



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

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Control optogenético de los circuitos neuronales
relacionados con la alimentación”**

Tesis que presenta

M. en C. Luis Ernesto Prado Rodríguez

**Para obtener el grado de Doctor en Ciencias
en la especialidad de**

Farmacología

Director de la tesis:

Dr. Ranier Gutierrez Mendoza

México, D.F.

Junio 2017

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de neurobiología del apetito, del departamento de Farmacología del CINVESTAV. Con el apoyo del CONACyT a través de la beca doctorado (para Luis Prado) y el Consejo Nacional de Ciencias CB 179484, ICyTDF-PICSA 12-126 Productos Medix 001276, Fronteras de la ciencia #63 y Problemas Nacionales #464 (para Ranier Gutierrez)

Índice

Resumen.....	6
Abstract.....	8
INTRODUCCIÓN	10
El cerebro y su estimulación selectiva	10
¿Qué es la optogenética?	11
¿Para qué sirve la optogenética?	13
Uso de la optogenética para controlar la alimentación	16
Participación del Núcleo Accumbens Shell en la alimentación	17
Justificación.....	25
Hipótesis	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Materiales y métodos	26
Animales	26
Experimentos conductuales.....	26
Implantación de fibras ópticas.....	29
Registros con Optrodo	29
Análisis de datos y estadística	30
Resultados	33
Patch Clamp en rebanadas de cerebro:	33
Estudios conductuales	35
<i>La activación optogenética de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh detienen el consumo de sacarosa</i>	35

<i>Un sólo pulso de luz de 30ms es capaz de interrumpir transitoriamente el consumo de sacarosa</i>	38
El ratón Thy1-ChR2 es capaz de aprender a lengüetear en un bebedero vacío para auto-estimularse	40
La estimulación óptica de las fibras del aNAcSh detiene la alimentación de sacarosa, pero no disminuye la ingesta total de sacarosa.	45
Correlatos neuronales en el aNAcSh durante la tarea de estimulación independiente de la conducta.....	46
La activación optogenética de las fibras glutamatérgicas aferente al aNAcSh conduce a la activación in las neuronas locales registradas en el aNAcSh.	50
Actividad poblacional durante la estimulación optogenética.	51
Respuestas durante el periodo de láser y el de tiempo fuera predicen el tiempo que tomará al animal a regresar a lengüetear después de ser estimulado.....	54
Las neuronas moduladas por la alimentación y las modulaciones inducidas por la activación optogenética de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh	55
La estimulación optogenética en el aNAcSh modula las neuronas de la corteza medial prefrontal (mPFC)	58
La estimulación optogenética de las fibras del aNAcSh modula la actividad neuronal en el hipotálamo lateral (LH)	61
Latencias evocadas en aNAcSh, LH y mPFC debidas a la estimulación de las fibras de aNAcSh.....	64
Discusión.....	67
Estudios conductuales	69
Vías dopaminérgicas y glutamatérgicas aferentes y eferentes del aNAcSh	70
Respuestas poblacionales en el aNAcSh, LH y mPFC evocadas por la estimulación de las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh.....	71
Red neuronal y propagación mono y polisináptica.....	72

Conclusiones.....	74
Bibliografía	76

Índice de figuras

Figura 1. Desarrollo de la optogenética.....	15
Figura 2 Influencia de la activación optogenética de las neuronas AgRP y POMC del núcleo arcuato sobre la alimentación	16
Figura 3 Esquema del microcircuito estriatal del núcleo accumbens	18
Figura 4 La actividad del NAcSh controla bidireccionalmente la alimentación:.....	19
Figura 5 La activación optogenética de las neuronas MSND1+ del NAcSh suprime el consumo de azúcar.	20
Figura 6. La activación optogenética de las neuronas GABAérgicas del LH es suficiente para inducir alimentación	21
Figura 7 La vía homeostática (por necesidad) vs. la vía hedónica (gratificante).....	23
Figura 8. La activación de los inputs glutamatérgicos del NAcSh provenientes ya sea del hipocampo ventral, la amígdala o de la corteza prefrontal es recompensante.....	24
Figura 9. La activación optogenética de los axones glutamatérgicos aferentes activa MSNs y FSI en el aNAcSh..	34
Figura 10. La estimulación optogenética global de las fibras del aNAcSh detienen transitoriamente el lengüeteo y demoran el reinicio del consumo de sacarosa.	38
Figura 11. Un solo pulso de luz es suficiente para para detener transitoriamente el lengüeteo de sacarosa.	40
Figura 12. Los ratones Thy1-ChR2 son capaces de lengüetear en un bebedero vacío para auto-estimular las fibras del aNAcSh	43
Figura 13. La activación glutamatérgica de las fibras del aNAcSh es recompensante .	44

Figura 14. Estimulación óptica de las fibras del aNAcSh detiene transitoriamente la alimentación, pero no disminuye la cantidad total ingerida de sacarosa.....	49
Figura 15. La activación de las fibras glutamatérgicas activa las neuronas en el aNAcSh y detiene el consumo de sacarosa.....	53
Figura 16. Modulaciones relacionadas a la alimentación y durante la estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas.	57
Figura 17. La estimulación optogenética de las fibras del aNAcSh es capaz de activar antidrómicamente a las neuronas del mPFC.	60
Figura 18 La estimulación optogenética de las fibras del aNAcSh modula la frecuencia de disparo de las neuronas de LH	63
Figura 19. La estimulación optogenética de las fibras del aNAcSh rápidamente recluta la actividad de una red neuronal que comprende al mPFC, LH y al mismo aNAcSh.....	66

RESUMEN

Aunque la liberación de la dopamina mesoacumbal ha sido clásicamente relacionada con la sensación de recompensa, estudios recientes señalan la importancia de la interacción entre la dopamina y el glutamato. Un componente importante del sistema de recompensa del cerebro es la parte anterior del Núcleo Accumbens Shell (aNAcSh), la cual envía proyecciones GABAérgicas hacia el Hipotálamo Lateral (LH) y a su vez recibe un gran número de inputs glutamatérgicos desde, entre otros sitios, la Corteza Medial Prefrontal (mPFC). No obstante, a los muchos estudios, los efectos de la activación glutamatérgica del aNAcSh sobre la alimentación y la recompensa, así como su efecto sobre la actividad del LH y mPFC aún no se conocen bien. Por lo que, en esta tesis estudiamos el comportamiento de ratones transgénicos que expresan el canal activado por luz channelrhodopsin 2 (ChR2), específicamente en las fibras glutamatérgicas que inervan al aNAcSh mientras registramos la actividad eléctrica extracelular de las neuronas localizadas en el aNAcSh, LH o mPFC. Encontramos que la estimulación de las fibras glutamatérgicas que convergen en el aNAcSh de ratones Thy1-ChR2 –hambrientos- fue capaz de detener –temporalmente y de igual forma- el consumo de sacarosa o el lengüeteo a un bebedero vacío. La estimulación de dichas fibras aferentes fue capaz de activar (o inhibir de forma indirecta) la actividad unitaria extracelular en el aNAcSh, LH y mPFC. Una población de pMSNs del aNAcSh que se modulaba de forma inhibitoria durante el consumo de azúcar, también fue activada mediante la estimulación óptica de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh, lo que sugiere su relevancia en la interrupción de la alimentación, esto basado en estudios previos que han demostrado que las neuronas del aNAcSh que se inhiben durante la alimentación son las que principalmente proyectan monosinápticamente al LH, esta última región ha sido clásicamente relacionada con la alimentación. El aspecto de recompensa de la foto estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh se observó cuando el ratón Thy1-ChR2 fue capaz de aprender a introducir su nariz a un orificio (nose-poke) o a beber de un bebedero vacío para autoestimularse, lo que indica que la estimulación masiva de estas fibras es recompensante en el sentido de querer (o wanting en inglés). Adicionalmente los registros unitarios revelaron que la estimulación de las fibras excitatorias aferentes del aNAcSh produce ambas respuestas mono y polisinápticas distribuidas en las tres

regiones cerebrales registradas. En resumen, encontramos que la activación de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh es recompensante y que temporalmente inhibe la alimentación. En esta tesis, he establecido por primera vez que la activación de las fibras glutamatérgicas en el aNAcSh temporalmente detiene la alimentación (sin importar el sabor o su componente calórico, ya que también detiene el lengüeteo de un bebedero vacío) y ya que los ratones son capaces de auto-estimularse es a la vez recompensante. Por otra parte, hemos caracterizado las respuestas neuronales unitarias extracelulares de los componentes de una red hedónica que comprende el aNAcSh, LH y mPFC la cual es reclutada por la activación glutamatérgica de las fibras aferentes del aNAcSh que están involucradas en la codificación de una señal de valencia positiva importante para el componente de querer (wanting) una recompensa y que detiene temporalmente las acciones consumatorias, tales como el lengüeteo.

ABSTRACT

Although the release of mesoaccumbal dopamine is certainly involved in rewarding responses, recent studies point to the importance of the interaction between it and glutamate. One important component of this network is the anterior nucleus accumbens shell (aNAcSh), which sends GABAergic projections into the lateral hypothalamus (LH) and receives extensive glutamatergic inputs from, among others, the medial Prefrontal Cortex (mPFC). The effects of glutamatergic activation of aNAcSh on the ingestion of rewarding stimuli, as well as its effect in the LH and mPFC are not well understood. Therefore, we studied behaving mice that express a light-gated channel (ChR2) in glutamatergic fibers in their aNAcSh while recording from neurons in the aNAcSh, or mPFC or LH. In Thy1-ChR2, but not WT, mice activation of aNAcSh fibers transiently stopped the mice licking for sucrose or an empty sipper. Stimulation of aNAcSh fibers both activated and inhibited single unit responses aNAcSh, mPFC and LH, in a manner that maintains firing rate homeostasis. One population of licking-inhibited pMSNs in the aNAcSh was also activated by optical stimulation, suggesting their relevance in the cessation of feeding. A rewarding aspect of stimulation of glutamatergic inputs was found when the Thy1-ChR2 mice learned to nose-poke to self-stimulate these inputs, indicating that bulky stimulation of these fibers are rewarding in the sense of wanting. Stimulation of excitatory afferents evoked both mono- and polysynaptic responses distributed in the three-recorded areas. In summary, we found that activation of glutamatergic aNAcSh fibers is both rewarding and transiently inhibits feeding.

Significant statement

We have established that the activation of glutamatergic fibers in the aNAcSh transiently stops feeding and yet, since mice self-stimulate, is rewarding in the sense of wanting. Moreover, we have characterized single-unit responses of distributed components of a hedonic network (comprising the aNAcSh, mPFC and LH) recruited by activation of glutamatergic aNAcSh afferents that are involved in encoding a positive valence signal important for the wanting of a reward and that transiently stops ongoing consummatory actions such as licking.

INTRODUCCIÓN

El cerebro y su estimulación selectiva

El cerebro es el órgano más complejo y representa la última frontera del conocimiento en la biología. El cerebro humano está conformado por 85 mil millones de células gliales y más de 86 mil millones de neuronas (Herculano-Houzel 2009) estas últimas están selectivamente conectadas entre sí, formando un gran conectoma funcional de ensambles neuronales, de cuya actividad eléctrica emergen todas las funciones cerebrales, desde el caminar hasta la conciencia misma. Enfermedades tan comunes como el Parkinson, el Alzheimer, la esquizofrenia y diversas adicciones, por nombrar algunas, tienen su origen en disfunciones cerebrales. Por tal motivo, el estudio del funcionamiento del cerebro es fundamental para entender las causas de éstas y otras enfermedades y para comprender quiénes somos como especie humana y que es lo que nos hace únicos como personas. Los potenciales de acción son la vía fundamental de transmisión de códigos neurales, la generación y propagación de los potenciales de acción requiere de la entrada de iones de sodio para despolarizar la membrana celular, seguida de una salida de iones de potasio que sea capaz de restablecer el potencial de membrana, repolarizando así a la neurona, para llevar a cabo la entrada y salida de iones es necesaria la participación de canales iónicos y bombas, principalmente.

Para entender el funcionamiento de los ensambles neuronales es necesario poder activar o inhibir con precisión temporal de milisegundos a un grupo específico de neuronas con una función similar (e.g, a las neuronas relacionadas a la alimentación), sin afectar a otras neuronas encargadas de otras funciones (e.g., el control motor) las cuales pueden estar espacialmente entremezcladas. El control de la actividad neuronal de forma selectiva ha sido el reto tecnológico más importante y el sueño de muchos neurocientíficos. En la última década hemos sido testigos de grandes avances en el entendimiento del funcionamiento del cerebro, sin embargo, estos logros han sido limitados debido a la organización tan compleja del mismo. El cerebro contiene varios

cientos de tipos distintos de neuronas (Figura 1A), que están entremezcladas entre sí, de tal forma que si estimulamos con impulsos de corriente eléctrica una región del cerebro, afectaríamos la actividad de todos los grupos neuronales que se localizan en el tejido, trayendo como consecuencia efectos secundarios indeseados, de igual forma, si utilizamos genética tradicional podemos obtener control tejido específico pero no precisión temporal y, el control farmacológico no nos ofrece ni control tejido específico ni temporal (Gradinaru et al. 2010). Para resolver este problema, se ha desarrollado una técnica de vanguardia llamada **optogenética** (Deisseroth et al. 2006).

¿Qué es la optogenética?

La optogenética combina métodos ópticos (destellos de luz proveniente de un láser o un LED) con métodos genéticos para transferir a un grupo específico de neuronas, genes que codifican proteínas de origen microbiano sensibles a la luz, llamadas opsinas. (Deisseroth et al. 2006, Gradinaru, Thompson and Deisseroth 2008, Zhang et al. 2010, Zhang et al. 2006). Esta es una tecnología de vanguardia que inició su desarrollo en el 2005 por el Dr. Karl Deisseroth (Boyden et al. 2005), de la Universidad de Stanford y en el 2010 la revista Nature Methods la nombró el método más importante del año (Deisseroth 2011).

Las bases de la optogenética se encuentran en el estudio de un organismo unicelular, el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, (Figura 1B) y su capacidad para moverse hacia una fuente de luz. Los doctores Peter Hegemann, el Dr. Georg Nagel, y el Dr. Ernst Bamberg, descubrieron una proteína llamada Channeloropsina 2 (ChR2) por medio de la cual ésta alga se puede desplazar hacia la luz (Nagel et al. 2003). Ante la estimulación con una luz de 473nm (luz azul), el ChR2 se abre permitiendo el paso de iones a través del gradiente electroquímico de la célula ($H^+ > Na^+ > K^+ > Ca^+$) (Figura 1C) (Boyden et al. 2005). Pocos años después del descubrimiento de la ChR2, el profesor Dr. Karl Deisseroth, Feng Zhang y el Dr. Ed Boyden se les ocurrió la idea de utilizar métodos estándares de ingeniería-genética para introducir el gen de la ChR2 en neuronas de roedores (Figura

1D), las neuronas de forma normal no expresan ChR2, de tal forma que las neuronas genéticamente modificadas pueden expresar el canal ChR2. Después de aproximadamente 2 meses las neuronas expresan niveles suficientes de ChR2 en el soma y dendritas (Figura 1E) como para permitir que un simple pulso de luz azul dirigido a través de una fibra óptica y una fuente de luz, abra el ChR2 permitiendo la entrada de Na^+ al interior de la neurona y produciendo una despolarización del potencial de membrana y un potencial de acción (Figura 1 F).

La optogenética permite manipular la actividad de las neuronas con precisión temporal de milisegundos gracias a la aplicación controlada de destellos luminosos que inciden en la función de los canales de sodio sensibles a la luz, expresados en poblaciones neuronales definidas, para poder controlar la actividad neuronal es necesario que las neuronas contengan en toda su membrana, el canal ChR2 y para lograrlo se pueden utilizar un virus que sea capaces de infectar e incorporar el material genético necesario para que las neuronas expresen dicho canal, (Zhang et al. 2010) o bien, animales transgénicos que ya expresan constitutivamente el canal como parte de su genoma (Wang et al. 2007, Arenkiel et al. 2007) y éstos animales han sido utilizados para estudiar el circuito neuronal involucrado en Parkinson, (Gradinaru et al. 2009) la relación entre la corteza motora y la corteza somatosensorial (Matyas et al. 2010) entre otros. De tal forma que la aplicación controlada de haces de luz provoca potenciales de acción lo que permite estudiar la función de aquellas neuronas que el experimentador eligió previamente y, de manera importante, sin afectar a las que se encuentran en el entorno, ya que no son sensibles al haz luminoso.

A través de estrategias genéticas, los genes de las opsinas microbianas, se pueden introducir a neuronas genéticamente definidas (Zhang et al. 2010). Estas opsinas son componentes únicos (no requieren de la adición de cofactores) sensibles a la luz ya sean canales permeables a iones (e.g., ChR2) o bombas de aniones (NpHR) con cinéticas de activación-inactivación en el rango de milisegundos (Zhang et al. 2007). Cuando estas opsinas se expresan en la membrana neuronal, las opsinas pueden literalmente transformar pulsos de luz en cambios en el potencial de membrana,

desencadenando la generación de impulsos eléctricos o potenciales de acción (Boyden et al. 2005, Gradinaru et al. 2007).

Las herramientas de optogenética pueden clasificarse en dos grandes categorías: los canales sensibles a la luz (Boyden et al. 2005) que inducen despolarización de la neurona como es el caso de *Chlamydomonas channelrhodopsin-2* (ChR2), (Boyden et al. 2005, Zhang et al. 2006), *Volvox channelrhodopsin-1* (VChR1) (Zhang et al. 2008) y una segunda clase conformada por *Natronomonas halorhodopsin* (NpHR) que hiperpolarizan a la neurona (Gradinaru et al. 2008, Zhang et al. 2007) .

Para lograr la activación es necesario introducir a las neuronas el canal permeable a iones Channelrhodopsin-2 (ChR2), que mediante la estimulación con un haz de luz, se abre, permitiendo el paso de iones ($H^+Na^+K^+Ca^+$) (Nagel et al. 2003) al interior de la neurona, logrando la despolarización de esta y, combinando ChR2 con una fuente capaz de prender y apagar rápidamente un haz de luz de 473nm es posible generar un sólo potencial de acción o, mediante una liberación sostenida de luz generar trenes de potenciales de acción, mientras que la inhibición de la actividad neuronal se logra mediante la bomba de Cl^- , NpHR, proveniente del alga *Natronomonas pharaonis*, que al ser estimulada permite el paso de Cl^- al interior de la neurona logrando una hiperpolarización de esta, inhibiendo su actividad.

¿Para qué sirve la optogenética?

La mayor aportación de la optogenética es por supuesto científica, ya que permite determinar el efecto causal y funcional entre la actividad de un grupo de neuronas genéticamente definidas y su efecto en la conducta. Este método servirá para identificar a las poblaciones celulares implicadas en diversos padecimientos y apoyará en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Además, el método en sí mismo promete utilidad terapéutica. Por ejemplo, el grupo de neuronas que responde al tratamiento del Parkinson mediante estimulación eléctrica profunda, fue recientemente identificado con estrategias optogenéticas (Gradinaru et al. 2009). Además, la optogenética ha servido

para controlar ataques epilépticos en modelos animales experimentales (Tonnesen et al. 2009). Así mismo, se ha descubierto el papel primordial que juegan las neuronas dopaminérgicas en generar conductas adictivas a la cocaína (Tsai et al. 2009). Así como otros grupos de neuronas que son importantes para potenciar o evitar la adicción a la cocaína (Lobo et al. 2010).

El control neuronal del sueño y vigilia ha podido ser manipulado a voluntad mediante la optogenética. La activación optogenética de neuronas llamadas hipocretinas interrumpe el sueño de un animal profundamente dormido (Adamantidis et al. 2007). En tanto que la inhibición optogenética de estas neuronas provoca un estado inmediato de sueño profundo en animales que estaban despiertos al momento de aplicar el estímulo luminoso (Tsunematsu et al. 2011). Estos hallazgos han sentado las bases para desarrollar fármacos que modulen el sueño y para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sueño, como la narcolepsia (Kroeger and de Lecea 2009).

Células ajenas al sistema nervioso central también pueden ser manipuladas optogenéticamente con fines de estudio y en terapias experimentales. Estos métodos han permitido recuperar la vista a ratones ciegos (Chow et al. 2011). Por otro lado, la función cardíaca es potencialmente controlable optogenéticamente, de tal forma que si una arritmia ocurre, a través de un pulso de luz azul, el corazón nuevamente bombea sangre al ritmo de la luz (Deisseroth 2011). Este descubrimiento tiene el potencial para generar el primer marcapaso basado en pulsos de luz y optogenética. Así mismo ya se han realizado, con éxito, los primeros experimentos de optogenética en primates no-humanos (Diester et al. 2011). Así pues, los descubrimientos han sido numerosos en tan poco tiempo y sus aplicaciones vastas, este es un campo de investigación novedoso en las neurociencias.

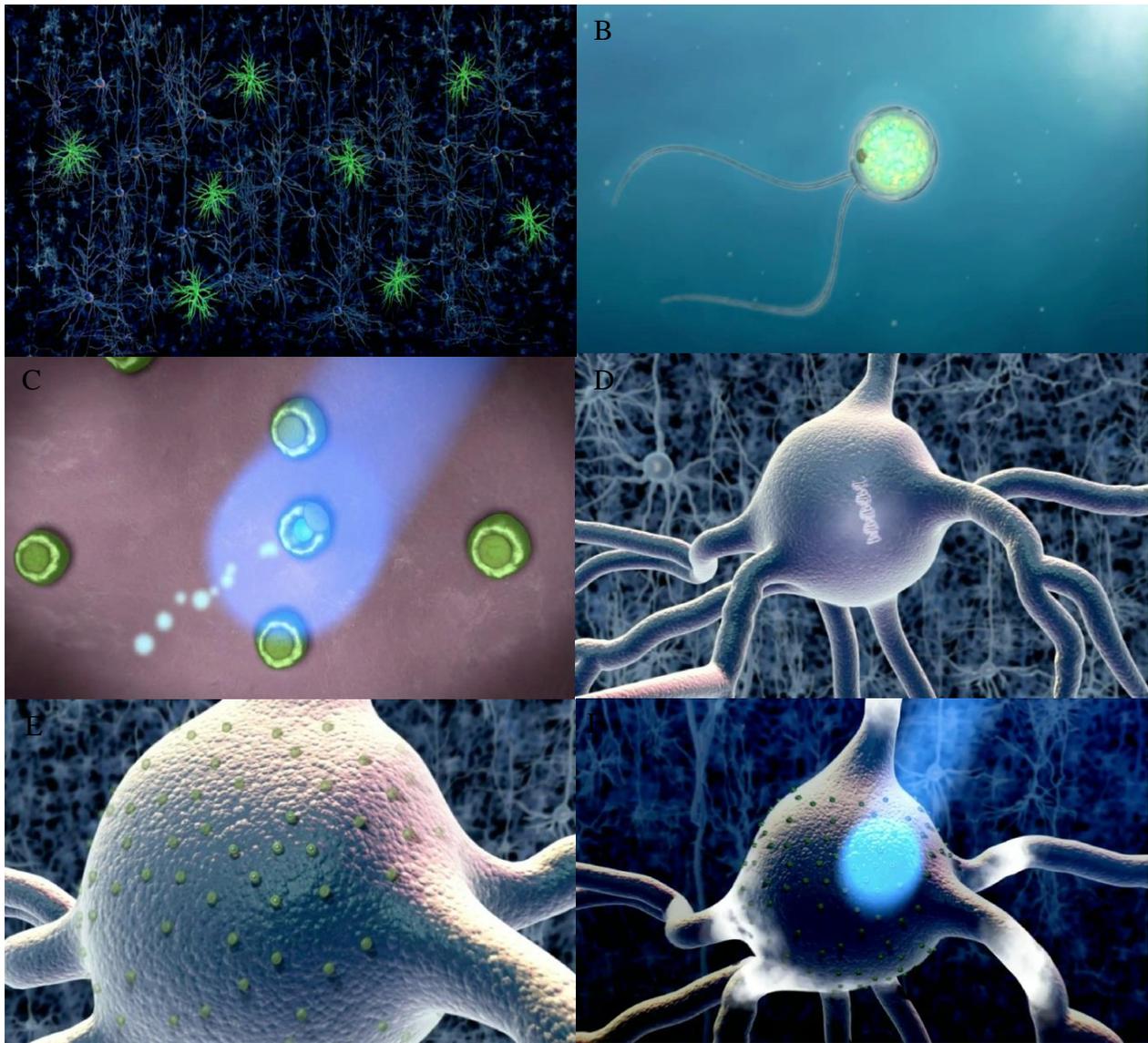


Figura 1. Desarrollo de la optogenética.

El cerebro está conformado por distintos grupos neuronales entremezclados entre sí (A) lo que ha dificultado estudiar su funcionamiento, en respuesta a este problema, a partir del 2005 se desarrolló una técnica llamada optogenética que nos permite el estudio de la función de grupos neuronales genéticamente definidos sin afectar la respuesta de otros adyacentes. El desarrollo de la optogenética comenzó con la observación de un canal sensible a la luz perteneciente a alga *chlamydomonas reinhardtii* (B) el canal, conocido como channelrhodopsin 2, (ChR2) al ser estimulado con luz azul permite el paso de iones (C), posteriormente se introdujo ChR2 a las neuronas (D), comúnmente por medio de virus y, una vez que se ha expresado ChR2 en las neuronas genéticamente definidas (E) se pueden producir potenciales de acción en las neuronas por medio de la estimulación de los canales ChR2 con luz azul (F). (Adaptado de http://www.ted.com/talks/ed_boyden?language=en)

Uso de la optogenética para controlar la alimentación

Nuestro laboratorio se ha dedicado al estudio de los circuitos neurales relacionados con la alimentación y la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos que ayuden a combatir el problema de la obesidad, por lo que, son de nuestro particular interés los estudios que por medio de la aplicación de la optogenética ha permitido controlar las conductas de consumo de alimento. Por ejemplo, uno de los primeros descubrimientos en este respecto fue que la activación selectiva de un grupo de neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (NPY-AGRP) causa un apetito voraz incluso en animales saciados. Por otra parte, la activación de otro grupo de neuronas, las -POMC-, localizadas en la misma región del cerebro, reduce el apetito y produce pérdida de peso corporal en menos de 24 h de su estimulación continua (Aponte, Atasoy and Sternson 2011). Lo que ha generado enormes expectativas en torno a nuevos tratamientos para disminuir el sobrepeso. Como se hablará más adelante, estos dos grupos neuronales forman parte de la vía homeostática, la cual integra señales periféricas de saciedad (como la leptina, liberada en los adipositos) o de señales hambre como la ghrelina (liberada en el fundus del estómago) y regula la alimentación cuando una demanda energética se presenta (ver Figura 7)

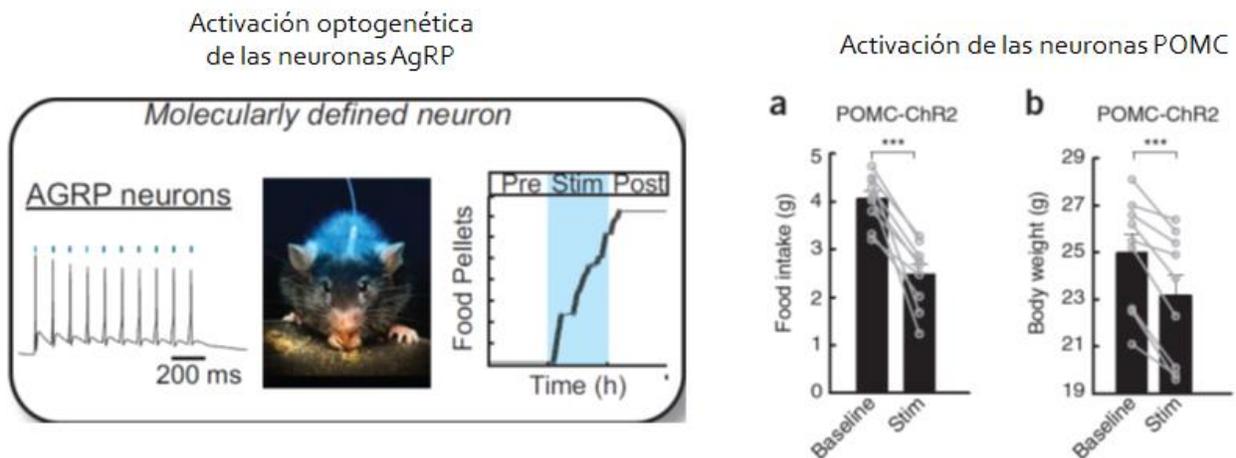


Figura 2. Influencia de la activación optogenética de las neuronas AgRP y POMC del núcleo arcuato sobre la alimentación.

En esta figura se puede observar que mientras que la activación optogenética de las neuronas AgRP del núcleo arcuato del hipotálamo tiene una influencia positiva (la incrementa) sobre la

alimentación, la activación de las neuronas POMC de la misma zona del cerebro disminuye dicha conducta e induce pérdida de peso. Adaptado de (Aponte et al. 2011)

Participación del Núcleo Accumbens Shell en la alimentación

El inicio de la alimentación voluntaria depende de varios factores entre los cuales se incluye el sabor de la comida, su valor hedónico y el estado metabólico del sujeto (Lutter and Nestler 2009) y, aunque se han descrito péptidos y hormonas que regulan el apetito (Cegla, Tan and Bloom 2010) los mecanismos neurales que regulan a la alimentación no han sido completamente elucidados. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el control del apetito, a nivel central, involucra redes neuronales que requieren de la acción coordinada de ensambles neuronales distribuidos a través de diversas regiones del cerebro involucradas con el sabor y la recompensa (Gutierrez and Simon 2011, Simon et al. 2006) y como parte de dichos circuitos se encuentra el Núcleo Accumbens Shell (aNAcSh) y el Hipotálamo Lateral (LH). Las neuronas GABAérgicas espinosas medianas o medium spiny neurons (MSNs del inglés) conforman la mayor población (90-97%) del núcleo accumbens (Humphries and Prescott 2010) y se ha demostrado que existen dos principales poblaciones neuronales en el núcleo accumbens una que expresa el receptor D1 (MSND1+) y otra que expresa el receptor D2 (MSND2+) a dopamina (ver Figura 3). Del 3 al 10% en este núcleo están compuestos por interneuronas que han sido clasificadas como interneuronas colinérgicas gigantes (o TANs – también llamadas ChAT), y otros tres tipos de interneuronas GABAérgicas unas que expresan somatostatina, otras parvalbumina (también llamada Fast Spiking por su capacidad para disparar muy rápido) y las restantes expresan calretinina (Matamales et al. 2009).

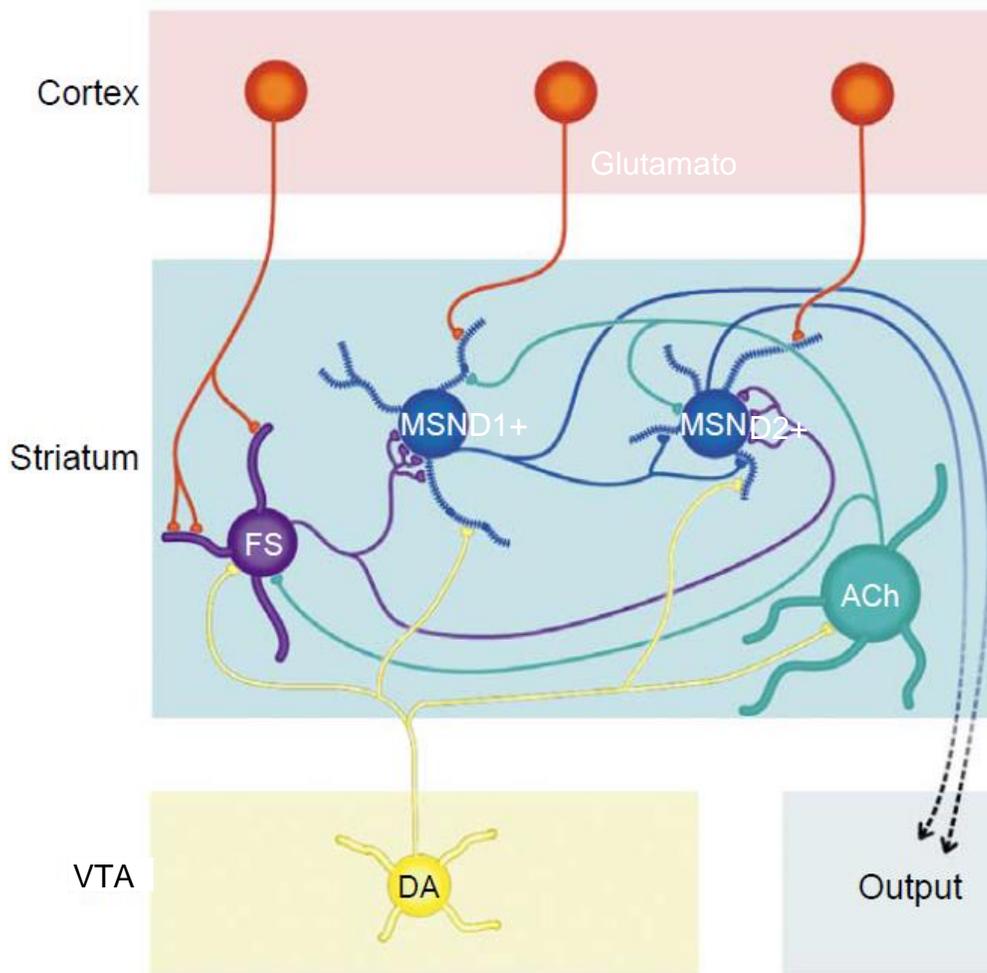


Figura 3. **Esquema del microcircuito estriatal del núcleo accumbens.**

El estriado recibe proyecciones de la corteza (específicamente de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza las cuales son glutamatérgicas) que tienen por objetivo las MSN's e interneuronas Fast-Spiking (FS). El estriado recibe proyecciones del sistema mesolímbico, y en el caso del NAc, de terminales axonales dopaminérgicas provenientes del área ventral tegmental (neuronas DA amarillas). Las interneuronas FS están involucradas en el control del ritmo de disparo de las MSN's, su principal objetivo sináptico. Las interneuronas colinérgicas (ACh verdes) por su parte modulan la actividad de las neuronas MSN's y de las interneuronas FS (Tepper and Bolam 2004a).

El NAcSh es un componente fundamental del sistema de recompensa debido a que recibe grandes cantidades de dopamina de las neuronas del área ventral tegmental (VTA), pero también recibe una modulación excitadora muy importante de fibras

glutamatérgicas provenientes principalmente de la corteza prefrontal (principalmente de las neuronas piramidales de la capa V cortical). Adicionalmente a su participación en procesos de recompensa y adicción (Lobo et al. 2010), el NAcSh también se ha involucrado con el control de la alimentación. Por ejemplo, en un estudio reciente se demostró que, la estimulación eléctrica del NAcSh inhibe transitoriamente la conducta de alimentación sugiriendo que es necesaria una pausa en la actividad neuronal del núcleo accumbens para que ocurra la alimentación (Krause et al. 2010). Lo anterior también fue abordado inhibiendo farmacológicamente el NAcSh mediante inyecciones de muscimol, un agonista de los receptores GABA_A, produciendo un aumento en la alimentación (Stratford, Kelley and Simansky 1999), ver Figura 4.

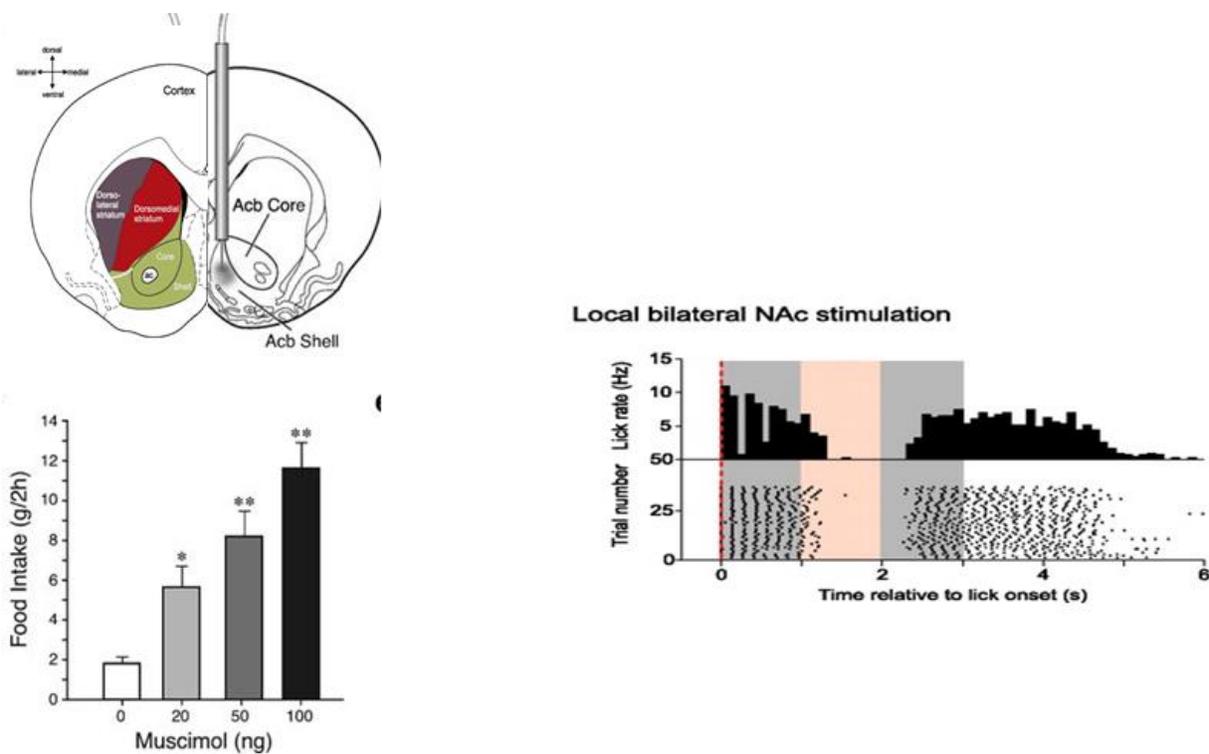


Figura 4 La actividad del NAcSh controla bidireccionalmente la alimentación.

Específicamente, su inactivación farmacológica promueve el consumo, mientras que su activación a través de la estimulación eléctrica suprime el consumo de sacarosa. Se muestra en el panel de la izquierda la inactivación farmacológica del NAcSh por medio de muscimol, un agonista gabaérgico, se puede observar que la inactivación aumenta de manera dosis dependiente el consumo de alimento (Kelley et al. 2005), mientras que en el panel de la derecha

inyección de muscimol en el LH se revierte de manera dosis-dependiente la hiperfagia inducida por inyecciones de muscimol en el núcleo accumbens shell (Stratford and Kelley 1999) así como también se observó que, las infusiones de muscimol en el accumbens shell reducen la expresión de c-Fos en el LH (Baldo et al. 2004, Stratford and Kelley 1999) y la infusión de muscimol sólo en el LH no induce hiperfagia (Stratford and Kelley 1997). Estos resultados sitúan al NAcSh y su comunicación con el LH como un circuito de gran relevancia para identificar mejores blancos terapéuticos para el tratamiento de la obesidad. De hecho (Jennings et al. 2015) recientemente descubrió que la activación optogenética de las neuronas GABAérgicas del LH es suficiente para que los animales coman de forma voraz, mientras que la ablación de estas neuronas produce anorexia y pérdida de peso (Ver Figura 6).

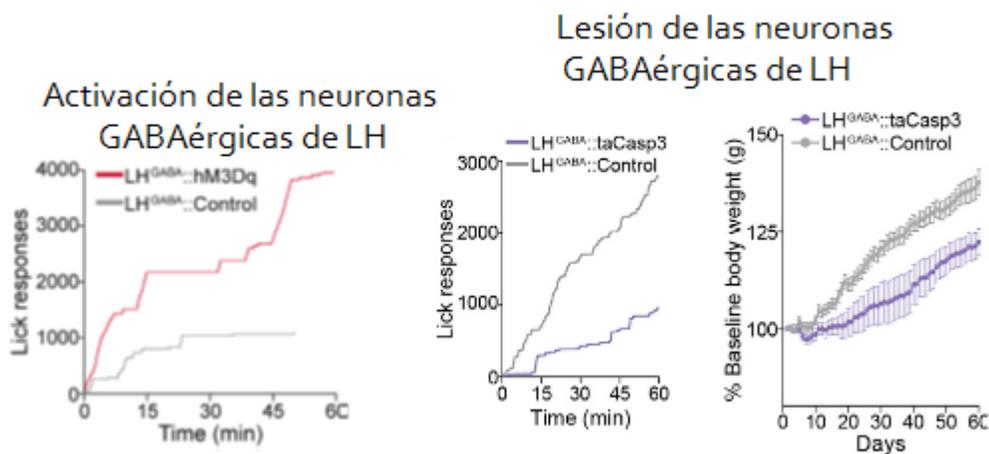


Figura 6. La activación optogenética de las neuronas GABAérgicas del LH es suficiente para inducir alimentación, mientras que su lesión (a través de la activación de la vía de las caspasas) reduce el consumo e induce pérdida de peso, modificado de (Jennings et al. 2015).

La estimulación cerebral profunda, del núcleo accumbens, ha sido sugerida como un posible tratamiento para la obesidad en humanos (Halpern et al. 2008). Sin embargo, esta posibilidad aún no se ha llevado a la práctica clínica de forma generalizada. A pesar de que la aplicación de la optogenética en humanos aún no está permitida, su uso en

roedores que expresan ChR2 para activar el núcleo accumbens con pulsos de luz azul, es quizá la alternativa más viable para obtener una respuesta definitiva a la pregunta de si la estimulación de este núcleo reduce la motivación por comer alimentos palatables, y para identificar a un grupo de neuronas que inducen la disminución del apetito y pérdida de peso con la finalidad de poder identificar nuevos y más eficientes blancos farmacológicos para el control y tratamiento integral de la obesidad.

Gracias al advenimiento de la optogenética recientemente ha quedado claro que la alimentación es regulada a través de dos vías: 1) la vía homeostática (por necesidad) o 2) por la vía hedónica (por placer). La primera vía nos permite comer para recuperar las demandas energéticas que nuestro cuerpo demanda, mientras que la segunda vía nos

permite comer de más, aunque estemos saciado (por tal motivo este circuito no está directamente ligado al número de calorías consumidas).

En la Figura 7 se muestra a los grupos de neuronas que conforman a cada una de estas vías.

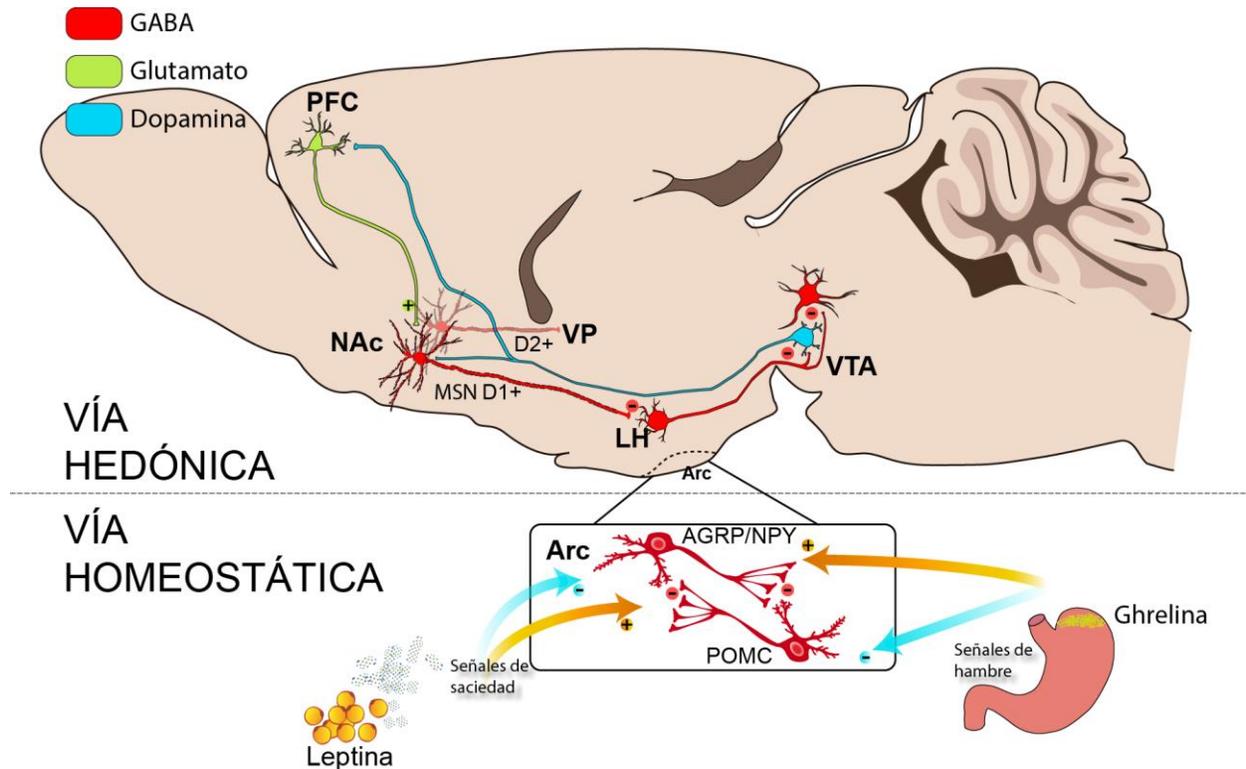


Figura 7. La vía homeostática (por necesidad) vs. la vía hedónica (gratificante).

El tipo de neurotransmisor que expresa cada neurona está indicado en color. La vía hedónica está conformada por las neuronas glutamatérgicas de la corteza PFC, de las neuronas MSND1+ del NAc, las neuronas gabaérgicas del LH y las neuronas gaba y dopaminérgicas del VTA. Mientras que la vía homeostática está conformada por las neuronas AGRP y POMC ambas gabaérgicas. Estas neuronas reciben directamente las señales periféricas de saciedad y hambre (Dibujo original).

Como se mencionó anteriormente el NAcSh no sólo participa en la alimentación también es parte del sistema de recompensa del cerebro. Aunque es indudable el papel que juega la liberación de dopamina en el NAcSh para inducir la sensación de recompensa, recientemente se ha demostrado que la activación de las terminales glutamatérgicas del NAcSh las cuales hacen sinapsis con las neuronas MSND1+ y MSND2+ es también recompensante (Britt et al. 2012). Ellos reportaron que la activación de estas fibras

glutamatérgicas sin importar de donde provengan (hipocampo ventral, amígdala o corteza prefrontal) es *per se* recompensante (ver Figura 8). Lo que indica que es más importante que se libere glutamato en el NAcSh -que su fuente- para inducir la sensación de recompensa, aunque ellos no evaluaron sus efectos sobre la alimentación.

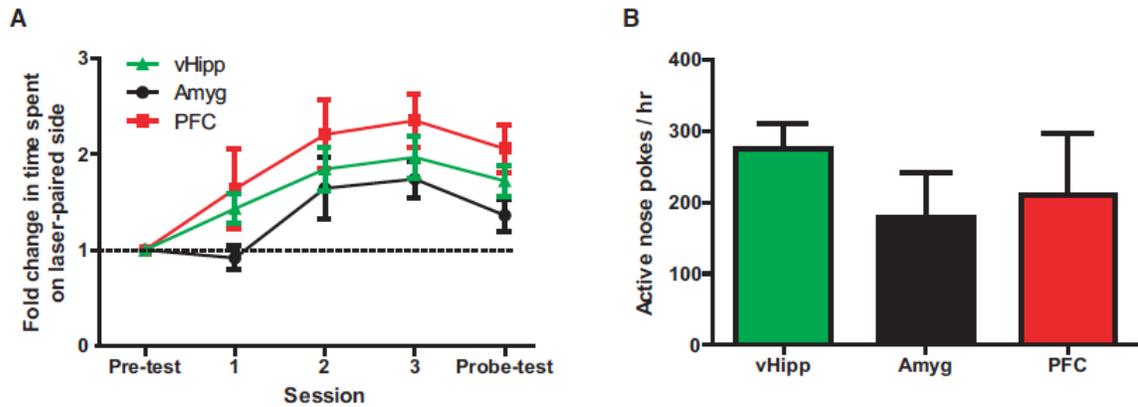


Figura 8. La activación de los inputs glutamatérgicos del NAcSh provenientes ya sea del hipocampo ventral, la amígdala o de la corteza prefrontal es recompensante (Britt et al. 2012).

Estos resultados nos sugirieron *que la activación de estas fibras glutamatérgicas va a ser recompensante, pero basados en que la activación eléctrica del NAcSh detiene la alimentación* en esta tesis proponemos que la activación optogenética masiva e indiscriminada de las fibras glutamatérgicas que inervan al NAcSh va a ser recompensante y también va a detener el consumo de alimentos palatables.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica que ha alcanzado niveles pandémicos, su presencia promueve el desarrollo de otros padecimientos mortales como la diabetes, el Alzheimer y algunos tipos de cáncer. Por lo que es fundamental describir cuales son los circuitos neuronales que controlan la alimentación para poder desarrollar mejores tratamientos para el sobrepeso y la obesidad. La idea principal de esta tesis es determinar la participación de las fibras glutamatérgicas que proyectan al NAcSh en el control de la alimentación y de la recompensa.

HIPÓTESIS

La activación de los inputs glutamatérgicos del NAcSh reclutará la actividad de la corteza prefrontal, del NAcSh y del hipotálamo lateral y será recompensante (es decir, los animales se autoestimularán), además de que -en animales hambrientos- detendrá el consumo de sacarosa.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de las fibras glutamatérgicas del NAcSh en procesos de recompensa y en el control de la alimentación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Utilizar al ratón transgénico Thy1-ChR2 como un modelo para estimular las fibras glutamatérgicas del NAcSh
2. Caracterizar la participación de estas fibras en la recompensa y en la alimentación

3. Determinar el circuito neuronal que se modula al activar optogenéticamente a las fibras glutamatérgicas que proyectan al NAcSh

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los animales utilizados fueron de la cepa B6.Cg-Tg (Thy1-*COP4/EYFP*) 18Gfng/J (*Thy1-ChR2-EYFP line 18*) adquiridos de Jackson Laboratory (USA RRID: IMSR_JAX:007612) se compraron ratones para poner un pie de cría y después fueron cruzados y criados en el bioterio de CINVESTAV. Dichos ratones (Thy1-ChR2 para futuras referencias) expresan el canal de iones activado por luz, Channelrhodopsin-2 (ChR2) acoplado a la expresión de la proteína amarillo fluorescente (EYFP) que cumple la función de reportero, bajo el control del promotor de thymus cell antigen 1 (*Thy1*) (Arenkiel et al. 2007). Para todos los experimentos se utilizaron hembras y machos de 3 a 7 meses de edad, ya que la expresión de thy 1 es suficiente cuando los animales son adultos (Porrero et al. 2010). Todos los procedimientos fueron realizados con la aprobación del comité de cuidado y uso de animales de laboratorio del CINVESTAV-IPN

Experimentos conductuales

Freely Licking task: En esta tarea conductual el animal es libre de beber cuando desee y cada ensayo consiste de tres etapas (1) antes de que se encienda el láser (control) (2) durante el periodo de tiempo que el láser está encendido (láser) y (3) el periodo posterior al término del patrón del láser (time out) (Figura 10).

Periodo control: Cada animal tiene que beber sacarosa (10% peso/volumen) dispuesta en un bebedero que dispensa sacarosa por gravedad y en donde el animal tiene que lengüetear al menos 3 veces (licks).

Periodo de láser: En el cuarto lengüeteo el láser (Laserglow technologies, Toronto) es activado durante un segundo a diferentes frecuencias (sin estimulación (control), 4, 7 14 ó 20 Hz con una duración del pulso de 30ms) en orden pseudoaleatorio de tal forma que el animal no puede predecir qué frecuencia de estimulación recibirá.

Time out: durante un segundo posterior a la estimulación el láser no puede ser activado nuevamente, durante este segundo, el animal puede seguir bebiendo si le es posible. Figura 10 una vez terminado el time out el animal puede beber cuando lo desee y una vez que empiece a hacerlo inicia un nuevo ensayo, se requieren otra vez de 3 lengüeteos en el periodo control, en el cuarto comienza un segundo de estimulación, después un segundo de time out y así sucesivamente hasta el final del experimento (30 minutos). También se diseñó un experimento para cuantificar el número de pulsos necesarios a una frecuencia de 20Hz para detener el lengüeteo y los resultados de este experimento se pueden observar en la Figura 11.

Con la finalidad de evaluar si la foto-estimulación de las fibras glutamatérgicas aferentes al NAcSh es recompensante: se diseñó un experimento en el cual los animales fueron entrenados durante 7 días a lengüetear un bebedero que no contenía sacarosa (vacío), pero que si era capaz de encender el láser y foto estimular a los ratones (paneles izquierdos de la (Figura 12). Después de los 7 días los mismos animales fueron puestos en la misma caja conductual pero ahora el bebedero si contenía sacarosa (10% peso/volumen) paneles de la derecha de la Figura 12

Para demostrar que la activación a 20Hz de las fibras glutamatérgicas aferentes al NAcSh en los ratones Thy1-ChR2 es recompensante además de la habilidad de esta estimulación para detener el lengüeteo se entrenó otro grupo de 3 animales para que se auto estimularan en una caja conductual (MedAssociates VT, USA) equipada con dos compartimentos donde el animal podía meter la nariz generando una señal (nose-poke) (Britt et al. 2012). Uno de los puertos era activo y el otro inactivo y después se

intercambiaron para contrabalancear el experimento entre animales. El puerto activo generaba una respuesta sonora por medio de un clicker (MedAssociates VT, USA) y desencadenaba un tren de estimulación óptica a 20Hz (30ms de duración a una potencia de 15mW durante un segundo) seguido por un periodo de espera de 4s (time out) de modo tal que no se podía iniciar otro ensayo hasta que hubiera pasado este periodo de time out. El puerto inactivo, que no genera foto estimulación sólo genera la respuesta sonora en el clicker sin otra consecuencia programada (ver Figura 13). Los animales aprendieron a auto-estimularse en 3-4 días y una vez que tuvieron al menos 4 sesiones continuas con una auto-estimulación estable (Figura 13A), la posición de los puertos, activo e inactivo, fue invertida (Figura13B).

Para determinar el efecto de la foto-estimulación sin que esta sea desencadenada por el propio lengüeteo se diseñó un experimento que se compone por un periodo de 5 minutos de estimulación óptica seguido por un periodo sin estimulación hasta completar 30 minutos (Figura 14). En los periodos en los que el animal es estimulado el ratón recibe un patrón de estimulación que consta de 1 segundo de estimulación continua del láser más 2 segundos con el láser apagado repitiéndose este patrón durante los 5 minutos que dura cada uno de estos periodos (20Hz; 30ms de duración a 15 mW).

Para conocer el correlato neuronal asociado a esta tarea conductual, se registraron las respuestas neuronales mediante el registro de la actividad unitaria extracelular en el aNAcSh en 5 ratones transgénicos, con la adición de 5 minutos anteriores al primer periodo de estimulación (-5 a 0 min) que fueron utilizados para conocer la actividad basal de la actividad neuronal, periodo durante el cual, el animal no tuvo acceso a la sacarosa; en el tiempo 0 el experimentador introdujo manualmente el bebedero que contenía una solución de sacarosa al 10% (peso/volumen) ver (Figura 14 C-E) posterior a estos 5 minutos se siguió registrando la actividad neuronal durante 30 minutos más.

Implantación de fibras ópticas

Todas las fibras (Thorlabs, New Jersey, USA) y los optrodos fueron diseñados y elaborados en el laboratorio fueron implantados unilateralmente en el aNAcSh en las siguientes coordenadas AP=1.2, L=1 y DV=-5. Algunos animales fueron implantados en el hemisferio izquierdo mientras que otros en el derecho del cerebro para contrabalancear los experimentos y no se encontraron diferencias entre hemisferios (datos no mostrados). A algunos animales, adicionalmente a la implantación en el aNAcSh, se les implantó un arreglo de 16 electrodos en uno de los siguientes sitios: Hipotálamo lateral, LH, (AP= -1.34, L= 1.2, DV=-5.1) (Jennings et al. 2015) o Corteza Prefrontal Medial, mPFC, (AP=1.94, L= 0.3 y DV= 2.8). mPFC fue elegido debido a que manda sus proyecciones glutamatérgicas al aNAcSh (Britt et al. 2012)

Registros con optrodo

Los optrodos fueron diseñados y fabricados en el laboratorio y constan de un arreglo de 16 cables de tungsteno (35 μm de diámetro) los cuales se encuentran rodeando, en una configuración circular, a una fibra óptica de 200 μm de diámetro (NA = 0.39) y se implantaron unilateralmente en el aNAcSh. La potencia del láser fue medida en la punta de la fibra óptica por medio de un medidor de potencia (Thorlabs). Durante los experimentos se utilizó una potencia de 15 mW que produce una irradiación calculada de 109 mW/mm^2 . Esta intensidad de luz fue elegida ya que durante los experimentos piloto encontramos que a bajas intensidades (1.5 mW) no se detenía el lengüeteo de los animales (datos no mostrados) mientras que la estimulación a 15 mW de las fibras glutamatérgicas aferentes activan al aNAcSh y detienen transitoriamente la alimentación (lengüeteo).

Análisis de datos y estadística

Análisis de coherencia

La coherencia fue calculada segmentando los trenes de las espigas y de los pulsos de láser (en cada ensayo) en pedazos tratándolos como procesos puntuales binados (Jarvis and Mitra 2001). La coherencia (C) entre la frecuencia del láser y la frecuencia de disparo de las neuronas se realizó utilizando la siguiente formula: $C(f) = I_{xy} / \sqrt{I_{xx}I_{yy}}$, en donde I_{xx} es el espectro de las frecuencias del láser, I_{yy} es el espectro del poder de la actividad neuronal binada, y I_{xy} es el co-espectro multiplicado del espectro de poder del láser y las espigas. Finalmente f es el rango de frecuencia en donde la coherencia fue calculada. Cuatro ventanas de frecuencias fueron utilizadas: (3–5 Hz para detector neuronas con actividad en fase a 4Hz y 6-8 para 7Hz, 13-15 para 14Hz y 19-21 para 20Hz). Nota que la coherencia (C) está normalizada para que tenga valores en el rango entre 0 y 1. El intervalo de confianza de la coherencia $C(f)$ y su umbral de significancia (fue de un $\alpha = 0.05\%$) se calcularon con el método de la navaja de Jack (jackknife) y una corrección de tamaño finito fue aplicada de acuerdo con el procedimiento descrito por (Jarvis and Mitra 2001). Una neurona fue clasificada como coherente con el láser solo si su intervalo de confianza inferior (95%) cruzaba el umbral de significancia (Gutierrez, Simon and Nicolelis 2010).

Clasificación putativa de las neuronas del aNAcSh

Como se detalló previamente (Tellez et al. 2012) las neuronas del aNAcSh se clasificaron putativamente en los siguientes tipos celulares MSNs, Interneuronas de alta tasa de disparo (FSIs), interneuronas ChAT y neuronas que no caen dentro de ninguna de las anteriores categorías U (o no identificadas) de acuerdo a cuatro características: tasa de disparo, coeficiente de variación 2 (CV2), razón valle-amplitud (VAR) (Yarom and Cohen 2011) y amplitud pico-valle (V-P width). En resumen, la tasa de disparo se calculó como el número de disparos dividido entre la actividad de la línea base que se tomó antes que los experimentos (estimulación con el láser) dieran inicio. El CV2 fue calculado para cada

intervalo entre dos intervalos entre espigas adyacentes (ISIs; Inter-Spike-Interval), y el promedio del CV2 fue calculado de acuerdo al tipo neuronal asignado. El CV2 fue calculado como $CV2_ISI_2(ISI2 - ISI1) / (ISI2 - ISI1)$ (Holt et al. 1996). El VAR fue calculado como el valor absoluto del primer valle dividido por la diferencia entre su valor mínimo y el siguiente máximo. Para el cálculo del ancho del pico-valle (V-P width), se calculó el tiempo entre el valor mínimo de la forma del potencial de acción (waveform shape) y de su siguiente máximo. Para cada neurona registrada, se calcularon estas 4 características y todas las neuronas fueron putativamente clasificadas en 4 grupos usando el algoritmo “fuzzy cluster” el cual se visualiza mediante el análisis de componentes principales (PCA) como base, seguido por la gráfica de “fuzzy Sammon’s” como se describe en el algoritmo the MATLAB “Fuzzy Clustering & Data Analysis Toolbox

Análisis de latencia para determinar las respuestas mono o polisinápticas.

El inicio de las respuestas evocadas por los pulsos de luz azul fue calculado usando la estadística de cumsum (Gutierrez et al. 2006) para obtener el primer bin ($1 \text{ ms} \leq$ de resolución) después del primer pulso que provocara un incremento significativo en la frecuencia de disparo por encima de la línea base (-100 a 0ms) que anteceda a la estimulación óptica. La categoría de monosináptica se asignó a las respuestas evocadas que tuvieron una latencia $\leq 10 \text{ ms}$ de acuerdo a lo descrito por (Buonomano 2003)

Preparación de las rebanadas de cerebro

Las rebanadas de cerebro se obtuvieron de ratones adultos Thy1-ChR2. Los ratones fueron profundamente anestesiados con una dosis de 150 mg/kg de ketamina y 30 mg/kg de xilazina i.p. y perfundidos a través del corazón con una solución Ringer fría (en mM) 248 sacarosa, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 23 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 7 glucosa, 1 ascorbato, 3 piruvato, ajustada a un pH 7.3 mediante burbujeo de 95/5% O₂ / CO₂. El cerebro se removió rápidamente y se colocó en un vaso de precipitados que contenía una solución de Ringer fría y oxigenada y se cortó un bloque del cerebro que contenía la región del

estriado. Se cortó en secciones de 250-300 μm en un vibratomo en la misma solución (Pelco 101 Series 1000; Pelco, St. Louis, MO) e inmediatamente se transfirió a una solución normal de Ringer (en mM) 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 1.3 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 glucosa, 1 ascorbato, 3 piruvato, and 0.4 myo-inositol; a justada a un de pH 7.3 mediante burbujeo con 95/5 O_2/CO_2) durante una hora previa al registro. Las rebanadas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso, tras lo cual se transfirieron a la cámara de registro y se sumergieron en una solución buffer oxigenada que fluía continuamente (2-4 ml/minuto)

Registros de célula completa (Whole Cell)

Los registros se realizaron a temperatura ambiente en neuronas localizadas en el aNAcSh y se visualizaron por medio de video-microscopía de interferencia diferencial infrarroja de contraste (IR-DIC) con un objetivo de inmersión de 40X. Las micropipetas para registro fueron de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) con un O.D. de 1.5mm en un puller horizontal (Sutter P-87). La solución interna para los registros fue de (en mM): 120 KMeSO_4 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 2 Na_2ATP , 0.2 GTP, 10 EGTA, 1 CaCl_2 and 0.1-0.3% biocytin (pH 7.3 - 7.4).

Los registros se realizaron con un amplificador Axoclamp (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas localizadas en el aNAcSh se realizaron con pulsos de luz de un ancho de pulso de 2 ms. Al terminar los experimentos se fijaron las rebanadas, que recibieron una inyección de biocitina, mediante inmersión en paraformaldehído al 4% y se almacenaron durante toda la noche a 4°C.

RESULTADOS

Patch Clamp en rebanadas de cerebro:

La estimulación optogenética de los axones glutamatérgicos aferentes activa a las neuronas del estriado.

Para demostrar que la activación optogenética de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh puede evocar potenciales de acción en las neuronas MSNs (y presumiblemente en las interneuronas FSIs (Sciamanna et al. 2015)) se llevaron a cabo registros intracelulares de patch clamp en rebanadas de cerebro de ratones Thy1-ChR2 como se muestra en la Figura 9A. La Figura 9B muestra que, en esas rebanadas, el marcaje es abundante en las fibras del aNAcSh y que no se observan somas marcadas, es decir las neuronas locales del aNAcSh no expresan la ChR2, ya que la ChR2 sólo esta expresada en sus inputs (fibras) glutamatérgicos. No obstante también encontramos que la fotoestimulación de las fibras del aNAcSh evoca potenciales de acción en las MSNs (9C y 9D) identificadas morfológicamente (Figura 9C-2) y por sus propiedades biofísicas y eléctricas (Figura 9C-3). Además, estas corrientes excitatorias de entrada provocadas por la estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas fueron inhibidas por antagonistas de receptores a glutamato tipo AMPA y NMDA (Figura 9E). También encontramos que esta estimulación es capaz de evocar potenciales de acción en interneuronas FSI. Las cuales fueron identificadas eléctricamente como podemos observar en la Figura 9 F-I Estos datos demuestran que la fotoestimulación de las fibras glutamatérgicas aferentes del aNAcSh es capaz de activar el circuito local del aNAcSh. Por lo tanto, se demuestra que la activación optogenética es capaz de evocar potenciales de acción tanto en MSNs como en interneuronas y tomamos esto como base para suponer que esta modulación se presenta en los experimentos descritos a continuación con animales en libre movimiento.

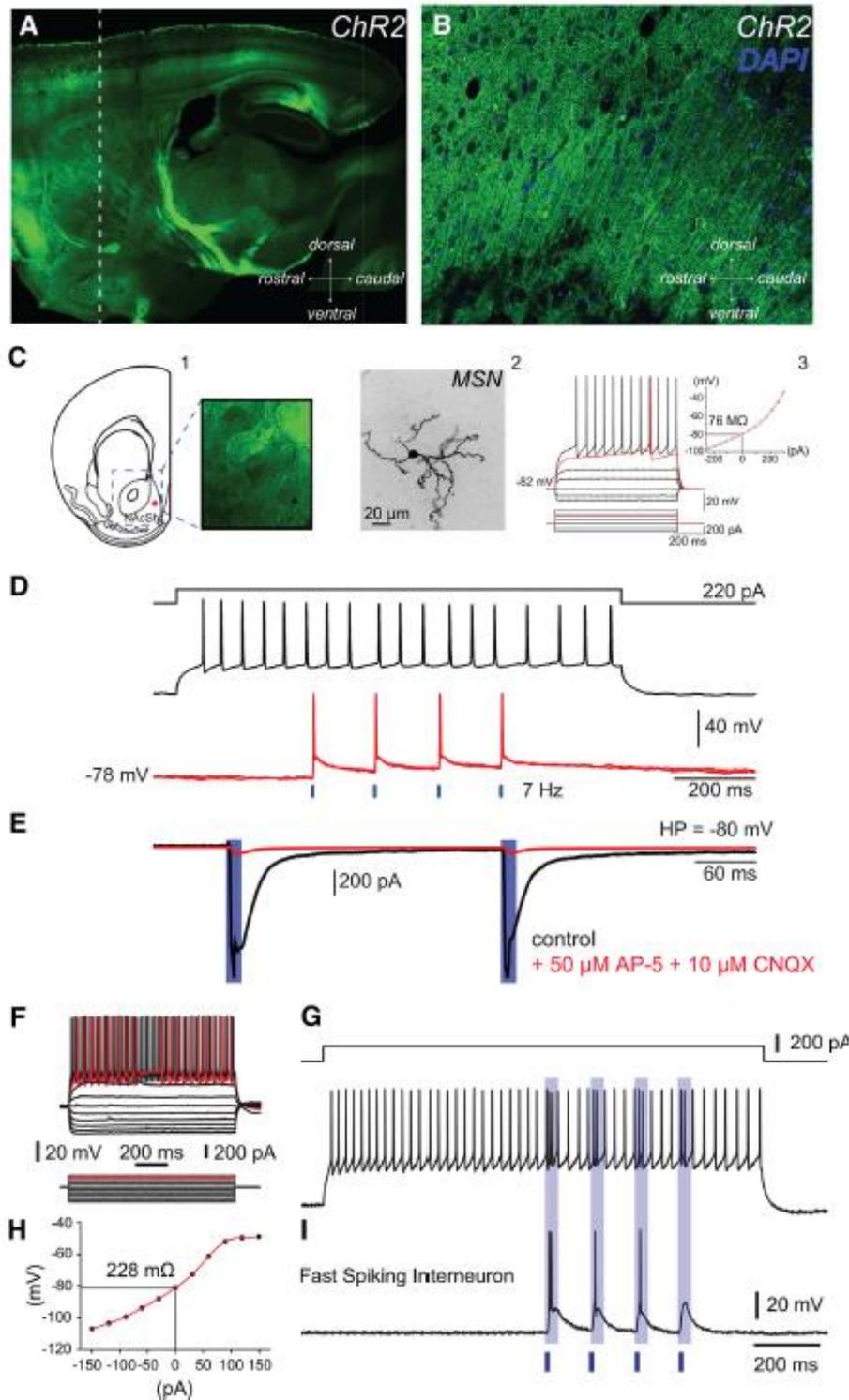


Figura 9. La activación optogenética de los axones glutamatergicos aferentes activa MSNs y FSI en el aNacSh. A. muestra un corte parasagital del cerebro de un ratón transgénico ChR2(H134R)-EYFP. Esta foto muestra la expresión de ChR2 localizada en la capa V de neuronas piramidales de la corteza. **B.** muestra una amplificación de un corte sagital mostrando

los cuerpos celulares en azul marcados con DAPI, demostrando que la expresión de ChR2 no se encuentra en los somas, sino en las fibras que llegan al aNAcSh. C1, Un dibujo con un punto rojo indicando la localización de la neurona MSN registrada intracelularmente. El inset muestra un corte coronal del ratón, nuevamente mostrando la fuerte expresión de ChR2 en fibras. C2, Fotomicrografía de la neurona MSN registrada la cual fue reconstruida con biocitina después de los registros electrofisiológicos. Esta neurona MSN fue localizada en el aNAcSh. C3, Muestra las respuestas de voltaje ante la inyección de corrientes hiperpolarizantes y despolarizantes. D. Las respuestas de voltaje inducidas por la inyección de corriente despolarizante y los potenciales de acción evocados (trazo negro). En la misma neurona la activación optogenética de las terminales glutamatérgicas (2 ms a 7 Hz) evoca una fuerte despolarización de la misma neurona MSN y también induce potenciales de acción (trazo rojo). Registro de voltaje-fijo en la misma neurona MSN demostró que la estimulación optogenética evoca una fuerte corriente de entrada (trazo negro). Pero en presencia de AP-5 y CNQX (50 y 10 μ M; respectivamente antagonistas de receptores NMDA y AMPA), la corriente de entrada fue marcadamente inhibida indicando que la activación optogenética evoca la liberación de glutamato de las fibras y la activación de estos receptores. F. Panel de arriba: muestra las respuestas de una interneurona Fast Spiking Interneuron (FSI) ante la inyección de corriente intracelular (abajo), mostrando su patrón característico de disparo en forma de tartamudo (trazo rojo) y su alta tasa de disparo (trazo negro). H. Se grafica la relación V/I y la resistencia de esta interneurona. G. Un tren de potenciales de acción son evocados ante la inyección de corriente intracelular (arriba). Observa que la frecuencia de disparo incrementó después de la estimulación optogenética. I. Los mismos pulsos de luz azul fueron suficientes para despolarizar y evocar potenciales de acción con un potencial de membrana de reposo (abajo).

Estudios conductuales

La activación optogenética de las fibras glutamatérgicas aferentes del aNAcSh detienen el consumo de sacarosa

Inicialmente nos preguntamos cómo la activación de las fibras glutamatérgicas en el ratón Thy1-ChR2 podría afectar el consumo de sacarosa (en solución al 10% peso/volumen). Esto lo logramos por medio de una tarea sencilla -que no requiere de entrenamiento formal, tomando a nuestro favor la conducta natural de lengüeteo de los ratones y que mantiene todas las características fisiológicas de una conducta consumatoria de alimentación. La tarea consiste de tres etapas: la primera etapa es de línea base, en la cual el animal debe lengüetear en 4 ocasiones seguidas. La etapa de láser, en la cual el láser se enciende durante un segundo y podía ocurrir a diferentes

frecuencias (0, 4, 7, 14 ó 20 Hz). Por último la etapa de tiempo fuera (timeout), donde el láser permanecía apagado durante un segundo, aunque el animal siguiera lengüeteando (Figura 10A). En la Figura 10B y 10C se muestran dos gráficas tipo raster representativas, de un ratón control y de uno Thy1-ChR2 respectivamente, en donde se muestra los lengüeteos de sacarosa (10% P/V) alineados al primer disparo del láser (tiempo=0) en el ensayo. Nótese que para el ratón Thy1-ChR2 a mayor frecuencia menor número de lengüeteos y consecuentemente menor consumo de sacarosa (Figura 10C) y este tipo de respuesta no se observa para al animal control (Figura 10C). Lo que indica que es la activación de las fibras glutamatérgicas (a través del ChR2) y no la luz *per se* lo que detiene el consumo de sacarosa. En la Figura 10D mostramos la cuantificación de este efecto por cada grupo. Se realizó un análisis de ANOVA de dos vías y encontramos diferencia significativa para los grupos $F_{(2,8)}=614$, $P<0.0001$ y para la frecuencia del láser $F_{(4,8)}=36.7$, $P<0.0001$, con una interacción entre grupos y frecuencia significativa $F_{(8,4802)}=64.8$. $P<0.0001$. El análisis *pos hoc* reveló que los animales Thy1-ChR2 detienen el lengüeteo de manera frecuencia dependiente (para todas las P 's=0.001) comparados contra el animal control estimulado con el láser de la misma manera que el ratón transgénico. La respuesta al láser se estabilizó entre 14 y 20Hz ya que no se encontró diferencia significativa entre estas dos frecuencias ($P = 0.41$ n.s. Fig. 10D). Para cuantificar el efecto de la frecuencia de estimulación del láser sobre el lengüeteo, se ajustaron los datos a una sigmoide que nos arroja un valor de 4.75 Hz que es el valor necesario de frecuencia para disminuir en un 50% el lengüeteo ($LI_{50\%}$ = Inhibición del lengüeteo 50%). En contraste, los animales silvestres (WT) no mostraron ninguna modulación dependiente del láser en su lengüeteo para ninguna de las frecuencias de estimulación probadas en este trabajo (Figura 10G). En resumen, estos datos muestran que, a pesar de que los animales fueron privados de agua y comida durante 12h, la estimulación optogenética unilateral de las fibras glutamatérgicas aferentes del aNAcSh detiene transitoriamente el lengüeteo de sacarosa en animales Thy1-ChR2.

En el periodo de tiempo fuera, podemos observar que los ratones transgénicos no regresan a beber inmediatamente como lo hacen los ratones WT y en el caso de transgénicos observamos que mientras más alta es la frecuencia de estimulación, es

menor el número de lengüeteos en ese periodo (Figura 10E) y es mayor el tiempo que tardan en regresar y lengüetear de nuevo (Figura 10F).

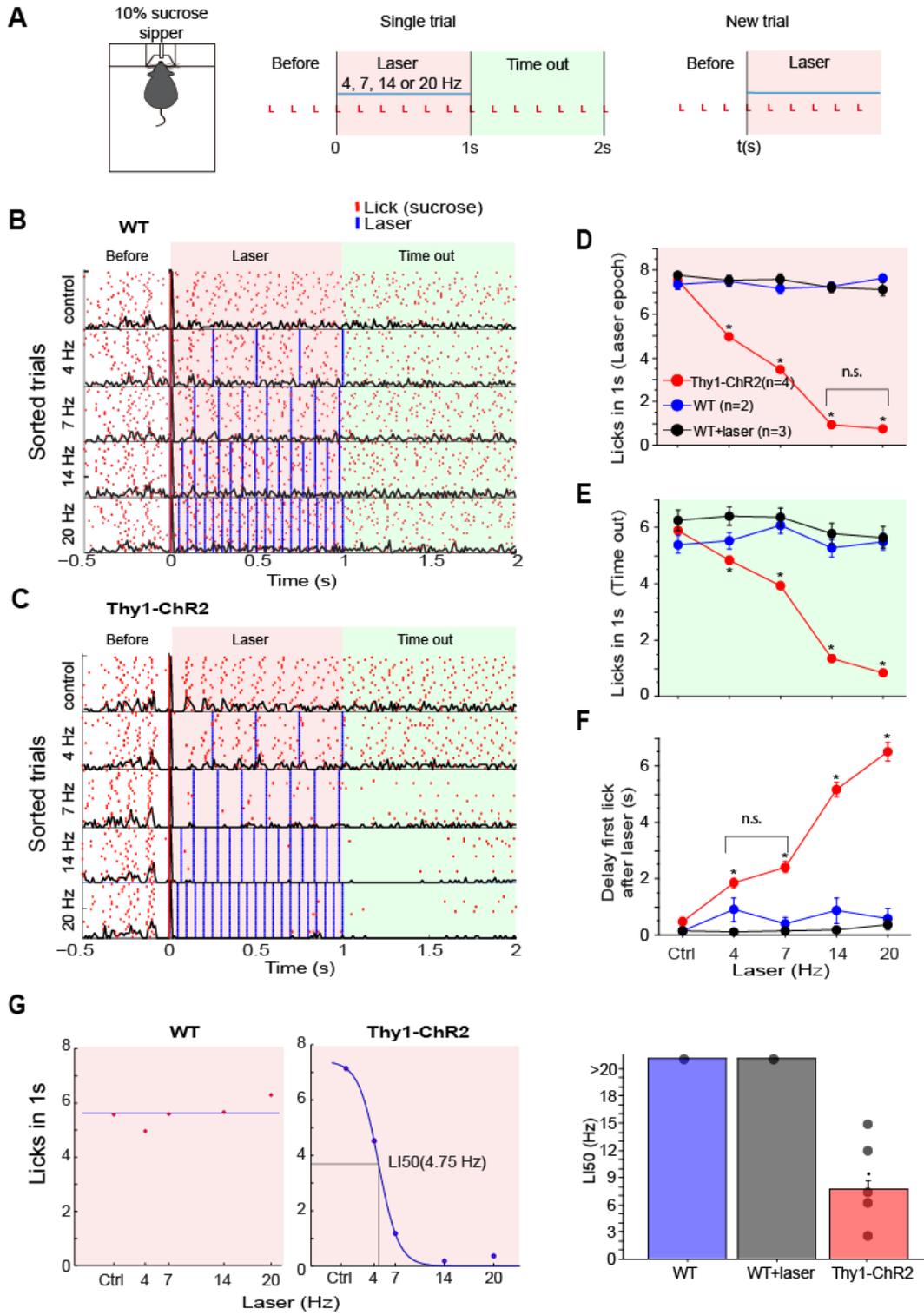


Figura 10. La estimulación optogenética global de las fibras del aNacSh detienen transitoriamente el lengüeteo y demoran el reinicio del consumo de sacarosa.

A. Tarea de lengüeteo de lazo-cerrado, la cual contiene tres periodos: Antes (cuatro lengüeteos), Láser (1 s) y Tiempo fuera (1 s; ver Métodos por más detalles). Cada letra roja “L” indica un lengüeteo dado a un bebedero lleno de sacarosa al 10%. Cada 4 lengüeteos dados después del periodo de Tiempo fuera activa un nuevo periodo de Láser. Por lo que el ratón tiene el control directo sobre el número de ensayos y por ende de veces que el láser se prende (pero no de la frecuencia que recibe). **B** y **C.** Muestra una gráfica tipo raster de los lengüeteos (marcas rojas) de un ratón silvestre (WT wild-type) y del Thy1-ChR2 (respectivamente) alineado (tiempo = 0 s) a la fotoestimulación del aNacSh en función de la frecuencia del láser. **D.** Muestra el número de lengüeteos en el periodo Láser y en **E**, en el periodo de “tiempo fuera”. **F.** Gráfica la demora para reiniciar el primer lengüeteo después del primer pulso del láser. **G.** El valor $LI_{50\%}$ (una medida de la sensibilidad global del ratón ante la fotoestimulación) fue calculada durante los lengüeteos en el periodo del láser. El panel de la izquierda indica el $LI_{50\%}$ de la gráfica tipo raster mostrado en el panel **B**, mientras que el panel de enmedio corresponde al ratón Thy1-ChR2 del panel **C**. El panel de la derecha muestra el valor promedio $LI_{50\%}$ de cada grupo de animales.

Un sólo pulso de luz de 30ms es capaz de interrumpir transitoriamente el consumo de sacarosa

Una vez que observamos que la estimulación optogenética del aNacSh era capaz de detener el lengüeteo, nos preguntamos ¿cuántos pulsos eran necesarios para detener el lengüeteo de sacarosa? Y realizamos en el mismo grupo de animales una versión abreviada del experimento anterior, en la cual los animales recibieron ensayos sin estimulación, o ensayos en los que se les estimulaba con 1, 2, 3 ó 4 pulsos de luz (dados a una frecuencia de 20Hz). Encontramos que un solo pulso de luz fue suficiente para interrumpir transitoriamente el lengüeteo de sacarosa (Figura 11A, ANOVA de dos vías; efecto de grupos $F_{(2,8)}=278$, $P < 0.0001$ y efecto de los pulsos de luz $F_{(4, 8)} = 6.1$, $P = 0.0001$, con una interacción significativa entre grupos y pulsos, $F_{(8, 2217)} = 23.4$, $P < 0.0001$). Sin embargo, la estimulación de un segundo completo 9D es más efectiva deteniendo el lengüeteo comparado con la estimulación de 1, 2, 3 ó 4 pulsos de luz como

observamos en la Figura 11B. Estos resultados, resumidos en la Figura 11B muestran una disminución significativa en el número de lengüeteos en el ratón Thy1-ChR2 comparado con ratones silvestres (P 's < 0.0001) y esta disminución es dependiente del número de pulsos (P 's < 0.01). De la misma forma podemos ver en la Figura 11C el tiempo que les toma a los animales regresar a lengüetear después de ser estimulados, comparado con los grupos control, al grupo Thy1-ChR2 le toma más tiempo regresar a lengüetear (ANOVA de dos vías; efecto de grupo $F_{(2, 8)} = 120.6$, $P < 0.0001$ y efecto de los pulsos de luz, $F_{(4, 8)} = 3$, $P = 0.017$, con una interacción significativa entre grupos y el número de pulsos $F_{(8, 2217)} = 6.37$, $P < 0.0001$). En resumen, la estimulación de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh detiene transitoriamente el lengüeteo por sacarosa, incluso con un solo pulso de luz azul.

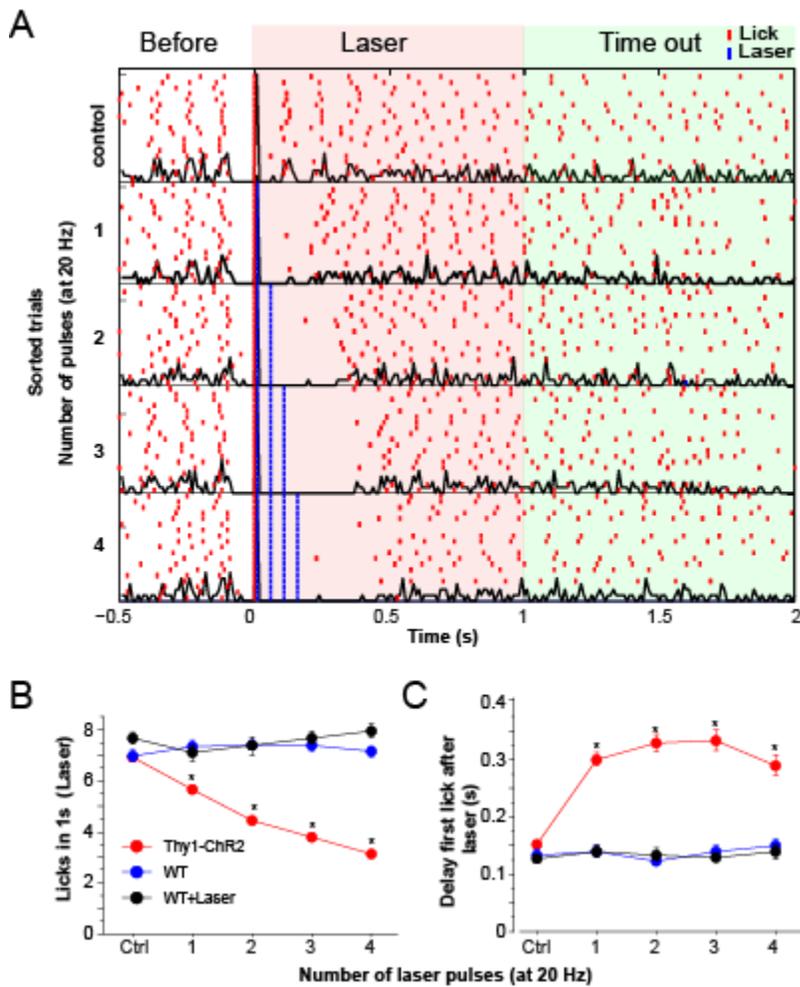


Figura 11. Un solo pulso de luz es suficiente para para detener transitoriamente el lengüeteo de sacarosa. Las mismas convenciones que la Figura 10.

El ratón Thy1-ChR2 es capaz de aprender a lengüetear en un bebedero vacío para auto-estimularse

Dado que la estimulación del aNacSh detuvo el lengüeteo de un estímulo hedónico como la sacarosa en animales Thy1-ChR2, nos preguntamos si el estímulo de luz podría interpretarse como un estímulo aversivo, y para responder esto se utilizó una tarea similar a la de la Figura 10 con la diferencia que en esta tarea el bebedero se encontraba vacío. Utilizamos un grupo de animales ingenuos, es decir que nunca habían probado la sacarosa y durante un periodo de 7 días se pusieron en la tarea a lengüetear el bebedero vacío (Figura 12A columna izquierda y central). Después de estos 7 días, se llenó el

bebedero con sacarosa al 10% y se repitió la tarea durante 3 días más (Figura 12A columna derecha). En la Figura 12A se muestran gráficas tipo raster representativas que ilustran los lengüeteos alineados al inicio del primer pulso del láser, los paneles superiores corresponden a los experimentos conducidos por los animales silvestres (WT), mientras que los inferiores a los animales transgénicos. Podemos observar que los animales WT normalmente evitan lengüetear en un bebedero vacío (Perez et al. 2013). Por ejemplo, se observa que los animales WT no lengüeteen el bebedero vacío (día 1 y 5), pero cuando se le pone el bebedero con sacarosa empiezan a beber ávidamente (día 10). En contraste los ratones Thy1-ChR2 aprendieron a lengüetear el bebedero vacío, en comparación con los animales controles (día 1 y 5) y en el día 10 fueron capaces de beber rápidamente la sacarosa y como se esperaba, cuando estos animales fueron estimulados dejaron de beber. Para los animales Thy1-ChR2 se demostró que la estimulación no es aversiva, al contrario, es recompensante (por lo menos en el sentido de “querer” de acuerdo a la definición de Berridge (Berridge, Robinson and Aldridge 2009) y cómo podemos ver en la Figura 12B los ratones Thy1-ChR2 lengüeteen de un bebedero vacío para autoestimularse. Para el grupo control el número total de lengüeteos y ensayos fue bajo y constante (durante los primeros 7 días). Sin embargo, para el grupo de ratones Thy1-ChR2 tanto el número de lengüeteos como el de ensayos incremento notoriamente hasta el día 5 y a partir de ahí mostró una disminución durante los dos días restantes. Aunque no queda claro porque la autoestimulación no siguió un crecimiento lineal, encontramos que los animales Thy1-ChR2 lengüetearon significativamente más en comparación con los WT en todos los días (ANOVA $F_{(1,10)}=8.1$, $p\text{-value}=0.017$). Dado que no existía un estímulo gustativo (y por lo tanto no había ningún componente gustativo de la recompensa) el incremento en el número de lengüeteos y ensayos indica que los ratones Thy1-ChR2 aprendieron a lengüetear el bebedero vacío para autoestimularse, sugiriendo que la estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh es *per se* recompensante, por lo menos en el sentido de querer. Se encontraron diferencias significativas a lo largo de los 7 días entre el número de lengüeteos y ensayos de los ratones WT y Thy1-ChR2 (factor RMANOVA WT vs. Thy1-ChR2; $F_{(1,24)}=36.44$; $P<0.005$). Los mismos animales fueron probados otra vez en los días 8 a 10 (paneles de la

derecha), sólo que ahora con el bebedero lleno de sacarosa. En estas sesiones, ambos grupos, WT y transgénico produjeron el mismo número de lengüeteos (es decir, consumieron la misma cantidad de sacarosa; RMANOVA, $F_{(1,8)}=0.215$; $P=0.66$) lo que indica que esta estimulación no disminuye el hambre, ni afecta la palatabilidad por la sacarosa. Sin embargo, para alcanzar a beber la misma cantidad de sacarosa que los animales WT, los Thy1-ChR2 realizaron significativamente más ensayos (RM ANOVA, $F_{(1,8)}=8.69$; $P<0.05$).

Adicionalmente, para los dos grupos, analizamos el número de lengüeteos en el periodo de láser en función de la frecuencia y el tiempo que les toma volver a lengüetear después del láser. Como se observa en la Figura 12D, para el grupo transgénico el número de lengüeteos disminuye con el incremento en la frecuencia, tanto para los ensayos con el bebedero vacío como para el que contenía sacarosa. La frecuencia necesaria para inhibir en 50% el número de lengüeteos (para el bebedero vacío, $LI_{50\%}=5.4\pm 1.4$ ($n = 15$); Para el bebedero con sacarosa es $LI_{50\%} = 2.5\pm 0.4$; t test $P=0.14$ ($n=8$); datos no mostrados) lo que indica que independientemente del contenido calórico, la estimulación del aNAcSh detiene transitoriamente el lengüeteo. Los paneles inferiores muestran el tiempo que lleva a los animales volver a lengüetear después de recibir la estimulación optogenética. Se puede observar que en ambos casos los ratones transgénicos retrasaron su regreso a lengüetear en función de la frecuencia de estimulación. En resumen estos datos sugieren que la activación de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh es recompensante, en el sentido de querer y aprendizaje; y que transitoriamente detienen el lengüeteo, independientemente del contenido calórico y del valor hedónico de la sacarosa

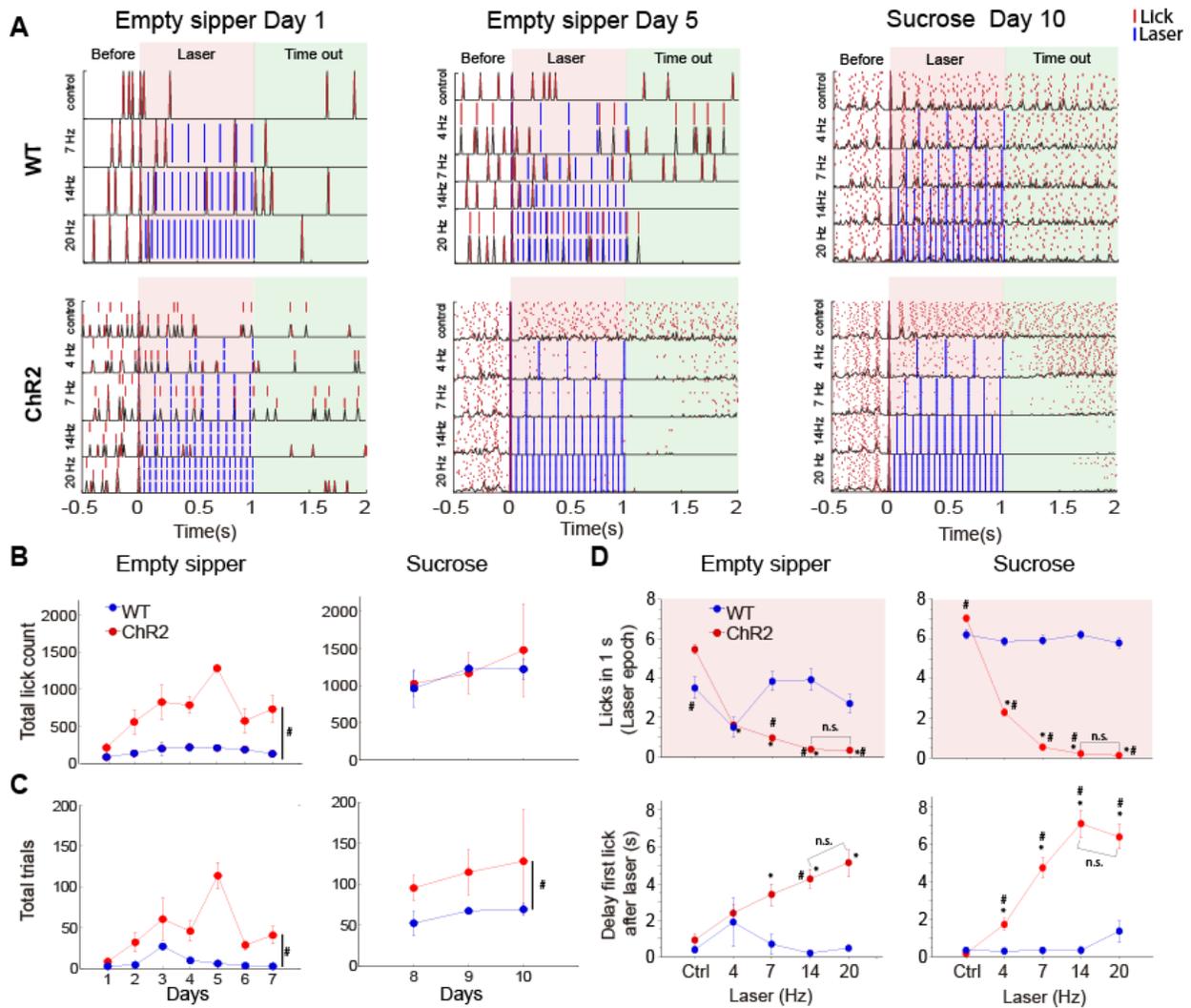


Figura 12. Los ratones Thy1-ChR2 son capaces de lengüetear en un bebedero vacío para auto-estimular las fibras del aNAcSh.

Rasters representativos de un ratón WT (hilera de arriba, $n=3$) y un ratón transgénico (abajo, $n=3$) lengüeteando un bebedero vacío (columnas izquierda y centrales) o de sesiones con el bebedero lleno de sacarosa (columna derecha). **B.** El número de lengüeteos dados en orden cronológico a un bebedero vacío (sesiones 1-7), seguidas de 3 sesiones más con sacarosa (sesiones del día 8 al 10). **C.** Lo mismo que en panel **B** pero se muestra el número de ensayos por sesión. **D.** El número de lengüeteos en la ventana de 1 s del periodo del “Láser” dados con un bebedero vacío o lleno (izquierda) con sacarosa (derecha). * $P < 0.05$ con respecto a los ensayos control, # $P < 0.05$ en comparación con los ratones WT, n.s. es no significativo.

Para demostrar que la estimulación óptica de las aferentes glutamatérgicas es *per se* recompensante, independientemente de su habilidad de detener el lengüeteo, desarrollamos otro experimento con un nuevo grupo de ratones. En esta tarea los animales transgénicos tenían que responder metiendo la nariz en uno de dos puertos, uno activo del cual obtenían 1 segundo de estimulación a una frecuencia de 20Hz y otro inactivo, cuya activación no desencadenaba ningún estímulo. Encontramos que estos animales aprendieron rápidamente a meter la nariz en el puerto activo y prácticamente ignorar el puerto inactivo (Figura 13A; Kolmogorov-Smirnov test=261; *valor-p* <0.0001). Para demostrar que estas respuestas no fueron al azar, se intercambió la posición de los puertos (Figura 13B). Observamos que los animales cambiaron rápidamente de puerto (datos no mostrados) y 3 o 4 días después aprendieron a responder hacia el nuevo puerto activo (Kolmogorov-Smirnov test=60.8; *valor-p* <0.0001). Estos datos nos muestran evidencia de que la activación a 20Hz de las fibras glutamatérgicas es recompensante a pesar de que en el ratón Thy1-ChR2 detiene el lengüeteo.

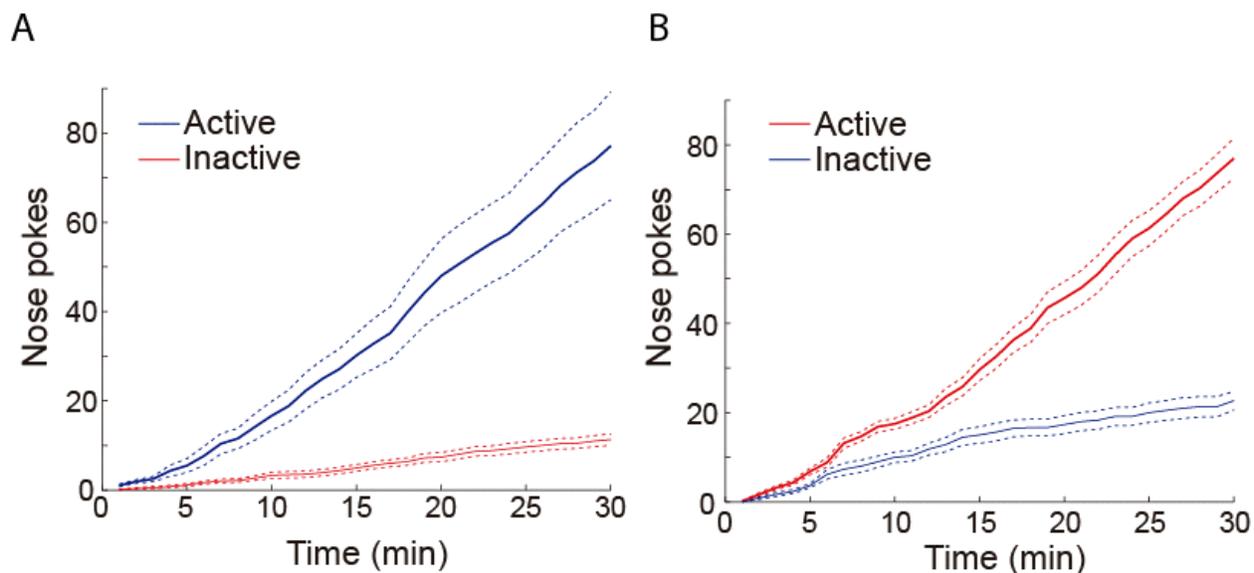


Figura 13. La activación glutamatérgica de las fibras del aNAcSh es recompensante. A. Se gráfica el número de nose-pokes acumulativo a lo largo de los 30 min de la sesión para los puertos activos e inactivos. **B.** Lo mismo que en “A” pero la posición del puerto activo fue cambiada.

La estimulación óptica de las fibras del aNAcSh detiene la alimentación de sacarosa, pero no disminuye la ingesta total de sacarosa

Con un nuevo grupo de animales, WT y Thy1-ChR2 (n=3 por grupo) nos dimos a la tarea de probar si la estimulación prologada del aNAcSh es capaz de reducir la ingesta de sacarosa. Esta prueba consistió en estimular durante bloques de 5 minutos independientes de la conducta de los animales (e.g. Independiente de si el animal estaba bebiendo o metiendo la nariz en un orificio para generar respuestas como en experimentos anteriores) seguido de bloques de 5 minutos sin estimulación. La Figura 14A muestra el número de lengüeteos en cada bloque de 5 minutos. Se observa que al inicio del experimento los animales WT (estimulados) iniciaron bebiendo ávidamente la sacarosa pero, como se esperaba, el número de lengüeteos por bloque disminuyó a medida que los animales se fueron saciando (círculos negros). En contraste, los ratones Thy1-ChR2 mostraron una reducción marcada en el bloque inicial de estimulación. Sin embargo, durante el segundo bloque, sin estimulación (Figura 14A, círculos rojos 5-10 min y 15-20 min) los animales incrementaron su ingesta de sacarosa (ver las flechas). Este incremento en la ingesta de sacarosa fue significativamente mayor que el número de lengüeteos de los ratones WT (post hoc WT vs. Thy1-ChR2 en el bloque 2; $P < 0.001$). Sin embargo, al final de la sesión ambos grupos de animales tuvieron un número de lengüeteos similar [RMANOVA de todos los bloques no mostró diferencia significativa entre ambos grupos; $F(1, 4) = 0.2$, $P = 0.66$, pero si un efecto significativo para el factor de bloques ($F(1, 4) = 11.4$, $P < 0.0001$) con una interacción significativa del tipo de grupo por bloque $F(1, 6) = 9$, $P < 0.0001$]. Estos datos indican que la estimulación prolongada de las entradas glutamatérgicas no afecta directamente el estado de hambre/saciedad de los animales.

El incremento acelerado de la ingesta de sacarosa es más claro si graficamos la distribución acumulativa del lengüeteo minuto a minuto (Figura 14B). Mientras, que para los animales WT, la tasa de cambio en la ingesta de sacarosa disminuyó suavemente a un ritmo constante hasta la saciedad, los ratones Thy1-ChR2 mostraron una conducta muy diferente. Específicamente, en el primer bloque de estimulación se muestra en las

barras azules un lento incremento en la suma acumulativa de lengüeteos (Figura 14B, intervalo de 5-10min) mientras que en el segundo bloque (sin estimulación) observamos un rápido incremento en la curva (intervalo de 10-15min) seguido de otra disminución en la tasa de incremento en el segundo periodo con estimulación. La distribución en la curva acumulativa entre el grupo WT y el Thy1-ChR2 fue significativamente diferente (Kolmogorov-Smirnov = 0.355, $P = 0.029$). El incremento acelerado en la ingesta de sacarosa observado en el ratón Thy1-ChR2 puede deberse a la activación prolongada de las fibras del aNAcSh que, después de detener el lengüeteo, desencadena una actividad de rebote en el aNAcSh o como una estrategia conductual para compensar “el tiempo perdido” en la alimentación y que no fue causado directamente por la estimulación optogenética (ver el siguiente experimento y discusión más sobre esto).

Correlatos neuronales en el aNAcSh durante la tarea de estimulación independiente de la conducta

Con la finalidad de probar y de distinguir entre estas dos alternativas y para obtener los correlatos neuronales de esta tarea, realizamos registros mediante optrodos implantados en el aNAcSH durante la estimulación prolongada en periodos de 5 minutos (Figura 14C-E). En un nuevo grupo de animales ($n=5$) registramos un total de 182 neuronas. En la Figura 14C se muestra la gráfica tipo raster e histogramas periéstímulos (Peri-Stimulus Time Histogram; PSTHs del inglés) observamos las respuestas de dos neuronas representativas; una activada (panel superior) y otra inhibida (panel inferior) con la estimulación optogenética de las entradas glutamatérgicas. El raster superior muestra una neurona que dispara con coherencia a cada pulso de luz durante el periodo de 0 a 1 s (a 20Hz; las marcas azules representan un potencial de acción durante los bloques de estimulación, mientras que las marcas negras muestran los potenciales de acción durante los periodos sin estimulación) y observamos que también aumenta su frecuencia de disparo durante el segundo posterior a que terminó la estimulación de 1 a 2 s. El otro ejemplo (panel inferior también muestra una respuesta coherente con el láser, pero en el

periodo de 1 a 2s la actividad de esta neurona muestra una disminución en su tasa de disparo posterior a la estimulación optogenética (Figura 14C raster inferior). También registramos neuronas que mostraron una inhibición (más fuerte y franca) la cual se mantuvo durante todo el bloque de 5 minutos (Figura 14E, neuronas 180-182)

Como se esperaba, la estimulación óptica de las entradas glutamatérgicas incrementó la actividad global del aNAcSh, pero esta respuesta fue acotada al periodo de un segundo de estimulación como se ve claramente cuando alineamos las respuestas al primer pulso del láser (tiempo=0; Figura 14D). A partir de este punto, su magnitud disminuye gradualmente hasta el cuarto pulso de luz y a partir de ahí se mantiene constante hasta el último pulso de luz (Figura 14D). Se observa que durante el tiempo fuera en la tarea (de 1 a 2s y de -1 a 0s) comparado con la línea base (BL) la actividad global de la población fue significativamente menor. Es importante notar que la actividad poblacional permaneció relativamente sin cambios a través de los tres bloques sin estimulación, lo que sugiere que esta actividad no correlaciona con la conducta acelerada del lengüeteo (en el primer bloque apagado), ni muestra cambios asociados a la saciedad de los animales.

Sin embargo, los registros electrofisiológicos nos dieron una idea de la homeostasis de la tasa de disparo en el aNAcSh. En el panel E se observan las mismas respuestas neuronales, pero a una escala mayor (minutos) como fueron clasificados de acuerdo al análisis de PCA en función de su modulación (Figura 14E). En comparación a la línea base las respuestas marcadas de amarillo a azul oscuro muestran la más alta o baja actividad respectivamente. El 52% (95 de 182 neuronas) mostraron un incremento en la tasa de disparo (línea roja) y el 39% (71 de 182 neuronas) mostraron una disminución en la tasa de disparo neuronal (línea azul). La actividad poblacional de todas las neuronas registradas mostró solamente activaciones entre 0.5 y 1 desviaciones estándar por encima de los niveles basales. Además, en los bloques sin estimulación, la actividad poblacional rápidamente regresó a su actividad basal (Figura 14E, línea negra). Estos datos indican que la red neuronal asociada al aNAcSh muestra una fuerte homeostasis de la tasa de disparo la cual mantiene el balance -activación e inhibición- incluso en presencia de una perturbación externa, como la activación optogenética de las entradas

glutamatérgicas que recibe el aNAcSh. Por lo tanto, esta estimulación prolongada no provoca un rebote en la actividad registrada durante los periodos sin estimulación y, de hecho, sólo fue encontrada en 15 neuronas (Figura 14E, parte inferior de este panel). En conjunto, estos datos sugieren que el incremento acelerado en el lengüeteo durante los periodos en que no hubo estimulación es más probable que se deba a una estrategia del animal para compensar “el tiempo perdido en que la recompensa estuvo disponible pero que no la pudo comer”, a que se deba a un efecto secundario de la estimulación prolongada en el aNAcSh

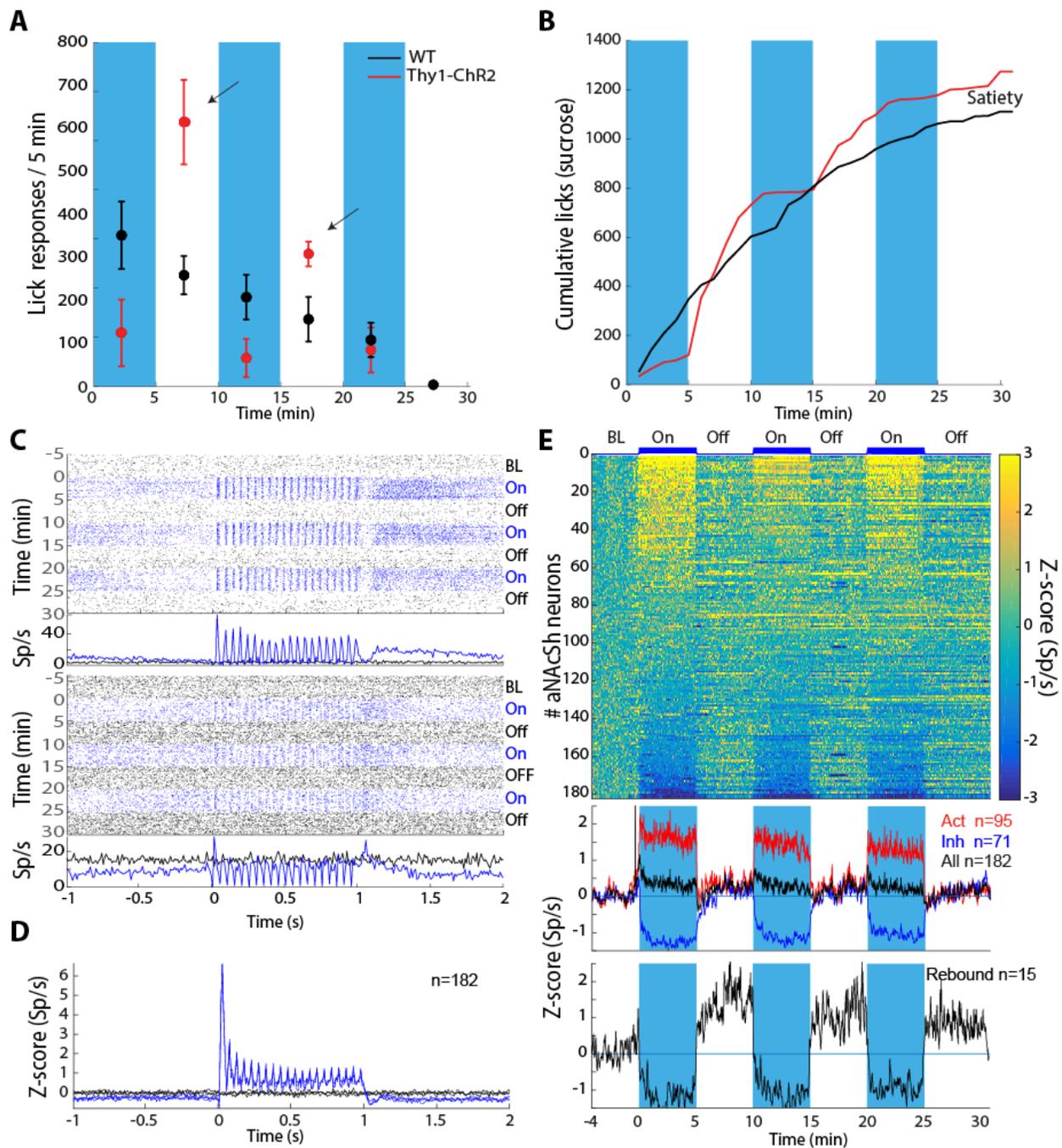


Figura 14. Estimulación óptica de las fibras del aNacSh detiene transitoriamente la alimentación, pero no disminuye la cantidad total ingerida de sacarosa.

A. Muestra el número de lengüeteos en el bloque de 5 min con el láser encendido (sombreado azul a 20Hz, 1 s prendido y 2 s apagado por 5 min) seguido por un bloque de 5 min sin estimulación para los ratones control (WT n=3, en negro) y ratones Thy1-ChR2 (n=3, rojo). **B.** Suma cumulativa del consumo de sacarosa a lo largo de los 30 min de la sesión. Las flechas indican los periodos en donde los ratones transgénicos experimentaron una conducta de atracción por el azúcar. Nota que al final de la sesión ambos grupos consumieron

aproximadamente la misma cantidad de sacarosa. **C.** Registros con optrodos del aNAcSh mientras los animales ejecutan la tarea de lazo abierto. Se ven dos gráficas tipo raster de 2 neuronas; una activada y la otra inhibida por la fotoestimulación. Las respuestas fueron alineadas (tiempo = 0) al inicio de la estimulación a 20Hz (1s on 2 s off). Por lo que las respuestas durante el tiempo -1 a 0 y 1 a 2 s corresponden a los 2 segundos off del periodo de tiempo fuera. Las espigas están marcadas en negro para los bloques off y en azul para los bloques de estimulación (on). **D.** Muestra la actividad normalizada en Z-score de la actividad poblacional de 182 neuronas del aNAcSh alineadas al inicio del láser en los bloques estimulados (trazos azules) y en negro para los bloques sin estimulación. **E.** Gráfica el PSTH en color de la actividad normalizada de 182 neuronas registradas en la tarea. En la parte superior se ven a las neuronas activadas y en la parte de abajo a las inhibidas por la estimulación de las fibras glutamatérgicas. Abajo se ven los PSTH poblacionales de las neuronas activadas (trazo en rojo) e inhibidas (azul) y la actividad de todas las neuronas (moduladas o no; trazo en negro).

La activación optogenética de las fibras glutamatérgicas aferente al aNAcSh conduce a la activación en las neuronas locales registradas en el aNAcSh.

Una vez que se caracterizaron los correlatos neuronales de la tarea anterior (en el protocolo de lazo abierto), nos dimos a la tarea de obtener los correlatos neuronales de la tarea en que la estimulación óptica se encuentra asociada al lengüeteo (lazo-cerrado) que produce que se inhiba el lengüeteo transitoriamente (Figuras 10-12). Para lograr esto registramos neuronas localizadas en el aNAcSh, una área que está involucrada en la recompensa y la alimentación (Kelley and Berridge 2002). Se registraron 381 neuronas durante 56 sesiones de 5 ratones macho Thy1-ChR2 (las respuestas de estas neuronas se muestran en la Figura 15C). La Figura 15A muestra dos ejemplos representativos de las respuestas evocadas por la estimulación con el láser en el aNAcSh. En un tipo de respuesta, los potenciales de acción respondieron en fase con los pulsos de luz a 20Hz ($LI_{50\%} = 5.9$). Se observa que durante el periodo de tiempo fuera la actividad permanece inhibida como se puede notar en los ensayos de 14 y 20 Hz. El segundo tipo de respuesta, aunque menos común, se muestra en la Figura 15B y muestra a un grupo de neuronas que se inhiben de manera dependiente con la frecuencia de estimulación ($LI_{50\%}$

= 14 Hz). Se observa que, para la respuesta inhibitoria, en el periodo de tiempo fuera, la actividad neuronal se recupera más rápido que para las neuronas que se activan.

La actividad poblacional del aNAcSh durante la estimulación optogenética

La Figura 15C muestra la actividad de la población de neuronas registradas (381 en el aNAcSh) durante la estimulación optogenética del aNAcSh. Se utilizó un análisis de PCA para visualizar el patrón de activación neuronal de las respuestas evocadas. La figura muestra una codificación de colores del z-score PSTHs de las 381 neuronas que fueron moduladas (o no) por la estimulación óptica y después fueron ordenadas usando el primer componente de PCA. Se observa que la estimulación óptica activo el 34% (129/381) de las neuronas, inhibió el 12% (46/381) y el resto no mostro modulación ente este estímulo. En general la población mostro que puede seguir fielmente la estimulación de luz (Figura 15C; trazo negro Z-score -Sp/s-). Observe que durante el periodo de estimulación la actividad neuronal del aNAcSh correlaciona de manera negativa con las respuestas de lengüeteo (trazo rojo). Es decir, entre más se activa al aNAcSh los ratones dejan más rápido de comer azúcar.

Para cada neurona también comparamos (usando una ANOVA de dos vías) la tasa de disparo en el periodo antes del láser (-1 a <0s) contra el periodo de la estimulación con láser (0-1s) en función de la frecuencia de estimulación. Encontramos que solo el 46% (175/381) de las neuronas mostraron un efecto significativo en la modulación entre el periodo antes vs. durante la estimulación y la frecuencia, con una interacción significativa entre el periodo y la frecuencia (para todas las P 's <0.05). Del total de neuronas que mostraron una modulación, 34% (129/381) fueron activadas mientras que el 12% (46/381) fueron inhibidas por la estimulación (puntos azules; ver gráfica de dispersión Figura 15D). Con el fin de medir la fuerza con la cual un potencial de acción respondió de la misma manera que la fotoestimulación usamos un análisis de coherencia entre los potenciales evocados y las frecuencias del láser (ver Métodos). Con este análisis

encontramos que el 67% (257/381) de las neuronas registradas en el aNAcSh fueron significativamente coherentes en al menos una de las frecuencias analizadas. En general, observamos que a mayor frecuencia del láser, mayor es el número de neuronas coherentes con la estimulación (Figura 15E; n=142 neuronas coherentes a 4 Hz, n= 186 para 7Hz, n=210 para 14Hz, n=207 para 20Hz). Dado que la coherencia tiene un rango de valores que va de 0 a 1 (donde 0 significa que no hay correlación entre los disparos neuronales y la estimulación con el láser y 1 significa una correlación perfecta tanto en fase como en frecuencia) encontramos que la coherencia aumentó con el incremento de la frecuencia de estimulación. El promedio de la coherencia producida por cada frecuencia de estimulación se muestra en la Figura 15E (a la derecha) [Kruskal Wallis $(3,741) = 18.78$, $P < 0.0003$]. Las neuronas coherentes con la estimulación de 20Hz muestran una coherencia significativamente más alta en comparación con las coherentes con la estimulación a 14Hz ($P < 0.0001$; Figura 15E a la derecha). Estos datos muestran que una gran cantidad de neuronas disparan de manera coherente con la estimulación y su coherencia incrementa con el aumento de la frecuencia en la estimulación, lo que nos lleva a pensar que, a mayor frecuencia, mayor coherencia y, por ende, mayor efectividad deteniendo el lengüeteo.

Para demostrar que la expresión de ChR2 fue la responsable de la estimulación con el láser y de detener el lengüeteo, usamos el mismo protocolo pero ahora en ratones WT y encontramos que la estimulación no interrumpe el lengüeteo para obtener sacarosa (datos no mostrados). De manera similar, en el grupo WT las neuronas registradas (100 neuronas) no mostraron coherencia con ninguna frecuencia en sus potenciales de acción.

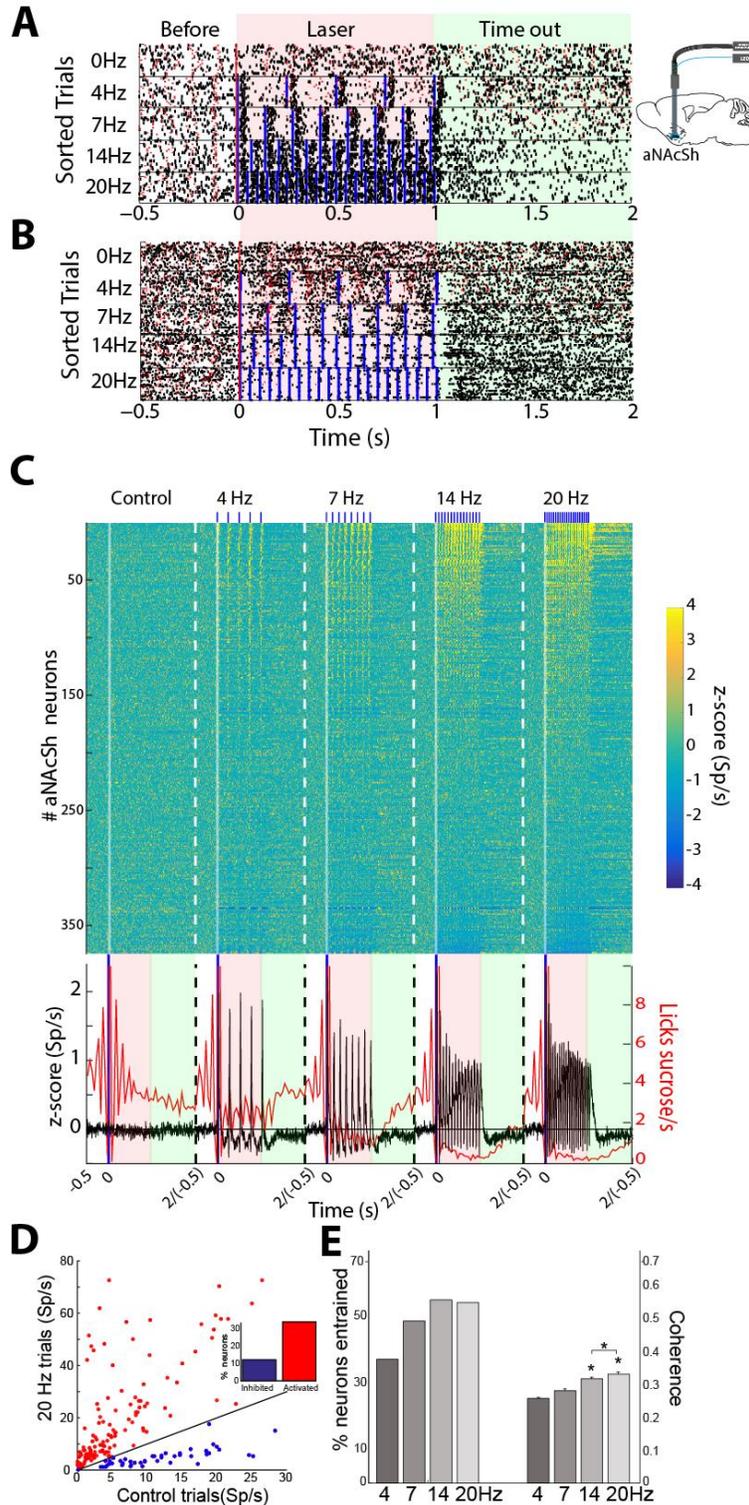


Figura 15. La activación de las fibras glutamérgicas activa las neuronas en el aNacSh y detiene el consumo de sacarosa. A. Un raster representativo de una neurona en aNacSh durante los periodos de línea base, Láser y Tiempo fuera. Esta neurona dispara en coherencia con todas las frecuencias del láser. Las respuestas neuronales están alineadas al primer pulso

del láser (tiempo = 0s) y fueron clasificadas en función de la frecuencia de estimulación. Una marca roja indica un lengüeteo con sacarosa, mientras que una marca negra indica un potencial de acción. El inset muestra un esquema del optrodo localizado en el aNAcSh. **B.** Ejemplo de otra neurona cuyo disparo fue inhibido por la estimulación. **C.** Muestra la actividad de todas las 381 neuronas registradas en la tarea. Las neuronas se muestran en el eje de las y's. El eje de la abscisa muestra las respuestas neuronales binadas (50 ms) alrededor de -0.5 a 2s de tiempo con respecto al inicio del láser. Los ensayos control 4, 7, 14, 20 Hz fueron concatenados a la derecha, formando un solo PSTH con código de color, en donde el color amarillo significa mayor actividad y el azul menor actividad (en valores z-score). El sombreado rosa y verde indica el periodo de "Laser" y "Time out", respectivamente. **D.** Una gráfica de dispersión de la frecuencia de disparo en el periodo del láser durante los ensayos control vs. 20 Hz. Las neuronas en rojo fueron activadas por la fotoestimulación y las de color azul fueron inhibidas. **E.** El porcentaje de neuronas que fueron reclutadas en coherencia con cada frecuencia del láser. El panel de la derecha muestra el valor promedio de coherencia para cada frecuencia.

Respuestas durante el periodo de láser y el del tiempo fuera predicen el tiempo que tomará al animal en regresar a lengüetear después de ser estimulado

Después nos preguntamos si la tasa de disparo durante el periodo de láser y el de tiempo fuera pudiera predecir el tiempo que tomará a los animales regresar a beber sacarosa después de haber recibido la estimulación optogenética. Esto se logró ajustando los datos a un modelo de regresión lineal en el tiempo que toma al animal regresar a consumir sacarosa después de la estimulación usando como variables de predicción, la tasa de disparo en ambos periodos. En el periodo del láser la tasa de disparo del 22.8% (87/381) de las neuronas registradas en aNAcSh podría utilizarse para predecir el tiempo de latencia al lengüeteo después del láser; mientras que para el periodo de tiempo fuera sólo el 8.6% (33/381) de las neuronas muestran un coeficiente significativo ($p < 0.05$). El 61% restante ($n=232$) de las neuronas no mostraron ninguna modulación significativa en ningún periodo. Estos datos sugieren que las modulaciones en la tasa de disparo especialmente en el periodo de estimulación, aunque también en el de tiempo fuera pueden predecir -ensayo por ensayo- el retraso en el lengüeteo después de la estimulación.

Las neuronas moduladas por la alimentación y las modulaciones inducidas por la activación optogenética de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh

Estudios previos han mostrado que durante el consumo de soluciones palatables, las neuronas del NAcSh permanecen principalmente inhibidas (Krause et al. 2010, Tellez et al. 2012, Roitman, Wheeler and Carelli 2005) sugiriendo que es necesaria una pausa en la actividad del NAcSh, que probablemente resulta de la inhibición de las neuronas MSND1+ (O'Connor et al. 2015) para permitir el consumo de sacarosa, y que la estimulación eléctrica de las fibras del NAcSh presuntamente activa este tipo de neuronas para detener la alimentación (Krause et al. 2010). Basados en estos resultados analizamos si la activación de fibras glutamatérgicas del aNAcSh podría exhibir una preferencia para activar a las neuronas que fueron inhibidas en el aNAcSh mientras los animales consumieron sacarosa. El panel de la izquierda de la Figura 16A muestra las respuestas normalizadas en Z-score de la población registrada en el aNAcSh cuando el animal se acerca al bebedero (-1 a <0 s) y hasta el periodo de inicio ($t=0$, indicada por una línea blanca vertical). Es importante notar que para los siguientes 4 lengüetes el láser está apagado. El panel derecho muestra las mismas neuronas ordenadas de la misma manera que el panel izquierdo, sólo que se muestra el periodo entre -0.5 a 0s que representa el periodo antes de la estimulación y la línea blanca vertical muestra el tiempo en que el láser es encendido y la estimulación comienza. En este panel las respuestas fueron normalizadas al periodo de antes de la estimulación es por eso que aparentemente no parecen estar modulándose con la estimulación, la nomenclatura para la clasificación de las neuronas es la siguiente: panel de la izquierda, inhibidas (inh), activadas (Act) y no moduladas (NM) y el panel de la derecha representa si las respuestas fueron (CoV) o no coherentes (noCoV) con la estimulación del láser (a 20Hz). Por ejemplo, el panel superior denominado Inh/CoV significa que las neuronas fueron inhibidas al inicio del lengüeteo (al consumir azúcar) y las respuestas evocadas fueron también coherentes con la estimulación del láser (a 20Hz).

Para el panel izquierdo se observó que el 20% (78/381) de las neuronas mostraron una inhibición en su frecuencia de disparo durante el lengüeteo, el 13% (49/381) fueron activadas (los dos paneles siguientes hacia abajo) y el 67% (236/381) no modularon su frecuencia de disparo. Con respecto al panel derecho, el 62% (236/381) de las neuronas co-varian sus respuestas con la estimulación del láser (a 14 o 20 Hz). De esta manera tenemos 5 grupos de modulación que fueron agrupadas como sigue: Inh/CoV 59% (46/78), Inh/noCoV 41% (32/78), Act/CoV 61% (30/49), Act/noCoV 39% (19/49) y NM/CoV 63% (160/254). En conjunto estos datos muestran que la activación optogenética de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh puede modular neuronas del aNAcSh independientemente de si fueron activadas, inhibidas o no moduladas por el lengüeteo.

Dado que el aNAcSh contiene varios tipos neuronales, incluyendo neuronas espinosas medianas (MSNs), interneuronas de disparo rápido (FSIs) e interneuronas ChAT (Tepper et al. 2010), probamos si la estimulación óptica en el aNAcSh podría afectar selectivamente a algún grupo neuronal en específico. Mediante el uso de su patrón de disparo y las formas de los potenciales de acción, se clasifico putativamente en grupos neuronales (ver Métodos). La Figura 16B muestra las clasificaciones putativas de neuronas moduladas en cada uno de los seis grupos (incluyendo las que no se pudieron clasificar en ningún grupo, U). El bloque rojo de los rectángulos nos muestra el número de neuronas que fueron coherentes con la estimulación del láser y el bloque blanco muestra el número de neuronas que no mostraron coherencia con la estimulación. Se observa que la estimulación de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh activó a los tres tipos putativos de neuronas del aNAcSh.

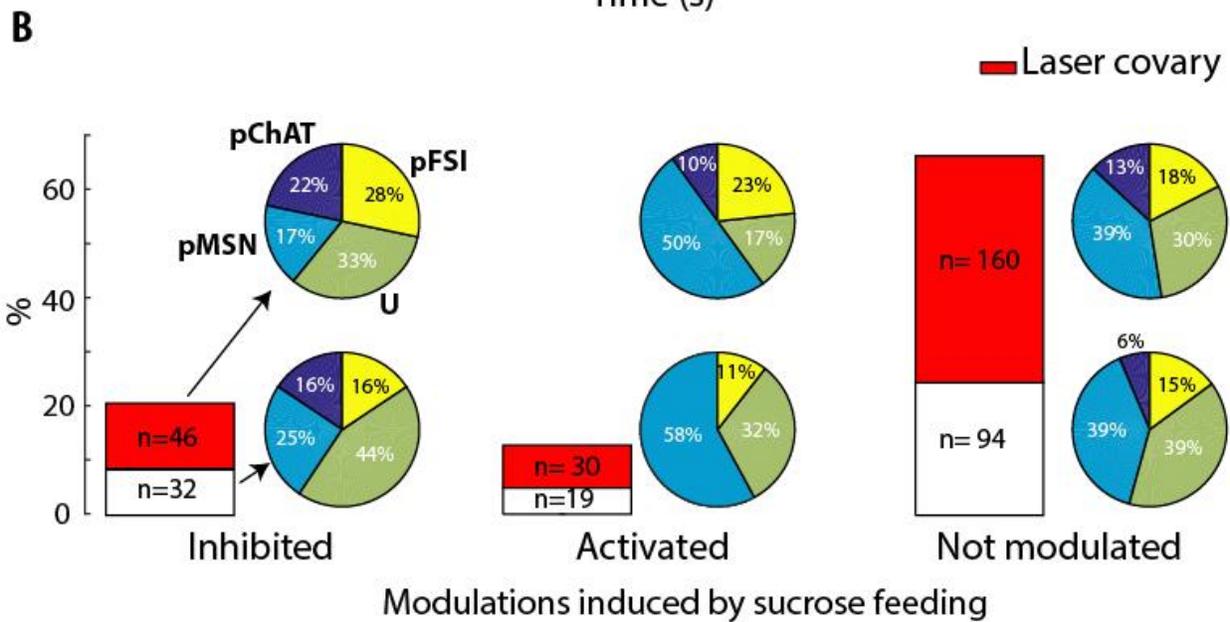
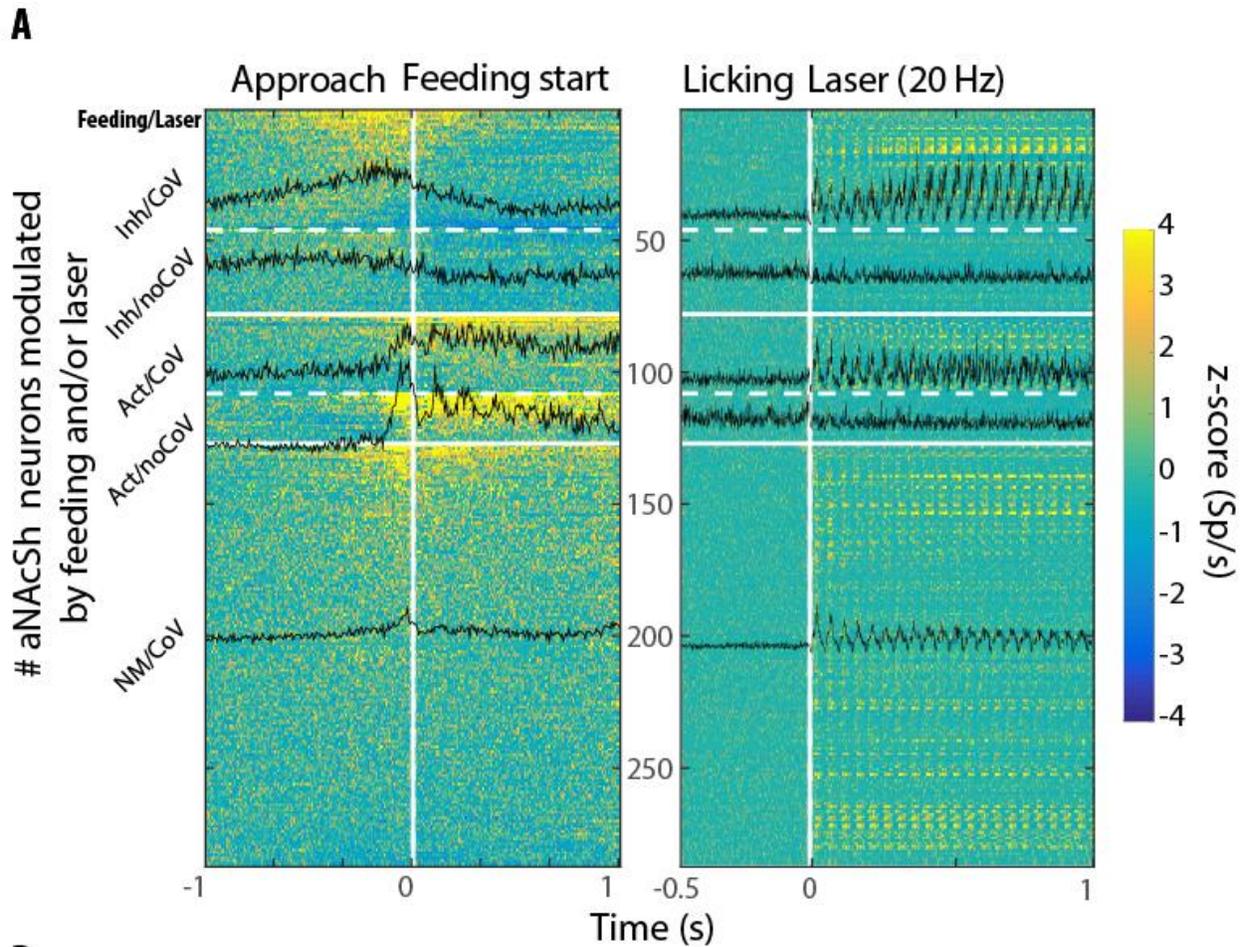


Figura 16. Modulaciones relacionadas a la alimentación y durante la estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas. A. El panel de la izquierda muestra la frecuencia

de disparo normalizada de las neuronas del aNAcSh moduladas durante el consumo de sacarosa (time = 0 s). Las neuronas fueron clasificadas como inhibidas (Inh) o activadas (Act) o simplemente no-moduladas (NM). El panel de la derecha muestra las respuestas de las mismas neuronas, pero su actividad está ahora alineada (tiempo =0) al inicio del primer pulso de luz y fueron subdivididas en función de sí covariaban (CoV) o no (noCoV) con el láser. **B.** Se grafica el porcentaje de neuronas clasificadas putativamente como pMSN, pFSI, and pChAT que fueron moduladas (ya sea inhibidas, activadas o no moduladas) por comer azúcar. Los recuadros en rojo da el número de neuronas que fueron coherentes y el rectángulo en blanco indica el número que no fue coherente con la estimulación optogenética. A la derecha de cada barra muestra en una gráfica tipo pie, el porcentaje de neuronas de acuerdo al tipo putativo celular. Los porcentajes pueden no dar 100% debido al redondeo de decimales.

La estimulación optogenética en el aNAcSh modula las neuronas de la corteza medial prefrontal (mPFC)

Dado que una proyección cortical primaria que se dirige al aNAcSh surge de las neuronas piramidales de la capa V de la mPFC (Britt et al. 2012) exploramos si esta área cortical puede ser activada antidrómicamente y/o polisinápticamente por la estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas del aNAcSh. La Figura 17 muestra dos respuestas representativas a la estimulación con láser. En el panel superior, la estimulación evoca una probable respuesta antidrómica o monosináptica (inicio = 4.2 ± 0.03 ms) seguida por una esporádica y variable respuesta. Este tipo de respuesta neuronal respondió de manera rápida después de cada pulso, aunque con menos fidelidad con los siguientes pulsos de luz. En el panel inferior se muestra un ejemplo de la respuesta tardía, polisináptica, seguida de inhibición. Se puede observar que las respuestas en ráfaga fueron inhibidas por la estimulación a 14 y 20 Hz. La Figura 17B muestra las respuestas evocadas de 113 neuronas en mPFC. De estas, el 45% (51/113) fueron significativamente moduladas por la estimulación con el láser, el 21% de estas (11/51) fueron inhibidas y el 79% (40/51) fueron activadas [ANOVA de dos vías, $P_s < 0.05$].

El Z-score para la población se muestra en el panel inferior (trazo negro). La estimulación óptica produjo una gran porción de neuronas reclutadas por el láser, 113 [4Hz n=53(46%), 7Hz n=64(56%), 14Hz n=73(64%), 20 Hz n=58 (51%)] y la coherencia significativamente se vio incrementada en función de la frecuencia (valor de coherencia; 4 Hz= 0.22 ± 0.01 , 7Hz 0.27 ± 0.01 , 14Hz 0.32 ± 0.01 , 20 Hz 0.33 ± 0.02 Kruskal-Wallis $P < 0.05$). De este modo demostramos que la activación optogenética de las fibras excitatorias del aNAcSh también puede evocar respuestas neuronales en el mPFC tanto antidrómicas como polisinápticas (posiblemente vía interacciones cortico-corticales y/o tálamo-cortical)

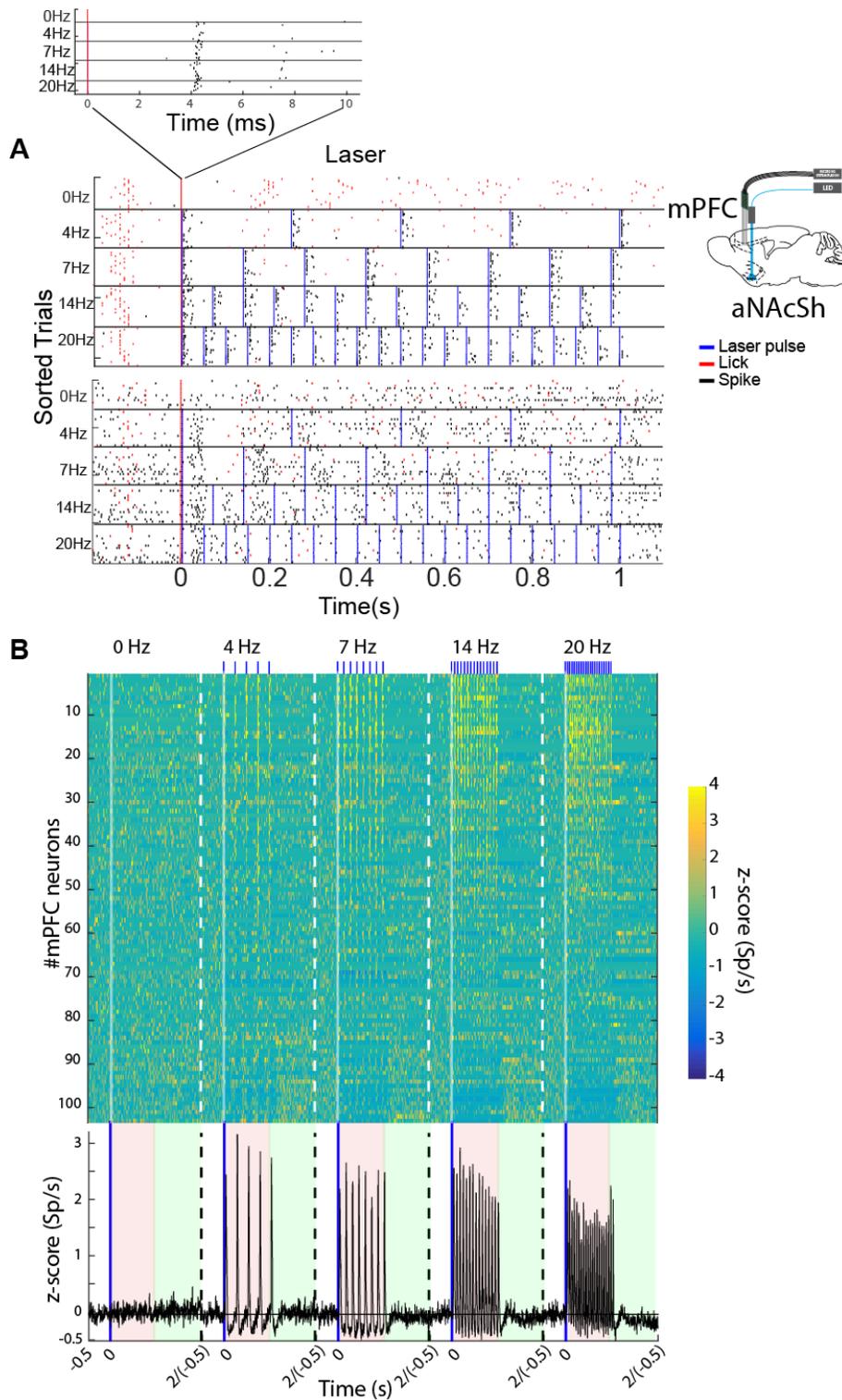


Figura 17. La estimulación optogenética de las fibras del aNacSh es capaz de activar antidrómicamente a las neuronas del mPFC. A. Raster de dos neuronas registradas en la tarea de lazo-cerrado. La primera neurona dispara de forma muy confiable una espiga con una

latencia de $= 4.2 \pm 0.03$ ms después de cada pulso de luz (ver el inset este es un ejemplo de respuesta monosináptica) y esporádicamente da una segunda espiga. El raster de abajo muestra a otra neurona inhibida. Las mismas convenciones que en la Figura 15. El inset a la derecha muestra el diagrama de los sitios de registro (en mPFC) y de la implantación de la fibra óptica (en el aNAcSh). **B.** Muestra el PSTH de color de las 113 neuronas registradas en la corteza mPFC mientras que los animales ejecutaban la tarea de lazo cerrado.

La estimulación optogenética de las fibras del aNAcSh modula la actividad neuronal en el hipotálamo lateral (LH)

Dado que existen conexiones recíprocas entre el aNAcSh y el LH (O'Connor et al. 2015) también fue de nuestro interés explorar el efecto de la estimulación optogenética en el aNAcSh sobre la actividad neuronal del LH. La Figura 17A muestra dos respuestas representativas. En la parte superior podemos observar que la estimulación óptica en aNAcSh evoca potenciales de acción en el LH. Esto es más evidente a 4 Hz dado que la respuesta de LH sigue con fidelidad la frecuencia de estimulación en aNAcSh y esta fidelidad disminuye a frecuencias más altas, pero, aun así, las respuestas muestran coherencia con la estimulación. De manera contraria, en el panel inferior se muestran las respuestas de inhibición debidas a la estimulación en LH. En LH encontramos los mismos patrones de respuestas. Específicamente, el 15% (45/297) de las neuronas registradas en LH fueron significativamente moduladas por la estimulación óptica, de las cuales, 14 neuronas (31%) fueron inhibidas mientras que 31 (69%) mostraron una activación significativa (mostrado en el análisis de ANOVA de dos vías). La activación se debió principalmente a incrementos en la tasa de disparo evocados por el primer pulso del láser (ver Figuras 18 y 19). En contraste con los resultados mostrados previamente, el análisis de coherencia mostró, en este caso, que estimular con las frecuencias altas en el aNAcSh no induce grandes coherencias en las respuestas del LH [valor de coherencia; 4 Hz= 0.29 ± 0.02 , 7 Hz 0.28 ± 0.01 , 14 Hz 0.27 ± 0.015 , 20 Hz 0.30 ± 0.018 Kruskal-Wallis $P = 0.78$, n.s.], ni siquiera reclutando más neuronas en función de las frecuencias del

láser [4Hz n=69 neuronas (23%), 7Hz 78(26%), 14Hz 82(27%), y 20Hz 60(20%)]. En resumen, la estimulación óptica de las fibras del aNAcSh modula las respuestas neuronales en LH activándolas inicialmente, pero en las estimulaciones siguientes la magnitud de la respuesta disminuye al grado de inducir inhibición.

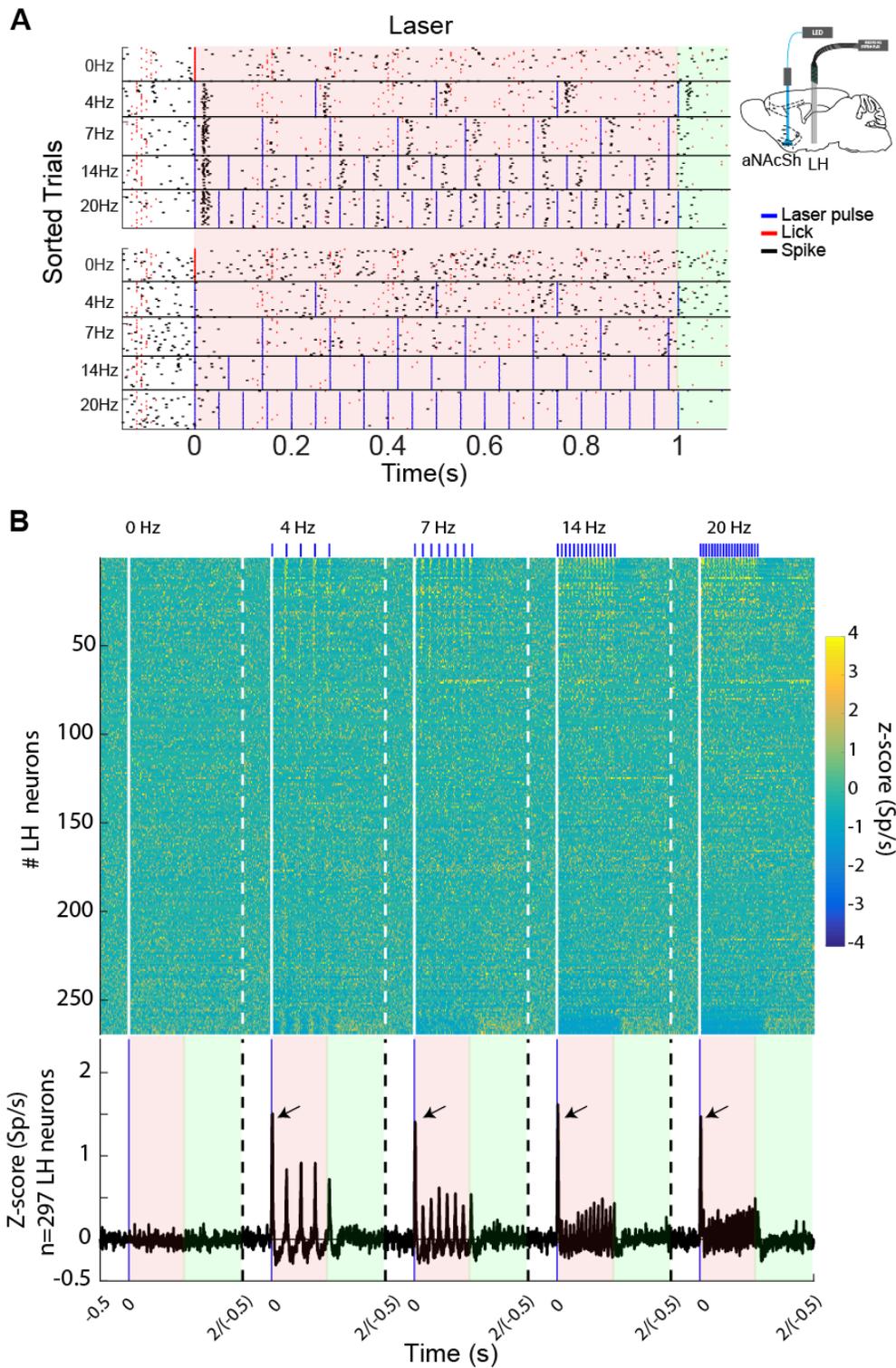


Figura 18. La estimulación optogenética de las fibras del aNAcSh modula la frecuencia de disparo de las neuronas de LH.

A. Una gráfica tipo raster de 2 neuronas registradas simultáneamente, mismas convenciones que la Figura 15. **B.** Muestra la actividad poblacional en color de las 297 neuronas registradas en LH. En la parte superior se colocaron a las neuronas que fueron activadas, mientras que en la parte inferior aquellas que fueron inhibidas. La flecha indica la respuesta evocada ante el primer pulso de luz azul. La línea negra muestra el PSTH poblacional.

Las latencias evocadas en el aNAcSh, LH y mPFC por la estimulación de las aferentes glutamatérgicas al aNAcSh

Para obtener una mejor comprensión de como las señales evocadas por la estimulación de las fibras glutamatérgicas se transmite a través de la red aNAcSh, LH y mPFC, medimos, para la frecuencia de 4 Hz, el primer cambio significativo en la frecuencia de disparo (latencia) después del primer pulso de estimulación óptica. Se registró un rango de latencias que va desde 2 ms hasta cientos de ms. Basado en estudios previos para la transmisión monosináptica el rango es de 1 a 10 ms (Buonomano 2003), nosotros dividimos estas respuestas en monosinápticas con latencias menores o iguales a 10ms y polisinápticas con latencias mayores a 10ms (líneas punteadas en la Figura 19A; parte alta y baja). La Figura 19A muestra la dinámica temporal del PSTH poblacional de las respuestas tempranas (panel superior) y las respuestas tardías (panel inferior) de las neuronas que respondieron a la estimulación con el láser. La distribución de las latencias de inicio en las tres áreas se puede observar en la Figura 19B. El inicio de las primeras respuestas tempranas no fue significativamente distinto entre las regiones mPFC (6.7 ± 0.5 ms), LH (6.3 ± 0.5 ms) y el aNAcSh (6.2 ± 1.1 ms) (Kruskal-Wallis; n.s.) Sin embargo, las respuestas tempranas en el LH fueron de mayor magnitud comparadas con las encontradas en aNAcSh and mPFC. Estamos conscientes de que estas respuestas tempranas en LH (7% de las neuronas) pueden incluir respuestas antidrómicas o activaciones directas de las fibras glutamatérgicas que alcanzan al LH (Figura 19D) (Mogenson, Swanson and Wu 1983).

Una razón de que el aNAcSh mostrara una proporción menor de activaciones monosinápticas (solo 10/381; 2.6%) que las otras áreas es debido a la inhibición tónica lateral causada por las MSNs vecinas (Tepper and Bolam 2004b). Cabe señalar que las respuestas monosinápticas están compuestas principalmente de pMSNs (50%) y sólo unas pocas interneuronas putativas (Figura 19C). En contraste con el mPFC, el aNAcSh presentó un mayor número de respuestas tardías (37%). Y estas se componen de un número similar de pMSN e interneuronas putativas, indicando que las respuestas tardías son un reflejo de las interacciones entre miembros de los ensambles locales del estriado.

El análisis de las respuestas tardías mostró una dinámica temporal distinta a la de las respuestas tempranas (Figura 19A parte inferior). Es decir, el inicio de las respuestas tardías fue significativamente distinto entre las distintas regiones registradas en este trabajo (Kruskal-Wallis $(2,252) = 13.3$, $P = 0.0013$): el inicio de las respuestas fue para mPFC (24 ± 2 ms), para LH (23.9 ± 1.6 ms) y para aNAcSh (30.6 ± 1.5 ms). El análisis pos hoc reveló que sólo las respuestas tardías en el aNAcSh se retrasaron significativamente en relación a aquellas en el LH ($P < 0.05$). También se encontró una tendencia no significativa entre aNAcSh and mPFC ($P > 0.05$ n.s.) Estos datos indican que cuando las respuestas tardías (polisinápticas) en el aNAcSh fueron máximas (véase la flecha), las respuestas en LH fueron principalmente inhibidas (Figura 19, panel inferior).

En resumen, estos datos indican que la estimulación optogenética de los aferentes glutamatérgicos en el aNAcSh influye rápidamente una amplia red neuronal (Kumar et al. 2013), que abarca por lo menos el circuito hedónico de la alimentación que comprende mPFC-activa-aNAcSh-inhibe-LH

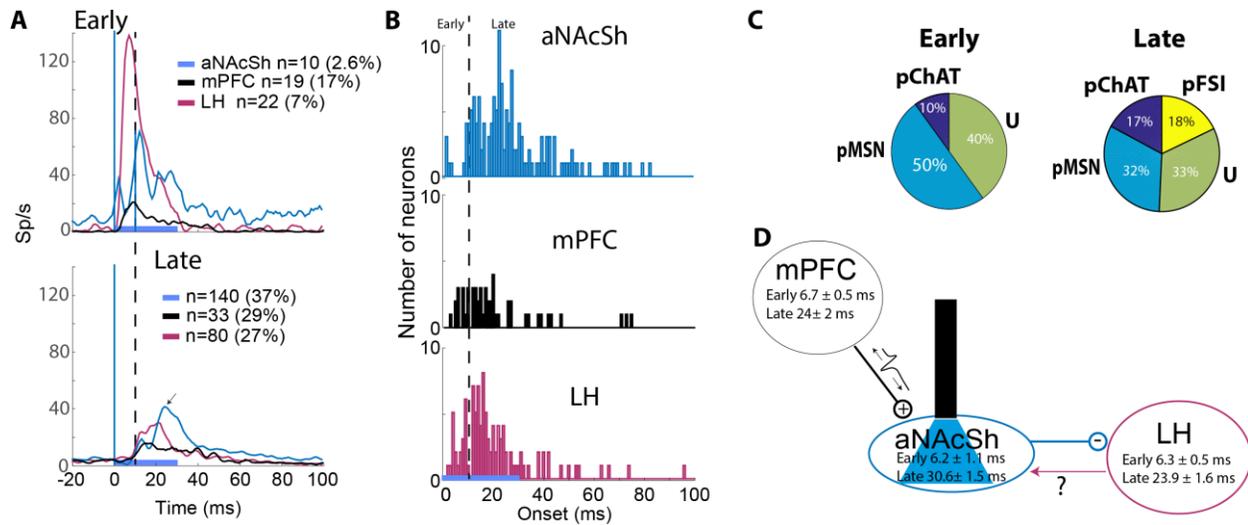


Figura 19. La estimulación optogenética de las fibras del aNacSh rápidamente recluta la actividad de una red neuronal que comprende al mPFC, LH y al mismo aNacSh. A. arriba las respuestas poblacionales tempranas (monosinápticas) de las tres regiones registradas durante el primer pulso de luz azul (30 ms) en los ensayos de 4Hz. Panel de abajo, lo mismos que en el anterior, pero para las respuestas tardías o polisinápticas. La línea vertical indica la división (de 10 ms) entre respuestas tempranas y tardías. **B.** Histograma del número de neuronas con latencias significativas después del primer pulso de luz. **C.** Gráfica de tipo pie mostrando la proporción de tipos celulares putativos registrados en el aNacSh que mostraron respuestas tempranas o tardías. **D.** Esquema representando la generación antidrómica (en dirección inversa) y ortodrómica (en la dirección correcta) de potenciales de acción inducidos por la fotoestimulación de las fibras glutamatérgicas del aNacSH. El número en cada región indica el onset de las latencias promedio.

DISCUSIÓN

El aNAcSh forma parte del centro de recompensa del cerebro y esta función se le ha atribuido principalmente porque todos los estímulos sensoriales que se conoce que son recompensantes también liberan dopamina en esta región. Adicionalmente, el aNAcSh también forma parte de la red neuronal relacionada con la alimentación. Aunque ciertamente estos dos procesos están íntimamente relacionados, la recompensa es un estado mental (una sensación de gratificación) mientras que la alimentación es una conducta con una meta que tiene un componente oromotor muy fuerte, lo cual indica que ambas conductas son reguladas a través de diferentes circuitos neuronales, pero que están necesariamente relacionadas. Aunque es verdad que se necesita del sistema mesoacumbal dopaminérgico intacto para que la conducta de alimentación ocurra (Szczyepka et al. 1999), y también para que se le asigne un valor hedónico de recompensa a la comida (Rossi and Yin 2015). Evidencia reciente ha sugerido que la interacción entre la dopamina y el glutamato en el aNAcSh podría jugar un papel importante para ambos procesos tanto para la alimentación como para asignarle valor de recompensa a un alimento (Britt et al. 2012). Es importante resaltar que adicionalmente a la modulación dopaminérgica que recibe el aNAcSh (de las neuronas dopaminérgicas del VTA ver esquema de la Figura 7), esta región también recibe una fuerte modulación de inputs glutamatérgicos principalmente de la corteza (mPFC, ver Fig. 7). En este trabajo nos dimos a la tarea de investigar a detalle la participación del glutamato en procesos de alimentación y recompensa, usando un modelo de optogenética para estimular en el aNAcSh las fibras glutamatérgicas que expresan ChR2, principalmente, en las neuronas glutamatérgicas que proyectan al aNAcSh (Figura 9). Encontramos que el ratón transgénico Thy1-ChR2 es un buen modelo para simular la estimulación global de las fibras nerviosas que muy probablemente son activadas de forma indiscriminada al estimular eléctricamente al NAc (Vizcarra-Chacon et al. 2013, Krause et al. 2010) (ver Figura 4). En este trabajo demostramos que la estimulación unilateral de las fibras excitatorias aferentes del aNAcSh activa, pero también inhibe de forma indirecta la actividad neuronal de las neuronas tipo MSNs (MSND1+ y MSND2+)

e interneuronas (FS) de una manera tal que mantiene la homeostasis de la tasa de disparo del aNAcSh global (ver Figura 14E en trazo negro). Es importante destacar que la estimulación optogenética de las fibras excitatorias que convergen en el aNAcSh provocan que un animal hambriento transitoriamente deje de comer azúcar, de forma independiente del valor calórico y hedónico de la sacarosa (ya que también detuvo el lengüeteo de un bebedero vacío) y del estado de saciedad del animal, esto porque a pesar de que la estimulación optogenética detiene transitoriamente la alimentación, el consumo total de la sacarosa en los 30 min de la sesión no fue disminuido (Figura 14B). En este trabajo también demostramos que el animal transgénico Thy1-ChR2 es capaz de auto-fotoestimularse, ya sea lengüeteando un bebedero vacío (Figura 12) o produciendo respuestas de nose-poke (Figura 13).

Con la finalidad de obtener información relacionada a la red neuronal asociada a la conducta de alimentación (la cual detuvo el lengüeteo por sacarosa), se registró la actividad neuronal de tres componentes de ésta red de alimentación y la recompensa (en un sistema de estimulación optogenética de lazo-cerrado, es decir en donde los animales se pueden autoestimular al lengüeteo): el aNAcSh, LH y mPFC. En las tres regiones cerebrales, encontramos que la estimulación de las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh produce activación (e inhibición) neuronal y en algunos casos las neuronas se modularon en sincronía con la estimulación óptica de manera frecuencia dependiente. Interesantemente, observamos que una población de las neuronas que se inhiben durante el consumo de azúcar (tal vez pMSND1+), también se activó con la estimulación optogenética (Figura 16; inh/CoV) lo que nos sugiere que esta población desempeña un papel importante asociado a la conducta de detener la alimentación (ver Figura 5 (O'Connor et al. 2015)). Esta población u otra que muestre respuestas coherentes con la fotoestimulación (Figura 16) podrían representar la señal de recompensa. El análisis de la latencia reveló importantes propiedades de propagación mono (directas) y polisinápticas (indirectas) de esta red neuronal que comprende al mPFC→aNAcSh→LH. En resumen, en este trabajo mostramos la importancia de la activación glutamatérgica de las fibras aferentes al aNAcSh en la alimentación y la recompensa.

Estudios conductuales

Los estudios conductuales conducidos en esta tesis -en animales altamente motivados y privados de agua- demuestran que la activación unilateral de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh provoca que la alimentación con sacarosa se detenga de manera inmediata, pero de forma transitoria (por varios segundos Figuras 10 y 11). Este resultado es interesante porque estudios previos de nuestro laboratorio y de otros han demostrado que a los roedores les resulta sumamente difícil detener el lengüeteo una vez que ha empezado una ráfaga de lengüeteos, especialmente si están bebiendo sacarosa (Perez et al. 2013, Weiss and Di Lorenzo 2012).

La parte del deseo por una recompensa (wanting) fue evidente al observar que los animales Thy1-ChR2 ingenuos fueron capaces de aprender a lengüetear un bebedero vacío o a ejecutar respuestas de nose-poke en el puerto activo -con tal de autoestimularse por medio de la fotoactivación de las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh (Figuras 12 y 13). De ello se deriva que la estimulación de las fibras glutamatérgicas puede desencadenar una señal de recompensa (wanting) que puede reforzar conductas operantes, tales como lengüetear un bebedero vacío o hacer que un animal introduzca su nariz en un agujero (nose-poke), la activación de este circuito es capaz de reforzar la conducta y generar el aprendizaje de autoestimulación (Berridge et al. 2009).

Adicionalmente, en el experimento en el cual se somete a los animales a la fotoestimulación en lazo abierto -es decir cuando el láser se prende de forma independiente de si el animal lengüetea o no (open-loop) con bloques de 5 minutos encendido y 5 apagado (ver Figura 14). Encontramos que un animal hambriento no bebe sacarosa en los bloques que el láser se encontraba encendido, comparado con los animales silvestres (Figura 14B). Es decir, este resultado demuestra que mientras se mantengan activadas a las fibras glutamatérgicas, los animales no comerán. Sin embargo y de forma inesperada también encontramos que durante los periodos en que el láser se apagó los mismos animales que no pudieron beber sacarosa por la estimulación ahora empezaron a consumir sacarosa a una velocidad aún más alta que

los animales control (ver flechas en Figura 14A). Con base en estos resultados postulamos que los ratones thy1-ChR2 utilizan esta estrategia de atracón para compensar la “pérdida de tiempo” en la que estaba disponible la recompensa pero que no la pudieron consumir por la fotoestimulación. En este trabajo no encontramos el correlato neuronal de esta conducta de atracón en el aNAcSh y asumimos que este se debe de encontrar en la actividad de otra zona del cerebro.

Vías dopaminérgicas y glutamatérgicas aferentes y eferentes del aNAcSh

Como se mencionó en la introducción Britt en el 2012 demostró que la estimulación de las entradas glutamatérgicas al NAc incluidas aquellas provenientes de mPFC, hipocampo ventral y la amígdala basolateral es recompensante. Esto porque en cada uno de los casos, los animales aprendieron a dar respuestas de nose-poke para autoestimularse indicando la importancia de la liberación de glutamato en el NAc para inducir recompensa independientemente de donde provenga el glutamato (al menos en el sentido de querer una recompensa (wanting ver Figura 13) (Britt et al. 2012). Es decir, nosotros no podemos saber si los animales sienten alguna clase de placer (liking) al autoestimularse, lo que sí sabemos es que los animales quieren hacerlo. Nuestros resultados son coherentes con estas observaciones dado que la activación global de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh en el ratón Thy1-ChR2 también fue recompensante como se muestra en las Figuras 12 y 13. Además, ya que la activación de mPFC provoca la liberación de ambos dopamina y glutamato en el NAc (Quiroz et al. 2016) se puede especular que ambos neurotransmisores, dopamina y glutamato en el aNAcSh, son importantes para inducir recompensa (Stuber, Britt and Bonci 2012, Britt et al. 2012). En este trabajo mostramos que además del papel que desempeñan en la recompensa, las fibras aferentes excitatorias del aNAcSh, estas también están involucradas en la alimentación.

Respuestas poblacionales en el aNAcSh, LH y mPFC evocadas por la estimulación de las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh

Los registros intracelulares en rebanadas de cerebro demostraron que la estimulación óptica de las fibras aferentes excitatorias del aNAcSh puede activar tanto a las MSNs como a las FSIs (Figura 9). Sin embargo, la estimulación de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh, como se ha comentado, evoca respuestas tanto excitatorias, pero como también activa a interneuronas estas pueden terminar inhibiendo a otras neuronas del circuito estriatal, manteniendo la homeostasis global de la actividad neuronal del aNAcSh (Figuras 14C-E). Resulta interesante resaltar que nuestras clasificaciones putativas de los tipos neuronales del aNAcSh (pMSN, pFSI y pChAT) muestran una modulación tanto en la alimentación como en respuesta a la estimulación óptica (Figura 16). En este sentido O'Connor en el 2015 (O'Connor et al. 2015) encontró que las proyecciones GABAérgicas del aNAcSh MSND1+ son las únicas que se inhiben durante el lengüeteo y también son las únicas que proyectan hacia las neuronas GABAérgicas en el LH y que la activación de las neuronas MSND1+ del aNAcSh es suficiente para detener la alimentación (Ver Figura 5). En este trabajo encontramos que aproximadamente la mitad de las neuronas que se modularon negativamente con el lengüeteo, fueron también activadas con la estimulación óptica (Figura 16 Inh/CoV), lo que nos da una idea de porque la activación de las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh pudo haber detenido rápidamente el consumo de sacarosa (O'Connor et al. 2015). En otras palabras, al liberar glutamato activando los inputs del aNAcSh se activa a las neuronas pMSND1+ las cuales a su vez pueden inhibir a las neuronas GABAérgicas del LH (recuerden que la inhibición de estas neuronas detiene la alimentación, ver Figura 6). Aunque las neuronas Inh/CoV están claramente implicadas en la alimentación, las neuronas relacionadas con la recompensa podrían ser cualquiera de las que sincronizan su actividad con la estimulación optogenética (Inh/Cov, Act/Cov and NM/Cov (Figura 16). Este problema, en particular puede ser resuelto en estudios futuros mediante el marcaje genéticamente dirigido a cada una de las subpoblaciones aferentes al aNAcSh.

Horst y Laubach encontraron que las neuronas de mPFC responden al inicio y al término del consumo de sacarosa, lo que sugiere que estas neuronas tienen la función de monitorear la conducta de alimentación (Horst and Laubach 2013). Nuestros datos sugieren que las fibras aferentes del aNAcSh provenientes de mPFC y de otras regiones incluyendo la amígdala y el hipocampo ventral (Britt et al. 2012) actúan como un switch o control río arriba en el circuito aNAcSh-LH que modula (apaga o detiene) la alimentación, ya que observamos que la activación antidrómica mono y polisináptica de las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh proviene del mPFC (Figura 17A) y la consecuente liberación de glutamato (Figuras 9 y 15) activa el circuito local del aNAcSh. Dado que, como O'Connor et. al 2015 demostró que las neuronas GABAérgicas MSND1+ del aNAcSh inhiben a las neuronas GABAérgicas del LH (O'Connor et al. 2015), esto puede explicar por qué la estimulación eléctrica del NAc es capaz de inhibir la actividad en las neuronas del LH (Mogenson et al. 1983). En nuestro trabajo los registros individuales de las neuronas en el LH también revelan una inhibición robusta de la población neuronal registrada en LH especialmente después del segundo pulso de luz, como se puede observar en la Figura 18 y 19 de esta tesis, esto es relevante ya que la activación de las neuronas GABAérgicas en el LH produce la conducta consumatoria, mientras que su inhibición reduce el consumo (Jennings et al. 2015) (ver Figura 6). Cabe señalar que, si las neuronas GABAérgicas del LH modulan el consumo de cualquier estímulo gustativo, independientemente de su valor calórico o relevancia biológica (por ejemplo pueden morder madera -gnawing) (Navarro et al. 2016), entonces los datos mencionados y nuestros resultados (Figura 12) sugieren que gran parte del circuito hedónico (ver Figura 7) parece operar independientemente del contenido calórico de la comida.

Red neuronal y propagación mono y polisináptica

Nuestros resultados demuestran que la estimulación optogenética de las fibras del aNAcSh provoca respuestas en las neuronas del propio aNAcSh, en mPFC y en LH (Figuras 14, 15, 17 y 18). Estos resultados son consistentes con estudios previos de

estimulación eléctrica profunda (DBS) del NAc que recluta una amplia red neuronal que incluye la corteza orbitofrontal e infralímbica así como el propio NAc (Vassoler et al. 2013, McCracken and Grace 2009). Para entender mejor como las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh transmiten su información a este circuito neuronal (mPFC→aNAcSh→LH), dividimos las respuestas en monosinápticas o respuestas rápidas y polisinápticas o respuestas tardías. En primer lugar, encontramos que las tres regiones registradas fueron rápidamente reclutadas por medio de la activación de las fibras excitatorias aferentes al aNAcSh, ya que las latencias de activación monosináptica de las tres zonas no fueron significativamente diferentes entre ellas. Sin embargo, esperábamos encontrar una mayor proporción de respuestas en las proyecciones corticales, es decir, que se hubieran registrado más respuestas monosinápticas antidrómicamente activadas en mPFC y esto fue exactamente lo que observamos tal como lo han reportado otros trabajos (Taber and Fibiger 1995). En segundo lugar, la activación de las neuronas de mPFC (y probablemente de otras aferencias glutamatérgicas, tales como, las provenientes de la amígdala basolateral, el hipocampo ventral y el tálamo) que proyectan hacia el aNAcSh liberan glutamato (Quiroz et al. 2016) y activan algunas respuestas rápidas en el aNAcSh (Figura 19A) incluyendo la activación de pMSNs y pInterneuronas (Figura 19C). Las pocas respuestas monosinápticas encontradas en el aNAcSh se puede explicar debido a la inhibición lateral ejercida por las mismas MSNs que de alguna manera podría estar enmascarando estas respuestas rápidas (Tepper and Bolam 2004b). En contraste, encontramos un mayor número de modulaciones tardías (polisinápticas) en el aNAcSh con periodos de latencia más largos en comparación con los encontrados en LH. Las respuestas tardías en el aNAcSh pueden provenir de las interacciones entre el propio circuito estriatal, ya que esta región mostró grandes proporciones de modulación similares tanto en pMSNs e Interneuronas putativas (Figura 19C), y/o pueden provenir de las interacciones polisinápticas inter-regiones de las neuronas corticales que disparan a diferentes tiempos a una misma neurona MSN (Vizcarra-Chacon et al. 2013). Además, se encontró que el último pico registrado en el aNAcSh estaba fuera de fase y que correlaciono negativamente con el último pico registrado en el LH (Figura 19A, marcado con una flecha). Es decir, mientras las neuronas del aNAcSh estaban más activas, las neuronas del LH disparaban menos.

Estos datos sugieren que las neuronas del aNAcSh liberan suficiente cantidad de GABA para inhibir las respuestas tardías de LH y que esta inhibición incrementa entre más pulsos de luz ocurran.

CONCLUSIONES

En esta tesis demostramos por primera vez que la estimulación optogenética de las fibras glutamatérgicas aferentes al aNAcSh es recompensante y ejerce un rápido control sobre las conductas consumatorias, tales como la alimentación, esto independientemente del contenido calórico de la sacarosa y del estado de saciedad del animal. Nuestros datos indican que la estimulación optogenética de las aferencias glutamatérgicas al aNAcSh puede modular tanto el circuito de la alimentación como el circuito de la recompensa y abre el camino para encontrar mejores blancos terapéuticos para tratar a la obesidad.

Reconocimientos:

Agradezco al Dr. Osvaldo Ibañez Sandoval por su participación en el registro electrofisiológico *in vitro* mostrado en la Figura 9, así como a la doctora Elvira Galarraga y a Mario A. García por facilitarnos el equipo y reactivos necesarios para la realización de este experimento. A Liliana Purón por participar en los registros electrofisiológicos que llevaron a la culminación de la Figura 14C-E del presente trabajo. Así mismo por la colaboración de mi muy estimado compañero Jorge Luis Islas en la ejecución de experimentos conductuales que se llevaron a cabo para terminar la Figura 12 y un reconocimiento especial por su labor incondicional en todo momento y por realizar todos los electrodos y optrodos de registro que se utilizan en el laboratorio a Mario Gil Moreno. Así mismo a Fabiola Olvera por el cuidado realizado en todo momento a los animales utilizados durante este experimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamantidis, A. R., F. Zhang, A. M. Aravanis, K. Deisseroth & L. de Lecea (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 450, 420-4.
- Aponte, Y., D. Atasoy & S. M. Sternson (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci*, 14, 351-5.
- Arenkiel, B. R., J. Peca, I. G. Davison, C. Feliciano, K. Deisseroth, G. J. Augustine, M. D. Ehlers & G. Feng (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron*, 54, 205-18.
- Baldo, B. A., L. Gual-Bonilla, K. Sijapati, R. A. Daniel, C. F. Landry & A. E. Kelley (2004) Activation of a subpopulation of orexin/hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABA_A receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. *Eur J Neurosci*, 19, 376-86.
- Berridge, K. C., T. E. Robinson & J. W. Aldridge (2009) Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol*, 9, 65-73.
- Boyden, E. S., F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel & K. Deisseroth (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 8, 1263-8.
- Britt, J. P., F. Benaliouad, R. A. McDevitt, G. D. Stuber, R. A. Wise & A. Bonci (2012) Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron*, 76, 790-803.
- Buonomano, D. V. (2003) Timing of neural responses in cortical organotypic slices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4897-902.
- Cegla, J., T. M. Tan & S. R. Bloom (2010) Gut-brain cross-talk in appetite regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13, 588-93.
- Chow, B. Y., A. S. Chuong, N. C. Klapoetke & E. S. Boyden (2011) Synthetic physiology strategies for adapting tools from nature for genetically targeted control of fast biological processes. *Methods Enzymol*, 497, 425-43.
- Deisseroth, K. (2011) Optogenetics. *Nat Methods*, 8, 26-9.
- Deisseroth, K., G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenbock, A. Ting & M. J. Schnitzer (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci*, 26, 10380-6.
- Diester, I., M. T. Kaufman, M. Mogri, R. Pashaie, W. Goo, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth & K. V. Shenoy (2011) An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat Neurosci*, 14, 387-97.
- Gradinaru, V., M. Mogri, K. R. Thompson, J. M. Henderson & K. Deisseroth (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science*, 324, 354-9.
- Gradinaru, V., K. R. Thompson & K. Deisseroth (2008) eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol*, 36, 129-39.
- Gradinaru, V., K. R. Thompson, F. Zhang, M. Mogri, K. Kay, M. B. Schneider & K. Deisseroth (2007) Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27, 14231-8.
- Gradinaru, V., F. Zhang, C. Ramakrishnan, J. Mattis, R. Prakash, I. Diester, I. Goshen, K. R. Thompson & K. Deisseroth (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*, 141, 154-65.
- Gutierrez, R., J. M. Carmena, M. A. Nicolelis & S. A. Simon (2006) Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J Neurophysiol*, 95, 119-33.
- Gutierrez, R. & S. A. Simon (2011) Chemosensory processing in the taste - reward pathway. 26, 231-238.
- Gutierrez, R., S. A. Simon & M. A. Nicolelis (2010) Licking-induced synchrony in the taste-reward circuit improves cue discrimination during learning. *J Neurosci*, 30, 287-303.

- Halpern, C. H., J. A. Wolf, T. L. Bale, A. J. Stunkard, S. F. Danish, M. Grossman, J. L. Jaggi, M. S. Grady & G. H. Baltuch (2008) Deep brain stimulation in the treatment of obesity. *J Neurosurg*, 109, 625-34.
- Heimer, L., D. S. Zahm, L. Churchill, P. W. Kalivas & C. Wohltmann (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*, 41, 89-125.
- Herculano-Houzel, S. (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*, 3, 31.
- Holt, G. R., W. R. Softky, C. Koch & R. J. Douglas (1996) Comparison of discharge variability in vitro and in vivo in cat visual cortex neurons. *J Neurophysiol*, 75, 1806-14.
- Horst, N. K. & M. Laubach (2013) Reward-related activity in the medial prefrontal cortex is driven by consumption. *Front Neurosci*, 7, 56.
- Humphries, M. D. & T. J. Prescott (2010) The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog Neurobiol*, 90, 385-417.
- Jarvis, M. R. & P. P. Mitra (2001) Sampling properties of the spectrum and coherency of sequences of action potentials. *Neural Comput*, 13, 717-49.
- Jennings, J. H., R. L. Ung, S. L. Resendez, A. M. Stamatakis, J. G. Taylor, J. Huang, K. Veleta, P. A. Kantak, M. Aita, K. Shilling-Scrivo, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, S. Otte & G. D. Stuber (2015) Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell*, 160, 516-27.
- Kelley, A. E., B. A. Baldo, W. E. Pratt & M. J. Will (2005) Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav*, 86, 773-95.
- Kelley, A. E. & K. C. Berridge (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci*, 22, 3306-11.
- Krause, M., P. W. German, S. A. Taha & H. L. Fields (2010) A pause in nucleus accumbens neuron firing is required to initiate and maintain feeding. *J Neurosci*, 30, 4746-56.
- Kroeger, D. & L. de Lecea (2009) The hypocretins and their role in narcolepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 8, 271-80.
- Kumar, S., S. J. Black, R. Hultman, S. T. Szabo, K. D. DeMaio, J. Du, B. M. Katz, G. Feng, H. E. Covington, 3rd & K. Dzirasa (2013) Cortical control of affective networks. *J Neurosci*, 33, 1116-29.
- Lobo, M. K., H. E. Covington, 3rd, D. Chaudhury, A. K. Friedman, H. Sun, D. Damez-Werno, D. M. Dietz, S. Zaman, J. W. Koo, P. J. Kennedy, E. Mouzon, M. Mogri, R. L. Neve, K. Deisseroth, M. H. Han & E. J. Nestler (2010) Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*, 330, 385-90.
- Lutter, M. & E. J. Nestler (2009) Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J Nutr*, 139, 629-32.
- Matamales, M., J. Bertran-Gonzalez, L. Salomon, B. Degos, J. M. Deniau, E. Valjent, D. Herve & J. A. Girault (2009) Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS One*, 4, e4770.
- Matyas, F., V. Sreenivasan, F. Marbach, C. Wacogne, B. Barsy, C. Mateo, R. Aronoff & C. C. Petersen (2010) Motor control by sensory cortex. *Science*, 330, 1240-3.
- McCracken, C. B. & A. A. Grace (2009) Nucleus accumbens deep brain stimulation produces region-specific alterations in local field potential oscillations and evoked responses in vivo. *J Neurosci*, 29, 5354-63.
- Mogenson, G. J., L. W. Swanson & M. Wu (1983) Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *J Neurosci*, 3, 189-202.
- Nagel, G., T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann & E. Bamberg (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13940-5.

- Navarro, M., J. J. Olney, N. W. Burnham, C. M. Mazzone, E. G. Lowery-Gionta, K. E. Pleil, T. L. Kash & T. E. Thiele (2016) Lateral Hypothalamus GABAergic Neurons Modulate Consummatory Behaviors Regardless of the Caloric Content or Biological Relevance of the Consumed Stimuli. *Neuropsychopharmacology*, 41, 1505-12.
- O'Connor, E. C., Y. Kremer, S. Lefort, M. Harada, V. Pascoli, C. Rohner & C. Luscher (2015) Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron*, 88, 553-64.
- Perez, I. O., M. Villavicencio, S. A. Simon & R. Gutierrez (2013) Speed and accuracy of taste identification and palatability: impact of learning, reward expectancy, and consummatory licking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 305, R252-70.
- Porrero, C., P. Rubio-Garrido, C. Avendano & F. Clasca (2010) Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res*, 1345, 59-72.
- Quiroz, C., M. Orru, W. Rea, A. Ciudad-Roberts, G. Yepes, J. P. Britt & S. Ferre (2016) Local Control of Extracellular Dopamine Levels in the Medial Nucleus Accumbens by a Glutamatergic Projection from the Infralimbic Cortex. *J Neurosci*, 36, 851-9.
- Roitman, M. F., R. A. Wheeler & R. M. Carelli (2005) Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output. *Neuron*, 45, 587-97.
- Rossi, M. A. & H. H. Yin (2015) Elevated dopamine alters consummatory pattern generation and increases behavioral variability during learning. *Front Integr Neurosci*, 9, 37.
- Sano, H. & M. Yokoi (2007) Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J Neurosci*, 27, 6948-55.
- Sciamanna, G., G. Ponterio, G. Mandolesi, P. Bonsi & A. Pisani (2015) Optogenetic stimulation reveals distinct modulatory properties of thalamostriatal vs corticostriatal glutamatergic inputs to fast-spiking interneurons. *Sci Rep*, 5, 16742.
- Simon, S. A., I. E. de Araujo, R. Gutierrez & M. A. Nicolelis (2006) The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci*, 7, 890-901.
- Stratford, T. R. & A. E. Kelley (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci*, 17, 4434-40.
- (1999) Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci*, 19, 11040-8.
- Stratford, T. R., A. E. Kelley & K. J. Simansky (1999) Blockade of GABA_A receptors in the medial ventral pallidum elicits feeding in satiated rats. *Brain Res*, 825, 199-203.
- Stuber, G. D., J. P. Britt & A. Bonci (2012) Optogenetic modulation of neural circuits that underlie reward seeking. *Biol Psychiatry*, 71, 1061-7.
- Szczypka, M. S., M. A. Rainey, D. S. Kim, W. A. Alaynick, B. T. Marck, A. M. Matsumoto & R. D. Palmiter (1999) Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12138-43.
- Taber, M. T. & H. C. Fibiger (1995) Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci*, 15, 3896-904.
- Tellez, L. A., I. O. Perez, S. A. Simon & R. Gutierrez (2012) Transitions between sleep and feeding states in rat ventral striatum neurons. *J Neurophysiol*, 108, 1739-51.
- Tepper, J. M. & J. P. Bolam (2004a) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *ELSEVIER*, 1-6.
- Tepper, J. M. & J. P. Bolam (2004b) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 685-92.

- Tepper, J. M., F. Tecuapetla, T. Koos & O. Ibanez-Sandoval (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat*, 4, 150.
- Tonnesen, J., A. T. Sorensen, K. Deisseroth, C. Lundberg & M. Kokaia (2009) Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12162-7.
- Tsai, H. C., F. Zhang, A. Adamantidis, G. D. Stuber, A. Bonci, L. de Lecea & K. Deisseroth (2009) Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*, 324, 1080-4.
- Tsunematsu, T., T. S. Kilduff, E. S. Boyden, S. Takahashi, M. Tominaga & A. Yamanaka (2011) Acute Optogenetic Silencing of Orexin/Hypocretin Neurons Induces Slow-Wave Sleep in Mice. *J Neurosci*, 31, 10529-10539.
- Vassoler, F. M., S. L. White, T. J. Hopkins, L. A. Guercio, J. Espallergues, O. Berton, H. D. Schmidt & R. C. Pierce (2013) Deep brain stimulation of the nucleus accumbens shell attenuates cocaine reinstatement through local and antidromic activation. *J Neurosci*, 33, 14446-54.
- Vizcarra-Chacon, B. J., M. A. Arias-Garcia, M. B. Perez-Ramirez, E. Flores-Barrera, D. Tapia, R. Drucker-Colin, J. Vargas & E. Galarraga (2013) Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci*, 14, 60.
- Wang, H., J. Peca, M. Matsuzaki, K. Matsuzaki, J. Noguchi, L. Qiu, D. Wang, F. Zhang, E. Boyden, K. Deisseroth, H. Kasai, W. C. Hall, G. Feng & G. J. Augustine (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8143-8.
- Weiss, M. S. & P. M. Di Lorenzo (2012) Not so fast: taste stimulus coding time in the rat revisited. *Front Integr Neurosci*, 6, 27.
- Yarom, O. & D. Cohen (2011) Putative cholinergic interneurons in the ventral and dorsal regions of the striatum have distinct roles in a two choice alternative association task. *Front Syst Neurosci*, 5, 36.
- Zhang, F., V. Gradinaru, A. R. Adamantidis, R. Durand, R. D. Airan, L. de Lecea & K. Deisseroth (2010) Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat Protoc*, 5, 439-56.
- Zhang, F., M. Prigge, F. Beyriere, S. P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann & K. Deisseroth (2008) Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat Neurosci*, 11, 631-3.
- Zhang, F., L. P. Wang, E. S. Boyden & K. Deisseroth (2006) Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods*, 3, 785-92.
- Zhang, F., L. P. Wang, M. Brauner, J. F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P. G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk & K. Deisseroth (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446, 633-9.

Referencias de sitios de internet:

http://www.ted.com/talks/ed_boyden?language=en