



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“EFECTO DE LA ACTIVACIÓN OPTOGENÉTICA DE AFERENCIAS
GLUTAMATÉRGICAS DEL NÚCLEO ACCUMBENS SOBRE LAS
CONDUCTAS DE HÁBITO Y DIRIGIDA A LA META”**

T E S I S

Que presenta:

QFB Jorge Luis Islas

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Ranier Gutiérrez Mendoza

México, Ciudad de México

Abril, 2016

Agradecimientos:

Especial agradecimiento a mi padre Jorge Rafael Luis Ramírez, a mi madre Julia Islas Valdez y a mis hermanos Rosendo, Emanuel, Rodolfo y Ernesto por su apoyo de forma incondicional a lo largo de todos estos años

Así mismo también a mi esposa Guadalupe Barbosa Islas y a mi hija Naomi Luis Barbosa por ser mi inspiración y mi motor para continuar y cumplir con mis metas.

A Luis E. Prado por aportar sus conocimientos e ideas necesarias para llevar a cabo este proyecto de maestría.

Al Dr. Ranier Gutiérrez por dirigir esta tesis y brindar sus conocimientos y tiempo para realizar este trabajo.

Y por último al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México donativo 179484, Fronteras de la Ciencia donativo 63 y Productos Medix donativo 1275 (para R. Gutiérrez) por sustentar económicamente este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN	2
CONDUCTA DIRIGIDA A LA META	4
EL HÁBITO	4
PRUEBA DE DEVALUACIÓN	5
CIRCUITO CEREBRAL INVOLUCRADO EN LOS PROCESOS DE LA CONDUCTA DIRIGIDA A LA META Y EL HÁBITO	6
ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES GLUTAMATÉRGICAS AL NAc MEDIANTE OPTOGENÉTICA	10
ESTUDIO MEDIANTE OPTOGENETICA DE LA PARTICIPACION DEL NAc Shell EN EL CONSUMO DE SACAROSA	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
General:	19
Específicos:	19
METODOLOGÍA.....	20
Animales de experimentación	20
Materiales.....	20
Cirugía	21
Parámetros de la fotoestimulación	21
Paradigma conductual	22
Experimento de autoestimulación	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
RESULTADOS.....	27
La activación de las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc interrumpe temporalmente el consumo de recompensa líquida de forma dependiente de la frecuencia de la fotoestimulación	27
La activación de las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc tiene, por sí mismo, un efecto recompensante	30
La activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc en la tarea de libre consumo induce un efecto a largo plazo sobre la motivación de los ratones Thy1-ChR2.....	34
La activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc interrumpe temporalmente la ejecución del palanqueo de manera dependiente del valor motivacional de la recompensa.....	36

La activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc también afecta la conducta apetitiva y el consumo de alimento sólido	40
La fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas del NAc no solo afecta el consumo de recompensa líquida sino también su conducta apetitiva	41
La alta motivación que tiene el sujeto por obtener sus recompensas en la tarea RF4 disminuye la duración del efecto que tiene la estimulación optogenética de las terminales glutamatérgicas del NAc sobre el consumo de sacarosa	45
La activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc mantiene un mayor valor motivacional hacia las recompensas aun cuando estas han sido devaluadas	46
La activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc mantiene el valor motivacional aun en ausencia de las recompensas (pellet o sacarosa)	48
La activación continua de las aferencias glutamatérgicas del NAc aumenta la sensibilidad a la fotoestimulación durante el consumo de sacarosa en la readquisición de la tarea de libre consumo	50
El cambio de la recompensa líquida de sacarosa por agua aumenta el valor motivacional por las recompensas	52
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIÓN	62
REFERENCIAS	63

RESUMEN

La conducta dirigida a la meta es una asociación acción-consecuencia, en la cual el sujeto realiza una acción para obtener una recompensa. Cuando esta conducta se repite de manera rutinaria se transforma en un hábito, generando una asociación estímulo-respuesta. Se ha sugerido que las neuronas del núcleo accumbens (NAc) participan en la formación de la conducta dirigida a la meta, y en su transición a un hábito, sin embargo aún se desconoce el papel que juegan las proyecciones glutamatérgicas que recibe el NAc en la generación de ambas conductas. Por lo que en el presente trabajo se investigó la función de estas proyecciones en ambas conductas utilizando a un ratón transgénico que expresa el canal de rodopsina 2 (ChR2), una opsina sensible a la luz, en terminales glutamatérgicas del NAc. Esto nos permitió evaluar en los mismos ratones el impacto de la activación de estas terminales en una tarea de libre consumo de agua y después de sacarosa, en una tarea de autoestimulación y una de condicionamiento operante de razón fija 4 (RF4) con recompensas de diferente valor motivacional (pellet de chocolate y sacarosa). En la tarea RF4 también se realizaron pruebas de devaluación y extinción. Finalmente reevaluamos la sensibilidad de la fotoestimulación en la tarea de libre consumo. Encontramos que -de manera dependiente de la frecuencia de la fotoestimulación- la activación de las terminales glutamatérgicas al NAc interrumpe -de igual forma y magnitud- el consumo de agua y de sacarosa. En la tarea de autoestimulación se encontró que los animales estuvieron dispuestos a lengüetear un bebedero vacío para auto-estimularse con el láser, indicando que la activación de las aferencias glutamatérgicas es *per se* recompensante. En la tarea de RF4 la fotoestimulación también afectó conductas apetitivas, así como el palanqueo asociado a la entrega de una recompensa. Además la duración de dicho efecto dependió del valor motivacional de la recompensa, siendo menor cuando el valor de la recompensa era mayor. La fotoestimulación además mantuvo un alto valor de las recompensas aun cuando estas fueron devaluadas. En las sesiones de extinción se encontró que la activación de estas aferencias ayudó al sujeto a mantener el valor motivacional de las recompensas aun en ausencia de estas. Al reevaluar la sensibilidad de la estimulación en la tarea de libre consumo con sacarosa se encontró que estos animales presentaron una mayor sensibilidad a la fotoactivación, sugiriendo que la activación -a través de los días- desencadena procesos de plasticidad neuronal. En resumen, nuestros datos sugieren que las aferencias glutamatérgicas del NAc refuerzan la conducta dirigida a la meta aumentando el valor motivacional de las recompensas, pero también participa en el hábito, ya que su activación mantiene la conducta instrumental en ausencia de recompensa.

ABSTRACT

Goal directed behavior is an association action-outcome, in which the subject makes an action to get a reward. When the goal directed behavior is repeated routinely this behavior is converted into a habit, generating an association stimulus-response. Although there are many circuits underlying these behaviors, it has been suggested that neurons in the nucleus accumbens (NAc) are involved in the development of goal directed behavior, furthermore in the transition to habit, the role of glutamatergic projections over NAc is still unknown in both behaviors. Using optogenetic techniques in a transgenic mouse expressing the *channelrhodopsin-2* (ChR2), an opsin light sensitive channel, in the NAc glutamatergic terminals. We evaluated the activation impact of these terminals in a water freely licking task, sucrose freely licking task, as well as in a self-stimulation task and a fixed ratio 4 task (FR4) with different motivational value rewards (chocolate pellet and sucrose). In FR4 task a devaluation test and extinction task were also performed. Finally we reevaluated the light sensitivity in freely licking task. We found that –frequency dependent of photostimulation- the activation of glutamatergic terminals to NAc interrupted –in the same form and magnitude- water and sucrose consum. In the self-stimulation task we found that animals were disposed to lick an empty sipper to self-stimulated by laser, showing that the activation of glutamatergic afferents is *per se* rewarding. In FR4 task the photostimulation also affected appetitive behavior as well as lever presses associated with a reward. Furthermore, duration of the effect depended on the motivational value, being lower when the motivational value was higher. The photostimulation maintained a high reward value when these were devaluated. In extinction sessions (where the chocolate pellet and sucrose were absent), we found that the activation of glutamatergic afferents to NAc, helped to subject to keep the motivational value of the rewards, even in absence of them. When we revalued the light sensitive in the sucrose freely licking task, we found that these subjects had higher sensitivity to photoactivation than before FR4 task, suggesting that the activation –through days- triggers processes of neuronal plasticity. In summary, our data suggest that glutamatergic afferents to NAc reinforce the goal directed behavior, increasing the motivational value by rewards, but also participates in habit, being that activation keep the instrumental behavior in the absence of rewards.

INTRODUCCIÓN

A través de la evolución las especies han empleado dos tipos de conductas para la toma de decisiones, una de tipo reflexiva y otra reflectiva. La conducta reflexiva involucra una asociación acción-consecuencia conocida como conducta dirigida a la meta, ésta es sensible al valor motivacional de la recompensa, se dice que es reflexiva ya que permite la re-evaluación de las consecuencias que puede tener una acción y por tanto el animal puede decidir mantener la misma acción o hacer una acción diferente, con base a las esperadas. Ejemplos de la conducta dirigida a la meta que se observan en la naturaleza son el forrajeo, escape de depredadores y la migración, en las cuales la sobrevivencia de las especies depende de su capacidad para re-evaluar las consecuencias y rápidamente tomar una decisión (Smith & Graybiel 2014; Balleine & O'Doherty 2010; Mannella et al. 2013). Mientras que la conducta de tipo reflectiva es una asociación estímulo-respuesta conocida como hábito, que ha sido adquirida a través del sobre-entrenamiento, en el cual la misma acción siempre genera el mismo resultado. Se dice que es reflectiva ya que permite la ejecución de una acción de manera rápida y precisa ante un estímulo (Balleine & Dickinson 1998; Balleine & O'Doherty 2010; Burton et al. 2015; Smith & Graybiel 2014; Dezfouli & Balleine 2012). El hábito (ya sea bueno o malo) es una acción que se ha realizado de forma rutinaria. La facilidad con la que un hábito cambia entre una conducta dirigida a la meta ("romper el hábito"), depende del efecto fisiológico que genera la recompensa en el sujeto y de la duración que este la ha llevado a cabo. Las adicciones y los trastornos obsesivo-compulsivos, son ejemplos de hábitos malos que son difíciles de romper a pesar de que tienen consecuencias negativas y que pueden seriamente afectar a la salud. En estos casos la re-evaluación de las consecuencias no es suficiente para dejar de realizar estas conductas dañinas (Everitt 2014; Belin & Everitt 2008).

La conducta dirigida a la meta y el hábito forman parte del condicionamiento instrumental, el cual se refiere a que la conducta sirve como un instrumento (u operante) para producir una respuesta y obtener una recompensa. El

condicionamiento instrumental fue propuesto inicialmente por Thorndike en 1911 y retomado por Bernard Balleine y Anthony Dickinson en 1998 los cuales lo dividieron en conducta dirigida a la meta y hábito debido a las características propias de cada una (Thorndike & Jelliffe 1912; Balleine & Dickinson 1998), de las cuales se hablará en más detalle a continuación.

CONDUCTA DIRIGIDA A LA META

La conducta dirigida a la meta, como ya se mencionó es una asociación acción-consecuencia, la cual depende de la recompensa obtenida para que se genere la acción y forma parte del condicionamiento instrumental. La conducta dirigida a la meta es adquirida por dos tipos de aprendizaje: el de contingencia y el incentivo. El aprendizaje de contingencia se refiere a la asociación que hace el sujeto entre las acciones y sus probables consecuencias antes de realizar la acción, en tanto que el aprendizaje incentivo se refiere al valor motivacional que adquiere la recompensa o consecuencia de acuerdo a las circunstancias en las que se encuentre el sujeto (e.g., un sujeto privado de alimento trabaja con mayor motivación para obtener un pellet de comida). De esta forma se dice que una conducta instrumental es dirigida a la meta, si es sensible a la contingencia acción-consecuencia y al valor motivacional de la recompensa (Balleine & Dickinson 1998; Balleine & O'Doherty 2010).

EL HÁBITO

Mientras la conducta dirigida a la meta es una asociación acción-consecuencia, el hábito es una asociación estímulo-respuesta, la cual se genera a través del sobre-entrenamiento. Las respuestas tipo hábito tienen la función de garantizar una respuesta rápida y precisa ante estímulos externos que no requieren de muchos recursos cognitivos.

El hábito puede ser explicado por el modelo de la triple contingencia de Thorndike: estímulo-respuesta/reforzador, en la cual el reforzador o recompensa tiene la función de hacer más estrecha la relación entre el estímulo y la respuesta por lo que a cada estímulo le seguirá una subsecuente respuesta y un reforzador. La diferencia

entre el hábito y el modelo de Thorndike es que la respuesta se puede seguir generando aun en ausencia de un reforzador, en especial en hábitos anormales como los trastornos obsesivos-compulsivos (Cougles et al. 2011). En el hábito el sujeto no es sensible a los cambios del valor motivacional de una recompensa, y la presencia o ausencia del reforzador (recompensa) no afecta a la generación de una respuesta posterior a un estímulo. Para experimentalmente poder discernir entre ambas conductas se emplea la prueba de devaluación, la cual consiste en disminuir el valor motivacional de una recompensa (Balleine & Dickinson 1998; Smith & Graybiel 2014).

PRUEBA DE DEVALUACIÓN

Posterior a que el sujeto ha aprendido a realizar un trabajo para obtener una recompensa (p. ej. presionar una palanca para obtener un pellet, Fig. 1A), al sujeto se le entrega la recompensa *ad libitum* en su caja hogar durante una hora, lo cual disminuye el valor de la recompensa (se devalúa a la recompensa), una vez transcurrido este tiempo el sujeto es colocado en una sesión de extinción, es decir, una sesión en la cual el trabajo realizado no es recompensado, durante un lapso de 10 minutos (degradación de la asociación acción-consecuencia, Fig. 1B). Al entregar la recompensa *ad libitum* y colocar al sujeto en una sesión de extinción (en donde no se le entrega ningún reforzador) se disminuye la motivación del sujeto para realizar el trabajo. La cantidad de trabajo (p. ej. palanqueo), realizada en la prueba de devaluación es comparada con una situación control, en la cual el sujeto recibe alimento chow, un alimento familiar para él, durante una hora y posteriormente el sujeto es colocado en la sesión de extinción. En la situación control, conocida como valuada, el sujeto mantiene el valor motivacional de la recompensa, por lo que sí existe mayor cantidad de ensayos en la sesión valuada con respecto a la devaluada, se dice que es una conducta dirigida a la meta, en cambio si no hay diferencia entre una sesión valuada contra una devaluada, entonces se trata de un hábito (Rossi & Yin 2012; Gremel & Costa 2013; Balleine & Dickinson 1998).

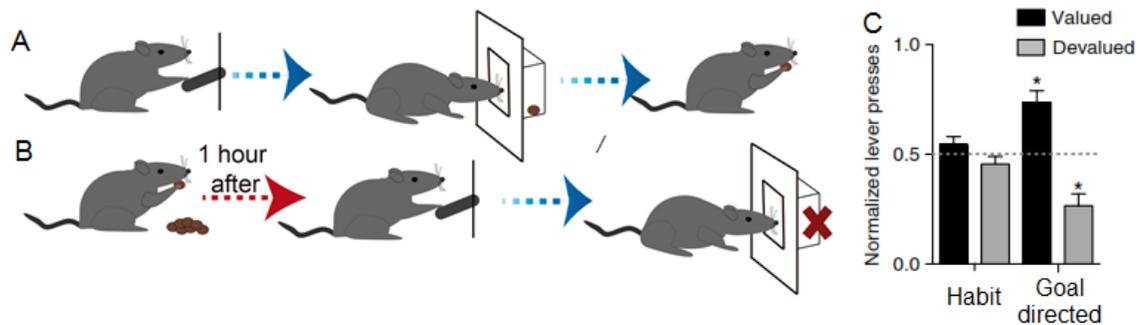


Figura 1. Prueba de devaluación. **A.** Muestra el ejemplo de una tarea en la cual el sujeto ha sido condicionado a presionar una palanca para recibir una recompensa. **B.** Esquema del protocolo de devaluación: Durante una hora el sujeto recibe la recompensa *ad libitum* por la que en condiciones normales realiza el trabajo posteriormente es colocado en una sesión de extinción en la que el trabajo que realiza no es recompensado, esto disminuye la motivación para realizar el trabajo. **C.** Cantidad de palanqueos ejercidos por el sujeto en una sesión valuada (barra negra), contra una devaluada (barra gris); en la sesión valuada el sujeto recibe en su caja hogar comida chow hasta la saciedad, en tanto que la devaluada recibe la recompensa por la cual trabaja (e.g. pellet). Cuando la conducta del sujeto es un hábito no hay diferencias en la cantidad de palanqueos ejercidos en ambas sesiones, pero si es una conducta dirigida a la meta ejerce mayor cantidad de palanqueos en una sesión valuada en comparación a una devaluada. La figura **C** fue modificada de (Gremel & Costa 2013).

CIRCUITO CEREBRAL INVOLUCRADO EN LOS PROCESOS DE LA CONDUCTA DIRIGIDA A LA META Y EL HÁBITO

El circuito cerebral involucrado en la conducta dirigida a la meta y el hábito incluye a estructuras como el estriado (tanto a su región dorsal y en su región ventral), la amígdala basolateral (BLA), el hipocampo ventral (vHipp), la corteza prefrontal (PFC), área tegmental ventral (VTA), entre otras (Mannella et al. 2013)(Fig. 2). La información de distintos sistemas sensoriales es procesada en estas regiones, y esta información es transformada en una respuesta motora que puede (o no) depender del valor motivacional hacia la recompensa (Mannella et al. 2013).

El núcleo accumbens (NAc) se encuentra en la región ventral del estriado y se subdivide en dos regiones: su porción shell y core (Groenewegen et al. 1999). Cerca

del 95% de las neuronas del NAc, son neuronas GABAérgicas espinosas medianas (MSN) (Song et al. 2014; Sesack & Grace 2010). Estas neuronas son de proyección y su actividad se ha relacionado con el valor motivacional de una recompensa, observándose mayor actividad de las MSN en la elección y consumo de recompensas con mayor valor motivacional con respecto a las de menor valor (Burton et al. 2015). Debido a los inputs que recibe el NAc en su mayoría de regiones del sistema límbico (en especial del VTA, PFC, vHipp y BLA) los cuales se encuentran involucrados en procesos motivacionales y a que las neuronas del NAc proyectan a estructuras motoras, se ha propuesto que el NAc sirve como una interfaz entre el sistema límbico y el sistema motor (Mogenson et al. 1980), de esta manera esta región se encarga de la selección y del vigor asignado a las acciones guiadas por una recompensa (Wang et al. 2014; Salgado & Kaplitt 2015; Mogenson et al. 1980; Belin & Everitt 2008).

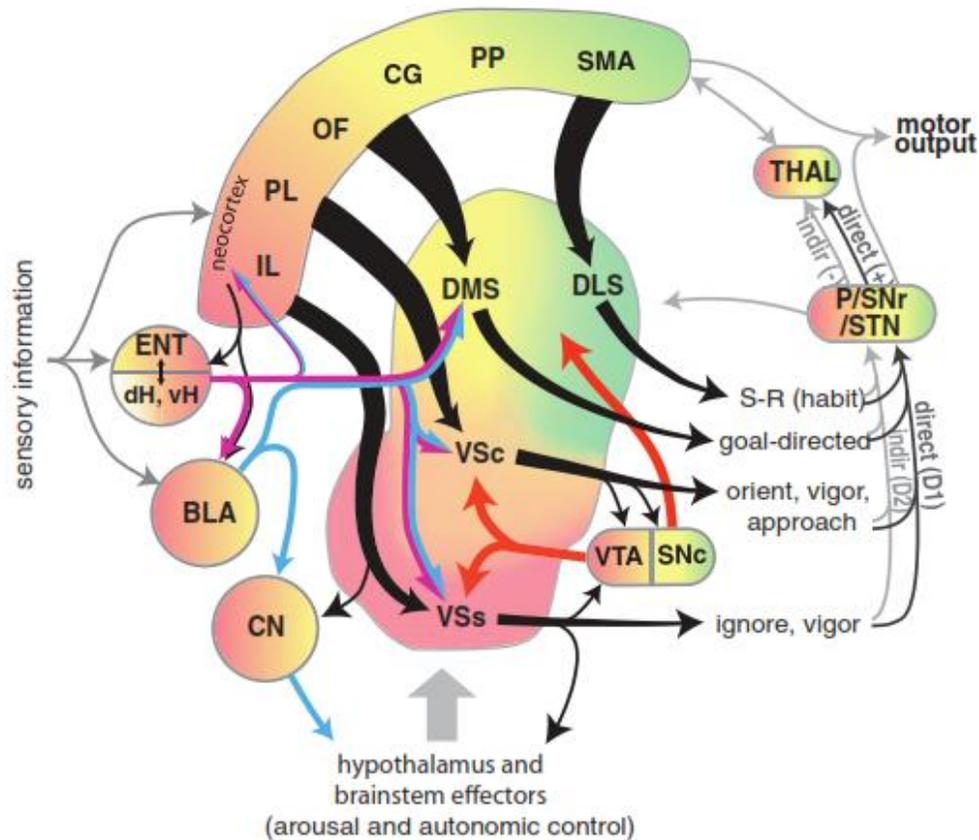


Figura 2. Circuito cerebral encargado de la conducta dirigida a la meta y el hábito. El circuito cerebral mostrado indica las regiones cerebrales encargadas de codificar información sensorial de entrada para posteriormente generar una respuesta motora en base al contexto. La conducta generada puede ser conducta dirigida a la meta por parte de DMS o hábito por parte de DLS, en tanto el NAc asigna el vigor a la conducta, así como la selección de la meta, la orientación y la aproximación. Las abreviaturas son DLS, estriado dorsolateral; DMS, estriado dorsomedial; VSc, región core del núcleo accumbens en el estriado ventral; VSs, región Shell del núcleo accumbens en estriado ventral; VTA, área tegmental ventral; SNc, substancia nigra pars compacta; SNr, substancia nigra pars reticulata; P, pálido; STN, núcleo subtalámico; dH, hipocampo dorsal; ENT, corteza entorhinal; BLA, amígdala basolateral; CN, núcleo central de la amígdala; regiones de la neocórtex: IL, infralímbica; PL, prelímbica; OF, orbitofrontal; CG, cingulata; PP, parietal; SMA, área suplementaria motora. Imagen tomada de (Gruber & McDonald 2012)

La actividad de las proyecciones de tipo glutamatérgicas que recibe el NAc (principalmente de regiones como el BLA, vHipp y PFC), han sido relacionadas a la conducta dirigida a la meta ya que se encuentran involucradas en la asignación del valor motivacional (vigor) y la predicción de una recompensa (Fig. 3A) (Mannella et al. 2013). La otra fuente principal de neuromodulación del NAc proviene de la dopamina producida en las neuronas dopaminérgicas del VTA las cuales proyectan al NAc, esta proyección dopaminérgica se encuentra involucrada en la facilitación de la transición de una conducta dirigida a la meta hacia un hábito, no obstante aún no es claro el papel que juegan estas proyecciones en ambas conductas (Mannella et al.

2013; Belin & Everitt 2008; Robbins et al. 1989; Tye 2012; Britt et al. 2012; Asher & Lodge 2012). Una hipótesis es que el NAc participa en ambas conductas regulando la actividad de diversas estructuras en forma de espiral, de forma que cuando el NAc en su región shell es activado, este regula la actividad del VTA. El VTA por su parte proyecta al NAc shell pero también al NAc en su región core. El NAc core regula la actividad de la sustancia nigra pars compacta (SNc), las neuronas de la SNc proyectan hacia el estriado dorsal (Fig. 3B), tanto a la región dorsomedial del estriado (DMS), relacionada a la conducta dirigida a la meta, así como a la región dorsolateral del estriado (DLS) cuya actividad se encuentra relacionada al hábito (Fig. 3C; (Burton et al. 2015; Belin & Everitt 2008; Balleine & O'Doherty 2010; Stalnaker et al. 2010).

Como se acaba de mencionar, el NAc juega un papel importante en la codificación de ambas conductas y la activación de las proyecciones glutamatérgicas aumentan el valor motivacional de una recompensa (Britt et al. 2012; Tye 2012). Por otra parte se ha determinado que la activación de los receptores de dopamina tipo D1, induce la fosforilación de los receptores NMDA localizados en las neuronas espinosas medianas del NAc, por consiguiente un aumento de CaMK II, ERK 1/2 y CREB en ratas privadas (Haberny & Carr 2005). El aumento de CREB induce el incremento de la expresión de receptores tipo NMDA y de los efectos provocados por la activación de estos receptores (Huang et al. 2008), sugiriendo que los efectos de la dopamina y el glutamato pudieran trabajar en conjunto para activar a las neuronas del NAc, sugiriendo que la recompensa podría no solo depender de la dopamina sino también del glutamato (Tecuapetla et al. 2010).

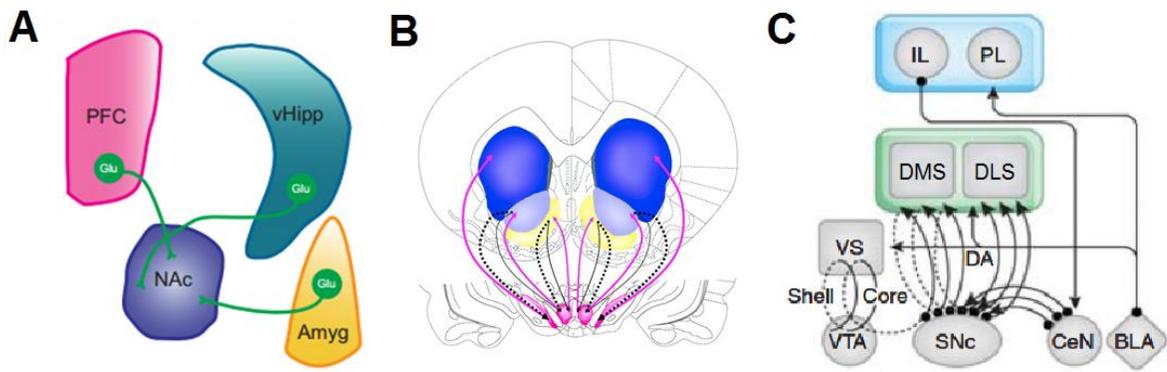


Figura 3. Regulación en espiral del NAc. **A.** Regiones cerebrales que proyectan aferencias de tipo glutamatérgicas al NAc. **B.** Modelo espiral que involucra proyecciones dopaminérgicas (flechas rosas) y GABAérgicas (flechas negras), inicia en el NAc (color amarillo) el cual proyecta a VTA (rosa), VTA proyecta a NAcc (azul claro), NAcc proyecta a SNc (rosa), SNc proyecta a estriado dorsal (Azul rey). **C.** representación del modelo de espiral involucrando a las proyecciones que son generadas por corteza (región superior), la cual proyecta a diferentes regiones que participan en la codificación de la conducta dirigida a la meta y el hábito en este caso el CeN, se muestra proyecciones a DMS y DLS involucrado también en ambas conductas. Las abreviaturas son: VS, estriado dorsal; VTA, área tegmental ventral; SNc, sustancia nigra pars compacta; DMS, estriado dorsomedial; DLS, estriado dorsolateral; CeN, núcleo central de la amígdala; BLA, amígdala basolateral; IL, corteza infralímbica; PL, corteza prelímbica; DA, dopamina. Imágenes modificadas de **A** (Tye 2012); **B** (Belin & Everitt 2008); **C** (Balleine & O'Doherty 2010).

ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES GLUTAMATÉRGICAS AL NAc MEDIANTE OPTOGENÉTICA

En el estudio de las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc se han empleado principalmente la administración de fármacos o de técnicas de lesión de alguna de las regiones o su estimulación eléctrica (Kelley & Swanson 1997; Schneider & Koch 2005; McCracken & Grace 2013), sin embargo cualquiera de estos tres métodos presentan desventajas en la temporalidad (en el caso de los tratamientos farmacológicos o de lesión) y la selectividad (en el caso de la estimulación eléctrica). El método con mayor eficacia para el estudio de la actividad neuronal es la optogenética, en el cual se modifican genéticamente las neuronas para que estas generen potenciales de acción empleando pulsos de luz. Se han diseñado diferentes constructos para poder expresar opsinas sensibles a la luz en neuronas de mamíferos; la opsina más empleada es el canal de rodopsina 2 (ChR2). Este canal se abre ante la estimulación con luz a una longitud de onda de 473 nm

permitiendo la entrada de cationes (incluyendo el Na⁺) al interior de la célula, únicamente durante el lapso de tiempo que dura encendida la luz. El ChR2 es un canal catiónico proveniente del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, la expresión del ChR2 a nivel neuronal se da por medio del diseño de un vector que contenga la información genética para expresar el ChR2, este vector es introducido en el ovocito para generar un animal transgénico o a través de la inyección de un adenovirus directamente en la región cerebral que se quiere investigar (Arenkiel et al. 2007; Tye & Deisseroth 2012). Una vez expresado el ChR2 a nivel membranal, es activado por medio de fotones, lo cual permite su apertura, entrada de cationes y la despolarización de la neurona (Fig. 4A). El vector que contiene la información del ChR2 se encuentra unido a un promotor específico (p.ej. α CAMKII, Vgat, Vglut2 etc.) lo cual permite la selectividad de la expresión en neuronas que presenten dicho promotor, de esta manera la activación de las neuronas sólo se da en las que expresan el canal (Fig. 4B; Boyden et al. 2005; Arenkiel et al. 2007). En cuanto a la temporalidad, el canal permanece abierto durante el lapso de tiempo que dura la luz y el tiempo en que comienza a disparar potenciales de acción la neurona es en escala de milisegundos. La despolarización de las neuronas mediante la fotoestimulación (estimulación con luz), induce la liberación de neurotransmisores para que de esta manera se active un circuito cerebral completo (Fig. 4C; Boyden et al. 2005).

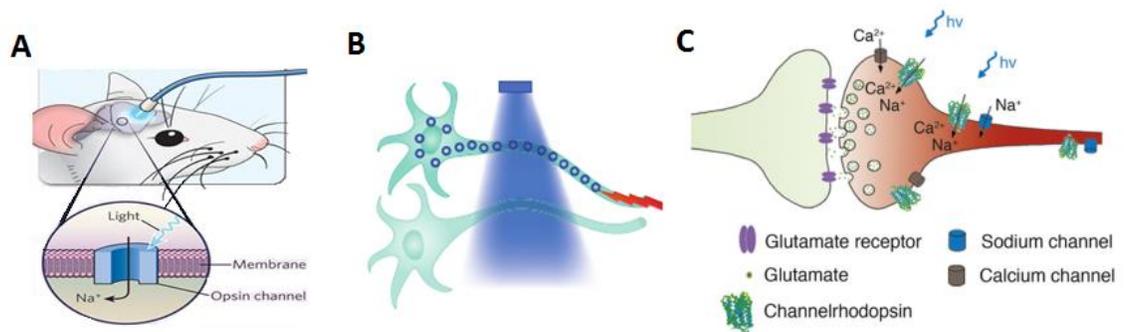


Figura 4. Activación del circuito neuronal empleando optogenética. **A.** Esquema de ratón con una fibra óptica implantada en el cerebro, dicha fibra permite la llegada de un haz de luz en la región donde fue implantada, induciendo la activación del canal de rodopsina (ChR2), el cual es un canal catiónico sensible a la luz, dicha activación permite la entrada de iones y la generación de un potencial de acción. **B.** La ventaja de este método es su selectividad, por lo cual sólo se activan por luz las neuronas que expresen el canal ChR2. **C.** Se puede inducir la liberación de neurotransmisores por medio de la activación de las neuronas que expresan el ChR2 y por lo tanto el cambio temporal de la actividad del circuito neuronal. Las imágenes de los paneles **A** y **B** fueron tomadas de (<http://optogenetics.weebly.com>); y **C** de (Fiala et al. 2010).

Por medio de la optogenética se han estudiado a las proyecciones glutamatergicas del NAc, por ejemplo Britt et. al., 2012 inyectó un adenovirus en distintas regiones de vHipp, BLA y PFC para expresar el ChR2, selectivamente en las neuronas glutamatergicas (usando el promotor CAMKII; Fig. 5A) Se identificó que el vHipp aporta la mayor cantidad de proyecciones glutamatergicas al NAc Shell, con respecto al NAc Core, que cualquiera de las otras regiones estudiadas (Fig. 5B). Posteriormente fotoestimularon a las terminales que proyectan al NAc a través de una fibra óptica y un láser color azul para medir sus efectos conductuales.

En ese mismo estudio también se encontró que la activación de las aferencias glutamatergicas del vHipp hacia el NAc pueden reforzar la conducta instrumental, ya que en una sesión de auto-estimulación (es decir, en un lazo-cerrado en donde el animal tiene el control del encendido del láser), el sujeto cada vez que asomaba la nariz en un puerto (nose-poke) activaba estas proyecciones con un tren de fotoestimulación de 30 pulsos a 20 Hz, realizando más nose-poke si estos

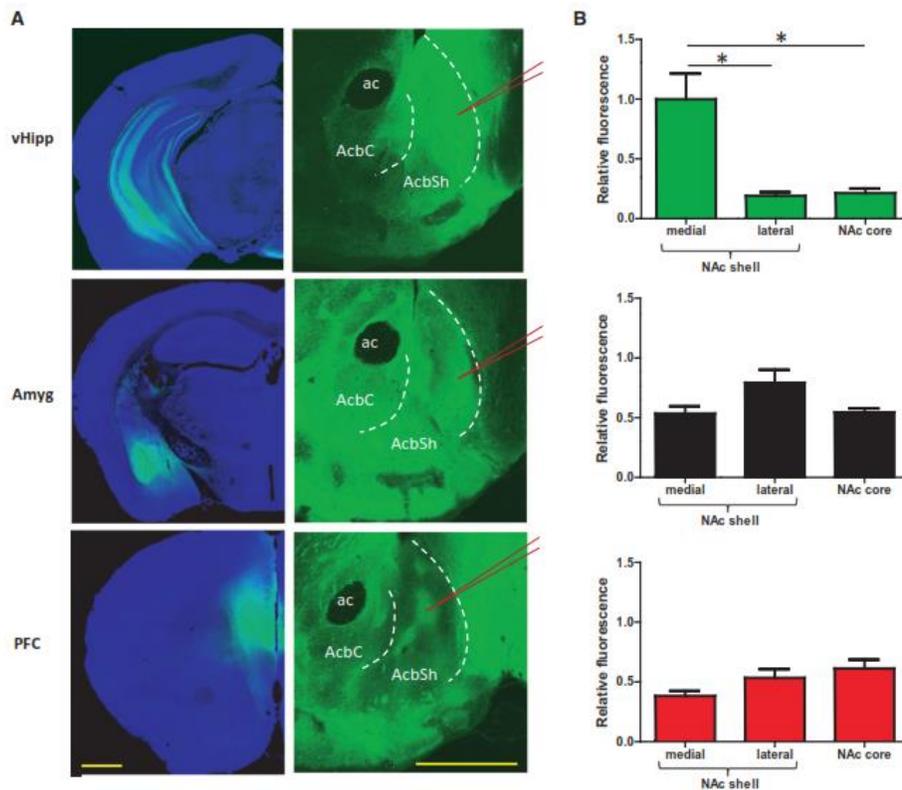


Figura 5. Proyecciones glutamatérgicas al NAc. **A.** Muestra la expresión de EYFP (verde) después de la inyección del adenovirus con ChR2 en las diferentes regiones cerebrales que mandan sus proyecciones glutamatérgicas al NAc. Izquierdo: imágenes de hipocampo ventral (vHipp), amígdala basolateral (amyg) y corteza prefrontal (PFC) donde fue inyectado el virus. Derecho: expresión de aferentes al NAc. **B.** Promedio de fluorescencia de cada región del NAc. Imagen tomada de (Britt et al. 2012)

entregaban el tren de estimulación (Fig. 6A), en comparación con sujetos que no expresaban el ChR2 (vector vacío) o con los sujetos que expresaron el ChR2 y no fueron estimulados (Fig. 6B). Además concluyen que el glutamato (sin importar la fuente de donde provenga) tiene la función de reforzar la conducta instrumental, ya que el experimento de auto-estimulación lo realizó también con la expresión del ChR2 en PFC y en BLA obteniendo resultados similares a los encontrados con el vHipp (Fig. 6C). Por lo que concluyen que tiene más importancia la cantidad de

glutamato liberada en el NAc, que la fuente de donde proviene para reforzar la conducta instrumental (Britt et al. 2012; Tye 2012)

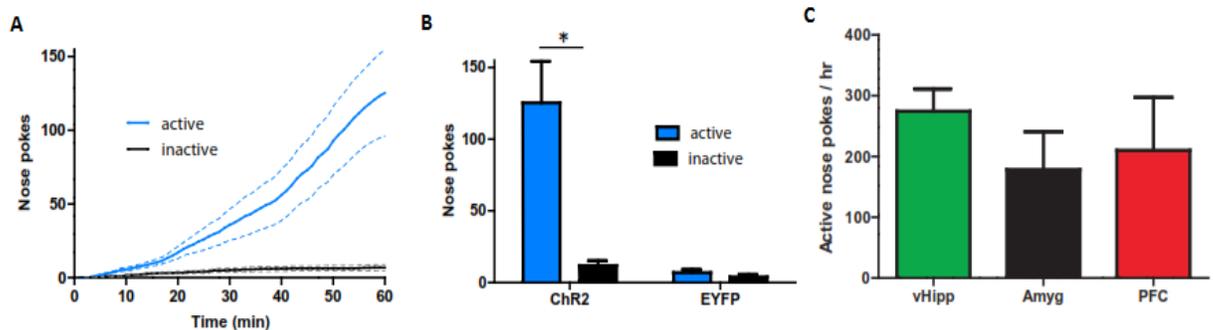


Figura 6. Auto-estimulación de aferencias glutamatergicas al NAc. **A.** Cantidad de nose pokes (asomar la nariz en un puerto), a través de la hora que dura la sesión en ratones auto-estimulados en proyecciones por del vHipp a NAc. **B.** Nose pokes realizado por ratones auto-estimulados en aferencias de vHipp que proyectan al NAc con el canal de rodopsina vs vector vacío. **C.** Nose pokes por sesión en las diferentes regiones que proyectan aferencias glutamatergicas al NAc. Imagen modificada de (Britt et al. 2012)

ESTUDIO MEDIANTE OPTOGENETICA DE LA PARTICIPACION DEL NAc Shell EN EL CONSUMO DE SACAROSA

Por otra parte en un trabajo realizado por Taha et. al. 2005, se encontró que algunas neuronas del NAc están relacionadas al consumo de sacarosa, por una parte una población se activaba durante el consumo y su frecuencia de disparo incrementaba conforme lo hacía la concentración de sacarosa; Taha et. al. propuso que estas neuronas codificaban la palatabilidad de una recompensa. Por otra parte una segunda población se inhibía durante el consumo, y no eran afectadas por los cambios en la concentración de sacarosa e incluso se mantenían inhibidas durante los lengüeteos en seco, en donde la sacarosa dejaba de liberarse, por lo que propusieron que este tipo de neuronas (inactivadas) se encontraban asociadas al inicio y mantenimiento del acto consumatorio (e.g., el lengüeteo)(Taha & Fields 2005). En un trabajo posterior, Krause en el 2010 estimuló eléctricamente al NAc shell, con la hipótesis de que si la segunda población de neuronas encontradas por Taha et. al. 2005 tenían que mantenerse inhibidas para permitir el acto consumatorio, entonces su activación tendría que interrumpir el consumo de

sacarosa. Ellos encontraron que la estimulación eléctrica del NAc shell inhibió transitoriamente el consumo de sacarosa, corroborando de forma indirecta que es necesario que las neuronas del NAc se mantengan inhibidas para permitir el acto consumatorio (Krause et al. 2010)

Partiendo de los trabajos de Krause y Taha, en nuestro laboratorio hemos utilizado al ratón transgénico Thy1-ChR2/EYFP, el cual es un modelo que expresa el ChR2 generalmente en neuronas glutamatérgicas (Ting & Feng 2013) por lo que se puede estudiar el efecto de la activación de las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc sobre el consumo de sacarosa. El promotor Thy1 es un promotor que se encuentra en diferentes regiones del sistema nervioso central (Fig. 7A), esto ayuda a una mejor expresión del ChR2 (Morris 1985).

Usando patch-clamp en su configuración whole cell, para medir el cambio de voltaje a corriente constante, en rebanadas de cerebro del ratón Thy1-ChR2 se ha demostrado que se puede activar a las MSN del NAc empleando tanto la estimulación eléctrica, como la fotoestimulación con pulsos de luz azul (Fig. 7B y Fig. 7C). La activación optogenética de las neuronas MSN del NAc es atenuada por la presencia de antagonistas a los receptores de glutamato NMDA y AMPA (AP-5 y CNQX, respectivamente), lo cual demuestra que esta activación se debe a la expresión del ChR2 en las aferencias del tipo glutamatérgicas que proyectan al NAc (Prado et al, datos no publicados).

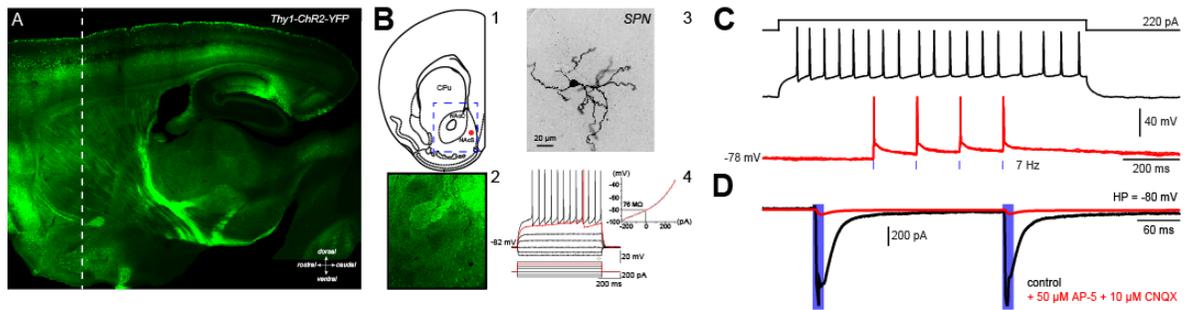


Figura 7. Expresión y funcionalidad del ChR2 en neuronas MSN del ratón Thy1-ChR2/EYFP. A. Corte sagital, donde se muestra la fluorescencia del gen reportero EYFP acoplado al canal ChR2. B. Registro electrofisiológico en neuronas espinosas de proyección (MSN); B1: esquema de corte coronal, la línea discontinua indica el lugar aproximado donde se realizó el registro electrofisiológico in vitro. B2. Imagen que muestra la alta densidad de fibras en el NAc. B3. Fotomicrografía de una neurona SPN donde se realizó el registro. B4. Esquema que muestra la respuesta en voltaje de las neuronas registradas, a las cuales se les inyectó corriente despolarizante y repolarizante, en rojo se muestra la latencia de aparición del potencial de acción. C. Medición de voltaje por patch-clamp en su configuración whole cell a corriente fija de 220pA en negro y en rojo con fotoestimulación sin inyección de corriente, en azul se muestra la aplicación de un pulso de luz (7Hz, 20ms) que provoca una fuerte despolarización. D. En negro se muestran las corrientes de entrada, a voltaje constante, cuando se da un pulso de luz (en azul), en las neuronas SPN, misma respuesta que es atenuada (en rojo), al administrar antagonistas a receptores de glutamato (CNQX para AMPA y AP-5 para NMDA). (Prado et al, datos no publicados)

Además se ha demostrado que la activación de estas terminales en el ratón Thy1-ChR2 interrumpe transitoriamente el consumo de sacarosa (10%) en ratones privados de agua por 23 h (Fig. 8A-C), tal como ocurre en el trabajo realizado por Krause con la estimulación eléctrica (Krause et al. 2010). Este efecto es directamente proporcional a la frecuencia de la estimulación (Fig. 8D) y se mantiene varios segundos posteriores a la terminación de la fotoestimulación (efecto post-estimulación; Fig. 8E-F), indicando que las aferencias glutamatérgicas al NAc juegan un papel importante en el consumo de una recompensa líquida (Prado et al, datos no publicados)

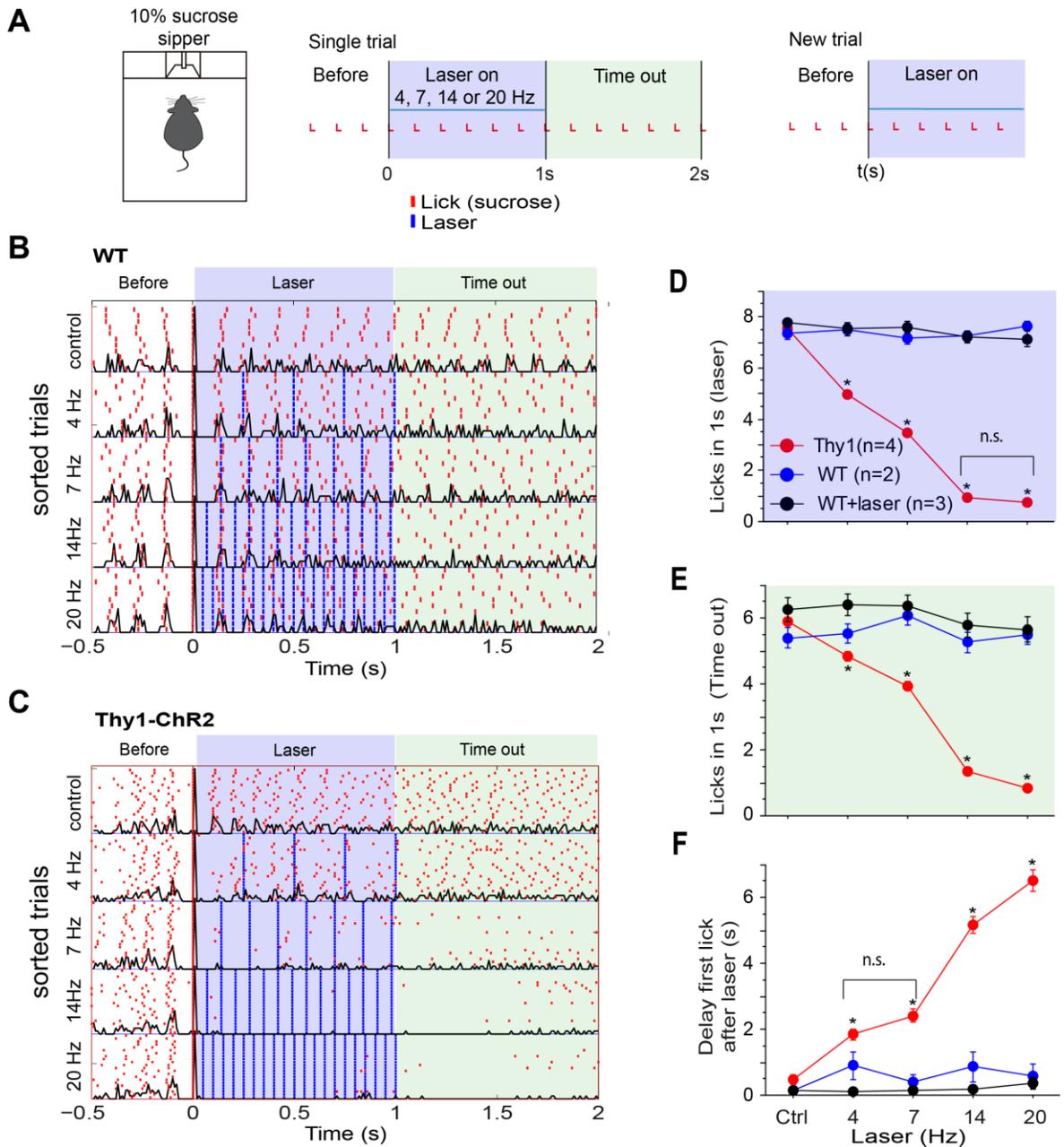


Figura 8. Tarea de consumo libre: la fotoestimulación de las aferencias glutamatergicas al NAC interrumpe transitoriamente el consumo de sacarosa. **A.** Protocolo conductual. Izquierdo: el ratón bebía sacarosa libremente; Derecho: cada cuatro lengüeteos iniciaban un tren de estimulación a diferentes frecuencias control, 4, 7, 14 o 20 Hz, durante una ventana de un 1 segundo, posteriormente le seguía un tiempo fuera de 1 segundo adicional. Los siguientes cuatro lengüeteos rítmicos (intervalo entre lengüeteos < 200ms) inician un nuevo ensayo. **B y C.** Muestra una gráfica tipo raster, en la cual se indican los lengüeteos ejercidos por el sujeto a las diferentes frecuencias de estimulación. Las marcas rojas indican cada lengüeteo y las azules los pulsos de láser. **D.** Efecto en el lengüeteo durante la estimulación a las diferentes frecuencias. **E y F.** Efecto posterior a la estimulación, nótese que el efecto es mayor dependiendo de la frecuencia del láser. (Prado et al, Datos no publicados)

En resumen, basado en todas estas evidencias concluimos lo siguiente:

1. El trabajo de Taha et. al. propone que un grupo de neuronas del NAc se encuentra relacionado a la codificación del valor hedónico de una recompensa, de esta manera el NAc podría tener una relación muy estrecha con la generación de la conducta dirigida a la meta (Taha & Fields 2005).
2. Basado en los resultados del trabajo de Britt et. al. 2012 se desprende que la foto-activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc refuerza la conducta instrumental, aun en ausencia de recompensa, lo que puede estar relacionado a la formación de un hábito (Britt et al. 2012)
3. Los datos de nuestro laboratorio indican que la fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas al NAc interrumpen el acto consumatorio, indicando que el NAc shell también puede estar relacionada a la interrupción de conductas tipo hábito (acto motor reflejo; Prado et al, datos no publicados).

Por lo que es posible proponer que las aferencias glutamatérgicas se encuentren involucradas en la selección y codificación de la conducta dirigida a la meta y del hábito

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que se conoce que el NAc shell se encuentra implicado en la codificación del valor motivacional de una recompensa (Kelley et al. 2005) y que la activación de las aferencias glutamatérgicas podría reforzar la conducta instrumental (Britt et al. 2012), mientras que datos de nuestro laboratorio indican que la activación de las aferencias glutamatérgicas interrumpen de manera transitoria el consumo de sacarosa, lo cual puede estar relacionado al hábito (Prado et al, datos no publicados), se pretende estudiar la influencia de la activación de dichas aferencias en la generación de una conducta dirigida y en la formación del hábito.

HIPÓTESIS

La activación optogenética de las aferencias glutamatérgicas del núcleo accumbens puede interrumpir el acto consumatorio (lengüetear por sacarosa, hábito), además de afectar la secuencia de acciones para obtener una recompensa (conducta dirigida a la meta y aproximación), por lo que el NAc podría estar involucrado en ambas conductas.

OBJETIVOS

General:

Determinar si la activación optogenética de las aferencias glutamatérgicas del NAc afecta a la conducta dirigida a la meta y a la formación del hábito.

Específicos:

- 1.- Diseñar una tarea en la cual el sujeto lleve una secuencia de acciones para obtener una recompensa en la que se pueda estudiar a la conducta dirigida a la meta y el hábito.
- 2.- Determinar si la activación de las aferencias glutamatérgicas tiene un efecto diferencial en el consumo de una sustancia líquida (sacarosa al 10%) o de un alimento sólido (pellets de chocolate [20 mg]).

3.- Comparar el efecto de la estimulación durante el consumo de recompensas con diferente valor motivacional.

METODOLOGÍA

Animales de experimentación

Se emplearon ratones transgénicos de la cepa C57BL/6J (n=4) y ratones transgénicos Thy1-ChR2 (n=6), con un peso de 20 a 25 g al momento de la cirugía. Los ratones fueron restringidos de agua, los primeros 14 días (23h) y las sesiones posteriores se restringieron de agua y alimento (20 h).

Materiales

Para las primeras 14 sesiones (cada sesión tuvo una duración de 30 min), el entrenamiento conductual se llevó a cabo en una caja con bebedero libre, la cual era una caja de acrílico de 40x36 cm que contaba con un puerto con bebedero y un sensor infrarrojo (photobeam) como contador de lengüeteos construida en el laboratorio. En las primeras 7 sesiones se entregó como recompensa agua y en las sesiones 8 a 14 se entregó sacarosa (10%).

Para las sesiones 15 a 48 y 51 a 56 (una sesión diaria de 40 min), el entrenamiento se realizó en una cámara operante para ratón de la marca Med Associates, con dos palancas retractiles colocadas en paredes opuestas, dos focos que se encienden como indicadores de entrega de recompensa, un foco para la iluminación general de la caja, un puerto dispensador de pellets con un sensor photobeam, donde se entregó un pellet de chocolate (20 mg) de Bio-Serve, un puerto dispensador de sacarosa con photobeam, donde se entregó 4 gotas obligatorias + 2 segundos de libre consumo de sacarosa al 10% (5µL/gota) en cada ensayo.

En las sesiones 49 a 50 los sujetos realizaron la tarea nuevamente en la caja de bebedero libre que se usó en las primeras 14 sesiones.

Cirugía

Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de Ketamina/Xilacina (100/8mg por kg de ratón), posteriormente la cabeza del sujeto fue afeitada y montada en un estereotáxico. Se le administró subcutáneamente 0.001 ml de lidocaína en el pericráneo, seguido de lubricante para proteger los ojos (Trióptico compuesto), se realizó una incisión en el cráneo, se limpió el cráneo con peróxido de hidrogeno y se removió el periosteo. Se localizó Bregma y Lamba para nivelar el plano horizontal del cráneo. Posteriormente se localizaron las coordenadas para el NAc shell [AP +1.2, ML +1, DV-5.2mm], a partir de medir Bregma y se realizó el trepano unilateral, a través del cual se descendió una fibra óptica de 200µm de diámetro. Con una apertura numérica de 0.39. Esta fibra fue fijada con resina fotocurable Futurabond® y asegurada con dos tornillos al cráneo, posteriormente se selló con resina dental. Luego de la cirugía los sujetos recibieron antibiótico (Baytril®) vía intraperitoneal durante tres días y se dejaron recuperar por una semana.

Parámetros de la fotoestimulación

Cada tren de foto-estimulación fue entregado a los sujetos en las diferentes tareas conductuales a una potencia de 15mW, lo cual generó una irradiación de 119.32mW/mm² en la punta de la fibra, de acuerdo a su apertura numérica (0.39) y de su diámetro (200µm). Los trenes de estimulación estuvieron compuestos por pulsos de láser de 30 ms de una longitud de onda de 473 nm, estos fueron a las frecuencias de 4, 7, 14 y 20Hz para las primeras 14 sesiones y solo de 20Hz para las sesiones subsecuentes con una duración de 1 s por ensayo.

Paradigma conductual

Los sujetos fueron privados de agua por 23 horas, antes de comenzar la tarea, posteriormente se les colocó en la caja con bebedero libre, donde tuvieron acceso libre a agua por 30 min durante tres sesiones (una sesión por día). En las sesiones 4 a 7, los sujetos recibieron estimulación optogenética (fotoestimulación), durante el consumo de agua (Fig. 9A).

Durante cada ensayo compuesto por cuatro lengüeteos rítmicos (con un intervalo entre lengüeteo $<$ a 200 ms), se iniciaba un tren de estimulación de forma aleatoria (Control, 4Hz, 7Hz, 14Hz y 20 Hz) por un segundo. Posterior a la estimulación se dio un segundo de tiempo fuera como se muestra en la Figura 9B. A partir de la sesión 8, la recompensa de agua fue reemplazada por sacarosa (10%) y se les permitió a los sujetos consumir sacarosa libremente, pero sin estimulación hasta la sesión 10. En las sesiones 11 a 14 se comenzó a fotoestimar bajo las mismas condiciones que en las sesiones 4 a 7. (Fig. 9).

Al término del día 14 los sujetos fueron privados de agua y alimento durante 20 h y en las sesiones 15 a 20 fueron entrenados para realizar una tarea de razón fija 1 (RF1), la cual se llevó a cabo en una cámara conductual de Med Associates. Al comienzo de cada ensayo de dicha tarea, la luz de la cámara conductual se encendía y una de dos palancas era expuesta, cuando el sujeto presionaba la palanca, ésta era inmediatamente retraída y un foco -colocado arriba del dispensador correspondiente- se encendía para indicarle al sujeto que tenía una recompensa disponible, dicha recompensa podía ser un pellet de chocolate o cuatro gotas de sacarosa + 2 s de libre consumo de sacarosa (10%). El ensayo finalizaba cuando el sujeto consumía su recompensa y la luz de la cámara conductual se apagaba (Fig. 9C).

Un nuevo ensayo iniciaba dos segundos después, encendiendo de nuevo la luz de la cámara conductual y exponiendo una palanca diferente a la del ensayo anterior (Fig. 9C). En la tarea se alternaba entre recompensas (un ensayo para cada tipo de

recompensa), realizándose una sesión por día, con una duración de 40 min, hasta que se completará mínimo 10 ensayos (esto tomo aproximadamente 6 sesiones). Cuando el sujeto aprendía esta relación palanca-recompensa, se cambió la tarea a RF4, esto es, la recompensa fue entregada por cada cuatro palanqueos que ejercía el ratón, durante 5 sesiones (1 sesión por día con una duración de 40 minutos). En las siguientes 12 sesiones (sesión 26 a 37) se continuó entrenando al sujeto en la tarea de RF4, pero con la fotoestimulación en diferentes periodos de la tarea: durante el primer palanqueo, en la aproximación al puerto de recompensa y durante el consumo (Fig. 9A y 9D). La fotoestimulación se dio en uno de los periodos de forma aleatoria por ensayo, con una frecuencia de 20 Hz y una duración de 1 s.

En las sesiones 38 a 40 se procedió a realizar la prueba de devaluación, en la cual al sujeto tuvo acceso libre a sólo una de las dos recompensas (ya sea de pellet sabor chocolate o sacarosa líquida) junto a comida chow + agua, o en el caso del día control sólo a comida chow + agua (estado valuado) en su caja hogar, durante una hora (Fig. 1B). Transcurrido este tiempo se colocó al sujeto en una sesión de extinción de 10 min, esto es, la tarea de RF4 con estimulación en los tres periodos de forma aleatoria, pero sin entrega de ninguna recompensa. Las pruebas de devaluación se llevaron a cabo en tres días continuos (1 sesión y una recompensa devaluada por día).

Posterior a la devaluación los sujetos fueron condicionados a la readquisición de la tarea durante la sesión 41 a 43; esto como control para las siguientes 5 sesiones (sesión 44 a 48), las cuales fueron de extinción con una duración de 40 min y con estimulación de manera aleatoria en los mismos periodos que en una sesión normal (Fig. 9D), pero sin entrega de recompensa.

En las sesiones 49 a 50 los sujetos se colocaron en la misma cámara conductual donde realizó las primeras 14 sesiones, en la cual realizó la misma tarea de libre consumo de sacarosa (Fig. 9B), esto para determinar si hubo un cambio en la intensidad del efecto observado en las primeras 14 sesiones.

En las sesiones 51 a 53 el sujeto fue colocado en la cámara conductual de Med Associates para readquirir la tarea de RF4 -en la cual recibió pellets de chocolate y sacarosa 10% como recompensas. Finalmente y posterior a estas sesiones, la recompensa de sacarosa fue cambiada por agua en las sesiones 54 a 56 y fue estimulado de forma aleatoria bajo los mismos periodos que en una sesión normal de RF4 (Fig. 9D).

Experimento de autoestimulación

Un nuevo grupo de ratones (n=6) ingenuos, fueron colocados en la caja de bebedero libre, en donde se llevó a cabo el paradigma conductual idéntico al usado en la tarea de consumo libre, pero en esta ocasión se utilizó un bebedero vacío, en el cual cada cuatro lengüeteos desencadenaban un tren de estimulación a las diferentes frecuencias (Fig. 9E) durante 7 sesiones; posterior a estas se realizó la tarea pero con sacarosa (sesiones 8 a 10).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A menos que se mencione algo diferente, los datos mostrados representan la media \pm error estándar (SEM). Los datos fueron analizados en MATLAB R2012a, Excel 2013 y Stat View versión 4.57. Para el análisis estadístico se realizaron t de student, ANOVA de medidas repetidas, ANOVA de dos vías con prueba de pos hoc de Fischer y para el análisis de datos no paramétricos se empleó la prueba de Wilcoxon, Kolmogorov-Smirnov y Kruskal Wallis. $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

En las sesiones de libre consumo se calculó el M50 como una medida de sensibilidad, en la cual se tomó en cuenta las medianas de los lengüeteos ejercidos por los sujetos en cada frecuencia de estimulación y posteriormente en base a la mitad de los lengüeteos ejercidos en la condición control, se extrapola la frecuencia necesaria para producir el 50% del efecto inducido por la fotoestimulación. En el experimento de RF4, se calculó el tiempo que tardó el sujeto en ejecutar los palanqueos en los ensayos en los cuales se encontraba más motivado, colocando

como límite de tiempo el valor en el cual se incluyeran mínimo el 75% de todos los datos (tercer cuartil, Q3), asimismo también se calculó el tiempo de los palanqueos ejercidos incluyendo los ensayos en los cuales el sujeto se encontró menos motivado tomando como límite de tiempo el valor en el cual se asegurará que todos los datos incluyeran el valor del rango inter-cuartil (IQR), 1.5 veces mayor al tercer cuartil ($Q3+1.5(IQR)$), de esta manera se incluyeron más del 75% de los datos y se omitieron los valores atípicos, en los cuales el sujeto probablemente no se encontraba enganchado en el ensayo.

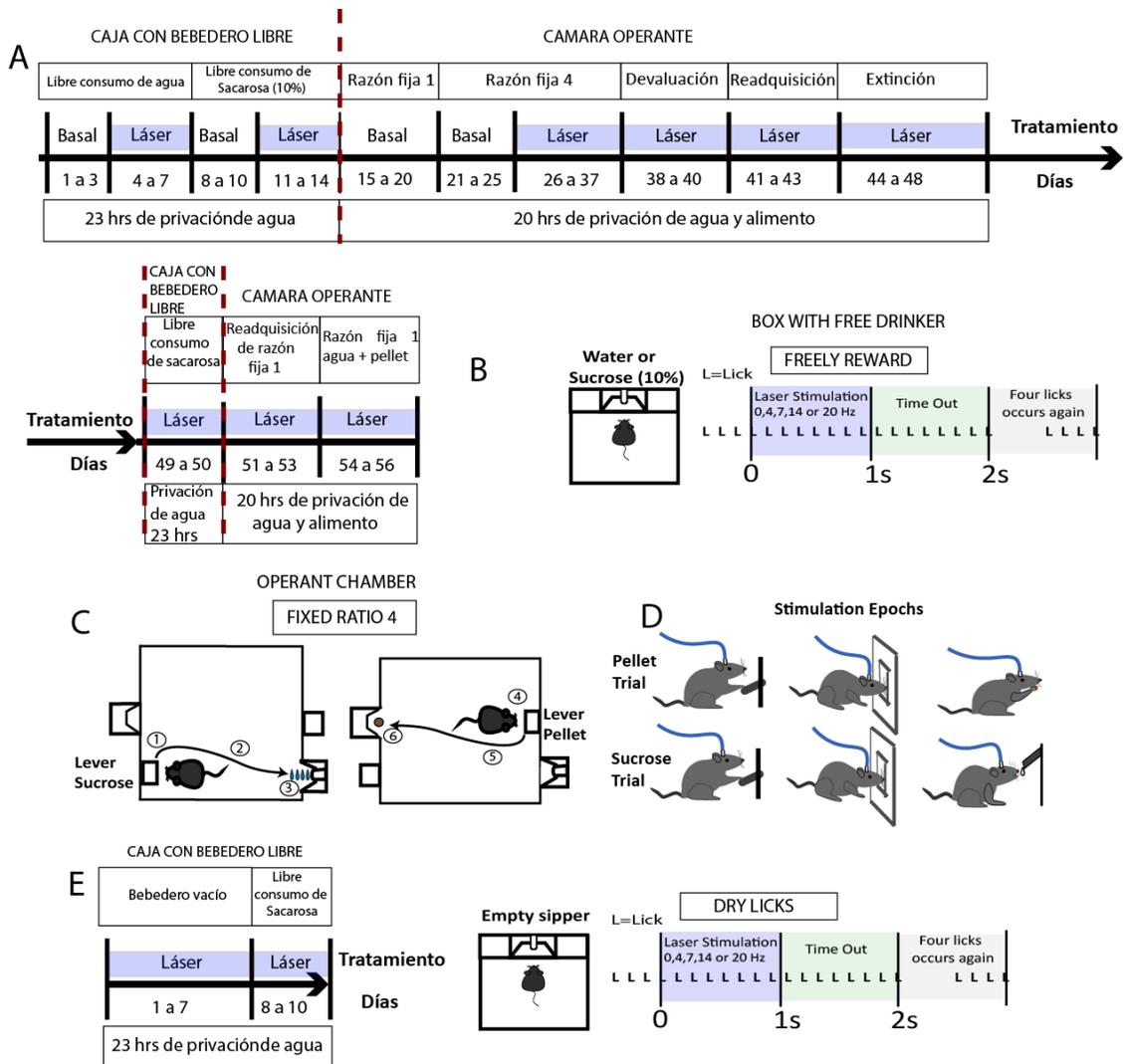


Figura 9. Protocolo conductual. **A.** Indica las sesiones en que realizó cada tarea el sujeto a través del tiempo y en cuales de ellas fue estimulado, además del tipo de privación que recibió antes de cada tarea, la línea roja discontinua indica el cambio de cámara conductual. **B.** Tarea de libre consumo de agua o sacarosa, en la cual cada cuatro lengüeteos ejercidos por el sujeto inician un tren de estimulación a diferentes frecuencias (Control, 4Hz, 7Hz, 14Hz, 20Hz), durante un segundo que recibió el sujeto, posterior a la estimulación se dio un tiempo fuera de 1 segundo, para volver a contar otros cuatro lengüeteos e iniciar un nuevo ensayo. **C.** Esquema de la tarea razón fija 4, en la cual el ratón palanqueaba para obtener una recompensa de forma alternada, los números indican los pasos para obtener cada recompensa alternando cada ensayo. **D.** Periodos de estimulación en la tarea de RF4. **E.** Tarea de auto-estimulación en la cual cada cuatro lengüeteos iniciaron un tren de estimulación a diferentes frecuencias como en **B**, las primeras 7 sesiones con el bebedero vacío y las siguientes 3 sesiones con el bebedero con sacarosa.

RESULTADOS

La activación de las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc interrumpe temporalmente el consumo de recompensa líquida de forma dependiente de la frecuencia de la fotoestimulación

En la tarea de libre consumo, el ratón fue estimulado a diferentes frecuencias de forma aleatoria cuando este ejercía un cuarto lengüeteo rítmico (Fig. 9B) dicha estimulación provocó la interrupción temporal del consumo de recompensa líquida, tanto de agua como de sacarosa (Fig. 10A). La intensidad del efecto de la fotoestimulación se determinó mediante la cantidad de lengüeteos ejercidos durante el segundo de fotoestimulación, hallándose que a mayor frecuencia de estimulación - el ratón Thy1-ChR2/EYFP- emitió menos cantidad de lengüeteos (Fig. 10B; ANOVA dos vías factor ratón x frecuencia de estimulación $F(1,4)=96.090$, $p<0.0001$), e incluso el efecto se mantuvo un 1 s posterior a la fotoestimulación (Time out; Fig. 10C; $F(1,4)=35.987$, $p<0.0001$) y la duración de la interrupción en el consumo fue mayor conforme mayor frecuencia de la fotoestimulación, es decir se observó un mayor retraso del siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de luz a altas frecuencias (Delay to first lick after laser; Fig. 10D; $F(1,4)=12.524$, $p<0.0001$). Interesantemente, este efecto no fue diferente entre los dos estímulos gustativos (agua vs. sacarosa 10%; ANOVA de dos vías factor recompensa x frecuencia de estimulación $F(1,4)=1.060$ $p=0.3749$), indicando que el valor motivacional entre estas dos recompensas no influyó en el efecto inducido por la fotoestimulación de estas fibras.

La sensibilidad a la fotoestimulación se determinó mediante el cálculo del M50, el cual se refiere a la frecuencia necesaria para reducir la cantidad de lengüeteos al 50% por debajo de la cantidad basal (Fig. 10E), encontramos que el M50 para el ratón Thy1-ChR2 no fue diferente entre las dos recompensas (agua o sacarosa) (Fig. 10F; $t(1)=0.8577$). Algo relevante que ocurrió en estos resultados es que, semejante

a lo que encontró **Britt et. al., 2012** es decir, que la auto-estimulación de las aferencias glutamatérgicas del NAc refuerzan la conducta instrumental (medida por el número de nose-pokes), su activación en el ratón Thy1-ChR2 parece también incrementar la motivación del sujeto para ejercer mayor cantidad de lengüeteos a lo largo de las sesiones, observándose una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de lengüeteos (ANOVA $F(1,9)=11.09$ $p<0.01$) y de ensayos realizados por el ratón transgénico (ANOVA $F(1,9)=10.717$ $p<0.01$), en comparación a los ratones silvestres (C57BL6/J). Este efecto es más evidente a partir de la tercera sesión de estimulación en las sesiones con agua como recompensa (Fig. 10G y Fig. 10H). Este resultado de manera indirecta sugiere que la activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc no sólo interrumpió el consumo de una recompensa líquida, sino que también su estimulación -por si misma- es recompensante. Otro efecto que lo corrobora es el aumento en la cantidad de lengüeteos (post hoc, $p<0.05$) y de ensayos (post hoc, $p<0.0001$) ejercidos durante el primer día de la fotoestimulación de las sesiones de sacarosa, el cual fue mayor a la cantidad ejercida en las dos sesiones controles anteriores sin fotoestimulación (Fig.10G y Fig. 10H). Estos resultados sugieren que la activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc además de interrumpir el consumo de sacarosa de forma dependiente de la frecuencia, también aumenta la motivación del sujeto por obtener una recompensa líquida (agua o sacarosa; ver Fig. 10).

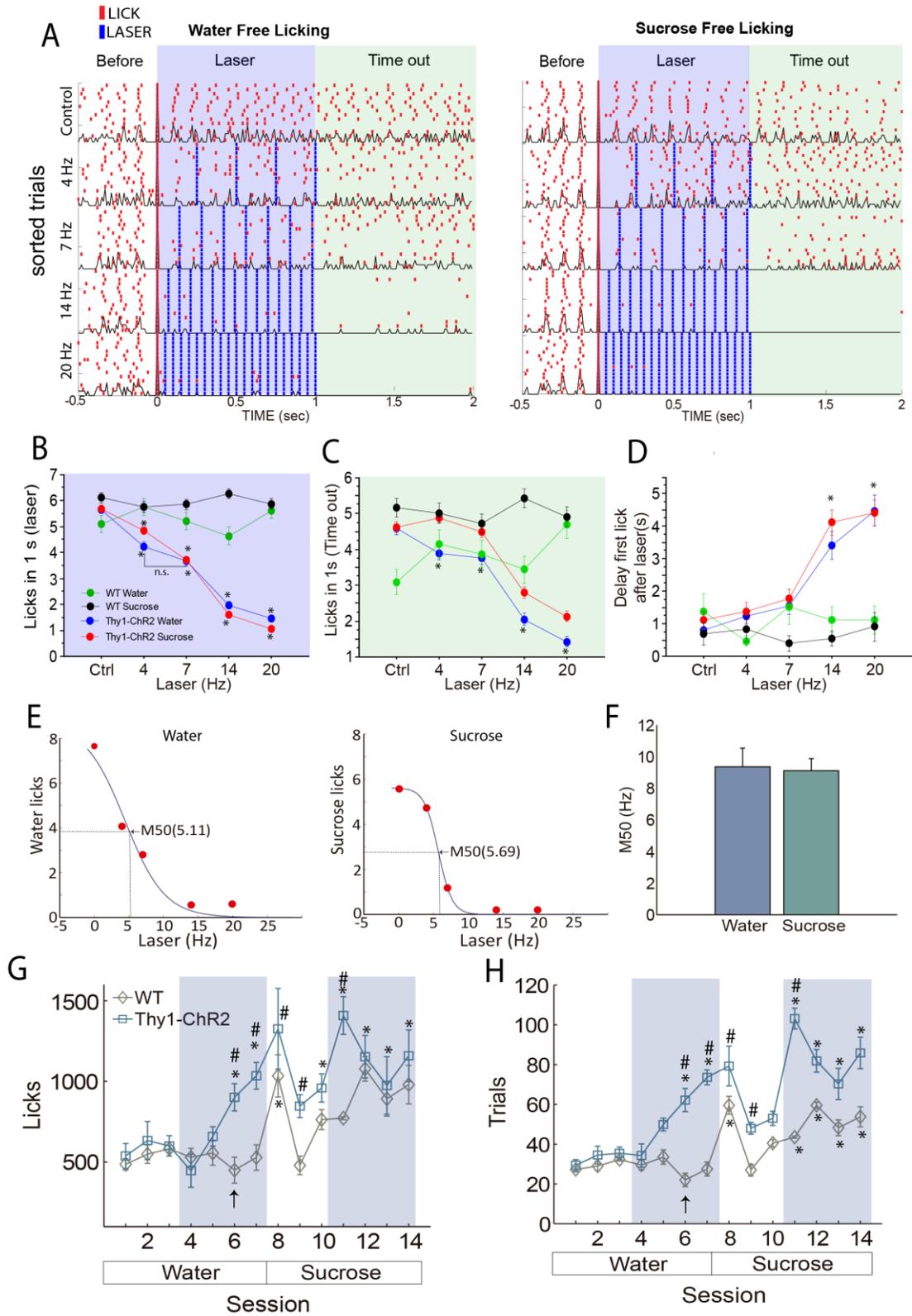


Figura 10. Efecto de la estimulación de las aferencias glutamatergicas del NAC durante el consumo de una recompensa líquida. A Gráfica tipo raster en donde se indica la cantidad de lengüeteos (marcas rojas) y las diferentes frecuencias de estimulación (marcas azules) durante el consumo de agua (izquierda) y sacarosa

(derecha). Las respuestas están alineadas (tiempo = 0s) al inicio de la fotoestimulación. **B.** Cantidad de lengüeteos ejercidos durante el segundo que dura la estimulación a las diferentes frecuencias. **C.** Cantidad de lengüeteos ejercidos un segundo posterior a la estimulación a las diferentes frecuencias. **D.** Tiempo que tarda el sujeto en dar el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de estimulación a las diferentes frecuencias. **E.** Cálculo del M50, para el ensayo de agua y sacarosa respectivamente mostrado en A. **F.** Comparación de M50 entre agua y sacarosa a lo largo de las cuatro sesiones de estimulación para cada recompensa. **G.** Lengüeteos ejercidos por los sujetos a lo largo de las 14 sesiones, las barras azules indican las sesiones en las cuales fueron estimulados, la flecha negra indica la sesión en la cual comienza a observarse diferencia entre los sujetos en la cantidad de lengüeteos ejercidos para agua. **H.** Muestra la cantidad de ensayos ejercidos a lo largo de las 14 sesiones, las barras azules indican las sesiones con estimulación, la flecha negra indica la sesión en la cual comienza a observarse diferencia entre los sujetos en la cantidad de ensayos para agua. * $p < 0.05$ con respecto a los ensayos control para B-D y con respecto a las primeras tres sesiones de agua basales para G y H. # $p < 0.05$ con respecto los lengüeteos ejercidos por el ratón tipo silvestre en la misma sesión para G o con respecto a los ensayos realizados por el ratón tipo silvestre para H. Las gráficas representan la media \pm SEM.

La activación de las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc tiene, por sí mismo, un efecto recompensante

Los datos anteriores (ver Fig. 10G) fuertemente sugieren que los sujetos lengüeteaban por buscar la auto-estimulación, independientemente del tipo de recompensa líquida (agua o sacarosa), para poner a prueba esta hipótesis, se llevó a cabo un nuevo experimento pero esta vez con un grupo de ratones ingenuos, los cuales jamás habían asociado la caja conductual a la entrega de alguna recompensa, estos ratones tenían que lengüetear un bebedero vacío (lengüeteos en seco), y cada cuatro lengüeteos rítmicos se les entregaba un tren de estimulación a diferentes frecuencias de forma aleatoria durante un segundo (Fig. 9E), en esta tarea al tratarse de un bebedero vacío, los lengüeteos emitidos por el sujeto no tuvieron otra finalidad más que la de obtener el tren de estimulación (es decir, estas condiciones experimentales son de un lazo-cerrado, en donde el animal con el lengüeteo en seco, tiene el control directo del encendido del láser). En este nuevo experimento encontramos que la estimulación de las aferencias glutamatérgicas del NAc en los ratones Thy1-ChR2 causó la interrupción del lengüeteo, como se observó en la Figura 10A, la diferencia es que en este caso fue en ausencia de una recompensa líquida (ya que el bebedero estaba vacío), esto sugiere que la fotoestimulación de las terminales glutamatérgicas del NAc interrumpe la conducta

oromotora *per se* (tenga o no algún líquido el bebedero) (Fig. 11A). Como era de esperarse, en el caso de los ratones silvestre, no se observó algún efecto durante la estimulación y como se puede observar en la Figura 11A en estos ratones control los lengüeteos no fueron rítmicos en las sesiones con el bebedero vacío (lo cual es esperado), y solo se observan motivados cuando el bebedero contiene sacarosa (ver sesiones 8 a la 10), mientras que el ratón Thy1-ChR2-EYFP se mantuvo motivado con o sin recompensa en el bebedero (Fig. 11A), indicando que la fotoestimulación fue lo suficientemente recompensante como para hacer que el sujeto lengüeteo rítmicamente un bebedero vacío. La intensidad y la duración del efecto en la interrupción del lengüeteo en las sesiones con el bebedero vacío fueron dependientes de la frecuencia de la estimulación (Fig. 11B), tal como ocurrió con recompensa líquida de sacarosa (Fig. 10B, Fig. 10C Y Fig. 10D). La motivación por parte del sujeto para auto-estimularse fue menor que cuando consumió sacarosa y fue fotoestimulado ya que al comparar los ensayos control, la cantidad de lengüeteos ejercidos en las sesiones con el bebedero vacío fue menor que cuando este contenía sacarosa ($t(368)= 5.646$ $p<0.0001$), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de lengüeteos ejercidos en los ensayos control del ratón Thy1-ChR2 de las sesiones con el bebedero vacío con respecto a los ejercidos por el ratón silvestre en las sesiones con sacarosa ($t(277)=1.332$, $p=0.1838$), lo que sugiere que el efecto recompensante de la estimulación no fue muy diferente al inducido por el consumo de sacarosa sin estimulación. La cantidad de los lengüeteos en seco dados por el ratón Thy1-ChR2 fue mayor que los realizados por el tipo silvestre (Fig. 11C) así como la cantidad de ensayos con el bebedero vacío (Fig. 11D). La diferencia en la cantidad de lengüeteos desapareció cuando a los sujetos se les entregó sacarosa como recompensa en las tres últimas sesiones (Fig. 11C), sin embargo la cantidad de ensayos fue mayor en el ratón Thy1-ChR2 con respecto al silvestre, esto se debió a que la fotoestimulación interrumpió el lengüeteo en el ratón transgénico y para que éste pudiera realizar la misma cantidad de lengüeteos que un animal silvestre, este tuvo que realizar más ensayos

(Fig. 11D). Estos resultados fuertemente indican que la activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc en el ratón Thy1-ChR2 además de interrumpir el consumo de recompensa líquida, también es por si misma recompensante.

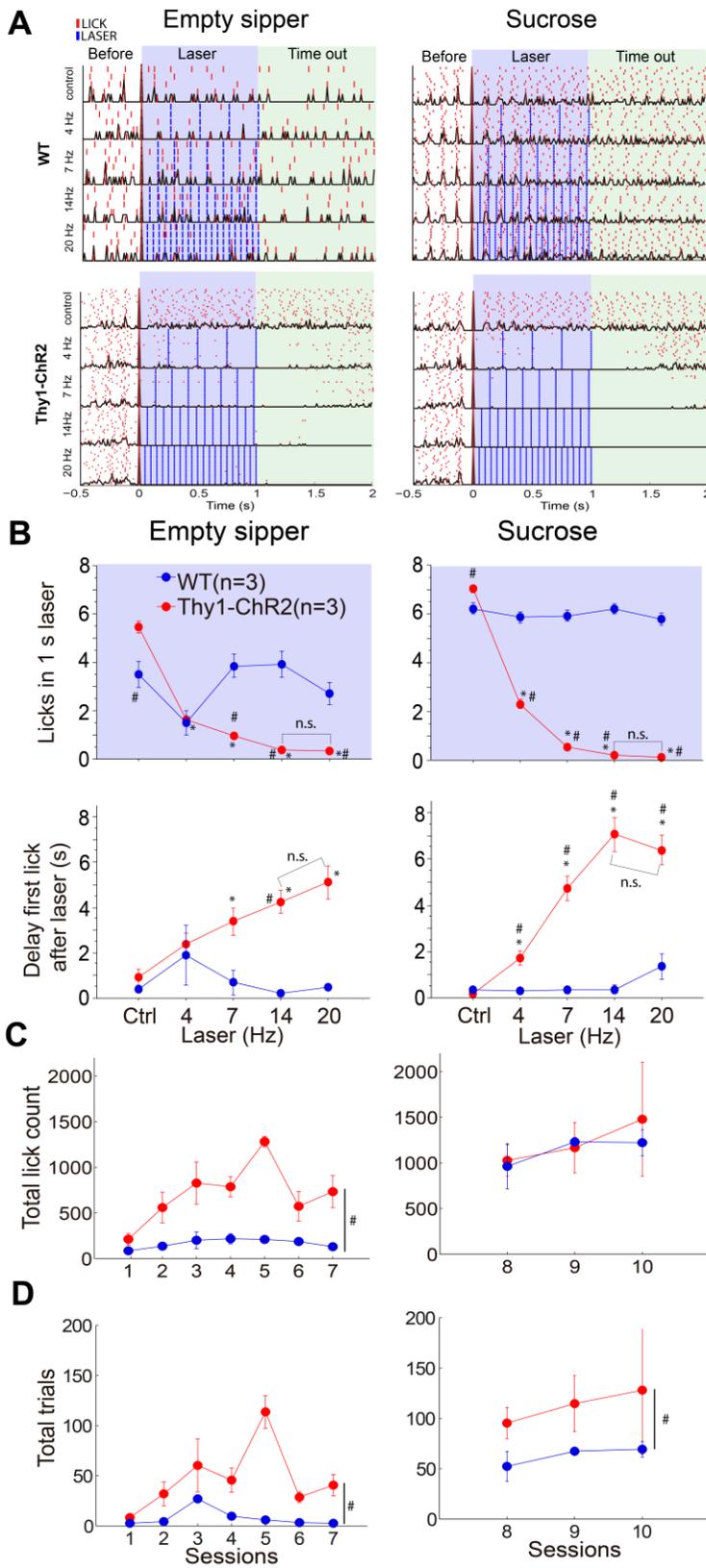


Figura 11. auto-estimulación de aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc. A.

Gráfica tipo raster, en la cual se muestra la cantidad de lengüeteos ejercidos por el sujeto durante las diferentes frecuencias de estimulación. Del lado izquierdo: los ensayos con el bebedero vacío. Derecho: bebedero con sacarosa. En la región superior son los ensayos para los ratones tipo silvestre y en la región inferior los ensayos de los ratones transgénicos **B.** Intensidad y duración del efecto en la interrupción del lengüeteo fue dependiente de la frecuencia de estimulación. Izquierdo: efecto con el bebedero vacío. Derecho: efecto con el bebedero con sacarosa. En la región superior se muestra la cantidad de lengüeteos durante la estimulación. En la región inferior el tiempo que tarda el sujeto en ejercer el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de estimulación. **C.** Cantidad de lengüeteos ejercidos por los sujetos a lo largo de las sesiones, las primeras 7 sesiones corresponden a la tarea con el bebedero vacío las siguientes 3 con el bebedero lleno de sacarosa. **D.** Muestra la cantidad de ensayos con el bebedero vacío (panel izquierda) y con el bebedero con sacarosa (panel derecho). * $p < 0.05$ con respecto a los ensayos control. # $p < 0.05$ con respecto a los sujetos control. Los datos en **B**, **C** y **D** representan la media \pm SEM

La activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc en la tarea de libre consumo induce un efecto a largo plazo sobre la motivación de los ratones Thy1-ChR2

Todos los experimentos que se describen a continuación fueron realizados en los mismos animales ($n=10$) descritos en la Figura 10A. Posterior a las sesiones de libre consumo de sacarosa y de agua los ratones fueron colocados en la cámara operante de Med Associates, en la cual las sesiones 15 a 20 realizaron una tarea de RF1, en la que cada palanqueo entregó una recompensa (pellet de chocolate o sacarosa 10%), y los ensayos se realizaban de manera alternada (un ensayo para pellet, uno para sacarosa, Fig. 9C). Después de esto las sesiones 21 a 37 se cambió a RF4, es decir que cada cuatro palanqueos entregaron una recompensa de manera alternada, siendo las sesiones 25 a 37 con fotoestimulación en los diferentes periodos señalados en la Figura 9D (un periodo de fotoestimulación por ensayo o solo control sin fotoestimulación). En la tarea de RF4 se observó que conforme ocurrieron las sesiones los sujetos realizaron cada vez más ensayos llegando a una cantidad aproximada entre 40 a 60 ensayos a partir de la sesión 33 (Fig. 12A, ANOVA de medidas repetidas $F(1,72)=6.806$ $p<0.02$, comparando las sesiones 21 a 24 contra las sesiones 33 a 37), tanto para el ratón silvestre como para el Thy1-ChR2. Esto habla de una mayor motivación por parte del sujeto y del sobreentrenamiento que tuvieron los animales. Algo interesante que se puede observar en la Figura 12A es que aparentemente los sujetos Thy1-ChR2 se enfocaron más motivados para realizar la tarea en las primeras sesiones en comparación con los ratones silvestres a pesar de que no fueron fotoestimulados en estas sesiones, aunque la diferencia entre ellos no es estadísticamente significativa (ANOVA de medidas repetidas, $F(1,32)=2.020$ $P=0.1930$), se pudo observar una tendencia a realizar más ensayos por parte del sujeto Thy1-ChR2, misma que se corroboró con la cantidad de palanqueos por minuto, ya que estos fueron mayores para el sujeto Thy1-ChR2 con respecto al sujeto silvestre en las primeras sesiones sin fotoestimulación (Fig. 12B, ANOVA, $F(1,1872)=7.084$, $P<0.05$), esta diferencia se compensó en las últimas sesiones (12B,

ANOVA de medidas repetidas, $F(1,1794)=2.403$, $P=0.1280$). Esto sugiere que la fotoestimulación de las aferencias glutamatergicas del NAC en las sesiones anteriores a RF4 (sesiones 11 a 14), pudo haber realizado cambios en la plasticidad neuronal que generaron una mayor motivación por parte del sujeto hacia las recompensas. En cuanto al tiempo que tardó el sujeto en terminar los ensayos de las dos recompensas (pellet de chocolate y sacarosa), contando desde el primer palanqueo hasta el momento en que asomó su cabeza al puerto con recompensa (omitiendo los ensayos con fotoestimulación en el primer palanqueo), fue menor con respecto al que tardaron los ratones silvestres (ANOVA factorial $F(1,652)=25.564$, $P<0.0001$), esta diferencia desapareció en las sesiones 33-37 (Fig. 12C), lo cual sugiere que la activación de las aferencias glutamatergicas del NAc antes de la tarea RF4 generó una mayor motivación por parte de los ratones Thy1-ChR2, efecto que se observa desde las primeras sesiones en ausencia de la fotoestimulación.

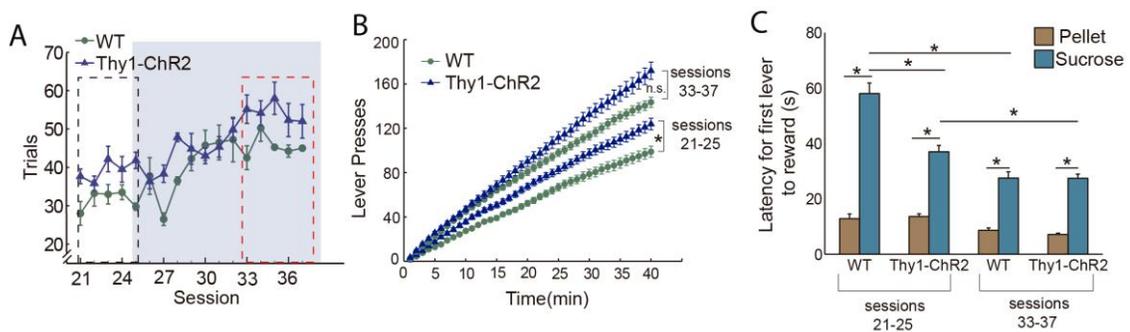


Figura 12. Tarea alternada de RF4 con recompensas de diferente valor motivacional. **A.** Ensayos realizados a lo largo de las 17 sesiones por los sujetos Thy1-ChR2 y WT. la línea discontinua negra indica las primeras cinco sesiones en esta tarea, la línea punteada roja indica las últimas cinco sesiones, las cuales se tomaron para el análisis de **B** y **C**; las primeras 5 fueron sin fotoestimulación, la región azul indica las sesiones con fotoestimulación. **B.** Suma acumulativa de palanqueos por minuto a lo largo de la sesión como medida de motivación y aprendizaje, durante las primeras cinco sesiones (sin fotoestimulación) y las últimas cinco (con fotoestimulación) para los ratones Thy1-ChR2 y WT. Se puede observar la diferencia en la motivación que existió entre ambos sujetos en las primeras sesiones. **C.** Tiempo que tarda el sujeto en dirigirse hacia su recompensa, contado desde el primer palanqueo hasta el momento en que ingresa su cabeza en el puerto con recompensa, omitiendo los ensayos con fotoestimulación durante el primer palanqueo. * $p<0.05$, ANOVA de medidas repetidas para **A** y **B**. ANOVA factorial de tres vías para **C**. Todos los datos representan la media \pm SEM

La activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc interrumpe temporalmente la ejecución del palanqueo de manera dependiente del valor motivacional de la recompensa

En la tarea RF4 los sujetos fueron fotoestimulados a 20 Hz durante un segundo en diferentes periodos de la tarea (ver Fig. 9C, un periodo de fotoestimulación por ensayo). Cuando la fotoestimulación ocurrió durante el primer palanqueo, ésta causó la interrupción temporal de la ejecución del siguiente palanqueo en los sujetos Thy1-ChR2, mientras que en los ratones silvestres no se observó dicho efecto (Fig. 13A ver sombreado blanco). Al comparar la latencia entre el primer y segundo palanqueo de la condición con (ON) o sin fotoestimulación (OFF) para cada palanca (asociada al pellet o a la sacarosa), sólo se observó diferencias significativas en la latencia de la palanca asociada al pellet (ver panel B1 cuadro café; ANOVA $F(1,862)=17.251$, $P<0.0001$), mientras que en los ensayos con sacarosa no hubo diferencias significativas (ver cuadros verdes; ANOVA $F(1,840)=0.946$, $P=0.3311$), esto probablemente se debió a que al ser una tarea de razón fija, el sujeto fácilmente se distrae y pierde la motivación por completar un ensayo, tanto en la condición OFF como en la condición ON y de esta forma el efecto de la fotoestimulación que claramente se puede observar en la gráfica tipo raster (figura 13A) se diluyó.

Para determinar con mayor detalle el efecto que generó la fotoestimulación durante el primer palanqueo se analizaron los ensayos con distintos criterios de nivel de motivación (ver Métodos). Al realizar la comparación en la latencia del primer al segundo palanqueo en los ensayos motivados y ligeramente motivados, se observó que esta fue mayor cuando el sujeto fue fotoestimulado durante el primer palanqueo (condición ON) en comparación con los ensayos control (condición OFF) tanto para la palanca de pellet (ANOVA $F(1,857)=89.866$, $P<0.0001$) y en esta ocasión también para los ensayos con sacarosa (ANOVA $F(1,785)=13.336$, $P<0.0005$;

Fig.13B.2). Como era de esperarse, los animales silvestres no mostraron diferencias entre ensayos con láser y sin él. La magnitud del retraso entre el primero y segundo palanqueo fue similar en ambas palancas a pesar de que cada una tenía un valor motivacional diferente (ANOVA dos vías factor laser x tipo de palanca $F(1,1642)=0.061$, $P=0.8043$; Fig. 13B.2). Este mismo resultado es más evidente al analizar sólo los ensayos donde el sujeto se encontró más motivado (Fig. 13B.3; ANOVA dos vías factor laser x tipo de palanca $F(1,1484)=0.485$, $P=0.4862$). Este resultado sugiere que la fotoestimulación interrumpe transitoriamente el palanqueo asociado a una recompensa y que la intensidad de dicho efecto es similar entre recompensas de diferente valor motivacional.

Ahora procedemos a analizar las latencias entre el segundo y el cuarto palanqueo (ver sombreado amarillo en el raster). Nuevamente, las latencias de todos los ensayos no fueron significativamente diferentes entre la condición OFF y ON para ninguna de las palancas (ANOVA $F(1,1704)=0.013$, $P=0.9077$; Fig. 13C.1). Sin embargo al comparar la latencias de los ensayos motivados y medio motivados (Fig. 13C.2) del segundo al cuarto palanqueo (en el cual en teoría el efecto de la fotoestimulación ya terminó, debido a que el sujeto ha ejecutado el segundo palanqueo), se observó diferencias significativas en la condición ON con respecto a la condición OFF sólo en la palanca asociada a la entrega de sacarosa (ANOVA $F(1,798)=16.992$ $P<0.0001$), mientras que en la palanca para pellet no se observó diferencias (Fig. 13C.2; ANOVA $F(1,854)=0.920$ $P=0.3377$), este mismo resultado fue aún más evidente al comparar los ensayos donde el sujeto se encontró más motivado (ANOVA, $F(1,645)=17.365$ $P<0.0001$ para sacarosa y $F(1,821)=0.098$ $P=0.7539$ para pellet; Fig. 13C.3). Esto sugiere que la fotoestimulación además de interrumpir la ejecución del siguiente palanqueo pudiera estar disminuyendo aún más el valor motivacional de la sacarosa y por lo tanto aumentando la latencia en la ejecución de los palanqueos posteriores al segundo palanqueo.

Finalmente, al analizar las latencias entre el primer y cuarto palanqueo (como una medición del efecto global de la fotoestimulación), encontramos que no hubo diferencia en la latencia usando todos los ensayos (ANOVA $F(1,1704)=0.013$, $P=0.9077$; Fig. 13D.1). No obstante, cabe mencionar que en este análisis es evidente que los ratones mostraron mayor motivación por completar los cuatro palanqueos para los ensayos de pellet que para los de sacarosa (ANOVA $F(1,1704)=112.810$, $P<0.0001$, Fig. 13D.1) reflejando las diferencias motivacionales entre las recompensas utilizadas. Aún más al comparar el efecto de la fotoestimulación en la ejecución del primer al cuarto palanqueo, pero de los ensayos motivados y menos motivados (Fig. 13D2) se observó un efecto significativamente mayor en la palanca asociada a sacarosa que a la de pellet (Fig. 13D.2; ANOVA dos vías factor laser x tipo de palanca $F(1,1668)=4.931$, $P<0.05$), evidenciándose aún más en los ensayos en donde el sujeto se encontró más motivado (ANOVA dos vías factor laser x tipo de palanca $F(1,1526)=12.257$, $P<0.001$, Fig. 13D.3)

En resumen, estos datos dan evidencia de que la activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc puede interrumpir transitoriamente la ejecución del palanqueo asociado a una recompensa y que la duración de este efecto depende del valor motivacional que se tiene hacia las recompensas, siendo este menor cuando la recompensa tiene mayor valor motivacional (pellet de chocolate).

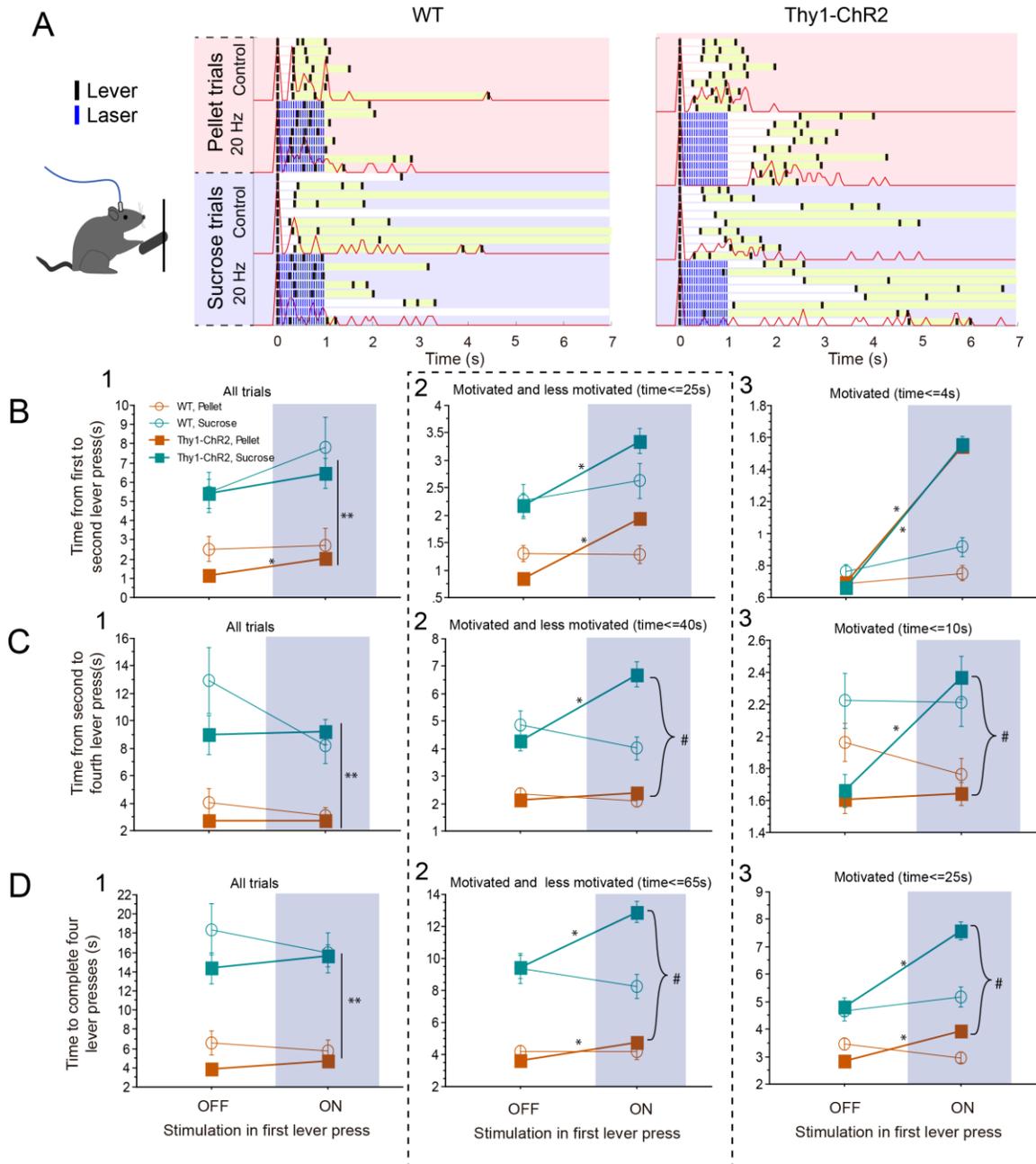


Figura 13. Efecto de la activación optogenética de las aferencias glutamatergicas del NAc shell en la ejecución del palanqueo. **A.** Gráfica tipo raster alineado al primer palanqueo para ensayos de pellet (región rosa) y de sacarosa (región azul) en los ratones silvestre (panel izquierdo) y Thy1-ChR2 (derecho). Cada panel se encuentra subdividido en ensayos control (superior) y con fotoestimulación a 20Hz (inferior), en el ratón Thy1-ChR2, obsérvese que la fotoestimulación retrasa la ejecución del segundo palanqueo (región en blanco entre palanqueos) y este efecto es mayor en la ejecución del segundo al cuarto palanqueo para sacarosa (región amarilla). **B.** Latencia en ejecutar el segundo palanqueo posterior al primero para la condición sin fotoestimulación (OFF) o con fotoestimulación (ON), dividida en: 1. Todos los ensayos. 2. Ensayos que incluyen mínimo el Q3+1.5(IQR). 3. Ensayos que incluyen cómo mínimo el Q3. **C.** Latencia del segundo al cuarto palanqueo en las mismas condiciones como se mencionó en **B.** **D.** Latencia del primero al cuarto palanqueo como se mencionó en **B.** La línea discontinúa negra se empleó para representar lo que se observó en la mayoría de las gráficas tipo raster. * $P < 0.05$ con respecto a la condición OFF ANOVA; ** $P < 0.05$ entre recompensas ANOVA; # $P < 0.05$ ANOVA de dos vías (factor laser x tipo de palanca). Todos los datos representan la media \pm SEM

La activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc también afecta la conducta apetitiva y el consumo de alimento sólido

Durante la fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas del NAc durante los periodos de aproximación (conducta apetitiva) y consumo en la tarea de RF4, también se observaron efectos. En el caso de la aproximación, el cual es el momento en que el sujeto asoma su cabeza al puerto cuando hay recompensa disponible, se observó que el sujeto permaneció menos tiempo en el puerto con recompensa cuando el sujeto era fotoestimulado en este periodo en comparación con la situación control (Fig. 14A, ANOVA, $F(1,859)=11.776$, $P<0.001$), dicho efecto solo se presentó en el ratón transgénico (ANOVA factorial de dos vías, factor laser x tipo de ratón $F(1,1339)=4.010$, $P<0.05$), lo cual indica que la activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc también afecta la conducta apetitiva inducida por el pellet de chocolate. Para determinar el efecto en el consumo de recompensa sólida, en específico, el consumo de pellet de chocolate, el sujeto fue fotoestimulado por un 1s después asomar la cabeza al puerto con la recompensa (en base al cálculo de la distribución de tiempos de permanencia en el puerto con recompensa como se muestra en la Figura 14A) y se cuantificó la cantidad de pellet tirada al piso (debido a que el piso se encontraba separado por una reja, el sujeto no podía recuperar el alimento tirado) de esta manera encontramos que los sujetos transgénicos dejan caer mayor cantidad de pellet con respecto a los sujetos silvestres (Fig. 14B, $t(116)=-3.698$, $P<0.005$). Es decir, la activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc, no solo afecta el consumo de recompensa líquida, sino también el consumo de alimento sólido, así como la conducta apetitiva del alimento sólido.

Trials for chocolate pellet

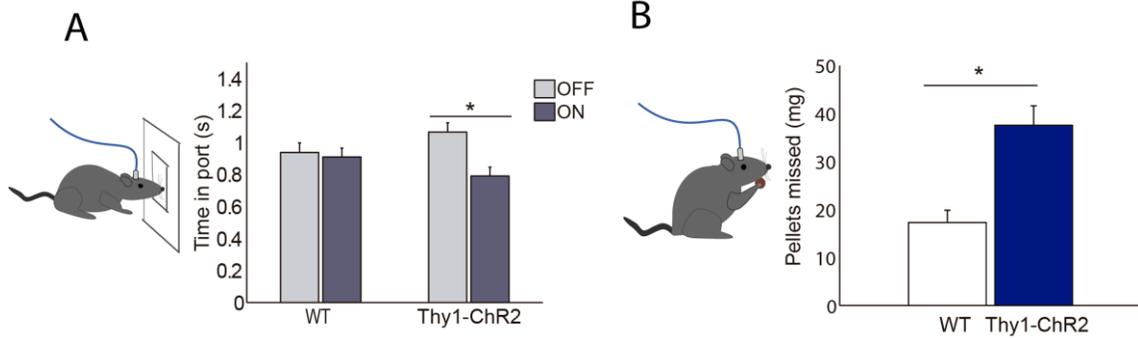


Figura 14. Efecto de la estimulación optogenética de las aferencias del NAc en la conducta apetitiva y consumatoria de pellet de chocolate. **A.** Comparación del tiempo que permanece los sujetos en el puerto con recompensa de pellet en el periodo control vs. el de la fotoestimulación durante la aproximación. **B.** Cantidad de pellets tirados al piso sin posibilidad de recuperarlos en el ratón silvestre vs. ratones transgénicos a lo largo de las sesiones con fotoestimulación en RF4. * $p < 0.05$. Todos los datos representan la media \pm SEM.

La fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas del NAc no solo afecta el consumo de recompensa líquida sino también su conducta apetitiva

Como recordaran, en el experimento de libre consumo de recompensa líquida se observó que la activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc interrumpió el acto consumatorio. En el caso de la tarea RF4 se evaluó el efecto de la activación de dichas aferencias en la conducta apetitiva, además de la consumatoria. Para evaluar ambas conductas se fotoestimuló a 20 Hz durante 1s en el momento en que el sujeto asomó la cabeza en el puerto con recompensa (conducta apetitiva o aproximación a la recompensa), o en el momento que ejerció un cuarto lengüeteo recompensado (periodo de consumo). Encontramos que la fotoestimulación durante el periodo de aproximación retrasó el acto consumatorio, asimismo interrumpió el consumo de sacarosa cuando el sujeto fue fotoestimulado durante la ejecución del cuarto lengüeteo (Fig. 15A), esto sugiere que la activación de las aferencias glutamatérgicas afecta la conducta apetitiva además del consumo de recompensa líquida, dicho efecto no se observó en los sujetos silvestres (Fig. 15A). De esta manera la fotoestimulación impidió que el sujeto iniciaría o continuara la ejecución

del lengüeteo durante el segundo que duró la fotoestimulación (post hoc $P < 0.0001$), sin embargo dicho efecto no fue diferente entre el periodo de aproximación al compararlo contra el periodo de consumo (ANOVA de tres vías, factor Laser x Periodo de fotoestimulación x tipo de ratón, $F(1,2615)=0.016$, $P=0.8991$), por lo que estos datos sugieren que la intensidad del efecto de la fotoestimulación no depende del periodo de la fotoestimulación durante los ensayos de sacarosa. Para determinar la duración del efecto se analizó el tiempo que tardó el sujeto en ejecutar el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de la fotoestimulación observándose que esta latencia se retrasó por aproximadamente un segundo tanto en el periodo de aproximación (Wilcoxon $Z=-13.115$, $P < 0.0001$, Fig. 15C), como durante la conducta consumatoria (Wilcoxon $Z=-9.251$, $P < 0.0001$, Fig. 15D), esto indica que la duración del efecto es semejante a la del tren de la fotoestimulación, la cual es de 1s. Al comparar la duración del efecto entre el periodo de aproximación con respecto al de consumo se observó que ésta fue similar entre ambos periodos (Wilcoxon, $Z=-1.872$, $P=0.0613$), este dato corrobora que la magnitud y duración del efecto no dependen del periodo de fotoestimulación en los ensayos de sacarosa. Importante, al determinar la cantidad de lengüeteos ejercidos -por ensayo- con o sin fotoestimulación en el periodo de aproximación no se observó diferencias estadísticamente significativas (post hoc $P=0.4511$), lo cual indica que la fotoestimulación no está afectando a procesos de la saciedad. Sin embargo, al comparar la cantidad de lengüeteos ejercidos con recompensa entre ambos sujetos en el periodo de aproximación se observó una cantidad ligeramente mayor en los ratones silvestres (ANOVA $F(1,1306)=5.618$, $P < 0.05$), esta diferencia es más evidente cuando se comparan los lengüeteos en seco ejercidos por los sujetos, observándose una menor cantidad en el transgénico con respecto al silvestre (ANOVA $F(1,1306)=38.851$, $P < 0.0001$, Fig. 15E). Dicho resultado podría deberse a que los sujetos Thy1-ChR2 tienen una mayor motivación hacia el pellet de chocolate, debido a la continua activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc, por lo que terminan un ensayo de sacarosa solo para obtener su recompensa de

pellet de chocolate. Con respecto a los lengüeteos ejercidos en los periodos de consumo, a diferencia del periodo de aproximación, los sujetos Thy1-ChR2 si son afectados en la cantidad de lengüeteos con recompensa por la fotoestimulación, siendo ésta menor (ANOVA, $F(1,842)=41.915$, $P<0.0001$), esto puede ser debido a la disponibilidad de la recompensa, ya que posterior al cuarto lengüeteo (en el cual se inicia la fotoestimulación a 20Hz durante 1s), el sujeto tiene la oportunidad de consumir toda la sacarosa que deseé durante dos segundos(Fig. 15A, región en verde del periodo de consumo), posterior a este intervalo de tiempo la recompensa deja de estar disponible, de esta manera el sujeto al ser fotoestimulado durante el primer segundo en esta ventana de tiempo solo tiene la posibilidad de obtener su recompensa durante el segundo restante. Esto se corroboró al comparar los lengüeteos en seco en los cuales el sujeto ejerce una mayor cantidad en los ensayos con fotoestimulación con respecto a los controles (ANOVA $F(1,842)=9.473$, $P<0.005$; Fig. 15F)

En resumen, todos estos datos demuestran que la activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc retrasa el inicio del acto consumatorio, además de la interrupción del mismo, y que la magnitud y duración del efecto no depende del periodo de fotoestimulación (aproximación y consumo) de sacarosa.

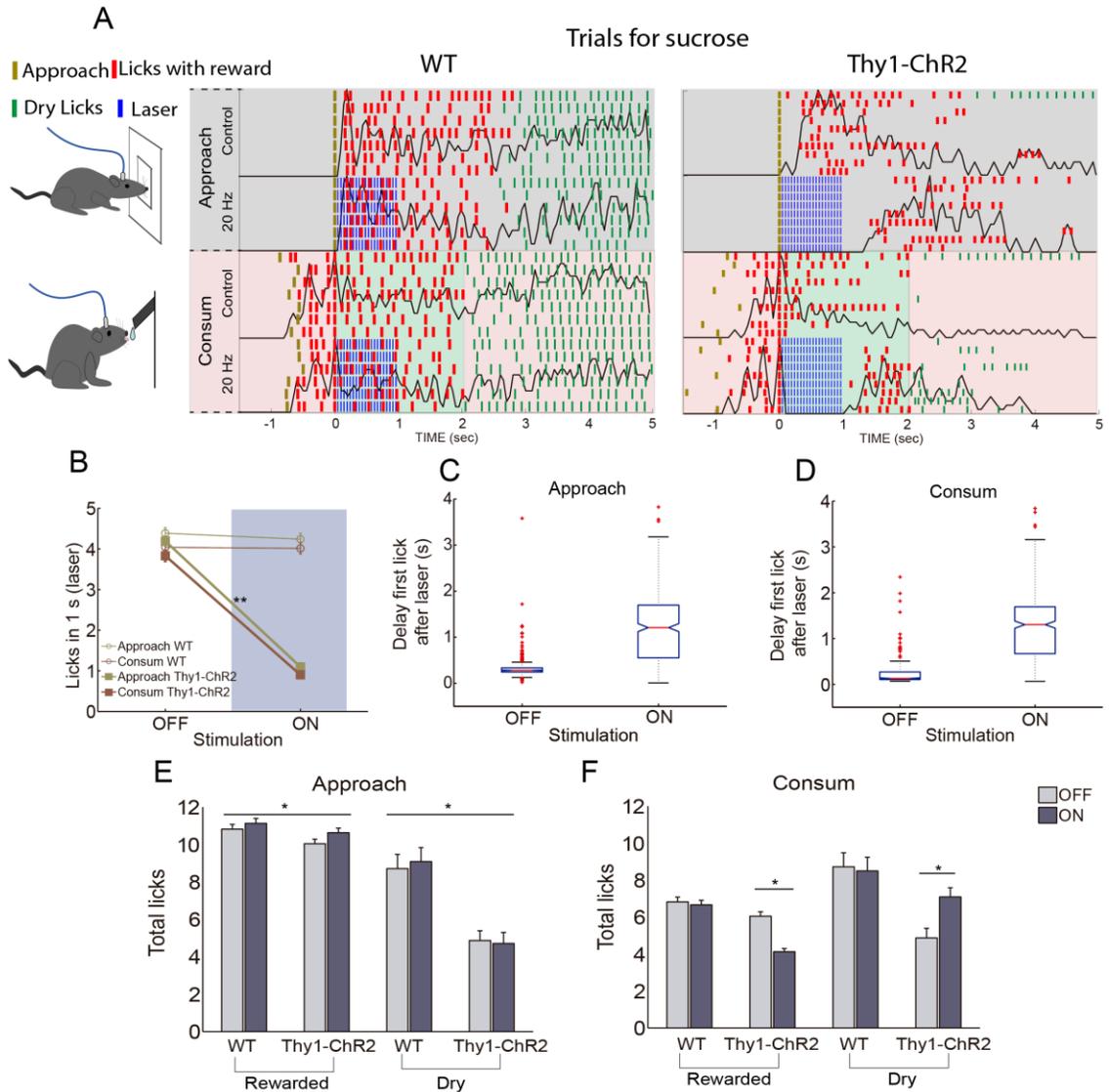


Figura 15. Efecto de la estimulación optogenética en la conducta apetitiva y consumatoria en ensayo de sacarosa. **A.** Gráfica tipo raster alineados al tiempo en que el sujeto ingresa su cabeza al puerto de sacarosa con recompensa (región azul superior) y en la conducta consumatoria, tomándose en cuenta como el cuarto lengüeteo (región inferior, rosa), cada una dividida en dos subregiones (control y estimulación). La región en verde del periodo de la conducta consumatoria, indica el intervalo de dos segundos en el cual se encuentra la recompensa disponible. **B.** Comparación de la cantidad de lengüeteos ejercidos en los ensayos control contra los realizados durante la estimulación en los periodos de aproximación y de consumo. **C** y **D.** Comparación de la latencia del primer lengüeteo posterior al primer pulso de estimulación en el periodo de aproximación (ingreso de cabeza en el puerto, **B**), o durante el consumo (cuarto lengüeteo, **C**) respectivamente. **E** y **F.** Cantidad de lengüeteos ejercidos con recompensa disponible y en seco (posterior al intervalo de dos segundos de recompensa disponible) en los periodos de aproximación (**E**) y consumo (**F**) respectivamente. ** $P < 0.05$ ANOVA de dos vías (factor laser x tipo de ratón). * $P < 0.05$ ANOVA con respecto al sujeto Thy1-ChR2 en **E** y con respecto a la condición con fotoestimulación en **F**. Las gráficas **B**, **E** y **F** representan la media \pm SEM.

La alta motivación que tiene el sujeto por obtener sus recompensas en la tarea RF4 disminuye la duración del efecto que tiene la estimulación optogenética de las terminales glutamatérgicas del NAc sobre el consumo de sacarosa

Las estimulación de las aferencias glutamatérgicas al NAc, interrumpe una secuencia de acciones asociadas a una recompensa (palanqueo, aproximación, consumo), lo cual puede dar indicios de que el efecto prodría ser principalmente motor. Al comparar la intensidad del efecto de la fotoestimulación en la interrupcion del lengüeteo en la tarea de libre consumo de sacarosa con respecto a RF4 es posible determinar que el efecto fue similar en ambas tareas (Fig. 16A, $t(856)=1.771$ $P=0.0769$), sin embargo la duración del efecto fue diferente entre ambas tareas observandose una mayor cantidad de lengüeteos ejercidos en 1 segundo posterior al tren de la fotoestimulación (equivalente al *Time out* de la Figura 10C) en la tarea RF4 con respecto a la de libre consumo ($t(856)=-4.650$, $P<0.0001$, Fig. 16B), además el tiempo que tarda el sujeto en ejercer el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de estimulación es menor en la tarea de RF4 con respecto a la de libre consumo ($t(843)=4.910$, $P<0.0001$, Fig. 16C). Probablemente esto se deba al alto valor motivacional que tiene el pellet de chocolate, ya que en nuestra tarea el sujeto esta obligado a terminar un ensayo de sacarosa para comenzar uno de pellet de chocolate; pero además también pudo haber influido la ventana de tiempo de 2s en que se encontraba disponible la recompensa en la tarea de RF4, de esta manera si el sujeto no reiniciaba la conducta consumatoria inmediatamente después a la fotoestimulación, éste perdía su oportunidad para consumir sacarosa en ese ensayo. Con estos datos se corrobora que la duración del efecto de la fotoestimulación de aferencias glutamatérgicas al Nac durante el consumo depende del valor motivacional de la recompensa y que el sujeto puede acortar su efecto con tal de obtener un poco más de sacarosa.

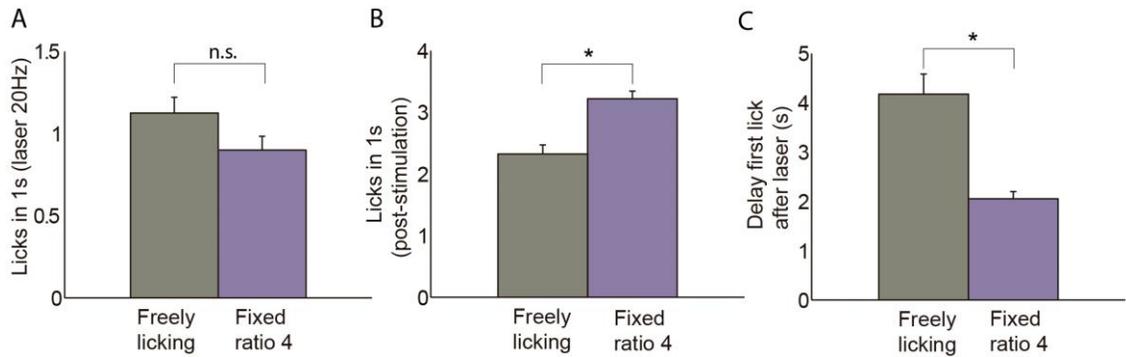


Figura 16. Comparación del efecto de la fotoestimulación de las fibras glutamatérgicas del NAc en la interrupción del consumo de sacarosa durante la tarea de libre consumo con respecto a la tarea RF4. **A.** Muestra la cantidad de lengüeteos ejercidos durante el segundo que dura la estimulación a 20Hz en ambas tareas. **B.** Se gráfica los lengüeteos ejercidos un segundo posterior al tren de estimulación (Time out), para indicar el efecto post-estimulación. **C.** Muestra el tiempo que tarda el sujeto en ejecutar el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de estimulación a 20 Hz en la tarea de libre consumo en comparación con la tarea RF4 durante el consumo de sacarosa. * $P < 0.05$, t de student. Los datos representan la media \pm SEM.

La activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc mantiene un mayor valor motivacional hacia las recompensas aun cuando estas han sido devaluadas

La prueba de devaluación se llevó a cabo para determinar que la conducta generada por el sujeto en la tarea de RF4 fuera dirigida a la meta. De esta manera como se explicó en la metodología, si la conducta era dirigida a la meta, al darle al sujeto una hora de alimento chow + agua + una de las dos recompensas (e.g., pellet de chocolate o sacarosa) y posteriormente se les coloca en la sesión de extinción por 10 min (en donde ninguno de sus palanqueos fue recompensado), si el sujeto disminuye su motivación para ejecutar la tarea, es decir si disminuye la cantidad de palanqueos en comparación con una sesión valuada (en donde solo se entregó 1 h antes de la tarea Chow + Agua). Por lo que al realizar la devaluación en los sujetos silvestres estos solo fueron afectados cuando se devaluó a la sacarosa (Kolmogorov-Smirnov, $\chi^2(2,40,40)=14.450$; $P < 0.005$), en tanto que la devaluación de pellet no mostro diferencia significativa con respecto a la condición valuada (Kolmogorov-Smirnov, $\chi^2(2,40,40)=7.200$; $P=0.0546$ Fig. 17A). Esto sugiere que el valor motivacional del pellet de chocolate es tan alto que no es fácil devaluarlo, tal como ocurre con las drogas de adicción. Sin embargo en el caso de los ratones Thy1-ChR2

estos fueron afectados en la devaluación tanto de pellet (Kolmogorov-Smirnov, $\chi^2(2,60,60)=9.633$; $P<0.05$) como de sacarosa (Kolmogorov-Smirnov, $\chi^2(2,60,60)=12.033$; $P<0.005$; Fig. 17B). Este resultado sugiere que probablemente la activación de las aferencias glutamatergicas al NAc causó la interrupción del hábito y generó una conducta dirigida a la meta, evidenciándose en la sensibilidad a la devaluación en cualquiera de las dos recompensas (tanto en la devaluación de pellet como en la de sacarosa). Además de esto, la motivación de los sujetos Thy1-ChR2 durante la prueba de devaluación fue mayor que la de los sujetos silvestres, específicamente observamos una mayor cantidad acumulada de palanqueos tanto para pellet (Kolmogorov-Smirnov, $\chi^2(2,40,60)=8.640$; $P<0.05$; Fig. 17C), como para sacarosa (Kolmogorov-Smirnov, $\chi^2(2,40,60)=15.360$; $P<0.001$; Fig. 17D), de esta manera aunque la devaluación afecta a la motivación del sujeto Thy1-ChR2 para ejecutar los palanqueos, esta sigue siendo mayor que en los sujetos silvestres, indicando que la activación de las aferencias glutamatergicas al NAc refuerza la conducta instrumental aun cuando se ha devaluado el valor motivacional de las recompensas.

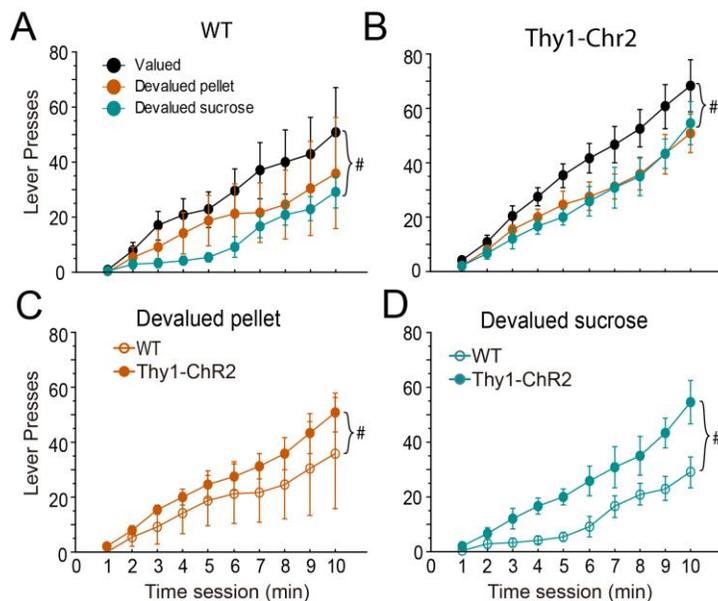


Figura 17. Prueba de devaluación en la tarea de RF4. **A.** Cantidad acumulada de palanqueos (tanto de pellet como de sacarosa combinados), realizados por los sujetos silvestres bajo las diferentes condiciones: valuado, pellet devaluado, sacarosa devaluada. **B.** Cantidad acumulada de palanqueos como en “A” pero en los ratones transgénicos Thy1-ChR2. **C.** Comparación de la cantidad acumulada de palanqueos en la sesión de devaluación de pellet para los sujetos silvestres con respecto al

Thy1-ChR2. **D.** Comparación como en **C** pero para la devaluación de la recompensa sacarosa. # $P<0.05$ Kolmogorov-Smirnov. Los datos representan la media \pm SEM

La activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc mantiene el valor motivacional aun en ausencia de las recompensas (pellet o sacarosa)

Para determinar si la fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas al NAc era suficiente para que el sujeto continuara trabajando en sesiones de extinción (en donde la recompensa –pellet o sacarosa- fue omitida), de la misma manera que lo haría en una sesión normal de RF4, los sujetos fueron colocados en 3 sesiones de readquisición de la tarea y posteriormente en 5 sesiones de extinción, en las cuales el sujeto fue fotoestimulado en uno de los tres periodos señalados en la figura 9D. Tal como ocurrió en el experimento de auto-estimulación señalado anteriormente (Fig. 9E), en el cual el sujeto Thy1-ChR2 realizó ensayos solo para recibir fotoestimulación (Fig. 11D); en los ensayos de extinción de RF4, los sujetos Thy1-ChR2 en ausencia de recompensa mantuvieron la conducta instrumental (ANOVA medidas repetidas, $F(7,28)=2.338$, $P=0.518$) mientras que los animales silvestres la extinguieron (ANOVA medidas repetidas, $F(7,21)=5.595$, $P<0.005$, Fig. 18A) siendo la cantidad de ensayos por parte de los ratones silvestres menor que las realizadas por los Thy1-ChR2 en las sesiones de extinción (ANOVA medidas repetidas, sesión 44-48, $F(1,8)=56.825$, $P<0.0001$, Fig. 18A). Lo cual sugiere que la activación de las aferencias glutamatérgicas del NAc fue lo suficientemente reforzante para que el sujeto continuara trabajando, esto se corroboró al determinar la cantidad acumulada de palanqueos por minuto en la cual se halló que los sujetos Thy1-ChR2 no mostraron diferencia en la tarea de readquisición con respecto a la de extinción (ANOVA medidas repetidas, $F(1,1755)=0.655$, $P=0.9512$), mientras que los silvestres disminuyeron la cantidad de palanqueos por minuto en ausencia de recompensa (ANOVA medidas repetidas, $F(1,1131)=6.850$, $P<0.0001$, Fig. 18B). Estos datos dan evidencia nuevamente de que la fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas del NAc es recompensante. Al determinar los tiempos en que tardó el sujeto Thy1-ChR2 en terminar un ensayo de pellet con respecto a uno de sacarosa (contando desde el primer palanqueo hasta el momento en que ingresó su cabeza en el puerto

con recompensa), se observó una diferencia entre los tipos de ensayos en la readquisición de la tarea, siendo menor el tiempo en los ensayos de pellet (ANOVA, $F(1,1502)=41.175$, $P<0.0001$), tal como se observó en la Figura 12C, de igual manera ocurrió con los ratones silvestres (ANOVA, $F(1,420)=46.260$, $P<0.0001$), sin embargo cuando los sujetos silvestres fueron colocados en las sesiones de extinción estos perdieron la diferencia motivacional entre los tipos de ensayo (ANOVA $F(1,405)=0.002$, $P=0.9668$), mientras que el Thy1-ChR2 mantuvo la diferencia motivacional aun en ausencia de las recompensas físicas (ANOVA $F(1,1502)=137.342$, $P<0.0001$) e incluso fue mayor su motivación por terminar los ensayo que la de los sujetos silvestres (ANOVA $F(1,1909)=164.503$, $P<0.0001$, Fig. 18C). Este último resultado sugiere que la fotoestimulación no solamente pudiera ser recompensante, sino que además esta activación del NAc sorprendentemente puede mantener el valor motivacional de las recompensas físicas aun en ausencia de ellas, de esta manera el NAc refuerza la conducta instrumental como lo sugirió Britt et al. 2012 y por consiguiente racionaliza el por qué el NAc se encuentra involucrado en el mantenimiento del hábito.

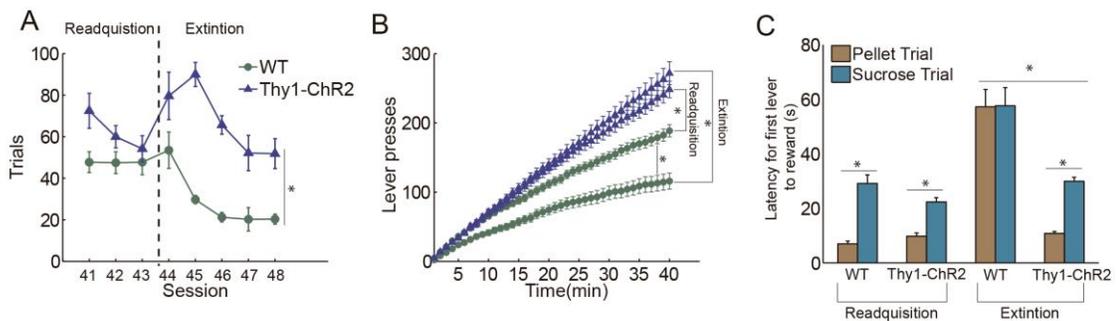


Figura 18. La fotoestimulación mantiene la motivación durante las sesiones de extinción de RF4 en ratones Thy1-ChR2. **A.** Ensayos realizados por los sujetos, las 3 primeras sesiones corresponden a la readquisición, las últimas 5 a ensayos de extinción. **B.** Cantidad acumulada de palanqueos por minuto durante la sesión (40 min). **C.** Tiempo que tardaron los sujetos en dirigirse hacia su recompensa, contado desde el primer palanqueo hasta el momento en que ingresó su cabeza en el puerto recompensante. * $P<0.05$, ANOVA de medidas repetidas en **A** y **B**, factorial para **C**. Los datos representan la media \pm SEM.

La activación continua de las aferencias glutamatérgicas del NAc aumenta la sensibilidad a la fotoestimulación durante el consumo de sacarosa en la readquisición de la tarea de libre consumo

Al colocar a los ratones bajo privación de agua y en la tarea de libre consumo de sacarosa de nuevo -tal como ocurrió en las sesiones 11 a 14 (Fig.9A)- se observó un mayor efecto en la interrupción del consumo de sacarosa desde la frecuencia más baja de fotoestimulación (4Hz, Fig. 19A) diferente a lo observado en la Figura 10A en la cual la frecuencia que indujo una interrupción casi total del lengüeteo fue la de 14Hz (Fig. 10A), este cambio en la sensibilidad se demostró con el valor del M50 el cual sugiere, para el ejemplo de la Figura 19A, que la frecuencia para disminuir la cantidad de lengüeteos al 50% fue alrededor de 2.5 Hz (Fig. 19B). Al comparar el promedio de los M50 en los sujetos Thy1-ChR2 antes de la tarea RF4 (sesión 11 a 14) y durante la readquisición (sesión 49 a 50), fue posible corroborar el dramático cambio en la sensibilidad del efecto en la interrupción del consumo de sacarosa, ya que en la readquisición el M50 fue menor que el obtenido en las sesiones antes de RF4 (t de student, $t(34)=6.150$, $P<0.0001$, Fig. 19C). Algo interesante que se pudo observar fue que en los ensayos control la cantidad de lengüeteos ejercidos por los ratones Thy1-ChR2 durante la readquisición fue mayor que en los sujetos silvestres (ANOVA pos hoc $P<0.0005$) e incluso mayor que en los sujetos Thy1-ChR2 antes de la tarea RF4 (ANOVA pos hoc $P<0.0001$, Fig. 19D), además el mayor efecto se obtuvo a la frecuencia de 7Hz (a partir de la cual ya no presentó diferencias significativas en las siguientes frecuencias de fotoestimulación, ANOVA pos hoc, 7Hz a 14Hz, $P=0.0927$) a diferencia de la tarea antes de RF4 en la cual el máximo efecto fue a 20Hz (ANOVA pos hoc, 14Hz a 20Hz, $P<0.001$), siendo además el efecto en la fotoestimulación a 20Hz durante el consumo de sacarosa, mayor en la tarea de readquisición con respecto a la tarea antes de RF4 (ANOVA pos hoc $P<0.0001$, Fig. 19D), lo cual corrobora que la intensidad del efecto fue mayor en la readquisición de la tarea. Al comparar los efectos post-estimulación (*Time out* y *Delay first lick*) el

efecto continuó después de la fotoestimulación e incluso de manera similar a lo encontrado en la Figura 19D (Fig. 19E y 19D). Con respecto a los ensayos control, de igual manera que en la figura 19D, se observó que la cantidad de lengüeteos ejercidos durante estos ensayos fue mayor en la readquisición de la tarea en el ratón Thy1-ChR2 con respecto a los silvestres, (ANOVA pos hoc $P < 0.0001$) y con respecto al mismo Thy1-ChR2 antes de la tarea RF4 (ANOVA pos hoc $P < 0.0001$), esto sugiere que existe una mayor motivación por parte del sujeto y probablemente no se deba completamente a la sacarosa si no a recibir la mayor cantidad de fotoestimulación posible o que la sacarosa haya adquirido un mayor valor motivacional por parte de la continua activación de estas aferencias, sin embargo esta última hipótesis pudiera descartarse ya que el efecto post- estimulación fue mayor en la readquisición con respecto a la tarea antes de RF4 en el ratón Thy1-ChR2 (ANOVA pos hoc, 20Hz, $P < 0.0001$, Fig. 19E y 19F), diferente a lo observado en las Figuras 16B y 16C, en las cuales se sugiere que el efecto post-estimulación es menor si el sujeto se encuentra motivado a recibir la mayor cantidad de sacarosa posible. Estos datos dan evidencia de que la sensibilidad a la fotoestimulación no es constante y sugieren que la continua activación a lo largo de las sesiones y el cambio a la tarea RF4 (con pellet de chocolate), pueden cambiar la sensibilidad probablemente debido a la generación de nuevas sinapsis.

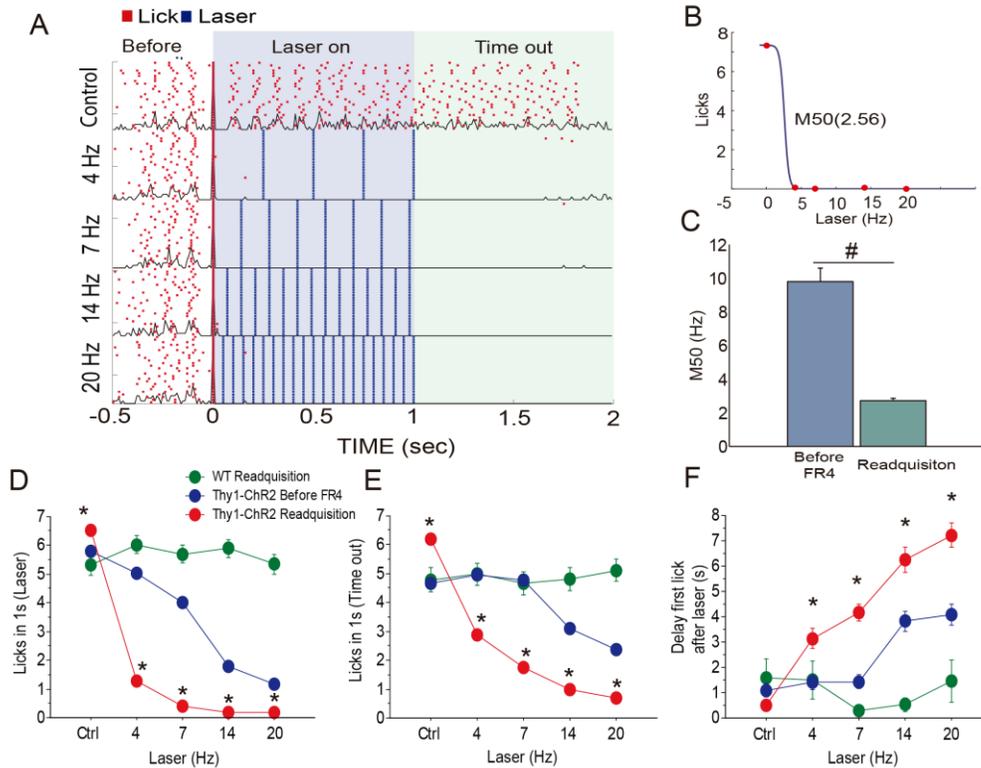


Figura 19. Readquisición de la tarea de libre consumo de sacarosa. **A.** Gráfica tipo raster que indican la cantidad de lengüeteos y las diferentes frecuencias de estimulación durante el consumo de sacarosa **B.** Cálculo de la frecuencia de estimulación en la cual se reduce la cantidad de lengüeteos al 50% por debajo la condición basal para **A.** **C.** Comparación del M50 como medida de sensibilidad a la estimulación, para los ensayos realizados antes de la tarea RF4 y en la readquisición. **D.** Comparación del efecto en la cantidad de lengüeteos durante el segundo que duró la fotoestimulación a las diferentes frecuencias en la tarea de libre consumo antes de RF4 y durante la readquisición. **E.** Cantidad de lengüeteos ejercidos un segundo posterior a la fotoestimulación a las diferentes frecuencias. **F.** Tiempo que tardó el sujeto en dar el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de fotoestimulación a las diferentes frecuencias. # $P < 0.05$ por t de student; * $P < 0.05$ ANOVA pos hoc de Fisher, con respecto a los diferentes grupos a la misma frecuencia de fotoestimulación. Los datos representan la media \pm SEM.

El cambio de la recompensa líquida de sacarosa por agua aumenta el valor motivacional por las recompensas

Por ultimo, se realizó un experimento en el cual el sujeto realizó la readquisición de la tarea de RF4, con sus respectivas recompensas de pellet y sacarosa en las sesiones esto durante tres sesiones (sesion 51 a 53), para posteriormente cambiar la recompensa líquida de sacarosa por agua en las siguientes (sesion 54 a 56), de esta manera se compararía el efecto de la fotoestimulación en la tarea RF4 disminuyendo aún mas el valor motivacional de la recompensa líquida, sin embargo ocurrió algo diferente. Durante las tres primeras sesiones el sujeto alcanzó una cantidad de

ensayos en el rango de 40 a 60, los cuales son semejantes a la cantidad mostrada en la Figura 12A, para posteriormente alcanzar de 70 a 80 ensayos en las sesiones con agua en los sujetos Thy1-ChR2, momento en el cual se mantiene constante (ANOVA medidas repetidas, $F(2,10)=0.568$, $P=0.5837$), aunque no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el sujeto Thy1-ChR2 con respecto al silvestre (ANOVA medidas repetidas $F(5,40)=1.033$, $P=0.4114$), hay una tendencia por parte del Thy1-ChR2 para realizar más ensayos que el ratón silvestre (Fig. 20A), misma que se corroboró al determinar la cantidad de palanqueos acumulados a lo largo de la sesión en la cual hay diferencia entre el sujeto Thy1-ChR2 y el silvestre en las sesiones con sacarosa (ANOVA medidas repetidas $F(39,1092)=5.945$ $P<0.0001$) y en las sesiones con agua (ANOVA medidas repetidas $F(39,1092)=4.965$ $P<0.0001$, Fig. 20B), además aparentemente el agua pudiera motivar más al sujeto para trabajar, ya que al tener menor valor motivacional, aumentaría aún más el valor del pellet de chocolate como si este fuera la única recompensa, esto se corroboró analizando el tiempo que tardó el sujeto en completar los ensayos tanto de pellet como de sacarosa, siendo afectados de igual manera ambos, en los cuales en las sesiones con agua llevan a cabo los ensayos en menor tiempo en el ratón Thy1-ChR2 (ANOVA dos vías, factor tipo de sesión $F(1,1)=29.651$ $P<0.0001$, interacción tipo de sesión x recompensa $F(1,1592)=0.570$, $P=0.4502$, Fig. 20C), de igual manera ocurrió en los sujetos silvestres (ANOVA dos vías, factor tipo de sesión $F(1,1)=45.860$ $P<0.0001$, interacción tipo de sesión x recompensa $F(1,855)=1.771$, $P=0.1836$, Fig. 20C). Estos datos sugieren que hay mayor motivación por parte de los sujetos en las sesiones en las cuales se les cambió la recompensa de sacarosa por agua; si bien no se puede afirmar que el agua tiene mayor valor motivacional que la sacarosa en esta tarea, al menos si se puede asegurar que no disminuyó la motivación del sujeto por realizar los ensayos como se esperaba, lo que sugiere que un estímulo neutro que le permita al sujeto consumir mayor cantidad de pellets de chocolate, ya que la sacarosa pudiera estar interfiriendo con la saciedad. Al realizar el estudio comparativo entre la cantidad de lengüeteos que ejerció en la tarea de libre

consumo con agua con respecto a la tarea RF4, se observó que existió un mayor efecto comparado con las primeras sesiones (t de student $t(422)=8.439$, $P<0.0001$, Fig. 20D), del mismo modo, el efecto post-estimulación en el time out fue mayor en las sesiones con agua (t de student $t(422)=2.948$, $P<0.005$, Fig. 20E); pero el tiempo que tarda el sujeto en dar el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de fotoestimulación no fue diferente entre ambas tareas (t de student $t(-10495)=414$, $P=0.1358$, Fig. 20F). Estos datos dan evidencia de que la motivación hacia el agua es menor con respecto a la tarea de libre consumo debido a que el efecto durante la fotoestimulación y post-estimulación es mayor. Por lo que estos datos sugieren que el cambio de recompensa líquida (sacarosa) por agua aumenta el valor motivacional para ejecutar la tarea RF4 probablemente al actuar como un estímulo neutro que le permite al sujeto consumir una mayor cantidad de pellets de chocolate.

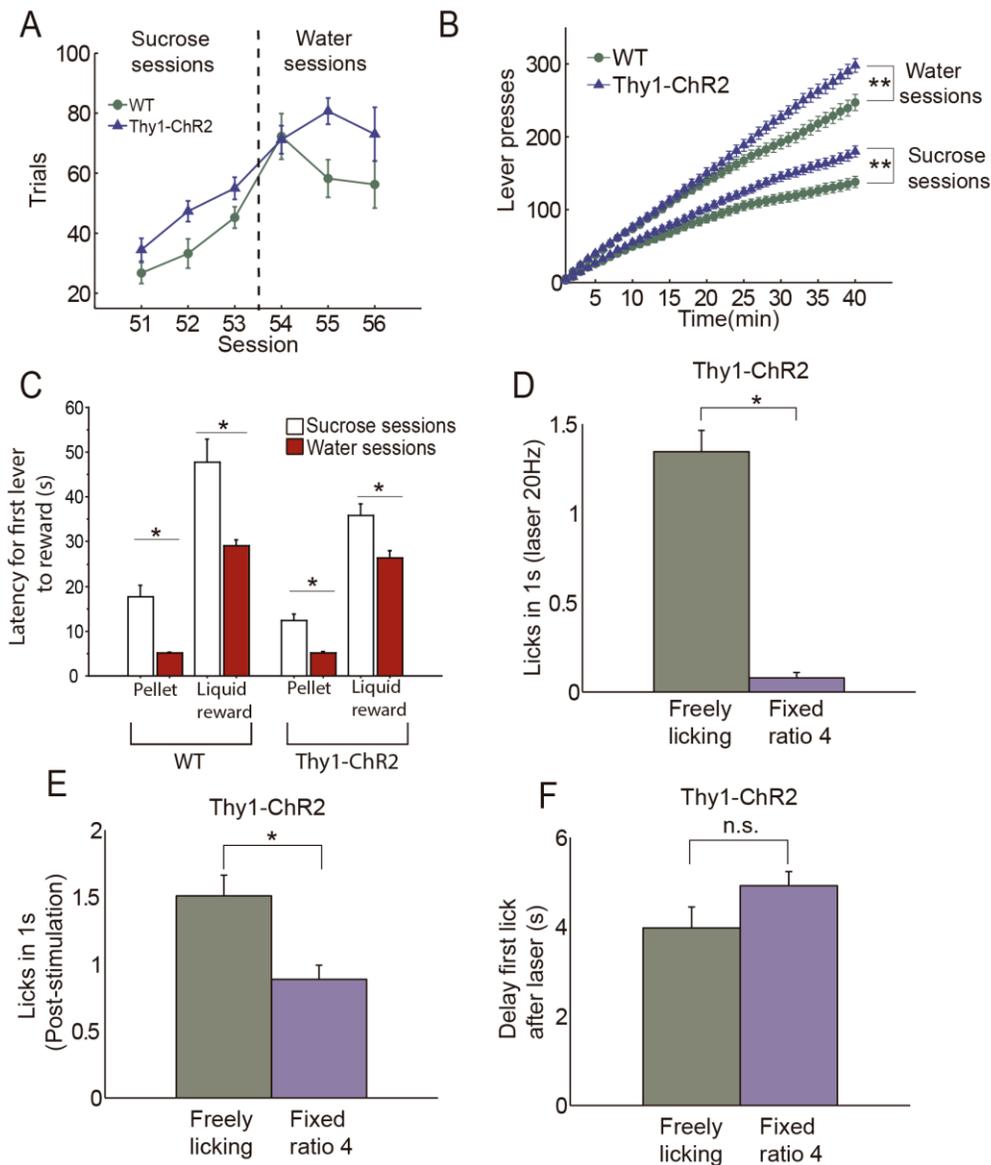


Figura 20. Cambio del valor motivacional de las recompensas. **A.** Ensayos realizados por el sujeto comenzando por 3 sesiones de readquisición, seguido de 3 sesiones cambiando la recompensa líquida por agua. **B.** Cantidad acumulada de palanqueos por minuto durante los 40 min que duró las sesiones tanto de readquisición como en el cambio de recompensa líquida. **C.** Tiempo que tardaron los sujetos en dirigirse hacia su recompensa, contado desde el primer palanqueo hasta el momento en que ingresó su cabeza al puerto con recompensa. **D.** Lengüeteos ejecutados por los sujetos Thy1-ChR2 durante el segundo que duró la fotoestimulación, en la tarea de libre consumo con agua como recompensa (sesión 7 a 10) como en las sesiones de RF4 con agua como recompensa líquida (sesión 54 a 56). **E.** Lengüeteos ejercidos un segundo posterior al segundo de fotoestimulación (time out), en las mismas condiciones que en **E.** **F.** Tiempo que tardaron los sujetos en ejecutar el siguiente lengüeteo posterior al primer pulso de fotoestimulación en las mismas condiciones que en **E.** ** $P < 0.05$ ANOVA de medidas repetidas; * $P < 0.05$ ANOVA para **C** y *t* de student para **D-F**. Los datos representan la media \pm SEM.

Análisis histológico

Al finalizar todas las tareas conductuales, se procedió a sacrificar a los sujetos para posteriormente perfundirlos y realizar cortes histológicos para corroborar que las coordenadas empleadas en la cirugía estereotáxica exitosamente quedaran en el NAc en su región shell (Fig. 21), confirmamos que todos los efectos reportados en esta tesis se pueden atribuir a la fotoestimulación de las terminales glutamatérgicas que proyectan al NAc Shell.

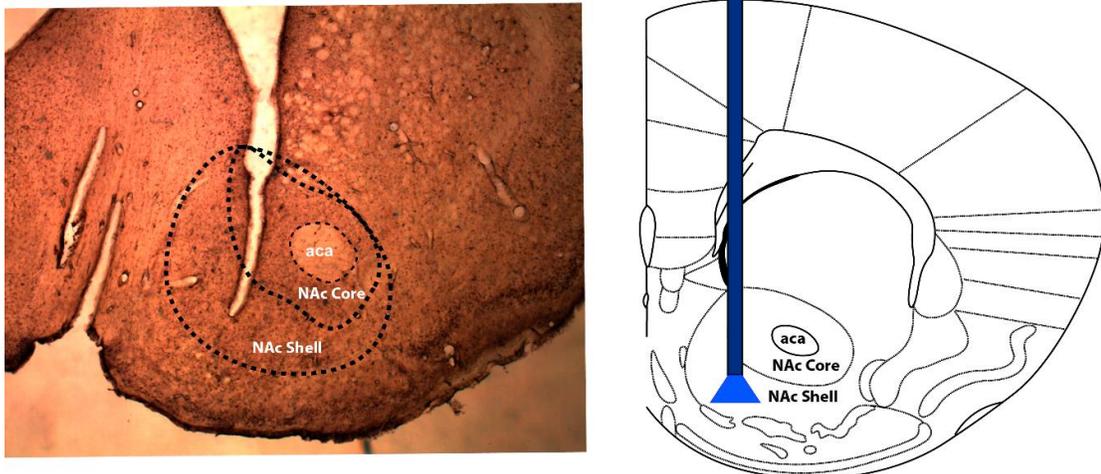


Figura 21. Sitio de implantación. De lado izquierdo se muestra la trayectoria de la fibra en un corte histológico del cerebro de uno de los ratones que participó en la tarea, se puede observar que la fibra llega hasta NAc Shell. De lado derecho, se muestra un diagrama de Paxinos de como la fibra fue implantada en el cerebro del sujeto hasta llegar al NAc Shell para fotoestimular las terminales glutamatérgicas que llegan a esta región.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó la influencia de las proyecciones glutamatérgicas al NAc en las conductas de hábito y dirigida a la meta, así como su participación en conductas instrumentales, apetitivas y consumatorias, empleando al ratón transgénico Thy1-ChR2/EYFP, el cual expresa el canal de rodopsina 2 (ChR2) en las proyecciones glutamatérgicas al NAc (Ting & Feng 2013; Prado et al, datos no publicados).

Estudios previos de nuestro laboratorio indican que la fotoestimulación del NAc shell en estos ratones transgénicos interrumpe el consumo de sacarosa. En estudios en rebanadas in vitro de las MSN del NAc empleando antagonistas glutamatérgicos (AP-5 y CNQX) se determinó que el efecto de la fotoestimulación se debe a la expresión del ChR2 en las proyecciones glutamatérgicas al NAc (Prado et al, datos no publicados). Sin embargo aún se desconoce, la razón por la cual los ratones sedientos interrumpen el consumo de sacarosa al fotoestimar a las proyecciones glutamatérgicas al NAc, por esta razón en esta tesis se replicó el experimento de la fotoestimulación durante el consumo de sacarosa, pero también se extendió a otros estímulos gustativos como agua. Encontramos que la activación de estas aferencias al NAc, inducen la interrupción del consumo de recompensa líquida (tanto de agua como de sacarosa), y que este efecto dependía de la frecuencia, un resultado muy semejante a lo encontrado por Krause en el 2010 (Krause et al. 2010) usando estimulación eléctrica del NAc. En esta tesis avanzamos nuestro conocimiento y encontramos información contundente que confirma que su fotoestimulación es *per se* reforzante -ya que además de causar la interrupción del lengüeteo-, los ratones transgénicos fueron capaces de ejercer lengüeteos en seco, sólo para autoestimularse. Este resultado está en línea con el trabajo realizado por Britt en el 2012 en el cual los sujetos se autoestimulaban activando con un láser azul las proyecciones glutamatérgicas provenientes de PFC, BLA y vHipp hacia el NAc, en esta tesis demostramos que la activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc

interrumpen el consumo de recompensa líquida y además es recompensante (Britt et al. 2012)

Retomando el trabajo realizado por Taha en el 2005 en el que se reporta que hay dos poblaciones neuronales relacionadas al consumo, la primera que se activa debido a la palatabilidad y la segunda que se inhibe para permitir el acto consumatorio, es plausible proponer que al fotoestimular las aferencias glutamatérgicas al NAc en el ratón Thy1-ChR2 se activaron estas dos poblaciones de manera indistinta, explicando por qué se interrumpe el lengüeteo durante la fotoestimulación, pero además el sujeto se encontró más motivado para llevar a cabo la tarea como se demostró a lo largo de todos los experimentos en especial en los mostrados en la Figura 10, 11 y 15 (Taha & Fields 2005).

En un trabajo realizado por Stratford en 1999 indica que el NAc shell regula la actividad de las interneuronas glutamatérgicas del hipotálamo lateral (LH), de modo que cuando se inhibe a las neuronas del NAc shell con agonistas GABA A, deja de liberarse GABA a estas interneuronas y por consiguiente se activa al LH, una vez que el LH es desinhibido el sujeto comienza a consumir mayor cantidad de alimento que en la condición control (Stratford & Kelley 1999), este dato corrobora los resultados encontrados tanto en el presente trabajo como en el de Krause (Krause et al. 2010), ya que al activar eléctricamente al NAc se interrumpe el consumo.

También observamos que la activación continua de las aferencias glutamatérgicas generó un posible cambio en la plasticidad neuronal del NAc, es plausible proponer que este efecto podría deberse a la activación de los receptores NMDA como lo reportó Haberny en el 2005, en donde indica que la activación de los receptores NMDA aumenta la concentración de CREB y por otra parte CREB, de acuerdo a lo hallado por Huang en el 2008, induce el incremento de la expresión de receptores tipo NMDA, de la plasticidad neuronal y disminuye el umbral de activación neuronal (Haberny & Carr 2005; Huang et al. 2008). Estos trabajos pudieran explicar los resultados encontrados en la Figura 12B y 12C en la cual los ratones THy1-ChR2 se

encontraron -desde las primeras sesiones- más motivados a realizar la tarea, en las cuales no había fotoestimulación, además otro dato a favor de esta hipótesis son los resultados obtenidos en la readquisición de la tarea de libre consumo, en la cual el efecto de la fotoestimulación durante el consumo de sacarosa fue aún mayor en intensidad y duración en la readquisición que en la tarea inicial de libre consumo, lo cual sugiere que la estimulación constante de estas terminales pudieron haber generado nuevas sinapsis y aumentado la expresión de receptores de glutamato, sin embargo más estudios son necesarios para demostrar esta hipótesis.

Por primera vez demostramos que la activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc no solo afectó a la conducta consumatoria y a la motivación (Stratford & Kelley 1999; Britt et al. 2012; Krause et al. 2010), sino que además interrumpió las secuencias motoras asociadas a la entrega de una recompensa como el palanqueo (Fig. 13) y la aproximación a alimentos (conducta apetitiva) (Fig. 15B).

Ann Kelley en 1997 estudió los efectos del glutamato en el consumo de alimento chow observando que la administración de CNQX (un antagonista de los receptores, AMPA/Kainato), en el NAc inducía el consumo voraz de alimento en animales saciados, en tanto que la activación de las MSNs del NAc mediada por el incremento en la respuesta de los receptores NMDA se encontraba relacionada a la disminución de la respuesta motora hacia la cocaína o a estímulos novedosos (Kelley & Swanson 1997; Dong et al. 2006; Huang et al. 2008), estos datos sugieren que la activación de los receptores de glutamato en el NAc involucran la interrupción tanto de la alimentación (AMPA/Kainato) como de los procesos motores (NMDA), y esto podría explicar el resultado observado en la tarea RF4, en donde se interrumpió el consumo de alimento sólido (Fig. 14B), además del líquido y las secuencias motoras instrumentales (Fig. 13 y 15).

Dicho efecto en la interrupción de las secuencias motoras o del consumo fue diferente en intensidad y duración dependiendo de la motivación por parte del sujeto como se mostró en las Figuras 13B, 16C y 20F, lo cual sugiere que posterior a

la fotoestimulación, la predicción de una recompensa con alto valor motivacional (en este caso el pellet de chocolate) mantiene activo al NAc, probablemente debido a una mayor liberación de dopamina por parte de VTA (Cacciapaglia et al. 2012; Saddoris et al. 2013; Stuber & Sparta 2011), misma que podría causar la reducción de la duración del efecto en la ejecución de acciones relacionadas a la entrega del pellet de chocolate (Taha & Fields 2005; Burton et al. 2015).

La interferencia de la motivación en el efecto generado por la fotoestimulación puede explicarse por el modelo de circuito en espiral del NAc (Fig. 3), de esta manera al activar NAc shell se regula la actividad de la sustancia nigra (relacionada a acciones motoras), además de regular la actividad de circuitos relacionados a la motivación y a la recompensa como son el VTA y el DMS (Burton et al. 2015; Belin & Everitt 2008)

Francesco Mannella propone que el NAc shell está involucrado en la generación de una conducta dirigida a la meta, evaluando las circunstancias para obtener la recompensa y en la toma de decisiones (Mannella et al. 2013), sin embargo al activar las aferencias glutamatérgicas al NAc durante la prueba de devaluación el sujeto continuó trabajando aun en ausencia de una recompensa física de manera similar a la condición control, como si éstas no estuvieran involucradas en la generación de una conducta dirigida a la meta sino en el hábito (Fig. 17A). Esto puede explicarse porque la fotoestimulación probablemente sea en sí misma una recompensa artificial para el sujeto, la cual no fue posible de devaluar. La única devaluación que afectó a la ejecución de la tarea en los sujetos silvestres, fue la de sacarosa, con lo cual sugerimos que el pellet de chocolate fue tan recompensante que no fue posible devaluarlo o que incluso pudo haber generado una especie de hábito como las drogas de adicción. Bruinsma en 1999 mencionó que el chocolate puede generar efectos conductuales y adictivos similares a los de las drogas de abuso (Bruinsma & Taren 1999). El pellet de chocolate sólo pudo devaluarse en los sujetos Thy1-ChR2 en los que la activación de las aferencias glutamatérgicas pudo haber interrumpido la conducta tipo hábito con el chocolate y haber generado una

conducta dirigida a la meta (Fig. 17C). Sin embargo al realizar el experimento de extinción sin devaluar las recompensas (Fig. 18), sorprendentemente la activación de estas aferencias glutamatérgicas ayudó a mantener el valor motivacional de las recompensas aun en ausencia de ellas, lo cual es diferente a lo que mencionó Mannella de que el NAc actúa en la selección de las acciones en base al resultado a esperar (Mannella et al. 2013); de esta manera al mantener la conducta aun en ausencia de recompensa física y mantener los mismo tiempos como en una sesión normal da evidencia de que la activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc se encuentra involucrada también en la formación y mantenimiento del hábito, como lo señaló Belin en el 2008 de acuerdo al circuito en espiral del NAc (Belin & Everitt 2008; Everitt 2014), y de esta forma también se corrobora lo que mencionó Britt en el 2012 acerca de que la fotoestimulación sirve para reforzar la conducta instrumental (Britt et al. 2012).

El hecho de que el sujeto mantenga el valor motivacional de las recompensas puede deberse a la generación de nuevas conexiones neuronales, ya que la activación de los receptores NMDA y AMPA/kainato se encuentran relacionadas a la generación de nuevas sinapsis y a la neuroadaptación en sujetos adictos a cocaína (Hernandez et al. 2005; Schmidt & Pierce 2010)

La intensidad y duración del efecto de la fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas al NAc no fue permanente y éste se modificó al cambiar ya sea de tarea (contexto) o de recompensa, como lo observado en el último experimento en el cual la recompensa líquida de sacarosa fue cambiada por agua, observándose que el efecto de la fotoestimulación durante el consumo de esta recompensa en la tarea RF4 fue mayor en comparación con la tarea de libre consumo de las sesiones 7 a 10 (Fig. 20D-20F), dando evidencia de que la fotoestimulación de las aferencias glutamatérgicas al NAc afectan los procesos relacionados a la conducta dirigida a la meta, ya que la intensidad y duración del efecto dependió del valor motivacional que tenga el sujeto hacia las recompensas .

CONCLUSIÓN

Los datos de esta tesis soportan la idea de que la activación de las aferencias glutamatérgicas al NAc interrumpe el consumo, el acto oromotor, la conducta apetitiva (de aproximación) y la secuencia de acciones asociadas a la entrega de una recompensa. La intensidad y duración del efecto es dependiente del valor motivacional de la recompensa, siendo mayor conforme menor es el valor de la recompensa. La activación de las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc juegan un papel importante en la generación de estímulos recompensantes, pero además se encuentra involucrado en el mantenimiento del valor motivacional de las recompensas, mismo que no es constante y puede cambiar dependiendo de las circunstancias. De este modo se da evidencia de que las aferencias glutamatérgicas que proyectan al NAc se encuentran involucradas en la conducta dirigida a la meta y el mantenimiento del hábito (debido a sus propiedades reforzantes) y que además puede tener un papel importante en la transición de una conducta a otra por medio de la regulación en espiral de otras estructuras por parte del NAc. Sin embargo se necesita realizar otras investigaciones, como lo es el registro electrofisiológico de DLS y DMS, para corroborar esta hipótesis.

REFERENCIAS

Arenkiel, B.R. et al., 2007. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron*, 54(2), pp.205–18. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3634585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Asher, A. & Lodge, D.J., 2012. Distinct prefrontal cortical regions negatively regulate evoked activity in nucleus accumbens subregions. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 15(9), pp.1287–94. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3419342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Balleine, B.W. & Dickinson, a, 1998. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, 37(4-5), pp.407–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704982>.

Balleine, B.W. & O’Doherty, J.P., 2010. Human and rodent homologies in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), pp.48–69.

Belin, D. & Everitt, B.J., 2008. Cocaine Seeking Habits Depend upon Dopamine-Dependent Serial Connectivity Linking the Ventral with the Dorsal Striatum. *Neuron*, 57(3), pp.432–441.

Boyden, E.S. et al., 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience*, 8(9), pp.1263–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116447>.

Britt, J.P. et al., 2012. Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron*, 76(4), pp.790–803. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.040>.

Bruinsma, K. & Taren, D.L., 1999. Chocolate: food or drug? *Journal of the American Dietetic Association*, 99(10), pp.1249–56. DOI: 10.1016/S0002–8223(99)00307–7.

Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002822399003077>.

Burton, A.C., Nakamura, K. & Roesch, M.R., 2015. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiology of learning and memory*, 117, pp.51–9. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742714000860>.

Cacciapaglia, F. et al., 2012. Differential dopamine release dynamics in the nucleus accumbens core and shell track distinct aspects of goal-directed behavior for sucrose. *Neuropharmacology*, 62(5-6), pp.2050–2056. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.027>.

Cogle, J.R. et al., 2011. Termination of washing compulsions: a problem of internal reference criteria or “not just right” experience? *Journal of anxiety disorders*, 25(6), pp.801–5. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887618511000685>.

Dezfouli, A. & Balleine, B.W., 2012. Habits, action sequences and reinforcement learning. *European Journal of Neuroscience*, 35(7), pp.1036–1051.

Dong, Y. et al., 2006. CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nature neuroscience*, 9(4), pp.475–477. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16520736.

Everitt, B.J., 2014. Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories - indications for novel treatments of addiction. *European Journal of Neuroscience*, 40(1), pp.2163–2182.

Fiala, A., Suska, A. & Schlüter, O.M., 2010. Optogenetic approaches in neuroscience.

Current Biology, 20(20), pp.897–903.

Gremel, C.M. & Costa, R.M., 2013. Orbitofrontal and striatal circuits dynamically encode the shift between goal-directed and habitual actions. *Nature communications*, 4(May), p.2264. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026062&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Groenewegen, H.J. et al., 1999. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, pp.49–63.

Gruber, A.J. & McDonald, R.J., 2012. Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6(August), pp.1–26.

Haberny, S.L. & Carr, K.D., 2005. Food restriction increases NMDA receptor-mediated calcium-calmodulin kinase II and NMDA receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated cyclic amp response element-binding protein phosphorylation in nucleus accumbens upon D-1 dopamine receptor. *Neuroscience*, 132(4), pp.1035–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857708>.

Hernandez, P.J. et al., 2005. AMPA/kainate, NMDA, and dopamine D1 receptor function in the nucleus accumbens core: a context-limited role in the encoding and consolidation of instrumental memory. *Learn Mem*, 12(3), pp.285–295. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15930507.

Huang, Y.H. et al., 2008. CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: A critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(5), pp.2751–2760.

Kelley, A.E. et al., 2005. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology & behavior*, 86(5), pp.773–795. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16289609.

Kelley, A.E. & Swanson, C.J., 1997. Feeding induced by blockade of AMPA and kainate receptors within the ventral striatum: A microinfusion mapping study. *Behavioural Brain Research*, 89(1-2), pp.107–113.

Krause, M. et al., 2010. A pause in nucleus accumbens neuron firing is required to initiate and maintain feeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(13), pp.4746–4756.

Mannella, F., Gurney, K. & Baldassarre, G., 2013. The nucleus accumbens as a nexus between values and goals in goal-directed behavior: a review and a new hypothesis. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 7(October), p.135. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3805952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

McCracken, C.B. & Grace, A.A., 2013. Persistent cocaine-induced reversal learning deficits are associated with altered limbic cortico-striatal local field potential synchronization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(44), pp.17469–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3812511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Mogenson, G.J., Jones, D.L. & Yim, C.Y., 1980. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in neurobiology*, 14(2-3), pp.69–97.

Morris, R., 1985. Thy-1 in developing nervous tissue. *Developmental neuroscience*, 7(3), pp.133–160. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2866949>.

Robbins, T.W. et al., 1989. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 13(2-3), pp.155–162.

Rossi, M. a. & Yin, H.H., 2012. Methods for studying habitual behavior in mice.

Current Protocols in Neuroscience, 1(SUPPL.60), pp.1–13.

Saddoris, M.P. et al., 2013. Rapid dopamine dynamics in the accumbens core and shell: learning and action. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5(4), pp.273–88.

Available at: [/pmc/articles/PMC3897221/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3897221/?report=abstract).

Salgado, S. & Kaplitt, M.G., 2015. The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotactic and functional neurosurgery*, 93(2), pp.75–93. Available at:

<http://www.karger.com/Article/FullText/368279>.

Schmidt, H.D. & Pierce, R.C., 2010. Cocaine-induced neuroadaptations in glutamate transmission: potential therapeutic targets for craving and addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1187, pp.35–75. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201846>.

Schneider, M. & Koch, M., 2005. Behavioral and morphological alterations following neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in rats. *Exp Neurol*, 195(1), pp.185–198. Available at:

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WFG-4G9932F-2-H&_cdi=6794&_user=532038&_pii=S0014488605001664&_origin=search&_coverDate=09%2F30%2F2005&_sk=998049998&view=c&wchp=dGLzVlb-zSkzk&md5=80326b0de7d011f8440562eeb8ac205d&ie=/sdarticle.pdf.

Sesack, S.R. & Grace, A.A., 2010. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), pp.27–47.

Smith, K.S. & Graybiel, A.M., 2014. Investigating habits: strategies, technologies and models. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8(February), p.39. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3921576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Song, S.S. et al., 2014. Optogenetics reveals a role for accumbal medium spiny neurons expressing dopamine D2 receptors in cocaine-induced behavioral

- sensitization. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, p.336. Available at:
<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnbeh.2014.00336/abstract>.
- Stalnaker, T. a et al., 2010. Neural correlates of stimulus-response and response-outcome associations in dorsolateral versus dorsomedial striatum. *Frontiers in integrative neuroscience*, 4(May), p.12.
- Stratford, T.R. & Kelley, A.E., 1999. Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(24), pp.11040–11048. Available at:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10594084.
- Stuber, G. & Sparta, D., 2011. Amygdala to nucleus accumbens excitatory transmission facilitates reward seeking. *Nature*, 475(7356), pp.377–380. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775282/>.
- Taha, S. a & Fields, H.L., 2005. Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(5), pp.1193–1202.
- Tecuapetla, F. et al., 2010. Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(20), pp.7105–7110.
- Thorndike, E.L. & Jelliffe, 1912. Animal Intelligence. Experimental Studies. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 39(5), p.357.
- Ting, J.T. & Feng, G., 2013. Development of transgenic animals for optogenetic manipulation of mammalian nervous system function: Progress and prospects for behavioral neuroscience. *Behavioural Brain Research*, 255, pp.3–18. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.037>.

Tye, K.M., 2012. Glutamate Inputs to the Nucleus Accumbens: Does Source Matter? *Neuron*, 76(4), pp.671–673. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.008>.

Tye, K.M. & Deisseroth, K., 2012. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), pp.251–266. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3171>.

Wang, L. et al., 2014. Optogenetic activation of GABAergic neurons in the nucleus accumbens decreases the activity of the ventral pallidum and the expression of cocaine-context-associated memory. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 17(5), pp.753–63.