



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Doctorado en Ciencias Biomédicas

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Tesis que para obtener el título de:
Doctora en Ciencias Biomédicas

“Caracterización estructural y electrofisiológica de los componentes neuronales de la zona subventricular del cerebelo de ratón”

Presenta:

M en C. Gabriela Berenice Gómez González

Tutor Principal

Dr. Ataúlfo Martínez Torres
INB-UNAM

Comité Tutor

Dra. Diana Escalante Alcalde IFC-UNAM
Dr. Rogelio Arellano Ostoa INB-UNAM

Juriquilla, Querétaro, México, Junio de 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Dedicada a mi abuelo, el Sr. Julián González Rivera,
quién fue el pilar de la familia y mentor de nuestra vida.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Beca doctoral No: 277694

Al financiamiento de Proyecto CONACYT. A1-S-7659, Proyecto PAPIIT. IN 204520

A mi Tutor el Dr. Ataúlfo Martínez por su dirección, apoyo y enseñanzas durante todos estos años de posgrado.

A mi Comité Tutor, por su valiosos comentarios y dirección.

A la Unidad de Microscopía: Ing. Lourdes Palma Tirado, ISC. Elsa Nydia Hernández Ríos

A la Unidad de Enseñanza: M. en C. Leonor Casanova Rico, Dra. Nuri Aranda.

A la Unidad de Bioterio: Dra. Alejandra Castilla León, MVZ. José Martín García Servín, y Dra. María Carbajo.

Al personal técnico: Dra. Edith Espino Saldaña, Dra. Guadalupe Martínez Lorenzana, Dr. Rafael Olivares Moreno, por su guía, ayuda y enseñanzas.

Al Artista Visual Edgar Julián Gómez González, por los esquemas ilustrativos 2D-3D del presente trabajo.

A los Dr (as): Adán Hernández Hernández por su guía en los experimentos de electrofisiología; Miguel Condés Lara, Gerardo Rojas Piloni del INB-UNAM, y Annalisa Buffo del NICO-Turín, por la donación de los animales transgénicos y/o reactivos varios empleados en este trabajo.

Al personal auxiliar: Sra. Marina Ramírez Moreno por su asistencia y labor fundamental para el mantenimiento del laboratorio. Gracias por todas sus atenciones /cuidados para con los estudiantes.

De manera personal, agradezco *a mi familia y amigos* por ser mi soporte, mi batería, mi refugio en los momentos difíciles durante este proyecto, por acompañarme también en cada alegría y logro.

Tabla de contenido

Agradecimientos	3
Abstract	8
Resumen.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Anatomía general del cerebelo.....	10
1.2 Circuito cerebeloso.....	11
1.3 Conectividad anatómica del cerebelo.....	13
1.3.1 Aferencias cerebelosas	13
1.3.2 Eferencias cerebelosas.....	14
2. Antecedentes	16
2.1 Heterogeneidad celular en la zona ventral de los lóbulos I y X.....	16
2.2 Poblaciones neuronales en el techo del cuarto ventrículo.....	17
3. Hipótesis.....	20
4. Objetivo general	20
4.1 Objetivos particulares:.....	20
5. Estrategia Experimental.....	20
6. Materiales y Métodos	21
6.1 Animales	21
6.1.1 Línea Thy1: GCaMP-YFP	21
6.1.2 Línea Pax2: GFP	21
6.1.3 Línea GFAP-eGFP	21
6.2 Inyección intracerebral de trazadores mediante estereotaxia	22
6.2.1 Anestesia	22
6.2.2 Inyección intra cerebelosa.....	22
6.2.3 Periodo de supervivencia de los trazadores.....	23

6.3	Histología: Obtención de las rebanadas de cerebelo	24
6.3.1	Anestesia y perfusión intracardiaca.....	24
6.3.2	Perfusión del ratón Thy1: GCaMP-YFP	24
6.3.3	Decapitación y disección del cerebro	25
6.3.4	Crioprotección y congelación del tejido.....	25
6.3.5	Obtención de los cortes histológicos.....	25
6.4	Técnicas de inmunohistoquímica (IHQ)	25
6.4.1	Identificación de componentes biotinilados: Kit ABC.....	26
6.5	Infiltración de tejido en resina EPON	27
6.5.1	Preparación de la muestra.....	27
6.6	Técnicas de Microscopía: adquisición de imágenes.....	28
6.6.1	Microscopía confocal	28
6.6.2	Microscopía de epifluorescencia.....	29
6.6.3	Microscopía de luz	30
6.7	Registros electrofisiológicos de campo.....	30
6.7.1	Cirugía estereotáxica e implantación de electrodos.	30
6.7.2	Registro electrofisiológico de campo in vivo.....	31
7.	Resultados	33
Sección I: Identificación de las vías anatómicas.....		33
7.1	Identificación de las aferencias / eferencias de los aSV.....	33
7.1.1	Estandarización de los trazadores neuronales	33
7.1.2	Identificación de las regiones anatómicas asociadas con los aSV.....	35
7.2	Optimización del ángulo de corte para la observación de los aSV	39
7.2.1	Identificación de los tractos de la ZSV en ratones transgénicos Thy1-H: GCaMP-YFP	39
7.3	Identificación del núcleo fastigio como origen de los axones de la ZSV (aSV).....	43
7.3.1	Identificación de eferencias del Fastigio.....	43

7.3.2	Identificación de las aferencias del núcleo fastigio.....	49
7.3.3	Corroboración anatómica del circuito inter-fastigio: marcaje con Retrobeads	51
Sección II: Identidad neuroquímica de los aSV		52
7.4	Caracterización por inmunohistofluorescencia de las fibras de la ZSV	52
7.4.1	Identificación poblaciones neuronales GAD65 / 67+ en el NF con proyecciones contralaterales.	52
7.5	Identificación de los aSV en la línea transgénica Pax2 ⁺	55
Sección III: Aproximación funcional de la conexión inter-fastigios mediante registros electrofisiológicos de campo.....		58
7.6	Registros de campo en el cerebelo de ratones anestesiados.	58
7.6.1	Estandarización del protocolo de estimulación.	58
7.6.2	Resultados empleando el protocolo: tren de 10 estímulos / 50 Hz.....	59
7.6.3	Resultados empleando el protocolo: tren de 5 estímulos / 100 Hz.....	62
8.	Discusión.....	65
8.1	Caracterización de la vía anatómica GABAérgica asociada a los aSV.....	65
8.2	Funcionalidad del circuito inter-fastigio	68
9.	Conclusión.....	70
10.	Referencias	71
11.	ANEXO 1: SOLUCIONES	79
	Ácido tánico 1 %.....	79
	Azul de Metileno 1 %	79
	Buffer de fosfatos (PBS1x)	79
	DAPI (30 nM): 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride	79
	Medio de montaje: Mowiol®	80
	Buffer Cacodilato sódico (0.2 M): solución de lavado-dilución	80
	Resina EPON	80
	Solución de bloqueo: suero bovino fetal (BSA) al 2 %	81
	Solución fijadora: Karnovsky.....	81

Solución fijadora: Paraformaldeído al 4%.....	81
Solución permeabilizante al 0.1 % - 0.5 %	82
Solución salina (SSF) al 0.8 %.....	82
Yoduro de Propidio (YP): tinción nuclear	82
12. ANEXO 2: IMAGENES COMPLEMENTARIAS	83
13. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA	86

Abstract

Along the roof of the fourth ventricle formed by lobules I, II and X of the cerebellum, in the subventricular zone, glial cells and neurons reside above the ependymal cells that bathes the cerebrospinal fluid, establishing a direct contact interface, important to the maintain homeostasis. A tract of myelinated axons in this region runs transversally along the roof of this ventricle, as previously observed through transmission electron microscopy and immunolabeling (Gonzalez-Gonzalez et al., 2017). Due to its localization and transversal disposition, this tract of subventricular axons (SVa) are independent from the known axonal projections arriving from the *locus coeruleus* and from the supraependymal axons that pass through the *velum*. Thus, this study aimed to determine the anatomical origin and projection site of these SVa using a battery of fluorescent neuronal tracers, transgenic mouse lines, and immunofluorescence, supported by field extracellular recordings.

The results indicate that the fastigial nucleus (FN) is the origin and destiny of the SVa, establishing a previously unknown *inter-fastigial connection* made by GABAergic projection neurons mainly located in the middle and caudal region of the FN. The FN is involved in a wide range of motor and non-motor functions, for instance, saccadic and vestibular control, social behavior, blood pressure and intestinal motility. Preliminary results of extracellular recordings *in vivo*, confirmed this inter-fastigial connection at functional level. Altogether these finding add to the complex organization of this nucleus, raising new questions as the function of this interconnection in the fastigial and cerebellar physiology.

Resumen

El techo del cuarto ventrículo está formado por los lóbulos I, II y X del cerebelo, en su zona subventricular (ZSV), la cual es delimitada por los pies de la glía de Bergman y las células endimarias, residen neuronas y células gliales que en conjunto establecen una comunicación directa con el lumen ventricular, la cual interviene en el mantenimiento de la homeostasis del SNC. En esta misma zona previamente detectamos mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión, fibras mielinizadas que corren longitudinalmente a lo largo del techo ventricular (González-González et al., 2017). Debido a su localización y disposición transversal, estos axones mielinizados de la zona subventricular (aSV) son independientes de las proyecciones aferentes del *locus coeruleus*, así como de los axones supra-endimarios que pasan a través del *velum*. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo el determinar el origen anatómico y los sitios de proyección de estos aSV, empleando una batería de trazadores neuronales, líneas transgénicas y técnicas de inmunohistoquímica, además se realizaron registros electrofisiológicos de campo para corroborar el circuito anatómico.

Los resultados indican que el núcleo fastigio (NF) es el origen y uno de los destinos de los SVa, los cuales establecen una comunicación directa *inter-fastigio* no descrita previamente, la cual está constituida por neuronas GABAérgicas de proyección. Estas proyecciones contralaterales se mantienen a lo largo del NF, con una mayor tendencia en la zona caudal y medial del mismo. Los registros electrofisiológicos corroboraron de manera parcial la conectividad de esta vía anatómica.

El NF pertenece a los núcleos profundos del cerebelo, participa en una amplia gama de funciones motoras y no motoras, por ejemplo, en los movimientos oculares (sacadas), control vestibular, comportamiento social, presión sanguínea y motilidad intestinal, entre otros. Por lo que el descubrimiento de este contacto directo inter-fastigio añade complejidad a la conectividad asociada a estos núcleos, generando nuevas preguntas sobre la posible participación de esta vía directa en la función del cerebelo.

1. Introducción

El cerebelo (Cb) se encuentra situado en la parte posterior del encéfalo, es un centro receptor e integrador de estímulos sensoriales y motores (Ito, 2012). Su función es coordinar las respuestas involucradas con la función motriz (coordinación-ejecución del movimiento) y el aprendizaje motor, además de procesos de tipo cognitivos y emocionales en mamíferos (Grosche et al., 2002; Lippman et al., 2008; Schmahmann, 2010; Carta et al., 2019). Por lo tanto, dado su papel relevante en la integración de las señales del sistema nervioso en general, el Cb constituye una estructura clave en la comprensión de la integración y procesamiento de los procesos asociados (motores, sensoriales, cognitivos) a nivel de Sistema Nervioso.

1.1 Anatomía general del cerebelo.

La anatomía externa del Cb consiste en tres regiones principales: dos *hemisferios laterales* unidos por una región central denominada *vermis* (Fig. 1a). Funcionalmente, el vermis se asocia a la coordinación simétrica bilateral de los movimientos, mientras que los hemisferios laterales a la coordinación unilateral de las extremidades inferiores (Bolk, 1902; Glickstein y Voogd, 1995).

A lo largo de los años se han formulado diferentes clasificaciones anatomo-funcionales del Cb (Ramón y Cajal, 1909; Larsell, 1920; Fulton and Dow, 1937; Larsell, 1970; Angaut y Brodal, 1967), así la corteza cerebelosa y material blanca que le subyace se organizan en tres regiones lobulares (“lobes”, en inglés), cuya localización está asociada con los principales sitios de proyección y por ende una función en particular (Teoría lobular, Angevine et al., 1961; Fulton and Dow, 1937; Larsell, 1970; Brodal, 1967). Dichas regiones son delimitadas en el eje anteroposterior (AP) por la *fisura primaria* (Voogd y Marani, 2016) dando origen al lóbulo anterior y posterior; mientras que la *fisura posterolateral*, delimita el lóbulo posterior del lóbulo flocculonodular (Figs. 1a, b).

Las regiones lobulares son (Fig. 1a): 1) *cerebrocerebelo*; integrado por las zonas laterales de los hemisferios cerebelosos, recibe aferencias provenientes de la corteza cerebral. Funcionalmente asociado a la planeación y ejecución de secuencias complejas de movimientos temporo-espaciales, como el habla. 2) El *espinocerebelo*, compuesto por lóbulo anterior, la parte posterior del vermis (lóbulos VIII y IX) y el paraflóculo (Voogd y Marani, 2016). Está región recibe proyecciones ascendentes de la médula espinal dorsal y ventral, del tracto cuneo-cerebeloso y de la formación reticular; funcionalmente está asociada con la propiocepción de las extremidades inferiores y la información somatosensorial de las superiores, así como la regulación motriz (balance, postura y locomoción). La región del *vermis* regula el movimiento lateral de los ojos, recientemente ha sido

asociada con el procesamiento de las emociones (Shmahmann, et al., 2019), el circuito de la recompensa y comportamiento social (Carta et al., 2019), a través de conexiones directas de tipo glutamatérgico. 3) El *vestíbulo-cerebelo o floclunodular*; comprende el floclulo y el vermis inferior (lóbulo X). Recibe proyecciones ipsilaterales del aparato y núcleos vestibulares, por lo tanto, está asociada funcionalmente al equilibrio, el reflejo vestibulo ocular y la postura; siendo la región más ancestral (Balaei et al., 2017).

A su vez, estas regiones lobulares se subdividen en diez lobulillos (“*lobule*” en inglés) enumerados del I-X con base en la nomenclatura de Larsell (1952), (Figs. 1b, c). Estos lobulillos (también conocido como lóbulos) constituyen arreglos anatómicos originados a lo largo de la evolución por la compactación de la corteza cerebelosa en extensión, la cual invaginó hasta formar las múltiples folias que caracterizan el cerebelo de mamíferos como los roedores y humanos.

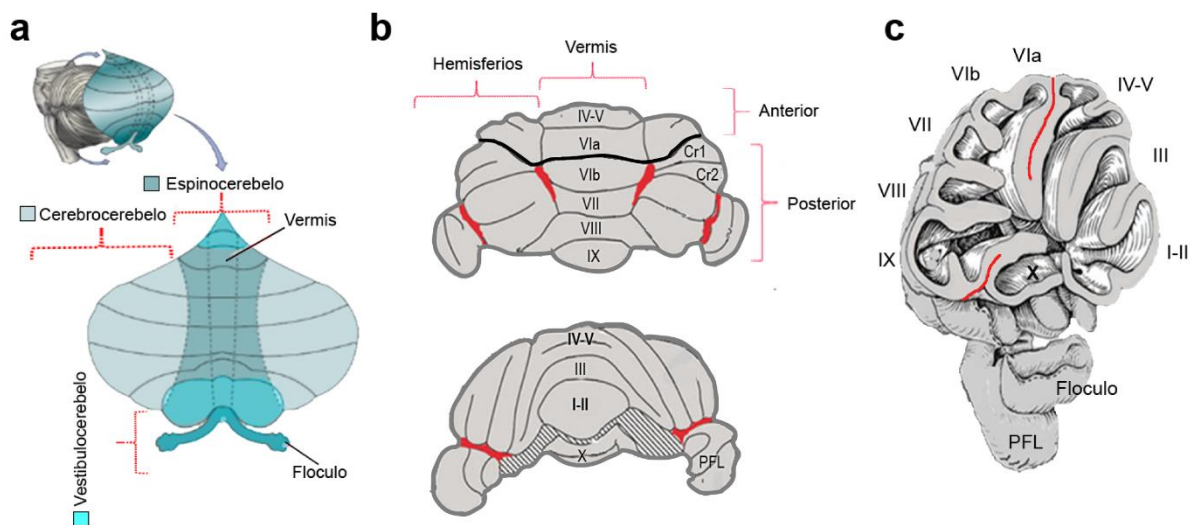


Fig. 1 Anatomía del cerebelo de ratón. a) Organización de la corteza cerebelosa según el origen de las aferencias. b) Vista dorsal y posterior del cerebelo, las líneas indican la región que forma el techo del cuarto ventrículo; la región en rojo indica la discontinuidad de la corteza. c) Vista sagital del cerebelo donde se muestran la disposición de los diez lóbulos del cerebelo, las líneas en rojo delimitan las fisuras, primaria y secundaria. Modificado de Paxinos et al., 2010 y Voogd y Marani, 2016.

1.2 Circuito cerebeloso

La estructura de las folias se mantienen a lo largo del cerebelo, compuestas por una corteza trilaminar, que envuelve la materia blanca formada a su vez por axones que proyectan de, y hacia la misma

corteza cerebelosa. Dichas láminas corticales son: la capa molecular (cM; más externa), la capa de Purkinje (cP) y la más interna, la capa granular (cG), (Balaei, et al., 2017).

Dentro de cada capa residen tipos particulares de neuronas y/o interneuronas (Fig. 2), que en su mayoría emplean a GABA como neurotransmisor, con excepción de las células granulares que emplean glutamato (excitadoras), por lo que el circuito cerebeloso es en sí principalmente inhibitorio. En él, las neuronas de Purkinje (CP) ejercen un papel central en la integración de las señales provenientes y en ejecutar la respuesta orquestada por el Cb, ya que sus axones constituyen la única vía de salida de información del Cb, a través de proyectar hacia los núcleos profundos del mismo. Por su parte el resto de las células que integran el circuito (células granulares, de canasta, de Golgi, de Lúgaro y de cepillo, regulan esta respuesta al contactar de manera directa o indirecta a las CP.

Un ejemplo de conexión indirecta son las fibras paralelas, formadas por los axones de las células granulares los cuales recorren la corteza (hasta 5mm en el eje dorsoventral, DV) y se bifurcan en la cM (Fig. 2, célula en color marrón), formando conexiones excitatorias en *passant* con las dendritas de las CP en una proporción de 200,000: 1 (Harvey y Napper, 1988).

A su vez el circuito cerebeloso recibe información de núcleos fuera del Cb a través de señales excitatorias de las fibras musgosas y de las fibras trepadoras. Siendo la primera, la principal vía de entrada de información (“*input*”) al Cb; éstas contactan de manera directa a las granulares. Por su parte las fibras trepadoras, contactan directamente tanto a las células de Golgi, como a la región distal del árbol dendrítico de la CP en una proporción de 1:1 (Shinoda et al., 2000) originando eventos masivos de disparos eléctricos conocidos como “*complex spikes*” que se traducen en la inhibición de los núcleos profundos del cerebelo (DCN, por sus siglas en inglés).

En el circuito cerebeloso prevalece un arreglo parasagital entre sus elementos (interneuronas de la capa molecular, fibras trepadoras y dendritas de las CP), con excepción de las fibras paralelas que se organizan transversalmente, (eje mediolateral, ML).

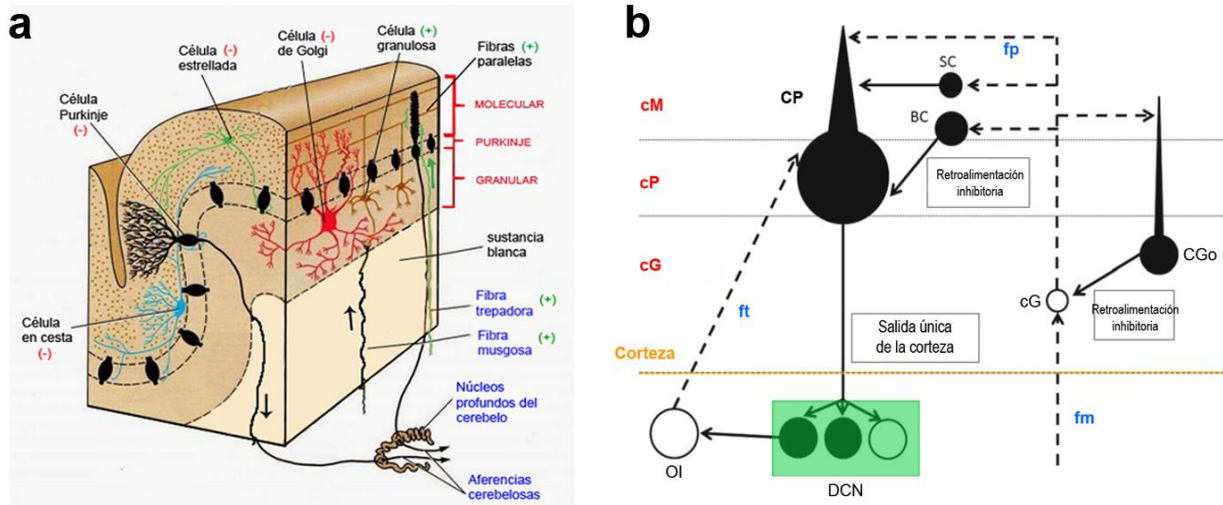


Fig. 2 Estructura de la corteza y circuito cerebelosos. a) En rojo se señalan los estratos que conforman la corteza cerebelosa, en cada uno se muestra los tipos celulares más representativos que poseen, así como las conexiones principales. El signo indica la naturaleza bioquímica asociada: (+) excitatorias, (-) inhibitorias. Tomado y modificado de Van Dum et al., 2018. b) Circuito neuronal del Cb. En negro se muestran las proyecciones/neuronas GABAérgicas mientras que en blanco las glutamatérgicas. ft, fibras trepadoras; fm, fibras musgosas; fp, fibras paralelas; cG, célula granular; CGo, célula de Golgi; BC, célula canasta; SC, célula satelital; OI, oliva inferior; DCN, núcleos profundos del cerebelo. Modificado de T. Hirano 2017.

1.3 Conectividad anatómica del cerebelo

La comunicación del Cb con otras regiones del sistema nervioso surge a través de diferentes vías neuronales clasificadas conforme la dirección de transmisión de la información respecto al núcleo de referencia, en: **aferecias** (proyecciones entrantes) y **eferecias** (proyecciones salientes), contenidas en tres estructuras denominadas en conjunto como **pedúnculos cerebelosos: superior, medial e inferior** (Fig. 1b).

1.3.1 Aferecias cerebelosas

Las principales **aferecias cerebelosas** fueron descritas en el año de 1911, por Ramón y Cajal. Existen tres vías principales constituidas por fibras que llevan información hacia el cerebelo: 1) las *fibras trepadoras*, de naturaleza glutamatérgica proyectan a las CP, y tienen su origen principal en el núcleo olivar inferior del tallo cerebral. 2) Las *fibras musgosas* cuyo origen es múltiple, siendo los núcleos principales a nivel de rombencéfalo: pontino (PGN), reticulotegmental (RTN), lateral reticular (LRN) y externo cuneatus (ECN); proyectan terminales glutamatérgicas al cG y núcleos profundos del cerebelo (DCN), dirigiendo información cortical y periférica hacia el Cb (Yamada y Hoshino, 2016).

3) Las *fibras delgadas* provenientes del cerebro (locus coeruleus y núcleo del rafe), las cuales proyectan directamente hacia las CP de la corteza cerebelosa y DCN (Kettenmann y Ransom, 2005; Ito, 2012) emitiendo señales excitatorias de origen glutamatérgico.

El conjunto de aferencias y eferencias mencionadas integran, moldean y modulan el circuito cerebeloso. Durante el desarrollo (primeras 2 semanas posnatales) median la correcta poda sináptica y maduración de terminales somáticas (provenientes de las fibras paralelas y trepadoras) alrededor de las CP (Sassoè-Pognetto et al., 2016), mecanismo clave para la correcta función del cerebelo como integrador y efector, durante la etapa adulta.

1.3.2 *Eferencias cerebelosas*

Los núcleos profundos del cerebelo: **dentado, interpuesto, fastigio y “vestibular”** (DCN: *deep cerebellar nuclei*, por sus siglas en inglés), se encuentran embebidos en la sustancia blanca (Fig. 3), y constituyen la principal vía de eferencias del cerebelo (Kettenmann y Ransom, 2005; Ito, 2012). En ellos convergen las terminales axónicas inhibitorias de las CP, que a su vez representan la única vía de salida con información procesada proveniente de la corteza de las diferentes regiones del cerebelo (Hirano et al., 2018; Figs. 2, 3). Así, las CP de la zona lateral del cerebelo proyectan hacia el *núcleo dentado*, las CP de la zona intermedia hacia los núcleos *interpuesto (globoso y emboliforme)*, las de la zona del vermis-paravermis hacia el *núcleo fastigio (NF)* y las CP de la zona flóculo nodular hacia los *núcleos vestibulares*; por esta razón los núcleos vestibulares son considerados como DCN por algunos autores, a pesar de estar propiamente fuera del Cb, en la parte dorsal del mesencéfalo.

Funcionalmente los DCN, son considerados como regiones de integración con capacidad de generar señales al presentar cierta forma de plasticidad neuronal intrínseca y asociada con las CP/fibras musgosas (Shen, 2016; Uusisaari y Knöpfel, 2011), por lo que su función no se limita a ser regiones de relevo de información.

A su vez, los DCN (excluyendo los núcleos vestibulares) se conforman por tres principales poblaciones celulares (Voogd, 2013): 1.- Neuronas de “relevo”, cuyos axones altamente ramificados proyectan al tálamo, mesencéfalo y médula espinal; en su mayoría de tipo Glutamatérgico, pero no de manera exclusiva, ya que se han identificado neuronas glicinérgicas que originan proyecciones ipsilaterales desde el fastigio. 2.- Pequeñas neuronas GABAérgicas que proyectan de manera exclusiva a la oliva inferior. 3.- Interneuronas inhibitorias glicinérgicas (Chen y Hillman, 1993) y GABAérgicas (Leto et al., 2006). Además de neuronas glicinérgicas del núcleo dentado con proyecciones directas a la corteza cerebelosa (Uusisaari y Knöpfel, 2010). En modelos murinos, estas células en conjunto se

caracterizan por presentar actividad espontánea regular, dada la presencia intrínseca de corrientes despolarizantes sostenidas también llamadas *plateau*; y por responder ante corrientes altamente hiperpolarizantes con ráfagas de actividad neuronal tipo rebote (*rebound spike burst*), las cuales han sido asociadas a corrientes de Ca y Na (Jaeger y Lu, 2016).

Dentro de cada DCN existen microrregiones asociadas a funciones sistemáticas particulares, dependiendo de las conexiones que poseen; así, los núcleos vestibulares modulan reflejos vestibulo-oculares y el equilibrio; el núcleo interpuesto y dentado controlan el movimiento de las extremidades inferiores, y el fastigio mantiene la postura y control de los músculos axiales, entre otras. En estas funciones, la sincronización de las señales inhibitorias y excitatorias generadas por las CP y las fibras trepadoras es crucial para su correcta ejecución (Jaeger y Lu, 2016).

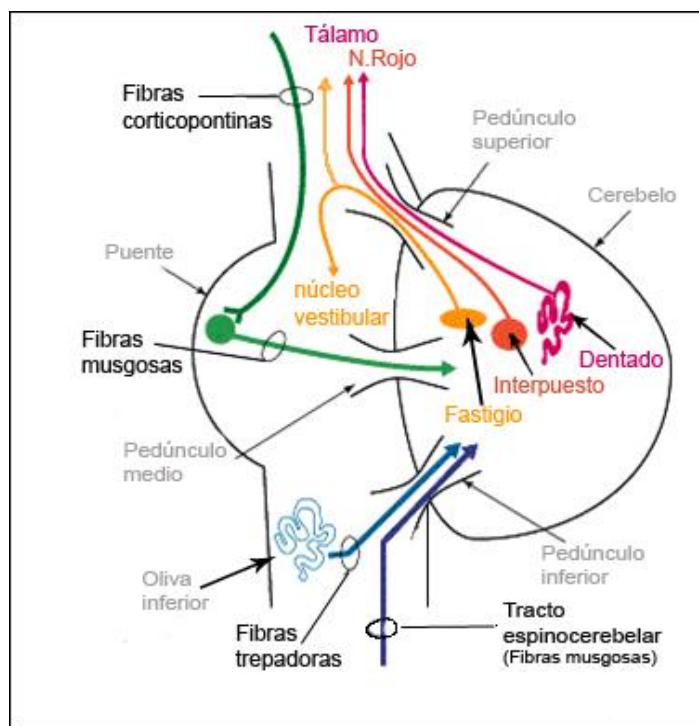


Fig. 3 Conectividad del cerebelo. a) Esquema de las principales proyecciones del cerebelo en relación con el resto del SN, las flechas indican el sentido del flujo de la información. Los colores se indican los DCN.

2. Antecedentes

2.1 Heterogeneidad celular en la zona ventral de los lóbulos I y X

La cito-arquitectura de la corteza cerebelosa se mantiene a lo largo de los diez lóbulos que la integran (Fig. 1b, c), sin embargo, el lóbulo X (nódulo) del cerebelo junto con el lóbulo I (úvula) y parte del lóbulo II, que constituyen el techo del cuarto ventrículo (IV), se encuentran en un microambiente distinto al encontrado en el resto de los lóbulos que integran el cerebelo. Dicho microambiente está determinado por el *líquido cefalorraquídeo* (LCR), un medio rico en intercambio de iones, proteínas y neurotransmisores (Bennett et al., 2009; Jhonson y Gross., 1993); el *plexo coroideo*, encargado de la producción y regulación de la composición del LCR (Falcao et al., 2012), incluida la liberación del morfógeno *Ptfla*⁺ para la diferenciación de interneuronas GABAérgicas en estado embrionario (Hoshino et al., 2005), y posiblemente del mantenimiento de zonas neurogénicas en etapas postnatales (Leto et al., 2016). Así mismo, la barrera de células endoteliales (CE) células multiciliadas encargadas de recircular el LCR, mediar el transporte a través de uniones intercomunicantes y controlar procesos de difusión (Bennett et al., 2009; Nguyen et al., 2001), añade dinamismo a esta región ventricular.

De manera particular, los lóbulos (X, I, II) que forman el techo ventricular, poseen una orientación invertida respecto a los superiores, por lo que su corteza se dispone de la parte interna a la externa en el siguiente orden: cG, cP, y cM delimitada por los pies terminales de la glía de Bergman, dando origen a la zona subventricular (ZSV) y la zona periventricular (ZPV). La ZPV conformada por las CE constituyen el estrato celular que está en contacto directo con el LCR (Fig. 4).

Recientes investigaciones del grupo de trabajo se han enfocado en describir mediante técnicas histológicas y electrofisiológicas la diversidad celular en estas zonas (ZPV / ZSV) del techo del IV, encontrándose una serie de diferentes componentes celulares los cuales incluyen: oligodendrocitos, astrocitos, precursores y dos arreglos celulares denominados: clúster celular subventricular (SVCC, por sus siglas en inglés) y cordón ventromedial (CVM), (González-González et al., 2017; Reyes-Haro et al., 2013) (Fig. 4). Este último, caracterizado por la sobreexpresión de nestina (marcador de células progenitoras en el adulto) y la disminución en la expresión de GFAP, en respuesta al condicionamiento hipóxico (Becerra-González et al., 2020).

Acompañando a esta diversidad celular en la ZSV del techo del IV, se identificaron un conjunto de axones dispuestos de manera transversal. Estos axones fueron evidenciados por microscopía electrónica, inmunohistofluorescencia para la proteína MBP (proteína básica de la mielina), así como técnicas de trazado viral y no viral (Carbocianinas-DiI, AdV:CMV-mCherry), (Gómez-González

2014, tesis de Maestría; González-González, et al. 2017) (Fig. 5). Sin embargo, se desconocen su trayectoria, origen, e identidad bioquímica.

2.2 Poblaciones neuronales en el techo del cuarto ventrículo

Previamente ha sido descrita la existencia de tres poblaciones neuronales sobre el techo del IV: 1) Las **neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus*** dispuestas dorsoventralmente sobre la ZSV, cuyas dendritas se extienden entre las CE hacia la luz ventricular (Grzanna y Molliver, 1979); 2) **Los axones inmersos en el *velum anterior***, y que corren longitudinalmente al eje AP, formando el par craneal IV-Troclear (Berry *et al.*, 1995); 3) **Los axones serotoninérgicos *supra-ependimales*** provenientes del *núcleo del rafe*, que interactúan con las CE a través de uniones estrechas (Lorez y Richards, 1982). Por lo que, ninguna de estas poblaciones coincide con la disposición (orientación y localización) de las fibras encontradas en la ZSV (Fig. 4, 5).

Esta información en conjunto resalta la diversidad celular particular que acompaña a los lóbulos del cerebelo que forman el techo del cuarto ventrículo, diversidad que incluye la presencia de los axones transversales en la ZSV del Cb, denominados ***axones subventriculares (aSV)*** en el presente trabajo; y de los cuales hasta el momento no se tiene descripción. Por ello, el estudio del origen y destino anatómico de los aSV, así como de las características de las neuronas que proyectan estos axones, sería relevantes en el conocimiento de los circuitos anatómicos intrínsecos en el cerebelo.

Dada la localización de los aSV en la región comprendida por el vestíbulo-cerebelo, se podría inferir que tengan su origen anatómico en los núcleos vestibulares, y que por ello compartan características bioquímicas (identidad neuroquímica) propias de las fibras musgosas. En este trabajo se utilizó una combinación de aproximaciones experimentales con el fin de determinar cuál es el origen y destino de estos axones SVa.

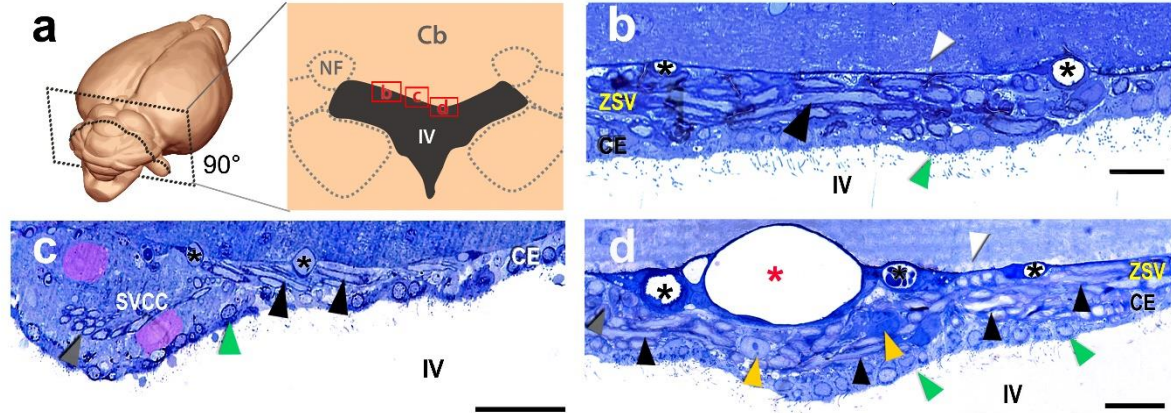


Fig. 4 Organización celular del techo del cuarto ventrículo en el ratón. a) Esquema en 3D del cerebro de ratón, indicando el ángulo y tipo de corte de las imágenes posteriores, correspondientes a cortes semifinos (300nm) teñidos con azul de toluidina. La imagen lateral indica la región específica del techo del ventrículo mostrada (recuadros rojos). b) Región lateral, los axones mielinizados (punta de flecha negra) corren de manera longitudinal en la ZSV, la cual está limitada dorsalmente por los pies terminales de la GB (punta de flecha blanca), y ventralmente por la capa de células ependimarias ciliadas (punta de flecha verde). Los asteriscos indican vasos sanguíneos transversales. c) Región medio-lateral, donde se observan los mismos elementos, acompañados de axones transversales (punta de flecha gris) que pasan a través de las células (delimitadas en rosa) que componen el SVCC. d) Región medial donde componentes celulares de distinta morfología (punta de flechas amarillas) se agrupan para formar el cordón ventromedial (CVM) a lo largo de un gran capilar central (asterisco rojo), y por donde los aSV (puntas flecha negras) mantienen su curso longitudinal. Cb, cerebelo; CE, capa ependimaria; ZSV, zona subventricular; SVCC, *subventricular cellular cluster*; IV, cuarto ventrículo. Barras: 20 μm (b,d), 50 μm (c).

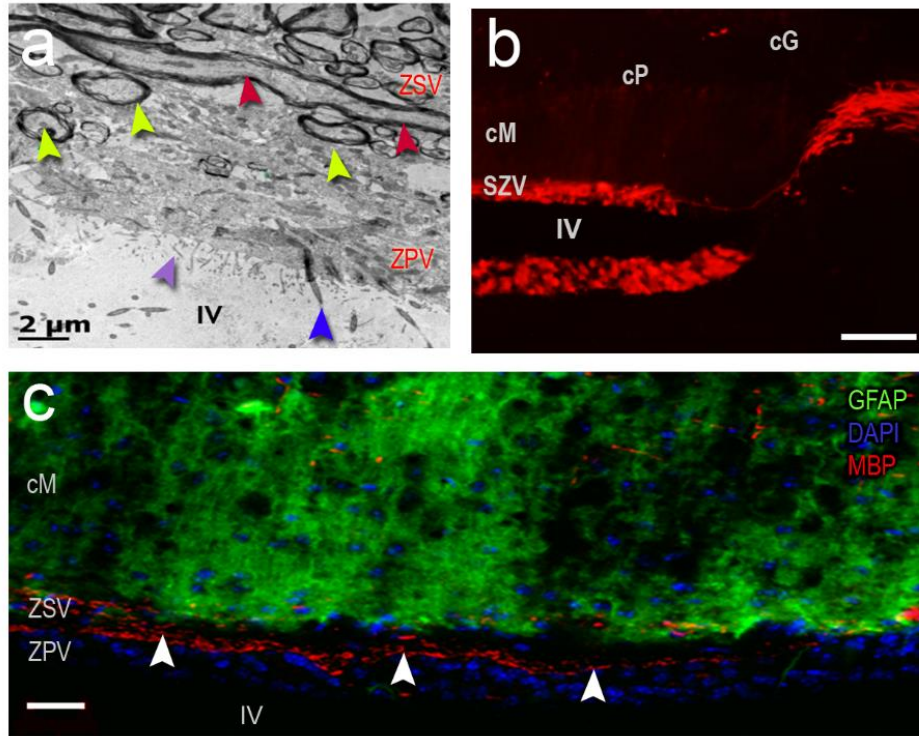


Fig. 5 Fibras axonales en la ZSV de los lóbulos I y X. a) Imagen de microscopía electrónica de transmisión, la marca electrodensa corresponde a la mielina que recubre las fibras longitudinales (aSV) (flechas rojas), las células endoteliales (CE) ciliadas se indican con la flecha morada, mientras que los cilios con la flecha azul. Axones mielinizados, transversales al ventrículo se indican con las flechas en verde. b) Marcaje de las fibras en la ZSV y las CE con DiI (Rojo). c) Fibras mielinizadas de la ZSV identificadas por inmunohistoquímica para la proteína MBP (en rojo), los núcleos celulares se muestran en azul (DAPI), y los procesos de la glía de Bergman en verde (GFAP). cM: capa molecular, cP: capa Purkinje, cG: capa granular, ZPV: zona periventricular, ZSV: zona subventricular. Tomado de *Gómez-González, tesis maestría 2014 (b)*; y *González-González et al. 2016 (c)*. Barras: 2 μm, 100 μm y 20 μm respectivamente.

3. Hipótesis

Los axones subventriculares (aSV) del techo del cuarto ventrículo del cerebelo de ratón son aferencias provenientes de los núcleos vestibulares y poseen características neuroquímicas propias de las fibras musgosas (Glutamatérgicas).

4. Objetivo general

Determinar las características estructurales y neuroquímicas de los componentes neuronales localizados en la zona subventricular del cerebelo de ratón.

4.1 Objetivos particulares:

1. Elucidar el destino y origen anatómico de los axones distribuidos en la zona subventricular del techo del cuarto ventrículo.
2. Determinar la identidad neuroquímica de los axones distribuidos en la zona subventricular del techo del cuarto ventrículo.
3. Comprobar de manera funcional la conexión anatómica.

5. Estrategia Experimental

1.- Para abordar el primer objetivo se inyectó en la ZSV del cerebelo de ratón trazadores anterógrados y retrógrados. Lo cual permitió identificar el origen anatómico, trayectoria y destino de las fibras neuronales (Fig.5). El análisis de las proyecciones marcadas se realizó a partir de imágenes adquiridas por microscopía de epifluorescencia y confocal.

2.- Para identificar la identidad neuroquímica de las neuronas, se probaron en cortes coronales de cerebelo de ratones previamente inyectados con trazadores neuronales, una batería de anticuerpos para transportadores vesiculares y neurotransmisores.

3.- Finalmente, se corroboraron la(s) vía anatómica identificada mediante registros electrofisiológicos extracelulares *in vivo*. Aplicando un tren de estímulos en el punto A (origen) del circuito anatómico y registrando en el sitio B (sitio de proyección de interés), posteriormente se aplicó localmente un inhibidor de la actividad celular (lidocaína) para determinar si la vía de comunicación es interrumpida.

6. Materiales y Métodos

6.1 Animales

Los experimentos fueron realizados acorde con los lineamientos de la NOM-062-ZOO bajo la aprobación del Comité de Bioética de la UNAM (INEU/SA/CB089). Se emplearon ratones de la cepa silvestre CD1, con las siguientes características: hembras y machos de 6.5-8 semanas de edad, con un rango de peso de 26-30 g. Adicionalmente se emplearon ratones de diferentes líneas transgénicas, descritas a continuación.

6.1.1 *Línea Thy1: GCaMP-YFP*

Ratón transgénico en el cual la expresión del gen reportero YFP (*yellow fluorescent protein*) se encuentra acoplado a un sensor de calcio (GCaMP), que a su vez es dirigido por el promotor Thy-1. Como resultado la expresión de YFP se observa exclusivamente en las neuronas de proyección, con una expresión predominante en el hipocampo y cerebelo (Porrero et al., 2010).

6.1.2 *Línea Pax2: GFP*

Ratones transgénicos que expresan de manera constitutiva la proteína GFP (*green fluorescent protein*) bajo el promotor del gen Pax2, el cual codifica para un factor de transcripción y cuya expresión es ampliamente distribuida en el cerebro durante el desarrollo, en los progenitores de neuronas e interneuronas GABAérgicas, permaneciendo en la etapa adulta en las interneuronas inhibitoras maduras de la sustancia blanca y núcleos profundos del cerebelo, entre otras regiones (Maricich et al., 1999). De esta línea se emplearon ratones hembra / macho de 4 semanas de edad.

6.1.3 *Línea GFAP-eGFP*

Esta línea transgénica generada por Nolte y Cols. (2001), expresa una variante mejorada de la proteína GFP (eGFP) en las células gliales que expresan la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), como los astrocitos y glía de Bergmann. Para este trabajo se emplearon hembras y machos de 6.5-8 semanas de edad, con un rango de peso de 26-30 g.

6.2 Inyección intracerebral de trazadores mediante estereotaxia

6.2.1 Anestesia

Para generar una anestesia general, a cada ratón se le administró una dosis de 81 mg/kg, 6 mg/kg de una mezcla de ketamina / xilacina diluida (1:1) en solución salina fisiológica (SSF) 0.9 %.

6.2.2 Inyección intra cerebelosa

Antes de iniciar el procedimiento, todo el instrumental quirúrgico empleado fue previamente esterilizado en etanol al 96 % durante 5 min, y las gasas en una autoclave (120 °C, 20 min).

- A. Se colocó al animal en un aparato estereotáxico con un adaptador para ratón (Stoelting Mod. 51500) donde se le fijó la cabeza ajustando los tornillos en el meato auditivo externo. Se alineó el cráneo de manera que quedara horizontal al plano de la base y se sujetó del hocico con un soporte del aparato (altura de los tornillos laterales 13 mm, altura del sujetador del hocico 9.5 mm; Fig. 6a). El animal se colocó sobre una cama térmica para evitar la pérdida de calor producto de la anestesia y estabilizar el estado general del ratón.
- B. Una vez posicionado el ratón, se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm en la parte superior del cráneo para exponer las suturas craneales (bregma y lambda). El periostio del cráneo fue removido con H₂O₂ al 3 %, con ayuda de una gasa estéril.
- C. Identificación de los sitios de interés (Fig. 6b):
Sitio 1: ZSV del lóbulo X; AP: Bregma -5.88 mm, ML: 0 mm, DV: 3.6 mm.
Sitio 2: Núcleo fastigio; AP: Lambda -2.08/-2.2 mm; ML: 0.7/0.75 mm; DV: -3.3/-3.5 mm.
- D. Se realizó un trepano craneal con la ayuda de un mini taladro inalámbrico de 7.2 V DREMEL 7700 (broca de 0.4 pulgadas, intensidad baja), cuidando no perforar las meninges o cerebro. El exceso de sangre en caso de romper algún vaso fue limitado mediante presión en el sitio (en el caso del cráneo, no en tejido) y aplicando una compresa con SSF 0.9%.
- E. *Inyección mecánica unilateral de los trazadores:* Se empleó una micropipeta de cristal pre graduada (Blaubrand, Cat. 708707) previamente pulida (pull: 40, heat: 615°, time: 150 s, speed: 30, DI: 7-10 µm, DE: 25 µm), la cual se acopló a una jeringa Hamilton Neuro-syringe (Cat. 65460-10). La inyección de los trazadores fue controlada manualmente con la ayuda de un microinyector (Model 5000, KOPF, USA) adaptado a la torre del estereotáxico.
El trazador se inyectó paulatinamente durante un lapso de 3-5 min, administrando ¼ del volumen total cada minuto; posterior a la última administración se dejaron pasar 10 min antes de remover la pipeta, para evitar el retorno del trazador.

Los trazadores empleados, las características y las condiciones de inyección se muestran en la Tabla 1.

- F. La superficie craneal expuesta se limpió con SSF y la herida se suturó con la técnica de sutura continua simple, empleando una sutura quirúrgica sintética absorbible (ATRAMAT, Cat. EA895/2) o no absorbible (Polipropileno, USP 6-0/EP 0.7).
- G. Finalizada la cirugía se dejó al ratón en recuperación aproximadamente 2-4 h con una fuente externa de calor (lámpara) hasta que se recuperará de la anestesia por completo. Se administró paracetamol como analgésico, 200 mg/kg diluido en el agua de uso, durante 3 días.

6.2.3 *Periodo de supervivencia de los trazadores*

Los trazadores se dejaron en el animal un periodo de 5-7 días post inyección. Tiempo suficiente en el cual los trazadores pueden difundir activa o pasivamente hasta su máximo alcance (0.4 cm / 2h) (Catapano et al., 2002; Verccelli et al., 2000).

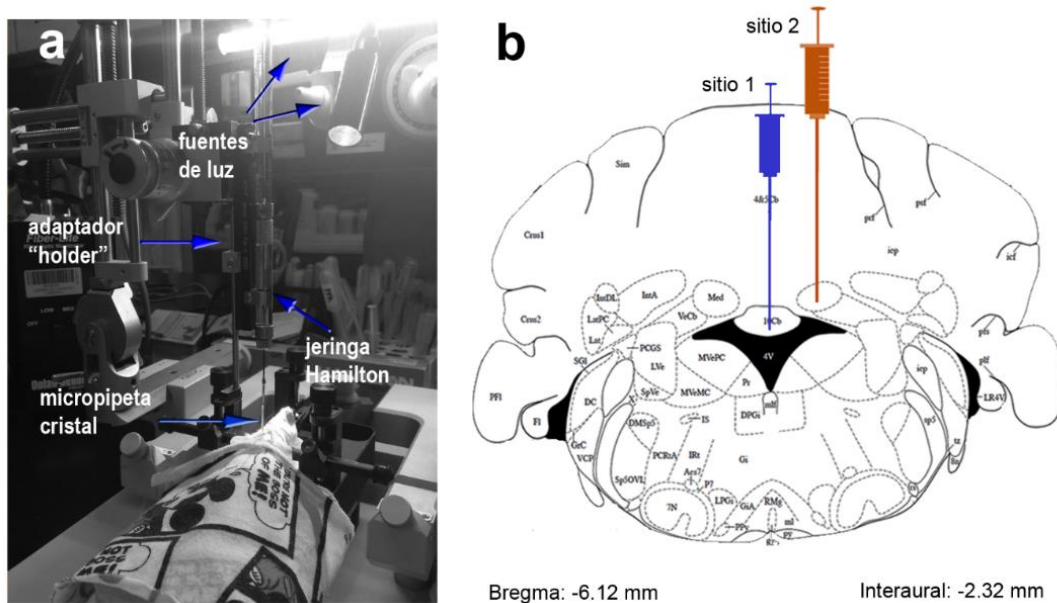


Fig. 6 Microinyección estereotáxica. a) Equipo de inyección, donde se señalan los componentes básicos. b) Representación gráfica de los sitios anatómicos de interés. *Imagen modificada del atlas Paxinos 2001.* Med: núcleo fastigio, IV: cuarto ventrículo, 10 Cb: lóbulo diez.

Trazador	Polaridad	Catálogo	[%] en ssf	Volumen	Periodo
FluoroRuby (FR)	A	Fluorochrome, USA.	5	70-100 nl	
Biotinylated Dextran Amine (BDA)	A	Vector Labs.	10	30-50 nl	5-7 d
Retrobeads (RB)	R	Lumafuor, Inc.	50	30-50 nl	
FluoroGold (FG)	R	Fluorochrome, USA.	5	40-50 nl	

Tabla 1. Trazadores neuronales empleados y condiciones de uso. A: anterógrado, R: retrógrado, d: días.

6.3 Histología: Obtención de las rebanadas de cerebelo

Con el objetivo de preservar el tejido, los ratones fueron perfundidos vía intracardial con SSF 0.9 %, seguido de paraformaldehído al 4 % (PFA), empleando el siguiente protocolo:

6.3.1 Anestesia y perfusión intracardiaca

El ratón fue anestesiado con una sobredosis de pentobarbital (90 mg/kg, intraperitoneal), una vez que no mostró signos de dolor al pinchado de la cola y patas, se expuso la cavidad torácica.

Para la perfusión se le insertó la punta de una cánula en el ventrículo derecho (a la altura del ápice del corazón), se cortó la aurícula derecha y aprovechando el bombeo cardiaco y la gravedad, se hizo circular 20 ml de SSF 0.9 % a flujo constante durante 5min, seguido de 30 ml de PFA al 4 %, durante 15 min. Una vez que el corazón se detiene las soluciones se continúan perfundiendo mediante gravedad, para ello las soluciones se colocan a 1 m de altitud desde el inicio del procedimiento.

6.3.2 Perfusión del ratón *Thy1*: GCaMP-YFP

Dado que la expresión del gen reportero YFP se encuentra acoplada a la activación de un sensor de calcio (GCaMP), y para promover la activación del reportero YFP en las neuronas de proyección (*Thy1*), el ratón se perfundió de manera intracardiaca con una solución rica en calcio (PBS 1x + CaCl₂ 0.09 mM), seguida de la solución fijadora; con el protocolo previamente descrito.

6.3.3 Decapitación y disección del cerebro

Una vez que el ratón fue completamente fijado (incluyendo el cerebro), se decapitó empleando tijeras de disección y se removió el cerebro cuidadosamente. Cada cerebro se mantuvo en post-fijación en 20 ml de PFA 4 % a 4 °C, durante 24 h.

6.3.4 Crioprotección y congelación del tejido

Con el objetivo de evitar la formación de cristales de agua y en consecuencia daño del tejido al momento de ser congelado. El cerebro se colocó en gradientes de sacarosa al 20 % y 30 % hasta decantar (~20 ml de solución por cerebro).

El cerebro fue congelado en hielo seco pulverizado y se almacenó en un ultracongelador (-70 °C) hasta su procesamiento.

6.3.5 Obtención de los cortes histológicos

Se obtuvieron cortes coronales seriados de todo el cerebro (etapa 1) y posteriormente de la zona que abarca las proyecciones de los aSV (Bregma -7.64 mm a -5.34 mm), en un criostato (Leica CM3050). Las rebanadas se recuperaron en forma seriada sobre un portaobjetos (75x25 mm, super frost, DAIGGER®) o bien en flotación empleando una solución anticongelante (Anexo 1). En el caso de los portaobjetos fueron procesados dentro las 42 h posteriores. Los cortes en flotación fueron almacenados a -30 °C hasta su procesamiento.

En el caso del ratón Thy1: GCaMP-YFP, los cerebros de ratón adulto (4-7 meses), fueron procesados en cortes coronales y sagitales, respectivamente con la finalidad de identificar los aSV en ambos ejes.

6.4 Técnicas de inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizaron IHQ a partir de cortes coronales de las diferentes cepas de ratones previamente mencionadas, en dos modalidades de incubación: por flotación o directamente sobre las laminillas. Los anticuerpos empleados se muestran en la Tabla 2, las soluciones se detallan en el Anexo 1. El protocolo empleado fue el siguiente:

- A. Se rehidrató el tejido y/o lavó de la solución anticongelante, con PBS (2x5 min).
- B. Incubó durante 30 min a 4°C en PBST 0.1-0.5 %+ BSA 2 %, para permear las membranas y el BSA para bloquear sitios de unión no inmunológicos.
- C. Lavados de 5 min con PBST, a 4 °C.

- D. Incubación del anticuerpo primario de 24-48 h, en agitación leve < 50 rpm a 4 °C.
- E. Lavados con PBST-PBS a temperatura ambiente (TA): 6x10 min.
- F. Incubación del anticuerpo secundario (acoplado a peroxidasa o a una sonda fluorescente) durante 2 h a TA, o 24 h a 4 °C, conforme el periodo de incubación del anticuerpo primario.
- G. Lavados con PBST a TA: 6x10 min.
- H. Contra tinción nuclear:
Con DAPI (30 nM) o yoduro de propidio (YP, 1 mg/ml, ver anexo 1), durante 20 min a TA.
- I. Lavados con PBS: 2x10 min.
- J. Las laminillas fueron cubiertas con el medio de montaje Vectashield® o Mowiol® (Cat.81381, Sigma) (ver anexo 1), y se les colocó un cubreobjetos.

En todo momento las preparaciones se protegieron de la luz para evitar la pérdida de fluorescencia y se almacenaron permanentemente a 4 °C.

6.4.1 *Identificación de componentes biotinilados: Kit ABC*

Con el objetivo de revelar la señal del trazador BDA, como primer paso se usó el kit ABC (Cat. PK-6100, Vector Lab) que permite la identificación de cualquier componente biotinilado, a través de la avidina (reactivo A) que interacciona con la peroxidasa biotinilada (reactivo B) para formar el complejo C. Protocolo empleado:

- A. Se eliminó la peroxidasa interna incubando las rebanadas en una solución H₂O₂ 0.6 % en agua miliQ durante 20 min, RT.
- B. Para 5 ml de reacción; se agregó en 5 ml de PBST:
 - a. 1 gota (50 µl) de reactivo A, y mezclar.
 - b. 1 gota (50 µl) de reactivo B.
 - c. Mezcla y deja reposar de 15-30 min.
- C. Se enjuagaron las rebanadas en PBS (3x5 min), a TA (hasta que ya no había burbujas).
- D. Se incubaron con la mezcla 48 h, a 4 °C, en condiciones de obscuridad.
- E. Lavados con PBS (3x5 min).
- F. Se incubaron con substrato DAB para revelar la señal de la peroxidasa:
 - a. Para preparar 5ml de solución se agregó en el mismo volumen de **agua destilada**:
 - i. 2 gotas de Buffer stock solution, mezclar.
 - ii. 4 gotas de DAB stock, mezclar.
 - iii. 2 gotas de HPS (solución de peróxido de hidrogeno), mezclar.
 - iv. 2 gotas de Niquel, (opcional, en caso de que se quiera ver negra la señal).

- b. Se incubó a TA, de 2-10 min, hasta que se alcanzó una buena intensidad en la tinción. Evitar el sobre oscurecimiento del tejido.
 - c. Se detuvo la reacción con agua destilada
 - d. Se enjuagó 2x5 min con agua destilada.
- G. En el caso de rebanadas en flotación, se montaron en cubreobjetos cargado e incluyeron con medio de montaje (Mowiol®), para finalmente colocar el cubreobjetos.

Anticuerpo primario	Dilución	Marca	Anticuerpo secundario	Dilución	Marca
GAD65/67 (conejo)	1:2000	Sigma, G5163	Alexa 594 anti-conejo	1:200	<i>Invitrogen</i>
VGat (conejo)	1:500	Synaptic 131004.	Alexa 555 anti-conejo	1:700	<i>Molecular Probes</i>

Tabla 2. Lista de anticuerpos empleados.

6.5 Infiltración de tejido en resina EPON

6.5.1 Preparación de la muestra

Rebanadas coronales (500 µm de grosor) de cerebelos de ratones CD1 fueron infiltradas en resina EPON con el objetivo de obtener cortes semifinos de 200-300 nm para identificar la citoarquitectura del techo del ventrículo enfatizando en los aSV. El protocolo es el mismo que se emplea en el procesamiento del tejido para microscopía electrónica (soluciones descritas en el Anexo 1), y consiste en:

- A. Fijar el tejido en solución Karnovsky, durante 24 h a 4 °C.
- B. Lavados en buffer de cacodilato 0.2 M: 3x10 min, a TA.
- C. Embeber el tejido en tetraóxido de osmio 1% (Cat. 19110, EMS), 1 h, a TA.
- D. Lavar en cacodilato de sodio 0.2 M, 3x10 min.
- E. Incubar en ácido tánico 1 % (Cat. 21710, EMS), 1 h, TA.
- F. Deshidratar en gradiente de etanol (10 % a 100 %), en intervalos de 10 %, durante 20 min cada uno. Mantener en todo momento en hielo (4°C).
- G. Incubar en óxido de propileno, 2x15 min.
- H. Infiltrar en resina epóxica (1:1, en óxido de propileno), hasta que el propileno se evapore (~24 h), se removió el remanente.

- I. Reemplazar con resina epóxica al 100 %, y mantener en rotación durante 5 h a TA.
- J. La rebanada se colocó con resina entre dos micas plásticas para garantizar su polimerización plana, y se mantuvieron O/N a 60 °C.
- K. Una vez polimerizada la rebanada se colocó en el fondo de una cápsula plástica.
- L. **Obtención cortes semifinos:** Se obtuvieron secciones semi seriadas coronales de 300 nm, con un ultramicrotomo (EMC Power Tome XL), se recuperaron en un portaobjetos sin carga (Leica, Cat. 3809299). Se fijaron mediante calor (mechero de bunsen) y se dejaron sobre una parrilla a ~40 °C O/N.
- M. **Tinción con azul de metileno:** Los cortes se tiñeron con azul de metileno 3 % durante 2 min y se enjuagaron con agua bidestilada; se dejaron secar sobre la parrilla O/N.
- N. Se cubrieron con medio de montaje base xileno Entellan® (Millipore, Cat.1079610500).

6.6 Técnicas de Microscopía: adquisición de imágenes

6.6.1 *Microscopía confocal*

En la etapa 1 (caracterización de la vía anatómica), cada cerebelo y mesencéfalo, fue rebanado (secciones de 60 µm de grosor) y analizado en su totalidad para identificar la presencia de neuronas marcadas con alguno de los trazadores, y así poder determinar las regiones anatómicas que poseen aferencias y/o eferencias al punto de inyección. Una vez caracterizada la vía, sólo se consideró la zona que abarcaba las proyecciones del fastigio (Bregma -7.64 mm a -5.34 mm).

Los cortes seriados de cada animal experimental se analizaron en un microscopio vertical de epifluorescencia (OLYMPUS® BX53), empleando los filtros correspondientes para cada longitud de onda y los objetivos (OLYMPUS®) con las siguientes características:

- LAchN 4x/0.13/Php, 10x/0.25/Php.
- CachN 20x/0.04/Php.
- Uplan FLN 40x/0.55/Php.

Posteriormente se seleccionaron aquellos animales en los que el punto de inyección estuviera situado en la zona de interés (ZSV o NF), y las respectivas rebanadas donde se encontraron proyecciones marcadas por los diferentes trazadores fueron adquiridas en un microscopio confocal Zeiss LSM780 bajo las condiciones de captura indicadas en la Tabla 3.

Las reconstrucciones panorámicas del techo del IV se adquirieron con la modalidad *tile-scan*, tomando 4x2 campos, de 30-40 μm totales de grosor cada uno, empleando la función: *Z-Stack* (25 rebanadas ópticas, intervalo de 1.2 μm , resolución de 1024x1024 píxeles).

Fluorocromo / trazador	Excitación / emisión (nm)*	Láser (nm) / %	Filtro (nm)	Objetivos
FR	540/600	DPSS 561/	600	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Plan-Neofluar 10x/0.30 ▪ Plan-Apocromático 25x/0.8 1mm Korr- DIC. ▪ Plan-Neofluar 40x/1.30 oil- DIC
FG	340/380	Chameleon Ultra / 2	445	
Red-RB	530/590	DPSS 561 /	600	
YFP/GFP/A488	498/509-519	Argon 488 / 13	488	
DAPI	358/461	Chameleon Ultra/ 2	445	
YP/ A594	535-590/617	DPSS 561/	600	

Tabla 3. Condiciones de adquisición por microscopía confocal. *Valores obtenidos del fabricante.

6.6.2 *Microscopía de epifluorescencia*

6.6.2.1 *Imágenes para conteo de somas trazados con FluoroGold*

Se adquirieron imágenes de las regiones anatómicas identificadas con somas marcados con FluoroGold (FG), usando un equipo Apotome Axio Imager (Zeiss), bajo los siguientes parámetros: captura única por región, resolución 514 píxeles, objetivo Plan-Apocromático 1 mm Korr DIC 25x/0.8 de aceite, lámpara UV (X-Cite), filtros 488 nm y 600 nm, para identificar la señal de FG y Alexa 549, para la señal GAD65/67. Esta última fue empleada con dos objetivos: 1) delimitar la región correspondiente al NF en los experimentos del conteo de somas FG⁺ en el NF, (*ver resultados sección 1*); y 2) determinar las poblaciones GABAérgicas del NF con proyecciones contralaterales (*ver resultados sección 2*).

6.6.2.2 *Conteo de somas trazados con Retrobeads*

A partir de animales previamente inyectados con RB, se adquirieron dos imágenes de cada NF por rebanada, de las tres regiones del NF; usando un equipo Apotome Axio Imager (Zeiss), bajo los siguientes parámetros: dos capturas por región, resolución 514 píxeles, objetivo Plan-Apocromático 100x/1.46 Oil, lámpara UV (X-Cite), filtro 600 nm y 455 nm, para identificar la señal de RG y DAPI, respectivamente.

6.6.2.3 *Atlas del cerebelo del ratón Thy1:GCaMP:YFP*

Se construyeron tres Atlas a partir de cortes coronales del cerebelo y tallo cerebral obtenidos a diferentes ángulos de inclinación: 25°, 45°, 75° y 90°; tomando como ángulo cero la parte dorsal más prominente del mesencéfalo.

Las imágenes fueron adquiridas por microscopía de epifluorescencia con el equipo Apotome Axio Imager (Zeiss), en la modalidad de *Tile scan* (5x6) sobre el plano óptico de mayor intensidad de la señal YFP. Las condiciones de captura fueron: objetivo Plan-Apochromat 10x/0.45, lámpara UV (X-Cite), filtro de 488 nm, cámara Axiocam MR3, software Axiocam.

Se adquirieron imágenes consecutivas de la región comprendida entre Bregma -6.23 y -6.08 mm; en el caso del atlas a 75° se extendió el área de adquisición de Bregma -6.48 a -5.93 mm.

6.6.3 *Microscopía de luz*

Esta técnica fue empleada para adquirir las imágenes de los cortes semifinos infiltrados teñidos con azul de toluidina, y los cortes teñidos con Black Gold.

El equipo utilizado fue microscopio Leica DM2000, objetivos PLAN 10x, 25x, 40x y 100x, iluminación LED, cámara ICC50 HD, software de captura Leica-LAS.

6.7 **Registros electrofisiológicos de campo**

6.7.1 *Cirugía estereotáxica e implantación de electrodos.*

- A. Se anestesió al ratón administrando una dosis IP de ketamina/xilacina (3:1), 10 U/10 g de peso.
- B. Una vez que se corroboró que el animal se encontraba anestesiado (no presentaba reacción al pincharle la cola-extremidades inferiores), se colocó en el aparato de estereotaxia.
- C. Siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección I. Se expuso el cráneo del ratón, y se realizaron dos trépanos en el cráneo (coordenadas: 20° inclinación, AP: -2.2 mm, Lat: +2.15 mm, VD: -3.5 mm, respecto a lambda), un tercer trepano a la altura de la parte anterior del cerebelo (hemisferio derecho) con la finalidad de colocar el electrodo de referencia (en la dura madre).

- D. Se insertaron tres electrodos monopolares de tungsteno (Diámetro: 2-3 μm ; Microprobes, Cat. WE3003X.XA3), dos en el NF izquierdo (0.1-0.4 $\text{M}\Omega$ de impedancia) y uno en el NF derecho (1 $\text{M}\Omega$), este último unido a una cánula.
- E. El electrodo de registro (ER) fue insertado lentamente (pasos de 3-5 mm) hasta llegar 5 mm antes de la zona, posteriormente se bajó el electrodo en pasos de 0.5 μm , hasta llegara al NF.

6.7.2 *Registro electrofisiológico de campo in vivo.*

- A. Se empleó un amplificador acoplado a una tarjeta digitalizadora (DigiData 1440-A, Molecular Devices), la señal fue registrada en una computadora portátil, empleando el software Clampex 7.1 (Molecular Devices).
- B. La actividad espontánea fue registrada, durante 1.7 min con una frecuencia de 10,000 Hz, empleando un filtro pasa bandas de 0.1 Hz-1 KHz.
- C. En cuanto a la actividad evocada, se probaron dos protocolos:
 - a. Tren 10 estímulos: frecuencia de 50 Hz, duración del pulso, 0.2 ms; intervalo entre estímulos, 20 ms, (n= 13).
 - b. Tren de 5 estímulos: frecuencia de 100 Hz, duración del pulso, 0.1 ms; intervalo entre estímulos, 10 ms, (n= 5).
- D. Una vez registrada la actividad espontánea, se posicionó el electrodo de estimulación (EE), siguiendo la misma técnica descrita para el ER.
- E. Se esperaron 15 min para que la señal se estabilizará en cuanto a la proporción respecto al ruido.
- F. Se determinó la intensidad de estímulo que produjera el 70-80 % de la señal máxima (en base a la amplitud de la respuesta), en cada protocolo. Para ello se aplicó el tren de estimulación variando la intensidad de 60 y hasta 220 μA , en pasos de 20 μA , cada 2 min.
- G. Transcurridos 15 min, tiempo de espera suficiente para normalizar la actividad eléctrica de la región estimulada. Se aplicó el protocolo de estimulación a la intensidad previamente seleccionada.
- H. Transcurridos 2 min, se administró lidocaína ([2-4 %], 10 μl) mediante presión a través de la cánula, en dosis única.
- I. Se aplicó el mismo protocolo de estimulación, a los 1, 3, 5, 10, 15 y 30 min posteriores al tiempo de administración del fármaco. Se registró la actividad espontánea, para determinar diferencias respecto a la actividad basal previa al experimento.
- J. Finalmente, el ratón fue sacrificado (eutanasia) con una sobredosis de Pentobarbital (300 μl , vía IP).

- K. Para corroborar la región anatómica de registro:
- a. Se disecó el cerebro y colocó en solución fijadora.
 - b. Una vez fijado el tejido (mínimo 3 días, 4 °C), se cortó el cerebelo rebanadas coronales de 150 μm de grosor, empleando un vibratomo (Leica, Mod. VT 1000S, solución de corte PBS 1x, TA).
 - c. Las rebanadas se montaron sobre un portaobjetos sin carga (Leica, Cat. 3809299) usando Mowiol® como medio de montaje.
 - d. Las rebanadas se observaron en un estereoscopio (Olympus SZ61) acoplado a una cámara de video.

7. Resultados

Sección I: Identificación de las vías anatómicas

7.1 Identificación de las aferencias / eferencias de los aSV

7.1.1 *Estandarización de los trazadores neuronales*

Con la finalidad de estandarizar los trazadores más adecuados para marcar los aSV, se probaron diferentes trazadores de diferente polaridad, es decir anterógrados y retrógrados: BDA, FG, Texas Red, FR, True Blue, bajo diferentes condiciones (concentración, volumen inyectado, periodo supervivencia). Las condiciones probadas se detallan en la Tabla 4, Fig.7.

Los trazadores fueron inyectados en el parénquima del techo del cuarto ventrículo (Bregma: -5.88 mm, Ventral: 3.3 mm) en 24 ratones adultos (detalles en la sección de métodos). Los trazadores que por su naturaleza y características (difusión del sitio de inyección y capacidad de captura por las fibras) permitieron trazar lo aSV y/o neuronas de la ZSV fueron: BDA (10 %), FR (5 %) y FG (10 %), Fig. 7. De los cuales el FG tiene una capacidad de difusión mayor, siendo el más inespecífico; y limitando su marcaje a los somas celulares (n= 16, Fig. 7, panel superior). El BDA y FR tuvieron un desempeño similar caracterizado por una mínima difusión del sitio de inyección, marcando somas, procesos y terminales axónicas (n= 12, Fig. 7, panel medio).

El trazador Texas Red no fue eficiente ya que no fue incorporado por ninguna neurona, limitándose su marcaje a los pericitos (n= 5, Fig.7, panel inferior). Empleando el trazador True Blue se pudieron marcar somas de neuronas con aferencias hacia el sitio de inyección, sin embargo el marcaje dentro del núcleo es escaso, la disolución del trazador difícil y el espectro de emisión de fluorescencia de amplio rango (n= 2), por lo que se eligió en su lugar al FG.

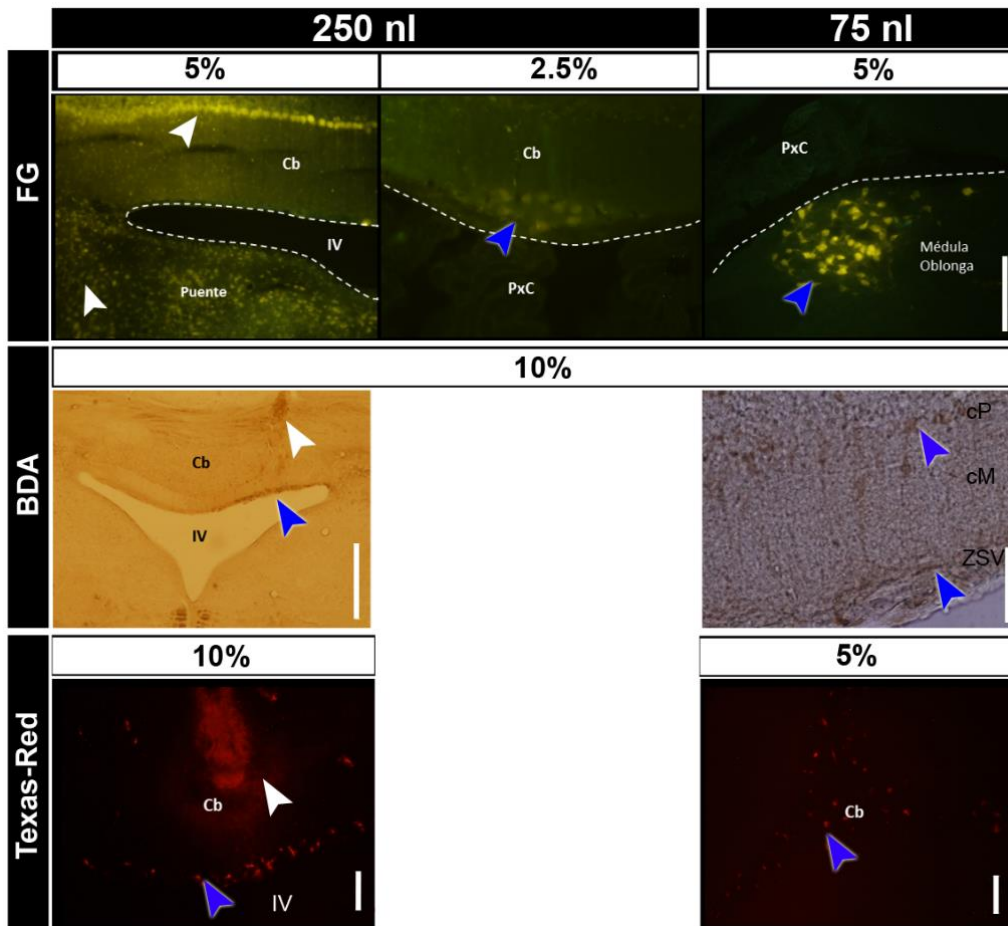
Los trazadores fueron inyectados solos o una mezcla de dos (anterógrado + retrógrado), sin embargo, se obtuvieron resultados más específicos al inyectarse solos en comparación a la mezcla. Esto en parte por el volumen empleado en la mezcla el cual no podía reducirse sin afectar la concentración del trazador.

El protocolo final con las condiciones específicas determinadas para cada trazador se muestra en la Tabla 1 de la sección de Métodos.

COORDENADAS	-5.88 mm	Lesión ± 0.02 mm
	-6.24 mm	SIN LESIÓN

TRAZADOR	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN	P. SUPERV	CEPA	N
FG + BDA	5% -10%	500nl	7, 5 y 2d	GFAP y CD1	4+5
Fluorogold	5% - 2.5%	250 nl		CD1	2+3
BDA	10%	100nl			3
True blue	3%	100 nl			2
BDA-Texas red	10%	100 nl	5d		3
BDA-TxR + FG	5% - 4%	75 nl	5d		2
					24

Tabla 4. Estandarización de diferentes condiciones de inyección de trazadores neuronales. Se muestran las diferentes condiciones probadas, así como el número de ratones empleados por condición. d: días, N: número de ratones probados, P. SUPERV: periodo de supervivencia, BDA: Biocityn Dextran Amida, FG: FluoroGold, BDA-TxR: BDA-Texas Red. Las coordenadas señaladas corresponden a Bregma.



◀ **Fig. 7 Imágenes representativas de tres de los trazadores neuronales probados en la ZSV y los lóbulos X-I.** Resultados clasificados de acuerdo con el trazador empleado, el volumen inyectado y la concentración (%) utilizada. *Los paneles superiores* muestran el marcaje con FG obtenido bajo diferentes condiciones, las puntas de flecha blancas indican el trazador ampliamente distribuido en la cP, cM e incluso a nivel del puente, mientras que las puntas de flecha azules muestran marcaje de somas en regiones más focalizadas. Nótese que a 5 %/75 nl se observa una intensidad de señal alta con marcaje focalizado. *Los paneles centrales*, corresponden al trazador BDA, el cual fue aplicado en dos volúmenes diferentes, la punta de flecha blanca indica el sitio de inyección mientras que las azules las regiones trazadas; donde el menor volumen permitió trazar de manera más específica. *Los paneles inferiores* muestran el marcaje obtenido con el Texas-Red, la punta de flecha blanca indica el punto de inyección donde se observa daño tisular dado el volumen, las flechas azules en ambas imágenes señalan los pericitos marcados. En ningún caso obtuvo trazado de neuronas. Cb: Cerebelo, PxC: Plexo coroideo, IV: cuarto ventrículo. Barras de izquierda a derecha: 200 μ m, 1000 μ m, 100 μ m, 500 μ m.

7.1.2 *Identificación de las regiones anatómicas asociadas con los aSV*

La inyección de los trazadores en la ZSV del cerebelo (n= 16 ratones) permitió la identificación de diversas regiones anatómicas con aferencias o eferencias relacionadas al punto de inyección: zona subventricular y lóbulos I-II, Fig. 8.

7.1.2.1 *Aferencias de la ZSV*

Para la identificación de los axones que proyectan hacia la ZSV con el trazador neuronal retrógrado FG, se eligieron a los animales en los cuales: a) el punto de inyección estaba en la ZSV en el lóbulo 1 (alrededor de bregma -5.88 mm) y b) presentaran marca en los aSV (n= 7). Los cerebelos y parte del cerebro de estos animales fueron analizados, encontrándose de manera consistente en todos ellos, células marcadas con FG, en las siguientes regiones anatómicas (identificadas con base al atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin, 2001), Fig. 8.

- MVePC: núcleo medial vestibular
- SuVe: núcleo superior vestibular
- DC: núcleo coclear dorsal
- VCP: núcleo coclear ventral
- 7N: núcleo facial
- unc: fascículo uncinado.

7.1.2.2 *Eferencias de la ZSV*

Siguiendo el mismo procedimiento de selección de muestras mencionado, se identificaron (n=5) células marcadas con BDA (trazador anterógrado, Figs. 9, 10), en las siguientes regiones anatómicas.

- Pf: Parafluoculo
- Med (NF): núcleo medial o fastigio
- Unc: Uncinado

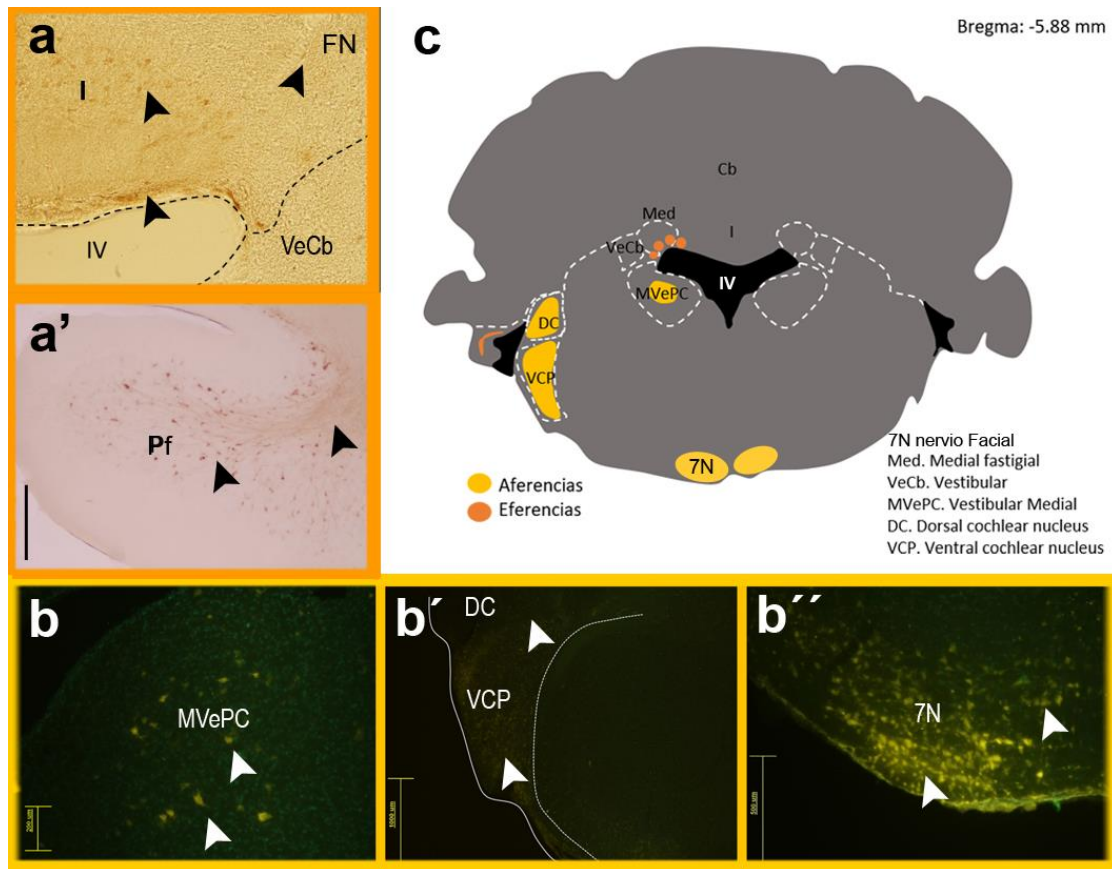


Fig. 8 Regiones anatómicas marcadas consecutivamente con FG y BDA (Bregma -5.88mm). **a-b**) Imágenes correspondientes a las áreas indicadas en el esquema en **c**) (basado en el atlas Paxinos 2001). Donde las eferencias a los lóbulos X-I (sitio de inyección) se indican en naranja (marca de BDA indicada con las puntas de flecha negras, **a-a'**), mientras que las aferencias en amarillo (marca de FG indicada con las puntas de flecha blancas **b-b''**). Pf, parafluoculo; IV, cuarto ventrículo, el significado de las abreviaciones restantes se muestra en c. Barras: 500 μ m (**a'**, **b''**), 200 μ m (**b**), 1 mm (**b'**).

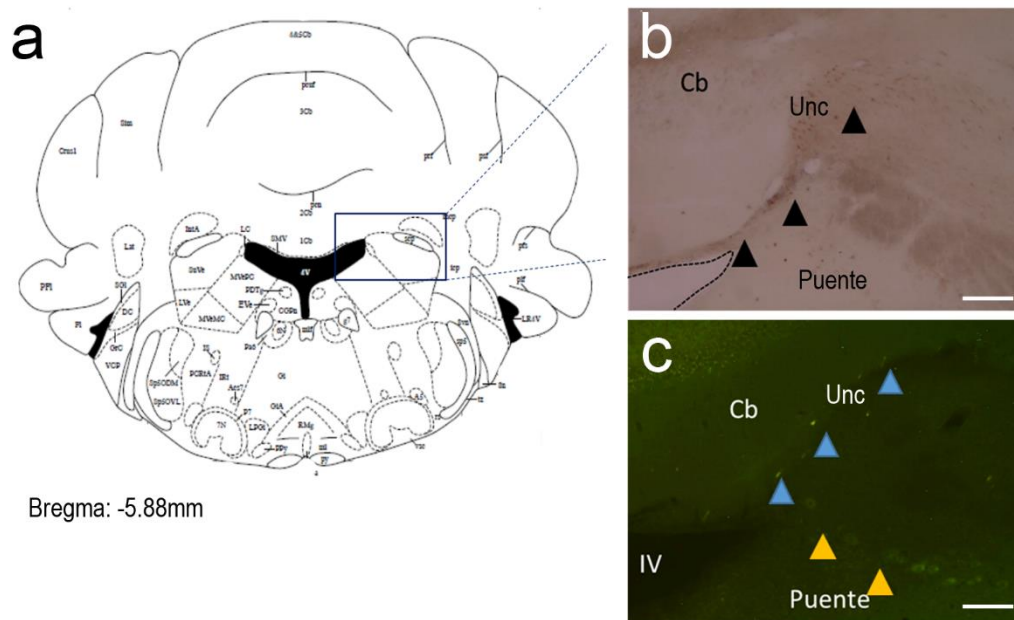


Fig. 9 Regiones anatómicas de la zona rostral marcadas con BDA y FG (Bregma -5.80 mm). a) Esquema tomado el Atlas Paxinos 2001, para referenciar la zona mostrada en b y c (rectángulo). b) Eferencias (BDA⁺) encontradas en la región del *Unc* (puntas de flecha negras). c) Aferencias en la región correspondiente al *Unc* (somatas FG⁺, puntas de flecha azules). Las flechas en amarillo indican la autofluorescencia de las neuronas del *coeruleus*. Cb: cerebelo, *Unc*: uncinado, Barras: 200 μ m.

7.1.2.3 Axones de la ZSV

Los axones de la ZSV (aSV) fueron evidenciados mediante el trazador BDA, producto de la difusión del trazador en lóbulo I del Cb (sitio de inyección); indicado que son proyecciones cuyo soma está localizado en el *NF y/o Pf*, regiones identificadas en la Fig. 8. Sin embargo, la trayectoria de estos tractos marcados con BDA no pudo ser evidenciada de manera directa, es decir en los cortes coronales no fue posible trazar a nivel de axón único la trayectoria de los tractos hasta llegar a los posibles sitios de origen. Por lo que se debió modificar el ángulo de corte, para ver si de este modo se podía evidenciar y corroborar dicha ruta anatómica.

Por otra parte, el co-trazado con FG, reveló somas marcados en SZV, los cuales no co-localizan con la marca de BDA, sugiriendo que se trata de dos poblaciones distintas. Es decir, que los aSV posiblemente están formados por proyecciones tanto eferentes como aferentes (Fig. 10).

Con el BDA algunas células del tipo GB fueron marcadas, la posición de los pies terminales sugiere un posible contacto con los aSV (Fig. 11); sin embargo, dicho contacto tendrá que ser corroborado mediante microscopía electrónica.

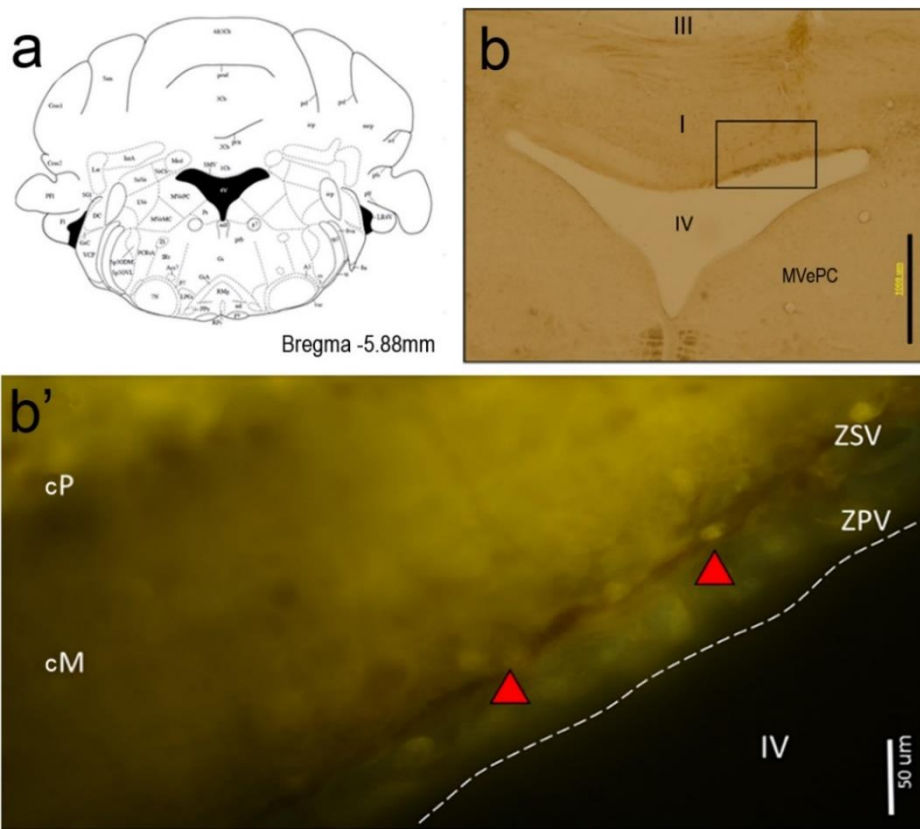


Fig. 10 Co-marcaje de los aSV: BDA y FG. a) Esquema de las coordenadas de referencia mostradas en b y b', tomado del atlas Paxinos 2001. b) Sitio de inyección de los trazadores neuronales, (puntas de flecha en negro). b') Amplificación de la zona dentro del recuadro en b, las puntas de flecha en rojo indican los aSV marcados con BDA, los cuales envuelven a somas marcados con FG (señal en amarillo). cM: capa molecular, cP: capa de Purkinje, ZSV: zona subventricular, ZPV: zona periventricular, IV: cuarto ventrículo. Barras: 1000 μm (b), 50 μm (b').

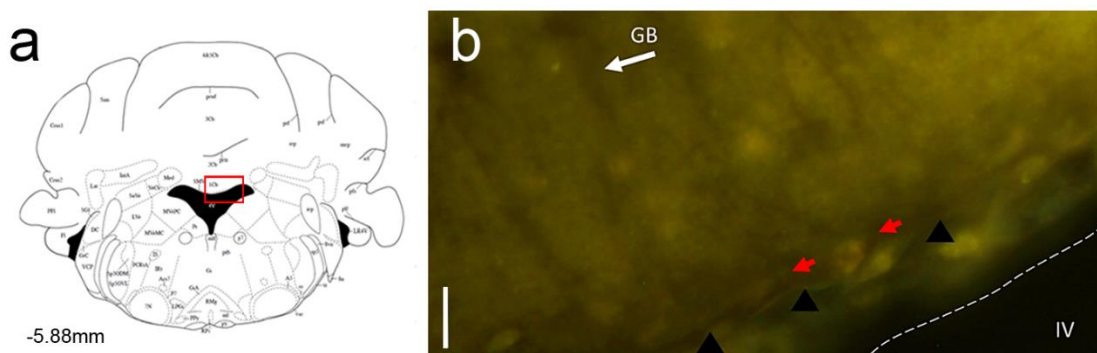


Fig. 11 Aproximación de los pies terminales de la GB a los aSV. a) Referencia anatómica de la imagen en b, correspondiente a la zona lateral del techo del IV (rectángulo rojo). b) Muestra la GB marcada con BDA (flecha blanca), así como los aSV (puntas de flecha en negro). La aproximación entre los pies de la GB y los axones se indica con las flechas en rojo. FG: señal en amarillo, BDA: señal en café. GB: Glía de Bergman, IV: cuarto ventrículo. Barra: 50 μm .

7.2 Optimización del ángulo de corte para la observación de los aSV

7.2.1 *Identificación de los tractos de la ZSV en ratones transgénicos Thy1-H: GCaMP-YFP*

Como estrategia alterna para la identificación de la trayectoria de los aSV, se utilizó la línea transgénica Thy1-H: GCaMP-YFP en la cual la expresión del gen reportero YFP regulado por el promotor Thy-1 se expresa en neuronas de proyección, maduras. Reportes como el de Porrero et al. (2010), muestran que líneas transgénicas similares (Thy1-YFP-h) marcan de manera específica poblaciones neuronales en el rombencéfalo, además de las neuronas clásicas de proyección de la corteza e hipotálamo, brindando una resolución a nivel de axón único. Esta característica es ideal para identificar el ángulo de corte en el cual es posible identificar directamente la trayectoria de los aSV.

A partir de la exploración del techo del IV de esta línea transgénica, fue posible identificar la distribución de los aSV en el eje AP, en cortes coronales del cerebelo obtenidos a diferentes ángulos de inclinación: 90°, 75°, 45° y 23° (N= 8, n= 2, Fig. 12, 13, 14 y anexo 2.1). Además de analizarse cortes sagitales (n= 2, Anexo 2.2), que confirman el paso de los aSV a través de la ZSV del lóbulo I-II, más no permiten seguir su ruta.

La observación de los aSV a través de la señal de YFP fue óptima en los cortes coronales a 75° y 45° (Fig. 13, 14) en comparación con los obtenidos a 90°, donde son evidentes los axones en la ZSV, pero no su ruta (Fig.12). Así, a 75° y 45° se logró evitar la segmentación de las fibras, e identificar la ruta anatómica que sigue la mayoría de los aSV, cuya distribución abarca desde Bregma -6.18 mm a -5.83 mm (lóbulos X-II, anexo 2.1) con una extensión total de 300-350 μ m, corriendo contralateralmente a través de la ZSV y la sustancia blanca; una fracción de ellos evidencia un aparente origen anatómico bilateral en el *núcleo fastigio* también llamado *núcleo medial* (NF, Med, Fig. 12a-c, 13a-c). Sitio anatómico que coincide con aquellos encontrados con los trazadores (resultados: sección 1).

Como parte de la descripción anatómica se encontró que los aSV se integran a la sustancia blanca a la altura de la interfase entre el lóbulo I y X, formando una cortina de axones que abarca $\sim 150 \pm 25$ μ m en el eje AP y posee ~ 800 μ m de extensión VM (Fig. 13b-c, 14a-c). Rostralmente (lóbulo I-II), son escasos los axones que pasan por la ZSV y abundantes las fibras dorsales que se extienden bilateralmente hacia ambos NF (Fig. 13a, 14a); mientras que caudalmente (lóbulo X), la densidad de aSV es mínima pero abundantes los axones dorsales de la materia blanca (Fig. 13d) en cortes a 75°. Una distribución opuesta se observa a 45° (Fig. 14d), lo que sugiere que en una reconstrucción 3D la integración de los aSV a la sustancia blanca continúa hasta la parte caudal (inicio del lóbulo X), región considerada en la extensión (AP) reportada en este trabajo (n= 4).

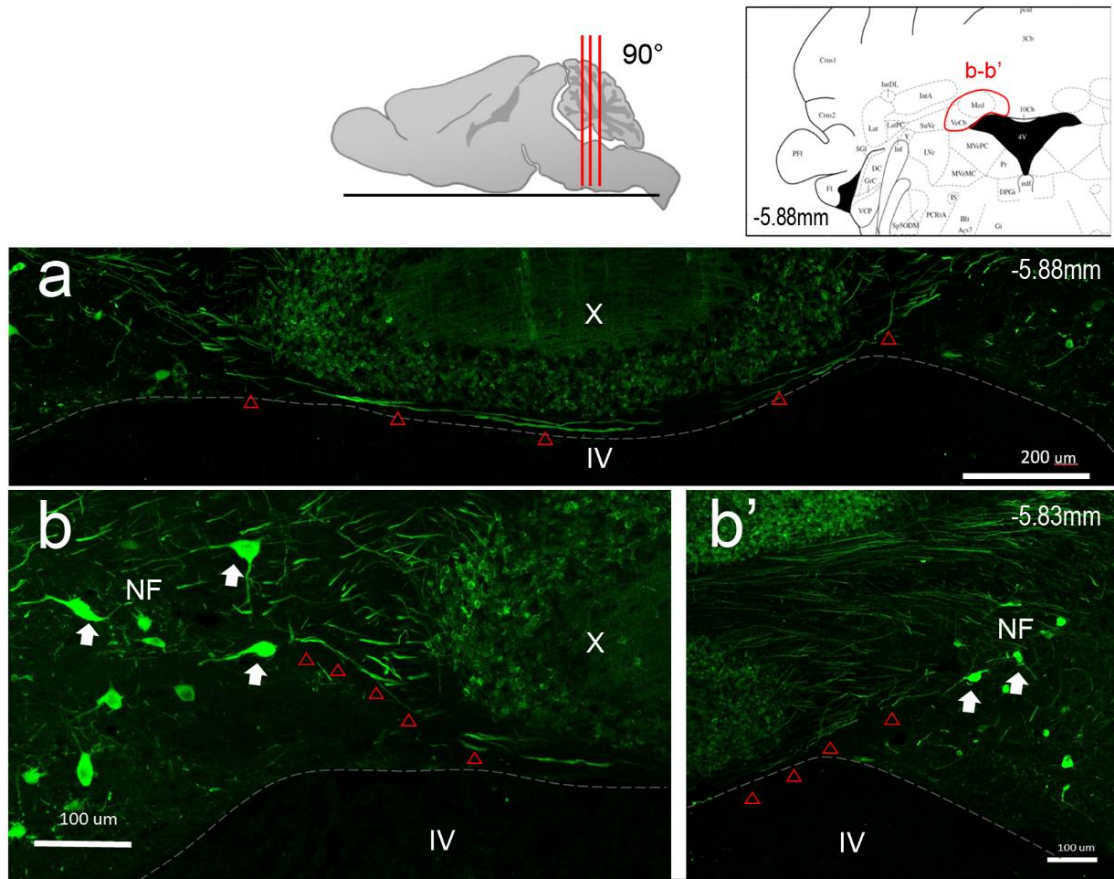


Fig. 12 Identificación de los axones del ZSV en cortes de cerebelo del ratón Thy1: GCaMP-YFP. Los diagramas en la parte superior indican el ángulo de corte y coordenadas en Bregma de las imágenes en a-b'. **a)** Techo del IV a la altura del lóbulo X donde los aSV (puntas de flechas rojas) lo recorren contralateralmente, sin embargo estos se ven segmentados a ambos extremos. **b-b')** Amplificaciones laterales de la rebanada contigua (bregma -5.83 mm), demuestran la trayectoria anteroposterior no lineal de los aSV (punta flecha en rojo), y sugieren provienen de las neuronas laterales (flechas blancas) del NF. En verde: Thy1-YFP. x, lóbulo diez; IV, cuarto ventrículo; NF, núcleo fastigio.

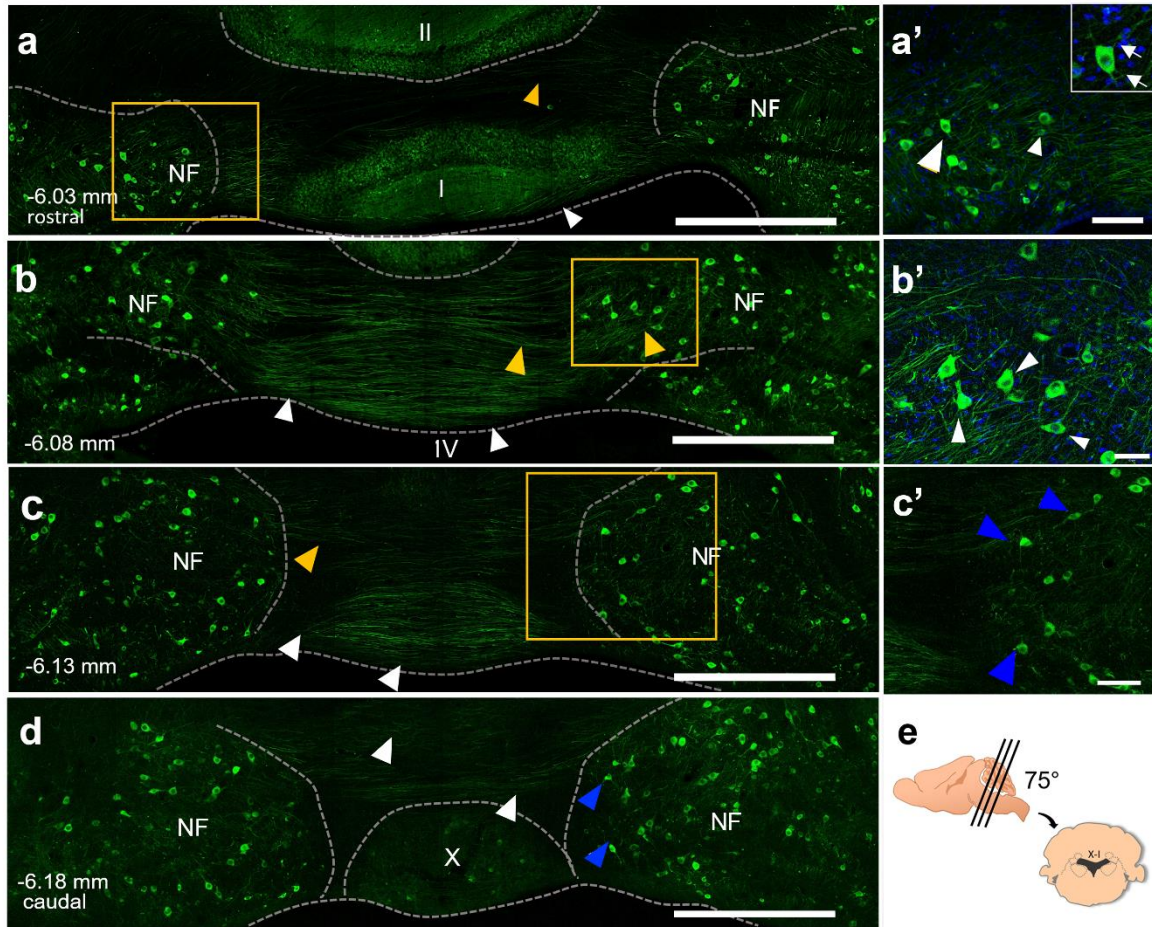


Fig. 13 Identificación de los axones del ZSV del cerebelo en el ratón Thy1: GCaMP-GFP. Cortes coronales seriados obtenidos a 75° de inclinación, donde se observa el trayecto de los aSV a diferentes alturas del techo del IV, se indican las coordenadas en Bregma. **a-c)** En los paneles principales los aSV ventrales se indican con puntas de flecha blancas, mientras que los axones dorsales con amarillos. La distribución de los aSV hacia la parte dorsal (materia blanca) es evidente en **b-c)**. La amplificación de las regiones indicadas por los recuadros amarillos correspondientes al NF, se indica en **a'-b')**; donde se observan neuronas con proyecciones laterales (puntas de flecha blancas). Las puntas de flecha azules en (**e', d)** indican las neuronas que delimitan el NF. **e)** Esquema región anatómica y ángulo de corte mostrados en las imágenes. En verde: Thy1; en azul: DAPI. Cb, cerebelo; IV, cuarto ventrículo; NF: núcleo fastigio. Barras: $500 \mu\text{m}$ (a-c) y $50 \mu\text{m}$ (a'-c').

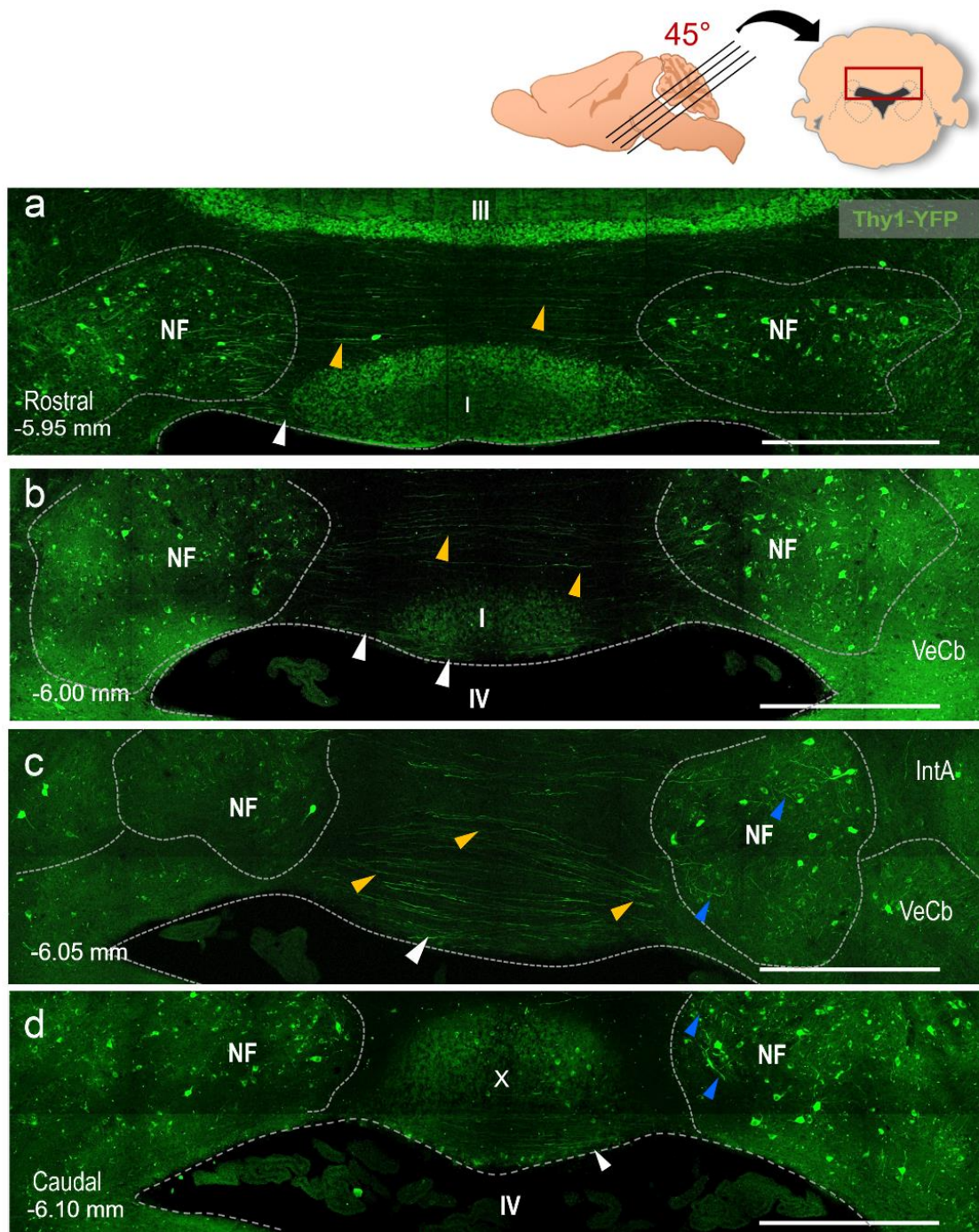


Fig. 14 Identificación de los axones del ZSV en cortes obtenidos a 45° de inclinación. Cortes coronales seriados, donde se observa el trayecto de los aSV a diferentes alturas del techo del IV indicadas por las coordenadas en Bregma. En la parte superior se muestran esquemas de la región anatómica y ángulo de corte mostrados en las imágenes debajo. En cada panel los aSV ventrales se indican con puntas de flecha blancas, mientras que los axones dorsales con amarillas. Las proyecciones contralaterales salientes del NF se muestran en la imagen en **a**), mientras que la distribución de los aSV hacia la parte dorsal (sustancia blanca) es evidente en **c**). **d**) La región caudal en este ángulo muestra una fracción de los aSV y los NF se delimitan claramente por neuronas locales (puntas de flecha azules). IntA, interpuesto anterior; VeCb, núcleo vestibular, NF: núcleo fastigio, IV, cuarto ventrículo. Barras: 500 μ m.

7.3 Identificación del núcleo fastigio como origen de los axones de la ZSV (aSV)

La evidencia reunida con la inyección de trazadores en el techo del ventrículo (lóbulos X-I) y la observación anatómica de la cepa Thy1-YGP, sugiere que es el NF es el origen probable de los aSV, por lo que se procedió a probar esta hipótesis. Para ello, se realizaron microinyecciones unilaterales y focalizadas en el NF empleando 4 trazadores diferentes (Tabla 1), en experimentos individuales realizados en ratones CD1 y transgénicos (Thy1: GCaMP-YFP, GFAP-eGFP), n= 29. Los trazadores anterógrados inyectados fueron el FR y BDA, los retrógrados FG y green Retrobeads (RB). Esta batería de trazadores son complementarios entre sí, en cuanto a polaridad; además de brindar resultados corroborativos dadas las características intrínsecas de cada uno, entre las que destaca la difusión del sitio de inyección y la especificidad de marcaje (Köbbert et al., 2000; Schofield, 2008; Catapano et al., 2008; Katz et al., 1984).

7.3.1 Identificación de eferencias del Fastigio

7.3.1.1 Trazado de los aSV con Fluoro Ruby

El análisis de 304 cortes coronales consecutivos de 60 μm (n= 12) correspondientes a la región Bregma -6.72 mm a -5.20 mm, reveló que las proyecciones del NF se distribuyen de la siguiente manera:

- A. Las neuronas del NF que se encuentran en la **región caudal** del lóbulo X (aprox. Bregma -6.48 a -6.18 mm), envían sus axones hacia los núcleos vestibulares (lateral-LVe, superior-SpVe y medial- VeCb) de manera ipsilateral, (Fig. 15).
- B. En la **región medial**, que abarca la interfaz entre la región rostral de lóbulo X y el comienzo del lóbulo I (aprox. Bregma -6.18 a -5.83 mm), fue dividida en dos regiones: a) *medial-caudal*; donde los axones del NF corren de manera longitudinal en el plano medio lateral en el techo del cuarto ventrículo, específicamente en la ZSV (Fig. 16b-b3, puntas de flecha en amarillo) y sustancia blanca (puntas de flecha en blanco), dirigiéndose hacia el NF contralateral (Fig. 16c-c2; Fig. 17). Esta disposición abarca alrededor de 150-200 μm en el eje AP y comprueba que los aSV se originan en el NF. b) *medial-rostral*; comprende ~ 100 μm , en ella las proyecciones del fastigio descienden ipsilateralmente al LVe, MVePC, DC; y bilateralmente al Pr (Fig. 16b, 17c).
- C. Las neuronas del NF en la **región rostral**, correspondiente a la región del lóbulo I (Bregma: -5.83 mm a -5.63 mm) envían sus axones de manera contralateral descendente hacia el LVe, y otra porción forma los llamados cuernos de Russell que integran el *Unc* (Fig. 18).

Estas observaciones muestran que los axones del NF proyectan de manera diferencial a lo largo del eje AP que abarca dicho núcleo; siguiendo una ruta a través de la ZSV en su porción medial. Siendo los axones de esta ruta los aSV.

Cabe destacar que los hallazgos de las proyecciones del segmento intermedio del NF, fuertemente sugieren una comunicación entre ambos NF.

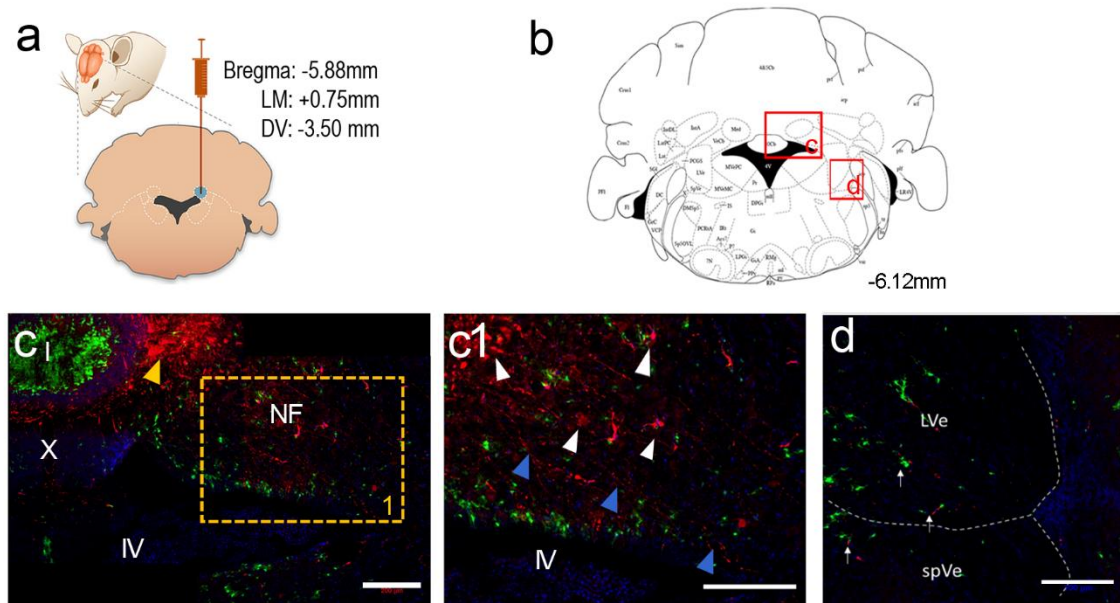


Fig. 15 Trayecto de los axones del fastigio en el lóbulo X de ratones GFAP-GFP. a) Sitio de inyección del trazador FR. b) Regiones anatómicas de las imágenes mostradas en c-d. c) Punto de inyección (punta de flecha amarilla), donde se observan las proyecciones del fastigio trazadas en rojo. c1) Amplificación de la región del recuadro amarillo en c); las neuronas del fastigio que incorporaron FR se indican con las puntas de flecha blancas y los procesos asociados, en azul. d) Destino anatómico de los axones del NF mostrados en c1, las terminales axónicas se indican con las flechas. FR: rojo, astrocitos (GFAP): verde, núcleos (DAPI): azul. NF, núcleo fastigio); LVe, núcleo vestibular lateral; spVe, núcleo vestibulo-espinal. Barras: 200 μ m.

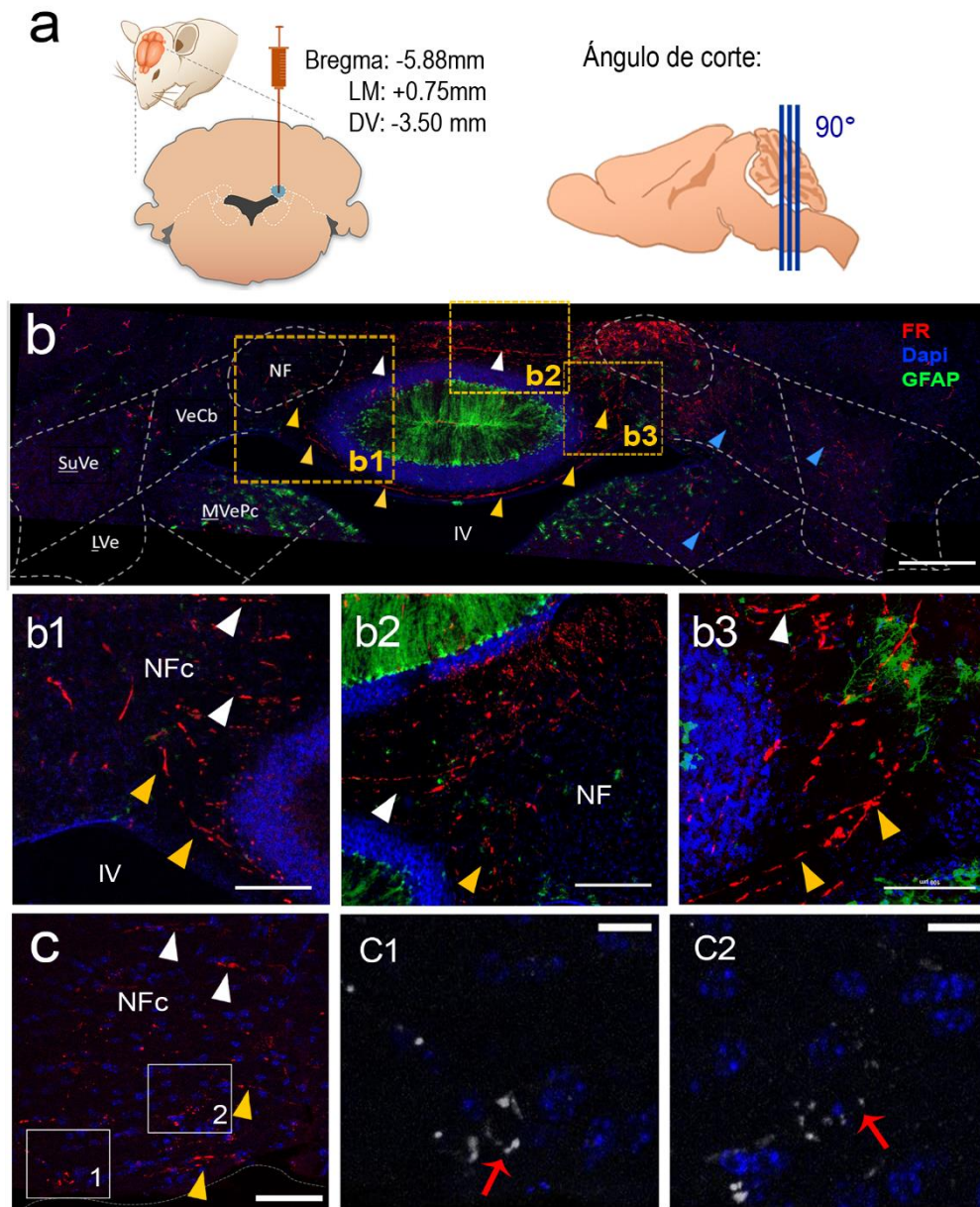


Fig. 16 Trayecto de los axones de las neuronas del NF en el lóbulo I en ratones GFAP-GFP. a) Esquema del sitio de inyección del trazador (NF) y ángulo de las imágenes mostradas. b) Trayecto contralateral al sitio de inyección que siguen las proyecciones del fastigio a través de la ZSV (señal en rojo). A lo largo de la figura las puntas de flecha amarillas indica el transcurso ventral de los axones, mientras que las blancas indican el curso dorsal de las mismas fibras a través de la sustancia blanca. **b1)** Ampliación de la zona lateral izquierda, donde se observan las fibras ventrales y dorsales proyectando hacia el NF contralateral (NFc). **b2)** Halo de dispersión del trazador a partir del punto de inyección abarcando el NF, axones dorsales y ventrales, salientes del núcleo. **b3)** Magnificación del NF en la porción ventral, donde destacan sus proyecciones ventrales rodeadas de atrociitos (célula verde). c) Corte 100 μm más caudal, donde se observa el mismo patrón de distribución y trayectoria de los axones hacia el NFc. **c1-2)** Amplificación de dos zonas de NFc mostradas en c, donde se observan las terminales axónicas (señal en blanco) rodeando somas de la región (señal en azul) señaladas por las flechas rojas; en estas imágenes el canal rojo se reemplazó por el blanco para mejorar el contraste. Verde: astrociitos y GB marcados con la proteína GFAP. Azul: tinción de núcleos, DAPI. I: lóbulo I, IV: cuarto ventrículo. Barras: 100 μm (a-c), 200 μm (d).

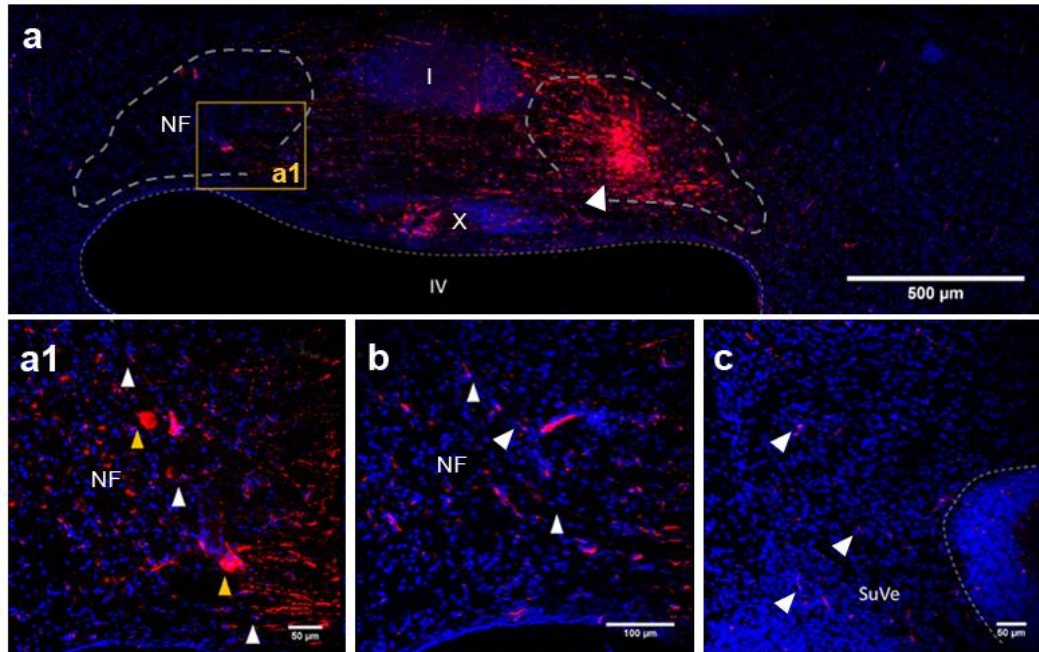


Fig. 17 Proyecciones contralaterales de la región media del NF. **a)** Corte coronal de 75°, a la altura de Bregma 6.0-8.8 mm, muestra el sitio de inyección del FR en el NF unilateral (puntas de flecha blanca) y las proyecciones de dichas neuronas hacia el NF contralateral. **a')** Amplificación del recuadro amarillo en a, donde se indican las terminaciones contralaterales al NF (puntas de flecha blancas), así como algunos somas del NFc marcados (puntas de flecha amarillas). **b)** Imagen correspondiente a la zona del NFc al sitio de inyección en la rebanada contigua (50 μm más rostral), donde las múltiples terminales axónicas fueron identificadas (puntas de flecha). **c)** Zona correspondiente al SuVe ipsilateral al punto de inyección, donde también se observan terminales de axones del fastigio (puntas de flecha). Azul, DAPI; NF, núcleo fastigio; I, lóbulo I; IV, cuarto ventrículo. Barras: 500 μm (a), 100 μm (c), 50 μm (b-d).

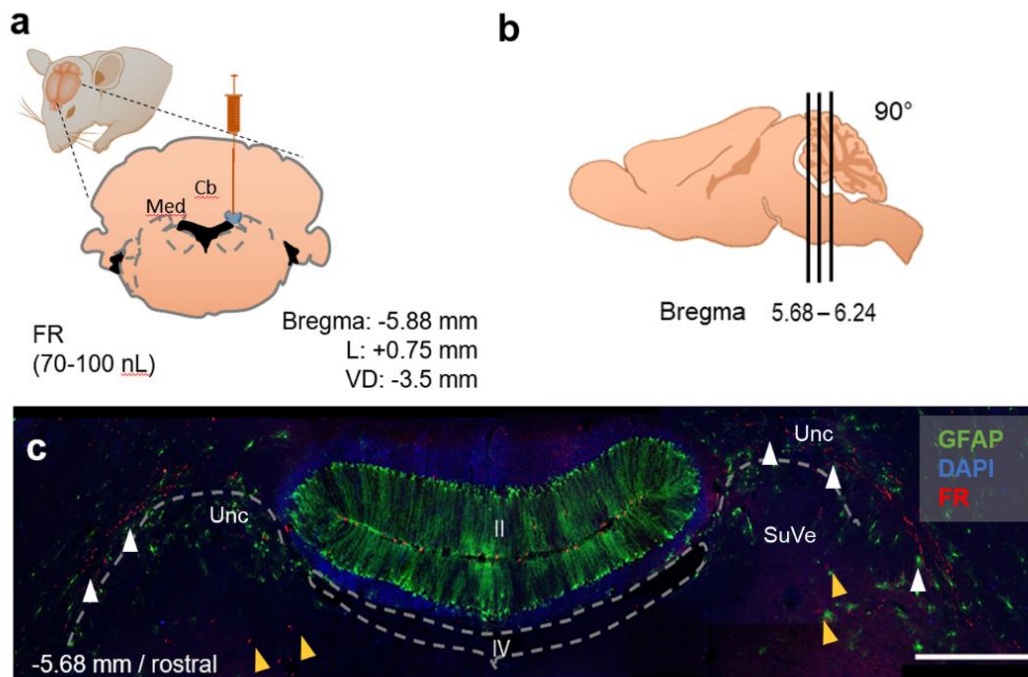


Fig. 18 Proyecciones bilaterales de la región rostral del NF. **a)** Esquema con las condiciones de inyección del trazador FR. **b)** Corte coronal de 90° de inclinación, a la altura de Bregma -5.68 mm, muestra la región anatómica de la imagen mostrada en c. **c)** Trayectoria de los axones del fastigio marcados con FR a la altura de la zona rostral de núcleo, donde una porción de los axones integra el Unc (puntas de flecha blancas) y otros proyectan al SuVe (puntas de flecha amarillas). El punto de inyección se muestra en la Fig 14c. II, lóbulo II; IV, cuarto ventrículo. Barra: 500 μ m (c).

7.3.1.2 Corroboración de los aSV como eferencias del fastigio mediante el trazador BDA

La identificación de las proyecciones neuronales mediante estudios anatómicos precisa del marcaje de estos con trazadores complementarios, de manera que las vías anatómicas sean corroboradas. Así, el siguiente paso fue la corroboración de los sitios de origen y proyección, mediante la inyección unilateral del trazador clásico anterógrado BDA (parámetros indicados en la Tabla 2), Fig. 19a, en el NF (n= 6).

Los resultados obtenidos mediante el análisis de los cortes coronales obtenidos a 75 y 90° de inclinación (n= 6), mostraron las neuronas del fastigio y sus respectivas proyecciones marcadas con BDA (Fig. 19b-e); las cuales siguen su trayectoria contralateral a lo largo de la sustancia blanca dejando a su paso terminales axónicas de tipo *roseta* (botones sinápticos) y fibras en *passant* en el NF contralateral (Fig.19f-g), icp y MVe (Fig. 19j-k). La trayectoria de los aSV a lo largo de la ZSV del IV ventrículo es evidente en la Fig. 19h-i. En conjunto estos resultados corroboran que los aSV surgen del fastigio, y una conexión directa entre los dos NF.

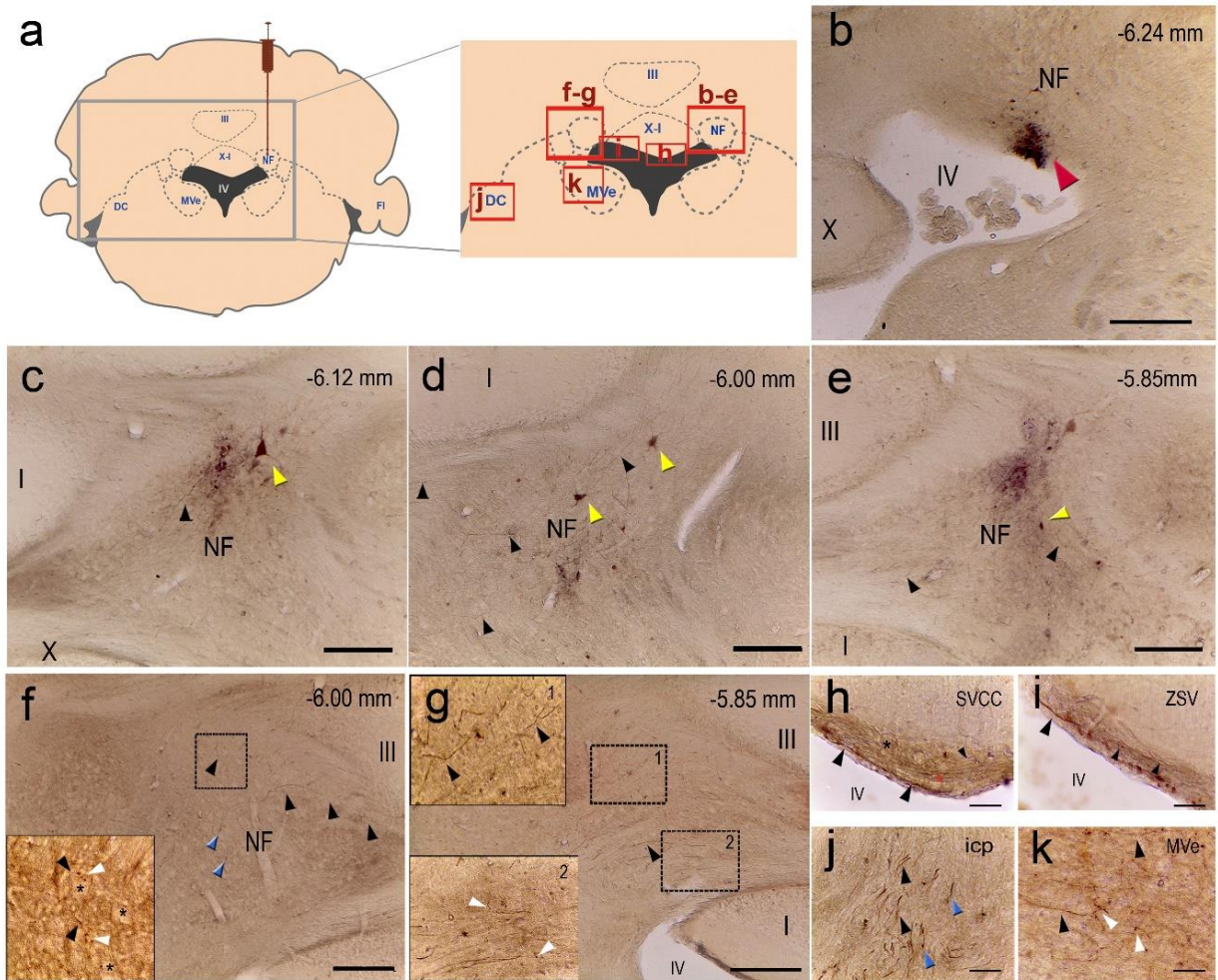


Fig. 19 Identificación de botones terminales en el NF contralateral asociados a los aSV. a) Sitio de inyección del BDA, el esquema de la derecha indica las regiones anatómicas correspondientes a las micrografías. b) Sitio de inyección (punta de flecha roja) en el NF derecho. c-e) Secciones coronales seriadas del NF donde se observan el marcaje específico largo del núcleo, somas (punta de flecha amarillas) y procesos (puntas de flecha negras). f-g) Proyecciones del fastigio corren contralateralmente a través de la sustancia blanca (puntas de flecha negras). *Puncta* (puntas de flecha azules) y botones terminales (puntas de flecha blancas) fueron identificados en la región rostral y medial del NF. Los recuadros punteados indican las regiones presentadas en las magnificaciones laterales, donde los somas (asteriscos en negro) resaltan dado el contraste de fase empleado. h); aSV marcados por el BDA (flechas negras), corriendo en la ZSV que subyace al SVCC (asterisco rojo). i) Parte lateral del techo del IV ventrículo con aSV marcados. j-k) Sitios con terminales axónicas (flechas azules), fibras segmentadas (flechas blancas) y botones terminales (flechas blancas). Las coordenadas correspondientes (Bregma) están indicadas en cada panel. Icp, pedúnculo cerebeloso inferior; MVe, núcleo vestibular medial; SVCC, *subventricular celular cluster*. Barras: 500 μ m (b-g), 50 μ m (h-k).

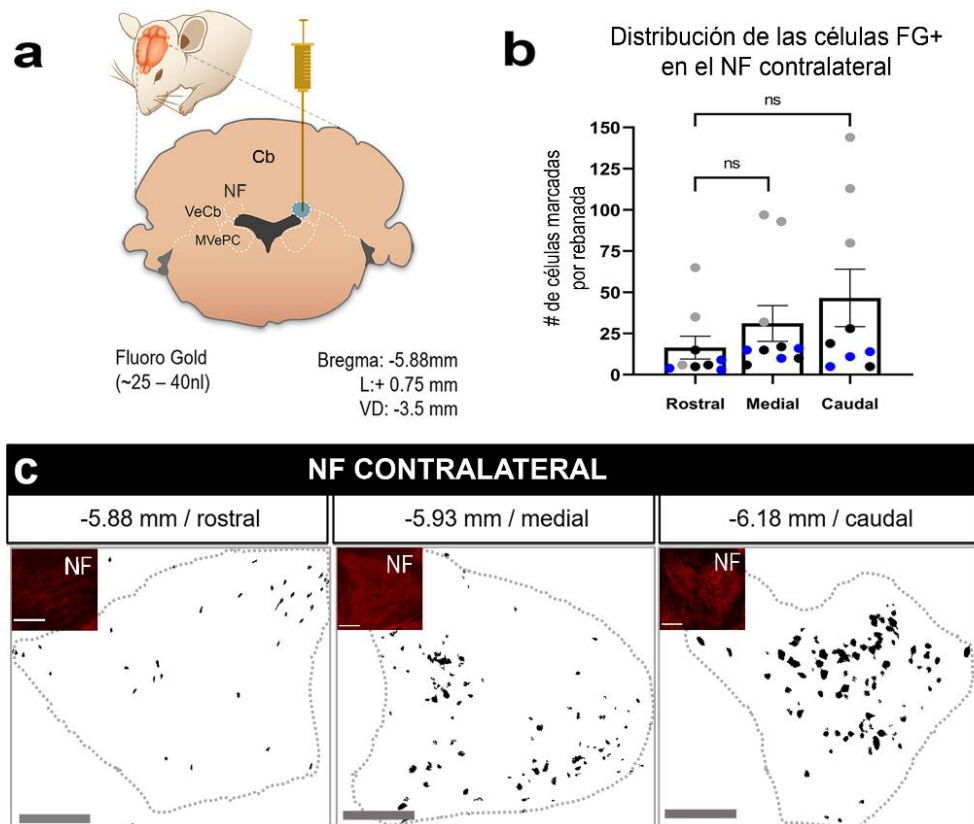
7.3.2 Identificación de las aferencias del núcleo fastigio

7.3.2.1 Aferencias del fastigio evidenciadas con Fluoro-Gold

Con el objetivo de corroborar las **aferencias** de las proyecciones *contralaterales del NF*, se realizaron inyecciones unilaterales del trazador retrógrado FG en ratones CD1 (n= 7, Fig. 20a). Ver especificaciones en la *sección 2 de métodos*.

El análisis de los sitios de proyección en cortes coronales consecutivos (a 75°), indicaron la presencia de somas marcados con FG en las tres regiones del NF: **rostral, medial y caudal** (Fig. 20b-c; N=7). La cuantificación de los somas FG⁺ (n= 3) arrojó una mayor presencia de éstos en la zona caudal y medial (47 ± 17 , 31 ± 11 ; mean \pm SEM) respecto a la zona rostral (16 ± 6.9), sin embargo, el análisis estadístico Kruskal-Wallis Test, post-hoc: Dunn's Test (alfa 0.05), no mostró diferencias significativas (valores de p = caudal vs rostral: 0.80; medial vs rostral: 0.85).

Estos resultados indican que a lo largo del NF (en el eje AP) existen somas con proyecciones contralaterales que evidencian la conexión anatómica entre ambos NF, reforzando los hallazgos previamente encontrados con los trazadores anterógrados.



◀ **Fig. 20 Distribución de las aferencias de NF.** **a)** Condiciones generales y sitio de inyección del FG. **b)** Gráfica de la cuantificación de los somas FG⁺ en las tres regiones del NF contralateral (rostral, medial, caudal), donde se presenta el promedio ± SEM, n= 3, Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison Test, *p< 0.05; cada color indica un sujeto experimental. **c)** Imágenes binarias representativas de cada región del NF a partir de las cuales se realizó la cuantificación, las marcas en negro corresponden los somas FG⁺ segmentados. Las coordenadas de Bregma se indican en la parte superior. Las imágenes incrustadas en cada panel corresponden a la señal del anticuerpo GAD 65/67 (marca roja), empleada como referencia para delimitar el NF. Barras: 200 μm.

7.3.2.1.1 Identificación de aferencias mesencefálicas y pontinas al núcleo fastigio

La inyección unilateral del trazador en el NF, además de mostrar aferencias provenientes del NF contralateral, evidenció que regiones anatómicas como los núcleos vestibulares medial, superior y lateral (MVe, SuVe, LVe) poseen proyecciones al sitio de inyección (Fig. 20), las cuales se presentan de manera ipsilateral y contralateral, para ambos casos. Así mismo se identificaron las regiones pontinas núcleo lateral paragigantocelular (LPGi); zona prefacial (P7); pedúnculo cerebeloso inferior (icp) y núcleo x. Estas proyecciones han sido previamente descritas (Voogd, 1964; Noda et al., 1990; Homma et al., 1995; Siebold et al., 1997).

Cabe resaltar que fueron analizados: el cerebelo, mesencéfalo y puente tronco-encefálico, encontrándose aferencias exclusivamente en las regiones hasta ahora mencionadas (Fig. 21).

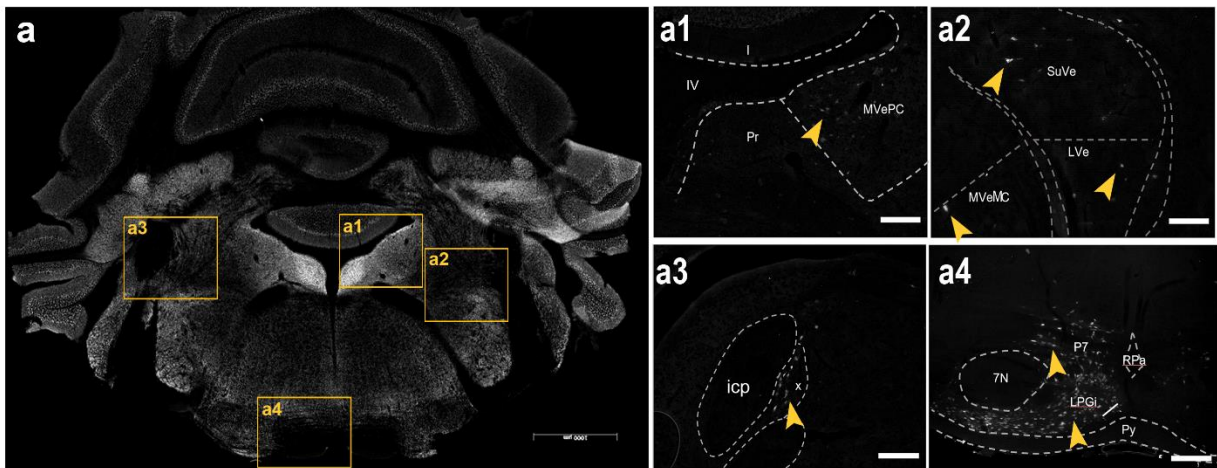
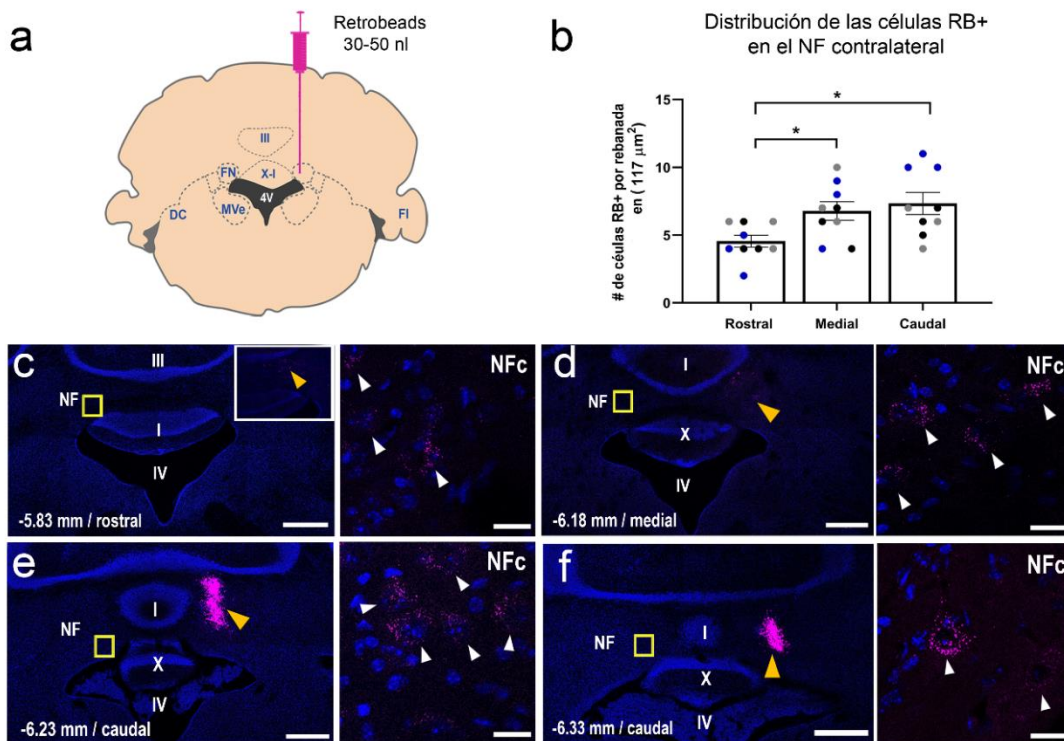


Fig. 21 Regiones anatómicas mesencefálicas y pontinas con proyecciones al NF. La imagen **a)** muestra un corte coronal de cerebelo indicando las zonas magnificadas presentadas en los paneles **a1-a4**, donde se muestran las distintas regiones a nivel de mesencéfalo y/o puente, con neuronas marcadas con FG. Icp, pedúnculo cerebeloso inferior; LVe, núcleo vestibular lateral; MVePC, núcleo vestibular medial parvocelular; LPGi, núcleo lateral paragigantocelular; P7, zona prefacial; SuVe, núcleo vestibular superior; x, núcleo x. Barras:1000 μm (a), 200 μm (a1-a4).

7.3.3 Corroboración anatómica del circuito inter-fastigio: marcaje con Retrobeads

Como parte de la estrategia experimental de la corroboración de la vía inter-fastigios, se inyectaron *Retrobeads* (RB), bajo las mismas condiciones, es decir de manera unilateral en el NF. Una ventaja de este trazador respecto al FG, es que, al estar formado por microesferas de látex, es pobremente captado por fibras de paso (Shofield, 2008; Köbbert, 2000); garantizando así la identificación de aferencias exclusivas de la región inyectada.

Los resultados obtenidos mostraron la existencia de proyecciones inter-fastigio a lo largo de las tres regiones del NF (rostral, medial y caudal; $n = 4$, Fig. 22), corroborando los resultados previos obtenidos con el FG. La cuantificación del número de somas por región indicó un aumento de estos en la zona caudal (7 ± 0.8) y medial (7 ± 0.7), respecto a la rostral (5 ± 0.4), ($n = 3$, Fig. 22b); diferencia estadísticamente significativa a la prueba Welch-ANOVA / post-hoc: Games-Howells, $*p < 0.05$, $p = 0.41$ (medial vs rostral) y $p = 0.28$ (caudal vs rostral). La comparación entre la región caudal medial y caudal, no arrojó ninguna diferencia ($p = 0.86$).



◀ **Fig. 22 Identificación de poblaciones de neuronas en el NF contralateral mediante *Retrobeads*.** **a)** Sitio de inyección y condiciones generales del experimento en ratones hembra CD1, n= 4. **b)** Gráfica del conteo de número de somas por región del fastigio, donde se muestra el valor por rebanada (media + SEM) y cada color indica un animal. El número de células fue menor en la zona rostral (prueba de Welch-ANOVA, post-hoc: Games-Howell's, *p<0.05). **c-f)** Imágenes representativas de un ejemplar inyectado con FR (marca rosa), cortes coronales del cerebelo. El punto de inyección se indica con las puntas de flecha en amarillo; el cuadro insertado en **c)** corresponde a una magnificación del NF ipsilateral al sitio de inyección. Los paneles laterales son magnificaciones de la región contenida en los recuadros amarillos, correspondientes al NF contralateral (NFc), en los cuales el marcaje FR⁺ alrededor en las somas del fastigio, es evidente (puntas de flecha blancas). DAPI: azul, FR: rosa. Barras: 500 µm (c-f, paneles grandes), 20 µm (paneles laterales).

Sección II: Identidad neuroquímica de los aSV

7.4 Caracterización por inmunohistofluorescencia de las fibras de la ZSV

7.4.1 *Identificación poblaciones neuronales GAD65 / 67+ en el NF con proyecciones contralaterales.*

Con el objetivo de caracterizar la identidad neuroquímica de los axones en estudio, de manera que se pudiera determinar puntualmente la naturaleza de los axones provenientes del NF contralateral, cerebelos de ratones CD1 previamente inyectados con el trazador FG en el NF, fueron procesados con la técnica de inmunohistofluorescencia (IHF) contra la enzima *glutamato descarboxilasa (GAD65/67)*, (n= 6). Enzima que sintetiza al neurotransmisor GABA a partir de glutamato, y reportada como marcador de terminales axónicas y neuropilo de neuronas GABAérgicas, incluyendo las de los núcleos profundos del Cb (Gilerovitch et al., 1995; Sheikh et al., 1999).

El análisis se llevó a cabo en cortes consecutivos de las tres regiones del NF (n= 4): rostral, medial y caudal, las cuales fueron definidas con base a las coordenadas mencionadas en la sección 1 de los resultados (marcaje con FR), y el área correspondiente al NF, con base a la expresión de GAD65/67 (Figs. 23, 24, 25). Las células fueron consideradas como GAD⁺ cuando la expresión de GAD65/67 se encontró dentro del soma, y GAD⁻ cuando la expresión de dicha enzima se restringía al borde de la membrana plasmática, asumiendo que esta señal indicaría únicamente las terminales axónicas de las CP.

El conteo del número de neuronas FG⁺ que expresan GAD 65/67 se realizó en 6 rebanadas por animal (2 por región), n= 4; arrojando los siguientes resultados:

a) Del total de células FG^+ contadas, el $88.4\% \pm 3.4$ fueron de tipo GABAérgico ($GAD65/67^+$), mientras que el $11.8\% \pm 3.4$ fueron $GAD65/67^-$; diferencia significativa a la prueba de T-no pareada (***) $p < 0.0001$, $n = 4$, Fig. 26a).

b) El conteo del número total de células ($FG^+ - GAD65/67^+$) por zona del fastigio (rostral $82.9 \pm 5.3\%$, medial $91.7 \pm 3.3\%$, caudal $88.5 \pm 4.5\%$), y comparaciones estadísticas entre grupos (valores $p =$ caudal vs. medial 0.95, caudal vs. rostral 0.9, y medial vs. rostral 0.72), no mostraron diferencia significativa a la prueba ANOVA-Tukey's ($p > 0.05$, $n = 4$, Fig. 26b). En conjunto estos resultados indican que en su mayoría las neuronas del NF con proyección contralateral son de tipo GABAérgico; y que la distribución de esta población neuronal es homogénea a lo largo del NF, dada la expresión de $GAD65/67$.

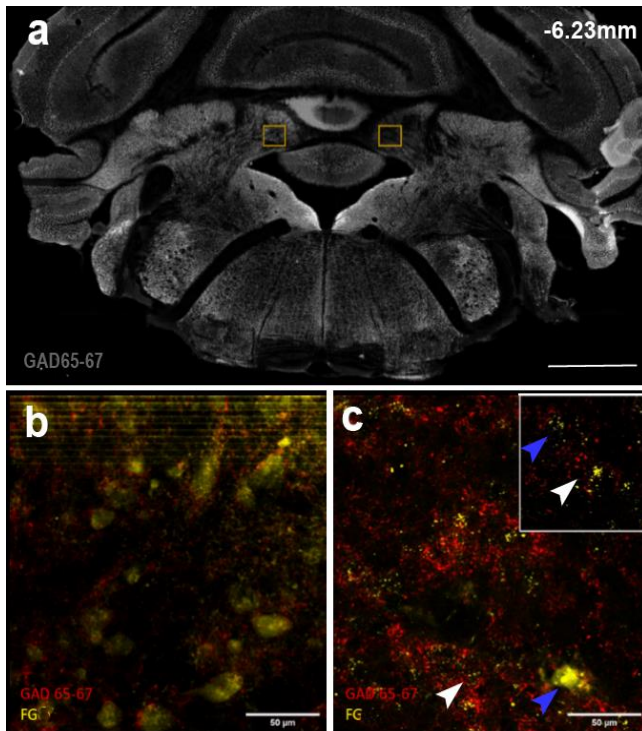


Fig. 23 Células $FG^+ / GAD65-67^+$ de la región caudal del NF. a) Corte coronal a la altura de Bregma -6.23 mm, la señal corresponde a la enzima $GAD65/67$. Los recuadros en amarillo indican las regiones magnificadas en b-c respectivamente. b) NF ipsilateral al sitio de inyección. c) NF contralateral al sitio de inyección. La imagen superior derecha muestra una ampliación de los somas. Los somas considerados GABAérgicos se indican con las puntas de flecha blanca, mientras que los no GABAérgicos con la azul. Barras: 1 mm (a); 50 μ m (b, c).

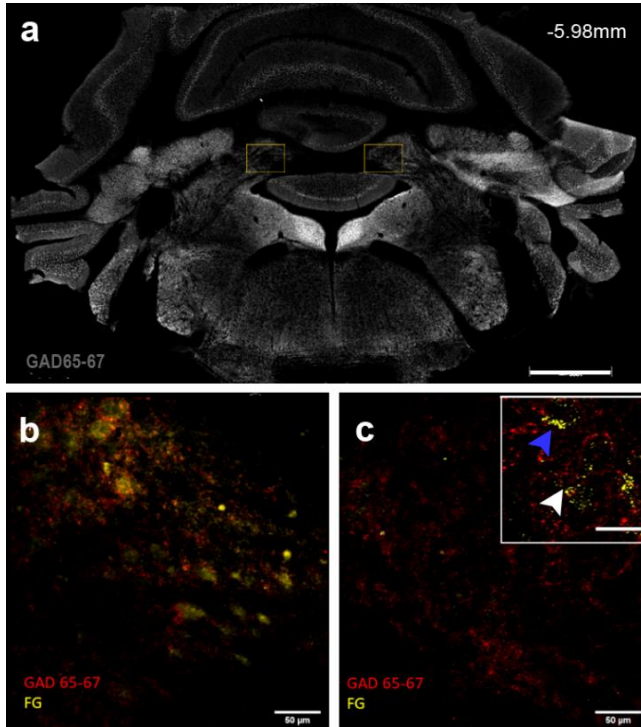


Fig. 24 Células FG+ / GAD65-67+ de la región medial del NF. a) Corte coronal a la altura de Bregma -5.98 mm, donde la señal corresponde a la enzima GAD65/67. Los recuadros en amarillo indican las regiones magnificadas en b-c respectivamente. b) NF ipsilateral al sitio de inyección. c) NF contralateral al sitio de inyección. La imagen superior derecha muestra una ampliación de los somas. Los somas considerados GABAérgicos se indican con las puntas de flecha blanca, mientras que los no-GABAérgicos con la azul. Barras: 1 mm (a); 50 μ m (b, c).

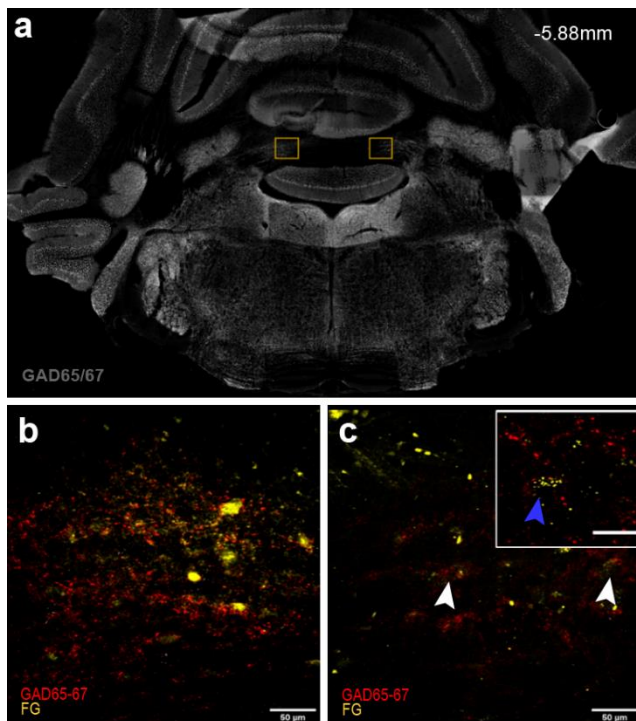


Fig. 25 Células FG+/GAD65-67+ de la región rostral del NF. a) Corte coronal a la altura de Bregma -5.88 mm, la señal mostrada corresponde a la enzima GAD65/67. Los recuadros en amarillo indican las regiones magnificadas en b-c respectivamente. b) NF ipsilateral al sitio de inyección. c) NF contralateral al sitio de inyección. La imagen superior derecha muestra una ampliación de los somas. Los somas considerados GABAérgicos se indican con las puntas de flecha blanca, mientras que los no-GABAérgicos con la azul. Barras: 1 mm (a); 50 μ m (b, c).

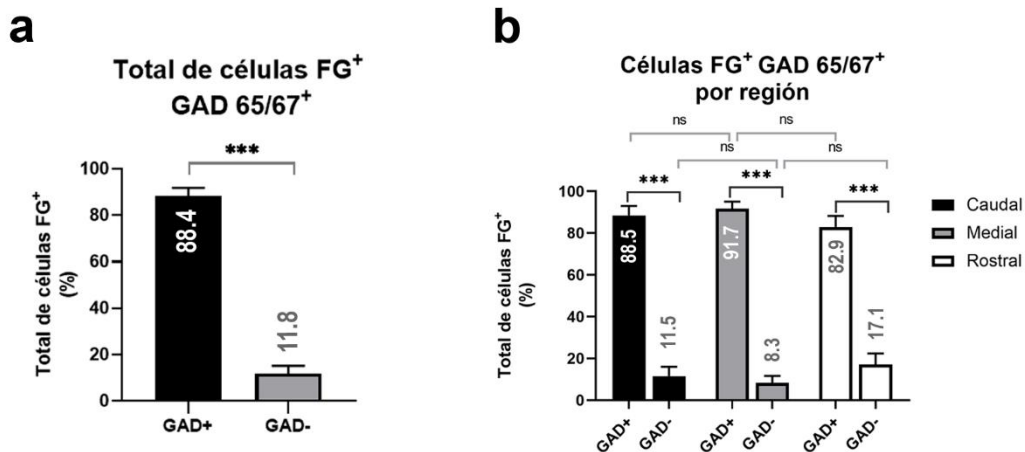


Fig. 26 **Conteo de neuronas del fastigio de tipo GABAérgico con proyecciones contralaterales.** a) Gráfica con el número de células totales identificadas por tipo con base en el marcaje con FG y la presencia y/o ausencia de GAD65/67 (Prueba T no pareada, *** $p < 0.0001$, $n = 4$). b) Gráfica con el conteo de células de la misma población agrupadas por región del NF (ANOVA-Tukey's, $p > 0.05$, $n = 4$).

7.5 Identificación de los aSV en la línea transgénica Pax2⁺

Con la finalidad de corroborar la naturaleza GABAérgica de los aSV, se utilizó la línea de ratones transgénicos Pax2: GFP, la cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) en precursores de interneuronas GABAérgicas durante el desarrollo embrionario (Maricich et al., 1999; Weisheit et al., 2006) y, en la etapa adulta es un marcador neuronal de interneuronas inhibitorias del cerebelo (Maricich et al., 1999) y de la médula (raíz dorsal) (Larsson, 2017).

A través del análisis consecutivo de rebanadas coronales de cerebelo de los ratones Pax2-GFAP (bregma -6.24 a -5.80mm), se identificaron un conjunto de fibras Pax2⁺ en la ZSV localizadas de manera transversal; dada la localización y distribución se infiere pertenecen a los aSV del NF, que corren a través de los lóbulos I-X (Fig. 27b, c). Indicando que al menos una parte de los aSV provienen de un precursor interneuronal de tipo GABAérgico; confirmando la naturaleza GABAérgica de la población con proyecciones contralaterales y en concordancia con estudios que reportan la identidad GABAérgica de la parte caudal del NF (Robinson et al., 1993). Sin embargo, no se encontró señal VGat⁺ a lo largo de los aSV, lo que aunado a la información obtenida de las imágenes de TEM (Anexo 2.3), comprueban que son axones de paso que no presentan colaterales GABAérgicas (Fig. 27b, c).

Así mismo, las rebanadas de cerebelo fueron procesadas por IHF para la proteína *VGat* (proteína transportadora vesicular de GABA), la cual se localiza en terminales axónicas. Los resultados revelaron la presencia de terminales GABAérgicas alrededor de las neuronas de ambos fastigios (Fig. 27d-f), lo que por una parte apoya la hipótesis de la intercomunicación entre éstos y, por lo tanto, la existencia de un circuito local. Sin embargo, debe considerarse que posiblemente la mayoría de esas vesículas identificadas pertenece a los axones de las CP del vermis, las cuales envían sus terminales GABAérgicas a los NF.

Adicionalmente, se identificó señal de *VGat* en somas de neuronas $Pax2^+$ del CVM, y en neuronas con procesos perpendiculares en la ZSV que posiblemente corresponden a interneuronas satelitales o de canasta.

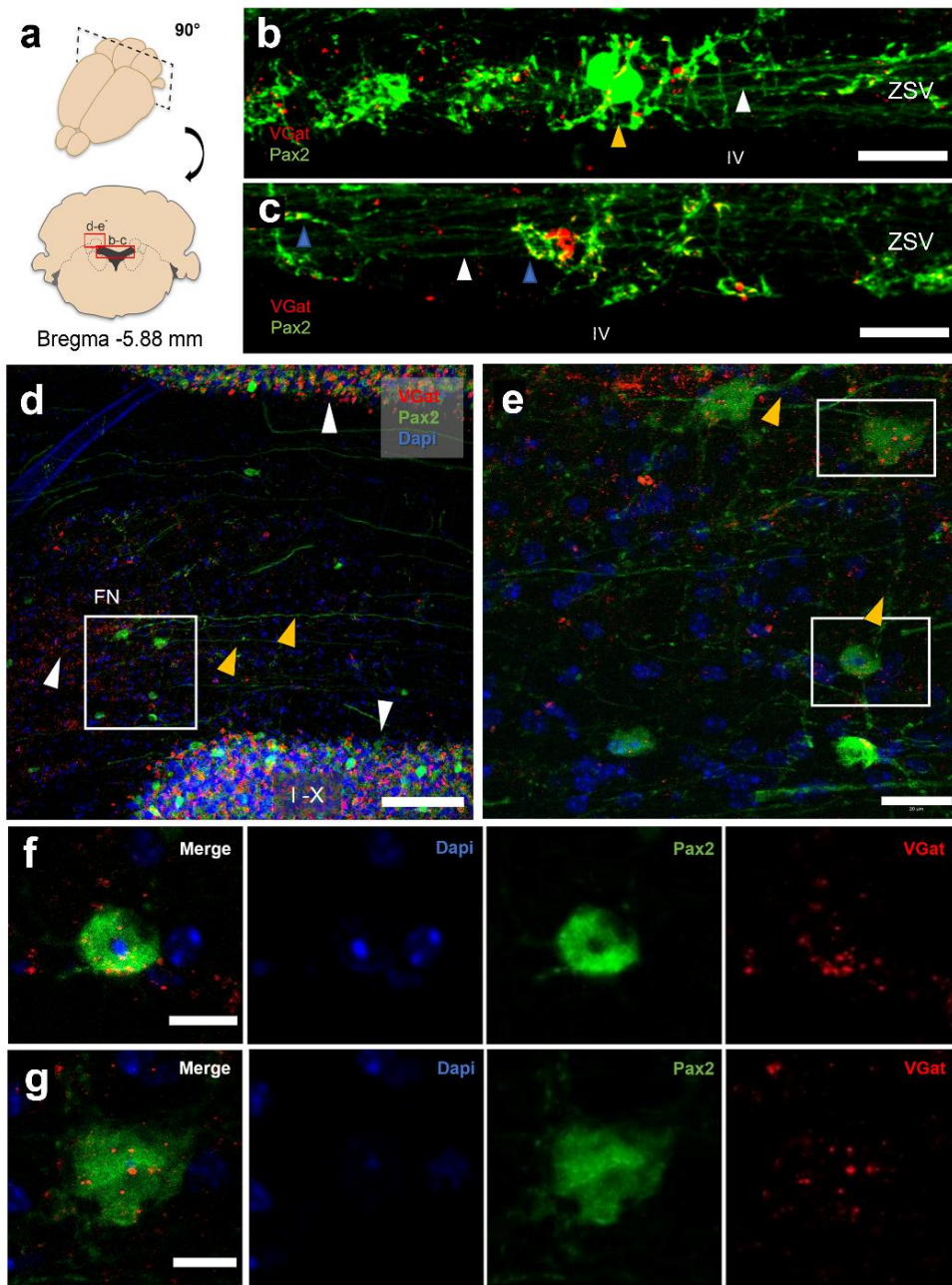


Fig. 27 NF y aSV en la línea transgénica Pax2: GFP. **a)** Esquema del cerebelo indicando el ángulo de y regiones visualizadas en las imágenes posteriores. **b-c)** ZSV del techo del IV ventrículo, en **b)** se observan la región media, dónde células Pax2+ posiblemente pertenecientes al VMC (puntas de flecha en amarillo) presentan marcaje VGat alrededor (señal en rojo) y los aSV pasan detrás de ellas (punta de flecha blanca). **c)** Zona lateral, se observan los aSV sin co-localización con VGat (punta flecha blanca), además de otras células con procesos verticales y reducidos (20 μ m) que muestran empalme con la señal VGat (empalme en amarillo, puntas de flecha azules). **d)** Región correspondiente al NF y sustancia blanca a la altura de los lóbulos X e I, donde la presencia de VGat es evidente (puntas de flecha blancas); las neuronas del fastigio y GB son Pax2+, el recorrido contralateral de los axones a través de la sustancia blanca es evidente (puntas de flecha amarillas). **e)** Amplificación de la región indicada en d), donde se observan neuronas del fastigio y sus correspondientes axones (puntas de flecha amarillas). **f-g)** Amplificación de las neuronas del NF indicadas en e), la separación de los canales evidencia las terminales GABAérgicas (señal canal rojo, VGat). Barras: 50 μ m (b-c), 1000 μ m (d), 20 μ m (e), 10 μ m (f-g).

Sección III: Aproximación funcional de la conexión inter-fastigios mediante registros electrofisiológicos de campo

Los resultados obtenidos anteriormente mediante el trazado neuronal indicaron que los axones del techo del IV ventrículo provienen del NF y proyectan hacia el mismo núcleo en su porción contralateral. Esto muestra la existencia de una conexión anatómica pero no necesariamente funcional entre ambos núcleos.

Con la finalidad de indagar la presencia de dichas conexiones funcionales, se realizó una serie de experimentos de electrofisiología de campo empleando ratones de la cepa CD1 anestesiados. Se registró la actividad del NF izquierdo previa estimulación del NF contralateral y, una vez registrada la respuesta evocada por el estímulo, se aplicó lidocaína con el fin de inhibir la respuesta generada y determinar si éste es el origen del estímulo.

7.6 Registros de campo en el cerebelo de ratones anestesiados.

7.6.1 *Estandarización del protocolo de estimulación.*

Para el registro de la actividad electrofisiológica extracelular (de campo), se insertaron mediante estereotaxia tres electrodos de tungsteno: dos en el NF izquierdo (0.1-0.4 M Ω de impedancia) y uno en el NF derecho (1 M Ω), de ratones previamente anestesiados (*ver protocolo en la sección de métodos*) (Fig. 28a).

Con el fin de estimular eficientemente el NF, se probaron dos protocolos basados en lo reportado previamente en la literatura (Golanov et al., 2017; Bagnall et al., 2009). Los protocolos empleados se detallan en la Fig. 28b. Estos fueron probados en ratones CD, (hembras y machos, 6-7 semanas de edad, 24-30 g). La metodología en general consistió en estimular el NF, seguido de la administración local de lidocaína; posteriormente se volvió a estimular (empleando las mismas condiciones) a diferentes ventanas de tiempo (3-30 min) para registrar los posibles cambios en la actividad evocada.

Respecto a la intensidad de estimulación empleada, se eligió como óptima aquella que evocara del 70–80 % de la respuesta máxima, en cada ratón. La cual osciló entre 140-180 μ A para el protocolo de 50 Hz (n= 8), y entre 60-120 μ A para el protocolo de 100 Hz (n= 3). Cabe resaltar que en ningún caso se observó actividad basal, lo cual está en concordancia con trabajos anteriormente publicados (Matsuyama y Jankowska, 2004). Esto se explica en parte a la anestesia general en la que está sometida

el animal y la naturaleza funcional del NF (participación en movimientos oculares, tono muscular de cuello).

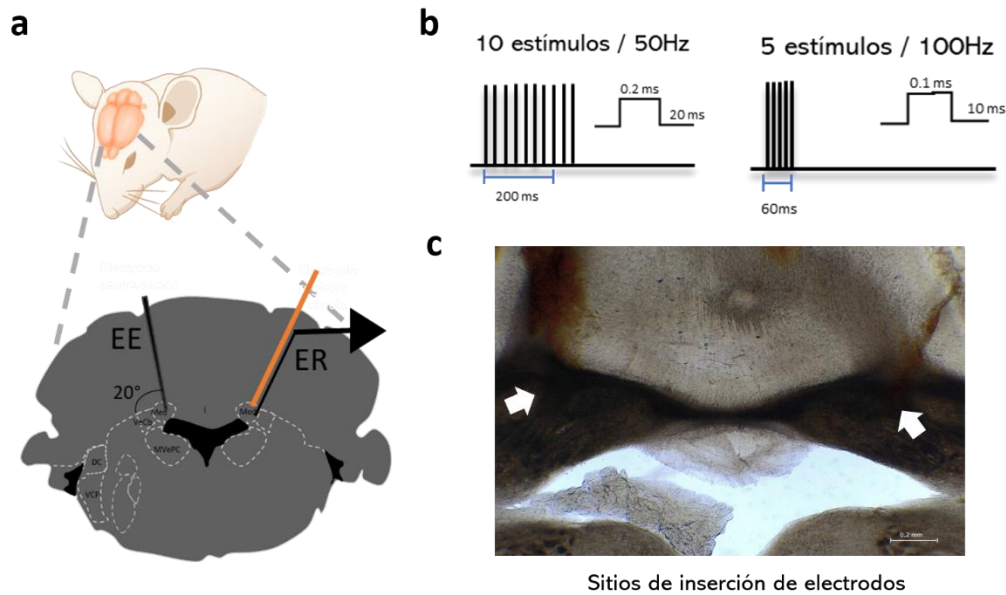


Fig. 28 Protocolos de estimulación del NF. **a)** Esquema de los sitios y condiciones de la inserción de los electrodos, nótese que en el NF izquierdo se inserta una cánula junto con el electrodo, (estructura naranja). **b)** Protocolos de estimulación empleados: tren de 10 y 5 estímulos con frecuencia en intensidad diferentes. En la parte superior de cada tren, se detalla la duración de cada pulso, así como el intervalo para cada estímulo (en ms). En ambos casos se registró la respuesta durante 500 ms. **c)** Corte coronal (150 μm) donde se muestra los sitios de inserción de los electrodos (flechas). EE: electrodo estimulación, ER: electrodo registro, ms: milisegundos. Barra 200 μm (c).

7.6.2 Resultados empleando el protocolo: tren de 10 estímulos / 50 Hz.

Se registraron 12 ratones bajo este protocolo, de los cuales, 4 fueron excluidos del análisis debido a que alguno de los electrodos no se localizó específicamente en la región anatómica de interés.

Las respuestas evocadas de los 8 ratones restantes fueron registradas en dos condiciones: sin lidocaína y con lidocaína (Fig. 29); considerándose para el análisis de la señal de la primera condición, la respuesta evocada por la estimulación con la intensidad preseleccionada, mientras que, para la condición con lidocaína se consideró la respuesta menor en un lapso de 3-30 min posterior a la administración local de dicho fármaco.

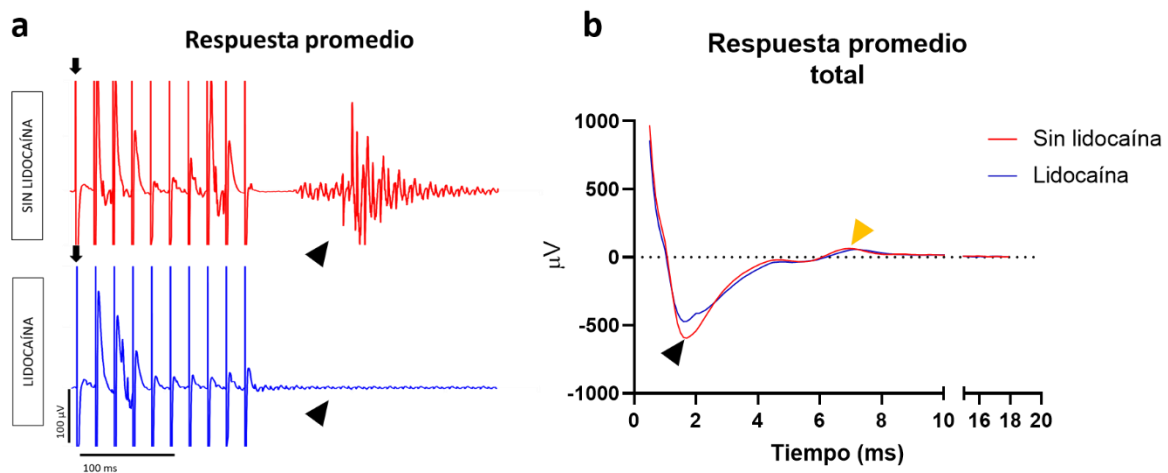
Las respuestas obtenidas en cada condición se procesaron de la siguiente manera:

1. Promediando las amplitudes de las respuestas generadas durante los 500 ms, es decir, considerando la señal evocada en el lapso de 300 ms posteriores al último pulso del tren de estimulación (Fig. 29a).

2. Aislando la señal evocada después de cada estímulo, y alineándola en base al artefacto del estímulo, para posteriormente promediarla. Esto es, considerándose únicamente la señal evocada entre cada pulso del tren de estímulos (Fig. 29b).

Se observaron dos respuestas: 1) la generada en el NF contralateral durante el momento de la estimulación del contralateral; 2) la respuesta generada aproximadamente 300 ms después del último pulso del protocolo. Esta última fue inhibida prácticamente al 100 % por acción de la lidocaína. (Fig. 29a).

La inhibición de la primera respuesta (durante el tren de estímulos) por la acción de la lidocaína, fue calculada en base a la amplitud máxima de los componentes negativos evocados, antes de su administración ($-594.02 \pm 153.05 \mu\text{V}$) y después de ella ($-470.51 \pm 116.89 \mu\text{V}$); resultando en una disminución estadísticamente significativa del 20.8 %, (Prueba de T-pareada de dos colas, valor $p = .016$, $*p < 0.05$, $n = 8$, Fig. 29b). El área bajo la curva asociada fue de 976.4 ± 108.2 vs 934.5 ± 95.2 , respectivamente. Asimismo, bajo este protocolo se evocó un componente positivo (punta de flecha amarilla), el cual presentó una tendencia en la inhibición de la amplitud en presencia de lidocaína del 11.54 % ($64 \pm 19 \mu\text{V}$ vs $58 \pm 17 \mu\text{V}$) no significativa a la prueba estadística Prueba de T-pareada de dos colas (valor de $p = 0.50$, $p < 0.05$, $n = 8$), (Fig.30 b); el área bajo la curva asociada fue 199.9 ± 19.52 vs 190.3 ± 17.66 , respectivamente.



◀ **Fig. 29 Respuesta evocada por la estimulación eléctrica (50 Hz / 10 estímulos) y su inhibición por lidocaína.** En ambas imágenes se muestra la señal respuesta promediada de 8 ratones. **a)** Trazo promedio de la señal obtenida con cada estímulo, considerando antes y después de la administración local de lidocaína. Las flechas indican los artefactos del estímulo presentes durante los primeros 200 ms y, las puntas de flecha, respuesta a los 300 ms y su bloqueo con lidocaína. **b)** Trazo promedio de los 10 estímulos, antes y después de la administración local de lidocaína, donde se observa la disminución significativa de la amplitud del componente negativo (punta de flecha negra, * $p < 0.05$, Prueba T-pareada) y una tendencia en la disminución del componente positivo (punta flecha amarilla, $p > 0.05$).

Por otra parte, las respuestas evocadas por cada pulso mostraron una gran heterogeneidad (Fig. 30), por lo que fueron comparadas independientemente, es decir, la respuesta generada por el tercer pulso (E3) se comparó con la respuesta generada por el tercer pulso en presencia de lidocaína, etc. (Fig. 31). Así, se analizaron dos componentes, el negativo y el positivo. En resumen, del análisis de los 10 estímulos, el componente negativo mostró una disminución del 20.56 % ($-594.0 \mu\text{V}$ vs $-471.9 \mu\text{V}$; Fig. 31), y de hasta un 38.63 % en el caso del estímulo 4 ($-342.3 \mu\text{V}$ vs $210.1 \mu\text{V}$; Fig. 31). La excepción en la tendencia de cambio se presentó en los E2 y E3, en donde por el contrario hubo un aumento del 40.14 % (Fig. 31), pero con un desfase en la respuesta señal y una disminución del componente positivo.

En conclusión, los resultados indican que la administración local de lidocaína generó una disminución significativa en los componentes negativos, pero no en los positivos de la señal evocada con el tren de estimulación de 10 pulsos a 50 Hz.

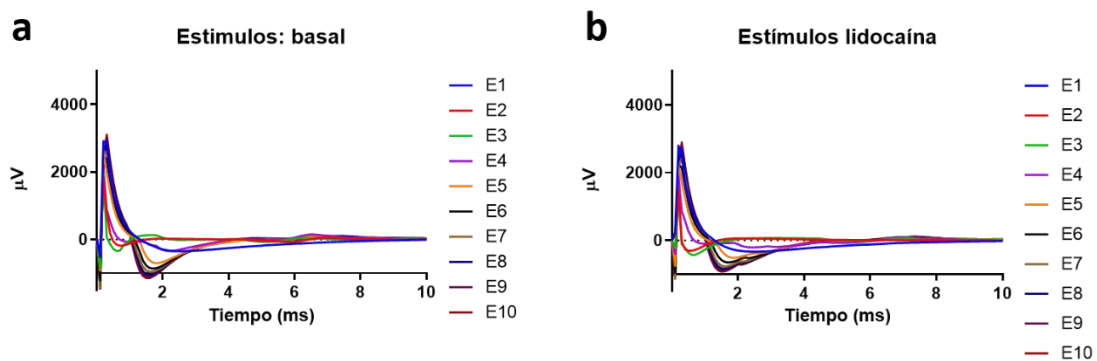


Fig. 30 Respuesta promedio de cada estímulo por condición. Gráfica de la respuesta promedio correspondiente a cada estímulo aplicado ($n = 8$), donde se observa la heterogeneidad de la respuesta evocada por cada estímulo del tren aplicado. Se muestran por separado la respuesta de los mismos ratones en condiciones basales de estimulación (**a**) y después de la aplicación de lidocaína (**b**). E, estímulo; μV , microvoltios; ms, milisegundos.

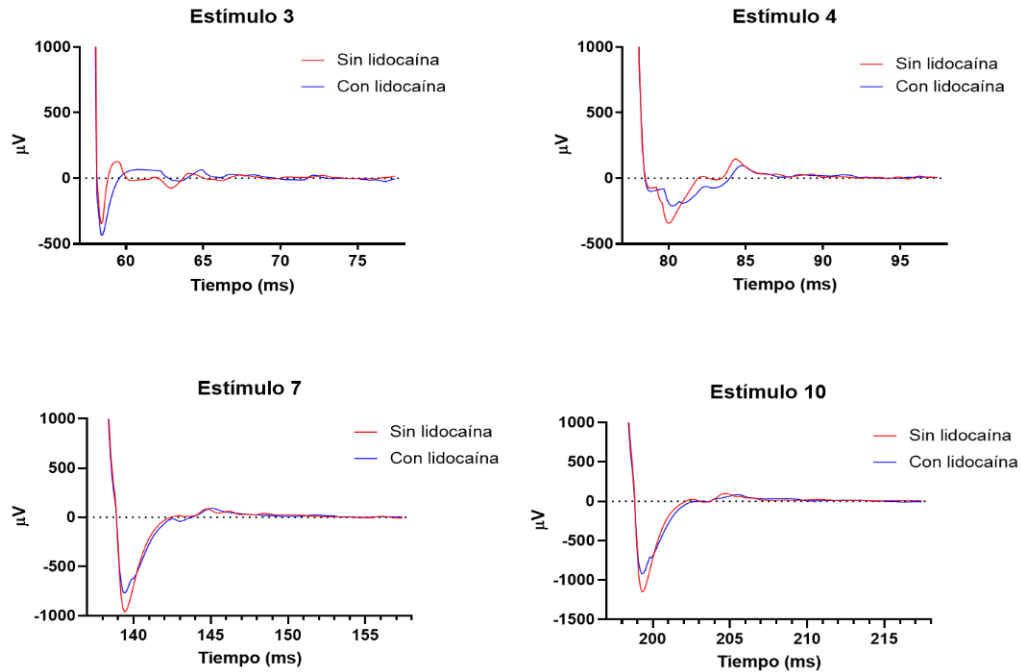


Fig. 31 Respuesta promedio de los estímulos con mayor cambio. Graficas de la respuesta promedio (n= 8) correspondiente a los estímulos 3, 4, 7 y 10, de ambas condiciones. Se puede observar que los componentes de la señal presentan cambios en amplitud y/o temporalidad, además, que la señal en general es equiparable. E, estímulo; μV , microvoltios; ms, milisegundos.

7.6.3 Resultados empleando el protocolo: tren de 5 estímulos / 100 Hz.

Dada la heterogeneidad de la respuesta obtenida entre cada estímulo del protocolo anterior, se decidió probar un segundo protocolo donde la frecuencia se duplicó, y la duración del tren se disminuyó a 60 ms, con la finalidad de generar una estimulación que pudiese reclutar mayor actividad.

De los 5 animales empleados, 1 se descartaron debido a que la proporción de señal-ruido del registro no fue la adecuada para identificar la señal evocada.

Las respuestas evocadas en los 300 ms posteriores al tren de estimulación con el protocolo de 100 Hz fueron mínimas, donde sólo se observaron EPSP evocados en 1 de los 5 ratones considerados en el análisis (Fig. 32a). En cuanto a los componentes negativos de la señal promedio evocada durante el tren de estímulos, se encontró una disminución significativa en la amplitud máxima de la respuesta después de la administración de lidocaína, del 21.25 % ($-0.80 \text{ V} \pm 0.04$ vs $-0.63 \text{ V} \pm 0.06$, T-pareada dos colas, valor $p= 0.02$, $p^* < 0.05$, $n= 4$ por grupo, promedio \pm SEM) (Fig. 32b); el área bajo la curva asociada

fue de 1.48 ± 0.05 vs 1.36 ± 0.05 , respectivamente. Por otra parte, cabe destacar que este protocolo no evocó ningún componente positivo en la señal.

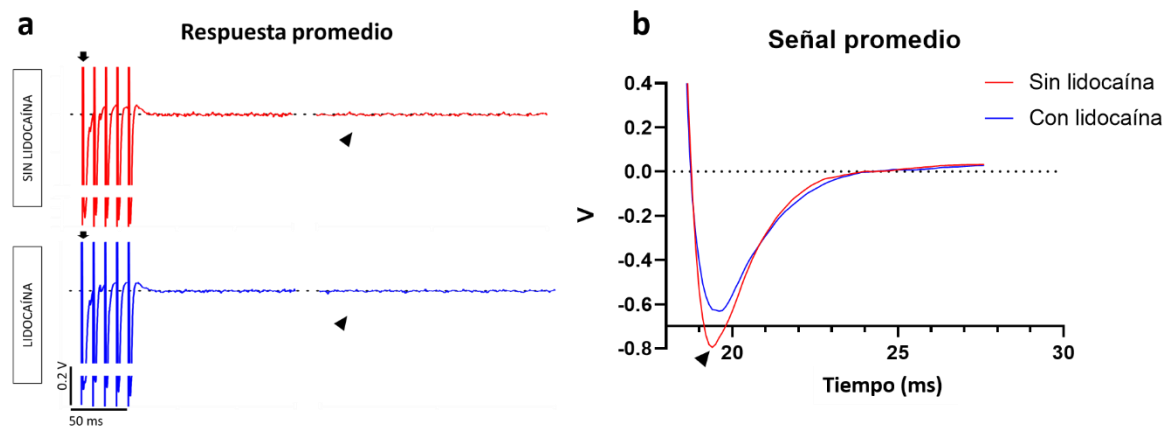


Fig. 32 Respuesta promedio evocada por la estimulación eléctrica (5 estímulos / 100 Hz). En ambas imágenes se muestra la señal respuesta promediada de 4 ratones. **a)** Trazo promedio de la señal total obtenida durante los 500 ms del registro. Las flechas indican el artefacto generado por el estímulo, mientras que las puntas de flecha indican el tiempo en el que se encontraron las respuestas con el protocolo de 10 estímulos / 50 Hz (contrastar con Fig. 28, 300 ms). **b)** Trazo promedio de los 10 estímulos de los 5 ejemplares analizados, antes y después de la lidocaína, cuya amplitud máxima del componente negativo (punta de flecha negra) es significativamente diferente en ambas condiciones (* $p < 0.05$, Prueba T-pareada, $n = 4$).

Los cambios en la señal registrada 10 min después de la administración local de lidocaína fueron evidentes al analizar cada estímulo de manera independiente, donde se observó una disminución generalizada en la amplitud de los componentes negativos en todos los estímulos, con una disminución máxima en el E3, de un 24.68 % de la amplitud (-0.81 V vs -0.61 V; Fig. 33); el área bajo la curva asociada fue de 1.29 vs 1.14, respectivamente.

Fig. 33 Respuesta promedio en cada estímulo en antes y después de la lidocaína. Gráficas con la respuesta promedio (n= 4) correspondiente a los estímulos 1, 3 y 5, para ambas condiciones. Se observa la inhibición generalizada de los componentes negativos de la señal en respuesta en cada estímulo en particular. E, estímulo; V, voltios; ms, milisegundos.

La estimulación unilateral del NF produjo una respuesta evocada en el NF contralateral en ambos protocolos probados (Fig. 29 y 32); sin embargo, la señal evocada durante el tren de estímulos fue mayor con el protocolo de 5 estímulos / 100 Hz; mientras que la señal evocada posterior al tren de estímulos (300 ms) fue mayor al emplearse el protocolo de estimulación a 50 Hz. Dicho incremento se evidenció en la amplitud de los potenciales evocados, durante y después del tren de estímulos aplicados, respectivamente. En cuanto a la inhibición de la señal evocada posterior a la aplicación local de lidocaína, prácticamente fue igual en ambos protocolos (20.79 % en 50 Hz vs 21.25 % en 100 Hz), corroborando el nivel de eficiencia del fármaco (valor de $p= 0.297$, prueba Mann Whitney, no pareada, alfa 0.05).

En conjunto estos resultados apoyan, pero no comprueban la hipótesis de una conexión funcional entre los núcleos fastigio en el cerebelo de ratón. Los registros extracelulares de campo nos brindan indicios de una comunicación sináptica, mas no prueban si ésta es directa o indirecta.

8. Discusión

8.1 Caracterización de la vía anatómica GABAérgica asociada a los aSV

Las diferentes aproximaciones experimentales del presente trabajo mostraron que los tractos de la zona subventricular del cerebelo, llamados aSV, ubicados en la interfaz de la parte rostral del lóbulo X y la parte caudal del lóbulo I (Bregma -6.18 a -5.83 mm), tienen su origen anatómico en el NF y forman parte de una vía de tipo GABAérgico, que conecta de manera directa ambos NF, principalmente en su porción medial y caudal.

Las proyecciones del NF han sido ampliamente estudiadas (Voogd 1964, 1967; Walberg et al. 1962; Bjorklund, 1996; Rasmussen, 1993), dichos estudios establecen que los axones del NF dan origen a dos tractos principales: *uncinato* (*unc*, tracto cerebroespinal) y *tracto fastigiobulbar*.

El *unc*, localizado en la región rostral del FN, sigue una trayectoria donde “la mayoría de sus eferencias decusan en el cerebelo, atravesando el NF contralateral” (Siebolt et al., 1997; Noda et al., 1990) y el *vellum medular anterior*, posteriormente pasa sobre el *brachium conjunctivum* (pedúnculo superior; BrainInfo, 2018) y termina en los núcleos vestibulares (SuVe, LVe, MVe, SpVe) (Walberg et al. 1962; Voogd 1967; Omori et al. 1997). Esta región rostral ha sido asociada con funciones espinales (postura, marcha y movimiento cuello, (Siebolt et al., 1997). Una segunda población derivada del *unc* envía proyecciones ascendentes hacia el tálamo rostral, a través del pedúnculo superior contralateral (Rasmussen, 1933; Angaut y Bowsher, 1970). Por su parte, el fastigiobulbar, localizado en la región caudal del NF pasa de manera ipsilateral sobre la parte medial del pedúnculo superior, en las paredes laterales del cuarto ventrículo, enviando sus proyecciones a los núcleos vestibulares, formación reticular pontina (núcleo reticular gigantocellularis) (Voogd 1964; Batton et al. 1977; Homma et al., 1995; Siebold et al., 1997) y núcleo x (Omori et al., 1997). Esta vía cerebelo-pontomedular, ha sido asociada al control de la actividad oculomotora (sacadas) y el movimiento de la cabeza (Takahashi et al., 2013).

Toda esta información, nos da un amplio panorama de las múltiples vías anatómicas y funcionales en las que se ha reportado participa el NF. Haciendo un análisis comparativo entre estos trabajos mencionados, y la descripción de los aSV del presente trabajo, podríamos decir que concuerdan parcialmente, ya que nuestros resultados difieren en dos aspectos importantes:

1) Los resultados obtenidos del análisis de los cortes semifinos y TEM del techo del IV, así como de las diferentes cepas de ratones transgénicos (Figs. 14, 27), no mostraron evidencia alguna que confirme la trayectoria de los axones del NF por el *vellum* como proponen Voogd (1967, 2013) y Batton et al.

(1977); considerando al *vellum* como una monocapa de células que durante el desarrollo cubre el techo del ventrículo y en la etapa adulta se retrae, quedando exclusivamente en los bordes anteriores y posteriores del Cb, y cuya disposición es supra-ependimaria (Louvi et al., 2003). Por el contrario, el presente trabajo evidencia la trayectoria de estos axones del NF (aSV) a través de la ZSV, la cual está delimitada dorsalmente por la capa molecular (pies de la GB) y ventralmente por las CE (González-González et al., 2016).

2) Las fibras que se encuentran principalmente en la región medial y caudal del NF no se limitan a la trayectoria del *fascículo uncinato*, sino que una fracción (los aSV) se quedan a nivel del NF contralateral, estableciendo una conexión inter-fastigios (Figs. 16, 17, 19, 20, 22 y 26), la cual no había sido descrita.

Otros estudios han examinado las conexiones contralaterales del NF a partir de experimentos de degeneración axonal y trazado retrógrado con WG-HRP en monos *Rhesus*, (Carpenter et al., 1959; Noda et al., 1990), sin embargo, en ambos casos los autores concluyeron que los axones solamente decusaban a través del NFc, es decir sin considerar el contacto local con las neuronas del núcleo. En contraste, nuestras observaciones del trazado con FR, BDA, FG, RB, y los cortes a 75° de inclinación de cerebelos de ratones Thy1: GCaMP-YFP, demuestran una interconexión anatómica directa entre ambos NF, la cual está presente a lo largo de las tres regiones del núcleo. Consideramos que la compleja organización de la zona, así como la limitada resolución de las técnicas disponibles en los estudios previos (Batton et al., 1977; Voogd et al., 2013; Glickstein et al., 2009), contribuyeron a obviar estas conexiones inter-fastigios.

En cuanto a la funcionalidad que podría tener esta conexión inter-fastigios dada su posición medio-caudal, las posibilidades son muy variadas, así como variadas son las funciones de este núcleo relacionadas con el Cb, cerebro y SN Periférico. Sin embargo, lo más evidente es plantear la hipótesis que este circuito inter-fastigios podría estar principalmente involucrado en la respuesta motora canónicamente asociada con el Cb, ya que la postura y balance están controlados por sistemas que cruzan contralateralmente por la parte medial del Cb, integrados por: el NF, núcleo vestibular, núcleos ventrales del tronco encefálico y la formación reticular ventromedial (Prekop et al., 2017; Koziol et al., 2014; Ito, 2006).

Además de las funciones motoras descritas, el NF caudal envía proyecciones bifurcadas hacia los colículos superiores (ipsilateral y contralateral) (Katoh y Benedek. 2003), que posteriormente alcanzan el tálamo y diferentes regiones del hipotálamo (Zhu et al., 2006); esta vía también llamada *hipotálamo-cerebelosa*, participa en la modulación de las respuestas motoras de tipo somático y en las respuestas no

motoras, las cuales incluyen la regulación de la alimentación, la presión sanguínea, funciones cardiovasculares, ritmo respiratorio, actividad gastrointestinal (Zhu et al., 2006); Por otra parte, proyecciones glutamatérgicas directas de los DCN hacia la amígdala ventrolateral han sido asociadas con la regulación del comportamiento, como la recompensa e interacción social en ratones, (Carta et al., 2019). Por toda esta evidencia mencionada, no descartamos este circuito inter-fastigio pueda también estar involucrado en respuestas asociadas al sistema nervioso periférico, fungiendo como un punto de relevo, integración y modulación de estas vías cerebelosas.

Asimismo, el hallazgo de esta vía anatómica local es una prueba de la necesidad de indagar en los circuitos intrínsecos de los DCN como bien lo expresa Prekop et al. (2017), ya que constituyen los efectores primarios de las respuestas sensoriales, motoras y cognitivas orquestadas por las CP y el circuito cerebeloso en general.

La naturaleza GABAérgica de los aSV, incluidos los que dan origen a la comunicación inter-fastigios, fue corroborada a través de las IHQ para la enzima GAD65/67 en axones previamente trazados con FG, la proteína vesicular (VGat) y el análisis de la cepa Pax2: GFP (Figs. 26, 27). Dentro del NF han sido identificadas tres poblaciones neuronales principales: glutamatérgicas, GABAérgicas y glicinérgicas, las cuales se distinguen por su morfología y características electrofisiológicas (Robinson et al. 1993; Uusisaari and Knöpfel 2008, 2012; Uusisaari et al. 2007; Pedroarena and Kamphausen 2008); sin embargo, se ha propuesto que la heterogeneidad celular presente puede ser incluso mayor (Beitz and Chan-Palay 1979; Canto et al. 2016). Afortunadamente, la línea transgénica Pax2: GFP se presenta como una herramienta que inequívocamente permitió determinar que los aSV forman parte de la población GABAérgica del NF. La expresión de Pax2 en el estado postnatal temprano está directamente asociada con los precursores GABAérgicos, sin embargo, en la etapa adulta, su expresión permanece en neuronas de los DCN e interneuronas de la capa molecular y granular de la corteza cerebelosa (Maricich and Herrup 1999; Weisheit et al. 2006; Larsson et al. 2017). Esta cepa permitió a su vez corroborar la identidad GABAérgica de las células que integran el CVM (González-González et al., 2016) (Fig. 27b), así como las interneuronas de la ZSV que por morfología corresponden a las neuronas A4 descritas por Grzanna y Molliver (1979), y que constituyen una población diferente de los aSV transversales (Fig. 27c). Por su parte, la asociación de GABA con la subpoblación de aSV que establece la conexión entre ambos NF, fue evidenciada dada la co-localización del trazador anterógrado FG y la identificación de GAD65/67 dentro del soma (Figs. 23-26), determinándose que el 88 % de esta población es GABAérgica; por lo que el 12 % restante probablemente es de tipo glutamatérgico, ya que es la segunda población más abundante reportada en el núcleo (Uusisaari and Knöpfel 2007). El conteo por región determinó que las proyecciones se distribuyen de manera homogénea a lo largo del NF; sin embargo, el

marcaje con RB, un trazador que es más específico ya que no es capturado por fibras de paso, determinó que las proyecciones inter-fastigio si bien se encuentran a lo largo de las tres regiones del NF, la distribución es significativamente mayor en las zonas caudal y medial del NF.

8.2 Funcionalidad del circuito inter-fastigio

La caracterización de una vía anatómica se complementa con estudios electrofisiológicos que prueben la funcionalidad de las vías propuestas. Las razones de elegir registros de campo por sobre registros celulares *in vitro* fueron de tipo técnico, ya que el *patch clamp* en rebanadas de cerebelo adulto se dificultó debido a la alta densidad de axones / mielina de la zona de interés. Por ello en este trabajo se probó de manera preliminar la conectividad inter-fastigios a través de registros electrofisiológicos de campo *in vivo* en condiciones control y ante la administración local de lidocaína. El protocolo de estimulación: tren 10 estímulos/50 Hz logró evocar respuestas tanto negativas como positivas en el NFc durante el tren de estímulos (150 ms) y posterior a éste (300 ms) (Fig. 29, 31), mientras que el protocolo de estimulación de 5 estímulos/100Hz, únicamente evocó respuesta con componentes negativos, pero de mayor magnitud, la cual estribó en el orden de los mV. En ambos casos las respuestas fueron inhibidas parcial y/o totalmente por la lidocaína, lo cual confirma la autenticidad de la señal registrada.

La administración local de lidocaína, al ser éste un inhibidor no selectivo de los canales de Na⁺, (Catterall, 1987; Salazar et al., 1995) podría en principio abatir la generación y propagación del impulso nervioso; sin embargo, dada la cantidad de circuitos intrínsecos existentes, así como la propia naturaleza del fármaco, no fue eficaz para inhibir más allá del 21.3 % de la respuesta total evocada durante el tren de estímulos. En concordancia, otros estudios de registros extracelulares en cerebro de diferentes especies muestran sólo una atenuación de la señal posterior a la administración de lidocaína (Unal et al., 2012). Para inhibir más eficientemente la respuesta evocada, es necesario emplear fármacos más potentes y/o selectivos como antagonistas de receptores GABAérgicos (bicuculina, picrotoxina), (Bagnall et al., 2009). Se descarta que los cambios sutiles en la respuesta evocada sean debido a la sensibilización de la región dada la estimulación continua, ya que no se encontró desensibilización o facilitación de la respuesta cuando se estimula a en intervalos mínimos de 2 min entre cada tren de estimulación.

En la interpretación de los datos obtenidos mediante la técnica de registro electrofisiológico de campo, es importante considerar la limitante de esta técnica, ya que, al ser extracelular, se registra la actividad de toda la población neuronal presente en la región (ensambles, microcircuitos), determinada por la zona

de inserción del electrodo. Por lo anterior, no se descarta que parte de respuesta registrada en el NF sea producto de la activación de las fibras que provienen de los núcleos vestibulares laterales y superiores cuya conexión funcional con esta región (NF) está demostrada (Siebolt et al., 1997; Noda et al., 1990). Otra posibilidad latente, es la activación del NF contralateral de manera indirecta a través de circuitos intrínsecos, los cuales se sabe tienen inferencias funcionales en la coordinación de la respuesta a nivel espacial y temporal (Shepherd y Koch, 1998; Pedroarena y Kamphausen, 2008).

Por lo tanto, podemos concluir que los resultados obtenidos por los registros de campo sustentan dentro de sus limitantes la funcionalidad de la comunicación inter-fastigios, sin embargo, para una comprobación inequívoca de la comunicación directa, se requieren hacer registros intracelulares previa estimulación del NFc (antidróxicos), en rebanadas coronales obtenidas a 75° de inclinación; ángulo en el que hemos demostrado corren la mayoría de los aSV, empleando animales de menor edad para evitar el problema de la abundante densidad axónica de la zona. Una alternativa es el registro in vivo previa inyección unilateral de lentivirus asociados a rodopsinas que permitan la estimulación local de las terminales contralaterales del NF y así registrar su efecto en dicho núcleo.

9. Conclusión

En el presente trabajo se determinó que los axones mielinizados de la ZSV del cerebelo (aSV) tienen su origen en el núcleo fastigio y son principalmente de tipo GABAérgico. Así mismo, se propone una nueva división del núcleo fastigio con base al destino anatómico de sus eferencias, las cuales son: 1) región caudal (Bregma -6.48 a -6.18 mm), 2) región medial (Bregma -6.18 a -5.83 mm) y 3) región rostral (Bregma: -5.83 mm a -5.63 mm). Una aportación del presente trabajo consiste en la determinación de la tercera región denominada medial, donde las proyecciones NF siguen una distribución a manera de fascículo que proyecta hacia el NF contralateral, y que sugiere una comunicación inter-fastigios de tipo GABAérgica. La funcionalidad de esta vía inter-fastigio fue parcialmente corroborada con el registro extracelular de potenciales evocados por la estimulación local del NF contralateral. Queda por determinar el rol de este circuito en la fisiología del cerebelo y del SNC en general.

10. Referencias

- Angaut, P., Brodal, A. (1967). The projection of the “vestibulocerebellum” onto the vestibular nuclei in the cat. *Arch Ital Biol.* 105(4):441-79.
- Angaut, P., Bowsher, D. (1970). Ascending projections of the medial cerebellar (fastigial) nucleus: an experimental study in the cat. *Brain Res.* 24(1):49-68
- Angevine, J. B., Mancall, E. L., y Yakovlev, P. I. (1961). The human cerebellum: An atlas of gross topography in serial sections. Boston: Little, Brown and Co.
- Badura, A., Sun, X.R., Giovannucci, A., Lynch, L.A., Wang, S.S. (2014). Fast calcium sensor proteins for monitoring neural activity. *Neurophotonics.* 1(2):025008.
- Bagnall, M.W., Zingg, B., Sakatos, A., Moghadam, S.H., Zeilhofer, H.U., du Lac, S. (2009). Glycinergic projection neurons of the cerebellum. *J Neurosci.* 29(32):10104-10.
- Balaei, R. M., Ashtari N. & Bergen H. (2017). The Embryology and Anatomy of the Cerebellum. En: Hassan, M. (Editor) Development of the cerebellum from molecular aspects to diseases. Springer, Switzerland. Capítulo 2, pp 35-38.
- Barmack, N. H., y Yakhnitsa, V. (2003). Cerebellar climbing fibers modulate simple spikes in Purkinje cells. *J Neurosci.* 23(21), 7904–16.
- Batton, R.R., Jayaraman, A., Ruggiero, D., Carpenter, M.B. (1977). Fastigial efferent projections in the monkey: an autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 174(2):281-305.
- Becerra-González M, Varman Durairaj R, Ostos Valverde A, Gualda EJ, Loza-Alvarez P et al. (2020). Response to hypoxic preconditioning of glial cells from the roof of the fourth ventricle. *Neuroscience.* 439:211-229.
- Beitz, A.J., Chan-Palay, V. (1979). A Golgi analysis of neuronal organization in the medial cerebellar nucleus of the rat. *Neuroscience.* 4(1):47–63.
- Bellamy, T.C. (2006). Interactions between Purkinje neurons and Bergmann glia. *Cerebellum.* 5(2), 116–26.
- Bennett, L., Yang, M., Enikolopoy, G., et al. (2009). Circumventricular organs: A novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol Cell Neurosci.* 41(3):337-47.

- Berry, M., M. Ibrahim, J. Carlile, F. Ruge, A. Duncan, and A. M. Butt. (1995). Axon-Glial Relationships in the Anterior Medullary Velum of the Adult Rat. *J Neurocytol.* 24 (12): 965–83.
- Bolk L. (1906). *Das Cerebellum der Säugtiere*. Jena: G. Fisher. pp 337.
- Brain Info (1991-present), National Primate Research Center, University of Washington, <http://www.braininfo.org>. Consultado el 21 de noviembre del 2017.
- Canto, C.B., Witter, L., De Zeeuw, C.I. (2016). Whole-cell properties of cerebellar nuclei neurons in vivo. *PLoS One.* 11(11):1–19.
- Carta, I., Chen, C.H., Schott, A.L., Dorizan, S., Khodakhah, K. (2019). Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science.* 363(6424): eaav0581.
- Catapano, L.A., Sanjay S.M., y Jeffrey D. M. (2008). Neuroanatomical Tracing of Neuronal Projections with Fluoro-Gold. *Methods Mol Biol.* 438 (1): 353–59.
- Catterall, W.A. (1987). Common modes of drug action of Na⁺ channels: local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants. *Trends Pharmacological Sci.* 8(2):57–65.
- Falcão, A.M., Marques, F., Novais, A., Sousa, N., Palha, J.A., Sousa, J.C. (2012). The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Front Cell Neurosci.* 6(34):1-8.
- Fulton, J.F., Dow, R.S. (1937). The Cerebellum: A Summary of Functional Localization. *Yale J Biol Med.* 10(1):89-119.
- Gilerovitch, H.G., Bishop, G. A., King, J.S., y Burry R.W. (1995). The Use of Electron Microscopic Immunocytochemistry with Silver-enhanced 1.4-nm Gold Particles to Localize GAD in the Cerebellar Nuclei. *J Histochem & Cytochem.* 43(3): 337-343.
- Glickstein, M., Strata, P., Voogd, J. (2009). Cerebellum: history. *Neuroscience.* 162(3):549–559
- Golanov, E.V., Regnier-Golanov, A.S., Britz, G.W. (2017). Integrity of cerebellar fastigial nucleus intrinsic neurons is critical for the global ischemic preconditioning. *Brain Sci.* 7(10):121.
- González-González, M.A., Gómez-González G.B., Becerra-González M., Martínez-Torres A. (2017). Identification of novel cellular clusters define a specialized area in the cerebellar periventricular zone. *Sci Rep.* 7(1):40768.
- Grzanna, R., Moliver, M.E. (1979). The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neurosci.* 5(1):21–40.

- Grosche, J., Kettenmann, H. y Reichenbach, A. (2002). Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res.* 15;68(2):138-49.
- Haemmerle, C.A., Nogueira, M.I., and Watanabe, I.S. (2015). The neural elements in the lining of the ventricular-subventricular zone: making an old story new by high-resolution scanning electron microscopy. *Front Neuroanat.* 9(1):134.
- Harvey, R.J., and Napper, R. M. (1988). Quantitative study of granule and Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *J Comp Neurol.*274(2):151-7.
- Helmchen, C., Straube, A., Buttner, U. (1994). Saccade-related activity in the fastigial oculomotor region of the macaque monkey during spontaneous eye movements in light and darkness. *Exp Brain Res.* 98(3):474-82.
- Hirano, T. (2018). Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function. *Cerebellum.* 17(6):699-700.
- Homma Y, Nonaka S, Matsuyama K, Mori S (1995) Fastigiofugal projection to the brainstem nuclei in the cat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci Res.* 23(1):89-102.
- Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawachi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, et al. (2005) Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron.* 47:201–213.
- Ito, M. (2006). Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol.* 78(3-5):272-303.
- Ito, M. (2012). *The Cerebellum: Brain for an Implicit Self.* New Jersey: Pearson Education. Inc.
- Jaeger, D. y Lu, H. (2016). Cerebellar Nuclei. En: Gruol, D.L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmammann, J.D., Shen, Y. (Eds.), *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders.* Springer. Cap. 42, pp. 311-312.
- Johnson, A.K., Gross, P.M. (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.* 7(8):678–686.
- Katoh, Y.Y., y Benedek, G. (2003). Cerebellar fastigial neurons send bifurcating axons to both the left and right superior colliculus in cats. *Brain Res.* 970(1-2):246-9.
- Katz, L.C., Burkhalter A., y Dreyer, W. J. (1984). Fluorescent Latex Microspheres as a Retrograde Neuronal Marker for in Vivo and in Vitro Studies of Visual Cortex. *Nature.* 310 (5977): 498–500.
- Kettenmann, H. y Ransom, B.R., editors. (2005). *Neuroglía.* 2da Edición. New York: Oxford.

- Köbbert, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J. L., Mey, J., Thanos, S. (2000). Current Concepts in Neuroanatomical Tracing. *Prog Neurobiol.* 62 (4): 327–51.
- Koziol, L.F., Budding, D., Andreasen, N., D'Arrigo, S., Bulgheroni, S., Imamizu, H. et al. (2014). Consensus paper: The cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum.* 13(1):151–177.
- Larsell, O. (1952). The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol.* 97(2): 281-356.
- Larsell, O., Jansen, J. (1972). The comparative anatomy and histology of the cerebellum III. The human cerebellum, cerebellar connections, and cerebellar cortex. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Larsson, M. (2017). Pax2 is persistently expressed by GABAergic neurons throughout the adult rat dorsal horn. *Neurosci. Lett.* 638(1): 96–101.
- Leto, K., Hawkes, R., Consalez G.G. (2016). Cerebellar Neurogenesis. En: Gruol, D.L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmammann, J.D., Shen, Y. (Eds.), *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer. Cap. 13, pp. 130-131.
- Lippman, J., Lordkipanidze, T., Buell, M.E., Yoon, S.O., Dunaevsky, A. (2008). Morphogenesis and regulation of Bergmann glial processes during Purkinje cell dendritic spine ensheathment and synaptogenesis. *Glia.* 56(13):1463–77.
- Lorez, H. P. y Richards, J. G. (1982). Supra-ependymal serotonergic nerves in mammalian brain: Morphological, pharmacological and functional studies. *Brain Res Bull.* 9(1-6):727-41.
- Louvi, A., Alexandre, P., Métin, C., Wurst, W., Wassef, M. (2003). The isthmic neuroepithelium is essential for cerebellar midline fusion. *Development.* 130(22):5319–5330.
- Maricich, S.M., Herrup, K. (1999). Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol.* 41(2):281-94.
- Matsuyama, K. y Jankowska, E. (2004). Coupling Between Feline Cerebellum (Fastigial Neurons) and Motoneurons Innervating Hindlimb Muscles. *J Neurophysiol.* 91(3):1183–1192
- Mugnaini, E., Oertel, W., (1985). An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. En: Bjorklund, A., Hokfelt, T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy, GABA and Neuropeptides in the CNS, Parte I*, 4. Elsevier Science Publishers, pp. 436-608.

- Nguyen, T., Chin, W., O'Brien, J.A., Verdugo, P., Berger, A.J. (2001). Intracellular pathways regulating ciliary beating of rat brain ependymal cells. *J Physiol.* 531(1):131-140.
- Noda, H., Sugita, S., Ikeda, Y. (1990). Afferent and efferent connections of the oculomotor region of the fastigial nucleus in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 302(2): 330–348.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33(1):72–86.
- Oberdick, J., y Sillitoe, R.V. (2011). Cerebellar zones: history, development, and function. *Cerebellum*, 10(3):301–6.
- Omori, O., Umetani, T., Sugioka, K. (1997). Projections from the subdivisions of the fastigial nucleus to the vestibular complex and the prepositus hypoglossal nucleus in the albino rat: an anterograde tracing study using biocytin. *Kobe J Med Sci.* 43(1):37–54.
- Paxinos, G. y Franklin, K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2da Edición. California (USA): Academic Press.
- Pedroarena, C.M., y Kamphausen, S. (2008). Glycinergic synaptic currents in the deep cerebellar nuclei. *Neuropharmacol.* 54(5):784–795.
- Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C., Clascá, F. (2010). Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* 1345(1):59-72.
- Prekop, H.T., Delogu, A., Wingate R.J.T. (2017). Cerebellar Developmental Disorders and Cerebellar Nuclei. En: Marzban H. (Ed.), *Development of the Cerebellum from Molecular Aspects to Diseases*. Springer, pp. 87-89.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., et al., editors. (2004). *Neuroscience*. 3a Edición. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Capítulo 19, Modulation of Movement by the Cerebellum.
- Ramón y Cajal, S. (1909). *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. A., Maloine: Paris. 230–252.
- Rasmussen, A.T. (1933). Origin and course of the fasciculus uncinatus (Russell) in the cat, with observations on other fiber tracts arising from the cerebellar nuclei. *J Comp Neurol.* 57(1): 165–197.

- Reyes-Haro, D., González-González, M.A., Pétriz, A., Rosas-Arellano, A., Kettenmann, H., Miledi, R., Martínez-Torres, A. (2013). γ -Aminobutyric acid- ρ expression in ependymal glial cells of the mouse cerebellum. *J Neurosci Res.* 91(4):527-34.
- Robinson, F.R., Straube, A., Fuchs, A.F. (1993). Role of the caudal fastigial nucleus in saccade generation. II. Effects of muscimol inactivation. *J Neurophysiol* 70(5):1741–1758.
- Salazar, B.C., Flash, D.O., Walewski, J.L., Recio-Pinto, E. (1995). Lidocaine has different effects and potencies on muscle and brain sodium channels. *Brain Res.* 699(2):305-14.
- Schofield, B.R. (2008). Retrograde Axonal Tracing with Fluorescent Markers. *Curr Protoc Neurosci.* 43(1):1–24.
- Siebold, C., Glonti, L., Glasauer, S., y Ttner, U.B. (1997). Rostral Fastigial Nucleus Activity in the Alert Monkey During Three- Dimensional Passive Head Movements. *J Neurophysiol.* 77(3):1432–1446.
- Sassoè-Pognetto, M. (2016). Development of Glutamatergic and GABAergic Synapses. En: Gruol, D.L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmahmann, J.D., Shen, Y. (Eds.), *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer. Cap. 17, pp. 155.
- Schmahmann, J. D. (2010). The role of the cerebellum in cognition and emotion: personal reflections since 1982 on the dysmetria of thought hypothesis, and its historical evolution from theory to therapy. *Neuropsychol Rev.*20(3):236-60.
- Schmahmann, J. D. (2019). The cerebellum and cognition. *Neurosc Lett.* 688(1):62–75.
- Sheikh, S.N., Martin, S.B., Martin, D.L. (1999). Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain. *Neurochemistry.* 35(1):73-80.
- Shen, Y. (2016). Plasticity of the Cerebellum. En: Gruol, D.L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmahmann, J.D., Shen, Y. (Eds.), *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer. Cap. 43, pp. 317-319.
- Shepherd, G.M., Koch, C. (1998). Introduction to synaptic circuits. En: Sheperd, G.M. (Ed.), *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, New York, pp. 1-36
- Shinoda, Y., Sugihara, I., Wu, H. S., and Sugiuchi, Y. (2000). The entire trajectory of single climbing and mossy fibers in the cerebellar nuclei and cortex. *Prog. Brain Res.* 124(1):173–186.

- Takahashi, M., Sugiuchi, Y., Shinoda, Y. (2014). Convergent synaptic inputs from the caudal fastigial nucleus and the superior colliculus onto pontine and pontomedullary reticulospinal neurons. *J Neurophysiol.* 111(4):849-67.
- Unal, G., Apergis-Schoute, J. y Pare, D. (2012). Associative Properties of the Perirhinal Network. *Cereb Cortex.* 22(6):1318-32.
- Uusisaari, M., Knöpfel, T. (2008). GABAergic synaptic communication in the GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *Neuroscience.* 156(3):537–549.
- Uusisaari, M., Knöpfel, T. (2012). Diversity of neuronal elements and circuitry in the cerebellar nuclei. *Cerebellum.* 11(2):420–421.
- Uusisaari, M., Obata, K., Knöpfel, T. (2007). Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol.* 97(1):901–911.
- Vercelli, A., Repici, M., Garbossa, D., Grimaldi, A. (2000). Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull.* 51(1):11–28.
- Voogd, J. (1964). The cerebellum of the cat: Structure and fiber connections. *Thesis*, Leiden. Assen: van Gorcum.
- Voogd, J. (1967). Comparative aspects of the structure and fiber connexions of the mammalian cerebellum. En: Fox, C.A. y Snider, R.S. (Eds), *Progress in Brain Research: Cerebellum*. Elsevier, The Netherlands. vol 25, pp. 123-125.
- Voogd, J., y Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 21(9):370–5.
- Voogd, J., Shinoda, Y., Ruigrok, T.J.H., Sugihara, I. (2013). Cerebellar nuclei and the inferior olivary nuclei: organization and connections. En: Manto, M., Schmähmann, J.D., Rossi, F., Gruol, D.L., Koibuchi, N. (Eds) *Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders*. Springer, Dordrecht, pp. 419–421.
- Voogd J, Marani E. (2016) En: Gruol, D.L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmähmann, J.D., Shen, Y. (Eds.), *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer, Cap. 4, pp. 33-38.
- Walberg, F., Pompeiano, O., Westrum, L.E., Hauglie-Hanssen, E. (1962). Fastigioreticular fibers in the cat. An experimental study with silver methods. *J Comp Neurol.* 119(1):187–199.
- Watson, C.H., Paxinos, G., y Puelles, L, (Eds). (2012). *The Mouse Nervous System*. Elsevier, London (UK), Cap.11: *Cerebellum*.

Weisheit, G., Gliem, M., Endl, E., Pfeffer, P.L., Busslinger, M., Schilling, K. (2006). Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci.* 24(2):466-78.

Yamada M. y Hoshino M. (2016). Precerebellar nuclei. En: Gruol, D.L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmammann, J.D., Shen, Y. (Eds.), *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer. Cap. 7, pp. 63-64.

11. ANEXO 1: SOLUCIONES

Ácido tánico 1 %

Diluir el ácido tánico en polvo (Cat. 21710, EMS) en buffer cacodilato 0.1 M.

Azul de Metileno 1 %

- A. En agua milliQ, adicionar:
 - 1 % Azul de Toluidina
 - 1 % Borato de Sodio
- B. Mezclar por agitación durante 24 h.
- C. Filtrar
- D. Almacenar a TA, en frasco ámbar (proteger de la luz).

Buffer de fosfatos (PBS1x)

Para un volumen final de 1 L.

Compuesto	PM (g/mol)	[Mm] final 1x	10x (g)	1x (g)
NaCl	58.44	137	80	8
KCl	74.55	2.7	2	0.2
Na ₂ HPO ₄ dibásico	141.96	10	14.4	1.44
KH ₂ PO ₄ monobásico	136.08	1.8	2.4	0.24

- A. Una vez pesados los compuestos se añaden a 900 ml de agua milliQ y disolver.
- B. Aforar a un volumen final de 1 L.
- C. Ajustar pH 7.4
- D. Filtrar
- E. Almacenar a T.A.

DAPI (30 nM): 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride

En 9.99 ml de PBS1x adicionar:

- 1 ml de DAPI (Thermo-Fisher, Cat. D1306), concentración final 1:10,000.
- Proteger de la luz
- Almacenar a 4°C

Medio de montaje: Mowiol®

Reactivo: Mowiol 4-88 (~ 31,000 Mw), Sigma, Cat: 81381.

Para preparar 100 ml finales:

1. Solución A: Mowiol en glicerol.
 - 9.6 g de Mowiol
 - 24 ml de glicerol en un Becker de 100 mlA. Mezclar y agitar durante al menos 30 min.
B. Agregar 24 ml de agua destilada y dejar en agitación de 4-5 h.

2. Solución B: TRIS BUFFER 0.2 M, pH 8.5
 - 48 ml de agua milli Q
 - 1.162 g Trizma Base (PM: 121.1 g/mol)A. Mezclar 40 ml de agua + 1.162g de Trizma, agitar.
B. Aforar a 48 ml.
C. Ajustar pH 8.5

3. Mezclar solución A y B.
4. Calentar (no más de 50 °) y agitar constantemente hasta que se disuelvan los cristales.
5. Distribuir en falcon 50 ml y centrifugar por 15 min a 5000rpm.
6. Descartar el pellet.
7. Alicuotar en falcon 15 ml y almacenar a -20 °C hasta su uso.

Nota: La alícuota en uso debe ser almacenada a 4 °C.

Buffer Cacodilato sódico (0.2 M): solución de lavado-dilución

En base agua desionizada/destilada.

Para volumen de 1L, agregar 42.8 g para una solución 0.2 M [final].

Reactivo: Cacodilato de sodio trihidratado (Cat.12310, Electron Microscopy Sciences), PM: 214.02 g/mol/l.

[0.1M]: Para lavados continuos. Diluir del stock.

[0.2M]: Para incubaciones O/N. Preparar como stock.

Resina EPON

Para 100 ml finales agregar paulatinamente en el orden indicado hasta mezclar completamente, almacenar a -20 °C.

45 ml de EPON 812 (Cat. 14900)

30 ml de DDSA (Cat. 13710)

25 ml de NMA (Cat. 19000)

1 ml de BDMA ó DMP30 (Cat. 11400 / Cat. 13600)

Solución de bloqueo: suero bovino fetal (BSA) al 2 %

Para un volumen final de 10 ml, adicionar:

- 2 g de BSA (Sigma, Cat. 05470)
- Aforar a 10 ml con PBS1x
- Mezclar y mantener a 4 °C.

Solución fijadora: Karnovsky

Glutaraldehído 2.5 % (acuoso, Cat. 16310, Electron Microscopy Sciences) + PFA 4 % (grado ME) en Buffer Cacodilato 0.1 M.

Solución fijadora: Paraformaldeído al 4%

Para un volumen final de 600 ml:

- A. Disolver 24 g de PFA (sigma) en 300 ml de agua milliQ previamente calentada a no más de 60°C.
- B. Agregar 2 perlas de NaOH, o solución 1N hasta que comience a disolverse el PFA. Mantener en agitación constante hasta que se disuelva.
- C. Agregar 60 ml de PBS10x.
- D. Aforar a 600 ml con agua milliQ.
- E. Ajustar pH a 7.2-7.4
- F. Filtrar en botella estéril.

Solución Krebs normal / Freiburg

Para un volumen final de 1L en agua milliQ, disolver:

Compuesto	PM (mM)	(g)
NaCl	120	7.305
NaHCO3	25	2.1002
KCl	25	0.1864
NaH2PO4	1.25	0.1724
Glucosa	25	4.504
MgCl2	1	0.2034
CaCl2	2	0.294

- Preparar por separado la solución de Mg y Ca, para posteriormente adicionarla al resto de la solución.
- Preparar el mismo día que se emplea, mantener a 4 °C.

Solución permeabilizante al 0.1 % - 0.5 %

Agregar el volumen correspondiente en PBS1x

- Tritón X-100 (Sigma, Cat. 11332481001)
- Mezclar y mantener a TA.

Solución salina (SSF) al 0.8 %

Para preparar 800 ml:

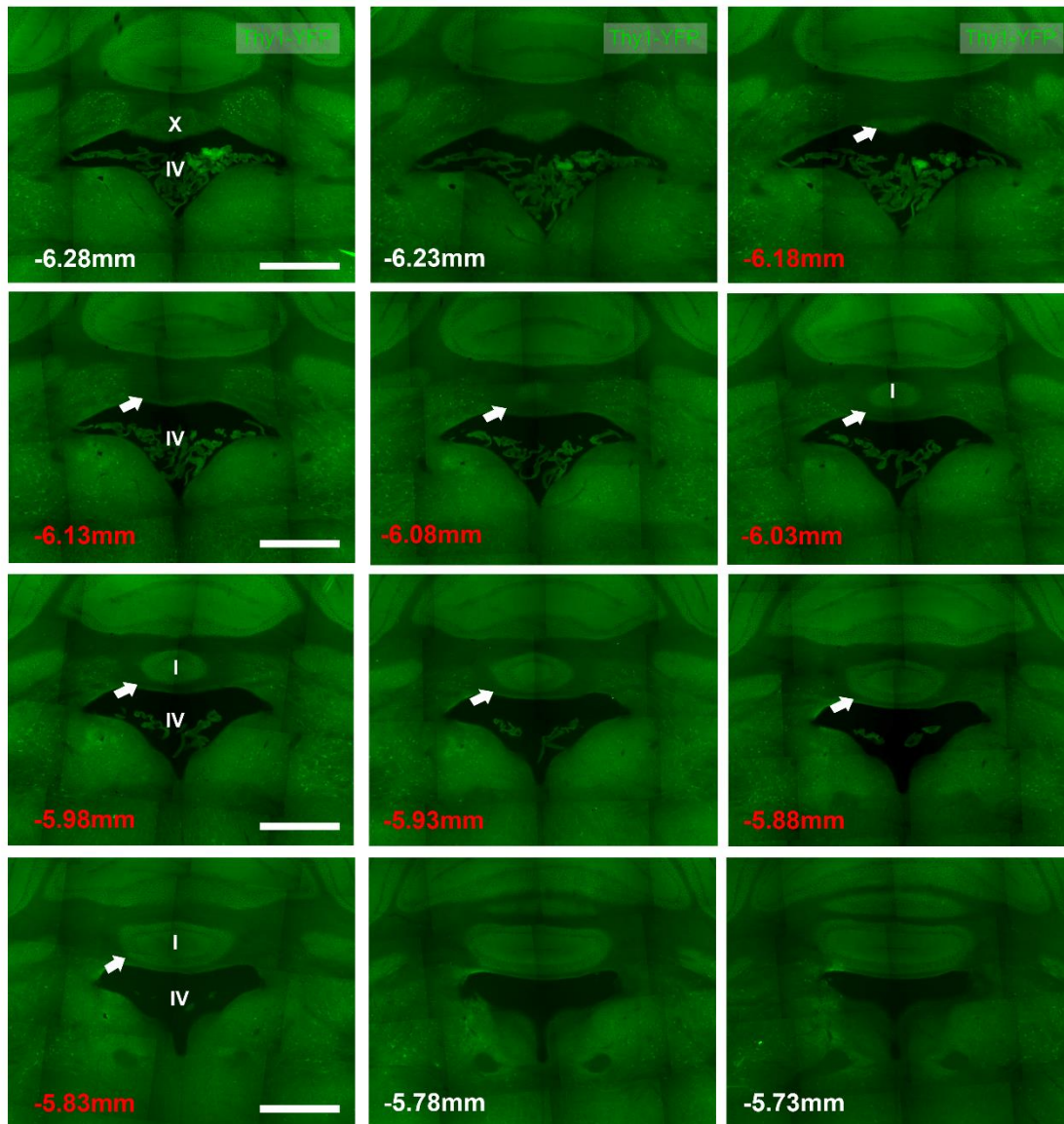
- A. Agregar 7.2 g de NaCl en 700 ml de agua miliQ, mezclar
- B. Aforar a 800 ml
- C. Filtrar en unidad de vacío (filtro de 0.2 μm) o esterilizar en autoclave
- D. Ajustar el pH a 7.2-7.4
- E. Almacenar a TA

Yoduro de Propidio (YP): tinción nuclear

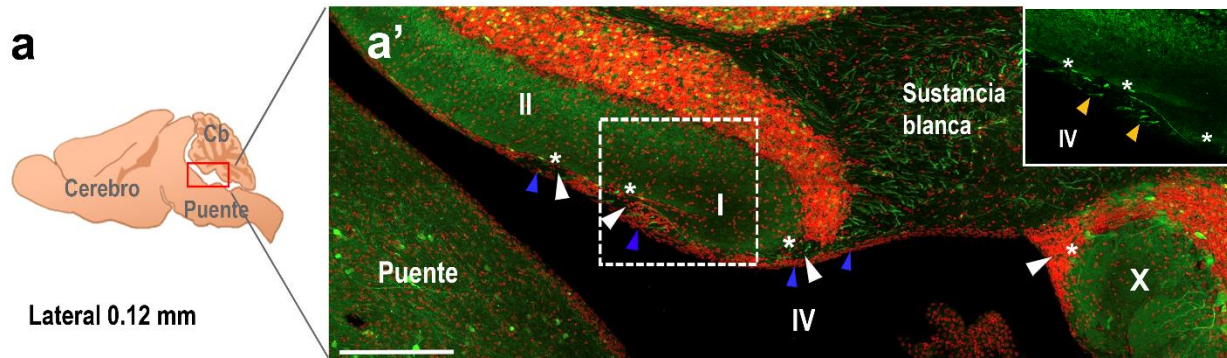
En un volumen equivalente de agua MilliQ, agregar:

- YP (1 mg/ml, Molecular Probes, Cat. 11599296)
- RNAsa (100 $\mu\text{g/mL}$)
- Mezclar
- Incubar el tejido 15min a TA.

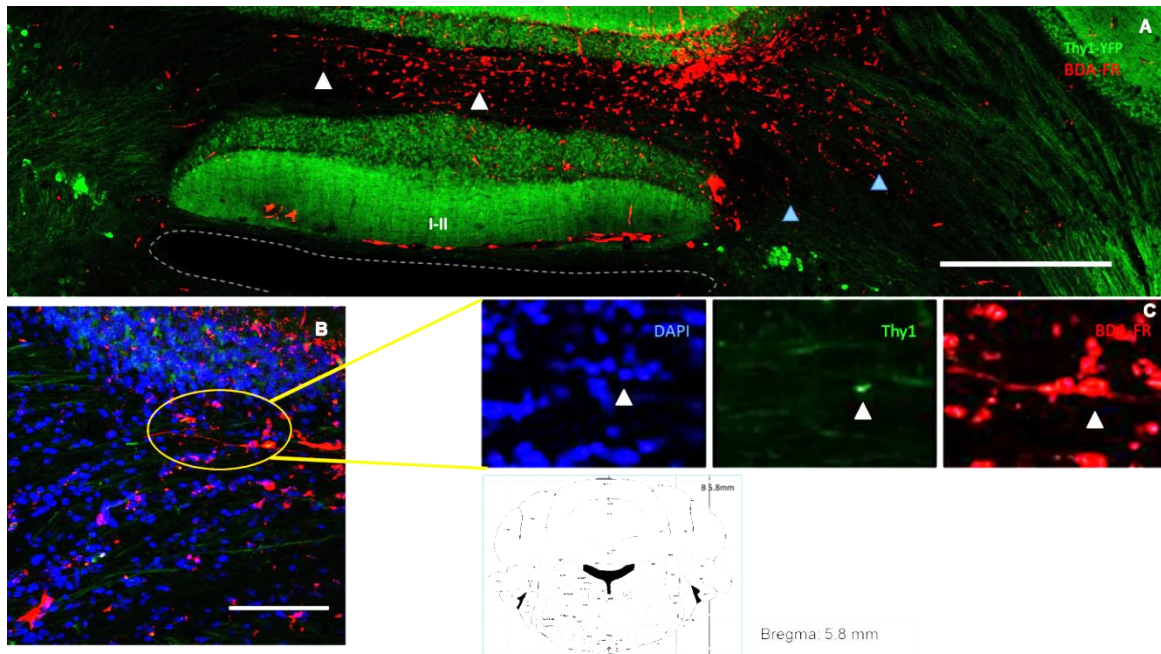
12. ANEXO 2: IMAGENES COMPLEMENTARIAS



A2.1 Atlas de referencia del cerebelo del ratón Thy1: GCaMP-GFP. Cortes coronales seriados obtenidos a 75° de inclinación. En cada imagen se indica la coordenada de referencia (Bregma), las flechas (blancas) indican la presencia de los aSV. La extensión AP de los aSV se resaltan con las coordenadas en rojo. IV: cuarto ventrículo. Barras: 500 μ m.



A2.2 Disposición de los aSV en cortes sagitales del cerebro de ratón Thy1: GCaMP-YFP. a) Esquema de la zona mostrada en a', indicando la coordenada correspondiente en el eje ML. a') Techo del IV abarcando los lóbulos X-II donde se observan las fibras segmentadas correspondientes por ubicación a los aSV (fibras verdes indicadas por las puntas de flecha blancas), delimitada por las dendritas apicales de las CP (asteriscos) y la monocapa de células endimarias que forman la superficie del techo (CE, puntas de flecha en azul). La imagen superior derecha corresponde a la magnificación de la superficie del lóbulo I (recuadro blanco), donde se aprecian con mayor detalle los aSV (punta de flecha en amarillo). Canal verde: Thy1, canal rojo: YP. Barra: 500µm.



A2.3. Proyecciones contralaterales y proyecciones descendentes del fastigio rostral en el ratón Thy1-H: GCaMP-YFP. **A:** Corte coronal (75°) a nivel de Bregma ~5.8 mm. Las puntas de flecha en blanco indican el curso contralateral del NF marcado con BDA-FR, mientras que las puntas de flecha en azul, los axones descendentes ipsilaterales provenientes del mismo sitio. **B:** Magnificación de las terminales de los axones donde se muestra la colocalización del trazador y el GFP. Barras: 500 µm (A); 200 µm.

13. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA



Inter-fastigial projections along the roof of the fourth ventricle

Gabriela B. Gómez-González¹ · Ataúlfo Martínez-Torres¹

Received: 11 January 2020 / Accepted: 11 January 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

The fastigial nucleus (FN) is a bilateral cerebellar integrative center for saccadic and vestibular control associated with non-motor functions such as feeding and cardiovascular regulation. In a previous study, we identified a tract of myelinated axons embedded in the subventricular zone (SVZ) that is located between the ependymal cells that form the dorsal wall of the ventricle and the *glia limitans* at the roof of the fourth ventricle González-González (Sci Rep 2017, 7:40768). Here, we show that this tract of axons, named subventricular axons or SVa, contains projection neurons that bilaterally interconnect both FNs. The approach consisted of the use of a battery of fluorescent neuronal tracers, transgenic mouse lines, and immunohistofluorescence. Our observations show that the SVa belong to a wide network of GABAergic projection neurons mainly located in the medial and caudal region of the FN. The SVa should be considered a part of a continuum of the cerebellar white matter that follows an alternative pathway through the SVZ, a region closely associated with the physiology of the fourth ventricle. This finding adds to our understanding of the complex organization of the FN; however, the function of the interconnection remains to be elucidated.

Keywords Cerebellum · Deep cerebellar nuclei · GABA · Fastigial nucleus · Subventricular zone

Abbreviations

BG	Bergmann glia	Med	Medial (fastigial) nu
Cb	Cerebellum	MVePc	Medial vestibular nu (parvocellular)
CFS	Cerebrospinal fluid	MVeMC	Medial vestibular nu (magnocellular)
DC	Dorsal cochlear nu	nu	Nucleus
ECs	Ependymal cells	Pc	Purkinje cell
ECL	Ependymal cell layer	pcn	Precentral fissure, cerebellum
FG	Fluro-gold	PnC	Pontine reticular nu
Fl	Flocculus	Pr	Prepositus hypoglossal nu
FN	Fastigial nucleus	py	Pyramidal tract
FR	Fluoro-ruby	P7	Prefacial zone
GiA	Gigantocellular nu	SpVe	Spinal vestibular nu
icp	Inferior cerebellar peduncle	Sp5	Spinal trigeminal tract
IntA	Anterior interpositus	SuVe	Superior vestibular nu
LVe	Lateral vestibular nu	SVa	Subventricular axons
LPGi	Lateral paragigantocellular nu	SVCC	Subventricular cellular cluster
		Unc	Uncinate fasciculus
		VCP	Ventral cochlear posterior nu
		VeCb	Vestibulocerebellar nu
		VMC	Ventromedial cord
		X	Cerebellar lobule ten
		x	X nu
		I	Cerebellar lobule one
		4 V	Fourth ventricle
		7 N	Facial nu

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02217-8>.

✉ Ataúlfo Martínez-Torres
ataulfo@unam.mx

¹ Laboratory of Molecular and Cellular Neurobiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México

Introduction

In the cerebellum, diverse motor and sensorial stimuli are integrated and processed, giving rise to orchestrated responses involved in motor coordination, motor learning, and emotional-cognitive processes (Ito 2006; Koziol et al. 2014, Consensus Paper). The fastigial nucleus (FN, also known as medial nucleus) is one of the three cerebellar nuclei which serve as an integrative node for inputs and outputs of the cerebellum (Voogd and Glickstein 1998; Oberdick and Sillitoe 2011; Ito 2012).

The cerebellar cortex is uniformly divided into three cell layers (molecular, Purkinje, and granular) continuously folded into ten lobules (I–X) that surround an internal layer of white matter, where the deep cerebellar nuclei (DCN; dentate, interposed, and fastigial) are embedded. In rodents, lobules I, II, and X form the roof of the fourth ventricle (4 V). In the roof of the 4 V, the end feet of the Bergmann glia (BG) form the *glia limitans*, and beneath this, the ciliated ependymal cells (ECs) form the dorsal wall of the ventricle, which is in direct contact with the CSF (Brocklehurst 1969; Alvarez-Morujo et al. 1992; Voogd et al. 1996; Grosche et al. 2002; Falcão et al. 2012). Between the *glia limitans* and the ventricular layer is the SVZ, which is formed by a heterogeneous population of cells including neurons, oligodendrocytes, microglia, and neurons (Reyes-Haro et al. 2013; González-González et al. 2017; Becerra-González et al. 2020).

In a previous study, single-cell electrophysiological recordings in the SVZ of the cerebellum revealed electrical profiles of neurons; that is to say, the cells responded by generating action potentials after intracellular injection of depolarizing current pulses (Reyes-Haro et al. 2013). A closer inspection of the area exposed two neuronal populations: (1) unmyelinated neurons that form a small local circuit of undisclosed function; and (2) myelinated subventricular axons, here referred to as SVa, which were revealed by standard histological preparations, immunohistochemistry (IHF), and transmission electron microscopy (TEM) (Reyes-Haro et al. 2013; González-González et al. 2017). Previous reports have described two groups of axonal projections along the cerebellar SVZ and the ventricular surface: (1) the noradrenergic neurons whose projections arrive from the *locus coeruleus*, which are primarily composed of bipolar neurons running along a sagittal pathway (Voogd 1967, 2013; Grzanna and Moliver 1979) and, (2) the supraependymal axons that cross underneath the velum (Berry et al. 1995, 1998); nevertheless, based on their position, the SVa of the cerebellum do not belong to any of these two groups of axonal projections. Thus, the question remained as to where the SVa of the roof of the 4 V originate.

The boundaries of the myelinated SVa at different levels of the roof of the 4 V are delineated in Fig. 1, in a series of semithin coronal sections stained with toluidine blue (Fig. 1a–g), and sagittal sections of a transgenic mouse that expresses YFP under the pan-neuronal promoter Thy-1 (Thy1:GCaMP-YFP) (Fig. 1h–h', for detail see Methods). The SVa are distributed in the medial (Fig. 1b, c, d, h') and lateral (Fig. 1e, f) sections of the roof of the 4 V, where they pass by the subventricular cellular cluster (SVCC, Fig. 1c) and the ventromedial cord (VMC, Fig. 1d), a group of GFAP⁺/nestin⁺ cells that respond under hypoxic conditions (Becerra-González et al. 2020). In these images, the SVa seem to cross along the roof of the 4 V; however, this path has not been previously documented. Thus, in this study, we aimed to determine the origin and projection site of these SVa using a battery of neuronal tracers, transgenic mice, and IHF. Together, these approaches allowed us to conclude that the origin of these myelinated SVa is the FN, unexpectedly providing evidence of an inter-fastigial connection not previously considered, which might endow this nucleus with novel functional roles.

Material and methods

Animals

Experiments were performed in male and female mice (post-natal p45–56, 27–30 g) from the CD1 strain, and transgenic strains Thy1: GCaMP-YFP (Porrero et al. 2010), GFAP-eGFP (Nolte et al. 2001) and Pax2: GFP (p30, Weisheit et al. 2006). All experiments were designed to prevent animal suffering and discomfort at any moment. Animal protocol (INEU/SA/CB089) was approved by the Institutional Bioethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, in accordance with national (NOM-062-ZOO-1999) and international guidelines (National Institutes of Health, USA).

Stereotaxic tracer injection

Mice were anesthetized intraperitoneally with a mixture of ketamine/xylazine (81 mg/kg and 6 mg/kg, respectively) in 0.9% saline solution. Anesthesia was verified by tail pinching before transferring the animal to the stereotaxic frame (Stoelting Mod. 51,500). Eyes were maintained hydrated with saline solution. Next, the skull was exposed, and the periosteum was removed while rubbing the area with a cotton swab dampened in 3% H₂O₂ used to highlight the cranial sutures; then, Bregma and Lambda coordinates were aligned at the *x* axis. The following coordinates were set from the Lambda suture for injection into the right FN, based on the Paxinos

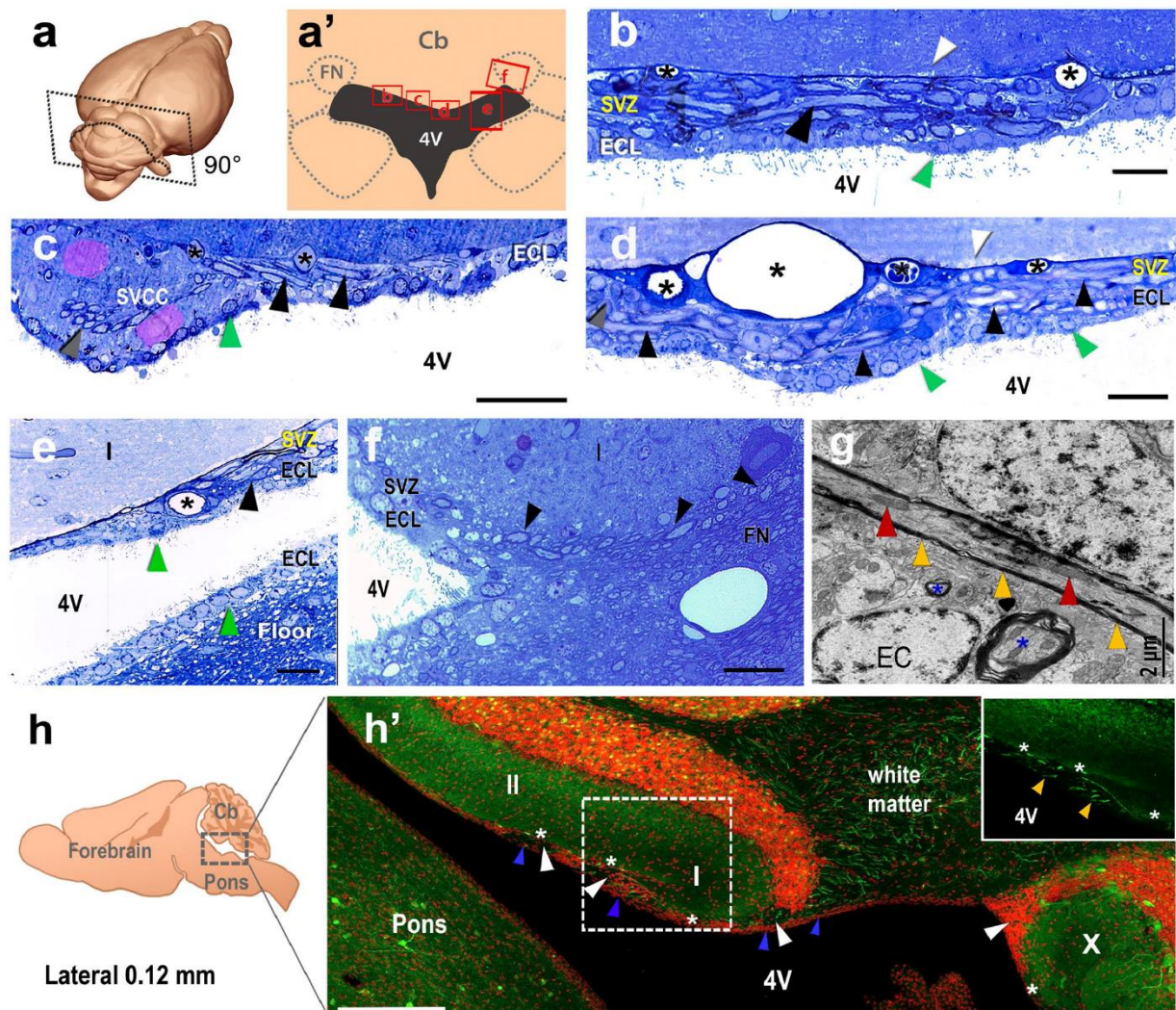


Fig. 1 SVa in the roof of the fourth ventricle. **a** Diagram of the mouse brain to show the regions (red boxes) analyzed in this figure. **b–f**; Semithin coronal Sects. (300 nm) of the cerebellum at the level of the 4 V stained with toluidine blue show the array of SVa, $n=3$. **b** Lateral section of the roof of the 4 V; the myelinated SVa (black arrowheads in **b–f**) are clearly observed in the subventricular zone (SVZ), which is between the *glia limitans* formed by the BG endfeet (white arrowhead in **b, d**) and the ependymal cell layer (ECL, green arrowheads in **b–d**). Blood vessels are indicated with (*) in **b–f**. **c** The SVa pass by the subventricular cellular cluster (SVCC, González-González et al. 2017), a structure formed by diverse cells that include local neurons (highlighted in pink), longitudinal axons are indicated by gray arrowheads in **c–d**. **d** The SVa pass by the ventromedial cord (VMC), a group of cells aligned along blood vessels distributed in the SVZ. **e** SVa distributed in a lateral section of the roof of the 4 V (black arrowhead). The differences in the cellular organization between the roof and the floor of the 4 V are evident in this section.

Notice the homogeneous cubic ependymal cells (green arrowheads) in the floor that contrast with the heterogeneous morphology of the cells of the roof. **f** Myelinated axons between lobule I and FN in a lateral section of the 4 V, which appear to follow a path that descends to the SVZ (black arrowheads). **g** TEM show an isolated SVa (yellow arrowheads) from the lateral section of the 4 V. Notice the presence of multiple mitochondria (red arrowheads), a segmented myelinated axon (blue asterisks) and an ependymal cell (EC). **h** Drawing to indicate the area (red rectangle) shown in **h'**. **h'** 50 μm sagittal-sections of a Thy1:GCaMP-YFP mouse show the SVZ (white arrowhead) in the lobule I, between the ECL (blue arrowheads) and the top of the molecular layer (asterisk). In the inset, the SVa appear segmented within the SVZ (yellow arrowheads) because their transversal trajectory; nuclei staining (red signal) was removed in this image for a better visualization of the axon fibers at the SVZ. Scale bar; 20 μm (**b–e**), 50 μm (**c**), 40 μm (**f**), 200 μm (**h**)

Atlas: $-2.08/-2.2$ mm anteroposterior, $+0.7/+0.75$ mm medio-lateral and $-3.3/-3.5$ mm dorsoventral. A small hole was made in the skull with a mini drill (Dremel 7700, 7.2 V), using a 1/32" bit. For the injections of the tracers, we used pre-pulled tip glass-micropipettes (outer diameter 25 μm , inner diameter 7–10 μm) (Blaubrand Cat. 708,707), coupled to a Hamilton syringe (Cat. 65,460–10). The tracers were administered in steps of ~ 3.5 nl every minute, using a microinjector (Model 5000, KOPF, USA). After 10 min, the micropipette was gently removed, and the skin was sutured (Polypropylene, USP 6-0/EP 0.7). Paracetamol (200 mg/kg) was administered p.o. as analgesic for 3 days post-surgery.

The neuronal tracers used in this study were: fluoro-Gold (FG), [5%], 40–50 nl, Fluorochrome, USA; Red Retro-Beads (RB), diluted to 1:1 or 1:2 in standard saline solution, 30–50 nl, Lumafluor, Inc.; Fluoro-Ruby (FR), [10%], 70–100 nl, Tetramethylrhodamine dextran-amide, 10,000 MW (Fluorochrome, USA); and Biotinylated Dextran Amine (BDA), [10%], 30–50 nl, Vector Labs. Those were unilaterally administered (into the right FN) in independent experiments ($n=7, 4, 12$ and 6 ; respectively). Mice were euthanized 5–7 days after the injection; this time has been validated as sufficient for the tracers to reach their maximal diffusion (0.4 cm²/h, Vercelli et al. 2000; Catapano et al. 2002).

Brain tissue dissection and fixation

Mice were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (60 mg/Kg) and intracardially perfused with 20–30 ml of saline solution (0.9% in deionized water), followed by 30 ml of 4% PFA in PBS 1X, pH 7.4. The whole brain was dissected and post-fixed overnight at 4 °C. Next, the brain was cryoprotected in sucrose gradients of 10%, 20% and 30%, frozen in dry ice and stored at -70 °C.

To expose the SVa on the roof of the 4 V, we tested three angles for brain sectioning: 45°, 75°, or 90°; based on the most prominent dorsal region from the forebrain. The antero-posterior coordinates for each slice were established according to the distance (in μm) and as the starting point the most caudal region, according to the Paxinos and Franklin (2001) Mouse Brain Atlas.

Brain sections that included the cerebellum and midbrain were mounted on a plate and covered with a layer of OCT (Tissue-Plus). Serial 50–55 μm slices were obtained with a cryostat (Leica model CM3050S) and collected on Superfrost slides (Digger, Cat. EF15978Z). Samples were kept at 4 °C until processing.

BDA labelling detection

Cerebella injected with BDA ($n=6$), were processed as follows: first, endogenous peroxidase activity was reduced by

immersing slices in 0.6% H₂O₂ for 20 min, then the slices were washed with PBS and incubated in a solution of avidin-peroxidase (ABC kit, PK-6100 Vector Labs) in 5 ml of PBST (PBS + Triton X-100 0.15%, pH 7.5) for 48 h at 4 °C. Finally, the peroxidase signal was revealed with the DAB substrate kit solution, used according to the manufacturer's instructions (Cat. SK-4100, Vector).

Tissue processing for semithin sectioning and transmission electron microscopy

The brains ($n=3$, CD1 mice) were post-fixed with 4% PFA and sodium cacodylate trihydrate 0.1 M (Cat.12310, Electron Microscopy Sciences) for 24 h. The excess solution was washed with 0.2 M cacodylate, 3 times every 10 min at room temperature. The tissue was embedded in 1% osmium tetroxide (Cat. 19,110 EMS) in deionized water for 1 h and washed in 1% sodium cacodylate 3 times every 10 min, then incubated in 1% tannic acid (cat. 21,710, EMS) for 1 h, immersed in 0.2 M cacodylate and kept at 4 °C. The following steps were performed on ice: the samples were dehydrated in an ethanol gradient ranging from 10 to 100% in steps of 10%, for 20 min each; then were immersed in propylene oxide (2 times, 15 min each) and infiltrated into an epoxy resin (1:1 in propylene oxide) (EPON 812 cat. 14,900, DDSA Cat. 13,710, NMA Cat. 19,000, BDMA Cat. 11,400) until the propylene evaporated (24 h approximately). Later, the resin was removed and replaced with 100% epoxy resin and kept in rotation for 5 h at RT. The tissue was flattened between plastic slides and kept overnight at 60 °C. Finally, the sample was transferred onto a beam capsule filled with 100% epoxy resin and allowed to polymerize. For histological analysis, the sample was sliced into semithin Sects. (300–600 nm) stained with 3% toluidine blue in 0.1 M boric acid, covered with mounting medium (Entellan), and imaged on a bright-field microscope (Leica, DM2000) coupled to an ICC50 HD camera.

For ultrastructural analysis, semithin sections were processed for TEM; first, 60 nm sections were obtained with a diamond blade, recovered on a 50-mesh hexagonal grid, and stained with uranyl acetate 2% (dissolved in distilled water) for 25 min. Then, the sections were incubated for 7 min in lead citrate 2% (in a 0.1 NaOH solution) and finally observed under a JEOL-JEM 1010 transmission electron microscope at 80 kV (Jeol, Tokyo, Japan).

Thy1: GCaMP-YFP histological processing

This transgenic mouse line expresses the YFP and the calcium sensor GCaMP under the Thy-1 promoter, which directs the expression to projection neurons, including the SVa (Porrero et al. 2010; Akerboom et al. 2013). Brains were processed mostly as mentioned in the protocol above

but, to enhance the fluorescence emitted by GCaMP, 20 ml of high calcium buffer (0.09 mM CaCl₂ in PBS-1X, pH 7.4) was used after perfusion with the standard saline solution.

IHF for GAD 65–67 and GABA vesicular transporter protein (VGat)

The IHF protocol was performed on slides ($n=6$ mice) based on the report by Hoffmann et al. (2008). First, the tissue was hydrated with PBS 1X for 10 min at RT, the primary antibody was added in PBS 1X + Triton X-100 0.4%, shaking for 1 h at RT, then incubated overnight at 4 °C with slow agitation (less than 50 rpm). The primary Ab was washed 6 times with PBS, 10 min each. Next, the secondary antibody was added and incubated for 2 h at RT and washed 5 times for 5 min with PBS 1X. Mowiol (Cat. 81,381, Sigma) was used as a mounting medium. Table 1 shows the antibodies used in this study.

Epifluorescence and confocal microscopy

Tiled images were obtained using an Apotome Axio Imager, Zeiss microscope, with Plan-Apochromat 10×/0.45, Plan-Apochromat 1 mm Korr DIC 25×/0.8 Oil or Plan-Apochromat 100×/1.46 Oil objectives. An X-Cite UV lamp and filters of 600 nm, 488 nm, 445 nm were used to visualize Alexa 594/RB, GFP and FG/DAPI, respectively. The images were taken with an Axiocam MR3 camera.

Confocal images from consecutive slices were obtained using a Zeiss LSM-780 confocal microscope with Plan-Neofluar 10×/0.30, Plan-Apochromatic 25×/0.8 1 mm Korr DIC and Plan-Neofluar 40×/1.30 oil DIC objectives. The following lasers were used; Argon 488 nm, DPSS 561 nm, and Chameleon Ultra-Ti: Sapphire from Coherent; to detect GFP-YFP/FG, FR/Alexa 594, and DAPI, respectively. The roof of the 4 V was reconstructed using 30 μm confocal image stacks (1.2 μm optical slice, resolution of 1024×1024 pixels). 10× and 20× images were obtained to reconstruct the roof of the 4 V using the tile scan mode.

Image analysis

Confocal images were processed using Fiji-Image J (version 1.52a). In general, background subtraction of 30 pixels per channel followed by a Z-stack projection in summary/maximum mode was applied in each image. For Thy1: GCaMP-YFP and RB-DAPI images, an enhanced contrast of 0.3% pixels was applied to highlight the axons. For low magnification image reconstructions, the pairwise function was used (Preibisch et al. 2009). Finally, in the case of RB and FG images, the noise remover “Despeckle” filter was applied.

Epifluorescence images were used to determine the number of FG and RB labeled somas in the FN. For FG

experiments, a 10× multichannel image per slice (GAD 65–67/Rhodamine, and FG/UV) covering the entire FN (varying in size according to the fastigial region) was acquired and transformed into a binary image. For RB experiments, in which the signal is more discrete due to a labeling pattern in the form of granules restricted to the soma (Katz et al. 1984), we used a set of two 100× images from two different areas of FN per slice. The multichannel images (RB/Rhodamine filter, DAPI/UV filter) were converted into binary images. Then, both images were processed as follows: the channels were split and the ROIs (FN regions) were delimited according to the GAD 65–67 or DAPI fluorescent signal. The contrast was enhanced by 0.1% pixels to FG signal and 0.3% pixels in the case of RB. In the case of the FG images, to isolate positively labeled somas, the images were segmented by applying the triangle threshold, then the signal within somas was filtered and scored using the “analyzing particles” tool (circularity: 0.1–1, pixels: 20–1250 and 12–1250 in rostral sections). The difference in circularity was determined according to the average size of the soma. As explained before, the scarce and centered signal of the RB, besides the higher magnification acquisition allows the counting of labeled somas with no previous segmentation of the images. In both cases, the results are presented as mean and SEM.

To evaluate the percentage of FG labeled somas that express GAD 65–67, confocal stack images of 25 μm, area 360×360 μm and resolution 1024×1024; were processed by enhancing the fluorescent signal by 1–2% per channel, followed by a Z-stack projection (maximum mode). Over the resultant image, using the cell counter plugin, the somas were counted according to three categories: total FG⁺ somas, GAD 65–67⁺ and GAD 65–67⁻; which were scored as GAD 65–67⁺ when signal was present at the perikaryon.

The light microscope images of the semithin sections were filtered with the Enhance local contrast tool (CLAHE, blocksize 199, histogram bins 500, max. slope 2.00) (Preibisch 2009).

Figures were processed using Adobe Photoshop CS3 and Illustrator software, where no other parameter than brightness were adjusted. Figure art (schemes and drawings) were prepared on Illustrator and Blender 3D render software.

Statistical analysis

FG and RB labeling were counted in semi-serial slices of the FN which was divided into three regions based on the SVa projection sites labeled by the tracers (medial, rostral and caudal), $n=3$ mice per tracer. To avoid the overestimation of somas, a slice was skipped after each that was counted. For the FG total estimation, the regions were compared in terms of the total of FG labeled cells at the contralateral FN, applying the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s

multiple comparison Test (alpha 0.05). In the case of RB where 2 images per slice were considered, a Welch ANOVA followed by Games-Howell's multiple comparisons test (alpha 0.05) was used.

The number of GAD 65–67⁺ FG cells in the FN was determined in 4 mice, 19 slices in total, analyzing every 3–4 slices that covered the whole FN. Statistical differences between GAD⁺ vs. GAD⁻ were assessed by an Unpaired *T* test, one-tailed, (alpha 0.05). The relative percentage of GABAergic cells for each fastigial region (rostral, medial, caudal), was calculated based on the same data, considering the total FG labeled somas as 100%. One-way ANOVA (unpaired), followed by Tukey's comparison test (15 comparisons per family, alpha 0.05) was conducted.

In all cases, the software GraphPad Prism (v.8) was used for computing the statistics and graphing the results.

Results

Distribution and trajectories of the SVa of the roof of the 4 V

As shown in Fig. 1b–f, coronal sections of the roof of the 4 V revealed the SVa, which have a myelin coat of about 200 nm and pass by different cellular elements that reside within the SVZ (Fig. 1g). No collaterals from the SVa were identified. Although the images clearly provided evidence for the presence of these axons immersed in the SVZ (Fig. 1h'), they do not provide an obvious suggestion of their pathway. To overcome this limitation, we explored whether tilting the slicing angle would reveal the trajectories of these axons using cerebellar sections of the Thy1: GCaMP-YFP mouse line, which allowed us to visualize the SVa due to the expression of YFP (Porrero, et al. 2010; Akerboom, et al. 2013). Under the confocal fluorescence microscope, slices taken at 75° (Fig. 2, *n* = 3) revealed that the SVa cross transversally along with the dorsal white matter axons from the roof ventricle, and a fraction apparently project towards the FN (Fig. 2a–c); however, this preparation did not allow us to determine whether the axons end in the contralateral FN or pass by it.

Nevertheless, consecutive slices revealed that in the anteroposterior axis, the SVa span about 300–350 μm, from Bregma –5.83 to –6.18 mm (Supplementary Material I). At this level, the axons from the FN follow different pathways: 1) in the most rostral section, the SVa are barely evident and most of the axons project at the level of lobules I–II (Fig. 2a). (2). In the medial section (between Bregma –6.18 and –6.03 mm, ±0.05 mm), the SVa are clearly observed along the roof of the 4 V whereas the rest of the axons of the FN integrate in the white matter between lobules I and X, an area restricted to 150 ± 25 μm width (Fig. 2b, c). Here, the

axons decussate to form a peculiar organization similar to a “drape” of ~800 μm in the dorsoventral direction. Finally, (3) caudal to –6.18 Bregma, at lobule X only a few axons of the SVa cross above this lobule (Fig. 2d). Near the most lateral section of the roof of the 4 V, the apparent pathway of the SVa seems to reach the FN, yet these preparations do not fully show where the SVa end and this hypothesis was further confirmed using neuronal tracers.

In slices taken at 45°, SVa were also observed in the area of the roof of the 4 V formed by lobules I and II (Bregma –6.05, *n* = 2, Supplementary material II); unfortunately, the SVa end terminals appeared segmented making it difficult to discern their actual origin. Nevertheless, the images are informative since they expose how the SVa change their trajectories along their pathway, some of them in clear direction toward the FN. Thus, no further effort was made to determine the pathway of the SVa in these sections and we concluded that slicing the cerebellum at 75° was the best option to follow their trajectories.

The SVa originate in the fastigial nucleus

To assess if the somas of the SVa reside within the FN, four neuronal tracers were injected: the anterograde tracers FR and BDA (Vercelli et al. 2000; Köbber et al. 2000; Catapano et al. 2002), and the retrograde tracers, FG and RB (Schmued and Heimer 1990; Vercelli et al. 2000; Köbber et al. 2000). The tracers were injected separately and unilaterally into the right FN of male and female adult mice from different lines: CD1 and GFAP-eGFP (which expresses GFP in astrocytes and BG) (total *n* = 29; Figs. 3a, 4a, 5a, 6a and supplementary material III). The GFP signal of this transgenic mouse allowed us to delineate the cerebellar nuclei and lobules, as well as the VMC at the roof of the 4 V. In CD1 mice, DAPI staining delineated the anatomical structures.

Identification of afferents from the contralateral FN by FR labeling

Five days after injection of FR into the right FN, the most caudal sections of the brain (Bregma –6.72 mm to –5.20 mm) were analyzed (Fig. 3b, *n* = 12). The description that follows is focused only on those sections that included the hindbrain and pons (Fig. 3c–f, Supplementary material IIIa–c).

Based on the density of SVa projection sites labeled by FR, the FN was divided into three regions (divisions that will be used along with this study): (1) The *rostral region*, –5.63 to –5.83 mm ± 50 μm from Bregma, in which the FN afferents project bilaterally to the Unc at the level of lobule II; at this level there is no presence of SVa in the roof of the 4 V (Fig. 3c). (2) The *medial region*, –5.83 to

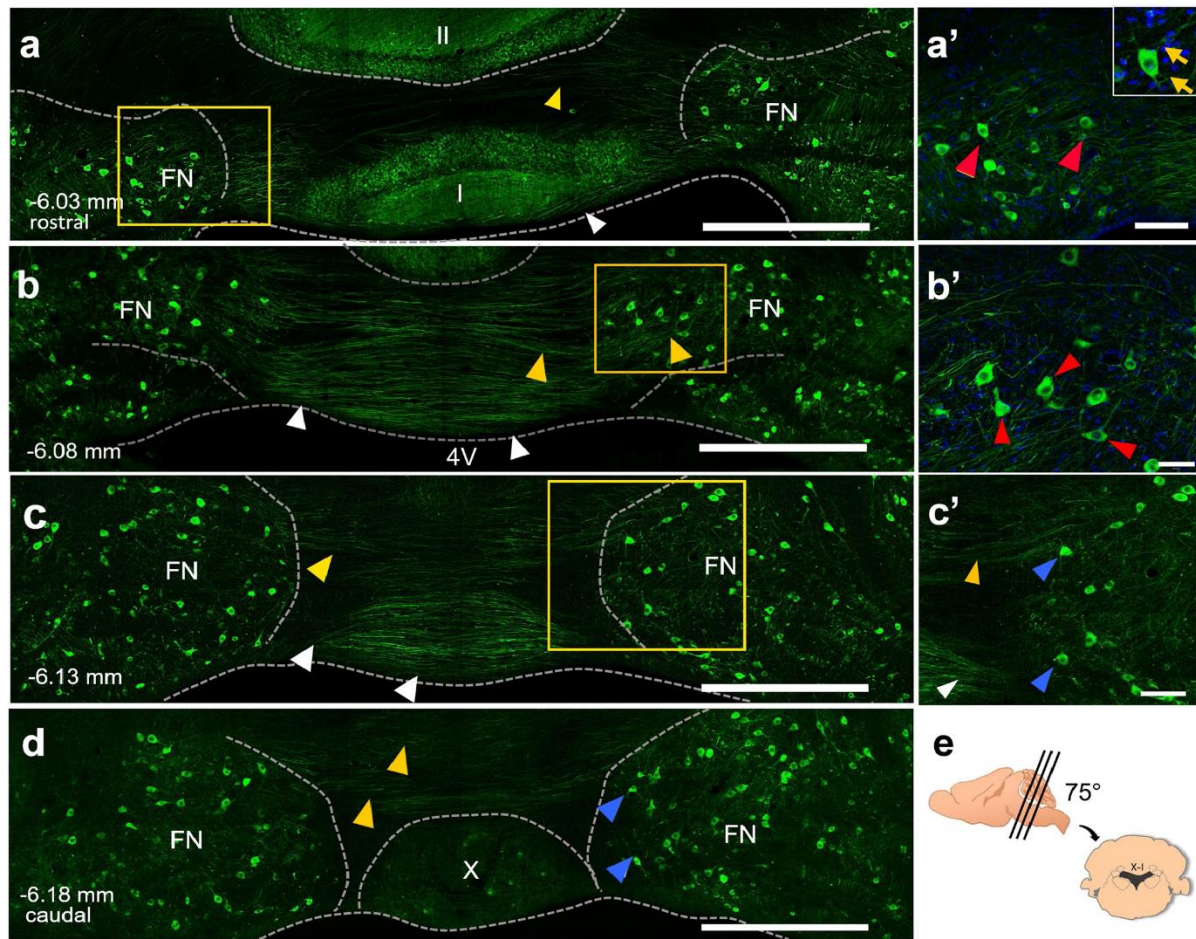


Fig. 2 SVa in the roof of the 4 V labeled in the Thy1: GCaMP-YFP transgenic mouse line. Sample images from a Thy1: GCaMP-YFP transgenic mouse sectioned at the level of lobules I, II and X of the cerebellum in 50 μ m serial coronal slices; the images include parts of the fourth ventricle (4 V) $n=3$. Slices were cut at 75° of inclination at the Bregma coordinates indicated in each panel. **a** The rostral region of the FN shows axons crossing lobules I and II (yellow arrowhead). The SVa are indicated by white arrowheads. The yellow square is magnified in **a'**, where a subset of rostral FN neurons (red arrowheads) project toward the contralateral side. The inset within **a'** shows a magnification of the area in which arrows point to axons. **b** Representative image of the white matter that forms the transition between lobules I and X. Here the SVa are found along the roof of the 4 V (white arrowheads), whereas the number of axons of the white matter is larger and their contralateral projections are more evident (yellow

arrowheads). The yellow square is magnified in **(b')**; red arrowheads indicate projection neurons. **c** Consecutive caudal slice from **b**). The SVa are observed along the roof of the 4 V (white arrowheads). In addition, a bundle of axons of the white matter that continues contralaterally is observed in this section (yellow arrowhead). **c'** shows the right FN in which local interneurons (blue arrowheads) limit the boundaries of the nucleus, white matter axons that cross dorsally (yellow arrowhead) and the SVa ventrally (white arrowhead). **d** The most caudal section shows the lobule X, where the ventral axon bundle is practically absent and SVa are not observed in the roof of the 4 V. Here the caudal FN is delineated by its own neurons (blue arrowheads). Scale bar; 500 μ m (**a–d**), 50 μ m (**a'–c'**). (blue, DAPI counterstain). **e** Diagram of the mouse brain that indicates the slicing angle and image plane

–6.18 mm \pm 50 μ m from Bregma, which includes the interface between lobules I and X (Fig. 3d) and is divided into two sections: (a) the *mid-rostral section* (about 100 μ m), where the axons descend ipsilaterally towards the LVe and MVePC-Pr and DC and contralaterally to the Pr (Fig. 3d, d' and supplementary material IIIId); (b) the *mid-caudal*

section, in which the axons project contralaterally, mainly ending at the FN. The latter section spans an extension of ~150–200 μ m in the anteroposterior axis and reveal the SVa along with the 4 V (Fig. 3e–e'). The array of axons and end-terminals can be visualized clearly in preparations sliced at 75° (Supplementary material IIIa–c). Finally, (3)

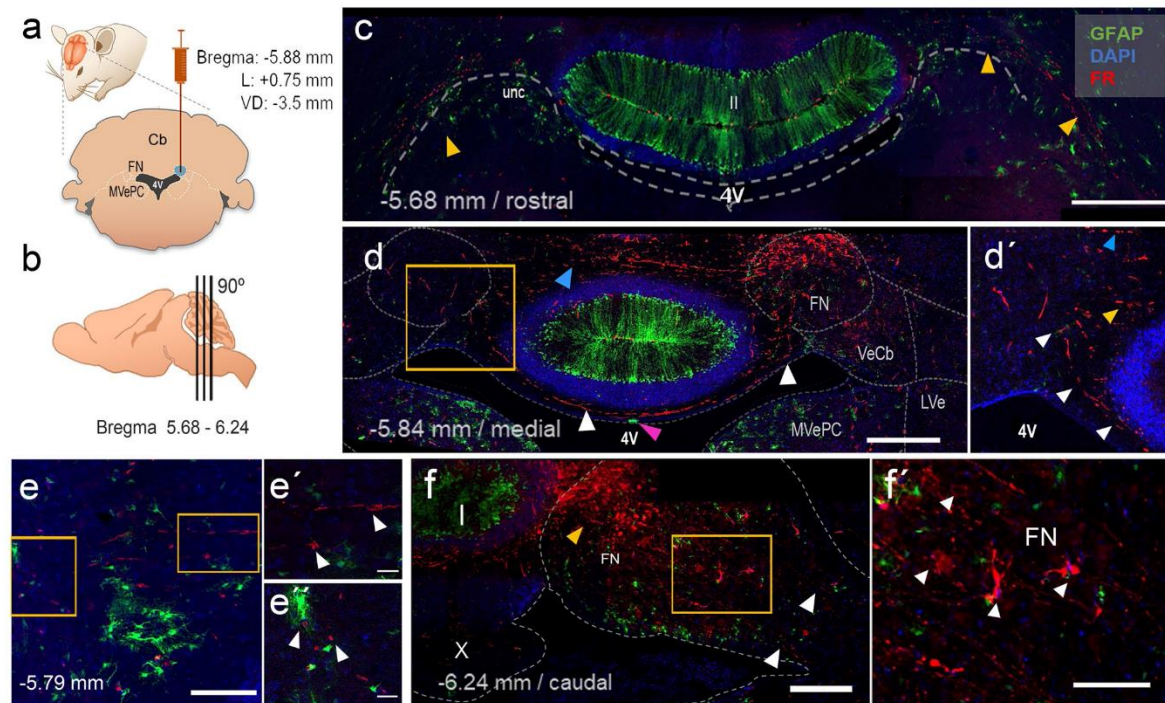


Fig. 3 Injection of FR in the FN shows contralateral projections. **a** FR was injected in the right FN. Injection coordinates indicated to the right, $n=12$. **b** Brain sagittal view indicating the anatomical coordinates from where images in c-f were taken. **c** A coronal section shows axons of the Unc that project toward the rostral section (yellow arrowheads) at the level of lobule II. **d** In this section the FR labeled the SVa (white arrowheads) that run along with the 4 V near the VMC (pink arrowhead); more axons of the FN run along with the white matter of lobule I (blue arrowhead). In both cases, the axons reach the contralateral FN (yellow square). **d'** In this area, the SVa arrive in the contralateral FN. The image shows a 100 μm z-plane reconstruction of an area of the FN indicated within a yellow

square in **d**. Here, the axon end terminals were found distributed in the three regions of the FN: medial (yellow arrowhead), dorsal (blue arrowhead) and ventral (SVa, white arrowheads). **e** An image of the contralateral FN taken 100 μm rostral from **d'**. The image shows varicosities (**e'**, white arrowheads) and punctate terminal axons (**e''**, arrowheads). **f** Injection site in the right FN (yellow arrowhead) and its ipsilateral descendent projections to the VeCb (white arrowheads). The yellow rectangle is magnified in **f'**, which highlights the FR labeled somas in the FN (white arrowheads). Scale bars; 500 μm (**c**), 200 μm (**d, f**), 100 μm (**e, f**), 50 μm (**f**), 20 μm (**e'-e''**). Blue staining (DAPI); green fluorescence, GFAP-GFP expression; red fluorescence, FR

the *caudal region*, -6.18 to -6.48 mm ± 50 μm from Bregma, includes the caudal section of lobule X. Here, the FN axons descend ipsilaterally to the LVe, VeCb and SpVe (Fig. 3f). Figure 3f' shows FR labeling of the neurons within the FN. FR tracing indicates that the SVa observed along the roof of the 4 V project from FN. This is also supported by slices obtained at 75° that show efferent fibers labeled with FR in the same restricted regions including the SVZ (Fig. 3d and Supplementary material IIIa-c).

Injection of BDA labeled terminal boutons at the contralateral FN

Injection of BDA into the right FN (Fig. 4a-e) and its detection with avidin-HRP revealed simple terminal boutons and rosette-like terminals at the medial and rostral regions of the contralateral FN (Fig. 4f-g, $n=6$). In addition, the SVa at

the roof of the 4 V were positively labeled by BDA, supporting the hypothesis that they project from the FN and form part of a direct interconnection between both FNs (Fig. 4h-i). Further labeling of terminal boutons was observed in regions known to be targeted by axon projections from the FN, including MVe, LVe, DC, icp, and FI (Fig. 4j-k).

FG⁺ somas identified in the contralateral FN

Coronal cerebellar sections from 7 mice injected with FG were examined under the fluorescence microscope to determine whether FG accumulated in neuron somas of the contralateral FN (Fig. 5a). The sample images show that FG labeled somas throughout the FN, but these were apparently more abundant in the caudal and medial regions (47 ± 17 , 31 ± 11 ; mean \pm SEM; Fig. 5b, c) compared to the

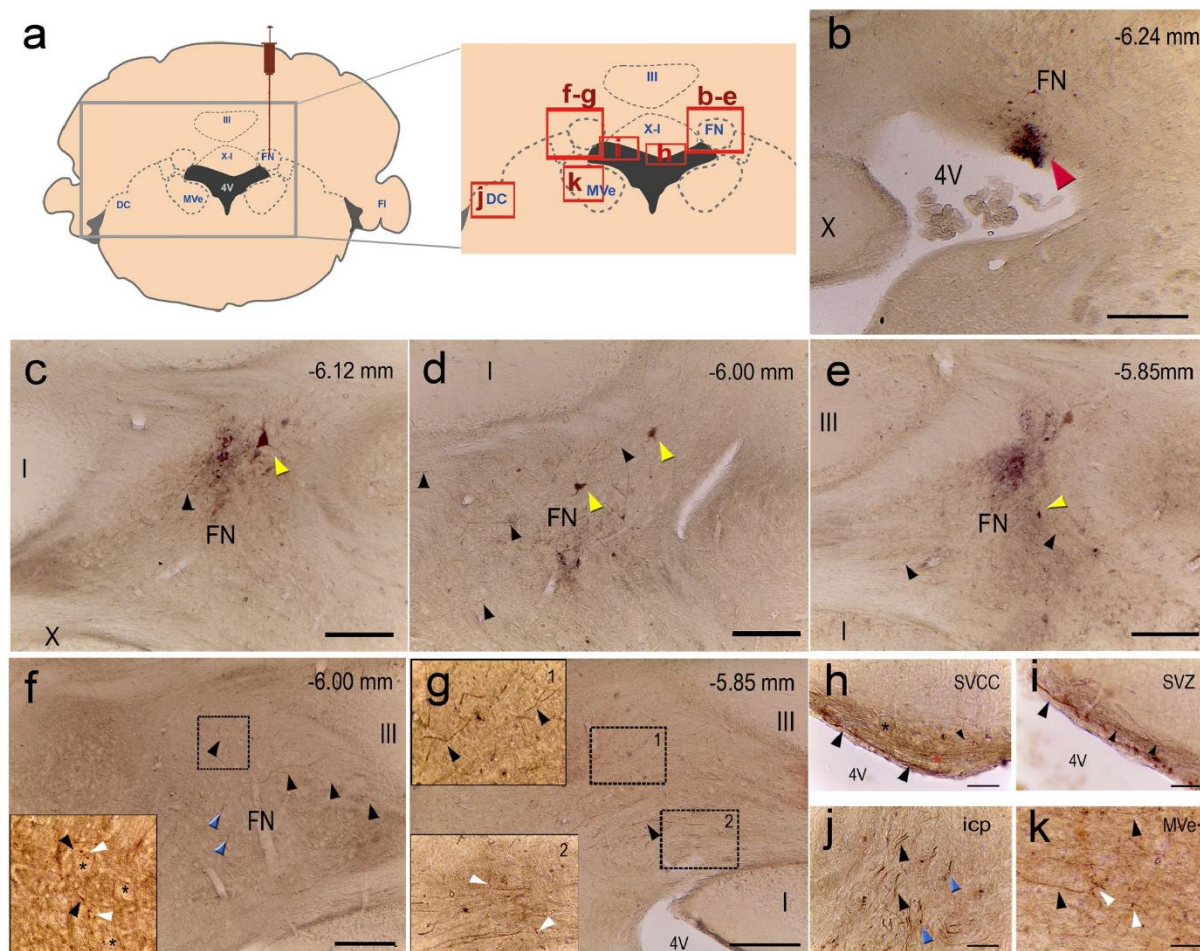


Fig. 4 Contralateral terminal boutons labeled with BDA. **a** Diagram of the BDA injection sites; the drawing to the right indicates the anatomical regions of the following images. **b** Injection site in the right FN, red arrowhead. **c–k** Representative coronal slices in the injection site of the FN. Cell somas (indicated as yellow arrowheads in **c–e**) and transversal axons (indicated as black arrowheads in **f–g**) from the injected site were observed in the three regions of the FN (caudal, medial and rostral, **c–e**). Axons run along with the white matter and project to the contralateral FN shown in **f–g**, where puncta (blue arrowheads) and rosette-like boutons (white

arrowheads) were identified in the medial and rostral sections. Somas are indicated with a black asterisk (**f** and **h**). **h** SVa were labeled with BDA, in this image are shown near the SVCC (black asterisk), an axon bundle is indicated with a red asterisk, **i** SVa along the roof of the 4 V (black arrowheads). **j–k** Labeled terminals along the icp and MVe, two sites of known bilateral fastigial projections, axons indicated with black arrowheads, axon endings indicated with white (rosette-like) and blue arrowheads (puncta). Bregma coordinates are indicated in each panel. Scale bars; 500 μ m (**b–g**), 50 μ m (**h–k**)

number of somas labeled in the rostral region (16 ± 6.9); nevertheless, an unpaired *t* test revealed no significant differences (*p* values: caudal vs. rostral, 0.80; medial vs. rostral, 0.85).

FG labeled somas were also observed along the brainstem in (1) the *rostral region*, within the MVePC and Pr (Fig. 5d); (2) the *medial region*, within the GiA, LVe, and ipsilateral SuVe, MVePC (Fig. 5e); (3) and the *caudal region*, mainly within the ipsilateral SpVe, LVe, x, DC, VCP, contralateral LPGi, and bilateral MVePC (Fig. 5f–g). For

these experiments, we only considered mice in which the FG injection site was concentrated at the FN. Nevertheless, in all cases, some FG diffused to the lateral part of lobule I.

Retrobeads labeling of the contralateral FN

Since FG could have been captured by fibers of passage abundant near the injection site, we used a second retrograde tracer, retrobeads or RB (Fig. 6a), which are known to be poorly taken by those fibers (Shofield 2008; Köbbert

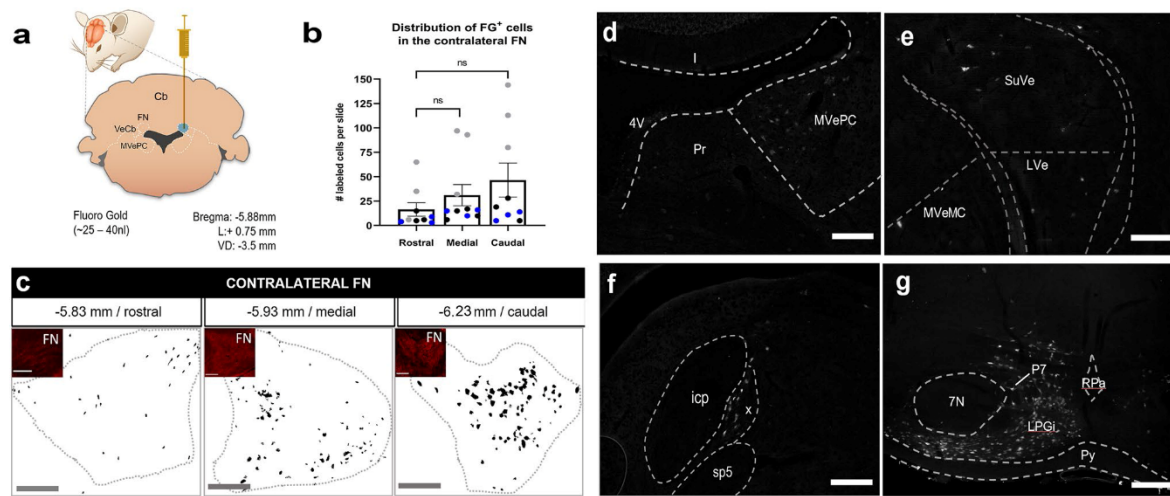


Fig. 5 Contralateral FN somas labeled after FG injection into the right FN. **a** Scheme of the FG injection site and the stereotactic coordinates, $n=7$. **b** Number of FG labeled cells in the three regions of the contralateral FN (rostral, medial and caudal). The plot shows the mean value \pm SEM, $n=3$, Kruskal–Wallis Test, Dunn’s multiple comparison Test, $*p<0.05$. Each dot color represents a mouse. **c** Representative segmented binary images from the three regions of the FN contralateral to the injection site, these images were used to determine the number of FG⁺ cells (stereotactic coordinates indicated on

top of the images). Notice the FG⁺ cells in the caudal region are clustered, in contrast with the dispersed distribution in the rostral region. The images in the insets show GAD 65–67 immunolabeling, used as a reference to delineate the FN. **d** FG labeled neurons were found in the rostral region of the Cb, in the contralateral MVePC; in the medial portion of the Cb bilaterally in the vestibular nuclei (**e**), and in the contralateral caudal region of the brainstem (**f**) and pons (**g**). Scale bars, 200 μ m

et al. 2000). The results show somas labeled with RB widely distributed in the contralateral FN ($n=4$, Fig. 6b–f). RB remained mostly in the injection site and was not detected in surrounding areas (Fig. 6c–f). To score the distribution of labeled cells, the FN was divided into the three regions previously described, which showed the following distribution: caudal region, 7 ± 0.8 cells; medial region, 7 ± 0.7 cells; and rostral, 5 ± 0.4 cells. RB⁺ cells are more abundant in the caudal and medial regions than in the rostral region ($n=9$; $*p<0.05$, p value = 0.41 and 0.28, respectively, Welch-ANOVA, Games-Howells multiple comparison test). No differences were found in the number of labeled cells between the caudal and medial region ($n=9$, p value = 0.86). Furthermore, RB somas were also observed in the SuVe, MVePC, LVe, IntA, and x nuclei. These observations were consistent with those obtained with FG.

Retrogradely labeled FG neurons of the FN are GAD 65–67⁺

Within the FN, diverse classes of neurons produce different neurotransmitters, glutamate, glycine, or GABA. Two groups of GABAergic neurons are known in the FN. The first projects to the inferior olive, whereas the second releases both GABA and glycine and remains within the FN, providing a powerful signal for neural integration (Uusisaari

and Knöpfel 2008, 2012; Canto et al. 2016). Because of the dual role of GABAergic neurons as projection neurons and interneurons, we were interested in exploring if they were labeled by FG. Thus, to determine the extent of GABAergic cells in the FN, an anti-GAD 65–67 antibody was used in coronal slices and was revealed with a secondary Ab coupled to Alexa 549–555 ($n=6$; Fig. 7a–c). Then, we overlapped the signals of GAD 65–67 (GABAergic cells) and FG⁺ (projections arriving from the contralateral FN) (Figs. 7a–c). We found immunofluorescence for GAD 65–67 in cells widely distributed throughout the FN ($n=6$, Figs. 7a–c). To score that a cell was GAD⁺ we considered only those in which the immunolabel was within the soma. Thus, the $88.4\% \pm 3.4$ of the somas labeled with FG were also positive for GAD 65–67, therefore most of the contralateral projections are GABAergic ($n=4$ $***p<0.0001$, unpaired t Test, Fig. 7d). The remaining $11.8\% \pm 3.4$ corresponds to a non-GABAergic population of projection neurons, that were negative to GAD signal. (Fig. 7a–c, blue arrowheads, and 7d).

As mentioned above, expression of GAD 65–67 was widely distributed throughout the FN and it was also found to be uniformly distributed in the three FN regions (rostral, medial and caudal; $n=4$, $p>0.05$, ANOVA-Tukey’s Fig. 6e). The proportion of FG-labeled neurons that were also positive for GAD 65–67 remained statistically similar among the three FN regions: $88.5 \pm 4.5\%$ in the caudal

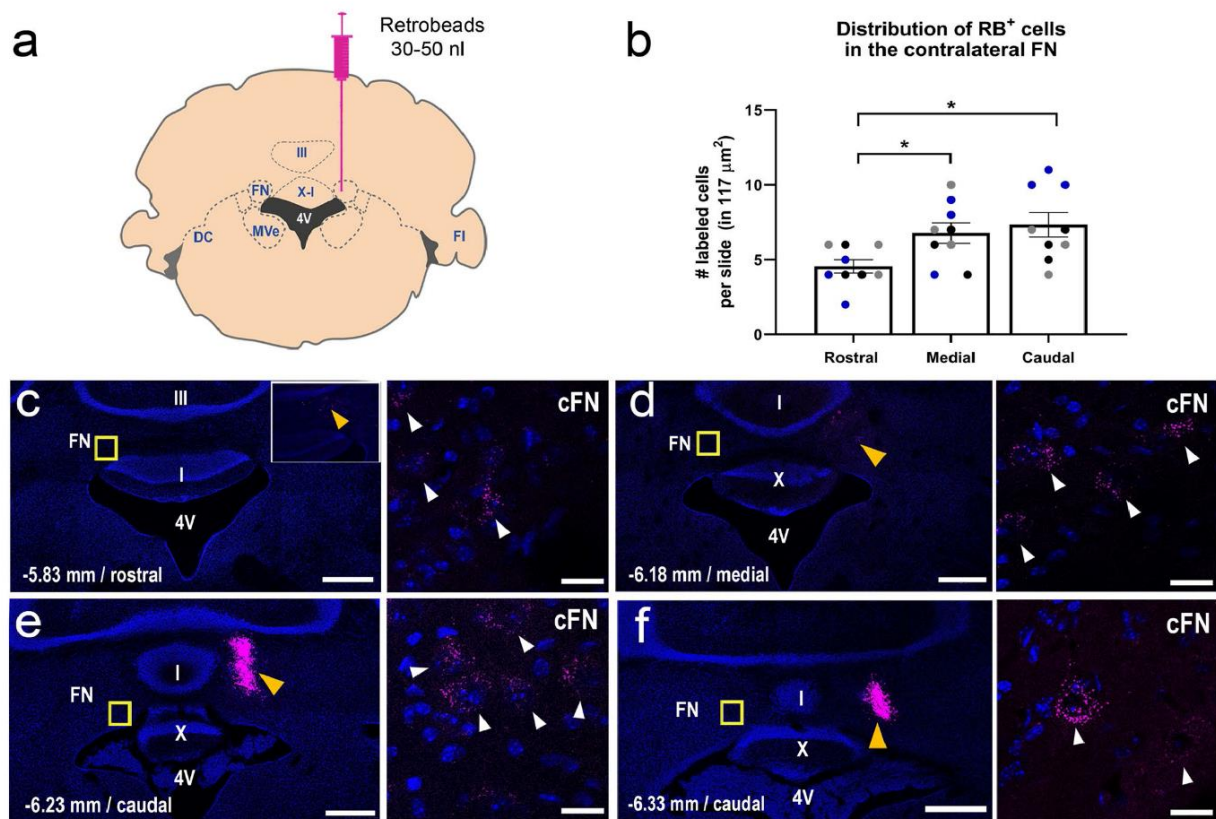


Fig. 6 Retrograde tracing with fluorescent beads identifies populations of neurons in the contralateral FN. **a** Retrobeads were injected in the FN of CD1 female mice, $n=4$. **b** The FN was divided into three regions, caudal, medial and rostral; and the number of RB⁺ cells per region of the contralateral FN was scored (see Methods for details). The plot shows the number of cells per slice (mean \pm SEM) from three mice, where each color dot represents a mouse. The number of labeled cells was higher in the caudal and medial regions (Welch-ANOVA test, Games-Howell's multiple comparison test, $*p < 0.05$). **c–f** Representative coronal section at the level of the cer-

ebellum. The large panels show the RB injection site spanning the three regions of the FN (yellow arrowheads); the inset in (e) confirms the RB dispersion to the rostral FN. The high-magnification lateral images belong to the contralateral FN (cFN), indicated by a yellow square in the main panel. It shows RB⁺ somas (white arrowheads) in each region of the contralateral FN. Bregma coordinates are shown in the lower left of each image. Blue signal, DAPI; pink signal, RB. Scale bar, 500 μ m (c–f, low-magnification images), 20 μ m (lateral panels). 4 V, fourth ventricle

region, $91.7 \pm 3.3\%$ in the medial region and $82.9 \pm 5.3\%$ in the rostral region (p values; caudal vs. medial 0.95, caudal vs. rostral 0.9, and medial vs. rostral 0.72) (Fig. 7e).

This result indicated that most of the neurons projecting to the contralateral FN are GABAergic but there is a small population of non-GABAergic projection neurons.

A set of neurons of the medial FN are Pax2⁺ and receive GABAergic input

Purkinje neurons are the main GABAergic input of the FN, and their terminals together with the perikarya of GABAergic cells (Ito 2006; Husson et al. 2014), have been labeled with the GAD 65–67 antibody used in this study. Thus, we used a complementary strategy to label GABAergic neurons

and determine their neurochemical identity. In this strategy, we used cerebella of the transgenic mouse line Pax2: GFP (Fig. 8a), which is known to direct the expression of the fluorescent protein in many, but not all, GABAergic neurons of the DCN in the adult (Maricich and Herrup 1999; Weisheit et al. 2006). This scattered GFP⁺ expression was observed in the soma of neurons within the FN, the SVa of the 4 V ($n=3$, Fig. 8b, c) and the white matter (Fig. 8d, e); confirming the GABAergic nature of those neuronal populations. In addition, we used a VGat antibody in the same Pax2: GFP cerebellar slices; VGat localizes in perikarya and synaptic vesicles of GABAergic and glycinergic neurons (Chaudhry et al. 1998). VGat signal was observed in the roof of the 4 V and around the soma of cells of the VMC (Fig. 8b). On the other hand, as shown in Fig. 8e, f, VGat labeling is within

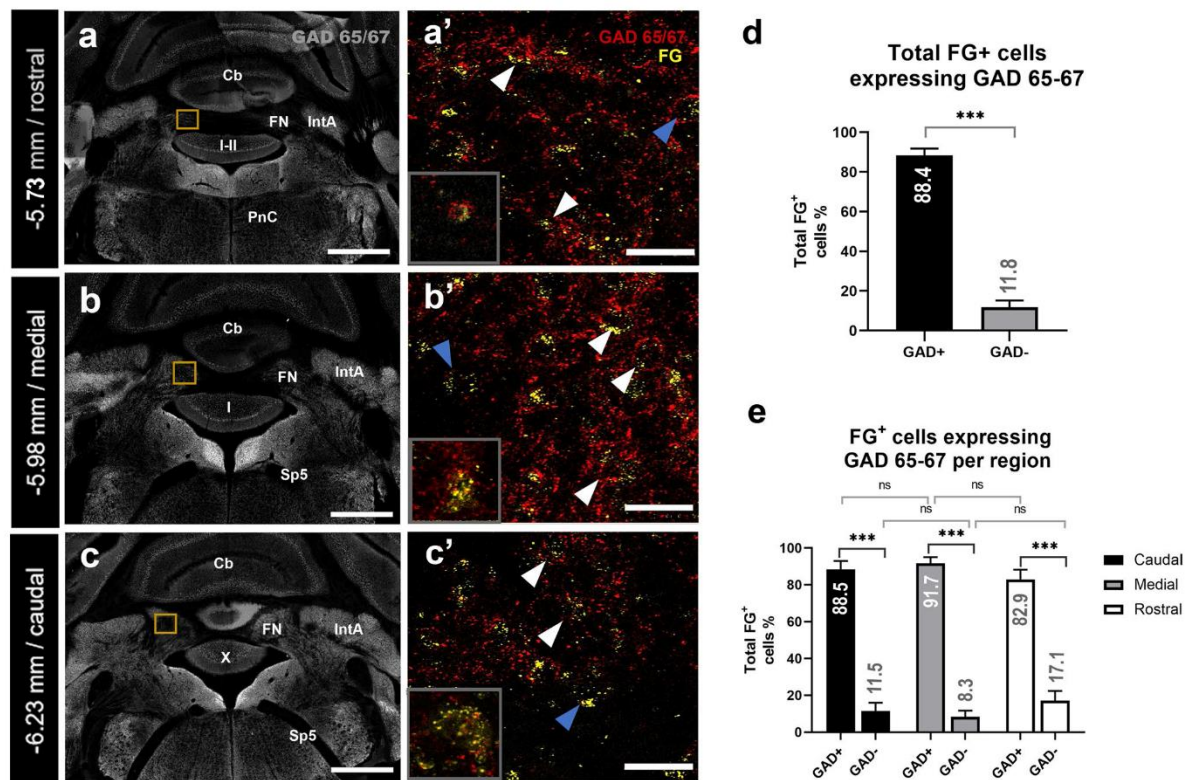


Fig. 7 GAD 65–67⁺ immunostaining of FG labeled neurons. Coronal sections at the level of the cerebellum to show FG⁺ cells within the rostral, medial and caudal regions of the FN ($n=6$). **a–c** Low-magnification images of brain slices labeled with a GAD 65–67 antibody. Yellow boxes are magnified in (**a'–c'**), where GAD 65–67 signal co-localized within the soma of FG⁺ cells (white arrowheads) in the three regions of the FN (rostral, medial, caudal). The FG⁺ cells that were negative for GAD 65–67 are indicated with blue arrowheads (**a'–c'**); notice that these show GAD label only in the cell periphery,

thus they were considered negative for GAD. The insets in **a'–c'** show samples of FG⁺/GAD⁺ in each region (white arrowheads). Here the GAD 65–67 labeling is within the cell soma, therefore considered positive for GAD. **d** Percentage of GAD 65–67 cells per FG⁺ cells in the FN. **e** In the three regions, the largest percentage of FG⁺ cells were GAD 65–67⁺ ($n=4$, Unpaired t test, $***p<0.005$). No differences were found in percentages of GAD⁺/FG⁺ cells among the three regions, ($n=4$, ANOVA-Tukey, $***p<0.005$, $\alpha 0.05$). Scale bars: 1 mm (**a–c**), 50 μm (**a'–c'**)

and surrounding the soma of a set of Pax2⁺ neurons of the FN, and remarkably, of neurons that extend their projection contralaterally. These observations strongly suggest that neurons of the FN that project to the contralateral nucleus are GABAergic and receive GABAergic input (due to the VGat⁺ signal around them, Fig. 8f–g).

Discussion

The Fastigial Nucleus is the origin of the SVa

The main question explored in this work concerns the anatomical origin of the SVa that cross the roof of the 4 V. In our previous studies using patch-clamp electrophysiology, we found that electrical responses in the SVZ of the cerebellum suggested the presence of neurons, which were

not previously documented in this area (Reyes-Haro et al. 2013). The presence of a population of neurons was confirmed when a combination of immunolabeling and TEM revealed the presence of local neurons as well as axon fibers (referred here as SVa) that cross the roof of the 4 V (González-González et al. 2017). Thus, the main finding presented here is that these SVa project from the FN, that they are mainly GABAergic and a fraction cross contralaterally, interconnecting the FNs.

The anatomical pathways from the FN have been explored since the nineteenth century (Russell 1895; Rasmussen et al. 1933). Many studies have described the fastigial efferent and afferent connections in several species using classical techniques such as silver impregnation, HRP tracing and axonal degeneration. FN projections are currently classified as rostral and caudal (Voogd 1967; Voogd et al. 1996; Voogd and Glickstein 1998; Carpenter 1959; Batton et al.

1977): (1) the rostral region, which gives rise to contralateral descending projections that form the Unc (Voogd 1967; Carpenter 1959; Batton et al. 1977; Noda et al. 1990; Siebold et al. 1997; Voogd et al. 2013) and ascending projections (the fastigiofugal tract) that reach the thalamus and superior colliculus (Angaut and Bowsher 1970; Batton et al. 1977; Bentivoglio and Kuypers, 1982; Homma et al. 1995; Katoh and Benedek 2003; Gao et al. 2018); (2) the caudal region, represented by the fastigiobulbar tract divides into ipsilateral descending projections that end in the vestibular nuclei (SuVe, LVe, MVe, SpVe) (Walberg et al. 1962; Voogd 1967; Omori et al. 1997), pontine reticular formation (Voogd 1964; Batton et al. 1977; Siebold et al. 1997) and x nucleus (Omori et al. 1997). In sum, the organization and physiology of the FN have been widely studied; however, information about the inter-projections reported in those studies is scarce and we now provide evidence that the FNs are interconnected.

The SVa that cross along the roof of the 4 V span 300–350 μm in the anteroposterior axis, between Bregma -5.83 and -6.18 mm. Voogd (1967; 2013) and Batton et al. (1977) found that the Unc crosses through the cerebellum and underneath the anterior medullary *velum*, to later cross over the brachium *conjunctivum* (named superior pedunculus; Brain Info 1991) and ends in the vestibular nucleus. This description is similar to what we have classified as the projections of the rostral (-5.63 to -5.83 mm ± 50 μm Bregma) and medial regions (-5.83 to -6.18 mm ± 50 μm , Bregma) of the FN (Fig. 2a-c, 3c-e, 4f, g, j, k; supplementary material III). There are two key differences in our description; first, we show that the fastigial SVa cross the 4 V along the SVZ (Fig. 3d-d', 4 h-i), and second, we describe the existence of a direct inter-fastigial connection (Fig. 3e, 4f-g, 5, 6). We did not find evidence to confirm that the SVa observed along the roof of the 4 V cross within the velum, considering that the velum is a thin sheet that in the adult stage remains only in the antero-posterior borders of the Cb, with a *supraependymal* positioning (Louvi et al. 2003). Furthermore, in our experience with the cerebellar whole mount preparation, when the velum is mechanically removed the SVZ remains, delimited by the ECL (González-González et al. 2017); hence the SVZ conforms a separate section from the vellum, forming a continuum with the white matter, and thus the SVa constitute a neuronal population separated from the classic description of the Unc.

A lead about the inter-fastigial bilateral afferents was provided in a study by Batton et al. (1977), in which radioisotope labeling suggested an *FN interconnection in non-human primates*. In that study they demonstrated that after injection of the right FN some labeling of the “fastigiospinal fibers at the left FN” was detected; unfortunately, the limited resolution of the autoradiographies used at that time did not allow the authors to conclude that the FNs are directly

connected. On the other hand, Voogd et al. (2013) showed that after unilateral injection of a retrograde neuronal tracer in the FN, label is found in three regions in the *contralateral FN*: rostral, ventrocaudal, and lateral protuberance. These regions partially match the three regions defined by FG and RB labeling in our study (Figs. 5, 6); our description, though, corresponds better in terms of FG distribution to that of Beitz and Chan-Palay (1979), who divided the FN into rostral, medial, and caudal regions based on the differential distribution of neuronal morphologies.

Other studies have examined the contralateral projections of the FN; Carpenter et al. (1959) and Noda et al. (1990) concluded that the axons cross through the contralateral FN and project to the SuVe and MVePC. That is to say, that the axons do not contact the neurons of the contralateral FN. Those studies were performed in *Rhesus* monkeys using either mechanical axon degeneration or WG-HRP as retrograde tracer. However, based on our observations with RB, FG, FR and BDA labeling and with the cerebella of Thy1: GCaMP-YFP transgenic mice sliced at 75° , we show direct anatomical interconnection along the three sections of the FN, particularly at the medial and caudal sections. The complex organization of this area, combined with the low resolution available at the time of the previous studies (Batton et al. 1977; Voogd et al. 2013; Glickstein et al. 2009), could have contributed to missing the direct connection of both FNs.

Modular organization of the FN interconnection and GABAergic identity

The regional organization of the FN according to the projections arriving from the contralateral nucleus (rostral, medial, and caudal; Figs. 4, 5, 6) show that they are organized in modules that suggest they are implicated in some cerebellar functions. Thus, the rostral FN is associated with spinocerebellar and vestibular functions, such as posture, neck holding, and gait (Yamada and Noda 1987; Büttner et al. 1991), whereas the caudal region is associated with oculomotor functions such as eye movement control (saccade, smooth pursuit) (Noda et al. 1990; Büttner et al. 1991; Robinson et al. 1993; Helmchen et al. 1994; Kheradmand and Zee 2011). Since the inter-fastigial projections were identified in the entire FN region in a dense fiber array, we speculate that they could be involved in both motor and non-motor associated functions, and could represent a relay pathway in the general fastigial circuitry. In recent years, non-conventional cerebellar functions have been conferred to fastigial-thalamic projections, such as blood pressure regulation (Zhang et al. 2016, reviewed; Benagiano et al. 2018), hypoxic conditioning (Xu et al. 2001; Golanov et al. 2017), and feeding control (Zhu et al. 2006). It remains to be determined how the interconnection

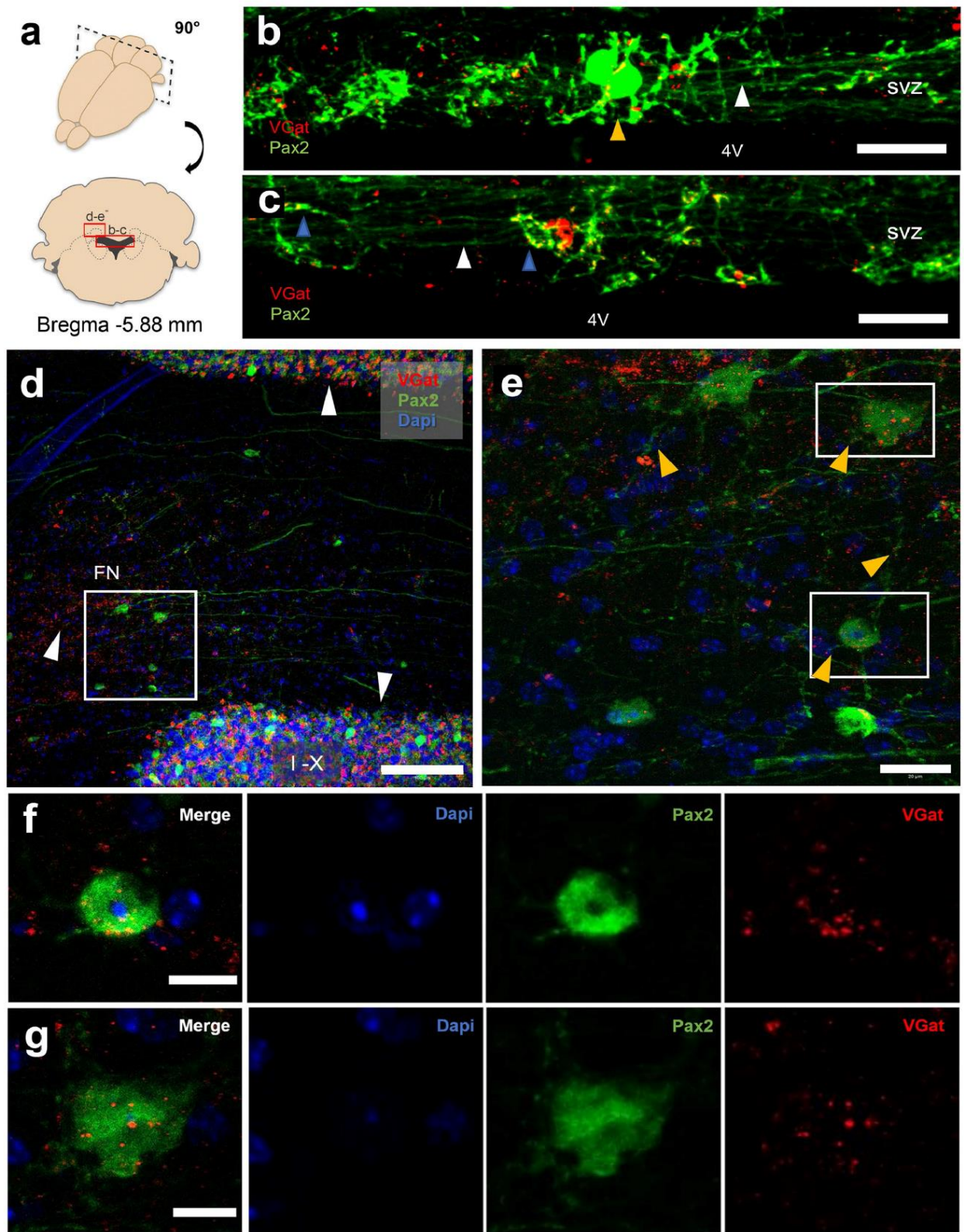


Fig. 8 The neurons from the medial FN are Pax2⁺ and receive GABAergic input. Sections of the cerebellum from a Pax2: GFP mouse immunolabeled for VGat. The SVa are Pax2⁺ neurons and therefore considered GABAergic. **a** Scheme of a coronal section of the mouse brain and stereotaxic coordinates. **b** Central region of the roof of the 4 V that shows the SVa Pax2-GFP⁺ (white arrowhead) immersed in the SVZ. The VGat signal (in red) was observed in cells of the VMC (yellow arrowhead). **c** Lateral region of the roof of the 4 V, the SVa are Pax2-GFP⁺ (white arrowhead); several cells of the SVZ are VGat⁺ (blue arrowheads). **d** Medial region of the FN, where Pax2: GFP⁺ neurons project their axons contralaterally along with the white matter (white box). VGat label is distributed in the FN and in the I-X cerebellar lobules (white arrowheads). The white square is magnified in **(e)** Pax2: GFP⁺ fastigial neurons and VGat label in red (yellow arrowheads). The VGat label is widespread, but intense around somas of some Pax2: GFP⁺ (white boxes), as shown in f-g. **f-g** Stack projections of two fastigial neurons. Merged images of the different color channels reveal the distribution of VGat in the soma (red). Cell nuclei stained with DAPI, $n=3$. Scale bar; 50 μm (b-c), 1000 μm (d), 20 μm (e), 10 μm (f-g)

of the FN and its modular organization contribute to these diverse functions.

Disclosure of the inter-fastigial connection immediately raised the question about the identity of the neurons that form part of this circuit. Within the FN, three principal groups of neurons have been found: glutamatergic, GABAergic and glycinergic (Robinson et al. 1993; Uusisaari and Knöpfel 2008, 2012; Uusisaari et al. 2007; Pedroarena and Kamphausen 2008), although the morphological and electrophysiological variability of neurons in the FN seems to be larger, as suggested in other studies (Beitz and Chan-Palay 1979; Canto et al. 2016). Fortunately, the Pax:GFP transgenic mouse line offered a straightforward approach to determine that SVa inter-fastigial projection neurons are GABAergic. Pax2 is related to GABAergic neuronal precursors in early postnatal life; however, in adult life, its expression remains in a set of neurons of the DCN and interneurons of the molecular and granular layers of the cerebellar cortex (Maricich and Herrup 1999; Weisheit et al. 2006; Larsson et al. 2017). The Pax2: GFP transgenic line allowed the observation of the SVa along the roof of the 4 V, and, along with our findings with the neuronal tracers (RB, FG, FR and BDA), implies their provenance from the FN. Finally, GAD 65–67 labeling confirmed the GABAergic identity of the contralateral projections of FG⁺ fastigial neurons (Fig. 7). Observations using an anti-VGat in Pax2: GFP mice also suggested that somas of the projection neurons of the FN (labeled by GFP) receive GABAergic input (labeled by VGat positive terminals surrounding the neuron soma) (Fig. 8e, f). VGat signal was also detected in a group of local neurons of the SVZ of the roof of the 4 V (Fig. 8c, blue arrowheads); these may well correspond to the A4 group of neurons described by Grzanna and Molliver (1979) which are indeed a population separated from the transversal SVa

(Fig. 1c, d). Although most of the projection neurons seem to be mostly GABAergic (about 88%), the rest may well be glutamatergic, since this is the second most abundant neurotransmitter in the FN (Uusisaari and Knöpfel 2007).

Conclusions

The contribution of the present study is synthesized in two key findings: (1) The myelinated SVa that cross the roof of the 4 V originate in the FN and are GABAergic, and (2) the SVa form an inter-fastigial pathway.

The SVa found running contralaterally along the roof of the 4 V add to the complexity of this region. In this study, we focused on determining the origin of the myelinated SVa, which resulted in tracing their origin to the FN. We found a direct inter-fastigial connection primarily composed of GABAergic projections from the medial-caudal region of this nucleus; furthermore, the fastigial axons project to three different regions in the contralateral FN. These regions resemble the functional anatomical divisions provided in other studies. However, functional experiments are required to decipher the role of the inter-fastigial connection and the mechanisms that underlie the regional division of the FN.

Acknowledgements This project was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (A1S7659) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA) (IN204520) to AMT. GBGG is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and was supported by CONACyT fellowship 277694. For the kindly donation of mice and materials, we thank Dr. Annalisa Buffo (NICO Institute-Italy), M. Condés-Lara and G. Rojas Piloni (Instituto de Neurobiología-INB, UNAM, Mexico), and H. Kettenmann (MDC-Berlin). We thank Dr. D. Escalante (IFC-UNAM) and R. Arellano (INB-UNAM) for suggestions and feedback. We thank the INB-Core Facilities for their technical support: unit of Microscopy (L. Palma-Tirado, E. N. Hernández-Ríos), and animal facility (A. Castilla-Leon, M. García-Servín, M.A. Carabajo). We also appreciate the technical backing of G. Martínez-Lorenzana, R. Olivares-Moreno and A.E. Espino Saldaña; the input and manuscript editing by M.A. González-González; and the English grammar editing by Dr. M. C. Jeziorski and J. G. Norris.

Author contributions GBGG conducted the experiments. AMT and GBGG designed the work, analyzed data, and wrote the paper.

Funding Funding provided to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (MX): 277694; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México: IN204520; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (MX): A1S7659.

Data availability All raw data are available on demand.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All experiments were designed to prevent animal suffering and discomfort at any moment. The animal protocol (INEU/SA/CB089) was approved by the Institutional Bioethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, in accordance with national (NOM-062-ZOO-1999) and international guidelines (National Institutes of Health, USA).

References

- Akerboom J, Calderón NC, Tian L, Wabnig S, Prigge M, Toló J et al (2013) Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci* 6:1–29
- Alvarez-Morujó AJ, Toranzo D, Blazquez JL, Pelaez B, Sanchez A, Pastor FE et al (1992) The ependymal surface of the fourth ventricle of the rat: a combined scanning and transmission electron microscopic study. *Histol Histopathol* 7:259–266
- Angaut P, Bowspher D (1970) Ascending projections of the medial cerebellar (fastigial) nucleus: an experimental study in the cat. *Brain Res* 24:49–68
- Batton RR, Jayaraman A, Ruggiero D, Carpenter MB (1977) Fastigial efferent projections in the monkey: an autoradiographic study. *J Comp Neurol* 174:281–305
- Becerra-González M, Varman Durairaj R, Ostos Valverde A, Gualda EJ, Loza-Alvarez P et al (2020) Response to hypoxic preconditioning of glial cells from the roof of the fourth ventricle. *Neuroscience* 439:211–229
- Beitz AJ, Chan-Palay V (1979) A Golgi analysis of neuronal organization in the medial cerebellar nucleus of the rat. *Neuroscience* 4:47–63
- Benagiano V, Rizzi A, Lorusso L, Flace P, Saccia M, Cagiano R et al (2018) The functional anatomy of the cerebrocerebellar circuit: a review and new concepts. *J Comp Neurol* 526:769–989
- Bentivoglio M, Kuypers HG (1982) Divergent axon collaterals from rat cerebellar nuclei to diencephalon, mesencephalon, medulla oblongata and cervical cord. A fluorescent double retrograde labeling study. *Exp Brain Res* 46:339–356
- Berry M, Ibrahim M, Carlile J, Ruge F, Duncan A, Butt AM (1995) Axon-glial relationships in the anterior medullary velum of the adult rat. *J Neurocytol* 24:965–983
- Berry M, Hunter AS, Duncan A, Lordan J, Kirvell S, Tsang WL et al (1998) Axon-glial relations during regeneration of axons in the adult rat anterior medullary velum. *J Neurocytol* 27:915–937
- Brain Info (1991) National Primate Research Center, University of Washington. <http://www.braininfo.org>. (Accessed Aug 2019)
- Brocklehurst G (1969) The development of the human cerebrospinal fluid pathway with particular reference to the roof of the fourth ventricle. *J Anat* 105:467–475
- Büttner U, Fuchs AF, Markert-Schwab G, Buckmaster P (1991) Fastigial nucleus activity in the alert monkey during slow eye and head movements. *J Neurophysiol* 65:1360–1371
- Canto CB, Witter L, De Zeeuw CI (2016) Whole-cell properties of cerebellar nuclei neurons in vivo. *PLoS ONE* 11:1–19
- Carpenter MB (1959) Lesions of the fastigial nuclei in the rhesus monkey. *Am J Anat* 104:1–33
- Catapano LA, Magavi SSP, Macklis JD (2002) Neuroanatomical tracing of neuronal projections with fluoro-gold. In: Sanberg PR, Sanchez-Ramos JR (eds) *Methods mol biol neural stem cells methods and protocols*. Humana Press Inc., Totowa
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH et al (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18:9733–9750
- Falcão AM, Marques F, Novais A, Sousa N, Ja P, Sousa JC (2012) The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Front Cell Neurosci* 6:34
- Gao Z, Davis C, Thomas AM, Economo MN, Abrego AM, Svoboda K et al (2018) A cortico-cerebellar loop for motor planning. *Nature* 563:113–116
- Glickstein M, Strata P, Voogd J (2009) Cerebellum: history. *Neuroscience* 162(3):549–559
- Golanov EV, Regnier-Golanov AS, Britz GW (2017) Integrity of cerebellar fastigial nucleus intrinsic neurons is critical for the global ischemic preconditioning. *Brain Sci* 7:10
- González-González MA, Gómez-González GB, González-Becerra M, Martínez-Torres A (2017) Identification of novel cellular clusters define a specialized area in the cerebellar periventricular zone. *Sci Rep* 7:40768
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neu Res* 68:138–149
- Grzanna R, Moliver ME (1979) The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5:21–40
- Helmchen C, Straube A, Büttner U (1994) Saccade-related activity in the fastigial oculomotor region of the macaque monkey during spontaneous eye movements in light and darkness. *Exp Brain Res* 98:474–482
- Homma Y, Nonaka S, Matsuyama K, Mori S (1995) Fastigial projection to the brainstem nuclei in the cat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci Res* 23:89–102
- Husson Z, Rousseau CV, Broll I, Zeilhofer HU, Dieudonné S (2014) Differential GABAergic and glycinergic inputs of inhibitory interneurons and Purkinje cells to principal cells of the cerebellar nuclei. *J Neurosci* 34:9418–9431
- Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78:272–303
- Ito M (2012) *The Cerebellum: brain for an Implicit Self*. Pearson Education Inc, New Jersey
- Katoh YY, Benedek G (2003) Cerebellar fastigial neurons send bifurcating axons to both the left and right superior colliculus in cats. *Brain Res* 25:246–249
- Katz LC, Burkhalter A, Dreyer WJ (1984) Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature* 310:498–500
- Kheradmand A, Zee DS (2011) Cerebellum and ocular motor control. *Front Neurol* 1(2):53
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327–351
- Koziol LF, Budding D, Andreasen N, D'Arrigo S, Bulgheroni S, Imamizu H et al (2014) Consensus paper: The cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum* 13:151–177
- Larsson M (2017) Pax2 is persistently expressed by GABAergic neurons throughout the adult rat dorsal horn. *Neurosci Lett* 638:96–101
- Louvi A, Alexandre P, Métin C, Wurst W, Wassef M (2003) The isthmus neuroepithelium is essential for cerebellar midline fusion. *Development* 130:5319–5330
- Maricich SM, Herrup K (1999) Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol* 41:281–294
- Noda H, Sugita S, Ikeda Y (1990) Afferent and efferent connections of the oculomotor region of the fastigial nucleus in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 302:330–348
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33:72–86

- Oberdick J, Sillitoe RV (2011) Cerebellar zones: history, development, and function. *Cerebellum* 10:301–306
- Omori O, Umetani T, Sugioka K (1997) Projections from the subdivisions of the fastigial nucleus to the vestibular complex and the prepositus hypoglossal nucleus in the albino rat: an anterograde tracing study using biocytin. *Kobe J Med Sci* 43(1):37–54
- Pedroarena KM, Kamphausen S (2008) Glycinergic synaptic currents in the deep cerebellar nuclei. *Neuropharmacology* 54:784–795
- Porrero C, Rubio-Garrido P, Avendaño C, Clascá F (2010) Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res* 1345:59–72
- Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25(11):1463–1465
- Rasmussen A (1933) Origin and course of the fasciculus uncinatus (Russell) in the cat, with observations on other fiber tracts arising from the cerebellar nuclei. *J Comp Neurol* 57:165–197
- Reyes-Haro D, González-González MA, Pêtriz A, Rosas-Arellano A, Kettenmann H, Mileđi R et al (2013) γ -Aminobutyric acid- ρ expression in ependymal glial cells of the mouse cerebellum. *J Neurosci Res* 91:527–534
- Robinson FR, Straube A, Fuchs AF (1993) Role of the caudal fastigial nucleus in saccade generation. II. Effects of muscimol inactivation. *J Neurophysiol* 70:1741–1758
- Russell JSR, Horsley VAH (1895) XIV. Degenerations consequent on experimental lesions of the cerebellum. *Phil Trans R Soc Lond B* 186:633–660. <https://doi.org/10.1098/rstb.1895.0014>
- Schmued LC, Heimer L (1990) Ionophoretic injection of fluoro-gold and other fluorescent tracers. *J Histochem Cytochem* 38:721–723
- Schofield BR (2008) Retrograde axonal tracing with fluorescent markers. *Curr Protoc Neurosci* 17:1–24. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0117s43>
- Siebold C, Glonti L, Glasauer S, Büttner U (1997) Rostral fastigial nucleus activity in the alert monkey during three-dimensional passive head movements. *J Neurophysiol* 77:1432–1446
- Uusisaari M, Knöpfel T (2008) GABAergic synaptic communication in the GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* 156:537–549. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.060>
- Uusisaari M, Knöpfel T (2012) Diversity of neuronal elements and circuitry in the cerebellar nuclei. *Cerebellum* 11:420–421
- Uusisaari M, Obata K, Knöpfel T (2007) Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 97(1):901–911
- Vercelli A, Repici M, Garbossa D, Grimaldi A (2000) Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull* 51(1):11–28
- Voogd J (1964) The cerebellum of the cat: Structure and fiber connections. Thesis, Leiden. Assen: van Gorcum.
- Voogd J (1967) Comparative aspects of the structure and fiber connections of the mammalian cerebellum. In: Fox CA, Snider RS, Leiden S (eds) *Progress in Brain Research: Cerebellum*. Elsevier, The Netherlands
- Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370–375
- Voogd J, Jaarsma D, Marani E (1996) The Cerebellum chemoarchitecture and anatomy. In: Björklund A, Hökfelt T (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy*. Elsevier, The Netherlands
- Voogd J, Shinoda Y, Ruijgrok TJH, Sugihara I (2013) Cerebellar nuclei and the inferior olivary nuclei: organization and connections. In: Manto M, Schmähmann JD, Rossi F, Gruol DL, Koibuchi N (eds) *Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders*. Springer, Dordrecht, pp 419–421
- Walberg F, Pompeiano O, Westrum JE, Hauglie-Hanssen E (1962) Fastigioreticular fibers in the cat. An experimental study with silver methods. *J Comp Neurol* 119:187–199
- Weisheit G, Gliem M, Endl E, Pfeffer PL, Busslinger M, Schilling K (2006) Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci* 24:466–478
- Xu FD, Zhang Z, Frazier DT (2001) Microinjection of acetazolamide into the fastigial nucleus augments respiratory output in the rat. *J Appl Physiol* 91:2342–2350
- Yamada J, Noda H (1987) Afferent and efferent connections of the oculomotor cerebellar vermis in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 265:224–241
- Zhang XY, Wang JJ, Zhu JN (2016) Cerebellar fastigial nucleus: from anatomic construction to physiological functions. *Cerebell Ataxias* 3:9
- Zhu JN, Yung WH, Kwok-Chong Chow B, Chan YS, Wang JJ (2006) The cerebellar hypothalamic circuits: potential pathways underlying cerebellar involvement in somatic-visceral integration. *Brain Res Rev* 52:93–106

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Material

I. Brain slices at 75° of the Thy1: GCaMP-YFP mouse.

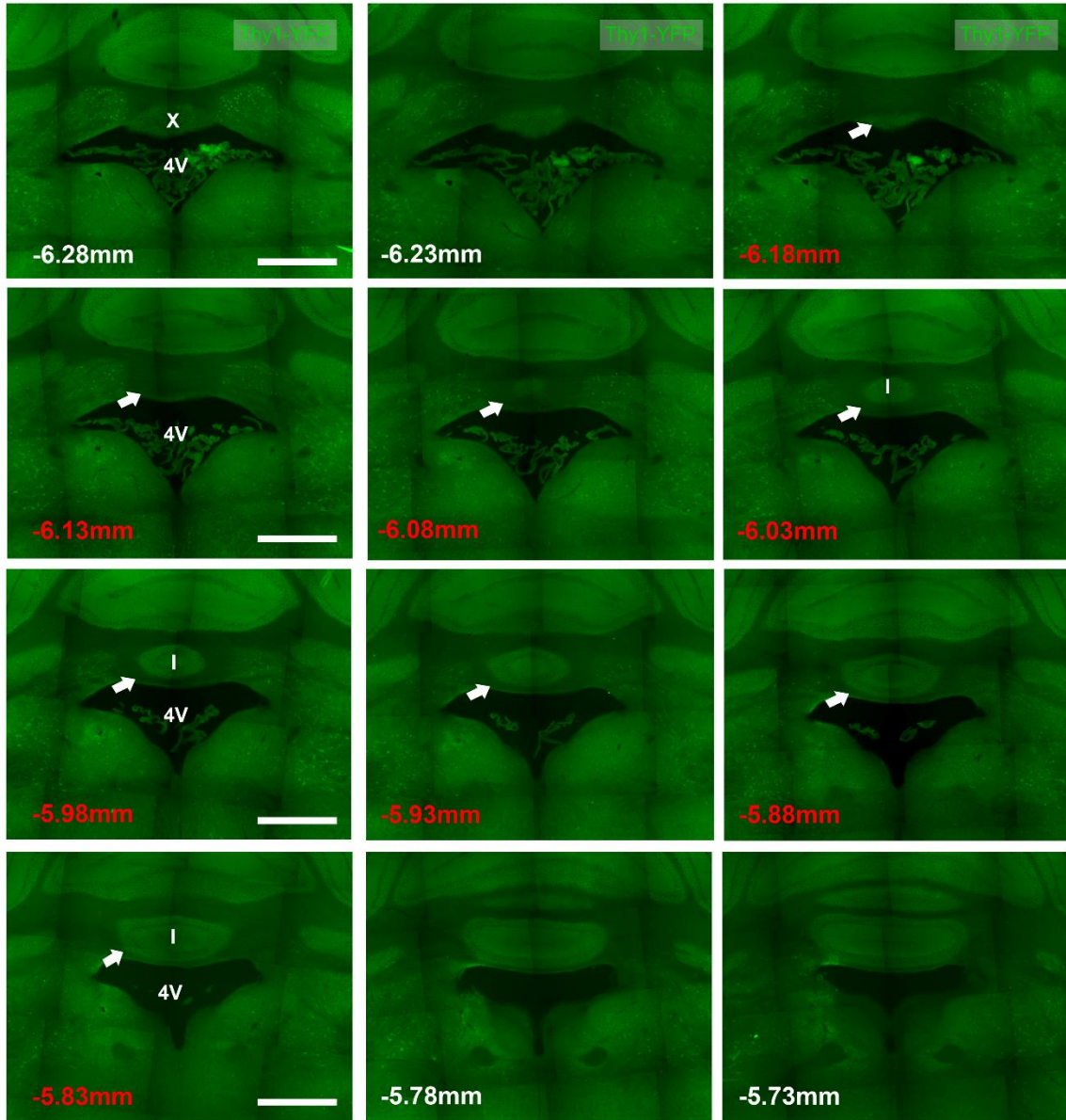
Serial coronal sections (50 μm thick) that include the cerebellum. The SVa along the roof of the 4V are indicated with a white arrow. Stereotactic coordinates where the SVa are shown in red (from Bregma -6.18 to -5.83 mm, $\pm 50\mu\text{m}$). Scale bars, 1mm.

II. Brain slices at 45° of the Thy1: GCaMP-YFP mouse.

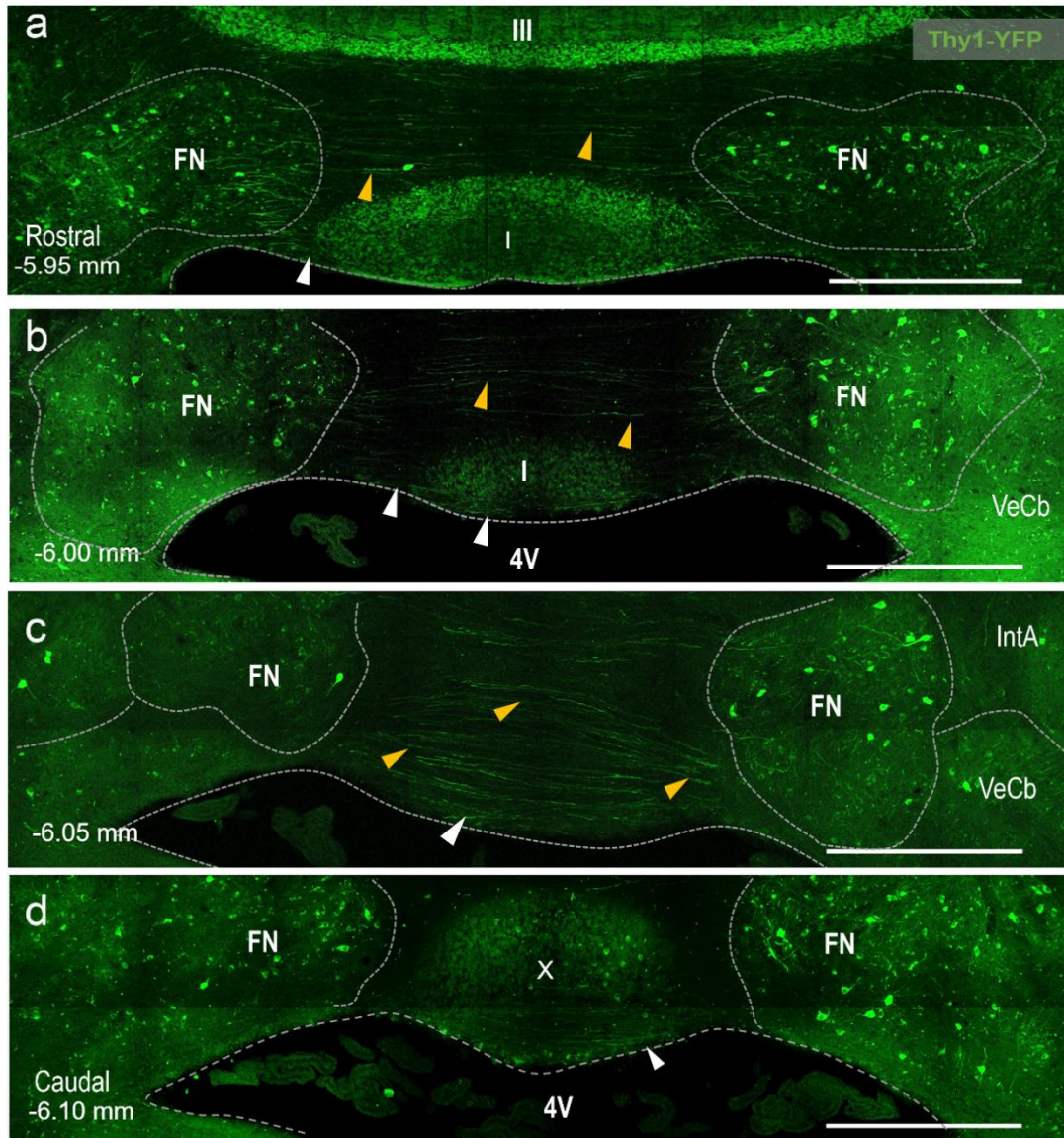
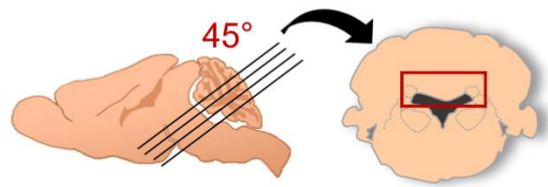
Serial coronal sections (50 μm thick) of the cerebellum. Dorsal fastigial projections are indicated with yellow arrowheads and SVa with white arrowheads. Stereotactic coordinate is shown in each slide (n= 2); see the methods section for details. **a**); At the most rostral section, the dorsal projections are evident, few SVa are observed at the roof of the 4V. **b**); Shows increased amount of SVa along the 4V and in the dorsal region. **c**); Shows SVa at the roof of the ventricle in continuum with the medial and dorsal region of the white matter. This preparation however does not permit us to follow the end terminals of the SVa as observed in Fig. 2. Finally, in **d**), at the level of lobule X only a few SVa are observed.

III. Projections of the medial FN labeled with FR in coronal sections sliced at 75°.

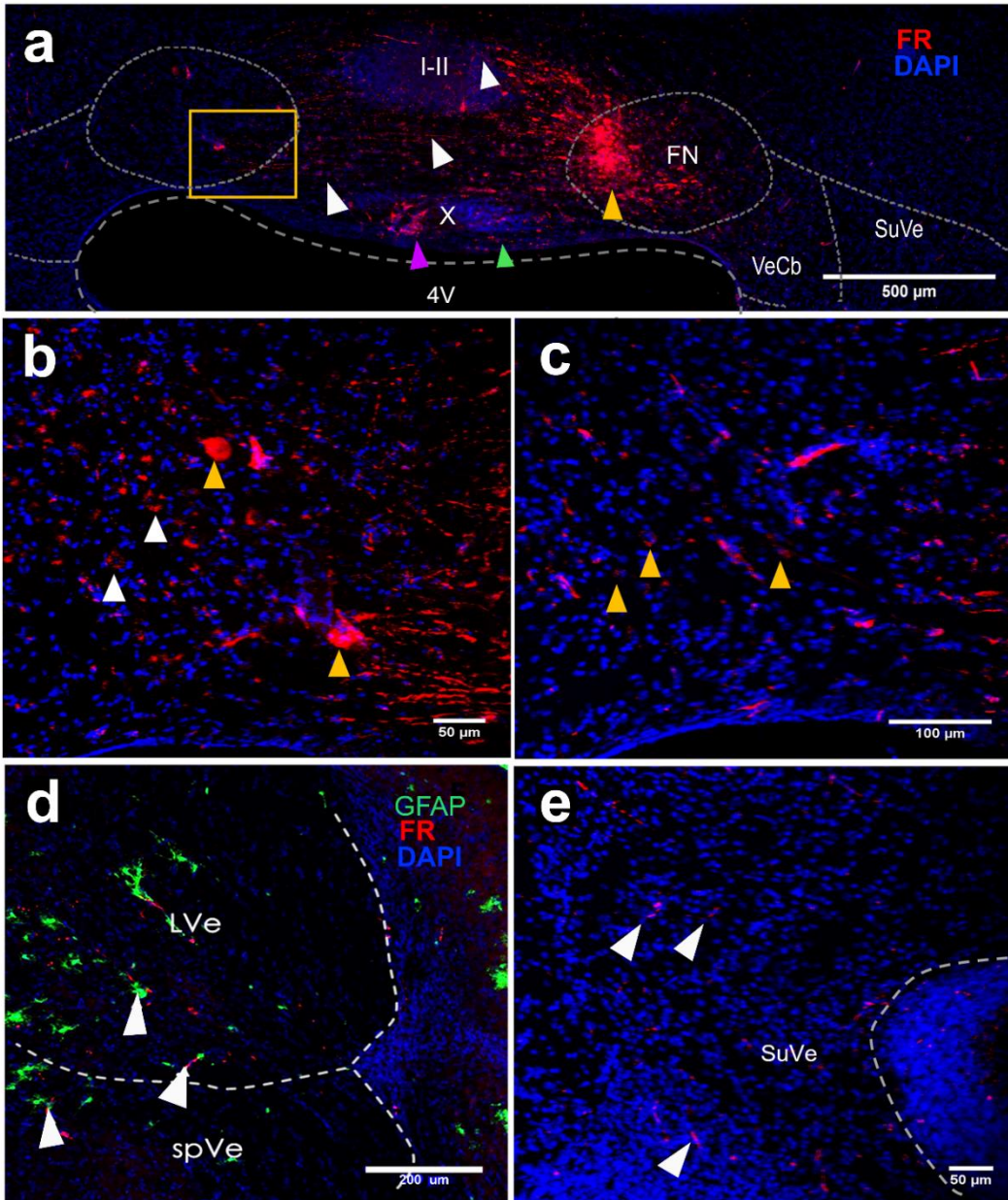
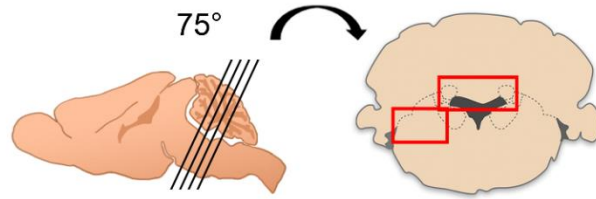
a); A coronal section of the Cb at the rostral section of lobule X (Bregma \sim -6.18mm) shows the injection site within the FN (yellow arrowhead) and its projections to the contralateral FN (white arrowheads). The SVa along the roof of the 4V are indicated by a green arrowhead. Labeled pericytes are indicated with the pink arrowhead. **b**); amplification of the contralateral FN area (yellow square) indicated in a), where FR-labeled end terminals (white arrowheads) and FR-labeled somas (yellow arrowhead) are present. **c**) The continuous slice from a) shows the end terminals labeled by FR in the contralateral FN (yellow arrowhead). **d**); Slices taken from a GFAP-eGFP transgenic mouse to show the regions of the pons (white arrowheads in LVe and spVe) labeled after injection of FR in the FN. **e**); FR terminals in the SuVe of the pons (white arrowheads). n= 6, DAPI in blue.



Supplementary I



Supplementary II



Supplementary III