

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



**“Rol del cerebro basal anterior en la
discriminación olfatoria de mezclas complejas de
odorantes en ratones”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

SOFÍA FERNANDA ROMERO HERMOSILLA

Dra. Alexia Núñez Parra

Directora de Seminario de Título

Dra. Cecilia Vergara Montecinos

Co-Directora de Seminario de Título

Octubre 2020

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.:

SOFÍA FERNANDA ROMERO HERMOSILLA

“Rol del cerebro basal anterior en la discriminación olfatoria de mezclas complejas de odorantes en ratones”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Alexia Núñez Parra

Directora de Seminario de Título

Dra. Cecilia Vergara Montecinos

Co-Directora de Seminario de Título

Una firma manuscrita en azul que parece decir "Alexia Núñez Parra".

Comisión Revisora y Evaluadora:

Dr. Julio Alcayaga Urbina

Presidente Comisión

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Evaluador

Santiago de Chile, octubre de 2020.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi directora de seminario, Dra. Alexia Núñez y a mi co-directora, Dra. Cecilia Vergara, por guiarme en el proceso de mi seminario de título y por otorgarme los recursos y facilidades para poder finalizar este trabajo de la mejor manera posible dadas las circunstancias.

También quisiera agradecer a los miembros del Laboratorio de Fisiología Celular por ayudarme a resolver dudas, inconvenientes y por entregarme críticas constructivas a lo largo de este trabajo. Especialmente, quisiera agradecer a Morín Henríquez, Andrea Vidal y Tamara Molina, quienes se convirtieron en grandes amigas y personas muy importantes para mí. Gracias por su apoyo, compañía, su ayuda en los momentos de estrés y de frustración y gracias por todos los momentos de risas.

Gracias a Diego Becerra, por enseñarme a inyectar virus cuando comencé en el laboratorio, por haberme tenido paciencia y por darme su apoyo en los momentos de frustración, además de ayudarme con los gráficos. Quisiera agradecer también a Lorena Saragoni por su amabilidad y buena disposición para ayudarme a tomar las imágenes de microscopía.

Agradezco también a mis amigos por su sincera amistad y por las risas para aliviar el estrés. A Francisca López, mi amiga de hace 17 años, quien además me enseñó cómo usar los programas para hacer las reconstrucciones de imágenes de microscopía confocal. Gracias también a Kevin Chou por creer en mí siempre y por darme ánimos.

Finalmente, quisiera agradecer a mis padres por su apoyo moral y sacrificio económico durante estos años de estudio, que hicieron posible que pudiera culminar mi pregrado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS, ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
<i>Rol del cerebro basal anterior en el procesamiento sensorial</i>	2
<i>Relación entre la neuromodulación en el BF y la percepción olfatoria</i>	5
<i>Optogenética como herramienta para modificar la actividad neuronal</i>	9
<i>Modulación de la actividad neuronal del BF y sus efectos en el procesamiento de la información olfatoria in vivo en animales despiertos</i>	13
Hipótesis	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. Animales de experimentación	16
2. Virus.....	16
3. Cirugía estereotáxica de titulación viral	16

4.	Verificación del sitio de inyección viral	18
	4.1 <i>Perfusión intracardiaca y obtención de muestras</i>	18
	4.2 <i>Histología y fluorescencia</i>	18
5.	Fabricación del implante de fibra óptica	19
6.	Medición de irradiancia de la fibra óptica	21
7.	Cirugía estereotáxica de inyección viral e implante de fibra óptica.....	23
8.	Entrenamiento conductual go/no-go.....	24
	8.1 <i>Entrenamiento inicial</i>	27
	8.2 <i>Prueba inicial de discriminación go/no-go</i>	28
	8.3 <i>Prueba inicial de discriminación go/no-go con estimulación optogenética</i>	30
	8.4 <i>Prueba de discriminación go/no-go con mezclas complejas de odorantes</i>	32
9.	Verificación del sitio de inyección viral e implante de fibra óptica	33
	9.1 <i>Perfusión intracardiaca y obtención de la muestra</i>	33
	9.2 <i>Histología y fluorescencia</i>	33
10.	Criterios de inclusión y exclusión de resultados	33
	10.1 <i>Criterios de inclusión</i>	33
	10.2 <i>Criterios de exclusión</i>	34
11.	Análisis	34
	RESULTADOS	35
1.	Titulación de la expresión viral de canalrodopsina-2 (ChR-2) en neuronas del HDB de ratones.....	35

2.	Fabricación de implantes de fibras ópticas y cirugía estereotáxica	39
2.1	<i>Fabricación del implante de fibra óptica y medición de irradiancia</i>	<i>39</i>
2.2	<i>Cirugía estereotáxica de inyección viral e implante de fibra óptica.....</i>	<i>42</i>
3.	Evaluación de la capacidad de discriminación olfatoria de ratones inyectados con AAV en una prueba go/no-go al fotoestimar neuronas del HDB.....	44
3.1	<i>Estudios de discriminación olfatoria en ratones inyectados con AAV.....</i>	<i>44</i>
3.2	<i>Efecto de la estimulación optogenética del cerebro basal anterior en la discriminación olfatoria</i>	<i>46</i>
3.3	<i>Rol del cerebro basal anterior en la discriminación de mezclas complejas de odorantes</i>	<i>49</i>
	DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....	53
	Inyecciones de AAV en el cerebro basal anterior	53
	Elección del protocolo de fotoestimulación.....	54
	Discriminación de mezclas complejas de odorantes	56
	Rol de las neuronas colinérgicas del BF en la discriminación olfatoria	59
	Rol de las neuronas GABAérgicas del BF en la discriminación olfatoria.....	62
	Proyecciones	63
	<i>AAV retrógrados para otorgar selectividad en la activación neuronal</i>	<i>63</i>
	<i>Expresión de AAV bajo promotores específicos para otorgar especificidad.....</i>	<i>64</i>
	<i>Electrofisiología y Optogenética in vivo.....</i>	<i>65</i>
	<i>Fotometría de fibra óptica.....</i>	<i>65</i>

CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	67
ANEXO	77
Canalrodopsina-2 (ChR-2) modificada	77
Odorantes	77
Referencias Anexo.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del protocolo de entrenamiento conductual realizado.	32
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cerebro basal anterior y sus proyecciones aferentes y eferentes.	4
Figura 2. Esquema simplificado del sistema olfatorio.....	7
Figura 3. El sistema olfatorio recibe proyecciones colinérgicas del cerebro basal anterior	8
Figura 4. Opsinas como herramientas de optogenética.	12
Figura 6. Medición de irradiancia de la fibra óptica.	22
Figura 7. Protocolo de fotoestimulación.	22
Figura 8. Transmisión de luz de la fibra óptica.	23
Figura 9. Olfatómetro utilizado para los entrenamientos conductuales.....	26
Figura 10. Esquema de las etapas 1 y 2 del entrenamiento inicial.	28

Figura 11. Estimulación optogenética <i>in vivo</i> durante la prueba de discriminación go/no-go.	31
Figura 12. Estrategia experimental de inyección viral estereotáxica de ChR-2 en el HDB de ratones.	35
Figura 13. Expresión viral de ChR-2 en neuronas del cerebro basal anterior de ratón.	37
Figura 14. Calibración de la potencia de la fibra óptica de acople, del implante fabricado y valores de irradiancia.	41
Figura 15. Estrategia experimental de inyección viral estereotáxica de cada virus e implante de fibra óptica en el HDB de ratones.	43
Figura 17. Al activar neuronas del HDB, el 100% de los roedores aprenden a discriminar ISO/MO en dos sesiones de entrenamiento.....	47
Figura 18. Al activar neuronas del HDB, el 100% de los roedores aprenden a discriminar PHEN/BUT en dos sesiones de entrenamiento.	48
Figura 19. Al activar neuronas del HDB, un roedor aprende a discriminar mezclas complejas de odorantes al 0,16% v/v en MO en una sesión de entrenamiento.....	50
Figura 20. Al activar neuronas del HDB, un roedor no logra discriminar mezclas complejas de odorantes al 1,6% v/v en MO en dos sesiones de entrenamiento.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV	Virus adeno-asociado
ACh	Acetilcolina
BF	Cerebro basal anterior
ChR-2	Canalrodopsina-2
ET	Neuronas externas en penacho
GC	Neurona granular
HDB	Subnúcleo horizontal de la banda diagonal de Broca
hSyn	Promotor de sinapsina humana I
MC	Neurona mitral
MCPO	Núcleo preóptico magnocelular
MOB	Bulbo olfatorio
OE	Epitelio olfatorio
OR	Receptor olfatorio
OSN	Neurona sensorial olfatoria
PC	Corteza piriforme
PG	Neurona periglomerular
Pyr	Neurona piramidal

RESUMEN

Todos los organismos requieren integrar información proveniente del ambiente para ejecutar acciones coherentes en su entorno, como huir de depredadores o localizar alimento. La percepción de estas señales y la capacidad de responder a estímulos relevantes ocurre mediante un proceso dinámico que se modifica a través de la experiencia y en el que participan circuitos neuromodulatorios.

El cerebro basal anterior (BF) es uno de los conjuntos de núcleos neuromoduladores más importante en mamíferos, proyectando a gran parte de la corteza y al sistema olfatorio. Está involucrado en variados procesos cognitivos como la atención, el aprendizaje, la memoria y la discriminación sensorial. El BF está compuesto por tres poblaciones neuronales principales: colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas.

En todos los vertebrados, el sistema olfatorio participa en comportamientos fundamentales como la identificación de depredadores, la reproducción y la paternidad. Cuando las moléculas de odorante ingresan por la nariz, son reconocidas por receptores en las neuronas sensoriales olfatorias, permitiendo la activación de éstas y la transmisión sináptica de esta señal hacia el bulbo olfatorio en el sistema nervioso central. En el cerebro, las neuronas de esta estructura proyectan axones hacia la corteza piriforme, donde se codifican las señales generadas por odorantes y que finalmente permiten generar perceptos olfatorios. En la codificación olfatoria no sólo está involucrada la transmisión sináptica producida por señales del medio externo o "*Bottom up*", sino que también la transmisión sináptica "*Top down*" desde núcleos modulatorios cerebrales. Un ejemplo de esto son las fibras colinérgicas y GABAérgicas del BF que proyectan sus axones al bulbo olfatorio y la corteza piriforme, específicamente desde el subnúcleo

horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB). Sin embargo, se desconoce el rol *in vivo* de la activación neuronal del BF en la discriminación de mezclas complejas de odorantes de composición similar.

Para evaluar el rol del HDB en la discriminación olfatoria, se llevó a cabo la activación neuronal por fotoestimulación de esta región cerebral de manera simultánea con pruebas conductuales. Específicamente, se expresó canalrodopsina-2 a través de inyecciones estereotáxicas virales en neuronas del HDB de ratones y se implantó una fibra óptica en esta zona del cerebro para controlar espacial y temporalmente, mediante optogenética *in vivo*, la activación de neuronas de esta área durante una prueba de discriminación go/no-go de mezclas complejas de odorantes.

Los resultados obtenidos sugerirían que el 85% de ratones implantados aprende a discriminar entre isoamilacetato y aceite mineral en tres sesiones de la prueba go/no-go. Al activar neuronas del HDB, el total de los animales implantados que expresan ChR-2 aprenderían a discriminar los mismos estímulos en dos sesiones de entrenamiento y aprenderían a discriminar entre fenilacetato y 2-butanona en dos sesiones de entrenamiento. Finalmente, en el único sujeto experimental en el cual se activaron neuronas del HDB durante la prueba de discriminación de mezclas complejas de odorantes, se observó un aumento de la sensibilidad olfativa. Más experimentos son necesarios para comprobar esta hipótesis.

ABSTRACT

All organisms need to integrate information from the external world to make coherent actions in a constantly changing environment, such as fleeing from predators or food localization. Signal perception and the ability to respond to relevant stimuli occurs through a dynamic process that is modified by experience in part by the activation of the neuromodulatory circuits.

The basal forebrain (BF) is one of the most important sets of neuromodulatory nuclei in mammals, projecting a large part of the cortex and the olfactory system. It is involved in various cognitive processes such as attention, learning, memory and sensory discrimination. The BF is composed of three main neuronal populations: cholinergic, GABAergic, and glutamatergic.

In all vertebrates, the olfactory system participates in fundamental behaviors such as the predator identification, mating and parenting. When the odorant molecules enter the nose, they are recognized by receptors in the olfactory sensory neurons, allowing the activation of them and the synaptic transmission of this signal to the olfactory bulb in the central nervous system. In the brain, the neurons of this structure project their axons towards the piriform cortex, where the signals generated by odorants are encoded generating the olfactory perception. In olfactory coding, not only is the synaptic transmission produced by signals from the external environment or "*Bottom up*" involved, but also synaptic transmission "*Top down*" from brain modulatory nuclei. An example of this are the cholinergic and GABAergic fibers of the BF that project their axons to the olfactory bulb and the piriform cortex, specifically from the horizontal limb of the diagonal band of Broca (HDB). However, the role of *in vivo* neuronal activation of BF

in the discrimination between complex mixtures of odorants of similar composition is unknown.

Here, to evaluate the role of HDB in olfactory discrimination we carried neuronal activation by photostimulation of this brain region simultaneously with a behavioral task. Specifically, we carried the expression of channelrhodopsin-2 through viral stereotaxic injections in HDB neurons of mice and performed an implanted an optical fiber in the area to be able to control spatially and temporally, through *in vivo* optogenetics, the activation of neurons in this region. The activation of neurons of HDB was performed during a go/no-go discrimination task of complex mixtures of odorants.

Our results would suggest that 85% of total mice implanted with an optical fiber learn to discriminate between isoamylacetate and mineral oil mostly in three training sessions of go/no-go task. By activating HDB neurons, all implanted animals expressing ChR-2 would learn to discriminate the same stimuli in two training sessions and would learn to discriminate between phenylacetate and 2-butanone in two training sessions. Finally, in the only experimental subject in whom HDB neurons were activated during the discrimination task of complex mixtures of odorants, an increase in olfactory sensitivity was observed. More experiments are necessary to prove this hypothesis.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos requieren integrar información que es percibida desde el ambiente para la ejecución coherente de acciones en un entorno cambiante, como huir de depredadores o localizar alimento. Este proceso es extremadamente relevante para la supervivencia de las especies, incluso permitiendo comportamientos reproductivos, agresivos o maternales en mamíferos. Los circuitos neuronales poseen plasticidad, es decir, son capaces de modificar su actividad, permitiendo procesar la información sensorial, cognitiva y motora en un contexto externo continuo y dinámico, que depende del estado fisiológico o interno (Grossberg y col., 2016). La percepción sensorial es regulada aumentando la información significativa en relación con la información menos relevante dependiendo de la experiencia, reflejándose en cambios en el patrón global de actividad neuronal en diferentes áreas cerebrales (Nunez-Parra y col., 2020). La actividad cerebral varía constantemente a través de distintos estados fisiológicos en que cambia el nivel de activación de las neuronas, y es influenciada no sólo por las respuestas a las señales en el ambiente (*“Bottom up”*), sino también por la capacidad del sistema para procesar este influjo de información (*“Top down”*). Por lo tanto, se genera una integración de las señales percibidas que finalmente son reflejadas en la conducta del animal al realizar una acción, involucrando la actividad motora y la atención del individuo (McCormick y col., 2020).

La regulación del balance entre la gran variedad de señales excitatorias e inhibitorias es fundamental para preservar niveles estables de actividad en los circuitos y evitar la hiperexcitabilidad, que puede generar focos epilépticos, hipersensibilidad o defectos cognitivos y perceptuales, como alucinaciones (Gogolla y col., 2009; Tatti y col., 2017; Sohal & Rubenstein, 2019).

En este contexto, la neocorteza está compuesta en un 80% de neuronas excitatorias y un 20% de interneuronas inhibitorias (Puigbò y col., 2020) que se activan de manera recíproca, generando circuitos de activación y retroalimentación inhibitoria.

El procesamiento de la información sensorial es además regulado por neurotransmisores como serotonina, acetilcolina, noradrenalina, dopamina, etc., que al ser liberados en los terminales presinápticos son reconocidos por receptores de la neurona postsináptica y alteran el potencial de membrana, la actividad de disparo y la plasticidad sináptica de la neurona objetivo (Giocomo & Hasselmo, 2007). Los efectos de cada neurotransmisor dependen del sitio de liberación, de la población neuronal postsináptica y del tipo de receptor que ésta posea.

Existen variados núcleos neuromodulatorios en el cerebro, definidos como conjuntos de estructuras que poseen neuronas que proyectan sus axones a diferentes regiones cerebrales y a la neocorteza, y que contribuyen a regular procesos como la atención, el aprendizaje, la memoria y la discriminación de estímulos sensoriales. Entre ellos, se encuentra el tronco encefálico, el hipotálamo y el cerebro basal anterior (Lee & Dan, 2012).

Rol del cerebro basal anterior en el procesamiento sensorial

El cerebro basal anterior (BF) es uno de los núcleos neuromoduladores más importantes en mamíferos (Gritti y col., 2006), proyectando a gran parte de la corteza y el sistema olfatorio (Zaborszky y col., 2012). Está compuesto por un conjunto de estructuras heterogéneas, incluyendo el área septal medial, el palidum ventral, los subnúcleos de la banda diagonal de Broca, la sustancia innominada y el núcleo preóptico magnocelular.

El BF es una región altamente compleja que está involucrada funcionalmente en la activación cortical, la atención (Buzsaki y col., 1988; Picciotto y col., 2012), el aprendizaje (Klinkenberg y col., 2011) y en la memoria (Everitt & Robbins, 1997). Además, participa durante todo el proceso de toma de decisiones en comportamientos dirigidos a un objetivo en particular (Nunez-Parra y col., 2020), en la prominencia motivacional (Lin & Nicolelis, 2008) y en la discriminación sensorial (Linster & Devore, 2012; Nunez-Parra y col., 2013). Este núcleo está compuesto por tres poblaciones de neuronas principales que liberan como neurotransmisor a acetilcolina (ACh), ácido γ -aminobutírico (GABA) o glutamato (Gritti y col., 1993; 2006) y que se encuentran en poblaciones separadas en esta región cerebral, como se ha demostrado al visualizar la expresión de marcadores como colinacetiltransferasa (ChAT), glutamato descarboxilasa-67 (GAD67) o el transportador vesicular de glutamato-2 (vGluT2), respectivamente para cada tipo neuronal (McKenna y col., 2020). Estas neuronas proyectan sus axones hacia diferentes regiones cerebrales, pero además poseen una compleja conectividad local, es decir, su actividad afecta a neuronas del mismo núcleo (Figura 1, A).

Las neuronas de proyección colinérgicas del BF son la fuente principal de ACh hacia las estructuras límbicas, el manto cortical y las áreas olfativas (Hur & Zaborszky, 2005; Böhm y col., 2020) (Figura 1, B). Se ha descrito que ACh potencia los comportamientos que se adaptan a los estímulos ambientales y disminuye las respuestas a los estímulos continuos que no requieren una acción inmediata (Picciotto y col., 2012). Además, la activación específica de neuronas colinérgicas del BF mejora la discriminación de estímulos visuales, mientras que la inhibición de estas neuronas tiene el efecto opuesto (Pinto y col., 2013). Por lo tanto, el sistema colinérgico del BF participa en el procesamiento sensorial. Incluso, alterar la transmisión colinérgica desde el BF afecta

procesos cognitivos como el aprendizaje, la atención y la memoria (Conner y col., 2003; Luchicchi y col., 2014).

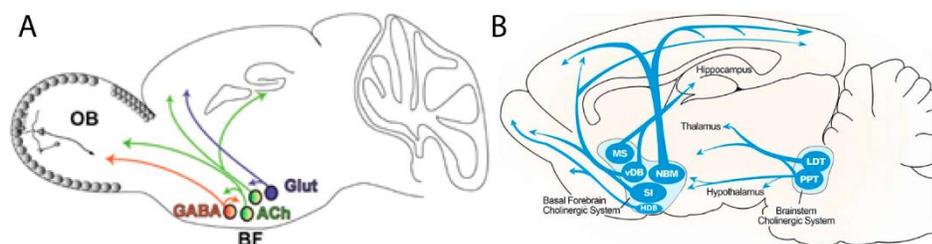


Figura 1. Cerebro basal anterior y sus proyecciones aferentes y eferentes. A) Proyecciones colinérgicas (ACh), GABAérgicas (GABA) y glutamatérgicas (Glut) eferentes del BF hacia diferentes regiones cerebrales corticales y hacia estructuras del sistema olfatorio. B) Proyecciones colinérgicas aferentes y eferentes del BF. Se incluye el septum medial (MS), el subnúcleo vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca (vDB y HDB), el núcleo basal de Meynert (NBM) y la sustancia innominada (SI). Estas regiones proyectan al hipocampo, al tálamo, al bulbo olfatorio y a regiones corticales. Las neuronas colinérgicas del ponto-mesencéfalo incluyen al núcleo tegmental laterodorsal (LDT) y tegmental pedunculopontino (PPT) y proyectan al cerebro posterior, al tálamo, al hipotálamo y al BF (Imagen tomada de Paul y col., 2015).

Por otro lado, la inhibición en la corteza cerebral se produce en términos generales por neuronas que liberan el neurotransmisor GABA y que también son fundamentales en la regulación de la actividad y el funcionamiento de la red (Giocomo & Hasselmo, 2007). En el BF existe una población abundante de neuronas GABAérgicas que proyectan hacia gran parte de la corteza cerebral, particularmente hacia la olfatoria, visceral y límbica, y también hacia el diencefalo y al tronco encefálico (Zaborszky y col., 1986; Gritti y col., 1993; Sarter & Bruno, 2002). Las neuronas GABAérgicas que proyectan hacia la corteza cerebral son cruciales para la activación cortical y se concentran en diferentes sectores de cada región, son de menor tamaño y dos veces más numerosas que las neuronas colinérgicas en el BF, aunque varían en los diferentes subgrupos celulares (Gritti y col., 1993). Estas neuronas corresponden a interneuronas locales o neuronas de proyección

que inervan de forma paralela a la inervación colinérgica a las regiones corticales. Las vías eferentes GABAérgicas pueden actuar sinérgicamente con las señales eferentes colinérgicas para facilitar la activación cortical mediante desinhibición o actuando antagónicamente a la influencia colinérgica (Freund & Meskenaite, 1992).

Por otro lado, la población de neuronas glutamatérgicas del BF posee proyecciones que alcanzan áreas cerebrales fundamentales en la regulación del estado de alerta y vigilancia, incluyendo la corteza frontal y regiones del cerebro anterior (Hur & Zaborszky, 2005; Henny & Jones, 2006; Brown y col., 2012; Do y col., 2016; Agostinelli y col., 2019). Además, estas neuronas proyectan al área tegmental ventral, al hipotálamo lateral y a la habénula lateral, un área estrechamente relacionada con las predicciones de recompensa negativa y comportamientos aversivos (Tian & Uchida, 2015; Lazaridis y col., 2019). Incluso, la estimulación selectiva de neuronas glutamatérgicas del BF en ratones en libre movimiento cuando ingresan a un compartimento, reflejó un comportamiento aversivo a este espacio, con una baja permanencia en ese lugar con respecto a otro compartimento en que no se estimulaba esta población neuronal y donde no se observó una conducta aversiva (McKenna y col., 2020).

Relación entre la neuromodulación en el BF y la percepción olfatoria

El sentido del olfato es una de las modalidades sensoriales que permite a los seres vivos censar las señales generadas por estímulos del ambiente que son relevantes según el contexto, dando la capacidad al organismo de realizar comportamientos fundamentales como la identificación de depredadores, localizar alimento, comportamientos asociados a la crianza, entre otros. En roedores, el olfato se encuentra bastante desarrollado, por lo que se considera un modelo ideal para estudiar este sistema en el contexto de la actividad neuronal asociada al comportamiento (Sanchez-Andrade & Kendrick, 2009).

La percepción olfatoria es un proceso dinámico que se inicia cuando moléculas de odorante, que pueden ser un compuesto monomolecular o una mezcla de compuestos, ingresan en las fosas nasales a través del aire inhalado. Cada odorante es reconocido por receptores olfatorios (OR) ubicados en los cilios apicales de las neuronas sensitivas olfatorias (OSN), localizadas en el epitelio olfatorio (OE) y que expresan sólo un tipo de OR (Mombaerts, 2006; Imai & Sakano, 2007; Zou y col., 2009) (Figura 2). El reconocimiento de odorantes se produce a través de un código combinatorial en que un olor determinado activa múltiples ORs, y cada OR responde a múltiples odorantes (Malnic y col., 1999). Las OSN proyectan su axón hacia el sistema nervioso central, específicamente a la capa glomerular del bulbo olfatorio (MOB) en el cerebro, donde ocurre la primera sinapsis excitatoria con la dendrita de las neuronas mitrales (MC), en una unidad funcional denominada glomérulo, donde convergen neuronas que expresan un mismo tipo de receptor (Sakano, 2010). De esta manera, los diferentes estímulos olfatorios recibidos en el OE producen combinaciones únicas de glomérulos activados de manera distribuida a través de un determinado engrama de neuronas activadas en diferentes magnitudes. El MOB transforma las señales entrantes, realizando operaciones que incluyen normalización de la actividad, mejora de contraste y regulación de la razón señal/ruido antes transmitir estas señales a estructuras olfatorias secundarias (Cleland & Linstner, 2005; Cleland & Sethupathy, 2006; de Almeida y col., 2013; Li y col., 2020). Además, la actividad de interneuronas inhibitorias GABAérgicas de la capa glomerular del MOB, que incluyen a las neuronas periglomerulares (PG) y las neuronas externas en penacho (ET), forman redes complejas que permiten este procesamiento de las señales entrantes (Escanilla y col., 2010). Las MC interactúan con otro tipo de interneuronas inhibitorias llamadas neuronas granulares (GC), que son el tipo neuronal inhibitorio más abundante en el MOB y proporcionan retroalimentación a la

red mediante sinapsis dendrodendrítica con las MC (Escanilla y col., 2010). Se plantea que la capa granular estaría involucrada en la creación de ritmos oscilatorios del bulbo olfatorio y la generación de patrones sincronizados de activación (Linster & Devore, 2012). De esta manera, esta conversión de estímulos de odorantes a un mapa de activación olfatoria de dos dimensiones permite al cerebro de mamíferos detectar y discriminar una gran variedad de olores (Mori y col., 2006).

Las MC proyectan su axón directamente a la corteza olfatoria, específicamente a la corteza piriforme (PC), donde hacen sinapsis con las neuronas piramidales (Pyr), sin proyectar al tálamo como ocurre con otras modalidades sensoriales tales como la visión o la audición (Kay & Sherman, 2007). En la corteza olfatoria es donde se produce la integración de las señales generadas por los estímulos olfatorios provenientes del medio externo. Al existir sólo dos sinapsis entre el exterior y la corteza, el sistema olfatorio se considera un modelo ideal para estudiar circuitería y conectividad neuronal en el contexto del procesamiento sensorial, que se ve reflejado en el comportamiento del individuo.

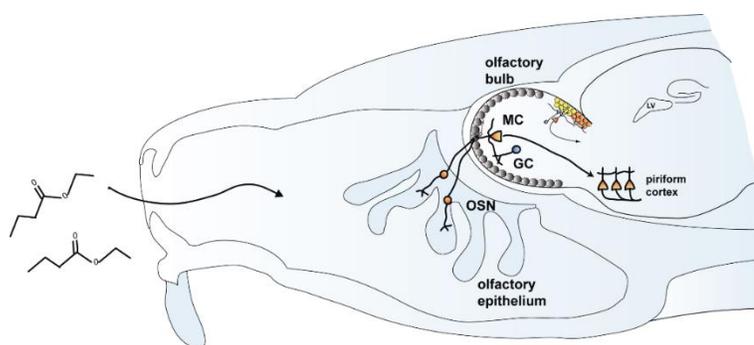


Figura 2. Esquema simplificado del sistema olfatorio. Las neuronas sensitivas olfatorias (OSN) en el epitelio olfatorio proyectan su axón a la capa glomerular del bulbo olfatorio (MOB), donde hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas mitrales (MC). Estas últimas proyectan su axón hacia la corteza olfatoria, específicamente a la corteza piriforme, donde hacen sinapsis con las neuronas piramidales (Pyr) (Imagen de ANP Lab).

El sistema olfatorio, principalmente la capa glomerular y granular del MOB y también la PC, reciben extensas proyecciones colinérgicas únicamente desde el BF, específicamente desde el subnúcleo horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB) (Luskin & Price, 1982; Zaborszky, 1986) (Figura 3). Por otro lado, la PC proyecta axones hacia el BF y axones de regreso hacia el MOB, llamadas proyecciones de retroalimentación, que permiten una modulación de la información perceptual.

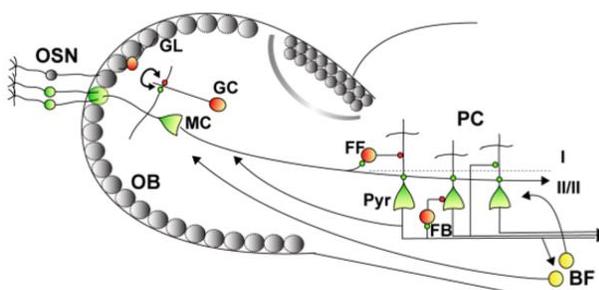


Figura 3. El sistema olfatorio recibe proyecciones colinérgicas del cerebro basal anterior. Neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (BF) proyectan sus axones a la corteza piriforme (PC) y al bulbo olfatorio (MOB). A su vez, el BF recibe proyecciones desde la PC. En la PC, las señales provenientes del MOB activan a las neuronas inhibitorias (FF) y a dendritas de las neuronas piramidales (Pyr) en la capa I de la PC. Los somas de Pyr se ubican en las capas II/III de la PC y al activarse, activan otra población de neuronas inhibitorias (FB). Las Pyr poseen fibras asociativas entre ellas en la capa I de la PC (Imagen de ANP Lab).

La neuromodulación de la red olfatoria mediante ACh es esencial para el aprendizaje olfatorio y la memoria, en los diferentes niveles del procesamiento de las señales generadas por estímulos olfatorios, teniendo un rol importante en la regulación de la excitabilidad neuronal, la sincronización, la actividad oscilatoria, es decir, las fluctuaciones rítmicas, y la densidad de activación de la red neuronal (Linster & Devore, 2012). Esto conduce a una reducción de los umbrales sensoriales, un refinamiento de los campos receptivos mediante la agudización de la relación señal/ruido y mayor

plasticidad de la red. Además, se ha observado que la liberación de ACh en el bulbo olfatorio aumenta la capacidad de discriminar estímulos olfatorios, involucrando un aumento de la atención del individuo (Ogg y col., 2018). También, al activar fibras colinérgicas del HDB en animales anestesiados, se genera una mayor excitación de las MC (Ma & Luo, 2012; Böhm y col., 2020). Por lo tanto, la población neuronal colinérgica del BF podría permitir filtrar la información sensorial, disminuyendo la actividad neuronal por estímulos basales o no relevantes y aumentando la actividad en respuesta a señales generadas por estímulos relevantes, según el estado fisiológico del animal.

Por otro lado, existe una inervación extensa de fibras GABAérgicas en el HDB que se dirigen principalmente a la capa granular en el MOB (Gracia y col., 2010). La excitabilidad de las PG y GC en el MOB desempeñan un rol fundamental en el procesamiento olfatorio. Estas interneuronas son reguladas por señales locales y de proyección, siendo relevantes en la discriminación de odorantes, ya que mantienen el equilibrio de excitación-inhibición en la red neuronal que es necesario para el procesamiento sensorial (Nunez-Parra y col., 2013). Las fibras GABAérgicas del BF en el MOB probablemente aumentan la relación señal/ruido de las MC al inhibir señales entrantes débiles y aumentar la actividad en respuesta a señales más robustas, siendo fundamental en los procesos atencionales (Böhm y col., 2020).

Optogenética como herramienta para modificar la actividad neuronal

Las técnicas para estudiar activación/inhibición de neuronas, tales como estimulación eléctrica, compuestos farmacológicos o métodos genéticos, afectan simultáneamente células vecinas y otros procesos además de la población en particular que se desea estudiar. Además, estos métodos tienen una cinética lenta del orden de segundos o minutos, comparada con la activación neuronal que es del orden de milisegundos. Por

otro lado, estos métodos muchas veces poseen una reversibilidad baja hacia las condiciones fisiológicas basales.

La optogenética es una técnica relativamente nueva utilizada desde aproximadamente el año 2005 (Boyden y col., 2005) en que, combinando herramientas ópticas y de biología molecular, es posible modular la actividad de poblaciones neuronales en particular, ya sea neuronas con capacidades excitatorias y/o inhibitorias dentro del cerebro (Williams & Deisseroth, 2013). De esta manera, al perturbar selectivamente neuronas de manera muy precisa espacial y temporalmente, en escala de milisegundos y con alta reversibilidad hacia las condiciones fisiológicas basales, es posible estudiar la dinámica y plasticidad de la red neuronal de la que forman parte, evidenciando el impacto de esta modulación en el comportamiento del individuo (Deisseroth, 2010).

Existe una diversa familia de proteínas de membrana o canales llamadas opsinas, que reaccionan a la luz transportando iones a través de la membrana celular. Estas proteínas provienen de microorganismos como las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* en el caso de la canalrodopsina-1 (ChR-1) (Nagel y col., 2002) y canalrodopsina-2 (ChR-2) (Boyden y col., 2005; Zhang y col., 2006), de *Volvox carteri* en el caso de la canalrodopsina-1 VChR-1 (Zhang y col., 2008) y de la arquea *Natronomonas pharaonis* en el caso de la halorodopsina NpHR (Zhang y col., 2007). Además, existen otras rodopsinas sintéticas llamadas OptoXR en que los bucles o loops intracelulares de la rodopsina bovina se reemplazaron por los loops intracelulares de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

Las propiedades de cada opsina son diferentes. Por ejemplo, ChR-2 es activada óptimamente por luz azul a 470nm, mientras que VChR-1 es sensible a la luz en gran medida a 535 (luz azul) y 589nm (luz amarilla), longitud de onda en que ChR-2 es muy

poco sensible (Figura 4, A y B). Además, ChR-2 tiene una constante de tiempo de desactivación de aproximadamente 12ms, mientras que la de VChR-2 es de 120ms aproximadamente (Boyden y col., 2005). Por otro lado, ChR-1 es un canal de protones y ChR-2 es un canal que permite el ingreso de cationes, al igual que VChR-1 (Boyden y col., 2005), es decir, generan corrientes de entrada en la célula en que se expresan. Por lo tanto, al expresarse en neuronas permiten la depolarización de éstas. En cambio, la halorodopsina NpHR consiste en una bomba de cloruro que se activa con luz amarilla a 589nm permitiendo el movimiento de iones cloruro a través de la membrana (Zhang y col., 2007), es decir, genera corrientes de entrada o de salida en la célula, según la diferencia de concentración de iones cloruro en el medio extracelular con respecto al medio intracelular. En el caso de las opsinas OptoXR, la luz verde a 505nm conduce de manera óptima a la activación precisa de la señalización río-abajo de vías de señalización (Airan y col., 2009) (Figura A, B). La gran variedad de opsinas disponibles junto con sus diferentes longitudes de onda óptimas de activación, permiten utilizar sistemas de modulación neuronal de más de un tipo de población mediante la activación de más de una opsina en el mismo tejido cerebral. Todas las opsinas utilizan trans-retinal como cromóforo, que absorbe energía y se excita a cierta longitud de onda, y que se encuentra en el tejido cerebral de mamíferos. Esto hace que las herramientas de optogenética sean funcionales en estos organismos sin la necesidad de adicionar cofactores (Zhang y col., 2007).

Además, la ingeniería molecular ha permitido alterar propiedades de las opsinas como espectros de excitación, conductancia o cinética. Por ejemplo, la mutación puntual H134R en ChR-2, que corresponde a D96 en bacteria y que es un residuo crucial para

el ingreso de protones (Butt y col., 1989), resultó en un aumento de 2 a 3 veces en las fotocorrientes (Nagel y col., 2005) (Ver Anexo, Tabla 1).

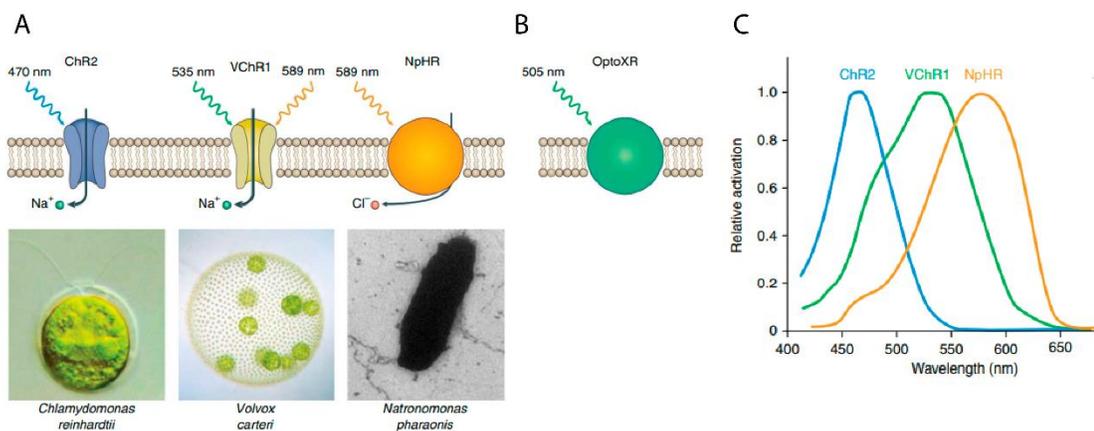


Figura 4. Opsinas como herramientas de optogenética. a) Opsinas provenientes de microorganismos que naturalmente se activan con la luz. Se indica la longitud de onda a la que se obtiene una activación óptima para cada opsina. b) Rodopsina sintética para el control óptico en la señalización intracelular mediante proteínas G. c) Espectro de acción de las diferentes opsinas. (Imagen tomada de Zhang y col., 2010).

Para poder expresar opsinas en determinadas poblaciones neuronales existen diferentes estrategias genéticas. Los genes de distintas opsinas pueden expresarse de manera selectiva o no selectiva utilizando vectores virales. Se han utilizado principalmente lentivirus y virus adeno-asociados (AAV) para contener el gen de la opsina de interés y ser expresada en modelos experimentales mamíferos desde roedores hasta primates (Zhang y col., 2010). Los AAV más comunes utilizados expresan la opsina bajo un promotor ubicuo o presente en todos los tipos neuronales. Sin embargo, también se han empleado AAV que expresan la opsina bajo un promotor específico de un tipo neuronal y con ello permiten la expresión selectiva de la opsina en una determinada población neuronal. Sumado a esto, los lentivirus y AAV contienen en

su secuencia un gen que expresa un marcador fluorescente, de forma que la opsina se expresará fusionada a un reportero (Dittgen y col., 2004).

Una de las finalidades de la optogenética ha sido determinar la circuitería neuronal de una región cerebral. Las neuronas expresan la opsina fusionada al reportero en sus somas. Sin embargo, luego de unas 4 a 6 semanas, dependiendo del vector viral usado, la opsina se expresa en dendritas y terminales axónicos. El marcador fluorescente permite posteriormente determinar las proyecciones de las neuronas infectadas hacia otras regiones del cerebro (Zincarelli y col., 2008).

Además del estudio de la fisiología del cerebro a nivel celular y tisular, el uso de la optogenética ha sido una metodología esencial para la neurociencia contemporánea al permitir el estudio de la modulación de la actividad neuronal *in vivo* mientras se estudia el comportamiento de un individuo. A través de la construcción de fibras ópticas implantables es posible controlar de forma precisa la activación o inhibición de una población neuronal determinada (Zhang y col., 2010). Las fibras ópticas son insertadas permanentemente en el tejido cerebral y fijadas al cráneo, asegurando que en cada sesión experimental es la misma región cerebral la que es estimulada (Sparta y col., 2012). De esta manera, es posible transmitir luz proveniente de un láser o diodo emisor de luz (LED) al cerebro del animal por varias sesiones de entrenamiento conductual.

Modulación de la actividad neuronal del BF y sus efectos en el procesamiento de la información olfatoria in vivo en animales despiertos

A pesar de que se conoce el rol de ACh, GABA y glutamato en el BF en ámbitos conductuales como la atención o la memoria (Ver secciones anteriores), su rol fisiológico en el procesamiento de la información olfatoria en animales despiertos en libre movimiento aún permanece poco explorado. Además, poco se ha descrito sobre el

impacto en la dinámica neuronal por la activación de las proyecciones colinérgicas del BF a la PC y al MOB en experimentos conductuales, específicamente en el aprendizaje y la capacidad de discriminar estímulos olfatorios. Aunque las fibras colinérgicas y GABAérgicas del HDB son las únicas fuentes de ACh y GABA en el sistema olfatorio, existen escasos estudios acerca de cómo la modulación de estas proyecciones afecta la capacidad de discriminar odorantes incluso en animales anestesiados.

Por otro lado, se ha descrito que la actividad de las redes neuronales es diferente dependiendo del estado del individuo. Por ejemplo, los animales anestesiados no aumentan su frecuencia de olfateo durante la exposición a un estímulo de odorante. En animales despiertos, este aumento modula las señales sensoriales entrantes y la codificación de éstas, reflejándose en cambios en la dinámica espaciotemporal de las MC (Rinberg & Gelperin, 2006; Wachowiak, 2011, Blauvelt y col., 2013). Además, las MC modifican su respuesta cuando un odorante se entrega pasivamente o el animal discrimina activamente entre estímulos, por lo que la respuesta a un odorante puede cambiar con el aprendizaje asociado a una recompensa (Fuentes y col., 2008). Por lo tanto, los estudios sobre codificación de la información olfatoria y su modulación idealmente deben realizarse empleando animales despiertos, ya que la percepción e integración de la información sensorial es modulada según el estado del animal.

A partir de lo anterior, este estudio se enfocó en determinar el rol fisiológico del BF, particularmente del subnúcleo horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB), y su impacto en la dinámica neuronal del procesamiento de la información olfatoria para discriminar estímulos, empleando para ello animales en libre movimiento.

Hipótesis

Activar neuronas del HDB facilita la discriminación olfatoria de mezclas complejas de odorantes en ratones.

Objetivo general

Estudiar el rol de la activación neuronal del HDB en la discriminación de mezclas complejas de odorantes en ratones.

Objetivos específicos

1. Titular la expresión viral de canalrodopsina-2 (ChR-2) en neuronas del HDB de ratones C57BL/6J.
2. Fabricar implantes de fibras ópticas e implantarlos de manera estereotáxica en el HDB de ratones que expresan ChR-2 en dicha región.
3. Verificar la correcta expresión de ChR-2 y el correcto posicionamiento de la fibra óptica en el HDB de cada animal.
4. Evaluar la capacidad de discriminación olfatoria de mezclas complejas de odorantes en ratones en una prueba go/no-go al activar neuronas del HDB.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Se utilizó un total de 3 ratones hembra y 7 ratones macho wild-type C57BL/6J (Jackson Laboratory, USA), desde 8 semanas hasta 5-6 meses de edad. Se asignó a las hembras exclusivamente para la titulación viral y a los machos para los experimentos conductuales, ya que los cambios hormonales debidos al ciclo estral de la hembra influyen en el comportamiento (Guttman y col., 1975). Se mantuvieron a todos los animales en un ciclo de luz: oscuridad de 12 horas (08:00am: 08:00pm) a 22-28°C, provistos de comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo al protocolo evaluado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

2. Virus

Se utilizó el virus adeno-asociado AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-m-Cherry (UNC Vector Core, USA) para expresar en neuronas la proteína de membrana ChR-2 fusionada al reportero m-Cherry, bajo el promotor de sinapsina I humana, que es un promotor neuronal en general (Nieuwenhuis y col., 2020). Como control, se utilizó el virus adeno-asociado AAV5-hSyn-EYFP (UNC Vector Core, USA), que expresa en neuronas el reportero EYFP bajo el mismo promotor. Se inyectaron estos virus en los ratones C57BL/6J a las 8 semanas de vida aproximadamente.

3. Cirugía estereotáxica de titulación viral

Se colocó a cada ratón hembra (18-28g) en una cámara cerrada de 15x10x10cm y se indujo anestesia por vía inhalatoria con 0,5mL de isoflurano líquido (Forene®). Se anestesió a cada animal mediante la inyección de una mezcla de ketamina (100mg/kg) y xilacina (10mg/kg) por vía intraperitoneal. Tras 10 minutos de espera, se comprobó la

ausencia de reflejos presionando las patas y cola con una pinza, y se colocó al animal en el aparato estereotáxico (RWD Life Science, Modelo E37018-006, China), para fijar el cráneo. Se acopló al aparato un nanoinyector para colocar una jeringa Hamilton y el respectivo controlador de flujo (UMP3 y MICRO2T SMARTouch, USA), para realizar las inyecciones virales de manera precisa. Se limpió la cabeza del animal con un hisopo con etanol, otro con clorhexidina y se inyectaron 100 μ L de lidocaína en la cabeza, de forma subcutánea. Al transcurrir 5 minutos, se expuso el cráneo mediante un corte con bisturí en la línea media vertical de la cabeza, con ayuda de tijeras quirúrgicas. Además, se desplazaron hacia los extremos las membranas que se encuentran sobre el cráneo utilizando un hisopo con peróxido de hidrógeno. Se ubicaron bregma y lambda en el cráneo con ayuda de un estereomicroscopio, verificando que ambos puntos estén en el mismo plano dorsoventral ($\pm 0,2$ mm). Fijando bregma como origen en los ejes x,y,z, se realizó una craneotomía con un microtaladro en la coordenada de inyección, que correspondió a la ubicación estereotáxica del HDB: anteroposterior 0.02mm, medial-lateral $\pm 1,65$ mm (dependiendo si la inyección fue unilateral o bilateral) y dorsoventral -4,80mm.

Para la titulación viral, se realizaron inyecciones de diferentes volúmenes (Zhang y col., 2010): 1000, 500, 250 y 100nL de AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-m-Cherry, a una velocidad de inyección de 100nL/min. El descenso de la jeringa hacia la zona de interés fue lento (0,5mm/min) para disminuir el daño tisular. Al llegar a la coordenada estereotáxica, se esperó 10min antes y después de inyectar el virus. Tras extraer la jeringa lentamente (0,5mm/min), se procedió a suturar la cabeza y se retiró al animal del aparato estereotáxico. Se inyectaron de modo intraperitoneal 200 μ L de suero estéril, se dio una dosis subcutánea de carprofeno (5mg/kg) y se colocó al ratón sobre una manta

térmica, verificando sus reflejos. Los cuidados postoperatorios consistieron en anestesiarse al animal con isoflurano de manera inhalatoria e inyectar de forma subcutánea la misma dosis de carprofeno los próximos 2 días cada 24h.

4. Verificación del sitio de inyección viral

4.1 Perfusión intracardiaca y obtención de muestras

Tras 14 días de la cirugía de inyección viral, se indujo anestesia en cada ratón con 1,5mL de isoflurano por vía inhalatoria y se perfundió de manera intracardiaca a un flujo de 3mL/min, utilizando 20-30mL de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,0), seguido por 25mL de paraformaldehído (PFA) al 4% v/v disuelto en PBS. Se removió el cerebro y se post-fijó por 24h en PFA al 4% v/v disuelto en PBS. Se deshidrató la muestra por 2-3 días en una solución de PBS conteniendo 30% de sacarosa, hasta que sedimentó. El cerebro se congeló a -80°C con un compuesto preservante (Optimal Cutting Temperature, OCT) y se obtuvieron secciones coronales de 40µm de espesor usando un criostato. Se recolectaron 2mm de cortes en el eje anteroposterior, desde -1,70mm a 1.70mm desde bregma, según las coordenadas determinadas por Paxinos & Franklin (2004). Se almacenaron los cortes a 4°C en 4mL de PBS con 5µL de azida de sodio al 2%.

4.2 Histología y fluorescencia

Se montó en un portaobjetos (Superfrost Plus Microscope Slides, ThermoFisher, USA) un corte de cerebro recolectado cada 120µm, realizando el procedimiento en oscuridad para evitar el fotoblanqueamiento de las muestras. Los portaobjetos con los cortes se sumergieron en una solución de Triton X-100 0,1% v/v en PBS para permeabilizar las membranas celulares. Los núcleos celulares se marcaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,001mg/mL), utilizando Fluoromount como medio de montaje. Se colocó un cubreobjetos sobre las muestras y se selló por los bordes.

Se visualizaron todas las muestras montadas al microscopio confocal (LSM 710, Zeiss, Alemania), es decir, 15-20 secciones por cada cerebro, mediante dos láseres con distinto espectro de emisión; uno para alcanzar el espectro de excitación de DAPI: excitación 320-390nm y emisión: 420-540nm (Bestvater y col., 2002); y el filtro de fluorescencia de Rodamina para alcanzar el espectro de excitación de m-Cherry: excitación 520-590nm y emisión 578-696nm (Shaner y col., 2004). De una de las muestras de interés, se realizó una reconstrucción obteniendo imágenes al recorrer el corte de cerebro en el mismo plano con el objetivo de 10x. De la misma manera, pero con el objetivo de 20x, se reconstruyó la zona de mayor infección viral tomando imágenes de 15 distintos planos del eje z (Z-stack) para cada sector de la sección. Estas imágenes fueron comprimidas en una sola en un plano usando la función “Z Project” del paquete de procesamiento de imágenes Fiji, del software ImageJ (Schindelin & col., 2012). Se tomó una imagen aumentada en 1,5x de una población neuronal dentro de la zona de mayor infección viral, utilizando el objetivo de 40x. Las reconstrucciones se elaboraron mediante Adobe® Photoshop para Windows (Versión 20.0.0, www.adobe.com), colocando cada imagen adyacente a la siguiente. Se utilizó el software ImageJ para ajustar el brillo y el contraste cuando fue necesario y para determinar la magnitud de la difusión radial del AAV en cada reconstrucción, mediante la herramienta “Set scale” y “ROI Manager”.

5. Fabricación del implante de fibra óptica

Se cortaron 4cm aproximados de fibra óptica multimodo de apertura numérica 0,22, 105µm de diámetro del centro y rango de longitud de onda 400-2400nm (FG050LGA, ThorLabs, USA). Se expuso 1cm del centro de la fibra en un extremo usando una herramienta destinada a ello (Fiber Stripping Tool T06S13, ThorLabs). En ese lado, se insertó una férula cerámica de 1,25 mm de diámetro (MM-FER2007C, Precision Fiber

Products, USA), con el lado convexo hacia el extremo de la fibra, y se aseguró con una delgada capa de resina epóxica por ambos extremos de la férula. Tras dejar secar toda la noche, se cortó el exceso de fibra óptica del lado de la férula utilizando un cortador de vidrios (Ruby Fiber Scribe S90R, ThorLabs) bajo la lupa. Se colocó el extremo cortado de la fibra en un disco de pulido sobre una lija de $6\mu\text{m}$ con agua, en una superficie de vidrio. Ejerciendo presión con un alicate, se realizaron 100 veces movimientos con forma de 8 (Figura 5).

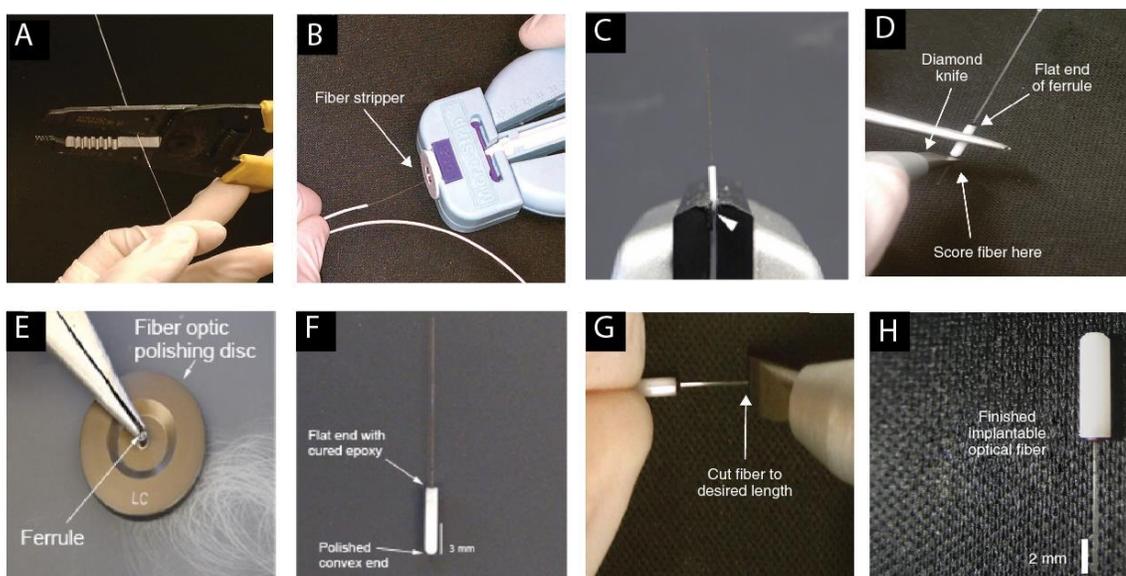


Figura 5. Fabricación de implante de fibra óptica. A) Se cortaron 4cm de fibra óptica. B) El centro de la fibra se expuso en uno de los extremos (se utilizó una fibra sin cubierta de plástico, pero el procedimiento que se muestra es el mismo). C) Se insertó la fibra en la férula con el lado convexo hacia el extremo expuesto de la fibra. Se aseguró la unión colocando resina epóxica a ambos lados de la férula. D) El exceso de fibra se cortó en el lado convexo de la férula. E) La fibra se pulió insertándola en un disco de pulido, utilizando lijas cada vez más finas. F) Fibra pulida. G) La fibra se marcó y se cortó del largo adecuado para ser implantada en el cerebro del roedor. H) Cánula terminada. No se muestra el conector metálico que se adhiere al implante posteriormente (Modificado de Sparta y col., 2012; Ung & Arenkiel, 2012; Zhang y col., 2010).

Se limpió la fibra con metanol y se verificó la integridad de ésta con un inspeccionador de fibra óptica (Fiber Inspection Scope FS201, ThorLabs). Se repitió el mismo procedimiento de pulido con una lija de $1\mu\text{m}$ por 100 veces y se examinó la fibra nuevamente al finalizar. Se realizó una limpieza final con etanol al 99% y se inspeccionó la fibra por tercera vez para verificar la integridad de la superficie del centro. La fibra óptica se adhirió con resina epóxica a un conector metálico (Cannula Implant Guide OGL, ThorLabs) para dar más estabilidad a la cánula o implante al ser insertado en el cerebro. Se dejó secar toda la noche. Se cortó bajo la lupa el extremo sin férula de la fibra usando el micro-alcate, obteniendo una fibra de una longitud adecuada para que, al implantar la cánula en el sitio de interés en el cerebro del roedor, ésta quede apoyada en la superficie del cráneo (5,80mm de largo sin considerar la férula). Se limpió la fibra con etanol al 99% para el acabado final.

6. Medición de irradiancia de la fibra óptica

Se midió la irradiancia o potencia con la que incide la luz de la punta de la fibra óptica en una unidad de superficie (mW/mm^2). Para ello, se conectó la cánula a través de un interconector (Ceramic Mating Sleeve ADAL1, ThorLabs) a otra fibra óptica larga de acople. A su vez, se conectó esta fibra larga al LED con su respectiva fuente de poder (PlexBright 465nm Blue; LED Driver LD-1, PLEXON, USA) a través de un adaptador FC-FC. Se utilizó un generador de pulsos (Pulse Stimulator Model 2100 A-M System, USA) para producir la señal que recibe el LED para encenderse. Para compensar la pérdida de la señal debida a las conexiones entre instrumentos, se determinó la potencia en la punta de cada fibra óptica conectada a los equipos que incluye el sistema. Se registró la potencia de salida utilizando un medidor de potencia luminosa (Fiber Optic Power Meter

PM20A, ThorLabs) ajustado a 465nm, que corresponde a la longitud de onda de la luz azul del LED (Figura 6).

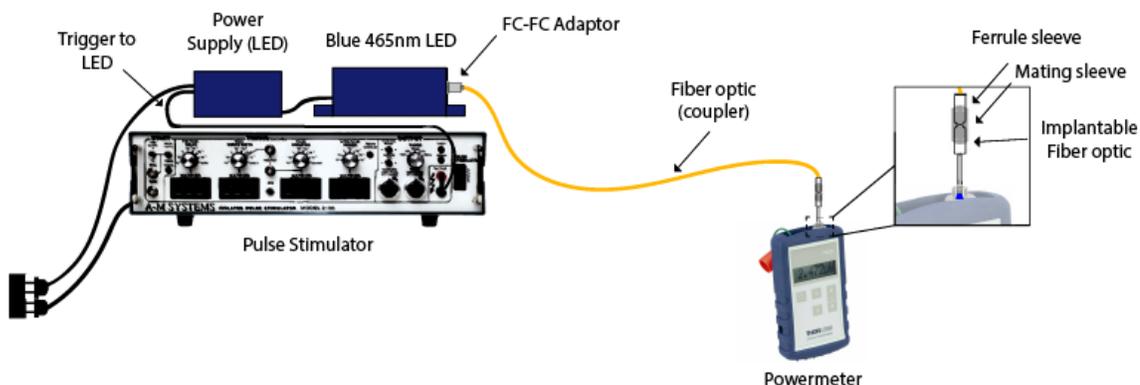


Figura 6. Medición de irradiancia de la fibra óptica. Se esquematizan las conexiones descritas anteriormente para permitir la transmisión de la luz desde el LED conectado a su fuente de poder. El LED se conectó mediante un adaptador metálico FC-FC a una fibra óptica de acople. A su vez, la fibra de acople se conectó mediante un interconector (Mating sleeve, representado en gris) a la fibra óptica implantable. El medidor de potencia luminosa registra la potencia en la punta de la fibra óptica. El generador de pulsos entrega la señal al LED para encenderse.

El generador de pulsos se ajustó para producir un tren de 60 pulsos con una duración de 15ms cada uno, a 20Hz por 3s. Estos parámetros corresponden al protocolo de fotoestimulación para realizar los entrenamientos conductuales (Figura 7).

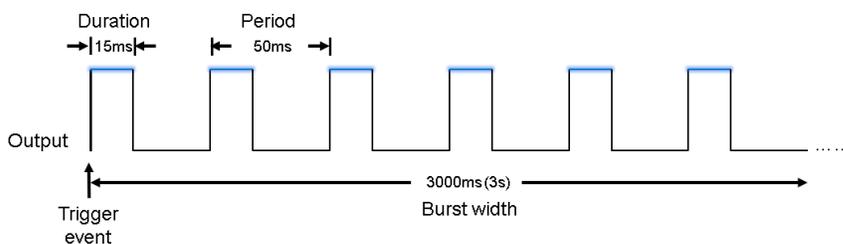


Figura 7. Protocolo de fotoestimulación. Se esquematiza un tren de 60 pulsos de duración 15ms, a 20Hz (período 50ms), en una ventana temporal de 3s. Se representan en azul los pulsos de 465nm dados por el LED. La generación del pulso luego de que se gatilla la señal es inmediata (delay 0 ms).

Para disminuir la atenuación de potencia al unir mediante el interconector la cánula a la fibra óptica larga, se agregó en el interconector un compuesto de acoplamiento óptico cristalino similar a un gel (Index Matching Gel G608N3, ThorLabs). La luz emitida en la punta de la fibra óptica debe generar un círculo de luz concéntrico y homogéneo y se debe obtener >70% de la potencia de la fibra óptica de acople, asegurando que la fibra y las conexiones están en buen estado. Si la emisión de la luz no posee estas características, la fibra óptica no es viable y debe ser descartada (Figura 8).

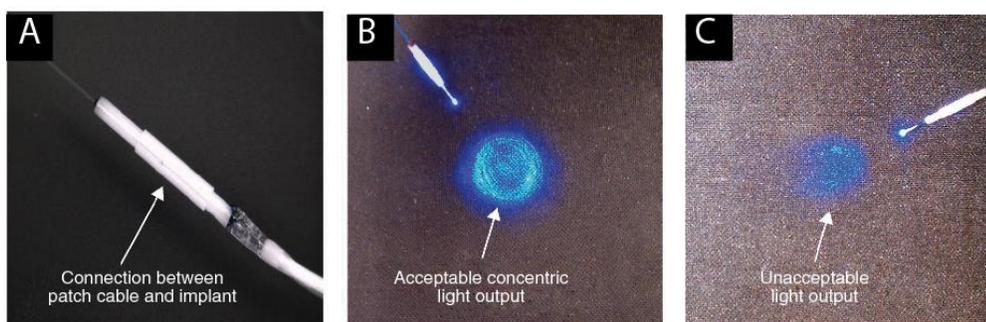


Figura 8. Transmisión de luz de la fibra óptica. A) Fibra óptica implantable conectada a la fibra óptica de acople. B) Transmisión de luz a través de la fibra óptica que es uniforme y concéntrica. C) Transmisión de luz no concéntrica (Imagen tomada de Sparta y col., 2012).

7. Cirugía estereotáxica de inyección viral e implante de fibra óptica

Como fue descrito en estudios previos (Sparta y col., 2012), se realizó en una sola intervención quirúrgica el procedimiento de inyección viral, detallado anteriormente, y la inserción del implante de fibra óptica. En este caso, empleando solamente ratones macho, se inyectaron unilateralmente (hemisferio izquierdo) 250nL del virus correspondiente: AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-m-Cherry (n=5) o AAV5-hSyn-EYFP (n=2). Se utilizaron las coordenadas estereotáxicas exactas correspondientes al centro de la ubicación del HDB (Paxinos & Franklin, 2004): anteroposterior 0.02mm, medial-lateral $\pm 1,44$ mm y dorsoventral -5,12mm. Luego de inyectar el virus y extraer lentamente

la jeringa, se colocó el soporte estereotáxico para fibras ópticas implantables (Stereotaxic Cannula Holder XCL, ThorLabs) y se insertó la fibra previamente esterilizada con etanol en este adaptador. Se marcó el origen en los ejes x,y,z en bregma con la punta de la fibra óptica. Ésta se posicionó en las mismas coordenadas estereotáxicas de la inyección viral en el hemisferio izquierdo del cráneo. Se agregó una gota de suero estéril sobre el orificio del cráneo (Sparta y col., 2012), y se descendió lentamente (2mm/min) el adaptador estereotáxico que sujeta la fibra óptica hasta llegar a la coordenada exacta en que se inyectó el virus. Se aplicó una capa de cemento de fijación de ionómero de vidrio (Luting & Lining Cement, GC, Japón), preparado con 1 cucharada de polvo y 2 gotas de solvente, por toda la parte superior del cráneo y la parte inferior del interconector metálico, para asegurar un anclaje adecuado. Se dejó secar por 10 minutos. Sobre esta capa de cemento, se agregó una mezcla de monómero y solvente de resina acrílica autopolimerizable (Acrílico rápido Marché, Chile), cubriendo el cráneo y la cánula hasta la parte superior del interconector metálico, dejando al menos 4-5mm del extremo superior de la férula libre. Tras 10 minutos de espera, se aflojó y extrajo el soporte del implante de la fibra óptica y se retiró al animal del aparato estereotáxico. Se inyectaron 200µL de suero estéril por vía intraperitoneal y carprofeno de manera subcutánea; se llevaron a cabo los cuidados postoperatorios mencionados anteriormente.

8. Entrenamiento conductual go/no-go

Transcurridas 6 semanas desde la cirugía de inyección viral e implante de la fibra, se privó de agua a cada ratón por 48h, como indica el procedimiento descrito en estudios anteriores para lograr que el animal se encuentre motivado para realizar las pruebas (Clevenger & Restrepo, 2006; Berditchevskaia y col., 2016). Durante los experimentos

conductuales, se restringió la ingesta de agua por 14-21 días aproximadamente. Se monitoreó el peso de cada roedor diariamente antes de realizar la prueba correspondiente y se le entregó un volumen restante de agua en una placa de Petri hasta llegar a 1-1,5mL, según el peso del animal, al finalizar la sesión. Se mantuvo un 80-85% aproximado del peso inicial del roedor antes de la deprivación (Chu y col., 2017). Se llevaron a cabo los experimentos en la etapa de luz del ciclo, en una habitación iluminada a una temperatura aproximada de 25°C. Luego de finalizar las sesiones de entrenamiento, los ratones pasaron al menos 2 semanas con agua *ad libitum* antes de volver a ser deprivados.

Se entrenó a los animales una vez al día, utilizando un olfactómetro de multietapas con 8 canales similar al descrito en la literatura, utilizando los mismos procedimientos de condicionamiento operante detallados por Bodyak & Slotnick (1999), para evaluar la detección y discriminación de odorantes en ratones. El equipo funciona de manera automatizada a través de códigos de programación escritos en MatLab, entregando una dilución de aire controlada y permitiendo un suministro preciso de una concentración conocida del odorante.

El flujo de aire del odorante (50mL/min) se mezcla con un flujo de aire limpio (1950mL/min), por lo que la concentración de odorante corresponde a un 2,5% de la concentración por encima del líquido del vial que lo contiene (Slotnick & Restrepo, 2005). El componente llamado “final valve” (FV) permite que se cierre el paso del aire hacia la cámara operante en un intervalo de 1-1,5s al mezclar ambos flujos. Tras este intervalo, se abre nuevamente el paso del aire y se libera el odorante concentrado hacia un tubo de muestreo de odorantes dentro de la cámara. En esta cámara de plexiglás de 16x12x12cm, se encuentra un sensor fotoeléctrico infrarrojo (compuesto por un LED y

un detector infrarrojo), empleado para determinar de forma automatizada las inserciones de la cabeza del animal en el compartimento en que se ubica el tubo de muestreo de odorantes a la altura de la nariz (Figura 9).

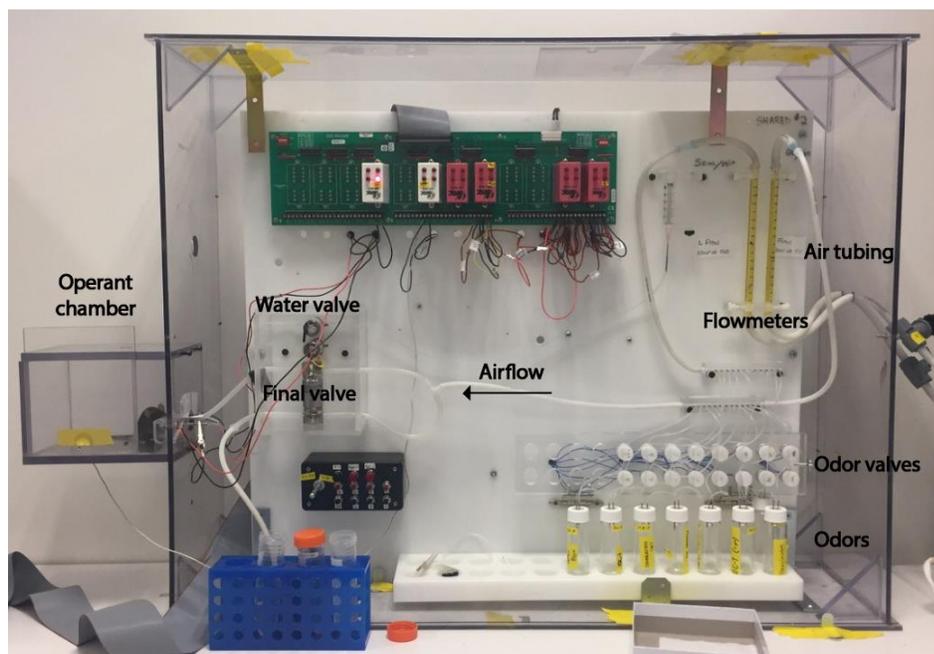


Figura 9. Olfactómetro utilizado para los entrenamientos conductuales. Se muestran los distintos componentes que conforman el equipo y la dirección del flujo de aire que permite que un odorante particular llegue desde el vial que lo contiene hasta el tubo de muestreo en la cámara operante.

Bajo el tubo de muestreo de odorantes, a la altura de la boca del ratón, se sitúa un tubo de recompensa terminado en una esfera metálica, que está conectado a un recipiente que contiene 5mL de agua. El roedor ingresa al compartimento para obtener agua como recompensa. La resistencia del circuito es prácticamente infinita cuando el ratón no lame este tubo. Cuando lo lame, la resistencia disminuye y genera una señal hacia el olfactómetro. Dependiendo de la prueba, la recompensa se da cuando el ratón lame este tubo repetidas veces, generando la apertura de una válvula solenoide que proporciona de manera controlada 10 μ L de agua en la salida del tubo de recompensa.

Se lavaron las conexiones del equipo frecuentemente con detergente diluido en agua para evitar la contaminación por odorantes. Asimismo, se limpió la cámara operante después de cada sesión con clorhexidina al 2% diluida en agua.

8.1 Entrenamiento inicial

El entrenamiento inicial (Begin), detallado en investigaciones anteriores (Slotnick & Restrepo, 2005), consistió en dos etapas. En la primera etapa el ratón aprende a insertar su cabeza en el compartimento y es recompensado con 10 μ L de agua cada vez que ejecuta esta acción (Figura 10, arriba). El animal debe repetir esto por 20 veces (ensayos) para completar esta etapa. Cada ensayo comienza cuando el roedor pone su cabeza dentro del compartimento y termina con la entrega de la recompensa.

La segunda etapa consiste en 160 ensayos, divididos en 8 bloques de 20 ensayos cada uno. En esta fase, el ratón debe ingresar al compartimento y permanecer en él de 0 a 1,5s progresivamente a lo largo de la prueba. Si se cumple esto, se entrega un pulso de odorante de 2,5s. El animal debe permanecer en el compartimento por 0,5s para que se considere válido el ensayo y lamer el tubo de recompensa por cada vez más tiempo luego de la presentación del olor (Figura 10, abajo). El odorante que se presentó fue isoamilacetato (ISO) al 1% v/v disuelto en aceite mineral (MO) (Ver Anexo, Tabla 1). El animal debe lamer al menos una vez en cada segmento de 0,5s para obtener la recompensa. En ese caso, se considera que respondió correctamente el ensayo. Si el roedor no lame en uno de los segmentos correspondientes o se retira del compartimento, no se da la recompensa y el animal debe repetir el ensayo. Los segmentos en que el animal debe lamer aumentan progresivamente de 1 a 4 a lo largo de los bloques en la prueba. El intervalo entre ensayos (ITI) es de 8s. Cada ratón debe completar el 8° bloque por 3 días consecutivos (Figura 10). Luego del primer día de entrenamiento, la prueba

se inicia en 1-2 bloques anteriores al bloque alcanzado por el roedor el día anterior. Cuando el animal termina el bloque 8, al día siguiente la prueba comienza desde el 5° bloque.

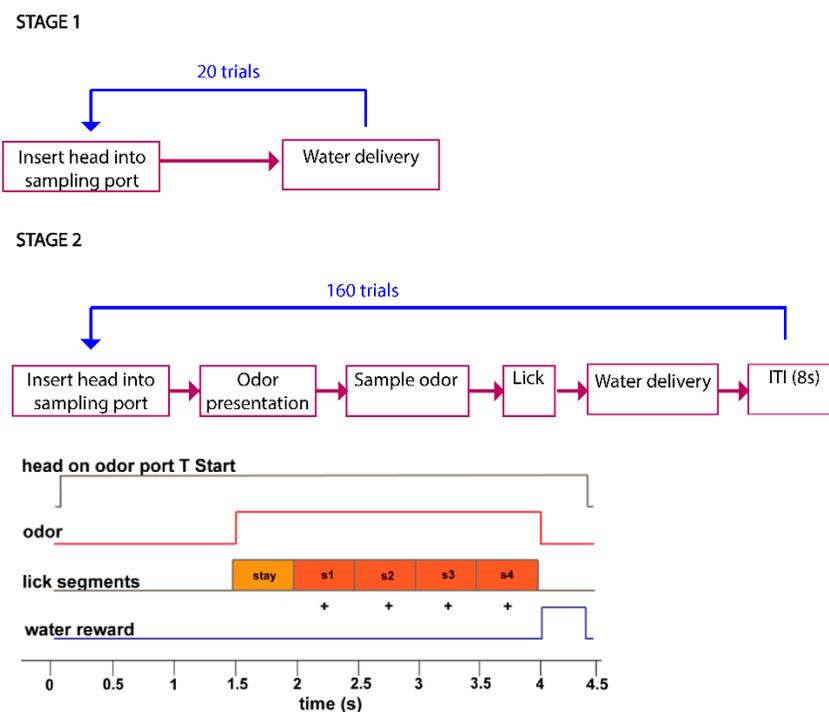


Figura 10. Esquema de las etapas 1 y 2 del entrenamiento inicial. En la etapa 1 el animal debe insertar su cabeza en el compartimento, iniciando el ensayo y es recompensado con agua, finalizando el ensayo. Esto se repite por 20 veces. En la etapa 2, el ratón debe permanecer con su cabeza en el compartimento por 0-1,5s progresivamente. Se presenta el odorante por 2,5s. El roedor debe permanecer por 0,5s luego de la presentación del odorante y lamer el tubo de recompensa una vez en cada segmento de 0,5s (que aumentan progresivamente a lo largo de la prueba) para obtener agua. El intervalo entre ensayos (ITI) es de 8s. El ratón debe realizar 160 ensayos para finalizar el entrenamiento.

8.2 Prueba inicial de discriminación go/no-go

Además del odorante utilizado en el entrenamiento inicial, se agregó un estímulo no recompensado con agua que consistió en el disolvente del odorante que se empleó, es decir, MO. En esta prueba de discriminación se presentan ambos estímulos al ratón en

orden aleatorio, con una cantidad igual de ambos en un bloque y donde un estímulo no se repite más de 3 veces sucesivas. El tiempo de presentación de odorante es de 2,5s y el de FV 1,5s, de la misma manera en que se representa en la Figura 10. El entrenamiento consta de 199 ensayos divididos en 9 bloques de 20 ensayos y un último bloque de 19 ensayos. Si el animal lame el tubo de recompensa al menos una vez en los 4 segmentos de 0,5s al presentarse el olor recompensado (S+), se considera un acierto (Hit) y se le entrega agua al finalizar el ensayo. Cuando se presenta el olor no recompensado (S-) y el animal deja de lamer en uno o más de los segmentos, no se le entrega agua, pero es considerado como un acierto en la prueba (Correct rejection). Si el roedor no lame el tubo de recompensa al presentarse S+ (Miss) o lame el tubo de recompensa en los 4 segmentos cuando se presenta S- (False alarm), se considera un fallo y no se entrega agua en ambos casos. Luego de cada ensayo, el ITI fue de 8s antes de comenzar el siguiente. Si el animal permanece en el compartimento menos de 0,5s luego de la presentación del olor, el ensayo no es válido y transcurren los 8s de ITI antes de comenzar el siguiente ensayo. El porcentaje de aciertos en cada bloque es entregado por el programa automáticamente y se calcula de la siguiente forma (Slotnick & Restrepo, 2005):

$$\% \text{ aciertos} = \frac{\text{Hits} + \text{Correct Rejections}}{20} * 100$$

La prueba se considera completada cuando el animal logra un porcentaje $\geq 85\%$ de aciertos en al menos 3 bloques a lo largo de la sesión. En cada día de entrenamiento se utilizaron distintas válvulas para acoplar las mangueras de los viales que contienen el odorante. Se realizaron las pruebas en una sala cerrada en silencio.

8.3 Prueba inicial de discriminación go/no-go con estimulación optogenética

El equipo utilizado cuenta con una computadora que controla el olfactómetro y un fotodiodo que simultáneamente enciende y luego apaga la señal que se entrega al generador de pulsos. Para realizar la estimulación optogenética acoplada al entrenamiento conductual, se conectó el generador de pulsos al equipo con el objetivo de que éste último gatille la señal hacia el generador y así encender el LED.

Se realizó el protocolo de fotoestimulación descrito anteriormente para todos los animales implantados con fibra óptica. Esta prueba de discriminación go/no-go sigue el mismo protocolo mencionado en la prueba anterior, con la excepción que cuando el ratón recibe un pulso de odorante (S+ o S-), simultáneamente recibe el tren de pulsos de luz por 3s.

Se indujo anestesia en cada ratón por vía inhalatoria utilizando 0,5mL de isoflurano en una cámara pequeña de 15x10x10cm. Se conectó la fibra óptica de acople por un lado al LED y por otro a la fibra óptica del ratón implantado, como se detalló anteriormente (Figura 11). Se limpiaron ambas fibras con metanol antes de comenzar la prueba. Tras conectar el implante y colocar al ratón en la cámara operante, se inicia la prueba cuando el ratón esté completamente despierto (5min aproximadamente luego de anestesiarse). Se realizó la misma prueba anterior utilizando isoamilacetato 1% v/v en MO, como estímulo recompensado (S+) y MO como estímulo no recompensado (S-).

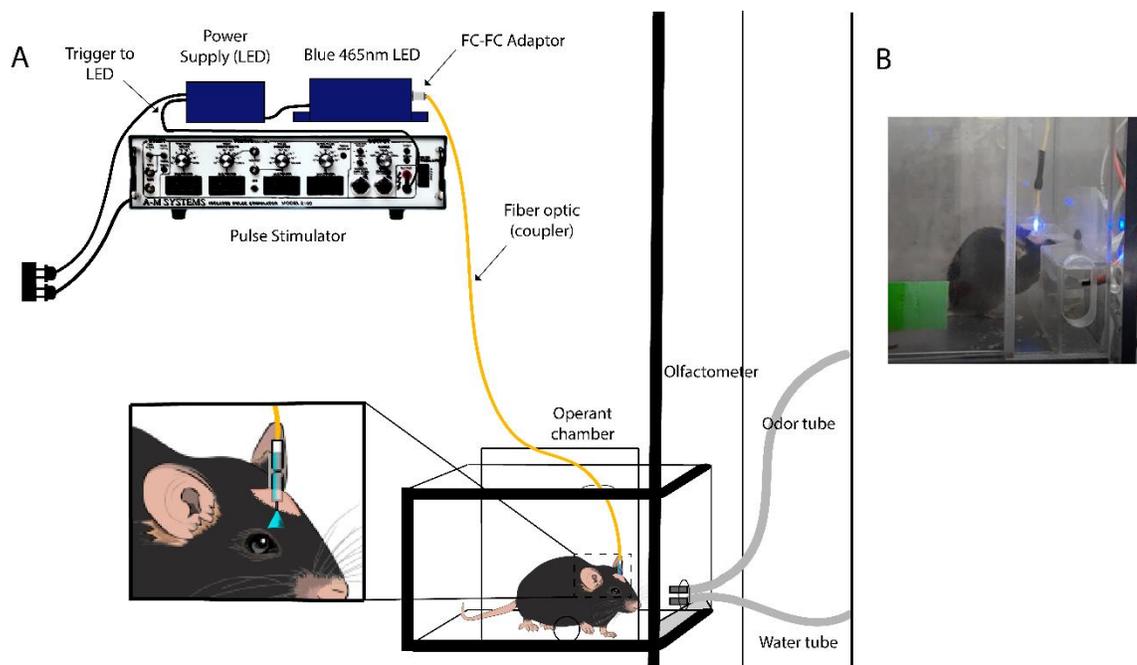


Figura 11. Estimulación optogenética *in vivo* durante la prueba de discriminación go/no-go. A) Se esquematizan las conexiones para permitir la transmisión de la luz desde el LED azul, pasando por la fibra óptica de acople hasta la punta de la fibra óptica del implante. El ratón recibe el pulso de luz simultáneamente con el pulso de odorante, cuando se presentan ambos estímulos de olor (S+ o S-). Abajo a la izquierda, se presenta un diagrama amplificado de la fotoestimulación dentro del cerebro del animal implantado, a través de la fibra óptica. B) Estimulación optogenética experimental durante una prueba de discriminación go/no-go. El animal se encuentra dentro del compartimento durante el transcurso de un ensayo, lamiendo el tubo de recompensa mientras se presenta el estímulo S+.

Al finalizar la sesión, se indujo anestesia en el animal nuevamente con isoflurano en la cámara operante para desconectar la fibra óptica y limpiar los residuos del gel de acoplamiento óptico en ambas fibras y el interconector.

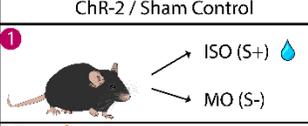
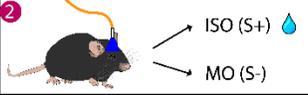
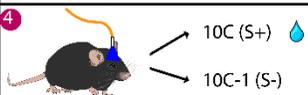
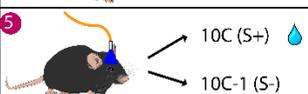
Cuando el animal aprendió la prueba, se realizó un entrenamiento al día siguiente con las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, con la excepción de que se utilizaron los siguientes pares de odorantes: fenilacetato 1% v/v en MO, como estímulo recompensado (S+) y 2-butanona 1% v/v en MO, como estímulo no

recompensado (S-) (Ver Anexo, Tabla 2). Cada animal tuvo que completar al menos 3 bloques con un porcentaje de acierto de $\geq 85\%$ a lo largo de la sesión para cumplir el criterio de aprendizaje, al igual que la prueba anterior.

8.4 Prueba de discriminación go/no-go con mezclas complejas de odorantes

Se probaron dos concentraciones diferentes de dos mezclas complejas de odorantes de composición similar: una consistió en un conjunto de 10 odorantes monomoleculares distintos (10C) y la otra en 9 de éstos (10C-1). Los compuestos utilizados corresponden a isoamilacetato, etil-valerato, 5-metil-2-hexanona, isopropilbenceno, 1-pentanol, 1,7-octadieno, 2-heptanona, heptanal, 4-metil-3-penta-2-ona y nonano, siendo este último odorante el que se remueve en la mezcla 10C-1. Se utilizaron las mezclas a una concentración de 1,6% y 0,16% v/v en MO (Ver Anexo, Tabla 3). La mezcla de odorantes 10C fue el estímulo recompensado con agua (S+), mientras que la mezcla de odorantes 10C-1 no fue recompensada (S-), para ambas concentraciones (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen del protocolo de entrenamiento conductual realizado. Se esquematiza el orden de las diferentes pruebas go/no-go a las que se sometió a cada animal, con su respectivo odorante recompensado (S+) y no recompensado (S-), además de la duración de éstas y su objetivo en particular.

ChR-2 / Sham Control	Days	Task objective
	1-4	Discriminate stimuli of odorants (easy)
	1-2	Discriminate stimuli of odorants with photostimulation
	1-2	Discriminate stimuli of odorants (medium) with photostimulation
	2	Discriminate odorant mixtures at 0,16% (very hard) with photostimulation
	2	Discriminate odorant mixtures at 1,6% (hard) with photostimulation

9. Verificación del sitio de inyección viral e implante de fibra óptica

9.1 Perfusión intracardiaca y obtención de la muestra

Al finalizar los experimentos conductuales, cada ratón fue anestesiado como se detalló para los animales empleados en la titulación viral. Tras la perfusión intracardiaca, el implante de fibra óptica fue removido cuidadosamente. Se siguió el mismo protocolo de post-fijado y obtención de muestras de cerebro detallado anteriormente.

9.2 Histología y fluorescencia

Se realizó el procedimiento de histología y visualización de la fluorescencia de cada muestra, a través de un microscopio confocal, como se detalló antes. Se llevó a cabo el mismo procedimiento de toma de imágenes y reconstrucción de éstas descrito para la titulación viral.

10. Criterios de inclusión y exclusión de resultados

10.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron todas las pruebas conductuales y los animales en los que:

- No se detectaron contaminaciones debidas a odorantes en las mangueras del olfactómetro. Además, las variables del equipo funcionan correctamente: se detectan las lamidas del roedor, el software detecta el resultado de cada ensayo, fluye aire por las mangueras y no hay fugas de aire en las conexiones.
- El implante de fibra óptica del animal permanece íntegro por todas las sesiones de entrenamiento.
- Los animales tienen menos de 6 meses de edad.
- Las variables del sistema de optogenética *in vivo*, tales como los pulsos de luz, se dan por el tiempo determinado durante toda la prueba.

10.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron todas las pruebas conductuales y los animales en los que:

- Se detectaron contaminaciones de odorantes en las mangueras del olfactómetro.
- Existieron problemas al detectar las lamidas del animal, se detectó alguna manguera tapada o el aparato no entregaba el volumen de agua correspondiente.
- Los animales tienen 6 meses de edad o más.
- Se desprendió el implante de fibra óptica del roedor. Se procedió a la eutanasia del animal inmediatamente en dichos casos.

11. Análisis

Se graficaron los datos utilizando el software GraphPad Prism 8.4.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Las Figuras presentadas fueron realizadas utilizando el software Adobe Illustrator 23.0 64-bit para Windows (Adobe Inc., www.adobe.com/products/illustrator).

RESULTADOS

1. Titulación de la expresión viral de canalrodopsina-2 (ChR-2) en neuronas del HDB de ratones

Para determinar el volumen óptimo de AAV a inyectar para expresar ChR-2 específicamente en el HDB, se realizaron 4 inyecciones virales utilizando volúmenes decrecientes de AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-m-Cherry: 1000, 500, 250 y 100nL en distintos animales, con el protocolo detallado anteriormente (Ver Materiales y Métodos) y que se esquematiza en la Figura 12.

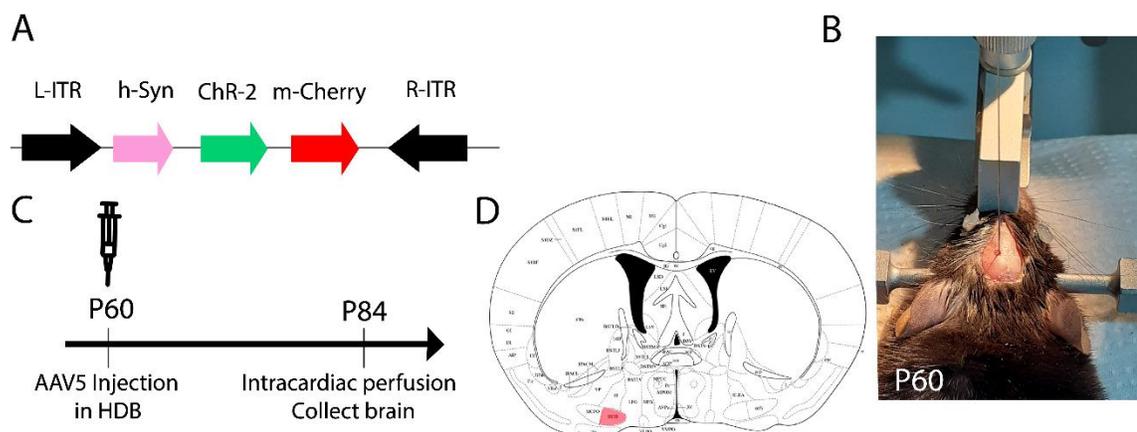


Figura 12. Estrategia experimental de inyección viral estereotáxica de ChR-2 en el HDB de ratones.

A) Esquema del constructo viral usado para la titulación del virus. La expresión de ChR-2 fusionada a m-Cherry es comandada por el promotor de sinapsina humana I (hSyn), flanqueada por repetidos invertidos terminales (L-ITR y R-ITR). B) Imagen de un ratón de 60 días de vida, anestesiado y colocado en el aparato estereotáxico, con el cráneo expuesto y con la jeringa que permite inyectar el virus en las coordenadas estereotáxicas descritas. C) Línea de tiempo de la inyección del AAV y la perfusión intracardiaca a los 14 días después de la cirugía para obtener la muestra de cerebro. D) Esquema de sección coronal de cerebro de ratón a 0,02mm de bregma (Paxinos & Franklin, 2004), que corresponde al plano anteroposterior en que se realizó la inyección viral. Se destaca el sitio de interés en el cerebro basal anterior en rosado, que corresponde al HDB.

El AAV utilizado se expresa bajo el promotor de sinapsina I humana (hSyn), que es una proteína de membrana localizada en vesículas sinápticas en los terminales axónicos en el sistema nervioso central y periférico (Thiel y col., 1991). Al expresar el AAV bajo este promotor, permite que el virus se exprese solamente en neuronas (Nieuwenhuis y col., 2020) de manera no selectiva al tipo neuronal, es decir, se expresa en todas las neuronas infectadas. El AAV de serotipo 5 empleado, tarda 14 días aproximadamente en alcanzar una expresión óptima en los somas neuronales para ser visualizada por microscopía confocal gracias al reportero utilizado (Sparta y col., 2012), razón por la que se obtuvo la muestra de cerebro de cada ratón luego de 14 días luego de la inyección viral.

La reconstrucción que se muestra en la Figura 13 corresponde a uno de los cortes de cerebro de 40 μ m de grosor obtenido dentro del rango de máxima expresión del virus para la inyección de 1000nL en el eje anteroposterior, es decir, donde se visualizó mayor fluorescencia al recorrer una secuencia de 2mm en este eje, con secciones obtenidas cada 120 μ m. Como se muestra en la Figura 13, al inyectar un volumen viral de 1000nL se obtuvo una excesiva difusión del virus en zonas del cerebro que se encuentran sobre el HDB, especialmente en la parte medial (IPACM) y lateral (IPACL) del subnúcleo intersticial posterior de la comisura anterior. Se observó además la difusión del virus a estructuras que conforman el cerebro basal anterior, como el pallidum ventral (VP) y la sustancia innominada (SI), expresándose también en parte del HDB y del tracto óptico (OPT). La magnitud de difusión radial del AAV en esta sección fue de 0,555mm² (Ver Materiales y Métodos).

Con respecto a las inyecciones virales con un volumen de 500nL, 250nL y 100nL, no se observó difusión viral en el HDB, sino que en regiones cerebrales que se encuentran sobre el cerebro basal anterior. Las magnitudes de difusión radial del AAV en las

reconstrucciones realizadas para estas inyecciones fueron, respectivamente: 0,491mm², 0,625mm² y 0,339mm². Cabe destacar que, en todas las inyecciones realizadas, se observó difusión del virus hasta zonas más posteriores a las correspondientes al HDB en el eje anteroposterior.

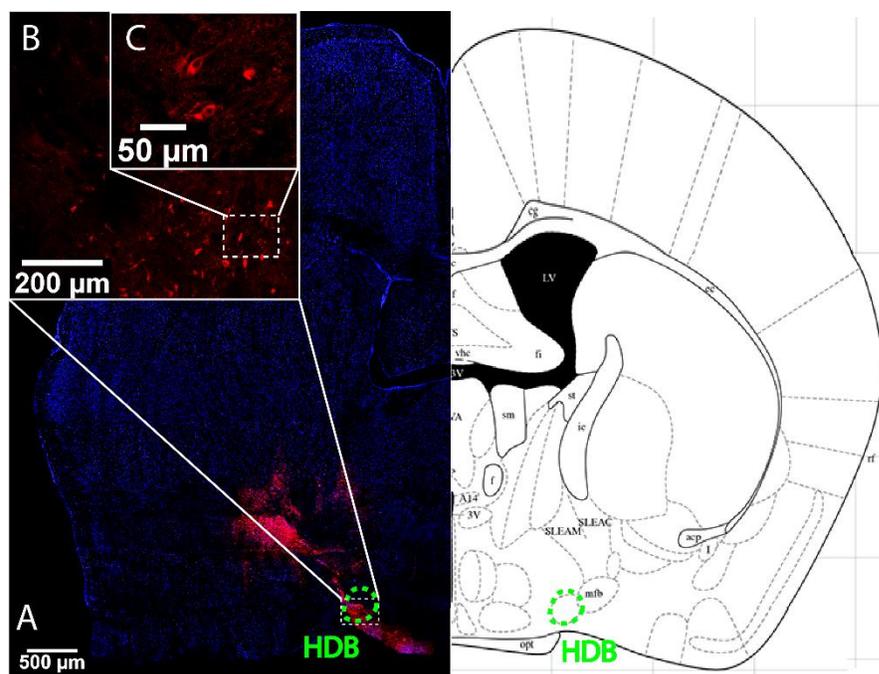


Figura 13. Expresión viral de ChR-2 en neuronas del cerebro basal anterior de ratón. Se presenta en azul el marcador nuclear DAPI y en rojo m-Cherry, reportero de ChR-2. A) A la izquierda, se muestra una reconstrucción de un corte de cerebro de ratón de una sección coronal de 40μm de grosor (aumento 10x) a -0,34mm de bregma. A la derecha, se muestra el diagrama de una sección coronal a -0,34mm de bregma en el cerebro de ratón (Paxinos & Franklin, 2004). El HDB se destaca en verde en ambos casos. B) Magnificación de la zona de mayor difusión del virus en el HDB en un plano de grosor 4μm, donde se observa que el virus se expresó en somas neuronales, dendritas y axones (aumento 20x). C) Amplificación de algunas de las neuronas infectadas en el HDB (aumento 40x).

Considerando los resultados obtenidos, se sugirió verificar las coordenadas estereotáxicas específicas al centro del HDB (Paxinos & Franklin, 2004) para las cirugías

de inyección viral posteriores, para tener más probabilidad de que el virus difunda de manera más específica a este sector. Las coordenadas estereotáxicas finales correspondieron a 0,02mm anteroposterior, $\pm 1,44$ mm medial-lateral y -5,12mm dorsoventral. Como consideración extra, se tomó en cuenta la desviación del cráneo registrada en el eje dorsoventral al fijar el cráneo en el aparato estereotáxico, y se restó esta medida a la coordenada del eje anteroposterior, para corregir el ángulo de entrada que tendrá la jeringa en el cerebro. Sin embargo, como muestra la Figura 13, si se logró expresar ChR-2 en el HDB con la inyección viral en que se utilizó un volumen de 1000nL.

En ninguna de las imágenes analizadas se observaron proyecciones axonales hacia otras zonas del cerebro, considerando 14 días post-inyección hasta la recolección de las muestras de cerebro de cada animal. El AAV de serotipo 5 puede tardar entre 4-6 semanas en alcanzar una expresión óptima en fibras celulares y terminales neuronales (Zincarelli y col., 2008; Sparta y col., 2012) y tiene la capacidad de permanecer estable hasta por más de 9 meses. Por esta razón, para las cirugías que se realizaron posteriormente, se aumentó el tiempo de espera a 4-6 semanas antes de realizar los experimentos conductuales de optogenética *in vivo*. Esto aumenta la probabilidad de visualizar proyecciones de axones, especialmente desde el HDB hacia la corteza piriforme, lo que permite verificar visualmente que al fotoestimular el HDB se produce la modulación de la actividad neuronal que influiría en la percepción olfatoria.

Con estos resultados, se determinó que el volumen óptimo requerido para obtener la expresión específica de ChR-2 en el cerebro basal anterior y particularmente en el HDB es de 250nL, teniendo en cuenta las magnitudes de difusión radial del virus obtenidas. Con este volumen, es mayor la probabilidad de que el virus se exprese en el HDB cuando se implanta la fibra óptica en el mismo sitio de inyección, sin difundir excesivamente a

otras regiones cerebrales. En cambio, con un volumen viral menor como 100nL, sería menos probable que el virus se exprese en el HDB al implantar la fibra óptica en la misma zona, como se discutirá más adelante.

2. Fabricación de implantes de fibras ópticas y cirugía estereotáxica

2.1 Fabricación de implante de fibra óptica y medición de irradiancia

Se construyeron implantes de fibras ópticas de apertura numérica 0,22, 105µm de diámetro y 5,80mm de longitud (Ver Materiales y Métodos). Luego, se determinó la potencia de la luz que es transmitida por cada fibra de acople sin la cánula conectada, con la configuración descrita anteriormente. Al calibrar 2 fibras de acople, se observó que a medida que aumenta la intensidad de corriente a través del comando digital del LED (465nm), aumenta la potencia que transmite la fibra de acople. Para determinar la potencia que transmite cada implante de fibra óptica, se conectó a cada fibra de acople un implante de fibra óptica (Figura 14, A). Se observó que a medida que aumenta la intensidad de corriente, aumenta la potencia que transmite la fibra óptica, y que la luz que transmite la fibra es dispersada sólo en la punta de ésta (Figura 14, B). Sin embargo, se evidenció la importancia de medir la potencia entregada por cada fibra de acople, debido a que varía para cada una a la misma intensidad de corriente. Además, al conectar la cánula a la fibra de acople y medir la potencia en la punta de la fibra óptica, se registró una pérdida de potencia.

Para obtener una aproximación de la potencia que se transmite a través de la fibra óptica en el tejido cerebral de roedores, considerando la calibración realizada, se utilizó un modelo desarrollado por la Universidad de Stanford (Aravanis & col., 2007) de la extensión cónica de la luz que se disipa en la punta de la fibra óptica dentro del tejido cerebral de mamífero, con un ángulo determinado por las propiedades ópticas de la fibra

mencionadas anteriormente (Ver Materiales y Métodos). (Figura 14, C). Este modelo se encuentra disponible en línea (Optogenetic Resource Center, www.optogenetics.org/calc), y predice valores de irradiancia (también llamada densidad de potencia) basados en medidas directas del tejido cerebral de mamífero en función de la profundidad de éste desde la posición de la fibra óptica. El modelo involucra suposiciones ideales; que el tejido es homogéneo, que la punta de la fibra es un difusor ideal iluminado desde un lado con luz difusa y que la reflexión y la absorción son constantes en el grosor de la muestra (Yizhar y col., 2011). No obstante, permite un buen ajuste a los datos considerando que la luz es emitida con un patrón cónico que se dispersa y absorbe a medida que pasa a través del tejido cerebral. Se determinó que la luz transmitida en la punta de la fibra óptica se atenúa con la distancia, a mayor profundidad del tejido cerebral, fenómeno que se esquematiza en la Figura 14, C.

La pérdida de potencia observada al conectar el implante de fibra óptica a la fibra de acople, con respecto a cuando se mide la potencia sin conectar el implante, se debe a que la presencia de aire en esta unión genera una refracción de la luz por la impedancia óptica que existe entre el aire y la señal transmitida por ambas fibras. Por lo tanto, se pierde parte de la señal al conectar ambas fibras. El gel de acoplamiento óptico en la unión de la fibra óptica de acople y la cánula (Ver Materiales y Métodos) minimiza considerablemente esta pérdida de potencia, ya que posee un índice de refracción muy bajo (<0.003) (G608N3, www.thorlabs.com). Además, absorbe la expansión térmica diferencial de los implementos ópticos sin inducir tensiones y desgaste del material, y no permite el ingreso de partículas de polvo que puedan influir en la transmisión de la señal. Sin embargo, aún con este gel se determinó que existe una pérdida de señal que es

necesario medir para poder ser compensada y poder llevar a cabo una fotoestimulación *in vivo* de manera óptima.

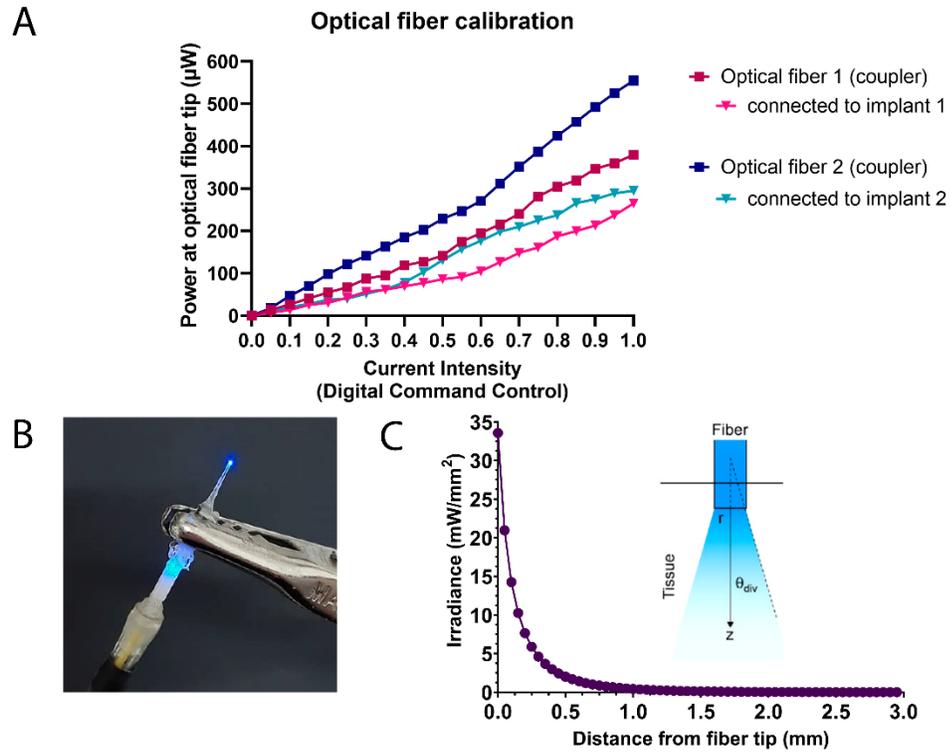


Figura 14. Calibración de la potencia de la fibra óptica de acople, del implante fabricado y valores de irradiancia. A) Calibración de la potencia (μW) de la luz que se transmite hacia la fibra óptica de acople a través del LED (sin conectar la cánula) a medida que aumenta la intensidad de la corriente del comando digital. Se midió la potencia utilizando dos fibras ópticas de acople diferentes (1 en burdeo y 2 en azul) y también al conectar un implante de fibra óptica a cada fibra de acople (1 en rosado y 2 en celeste). B) Configuración en que se midió la potencia de la cánula conectada a la fibra de acople. C) Valores de irradiancia (mW/mm^2) en la punta del implante de fibra óptica, según el modelo desarrollado por la Universidad de Stanford (Aravanis & col., 2007). A la derecha, se muestra un esquema que explica que la luz que se transmite en la punta de la fibra óptica es más tenue a mayor profundidad en el tejido cerebral (r : radio de la fibra; z : profundidad del tejido desde la punta de la fibra; θ_{div} : ángulo medio de divergencia de la luz en el tejido) (tomado de Aravanis & col., 2007).

El LED utilizado entrega una potencia máxima de 260 μ W medida con el medidor de potencia luminosa en la punta del implante de fibra óptica. Considerando que el diámetro del centro de ésta es de 105 μ m y sabiendo que el área de un círculo se calcula como $A = \pi r^2$, se obtuvo que el área circular iluminada por la fibra óptica en la superficie plana del sensor del medidor de potencia luminosa es de 0,00866mm². Con estas condiciones, se estimó que 260 μ W en esa superficie equivalen a una irradiancia de 30mW/mm², resultado que es validado por los valores de irradiancia del modelo presentado en la Figura 14, C. Este valor de irradiancia fue el utilizado en los experimentos de optogenética *in vivo* también debido a que estudios anteriores muestran que potencias altas de estimulación (≥ 30 mW) ocasionan un incremento mínimo en la temperatura del tejido cerebral cuando la duración de cada pulso es menor que 100ms (Stujenske y col., 2015).

2.2 Cirugía estereotáxica de inyección viral e implante de fibra óptica

En una sola intervención quirúrgica para cada ratón, se inyectaron 250nL del virus correspondiente en el HDB y en el mismo sitio se implantó la fibra óptica. Se inyectaron e implantaron 5 ratones con el virus AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-m-Cherry y 2 con el virus control AAV5-hSyn-EYFP (Figura 15).

Como se muestra en la Figura 15, la fibra óptica implantada ocasionó daño tisular en el hemisferio izquierdo del cerebro en el HDB, región donde se observa expresión del AAV. La magnitud de la difusión radial del virus fue de 0,051mm², evidenciando que al implantar la fibra óptica se obtiene una menor expresión del virus con respecto a la difusión viral que se obtiene cuando solamente se inyecta el mismo volumen de virus.

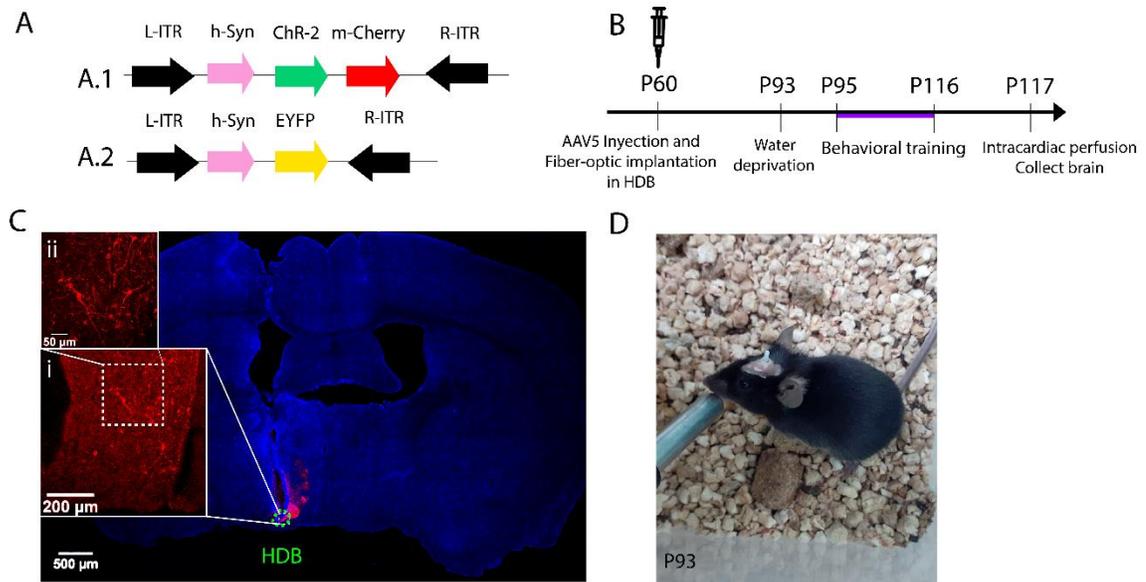


Figura 15. Estrategia experimental de inyección viral estereotáxica de cada virus e implante de fibra óptica en el HDB de ratones. A) Esquema de cada constructo viral utilizado. La expresión de ambos AAV (A.1: AAV que expresa ChR-2; A.2: AAV control) es comandada por el promotor hSyn y son flanqueados por repetidos invertidos terminales. B) Línea de tiempo de la inyección del AAV y el implante de fibra óptica en la misma cirugía. Tras 4-6 semanas aproximadamente, cada ratón fue privado de agua por 48 horas antes de comenzar los entrenamientos conductuales de 14-21 días de duración. Al finalizar el entrenamiento, cada ratón fue perfundido de manera intracardiaca para obtener la muestra de cerebro. C) Expresión viral de 250nL de AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-m-Cherry en neuronas del HDB (en verde). Se muestra una reconstrucción de corte de cerebro de 40μm de grosor de una sección coronal a -0,34mm de bregma (aumento 10x). Se muestra en azul el marcador nuclear DAPI y en rojo m-Cherry, reportero de ChR-2. C.i) Magnificación de la zona de difusión del virus en el HDB en un plano de grosor 4μm, donde se observa que el virus difundió a somas neuronales, dendritas y axones (aumento 20x). C.ii) Amplificación de algunas de las neuronas infectadas del HDB (aumento 40x). D) Imagen de ratón de 93 días de vida, tras 4-6 semanas de la cirugía de inyección viral e implante de la fibra óptica.

3. Evaluación de la capacidad de discriminación olfatoria de ratones inyectados con AAV en una prueba go/no-go al fotoestimular neuronas del HDB

Tras 4-6 semanas de la cirugía de inyección viral e implante de fibra óptica de los animales que fueron inyectados con el virus que expresa ChR-2 (AAV5-hSyn-hChR2(H134R)-m-Cherry) (n=5) y con el virus control (AAV5-hSyn-EYFP) (n=2), se privó de agua a cada ratón por 48 horas antes de comenzar los experimentos conductuales.

3.1 Estudios de discriminación olfatoria en ratones inyectados con AAV

Tras habituarse al olfactómetro y aprender la prueba de entrenamiento inicial descrita anteriormente (Ver Materiales y Métodos), los animales fueron entrenados utilizando los odorantes isoamilacetato (ISO) (1% v/v en MO) como odorante recompensado con agua (S+) y aceite mineral (MO) como odorante no recompensado (S-) en una prueba de discriminación go/no-go (n=7). En el día 1 de entrenamiento, 2 ratones (28,6% del total); uno inyectado con el virus que expresa ChR-2 y el otro animal inyectado con el virus control, cumplieron el criterio para completar la prueba. Este criterio, que consistió en lograr $\geq 85\%$ de aciertos en un bloque al menos 3 veces a lo largo de la sesión, fue considerado para asegurar la estabilidad de la respuesta del animal (Slotnick & Restrepo, 2005). En el 8vo bloque, estos animales lograron $\geq 85\%$ de aciertos al menos una vez. Los ratones que no completaron la prueba fueron entrenados un día adicional o más días hasta que alcanzaran el criterio de aprendizaje. Al día 2, dos ratones inyectados con el virus que expresa ChR-2 lograron el criterio, alcanzando en el 2do bloque $\geq 85\%$ de aciertos al menos una vez, obteniendo un 57,1% de animales en total que cumplieron el criterio hasta la 2da sesión de entrenamiento. Al 3er día, 2 ratones completaron la

prueba; un ratón inyectado con el virus que expresa ChR-2 y otro con virus control, alcanzando en el 4to bloque $\geq 85\%$ de aciertos al menos una vez y obteniendo un 85,7% de animales en total que cumplieron el criterio hasta la 3ra sesión de entrenamiento. Un ratón (14,3% del total) inyectado con el virus que expresa ChR-2 fue entrenado 4 días y logró $\geq 85\%$ de aciertos en el 2do bloque (Figura 16).

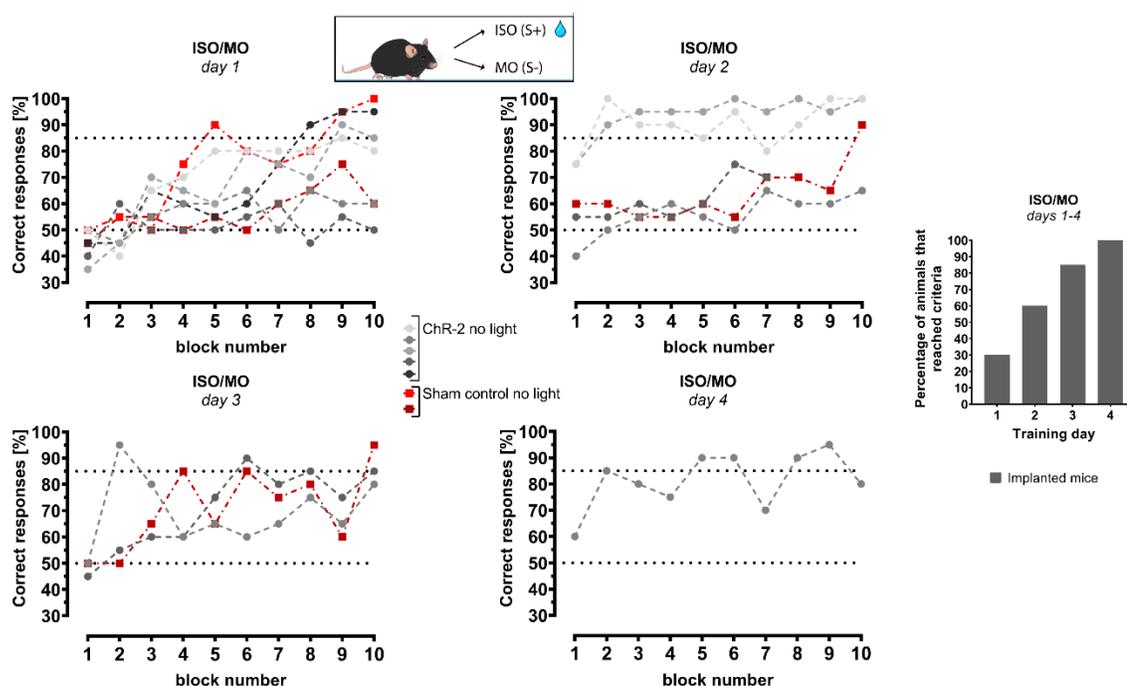


Figura 16. El 85% de los roedores implantados aprenden a discriminar ISO/MO en 3 sesiones de entrenamiento de la prueba inicial de discriminación go/no-go. Porcentaje de aciertos de los roedores en la prueba inicial de discriminación go/no-go de isoamilacetato vs. aceite mineral (ISO/MO) para cada día de entrenamiento (1-4), analizado por bloques de 20 ensayos de cada uno, para los ratones inyectados con el virus que expresa ChR-2 (tonos grises) (n=5) y ratones inyectados con el virus control (tonos rojos) (n=2), sin fotoestimulación. El odorante recompensado fue ISO (S+) y el odorante no recompensado fue MO (S-). El criterio de aprendizaje (85% de aciertos) fue alcanzado en el 3er día de entrenamiento por el 85% del total de ratones. Cada curva representa un animal. El gráfico de barras representa el porcentaje acumulado de animales que alcanzaron el criterio en cada día de entrenamiento.

Las pruebas fueron realizadas en una sala cerrada y en silencio para evitar un aprendizaje asociado a algún estímulo auditivo y/o visual y para evitar potenciales distractores que puedan influir en la capacidad de aprendizaje de los roedores. El agua que recibió cada animal diariamente, que consistió en la recompensa de agua a lo largo de cada sesión y agua adicional para completar 1-1,5mL según el peso de cada animal, corresponde a un 35% aproximado de la ingesta de agua *ad libitum* de ratones C57BL/6J (Bachmanov y col., 2002).

3.2 Efecto de la estimulación optogénica del cerebro basal anterior en la discriminación olfatoria

Esta prueba de discriminación go/no-go siguió el mismo protocolo que la anterior, con la excepción de que cuando el ratón recibe un estímulo de odorante (S+ o S-), simultáneamente recibe un tren de pulsos de luz por 3s, con el protocolo de fotoestimulación descrito anteriormente (Ver Materiales y Métodos). La importancia de repetir la prueba anterior es que el animal se habitúe a tener conectado a su implante la fibra óptica de acople y al efecto de la anestesia requerida para realizar esta conexión manualmente. El primer día de entrenamiento con fotoestimulación puede afectar el desempeño del roedor en la prueba, dificultando su aprendizaje. Cabe destacar que la potencia que entrega la fibra óptica no disminuye sustancialmente en el tiempo, incluso hasta 4 meses después de ser implantada (Sparta y col., 2012).

En el primer día de entrenamiento, 4 ratones cumplieron el criterio de aprendizaje. De estos roedores, 3 fueron inyectados con el virus que expresa ChR-2 (57,1% de los ratones inyectados con este virus) y un ratón fue inyectado con el virus control. En el 4to bloque, todos lograron $\geq 85\%$ de aciertos al menos una vez. Los ratones que no alcanzaron el criterio se entrenaron por un día adicional. Al 2do día de entrenamiento,

los 3 animales restantes lograron el criterio, aunque sólo completaron 9 de los 10 bloques de la sesión por pérdida de motivación para realizar la prueba desde el 9no bloque, alcanzando en el 4to bloque $\geq 85\%$ de aciertos al menos una vez. De estos ratones, 2 fueron inyectados con el virus que expresa ChR-2 (100% de los ratones inyectados con este virus) y un ratón fue inyectado con el virus control (Figura 17).

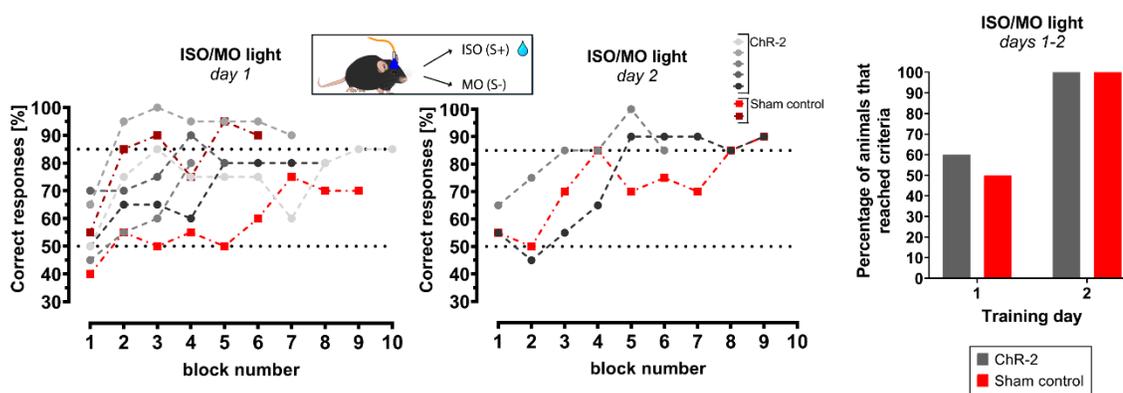


Figura 17. Al activar neuronas del HDB, el 100% de los roedores aprenden a discriminar ISO/MO en dos sesiones de entrenamiento. Porcentaje de aciertos de los roedores en la prueba inicial de discriminación go/no-go de isoamilacetato vs. aceite mineral (ISO/MO) con fotoestimulación para cada día de entrenamiento (1-2), analizado por bloques de 20 ensayos de cada uno, para los ratones inyectados con el virus que expresa ChR-2 (tonos grises) (n=5) y ratones inyectados con el virus control (tonos rojos) (n=2). El odorante recompensado fue ISO (S+) y el odorante no recompensado fue MO (S-). El criterio de aprendizaje (85% de aciertos) fue alcanzado en el 2er día de entrenamiento por el total de ratones. Cada curva representa un animal. El gráfico de barras representa el porcentaje acumulado de animales que alcanzaron el criterio en cada día de entrenamiento, para los ratones que fueron inyectados con el virus que expresa ChR-2 (gris) y ratones que fueron inyectados con el virus control (rojo).

Posteriormente se realizó un entrenamiento con las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente con fotoestimulación, pero con la excepción de que se utilizaron los odorantes fenilacetato 1% v/v en MO (PHEN), como estímulo recompensado (S+) y 2-butanona 1% v/v en MO (2-BUT), como estímulo no recompensado (S-). Esta prueba

se llevó a cabo después de ISO/MO debido a que es más fácil para los animales diferenciar la presencia-ausencia de un odorante que discriminar un par de odorantes con distintas cualidades. Ambos son compuestos hidrocarbonados hidrofóbicos que no comparten grupos funcionales, y que en este caso se entregan en una concentración supraumbra, por lo que es una prueba sencilla para los ratones. Cada animal tuvo que completar al menos 3 bloques con un porcentaje de acierto de $\geq 85\%$ para cumplir el criterio de aprendizaje, al igual que la prueba anterior (Figura 18).

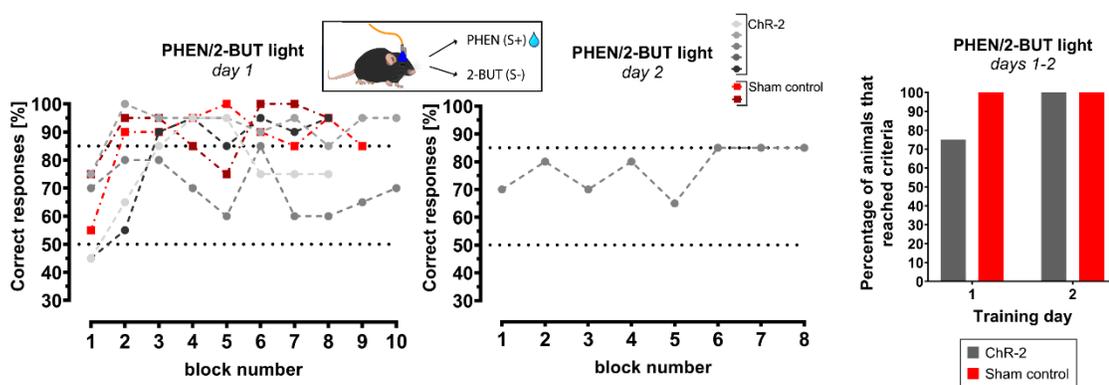


Figura 18. Al activar neuronas del HDB, el 100% de los roedores aprenden a discriminar PHEN/BUT en dos sesiones de entrenamiento. Porcentaje de aciertos de los roedores en la prueba de discriminación go/no-go de fenilacetato vs. 2-butanona (PHEN/2-BUT) con fotoestimulación para cada día de entrenamiento (1-2), analizado por bloques de 20 ensayos de cada uno, para los ratones inyectados con el virus que expresa ChR-2 (tonos grises) (n=4) y ratones inyectados con el virus control (tonos rojos) (n=2). El odorante recompensado fue PHEN (S+) y el odorante no recompensado fue 2-BUT (S-). El criterio de aprendizaje (85% de aciertos) fue alcanzado en el 2er día de entrenamiento por el total de ratones. Cada curva representa un animal. El gráfico de barras representa el porcentaje acumulado de animales que alcanzaron el criterio en cada día de entrenamiento, para los ratones que fueron inyectados con el virus que expresa ChR-2 (gris) y ratones que fueron inyectados con el virus control (rojo).

En el primer día de entrenamiento, 5 ratones cumplieron el criterio de aprendizaje. De estos animales, 3 fueron inyectados con el virus que expresa ChR-2 (75,0% de los

ratones inyectados con este virus) y 2 ratones fueron inyectados con el virus control. Al 3er bloque, todos ellos lograron $\geq 85\%$ de aciertos al menos una vez. Al segundo día de entrenamiento, el ratón restante que se inyectó con el virus que expresa ChR-2 (15,0% de los ratones inyectados con este virus), logró $\geq 85\%$ de aciertos en el 6to bloque y alcanzó el criterio de aprendizaje, aunque sólo completó 8 de los 10 bloques de la sesión debido a la pérdida de motivación para realizar la prueba desde el 8vo bloque.

3.3 Rol del cerebro basal anterior en la discriminación de mezclas complejas de odorantes

Se probaron dos concentraciones diferentes de dos mezclas complejas de odorantes de composición similar: un conjunto de 10 odorantes monomoleculares distintos (10C) y 9 de éstos (10C-1), siendo nonano el compuesto que no está presente (Ver Materiales y Métodos). Se realizó una prueba de discriminación go/no-go con fotoestimulación, en que la mezcla de odorantes 10C fue recompensada con agua (S+), mientras que la mezcla de odorantes 10C-1 no fue recompensada (S-). En estudios anteriores se observó que los ratones C57BL/6J no discriminan estas mezclas al 0,16%, pero logran discriminarlas al 1,6% en el segundo día de entrenamiento, siendo esta concentración el umbral de discriminación (Becerra, 2019). Las concentraciones utilizadas para esta investigación fueron una concentración bajo el umbral de discriminación (0,16% v/v en MO) y la concentración del umbral de discriminación (1,6% v/v en MO).

En el primer día de entrenamiento, el roedor cumplió el criterio de aprendizaje en el 4to bloque, alcanzando $\geq 85\%$ de aciertos. Se realizó un segundo día de entrenamiento para poder comparar de mejor forma los resultados con los obtenidos anteriormente en el laboratorio, independientemente del desempeño del animal. En el día 2 de entrenamiento, el ratón alcanzó $\geq 85\%$ de aciertos en el 2do bloque (Figura 19).

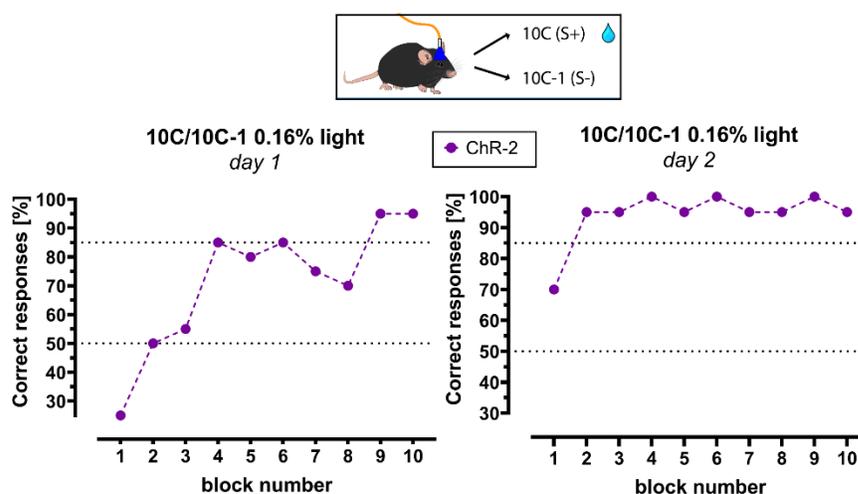


Figura 19. Al activar neuronas del HDB, un roedor aprende a discriminar mezclas complejas de odorantes al 0,16% v/v en MO en una sesión de entrenamiento. Porcentaje de aciertos del roedor inyectado con el virus que expresa ChR-2 (morado) (n=1) en la prueba de discriminación go/no-go de mezclas complejas de odorantes (10C vs. 10C-1) al 0,16% v/v en MO con fotoestimulación para cada día de entrenamiento (1-2), analizado por bloques de 20 ensayos de cada uno. La mezcla de odorantes 10C fue recompensada con agua (S+), mientras que la mezcla de odorantes 10C-1 no fue recompensada (S-). El animal alcanzó el criterio de aprendizaje (85% de aciertos) en el 1er día de entrenamiento.

Al día siguiente, se entrenó al mismo animal que fue inyectado con el virus que expresa ChR-2 en la prueba de discriminación go/no-go utilizando las mezclas complejas al 1,6% v/v en MO, en que la mezcla de odorantes 10C fue recompensada (S+), mientras que la mezcla de odorantes 10C-1 no fue recompensada (S-). En el primer día de entrenamiento, el ratón no alcanzó el criterio de aprendizaje, completando solamente 6 bloques con 70% de aciertos como máximo. Cabe destacar que el animal se acercaba al compartimento de muestreo de odorantes y se retiraba inmediatamente cuando se entregaba el estímulo de odorante, demorando más tiempo en completar los bloques y mostrando una aparente aversión a estas mezclas de odorantes a dicha concentración. Al segundo día de entrenamiento, el comportamiento del animal fue similar al día

anterior. El roedor completó sólo 4 bloques y no alcanzó el criterio de aprendizaje, sino que como máximo logro un 70% de aciertos que disminuyó a 55% en el 4to bloque (Figura 20).

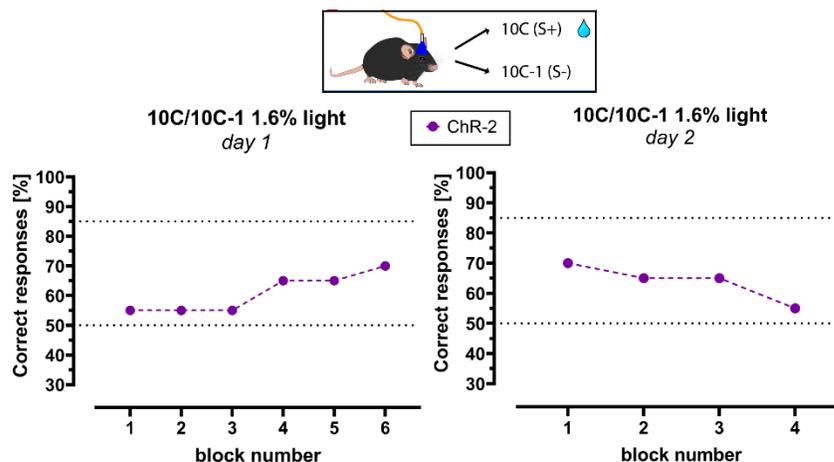


Figura 20. Al activar neuronas del HDB, un roedor no logra discriminar mezclas complejas de odorantes al 1,6% v/v en MO en dos sesiones de entrenamiento. Porcentaje de aciertos del roedor inyectado con el virus que expresa ChR-2 (morado) (n=1) en la prueba de discriminación go/no-go de mezclas complejas de odorantes (10C vs. 10C-1) al 1,6% v/v en MO con fotoestimulación para cada día de entrenamiento (1-2), analizado por bloques de 20 ensayos de cada uno. La mezcla de odorantes 10C fue recompensada con agua (S+), mientras que la mezcla de odorantes 10C-1 no fue recompensada (S-). El animal no alcanzó el criterio de aprendizaje (85% de aciertos) en dos sesiones de entrenamiento.

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Con el objetivo de estudiar el rol de la activación neuronal del BF, particularmente del HDB, en el contexto de la discriminación olfatoria de mezclas complejas de odorantes de composición similar, se utilizaron herramientas de optogenética *in vivo* para modular la actividad neuronal en ratones despiertos.

Inyecciones de AAV en el cerebro basal anterior

Las metodologías convencionales de activación o inhibición neuronal tales como las lesiones y agentes farmacológicos, tienen efectos duraderos e incluso irreversibles sobre las neuronas de una región, impidiendo el análisis con una apropiada resolución temporal que permita estudiar la contribución de una región cerebral en estudios conductuales. Por otro lado, la estimulación con electrodos o campos magnéticos permite una activación precisa temporalmente, pero con una resolución espacial difícil de verificar y que afecta no sólo a todos los tipos neuronales que constituyen una región neuronal, sino que incluso a las proyecciones provenientes de otras regiones cerebrales que atraviesan la zona. En este contexto, el uso de un vector viral para expresar opsinas en neuronas combinado con técnicas genéticas, tiene la ventaja de permitir la activación o inhibición de una población neuronal específica con una precisión de milisegundos (Aravanis y col., 2007).

En este trabajo, se llevó a cabo la activación neuronal del HDB durante una prueba de comportamiento, específicamente al inicio de cada ensayo, para evaluar la hipótesis de que activar neuronas de esta región facilita la discriminación de mezclas complejas de odorantes en ratones.

En primer lugar, se realizaron inyecciones virales utilizando volúmenes decrecientes de AAV para determinar el volumen óptimo a inyectar y de esta manera lograr la expresión

de AAV5-hSyn-ChR-2-m-Cherry en el HDB de ratones. Respecto a los resultados de esta titulación viral, se logró expresar ChR-2 en el HDB al inyectar 1000nL del virus, a pesar de que no pudo ser expresado específicamente en la zona de interés, ya que el virus difundió a otras zonas del BF como la SI, el VP y a regiones más alejadas que no corresponden al BF. Esto resulta problemático si se busca una activación neuronal dirigida a una región en particular, ya que, con un pulso de luz a través de la fibra óptica, se alterará la actividad de otras zonas cerebrales que no tienen que ver solamente con el procesamiento de la información olfatoria y que pueden modular la actividad por retroalimentación hacia el sistema olfatorio. Por ejemplo, la SI y el MCPO proyectan a la neocorteza y amígdala (Zaborszky y col., 1986). De esta manera, si se activan neuronas de esta zona que se ubica cerca del HDB, habrá modulación de la actividad en otras regiones cerebrales que pueden retroalimentar a la corteza piriforme y generar cambios en la percepción y discriminación de olores. Sin embargo, a pesar de que la difusión del virus no se localizó específicamente en la zona de interés, estos resultados fueron útiles para obtener una estimación de la tasa de difusión viral para ser considerada en las inyecciones cerebrales posteriores en que además se implantó la fibra óptica en el cerebro de los roedores. Es así como se determinó que con un volumen de 1000nL de AVV, la magnitud de la difusión radial fue de $0,555\text{mm}^2$, con 500nL fue de $0,491\text{mm}^2$, con 250nL fue de $0,625\text{mm}^2$ y con 100nL fue de $0,339\text{mm}^2$.

Considerando lo anterior, y si bien la tasa de difusión viral indicaba que el volumen óptimo de inyección debiese ser 100nL para expresar ChR-2 específicamente en el HDB, se estableció que el volumen óptimo de virus que debe inyectarse corresponde a 250nL. La razón principal que justifica esta elección se debe a que en estudios anteriores se ha descrito que dos pasos quirúrgicos en la misma cirugía (inyección viral e implante de la

fibra óptica) reducen significativamente el número de neuronas que son infectadas por el virus. Esto es debido a que aumenta la probabilidad de daño tisular y el riesgo de que parte del volumen de virus ascienda en la lesión tisular por capilaridad, además de la posibilidad que siempre está presente, de que la expresión del virus y la fibra óptica no se posicionen en la misma zona del cerebro (Jackman y col., 2018). Por otro lado, si la intervención quirúrgica se hubiera realizado en dos cirugías por separado, la tasa de éxito es aún menor, puesto que aumenta la probabilidad de que la fibra óptica no sea implantada en la misma región del cerebro, además de la implicancia de someter al animal a anestesia profunda por segunda vez.

No obstante, el implante de fibra óptica provee una ventaja en esta estrategia experimental, ya que las neuronas que se activen por fotoestimulación dependerán finalmente de la región donde se ubique el implante, a pesar de que el virus difunda además hacia otras zonas cerebrales fuera del HDB. La estructura cónica generada por la dispersión de la luz en la punta de la fibra óptica (Yizhar y col., 2011) permite solamente la fotoestimulación de las neuronas que se encuentren bajo ésta, otorgando más especificidad a la activación neuronal. Incluso, la fibra óptica limita la zona de fotoestimulación no solo en el eje medial-lateral, sino que también en los ejes anteroposterior y dorsoventral también, debido a la dispersión de la luz en el tejido de mamíferos (Aravanis y col., 2007). Se logró implantar exitosamente 7 animales.

Elección del protocolo de fotoestimulación

El protocolo de fotoestimulación fue diseñado para activar neuronas de manera muy precisa temporalmente, considerando la cinética de la opsina utilizada (ChR2/H124R) (Ver Anexo, Tabla 1). Tomando en cuenta lo anterior, se optó por fotoestimular mediante un tren de pulsos de 15ms con una frecuencia de 20Hz por 3s, permitiendo que el influjo

de cationes a través de ChR-2 despolarice a las neuronas durante la fotoestimulación. Además, se calibró la potencia de cada fibra óptica de acople sin el implante de fibra óptica y luego con éste, verificando que ocurre una pérdida de potencia debida a estas conexiones. De esta manera, se ajustó la intensidad de corriente con cada fibra óptica para transmitir la misma potencia en cada caso. Se utilizó una irradiancia de $30\text{mW}/\text{mm}^2$. A pesar de que ocurre un aumento de temperatura en el tejido cerebral cuando se entregan pulsos de luz, estos cambios son poco relevantes como para causar daño tisular ($0.2\text{-}2^\circ\text{C}$, de $3\text{-}30\text{mW}/\text{mm}^2$), pero suficientemente intensos como para poder provocar cambios fisiológicos como alteraciones en el potencial de campo y cambios conductuales en los individuos (Moser y col., 1993; Long & Fee, 2008), debido a que muchos procesos neuronales son dependientes de temperatura, incluyendo la conductancia de canales y la transmisión sináptica (Owen y col., 2019). Por otro lado, se ha descrito un modelo que predice que períodos largos de luz continua ($>100\text{ms}$) comúnmente utilizados para la inhibición optogenética, causan un incremento de la temperatura considerable a potencias de luz bajas ($3\text{-}5\text{mW}/\text{mm}^2$), mientras que potencias más altas ($\geq 30\text{ mW}$) causan un incremento mínimo de la temperatura cuando la duración de cada pulso es menor que 100ms (Stujenske y col., 2015). Según este modelo, a una frecuencia de estimulación de 20Hz con trenes de pulsos de luz de 10ms en un tiempo total de 10s con una potencia de 15mW , el aumento de temperatura es mínimo comparado al aplicar luz a una potencia de 15mW por trenes de pulsos de mayor duración (Owen y col., 2019). Por estas razones, el protocolo de fotoestimulación de este estudio consistió en pulsos de 30mW a 20Hz por 3s . Considerando las características físicas de la fibra óptica utilizada y propiedades del tejido cerebral de mamífero como densidad y calor específico, se determinó según los cálculos descritos en estudios anteriores (Yizhar y col., 2011) que el aumento máximo de temperatura en la punta de

la fibra óptica implantada es de aproximadamente $0,71^{\circ}\text{C}$ luego de los 3s de fotoestimulación en nuestro protocolo. Aunque esta magnitud es baja y el aumento de temperatura del tejido neuronal por efecto lumínico es bastante lento (Stujenske y col., 2015), se utilizaron ratones al que se le inyectó el virus control y que también fueron fotoestimulados para descartar la variable del efecto térmico en la estimulación del tejido cerebral.

Discriminación de mezclas complejas de odorantes

Los resultados obtenidos de los entrenamientos conductuales podrían indicar que la activación neuronal del HDB facilita la discriminación olfatoria de mezclas complejas de odorantes a una concentración a la que los ratones C57BL/6J no son capaces de discriminar (0,16% v/v en MO), según estudios anteriores del laboratorio (Becerra, 2019). Sin embargo, para corroborar esta afirmación es necesario aumentar el número de muestra y realizar esta prueba conductual con ratones inyectados con el virus control para comparar los resultados con el animal inyectado con el virus que expresa ChR-2 y con los estudios anteriores mencionados. Por otro lado, la activación neuronal del HDB reflejó una aparente aversión hacia estas mezclas a una concentración a la que los ratones C57BL/6J logran realizar la prueba (1,6% v/v en MO) (Becerra, 2019). Sin embargo, es necesario aumentar el número de muestra y realizar esta prueba con animales inyectados con el virus control.

Recientemente se determinó que el número de neuronas del BF que cambian su tasa de disparo aumenta a medida que el animal aprende a discriminar odorantes en una prueba go/no-go. En cambio, en una prueba go/go, en la que los roedores reciben recompensa de agua sin importar el estímulo que se presenta, la tasa de disparo de las neuronas del BF disminuye (Nunez-Parra y col., 2020), indicando que la actividad neuronal del BF se

relaciona con la conducta asociada a la obtención de un resultado correcto en una prueba de discriminación olfatoria.

Se ha determinado que la discriminación de mezclas de odorantes u odorantes monomoleculares puede ocurrir a distintos niveles de procesamiento del sistema olfatorio; a nivel del OB, PC o ambos, dependiendo de las diferencias entre los compuestos utilizados en cada prueba. Esta discriminación olfatoria implica un proceso de aprendizaje y plasticidad sináptica en que, a través de una consecuencia fisiológica relevante para los individuos, en este caso, la recompensa de agua, los animales aprenden a discriminar estímulos olfatorios muy similares (Chapuis & Wilson, 2012; Weiss y col., 2012).

Los resultados obtenidos en este estudio indicarían que el 85% de los ratones C57BL/6J implantados pueden completar una prueba go/no-go simple (ISO/MO) en tres sesiones de entrenamiento. Con fotoestimulación, ratones que expresan ChR-2 en el HDB y ratones controles logran completar la misma prueba anterior en dos sesiones de entrenamiento. Debido al bajo número de muestra, no fue posible realizar análisis estadísticos. Sin embargo, según los gráficos presentados para esta prueba, con fotoestimulación los ratones implantados alcanzan el criterio de aprendizaje en un día menos que sin fotoestimulación. Sin embargo, no es posible asociar este mayor rendimiento a la fotoestimulación, debido a que la preexposición de los odorantes por sí sola puede mejorar el rendimiento de los animales (Mandairon y col., 2006; Becerra, 2019). No obstante, el objetivo de esta prueba inicial (ISO/MO) fue principalmente que cada individuo aprendiera la dinámica del entrenamiento y se habituara al sistema de optogenética *in vivo* para luego incrementar la dificultad de la prueba, razón por la que posteriormente se realizó la prueba go/no-go utilizando otro par de estímulos olfatorios

(PHEN vs 2-BUT). En esta prueba, en que se realizó fotoestimulación, todos los ratones implantados alcanzaron el criterio de aprendizaje al segundo día de entrenamiento.

Con respecto a la prueba go/no-go con mezclas complejas de odorantes (10C/10C-1), sólo un ratón, que expresaba ChR-2 en el HDB, fue sometido a este entrenamiento. El animal logró discriminar estos estímulos muy similares y lograr el criterio de aprendizaje al primer día a la concentración de 0,16% v/v en MO, luego de someterse a una preexposición de dichas mezclas a dos concentraciones distintas (0,16% y 1,6% v/v en MO). Esta preexposición se llevó a cabo debido a inconvenientes con el olfactómetro que obligaron a repetir la prueba posteriormente. Este resultado implicaría una disminución del umbral de discriminación olfatoria, ya que anteriormente se determinó que ratones C57BL/6J no logran discriminar esta mezcla de odorantes al 0,16% v/v en MO luego de dos días de entrenamiento (Becerra, 2019). Sin embargo, el número de muestra es demasiado pequeño para atribuir este resultado a la activación neuronal del HDB, considerando que los ratones controles no pudieron ser sometidos a esta prueba para ser comparados.

Por otro lado, el mismo roedor mostró un comportamiento aversivo cuando fue expuesto a las mezclas 10C/10-C al 1,6% v/v en MO, luego de ser preexpuesto a dichas mezclas de odorantes como se mencionó anteriormente. Si al aumentar el número de muestra se observara la misma conducta en ratones implantados al activar neuronas del HDB y no en ratones inyectados con el virus control, se podría deber a que al activar neuronas del HDB, se modularía la actividad fásica de neuronas no-colinérgicas del BF, que cumplen un rol en la codificación de la saliencia motivacional hacia señales confiables de predicción de recompensa, independiente de las respuestas motoras asociadas (go/no-go) o el valor hedónico de estas señales (recompensa o castigo) (Lin & Nicolelis, 2008).

Además, la activación de las fibras glutamatérgicas del BF, que proyectan a regiones cerebrales relacionadas a la generación de comportamientos aversivos, puede influir en la percepción de estos estímulos olfatorios. De esta manera, la activación neuronal del HDB podría alterar la percepción de estas mezclas de odorantes a una concentración del 1,6% v/v en MO y otorgarles un valor hedónico aversivo o una menor saliencia motivacional. Cabe destacar que este comportamiento aversivo fue observado en estudios anteriores empleando las mismas mezclas complejas con ratones C57BL/6J a una concentración de 16% v/v en MO (Becerra, 2019). Sin embargo, es posible que esta conducta sea resultado de la variabilidad poblacional, ya que no fue posible comparar con el grupo control. Por lo tanto, es necesario aumentar el número de muestra para comparar estos resultados con el grupo control y con los obtenidos anteriormente en el laboratorio.

Rol de las neuronas colinérgicas del BF en la discriminación olfatoria

Se ha sugerido que la discriminación de estas mezclas complejas de odorantes es resuelta a nivel de la PC y no a nivel del MOB. Con registros electrofisiológicos utilizando animales anestesiados, se observó que al remover un componente de los 10 odorantes de esta mezcla, las neuronas mitrales del MOB se activan significativamente de manera distinta con cada compuesto que es removido. Sin embargo, las Pyr de la PC no se activan diferencialmente al remover los componentes de la mezcla, sugiriendo que los ensambles de activación neuronales completan las señales (compleción de patrones) y son percibidas como si la mezcla estuviera presente con todos sus componentes. Incluso, al remover más componentes los ensambles se activan de manera diferencial más fuertemente en la PC que en el MOB (Barnes y col., 2008; Wilson, 2009). Por lo tanto, aunque las Pyr responden diferencialmente a mezclas similares de este tipo con

sobrelape de activación, el conjunto de actividad neuronal ignora esta diferencia de variaciones en los estímulos y genera una compleción de patrones que es fundamental para la estabilidad perceptual, lo que explicaría la dificultad de la prueba go/no-go empleando mezclas complejas inicialmente.

Sin embargo, dependiendo de la experiencia, con una consecuencia relevante fisiológica como la recompensa de agua, se lograrían modificar los patrones de activación cortical. Se ha propuesto que inicialmente el nivel de activación de las neuronas colinérgicas en el BF frente a un estímulo de odorante nuevo es alto. Luego de ~80ms, la activación de Pyr inhibe parcialmente a las neuronas colinérgicas del BF. Al mismo tiempo, la modulación por ACh promueve gradualmente la potenciación a largo plazo (LTP) entre las conexiones auto-asociativas de Pyr (de Almeida y col, 2016). Por lo tanto, la actividad de cada Pyr refleja no solo la combinación de características del odorante percibido, sino que también recapitula la activación cortical de neuronas que se coactivaron con ese estímulo (Wilson & Sullivan, 2011). Cuando un odorante es percibido, integrado y recordado, las sinapsis recurrentes entre Pyr que se activaron se fortalecen y aumentan su actividad, inhibiendo a las neuronas colinérgicas del BF y reduciendo la modulación por ACh, disminuyendo la plasticidad sináptica y restaurando la transmisión de señales entre las conexiones auto-asociativas de Pyr, recordando ese percepto olfatorio. De esta manera, el circuito neuronal fluctúa entre los estados de aprender y recordar con cada estímulo olfatorio al que es expuesto el individuo. En general, la representación de la activación neuronal de este odorante en la red cortical es más fuerte y específica como resultado de la plasticidad sináptica (de Almeida y col., 2013). Por otro lado, la modulación colinérgica en la PC afecta fuertemente las representaciones de activación neuronal del odorante en el MOB, donde se generan señales distribuidas y sincrónicas

hacia la PC durante el aprendizaje, pero sin generar el recuerdo, es decir, sin integrar la información a nivel del MOB (de Almeida y col., 2016). Por lo tanto, en la prueba de discriminación go/no-go de mezclas complejas de odorantes, gradualmente mejoraría la distinción entre los estímulos de odorantes en el transcurso del entrenamiento conductual, produciendo la separación de estos patrones de activación y mejorando la agudeza perceptual (Chapuis & Wilson, 2012; 2013). De esta forma, las señales colinérgicas desde el BF hacia regiones del sistema olfatorio retroalimentan las respuestas a los estímulos y serían necesarios para la discriminación de odorantes.

Además de los efectos neuromodulatorios del BF sobre la corteza olfatoria, en regiones más tempranas del procesamiento de esta información, como el MOB, también existe evidencia de estudios de registros electrofisiológicos con animales anestesiados, en que se observó que la activación de receptores colinérgicos en el MOB aumenta el número de MC que responden diferencialmente a odorantes similares, regulando los campos receptivos a odorantes en las MC y aumentando la capacidad de discriminar estímulos olfatorios al cambiar las representaciones de éstos, que puede interpretarse además como un aumento en la atención del individuo frente a estos estímulos (Chaudhury y col., 2009). También, en otro estudio en que se activaron fibras colinérgicas del HDB en animales anestesiados, se observó una mayor excitación de las MC en reposo y frente a estímulos de odorantes de manera diferencial, sugiriendo que las fibras colinérgicas desde BF hacia el MOB podrían permitir filtrar la información sensorial, disminuyendo la actividad neuronal generada frente a estímulos basales o no relevantes y aumentando la actividad generada frente a estímulos relevantes según el contexto del individuo (Rothermel y col., 2014). Incluso, mediante registros electrofisiológicos utilizando animales despiertos, en que se realizó una prueba de discriminación activa, se determinó

que existen cambios en la actividad de MC que permitirían transmitir señales según el valor hedónico de un olor si éste es recompensado (Doucette y col., 2011).

Esta serie de estudios dan sustento a la hipótesis de que activar neuronas del HDB en ratones facilitarían la discriminación de estímulos de mezclas complejas de odorantes comparado con el grupo control. Sin embargo, es necesario aumentar el número de muestra para atribuir los resultados obtenidos, en parte, al rol de las neuronas colinérgicas del HDB como facilitadoras de la capacidad de discriminar odorantes similares.

Rol de las neuronas GABAérgicas del BF en la discriminación olfatoria

Estudios recientes utilizando animales anestesiados afirman que la activación de fibras GABAérgicas del HDB hasta el MOB inhibe la actividad de MC, pero mejora la respuesta frente a estímulos de odorantes. También, aumentan la amplitud de disparo por cada olfateo e inhiben las tasas de disparo mientras no se olfatea (Böhm y col., 2020). Por lo tanto, las fibras GABAérgicas del HDB que proyectan al MOB probablemente aumentan la relación señal/ruido de las MC al inhibir señales entrantes débiles y facilitar señales más robustas, siendo fundamental en los procesos atencionales (Böhm y col., 2020).

Además, se ha descrito que la inhibición farmacológica selectiva *in vivo* de neuronas de proyección GABAérgicas en el HDB dificulta la discriminación de odorantes similares estructuralmente (Nunez-Parra y col., 2013) y que los aferentes GABAérgicos del HDB inhiben a las GC (Nunez-Parra y col., 2013; Sanz Diez y col., 2019). La inhibición de este tipo de interneuronas podría generar una desinhibición de las MC y ET, que podría explicar la excitación de MC con la activación de fibras GABAérgicas del HDB (Böhm y col., 2020), mejorando la discriminación de odorantes. Estos estudios también darían sustento a la hipótesis de que al activar neuronas del HDB, a pesar de que no sea a un

tipo neuronal en específico, modificaría la red neuronal mejorando la discriminación de odorantes frente a mezclas complejas.

Las interneuronas inhibitorias de las PC son cruciales en el proceso de discriminación de estímulos olfatorios y el aprendizaje, permitiendo el restablecimiento del equilibrio entre excitación e inhibición y para mantener la estabilidad de la red neuronal. A medida que el animal aprende a discriminar estímulos olfatorios, la actividad de estas interneuronas aumenta, permitiendo a la red cortical integrar y recordar la información olfatoria sin provocar un estado hiperexcitable y podría ser un mecanismo para prevenir la conectividad sináptica indeseable (Brosh & Barkai, 2009).

Proyecciones

El BF no proyecta sus axones únicamente a regiones destinadas al procesamiento de la información olfatoria, sino que también a múltiples sitios del cerebro, como a gran parte de la corteza y al hipocampo (Zaborszky y col., 2012). Incluso, se han realizado registros electrofisiológicos de neuronas colinérgicas del BF en animales despiertos con su cabeza fijada mientras son sometidos a una prueba go/no-go de discriminación auditiva, en que se demostró que las neuronas colinérgicas del BF responden precisamente a la recompensa (agua) y al castigo del entrenamiento (pulso de aire), que son moduladas por la expectativa del individuo (Hangya y col., 2015), sugiriendo que el sistema colinérgico del BF puede transmitir señales que participarían en procesos cognitivos no sólo asociados a estímulos olfatorios.

AAV retrógrados para otorgar selectividad en la activación neuronal

Al inyectar AAV en el BF se produce la expresión de ChR-2 en neuronas que proyectan a diferentes regiones del cerebro. Por lo tanto, al activar las neuronas del BF con la metodología descrita en este estudio, ocurre una modulación de la transmisión sináptica

en otras regiones del cerebro además del sistema olfatorio. Por esta razón, una buena estrategia para futuros estudios sería utilizar un AAV de transporte retrógrado, es decir, que difunda desde el terminal sináptico de las neuronas infectadas, a lo largo de sus axones, hasta el citoplasma de estas neuronas (Kaspar y col., 2002; Tervo y col., 2016). De esta forma, se podría inyectar el virus en terminales axónicos de neuronas piramidales de la corteza piriforme, donde se expresaría ChR-2 en las membranas de somas y axones que proyectan al HDB, infectando a los somas de neuronas de dicha región. Considerando que la corteza piriforme recibe exclusivamente proyecciones del HDB, se podría activar más específicamente a las neuronas del BF que proyectan a la PC.

Expresión de AAV bajo promotores específicos para otorgar especificidad

Para estudiar el rol específico de una población neuronal del HDB en la discriminación olfatoria, se podrían emplear animales transgénicos que expresen la recombinasa Cre bajo un promotor específico de una población neuronal e inyectar en el cerebro de estos animales un AAV Cre-dependiente. Estos AAV contienen el gen de la opsina invertida con secuencias repetidas en ambos extremos. Al infectar una neurona que expresa Cre, el gen que codifica para la opsina se invertirá irreversiblemente y permitirá la expresión génica de la opsina solamente en aquella población neuronal (Zhang y col., 2010). Por ejemplo, para activar específicamente proyecciones colinérgicas o GABAérgicas del BF al MOB, se podría utilizar ratones transgénicos que expresen Cre bajo el control de ChAT (ChAT-Cre) o GAD2 (GAD2-Cre), respectivamente (Rossi y col., 2011; Taniguchi y col., 2011).

Electrofisiología y Optogenética in vivo

Las fibras ópticas implantables pueden utilizarse junto con electrodos múltiples para acoplar el protocolo experimental de fotoestimulación *in vivo* con electrofisiología *in vivo* (Kravitz & Kreitzer, 2011). Estas técnicas podrían utilizarse para inyectar AAV en el HDB, activar las neuronas a través de una fibra óptica implantada en esta zona del cerebro, y simultáneamente registrar la actividad neuronal mediante electrodos implantados en la PC o el MOB. De esta manera, se podría determinar el efecto fisiológico de la modulación de la actividad neuronal del HDB en neuronas de regiones involucradas al procesamiento de información olfatoria durante el comportamiento del animal en la prueba go/no-go.

Fotometría de fibra óptica

Otra técnica que puede utilizarse para registrar en tiempo real la actividad de las neuronas del HDB en un entrenamiento conductual, es la fotometría de fibra óptica. Mediante indicadores de activación neuronal, estas señales son traducidas a señales fluorescentes que se transmiten a través de la fibra óptica implantada en el cerebro del animal y son detectadas mediante un detector (Guo y col., 2015), pudiendo alcanzar regiones cerebrales profundas como el HDB. Las neuronas, al activarse de manera colectiva y sincrónica frente a estímulos externos o internos (Gunaydin y col., 2014), producen grandes cambios en las señales de calcio. Existen indicadores de calcio codificados genéticamente (GECIs) como las proteínas GCaMP (Chen y col., 2013) que permiten registrar la actividad de dendritas, axones y somas de neuronas de una población determinada a través de fotometría utilizando animales en libre movimiento (Kim y col., 2016).

CONCLUSIONES

En este estudio se logró implementar un sistema de optogenética *in vivo* con el objetivo de estudiar el rol de la activación neuronal del HDB en el contexto de la discriminación olfatoria de mezclas complejas de odorantes empleando animales en libre movimiento. Con un mayor número de muestra, este sería el primer estudio enfocado en determinar el rol de esta región cerebral en el sistema olfatorio utilizando animales despiertos y abre la posibilidad a la realización de más estudios que sustenten la participación del HDB y de cada población neuronal específica en la discriminación de odorantes para dilucidar los mecanismos de modulación neuronal de esta área en el procesamiento olfatorio.

Los resultados obtenidos sugerirían que el 85% de ratones implantados aprende a discriminar entre isoamilacetato y aceite mineral en tres sesiones de la prueba go/no-go. Al activar neuronas del HDB, el total de los animales implantados que expresan ChR-2 aprenderían a discriminar estos estímulos en dos sesiones de entrenamiento y entre fenilacetato y 2-butanona en dos sesiones de entrenamiento. Finalmente, en el único sujeto experimental en el cual se activaron neuronas del HDB durante la prueba de discriminación de mezclas complejas de odorantes, se observó un aumento de la sensibilidad olfativa. Más experimentos son necesarios para comprobar esta hipótesis, comparándolos con animales inyectados con el virus control.

La prueba de discriminación olfatoria go/no-go con mezclas complejas de odorantes genera un proceso de aprendizaje en los animales sedientos frente a una consecuencia fisiológica que en este caso es la recompensa de agua. Inicialmente es una prueba compleja para los roedores, ya que son estímulos olfatorios similares. Sin embargo, en el transcurso del entrenamiento, la experiencia del animal mejoría la agudeza perceptual. Si al aumentar el número de muestra se observara el mismo desempeño observado, se

podría afirmar que este proceso estaría facilitado por la activación neuronal del HDB, en el que se encuentran fibras neuromodulatorias que proyectan hacia regiones del sistema olfatorio y que retroalimentarían las respuestas a los estímulos.

REFERENCIAS

Agostinelli, L. J., Geerling, J. C., & Scammell, T. E. (2019). Basal forebrain subcortical projections. *Brain Structure and Function*, 224(3), 1097-1117.

Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H., & Deisseroth, K. (2009). Temporally precise *in vivo* control of intracellular signalling. *Nature*, 458(7241), 1025-1029.

Aravanis, A. M., Wang, L. P., Zhang, F., Meltzer, L. A., Mogri, M. Z., Schneider, M. B., & Deisseroth, K. (2007). An optical neural interface: *in vivo* control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *Journal of Neural Engineering*, 4(3), S143.

Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Beauchamp, G. K., & Tordoff, M. G. (2002). Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behavior genetics*, 32(6), 435-443.

Becerra, D. (2019). *Active olfactory discrimination between chemically similar cues in behaving mice*. (Tesis de magíster). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Barnes, D. C., Hofacer, R. D., Zaman, A. R., Rennaker, R. L., & Wilson, D. A. (2008). Olfactory perceptual stability and discrimination. *Nature Neuroscience*, 11(12), 1378.

Berditchevskaia, A., Cazé, R. D., & Schultz, S. R. (2016). Performance in a GO/NOGO perceptual task reflects a balance between impulsive and instrumental components of behaviour. *Scientific Reports*, 6, 27389.

Bestvater, F., Spiess, E., Stobrawa, G., Hacker, M., Feurer, T., Porwol, T., ... & Acker, H. (2002). Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging. *Journal of Microscopy*, 208(2), 108-115.

Blauvelt, D. G., Sato, T. F., Wienisch, M., & Murthy, V. N. (2013). Distinct spatiotemporal activity in principal neurons of the mouse olfactory bulb in anesthetized and awake states. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 46.

Bodyak, N., & Slotnick, B. (1999). Performance of mice in an automated olfactometer: odor detection, discrimination and odor memory. *Chemical Senses*, 24(6), 637-645.

Böhm, E., Brunert, D., & Rothermel, M. (2020). Input dependent modulation of olfactory bulb activity by HDB GABAergic projections. *Scientific Reports*, 10(1), 1-15.

- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005).** Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263-1268.
- Brosh, I., & Barkai, E. (2009).** Learning-induced enhancement of feedback inhibitory synaptic transmission. *Learning & Memory*, 16(7), 413-416.
- Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2012).** Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, 92(3), 1087.
- Butt, H. J., Fendler, K., Bamberg, E., Tittor, J., & Oesterhelt, D. (1989).** Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump. *The EMBO Journal*, 8(6), 1657-1663.
- Buzsaki, G. Y., Bickford, R. G., Ponomareff, G., Thal, L. J., Mandel, R., & Gage, F. H. (1988).** Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *Journal of Neuroscience*, 8(11), 4007-4026.
- Chapuis, J., & Wilson, D. A. (2012).** Bidirectional plasticity of cortical pattern recognition and behavioral sensory acuity. *Nature Neuroscience*, 15(1), 155.
- Chapuis, J., & Wilson, D. A. (2013).** Cholinergic modulation of olfactory pattern separation. *Neuroscience Letters*, 545, 50-53.
- Chaudhury, D., Escanilla, O., & Linster, C. (2009).** Bulbar acetylcholine enhances neural and perceptual odor discrimination. *Journal of Neuroscience*, 29(1), 52-60.
- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., ... & Looger, L. L. (2013).** Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295-300.
- Chu, M. W., Li, W. L., & Komiyama, T. (2017).** Lack of pattern separation in sensory inputs to the olfactory bulb during perceptual learning. *Eneuro*, 4(5).
- Cleland, T. A., & Linster, C. (2005).** Computation in the olfactory system. *Chemical Senses*, 30(9), 801-813.
- Cleland, T. A., & Sethupathy, P. (2006).** Non-topographical contrast enhancement in the olfactory bulb. *BMC Neuroscience*, 7(1), 1-18.
- Clevenger, A. C., & Restrepo, D. (2006).** Evaluation of the validity of a maximum likelihood adaptive staircase procedure for measurement of olfactory detection threshold in mice. *Chemical Senses*, 31(1), 9-26.
- Conner, J. M., Culberson, A., Packowski, C., Chiba, A. A., & Tuszynski, M. H. (2003).** Lesions of the basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron*, 38(5), 819-829.

- de Almeida, L., Idiart, M., & Linster, C.** (2013). A model of cholinergic modulation in olfactory bulb and piriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, *109*(5), 1360-1377.
- de Almeida, L., Idiart, M., Dean, O., Devore, S., Smith, D. M., & Linster, C.** (2016). Internal cholinergic regulation of learning and recall in a model of olfactory processing. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*, 256.
- Deisseroth, K.** (2010). Controlling the brain with light. *Scientific American*, *303*(5), 48-55.
- Dittgen, T., Nimmerjahn, A., Komai, S., Licznarski, P., Waters, J., Margrie, T. W., ... & Osten, P.** (2004). Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(52), 18206-18211.
- Do, J. P., Xu, M., Lee, S. H., Chang, W. C., Zhang, S., Chung, S., ... & Dan, Y.** (2016). Cell type-specific long-range connections of basal forebrain circuit. *Elife*, *5*, e13214.
- Doucette, W., Gire, D. H., Whitesell, J., Carmean, V., Lucero, M. T., & Restrepo, D.** (2011). Associative cortex features in the first olfactory brain relay station. *Neuron*, *69*(6), 1176-1187.
- Escanilla, O., Arrellanos, A., Karnow, A., Ennis, M., & Linster, C.** (2010). Noradrenergic modulation of behavioral odor detection and discrimination thresholds in the olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, *32*(3), 458-468.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W.** (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annual Review of Psychology*, *48*(1), 649-684.
- Freund, T. F., & Meskenaite, V.** (1992). gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(2), 738-742.
- Fuentes, R. A., Aguilar, M. I., Aylwin, M. L., & Maldonado, P. E.** (2008). Neuronal activity of mitral-tufted cells in awake rats during passive and active odorant stimulation. *Journal of Neurophysiology*, *100*(1), 422-430.
- Giocomo, L. M., & Hasselmo, M. E.** (2007). Neuromodulation by glutamate and acetylcholine can change circuit dynamics by regulating the relative influence of afferent input and excitatory feedback. *Molecular Neurobiology*, *36*(2), 184-200.
- Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., & Hensch, T. K.** (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *1*(2), 172-181.
- Gracia-Llanes, F. J., Crespo, C., Blasco-Ibáñez, J. M., Nacher, J., Varea, E., Rovira-Esteban, L., & Martínez-Guijarro, F. J.** (2010). GABAergic basal forebrain afferents

innervate selectively GABAergic targets in the main olfactory bulb. *Neuroscience*, 170(3), 913-922.

Gritti, I., Mainville, L., & Jones, B. E. (1993). Codistribution of GABA-with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 329(4), 438-457.

Gritti, I., Henny, P., Galloni, F., Mainville, L., Mariotti, M., & Jones, B. E. (2006). Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience*, 143(4), 1051-1064.

Grossberg, S., Palma, J., & Versace, M. (2016). Resonant cholinergic dynamics in cognitive and motor decision-making: attention, category learning, and choice in neocortex, superior colliculus, and optic tectum. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 501.

Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., ... & Tye, K. M. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, 157(7), 1535-1551.

Guo, Q., Zhou, J., Feng, Q., Lin, R., Gong, H., Luo, Q., ... & Fu, L. (2015). Multi-channel fiber photometry for population neuronal activity recording. *Biomedical Optics Express*, 6(10), 3919-3931.

Guttman, R., Lieblich, I., & Gross, R. (1975). Behavioral correlates of estrous cycle stages in laboratory mice. *Behavioral Biology*, 13(1), 127-132.

Hangya, B., Ranade, S. P., Lorenc, M., & Kepecs, A. (2015). Central cholinergic neurons are rapidly recruited by reinforcement feedback. *Cell*, 162(5), 1155-1168.

Henny, P., & Jones, B. E. (2006). Vesicular glutamate (VGlut), GABA (VGAT), and acetylcholine (VACht) transporters in basal forebrain axon terminals innervating the lateral hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 496(4), 453-467.

Hur, E. E., & Zaborszky, L. (2005). Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization. *Journal of Comparative Neurology*, 483(3), 351-373.

Imai, T., & Sakano, H. (2007). Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(5), 507-515.

Jackman, S. L., Chen, C. H., Chettih, S. N., Neufeld, S. Q., Drew, I. R., Agba, C. K., ... & Roberston, K. (2018). Silk fibroin films facilitate single-step targeted expression of optogenetic proteins. *Cell Reports*, 22(12), 3351-3361.

Klinkenberg, I., Sambeth, A., & Blokland, A. (2011). Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 430-442.

- Kaspar, B. K., Erickson, D., Schaffer, D., Hinh, L., Gage, F. H., & Peterson, D. A.** (2002). Targeted retrograde gene delivery for neuronal protection. *Molecular Therapy*, 5(1), 50-56.
- Kay, L. M., & Sherman, S. M.** (2007). An argument for an olfactory thalamus. *Trends in Neurosciences*, 30(2), 47-53.
- Kim, C. K., Yang, S. J., Pichamoorthy, N., Young, N. P., Kauvar, I., Jennings, J. H., ... & Davidson, T. J.** (2016). Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nature Methods*, 13(4), 325-328.
- Kravitz, A. V., & Kreitzer, A. C.** (2011). Optogenetic manipulation of neural circuitry *in vivo*. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(3), 433-439.
- Lazaridis, I., Tzortzi, O., Weglage, M., Martin, A., Xuan, Y., Parent, M., ... & Ramakrishnan, C.** (2019). A hypothalamus-habenula circuit controls aversion. *Molecular Psychiatry*, 24(9), 1351-1368.
- Lee, S. H., & Dan, Y.** (2012). Neuromodulation of brain states. *Neuron*, 76(1), 209-222.
- Li, A., Rao, X., Zhou, Y., & Restrepo, D.** (2020). Complex neural representation of odour information in the olfactory bulb. *Acta Physiologica*, 228(1), e13333.
- Lin, S. C., & Nicolelis, M. A.** (2008). Neuronal ensemble bursting in the basal forebrain encodes salience irrespective of valence. *Neuron*, 59(1), 138-149.
- Linster, C., & Devore, S.** (2012). Noradrenergic and cholinergic modulation of olfactory bulb sensory processing. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 52.
- Long, M. A., & Fee, M. S.** (2008). Using temperature to analyse temporal dynamics in the songbird motor pathway. *Nature*, 456(7219), 189-194.
- Luchicchi, A., Bloem, B., Viaña, J. N. M., Mansvelter, H. D., & Role, L. W.** (2014). Illuminating the role of cholinergic signaling in circuits of attention and emotionally salient behaviors. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 6, 24.
- Luskin, M. B., & Price, J. L.** (1982). The distribution of axon collaterals from the olfactory bulb and the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band to the olfactory cortex, demonstrated by double retrograde labeling techniques. *Journal of Comparative Neurology*, 209(3), 249-263.
- Ma, M., & Luo, M.** (2012). Optogenetic activation of basal forebrain cholinergic neurons modulates neuronal excitability and sensory responses in the main olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 32(30), 10105-10116.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B.** (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713-723.

Mandairon, N., Stack, C., & Linster, C. (2006). Olfactory enrichment improves the recognition of individual components in mixtures. *Physiology & Behavior*, *89*(3), 379-384.

McCormick, D. A., Nestvogel, D. B., & He, B. J. (2020). Neuromodulation of Brain State and Behavior. *Annual Review of Neuroscience*, *43*.

McKenna, J. T., Yang, C., Bellio, T., Anderson-Chernishof, M. B., Gamble, M. C., Hulverson, A., ... & Brown, R. E. (2020). Characterization of basal forebrain glutamate neurons suggests a role in control of arousal and avoidance behavior. *BioRxiv*.

Mombaerts, P. (2006). Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annual review of cell and developmental biology*, *22*, 713-737.

Moser, E., Mathiesen, I., & Andersen, P. (1993). Association between brain temperature and dentate field potentials in exploring and swimming rats. *Science*, *259*(5099), 1324-1326.

Mori, K., Takahashi, Y. K., Igarashi, K. M., & Yamaguchi, M. (2006). Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. *Physiological Reviews*, *86*(2), 409-433.

Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., & Hegemann, P. (2002). Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, *296*(5577), 2395-2398.

Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J. F., Adeishvili, N., Bamberg, E., & Gottschalk, A. (2005). Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current Biology*, *15*(24), 2279-2284.

Nieuwenhuis, B., Haenzi, B., Hilton, S., Carnicer-Lombarte, A., Hobo, B., Verhaagen, J., & Fawcett, J. W. (2020). Optimization of adeno-associated viral vector-mediated transduction of the corticospinal tract: comparison of four promoters. *Gene Therapy*, 1-19.

Nunez-Parra, A., Maurer, R. K., Krahe, K., Smith, R. S., & Araneda, R. C. (2013). Disruption of centrifugal inhibition to olfactory bulb granule cells impairs olfactory discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(36), 14777-14782.

Nunez-Parra, A., Cea-Del Rio, C. A., Huntsman, M. M., & Restrepo, D. (2020). The basal forebrain modulates neuronal response in an active olfactory discrimination task. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 141.

Ogg, M. C., Ross, J. M., Bendahmane, M., & Fletcher, M. L. (2018). Olfactory bulb acetylcholine release dishabituates odor responses and reinstates odor investigation. *Nature communications*, *9*(1), 1-11.

- Owen, S. F., Liu, M. H., & Kreitzer, A. C.** (2019). Thermal constraints on *in vivo* optogenetic manipulations. *Nature Neuroscience*, 22(7), 1061-1065.
- Paul, S., Jeon, W. K., Bizon, J. L., & Han, J. S.** (2015). Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 43.
- Paxinos, G., & Watson, C.** (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edR* Academic Press. New York.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B.** (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Gulf Professional Publishing.
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S.** (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116-129.
- Pinto, L., Goard, M. J., Estandian, D., Xu, M., Kwan, A. C., Lee, S. H., ... & Dan, Y.** (2013). Fast modulation of visual perception by basal forebrain cholinergic neurons. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1857-1863.
- Puigbò, J. Y., Arsiwalla, X. D., González-Ballester, M. A., & Verschure, P. F. M. J.** (2020). Switching Operation Modes in the Neocortex via Cholinergic Neuromodulation. *Molecular Neurobiology*, 57(1), 139-149.
- Rinberg, D., & Gelperin, A.** (2006). Olfactory neuronal dynamics in behaving animals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17(4), 454.
- Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C. E., ... & Elmquist, J. K.** (2011). Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, 13(2), 195-204.
- Rothermel, M., Carey, R. M., Puche, A., Shipley, M. T., & Wachowiak, M.** (2014). Cholinergic inputs from Basal forebrain add an excitatory bias to odor coding in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 34(13), 4654-4664.
- Sakano, H.** (2010). Neural map formation in the mouse olfactory system. *Neuron*, 67(4), 530-542.
- Sanchez-Andrade, G., & Kendrick, K. M.** (2009). The main olfactory system and social learning in mammals. *Behavioural Brain Research*, 200(2), 323-335.
- Sanz Diez, A., Najac, M., & De Saint Jan, D.** (2019). Basal forebrain GABAergic innervation of olfactory bulb periglomerular interneurons. *The Journal of Physiology*, 597(9), 2547-2563.

- Sarter, M., & Bruno, J. P.** (2002). The neglected constituent of the basal forebrain corticopetal projection system: GABAergic projections. *European Journal of Neuroscience*, *15*(12), 1867-1873.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Tinevez, J. Y.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676-682.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y.** (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, *22*(12), 1567-1572.
- Slotnick, B., & Restrepo, D.** (2005). Olfactometry with mice. *Current Protocols in Neuroscience*, *33*(1), 8-20.
- Sohal, V. S., & Rubenstein, J. L.** (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Molecular psychiatry*, *24*(9), 1248-1257.
- Sparta, D. R., Stamatakis, A. M., Phillips, J. L., Hovelsø, N., Van Zessen, R., & Stuber, G. D.** (2012). Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits. *Nature Protocols*, *7*(1), 12.
- Stujenske, J. M., Spellman, T., & Gordon, J. A.** (2015). Modeling the spatiotemporal dynamics of light and heat propagation for *in vivo* optogenetics. *Cell Reports*, *12*(3), 525-534.
- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., ... & Miyoshi, G.** (2011). A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*, *71*(6), 995-1013.
- Tatti, R., Haley, M. S., Swanson, O. K., Tselha, T., & Maffei, A.** (2017). Neurophysiology and regulation of the balance between excitation and inhibition in neocortical circuits. *Biological Psychiatry*, *81*(10), 821-831.
- Tervo, D. G. R., Hwang, B. Y., Viswanathan, S., Gaj, T., Lavzin, M., Ritola, K. D., ... & Huang, C. C.** (2016). A designer AAV variant permits efficient retrograde access to projection neurons. *Neuron*, *92*(2), 372-382.
- Thiel, G., Greengard, P., & Südhof, T. C.** (1991). Characterization of tissue-specific transcription by the human synapsin I gene promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(8), 3431-3435.
- Tian, J., & Uchida, N.** (2015). Habenula lesions reveal that multiple mechanisms underlie dopamine prediction errors. *Neuron*, *87*(6), 1304-1316.

- Ung, K., & Arenkiel, B. R. (2012).** Fiber-Optic Implantation for Chronic Optogenetic Stimulation of Brain Tissue. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (68), e50004.
- Wachowiak, M. (2011).** All in a sniff: olfaction as a model for active sensing. *Neuron*, 71(6), 962-973.
- Weiss, T., Snitz, K., Yablonka, A., Khan, R. M., Gafsou, D., Schneidman, E., & Sobel, N. (2012).** Perceptual convergence of multi-component mixtures in olfaction implies an olfactory white. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 19959-19964.
- Williams, S. C., & Deisseroth, K. (2013).** Optogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(41), 16287-16287.
- Wilson, D. A. (2009).** Pattern separation and completion in olfaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 306.
- Wilson, D. A., & Sullivan, R. M. (2011).** Cortical processing of odor objects. *Neuron*, 72(4), 506-519.
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M., & Deisseroth, K. (2011).** Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 71(1), 9-34.
- Zaborszky, L., Carlsen, J., Brashear, H. R., & Heimer, L. (1986).** Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *Journal of Comparative Neurology*, 243(4), 488-509.
- Zaborszky, L., Pol, A. V. D., & Gyengesi, E. (2012).** The basal forebrain cholinergic projection system in mice. *The Mouse Nervous System*, 684-718.
- Zhang, F., Wang, L. P., Boyden, E. S., & Deisseroth, K. (2006).** Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature Methods*, 3(10), 785-792.
- Zhang, F., Wang, L. P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., ... & Deisseroth, K. (2007).** Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446(7136), 633-639.
- Zhang, F., Prigge, M., Beyrière, F., Tsunoda, S. P., Mattis, J., Yizhar, O., ... & Deisseroth, K. (2008).** Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nature Neuroscience*, 11(6), 631.
- Zhang, F., Gradinaru, V., Adamantidis, A. R., Durand, R., Airan, R. D., De Lecea, L., & Deisseroth, K. (2010).** Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nature Protocols*, 5(3), 439.

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., & Rabinowitz, J. E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular Therapy*, *16*(6), 1073-1080.

Zou, D. J., Chesler, A., & Firestein, S. (2009). How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story?. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(8), 611-618.

ANEXO

Canalrodopsina-2 (ChR-2) modificada

Tabla 1. Propiedades cinéticas y de canal de ChR2 y ChR2/H134R. Comparación de algunas propiedades biofísicas de canalrodopsina-2 (ChR2) nativa y canalrodopsina-2 modificada (ChR2/H134R) (Modificado de Lin, 2011).

Channel variant	Response spectra peak		Level of desensitization / steady-state/peak	Light sensitivity/EC ₅₀		Opening rate τ (ms) 19.8 mW mm ⁻² light intensity	Closing rate τ (ms)
	Peak response	Steady-state response		Peak response	Steady-state response		
ChR2	~470 nm	~450 nm	~0.22 (470 nm)	~1.10 mW mm ⁻²	~1.05 mW mm ⁻²	~1.21 ms	~13.5 ms
ChR2/H134R	~450 nm	~450 nm	~0.39 (470 nm)	~1.07 mW mm ⁻²	~0.98 mW mm ⁻²	~1.92 ms	~17.9 ms

Odorantes

Se disolvieron los odorantes utilizados (Sigma-Aldrich, USA) en 5 mL de MO y se almacenaron en viales de vidrio. Se conectaron los viales al olfactómetro como se detalla en la literatura (Slotnick & Restrepo, 2005).

Tabla 2. Odorantes utilizados para las pruebas de discriminación go/no-go como estímulos de un componente, donde cada uno se presentó de forma separada en distintos viales. Se muestra la presión de vapor de cada odorante a 25°C (Perry, 1984; Alarie y col., 1995; Barnes y col., 2008), la cualidad de cada uno de ellos y el volumen utilizado para obtener una concentración del 1% v/v disuelto en MO.

Odorante	Presión de vapor (mmHg a 25°C)	Dilución en $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (1% v/v en MO)	Descripción de cualidad del odorante
isoamilacetato	5,00	50	Frutal, banana
fenilacetato	0,40	50	Dulce, almendra
2-butanona	90,6	50	Gasolina

Tabla 3. Odorantes utilizados para la prueba de discriminación go/no-go de la mezcla de 10 compuestos (10C) y la mezcla de 9 de ellos (10C-1). Se muestra la presión de vapor y la cualidad de cada odorante (Barnes y col., 2008). Además, se exponen los volúmenes necesarios de cada compuesto para obtener una concentración del 1,6% v/v disueltos en MO. Para las mezclas al 0,16% v/v en MO, se diluyó 10 veces ambas mezclas preparadas al 1,6%.

Odorante	Presión de vapor (mmHg a 25°C)	Dilución en $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (1,6% v/v en MO)	Descripción de cualidad del odorante
isoamilacetato	5,00	7,6	Frutal, banana
etil-valerato	4,80	7,9	Frutal, manzana
5-metil-2-hexanona	4,60	8,25	Frutal, dulce
isopropilbenceno	4,58	8,3	Aromático
1-pentanol	6,11	6,2	Aceite de fusel, dulce
1,7-octadieno	6,15	6,2	Combustible
2-heptanona	3,86	9,85	Frutal, condimento
heptanal	3,52	10,8	Pasto, vino
4-metil-3-penteno-2-ona	6,69	5,7	Condimento, vegetal
Nonano (sólo en 10C)	4,29	8,85	Gasolina

Referencias Anexo

Alarie, Y., Nielsen, G. D., Andonianhaftvan, J., & Abraham, M. H. (1995). Physicochemical properties of nonreactive volatile organic chemicals to estimate RD50: alternatives to animal studies. *Toxicology and applied pharmacology*, 134(1), 92-99.

Barnes, D. C., Hofacer, R. D., Zaman, A. R., Rennaker, R. L., & Wilson, D. A. (2008). Olfactory perceptual stability and discrimination. *Nature neuroscience*, 11(12), 1378.

Lin, J. Y. (2011). A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental physiology*, 96(1), 19-25.

Perry, R. H. (1984). Physical and chemical data. *Perry's chemical engineers' handbook*, 7-374.

Slotnick, B., & Restrepo, D. (2005). Olfactometry with mice. *Current protocols in neuroscience*, 33(1), 8-20.