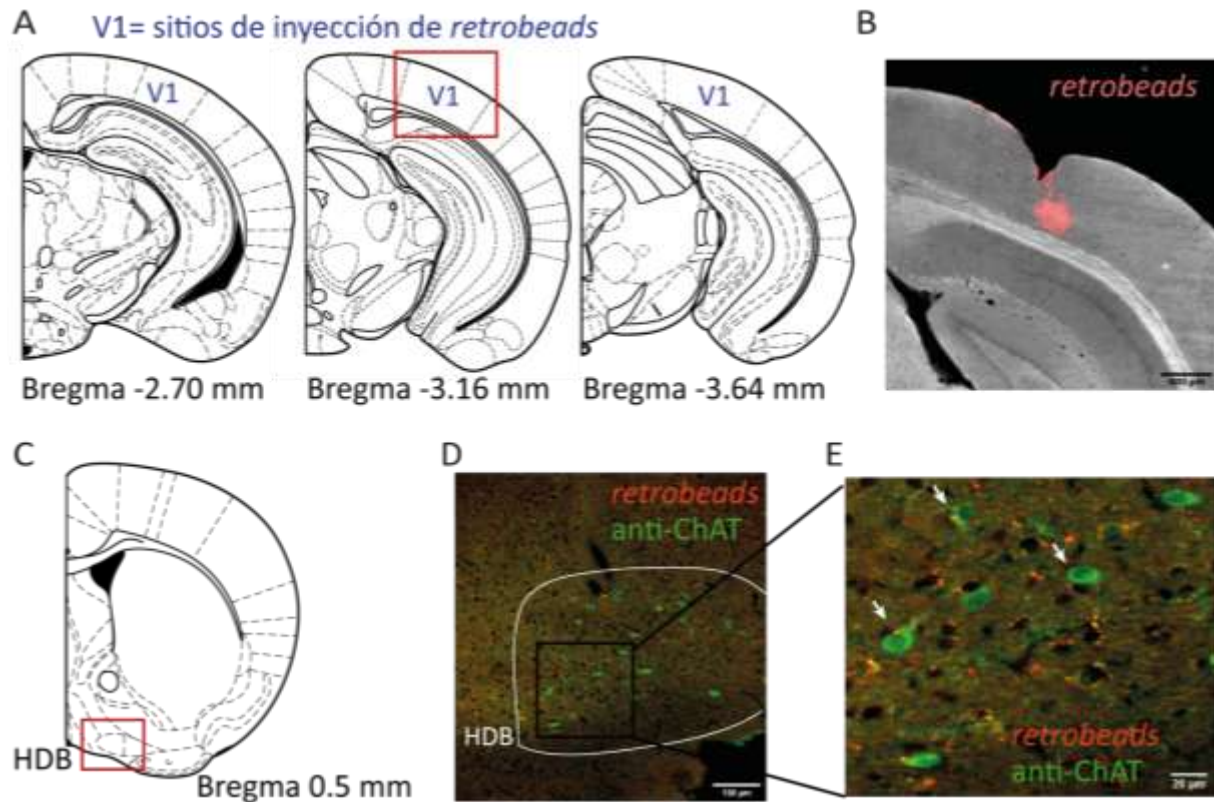


Figura R.3.1. Determinación de las coordenadas del área del BF que proyecta a V1. (A) Esquemas de cortes coronales correspondientes a las coordenadas de los tres sitios de inyección de *retrobeads* en el segmento binocular de V1 (señalado V1), a -2.70 mm, -3.16 mm y -3.64 mm desde bregma. (B) Imagen representativa de un corte coronal de cerebro que muestra uno de los tres sitios de inyección del marcador retrógrado (*retrobeads*, rojo) correspondiente al sitio marcado con un cuadrado rojo en (A). (C) Esquema de un corte coronal a 0.5 mm desde bregma, correspondiente al sitio de marca de *retrobeads* en el HDB. HDB: núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca. (D) Microfotografía fluorescente de un corte coronal a 0.5 mm desde bregma sometido a inmunotinción para ChAT (verde). El área cerebral mostrada corresponde al cuadrado rojo en (C). (E) Imagen ampliada del cuadro de color negro mostrado en (D). Las flechas blancas indican células donde colocaliza la marca de la inmunotinción para ChAT (verde) y los *retrobeads* (rojo). Los esquemas de cortes coronales de (A) y (C) son adaptaciones del atlas Paxinos y Franklin 2da edición, 2001.

R.4. Actividad neuronal del HDB durante el aprendizaje de una tarea de condicionamiento operante recompensada

En esta sección analizaremos las respuestas de las neuronas del HDB registradas durante el aprendizaje de la tarea de condicionamiento operante previamente descrita. Para registrar la actividad de neuronas únicas en esta región, implantamos animales de forma crónica con tetrodos, utilizando las coordenadas estereotáxicas que determinamos en el estudio de los *retrobeads*. Si bien ya habíamos realizado previamente en el laboratorio registros con tetrodos, parte de mi trabajo consistió en optimizar y poner a punto estos registros electrofisiológicos crónicos en un área cerebral muy pequeña y profunda, en animales despiertos y con la cabeza fija (*head-fixed*).

Siguiendo el procedimiento detallado en la sección R.2, se registró la actividad electrofisiológica de neuronas del HDB y se aislaron neuronas únicas mediante análisis y *clustering* de las características de sus potenciales de acción. Una vez identificadas las neuronas aisladas (*clusters*), analizamos sus respuestas a distintos eventos comportamentales de la tarea como la presentación de la clave visual, la entrega de la recompensa y su omisión, y evaluamos cómo varían sus propiedades de codificación entre las etapas inicial y tardía del entrenamiento.

En la etapa inicial, registramos 167 neuronas provenientes de 5 animales, mientras que en la etapa tardía registramos 302 neuronas provenientes de 6 animales. La diferencia en el número de animales incluidos en cada etapa se debe a que uno de ellos no presentaba actividad neuronal detectable en la señal electrofisiológica durante las primeras sesiones de entrenamiento. Es probable que, en este caso, los tetrodos no se encontraran inicialmente en la región de interés, y por eso la señal neuronal comenzó a detectarse en etapas más avanzadas, a medida que avanzamos los electrodos en el eje dorso-ventral.

En las próximas subsecciones se describen los resultados obtenidos para los distintos eventos de la tarea a lo largo del entrenamiento.

R.4.A. Las neuronas del HDB codifican el estímulo visual en ambas etapas del entrenamiento

El estímulo visual constituye un evento clave en esta tarea, ya que actúa como señal que predice la entrega de la recompensa tras la ejecución de una secuencia de *licks*. Diversos estudios han mostrado que las neuronas del BF, en particular las colinérgicas, pueden activarse ante estímulos sensoriales en contextos de aprendizaje asociativo (Crouse et al., 2020; Guo et al., 2019; Harrison et al., 2016; Kuchibhotla et al., 2017; Parikh et al., 2007). Sin embargo, este rol sigue siendo debatido, ya que otros trabajos, como el de Hangya et al. (2015), reportan que estas neuronas no responden a estímulos sensoriales, incluso luego del aprendizaje. Cabe destacar que la mayoría de estas investigaciones se han centrado en estímulos auditivos. Por este motivo, en esta tesis nos propusimos evaluar si las neuronas del HDB responden a claves visuales en el contexto de una tarea de condicionamiento operante guiada por un estímulo visual.

Para ello, alineamos la actividad de cada neurona al momento en que se presenta el estímulo visual y construimos *raster plots* con sus correspondientes histogramas perievento (HPE). En una primera instancia, realizamos un análisis exploratorio en el que encontramos que las neuronas del HDB responden a la clave visual con diferentes patrones de actividad. Por un lado, observamos dos tipos de respuesta: una de corta duración y otra que persiste por más tiempo tras la presentación del estímulo visual, aún cuando la clave ya no está presente. Decidimos analizar por separado estos dos tipos de respuestas. En esta subsección sólo analizaremos las respuestas de corta duración mientras que las de larga duración serán analizadas más adelante en la tesis. Por otro lado, en cuanto a las neuronas con respuesta corta a la clave visual observamos que algunas muestran respuestas excitatorias, como la neurona ejemplo de la **Figura R.4.1A**, mientras que otras exhiben respuestas inhibitorias, como la neurona ejemplo de la **Figura R.4.1B**.

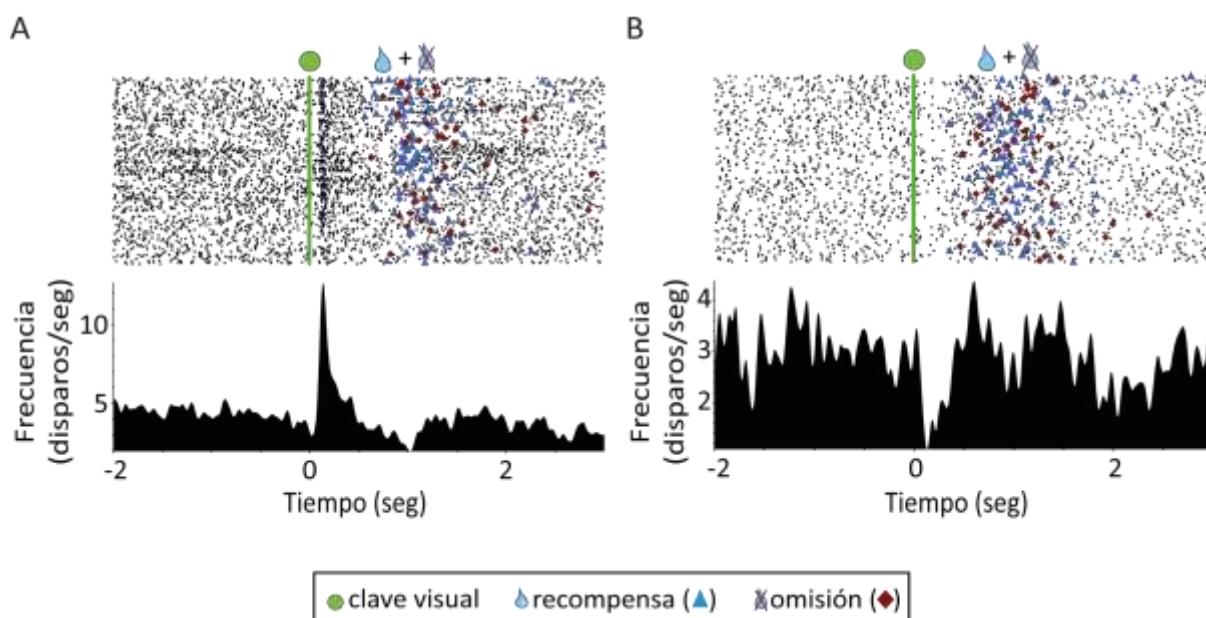


Figura R.4.1. Las neuronas del HDB muestran respuestas cortas excitatorias e inhibitorias a la presentación de la clave visual. Ejemplo representativo de una neurona con respuesta corta excitatoria **(A)** y una con respuesta corta inhibitoria **(B)** a la clave visual. **Panel superior:** *raster plot*; los puntos negros representan cada potencial de acción, registrados en todos los ensayos de una sesión, los símbolos azules indican el momento en que se entregó la recompensa, mientras que los símbolos rojos indican la omisión de la recompensa (ensayos correctos no recompensados). **Panel inferior:** histograma perievento (HPE). Actividad neuronal alineada a la presentación del estímulo visual (tiempo = 0 segundos, línea verde).

Al observar que las neuronas del HDB responden a la clave visual en el contexto de la tarea, nos propusimos analizar cómo evoluciona esa respuesta a lo largo del aprendizaje. Este aspecto ha sido poco explorado en la literatura y presenta resultados contradictorios. Algunos estudios sugieren que las respuestas del HDB a estímulos auditivos emergen únicamente cuando el estímulo predice una recompensa (Crouse et al., 2020; Harrison et al., 2016; Kuchibhotla et al., 2017; Parikh et al., 2007). En cambio, otros trabajos han encontrado que las respuestas aumentan con el aprendizaje, pero están presentes incluso ante estímulos neutros (Guo et al., 2019). Además, aunque se ha planteado que las respuestas se relacionan con el carácter predictivo de recompensa que adquiere el estímulo, aún no se ha caracterizado cómo se establece esa codificación durante las etapas iniciales del aprendizaje.

Para evaluar cómo evoluciona la codificación de la clave visual en las neuronas del HDB, analizamos la actividad de toda la población de neuronas registradas, comparando las etapas inicial y tardía del aprendizaje, como se muestra en la **Figura R.4.2**.

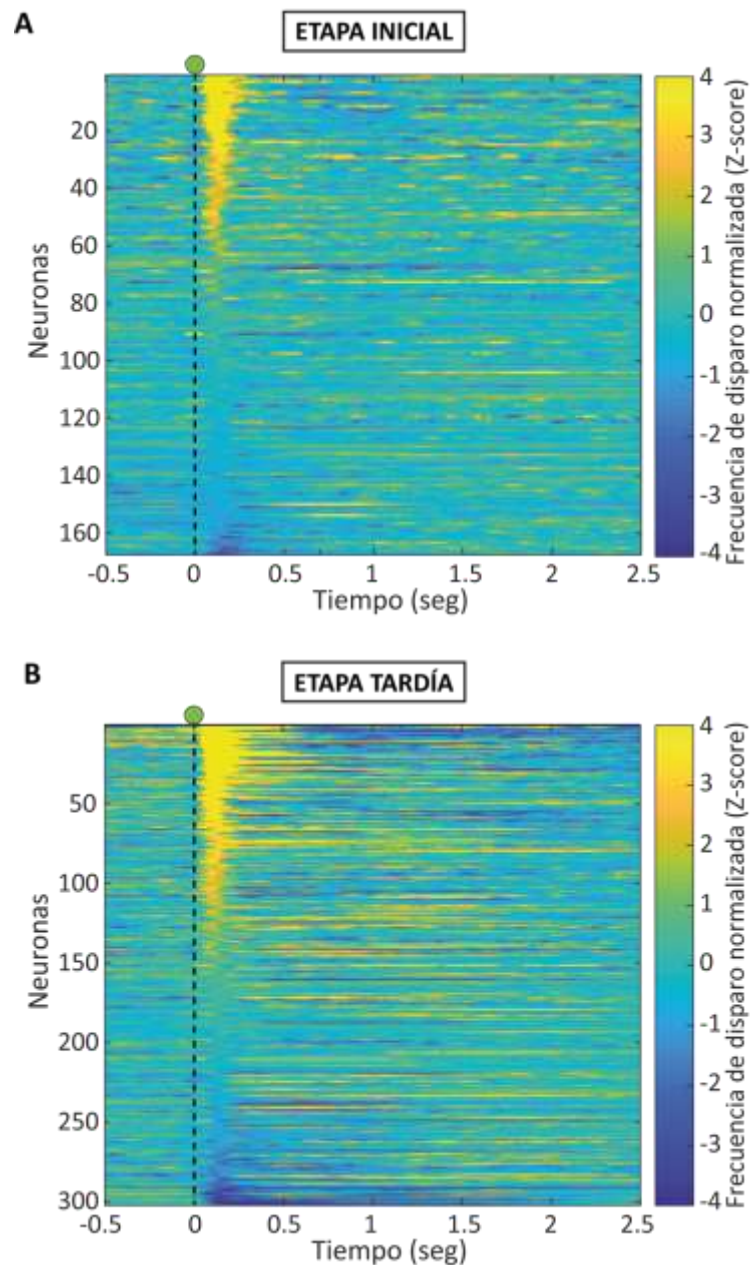


Figura R.4.2. Las neuronas del HDB responden a la clave visual tanto en la etapa inicial como tardía del entrenamiento. Conjunto de los HPE de cada una de las neuronas del HDB registradas en etapa inicial **(A)** y tardía **(B)** del entrenamiento. Se muestra el número total de neuronas registradas en cada etapa, $n = 167$ en etapa inicial y $n = 302$ en etapa tardía. Cada fila corresponde al HPE de una neurona. En el eje x se grafica el tiempo mientras que en el eje y se apilan los HPE de cada neurona. La frecuencia de disparo de las neuronas se encuentra normalizada al Z-score y alineada al momento

de la presentación de la clave visual (tiempo = 0 segundos, indicado con una línea punteada y un círculo verde). En el eje y las neuronas se ordenan de arriba hacia abajo según la intensidad de su respuesta (de mayores a menores valores de Z-score).

En la **Figura R.4.2** se muestra el HPE de cada una de las neuronas registradas en la etapa inicial (**Figura R.4.2A**, $n=167$) y tardía (**Figura R.4.2B**, $n=302$) del entrenamiento. En este gráfico, cada fila corresponde al HPE de una neurona en función del tiempo (eje x). La actividad está alineada a la presentación del estímulo visual (tiempo = 0 segundos). En el eje y, se muestran todas las neuronas, apiladas una sobre la otra. Para poder comparar las respuestas de neuronas con diferente frecuencia de disparo basal, normalizamos la actividad de cada célula utilizando un Z-score (ver sección Materiales y Métodos). Así, la frecuencia de disparo normalizada se muestra en el gráfico utilizando un código de colores (eje z). Los tonos más amarillos indican un incremento en la frecuencia de disparo, mientras que los tonos más azules representan una disminución. En este gráfico, las neuronas se ordenan de arriba hacia abajo, de acuerdo a su media de actividad en un intervalo de 0.08 a 0.2 segundos post encendido de la clave visual.

Una inspección visual de los gráficos de la etapa temprana y tardía del entrenamiento muestra que el patrón de la población de respuestas a la presentación de la clave visual es similar y que las neuronas del HDB responden tanto con excitaciones como inhibiciones en ambas etapas del entrenamiento. Sin embargo, pareciera que las respuestas prolongadas aparecen en la etapa tardía de entrenamiento. Como mencionamos previamente, en esta subsección sólo analizaremos las respuestas de corta duración por lo que esa posible diferencia en etapas del entrenamiento será abordada más adelante.

Para establecer qué neuronas poseen una respuesta corta significativa ante la presentación de la clave visual, definimos una ventana temporal de 0.08 a 0.2 segundos post clave y comparamos la frecuencia de disparo de la neurona en este intervalo con su frecuencia media. Este intervalo temporal fue determinado para tratar de maximizar la detección automática de las respuestas de corta duración observadas. Para ello, establecimos un umbral sumando 2 desvíos estándar al promedio de la actividad de la neurona durante toda la sesión, para detectar respuestas excitatorias, y restando 1 desvío estándar para identificar respuestas inhibitorias (ver sección Materiales y Métodos). De esta manera, clasificamos y cuantificamos de manera automática el número de neuronas con

respuesta corta a la clave visual; la proporción fue de 0.30 (50/167 neuronas) en la etapa inicial y de 0.27 (81/302 neuronas) en la etapa tardía.

Una manera de evaluar si la codificación del estímulo visual evoluciona con el aprendizaje es estudiar si la proporción de neuronas que presentan respuesta corta, tanto excitatorias como inhibitorias, cambia a lo largo del entrenamiento. Al analizar esto, no observamos diferencias significativas en la proporción de neuronas con este tipo de respuesta en ambas etapas (**Figura R.4.3A**). Por otro lado, tal como mostramos en la **Figura R.4.1**, de aquellas neuronas que presentan una respuesta corta significativa a la clave visual encontramos tanto respuestas excitatorias como inhibitorias en la etapa inicial (**Figura R.4.3B**) y tardía del entrenamiento (**Figura R.4.3C**). Analizamos si esta composición se modifica con el aprendizaje y tampoco encontramos diferencias significativas en las proporciones de respuestas excitatorias (etapa inicial: 0.25, $n = 42/167$ vs etapa tardía: 0.23, $n = 69/302$; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$) e inhibitorias (etapa inicial: 0.05, $n = 8/167$ vs etapa tardía: 0.04, $n = 12/302$; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$) en ambas etapas del entrenamiento.

Dado que no encontramos diferencias en el porcentaje de neuronas con respuesta de corta duración a la clave visual, planteamos la hipótesis de que el aprendizaje podría influir no en el número de neuronas activadas, sino en las propiedades de su respuesta.. Para explorar esta posibilidad, calculamos el área bajo la curva de todas las neuronas con respuesta significativa y evaluamos si éstas cambian a lo largo del entrenamiento. Esta medida contempla tanto la amplitud (pico o valle) como la duración temporal de la respuesta, por lo que es utilizada como un indicador de su magnitud. El promedio de las respuestas excitatorias e inhibitorias en la etapa inicial y tardía se muestra en la **Figura R.4.3D-E**. No observamos diferencias significativas en la magnitud de las respuestas excitatorias entre etapas (etapa inicial: mediana = 0.65, $n = 42/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana= 0.68, $n = 69/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$, **Figura R.4.3F**), ni en las respuestas inhibitorias (etapa inicial: 0.47 ± 0.12 , $n = 8/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.63 ± 0.13 , $n = 12/302$ neuronas, *T-test* de muestras no pareadas, $p > 0.05$; se indica media $\pm$ error estándar, **Figura R.4.3G**).

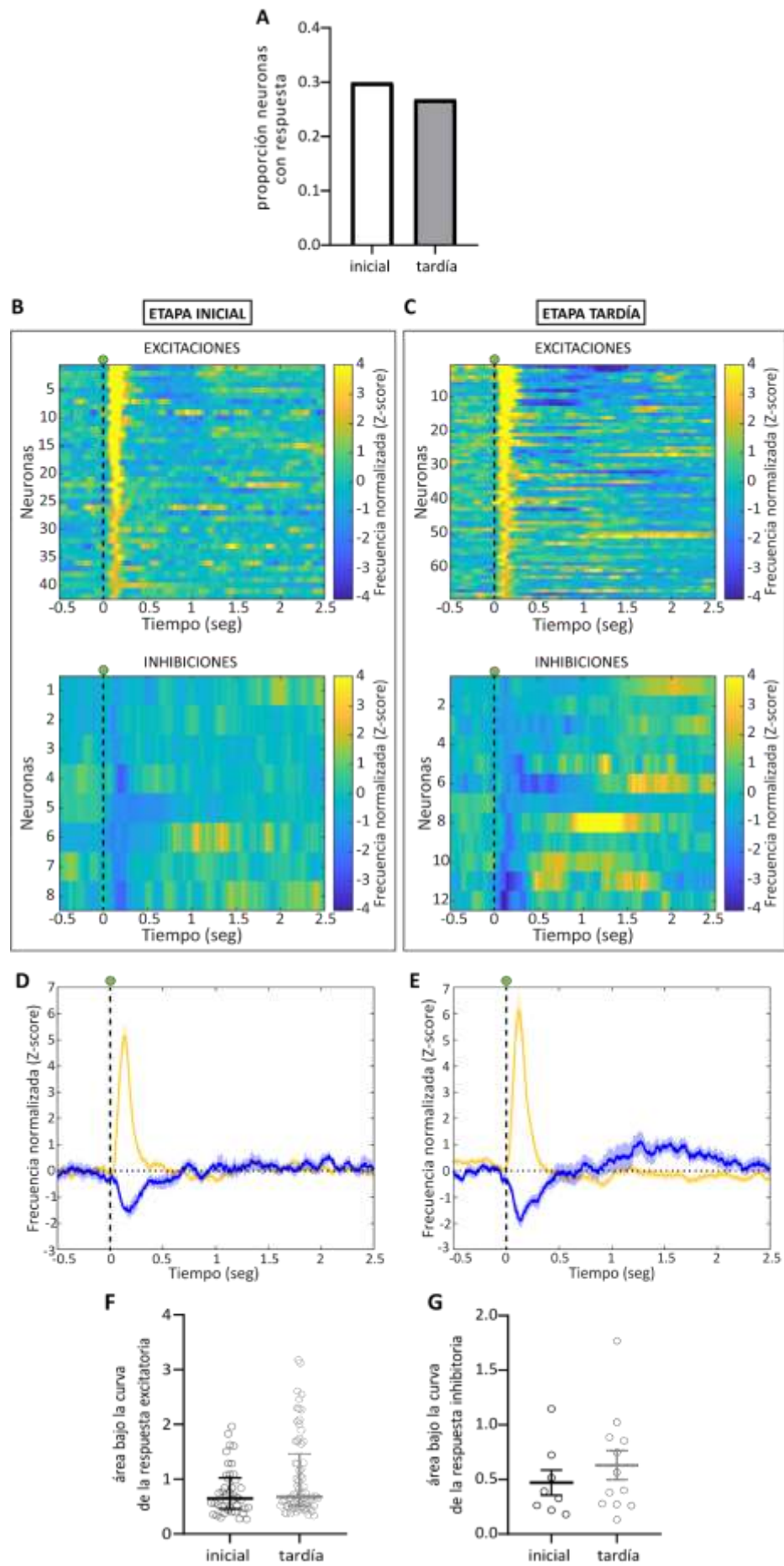


Figura R.4.3. La proporción de neuronas con respuesta corta a la clave visual no se modifica con el entrenamiento como así tampoco la magnitud de sus respuestas excitatorias e inhibitorias. (A) Proporción de neuronas con respuesta corta al estímulo visual (etapa inicial: 0.30, $n = 50/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.27, $81/302$ neuronas; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$). HPE de todas las respuestas excitatorias e inhibitorias en la etapa inicial **(B)** y tardía **(C)** del entrenamiento. La actividad de las neuronas está alineada a la presentación de la clave visual (tiempo = 0 segundos, indicado con una línea punteada y un círculo verde). Respuesta promedio de todas las excitaciones (curva naranja) e inhibiciones (curva azul) en la etapa inicial **(D)** y tardía **(E)**. Se muestra la media $\pm$ error estándar (sombra sobre la curva). **(F)** Área bajo la curva de las respuestas excitatorias (etapa inicial: mediana = 0.65, $Q1 = 0.46$, $Q3 = 1.02$, $n = 42/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 0.68, $Q1 = 0.52$, $Q3 = 1.47$, $n = 69/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$). Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. **(G)** Área bajo la curva de las respuestas inhibitorias (etapa inicial: 0.47 ± 0.12 , $n = 8/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.63 ± 0.13 , $n = 12/302$ neuronas; *T-test* de muestras no pareadas, $p > 0.05$). Se muestra la media $\pm$ error estándar.

Para seguir explorando la hipótesis de que el aprendizaje modifica las características de la respuesta neuronal, y no necesariamente la proporción de neuronas con respuesta, analizamos la latencia de las respuestas cortas a la clave visual. Para ello, determinamos la latencia al primer valor de frecuencia de disparo normalizada que cruza el umbral establecido para la detección de respuestas significativas. Dichos valores de latencia se indican con un punto rojo en los HPE de las **Figuras R.4.4A-B**. En esta figura, a diferencia de la **Figura R.4.2**, mostramos únicamente aquellas neuronas que poseen una respuesta significativa de corta duración a la clave visual. Observamos que los cambios en la frecuencia de disparo desencadenados por la presentación de la clave visual ocurren de manera rápida, es decir, presentan una latencia baja en ambas etapas del entrenamiento. Sin embargo, con el aprendizaje, se observó una latencia aún menor en la etapa tardía (etapa inicial: mediana = 0.08 segundos, $n = 50/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 0.06 segundos, $n = 81/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $*p = 0.001$; **Figura R.4.4C**). Es decir, las respuestas de corta duración son desencadenadas más rápidamente por la presentación de la clave visual en la etapa tardía del entrenamiento.

A partir de estos resultados, podemos afirmar que una subpoblación de neuronas del HDB codifica el estímulo visual con respuesta de corta duración desde las primeras sesiones de entrenamiento. Además, tanto la proporción de neuronas con esta respuesta como la

magnitud de sus respuestas no se ven modificadas como consecuencia del aprendizaje. Por último, observamos que la latencia de estas respuestas disminuye significativamente en la etapa tardía del entrenamiento. Una respuesta más rápida a la clave visual le permitiría al animal iniciar más rápidamente la secuencia de *licks* y, en consecuencia, obtener la recompensa en menos tiempo.

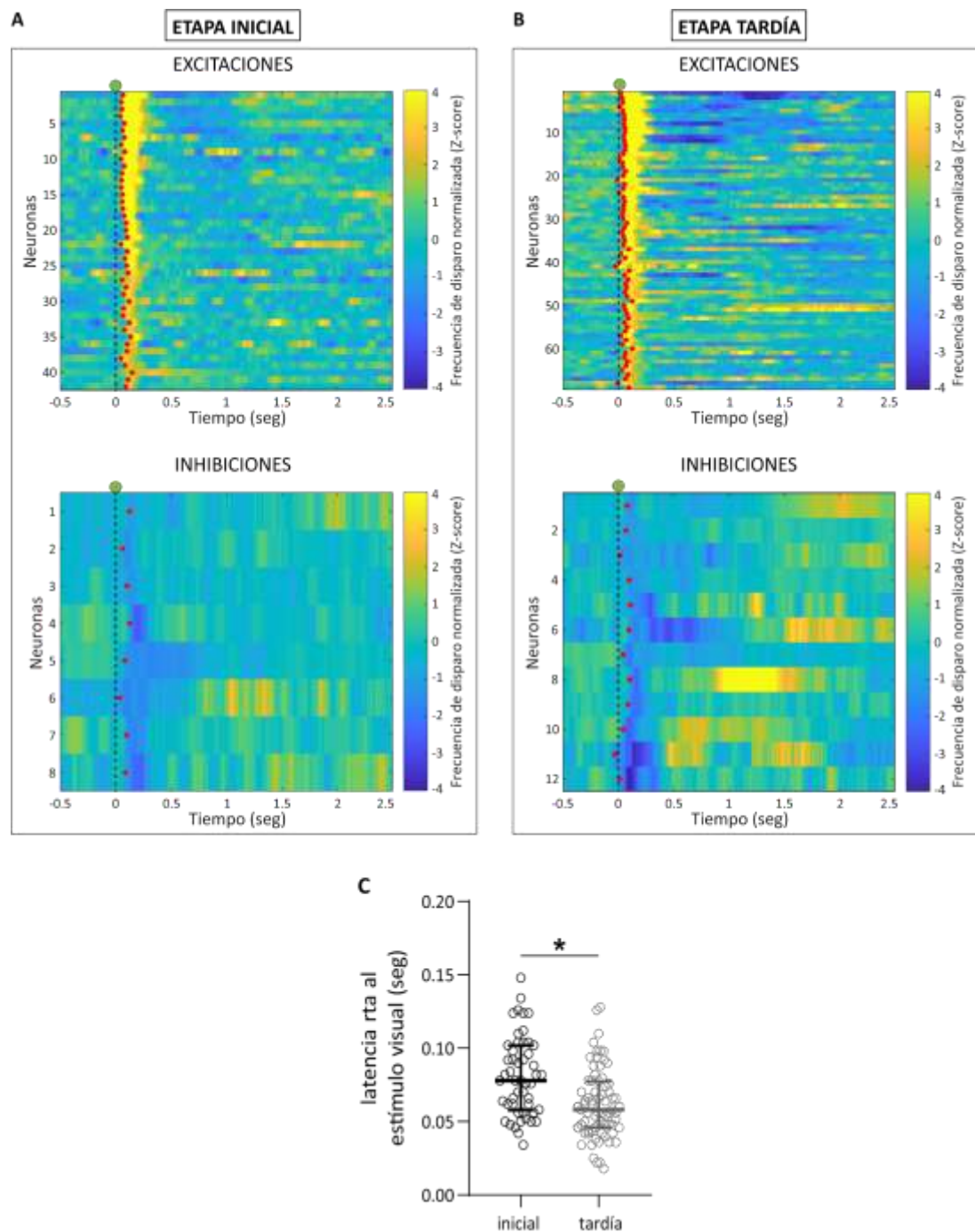


Figura R.4.4. Las neuronas del HDB muestran una corta latencia en sus respuestas de corta duración a la clave visual. Esta latencia disminuye con el aprendizaje de la tarea operante recompensada. HPE de todas las respuestas cortas excitatorias e inhibitorias en la etapa inicial **(A)** y en la etapa tardía **(B)** del entrenamiento. La actividad de las neuronas está alineada a la presentación de la clave visual (tiempo = 0 segundos, indicado con una línea punteada y un círculo verde). La latencia de la respuesta de cada neurona está indicada con un círculo de color rojo en los HPE. **(C)** Latencia de las respuestas cortas a la clave visual comparando la etapa inicial y tardía del entrenamiento (etapa inicial: mediana = 0.08 segundos, Q1 = 0.06, Q3 = 0.10, n= 50/167 neuronas vs etapa tardía: mediana = 0.06 segundos, Q1 = 0.05, Q3 = 0.08, n= 81/302 neuronas; *Mann-Whitney test*, *p= 0.001). Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. En cada grupo se encuentran incluidas tanto las excitaciones como las inhibiciones.

R.4.B. La codificación de la recompensa no se modifica con el aprendizaje

La recompensa constituye uno de los eventos más relevantes de la tarea; de hecho, puede considerarse el evento principal, ya que refuerza la conducta del animal y lo motiva a aprender la tarea. Estudios previos han mostrado que las neuronas del BF presentan respuestas rápidas a las recompensas (Hangya et al., 2015; Laszlovszky et al., 2020; S.-C. Lin & Nicolelis, 2008; Sturgill et al., 2020). Sin embargo, aún se desconoce cómo evoluciona esta actividad a lo largo del aprendizaje. Para abordar esta pregunta, aplicamos los mismos análisis descriptos en la subsección anterior.

En primer lugar, realizamos un análisis exploratorio con el objetivo de caracterizar los distintos tipos de respuestas neuronales ante la recompensa observadas en nuestros registros. Para ello, alineamos la actividad de cada neurona al momento de entrega de la recompensa y realizamos *raster plots* con sus respectivos HPE. Observamos que las neuronas del HDB presentan tanto respuestas excitatorias (**Figura R.4.5A**) como inhibitorias (**Figura R.4.5B**) ante la recompensa.

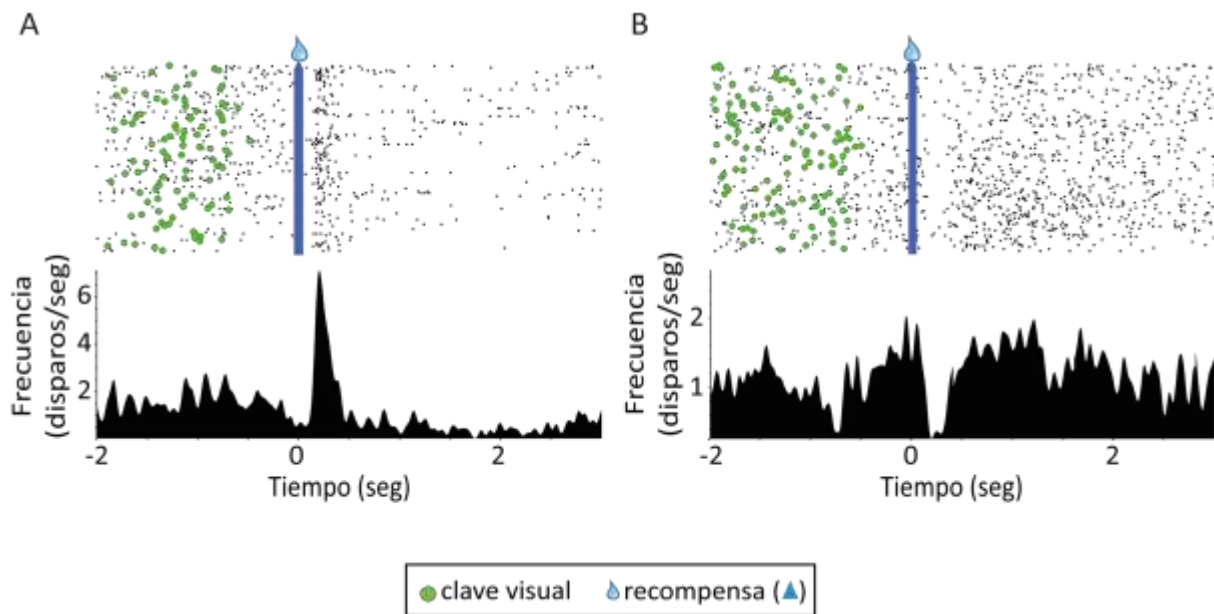


Figura R.4.5. Las neuronas del HDB responden con excitación o inhibición a la entrega de la recompensa. Ejemplo representativo de una neurona con respuesta excitatoria **(A)** y una con respuesta inhibitoria **(B)** a la recompensa (símbolo azul). **Panel superior:** *raster plot*; los puntos negros representan cada potencial de acción, registrados en todos los ensayos recompensados de una sesión, los símbolos verdes indican el momento en que se presentó la clave visual. **Panel inferior:** histograma perievento (HPE). Actividad neuronal alineada a la entrega de la recompensa (tiempo = 0 segundos, línea azul).

En base al perfil de respuestas observadas en el análisis exploratorio definimos una ventana temporal de 0.1 a 0.3 segundos posterior a la entrega de la recompensa y aplicamos el mismo criterio de umbral explicado previamente para clasificar de manera automática aquellas neuronas con respuesta significativa a este evento.

Luego de cuantificar la cantidad de neuronas con respuesta significativa a la recompensa, comparamos la proporción en ambas etapas para evaluar si la codificación de la recompensa evoluciona con el aprendizaje. Al igual que lo observado con la codificación del estímulo visual, no observamos diferencias significativas en la proporción de neuronas con este tipo de respuesta entre ambas etapas. En la etapa inicial, la proporción fue de 0.35, mientras que en la etapa tardía fue de 0.28 (etapa inicial: 58/167 neuronas vs etapa tardía: 85/302 neuronas; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$, **Figura R.4.6A**). Si distinguimos por tipo de respuesta a la recompensa identificamos 46 neuronas con respuesta excitatoria y 12 con respuesta inhibitoria de un total de 167 neuronas en la etapa inicial (**Figura R.4.6B**),

mientras que en la etapa tardía registramos 73 con respuesta excitatoria y 12 con respuesta inhibitoria de un total de 302 neuronas (**Figura R.4.6C**). Tampoco encontramos diferencias significativas en la proporción de excitaciones (etapa inicial = 0.28 vs etapa tardía = 0.24; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$) ni inhibiciones (etapa inicial = 0.07 vs etapa tardía = 0.04; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$) en ambas etapas del entrenamiento.

Por otro lado, al analizar si la magnitud de las respuestas se modifica con el aprendizaje, tampoco encontramos diferencias significativas en la respuesta excitatoria (etapa inicial: mediana = 2.07, $n = 46/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 2.30, $n = 73/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$; **Figura R.4.6F**). Sin embargo, sí observamos un cambio significativo en la respuesta inhibitoria, cuya magnitud aumentó en la etapa tardía del entrenamiento (etapa inicial: mediana = 0.72, $n = 12/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 3.37, $n = 12/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $*p = 0.0005$; **Figura R.4.6G**). El aumento en el área bajo de la curva de la respuesta inhibitoria se debe principalmente a una mayor duración de las inhibiciones en la etapa tardía del entrenamiento, como se puede observar en las **Figuras R.4.6D-E**, ya que la amplitud de las mismas no se ve modificada entre ambas etapas (etapa inicial: -2.00 ± 0.30 Z-score, $n = 12/167$ neuronas vs etapa tardía: -2.40 ± 0.18 Z-score, $n = 12/302$ neuronas; *T-test* de muestras no pareadas, $p > 0.05$).

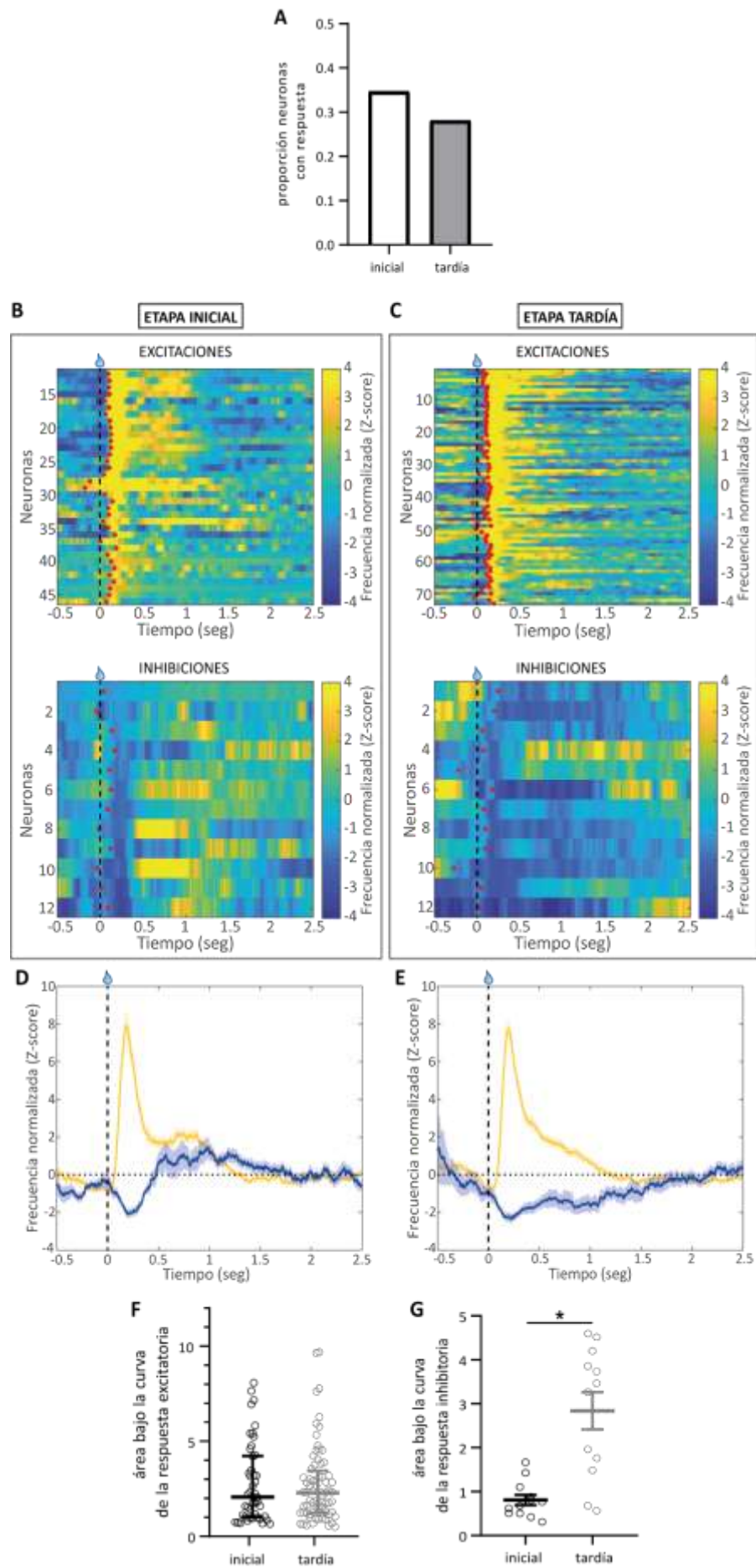


Figura R.4.6. Aproximadamente un tercio de las neuronas del HDB responde a la entrega de la recompensa en ambas etapas del aprendizaje. (A) Proporción de neuronas con respuesta a la recompensa (etapa inicial: 0.35, $n = 58/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.28, $85/302$ neuronas; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$). HPE de todas las respuestas excitatorias e inhibitorias a la recompensa en la etapa inicial (B) y tardía del entrenamiento (C); el momento de inicio de la respuesta de cada neurona está indicado con un punto rojo en los HPE. La actividad de las neuronas está alineada a la entrega de la recompensa (tiempo = 0 segundos, indicado con una línea punteada y un símbolo celeste). Respuesta promedio de todas las excitaciones (curva naranja) e inhibiciones (curva azul) en la etapa inicial (D) y tardía (E). Se muestra la media junto con el error estándar (sombra sobre la curva). (F) Área bajo la curva de las respuestas excitatorias (etapa inicial: mediana = 2.07, $Q1 = 1.02$, $Q3 = 4.22$, $n = 46/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 2.30, $Q1 = 1.25$, $Q3 = 3.45$, $n = 73/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$). (G) Área bajo la curva de las respuestas inhibitorias (etapa inicial: mediana = 0.72, $Q1 = 0.50$, $Q3 = 1.05$, $n = 12/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 3.37, $Q1 = 1.56$, $Q3 = 4.11$, $n = 12/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $*p = 0.0005$). En (F) y (G) se muestra la mediana y el rango intercuartílico.

Además, analizamos si la latencia de estas respuestas se ve afectada por el aprendizaje de la tarea. Este parámetro fue calculado tal como se describió en el análisis de las respuestas a la clave visual y los valores obtenidos se marcan con un punto rojo en los HPE de las **Figuras R.4.6B-C**. Como se observa en la **Figura R.4.7**, la latencia de las respuestas a la recompensa no se ve modificada por el aprendizaje de la tarea. No encontramos diferencias significativas en este parámetro entre las distintas etapas del entrenamiento (etapa inicial: 0.1044 ± 0.0048 segundos, $n = 58/167$ neuronas vs etapa final: 0.1146 ± 0.0045 , $n = 85/302$ neuronas. Los valores corresponden a media $\pm$ error estándar; *T- test* de muestras no pareadas, $p > 0.05$; **Figura R.4.7**).

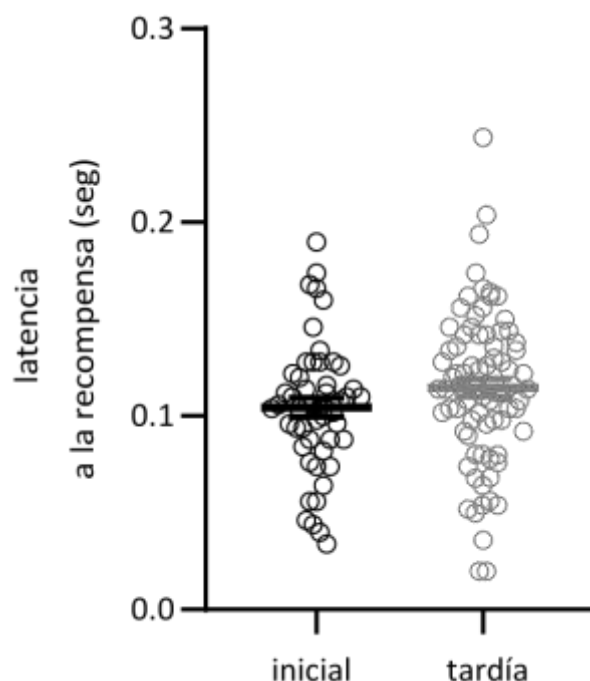


Figura R.4.7. Las neuronas del HDB muestran una corta latencia en sus respuestas a la recompensa. Esta latencia no cambia con el aprendizaje de la tarea operante recompensada. Latencia de las respuestas a la recompensa comparando la etapa inicial y tardía del entrenamiento (etapa inicial: 0.1044 ± 0.0048 segundos, $n = 58/167$ neuronas vs etapa final: 0.1146 ± 0.0045 , $n = 85/302$ neuronas; *T- test* de muestras no pareadas, $p > 0.05$). Se muestra la media $\pm$ error estándar. En cada grupo se encuentran incluidas tanto las excitaciones como las inhibiciones.

A partir de estos resultados, podemos concluir que la respuesta de las neuronas del HDB ante la recompensa no parece modificarse a lo largo del entrenamiento. Al comparar las etapas inicial y tardía, no se observaron cambios en la proporción de neuronas, la latencia de sus respuestas ni la magnitud de sus respuestas excitatorias. Solo se evidenció un aumento en la magnitud de las respuestas inhibitorias a la recompensa.

Por otro lado, al realizar un análisis exploratorio de los *raster plot* de la actividad de las neuronas con respuesta significativa a la recompensa nos llamó la atención notar que algunas parecían disminuir su respuesta a medida que avanza la sesión de entrenamiento, es decir a medida que el animal recibe las recompensas sucesivas y se va saciando (**Figura R.4.8A**). Para analizar cuantitativamente esta posible modulación dividimos cada sesión de entrenamiento en bloques de 15 recompensas (cada neurona tiene al menos 7 bloques), construimos un HPE alineado a la recompensa para cada bloque y calculamos la frecuencia media de la neurona en el intervalo temporal utilizado para clasificar las respuestas a este

evento. Esto fue realizado para cada neurona que había sido clasificada con respuesta significativa a la recompensa. Luego, graficamos la frecuencia normalizada (Z-score) en función del bloque y ajustamos los datos a una regresión lineal. Por último, cuantificamos cuántas neuronas presentaban una pendiente negativa significativa en su regresión lineal, lo que indicaría una disminución de su respuesta a lo largo de la sesión de entrenamiento.

A partir de este análisis, encontramos que una proporción de las neuronas con respuesta a la recompensa, 0.17 en la etapa inicial y 0.34 en la etapa tardía, mostró una disminución significativa en su respuesta conforme avanzaba la sesión, como se puede ver en el *raster plot* de una neurona ejemplo (**Figura R.4.8A**). Las Figuras **R.4.8B-C** muestran la curva promedio de aquellas neuronas cuya respuesta decrece, en contraste con las neuronas cuya actividad no se modula a lo largo de la sesión. Además, observamos que la proporción de estas neuronas aumenta significativamente con el entrenamiento, duplicándose en la etapa tardía (etapa inicial = 10/58 neuronas vs etapa tardía = 29/85 neuronas; *Fisher's exact test*, * $p = 0.035$, **Figura R.4.8D**).

Esta modulación en la respuesta neuronal podría interpretarse como una codificación del valor subjetivo de la recompensa. A medida que avanza la sesión y los animales obtienen más recompensas, su nivel de saciedad aumenta y, en consecuencia, el valor percibido de la recompensa disminuye. Así, la reducción progresiva en la actividad de un subgrupo de neuronas del HDB observada durante la sesión podría estar asociada con una disminución en la valoración de la recompensa.

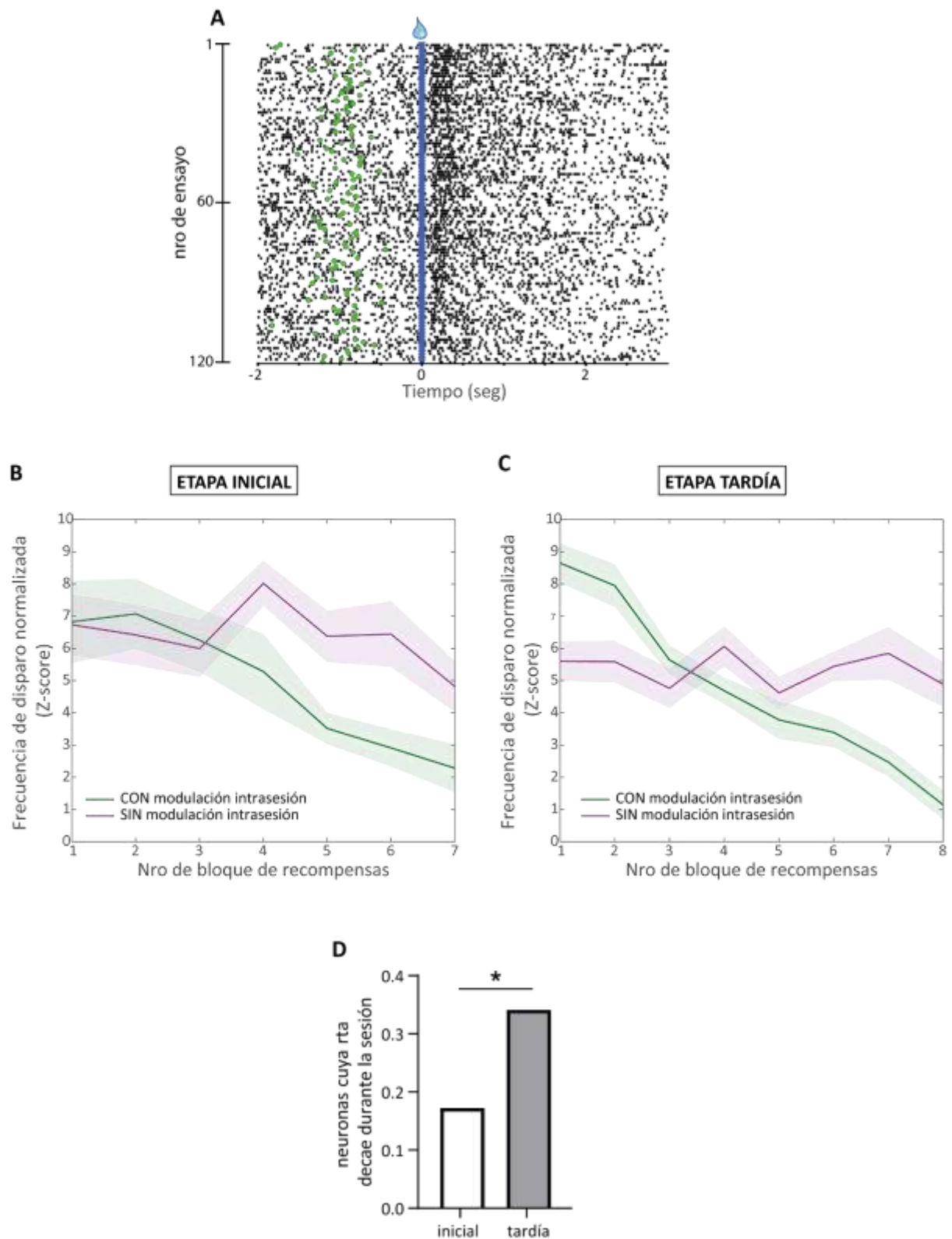


Figura R.4.8. Una subpoblación de las neuronas del HDB que responden a la recompensa podría estar codificando el valor subjetivo de la recompensa. (A) Raster plot de una neurona ejemplo cuya respuesta a la recompensa disminuye a lo largo de la sesión de entrenamiento. La actividad está alineada a la recompensa (tiempo = 0 segundos, marcado con símbolo azul). Cada punto negro

representa un potencial de acción de la neurona y cada fila de puntos corresponde a un ensayo. Los ensayos están ordenados según el orden en que ocurrieron en la sesión. **(B) y (C)** Promedio de la frecuencia de disparo normalizada (Z-score) del grupo de neuronas cuya respuesta a la recompensa decrece a lo largo de la sesión (curva verde) y del grupo cuya respuesta no se modifica (curva rosa), graficado en función del número de bloque de recompensas, en la etapa inicial y tardía del entrenamiento, respectivamente. Se muestra la media junto con el error estándar (sombra sobre la curva). **(D)** Proporción de neuronas cuya respuesta a la recompensa decae a lo largo de la de sesión respecto del total de neuronas que fueron clasificadas con respuesta significativa a la recompensa, comparando etapa inicial y tardía del entrenamiento ($n = 10/58$ vs $n = 29/85$ neuronas; *Fisher's exact test*, $*p = 0.035$).

R.4.C. Las neuronas del HDB codifican la omisión de la recompensa, y la proporción de células que lo hace aumenta con el aprendizaje

Continuando con el análisis de la codificación neuronal en el HDB durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada, analizamos si estas neuronas modifican su actividad en los ensayos correctos en los que la recompensa fue omitida. Es decir, aquellos en los que el animal completó la secuencia de cinco *licks*, pero no recibió la recompensa esperada. Esta condición resulta especialmente relevante para estudiar la codificación de expectativa o predicción de recompensa si la hubiera.

Algunos pocos estudios han mostrado que las neuronas del BF pueden codificar la omisión de una recompensa esperada. Según lo propuesto por Robert et al. (2021), esta capacidad dependería del núcleo específico del BF en estudio, ya que los distintos núcleos presentan patrones diferenciados de conexiones aferentes y eferentes, lo que podría traducirse en propiedades de codificación distintas. En ese trabajo, los autores compararon la actividad de neuronas colinérgicas de dos núcleos del BF, el HDB y la sustancia innominada (SI), y observaron respuestas a la omisión únicamente en el HDB. Por otra parte, un estudio en primates identificó dos tipos de neuronas en el BF con perfiles de respuesta distintos frente a la recompensa: un grupo que responde de manera fásica en el momento de la entrega y otro que presenta respuestas en rampa que anticipan su ocurrencia (Zhang et al., 2019). En este caso, los autores describieron que solo las neuronas con respuestas anticipatorias en rampa respondían también a la omisión, es decir, se activaban cuando una

recompensa esperada no era entregada. A pesar de estos hallazgos, todavía se conoce poco sobre cómo codifican las neuronas del BF la omisión de recompensas.

Para abordar esta cuestión, alineamos la actividad neuronal al quinto *lick* correcto no recompensado, que en adelante denominaremos omisión de la recompensa (ya que es el momento en el que el animal la hubiese recibido), y generamos los mismos gráficos utilizados en los análisis anteriores (*raster plots* y HPE). Esto nos permitió evaluar si las neuronas del HDB presentan respuestas frente a la omisión. Sin embargo, es importante destacar que en la tarea no hay una clave que indique si el ensayo será o no recompensado, y por lo tanto es de esperarse una mayor variabilidad en el tiempo de inicio, amplitud y duración de estas respuestas si las hubiere. Nuestros resultados muestran que las neuronas del HDB responden a la omisión de la recompensa con patrones tanto excitatorios (**Figura R.4.9A**) como inhibitorios (**Figura R.4.9B**).

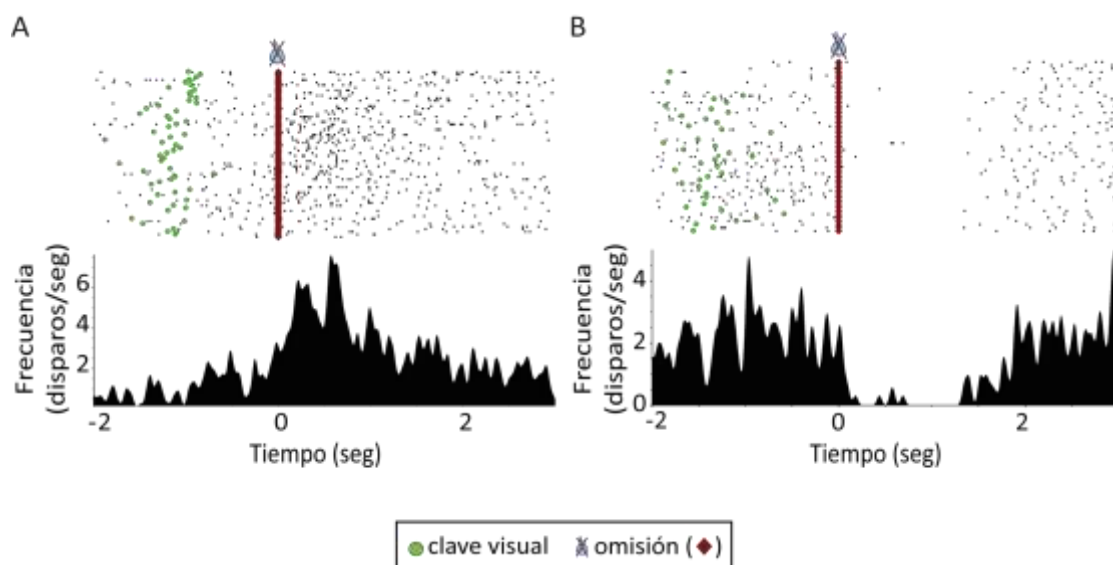


Figura R.4.9. Las neuronas del HDB responden con excitación o inhibición a la omisión de la recompensa. Ejemplo representativo de una neurona con respuesta excitatoria (**A**) y una con respuesta inhibitoria (**B**) a la omisión de la recompensa. **Panel superior:** *raster plot*; los puntos negros representan los potenciales de acción, registrados en todos los ensayos no recompensados de una sesión, los símbolos verdes indican el momento en que se presentó la clave visual. La actividad neuronal se encuentra alineada a la omisión de la recompensa (tiempo = 0 segundos, línea roja). **Panel inferior:** histograma perievento (HPE).

Según el perfil de respuestas observadas, la ventana temporal determinada para clasificar de manera automática estas respuestas fue de 0.3 a 0.7 segundos posterior a la omisión y utilizamos el mismo criterio de umbral ya explicado. Así cuantificamos una proporción de 0.14 de neuronas con respuesta a la omisión en la etapa inicial y de 0.28 en la etapa tardía. Observamos que, con el entrenamiento, la proporción de neuronas que codifican la omisión aumenta significativamente (etapa inicial, 23/167 neuronas vs etapa tardía, 85/302 neuronas; *Fisher's exact test*, $*p = 0.0004$, **Figura R.4.10A**). Por otro lado, a diferencia de lo observado en las respuestas a la clave visual y a la recompensa, en ambas etapas del entrenamiento, la mayoría de las respuestas a la omisión son inhibiciones (**Figura R.4.10B-C**). En este caso vemos un aumento significativo de la proporción de inhibiciones (etapa inicial: 0.1, $n=16/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.23, $n=69/302$ neuronas; *Fisher's exact test*, $p = 0.0003$) pero no de la proporción de excitaciones (etapa inicial: 0.04, $n=7/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.05, $n=16/302$ neuronas; *Fisher's exact test*, $p > 0.05$) en la etapa tardía del entrenamiento.

Aunque la proporción de neuronas con respuesta a la omisión aumenta con el aprendizaje, al analizar la respuesta promedio tanto de las excitaciones como las inhibiciones en ambas etapas del entrenamiento (**Figura R.4.10D-E**), no observamos cambios significativos en la magnitud de las respuestas excitatorias entre etapas (etapa inicial: mediana = 1.92, $n = 7/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 2.17, $n = 16/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$, **Figura R.4.10F**), ni en las respuestas inhibitorias (etapa inicial: mediana = 2.97, $n = 16/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 3.02, $n = 69/302$ neuronas, *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$, **Figura R.4.10G**).

Al observar que la mayoría de las respuestas a la omisión son inhibiciones y que es precisamente la proporción de estas la que aumenta con el aprendizaje, continuamos con el análisis centrándonos en las respuestas inhibitorias.

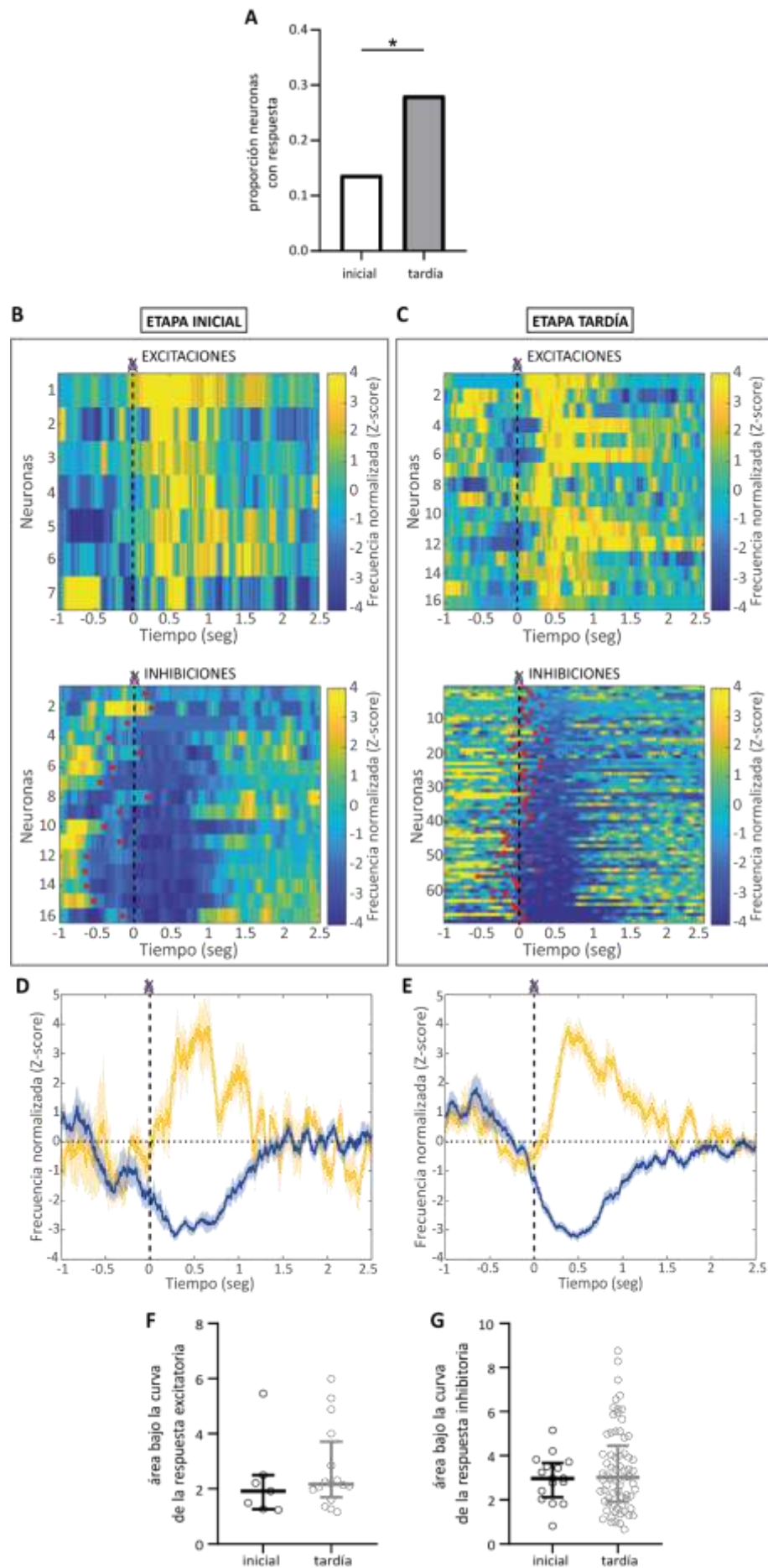


Figura R.4.10. La proporción de neuronas del HDB con respuesta a la omisión de la recompensa es mayor en la etapa tardía del entrenamiento. (A) Proporción de las neuronas con respuesta a la omisión (etapa inicial: 0.14, $n = 23/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.28, 85/302 neuronas; *Fisher's exact test*, $*p = 0.0004$). HPE de todas las respuestas excitatorias e inhibitorias a la omisión en la etapa inicial **(B)** y tardía **(C)** del entrenamiento. La actividad de las neuronas está alineada a la omisión de la recompensa (tiempo = 0 segundos, 5to *lick* no recompensado indicado con una línea punteada); el inicio de la respuesta de cada inhibición está indicado con un punto rojo en los HPE. Respuesta promedio de todas las excitaciones (curva naranja) e inhibiciones (curva azul) en la etapa inicial **(D)** y tardía **(E)**. Se muestra la media junto con el error estándar (sombra sobre la curva). **(F)** Área bajo la curva de las respuestas excitatorias (etapa inicial: mediana = 1.92, $Q1 = 1.26$, $Q3 = 2.49$, $n = 7/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 2.17, $Q1 = 1.69$, $Q3 = 3.71$, $n = 16/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$). **(G)** Área bajo la curva de las respuestas inhibitorias (etapa inicial: mediana = 2.97, $Q1 = 2.12$, $Q3 = 3.67$, $n = 16/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 3.02, $Q1 = 1.91$, $Q3 = 4.46$, $n = 69/302$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $p > 0.05$). En (F) y (G) se muestra la mediana y el rango intercuartílico.

A partir de nuestros resultados podemos decir que, una vez que los animales han aprendido y consolidado la asociación entre la clave visual y la recompensa, aumenta el porcentaje de neuronas que responden ante la omisión. Esto sugiere que, tras el aprendizaje, las neuronas del HDB no sólo codifican la presencia de estímulos salientes (como la clave visual y la recompensa), sino también la ausencia de un resultado esperado. En el contexto de la tarea, la presentación de la clave visual genera una expectativa de recompensa. Cuando dicha expectativa no se cumple, se produce una señal de error, que correspondería a la respuesta observada ante la omisión. Dado que no hay una señal explícita que indique que el ensayo será no recompensado, y considerando que la respuesta neuronal se alinea temporalmente bastante bien con el quinto *lick* no recompensado (momento en que se entregaría la recompensa), esta actividad podría reflejar una señal de error asociada al momento de expectativa temporal. Para evaluar esta hipótesis, calculamos el tiempo de inicio de las respuestas neuronales con respecto al momento en que debería haberse producido la recompensa.

El valor del tiempo de inicio para cada neurona se muestra indicado con un círculo rojo en los HPE de las **Figuras R.4.10B-C**. Al comparar ambas etapas del entrenamiento encontramos que este parámetro cambia de manera significativa como consecuencia del

aprendizaje (**Figura R.4.11**). En la etapa tardía, el tiempo de inicio de la respuesta de omisión adquiere un valor muy cercano a cero (mediana=0.02), sugiriendo que estas neuronas indican con exactitud cuándo se espera recibir la recompensa. Por otro lado, la mediana en la etapa inicial es -0.25, lo que evidencia una estimación adelantada del tiempo de recompensa. La omisión no es un evento señalizado, ya que no se presenta ninguna clave que indique que la recompensa no llegará en ese momento. Por lo tanto, la respuesta neuronal a la omisión depende de la propia estimación temporal del animal. Esto podría explicar por qué muchas respuestas neuronales a la omisión ocurren antes del quinto *lick* no recompensado. Otro aspecto a destacar es que la variabilidad en el tiempo de inicio de las respuestas es menor en la etapa tardía (diferencia significativa en la varianza entre los grupos; *Levene test*, $p = 0.004$). Esto indica que la estimación del tiempo en que se espera la llegada de la recompensa por parte de esta población de neuronas se vuelve más precisa como consecuencia del aprendizaje.

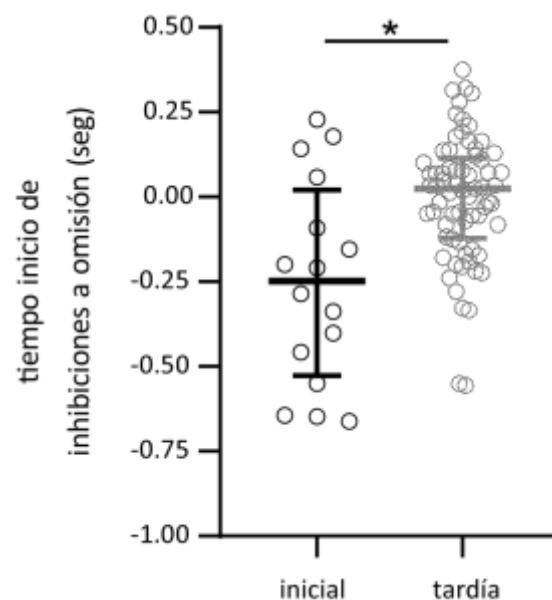


Figura R.4.11. Las neuronas del HDB que codifican la omisión muestran una estimación del tiempo de recompensa más precisa y exacta en la etapa tardía del entrenamiento. Tiempo de inicio de las respuestas inhibitorias a la omisión comparando la etapa inicial y tardía del entrenamiento (etapa inicial: mediana = -0.25, Q1 = -0.53, Q3 = 0.02, $n = 16/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 0.02, Q1 = -0.12, Q3 = 0.11, $n = 69/302$ neuronas; *Mann Whitney test*, $*p = 0.0019$). Se muestra la mediana y el rango intercuartílico.

En conjunto, estos resultados sugieren que, con el aprendizaje, una mayor proporción de neuronas del HDB muestra una señal de error ante la omisión de la recompensa, la cual además se vuelve más exacta y precisa en la etapa tardía. Para confirmar que estas respuestas inhibitorias representan la expectativa temporal de la recompensa, y no simplemente el momento en que el animal deja de lengüetear en los ensayos correctos no recompensados, alineamos la actividad de estas neuronas al tiempo de abandono del comportamiento de *licking* (**Figura R.4.12**). Observamos que sus respuestas no se alinean bien con el tiempo de abandono, en ninguna etapa del entrenamiento (**Figuras R.4.12A-D**). Es decir, la respuesta comienza antes de que los animales cesen el *licking*, lo que sugiere que la modulación de la frecuencia de disparo fue desencadenada por un evento previo. Esto se evidencia tanto en los HPE (**Figuras R.4.12A-B**) como en la respuesta promedio de esos HPE mostrada en las **Figuras R.4.12C-D**. En ambas etapas del entrenamiento, el desplazamiento hacia la izquierda de la curva azul respecto al tiempo = 0 segundos indica que la respuesta neuronal fue desencadenada antes de que el animal deje de lengüetear. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la respuesta de estas neuronas refleja la estimación del tiempo de llegada de la recompensa y no el tiempo de abandono.

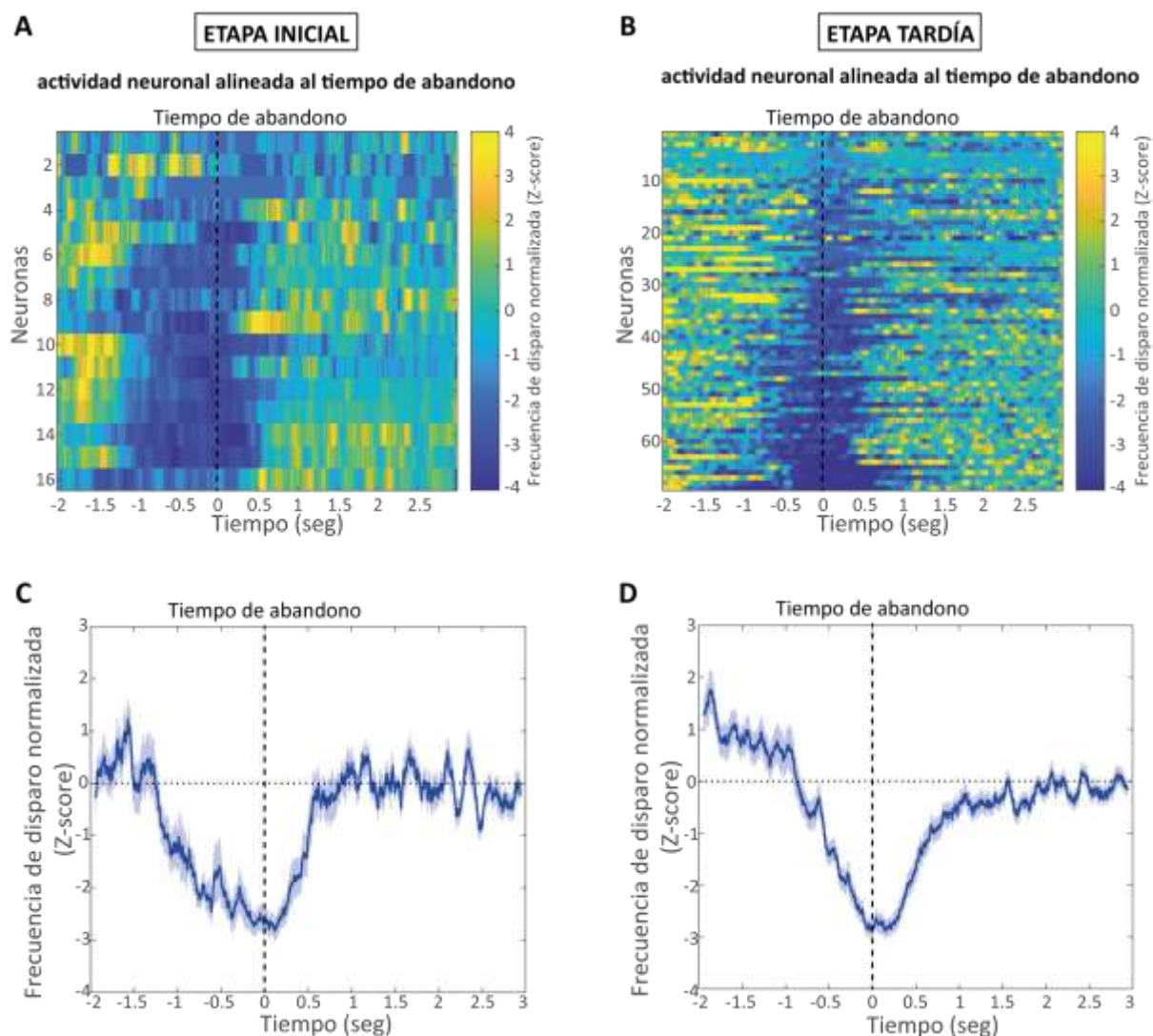


Figura R.4.12. El tiempo de abandono no gatilla las respuestas de las neuronas del HDB. HPE de todas las neuronas que fueron clasificadas con respuesta inhibitoria a la omisión, cuya actividad en este caso está alineada al tiempo de abandono en la etapa inicial **(A)** y tardía **(B)** del entrenamiento. Respuesta promedio de las neuronas en (A) y (B) en la etapa inicial **(C)** y tardía **(D)** respectivamente. N = 16/167 neuronas en la etapa inicial y 69/302 en la etapa final.

Por otra parte, al observar distintas duraciones en las respuestas a la omisión quisimos evaluar si la duración de las inhibiciones correlaciona con el momento en el que el animal finaliza el lengüeteo en los ensayos no recompensados. Si este fuera el caso, las respuestas a la omisión serían más largas cuanto mayor sea, en promedio, el tiempo que el animal permanece lengüeteando luego de la omisión. Para evaluar esta hipótesis, ordenamos las respuestas a la omisión de acuerdo al momento en que el animal deja de lengüetear post omisión en los ensayos no recompensados, desde tiempos más cortos (arriba) hasta

tiempos más largos (abajo) (**Figura R.4.13A**). Esta figura muestra la misma actividad neuronal alineada al momento de la omisión representada en los HPE de las **Figuras R.4.10B-C**, pero con un reordenamiento en el eje Y, en ambas etapas del entrenamiento.

Visualmente no encontramos evidencia de una relación entre la duración del *licking* post omisión y la duración de las respuestas inhibitorias. De existir tal relación, se esperaría observar un gradiente en la duración de las inhibiciones (representada por el intervalo temporal en tonos azules en los HPE), de más cortas (arriba) a más prolongadas (abajo), en los HPE de la **Figura R.4.13A**. Sin embargo, esto no es lo que se observa. Además, realizamos un análisis de correlación de ambas variables y no encontramos correlación significativa entre las mismas en ninguna de las etapas del aprendizaje (etapa inicial: Correlación de Pearson $r = -0.15$, $p > 0.05$; etapa tardía: Correlación de Pearson $r = 0.02$, $p > 0.05$. **Figura R.4.13B**), confirmando lo observado visualmente en la **Figura R.4.13A**.

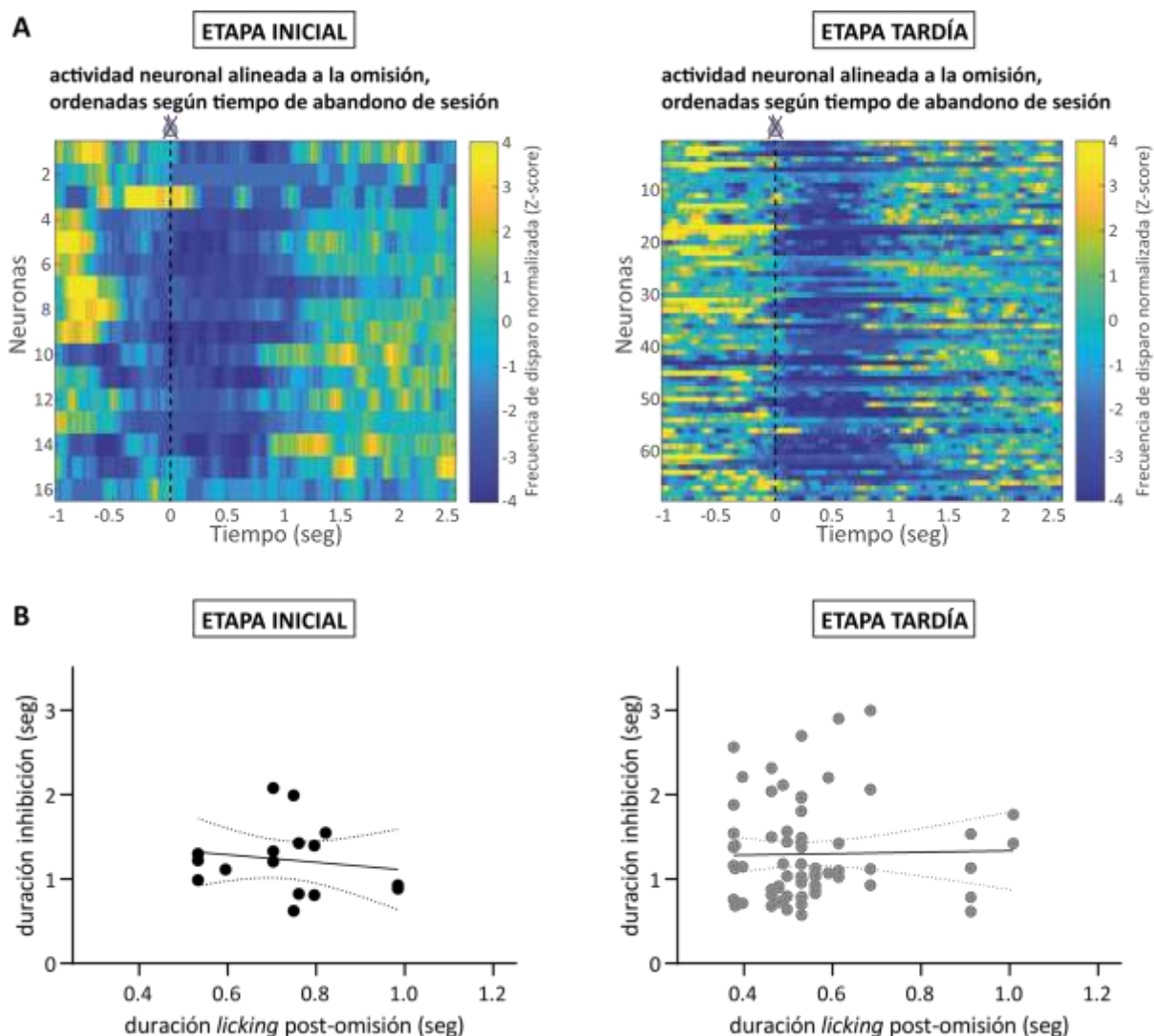


Figura R.4.13. La duración de las respuestas a la omisión no depende de la duración de la secuencia de *licks* post omisión. (A) y (B) HPE de todas las neuronas con respuesta inhibitoria a la omisión, la actividad está alineada a la omisión de la recompensa y las neuronas se ordenan de acuerdo al tiempo de abandono de la sesión, en la etapa inicial y tardía del entrenamiento respectivamente. Se ordena de tiempos de abandono más cortos (arriba) a tiempos más largos (abajo). **(C) y (D)** Correlación entre la duración de las inhibiciones post omisión y la duración de la secuencia de *licks* post omisión en la etapa inicial y tardía del entrenamiento, respectivamente (etapa inicial: Correlación de Pearson $r = -0.15$, $p > 0.05$; etapa tardía: Correlación de Pearson $r = 0.02$, $p > 0.05$). $n = 16/167$ neuronas en la etapa inicial y $69/302$ en la etapa final.

En conjunto, estos resultados respaldan nuestra interpretación de que las inhibiciones desencadenadas por la omisión representan la estimación del momento en que se espera la recompensa. Si la recompensa no llega, estas neuronas responden inhibiéndose, señalando su ausencia. En este sentido, estas respuestas también podrían ser interpretadas como un error de predicción de recompensa y, en este caso estarían señalizando un error negativo cuando la recompensa recibida es menor que la esperada. Esta posibilidad será analizada en la siguiente subsección.

R.4.D. Las neuronas del HDB podrían estar codificando un error de predicción de recompensas

Como describimos anteriormente, encontramos una proporción de neuronas del HDB que modulan su actividad ante la omisión de la recompensa, y esta proporción aumenta significativamente en la etapa tardía del entrenamiento. En particular, observamos respuestas inhibitorias que parecen señalar el momento en que la recompensa es esperada. Hipotetizamos que esta actividad podría reflejar un error de predicción de recompensa, un tipo de respuesta neuronal que informa sobre la discrepancia entre la recompensa esperada y la efectivamente recibida. Este tipo de actividad ha sido ampliamente caracterizado en las neuronas dopaminérgicas de la VTA y la SNpc (Schultz, 2016; Schultz et al., 1997), aunque también se ha observado en otras regiones cerebrales como la habénula lateral, el estriado, el globo pálido, la amígdala y la corteza cingulada anterior (Apicella et al., 2009; Belova et al., 2007; Ding & Gold, 2010; Hong & Hikosaka, 2008; Kennerley et al., 2011; Matsumoto & Hikosaka, 2007; Seo & Lee, 2007). El error de predicción de recompensa se suele manifestar

como una respuesta diferencial ante errores positivos (cuando la recompensa es mayor a la esperada) y errores negativos (cuando la recompensa es menor o se omite), generando modulaciones opuestas en la actividad neuronal.

Si nuestra hipótesis es correcta, y las neuronas del HDB efectivamente se inhiben ante la omisión como una señal de error negativo, esperaríamos que esas mismas neuronas se activen frente a la entrega de la recompensa, es decir, que presenten respuestas opuestas ante la presencia o ausencia del refuerzo esperado. Al analizar nuestros registros, observamos que muchas de las neuronas que responden a la entrega de la recompensa también responden a su omisión, y lo hacen de manera opuesta: se excitan ante uno de los eventos y se inhiben ante el otro. Esto sugiere un rol dual en la codificación de la presencia y ausencia del refuerzo.

Tal como se muestra en la **Figura R.4.14**, en la etapa inicial del entrenamiento, el 29% de las neuronas con respuesta a la recompensa (17 de 58) también responden a su omisión de manera opuesta. En la etapa tardía, esta proporción aumentó al 58% (49 de 85). Esta diferencia es estadísticamente significativa (*Fisher's exact test*, $*p = 0.0008$; **Figura R.4.14B**), duplicándose esta proporción una vez consolidada la asociación clave visual-recompensa.

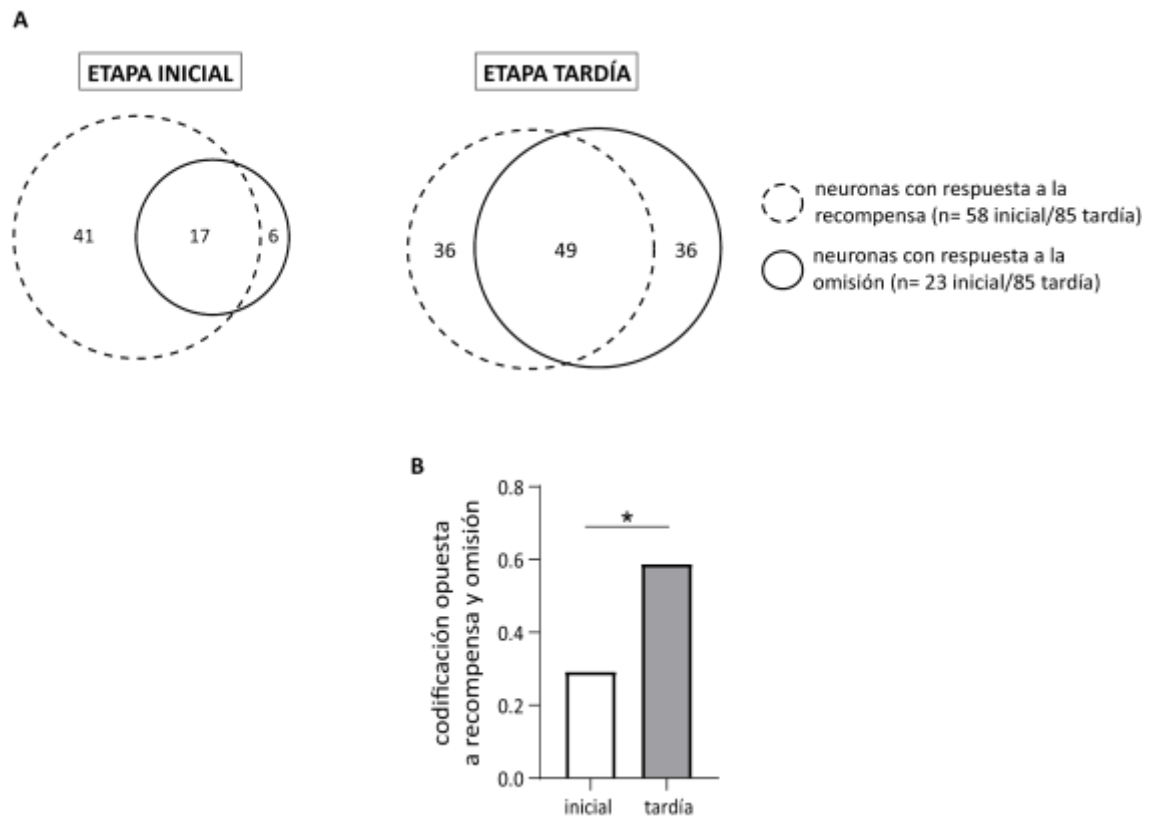


Figura R.4.14. La proporción de neuronas con respuesta a la recompensa que también responden a la omisión aumenta con el aprendizaje. (A) Diagrama de Venn mostrando el número de neuronas que responden solo a la entrega u omisión de la recompensa y el número de neuronas que responden a ambos eventos de manera opuesta, en la etapa inicial y tardía del entrenamiento. **(B)** Proporción de neuronas que responden de manera opuesta a la recompensa y a la omisión, respecto del total de neuronas con respuesta a la recompensa, comparando ambas etapas del entrenamiento (etapa inicial: 0.29, n = 17/58 neuronas vs etapa tardía: 0.58, n = 49/85 neuronas; *Fisher's exact test*, *p = 0.0008).

La gran mayoría de estas neuronas muestran un patrón de excitación ante la entrega de la recompensa e inhibición ante su omisión. En contraste, encontramos muy pocas neuronas con el patrón inverso, es decir, que se inhiben cuando la recompensa es entregada y se excitan cuando esta se omite (**Figura R.4.15**). En la **Figura R.4.15** se presentan los HPE de las neuronas que responden a ambos eventos, separadas por etapa de entrenamiento. Los HPE de la izquierda muestran la actividad neuronal alineada a la entrega de la recompensa, mientras que los de la derecha muestran la actividad de esas mismas neuronas alineada a la omisión.

Estos resultados sugieren que, si bien la proporción de neuronas que responden a la recompensa no varía significativamente con el entrenamiento, como describimos previamente, con el aprendizaje estas neuronas adquieren la capacidad de codificar también su ausencia. Consideramos especialmente relevante esta observación, ya que sugiere que estas neuronas podrían estar involucradas en la codificación del error de predicción de recompensa, y que esta propiedad emerge con el aprendizaje de la tarea.

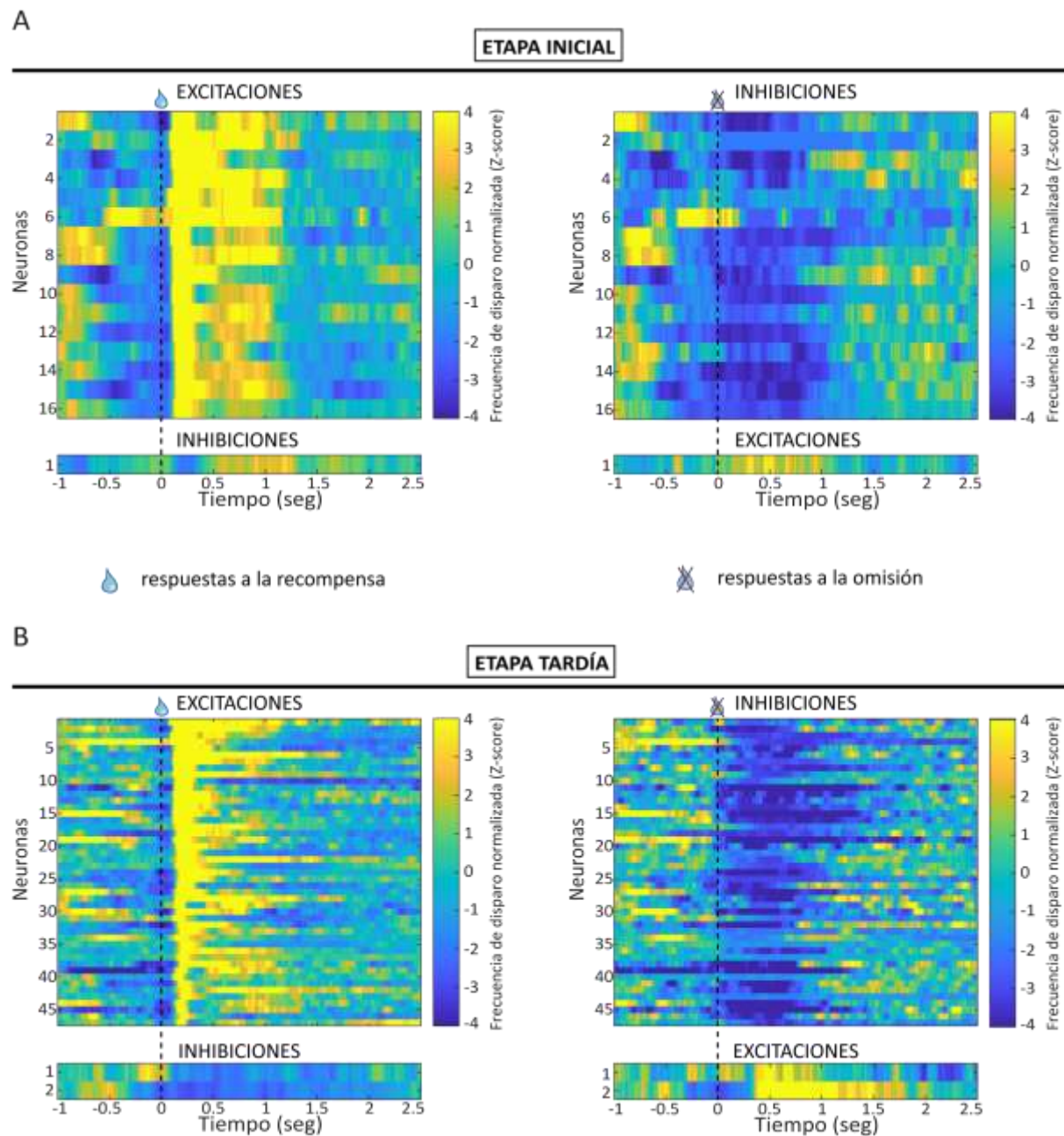


Figura R.4.15. Neuronas del HDB que responden de manera opuesta a la recompensa y a la omisión. HPE de las neuronas que responden a ambos eventos de manera opuesta en la etapa inicial

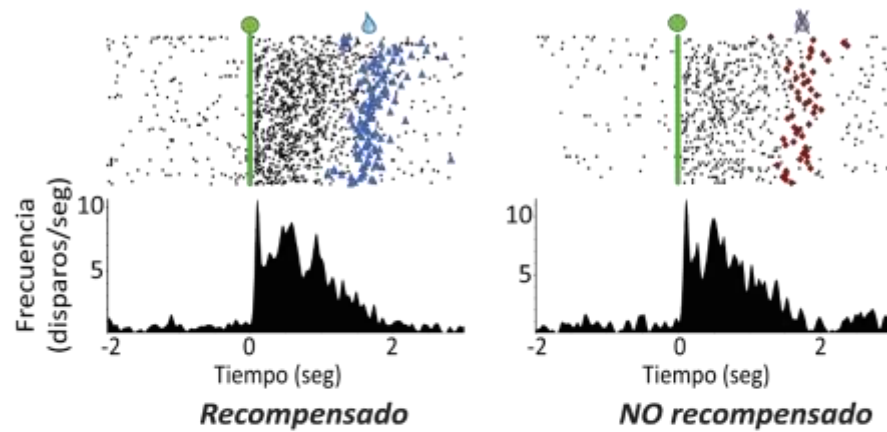
(A) y tardía (B) del entrenamiento; $n = 17/58$ neuronas en la etapa inicial y $49/85$ en la etapa final. **Izquierda:** actividad neuronal alineada a la recompensa. **Derecha:** actividad de las mismas neuronas alineada a la omisión. Cada fila en izquierda y derecha corresponde a la misma neurona.

R.4.E. Señal de expectativa temporal a la recompensa en HDB

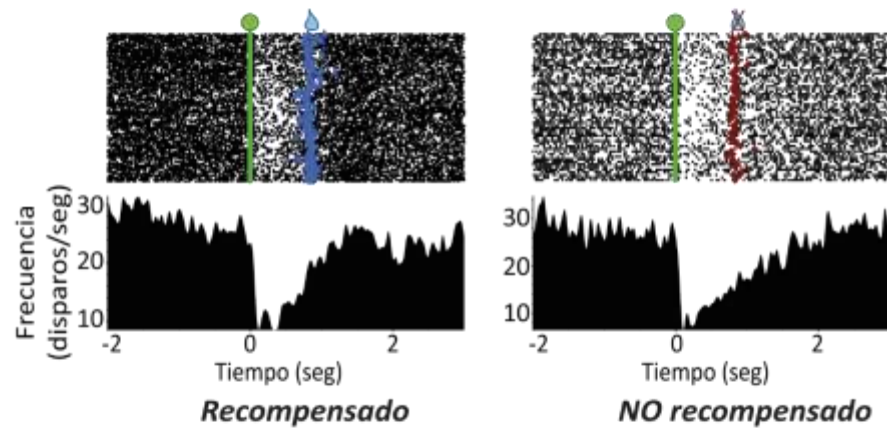
Uno de los resultados más interesantes de esta tesis es el que describiremos en esta subsección. En la subsección **R.4.A** caracterizamos una población de neuronas del HDB con una respuesta rápida y corta a la presentación de la clave visual. Sin embargo, además de esta respuesta transitoria, identificamos otro tipo de actividad neuronal desencadenada por el estímulo visual: una respuesta persistente que mantiene a las neuronas activas por un intervalo de tiempo significativamente posterior a la finalización de la clave visual.

Al explorar cualitativamente estas respuestas en los *raster plot* e HPE de actividad alineada a la presentación de la clave visual, observamos que son muy similares a las respuestas inducidas en V1 por la asociación entre una clave visual y una recompensa futura (*reward timing activity*) (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015; Shuler & Bear, 2006). Encontramos que las neuronas del HDB muestran los tres tipos de *reward timing activity* reportados en la literatura: un aumento (**Figura R.4.16A**) o inhibición sostenida (**Figura R.4.16B**) hasta el momento en que se espera la recompensa, o un pico de actividad en el momento en que se espera la recompensa (**Figura R.4.16C**). Estas respuestas también se observan en los ensayos correctos no recompensados, como se muestra en la **Figura R.4.16**. Por lo tanto, esta actividad estaría codificando la expectativa y no simplemente la recompensa *per se*.

A Aumento sostenido hasta el tiempo esperado de recompensa



B Inhibición sostenida hasta el tiempo esperado de recompensa



C Pico en el tiempo en que se espera la recompensa

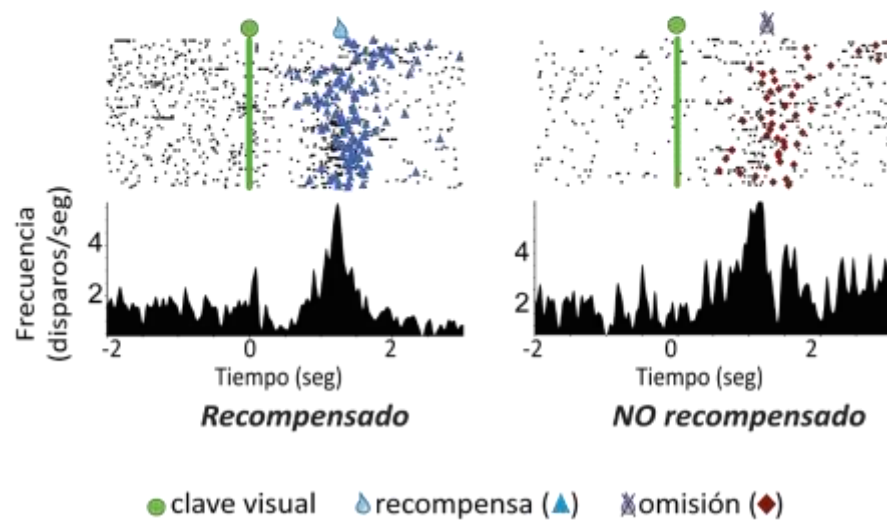


Figura R.4.16. Las neuronas del HDB responden de manera similar a las respuestas descriptas como señal de expectativa temporal a la recompensa en V1. Ejemplo representativo de una neurona con aumento (A) o inhibición sostenida (B) hasta el momento en que se espera la llegada de

la recompensa, o pico de excitación en el momento en que se espera la llegada de la recompensa **(C). Panel superior:** *raster plot*; los puntos negros representan cada potencial de acción de la neurona. **Panel inferior:** histograma perievento (HPE). Actividad neuronal alineada a la presentación de la clave visual (tiempo = 0 segundos, indicado con línea de color verde) en los ensayos recompensados (izquierda, la entrega de la recompensa se señala con símbolo azul) y no recompensados (derecha, la omisión se señala con símbolo rojo).

Este tipo de respuestas llamaron nuestra atención no solo porque implica otro tipo de codificación diferencial respecto a la respuesta corta al estímulo visual sino porque su similitud con el patrón de respuestas descrito para las neuronas de V1 da un indicio de que podrían ser respuestas de expectativa temporal a la recompensa y hasta el momento no se ha descrito en la literatura que el BF pueda codificar intervalos temporales.

Por lo tanto, para estudiar estas respuestas primero analizamos en qué etapas del aprendizaje están presentes y si evolucionan con el entrenamiento. Para ello, cuantificamos la cantidad de neuronas del HDB con respuestas extendidas desencadenadas por la clave visual en ambas etapas del entrenamiento, tal como analizamos las demás respuestas del HDB. Si bien en la **Figura R.4.16** mostramos ejemplos de los tres tipos de respuestas de expectativa temporal descritas en la literatura en las neuronas de V1, hemos encontrado muy pocas neuronas con respuesta de tipo pico de excitación (únicamente 2 neuronas en la etapa inicial del entrenamiento) por lo que decidimos centrarnos únicamente en las respuestas extendidas, que son las más predominantes en el HDB.

Para clasificar, y luego cuantificar, de manera automática las respuestas de estas neuronas, utilizamos el mismo criterio implementado para la clasificación de las respuestas de expectativa temporal en las neuronas registradas en V1 (sección R.2). De esta manera, encontramos neuronas con respuesta extendida a la clave visual en ambas etapas del entrenamiento: 13/167 neuronas en la etapa inicial y 87/302 neuronas en la etapa tardía. Nótese que la proporción de neuronas con este tipo de respuesta en la etapa inicial es bastante bajo (0.08) y que la misma aumenta más de tres veces en la etapa tardía del entrenamiento (0.29) (*Fisher's exact test*, $*p < 0.0001$, **Figura R.4.17A**). En la etapa inicial, del total de neuronas con respuesta, 15% mostraron excitación sostenida (2 de 13) y 85% mostraron inhibición sostenida (11 de 13). En la etapa tardía, 31% mostraron excitación sostenida (27 de 87) y 69% mostraron inhibición sostenida (60 de 87) (**Figura R.4.17B-C**).

Por otro lado, es importante destacar que no sólo la proporción de neuronas con respuesta persistente al LED parece verse afectada. Al comparar las respuestas promedio de las neuronas con respuesta excitatoria o inhibitoria entre ambas etapas del entrenamiento **(Figura R.4.17D-E)**, se observa que en la etapa tardía las respuestas tienden a prolongarse más en el tiempo. Esto se traduce en un área bajo la curva mayor y por lo tanto en una mayor magnitud de respuesta **(Figura R.4.17F)**. En el caso de las respuestas excitatorias, aunque la curva promedio en la etapa tardía se presenta más ancha y prolongada, no fue posible realizar una comparación estadística robusta debido al bajo número de neuronas con este tipo de respuesta en la etapa inicial ($n=2$). No obstante, los datos sugieren que, con el entrenamiento, las respuestas neuronales a la clave visual de ambos tipos tienden a extenderse en el tiempo.

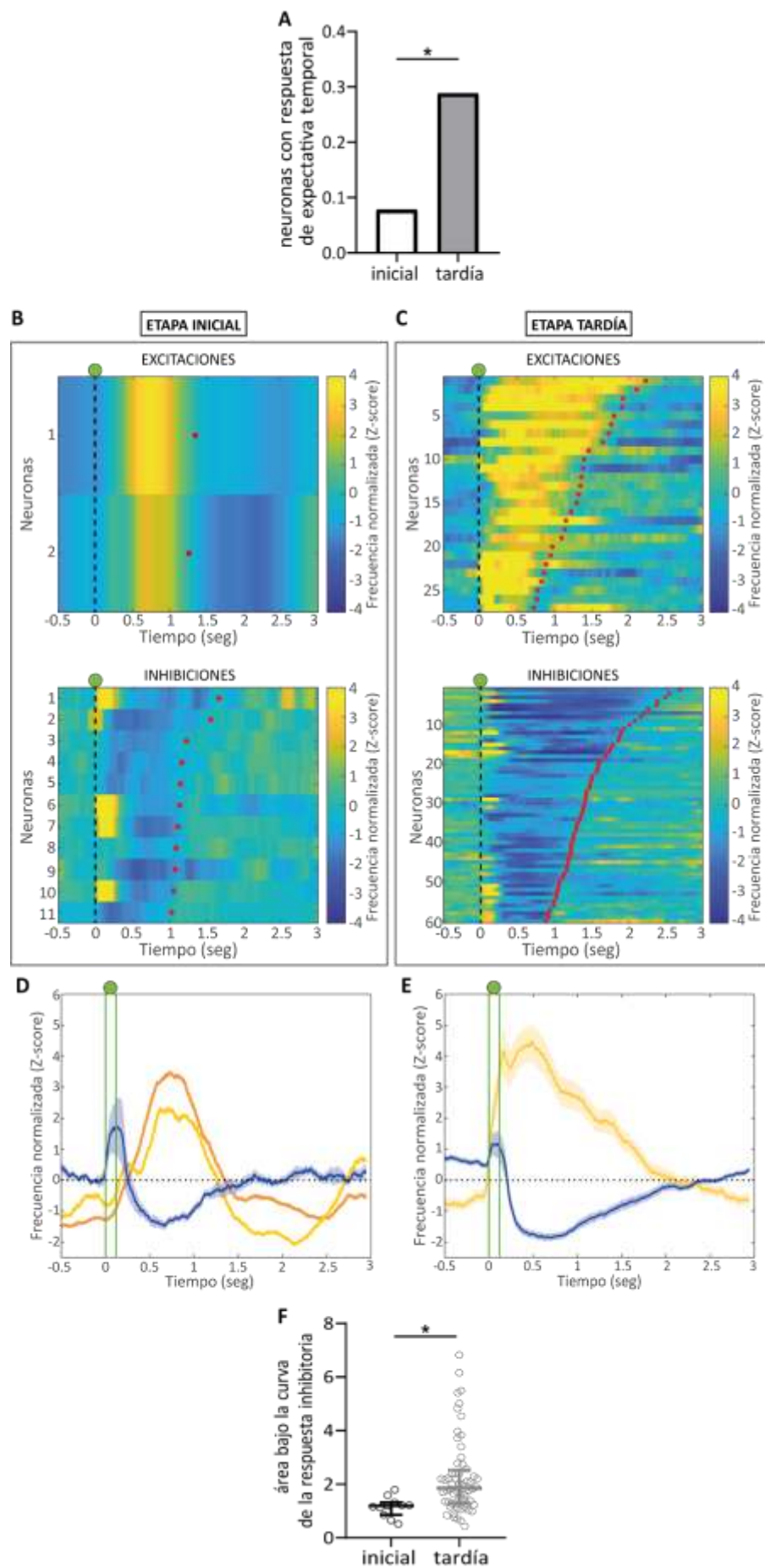


Figura R.4.17. Las neuronas del HDB muestran respuestas persistentes desencadenadas por la clave visual y su proporción aumenta en la etapa tardía del entrenamiento. (A) Proporción de neuronas con respuesta sostenida a la clave visual (etapa inicial: 0.08, $n = 13/167$ neuronas vs etapa tardía: 0.29, $87/302$ neuronas; *Fisher's exact test*, $*p = 0.0004$). HPE de todas las excitaciones e inhibiciones sostenidas en la etapa inicial (B) y tardía (C) del entrenamiento. La actividad de las neuronas está alineada a la presentación de la clave visual (tiempo = 0 segundos, indicado con una línea punteada y un símbolo verde); el reporte neuronal del tiempo de recompensa (NRT) está indicado con un punto rojo en los HPE. Respuesta poblacional de todas las excitaciones (curva naranja) e inhibiciones (curva azul) sostenidas en la etapa inicial (D) y tardía (E). Se muestra la media junto con el error estándar (sombra sobre la curva). En el caso de la respuesta excitatoria en (D) se muestran las curvas de respuesta correspondiente a cada neurona, al ser un $n=2$ no realizamos la curva promedio. (F) Área bajo la curva de las respuestas inhibitorias sostenidas (etapa inicial: mediana = 1.19, $Q1 = 0.85$, $Q3 = 1.33$, $n = 11/13$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 1.86, $Q1 = 1.28$, $Q3 = 2.53$, $n = 60/87$ neuronas; *Mann-Whitney test*, $*p = 0.001$). Se muestra la mediana y el rango intercuartílico.

Considerando que las respuestas prolongadas a la clave visual muestran características comparables a las descritas —y validadas en esta tesis— en neuronas de V1 (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015; Shuler & Bear, 2006), proponemos que las neuronas del HDB podrían estar codificando también el intervalo temporal de expectativa de la recompensa. Como mencionamos previamente, es una propiedad de codificación temporal hasta ahora no descrita en las neuronas del BF. Para comprobar nuestra hipótesis y poder definir si esta actividad persistente está relacionada con el intervalo de expectativa temporal clave visual-recompensa, primero determinamos la duración de las respuestas de las neuronas del HDB calculando el reporte neuronal del tiempo de recompensa (*neural report of time*, NRT). El NRT corresponde al instante en que la actividad neuronal regresa a su nivel basal, es decir, el tiempo en el que la frecuencia normalizada en Z-score vuelve a cero. Los valores de NRT fueron calculados para todas las neuronas clasificadas como neuronas con respuesta prolongada a la clave visual y se indican como un punto rojo sobre los HPE de las **Figuras R.4.17B-C**. Luego, analizamos las distribuciones de los NRT en relación con el tiempo promedio de obtención de la recompensa durante las fases inicial y tardía del entrenamiento (**Figura R.4.18**). Los NRT de cada neurona fueron relativizados al igual que lo realizado en la sección R.2. En la **Figura R.4.18** se presentan las curvas de probabilidad

acumulada de los valores de NRT relativizados al tiempo medio de recompensa de cada animal en ambas etapas del entrenamiento.

Lo que esperamos es que la tendencia central, es decir la mediana, de la distribución de NRT de la etapa tardía sea cercana a cero, lo que indicaría que la población de los NRT refleja el tiempo medio de recompensa (es decir, el momento en que el animal recibe efectivamente la recompensa). Por un lado, nuestros resultados muestran que las distribuciones de NRT en la etapa inicial y tardía difieren significativamente entre sí (etapa inicial: mediana = -0.26, $n = 13/167$ neuronas vs etapa tardía: mediana = 0.21, $n = 87/302$; *Kolmogorov-Smirnov test*, $*p = 0.000001$, **Figura R 4.18A**). Por otro lado, la mediana de la distribución de NRT en la etapa tardía se desvía de cero, con un valor de 0.21 (**Figura R.4.18A y R.4.18B**). Esto sugiere que a nivel poblacional las neuronas estiman un tiempo de recompensa mayor al tiempo real de la misma. Esta falta de exactitud en la estimación temporal de las neuronas, sin embargo, es similar a lo que observamos en los resultados de V1 (sección R.2). Aun así, en la etapa inicial, los NRT muestran una distribución desviada de cero, pero hacia valores negativos, con una mediana de -0.26. Esto indica que, a diferencia de la etapa tardía, las respuestas son más cortas que el tiempo medio de entrega de la recompensa. Este patrón podría sugerir que, en las primeras sesiones, las neuronas están comenzando a aprender el intervalo entre la clave visual y la recompensa. Es decir, aunque existe un desfase de tiempo entre la aparición de la clave visual y la entrega de la recompensa, el aprendizaje de este intervalo temporal aún no se ha consolidado.

Estos resultados sugieren, por lo tanto, que las neuronas del HDB son capaces de codificar el intervalo temporal entre la clave visual y la llegada de la recompensa. El hecho de que la sobreestimación temporal observada en las neuronas del HDB también se observa en las neuronas de V1 (mediana de la distribución de NRT en V1 = 0.31, **Figura R.2.3**, sección R.2) resulta de suma importancia ya que podría ser evidencia de una relación funcional en la codificación temporal de ambas estructuras. Siendo que las neuronas del HDB son necesarias y suficientes para inducir en V1 la señal de expectativa temporal a la recompensa (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015), podemos hipotetizar que su propia actividad de expectativa temporal podría estar contribuyendo a la representación de dicha expectativa en las neuronas de V1. Cabe destacar que en V1 no encontramos ninguna neurona con respuesta sostenida a la clave visual durante la etapa temprana del entrenamiento (la literatura indica que estas respuestas suelen emerger entre las sesiones 5 y 7). En cambio,

en el HDB observamos una pequeña proporción de neuronas con este tipo de respuesta ya desde las primeras tres sesiones, lo que sugiere que esta actividad podría originarse primero en el HDB y luego manifestarse en V1.

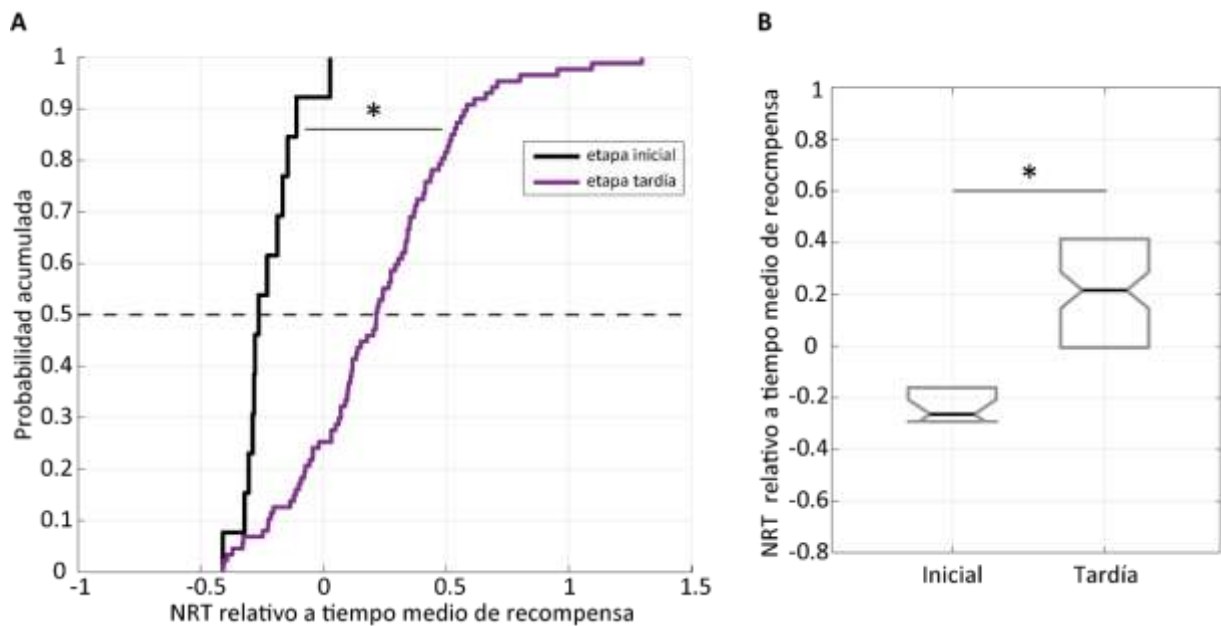


Figura R.4.18. Las distribuciones de NRT de la etapa inicial y la etapa tardía del entrenamiento son significativamente distintas. (A) Distribución de probabilidad acumulada de los valores de NRT, relativos al tiempo medio de recompensa de cada animal, calculados para las neuronas que fueron clasificadas con respuesta extendida a la clave visual en la etapa inicial (curva negra) y tardía (curva violeta) del entrenamiento. **(B)** Valores de mediana y rango intercuartílico correspondientes a la distribución de los valores de NRT relativos en la etapa inicial y tardía del entrenamiento. En **(A)** y **(B)** etapa inicial: mediana = -0.26, Q1 = -0.29, Q3 = -0.16, n = 13/167 neuronas vs etapa tardía: mediana = 0.21, Q1 = -0.005, Q3 = 0.41, n = 87/302 neuronas; *p=0.000001, *Kolmogorov Smirnov test*.

DISCUSIÓN

En este trabajo nos propusimos estudiar la evolución de las propiedades de codificación de las neuronas del BF durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada guiada por una clave visual. El BF es uno de los centros neuromoduladores más importantes en la regulación de funciones cognitivas como la atención, el aprendizaje, la memoria y la saliencia motivacional. En particular, se ha demostrado que sus proyecciones colinérgicas en V1 son necesarias y suficientes para inducir en las neuronas de esta región la actividad de expectativa temporal a la recompensa (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015). Esta capacidad de las neuronas de V1 de codificar el intervalo temporal entre una clave visual y una recompensa futura (Shuler & Bear, 2006) resulta de gran interés ya que es una propiedad de codificación que ha desafiado la interpretación clásica del rol de V1. En efecto, demuestra que funciones cerebrales complejas, como la codificación de la expectativa temporal de una recompensa, pueden ocurrir tempranamente en las vías de procesamiento sensorial. En este contexto, resulta especialmente relevante comprender las propiedades de codificación del BF en relación con el procesamiento sensorial y su función moduladora de las respuestas corticales. A continuación, discutiremos los resultados más importantes de esta tesis:

D.1. Adaptación del protocolo comportamental a una condición *head-fixed*

La tarea conductual utilizada en esta tesis fue diseñada para inducir en V1 la actividad de estimación del intervalo temporal entre una clave visual y una recompensa contingente. Precisamente, utilizamos una tarea de condicionamiento operante en la que una clave visual predice la llegada de una recompensa en un porcentaje de los ensayos, tras la realización de una secuencia de un mínimo de cinco *licks*. Para diseñar la tarea utilizada en esta tesis, nos basamos en el protocolo comportamental utilizado en los estudios originales que describieron *reward timing activity* en V1 (Shuler & Bear, 2006; Zold & Shuler, 2015). En estos trabajos, se entrenaron ratas en una caja comportamental donde tenían libertad de movimiento. La tarea era autoiniciada ya que los animales recibían la clave visual al entrar a un puerto *nose-poke*, habilitándolos a realizar una secuencia de *licks* y así tener cierta probabilidad de obtener recompensa. En nuestro caso, adaptamos esta tarea para su implementación en ratones y en un puesto de conducta en el que los animales permanecen

con la cabeza fija. Por lo tanto, en esta tesis la tarea no posee el carácter de autoiniciación. En contraste, los animales deben estar atentos y esperar a que se les presente la clave visual para estar habilitados a realizar la secuencia de *licks* y tener un 70% de probabilidad de recibir recompensa si completan la secuencia (**Figura R.1.1**).

Tal como mostramos previamente, realizamos una exitosa adaptación de la tarea ya que los ratones la aprenden en las primeras sesiones y su desempeño mejora rápidamente con el entrenamiento (**Figura R.1.1**). El aprendizaje de la tarea y el entrenamiento llevan a una disminución de: la latencia al primer *lick*, el tiempo que les toma obtener la recompensa, el coeficiente de variación del tiempo de recompensa y el tiempo de abandono en los ensayos no recompensados (**Figura R.1.2 y R.1.3**). De esta manera, los animales se vuelven más eficientes y aumentan la tasa de obtención de recompensas por sesión de entrenamiento (**Figura R.1.4**).

Uno de los indicadores más relevantes del aprendizaje en esta tarea es la reducción en la latencia al primer *lick* tras la presentación de la clave visual. Dado que dicha clave habilita la posibilidad de obtener una recompensa a través de una secuencia de *licks*, una menor latencia indica que el animal ha aprendido la asociación entre el estímulo visual y la probabilidad de recompensa.

Por otro lado, también observamos evidencia comportamental de que los animales aprenden a estimar el momento en que debería llegar la recompensa. Esto se refleja en la disminución del tiempo de *licking* en los ensayos correctos no recompensados. Es decir, que los animales acorten el tiempo que pasan lengüeteando luego de una omisión indica que han aprendido en qué momento esperar la recompensa. Como la omisión no está señalada por ningún evento perceptible, esta conducta sugiere que los animales forman una expectativa temporal interna de la llegada de la recompensa. Una vez que transcurre ese intervalo y no reciben recompensa, la estrategia más eficiente es abandonar el comportamiento de *licking* y esperar una nueva presentación de la clave visual, lo cual les ofrece una nueva oportunidad de ser recompensados. Si los animales estiman el tiempo en el que esperan la llegada de la recompensa, el cociente entre el tiempo de abandono y el tiempo a la recompensa debería ser cercano a 1. Con el entrenamiento, este valor se acerca más a 1 (**Figura R.1.3C**), lo que sugiere que los animales mejoran su estimación del tiempo de recompensa.

Si bien los animales que entrenamos aprendieron la tarea según los parámetros discutidos previamente, una limitación que encontramos y que consideramos que puede influir en los resultados observados en la codificación neuronal que discutiremos más adelante, es la variabilidad en el desempeño comportamental entre días de entrenamiento. Lo que observamos es que, en muchos de los animales entrenados, aún habiendo consolidado la conducta, su desempeño resulta variable de un día a otro o de una semana a otra, llevando a que el tiempo de recompensa entre sesiones resulte más variable de lo esperado. Hipotetizamos que esto podría hacer más difícil que los animales, y según discutiremos posteriormente, las neuronas, tengan una estimación más exacta del tiempo a la recompensa. Para que pueda aprenderse con exactitud un intervalo temporal, dicho intervalo debe mantenerse relativamente constante a lo largo de los ensayos y sesiones de entrenamiento.

Una posible explicación para esta variabilidad es la ausencia de un componente de autoiniciación en la tarea. Si cada ensayo fuera iniciado voluntariamente por el animal, el inicio implicaría ya una decisión de ejecutar la conducta. En ese contexto, la respuesta de *licking* luego de la presentación de la clave visual sería más estereotipada y la latencia al primer *lick* sería más consistente entre ensayos. En cambio, en el diseño actual, la clave visual aparece de manera pasiva para el animal, y su velocidad de reacción y, en consecuencia su latencia de respuesta, puede variar en función de su nivel de atención en ese momento. Dado que la atención del animal puede fluctuar de un momento a otro, se espera que el tiempo de reacción y el rendimiento en el ensayo se correlacionen con el nivel atencional al momento de la presentación del estímulo. En este contexto, la tarea conductual utilizada resultaría particularmente adecuada para identificar y analizar respuestas neuronales moduladoras del estado atencional que sean predictivas del desempeño del animal en cada ensayo.

D.2. El protocolo comportamental en animales *head-fixed* logra replicar la actividad de expectativa temporal en las neuronas de V1

En esta tesis validamos que la asociación estímulo-recompensa es capaz de generar en V1 la señal de expectativa temporal a la recompensa con las mismas características reportadas en la bibliografía (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015; Shuler & Bear, 2006;

Zold & Shuler, 2015), en nuestra tarea comportamental. Demostramos que en la etapa tardía del entrenamiento, un 32% de las neuronas registradas en V1 expresa una señal de expectativa temporal a la recompensa (**Figura R.2.2**), mostrando alguno de los tres tipos de respuestas descritos en trabajos previos, tanto en ensayos recompensados como no recompensados (**Figura R.2.1**). Confirmamos que estas respuestas están relacionadas con la estimación del tiempo de recompensa tal como se propuso en trabajos previos. Es interesante observar que, en nuestros experimentos la población de neuronas de V1 tiende a sobreestimar el tiempo a la recompensa (**Figura R.2.3**). El patrón de actividad temporal en V1 excede, en promedio, el tiempo real de entrega de la recompensa en un 31%, lo que equivale a una sobreestimación de aproximadamente 360 ms. Una posible explicación de este sesgo es la variabilidad en los tiempos de recompensa tanto dentro como entre sesiones de entrenamiento. Esta variabilidad podría representar una estrategia adaptativa, en la que el sistema neuronal prioriza una estimación conservadora del tiempo, asegurando así una mayor probabilidad de obtener la recompensa y evitando que una subestimación lleve a una omisión.

Por otro lado, es importante considerar que en nuestros análisis utilizamos el quinto *lick* como marcador temporal de la recompensa, ya que este evento activa la apertura del solenoide que libera la gota de agua. Sin embargo, dado que los animales lengüeteen a una frecuencia de aproximadamente 7 Hz, existe un desfase temporal inevitable (aproximadamente 150ms) entre la apertura del solenoide y el momento en que el animal efectivamente ingiere la recompensa, que suele coincidir con el sexto *lick* o un *lick* posterior. Este detalle es relevante, ya que la sobreestimación observada en la señal temporal de las neuronas de V1 —de aproximadamente 360 ms— podría no reflejar un sesgo real en la representación interna del tiempo, sino ser consecuencia de una discrepancia sistemática entre el evento empleado para marcar la recompensa y el momento real de su percepción por parte del animal. Dado que la mediana de la distribución de los NRTs obtenidos en V1 fue de 0.31 (**Figura R.2.3**), este desplazamiento podría representar ese retraso, sugiriendo que la estimación neuronal del tiempo sería más exacta si se tiene en cuenta este desfase.

Otro posible factor que podría haber contribuido a esta aparente sobreestimación es el criterio utilizado para calcular el NRT. En nuestro caso, definimos el NRT como el primer instante en que la actividad neuronal regresa a su nivel basal ($Z\text{-score} = 0$) utilizando los HPE alineados a la presentación de la clave visual. Sin embargo, este criterio podría ser

demasiado estricto. Alternativamente, podría haberse definido el final de la respuesta como el momento en que la actividad deja de superar el umbral de significancia, ya sea al descender por debajo de dos desviaciones estándar (para respuestas excitatorias) o al superar una desviación estándar negativa (para respuestas inhibitorias). Sin embargo, en publicaciones previas que estudian la actividad de estimación temporal en V1 (Chubykin et al., 2013; Liu et al., 2015; Monk et al., 2020), se ha utilizado mayoritariamente el mismo criterio que nosotros.

Más allá de lo hipotetizado sobre la sobrestimación del tiempo de recompensa evidenciada en las neuronas de V1, consideramos importante señalar que el número de unidades con actividad de expectativa temporal analizadas fue relativamente bajo ($n = 24$). Este tamaño muestral limitado podría afectar la representatividad de la población de NRTs, aumentando la probabilidad de sesgo.

D.3. Propiedades de codificación del HDB durante el aprendizaje de una tarea operante recompensada

Una vez validado que nuestra tarea induce actividad de estimación temporal en V1, nos propusimos determinar específicamente cuál es la principal región del BF que envía proyecciones a esta área cortical. Esto resulta particularmente relevante dado que el BF está compuesto por varios núcleos discretos, que no envían proyecciones de manera homogénea a la corteza y por lo tanto no todos envían proyecciones a V1 de igual manera. Realizamos un experimento con *retrobeads* y encontramos que el HDB es el principal núcleo del BF que envía sus proyecciones a V1 (**Figura R.3.1**). Por lo tanto, centramos nuestros registros electrofisiológicos en esta región con el objetivo de estudiar las propiedades de codificación de sus neuronas a lo largo del aprendizaje de la tarea operante y tratar de comprender cómo se estaría induciendo en V1 la actividad de expectativa temporal. Nuestro resultado de que el HDB es el principal núcleo que proyecta a V1 va en línea con el trabajo en el que demuestran que la presentación de una clave visual seguida, uno o dos segundos más tarde, por la activación optogenética de las terminales colinérgicas del HDB en V1, es suficiente para inducir en esta región una señal neuronal que replica la respuesta de codificación del intervalo temporal a la recompensa observada tras el aprendizaje conductual (Liu et al., 2015).

En esta tesis demostramos que durante el aprendizaje de una tarea operante mediada por recompensas las neuronas del HDB codifican los distintos aspectos relevantes de esta tarea: la presentación de la clave visual, la recompensa y la omisión. La respuesta a la recompensa no se modifica durante el aprendizaje (**Figura R.4.6**), mientras que la proporción de neuronas con respuesta a la omisión aumenta con el entrenamiento (**Figura R.4.10**). Por otra parte, encontramos dos tipos de respuestas a la clave visual: una respuesta corta y otra que se prolonga un intervalo de tiempo significativamente posterior a la finalización de la clave. La respuesta corta desencadenada por la presentación de la clave visual permanece constante durante el aprendizaje (**Figura R.4.3**), mientras que la respuesta extendida emerge con el entrenamiento, evidenciándose un aumento significativo de la proporción de neuronas con este tipo de respuesta en la etapa tardía (**Figura R.4.17**). A continuación, discutiremos en detalle cada uno de los tipos de respuesta observados en las neuronas del HDB:

D.3.A. Respuestas de corta duración al estímulo visual

Existe cierta controversia en el campo respecto al rol del BF en la codificación de estímulos visuales durante el aprendizaje. Diversos estudios han reportado resultados contradictorios acerca de si las neuronas del BF responden a estímulos sensoriales y cómo estas respuestas se modifican con el aprendizaje asociativo.

Por un lado, varios trabajos han demostrado que el BF sí responde a estímulos sensoriales cuando estos adquieren significado a través del aprendizaje (Crouse et al., 2020; Guo et al., 2019; Harrison et al., 2016; Kuchibhotla et al., 2017; Parikh et al., 2007). Nuestros resultados van en línea con esta perspectiva, evidenciando un rol activo del HDB, una subregión del BF, en la codificación del estímulo visual. Por otro lado, Hangya et al. (2015) propusieron que las neuronas del BF no responden a estímulos sensoriales, ni siquiera en contextos de aprendizaje asociativo.

Además, a diferencia de lo reportado por Guo et al. (2019), en nuestros experimentos no observamos un aumento en la magnitud ni en la proporción de neuronas con respuestas cortas a la clave visual tras el aprendizaje (**Figura R.4.3**). Este hallazgo coincide con lo reportado por Robert et al. (2021), quienes tampoco observaron incremento en las respuestas del BF a estímulos asociados con recompensa a lo largo del aprendizaje. Una posible explicación para estas discrepancias con los estudios que reportan un aumento de la

respuesta tras el condicionamiento radica en las diferencias en las regiones del BF estudiadas. Mientras que algunos estudios realizaron registros en núcleos más caudales como el núcleo basal de Meynert (NB) (Guo et al., 2019), nuestros registros se enfocaron específicamente en el HDB (Crouse et al., 2020; Harrison et al., 2016; Kuchibhotla et al., 2017; Parikh et al., 2007).

Por otra parte, en resultados preliminares no mostrados en esta tesis observamos que las neuronas del HDB responden con respuestas de corta duración a la clave visual incluso cuando se la presenta fuera del contexto asociativo en animales naïve. Este hallazgo coincide con lo propuesto por Guo et al. (2019), quienes observaron respuestas a estímulos auditivos cuando estos aún no habían sido condicionados. Nuestros datos extienden esa observación a estímulos visuales, y se contraponen a lo reportado por Robert et al. (2021), donde se informó que las respuestas a estímulos visuales no condicionados eran muy débiles o ausentes. Una posible explicación para esta discrepancia podría radicar en las características del estímulo visual empleado. Mientras que en Robert et al. (2021) utilizaron un patrón visual de barras de distintos contrastes, en nuestro caso empleamos un breve flash de luz de intensidad moderada presentado de forma binocular, en un entorno completamente oscuro. Este tipo de estímulo, al generar un cambio más marcado en las condiciones de iluminación, podría tener una mayor capacidad de captar la atención del animal y resultar más saliente, incluso en ausencia de un valor asociativo. Esta mayor saliencia podría explicar la presencia de respuestas más prominentes y fácilmente detectables en las neuronas del HDB.

Por último, observamos que la latencia de estas respuestas disminuye significativamente en la etapa tardía del entrenamiento (**Figura R.4.4**). Esto indica que, a medida que avanza el aprendizaje de la tarea, las neuronas del HDB responden más rápidamente a la presentación de la clave visual. Este acortamiento en la latencia podría ser consecuencia de procesos de plasticidad sináptica inducidos por el aprendizaje, como cambios en la eficacia de las sinapsis dentro del HDB (Bear, 2003; Citri & Malenka, 2008; J.-W. Lin & Faber, 2002; Vilimelis Aceituno et al., 2020). Un aumento en esta eficacia podría facilitar una integración más rápida de la señal y, junto con cambios en la excitabilidad intrínseca de las neuronas, dar lugar a respuestas de menor latencia ante la detección de la clave visual. Hipotetizamos que, una respuesta neuronal más rápida al estímulo relevante

permitiría una detección y reacción comportamental más veloz, iniciando antes la secuencia de *licks* y, por lo tanto, obteniendo la recompensa en menos tiempo.

Dado el conjunto de resultados discutidos, planteamos la hipótesis de que la ausencia de cambios en las respuestas cortas al estímulo visual a lo largo del entrenamiento podría deberse a que las neuronas del HDB codifican tanto la saliencia física del estímulo —por ejemplo, su intensidad, que lo vuelve intrínsecamente relevante para captar la atención— como su significado comportamental, al asociarse con la recompensa contingente. Esta combinación de factores podría explicar por qué dichas respuestas se mantienen constantes durante el aprendizaje, al estar vinculadas simultáneamente a propiedades sensoriales constantes y a un valor asociativo que se establece a lo largo del aprendizaje.

D.3.B. Codificación de recompensas y su omisión

Otro de los aspectos importantes acerca de las propiedades de codificación del HDB, es su rol en la codificación de recompensas. En nuestros experimentos, observamos que una subpoblación de neuronas de HDB respondió consistentemente a la entrega de recompensa en una tarea con probabilidad de refuerzo del 70%. Tanto la proporción de neuronas con respuesta a la recompensa como la magnitud de dicha respuesta se mantuvieron estables a lo largo del entrenamiento, sin cambios significativos desde la primera hasta la última etapa (**Figuras R.4.6 y R.4.7**). Estos resultados se alinean parcialmente con estudios previos en los que se ha reportado que neuronas del BF, incluyendo tanto poblaciones colinérgicas como no colinérgicas, responden a estímulos reforzantes. Por ejemplo, Hangya et al. (2015) demostraron que las neuronas colinérgicas del BF responden rápidamente a recompensas y castigos, y que la magnitud de la respuesta se modula según el carácter inesperado del refuerzo. Otros estudios en primates encontraron que neuronas en regiones del BF, como el núcleo basal de Meynert, responden a recompensas, aunque la sensibilidad a cambios en la expectativa parece variar según el subnúcleo y la especie (Richardson & DeLong, 1986; Wilson & Rolls, 1990).

Nuestra hipótesis, basada en esta literatura, era que la respuesta a la recompensa en el HDB disminuiría con el aprendizaje, una vez consolidada la asociación entre la clave visual y el refuerzo. En contraste, esto no es lo que observamos en nuestros resultados. Mientras algunos trabajos sugieren una disminución en la respuesta neuronal durante el aprendizaje,

nuestros datos muestran estabilidad en la respuesta a la recompensa, lo que podría reflejar diferencias metodológicas, anatómicas o funcionales específicas del HDB.

Esta estabilidad en la respuesta además contrasta con el comportamiento clásico de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA), que suelen mostrar una disminución de la respuesta a la recompensa cuando esta se vuelve esperada, tal como predice la teoría del *reward prediction error* (Schultz et al., 1997). Esto sugiere que, mientras el sistema dopaminérgico ajusta dinámicamente su actividad para codificar errores de predicción ensayo a ensayo, el sistema colinérgico del HDB parece mantener una señal más constante relacionada con la presencia del refuerzo. Esta característica sugiere que las neuronas colinérgicas constituyen un sistema neuromodulador con proyecciones corticales extensas, cuya función principal sería emitir señales de refuerzo rápidas y globales que faciliten la plasticidad sináptica, modulen la atención y mejoren el procesamiento sensorial en contextos de aprendizaje (Q. Gu, 2003; Hangya et al., 2015). Así, el HDB no reflejaría exclusivamente un error de predicción puntual, sino un marcador general de refuerzo capaz de preparar a la corteza para la incorporación eficiente de nueva información.

Además de la codificación de recompensas, los resultados de esta tesis demuestran que las neuronas del HDB codifican la omisión, una función de las neuronas del BF poco estudiada hasta ahora. Encontramos que la proporción de neuronas con este tipo de respuesta aumenta con el entrenamiento (**Figura R.4.10**). En la tarea utilizada en esta tesis la omisión no es un evento que esté señalizado, por lo que depende de la propia estimación temporal del animal. En este contexto, la respuesta neuronal a la omisión refleja una representación del momento en que la recompensa debería haber ocurrido, sugiriendo que las neuronas del HDB participan en la codificación de una señal de error cuando no se recibe la recompensa esperada.

Uno de los pocos trabajos en los que fue demostrada la codificación de omisión fue en primates (Zhang et al., 2019). Sin embargo, en roedores el único trabajo en el que se muestra codificación a la omisión es en Robert et al. (2021). Nuestros resultados van en línea con este trabajo ya que este tipo de codificación es demostrada únicamente en el HDB, aunque se propone que las respuestas corresponden a respuestas lentas con gran latencia. En cambio, nuestros resultados muestran que estas respuestas a la omisión estiman, en la etapa tardía, bastante certeramente como población el tiempo en el que se espera la llegada de la recompensa (**Figura R.4.11**). Como consecuencia del aprendizaje se genera

entonces una expectativa de recompensa y se estima el tiempo en que se espera obtenerla, si esta recompensa no llega las neuronas codifican su ausencia inhibiéndose.

Además, resulta interesante que una gran proporción de las neuronas que responden a la recompensa también responden a su omisión, y lo hacen con respuestas opuestas a ambos eventos. La proporción de neuronas con este tipo de respuestas aumenta con el aprendizaje (**Figura R.4.14 y R.4.15**). Si bien la proporción de neuronas con respuesta a la recompensa no se modifica con el entrenamiento, con el aprendizaje estas neuronas adquieren la capacidad de responder diferencialmente según ocurra o no el refuerzo.

La coexistencia de una respuesta estable a la recompensa y una respuesta creciente a la omisión puede interpretarse como la manifestación parcial de una señal de *reward prediction error* en el HDB. Mientras que la respuesta a la recompensa permanece constante para asegurar la señalización del refuerzo, la respuesta a la omisión refleja el ajuste de la expectativa y la codificación de errores negativos. Este patrón sugiere que la señal de error en el HDB está más relacionada con la detección de violaciones de expectativas (omisiones) que con la actualización del valor positivo del estímulo.

En comparación con el sistema dopaminérgico, que codifica errores de predicción tanto positivos como negativos modulando la respuesta a la recompensa según su previsibilidad (Schultz, 2016), el sistema colinérgico parece mantener una señal robusta a la recompensa, actuando más como un modulador global del estado cortical y facilitador de la plasticidad, simultáneamente, codificando la omisión para ajustar la atención y la expectativa. Así, la acetilcolina y la dopamina podrían cumplir funciones complementarias pero distintas en la codificación del refuerzo y el aprendizaje.

Aunque el rol del BF en la codificación de errores de predicción ha sido poco explorado, estudios recientes han comenzado a abordarlo. Por ejemplo, Sturgill et al. (2020) y Hegedüs et al. (2023) describieron que neuronas colinérgicas en tareas Pavlovianas responden más intensamente a claves que predicen recompensas altamente probables, y que sus respuestas a la recompensa disminuyen a medida que esta se vuelve más predecible. Otros trabajos en roedores también sugieren que neuronas no colinérgicas, como las de tipo ráfaga, podrían codificar errores de predicción (Manzur et al., 2023; S.-C.Lin & Nicolelis, 2008).

Algo a destacar de nuestros resultados es que describimos que una misma neurona del HDB puede responder de manera opuesta a la recompensa y a su omisión, algo no

descrito previamente en esta estructura. Por otro lado, en nuestro protocolo comportamental, la clave visual predice una probabilidad de recompensa del 70%. Para poder complementar nuestros resultados que muestran cierto tipo de codificación de error de predicción proponemos analizar la respuesta de las neuronas del HDB cuando la clave está asociada a distintas probabilidades de recompensa. Esperamos observar mayores respuestas a la recompensa cuando esta es menos probable, y mayores respuestas a la clave cuando anticipa un refuerzo más probable.

Finalmente, se propone que la señal de error de predicción del sistema colinérgico del BF podría funcionar de manera paralela y complementaria al sistema dopaminérgico (Sturgill et al., 2020). Al igual que las neuronas dopaminérgicas, esta propiedad de codificación en las neuronas del HDB las convierte en sensores del ambiente, ya que pueden detectar discrepancias entre la recompensa esperada y la recompensa obtenida, así como responder a eventos predictores de recompensa. Esta señal colinérgica de error de predicción podría adquirir especial relevancia en aquellas regiones cerebrales con escasa o nula innervación dopaminérgica, como es el caso de muchas áreas sensoriales primarias. En dichos circuitos, la señal del BF podría ser empleada para ajustar la respuesta neuronal y conductual del animal, favoreciendo la formación y actualización de asociaciones relevantes para el aprendizaje.

D.3.C. Señal de expectativa temporal a la recompensa en HDB

Si bien encontramos que las neuronas del HDB podrían estar codificando la saliencia del estímulo visual a través de las respuestas de corta duración y que, más allá de un cambio en la latencia, estas respuestas no se modifican con el aprendizaje, en esta tesis demostramos otro tipo de respuesta desencadenada por la clave visual que sí se modifica con el aprendizaje. Este otro tipo de respuesta surge con el entrenamiento y se trata de una respuesta prolongada tras la clave visual que se extiende por un intervalo de tiempo después de que dicha clave ha desaparecido (**Figura R.4.16**). La proporción de neuronas que presentan esta actividad sostenida aumenta en la etapa tardía del entrenamiento, así como también la magnitud de dicha respuesta, fundamentalmente debido a un aumento en su duración (**Figura R.4.17**). Comprobamos que, en la etapa tardía del entrenamiento, la duración de estas respuestas reporta a nivel poblacional el intervalo temporal entre la clave

visual y la obtención de la recompensa (**Figura R.4.18**). Sorprendentemente, estas respuestas muestran un patrón de actividad semejante al descrito en V1 (Shuler & Bear, 2006) (**Figuras R.2.1-3**), lo cual nos permite sugerir que se trata de una señal de expectativa temporal de recompensa.

Esta respuesta sostenida de las neuronas del HDB también parece sobreestimar el tiempo de recompensa (mediana = 0.21, **Figura R.4.18**), tal como observamos en nuestros registros de las neuronas de V1 (mediana = 0.31, **Figura R.2.3**). El patrón de actividad temporal en HDB excede, en promedio, el tiempo real de entrega de la recompensa en un 20%, lo que equivale a una sobreestimación de aproximadamente 230 ms. Esta sobreestimación podría ser consecuencia de lo discutido previamente en la sección de V1. Sin embargo, que la población de neuronas de ambas estructuras muestre una estimación semejante del intervalo de expectativa a la recompensa sugiere una posible relación funcional entre las señales de HDB y V1.

Curiosamente, tanto la actividad neuronal como la conducta de los animales parecen reflejar una expectativa temporal que evoluciona con el aprendizaje. En etapas tempranas, las neuronas subestiman el intervalo a la recompensa, mientras que los animales exhiben patrones de *licking* más prolongados, posiblemente debido a una mayor incertidumbre sobre el momento en que ocurrirá la recompensa. A medida que progresa el entrenamiento, ambos indicadores se ajustan: las neuronas comienzan a sobreestimar levemente el tiempo a la recompensa, y los animales abandonan el *licking* en un punto algo posterior al tiempo medio en que suelen recibir la recompensa. Esta ligera sobreestimación en la etapa tardía podría reflejar un mecanismo precautorio que permite mantener la expectativa activa por un intervalo ligeramente extendido. La coincidencia entre ambos fenómenos, sugiere que la dinámica de abandono podría estar correlacionada con la señal neuronal que codifica la expectativa temporal, especialmente en animales entrenados.

Por otro lado, dado que la codificación de la expectativa temporal a la recompensa surge primero en HDB y luego en V1, una hipótesis plausible es que la señal de HDB esté generando la codificación temporal observada en V1. Como ya mencionamos previamente, experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraron que la señal de expectativa temporal evocada en V1 puede ser generada localmente a partir de una entrada colinérgica que llega con un retraso respecto a la activación cortical inicial. Estos trabajos fueron basados en modelos computacionales que propusieron que las respuestas prolongadas en V1 pueden surgir de la

interacción de una entrada sináptica que brinde información acerca del estímulo visual y otra que indique el momento en que el animal recibe la recompensa (Gavornik et al., 2009; Gavornik & Shouval, 2011). Este modelo de aprendizaje plantea que una señal de recompensa globalmente disponible permite que se consoliden asociaciones de tipo hebbianas como modificaciones sinápticas permanentes. Es decir, las conexiones excitatorias laterales entre neuronas de la red cortical local de V1 podrían generar reverberaciones que sustenten estas representaciones temporales. Esta señal, conocida como *reward timing activity*, refleja la capacidad de las neuronas corticales de aprender la duración del intervalo entre un estímulo sensorial y una recompensa esperada, incluso en ausencia del refuerzo real. Estos hallazgos posicionaron a V1 no solo como una región sensorial pasiva, sino como un sitio capaz de almacenar información temporal adquirida mediante aprendizaje asociativo, facilitada por la acción moduladora de la acetilcolina.

En línea con estas observaciones, nuestros experimentos aportan evidencia complementaria desde una perspectiva subcortical. Tal como se había predicho y como fue demostrado por otros autores, observamos que una proporción de las neuronas del HDB responde de manera robusta a la entrega de la recompensa. Esta respuesta de tipo fásico coincide con el perfil caracterizado para las neuronas colinérgicas del BF en tareas recompensadas, y refuerza la idea de que este núcleo cumple un rol clave en la señalización de eventos relevantes para el aprendizaje. Sin embargo, nuestros resultados van un paso más allá: además de esta señal de recompensa, identificamos en las neuronas del HDB una señal que anticipa temporalmente la recompensa, emergente durante el aprendizaje y con una dinámica temporal muy similar a la *reward timing activity* observada en V1. Esto sugiere que el HDB no solo emite una señal de refuerzo en respuesta al evento hedónico, sino que también participa activamente en la codificación de la expectativa temporal de dicho evento, posiblemente contribuyendo a su representación cortical. Así, nuestros hallazgos amplían el entendimiento del rol funcional del HDB, mostrando que su actividad refleja no solo la presencia del refuerzo, sino también su predicción temporal, integrando componentes sensoriales, motivacionales y temporales en una señal moduladora que podría facilitar la plasticidad sináptica y la reorganización cortical durante el aprendizaje.

De hecho, la actividad sostenida del HDB tras la presentación de la clave visual observada en nuestros resultados es respaldada por el trabajo de Guo et al. (2019), en el que demostraron que durante un paradigma de condicionamiento de miedo auditivo, las

neuronas colinérgicas del BF incrementan progresivamente su respuesta al estímulo auditivo hasta abarcar todo el intervalo temporal que lo separa del estímulo aversivo. En este caso, esta actividad extendida es observada cuando ambos eventos no coexisten temporalmente y están separados por un intervalo de tiempo bastante mayor (5 segundos). Hipotetizamos que durante las primeras etapas del condicionamiento, la novedad de la asociación clave visual–recompensa provocaría un aumento inespecífico en el acoplamiento funcional entre el HDB y V1, potenciando la relación señal/ruido, la capacidad de detección de claves y la facilitación a largo plazo en V1 (Q. Gu, 2003; Kang et al., 2014; Pinto et al., 2013). Cuando el condicionamiento se extiende en el tiempo, y existe un intervalo de no solapamiento entre eventos se desencadenarían las respuestas sostenidas al estímulo predictivo de recompensa en el BF que se prolongan durante el intervalo temporal. Estas respuestas serían fundamentales para “puentear” la separación temporal entre ambos eventos sobre todo cuando este intervalo es prolongado.

Los resultados de esta tesis permiten proponer que el HDB participa activamente en procesos de estimación temporal, algo que no había sido reportado previamente con claridad, a diferencia de lo observado en otras regiones como el hipocampo (MacDonald et al., 2011; Pastalkova et al., 2008), las cortezas prefrontal (Kim et al., 2013; Xu et al., 2014), parietal (Janssen & Shadlen, 2005; Leon & Shadlen, 2003) y motora (Lebedev et al., 2008), el cerebelo (Mauk & Buonomano, 2004), y el estriado (Adler, 2012; Jin et al., 2009; Matell et al., 2003; Mello et al., 2015). Por ejemplo, se ha descrito en el hipocampo la existencia de “células de tiempo” que se activan secuencialmente durante un intervalo dado (MacDonald et al., 2011), mientras que en el estriado dorsal, patrones secuenciales de activación poblacional codifican intervalos temporales de 10 s a 1 min (Mello et al., 2015). En nuestro trabajo, identificamos en el HDB una forma de codificación temporal distinta: neuronas cuya actividad se extiende a lo largo del intervalo entre dos eventos que no se solapan temporalmente.

Desde un marco teórico más general, estos hallazgos pueden interpretarse a la luz de los modelos de *reinforcement learning*, particularmente en relación con el problema del crédito temporal. En muchas situaciones naturales, el estímulo condicionado (CS) y el refuerzo (US) no se superponen en el tiempo, y sin embargo los animales aprenden a asociarlos. Para que este aprendizaje ocurra, el sistema nervioso debe generar una representación interna que extienda temporalmente la presencia del CS o que prediga el

momento de aparición del US. Diversos estudios han propuesto que señales moduladoras, como la liberación de acetilcolina, pueden actuar como una *eligibility trace* que marca un intervalo de tiempo durante el cual una asociación puede consolidarse (Buonomano & Maass, 2009; Frémaux & Gerstner, 2016). En este sentido, la actividad observada en neuronas del HDB que reportan el tiempo esperado de la recompensa y su omisión, incluso en ausencia de señales externas, podría constituir una señal interna que permite estabilizar la asociación entre CS y US aún cuando estos no coinciden temporalmente. Esta función del HDB sería complementaria a la del sistema dopaminérgico, que ajusta la valoración de la asociación en función del error de predicción, mientras que el sistema colinérgico contribuiría a mantener activa la representación temporal del refuerzo esperado, facilitando así el aprendizaje dependiente de plasticidad cortical.

D.3.D. ¿Son colinérgicas las neuronas del HDB descritas en esta tesis?

Resulta importante discutir que en esta tesis caracterizamos el rol de las neuronas del HDB sin distinguir entre los distintos tipos neuronales que lo componen (colinérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas). Tradicionalmente, la investigación sobre el rol del BF en funciones cognitivas se ha centrado principalmente en su componente colinérgico, debido a su influencia moduladora sobre la corteza y su implicancia en procesos como la atención, el aprendizaje y la plasticidad. De esta manera, la mayor parte de los trabajos se centran en las funciones de estas neuronas. Sin embargo, las proyecciones del BF incluyen componentes no colinérgicos igualmente prominentes, como neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, y algunos trabajos comienzan a describir las funciones de estos otros tipos neuronales.

En el caso específico de la codificación de la recompensa, las neuronas colinérgicas han sido ampliamente implicadas como participantes clave (Hangya et al., 2015; Harrison et al., 2016; Guo et al., 2019; Laszlovszky et al., 2020; Sturgill et al., 2020), así como también en la señalización del error de predicción de recompensa (Hegedüs et al., 2023; Sturgill et al., 2020). No obstante, también se ha propuesto que otras neuronas que no son colinérgicas (pero que no han sido identificadas), también responden a recompensas con respuestas fásicas en ráfagas y expresan error de predicción (Avila and Lin, 2014a; Avila and Lin, 2014b; S.-C. Lin & Nicolelis, 2008; Manzur et al., 2023).

Por otro lado, respecto a la codificación de estímulos sensoriales, la mayor parte de los trabajos también han atribuido este rol predominantemente a neuronas colinérgicas (Crouse et al., 2020; Guo et al., 2019; Harrison et al., 2016; Kuchibhotla et al., 2017; Parikh et al., 2007; Zhou et al., 2022). Sin embargo, otros trabajos postulan que las neuronas GABAérgicas también codifican claves sensoriales en contextos de aprendizaje (De Saint Jan, 2022; Nunez-Parra et al., 2013). Por lo tanto, las neuronas que describimos con respuesta a la clave visual podrían ser en principio tanto colinérgicas como GABAérgicas. Por último, en relación a la actividad sostenida desencadenada por la clave visual, el trabajo de Guo et al., (2019) respalda la idea de que se trate de neuronas colinérgicas. Además, siendo que se asemeja a la actividad de estimación temporal reportada en V1 y que son precisamente las proyecciones colinérgicas del BF las necesarias y suficientes para esta modulación, también nos permite suponer que serían colinérgicas.

Dado que nuestros registros probablemente incluyen señales provenientes de distintos tipos neuronales, será importante en futuros estudios identificar con mayor precisión la identidad celular de las unidades registradas. Esto permitirá atribuir con mayor certeza las funciones observadas a poblaciones neuronales específicas dentro del HDB. Sería preciso utilizar ratones transgénicos para poder inducir la expresión de *channelrhodopsin-2* (ChR2) por ejemplo en neuronas colinérgicas del HDB, y de esta manera poder identificar estas neuronas en los registros extracelulares y determinar si son las que muestran las respuestas descritas en esta tesis. Proponemos recurrir a la técnica de optogenética debido a que, lamentablemente, las neuronas colinérgicas no pueden identificarse de manera definitiva utilizando técnicas de clasificación a partir de los registros extracelulares ya que carecen de características distintivas en la forma de sus potenciales de acción o en sus patrones de disparo que puedan ayudar en su identificación (Hangya et al., 2015; Lin et al., 2015).

CONCLUSIÓN

Esta tesis propone que las neuronas del HDB codifican diversos aspectos relevantes de una tarea operante recompensada guiada por una clave visual, contribuyendo así en procesos cognitivos como el aprendizaje y toma de decisiones. Desde las etapas iniciales del aprendizaje, estas neuronas representan tanto la saliencia del estímulo visual como la entrega de la recompensa. A medida que progresa el entrenamiento, también emergen respuestas asociadas a la omisión de la recompensa, compatibles con una señal de error de predicción, así como una señal de expectativa temporal que refleja la estimación del momento de llegada de la recompensa. Esta señal de expectativa temporal del HDB que se expresa como una modulación de la actividad sostenida durante el intervalo entre una clave visual y una recompensa contingente podría ser la señal que esté generando la codificación temporal observada en V1.

De este modo, nuestros resultados profundizan en el rol del HDB en funciones cognitivas como el aprendizaje asociativo, aportando nueva evidencia sobre su participación en la codificación de señales de refuerzo, expectativa temporal y omisión de recompensa. Estos cambios plásticos en las propiedades de codificación del HDB confirman que no se trata únicamente de un sistema que envía señal de refuerzo, sino de un nodo que participa activamente en la representación temporal del refuerzo y en el aprendizaje basado en eventos discontinuos en el tiempo. Además, dado que nuestros registros posiblemente incluyan la actividad combinada de diferentes tipos neuronales (colinérgicos, glutamatérgicos y GABAérgicos), los resultados sugieren que el HDB podría influir sobre la plasticidad cortical a través de múltiples mecanismos complementarios. Esta diversidad celular y funcional le otorgaría al HDB una notable capacidad para modular dinámicamente el procesamiento sensorial y adaptar las respuestas corticales en función del contexto y la experiencia previa. En conjunto, esta evidencia sugiere que las neuronas del HDB no solo contribuyen a la codificación y asociación de estímulos relevantes, sino que además podrían desempeñar un rol clave en tareas donde el estímulo condicionado y el refuerzo no se superponen temporalmente, facilitando asociaciones duraderas, tal como predicen ciertos modelos de *reinforcement learning*. Esto posiciona a las neuronas del HDB como un modulador de alta relevancia, comparable al sistema dopaminérgico en su implicancia funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, W. C., & Goddard, G. V. (1983). Asymmetric relationships between homosynaptic long-term potentiation and heterosynaptic long-term depression. *Nature*, 305(5936), 717–719. <https://doi.org/10.1038/305717a0>
- Adler, A., Katabi, S., Finkes, I., Israel, Z., Prut, Y., & Bergman, H. (2012). Temporal convergence of dynamic cell assemblies in the striato-pallidal network. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(7), 2473–2484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4830-11.2012>
- Alam, M. N., McGinty, D., & Szymusiak, R. (1997). Thermosensitive neurons of the diagonal band in rats: Relation to wakefulness and non-rapid eye movement sleep. *Brain Research*, 752(1–2), 81–89. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01452-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01452-7)
- Apicella, P., Deffains, M., Ravel, S., & Legallet, E. (2009). Tonicly 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), 515–526. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06872.x>
- Avery, M. C., & Krichmar, J. L. (2017). Neuromodulatory Systems and Their Interactions: A Review of Models, Theories, and Experiments. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 108. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00108>
- Avila, I., & Lin, S.-C. (2014a). Distinct neuronal populations in the basal forebrain encode motivational salience and movement. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 421. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00421>
- Avila, I., & Lin, S.-C. (2014b). Motivational salience signal in the basal forebrain is coupled with faster and more precise decision speed. *PLoS Biology*, 12(3), e1001811. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001811>
- Balleine, B. W., & Dickinson, A. (1998). Goal-directed instrumental action: Contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, 37(4–5), 407–419. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(98\)00033-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(98)00033-1)
- Bear, M. F. (2003). Bidirectional synaptic plasticity: From theory to reality. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1432), 649–655. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1255>
- Belova, M. A., Paton, J. J., Morrison, S. E., & Salzman, C. D. (2007). Expectation modulates neural responses to pleasant and aversive stimuli in primate amygdala. *Neuron*, 55(6), 970–984. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.004>
- Bentley, P., Husain, M., & Dolan, R. J. (2004). Effects of cholinergic enhancement on visual stimulation, spatial attention, and spatial working memory. *Neuron*, 41(6), 969–982. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00145-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00145-x)
- Bickford, M. E., Günlük, A. E., Van Horn, S. C., & Sherman, S. M. (1994). GABAergic projection from the basal forebrain to the visual sector of the thalamic reticular nucleus in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 348(4), 481–510. <https://doi.org/10.1002/cne.903480402>

- Bliss, T. V., & Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 357–374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Brashear, H. R., Zaborszky, L., & Heimer, L. (1986). Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band. *Neuroscience*, 17(2), 439–451. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90258-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90258-7)
- Briand, L. A., Gritton, H., Howe, W. M., Young, D. A., & Sarter, M. (2007). Modulators in concert for cognition: Modulator interactions in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 83(2), 69–91. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.06.007>
- Brown, R. E., & McKenna, J. T. (2015). Turning a Negative into a Positive: Ascending GABAergic Control of Cortical Activation and Arousal. *Frontiers in Neurology*, 6, 135. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00135>
- Buonomano DV, Maass W. State-dependent computations: spatiotemporal processing in cortical networks. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Feb;10(2):113-25. <https://doi.org/10.1038/nrn2558>
- Buzsáki, G. (2004). Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 7(5), 446–451. <https://doi.org/10.1038/nn1233>
- Buzsaki, G., Bickford, R. G., Ponomareff, G., Thal, L. J., Mandel, R., & Gage, F. H. (1988). Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(11), 4007–4026. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-11-04007.1988>
- Callaway, E. M. (1998). Visual scenes and cortical neurons: What you see is what you get. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3344–3345. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3344>
- Chen, C.-F. F., Barnes, D. C., & Wilson, D. A. (2011). Generalized vs. Stimulus-specific learned fear differentially modifies stimulus encoding in primary sensory cortex of awake rats. *Journal of Neurophysiology*, 106(6), 3136–3144. <https://doi.org/10.1152/jn.00721.2011>
- Chubykin, A. A., Roach, E. B., Bear, M. F., & Shuler, M. G. (2013). A cholinergic mechanism for reward timing within primary visual cortex. *Neuron*, 77(4). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.039>
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Cohen, J. Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B. B., & Uchida, N. (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature*, 482(7383), 85–88. <https://doi.org/10.1038/nature10754>
- Cooke, S. F., & Bear, M. F. (2010). Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(48), 16304–16313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4333-10.2010>

- Crouse, R. B., Kim, K., Batchelor, H. M., Girardi, E. M., Kamaletdinova, R., Chan, J., Rajebhosale, P., Pittenger, S. T., Role, L. W., Talmage, D. A., Jing, M., Li, Y., Gao, X.-B., Mineur, Y. S., & Picciotto, M. R. (2020). Acetylcholine is released in the basolateral amygdala in response to predictors of reward and enhances the learning of cue-reward contingency. *eLife*, 9, e57335. <https://doi.org/10.7554/eLife.57335>
- Cullinan, W. E., & Zaborszky, L. (1991). Organization of ascending hypothalamic projections to the rostral forebrain with special reference to the innervation of cholinergic projection neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 306(4), 631–667. <https://doi.org/10.1002/cne.903060408>
- Cummings, J. L., & Benson, D. F. (1984). Subcortical dementia. Review of an emerging concept. *Archives of Neurology*, 41(8), 874–879. <https://doi.org/10.1001/archneur.1984.04050190080019>
- Dayan, P., & Balleine, B. W. (2002). Reward, motivation, and reinforcement learning. *Neuron*, 36(2), 285–298. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00963-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00963-7)
- Dayan, P., & Niv, Y. (2008). Reinforcement learning: The good, the bad and the ugly. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(2), 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.003>
- De Saint Jan, D. (2022). Target-specific control of olfactory bulb periglomerular cells by GABAergic and cholinergic basal forebrain inputs. *eLife*, 11, e71965. <https://doi.org/10.7554/eLife.71965>
- DeLong, M. R. (1971). Activity of pallidal neurons during movement. *Journal of Neurophysiology*, 34(3), 414–427. <https://doi.org/10.1152/jn.1971.34.3.414>
- Ding, L., & Gold, J. I. (2010). Caudate encodes multiple computations for perceptual decisions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(47), 15747–15759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2894-10.2010>
- Disney, A. A., Aoki, C., & Hawken, M. J. (2007). Gain modulation by nicotine in macaque v1. *Neuron*, 56(4), 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.034>
- Do, J. P., Xu, M., Lee, S.-H., Chang, W.-C., Zhang, S., Chung, S., Yung, T. J., Fan, J. L., Miyamichi, K., Luo, L., & Dan, Y. (2016). Cell type-specific long-range connections of basal forebrain circuit. *eLife*, 5, e13214. <https://doi.org/10.7554/eLife.13214>
- Domenici, L., Parisi, V., & Maffei, L. (1992). Exogenous supply of nerve growth factor prevents the effects of strabismus in the rat. *Neuroscience*, 51(1), 19–24. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90466-f](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90466-f)
- Duque, A., Balatoni, B., Detari, L., & Zaborszky, L. (2000). EEG correlation of the discharge properties of identified neurons in the basal forebrain. *Journal of Neurophysiology*, 84(3), 1627–1635. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.3.1627>
- Eggermann, E., Kremer, Y., Crochet, S., & Petersen, C. C. H. (2014). Cholinergic signals in mouse barrel cortex during active whisker sensing. *Cell Reports*, 9(5), 1654–1660. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.005>
- Egorov, A. V., Hamam, B. N., Fransén, E., Hasselmo, M. E., & Alonso, A. A. (2002). Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature*, 420(6912), 173–178. <https://doi.org/10.1038/nature01171>

- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annual Review of Psychology*, 48, 649–684. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.649>
- Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L., & Maffei, L. (1994). Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: Dark rearing and monocular deprivation. *Vision Research*, 34(6), 709–720. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)90210-0)
- Felleman, D. J., & Van Essen, D. C. (1991). Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 1(1), 1–47. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.1.1-a>
- Foeller, E., & Feldman, D. E. (2004). Synaptic basis for developmental plasticity in somatosensory cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.011>
- Fox, K. (1992). A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(5), 1826–1838. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-05-01826.1992>
- Frémaux N, Gerstner W. Neuromodulated Spike-Timing-Dependent Plasticity, and Theory of Three-Factor Learning Rules. *Front Neural Circuits*. 2016 Jan 19;9:85. <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00085>
- Frenkel, M. Y., Sawtell, N. B., Diogo, A. C. M., Yoon, B., Neve, R. L., & Bear, M. F. (2006). Instructive effect of visual experience in mouse visual cortex. *Neuron*, 51(3), 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.026>
- Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (1991). GABAergic interneurons containing calbindin D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in the rat neocortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 314(1), 187–199. <https://doi.org/10.1002/cne.903140117>
- Freund, T. F., & Meskenaite, V. (1992). Gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 738–742. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.738>
- Fromme, R. C., Carcea, I., Barker, A. J., Yuan, K., Seybold, B. A., Martins, A. R. O., Zaika, N., Bernstein, H., Wachs, M., Levis, P. A., Polley, D. B., Merzenich, M. M., & Schreiner, C. E. (2013). Long-term modification of cortical synapses improves sensory perception. *Nature Neuroscience*, 16(1), 79–88. <https://doi.org/10.1038/nn.3274>
- Furey, M. L., Pietrini, P., & Haxby, J. V. (2000). Cholinergic enhancement and increased selectivity of perceptual processing during working memory. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5500), 2315–2319. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2315>
- Fuster, J. M., & Alexander, G. E. (1971). Neuron activity related to short-term memory. *Science (New York, N.Y.)*, 173(3997), 652–654. <https://doi.org/10.1126/science.173.3997.652>
- Gaffan, E. A., Gaffan, D., & Harrison, S. (1988). Disconnection of the amygdala from visual association cortex impairs visual reward-association learning in monkeys. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(9), 3144–3150. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-09-03144.1988>

- Gallagher, M., & Colombo, P. J. (1995). Ageing: The cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80022-0](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80022-0)
- Gavornik, J. P., & Bear, M. F. (2014a). Learned spatiotemporal sequence recognition and prediction in primary visual cortex. *Nature Neuroscience*, 17(5), 732–737. <https://doi.org/10.1038/nn.3683>
- Gavornik, J. P., & Bear, M. F. (2014b). Higher brain functions served by the lowly rodent primary visual cortex. *Learning & Memory*, 21(10), 527–533. <https://doi.org/10.1101/lm.034355.114>
- Gavornik, J. P., & Shouval, H. Z. (2011). A network of spiking neurons that can represent interval timing: Mean field analysis. *Journal of Computational Neuroscience*, 30(2), 501–513. <https://doi.org/10.1007/s10827-010-0275-y>
- Gavornik, J. P., Shuler, M. G. H., Loewenstein, Y., Bear, M. F., & Shouval, H. Z. (2009). Learning reward timing in cortex through reward dependent expression of synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16), 6826–6831. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901835106>
- Gaykema, R. P., & Zaborszky, L. (1996). Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. II. Substantia nigra-ventral tegmental area projections to cholinergic neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 374(4), 555–577. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961028\)374:4<555::AID-CNE6>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961028)374:4<555::AID-CNE6>3.0.CO;2-0)
- Gdalyahu, A., Tring, E., Polack, P.-O., Gruver, R., Golshani, P., Fanselow, M. S., Silva, A. J., & Trachtenberg, J. T. (2012). Associative fear learning enhances sparse network coding in primary sensory cortex. *Neuron*, 75(1), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.035>
- Gielow, M. R., & Zaborszky, L. (2017). The Input-Output Relationship of the Cholinergic Basal Forebrain. *Cell Reports*, 18(7), 1817–1830. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.060>
- Glimcher, P. W. (2011). Understanding dopamine and reinforcement learning: The dopamine reward prediction error hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 3(Suppl 3), 15647–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014269108>
- Goard, M., & Dan, Y. (2009). Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes. *Nature Neuroscience*, 12(11), 1444–1449. <https://doi.org/10.1038/nn.2402>
- Goel, A., & Buonomano, D. V. (2016). Temporal Interval Learning in Cortical Cultures Is Encoded in Intrinsic Network Dynamics. *Neuron*, 91(2), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.042>
- Goltstein, P. M., Meijer, G. T., & Pennartz, C. M. (2018). Conditioning sharpens the spatial representation of rewarded stimuli in mouse primary visual cortex. *eLife*, 7, e37683. <https://doi.org/10.7554/eLife.37683>
- Gordon, J. A., & Stryker, M. P. (1996). Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(10), 3274–3286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-10-03274.1996>

- Greuel, J. M., Luhmann, H. J., & Singer, W. (1988). Pharmacological induction of use-dependent receptive field modifications in the visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4875), 74–77. <https://doi.org/10.1126/science.2902687>
- Gritti, I., Mainville, L., & Jones, B. E. (1993). Codistribution of GABA- with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 329(4), 438–457. <https://doi.org/10.1002/cne.903290403>
- Gritti, I., Mainville, L., & Jones, B. E. (1994). Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 339(2), 251–268. <https://doi.org/10.1002/cne.903390206>
- Gritti, I., Mariotti, M., & Mancina, M. (1998). GABAergic and cholinergic basal forebrain and preoptic-anterior hypothalamic projections to the mediodorsal nucleus of the thalamus in the cat. *Neuroscience*, 85(1), 149–178. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00573-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00573-3)
- Grothe, M., Heinsen, H., & Teipel, S. J. (2012). Atrophy of the cholinergic Basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, 71(9), 805–813. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.019>
- Gu, Q. (2003). Contribution of acetylcholine to visual cortex plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 291–301. [https://doi.org/10.1016/s1074-7427\(03\)00073-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7427(03)00073-x)
- Gu, Z., Lamb, P. W., & Yakel, J. L. (2012). Cholinergic coordination of presynaptic and postsynaptic activity induces timing-dependent hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(36), 12337–12348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2129-12.2012>
- Gu, Z., & Yakel, J. L. (2011). Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 71(1), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.026>
- Guo, W., Robert, B., & Polley, D. B. (2019). The Cholinergic Basal Forebrain Links Auditory Stimuli with Delayed Reinforcement to Support Learning. *Neuron*, 103(6), 1164–1177.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.06.024>
- Hangya, B., Ranade, S. P., Lorenc, M., & Kepecs, A. (2015). Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback. *Cell*, 162(5), 1155–1168. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.057>
- Harrison, T. C., Pinto, L., Brock, J. R., & Dan, Y. (2016). Calcium Imaging of Basal Forebrain Activity during Innate and Learned Behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, 10, 36. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00036>
- Hassani, O. K., Lee, M. G., Henny, P., & Jones, B. E. (2009). Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(38), 11828–11840. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1259-09.2009>
- Hasselmo, M. E. (2006). The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(6), 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.002>
- Hazan, L., Zugaro, M., & Buzsáki, G. (2006). Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods*, 155(2), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.017>

- Hegedüs, P., Sviatkó, K., Király, B., Martínez-Bellver, S., & Hangya, B. (2023). Cholinergic activity reflects reward expectations and predicts behavioral responses. *iScience*, 26(1), 105814. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105814>
- Henny, P., & Jones, B. E. (2008). Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *The European Journal of Neuroscience*, 27(3), 654–670. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06029.x>
- Hilgard, E. R., Atkinson, R. C., & Atkinson, R. L. (1975). *Introduction to Psychology* (6th ed.). Harcourt Brace Javonovich Inc.
- Hillier, D., Fiscella, M., Drinnenberg, A., Trenholm, S., Rompani, S. B., Raics, Z., Katona, G., Juettner, J., Hierlemann, A., Rozsa, B., & Roska, B. (2017). Causal evidence for retina-dependent and -independent visual motion computations in mouse cortex. *Nature Neuroscience*, 20(7), 960–968. <https://doi.org/10.1038/nn.4566>
- Hofer, S. B., Mrsic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., & Hübener, M. (2006). Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nature Neuroscience*, 9(1), 127–132. <https://doi.org/10.1038/nn1610>
- Hong, S., & Hikosaka, O. (2008). The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron*, 60(4), 720–729. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.035>
- Hu, R., Jin, S., He, X., Xu, F., & Hu, J. (2016). Whole-Brain Monosynaptic Afferent Inputs to Basal Forebrain Cholinergic System. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 98. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00098>
- Hua, T., Bao, P., Huang, C.-B., Wang, Z., Xu, J., Zhou, Y., & Lu, Z.-L. (2010). Perceptual learning improves contrast sensitivity of V1 neurons in cats. *Current Biology: CB*, 20(10), 887–894. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.066>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of Physiology*, 148(3), 574–591. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006308>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology*, 160(1), 106–154. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1968). Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *The Journal of Physiology*, 195(1), 215–243. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008455>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *The Journal of Physiology*, 206(2), 419–436. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009022>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1977). Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 198(1130), 1–59. <https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0085>
- Hur, E. E., & Zaborszky, L. (2005). Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: A combined retrograde tracing in situ hybridization study [corrected]. *The Journal of Comparative Neurology*, 483(3), 351–373. <https://doi.org/10.1002/cne.20444>

- Janssen, P., & Shadlen, M. N. (2005). A representation of the hazard rate of elapsed time in macaque area LIP. *Nature Neuroscience*, 8(2), 234–241. <https://doi.org/10.1038/nn1386>
- Jin, D. Z., Fujii, N., & Graybiel, A. M. (2009). Neural representation of time in cortico-basal ganglia circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19156–19161. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909881106>
- Johnson, H. A., Goel, A., & Buonomano, D. V. (2010). Neural dynamics of in vitro cortical networks reflects experienced temporal patterns. *Nature Neuroscience*, 13(8), 917–919. <https://doi.org/10.1038/nn.2579>
- Jolkkonen, E., Miettinen, R., Pikkarainen, M., & Pitkänen, A. (2002). Projections from the amygdaloid complex to the magnocellular cholinergic basal forebrain in rat. *Neuroscience*, 111(1), 133–149. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00578-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00578-4)
- Jones, B. E. (2003). Arousal systems. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 8, s438–451. <https://doi.org/10.2741/1074>
- Jones, B. E. (2004). Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Progress in Brain Research*, 145, 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45011-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45011-5)
- Jourdain, A., Semba, K., & Fibiger, H. C. (1989). Basal forebrain and mesopontine tegmental projections to the reticular thalamic nucleus: An axonal collateralization and immunohistochemical study in the rat. *Brain Research*, 505(1), 55–65. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90115-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90115-7)
- Kalmbach, A., Hedrick, T., & Waters, J. (2012). Selective optogenetic stimulation of cholinergic axons in neocortex. *Journal of Neurophysiology*, 107(7), 2008–2019. <https://doi.org/10.1152/jn.00870.2011>
- Kang, J. I., Groleau, M., Dotigny, F., Giguère, H., & Vaucher, E. (2014). Visual training paired with electrical stimulation of the basal forebrain improves orientation-selective visual acuity in the rat. *Brain Structure & Function*, 219(4), 1493–1507. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0582-y>
- Karmarkar, U. R., & Dan, Y. (2006). Experience-dependent plasticity in adult visual cortex. *Neuron*, 52(4), 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.001>
- Kass, M. D., Rosenthal, M. C., Pottackal, J., & McGann, J. P. (2013). Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6164), 1389–1392. <https://doi.org/10.1126/science.1244916>
- Katz, L. C., Burkhalter, A., & Dreyer, W. J. (1984). Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature*, 310(5977), 498–500. <https://doi.org/10.1038/310498a0>
- Kaur, S., Junek, A., Black, M. A., & Semba, K. (2008). Effects of ibotenate and 192IgG-saporin lesions of the nucleus basalis magnocellularis/substantia innominata on spontaneous sleep and wake states and on recovery sleep after sleep deprivation in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(2), 491–504. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1585-07.2008>
- Kay, L. M., & Laurent, G. (1999). Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nature Neuroscience*, 2(11), 1003–1009. <https://doi.org/10.1038/14801>

- Kennerley, S. W., Behrens, T. E. J., & Wallis, J. D. (2011). Double dissociation of value computations in orbitofrontal and anterior cingulate neurons. *Nature Neuroscience*, 14(12), 1581–1589. <https://doi.org/10.1038/nn.2961>
- Kilgard, M. P., & Merzenich, M. M. (1998). Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5357), 1714–1718. <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1714>
- Kim, J., Ghim, J.-W., Lee, J. H., & Jung, M. W. (2013). Neural correlates of interval timing in rodent prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(34), 13834–13847. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1443-13.2013>
- Kim, T., Thankachan, S., McKenna, J. T., McNally, J. M., Yang, C., Choi, J. H., Chen, L., Kocsis, B., Deisseroth, K., Strecker, R. E., Basheer, R., Brown, R. E., & McCarley, R. W. (2015). Cortically projecting basal forebrain parvalbumin neurons regulate cortical gamma band oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3535–3540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413625112>
- Kirkwood, A., Rozas, C., Kirkwood, J., Perez, F., & Bear, M. F. (1999). Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(5), 1599–1609. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-05-01599.1999>
- Kojic, L., Gu, Q., Douglas, R. M., & Cynader, M. S. (2001). Laminar distribution of cholinergic- and serotonergic-dependent plasticity within kitten visual cortex. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 126(2), 157–162. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(00\)00146-2](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(00)00146-2)
- Komura, Y., Tamura, R., Uwano, T., Nishijo, H., Kaga, K., & Ono, T. (2001). Retrospective and prospective coding for predicted reward in the sensory thalamus. *Nature*, 412(6846), 546–549. <https://doi.org/10.1038/35087595>
- Kuchibhotla, K. V., Gill, J. V., Lindsay, G. W., Papadoyannis, E. S., Field, R. E., Sten, T. A. H., Miller, K. D., & Froemke, R. C. (2017). Parallel processing by cortical inhibition enables context-dependent behavior. *Nature Neuroscience*, 20(1), 62–71. <https://doi.org/10.1038/nn.4436>
- Laszlovszky, T., Schlingloff, D., Hegedüs, P., Freund, T. F., Gulyás, A., Kepecs, A., & Hangya, B. (2020). Distinct synchronization, cortical coupling and behavioral function of two basal forebrain cholinergic neuron types. *Nature Neuroscience*, 23(8), 992–1003. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0648-0>
- Lebedev, M. A., O'Doherty, J. E., & Nicolelis, M. A. L. (2008). Decoding of temporal intervals from cortical ensemble activity. *Journal of Neurophysiology*, 99(1), 166–186. <https://doi.org/10.1152/jn.00734.2007>
- Lee, M. G., Manns, I. D., Alonso, A., & Jones, B. E. (2004). Sleep-wake related discharge properties of basal forebrain neurons recorded with micropipettes in head-fixed rats. *Journal of Neurophysiology*, 92(2), 1182–1198. <https://doi.org/10.1152/jn.01003.2003>
- Leon, M. I., & Shadlen, M. N. (2003). Representation of time by neurons in the posterior parietal cortex of the macaque. *Neuron*, 38(2), 317–327. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00185-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00185-5)
- Li, W., Howard, J. D., Parrish, T. B., & Gottfried, J. A. (2008). Aversive learning enhances perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5871), 1842–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1152837>

- Lin, J.-W., & Faber, D. S. (2002). Modulation of synaptic delay during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(9), 449–455. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02212-9](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02212-9)
- Lin, S.-C., Brown, R. E., Hussain Shuler, M. G., Petersen, C. C. H., & Kepecs, A. (2015). Optogenetic Dissection of the Basal Forebrain Neuromodulatory Control of Cortical Activation, Plasticity, and Cognition. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(41), 13896–13903. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2590-15.2015>
- Lin, S.-C., & Nicolelis, M. A. L. (2008). Neuronal ensemble bursting in the basal forebrain encodes salience irrespective of valence. *Neuron*, 59(1), 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.031>
- Liu, C. H., Coleman, J. E., Davoudi, H., Zhang, K., & Shuler, M. G. (2015). Selective activation of a putative reinforcement signal conditions cued interval timing in primary visual cortex. *Current Biology : CB*, 25(12). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.028>
- Ljungberg, T., Apicella, P., & Schultz, W. (1992). Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *Journal of Neurophysiology*, 67(1), 145–163. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.1.145>
- Ludvig, E. A., Bellemare, M. G., & Pearson, K. G. (2011). A Primer on Reinforcement Learning in the Brain: Psychological, Computational, and Neural Perspectives. In *Computational Neuroscience for Advancing Artificial Intelligence: Models, Methods and Applications* (pp. 111–144). IGI Global Scientific Publishing. <https://doi.org/10.4018/978-1-60960-021-1.ch006>
- Lund, J. S. (1973). Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (Macaca mulatta). *The Journal of Comparative Neurology*, 147(4), 455–496. <https://doi.org/10.1002/cne.901470404>
- MacDonald, C. J., Lepage, K. Q., Eden, U. T., & Eichenbaum, H. (2011). Hippocampal “time cells” bridge the gap in memory for discontinuous events. *Neuron*, 71(4), 737–749. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.012>
- Makino, H., & Komiyama, T. (2015). Learning enhances the relative impact of top-down processing in the visual cortex. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1116–1122. <https://doi.org/10.1038/nn.4061>
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Manzur, H. E., Vlasov, K., Jhong, Y.-J., Chen, H.-Y., & Lin, S.-C. (2023). The behavioral signature of stepwise learning strategy in male rats and its neural correlate in the basal forebrain. *Nature Communications*, 14(1), 4415. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40145-9>
- Matell, M. S., Meck, W. H., & Nicolelis, M. A. L. (2003). Interval timing and the encoding of signal duration by ensembles of cortical and striatal neurons. *Behavioral Neuroscience*, 117(4), 760–773. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.4.760>
- Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*, 447(7148), 1111–1115. <https://doi.org/10.1038/nature05860>
- Mauk, M. D., & Buonomano, D. V. (2004). The neural basis of temporal processing. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 307–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144247>
- Mayer, M. J. (1983). Practice improves adults’ sensitivity to diagonals. *Vision Research*, 23(5), 547–550. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(83\)90130-x](https://doi.org/10.1016/0042-6989(83)90130-x)

- McGann, J. P. (2015). Associative learning and sensory neuroplasticity: How does it happen and what is it good for? *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 22(11), 567–576. <https://doi.org/10.1101/lm.039636.115>
- McGaughy, J., Dalley, J. W., Morrison, C. H., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2002). Selective behavioral and neurochemical effects of cholinergic lesions produced by intrabasal infusions of 192 IgG-saporin on attentional performance in a five-choice serial reaction time task. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), 1905–1913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-01905.2002>
- McGaughy, J., Everitt, B. J., Robbins, T. W., & Sarter, M. (2000). The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: Impact of new selective immunotoxins. *Behavioural Brain Research*, 115(2), 251–263. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00262-x](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00262-x)
- McGaughy, J., Kaiser, T., & Sarter, M. (1996). Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: Selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density. *Behavioral Neuroscience*, 110(2), 247–265. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.110.2.247>
- McGinty, D. J., & Serman, M. B. (1968). Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science (New York, N.Y.)*, 160(3833), 1253–1255. <https://doi.org/10.1126/science.160.3833.1253>
- Mello, G. B. M., Soares, S., & Paton, J. J. (2015). A scalable population code for time in the striatum. *Current Biology: CB*, 25(9), 1113–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.036>
- Mesulam, M. M., Hersh, L. B., Mash, D. C., & Geula, C. (1992). Differential cholinergic innervation within functional subdivisions of the human cerebral cortex: A choline acetyltransferase study. *The Journal of Comparative Neurology*, 318(3), 316–328. <https://doi.org/10.1002/cne.903180308>
- Metherate, R., Cox, C. L., & Ashe, J. H. (1992). Cellular bases of neocortical activation: Modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(12), 4701–4711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-12-04701.1992>
- Mishkin, M., & Ungerleider, L. G. (1982). Contribution of striate inputs to the visuospatial functions of parieto-preoccipital cortex in monkeys. *Behavioural Brain Research*, 6(1), 57–77. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(82\)90081-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(82)90081-x)
- Miyashita, Y., & Chang, H. S. (1988). Neuronal correlate of pictorial short-term memory in the primate temporal cortex. *Nature*, 331(6151), 68–70. <https://doi.org/10.1038/331068a0>
- Monk KJ, Allard S, Hussain Shuler MG. Reward Timing and Its Expression by Inhibitory Interneurons in the Mouse Primary Visual Cortex. *Cereb Cortex*. 2020 Jun 30;30(8):4662-4676. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa068>
- Montague, P. R., Dayan, P., & Sejnowski, T. J. (1996). A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive Hebbian learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(5), 1936–1947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-05-01936.1996>

- Morishita, H., Miwa, J. M., Heintz, N., & Hensch, T. K. (2010). Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6008), 1238–1240. <https://doi.org/10.1126/science.1195320>
- Moruzzi, G., & Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1(4), 455–473.
- Murphy, E. S., & Lupfer, G. J. (2014). Basic principles of operant conditioning. In *The Wiley Blackwell handbook of operant and classical conditioning* (pp. 167–194). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118468135.ch8>
- Niv, Y. (2009). Reinforcement learning in the brain. *Journal of Mathematical Psychology*, 53(3), 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.jmp.2008.12.005>
- Nunez-Parra, A., Maurer, R. K., Krahe, K., Smith, R. S., & Araneda, R. C. (2013). Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(36), 14777–14782. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310686110>
- Ohl, F. W., & Scheich, H. (2005). Learning-induced plasticity in animal and human auditory cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(4), 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.07.002>
- Okoyama, S., Tago, H., McGeer, P. L., Hersh, L. B., & Kimura, H. (1987). Cholinergic divergent projections from rat basal forebrain to the hippocampus and olfactory bulb. *Neuroscience Letters*, 83(1–2), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90219-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90219-9)
- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), 419–427. <https://doi.org/10.1037/h0058775>
- Pais-Vieira, M., Lebedev, M. A., Wiest, M. C., & Nicolelis, M. A. L. (2013). Simultaneous top-down modulation of the primary somatosensory cortex and thalamic nuclei during active tactile discrimination. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(9), 4076–4093. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1659-12.2013>
- Pan, W.-X., Schmidt, R., Wickens, J. R., & Hyland, B. I. (2005). Dopamine cells respond to predicted events during classical conditioning: Evidence for eligibility traces in the reward-learning network. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(26), 6235–6242. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1478-05.2005>
- Papadopoulos, G. C., Parnavelas, J. G., & Buijs, R. M. (1989). Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the noradrenaline innervation of the rat visual cortex. *Journal of Neurocytology*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF01188418>
- Paré, D., & Smith, Y. (1994). GABAergic projection from the intercalated cell masses of the amygdala to the basal forebrain in cats. *The Journal of Comparative Neurology*, 344(1), 33–49. <https://doi.org/10.1002/cne.903440104>
- Parent, A., Paré, D., Smith, Y., & Steriade, M. (1988). Basal forebrain cholinergic and noncholinergic projections to the thalamus and brainstem in cats and monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, 277(2), 281–301. <https://doi.org/10.1002/cne.902770209>

- Parikh, V., Kozak, R., Martinez, V., & Sarter, M. (2007). Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales. *Neuron*, 56(1), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.025>
- Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., & Buzsáki, G. (2008). Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5894), 1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>
- Paton, J. J., & Buonomano, D. V. (2018). The Neural Basis of Timing: Distributed Mechanisms for Diverse Functions. *Neuron*, 98(4), 687–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.045>
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex* (pp. xv, 430). Oxford Univ. Press.
- Pessoa, L. (2017). Chapter 29—The Emotional Brain. In P. M. Conn (Ed.), *Conn's Translational Neuroscience* (pp. 635–656). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00046-4>
- Pinto, L., Goard, M. J., Estandian, D., Xu, M., Kwan, A. C., Lee, S.-H., Harrison, T. C., Feng, G., & Dan, Y. (2013). Fast modulation of visual perception by basal forebrain cholinergic neurons. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1857–1863. <https://doi.org/10.1038/nn.3552>
- Polley, D. B., Heiser, M. A., Blake, D. T., Schreiner, C. E., & Merzenich, M. M. (2004). Associative learning shapes the neural code for stimulus magnitude in primary auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16351–16356. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407586101>
- Polley, D. B., Read, H. L., Storace, D. A., & Merzenich, M. M. (2007). Multiparametric auditory receptive field organization across five cortical fields in the albino rat. *Journal of Neurophysiology*, 97(5), 3621–3638. <https://doi.org/10.1152/jn.01298.2006>
- Rasmusson, D. D. (2000). The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behavioural Brain Research*, 115(2), 205–218. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00259-x](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00259-x)
- Ress, D., Backus, B. T., & Heeger, D. J. (2000). Activity in primary visual cortex predicts performance in a visual detection task. *Nature Neuroscience*, 3(9), 940–945. <https://doi.org/10.1038/78856>
- Richardson, R. T., & DeLong, M. R. (1990). Context-dependent responses of primate nucleus basalis neurons in a go/no-go task. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(8), 2528–2540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-08-02528.1990>
- Richardson, R. T., & DeLong, M. R. (1991). Electrophysiological studies of the functions of the nucleus basalis in primates. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 295, 233–252. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0145-6_12
- Robert, B., Kimchi, E. Y., Watanabe, Y., Chakoma, T., Jing, M., Li, Y., & Polley, D. B. (2021). A functional topography within the cholinergic basal forebrain for encoding sensory cues and behavioral reinforcement outcomes. *eLife*, 10, e69514. <https://doi.org/10.7554/eLife.69514>
- Robertson, R. T., Fehrenbach, C. J., & Yu, J. (1990). Neural systems contributing to acetylcholinesterase histochemical staining in primary visual cortex of the adult rat. *Brain Research*, 509(2), 181–197. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90543-k](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90543-k)

- Rokem, A., & Silver, M. A. (2010). Cholinergic enhancement augments magnitude and specificity of visual perceptual learning in healthy humans. *Current Biology: CB*, 20(19), 1723–1728. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.027>
- Rolls, E. T. (2000). The orbitofrontal cortex and reward. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 10(3), 284–294. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.284>
- Ross, J. M., & Fletcher, M. L. (2018). Learning-Dependent and -Independent Enhancement of Mitral/Tufted Cell Glomerular Odor Responses Following Olfactory Fear Conditioning in Awake Mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(20), 4623–4640. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3559-17.2018>
- Rutkowski, R. G., & Weinberger, N. M. (2005). Encoding of learned importance of sound by magnitude of representational area in primary auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13664–13669. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506838102>
- Rye, D. B., Wainer, B. H., Mesulam, M. M., Mufson, E. J., & Saper, C. B. (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: A study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 13(3), 627–643. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90083-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90083-6)
- Saleeba, C., Dempsey, B., Le, S., Goodchild, A., & McMullan, S. (2019). A Student's Guide to Neural Circuit Tracing. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 897. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00897>
- Santos-Benitez, H., Magariños-Ascone, C. M., & Garcia-Austt, E. (1995). Nucleus basalis of Meynert cell responses in awake monkeys. *Brain Research Bulletin*, 37(5), 507–511. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(95\)00033-b](https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00033-b)
- Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J., & Scammell, T. E. (2010). Sleep State Switching. *Neuron*, 68(6), 1023–1042. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.032>
- Sarter, M., Parikh, V., & Howe, W. M. (2009). Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: Time to move on. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(5), 383–390. <https://doi.org/10.1038/nrn2635>
- Sawtell, N. B., Frenkel, M. Y., Philpot, B. D., Nakazawa, K., Tonegawa, S., & Bear, M. F. (2003). NMDA receptor-dependent ocular dominance plasticity in adult visual cortex. *Neuron*, 38(6), 977–985. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00323-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00323-4)
- Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80(1), 1–27. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.1.1>
- Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 23–32.
- Schultz, W., Apicella, P., & Ljungberg, T. (1993). Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(3), 900–913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-03-00900.1993>
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5306), 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>

- Semba, K. (2000). Multiple output pathways of the basal forebrain: Organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behavioural Brain Research*, 115(2), 117–141. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00254-0](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00254-0)
- Seo, H., & Lee, D. (2007). Temporal filtering of reward signals in the dorsal anterior cingulate cortex during a mixed-strategy game. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(31), 8366–8377. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2369-07.2007>
- Seol, G. H., Ziburkus, J., Huang, S., Song, L., Kim, I. T., Takamiya, K., Huganir, R. L., Lee, H.-K., & Kirkwood, A. (2007). Neuromodulators control the polarity of spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Neuron*, 55(6), 919–929. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.013>
- Serences, J. T. (2008). Value-based modulations in human visual cortex. *Neuron*, 60(6), 1169–1181. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.051>
- Shah, A. (2012). Psychological and neuroscientific connections with reinforcement learning. In *Reinforcement Learning: State-of-the-Art* (M. Wiering and M. van Otterlo (Eds.), pp. 507–537). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Reward timing in the primary visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5767), 1606–1609. <https://doi.org/10.1126/science.1123513>
- Steinberg, E. E., Keiflin, R., Boivin, J. R., Witten, I. B., Deisseroth, K., & Janak, P. H. (2013). A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. *Nature Neuroscience*, 16(7), 966–973. <https://doi.org/10.1038/nn.3413>
- Sturgill, J. F., Hegedus, P., Chevy, Q., Siebels, A., Jing, M., Li, Y., Hangya, B., & Kepecs, A. (2020). Basal Forebrain-Derived Acetylcholine Encodes Valence-Free Reinforcement Prediction Error. <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.953141>
- Suga, N. (2012). Tuning shifts of the auditory system by corticocortical and corticofugal projections and conditioning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(2), 969–988. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.11.006>
- Sutton, R. S., & Barto, A. G. (1998). *Reinforcement Learning: An Introduction*. MIT Press.
- Szymusiak, R., & McGinty, D. (1986). Sleep suppression following kainic acid-induced lesions of the basal forebrain. *Experimental Neurology*, 94(3), 598–614. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(86\)90240-2](https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90240-2)
- Szymusiak, R., & McGinty, D. (1989). Sleep-waking discharge of basal forebrain projection neurons in cats. *Brain Research Bulletin*, 22(2), 423–430. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90069-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90069-5)
- Tagawa, Y., Kanold, P. O., Majdan, M., & Shatz, C. J. (2005). Multiple periods of functional ocular dominance plasticity in mouse visual cortex. *Nature Neuroscience*, 8(3), 380–388. <https://doi.org/10.1038/nn1410>
- Takahashi, K., Lin, J.-S., & Sakai, K. (2009). Characterization and mapping of sleep-waking specific neurons in the basal forebrain and preoptic hypothalamus in mice. *Neuroscience*, 161(1), 269–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.075>
- Thorndike, E. L. (1911). *Animal intelligence: Experimental studies* (pp. viii, 297). Macmillan Press. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.55072>

- Tsai, H.-C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1168878>
- Unal, C. T., Pare, D., & Zaborszky, L. (2015). Impact of basal forebrain cholinergic inputs on basolateral amygdala neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(2), 853–863. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2706-14.2015>
- Vandecasteele, M., M, S., Royer, S., Belluscio, M., Berényi, A., Diba, K., Fujisawa, S., Grosmark, A., Mao, D., Mizuseki, K., Patel, J., Stark, E., Sullivan, D., Watson, B., & Buzsáki, G. (2012). Large-scale recording of neurons by movable silicon probes in behaving rodents. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 61, e3568. <https://doi.org/10.3791/3568>
- Vilimelis Aceituno, P., Ehsani, M., & Jost, J. (2020). Spiking time-dependent plasticity leads to efficient coding of predictions. *Biological Cybernetics*, 114(1), 43–61. <https://doi.org/10.1007/s00422-019-00813-w>
- Villar, P. S., Hu, R., & Araneda, R. C. (2021). Long-Range GABAergic Inhibition Modulates Spatiotemporal Dynamics of the Output Neurons in the Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 41(16), 3610–3621. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1498-20.2021>
- Vincis, R., & Fontanini, A. (2016). Associative learning changes cross-modal representations in the gustatory cortex. *eLife*, 5, e16420. <https://doi.org/10.7554/eLife.16420>
- Voytko, M. L. (1996). Cognitive functions of the basal forebrain cholinergic system in monkeys: Memory or attention? *Behavioural Brain Research*, 75(1–2), 13–25. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00143-3](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00143-3)
- Voytko, M. L., Olton, D. S., Richardson, R. T., Gorman, L. K., Tobin, J. R., & Price, D. L. (1994). Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(1), 167–186. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00167.1994>
- Watanabe, Y., & Funahashi, S. (2004). Neuronal activity throughout the primate mediodorsal nucleus of the thalamus during oculomotor delayed-responses. II. Activity encoding visual versus motor signal. *Journal of Neurophysiology*, 92(3), 1756–1769. <https://doi.org/10.1152/jn.00995.2003>
- Weinberger, N. M. (2015). New perspectives on the auditory cortex: Learning and memory. *Handbook of Clinical Neurology*, 129, 117–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62630-1.00007-X>
- Whalen, P. J., Kapp, B. S., & Pascoe, J. P. (1994). Neuronal activity within the nucleus basalis and conditioned neocortical electroencephalographic activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(3 Pt 2), 1623–1633. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01623.1994>
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., & Delon, M. R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science (New York, N.Y.)*, 215(4537), 1237–1239. <https://doi.org/10.1126/science.7058341>
- Wiest, M. C., Thomson, E., Pantoja, J., & Nicolelis, M. A. L. (2010). Changes in S1 neural responses during tactile discrimination learning. *Journal of Neurophysiology*, 104(1), 300–312. <https://doi.org/10.1152/jn.00194.2010>

- Wilson, F. A., & Rolls, E. T. (1990). Neuronal responses related to reinforcement in the primate basal forebrain. *Brain Research*, 509(2), 213–231. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90546-n](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90546-n)
- Woolf, N. J., & Butcher, L. L. (2011). Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.046>
- Wu, M., Zaborszky, L., Hajszan, T., van den Pol, A. N., & Alreja, M. (2004). Hypocretin/orexin innervation and excitation of identified septohippocampal cholinergic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(14), 3527–3536. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5364-03.2004>
- Xu, M., Zhang, S., Dan, Y., & Poo, M. (2014). Representation of interval timing by temporally scalable firing patterns in rat prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 480–485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321314111>
- Zaborszky, L. (2002). The modular organization of brain systems. Basal forebrain: The last frontier. *Progress in Brain Research*, 136, 359–372. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(02\)36030-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)36030-8)
- Zaborszky, L., Csordas, A., Mosca, K., Kim, J., Gielow, M. R., Vadasz, C., & Nadasdy, Z. (2015). Neurons in the basal forebrain project to the cortex in a complex topographic organization that reflects corticocortical connectivity patterns: An experimental study based on retrograde tracing and 3D reconstruction. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 25(1), 118–137. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht210>
- Zaborszky, L., & Cullinan, W. E. (1989). Hypothalamic axons terminate on forebrain cholinergic neurons: An ultrastructural double-labeling study using PHA-L tracing and ChAT immunocytochemistry. *Brain Research*, 479(1), 177–184. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91350-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91350-4)
- Zaborszky, L., & Cullinan, W. E. (1992). Projections from the nucleus accumbens to cholinergic neurons of the ventral pallidum: A correlated light and electron microscopic double-immunolabeling study in rat. *Brain Research*, 570(1–2), 92–101. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90568-t](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90568-t)
- Zaborszky, L., & Cullinan, W. E. (1996). Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. I. Dopamine-beta-hydroxylase- and tyrosine hydroxylase input to cholinergic neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 374(4), 535–554. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961028\)374:4<535::AID-CNE5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961028)374:4<535::AID-CNE5>3.0.CO;2-2)
- Zaborszky, L., Cullinan, W. E., & Luine, V. N. (1993). Catecholaminergic-cholinergic interaction in the basal forebrain. *Progress in Brain Research*, 98, 31–49. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62379-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62379-1)
- Zaborszky, L., Gaykema, R. P., Swanson, D. J., & Cullinan, W. E. (1997). Cortical input to the basal forebrain. *Neuroscience*, 79(4), 1051–1078. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00049-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00049-3)
- Zaborszky, L., Léránth, C., & Heimer, L. (1984). Ultrastructural evidence of amygdalofugal axons terminating on cholinergic cells of the rostral forebrain. *Neuroscience Letters*, 52(3), 219–225. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(84\)90165-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90165-4)
- Zaborszky, L., van den Pol, A., & Gyengesi, E. (2012). The Basal Forebrain Cholinergic Projection System in Mice. In *The Mouse Nervous System* (pp. 684–718). doi:10.1016/b978-0-12-369497-3.10028-7

- Zaghloul, K. A., Blanco, J. A., Weidemann, C. T., McGill, K., Jaggi, J. L., Baltuch, G. H., & Kahana, M. J. (2009). Human substantia nigra neurons encode unexpected financial rewards. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5920), 1496–1499. <https://doi.org/10.1126/science.1167342>
- Zhang, K., Chen, C. D., & Monosov, I. E. (2019). Novelty, Salience, and Surprise Timing Are Signaled by Neurons in the Basal Forebrain. *Current Biology: CB*, 29(1), 134-142.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.012>
- Zhou, P., Liu, P., Zhang, Y., Wang, D., & Li, A. (2022). The Response Dynamics and Function of Cholinergic and GABAergic Neurons in the Basal Forebrain During Olfactory Learning. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 911439. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.911439>
- Zilles, K., Wree, A., Schleicher, A., & Divac, I. (1984). The monocular and binocular subfields of the rat's primary visual cortex: A quantitative morphological approach. *The Journal of Comparative Neurology*, 226(3), 391–402. <https://doi.org/10.1002/cne.902260308>
- Zold, C. L., & Hussain Shuler, M. G. (2015). Theta Oscillations in Visual Cortex Emerge with Experience to Convey Expected Reward Time and Experienced Reward Rate. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(26), 9603–9614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-15.2015>