



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA**

**Implementación de microendoscopía de fluorescencia
para el estudio de ensamblajes neuronales**

Tesis que presenta:

M. en C. Alam Iztac Hernández Coss

para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias

en la especialidad de
Ingeniería Eléctrica

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ernesto Suaste Gómez

Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza

Esta tesis de doctorado fue financiada por el CONACYT mediante el programa de becas de posgrado y los donativos Fronteras de la Ciencia 63 y Problemas Nacionales 432. Corresponde a un trabajo en conjunto entre la sección de Bioelectrónica, bajo la tutoría del Dr. Ernesto Suaste Gómez y el laboratorio 36 del departamento de Farmacología, a cargo del Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, ambos en el CINVESTAV Zacatenco.

En memoria del Dr. David Elías Viñas.

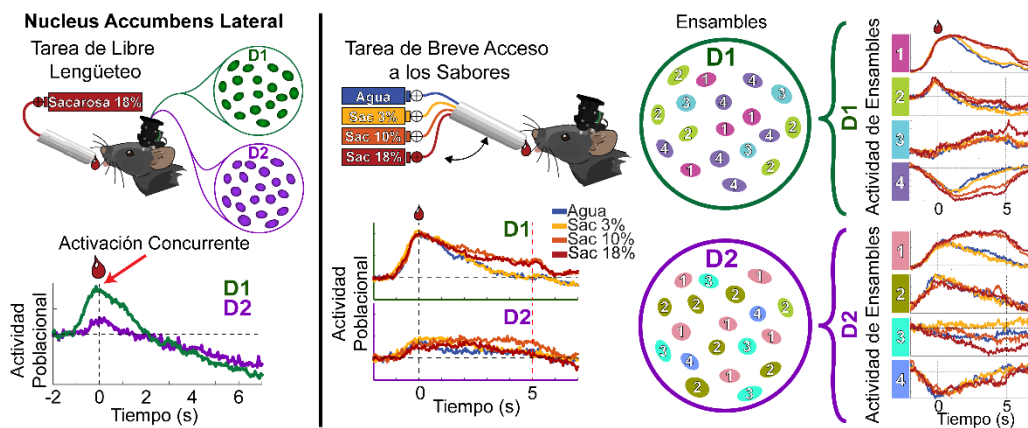
Contenido

1.-	Resumen	4
2.-	Abstract.....	4
3.-	Planteamiento del Problema	5
4.-	Hipótesis.....	6
5.-	Introducción.....	6
6.-	Objetivos Generales.....	9
7.-	Objetivos Particulares	10
8.-	Aportaciones del Estudio	11
9.-	Desarrollo.....	13
9.1.-	Resumen Gráfico del Desarrollo	13
9.2.-	Procedimiento de Inyección Viral	13
9.1.-	Caja conductual con bebedero retráctil.....	16
9.2.-	Diseño y Construcción de Aparato Conductual	20
9.3.-	Registro de tareas de libre y breve acceso a los sabores.....	21
9.1.-	Adquisición de datos y análisis de imágenes	22
10.-	Resultados.....	25
10.1.-	Las neuronas D1 y D2 del NAcLat correlacionan con el comportamiento de lengüeteo y las mismas neuronas pueden predecir confiablemente y monitorear el comportamiento de lengüeteo a través de los días	25
10.2.-	Las neuronas D1 y D2 del NAcLat predicen el comportamiento de lengüeteo	31
10.3.-	Las poblaciones de neuronas D1 y D2 del NAcLat tienen respuestas distintas durante las tareas de libre lengüeteo y BATT	33
10.4.-	Las neuronas individuales D1 y D2 del NAcLat categorizan las concentraciones de sacarosa de manera consistente con su palatabilidad.....	36
10.5.-	Las poblaciones D1 y D2 del NAcLat son heterogéneas y están compuestas de ensambles de neuronas con respuestas similares entre ellas	39
10.6.-	Las neuronas D1 y D2 del NAcLat codifican la intensidad de sacarosa	41
11.-	Discusión	44
12.-	Conclusión.....	51
13.-	Métodos y Materiales	51
13.1.-	Ratones	51
13.2.-	Inyección Viral.....	52
13.3.-	Implantación de lente y colocación de la base para microendoscopio	52

13.4.-	Prueba de Acceso Breve al Sabor.....	54
13.5.-	Análisis de Datos	55
13.6.-	Análisis de Señales de Calcio en Libre Lengüeteo de Sacarosa al 18%.....	57
13.7.-	Análisis de Señales de Calcio en BATT	57
13.8.-	Clasificación por Ensamble de Señales de Calcio.....	58
14.-	Bibliografía	59

1.- Resumen

En este proyecto presentamos la caracterización e implementación de la técnica de microendoscopía de fluorescencia para el estudio de subpoblaciones neuronales del Núcleo Accumbens Shell Lateral, en ratones en libre movimiento durante actividades apetitivas y consumatorias, así como el diseño y construcción del aparato experimental que provee a los sujetos de distintos estímulos gustativos mediante una tarea automatizada de acceso breve a los sabores (AutoBATT), este experimento permite obtener información sobre la respuesta de las poblaciones de neuronas que expresan receptores de dopamina tipo D1 y D2, de forma separada, elucidando así sus funciones específicas durante la alimentación.



Resumen Gráfico

2.- Abstract

In this project we present the characterization and implementation of a fluorescence microendoscopy technique to study the neuronal subpopulations of the Lateral Nucleus Accumbens Shell, in freely moving mice during appetitive and consummatory behaviors, and also the design and construction of the experimental apparatus providing the subjects with different tastants through an automated Brief Access to Taste Task (autoBATT), this experiment allows us to elucidate the responses of

neuronal population expressing D1 and D2 dopamine receptors, separately, thus elucidating their specific functions during feeding.

3.- Planteamiento del Problema

El estudio de ensambles neuronales específicos en animales en libre movimiento y realizando tareas implica varios problemas tecnológicos que son solucionados solo parcialmente por las técnicas actualmente utilizadas. El registro electrofisiológico tiene una muy alta resolución espacial y temporal, pero no permite observar poblaciones específicas y no puede realizarse durante varios meses para observar las mismas neuronas por las características de los electrodos, también es altamente sensible a los artefactos eléctricos. La resonancia magnética funcional tiene una menor resolución temporal, pero mayor resolución espacial de las áreas del cerebro que presentan actividad neuronal durante ciertos procesos, sin embargo, requiere que los animales estén inmobilizados y habitualmente anestesiados, lo que imposibilita el análisis de tareas de libre movimiento y altera inevitablemente la conectividad funcional de sus circuitos neuronales (Grandjean et al., 2014). Debido a estas limitantes se requiere tecnología novedosa que permita estudiar poblaciones de neuronas definidas genéticamente, en áreas determinadas del cerebro, mientras los animales están despiertos y que sea inmune a artefactos eléctricos producidos por la activación muscular.

Aunado a la resolución espacial y temporal que necesitan los experimentos actuales de neurobiología, es necesario observar poblaciones identificadas genéticamente para explicar en qué forma aporta cada una de estas poblaciones al funcionamiento del sitio a analizar. Hasta el momento de la realización de este proyecto no existen en nuestro país laboratorios que apliquen técnicas de registro que cumplan con estas características en animales en libre movimiento durante tareas apetitivas y consumatorias.

4.- Hipótesis

Las neuronas dopaminérgicas del Núcleo Accumbens Shell Lateral, divididas en poblaciones según su expresión de receptores tipo D1 y D2 tienen funciones diferentes y complementarias entre sí durante los procesos apetitivos y consumatorios.

5.- Introducción

En el cerebro de varias especies de mamíferos, incluyendo a los humanos y ratones, el Nucleus Accumbens parte Shell (NAcSh) está involucrado en la codificación de la recompensa, la alimentación y el valor hedónico de la sacarosa (Krause et al., 2010; Taha & Fields, 2005; Villavicencio et al., 2018). Se piensa que el NAcSh sirve como un sitio centinela que regula el apetito y las actividades consumatorias (O'Connor et al., 2015a; Prado et al., 2016), tales respuestas han sido encontradas en la parte medial del NAcSh (medNAcSh), sin embargo, hay escasa información sobre su parte lateral (NAcLat). Recientemente un estudio demostró que el medNAcSh y el NAcLat reciben distinta señalización dopaminérgica y codifican diferencialmente información de aversión y de recompensa. Por ejemplo, las neuronas del NAcLat se inhiben en presencia de estímulos aversivos pero incrementan su actividad durante la entrega de una recompensa o después de la presentación de estímulos condicionados que predicen una recompensa (de Jong et al., 2019). A pesar de ello, no se entiende completamente cómo las neuronas del NAcLat responden a estímulos apetitivos.

El estriado, el Nucleus Accumbens (NAc) y el tubérculo olfatorio constituyen una región sin divisiones anatómicas evidentes. Esta región está compuesta en un 90% de Neuronas Espinosas Medianas y en menos del 10% de varias interneuronas. Las neuronas espinosas medianas pueden dividirse de acuerdo con su expresión de diferentes receptores de dopamina en neuronas tipo D1 y D2. A pesar de su

aparente similitud y uniformidad anatómica un reciente censo molecular de los tipos celulares del NAc utilizando secuenciación de ARN de células individuales descubrió una sorprendente heterogeneidad espacial, molecular y celular. Particularmente, las neuronas espinosas medianas del medNAcSh y NAcLat expresan diferentes combinaciones de genes, esto sugiere, a pesar de su aparente simplicidad anatómica, que el NAc oculta una estructura heterogénea y una gama de diversas funciones dependientes a su localización espacial (R. Chen et al., 2021). Esfuerzos previos para elucidar la conectividad y función de las poblaciones genéticamente distintas de las neuronas del NAcLat encontraron que las neuronas D1 del NAcLat proyectan principalmente al Área Ventral Tegmental y que su estimulación artificial directa es recompensante. Estos descubrimientos anatómicos y funcionales resaltan la importancia de caracterizar a las diferentes regiones del NAcSh.

El NAcLat es ventralmente adyacente al estriado dorsolateral. En ratas, las neuronas del estriado dorsolateral incrementan su frecuencia de disparo con la estimulación sensorial de partes individuales del cuerpo y están localizadas a lo largo del eje dorsoventral del estriado con una organización somatotópica, es decir, diferentes coordenadas dorsoventrales contienen neuronas que responden a diferentes partes del cuerpo. La representación oral está en la parte más ventral del estriado (Robbe, 2018), subyacente al NAcLat.. Sin embargo no se sabe con certeza si esta representación oral se extiende hacia las neuronas del NAcLat (Cho & West, 1997), tampoco se conoce si las poblaciones de neuronas D1 y D2 del NAcLat responden homogéneamente a los estímulos gustativos o si forman ensambles funcionales para procesarlos.

Estudios del NAcSh han encontrado relaciones entre las respuestas de palatabilidad y los estímulos gustativos hedónicamente positivos y negativos (Krause et al., 2010; Roitman et al., 2005). La sacarosa en particular altera la actividad neuronal del NAcSh (Hajnal et

al., 2004) y evoca cambios dependientes de su concentración a lo largo de la vía del procesamiento gustativo (X. Chen et al., 2011; Jezzini et al., 2013; Rolls, 1989; Roussin et al., 2012; Stapleton, 2006; A. Wu et al., 2015).

Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar el papel de las neuronas D1 y D2 del NAcLat durante los comportamientos apetitivos y consumatorios. Para este fin, se realizaron grabaciones de microendoscopia de epifluorescencia con GCaMP6m, un sensor fluorescente de la actividad de calcio, en el NAcLat, mientras los ratones *Drd1-cre* y *Drd2-cre*, respectivamente, lengüeteaban un bebedero para obtener sacarosa durante una tarea de libre acceso al estímulo. También se monitoreó la actividad de las mismas neuronas D1 y D2 mientras los sujetos realizaban una tarea de breve acceso a los sabores con bebedero retráctil (autoBATT), entregando a los sujetos una variedad de estímulos gustativos, ya fueran concentraciones crecientes de sacarosa o diferentes cualidades gustativas como soluciones con quinina, ácido cítrico y cloruro de sodio. Esta tarea se utilizó para develar los correlatos neuronales de las respuestas de lengüeteo evocadas por el sabor relacionadas con la palatabilidad, calidad y concentración de los estímulos gustativos (Davis, 1973; Smith et al., 1992; Villavicencio et al., 2018; Young & Trafton, 1964).

Para la adquisición de información se utilizó el indicador fluorescente de calcio GCaMP6m, un sensor de calcio creado a partir de proteínas extraídas de especies bioluminiscentes que son modificadas e introducidas mediante infecciones virales en las células neuronales a estudiar. Al ser usadas como indicadores de actividad neuronal estas moléculas actúan como marcadores fluorescentes que se expresan en la pared celular, modificando su estructura en presencia de flujos iónicos alrededor de la célula, lo que pone al descubierto una molécula de fluoróforo que emite radiación lumínica en respuesta a estímulos

externos de luz (T.-W. Chen et al., 2013). Los potenciales de acción de las neuronas aparecen por flujos de iones a través de la membrana celular, los indicadores de Ca_2+ genéticamente modificados reaccionan durante dichos potenciales (también denominados espigas, ya que en cada potencial se incrementa el Ca_2+ intracelular, ver abajo) y se aumenta la fluorescencia del área infectada, la fluorescencia puede extraerse del cuerpo del animal a través de un sistema óptico, que permita la entrada de radiación lumínica excitatoria y la extracción de señales de fluorescencia.

La microendoscopía de fluorescencia es una de las técnicas que permiten obtener información de indicadores fluorescentes en animales vivos en libre movimiento, consiste en la implantación de un lente con gradiente de índice de refracción (GRIN) y su posterior alineamiento y adquisición mediante una cámara de alta ganancia, esta técnica permite observar en un video de tiempo real el aumento de la fluorescencia en los ensambles neuronales situados debajo de la cara interna del lente, el cuál puede implantarse a distintas profundidades del cerebro. La microendoscopía de fluorescencia permite observar en tiempo real a los indicadores fluorescentes de calcio expresados en las membranas celulares de las neuronas y mediante el análisis de su fluorescencia se obtiene información indirecta de su actividad sináptica.

6.- Objetivos Generales

- Estandarizar la expresión de indicadores fluorescentes de calcio genéticamente codificados (GECI) en neuronas de Núcleo Accumbens Shell en ratones.
- Diseño y construcción de un sistema de automatización para tareas conductuales, que permita realizar experimentos con microendoscopía de fluorescencia.

- Implementación de una tarea conductual que permita explicar cuál es la función específica de las neuronas D1 y D2 del Núcleo Accumbens Shell Lateral durante actividades apetitivas y consumatorias.
- Adquisición de información novedosa sobre el papel de las subpoblaciones neuronales de Núcleo Accumbens en la alimentación.

7.- Objetivos Particulares

- Identificación del Núcleo Accumbens Shell Lateral en cortes histológicos en ratones mediante tinción de Nissl para resaltar marcadores anatómicos pertinentes, como el Cuerpo Calloso y la Comisura Anterior.
- Realización de pruebas de dilución viral para encontrar la concentración adecuada de virus con promotores dependientes de Cre (FLEX), en ratones de dos cepas transgénicas que expresan Cre en poblaciones D1 y D2 (Drd1-cre y Drd2-cre, respectivamente).
- Inyección de adenovirus asociados dependientes de Cre para la expresión de GCaMP6m en animales transgénicos que expresen Cre en neuronas con receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2.
- Entrenamiento de los animales D1 y D2 en la tarea conductual de breve acceso a los sabores.
- Implantación de lentes GRIN en animales entrenados.
- Registros de señales de microendoscopia en animales en libre movimiento.
- Extracción y normalización de trazas de actividad de fluorescencia correspondientes a neuronas individuales.

- Análisis de la información obtenida para determinar la función de las poblaciones neuronales con receptores tipo D1 y D2 en Núcleo Accumbens en su parte Shell Lateral.

8.- Aportaciones del Estudio

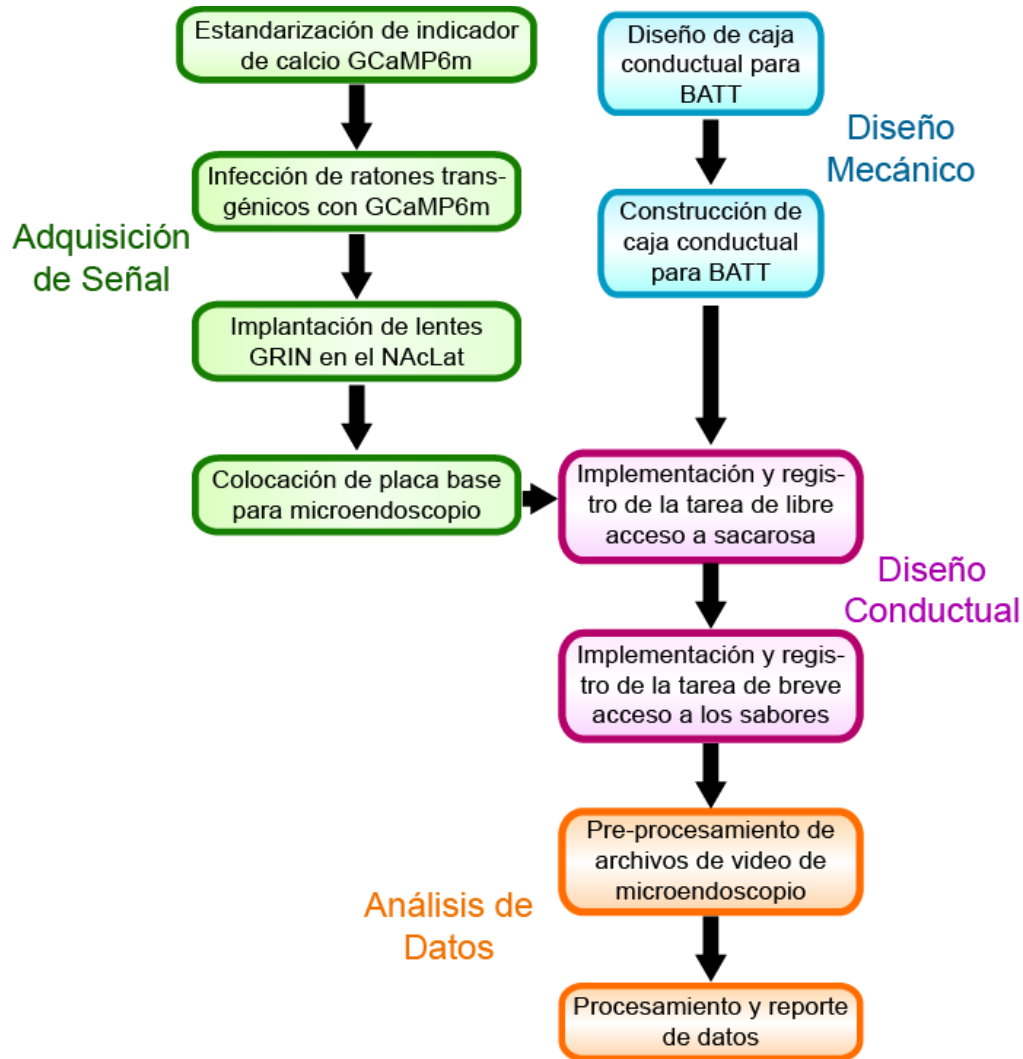
La palatabilidad y concentración de la comida azucarada promueve el consumo más allá de las necesidades homeostáticas, por ello es esencial entender las respuestas neuronales evocadas por el consumo de azúcar. En el cerebro de humanos, primates no humanos y modelos murinos (ratas y ratones) la región anteromedial del Nucleus Accumbens Shell (medNAcSh) es considerada una región centinela, que regula los comportamientos de alimentación de comida palatable a la vez que integra una gran cantidad de estímulos somatosensoriales externos, sin embargo, existía escasa información sobre cómo las neuronas de la región lateral del NAcSh (NAcLat) son moduladas durante el consumo de sacarosa y si pueden monitorear el comportamiento oromotor de lengüeteo y/o información de sabor. Para adquirir esta información, en este trabajo, se utilizaron microendoscopios de epifluorescencia para realizar análisis de imagenología de calcio en neuronas genéticamente identificadas como D1 o D2 en el NAcLat de ratones transgénicos *Drd1-cre* y *Drd2-cre*, mientras estos realizaban diversas tareas de comportamiento donde se les requería lengüetear un bebedero para obtener distintos estímulos gustativos incluyendo diferentes concentraciones de sacarosa.

Se encontró que la actividad de calcio proveniente de las neuronas D1 y D2 predice el comportamiento de lengüeteo en una tarea de libre lengüeteo, donde los sujetos tienen acceso sin restricción a un bebedero de solución de sacarosa al 18%. La actividad de neuronas de ambos tipos registrada en un día puede ser usada para predecir el comportamiento de lengüeteo en los días siguientes. Las respuestas neuronales en una tarea de libre acceso a la sacarosa fueron homogéneas, se observó que

las neuronas D1 incrementaron su excitabilidad precediendo el inicio del lengüeteo con mayor magnitud que las neuronas D2, este incremento fue seguido de un rápido decremento en su actividad de calcio, reflejando una inhibición de la actividad neuronal durante el lengüeteo. En contraste, en una tarea automatizada de acceso breve a los sabores donde los ratones tuvieron 5 segundos de acceso a cada estímulo gustativo, la respuesta de las neuronas D1 y D2 fue más funcionalmente heterogénea que en la tarea de libre acceso, específicamente, las neuronas del NAcLat responden a eventos externos relevantes para la tarea, tales como el inicio y el fin del periodo de acceso al estímulo gustativo, aunado a esto, las poblaciones de neuronas D1 y D2 pueden ser subdivididas en ensambles funcionales distintos que responden a la presencia de un estímulo líquido en el bebedero o a cambios en la concentración de sacarosa. Ensamblés específicos de neuronas D1 y D2 anticipan el inicio del lengüeteo, el final del periodo de acceso al estímulo gustativo, categorizan los estímulos gustativos de acuerdo con su concentración relativa de sacarosa y responden selectivamente a una o más cualidades gustativas diferentes. Estos resultados sugieren que el NAcLat puede servir como canales de procesamiento en paralelo para información oromotora, gustativa y relevante a la tarea. Cabe resaltar que las respuestas de las neuronas D1 y D2 del NAcLat son dependientes del contexto comportamental del sujeto, por ejemplo, las respuestas neuronales difieren si los ratones consumen sacarosa en un contexto de acceso libre o durante una tarea de breve acceso al sabor. En resumen, las poblaciones de neuronas D1 y D2 del NAcLat son funcionalmente heterogéneas y están compuestas de ensambles que se adaptan al contexto comportamental del sujeto, para monitorear de manera paralela eventos relevantes a la tarea, el inicio y fin del lengüeteo, las concentraciones de sacarosa y las cualidades gustativas.

9.- Desarrollo

9.1.- Resumen Gráfico del Desarrollo



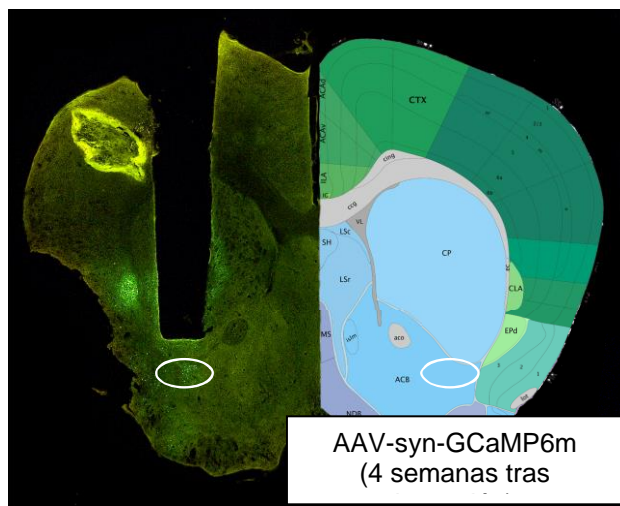
9.2.- Procedimiento de Inyección Viral

La primera parte es la estandarización de las inyecciones virales, de esto depende el éxito de las técnicas presentadas en este proyecto, para asegurar su buen funcionamiento se realizan pruebas de dilución. Cuando se distribuye un vector viral, se acompaña de una hoja de especificaciones donde se especifica el "Titer" o título viral que corresponde con la cantidad de unidades virales por volumen o la

cantidad de unidades formadoras de placa por volumen, pero este índice no es una medida confiable de la eficiencia del virus una vez introducido en el tejido a observar, es por eso que cada nuevo lote de virus debe someterse a una prueba de dilución viral que consta de los siguientes pasos:

1. Obtener alícuotas del material viral original del mínimo volumen necesario para cada sesión experimental, por ejemplo 5 μ l y mantenerlas en tubos de PCR a -60 °C, evitando que pasen por varios ciclos de congelación y descongelación, pues esto puede afectar negativamente la infectividad del virus.
2. Extraer una alícuota, descongelar sobre hielo y preparar distintas soluciones en salina en distintas proporciones: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 las cuáles serán inyectadas todas en distintos animales de la misma cepa en un área previamente determinada por sus coordenadas con respecto a bregma.
3. Realizar una craneotomía mediante cirugía estereotáxica en las mismas coordenadas laterales y anteroposteriores sobre el sitio en el cerebro que desea infectarse y retirar la dura para evitar obstrucciones en la aguja.
4. Cargar la aguja con el volumen de dilución a inyectar, usualmente 500 nl, pero puede variar dependiendo del volumen de la zona que se desea infectar y sus características anatómicas, como puede ser la cercanía a ventrículos.
5. Introducir la aguja a través de la apertura de la craneotomía y bajarla en el eje dorso-ventral hasta posicionarla sobre el sitio de infección.
6. Inyectar lentamente, a una velocidad alrededor de 100 nl por minuto y después dejar la aguja inmóvil 7 minutos para que la dilución sea absorbida por el tejido circundante y evitar que siga la ruta de la aguja al retraerse.

7. Limpiar la craneotomía y sellar con cera de hueso o adhesivo biocompatible y luego suturar la piel.
8. Inyectar al sujeto con las dosis de anti-inflamatorios y analgésicos apropiados a su peso.
9. Repetir la operación para cada una de las proporciones de dilución en los mismos sitios en distintos animales.
10. Después de 2 a 3 semanas sacrificar a todos los sujetos, perfundirlos y observar por microscopía confocal los niveles de fluorescencia en cada uno. Elegir la mayor dilución que infecte todo el sitio de interés sin presentar sobre-expresión. En el caso de los indicadores GCaMP6m, las neuronas sobre-expresadas tienen altos niveles fluorescencia y se observan como puntos brillantes, mientras que un buen nivel de expresión se observa como un halo fluorescente solo en las paredes celulares.



Corte histológico mostrando la fluorescencia en neuronas infectadas por un indicador de calcio tipo GCaMP6m y su equivalente en el Atlas del Allen Brain Institute.

Para el estudio de microendoscopía de fluorescencia, después de tres semanas de inyectados se realiza la implantación de los lentes GRIN por cirugía estereotáxica, cuando el lente es demasiado ancho como para

entrar sin causar un daño sustancial en el tejido se utiliza una bomba de vacío para extraer tejido de la corteza cerebral en su trayectoria de entrada. El lente se pega al cráneo y se cubre su superficie para evitar que el ratón raye su superficie.

Una semana después de la implantación se coloca una pieza plástica con magnetos conocida como *baseplate*, que sirve para la alineación y protección mecánica del lente y de su interfaz con el microendoscopio. Al conectar el microendoscopio se encienden la estimulación LED y la cámara interna y se puede observar la variación en fluorescencia en las neuronas del sitio de implantación que expresan el indicador de calcio.

9.1.- Caja conductual con bebedero retráctil

La caja conductual consta de piso y paredes de acrílico de 3 mm de espesor, formando una cámara con 130 x 74 mm de base y 125 mm de altura. El techo es una tapa removible con una ranura de 25 mm para permitir el paso del cable del microendoscopio. El piso debajo del bebedero es una pieza de acrílico transparente que ayuda a grabar la actividad consumatoria con una cámara de video colocada debajo. La altura del piso de la caja es de 127 mm para lograr el mejor plano de enfoque en el bebedero con una cámara web C920 de Logitech.

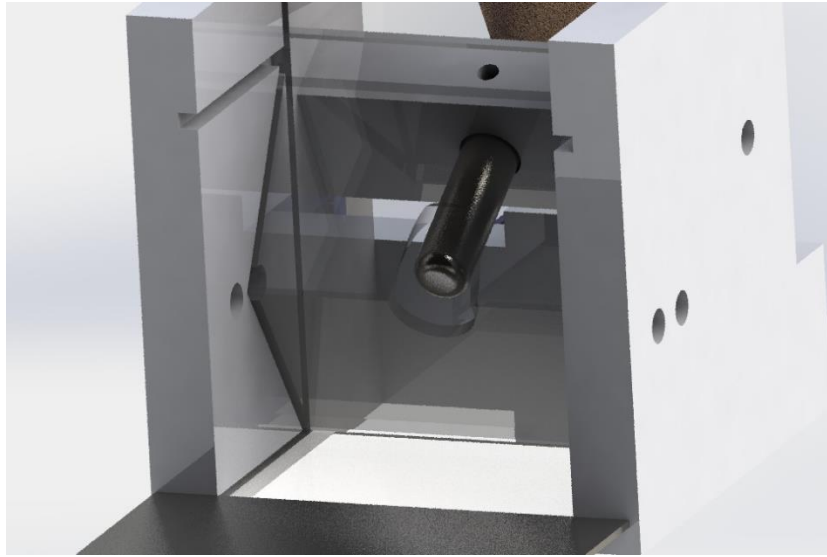
Una lámina de acero de 150 x 70 mm se coloca sobre el piso y sirve como un punto constante de contacto con el sujeto para el sensor resistivo de lengüeteos.

El bebedero consiste en un haz de agujas (21G x 1.15 pulgadas) adheridas con acrílico dental comunicadas con conectores Luer a mangueras de silicón que llevan a columnas con las diferentes soluciones. Las columnas con las soluciones están sometidas a presión de aire constante y la liberación de cada solución es mediada por electroválvulas que son controladas por el sistema MED. La presión de cada columna se calibra previo a cada sesión experimental para asegurar que cada gota liberada sea de 2 microlitros.

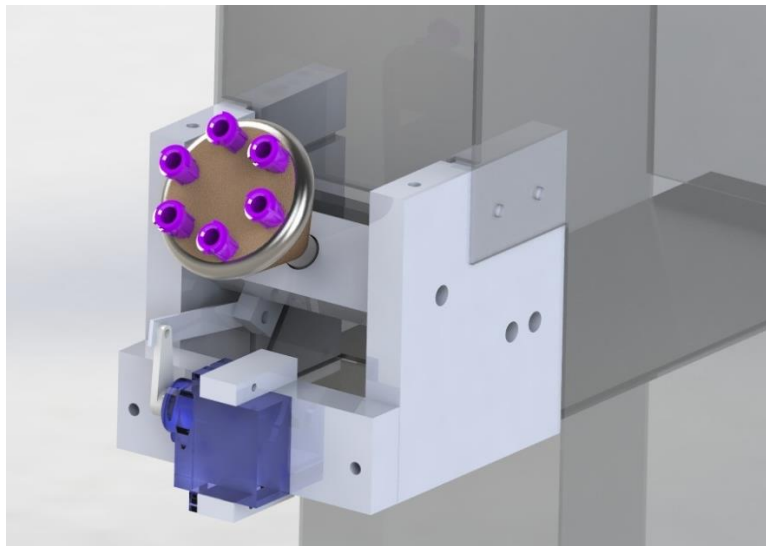


Render del diseño asistido por computadora para la caja conductual de AutoBATT

El sistema de retracción del bebedero es un mecanismo de tres barras accionado por un servomotor con momento de torsión de 1.6 kg/cm controlado por modulación de ancho de pulso y alimentado con una fuente de 5 V. Durante el periodo de acceso a la recompensa el servomotor rota 30° y la punta del bebedero se alinea con un agujero en el puerto permitiendo al sujeto lengüetear libremente. Al terminar los 7 segundos de acceso el servomotor rota 30° en sentido contrario, alejando la punta del bebedero del alcance de la lengua del ratón.



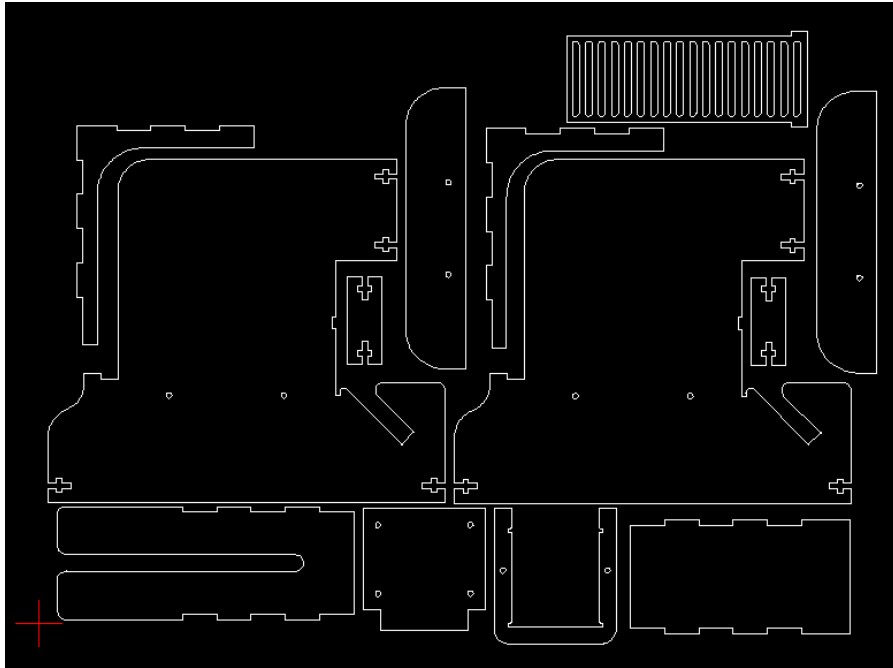
Detalle de caja de AutoBATT, parte interna donde se observa el bebedero extendido durante el periodo de acceso a la recompensa



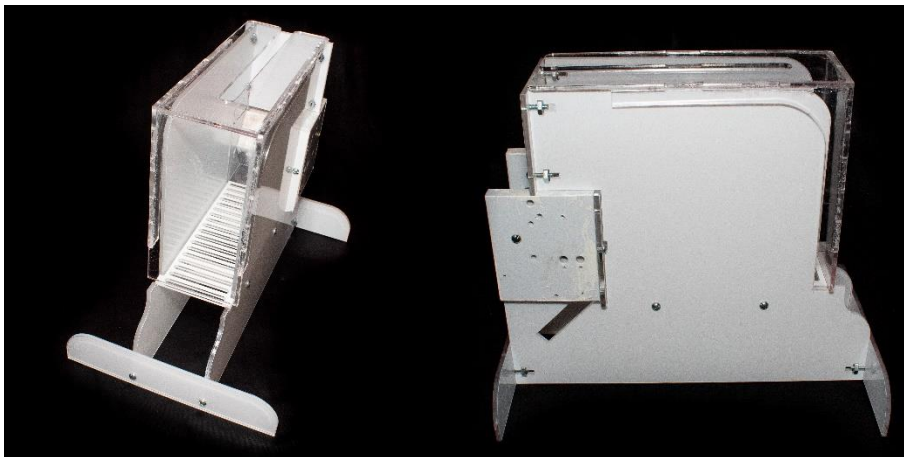
Detalle de caja de AutoBATT, parte externa donde se aprecia el bebedero de entradas múltiples con conectores Luer y en la parte inferior el servomotor con el mecanismo de retracción de bebedero.

El diseño de la caja de AutoBATT se mejoró en varias iteraciones para facilitar su fabricación y ensamblado. Se optó por un diseño final en acrílico de 3mm de ancho optimizado para corte láser, de tal forma que todas las piezas necesarias para armar la caja conductual pudieran

fabricarse en una sola secuencia de cortes y unirse sin necesidad de pegamentos.



Rasterización del plano .dxf, listo para corte láser de acrílico de 3 mm de grosor conteniendo todas las piezas necesarias para fabricar la caja de BATT.

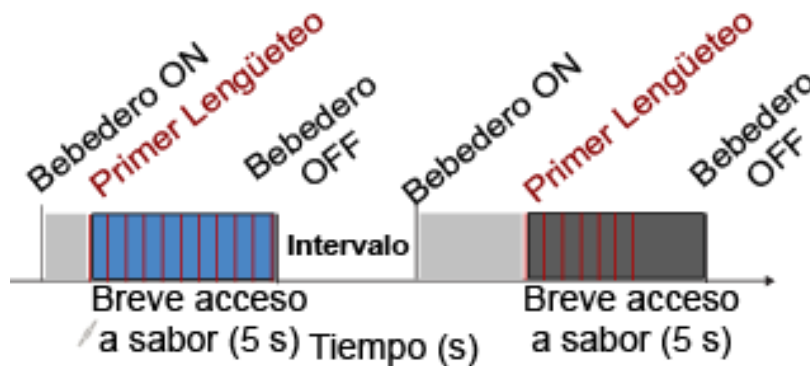


Caja de autoBATT completa fabricada en acrílico. La tapa permite el paso del cable de comunicación del microendoscopio sin dañarlo. Hendiduras en diagonal en las paredes laterales por debajo del bebedero permiten colocar un espejo para facilitar la grabación de video.

9.2.- Diseño y Construcción de Aparato Conductual

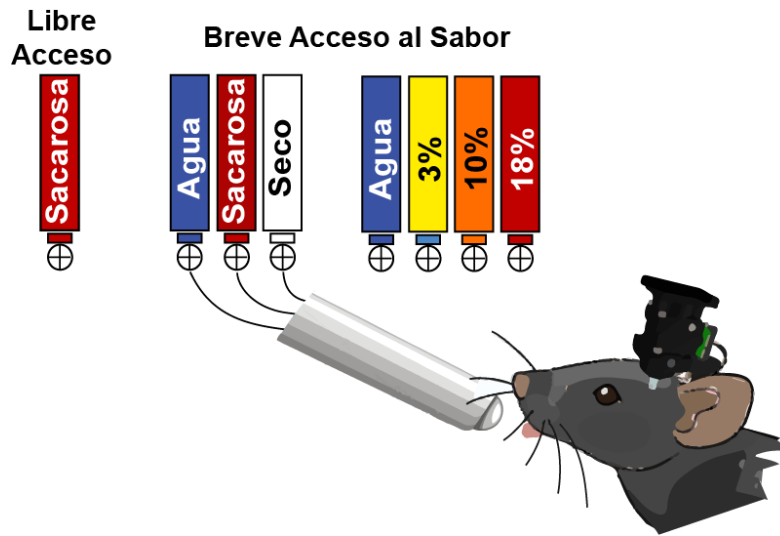
Para poner a prueba nuestra hipótesis se necesita implementar una tarea conductual que brinde información confiable de la actividad apetitiva y consumatoria de animales en libre movimiento, con este fin se diseñó la tarea automatizada de acceso breve a sabores (AutoBATT).

En la caja conductual previamente descrita se le presenta a un ratón un bebedero retráctil. Después de producir el primer el lengüeteo sobre el bebedero el sujeto tiene una ventana de oportunidad de 5 segundos donde por cada lengüeteo se le entrega una gota de 2 microlitros de una solución con cierta cualidad gustativa. Al terminar este periodo de acceso al sabor el bebedero se le retira y permanece retraído por 2 segundos, este tiempo se conoce como periodo entre ensayos.



Disposición temporal de la tarea de AutoBATT, en cada periodo de breve acceso al sabor se presenta una solución distinta.

La tarea puede proveer al sujeto de hasta cuatro soluciones distintas en la misma sesión. Las soluciones se presentan de forma pseudo aleatoria y una por cada periodo de acceso al sabor.



Esquema de columnas con soluciones de distintas cualidades gustativas ordenadas en las combinaciones de diferentes sesiones: Libre acceso a sacarosa 18%; Agua, sacarosa y bebedero seco; Agua, sacarosa 3%, 10% y 18%.

9.3.- Registro de tareas de libre y breve acceso a los sabores

El sujeto es anestesiado previo al ingreso a la tarea en una cámara de isoflurano, se le coloca el microendoscopio de fluorescencia, se enfoca y configura la potencia del LED de estimulación y la ganancia del sensor, alrededor de 30% de potencia y 3.0 de ganancia, según niveles de expresión en cada sujeto.

El bebedero es grabado en video y se registra cada lengüeteo con su marca de tiempo desde el inicio de la sesión. Dentro del campo visual del video se coloca un indicador luminoso (LED rojo) que parpadea a 0.5 Hz con ciclo de trabajo de 50% durante los 20 minutos que dura la tarea y ayuda a la sincronización del video con la información de lengüeteo y con el registro neuronal del microendoscopio.

Los lengüeteos son registrados mediante un sistema de adquisición y control DIG-716B de MED Associates, programado para producir tres salidas de TTL, uno es un pulso de 10 ms al inicio de cada lengüeteo y se envía al sistema de adquisición del microendoscopio, y el otro es un

pulso de 7 s al inicio de cada periodo de recompensa que se envía a un Arduino Nano, que a su vez controla el servomotor que extiende y retrae el bebedero, el tercer pulso TTL se mantiene en estado alto durante toda la tarea y es lo que inicia y termina la grabación del microendoscopio.

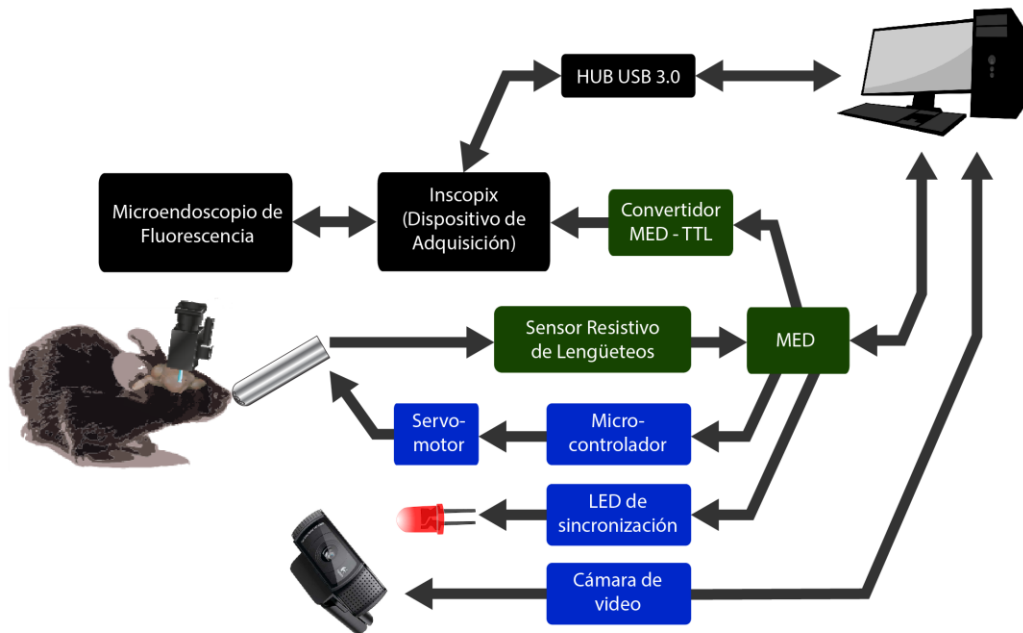


Diagrama de flujo con los elementos utilizados para ejecutar y registrar el comportamiento y la actividad de calcio en la tarea de AutoBATT.

9.1.- Adquisición de datos y análisis de imágenes

Los datos de comportamiento y las grabaciones de fluorescencia fueron guardadas en archivos de formato HDF5 e importados utilizando el software Inscopix Data Processing 1.3.1, los datos se preprocesaron con una reducción de muestreo de resolución de 3x, se aplicó un filtro pasa-banda espacial (corte inferior de 0.005 y corte superior de 0.5 píxeles), se corrigieron los artefactos de movimiento con una traslación máxima de 20 píxeles y las señales de fluorescencia se normalizaron utilizando el método de $\Delta F/F$ (Jia et al., 2011). Se utilizó un análisis de PCA/ICA de hasta 30 componentes para encontrar las regiones de interés (ROIs). Las

sesiones de los mismos sujetos que compartieron condiciones experimentales se concatenaron temporalmente y alinearon espacialmente, de forma que todas las neuronas observadas pudieran ser observadas varios días. Después de la concatenación, las áreas de interés fueron seleccionadas manualmente y sus trazos de fluorescencia se exportaron como archivos de valores separados por comas (*.csv) para su análisis independiente. Solo las regiones de interés que pudieron ser observadas a través de todas las sesiones concatenadas fueron analizadas.

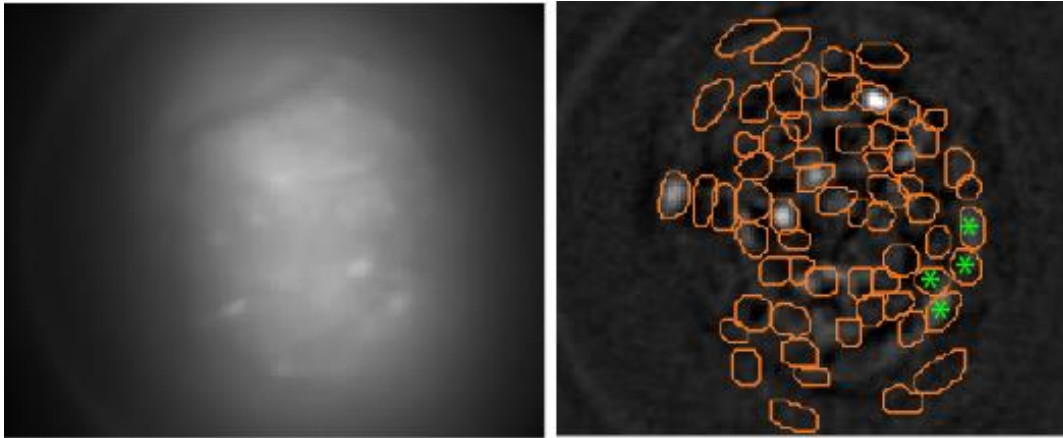


Diagrama de flujo del procesamiento de los videos de registro de microendoscopio.

Con el análisis PCA/ICA se obtienen las posiciones y formas de cada posible área de interés en el campo de visión y se seleccionan manualmente según su dinámica de calcio. Las áreas de interés con una

línea base ruidosa se rechazan, al igual que las que no están bien definidas en el espacio o que parecen un proceso neuronal en vez de un soma.

Al superponer todas las áreas de interés aceptadas como neuronas se obtiene un mapa de activación.



Mapa de activación de calcio en un sujeto con expresión de GCaMP6m en neuronas que expresan el receptor D1. Las áreas rodeadas en naranja corresponden a las regiones de interés detectadas por PCA/ICA y que fueron aceptadas como neuronas.

10.- Resultados

10.1.- Las neuronas D1 y D2 del NAcLat correlacionan con el comportamiento de lengüeteo y las mismas neuronas pueden predecir confiablemente y monitorear el comportamiento de lengüeteo a través de los días

Para caracterizar los correlatos neuronales de neuronas genéticamente identificadas como D1 y D2 en el NAcLat durante el consumo natural de sacarosa, se realizó imagenología de calcio mediante microendoscopios en ratones transgénicos lengüeteando libremente una solución de 18% de sacarosa. Todos los sujetos fueron implantados con un lente GRIN colocado dorsal al NAcLat (**Figs.1a-b**, n=4 Drd1-cre, n=4 Drd2-cre mice). Los ratones fueron privados de agua

y colocados por 30 minutos en una caja conductual equipada con un bebedero programado para entregar gotas de aproximadamente 2 μ l por lengüeteo. Se realizaron grabaciones de la actividad de calcio del NAcLat con microendoscopios de epifluorescencia (**Fig. 1c**) y se sincronizó cada cuadro del video con los eventos de lengüeteo registrados durante la tarea de libre acceso a la sacarosa (**Fig. 1d**). Se definió manualmente la región de interés de cada neurona (ROI), es decir, los píxeles que la componen y se extrajo el trazo de fluorescencia de cada sesión (**Fig. 1e**). Solo las áreas de interés de neuronas observables a través de todas las sesiones de libre acceso a sacarosa fueron analizadas.

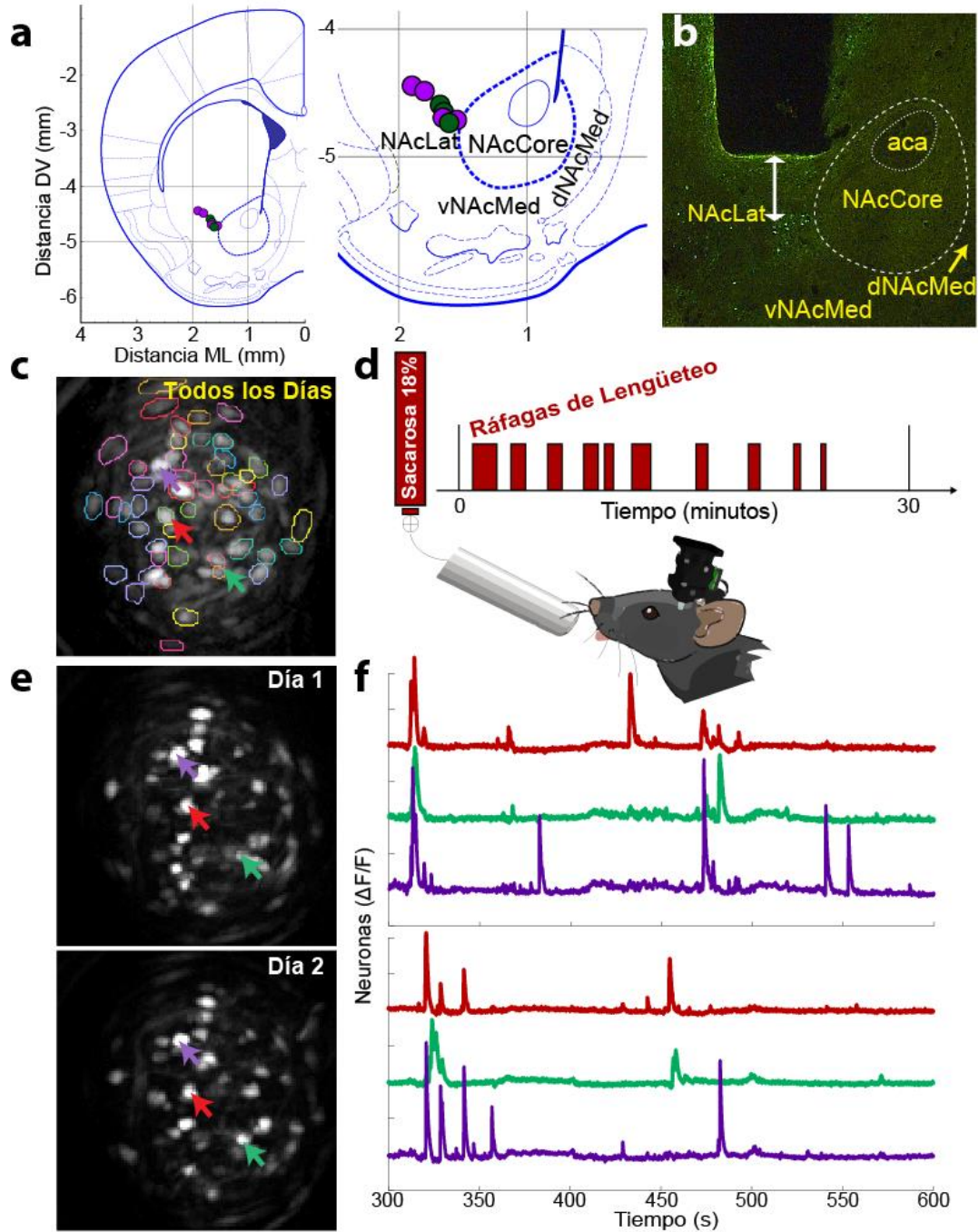
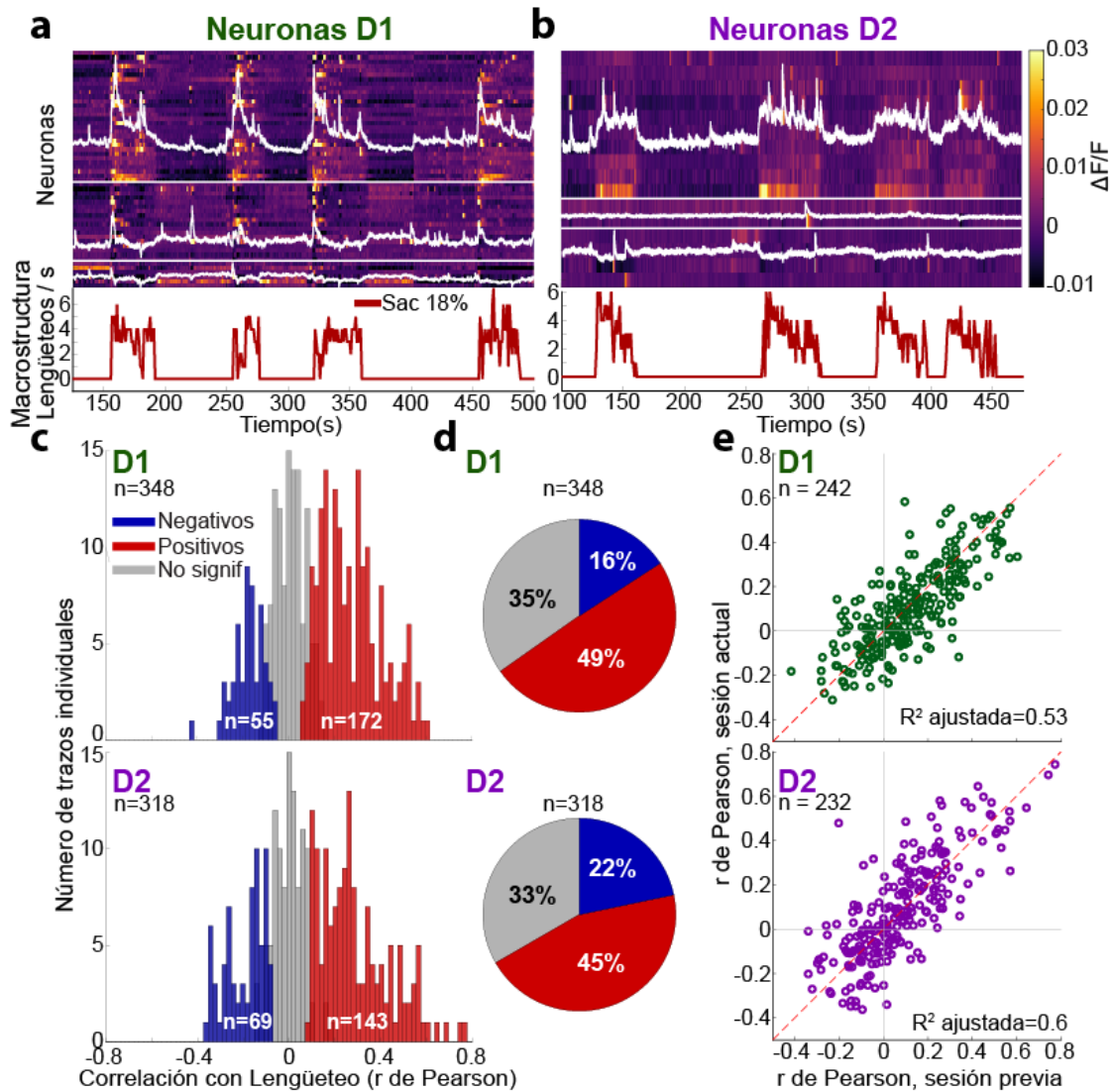


Figura 1. Coordenadas de implantación de lentes de índice en gradiente (GRIN) dentro del NAcLat y áreas de interés de trazos de fluorescencia. a) Izquierda: Localización de lentes GRIN en el NAcLat, los círculos verdes son ratones *DrDrd1-cre* ($n=3$) y los círculos magenta indican ratones *DrDrd2-cre* ($n=4$). Derecha: Acercamiento de los sitios de implantación, todos los lentes fueron colocados sobre el NAcLat. b) Un corte coronal de cerebro mostrando el tracto de un lente. Las neuronas D1 que expresan GCaMP6m se muestran

*en verde. La comisura anterior (aca) se utiliza como referencia anatómica. La doble flecha estima la distancia focal óptica a partir de la cara del lente, aproximadamente a 350 μ m abajo, donde 56 neuronas fueron registradas simultáneamente en este sujeto. c) Proyección máxima de todas las sesiones registradas para un sujeto. Las regiones de interés fueron definidas manualmente y se grafican con contornos de diferentes colores. d) Los ratones se colocaron en una caja operante equipada con un bebedero que entregaba $\sim 2 \mu$ L de solución de sacarosa por lengüeteo en una tarea de libre movimiento. Cada sesión duró 30 minutos. e) Las imágenes de arriba y abajo son las mismas neuronas del panel "c" grabadas en días consecutivos. Las tres flechas indican los trazos de fluorescencia registrados concurrentemente en un ratón *DrDrd1-cre*. f) Trazos de regiones de interés indicadas por las flechas del panel "e".*

Para estudiar la relación entre el comportamiento del lengüeteo y la actividad de neuronas D1 y D2 se realizó del coeficiente de correlación de Pearson entre los trazos fluorescencia normalizados (detrend) de cada neurona y la frecuencia de lengüeteo. Las neuronas fueron clasificadas como correlacionadas positivamente, no correlacionadas o correlacionadas negativamente con el lengüeteo para las neuronas D1 del NAcLat (**Fig. 2a**) y para las D2 (**Fig. 2b**). Hubo un porcentaje significativamente mayor de regiones de interés que correlacionaron positivamente con el lengüeteo que aquellas que no correlacionaron o lo hicieron negativamente (**Fig. 2c**) y estas proporciones fueron similares entre las poblaciones D1 y D2 (**Fig. 2d**). El número de neuronas D1 que correlacionaron positivamente con el lengüeteo ($n = 172$) fue significativamente más grande que el de las neuronas con correlación negativa ($n = 55$) ($\chi^2=31.1$, $p=2.4 \times 10^{-8}$). Similarmente, el número de neuronas D2 con correlación positivo fue significativamente mayor al de las neuronas con correlación negativa ($n=69$) ($\chi^2=8.92$, $p=0.0028$). Una ventaja de utilizar imagenología de calcio es que permite la grabación y el seguimiento de las mismas neuronas a través de varios días, de esta

forma fue posible cuantificar la estabilidad entre sesiones de las respuestas neuronales D1 y D2 durante el comportamiento de lengüeteo. Para examinar si las respuestas de neuronas individuales fueron estables a través de los días se graficó el coeficiente de correlación de cada neurona en una sesión contra su coeficiente en la sesión del día previo y se encontró que los datos se podían ajustar mediante una regresión lineal (véanse Métodos). Los parámetros del ajuste sugieren que las neuronas individuales D1 y D2 preservan sus correlaciones con el lengüeteo a través de días consecutivos (Bondad de Ajuste: R^2 ajustado=0.53 para D1, $R^2=0.6$ para D2) (**Fig. 2e**). Estos resultados sugieren que la correlación entre la actividad neuronal de las poblaciones D1 y D2 y el comportamiento de lengüeteo se mantiene constante a través de diferentes episodios de consumo de sacarosa y a través de los días.



*Figura 2 . La actividad concurrente de calcio de las neuronas D1 y D2 del NAcLat correlaciona con el análisis de macroestructura del comportamiento de lengüeteo y puede ser utilizado para predecir los lengüeteos confiablemente a través de los días. a) Arriba: Mapa de calor de los trazos fluorescentes de calcio de neuronas registradas en un ratón *DrDrd1-cre* representativo durante el consumo de sacarosa 18%. Las neuronas que exhibieron una correlación positiva con el lengüeteo ($p < 0.05$ en prueba de permutación) se grafican en la parte superior del mapa de calor, las neuronas sin correlación significativa están en la mitad y las neuronas correlacionadas negativamente en la parte inferior. Los promedios de la actividad de cada uno de estos ensambles se grafican en líneas blancas sobre cada grupo. Abajo: Histograma de Tiempo Peri-Estímulo (PSTH), de la velocidad de lengüeteo registrada en la misma*

sesión. b) Lo mismo que en el panel “a” pero con neuronas registradas en un ratón *DrDrd2-cre*. c) Distribución de coeficientes de correlación de Pearson de todas las neuronas D1 registradas a través de todas las sesiones (arriba) y de neuronas D2 (abajo). Los coeficientes de correlación de Pearson significativamente positivos están en rojo, los negativos en azul y los no significativos en gris. d) Arriba: Porcentaje de todas las neuronas D1 con correlación positiva, negativa o no significativa con el lengüeteo ($n = 103$ de 348 regiones de interés D1 fueron consistentemente observadas a través de las sesiones). Abajo: Porcentaje de todas las neuronas D2 con correlación positiva, negativa o no significativa con el lengüeteo (para las neuronas D2 identificamos $n=86$ de 318 trazos observables en todas las sesiones). El número de neuronas negativas D1 y D2 es significativamente diferente ($n = 55$ vs. $n = 69$; $\chi^2 = 8.19$, $p = 0.004$). e) Correlación entre el trazo de fluorescencia de cada neurona una sesión “actual” (D1 arriba y D2 abajo) y la velocidad de lengüeteo contra la correlación observada el día anterior. Nótese que las neuronas D1 y D2 mantienen una correlación con el lengüeteo estable a través de los días. Para los coeficientes D1, la suma de cuadrados debida al error $SSE = 4.29$, R^2 ajustado = 0.53, y para los coeficientes D2 $SSE = 4.846$, R^2 ajustada = 0.6054.

10.2.- Las neuronas D1 y D2 del NAcLat predicen el comportamiento de lengüeteo

Promediando los trazos de las poblaciones enteras de neuronas D1 y D2 del NAcLat encontramos que sus señales promedio no eran suficientes para predecir el comportamiento de lengüeteo eficientemente. Este fenómeno era esperado ya que las neuronas medidas estaban correlacionadas positiva o negativamente con el lengüeteo y era una posibilidad que los trazos individuales de las neuronas positivas se cancelaran con los trazos de las negativas al promediar la actividad de las poblaciones enteras. Para evitar este problema y responder si las poblaciones D1 y D2 pueden predecir independientemente la presencia de eventos de lengüeteo, se aplicó una regresión lineal a ambos tipos neuronales, usando la frecuencia de lengüeteos (lengüeteos / segundo)

como variable dependiente, se encontraron los coeficientes de pendiente para cada neurona que mejor permiten a la población predecir el comportamiento de lengüeteo. La señal de predicción fue binarizada usando el umbral más eficiente, que resultara en la más alta correlación entre la señal de predicción binaria y los eventos de lengüeteo (**Fig. 3a** para neuronas D1 y **Fig. 3b** para D2). Los coeficientes de pendiente fueron calculados en el primer día para todos los sujetos (Día de Entrenamiento) y permanecieron constantes para todos los días consecutivos, aun así, las correlaciones entre las señales de predicción y los eventos de lengüeteo no presentaron reducción a lo largo de los días (**Fig. 3c** para D1 and **Fig. 3d** para D2).

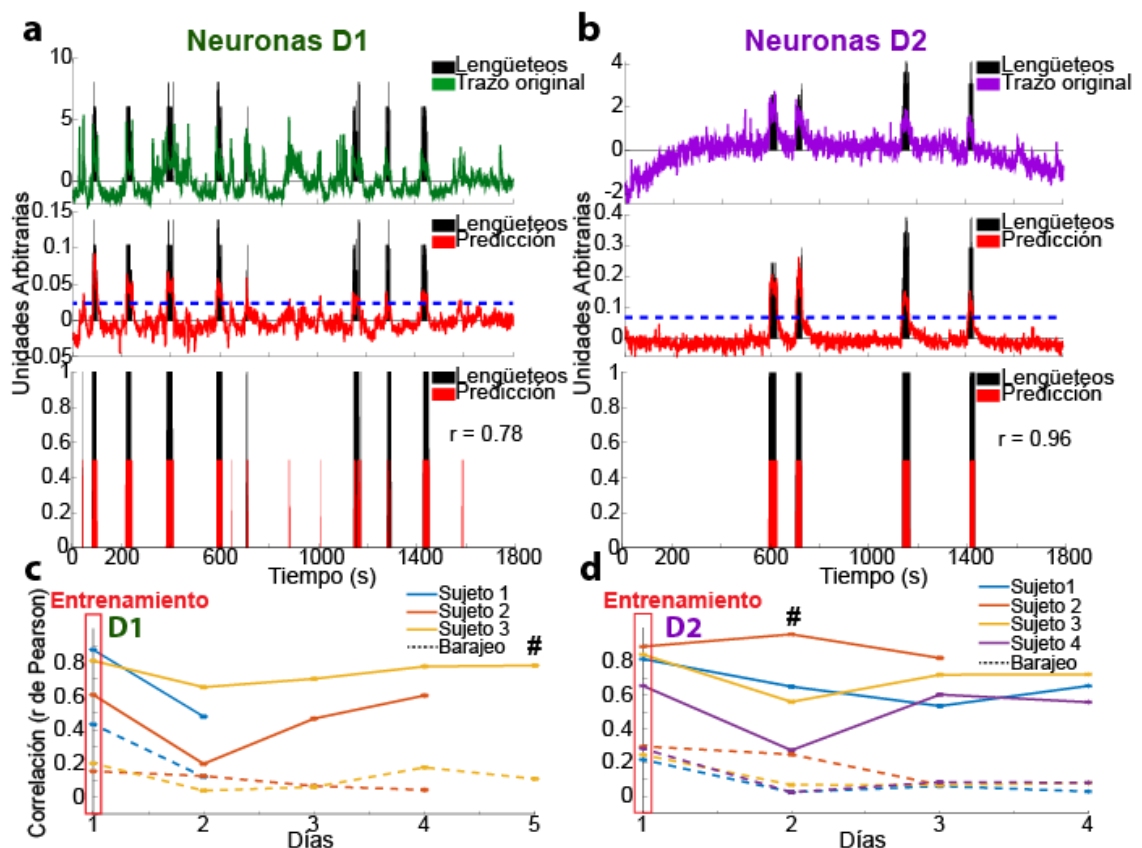


Figura 3. La misma actividad de ensamble de neuronas D1 y D2 del NAcLat pueden predecir y monitorear el comportamiento de lengüeteo a través de los días. a) Arriba: Promedio de todos los trazos de fluorescencia de una sesión en un ratón D1 (línea verde) y lengüeteo (línea negra). Mitad: Predicción de

lengüeteos calculada utilizando regresión lineal múltiple a partir de todos los trazos de fluorescencia (línea roja) y lengüeteos registrados (línea negra), con el umbral de binarización que maximiza la correlación entre los lengüeteos medidos y su predicción (línea discontinua horizontal azul). Abajo: Predicción binarizada de lengüeteos (rojo) y lengüeteos medidos (negro). b) Lo mismo que “a” pero para las neuronas D2 (línea morada). c) Máxima correlación entre la predicción de las neuronas D1 y comportamiento de lengüeteo por día, los coeficientes de regresión se entrenaron usando la actividad del Día 1 y se aplicaron en los días posteriores. Las líneas discontinuas son los valores de correlación calculados para los mismos ratones, pero con las etiquetas de tiempo de los eventos de lengüeteo desplazadas 5 segundos. d) Igual que “c” pero para neuronas D2.

10.3.- Las poblaciones de neuronas D1 y D2 del NAcLat tienen respuestas distintas durante las tareas de libre lengüeteo y BATT

Para comprender mejor las dinámicas temporales de las poblaciones D1 y D2 del NAcLat se analizó la actividad de calcio de ratones *Drd1-cre* y *Drd2-cre* durante una tarea de libre acceso a sacarosa 18% con los sujetos privados de agua (**Fig. 4a**). Los trazos de fluorescencia de cada neurona fueron alineados con el inicio de todas las ráfagas de lengüeteo, se define una ráfaga de lengüeteo como más de 3 lengüeteos consecutivos con al menos 1 segundo de intervalo entre ráfagas, se graficaron los histogramas de tiempo peri-estímulo de los lengüeteos para ambos grupos de ratones alineados a los inicios de ráfagas de lengüeteo y se comparó con el promedio de todos los trazos de fluorescencia de los ratones D1 (**Fig. 4b**) y D2, respectivamente (**Fig. 4c**). Ambas poblaciones mostraron un incremento en la actividad promedio de calcio precediendo al primer lengüeteo de cada ráfaga hasta por 1 segundo. Ambas señales alcanzaron su máxima amplitud alrededor del primer lengüeteo, con las neuronas D1 teniendo una mayor actividad

promedio de calcio, seguida de una más lenta disminución de los trazos de fluorescencia. Ninguna de las poblaciones presentó un cambio en la actividad de calcio al alinearla al fin de las ráfagas de lengüeteo (datos no mostrados).

Habiendo identificado que un cambio en la actividad de calcio precedió al comportamiento de lengüeteo, se buscó responder si estos cambios fueron debidos a la actividad oromotora, es decir, causados únicamente por el acto de lengüeteo o si codificaban otro estímulo como la presencia de una recompensa líquida o su valor hedónico, para investigar estas posibilidades se implementó una tarea de breve acceso al sabor (BATT) en ratones privados de agua, en esta tarea a los sujetos se les presentó un bebedero metálico retraíble que al ser lengüeteado entregaba gotas de 2 μ l de un estímulo gustativo durante 5 segundos (periodo de acceso al sabor), después de este periodo el bebedero era retraído fuera del alcance del sujeto durante 2 segundos (intervalo entre ensayos) y posteriormente presentado de nuevo al sujeto. Un grupo de tres estímulos gustativos fue presentado a los sujetos en orden semi-aleatorio, un estímulo por cada periodo de acceso al sabor, que podía ser: un bebedero vacío, agua destilada o una solución de sacarosa al 18% (**Fig. 4d**). Promediando los trazos de todas las neuronas D1 del NAcLat alineados al primer lengüeteo del periodo de acceso al sabor observamos un súbito incremento en la fluorescencia aproximadamente 1 segundo antes del primer lengüeteo, con un valor máximo al inicio del periodo de acceso al sabor similar al observado durante la condición de libre acceso al sabor. Sin embargo, la actividad de calcio tuvo mayor magnitud que la línea basal durante todo el periodo de acceso al sabor. Esto contrasta con la más potente inhibición observada unos segundos después del inicio de la ráfaga de lengüeteo durante la condición de libre acceso al sabor. También se observó un ligero incremento en el promedio de la fluorescencia de la población D1 posterior a la retracción del

bebedero al final del periodo de acceso al sabor. (**Fig. 4e**). La población de neuronas D2 del NAcLat también incrementó su fluorescencia 1 segundo antes del primer lengüeteo, pero en contraste con la actividad de D1, las neuronas D2 mantuvieron un incremento tónico de fluorescencia durante todo el periodo de acceso al sabor y presentaron una mayor activación al momento de la retracción del bebedero (**Fig. 4f**).

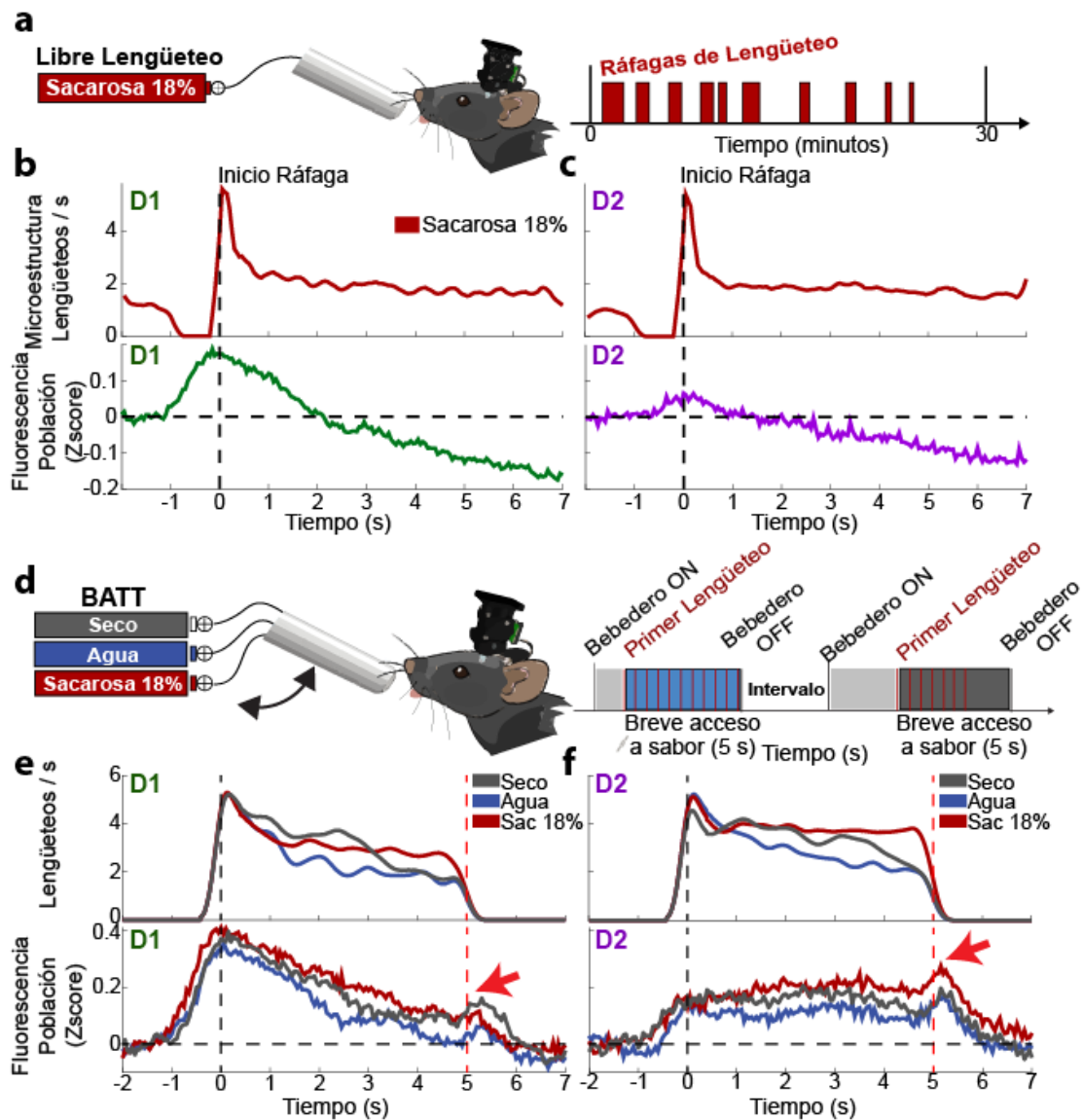


Figura 4. La actividad poblacional D1 y D2 del NAcLat detectó eventos discretos relevantes para la tarea e incrementó su actividad diferencialmente según el contexto. a) Esquema de una tarea de libre acceso a una solución de sacarosa al 18%. b) Arriba: Histograma peri-estímulo del lengüeteo de todos

los ratones D1 en una tarea de libre acceso alineado al inicio del primer lengüeteo de cada ráfaga (tiempo=0s). Abajo: Fluorescencia promedio de todas las neuronas D1 registrada en la tarea de libre acceso a la sacarosa. c) Igual que “a” pero para las neuronas D2. d) Esquema de una tarea de Breve Acceso a los Sabores (BATT) usando tres estímulos gustativos: un bebedero seco, agua y sacarosa al 18%. e) Arriba: Histogramas peri-estímulo de todos los lengüeteos de todos los ratones *Drd1-cre* en la tarea de breve acceso al sabor separados por el tipo de estímulo gustativo. **Abajo:** Fluorescencia promedio de la población de neuronas D1 evocada por cada estímulo gustativo. Las neuronas D1 mostraron un pico delgado que gradualmente regresó a la línea base, seguido de una ligera respuesta de “rebote” durante la retracción del bebedero. f) Igual que “e” pero para ratones *Drd2-cre*. Las neuronas D2 mostraron un pico de señal menos robusto que las D1 en el inicio del lengüeteo, pero exhibieron un incremento sustancial de actividad durante todo el periodo de acceso al sabor. Finalmente, las neuronas D2 tuvieron un incremento más considerable al final del periodo de acceso al sabor que las neuronas D1, como se indica con las flechas rojas.

10.4.- Las neuronas individuales D1 y D2 del NacLat categorizan las concentraciones de sacarosa de manera consistente con su palatabilidad

Ya que no observamos diferencia entre las respuestas neuronales promediadas al lengüeteo de un bebedero vacío y las de un bebedero con agua o sacarosa, podemos concluir que en general, las poblaciones D1 y D2 no están codificando la presencia o ausencia de una recompensa líquida, ni están codificando la específica cualidad gustativa de la sacarosa. Sin embargo, las diferencias observadas entre las respuestas promedio de D1 y D2 pueden deberse a la aportación de neuronas individuales dentro de estas poblaciones. Al graficar las respuestas de calcio de las neuronas individuales a un bebedero vacío, agua o sacarosa al 18% durante una prueba de BATT (**Fig. 5a, Fig. 5b**) se encontró que ambas poblaciones son heterogéneas en su actividad.

Se realizó análisis de Kruskal-Wallis de ventana deslizante para encontrar los periodos en que los trazos de fluorescencia fueran significativamente diferentes para al menos uno de los estímulos. Se encontró que 38 de un total de 98 neuronas D1 (38.76%) y 45 de 71 neuronas D2 (63.38%) tuvieron respuestas significativamente distintas para al menos uno de los estímulos durante el periodo de acceso al sabor de 5 segundos, aún cuando el comportamiento de lengüeteos no fuera significativamente distinto entre estímulos (**Fig. 5c, Fig. 5d**). Por lo tanto, las neuronas individuales D1 y D2 del NAcLat pueden codificar información apetitiva, independientemente de las respuestas oromotoras. La población D2 tuvo un mayor porcentaje de neuronas que respondieron diferencialmente a algún estímulo que la población D1.

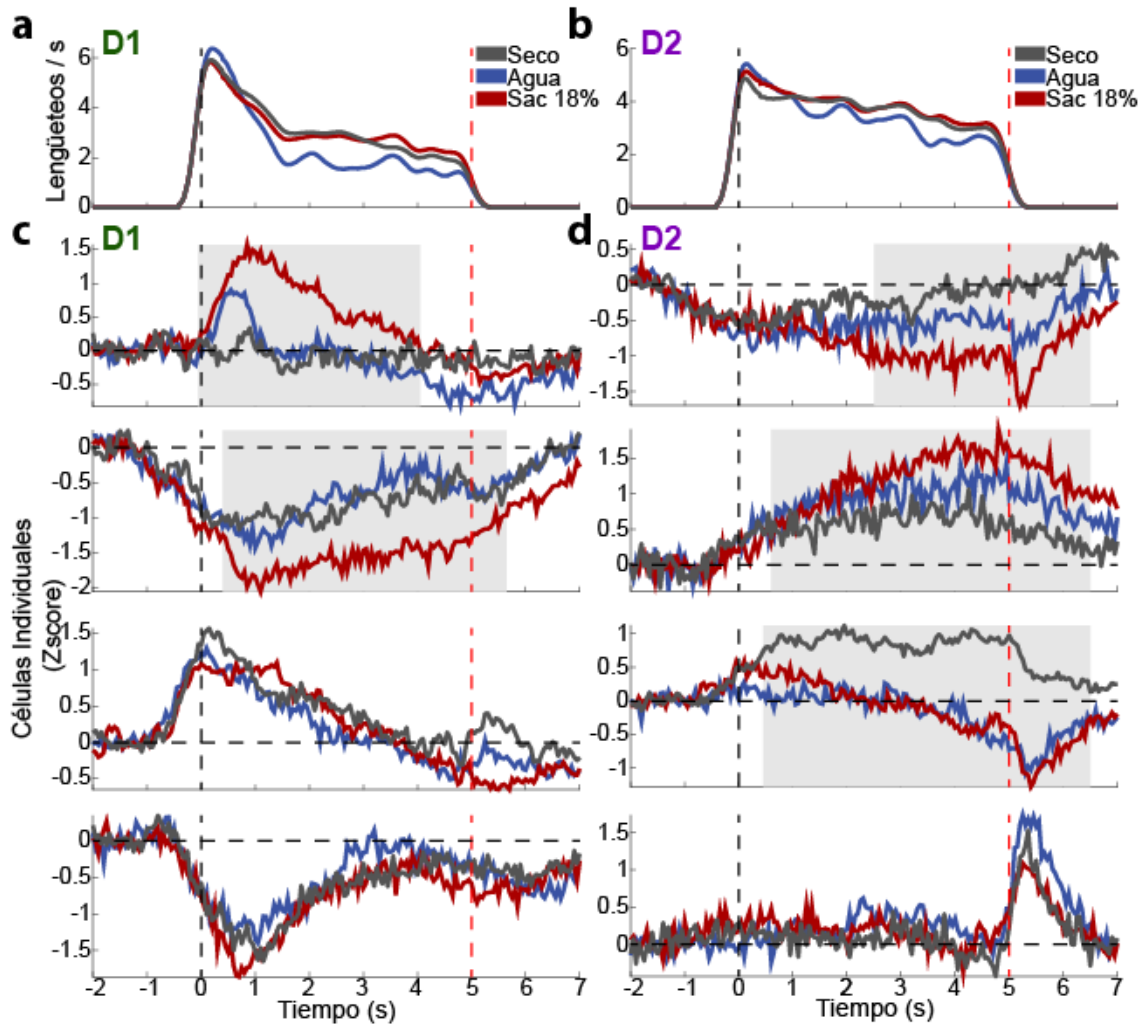


Figura 5. Ejemplos representativos de neuronas individuales D1 y D2 del NAcLat exhiben una amplia gama de respuestas evocadas por los estímulos gustativos. a) Velocidad de lengüeteo de ratones D1 en BATT con tres estímulos gustativos: bebedero seco, agua y sacarosa al 18%. b) Igual que “a” para células D2. c) Z-scores de fluorescencia de neuronas D1 individuales del NAcLat durante la misma sesión del panel “a”, ejemplificando la heterogeneidad de respuestas dentro de una población genéticamente identificada. El sombreado gris denota momentos de diferencia significativa para al menos un estímulo con respecto a cualquier otro. d) Igual que “c” para respuestas de neuronas individuales D2.

10.5.- Las poblaciones D1 y D2 del NAcLat son heterogéneas y están compuestas de ensambles de neuronas con respuestas similares entre ellas

Para categorizar la compleja gama de respuestas de las neuronas D1 y D2 del NAcLat ante diferentes estímulos se concatenaron los trazos promedio de cada neurona ante cada estímulo y se redujo la dimensionalidad de las poblaciones utilizando Análisis de Componentes Principales (PCA), el primero de los tres componentes fue usado para crear un árbol de agrupamiento jerárquico que clasificó a todas las neuronas en uno de cuatro ensambles (**Fig. 6a** para neuronas D1, **Fig. 6b** para neuronas D2). En la población D1 del NAcLat, dos ensambles están compuestos de neuronas que incrementan rápidamente su fluorescencia justo antes del primer lengüeteo con diferentes patrones temporales de respuesta. Un ensamble mostró un incremento tónico de la fluorescencia durante el periodo de acceso al sabor. Otro ensamble presentó inhibición justo antes del primer lengüeteo y se mantuvo inhibido hasta segundos después del fin del periodo de acceso al sabor. Tres de cuatro ensambles encontrados en las neuronas D1 del NAcLat respondieron con una mayor activación o inhibición durante los ensayos de sacarosa que con los ensayos de bebedero seco o con agua destilada (**Fig. 6c** y **Fig. 6e**). En contraste, ninguno de los ensambles D2 presentó activación fásica alrededor del primer lengüeteo. Sin embargo, uno de estos ensambles tuvo un pico de fluorescencia posterior a la retracción del bebedero al final del periodo de acceso al sabor. Un ensamble D2 tuvo un incremento tónico de fluorescencia con una respuesta particularmente grande durante los ensayos de sacarosa, otro ensamble mostró un decremento tónico de fluorescencia durante todo el periodo de acceso al sabor y regresaba rápidamente a sus valores de línea base tras la retracción del bebedero.

Interesantemente, uno de los ensambles se inhibió durante los ensayos de agua y de sacarosa, pero no lo hizo en los ensayos de bebedero seco

(Fig. 6d y Fig. 6f). Estos análisis muestran que las poblaciones D1 y D2 del NAcLat son poblaciones heterogéneas compuestas de diferentes ensambles de neuronas que pueden ser agrupadas de acuerdo con sus respuestas a diferentes estímulos apetitivos. Las respuestas de estos ensambles explican las diferencias que encontramos previamente entre los trazos de fluorescencia promediados de las poblaciones D1 y D2.

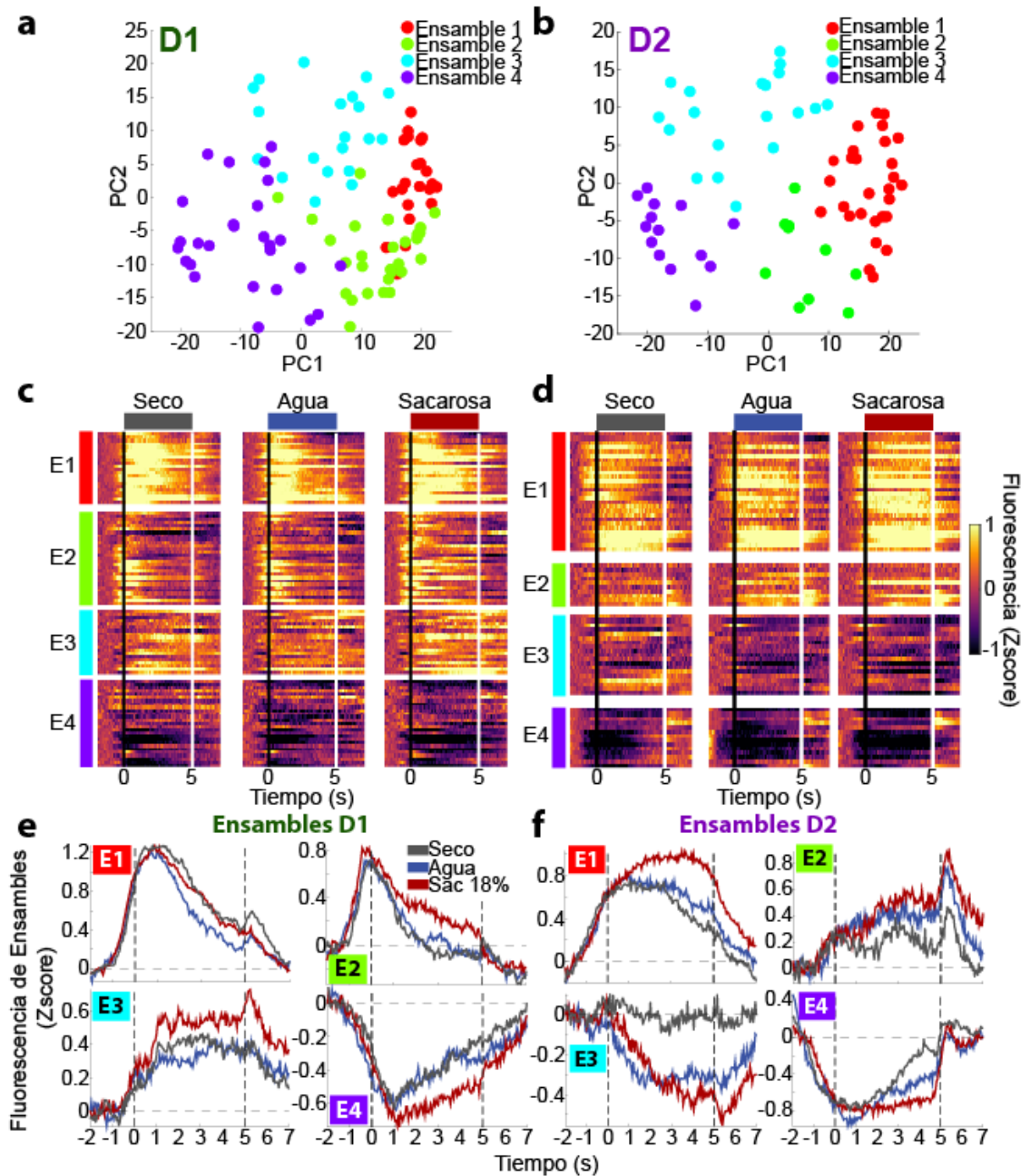


Figura 6. Las neuronas D1 y D2 del NAcLat forman varios ensambles funcionales durante la tarea de Breve Acceso al Sabor. a) Análisis de

componentes principales (PCA) y agrupamiento de la respuesta de las neuronas D1 del NAcLat a todos los estímulos gustativos. b) Igual a “a”, para neuronas D2. c) Histogramas peri-estímulo de la actividad de fluorescencia normalizada (zscore) de las neuronas D1 del NAcLat. Las neuronas están agrupadas de acuerdo con sus ensambles. Cada renglón corresponde a la misma neurona a través de diferentes estímulos gustativos: bebedero seco (panel izquierdo), agua (panel medio) y sacarosa 18% (panel derecho). Las respuestas de neuronas están agrupadas dentro de cuatro ensambles y están alineadas al primer lengüeteo de cada periodo de acceso al sabor (tiempo = 0 s) d) Misma convención que “c” para neuronas D2. e) Respuestas de los cuatro ensambles D1 a los estímulos de bebedero vacío, agua o sacarosa 18%. f) Igual a “e” para ensambles D2 del NAcLat.

10.6.- Las neuronas D1 y D2 del NAcLat codifican la intensidad de sacarosa

En la prueba BATT anterior con bebedero seco, agua y sacarosa, encontramos neuronas D1 y D2 del NAcLat con respuestas significativamente más grandes a la sacarosa. Aunque los cambios en frecuencias de lengüeteo no causaron estas diferencias en respuestas neuronales, no quedaba claro si estas neuronas estaban codificando otra información como la cualidad gustativa de la sacarosa o su concentración. Para responder a esta pregunta se repitió la prueba de acceso breve al sabor usando cuatro diferentes estímulos: agua, sacarosa 3%, sacarosa 10%, sacarosa 18% (**Fig. 7a**). Los lengüeteos realizados por ambos grupos de ratones reflejan la palatabilidad de las concentraciones crecientes de sacarosa. Sin embargo, solo el promedio de la población D1 presentó una mayor fluorescencia para los ensayos con más altas concentraciones de sacarosa (**Fig. 7b**). En contraste, la fluorescencia promedio de la población D2 no reflejó cambios en la concentración de sacarosa (**Fig. 7c**). Las neuronas D1 y D2 del NAcLat fueron agrupadas utilizando PCA y se analizó la respuesta de los ensambles resultantes a cada concentración de sacarosa. Se encontró

un ensamble D1 con una mayor respuesta a los ensayos de sacarosa a 18% que a cualquier de los otros estímulos. Otro ensamble tuvo una respuesta similarmente alta para los ensayos de sacarosa 10% y 18%, este mismo ensamble respondió con menos amplitud para los ensayos de agua y sacarosa 3%. Otro ensamble se inhibió más fuertemente ante las más altas concentraciones de sacarosa (**Fig. 7d** y **Fig. 7f**). Las neuronas D2 también formaron un ensamble con una respuesta similarmente alta para las dos concentraciones más altas de sacarosa y una baja fluorescencia para la concentración más baja y el agua. Otro ensamble D2 también mostró una mayor inhibición para ensayos de mayor concentración de sacarosa. (**Fig. 7e** y **Fig. 7g**). También se encontraron ensambles D1 y D2 que respondieron antes del primer lengüeteo y su actividad de calcio posterior fue independiente de la concentración de sacarosa.

Tanto en las poblaciones de neuronas D1 como D2 del NAcLat existen ensambles funcionales de neuronas que codifican la concentración de la sacarosa, como se muestra en el incremento o decremento de su actividad de calcio. La actividad de algunos de estos ensambles parece categorizar los estímulos en dos grupos de acuerdo con su baja o alta concentración de sacarosa.

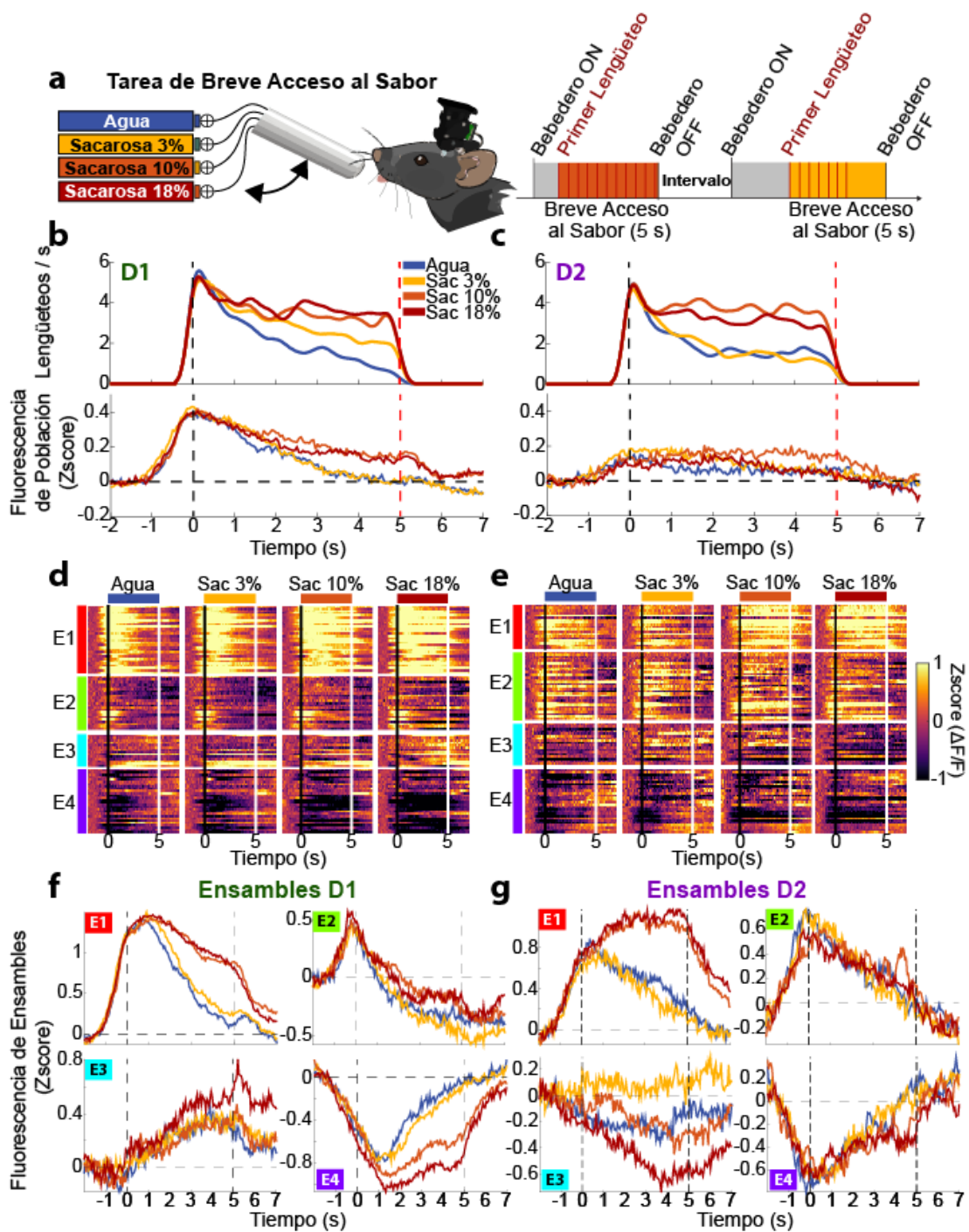


Figura 7. Diferentes ensambles D1 y D2 categorizaron las concentraciones de sacarosa como bajas o altas. a) Esquema de tarea de Breve Acceso al Sabor con cuatro estímulos gustativos: agua (en azul) y tres concentraciones de sacarosa (3% en amarillo, 10% en naranja, 18% en rojo). **b) Arriba:** Histograma peri-estímulo de lengüeteo para cada concentración de

*sacarosa para todos los ratones D1 en la prueba de acceso breve. **Abajo:** Respuesta de fluorescencia promedio de todas las neuronas D1 evocada por cada concentración de sacarosa. **c)** Igual que “b” para ratones *Drd2-cre*. **d)** Histogramas peri-estímulo de la actividad de fluorescencia normalizada (zscore) de las neuronas D1 del NAcLat. Las neuronas están agrupadas de acuerdo con sus ensambles y cada renglón corresponde a la misma neurona a través de los cuatro estímulos gustativos. **e)** Igual que “d” para neuronas D2. **f)** Fluorescencia promedio de los ensambles D1 de NAcLat para cada concentración. **g)** Igual que “f” para neuronas D2.*

11.- Discusión

El resultado principal de este estudio es que las poblaciones de neuronas genéticamente identificadas como D1 y D2 del NAcLat contienen una diversidad de ensambles funcionales que se adaptan contextualmente al comportamiento del sujeto para monitorear eventos relevantes de la tarea, el inicio del lengüeteo y las concentraciones de sacarosa. Observamos que las neuronas D1 y D2 se activan concurrentemente antecediendo al lengüeteo de sacarosa y su actividad de calcio creciente predice el tiempo del primer lengüeteo. Un resultado notable es que se pudo utilizar la actividad de ensambles registrados en el primer día de la tarea en ambos tipos de células para predecir el comportamiento de lengüeteo en los días subsecuentes. En el nivel de macroestructura del lengüeteo, nuestros resultados develan que la actividad de ensamble de ambas neuronas, D1 y D2, monitorea consistentemente el consumo de sacarosa a través de los días. Contrastantemente, durante una tarea de Breve Acceso al Sabor, las respuestas individuales D1 y D2 son más heterogéneas que en la tarea de libre acceso. Específicamente, las neuronas del NAcLat también responden a eventos discretos dependientes de la tarea, tales como el inicio y final del periodo breve de acceso al sabor. Las neuronas D1 y D2 crean una amplia gama de ensambles, algunos de estos responden a la presencia de un líquido en el bebedero o a la concentración de sacarosa. Varios de estos ensambles

anticipan el inicio del lengüeteo, responden al final del periodo de acceso al sabor y hasta categorizan de manera simultánea las concentraciones de sacarosa como bajas o altas, de acuerdo con su palatabilidad. Nuestros resultados sugieren que los ensambles del NAcLat sirven como canales paralelos de procesamiento oromotor, sabor e información relevante para la tarea, tal vez utilizando cada ensamble como una vía individual de información. En resumen, las poblaciones D1 y D2 del NAcLat son funcionalmente diversas, contienen varios ensambles que se adaptan al contexto de comportamiento de los sujetos para monitorear eventos relevantes para la tarea, el inicio del lengüeteo y categorizan concentraciones de sacarosa.

Previos trabajos en la parte rostral del dNAcMed han mostrado que las neuronas espinosas medianas D1 (pero no las D2) disparan en anticipación al comportamiento de alimentación, pero se inhiben durante el consumo (O'Connor et al., 2015b). Sin embargo los mismos autores encontraron que esas neuronas D2 no se modularon durante el lengüeteo de lipofundina, una emulsión de grasas (O'Connor et al., 2015b). Consistente con estos datos, la estimulación optogenética de las neuronas D1 pero no las D2 suprimió la alimentación y consumo de la emulsión de grasas. Aun así, sus efectos no son específicos a la grasa pues también suprimen el consumo de una solución de sacarosa (O'Connor et al., 2015b). En contraste, silenciarlas prolonga las ráfagas de lengüeteo (O'Connor et al., 2015b), lo que conecta con la hipótesis de que las neuronas espinosas medianas D1 del NAc Shell autorizan la alimentación (Kelley et al., 2005; O'Connor et al., 2015b; Taha & Fields, 2005). Nuestros datos extendieron estas observaciones y revelaron una actividad concurrente de neuronas D1 y D2 previa al lengüeteo e inhibición durante el lengüeteo de sacarosa. Tales respuestas fueron robustas y altamente consistentes, como lo indica nuestra capacidad para predecir las ráfagas de lengüeteo a través de los días con la actividad neuronal del primer día. Tal vez más importante, encontramos

que las respuestas D1 y D2 se adaptan a las tareas de comportamiento para codificar información de alimentación y otros eventos relevantes.

Un reciente estudio farmacológico mostró que la infusión de un antagonista al receptor D1 en el NAcLat de ratas incrementó su consumo de grasa, pero no de sacarosa líquida al 30%, o de alimento balanceado (chow) en un diseño de dieta tipo cafetería, en el cual los alimentos estaban disponibles al mismo tiempo. En contraste, inyectar un antagonista de receptores D2 no causó incrementos significativos en el consumo de alimentos (Joshi et al., 2021). Este resultado pareciera sugerir que las neuronas D1 y D2 no están relacionadas al consumo de sacarosa, que está en contraste directo con nuestros descubrimientos, en donde los ensambles del NAcLat de ambos tipos celulares responden en anticipación al consumo de sacarosa. Una posibilidad es que la inhibición farmacológica no selectiva de los receptores de dopamina D1 y D2 esté afectando a la vez a varios ensambles que provocan salidas de comportamiento diferentes y hasta opuestas entre ellas (K Inoue, 1995). Alternativamente y tal vez más probable es que Joshi et al. observaron un incremento selectivo del consumo de grasa porque era el estímulo más palatable disponible en la dieta de cafetería. En cualquiera de los dos casos, ambos estudios están de acuerdo que el NAcLat está relacionado con el consumo del estímulo gustativo más palatable o reforzador. Estos resultados son consistentes con previos datos que muestran que las neuronas del dNAcMed responden al consumo de "Ensure", una emulsión líquida con grasas (Tellez et al., 2012), o a una solución de sacarosa (Krause et al., 2010; Villavicencio et al., 2018). Similarmente, en ratones, un estudio de fotometría de fibra óptica observó que las neuronas D1 del dNAcMed, pero no las D2, incrementan su actividad en anticipación del consumo de pellets altos en grasa (H. Wu et al., 2022). En este estudio caracterizamos cómo las neuronas del NAcLat responden a la sacarosa, pero es razonable asumir con base en

los otros resultados que respuestas similares podrían observarse también con el consumo de grasas.

En general ha sido complicado asignar un rol inequívoco a la actividad de las neuronas D2 en el NAcMed y el NAcLat con respecto al comportamiento consumatorio. Sin embargo se sabe que afectan los comportamientos motivados (Natsubori et al., 2017; Soares-Cunha et al., 2018; Soares-Cunha, Correia, et al., 2020). Las estrategias optogenéticas y farmacológicas que han usado de blanco a las neuronas D2 han fallado para alterar el comportamiento de alimentación y consumo de forma consistente (Joshi et al., 2021; K Inoue, 1995; O'Connor et al., 2015b; Soares-Cunha, Correia, et al., 2020). Por eso, a diferencia de las neuronas D1 (O'Connor et al., 2015b; H. Wu et al., 2022), el rol causal de las neuronas D2 durante el lengüeteo sigue siendo desconocido. Una posibilidad es que la activación de las neuronas D2 alrededor del lengüeteo monitoree pero no sea necesario para el comportamiento de alimentación (O'Connor et al., 2015b; Soares-Cunha, Correia, et al., 2020; H. Wu et al., 2022). Sin embargo, Yao et al. encontró que la estimulación de las neuronas D2 del vNAcMed decrementa la preferencia por sacarosa en una prueba de elección de dos botellas, donde los estímulos eran agua y sacarosa. Por ello, pareciera que la función de las neuronas D1 y D2 depende de su localización precisa, del momento durante la tarea en que están siendo estimulada y de los parámetros empleados en la tarea (Natsubori et al., 2017; Soares-Cunha, de Vasconcelos, et al., 2020; Yao et al., 2021). Igualmente desconocida es la contribución de la activación concurrente de neuronas D1 y D2 sobre el comportamiento de alimentación observado en el NAcLat. Actualmente no tenemos respuestas claras para estas preguntas, pero nuestros datos no apoyaron la noción de funciones opuestas entre las neuronas espinosas medianas D1 y las D2, por lo menos no en la anticipación del consumo de sacarosa. Estos descubrimientos nos permiten reconsiderar la ampliamente mantenida suposición de que las neuronas D1 y D2 del

estriado tienen principalmente funciones opuestas entre ellas (Kravitz et al., 2012; Lobo et al., 2010). Nuestros resultados concuerdan con un reciente estudio que utilizó fotometría de fibra en el NAcLat en una tarea operante de razón progresiva motivada por comida. Natsubori et al. encontraron que las señales de calcio poblacionales de neuronas espinosas medianas D1 y D2 fueron notablemente similares en diferentes momentos de la tarea, tales como el inicio del ensayo, el presionar de una palanca y la entrega de una recompensa. Importantemente, también observaron que las neuronas ventrolaterales D1 y D2 se co-activaron en anticipación del consumo de un pellet de comida y las señales de Ca^{2+} regresaron a su línea base durante el consumo (Natsubori et al., 2017). Nuestros resultados confirman esta activación concurrente de D1 y D2, pero con una resolución de células individuales en anticipación del consumo de sacarosa, pero utilizando diferentes ensambles y dinámicas temporales.

A pesar de las evidencias anteriores, existen diferencias entre los subnúcleos del NAc, la más importante de ellas es que en el dNAcMed las D1 (pero no las D2) se activan en anticipación al consumo de comida (O'Connor et al., 2015b; H. Wu et al., 2022), mientras que nuestro estudio y el de (Natsubori et al., 2017) mostraron que tanto las D1 como las D2 del NAcLat están co-activas antes del comportamiento de ingesta. También es claro que estos subnúcleos comparten propiedades similares en su respuesta a los alimentos palatables. Por ejemplo, la habilidad que tienen los agonistas de opioides para incrementar el consumo de alimentos parece estar distribuido anatómicamente a través de todo el NAc (Peciña & Berridge, 2005). Similarmente, un detallado estudio electrofisiológico registrado a lo largo del eje antero-posterior y varias coordenadas medio-laterales encontró que un subgrupo de neuronas en el NAc de prácticamente todos los subnúcleos grabados exhibió una actividad similar de rampa antes del lengüeteo e inhibición durante el consumo de sacarosa (Krause et al., 2010). Nosotros extendimos esta

observación hacia el NAcLat y demostramos por primera vez con una resolución de células individuales que las neuronas D1 y D2 son moduladas por la sacarosa. Esto nos lleva a proponer que el estriado ventral puede estar sometiéndose a un reclutamiento generalizado de neuronas a través de diferentes regiones del NAc, provocado por la sacarosa, tal vez transmitiendo la información necesaria para realizar su función de “centinela sensorial” que había sido hipotetizada desde hace largo tiempo (Kelley et al., 2005). Por lo tanto proponemos que esta modulación distribuida de neuronas D1 y D2 provocada por la sacarosa tal vez lleva consigo información local hacia las neuronas D1 del dNAcMed, el cual, debido a sus proyecciones hacia el hipotálamo lateral, resulta en un nodo crítico en el control de la alimentación (Kelley et al., 2005; Nieh et al., 2016; O’Connor et al., 2015b; Peciña & Berridge, 2005; Prado et al., 2016).

Estudios recientes han demostrado que el NAcLat es un nodo central del sistema de la recompensa (de Jong et al., 2019; Yang et al., 2018). La estimulación optogenética de las terminales del NAcLat que proyectan hacia el núcleo ventral tegmental lateral (IVTA) es recompensante, pues los ratones buscan la auto-estimulación de estas fibras. (de Jong et al., 2019). De esta manera, extendemos estos resultados demostrando que las neuronas D1 y D2 del NAcLat son moduladas por el consumo de sacarosa y pueden monitorear el lengüeteo a través de los días. Aparte de esto mostramos por primera vez que ambos tipos celulares pueden procesar información de sabor (Gutierrez & Simon, 2021). Los estudios futuros se beneficiarían de investigar los efectos causales de la estimulación y silenciamiento optogenéticos de las neuronas del NAcLat. Idealmente, las perturbaciones optogenéticas deben tener como blancos no solo neuronas de acuerdo a sus marcadores genéticos (Yao et al., 2021) sino con base en los ensamblajes funcionales aquí descritos.

También encontramos varios ensambles modulados por el inicio del lengüeteo independientemente del estímulo gustativo o si eran lengüeteos de un bebedero seco, por ello proponemos que estos ensambles contienen información motora o somatosensorial provocada por la estimulación de la lengua. Estos descubrimientos están en línea con previas observaciones de que la representación de la lengua se encuentra en la parte ventral del estriado dorso-lateral y que podría extenderse hacia el NAcLat (Robbe, 2018; Tang et al., 2009).

Una limitación de nuestro estudio es que utilizamos ratones *Drd2-cre* que tienen como blanco preferencial las neuronas espinosas medianas, pero también podrían incluir interneuronas colinérgicas ChAT (Alcantara et al., 2003; Le Moine et al., 1990; Warner-Schmidt et al., 2012; Witten et al., 2010). Por lo tanto, la actividad de las neuronas ChAT puede influir en algunas de las respuestas, como la observada durante la retracción del bebedero (observar flecha en **Fig. 4f**). El significado de la excitación de rebote observada al final del periodo de acceso al sabor sigue siendo desconocido. Sin embargo, esta actividad es consistente con previos estudios que sugieren que las neuronas ChAT putativas responden a estímulos auditivos exteroceptivos (Villavicencio et al., 2018). Aunque encontramos que tal actividad de rebote no fue exclusiva a las neuronas D2 pues también se observó en las neuronas D1, tal como se había pronosticado en (Villavicencio et al., 2018). Los estudios futuros deben evaluar la actividad de calcio utilizando ratones *Adenosine2d-cre*, que expresan más fuertemente en sus poblaciones de neuronas espinosas medianas D2 (Lobo et al., 2006; Yun et al., 2021). Aún así, proponemos que la contribución de las interneuronas ChAT no explica enteramente la amplia gama de respuestas de D2, ya que la población D1 también fue altamente heterogénea y esta contiene solo neuronas espinosas medianas (Warner-Schmidt et al., 2012). Por lo tanto, parece que ambos tipos celulares, D1 y D2 están organizados en ensambles (Carrillo-Reid et al., 2008; Hebb, 2002). Estos resultados nos llevan a pensar que las

respuestas D1 y D2 que están relacionadas con el consumo y los comportamientos motivados son más complejos que la suposición actual de que son meramente funciones opuestas.

12.- Conclusión

Con base en nuestra evidencia presentada y en otras investigaciones analizadas, concluimos que, aunque las neuronas D1 y D2 están genéticamente identificadas, no actúan como una población simple y homogénea. En vez de esto, sus respuestas están agrupadas en varios ensambles con dinámicas temporales características alrededor y durante el consumo de sacarosa. Proponemos que estos ensambles del NAcLat sirven como canales paralelos para el procesamiento de la información oromotora, gustativa y relevante para la tarea. En resumen, la heterogeneidad funcional intrínseca de las neuronas identificadas como D1 y D2 en el NAcLat permite la formación de ensambles que se adaptan al contexto de comportamiento para monitorear eventos motrices y sensoriales, apoyando al NAc en su función de “centinela sensorial”, distribuida a lo largo de sus subnúcleos involucrados en el consumo hedónico de alimentos.

13.- Métodos y Materiales

13.1.- Ratones

Se utilizó un total de **n=3** ratones *Drd1-cre* (B6.Cg-Tg(*Drd1a-cre*)262Gsat/Mmcd (Compañía: MMRC, número de stock: 030989) y **n=4** ratones *Drd2-cre* (B6.FVB(Cg)-Tg(*DrDrd2-cre*)ER44Gsat/Mmcd, Compañía: MMRC, número de stock: 032108) de ambos sexos. Los ratones fueron colocados en cajas hogar individuales en un cuarto con temperatura controlada a 22(±1)°C y un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se les administró una dieta ad libitum para roedor (PicoLab Rodent Diet 20, MO, USA) y se les restringió de agua en las 22 h previas a cada sesión de grabación. El manejo de animales y protocolos de

comportamiento fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del CINVESTAV. Cada animal se sometió a 3 diferentes procedimientos quirúrgicos: uno para inyección viral, uno para implantación de lentes GRIN y el último para la implantación de la base del microendoscopio.

13.2.- Inyección Viral

Los sujetos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg, i.p.) y xilazina (8 mg/kg, i.p.). Se les administró 0.05 ml de lidocaína subcutáneamente debajo del cuero cabelludo como analgésico local. Se aplicó ungüento oftálmico (hidrocortisona, neomicina y polimixina-B) a los ojos de los sujetos para protegerlos de la deshidratación e infecciones. Los ratones fueron inyectados con AAV9-flex-GCaMP6m (Penn Vector Core, University of Pennsylvania, Lote: CS0421, qTiter 2.9×10^{13} (GC/ml)), en la parte lateral del Nucleus Accumbens Shell (NAcLat) usando las coordenadas desde bregma: AP = 0.98 mm, ML = ± 2 mm, and DV = -4.7 mm; utilizando un aparato estereotáxico para ratón (Digital Lab Standard, Mouse Stereotaxic Instrument Stoelting, IL, USA). En las coordenadas AP y ML mencionadas anteriormente se realizó una craneotomía de un 1 mm de diámetro. La aguja de inyección se conectó a una bomba de inyección manual (Starret No. 262M Micrometer Head) y se infundieron 500 nl del AAV a una velocidad de 50 nl/min. Posterior a la inyección la aguja se mantuvo en la misma coordenada por 7 minutos adicionales antes de retraerla para permitir una mejor difusión de AAV. Se utilizó cera de hueso para llenar la craneotomía (marca Atramat). El tratamiento posterior a la cirugía constó de 3 días con inyecciones diarias del antibiótico enrofloxacina (0.4 ml/kg).

13.3.- Implantación de lente y colocación de la base para microendoscopio

Los ratones se recuperaron de la cirugía de inyección durante tres semanas para dar tiempo a la expresión del indicador de calcio

GCaMP6m. Después de eso, fueron anestesiados con isoflurano inhalable y montados en el aparato estereotáxico para implantación de lentes. Se insertaron tres tornillos al cráneo y realizó una craneotomía de 1.5 mm de diámetro a través de la cual se introdujo un lente de gradiente de índice de refracción (GRIN, sonda ProView de 7.2 mm de largo, Inscopix) hasta la coordenada DV=4.4 mm a una velocidad de aproximadamente 1 mm/min para evitar la deformación excesiva de tejido causada por la superficie plana y amplia de la cara del lente GRIN. El microendoscopio se montó en el sujetador ProView sobre la cara externa del lente para visualizar y grabar la fluorescencia del tejido en tiempo real mientras el lente se introducía (nVista Software Suite, Inscopix, Palo Alto, CA, USA). Cuando se alcanzó la profundidad deseada, el lente se adhirió a la superficie del cráneo de forma para sellar la craneotomía utilizando pegamento de cianoacrilato (adhesivo instantáneo marca LOCTITE 454 PRISM). Los ratones se recuperaron durante una semana después de la implantación con tres días de inyecciones del antibiótico enrofloxacina (0.4 ml/kg).

Una semana después de la inserción del lente se colocó la base del microendoscopio. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano inhalable y colocados en el aparato estereotáxico mencionado previamente. Se montó el microendoscopio con una base conectada utilizando el sujetador de agarre ajustable con articulación esférica (TRB1- Locking Ball and Socket Mount, Thorlabs) y se colocó sobre el lente GRIN implantado hasta que se alcanzó el mayor enfoque posible del borde superior del lente, después se subió en el eje dorsoventral entre 350 y 500 μm para alinearlo con el plano focal del lente. A esta distancia varias neuronas fluorescentes están enfocadas. El microendoscopio se eleva adicionalmente 50 μm para compensar la contracción del pegamento durante el curado. La base se fija a la superficie del cráneo con adhesivo de cianoacrilato.

13.4.- Prueba de Acceso Breve al Sabor

Se diseñó una prueba de acceso breve al sabor automatizada. En esta tarea se colocó al ratón dentro de una caja conductual durante 30 minutos. Un bebedero se les presentaba automáticamente al inicio de la tarea, después del primer lengüeteo en el bebedero los ratones tenían una ventana de tiempo de 5 segundos para seguir lengüeteando antes de que el bebedero se retrajera. A esto le llamamos Periodo de Acceso al Sabor. El bebedero se mantiene retraído y fuera del alcance del sujeto durante 2 segundos, cualquier intento de lengüeteo en el puerto reinicia este tiempo de espera.

El bebedero consiste en un haz de agujas de acero inoxidable (diámetro 20G) adheridas entre ellas con acrílico dental, con los biseles removidos y las puntas lijadas (Villavicencio et al., 2018). Una manguera de silicón conectaba a cada aguja con una válvula solenoide (Marca Parker, Ohio, USA).

Los sujetos recibieron una gota de 2 μ l por lengüeteo y este volumen se controlaba mediante un sistema de aire a presión y calibrado antes de cada sesión experimental.

Durante el periodo de acceso al sabor, se les presentó a los ratones en orden semi-aleatorio uno de hasta cuatro diferentes sabores. Cada sesión podía tener una de tres combinaciones de estímulos gustativos:

- Agua/Sacarosa/Seco (Agua destilada, solución de sacarosa 18%, un bebedero seco que no entrega nada con los lengüeteos).
- Concentraciones de Sacarosa (agua, sacarosa 3%, sacarosa 10%, sacarosa 18%).

La sacarosa usada fue de calidad grado reactivo adquirida de Sigma-Aldrich (Ciudad de México, México). Las soluciones de 3, 10 y 18 wt/vol% se disolvieron utilizando agua destilada y fueron preparadas cada tercer día. Las soluciones se mantuvieron bajo refrigeración a $\sim 4^{\circ}\text{C}$ y se utilizaron a temperatura ambiente $\sim 23^{\circ}\text{C}$.

13.5.- Análisis de Datos

Fig. 2a-b. Arriba: Utilizando el programa Inscopix Data Acquisition Software se realizaron grabaciones de microendoscopio de la actividad de GCaMP6m en el NAcLat en ratones D1 y *Drd2-cre*, los datos crudos se analizaron utilizando el programa Inscopix Data Processing Software (ver. 1.3.1.2796). A todas las secuencias se les redujo el muestreo de resolución en un factor de 3x. Se aplicó un filtro pasa-bandas de valor de corte inferior de 0.005 y valor de corte superior de 0.5. Se aplicó corrección de movimiento en las grabaciones con una traslación máxima de 20 píxeles y se normalizó utilizando la función embebida de DFF ($\Delta F/F$) contra la media de todos los cuadros de cada sesión de grabación. Abajo: Los eventos de lengüeteo se adquirieron usando un detector infrarrojo de tipo *photobeam* (MEDPC) localizado perpendicularmente en el extremo del bebedero, después de cada lengüeteo detectado el bebedero entregó una gota de 2 μ l de sacarosa (18% wt).

Fig. 2c. Se extrajo un total de 348 trazos fluorescentes de neuronas D1 y 318 de neuronas D2. Un trazo es considerado el valor promedio de todos los píxeles dentro de una región de interés para cada cuadro en una grabación de 30 minutos. Todas las regiones de interés se definieron manualmente posterior a un ajuste longitudinal para alinear todas las sesiones de grabación del mismo sujeto. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre cada trazo y la frecuencia de lengüeteos correspondiente utilizando la función de Matlab “corrcoef()”

Fig. 2d. Se realizó un análisis de Chi Cuadrada (χ^2) en los trazos de neuronas D1 y D2. El número de neuronas D1 que correlacionaron positivamente con el lengüeteo (n=172) fue significativamente más grande que las neuronas con correlación negativa (n=55), ($\chi^2=31.1$, $p=2.4 \times 10^{-8}$). Similarmente, el número de neuronas D2 con correlación positiva con el lengüeteo (n=143) fue significativamente mayor que las neuronas D2 con correlación negativa (n=69), ($\chi^2=8.92$, $p=0.0028$).

Hubo 121 trazos D1 y 106 trazos D2 que no correlacionaron significativamente con el lengüeteo.

Fig. 2e. La estabilidad de la correlación de neuronas entre sesiones. Se calculó el coeficiente de correlación entre el trazo fluorescente de una neurona y la frecuencia de lengüeteo para sesiones consecutivas. El eje vertical de la gráfica de dispersión muestra los coeficientes de correlación de Pearson de una neurona en una sesión, el eje horizontal muestra el coeficiente de correlación de la misma neurona en la sesión anterior. Solo se muestra comparaciones entre sesiones consecutivas (D1, $n=242$; D2, $n=232$), por lo tanto, el número de valores es mejor que el total de trazos mostrados en 2c-d. Un punto en la gráfica de dispersión ubicado sobre la diagonal significaría que el coeficiente de correlación fue el mismo en dos sesiones consecutivas. Todos los puntos de datos se ajustaron linealmente a la diagonal usando la función "cftool" incluida en la "Curve Fitting Toolbox" de Matlab (para coeficientes D1 $SSE=4.29$, R^2 ajustado=0.53 y para coeficientes D2 $SSE=4.846$, R^2 ajustado=0.6054).

Fig. 3a-b. Arriba: Se utilizó la función " $b=regress(y,X)$ " para calcular un vector de coeficientes para una regresión lineal múltiple de las respuestas en el vector "y" respecto a los predictores en la matriz "X". El vector y contiene las frecuencias de lengüeteo de una sesión y la matriz X contiene todos los trazos de neuronas con reducción de muestreo (*downsample*) de la misma sesión concatenados a la derecha de una columna de unos para considerar un término constante en el modelo, conocido como intercepto. El vector de salida de coeficientes estimados b se utilizó para multiplicar a todas las neuronas en X. Todos los trazos de neuronas multiplicados por sus coeficientes de regresión se promediaron entre ellos, al vector resultante le consideramos la Predicción del Lengüeteo.

Centro: La predicción del lengüeteo se grafica en rojo en frente de sus correspondientes lengüeteos medidos. Las predicciones se binarizaron con el umbral que maximizó su correlación de Pearson con el lengüeteo.

El umbral de binarización óptimo se muestra como una línea puntuada azul horizontal.

Abajo: La binarización de la predicción del lengüeteo se grafica en rojo en frente de los lengüeteos medidos (reales) en esa sesión.

Fig. 3c-d. Todas las regresiones lineales múltiples se calcularon en la primera sesión de cada sujeto, estos días están marcados con un rectángulo rojo y se consideran “Entrenamiento”. Las estimaciones de coeficientes del primer día se utilizaron para calcular las predicciones de velocidad de lengüeteo de los días siguientes. Se graficó la correlación entre los lengüeteos medidos y sus predicciones para las siguientes sesiones. Los puntos de datos barajeados se calcularon a partir de los siguientes análisis, pero con los tiempos de lengüeteo desplazados 5 segundos.

13.6.- Análisis de Señales de Calcio en Libre Lengüeteo de Sacarosa al 18%

Las ráfagas de lengüeteo fueron calculadas cada sesión, se define como ráfaga de lengüeteo a dos o más eventos de lengüeteo consecutivos con un intervalo entre eventos de al menos 1 segundo. Los lengüeteos por segundo y los z-scores normalizados de todos los trazos de neuronas a través de las sesiones se alinearon al inicio de cada ráfaga de lengüeteo (**Figs. 4b and 4c**). Consideramos los valores de z-score de -2 a -1 segundo como línea base y el promedio de estos valores se sustrajo de los trazos para normalizarlos.

13.7.- Análisis de Señales de Calcio en BATT

Los ensayos se separaron y promediaron de acuerdo con sus estímulos (bebedero seco, agua o sacarosa al 18% **Figs. 4e and 4f**). Se graficaron las respuestas promedio de neuronas individuales en ensayos con diferentes tipos de estímulos (**Figs. 5c y 5d**). Se realizó un análisis Kruskal-Wallis de ventana deslizante de 1 s con saltos de 50 ms. Los

periodos sombreados indican momentos en que al menos una de las respuestas es diferente significativamente a cualquiera de las otras (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

13.8.- Clasificación por Ensamble de Señales de Calcio

Se extrajo el trazo promedio de cada neurona individual de -2 a 7 segundos alrededor de cada primer lengüeteo de todas las sesiones de BATT con tres estímulos: bebedero seco, agua y sacarosa 18%. Los trazos neuronales se concatenaron verticalmente con otras neuronas y de forma horizontal con la respuesta de las mismas neuronas a los tres estímulos por separado. Se utilizó un Análisis de Componentes Principales para reducir la dimensionalidad del arreglo concatenado, las gráficas de dispersión en las **Figs. 6a y 6b** muestran un punto por neurona usando de ejes sus dos primeros componentes principales. Todos los puntos de datos se agruparon mediante un análisis de agrupamiento jerárquico utilizando la función de Matlab "*linkage*" y ajustando el máximo número de ensambles a 4. La matriz concatenada de todas las neuronas se utilizó para clasificarlas en uno de los cuatro posibles ensambles. Se aplicó el "método del codo" para encontrar el número de ensambles que minimizara la varianza entre puntos sin crear demasiados ensambles con respuestas similares entre ellos. Se calculó la suma de cuadrados dentro de cada ensamble y se graficó contra el número de ensambles utilizados, de esta forma se puede identificar el punto en el que al aumentar el número de ensambles no mejora sustancialmente el cálculo de varianza. Las neuronas se ordenaron verticalmente de acuerdo con sus ensambles y se separaron horizontalmente según su respuesta a cada estímulo. El agrupamiento jerárquico se calcula de forma separada dentro de cada matriz, lo que significa que el ensamble 1 (E1) de las neuronas D1 no es el mismo ni es equivalente al ensamble E1 de las neuronas D2. Los mismos análisis se aplicaron a las sesiones de breve acceso al sabor con cuatro

estímulos: agua, sacarosa 3%, sacarosa 10% y sacarosa 18%, como se muestra en la **Fig. 7**.

14.- Bibliografía

- Alcantara, A. A., Chen, V., Herring, B. E., Mendenhall, J. M., & Berlanga, M. L. (2003). Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Research*, 986(1–2), 22–29. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03165-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03165-2)
- Allen Reference Atlases: Atlas Viewer*. (n.d.). Retrieved December 26, 2021, from <http://atlas.brain-map.org/>
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., & Vargas, J. (2008). Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), 1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>
- Chen, R., Blosser, T. R., Djekidel, M. N., Hao, J., Bhattacharjee, A., Chen, W., Tuesta, L. M., Zhuang, X., & Zhang, Y. (2021). Decoding molecular and cellular heterogeneity of mouse nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00938-x>
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Chen, X., Gabitto, M., Peng, Y., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2011). A Gustotopic Map of Taste Qualities in the Mammalian Brain. *Science*, 333(6047), 1262–1266. <https://doi.org/10.1126/science.1204076>
- Cho, J., & West, M. O. (1997). Distributions of single neurons related to body parts in the lateral striatum of the rat. *Brain Research*, 756(1–2), 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00143-1)
- Davis, J. D. (1973). The effectiveness of some sugars in stimulating licking behavior in the rat. *Physiology & Behavior*, 11(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(73\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(73)90120-0)
- de Jong, J. W., Afjei, S. A., Pollak Dorocic, I., Peck, J. R., Liu, C., Kim, C. K., Tian, L., Deisseroth, K., & Lammel, S. (2019). A Neural Circuit Mechanism for Encoding Aversive Stimuli in the Mesolimbic Dopamine System. *Neuron*, 101(1), 133–151.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.005>
- Grandjean, J., Schroeter, A., Batata, I., & Rudin, M. (2014). Optimization of anesthesia protocol for resting-state fMRI in mice based on differential effects of anesthetics on functional connectivity patterns. *NeuroImage*, 102, 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.08.043>
- Gutierrez, R., & Simon, S. A. (2021). Physiology of Taste Processing in the Tongue, Gut, and Brain. In R. Terjung (Ed.), *Comprehensive Physiology* (1st ed., pp. 2489–2523). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c210002>
- Hajnal, A., Smith, G. P., & Norgren, R. (2004). Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(1), R31–R37. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00282.2003>
- Hebb, D. O. (2002). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Psychology Press. <https://doi.org/10.4324/9781410612403>
- Jezzini, A., Mazzucato, L., La Camera, G., & Fontanini, A. (2013). Processing of Hedonic and Chemosensory Features of Taste in Medial Prefrontal and Insular

- Networks. *Journal of Neuroscience*, 33(48), 18966–18978.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2974-13.2013>
- Jia, H., Rochefort, N. L., Chen, X., & Konnerth, A. (2011). In vivo two-photon imaging of sensory-evoked dendritic calcium signals in cortical neurons. *Nature Protocols*, 6(1), 28–35. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.169>
- Joshi, A., Kool, T., Diepenbroek, C., Koekkoek, L. L., Eggels, L., Kalsbeek, A., Mul, J. D., Barrot, M., & la Fleur, S. E. (2021). Dopamine D1 receptor signalling in the lateral shell of the nucleus accumbens controls dietary fat intake in male rats. *Appetite*, 167, 105597. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105597>
- K Inoue. (1995). D2 receptors in the ventrolateral striatum are involved in feeding behavior in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 50(2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)00275-N](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)00275-N)
- Kelley, A. E., Baldo, B. A., Pratt, W. E., & Will, M. J. (2005). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward. *Physiology & Behavior*, 86(5), 773–795.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.066>
- Krause, M., German, P. W., Taha, S. A., & Fields, H. L. (2010). A pause in nucleus accumbens neuron firing is required to initiate and maintain feeding. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(13), 4746–4756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0197-10.2010>
- Kravitz, A. V., Tye, L. D., & Kreitzer, A. C. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience*, 15(6), 816–818. <https://doi.org/10.1038/nn.3100>
- Le Moine, C., Tison, F., & Bloch, B. (1990). D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience Letters*, 117(3), 248–252. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90671-U](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90671-U)
- Lobo, M. K., Covington, H. E., Chaudhury, D., Friedman, A. K., Sun, H., Damez-Werno, D., Dietz, D. M., Zaman, S., Koo, J. W., Kennedy, P. J., Mouzon, E., Mogri, M., Neve, R. L., Deisseroth, K., Han, M.-H., & Nestler, E. J. (2010). Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6002), 385–390.
<https://doi.org/10.1126/science.1188472>
- Lobo, M. K., Karsten, S. L., Gray, M., Geschwind, D. H., & Yang, X. W. (2006). FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nature Neuroscience*, 9(3), 443–452.
<https://doi.org/10.1038/nn1654>
- Natsubori, A., Tsutsui-Kimura, I., Nishida, H., Bouchekioua, Y., Sekiya, H., Uchigashima, M., Watanabe, M., d'Exaerde, A. de K., Mimura, M., Takata, N., & Tanaka, K. F. (2017). Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons Positively Regulate Food-Incentive, Goal-Directed Behavior Independently of D1 and D2 Selectivity. *Journal of Neuroscience*, 37(10), 2723–2733.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017>
- Nieh, E. H., Vander Weele, C. M., Matthews, G. A., Presbrey, K. N., Wichmann, R., Leppla, C. A., Izadmehr, E. M., & Tye, K. M. (2016). Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron*, 90(6), 1286–1298.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.035>
- O'Connor, E. C., Kremer, Y., Lefort, S., Harada, M., Pascoli, V., Rohner, C., & Lüscher, C. (2015a). Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron*, 88(3), 553–564.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.038>
- O'Connor, E. C., Kremer, Y., Lefort, S., Harada, M., Pascoli, V., Rohner, C., & Lüscher, C. (2015b). Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron*, 88(3), 553–564.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.038>

- Peciña, S., & Berridge, K. C. (2005). Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do μ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? *Journal of Neuroscience*, *25*(50), 11777–11786. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2329-05.2005>
- Prado, L., Luis-Islas, J., Sandoval, O. I., Puron, L., Gil, M. M., Luna, A., Arias-García, M. A., Galarraga, E., Simon, S. A., & Gutierrez, R. (2016). Activation of Glutamatergic Fibers in the Anterior NAc Shell Modulates Reward Activity in the aNAcSh, the Lateral Hypothalamus, and Medial Prefrontal Cortex and Transiently Stops Feeding. *Journal of Neuroscience*, *36*(50), 12511–12529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1605-16.2016>
- Robbe, D. (2018). To move or to sense? Incorporating somatosensory representation into striatal functions. *Current Opinion in Neurobiology*, *52*, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.009>
- Roitman, M. F., Wheeler, R. A., & Carelli, R. M. (2005). Nucleus Accumbens Neurons Are Innately Tuned for Rewarding and Aversive Taste Stimuli, Encode Their Predictors, and Are Linked to Motor Output. *Neuron*, *45*(4), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.055>
- Rolls, E. T. (1989). Information processing in the taste system of primates. *The Journal of Experimental Biology*, *146*, 141–164.
- Roussin, A. T., D'Agostino, A. E., Fooden, A. M., Victor, J. D., & Di Lorenzo, P. M. (2012). Taste Coding in the Nucleus of the Solitary Tract of the Awake, Freely Licking Rat. *Journal of Neuroscience*, *32*(31), 10494–10506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1856-12.2012>
- Smith, J. C., Davis, J. D., & O'Keefe, G. B. (1992). Lack of an order effect in brief contact taste tests with closely spaced test trials. *Physiology & Behavior*, *52*(6), 1107–1111. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90467-G](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90467-G)
- Soares-Cunha, C., Coimbra, B., Domingues, A. V., Vasconcelos, N., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2018). Nucleus Accumbens Microcircuit Underlying D2-MSN-Driven Increase in Motivation. *ENeuro*, *5*(2), ENEURO.0386-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENeuro.0386-18.2018>
- Soares-Cunha, C., Correia, R., Domingues, A. V., Coimbra, B., de Vasconcelos, N. A., Pinto, L., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2020). *Distinct role of nucleus accumbens D2-MSN projections to ventral pallidum in different phases of motivated behavior* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2020.11.27.401042>
- Soares-Cunha, C., de Vasconcelos, N. A. P., Coimbra, B., Domingues, A. V., Silva, J. M., Loureiro-Campos, E., Gaspar, R., Sotiropoulos, I., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2020). Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Molecular Psychiatry*, *25*(12), 3241–3255. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0484-3>
- Stapleton, J. R. (2006). Rapid Taste Responses in the Gustatory Cortex during Licking. *Journal of Neuroscience*, *26*(15), 4126–4138. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0092-06.2006>
- Taha, S. A., & Fields, H. L. (2005). Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(5), 1193–1202. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3975-04.2005>
- Tang, C. C., Root, D. H., Duke, D. C., Zhu, Y., Teixeira, K., Ma, S., Barker, D. J., & West, M. O. (2009). Decreased Firing of Striatal Neurons Related to Licking during Acquisition and Overtraining of a Licking Task. *Journal of Neuroscience*, *29*(44), 13952–13961. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2824-09.2009>
- Tellez, L. A., Perez, I. O., Simon, S. A., & Gutierrez, R. (2012). Transitions between sleep and feeding states in rat ventral striatum neurons. *Journal of Neurophysiology*, *108*(6), 1739–1751. <https://doi.org/10.1152/jn.00394.2012>

- Villavicencio, M., Moreno, M. G., Simon, S. A., & Gutierrez, R. (2018). Encoding of Sucrose's Palatability in the Nucleus Accumbens Shell and Its Modulation by Exteroceptive Auditory Cues. *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 265. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00265>
- Warner-Schmidt, J. L., Schmidt, E. F., Marshall, J. J., Rubin, A. J., Arango-Lievano, M., Kaplitt, M. G., Ibanez-Tallon, I., Heintz, N., & Greengard, P. (2012). Cholinergic interneurons in the nucleus accumbens regulate depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(28), 11360–11365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209293109>
- Witten, I. B., Lin, S.-C., Brodsky, M., Prakash, R., Diester, I., Anikeeva, P., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2010). Cholinergic Interneurons Control Local Circuit Activity and Cocaine Conditioning. *Science*, *330*(6011), 1677–1681. <https://doi.org/10.1126/science.1193771>
- Wu, A., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2015). Breadth of tuning in taste afferent neurons varies with stimulus strength. *Nature Communications*, *6*(1), 8171. <https://doi.org/10.1038/ncomms9171>
- Wu, H., Kakusa, B., Neuner, S., Christoffel, D. J., Heifets, B. D., Malenka, R. C., & Halpern, C. H. (2022). Local accumbens in vivo imaging during deep brain stimulation reveals a strategy-dependent amelioration of hedonic feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(1), e2109269118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109269118>
- Yang, H., de Jong, J. W., Tak, Y., Peck, J., Bateup, H. S., & Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron*, *97*(2), 434-449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>
- Yao, Y., Gao, G., Liu, K., Shi, X., Cheng, M., Xiong, Y., & Song, S. (2021). Projections from D2 Neurons in Different Subregions of Nucleus Accumbens Shell to Ventral Pallidum Play Distinct Roles in Reward and Aversion. *Neuroscience Bulletin*, *37*(5), 623–640. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00632-9>
- Young, P. T., & Trafton, C. L. (1964). Activity contour maps as related to preferences in four gustatory stimulus areas of the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *58*(1), 68–75. <https://doi.org/10.1037/h0044823>
- Yun, S., Yang, B., Martin, M. M., Yeh, N.-H., Contractor, A., & Parker, J. G. (2021). *Modulating D1 rather than D2 receptor-expressing spiny-projection neurons corresponds to optimal antipsychotic effect* (p. 2021.08.03.454992). <https://doi.org/10.1101/2021.08.03.454992>