



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CONTRIBUCIÓN DE LA CORTEZA PREMOTORA Y MOTORA A LA EJECUCIÓN DE UNA
SECUENCIA DE ACCIONES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ASAI SÁNCHEZ FUENTES

DIRECTOR DE TESIS

DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. RANIER GUTIÉRREZ MENDOZA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. HUGO MERCHANT NANCY
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

C.D.M.X. ABRIL 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.

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	9
¿Qué es una secuencia de acciones y por qué es importante su estudio?	9
Estudios previos de la contribución estriatal a la generación de secuencias de acciones.....	11
Estudios previos de la contribución cortical a la generación de secuencias de acciones	12
Pregunta de investigación	14
Hipótesis:	14
Objetivo General:	15
METODOLOGÍA	15
Animales.....	15
Entrenamiento conductual	16
Registro electrofisiológico extracelular unitario y fotoidentificación antidrómica	19
Re-escalamiento de la actividad neuronal	20
Análisis de los registros electrofisiológicos in vivo	21
Análisis ROC (receiving operating characteristic curve) con permutaciones.....	22
Expresión de opsinas e implante de fibras ópticas en el estriado lateral	23
Inyecciones de Retrobeads como trazador retrogrado	23
Inyecciones de Cre recombinasa de forma retrograda (Retro-Cre).	23
Micro-estimulación cortical de la región del brazo anterior en la corteza motora primaria	24
Inhibiciones optogenéticas estriatales in vivo.....	24
Análisis de la conducta durante las inhibiciones optogenéticas	26
Cuantificación de las fibras cortico-estriatales.....	26
Inhibición de las terminales cortico-estriatales en la fase temprana del aprendizaje	27
Registro de célula entera en la configuración de fijación de voltaje/corriente.	27
Diseño experimental y análisis estadístico.....	28
RESULTADOS	29
Los ratones aprenden a realizar secuencias de acciones.....	30
Modulación de la actividad en neuronas de la corteza premotora y motora durante la ejecución de secuencias de acciones.....	35
Tanto M2 como M1 contienen unidades que codifican la longitud de las secuencias de acciones.	40
La inhibición de las neuronas del estriado lateral antes de iniciar una secuencia de acciones afecta su ejecución.	46

La inhibición de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora y motora, antes de iniciar una secuencia de acciones, retrasa la iniciación, pero solo las proyecciones de la corteza premotora afectan la ejecución.	49
La inhibición de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora durante la ejecución disminuyeron las subsecuencias largas	55
La inhibición de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora en el momento de la transición aumentan el tiempo de transición entre subsecuencias	57
Las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora son requeridas al inicio del aprendizaje para ejecutar adecuadamente secuencias de acciones autoiniciadas	60
Las proyecciones premotoras cortico-estriatales inervan con mayor fuerza sináptica las neuronas estriatales de la vía directa que las neuronas estriatales de la vía indirecta	62
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	73
REFERENCIAS	75
Tabla Complementaria 1	82

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor y su director de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación citaré:

A mis padres por todo su amor y por darme el privilegio de cursar estudios universitarios. A mis hermanos y a toda mi familia por ser la mejor compañía, así como por todo el apoyo. También doy gracias a mi novia Lupita por estar conmigo y ser una gran compañera de viaje y de vida.

Este trabajo fue asesorado por el Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar al cual quiero agradecer su guía, disponibilidad, amabilidad y en general por darme la oportunidad de explorar y desarrollar mi curiosidad académica durante el doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quiero agradecer por el financiamiento de este trabajo a través de la beca de doctorado 597738.

Al Dr. Hugo Merchant Nancy y al Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza por su apoyo y sugerencias que siempre hicieron crecer académicamente este trabajo, así como por el interés que siempre mostraron en todas las evaluaciones semestrales.

A mis sinodales, el Dr. Gerardo Rojas Piloni, Dr. Pavel Rueda Orozco, Dr. Francisco Sotres y Dr. Luis Téllez por sus sugerencias y comentarios porque gracias a ellos mejoro bastante el escrito de la presente tesis doctoral.

Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio del Dr. Fatuel por toda la retroalimentación que recibí durante el desarrollo de este trabajo y por los buenos momentos que hemos compartido, en especial al Dr. Josué Jarquín, Mtro. Anil Kumar, Dr. Edgar Díaz, Lic. Héctor Alatraste y Mtra. Kathia Ramírez.

Agradezco también a la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo para organizar las reuniones semestrales para las evaluaciones tutorales así como también en su apoyo técnico en el laboratorio.

Agradezco también a la unidad de imagenología por su apoyo y asesoría en la obtención de imágenes de microscopia confocal y de epifluorescencia que se presentan en este trabajo. En especial a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés y a la Dra. Ruth Rincón Heredia.

Este estudio contó con el apoyo de la beca Ciencia Básica CONACyT 220412, Fronteras de la Ciencia CONACyT beca 2022 y 154039, las donaciones DGAPA-PAPIIT-UNAM IA200815, IN226517 e IN203420 y la Catedra Marcos Moshinsky 2019 a FT.

RESUMEN

La actividad estriatal es necesaria para iniciar y ejecutar secuencias de acciones y una de las principales entradas de excitación al estriado proviene de la corteza. Si bien se plantea la hipótesis de que las proyecciones cortico-estriatales motoras y premotoras son importantes para guiar la actividad estriatal durante la ejecución de acciones en serie, las limitaciones técnicas han dificultado la evaluación de esta premisa (Kawai et al., 2015; Rothwell et al., 2015). Para abordar esta hipótesis, en este trabajo de tesis, implementamos una tarea en ratones que permite el estudio de diferentes momentos en la ejecución de dos subsecuencias de acciones. Utilizando esta tarea, realizamos registros electrofisiológicos en la corteza premotora (M2) y motora (M1) y realizamos inhibiciones optogenéticas de sus proyecciones cortico-estriatales en diferentes momentos de la ejecución de estas secuencias de acciones en una etapa temprana y tardía del aprendizaje. Mostramos que, si bien en la etapa temprana del aprendizaje, las terminales de la corteza M2 en el estriado son requeridas para aprender una secuencia de acciones; mientras que, durante la etapa tardía del aprendizaje tanto M2 como M1 contienen actividad relacionada con la ejecución, solo las proyecciones premotoras cortico-estriatales contribuyen a la correcta ejecución / estructuración de las secuencias de acciones.

ABSTRACT

Striatal activity is necessary to initiate and execute sequences of actions. The main excitatory input to the striatum comes from the cortex. While it is hypothesized that the motor and premotor cortico-striatal projections are important to guide the striatal activity during the execution of sequences of actions, technical limitations have made the evaluation of this idea difficult. To address it, we implemented a task in mice that allows the study of different execution moments of a serial order sequence composed of two subsequences of actions. Using this task, we performed electrophysiological recordings in the premotor (M2) or motor cortex (M1) and state-dependent optogenetic inhibitions of their cortico-striatal projection. We show that while both M2 and M1 contain activity modulations related to the execution of serial order self-paced sequences, the premotor cortico-striatal projections are the main contributors to the proper execution/structuring of self-paced serial order sequences.

INTRODUCCIÓN

En la vida cotidiana realizamos constantemente secuencias de acciones motoras (Lashley, 1951) y uno de los núcleos subcorticales involucrados en la selección de acciones son los ganglios basales [(GB); (Gerfen & Surmeier, 2011; Redgrave et al., 2010)]. Los GB son parte de un circuito prosencefálico compuesto principalmente por el estriado, el globo pálido (GP), la sustancia *nigra* (SN) y el núcleo subtalámico (STN). El estriado es el núcleo más grande de los GB y la fuente principal de entrada sináptica hacia los GB. Todas las áreas corticales - sensoriales, motoras y asociativas- proyectan al estriado (Gerfen & Surmeier, 2011; Wall et al., 2013; Wilson, 1989). En este modelo las proyecciones corticales entran a los GB a través del estriado (vía cortico-estriatal) y la información fluye en los GB por medio de dos vías que tienen como principales núcleos de salida el globo pálido interno (GPi) y la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr). En general, la vía directa extiende sus proyecciones axónicas al GPi y al SNr, mientras que la vía indirecta llega a los núcleos de salida indirectamente por medio de un relevo en el globo pálido externo y el STN (Gerfen & Surmeier, 2011). Además, en estudios conductuales en roedores se ha mostrado que la actividad del estriado es necesaria para iniciar y ejecutar secuencias de acciones. Se ha observado que la actividad neuronal del estriado contiene información relacionada con iniciar, ejecutar y terminar una secuencia de acciones (e.g. presionar en una palanca), y además manipulando su actividad es posible afectar el inicio y ejecución de una secuencia de acciones (Cui et al., 2014; Dhawale et al., 2019; Jin et al., 2014; Tecuapetla et al., 2016).

Sin embargo, pese a saber la relevancia del estriado durante el inicio y ejecución de acciones, aún no está clara la contribución de sus aferencias corticales para iniciar y ejecutar una secuencia de acciones. Lo que sabemos de la actividad cortical aislada de sus proyecciones subcorticales es que una de las áreas de la corteza premotora medial, el área motora suplementaria (SMA), tiene actividad antes de iniciar, relacionada a realizar una secuencia de acciones, lo cual sugiere que dicha actividad posiblemente ayude a planear o estructurar el orden de los elementos en una secuencia (Nakayama et al., 2008; Shima et al., 2007). El homólogo del SMA en roedores es la corteza motora secundaria (M2) (Donoghue and Wise, 1982; Passingham et al., 1988) y se ha mostrado que está involucrada en conductas dirigidas a objetivos, en la selección y planeación de acciones (Gremel et al., 2013) así como también en conductas compulsivas (Corbit et al., 2019).

Hasta ahora, el único estudio que ha evaluado la contribución de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora durante la ejecución de secuencias de acciones, mostró que al reducir permanentemente de manera inespecífica la actividad de las neuronas de la corteza M2 que proyectan al estriado, afectó la apropiada ejecución de secuencias (una secuencia serial de dos acciones), disminuyendo la probabilidad de poder alternar entre dos palancas (Rothwell et al., 2015). Este estudio sugirió que la actividad de la corteza M2 que proyecta al estriado está implicada en la estructuración de elementos en una secuencia de acciones. Sin embargo, dado que solo se utilizó la ejecución de acciones seriadas de un solo elemento no se pudo concluir la contribución puntual de la proyección M2→estriado. A la par existen estudios que cuestionan la contribución de la corteza motora/premotora sobre la ejecución de secuencias de acciones (Kawai et al., 2015; Dhawale et al., 2019).

Por lo tanto, en el presente estudio nos dimos a la tarea de implementar un paradigma conductual que permitiera el estudio de la contribución de las aferentes cortico-estriatales de la

corteza premotora y motora en los diferentes momentos de dos subsecuencias dentro de una misma secuencia de acciones (o movimientos). La contribución de las aferentes corticales se evaluó por medio de registros electrofisiológicos de neuronas de la corteza premotora y motora o a través de manipulaciones optogenéticas de sus aferencias al estriado. Nuestros datos concluyen que tanto M2 como M1 contienen actividad relacionada con la ejecución de secuencias de acciones; mientras que, principalmente las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora, contribuyen a la correcta ejecución / estructuración de secuencias de acciones.

ANTECEDENTES

¿Qué es una secuencia de acciones y por qué es importante su estudio?

El estudio de secuencias de acciones se vuelve relevante al tratar de contestar a la pregunta de qué es el movimiento. En este sentido un movimiento puede ser clasificado de acuerdo a su función como por ejemplo la prensión (alcanzar y sujetar), la postura, la locomoción y el lenguaje. Todas estas funciones requieren la contracción de un grupo de músculos, que pueden estar realizando un movimiento voluntario o reflejo. Un movimiento reflejo es una respuesta (contracción/distensión de músculos) estereotipada a un estímulo específico y es generado por circuitos neuronales ubicados en la medula espinal o en el tallo cerebral. Un movimiento voluntario, a diferencia de un reflejo, es aquella respuesta que se realiza para la obtención de un objetivo específico, por lo que la selección de las articulaciones y segmentos corporales necesarios para la realización de dicho movimiento dependerá del objetivo. A diferencia de los reflejos la eficiencia de un movimiento voluntario mejora con la

experiencia y el aprendizaje, y se ha postulado que este tipo de movimiento es generado por circuitos prefrontales (Wolpert et al., 2013).

La importancia del estudio del control del movimiento radica en entender también patologías en donde se ve afectado la capacidad para iniciar y cambiar entre secuencias de acciones adecuadamente (enfermedad de Parkinson, Huntington) o en el cual se repiten secuencias incontroladamente como en el trastorno obsesivo compulsivo (Benecke et al., 1987) (Redgrave et al., 2010; Burguière et al., 2015; Graybiel, 1998).

A la fecha se han sugerido dos modelos de cómo es que se compone un movimiento voluntario: el modelo serial y el modelo jerárquico (Jin & Costa, 2015). En el primero, el movimiento está compuesto por varias acciones ($A_1, A_2 \dots A_n$) en donde cada acción desencadena la siguiente. Por ejemplo, A_1 desencadena A_2 , A_2 desencadena A_3 , A_3 a A_4 , y así sucesivamente. En este modelo A_2 no puede ser ejecutada hasta que suceda A_1 y A_3 no puede suceder si no existe antes A_2 . Por otra parte, en el modelo jerárquico se sugiere que existen módulos de acciones que se ejecutan sin necesidad del anterior. Por ejemplo, A_1, A_2 y A_3 serían parte de un módulo 1 (Mod1) y A_4, A_5 y A_6 serían parte del módulo 2 (Mod2). Cada módulo podría ejecutarse sin necesidad del anterior, lo cual es una ventaja ante el modelo serial, en el que la interrupción en alguna de las acciones ya no permitiría la ejecución de las subsecuentes.

A la fecha hay evidencia que apoya ambos modelos (Nieder et al., 2012; Ninokura et al., 2004; Long et al., 2010; Seeds et al., 2014; Sakai et al., 2003; Jax & Rosenbaum 2007). En ambos modelos existe el fenómeno de la estereotipia, definida como la reducción en la variabilidad en la ejecución del movimiento (Jin & Costa 2015).

En resumen, podemos decir que un movimiento voluntario está compuesto de una secuencia de subsecuentes acciones que se aprendieron o se producen de manera innata

(Aldrige et al., 2004), que su eficiencia mejora con la experiencia (aumentando la estereotipia) y que puede realizarse de forma serial o jerárquica.

Estudios previos de la contribución estriatal a la generación de secuencias de acciones

Como se mencionó anteriormente los GB están involucrados en la iniciación y ejecución de una secuencia de acciones y que la disfunción dentro de este circuito produce grandes repercusiones en el control del movimiento dando lugar a enfermedades como Parkinson y Huntington (Graybiel, 1995; Redgrave et al., 2010).

En estudios en roedores se han implementado tareas conductuales para poder estudiar la ejecución de una secuencia de acciones aprendida, tal como presionar cierto número de veces una palanca. Por medio de arreglos de electrodos implantados dentro de los GB se ha podido estudiar la actividad neuronal de esta región mientras los animales ejecutan la secuencia de presiones. El conocimiento que ha aportado este tipo de estudios ha sido: primero, que en la sustancia *nigra* (núcleo que recibe inervación estriatal y forma parte de la vía directa de los GB) hay un incremento en la actividad relacionado al inicio y final de una secuencia de 4 presiones en una palanca, actividad conocida como *start/stop* (Jin & Costa, 2010); segundo, que no solo en el circuito estriato-nigral se encuentra esta actividad, sino que también en el estriato-palidal. Lo cual sugiere que tanto la vía directa como la vía indirecta de los GB contribuyen en iniciar y terminar una secuencia de acciones. No obstante, de estos estudios no fue posible concluir concretamente qué subcircuitos de los GB eran necesarios/requeridos para iniciar/terminar una secuencia de acciones. Por lo que en 2016 Tecuapetla y cols. manipularon de forma específica la actividad de los dos subcircuitos de los GB mientras los animales realizaban una secuencia de presiones de palanca. Inhibiendo mediante técnicas de optogenética las células de la vía directa o de la vía indirecta de los GB y mostrando que la manipulación en la actividad de ambas vías produce un retraso en la iniciación de una secuencia

de acciones. Además, la manipulación de las vías específicas afectó la ejecución como resultado de un decremento en el número de presiones. Estos resultados confirmaron y permitieron concluir que el circuito de los GB es necesario para la iniciación y ejecución de una secuencia de acciones.

Si bien estos estudios son importantes para el entendimiento de los circuitos cerebrales que subyacen al inicio y la ejecución de una secuencia de movimientos, aún no está claro cómo los circuitos de los GB pueden concatenar varios grupos de secuencias de acciones y así realizar movimientos más complejos que dan como resultado la conducta de los individuos. En este sentido, en 2016 Geddes y colaboradores se preguntaron si los circuitos de los GB contribuían en la concatenación de dos subsecuencias y desarrollaron una tarea en donde los animales tenían que presionar dos veces una palanca A, seguido de dos presiones en una palanca B (AA→BB) y sugirieron que el circuito de la vía indirecta de los GB es necesario para transitar adecuadamente entre dos subsecuencias. Por otra parte, en otro estudio con una tarea similar de solo dos presiones alternadas (A→B) se sugirió que es el circuito de la vía directa era importante para adecuadamente alternar/transitar entre dos acciones componiendo una secuencia (Rothwell et al., 2015).

Estudios previos de la contribución cortical a la generación de secuencias de acciones

Lo que sabemos de la actividad cortical con respecto a la generación de secuencias de acciones es que el área motora suplementaria (SMA), la corteza motora secundaria (M2) en roedores (Donoghue and Wise, 1982; Passingham et al., 1988), tiene actividad antes de iniciar una secuencia de acciones, relacionada con la iniciación/ejecución de secuencias específicas.

Esto sugiere que dicha actividad posiblemente ayude a planear o estructurar el orden de los elementos en una secuencia (Nakayama et al., 2008; Shima et al., 2007). También sabemos que la actividad de la SMA es relevante para responder correctamente ante un cambio en el estímulo (contingencia) (Hikosaka and Isoda, 2010; Siniscalchi et al., 2016), por lo que esta corteza no sólo está involucrada con autoiniciar acciones (Murakami et al., 2014), sino también con la transición entre acciones ante cambios en las contingencias.

En un estudio en el que se reduce la actividad de las neuronas de M2 que proyectan al estriado (y muy probablemente a zonas colaterales como corteza, tálamo, puente, etc.) mientras los animales ejecutan una secuencia de palanqueo (A→B) disminuyó la ejecución apropiada de estas secuencias (Rothwell et al., 2015). Este estudio sugirió que la actividad de la corteza M2 que proyecta al estriado podría estar implicada en la estructuración de elementos en una secuencia de acciones. Sin embargo, dado que solo se utilizó la ejecución de acciones seriadas de un solo elemento, no se pudo concluir cuál es la contribución puntual de la proyección cortico-estriatal.

En contraste, un estudio reciente, en el que se lesiona a la corteza motora (y parte de la premotora), después de que los animales aprendieran a realizar secuencias de acciones, mostró que ésta corteza no es requerida para ejecutar secuencias de acciones, (Kawai et al., 2015). Un estudio del mismo tipo pero en el que se lesiona al estriado dorso-lateral mostró que este si es necesario para la ejecución de secuencias de acciones (Dhawale et al., 2019). Estos resultados sugieren que el estriado podría participar en la ejecución de una secuencia de acciones independientemente de las proyecciones de la corteza.

El contraste de estos antecedentes no permite establecer claramente si la corteza premotora/motora controla la actividad del estriado durante la ejecución de una secuencia de acciones. Sumado a esta controversia, sabemos que la inhibición de la corteza M2 en roedores

en un momento preciso (tiempo-dependiente) de un movimiento, antes de iniciar y no después de iniciado, afecta la correcta ejecución de un movimiento (Li et al., 2015).

Planteamiento del problema

Aunque se sugiere que las cortezas premotora y motora son necesarias para la ejecución de acciones, no está claro si la actividad de estas cortezas guía a la del estriado. La actividad de este último sabemos es requerida para la ejecución de secuencias de acciones. Es por esto que en el presente estudio nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación

¿Cuál es la contribución de las proyecciones corticales de corteza motora y premotora al inicio y ejecución de una secuencia de acciones compuesta de dos subsecuencias y a la transición entre estas?

Hipótesis:

Si la actividad del estriado es necesaria para ejecutar una secuencia de acciones y la actividad de la corteza premotora pero no la motora está involucrada en la planeación de una secuencia de acciones, entonces la actividad de la corteza premotora en la fase preparatoria guía la actividad estriatal para estructurar y ejecutar una serie de elementos en una secuencia de acciones, mientras que la actividad de la corteza motora guía la actividad estriatal en la ejecución.

Objetivo General:

Identificar la actividad neuronal de la corteza premotora y motora del circuito cortico-estriatal y su contribución en el inicio y ejecución de una secuencia de acciones de orden serial, así como en la transición intra-secuencia.

Para llevar a cabo el objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos particulares:**

- I) **Implementar con animales en libre movimiento una tarea conductual para el estudio de una secuencia de acciones que contenga dos subsecuencias.**
- II) **Analizar la actividad de las neuronas de las cortezas motora primaria y secundaria mientras los animales inician y ejecutan una secuencia de acciones.**
- III) **Inhibir a las aferentes cortico-estriatales para analizar la contribución de las proyecciones de la corteza premotora y motora durante el inicio y ejecución de secuencias de acciones.**

METODOLOGÍA

Animales. La unidad del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México, aprobó todos los procedimientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Protocolo número FT121-17). Este protocolo siguió la Norma Nacional para el uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). En este estudio se utilizaron Machos y hembras C57BL / 6J (Laboratorio *Jackson*) o ratones Emx1-Cre (que expresan la enzima Cre recombinasa en neuronas corticales piramidales) los cuales fueron cruzados con animales C57BL / 6J durante al menos seis generaciones (Gorski et al., 2002). Para este estudio se utilizaron ratones de 2-3 meses de edad al comienzo de los experimentos. El ratón Emx1-Cre fue donado por el profesor Dr. Rui M. Costa del Centro *Champalimaud* para lo Desconocido. Todos los animales se

obtuvieron de nuestra colonia reproductora del bioterio institucional (la línea Emx1 Cre se conservó en heterocigosis). Los animales se alojaron en un cuarto con ciclo de luz/oscuridad de 12 h (inicio del periodo de luz, 6:00 am) con acceso *ad libitum* a comida y agua antes de comenzar los experimentos de comportamiento.

Entrenamiento conductual. Usamos cajas de condicionamiento operante para ratones, equipadas con dos palancas retráctiles (21,6 cm de largo x 17,8 cm de ancho x 12,7 cm de alto; *Med-Associates*). Implementamos una tarea de secuencias de acciones de orden serial en dos modalidades: secuencias de orden serial forzadas y autoiniciadas. Para esto, colocamos las dos palancas de tal modo que en el panel izquierdo de la caja se encontraba la palanca 1 (subsecuencia 1; S1) y la otra en el panel frontal de la caja (subsecuencia 2; S2) al lado izquierdo del comedero (ver **Fig. 1A-B**). Debido a que observamos que era más eficiente el aprendizaje de nuestra tarea cuando se utilizaron *pellets* de azúcar en lugar de una recompensa líquida (agua con azúcar al 10%; datos no mostrados) como reforzadores, se utilizaron *pellets* de azúcar de 14 mg (Bio-Serv) que se entregaban como recompensa en el comedero. Las entradas al comedero se registraron mediante un sensor de movimiento infrarrojo (dentro del comedero). Otro sensor de movimiento infrarrojo se colocó entre el comedero y la palanca izquierda (**Fig. 1B**) para calcular la latencia para iniciar una secuencia de acciones. Antes de comenzar el entrenamiento se restringió de alimento a los animales, y durante las sesiones de entrenamiento la restricción se adecuó para mantenerlos en el 80-85% de su peso original, dependiendo del desempeño diario. Tres días antes del comienzo de los experimentos, los sujetos fueron alojados de manera individual y se inició la restricción del alimento. En estos tres días, los ratones también fueron manipulados por el experimentados durante dos minutos por día, colocándolos en su mano (utilizando guantes) y sujetándolos por la cola gentilmente para evitar

que salten. Esto ayudó a reducir el estrés que los ratones tienen cuando son tomados para colocarlos a la caja operante por primera vez.

El primer día del entrenamiento consistió en la exposición de los animales a las cajas operantes, los animales se colocaron en la caja operante sin palancas durante 30 min y se entregó una recompensa cada determinado tiempo (en promedio cada 60 segundos) 30 veces. Durante los siguientes tres días, a los animales se les presentó una palanca en el panel izquierdo y recibieron una recompensa cada vez que presionaban la palanca. Después de ocho recompensas, la palanca 1 se retiró y se presentó una segunda palanca (panel frontal). La sesión terminó una vez que el animal recibió 16 reforzadores, o pasados 30 min. Si en la primera sesión alguno de los animales no hacía ningún esfuerzo por presionar la palanca, para incrementar su motivación se molió un *pellet* de azúcar y se colocó un poco encima de la palanca, esto ayudó a los animales a empezar a asociar la palanca con la recompensa y con ello a que empezaran a presionarla. Este procedimiento solo se hizo con los animales que en la primera sesión no lograron ninguna recompensa. Adicionalmente, para aquellos animales que en la sesión 3 no lograron los 16 reforzadores, se realizaron más sesiones hasta que alcanzaran ese criterio de desempeño.

Posteriormente, el programa de entrenamiento cambió a un programa de razón fija 8 en cada palanca (RF8) durante tres días. En RF8, los animales tenían que acumular ocho presiones para recibir una recompensa. Una vez ocurrido, la palanca fue retraída, seguido de una presentación de una segunda palanca, reiniciando el requisito de 8 presiones de palanca para obtener una recompensa y retraer la segunda palanca (preentrenamiento). La sesión terminó cuando los ratones alcanzaron 30 recompensas (15 en la palanca 1 y 15 en la palanca 2) o pasados 30 minutos. Si los animales revisaban el comedero antes de alcanzar ocho presiones continuas, se retrajeron las palancas y se apagaban las luces por 10 segundos (*Time*

out), después de esto se reiniciaba el ensayo. Usamos estos tres días en RF8 ya que en estudios anteriores hemos visto que un programa de RF8 induce a los animales a presionar alrededor de cuatro presiones continuas (Tecuapetla et al., 2016).

Después de RF8, los animales fueron entrenados para realizar secuencias forzadas (3 días). Para ello, a los animales se les presentó una palanca (panel izquierdo, subsecuencia1); en la que tenían que acumular cuatro presiones continuas para que la palanca se retrajera, seguido de la presentación de una segunda palanca (panel frontal, subsecuencia 2). Los animales tenían que hacer cuatro presiones continuas en esta segunda palanca hasta que se retrajera y luego recibir una recompensa en el comedero (**Fig. 1B**, paneles superiores). Si los animales ejecutaban menos de cuatro presiones en la palanca 1 o en la palanca 2 visitando el comedero, se presentaba un *Time out* (10 segundos) y después de esto se reiniciaba el ensayo. La sesión terminó cuando los ratones obtuvieron 30 recompensas, o pasados 30 minutos. Después de estos tres días de secuencias forzadas, los animales ingresaron a la última etapa del entrenamiento (bloques de secuencias forzadas y autoiniciadas). Estas sesiones comenzaron con un bloque de secuencias forzadas pasando a un bloque de secuencias autoiniciadas en la misma sesión. El cambio entre bloques se condicionó mediante la ejecución de cinco secuencias correctas consecutivas. Para las secuencias autoiniciadas, a los animales se les presentaron dos palancas al mismo tiempo, y tuvieron que hacer al menos cuatro presiones (o más) en la palanca1, y al menos cuatro presiones (o más) en la palanca2 seguido de la entrega de una recompensa en el comedero. A diferencia de las secuencias forzadas, en los ensayos autoiniciados, los animales deciden cuándo transitar entre las subsecuencias de la palanca1 a la palanca2 (**Fig. 1B**, paneles inferiores). Una vez finalizado un bloque de ensayos autoiniciados, hubo un intervalo entre ensayos de 3 segundos antes de iniciar un nuevo bloque de ensayos Forzados. Si los animales ejecutaban menos de cuatro presiones en la palanca1 o

en la palanca2 visitando el comedero, se presentaba un *Time out* (10 segundos), seguido del reinicio del ensayo. La sesión terminó una vez que los animales obtuvieron 70 recompensas (35 recompensas forzadas y 35 recompensas autoiniciadas) o pasados 30 minutos. Las sesiones intercaladas continuaron durante 11 a 13 días (hasta alcanzar un desempeño estable; ver **Fig. 1D**). Todas las etiquetas de tiempo (por ejemplo, cada presión en la palanca 1 y 2, entradas al comedero, liberación de la recompensa, etc.) se registraron con una resolución de 10 ms con el paquete de software Med-PC IV (*Med-Associates*).

Registro electrofisiológico extracelular unitario y fotoidentificación antidrómica. Para investigar la actividad cortical, registramos la corteza utilizando una matriz de 16 electrodos fija o móvil (tungsteno 35 μm ; Durham, DC). La clasificación de unidades comenzaba 40 minutos antes de empezar la sesión de entrenamiento, mientras los animales permanecían en su caja habitación se hacía el rastreo en tiempo real de las unidades corticales con una clara relación señal/ruido $> 3:1$ (software Central, *Blackrock Microsystems*, UT). También una vez caracterizadas las unidades realizábamos una prueba de correlación cruzada (*Blackrock Microsystems*) para preguntar si las neuronas putativas seleccionadas eran únicas o tenían alguna contaminación de otras unidades en el mismo canal o de los demás canales y se descartaban todas aquellas unidades que tuvieron una correlación cruzada. Para una segunda clasificación de las unidades fuera de línea se utilizó el software *Offline Sorter* (Plexon Inc.).

Después de que los animales terminaban la sesión de entrenamiento, se colocaban en su caja habitación y para definir si la unidad registrada proyectaba al estriado, utilizamos la fotoidentificación antidrómica *in vivo* (Lima et al., 2009). Brevemente, expresamos *channelrhodopsin 2* (ChR2; *vectorcore* UPENN) en la corteza de interés utilizando animales Emx1-Cre, se implantó un arreglo de electrodos móvil 200 micras por encima del sitio de expresión de ChR2 durante la misma cirugía, y se implantó una fibra óptica (*Thorlabs*) en el

estriado (ipsilateral a la inyección). Este procedimiento nos permitió registrar la actividad de las neuronas putativas corticales durante la ejecución de secuencias, y mediante la foto-estimulación de las terminales axónicas en el estriado lateral al final de la sesión (2 mW, 473 nm, 10 Hz, 1 segundo, pulsos de 10ms; *Laserglow*), verificamos si la unidad registrada respondía de manera antidrómica y por lo tanto era del circuito cortico-estriatal (**Fig. 4**). El arreglo de electrodos móvil nos permitió buscar células que respondieran en al menos cinco sesiones por animal, avanzando ventralmente +100 μm 24 horas antes de los registros. Solo se consideraron las unidades que respondieron a la luz, es decir, que la frecuencia de disparo ante el estímulo incrementara y que la primera respuesta ante el estímulo tuviera una latencia menor a 10 ms. Cada pulso de luz tenía que producir un incremento en la frecuencia de disparo (**Fig. 7B**). Además de lo anterior, una unidad foto-identificada debía mostrar una correlación $> 0.9 R^2$ en la forma de la espiga registrada durante la ejecución de la tarea (Forma de la espiga conductual) y la forma de la espiga evocada por la luz de manera antidrómica (Forma de la espiga de la luz).

Re-escalamiento de la actividad neuronal. En los tipos de ambas secuencias, forzadas y autoiniciadas, cada secuencia tenía una duración ligeramente diferente y no se podía promediar directamente. Empleamos un procedimiento de cambio en la escala de tiempo (Kobak et al., 2016) para apreciar de manera más adecuada el patrón de respuesta general de cada unidad registrada. Así, realizamos un re-escalamiento de cada ensayo con al menos cuatro presiones en cada secuencia, definiendo los siguientes eventos de alineación: primera, segunda, penúltima y última presión de las subsecuencias 1 y 2. Los trenes de disparo de las neuronas se transformaron a tasa de disparo instantánea aplicando una convolución gaussiana (sigma 25ms) a 100Hz. La actividad se re-escaló mediante interpolación lineal al intervalo medio entre presiones y al intervalo entre subsecuencias de todas las sesiones de los animales registrados.

Análisis de los registros electrofisiológicos in vivo. Una vez que se aisló una unidad putativa (a través de la clasificación en tiempo real y fuera de línea), la actividad se alineó con la primera presión de las secuencias utilizando *scripts* desarrollados en MATLAB (MathWorks).

Comparación de la actividad normalizada en puntuación Z (*z-score*): para determinar las diferencias entre la actividad en *z-score* de la corteza M2 frente a M1, promediamos la actividad en *z-score* en la misma ventana de tiempo de las dos cortezas y calculamos la diferencia en términos de *z-score* con la siguiente ecuación:

$$Z_{difference} = \frac{Z1 - Z2}{\sqrt{\left(\frac{1}{N1 - 3}\right) + \left(\frac{1}{N2 + 3}\right)}}$$

Donde Z1 es el promedio de actividad normalizada de la corteza M2 y Z2 para la corteza M1, N1 la muestra de unidades de la corteza M2 (34 unidades) y N2 la muestra de unidades de la corteza M1 (26 unidades) (**Fig. 2F-G**, paneles inferiores, **2 J-L**). Los resultados se compararon en una tabla de distribución normal para determinar el valor p correspondiente (Chen y Popovich, 2011). Para determinar el porcentaje de unidades correlacionadas a lo largo del tiempo en cada periodo, hicimos un análisis de regresión lineal para preguntar si la tasa de disparo en cada intervalo de tiempo estaba correlacionada con diferentes parámetros: duración de la secuencia, presiones en la secuencia, duración de la transición, duración de la secuencia y número de presiones. Para este propósito, primero alineamos la actividad para cada periodo (primera, segunda, penúltima y última presión para cada secuencia) y tomamos 5000 ms antes y 5000 ms después de cada uno. Los trenes de disparo se transformaron a tasa de disparo instantánea como se describió anteriormente. Calculamos la frecuencia de disparo utilizando una ventana de tiempo de 200 ms con pasos de 10 ms. Separamos los ensayos y los clasificamos por el número de presiones en las secuencias (2, 4, 6, hasta 16, agrupamos cada incremento). De tal forma que se obtenían dos columnas para hacer una regresión por *bin* de

tiempo, en el eje x estaban la categoría del número de presiones y en el eje y la frecuencia media de disparo de cada unidad en los ensayos que correspondían a cada categoría del número de presiones. De igual forma, se llevó a cabo el mismo procedimiento para la duración de la secuencia y subsecuencias (S1& S2) y de la transición (ordenadas por duración de manera descendente, en siete categorías); Luego se calculó la tasa de disparo promedio para realizar la regresión lineal. Solo se aceptaron regresiones con coeficiente β diferente de cero ($p < 0.05$ y $R^2 > 0.6$); Se utilizaron ventanas móviles de 200ms desplazándose cada 10ms.

Análisis ROC (receiving operating characteristic curve) con permutaciones. Para determinar el porcentaje de unidades moduladas a lo largo del tiempo en cada periodo, realizamos un análisis ROC para preguntar si la frecuencia disparo en cada intervalo de tiempo fue diferente sobre el tiempo basal. Para este propósito, primero alineamos la actividad de las unidades a cada periodo (por ejemplo, primera presión) usando 4 segundos antes y 5 segundos después de cada época. Calculamos la frecuencia de disparo utilizando una ventana de tiempo de 200 ms que se desplazaba cada 10 ms. Utilizamos un tiempo basal de -4.5 a -4 segundos antes de la primera presión en las secuencias. Comparamos la frecuencia de disparo en cada intervalo de tiempo contra el tiempo basal. Para resolver estadísticamente si el área bajo la curva de la ROC (AUROC) era significativa, ejecutamos 1000 permutaciones y dividimos la suma de los valores de AUROC que eran > 0.5 o < 0.5 , entre el número de permutaciones. El valor de AUROC fue significativo si el resultado fue ($p < 0.05$). Además, en cada periodo, obtuvimos una matriz binaria donde comparamos cada *bin* de tiempo contra el tiempo basal. Esta matriz binaria se utilizó para encontrar el número de unidades moduladas en cada intervalo de tiempo. En la regresión lineal, para resolver estadísticamente si el valor p de la regresión era significativo, también ejecutamos 1000 permutaciones y dividimos la suma del valor $p >$ valor p inicial entre el número de permutaciones.

Expresión de opsinas e implante de fibras ópticas en el estriado lateral. Para las cirugías, los animales fueron anestesiados usando una mezcla de oxígeno (≤ 1 litro / min) isoflurano al 1%. Para los experimentos optogenéticos: después de la anestesia, a cada animal se le inyectó bilateralmente, utilizando pipetas de vidrio, 500 nL de una solución madre viral [rAAV5-EF1a-DIO-eArch3.0-EYFP (*Vector core, University of North Caroline*), AAV1.EF1a .DIO.eYFP.WPRE; AAV1.EF1a.DIO.hChR2 (H134R) -eYFP.WPRE titer $> 1 \times 10^{12}$ (*Vector core UPENN University Pennsylvania*) por presión en la corteza motora secundaria o primaria (M2, M1 respectivamente) o en el estriado lateral. Coordenadas con respecto a Bregma, M2: AP 2.34 mm, ML 1.25 mm y DV 0.60 a 0.70 mm. M1: AP 2.00 y 0.5 mm, ML 1.60 mm y DV 0.60 a 0.70 mm. Estriado lateral: AP 0.50 mm, ML 2.50 mm y DV 2.40 mm por debajo de la superficie del cerebro.

Después de que se realizaron las inyecciones (23 nL cada 5 segundos; Nanoject II, *Drummond Scientific*), esperando ~ 15 min para dar tiempo a la dispersión del virus, se colocó una fibra óptica (300 μm) (NA 0.37) en cada hemisferio del estriado. Una vez colocadas, las fibras ópticas se fijaron al cráneo con cemento acrílico (*Lang Dental Manufacturing Co., Inc*).

Inyecciones de Retrobeads como trazador retrogrado. Para los experimentos de marcaje retrógrado, se inyectaron 300 nL de *retrobeads* (*Lumafuor*, EE. UU.) en el estriado lateral de animales silvestres ($n=3$). Se obtuvieron secciones coronales (50 micrómetros) para determinar el número total de células marcadas en la corteza M2 o M1. La cuantificación se realizó en un corte coronal (50 μm) tomado cada 300 micras cubriendo estas regiones.

Inyecciones de Cre recombinasa de forma retrograda (Retro-Cre). Con la finalidad de poder visualizar los axones que proyectan específicamente de la corteza al estriado se utilizaron dos soluciones que tienen como resultado el marcaje específico de neuronas corticales que proyectan hacia el estriado. En resumen, de forma similar a las inyecciones de retrobeads, se inyectaron 300 nL de mCherry-Retro-Cre (*addgene*) en el estriado lateral, y se inyectaron 300

nL de DIO-eYFP en la corteza M2 de animales silvestres (n=3). Se obtuvieron cortes coronales del estriado de 50 micras para determinar los axones que cruzan el estriado dorsomedial o dorsolateral.

Micro-estimulación cortical de la región del brazo anterior en la corteza motora primaria.

Se realizaron experimentos de estimulación eléctrica (en animales *Emx1-cre^{+/-}*) para identificar las coordenadas de la corteza motora primaria (M1) correspondientes a la región de la pata contralateral delantera. El animal se colocó en el aparato estereotáxico bajo anestesia (ketamina 0.15 mg / g de ratón + xilacina 0.01 mg / g de ratón). El acceso a la corteza motora se logró trepanando una ventana de al menos 1 mm de diámetro alrededor de la región (AP +1, ML 1) de interés. La estimulación eléctrica se realizó usando un electrodo bipolar concéntrico (punta = 50 μ m; 1-4 M Ω) en la superficie de la duramadre. Se utilizaron este tipo de electrodos debido a que con ellos se evita la difusión de la carga y en específico la difusión de carga entre la corteza y el estriado (Vizcarra-Chacón et al., 2013). Para cada prueba de coordenada, se administraron 15 pulsos cuadrados de 200 microsegundos a una frecuencia de 200Hz y con una intensidad máxima de 50 mA usando un dispositivo estimulador (DS2, *Digimiter*). Con la administración de pulsos de voltaje, se corroboró el movimiento de la pata delantera contralateral empleando una cámara. Esta estimulación se realizó cada 100 micras en la dirección AP y ML. Se tomó la coordenada donde se observó el movimiento del bíceps braquial contralateral para así implantar el arreglo de electrodos de registro e inyección de ChR2 (ratón1: AP 0.5, ML 1.5; ratón2, AP 0.0, ML 1.5).

Inhibiciones optogenéticas estriatales in vivo. La luz se condujo a través de fibras implantables de 300 micrómetros de diámetro (*Doric Lenses*) acopladas a un láser de emisión de luz verde (CNI *lasers*). Para los experimentos de inhibición optogenética, se utilizó un sistema controlado por un AOM (*AAoptoelectronics*) y un obturador de velocidad rápida (*Thorlabs*)

activado por la salida de un TTL (*Transistor Transistor Logic*) de la caja de comportamiento MED-PC para mandar la señal de apertura de la luz. La cuantificación de la potencia en la punta de la fibra se verificó para cada experimento utilizando un medidor de potencia de la luz (*Thorlabs*). La potencia se ajustó en la punta de la fibra a 20 mW para la luz verde. Para lograr la inhibición optogenética de la proyección cortico-estriatal antes del inicio de secuencias, aprovechamos la estereotipia de los animales. Así, la próxima vez que el animal se movía del comedero a la primera palanca (palanca izquierda), el sensor infrarrojo se activaba, y esto determinaba la señal para encender la luz y cuantificar la latencia para iniciar las secuencias de acciones (**Fig. 1B**, **6D** y **Fig. 5B**). Para lograr las manipulaciones de la luz durante la ejecución de las secuencias, usamos como referencia de tiempo la primera presión de la palanca en la secuencia (**Fig. 7A**). Para lograr las manipulaciones de la luz durante la transición entre las subsecuencias forzadas, usamos la penúltima presión de la palanca de la subsecuencia¹ como referencia. En las secuencias autoiniciadas, cuantificamos la media de las presiones de la subsecuencia 1 del día anterior a las manipulaciones para poder definir cuál sería la penúltima presión (ver **Fig. 8B**). Durante la sesión de inhibición optogenética, se realizaron ensayos control (periodos de no luz; *Off*) y ensayos de estimulación (periodos de luz; *On*). Los ensayos de estimulación se presentaron al azar a lo largo de la sesión con un 50% de probabilidad de presentarse la inhibición. Los animales fueron habituados a las fibras ópticas que van conectadas a las fibras implantadas, por al menos 3 días antes de los experimentos de inhibición. Para ello, los animales fueron anestesiados colocándolos en una caja pequeña de anestesia con una torunda con un poco de isoflurano y una vez que los latidos cardiacos fueron no menores a 1/por minuto fueron retirados de la caja y colocados en una zona confortable (esponja) para conectar las fibras ópticas. Después de conectar las fibras correctamente, se colocó cuidadosamente una cinta adhesiva (oscura) para reducir un poco la salida de la luz (al momento de que se envíen los pulsos inhibitorios), se dejó que se recuperaran de la anestesia

por al menos 15 minutos, y posteriormente fueron introducidos a la sesión de entrenamiento. Para quitar las fibras utilizó el mismo procedimiento de anestesia mencionado y con unas pinzas se quitó cuidadosamente la cinta y finalmente las fibras ópticas.

Análisis de la conducta durante las inhibiciones optogenéticas. Se cuantificó el porcentaje de secuencias correctas. Una secuencia de orden serial correcta se definió como la secuencia con al menos cuatro presiones en la primera presión seguido de al menos cuatro presiones en la segunda palanca. También calculamos la proporción de secuencias incorrectas (errores; **Fig. 2 A**), dividiendo la frecuencia de estas secuencias incorrectas por el total de ensayos de inhibición (ensayos *On*) o ensayos donde no hubo inhibición (ensayos *Off*). La latencia para iniciar se calculó como el tiempo transcurrido del animal al cruzar el sensor infrarrojo fuera del comedero a la primera presión en las secuencias. La duración de una secuencia era el tiempo desde la primera presión de la subsecuencia1 hasta la última presión de la subsecuencia2. La transición entre secuencias fue el tiempo desde la última presión en la subsecuencia1 hasta la primera presión en la subsecuencia2. Se calculó el índice de cambio con la substracción de la media de los ensayos con inhibición menos los ensayos sin inhibición, Δ_{on-off} . Todos los animales fueron grabados en video durante las manipulaciones optogenéticas.

Cuantificación de las fibras cortico-estriatales. El protocolo de la cuantificación axonal fue como previamente se ha reportado (Díaz-Hernández et al., 2018). En resumen, extrajimos los cerebros y seccionamos el estriado (secciones coronales de 50 micras). Se adquirió una colección de imágenes en el eje Z (*z stack*) con un aumento de 63x (192x192x10 micras; 1 micra entre cortes) en un cuadrante aleatorio; utilizando una rejilla colocada al azar que cubre el estriado dorsolateral o el estriado dorsomedial (software ZEN lite, Zeiss, LSM 710). Estas colecciones de imágenes en el eje Z se importaron a un software especializado (*image J*), luego se utilizó una imagen de proyección máxima para aplicar un filtro (filtro de Hesse), permitiendo

la cuantificación de fibras definiéndolas como el número de fibras que cruzan una línea generada aleatoriamente y espaciada aproximadamente 20 micras.

Inhibición de las terminales cortico-estriatales en la fase temprana del aprendizaje. Se inyectó Arch3.0 en la corteza M2 e implantó un par de fibras en el estriado lateral como se describió previamente. Después de 4 días de recuperación los animales se introdujeron a los programas de entrenamiento antes mencionados (Preentrenamiento, RF8, Forzado y bloques forzado-autoiniciado). Cuando los animales llegaron a la fase de entrenamiento de ensayos forzados se sometió a los animales al protocolo de inhibición por 2 s justo antes de que los animales iniciaran una secuencia de acciones (antes). La inhibición “antes” se presentó desde las sesiones de ensayos únicamente forzados (días -3 al -1) y del día 1 al día 6 de ensayos en bloques Forzados-Autoiniciados (**Fig. 9 B**), después los siguientes días los animales siguieron el protocolo de entrenamiento sin luz de inhibición hasta el día 15 para evaluar el desempeño de los animales después de la inhibición.

Registro de célula entera en la configuración de fijación de voltaje/corriente. Se utilizaron animales que expresaban la proteína fluorescente verde (GFP) en neuronas espinosas medianas con el receptor D2 de dopamina (BACD2 ^{+/-}) cruzados con animales Emx1-cre (^{+/-}). De tal forma que las células estriatales marcadas en verde serían neuronas de la vía indirecta (iMSN). Para registrar neuronas de la vía directa estriatal se inyectó un marcador retrogrado en color rojo (*retrobeads*) en la sustancia negra, lo cual dejaría neuronas marcadas en el estriado de la vía directa (dMSN). Teniendo 1 a 2 meses de edad se procedió a inyectar a los animales con una solución viral (Ch2R) en la corteza M2 (con las coordenadas antes mencionadas) y con *retrobeads* en la sustancia negra (A.P. -3.1, M.L. 1.3 mm de bregma, D.V. -4.0 desde la superficie del cerebro). Pasadas 2 semanas de recuperación de la cirugía y dispersión del virus y marcador retrogrado se procedió a extraer el cerebro de los animales con una solución que

contiene (en mM) sacarosa 240, glucosa 9.9, NaHCO₃ 27.99, KCl 5, NaH₂PO₄ 0.55, MgCl₂ 6.40, Piruvato 3.7 y Ácido Ascórbico 0.99, la cual se dejó enfriar y se burbujeó con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Con esta solución se procedió a hacer una perfusión intracardiaca y posteriormente se extrajo el cerebro, colocándolo en un vibratomo (Pelco, 3000) con el que se obtuvieron rebanadas coronales de 200-300 μ m de grosor a la altura del estriado. Las rebanadas se transfirieron a una solución que contenía (en mM) NaCl 125, NaHCO₃ 26, Glucosa 15, KCl 3, NaH₂PO₄ 1.25, CaCl₂ 2.6 y MgCl₂ 1.3. Para lograr los registros electrofisiológicos se utilizó una solución interna con la que se llenó a la micropipeta de registro (capilares de borosilicato) que contenía (en mM) KMeSO₃ 120, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA/KOH 10, CaCl₂ 1, Na₂ATP 2.41, NaGTP 1.14, Biocitina 3.18.

Se realizaron registros en la configuración de célula completa con la técnica de fijación de voltaje y fijación de corriente. En la técnica de fijación de voltaje se fijó un potencial de mantenimiento para las células registradas de -80 mV, una vez que se logró el acceso se aplicaron pequeños pulsos de luz azul, utilizando un LED adaptado a la vía de iluminación del microscopio de registro (470 nm, con un tiempo de estimulación de 1ms y una intensidad de luz de 12 mW; intervalo entre pulso 5 segundos), esto para describir si la célula registrada en el estriado tenía una entrada sináptica excitatoria proveniente de los axones de las neuronas de la corteza que previamente fueron transfectados con ChR2.

Diseño experimental y análisis estadístico. El nivel de significancia fue de 0.05. Para la proporción, estadística pareada o entre grupos independientes, se utilizó la prueba Chi-cuadrada, la prueba de Wilcoxon o la prueba U de Mann-Whitney, respectivamente. En las comparaciones a lo largo de las sesiones se utilizó una prueba estadística de Friedman no paramétrica. Cuando se realizaron comparaciones múltiples (**Figs. 3B y 4B**), se utilizó una corrección de Benjamini-Hochberg para ajustar el valor p. Todos los análisis estadísticos se

realizaron utilizando Graph Pad, R-studio y MATLAB. Para el análisis de manipulaciones optogenéticas, utilizamos estadísticas de estimación basadas en intervalos de confianza (IC) como se describe en Ho J., et al., (2019) y Manouze et al., (2019). Introdujimos los datos en <https://www.estimationstats.com/> (Ho J., et al., 2019) y descargamos los resultados y gráficos. Los tamaños del efecto y los IC se describen como: tamaño del efecto [IC, límite inferior, límite superior]. Se hicieron cinco mil permutaciones, y los valores de P reportados son las probabilidades de observar el tamaño del efecto, si la hipótesis nula de diferencia cero es cierta.

RESULTADOS

Para identificar la contribución de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora y motora sobre la ejecución de secuencias de acciones, establecimos una tarea de comportamiento operante en ratones y se realizaron dos experimentos generales. Para la tarea, se entrenó a ratones para ejecutar dos subsecuencias de presiones en dos palancas (**Fig. 1,2**). Para el primer experimento, nuestro objetivo fue identificar si las cortezas estudiadas presentaban modulación de su actividad durante la ejecución de las secuencias estudiadas. Para ello, registramos la actividad de las neuronas corticales de M2 o M1 mientras los animales ejecutaban estas secuencias de acciones (**Fig. 3-5**). En un segundo experimento, nuestro objetivo fue identificar si las proyecciones de estas cortezas contribuían a la ejecución de secuencias, inhibiendo optogenéticamente las terminales cortico-estriatales antes, durante la ejecución de las secuencias y durante la transición entre las dos subsecuencias de las secuencias desarrolladas (**Fig. 11-13**).

Los ratones aprenden a realizar secuencias de acciones

Para investigar la contribución de las sinapsis cortico-estriatales en la estructuración de elementos en una secuencia de acciones, entrenamos ratones en una tarea de orden serial para ejecutar dos subsecuencias de acciones consecutivamente constituyendo una secuencia (**Fig. 1A**). La ejecución de una secuencia correcta se logró cuando los animales realizaron al menos cuatro presiones en la palanca1 (subsecuencia1; S1) seguidas de cuatro presiones en la palanca2 (subsecuencia2; S2), lo cual entregaba una recompensa en el comedero. Para ejecutar secuencias autoiniciadas, primero entrenamos a los animales a realizar secuencias forzadas (Forzada: solo una de las dos palancas estaba expuesta y se retraía cuando los animales lograban cuatro presiones presentando la segunda palanca, indicando así a los animales cuándo presionar; **Fig. 1B** paneles superiores). Más adelante en el entrenamiento, se intercalaron bloques de secuencias forzadas y autoiniciadas (Autoiniciada: ambas palancas permanecían expuestas para que los animales decidieran cuándo presionar y transitar entre subsecuencias; paneles inferiores de la **Fig. 1B**).

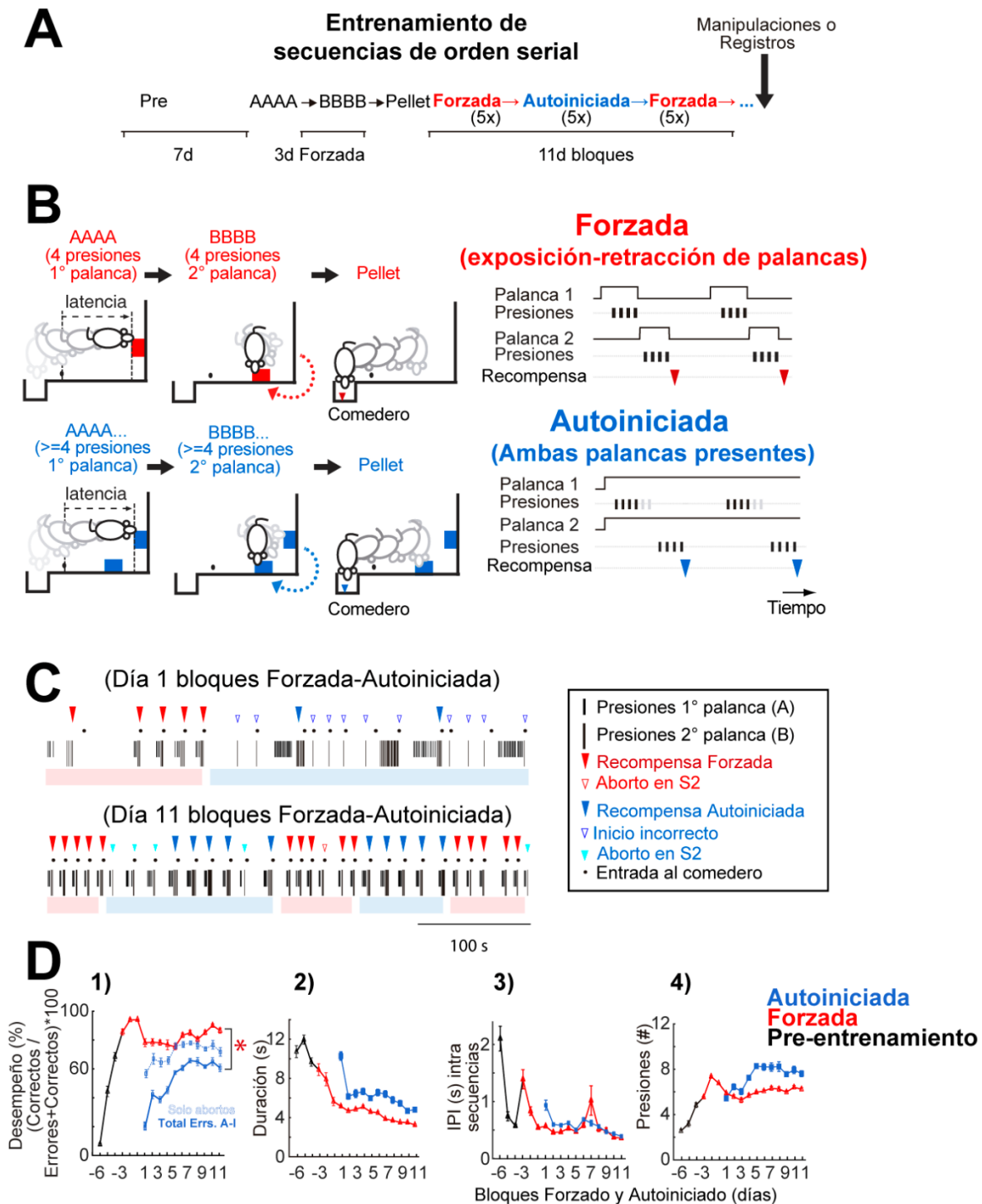


Figura 1. Los ratones aprenden a ejecutar secuencias de presiones de orden serial. (A) Cronología del entrenamiento en secuencias de orden serial (ver métodos). (B) De izquierda a derecha, diagramas de las presiones de la palanca 1 (AAAA = 4 presiones) → palanca 2 (BBBB = 4 presiones) entregando una recompensa en el comedero. En rojo se presentan las secuencias de orden en serial Forzadas, y en azul (paneles inferiores) la representación de los tipos de secuencias de orden serial autoiniciadas. (C) Ejemplo de las secuencias de presiones de un animal durante el primer día (temprano) y el undécimo día (tardío) durante las sesiones de bloques de secuencias de orden serial Forzadas - Autoiniciadas. Observe cómo las secuencias autoiniciadas se vuelven muy estereotipadas al final del entrenamiento. (D) De izquierda a derecha: porcentaje de secuencias correctas (correctas / errores + correctas), la duración, los intervalos de presiones dentro de las secuencias y el número de presiones a lo largo de los días, forzado (rojo) y autoiniciado (azul). Todas las curvas muestran la media ± el error estándar de la media (WT; n = 8).

El requisito de bloques intercalados fue implementado ya que el rendimiento de los animales disminuyó cuando se les pidió que realizaran solo secuencias autoiniciadas (probado en un grupo de 8 animales: datos no mostrados). La principal diferencia entre una secuencia forzada y una autoiniciada era que, en la primera, al completar cuatro presiones en la palanca1, se retraía y se mostraba una segunda palanca; si se ejecutaban cuatro presiones en la palanca2, también se retraía, seguido de la entrega de una recompensa en el comedero (**Video S1**). Por otro lado, la ejecución de una secuencia autoiniciada también requirió de al menos cuatro presiones en cada palanca (o más), pero en este caso, las ambas palancas permanecieron expuestas todo el tiempo (**Video S2**).

Durante una sesión de ensayos intercalados, se requirió que los animales logaran bloques de 5 y 5 secuencias correctas de ensayos Forzados y Autoiniciados consecutivamente durante 30 minutos. La **Fig. 1C** muestra el ejemplo de la conducta de un animal durante el primer día (aprendizaje temprano) y el onceavo día (aprendizaje tardío) en la ejecución de estos bloques (las recompensas están etiquetadas con triángulos rojos para ensayos Forzados y en azul para ensayos Autoiniciados). Después de 21 días de entrenamiento, nueve días realizando bloques, los animales mostraron un rendimiento estable de secuencias correctas de orden serial, ya que el desempeño no cambió en las últimas 3 sesiones [Desempeño_{Forzado}, $X^2(2) = 2.51$, $p = 0.30$, Desempeño_{Autoiniciado}, $X^2(2) = 1.0$, $p = 0.65$, prueba de Friedman, animales silvestres (C57BL6/J; WT), $n = 8$, **Fig. 1D, panel 1**]. Ni la duración, o los intervalos entre presiones (IPI), o el número de presiones (**Fig. 1D, paneles 2-4**), o la latencia para iniciar o las transiciones intra-subsecuencias fueron diferentes en estas últimas 3 sesiones ($p > 0.05$, Prueba U de Mann Whitney, animales WT, $n = 8$; para más información sobre los datos y resultados estadísticos ver Tabla 1).

Mientras que los animales en secuencias forzadas alcanzaron un $83 \pm 1.5\%$ de secuencias correctas (secuencias correctas / errores + secuencias correctas), en la ejecución de secuencias autoiniciadas solo alcanzaron el $61 \pm 1.7\%$ (animales WT, $n = 8$; **Fig. 1D**, panel izquierdo). Para investigar más a fondo este rendimiento, cuantificamos los tipos de errores y las formas en las que los animales ejecutaban las secuencias correctas. Un error fue definido como una secuencia de presiones en las que el animal no logró cuatro presiones en la palanca1 seguidas de cuatro presiones en la palanca2. Los errores se agruparon en cuatro categorías: 1) inicio incorrecto (comenzando en la palanca opuesta), 2) Abortos en la subsecuencia1, 3) cambios rápidos o prematuros de la sub-secuencia1 a la sub-secuencia2 y 4) Abortos en la subsecuencia2 (**Fig. 2A, paneles 1- 4** respectivamente; tener en cuenta que 1 y 3 solo estuvieron presentes en las secuencias autoiniciadas). Estas cuatro categorías se cuantificaron al principio y al final del aprendizaje de las secuencias. La disminución de los abortos en la subsecuencia1 (S1) y la subsecuencia (S2) fue el principal determinante para mejorar el rendimiento de las secuencias forzadas y autoiniciadas en comparación con el preentrenamiento (AbortosS1_{Pre}= $41 \pm 4.2\%$, AbortosS2_{Pre}= $52 \pm 5.1\%$ vs. AbortosS1_{tardío-Forzado}= $1.9 \pm 0.01\%$, AbortosS2_{tardío-Forzado}= $11 \pm 4.6\%$, $p < 0.05$, y AbortosS1_{tardío-Autoiniciado}= $2.6 \pm 1.0\%$, AbortosS2_{tardío-Autoiniciado}= $20 \pm 6.2\%$, $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney, animales WT, $n = 8$, **Fig. 2A, paneles 2 y 4**). Por su parte, los errores de inicio incorrecto explicaron la mejoría en el rendimiento de ensayos autoiniciados (inicio-incorrecto_{temprano}= $59 \pm 4.5\%$ vs. inicio-incorrecto_{tardío} = $4.6 \pm 1.1\%$, $p = 0.007$, prueba U de Mann-Whitney, animales WT, $n = 8$, **Fig. 2A, paneles 1**). No se detectó ninguna diferencia en el rendimiento entre las secuencias forzadas y autoiniciadas cuando se contabilizaron solo los errores disponibles tanto en ensayos Forzados como en Autoiniciados: AbortosS1 + AbortosS2 ($p = 0.5$, prueba U de Mann-Whitney, animales WT, $n = 8$; **Fig. 1D**, curva punteada azul frente a curva roja).

La ejecución correcta en secuencias forzadas fue $S1=4 \rightarrow S2=4$; en Autoiniciado la ejecución de secuencias correctas se agruparon en varias opciones ($S1>4 \rightarrow S2>=4$; $S1=4 \rightarrow S2=4$; $S1=4 \rightarrow S2>=4$). La mayor proporción de secuencias correctas fueron secuencias largas del tipo $S1>4 \rightarrow S2>=4$ (Largas-S1; Animales WT, $n = 8$; **Fig. 2B**).

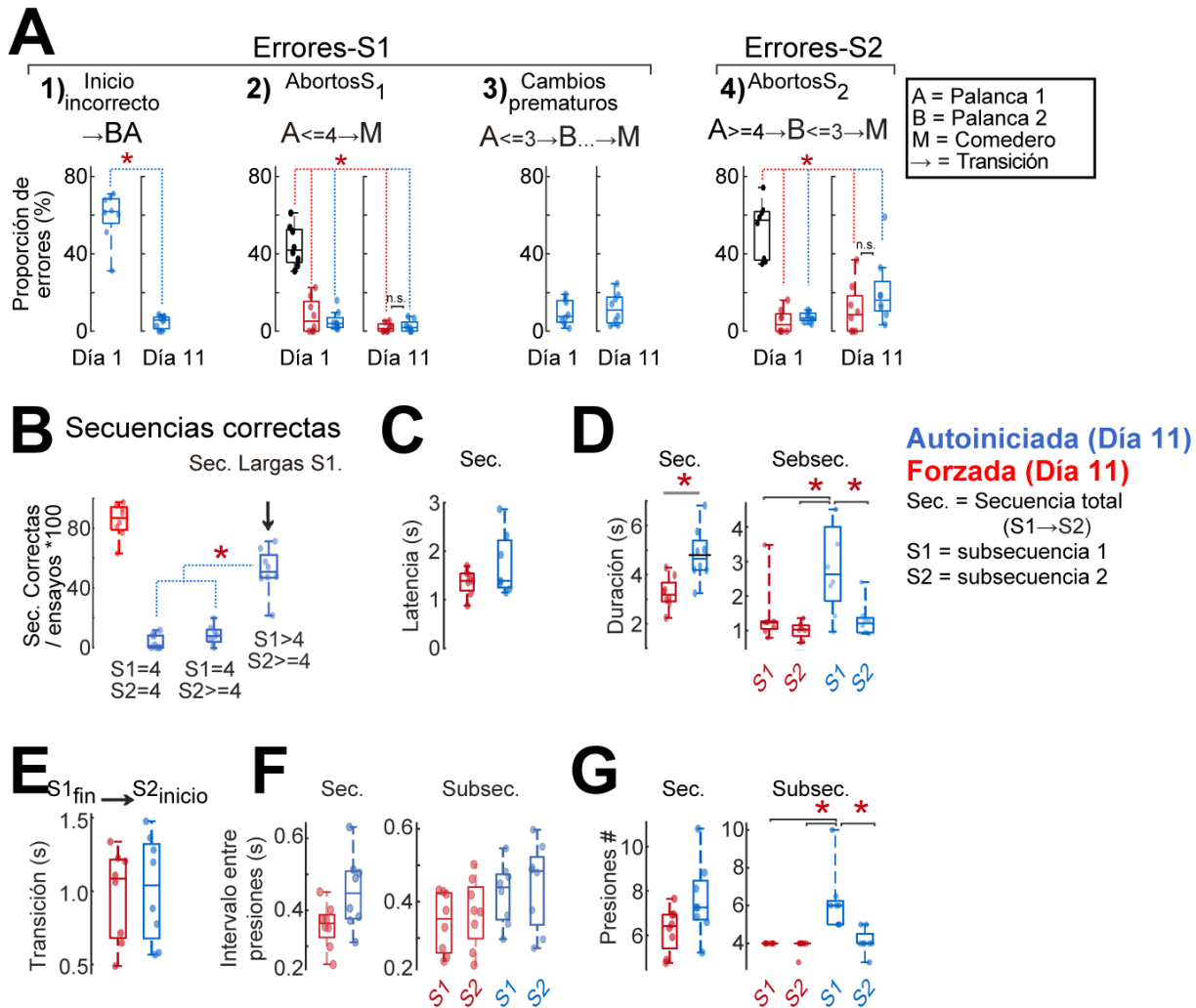


Figura 2. Los ratones aprenden a iniciar en la palanca correcta y a no interrumpir una secuencia de acciones en la etapa tardía del entrenamiento. (A) Diferentes categorías de errores que ejecutaron los ratones al intentar ejecutar secuencias forzadas o autoiniciadas correctas. (B) Las secuencias correctas fueron de un tipo ($S1 = 4 \rightarrow S2 = 4$) para Forzado, pero de varios tipos para Secuencias autoiniciadas, dominando el tipo $S > 4 \rightarrow S2 > = 4$. (C) Latencia de inicio, medida como el tiempo transcurrido desde la ruptura del sensor infrarrojo y la primera presión. (D) (E) y (F) Izquierda, duración media, media de los intervalos entre presiones, media de las presiones por secuencia, paneles de la derecha: por subsecuencia individual. (G) Tiempo de transición entre subsecuencias. Los datos en F-I son de animales WT ($n = 8$) durante el entrenamiento tardío. * $p < 0.05$, valores p específicos y prueba estadística especificada en el texto y la tabla 1.

Además de la estructura de la ejecución, cuantificamos los parámetros de duración de las secuencias, la latencia para comenzar, la duración, los intervalos entre presiones y la transición entre subsecuencias, en cuyos parámetros los animales se volvieron más rápidos a lo largo del tiempo del entrenamiento (prueba de Friedman, $p < 0.05$; Animales WT, $n = 8$, **Fig. 1D**, paneles 2-3; para todas las comparaciones, consulte la **Tabla 1**). Más adelante en el entrenamiento, la latencia para iniciar no fue diferente entre secuencias Forzadas y Autoiniciadas (Forzada: $1.18 \pm 0.1s$, Autoiniciada: $1.52 \pm 0.3s$, $p = 0.535$, prueba U de Mann-Whitney, animales WT día 11, $n = 8$, **Fig. 2C**). Sin embargo, la duración y el número de presiones fueron mayores en la subsecuencia S1 de secuencias Autoiniciadas que en Forzadas. En el primero, los animales decidían cuándo pasar de la subsecuencia S1 a la subsecuencia S2 ($Duración_{Forzada} = 3.2 \pm 0.2s$ vs. $Duración_{Autoiniciada} = 4.8 \pm 0.4s$; presiones $S1_{Forzadas} = 4 \pm 0$ vs. 6.1 ± 0.6 en $S1_{Autoiniciadas}$, $p = 0.0002$, Prueba U de Mann-Whitney, **Fig. 2D y 2G**). El tiempo de transición entre las subsecuencias ($S1_{end} \rightarrow S2_{start}$) y los intervalos entre presiones no fue diferente entre los dos tipos de secuencias ($p > 0.05$, prueba U de Mann-Whitney, **Fig. 2E y F**).

Esta parametrización de la tarea mostró que los ratones podían aprender y ejecutar secuencias de orden serial Forzadas y Autoiniciadas. Las diferencias en su ejecución, radicó en que en las secuencias autoiniciadas tuvieron más posibilidades de errores en la ejecución de secuencias largas de presiones en la sub-secuencia1.

Modulación de la actividad en neuronas de la corteza premotora y motora durante la ejecución de secuencias de acciones

Una vez que establecimos que los ratones eran capaces de ejecutar secuencias de acciones, pusimos a prueba la predicción de si la actividad de las neuronas corticales en M2 y/o M1 se modulaban durante la ejecución de secuencias (Churchland et al., 2006; Mushiake et al., 1990; Shima et al., 2007; Tanji y Evarts, 1976). Para ello, entrenamos a ocho animales, como se explica en la **Fig. 1 y 2**. Después de tres días de sesiones en bloques de secuencias Forzadas- Autoiniciadas, realizamos cirugías para implantar un arreglo de electrodos móviles ya sea en la corteza M2 (n = 6; **Fig. 3B**) o en la corteza M1 (n = 2; **Fig. 3C**). En la corteza M1 se confirmó la región que controla el movimiento de la pata delantera por un protocolo de microestimulación en la corteza M1 (ver métodos). Luego de cuatro días de recuperación, el entrenamiento se reinició hasta que los animales alcanzaron un desempeño estable en la ejecución de secuencias Forzadas y Autoiniciadas (tomó 10-15 sesiones de bloques). De estos animales, se identificaron 34 unidades aisladas en M2 y 26 unidades en M1 y en la figura **3D** y **3E** se presentan ejemplos representativos de la actividad de estas neuronas durante la ejecución de las secuencias.

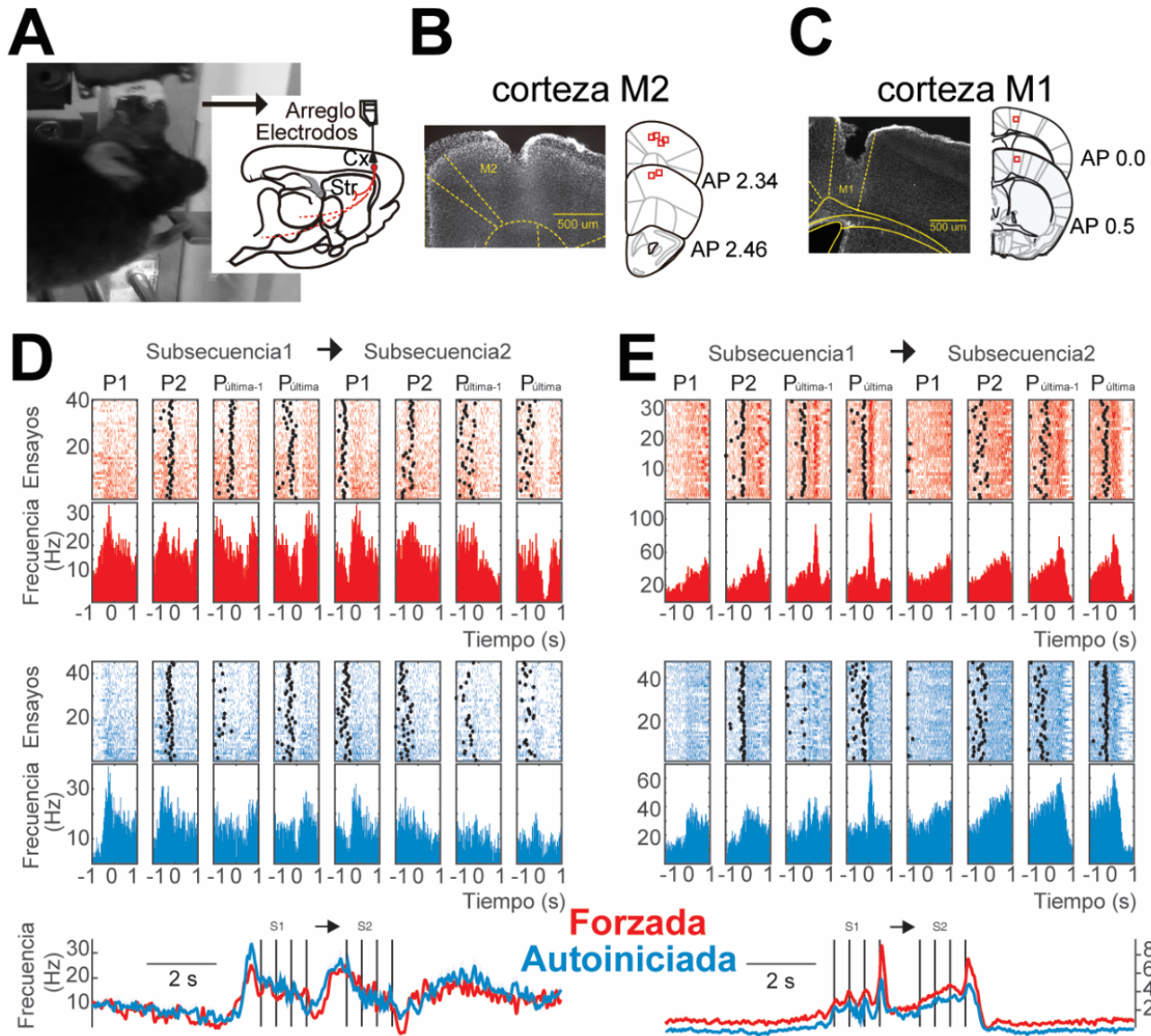


Figura 3. Actividad de una unidad de la corteza premotora y motora durante la ejecución de secuencias de acciones. (A) Imagen que muestra un ratón mientras presiona una de las palancas. (B) y (C) Microfotografías de secciones coronales de la corteza M2 o M1, respectivamente, que ilustran la marca del implante de la cánula y los electrodos. Derecha: Representación de cortes coronales que muestran los sitios de registro en M2 o M1. (D) y (E) Gráficos e histograma peri-eventos de una unidad M2 o M1, respectivamente, alineados con la primera (P1), segunda (P2), penúltima (Púltima-1) y última presión (Última) de la subsecuencia1 y la subsecuencia 2 para secuencias forzadas (rojo, paneles superiores) o autoiniciadas (azul, paneles intermedios). Los paneles inferiores significan la frecuencia de disparo de los paneles superiores.

La **figura 4** muestra el análisis de la población de todas las unidades de la corteza premotora y motora, empezando por los gráficos en códigos de color (donde blanco es alta y oscuro es poca actividad) donde se presenta la actividad normalizada de todas las unidades registradas (**Fig. 4A y B**).

La media de la actividad normalizada de todas las unidades no mostró una diferencia entre las secuencias forzadas y autoiniciadas ni en las unidades registradas en M2 ni en M1 ($p > 0.05$, prueba de la diferencia en *z-score*, **Fig. 4A y B, paneles inferiores**). Sin embargo, la actividad normalizada (*z-score*) de M2 fue mayor a M1 durante la sub-secuencia2 tanto en secuencias Forzadas como en Autoiniciadas (media del *z-score* Forzado: M2-S2 = 0.2 vs M1-S2 = -0.2; Autoiniciado: M2-S2 = 0.31 frente a M1-S2 = -0.15; $p < 0.05$, prueba de la diferencia en *z-score*; **Fig. 4A-B, paneles inferiores**).

Para responder si las mismas unidades podrían estar activas durante diferentes fases de las secuencias (véanse los paneles superiores de las **Figuras 4A-B**), cuantificamos la actividad media de las neuronas por encima de dos *z-scores* durante las secuencias. Clasificamos su actividad en categorías (**Fig. 4C**). No encontramos diferencias significativas cuando comparamos la proporción de unidades de M2 vs. M1; solo se observó una tendencia a tener más unidades relacionadas con la iniciación en M2 (**Fig. 4D**). Para explorar si había una diferencia durante el inicio de las secuencias, comparamos la media del *z-score* de la corteza M2 vs. al de M1 de las unidades que mostraron una modulación significativa un segundo antes de iniciar las secuencias (**Fig. 4E-F**). Esta comparación mostró una modulación positiva de actividad mayor en M2 que en M1 durante la ejecución de las secuencias (M2 = 14 de 34 unidades, M1 = 8 de 26 unidades; media *z-score* en secuencias forzadas: M2-S1 = 1.2, M2-S2 = 0.8 vs. M1-S1 = 0.6, M1-S2 = 0.1; Secuencias Autoiniciadas: M2-S1 = 1.32, M2-S2 = 0.85 vs. M1-S1 = 0.55, M1-S2 = 0.22; $p < 0.05$, prueba de *z-score*, **Fig. 4G** barras etiquetadas como "S1 y S2").

Sorprendentemente, las unidades en M2 mostraron una modulación más fuerte en las secuencias autoiniciadas durante el inicio ($M2_{\text{Autoiniciado-Inicio}} = 1.4$ frente a $M1_{\text{Autoiniciado-Inicio}} = 0.8$, $p < 0.05$, prueba de diferencia en *z-score*, **Fig. 4G**, barras etiquetadas como "Ini" en azul) y una

tendencia similar durante el inicio de secuencias forzadas (**Fig. 4G**, barras etiquetadas como “Iniciación” en rojo). No se detectó diferencia en el número de unidades reclutadas a lo largo de la ejecución de las secuencias ($p > 0.05$, prueba Chi-cuadrada, **Fig. 4H**).

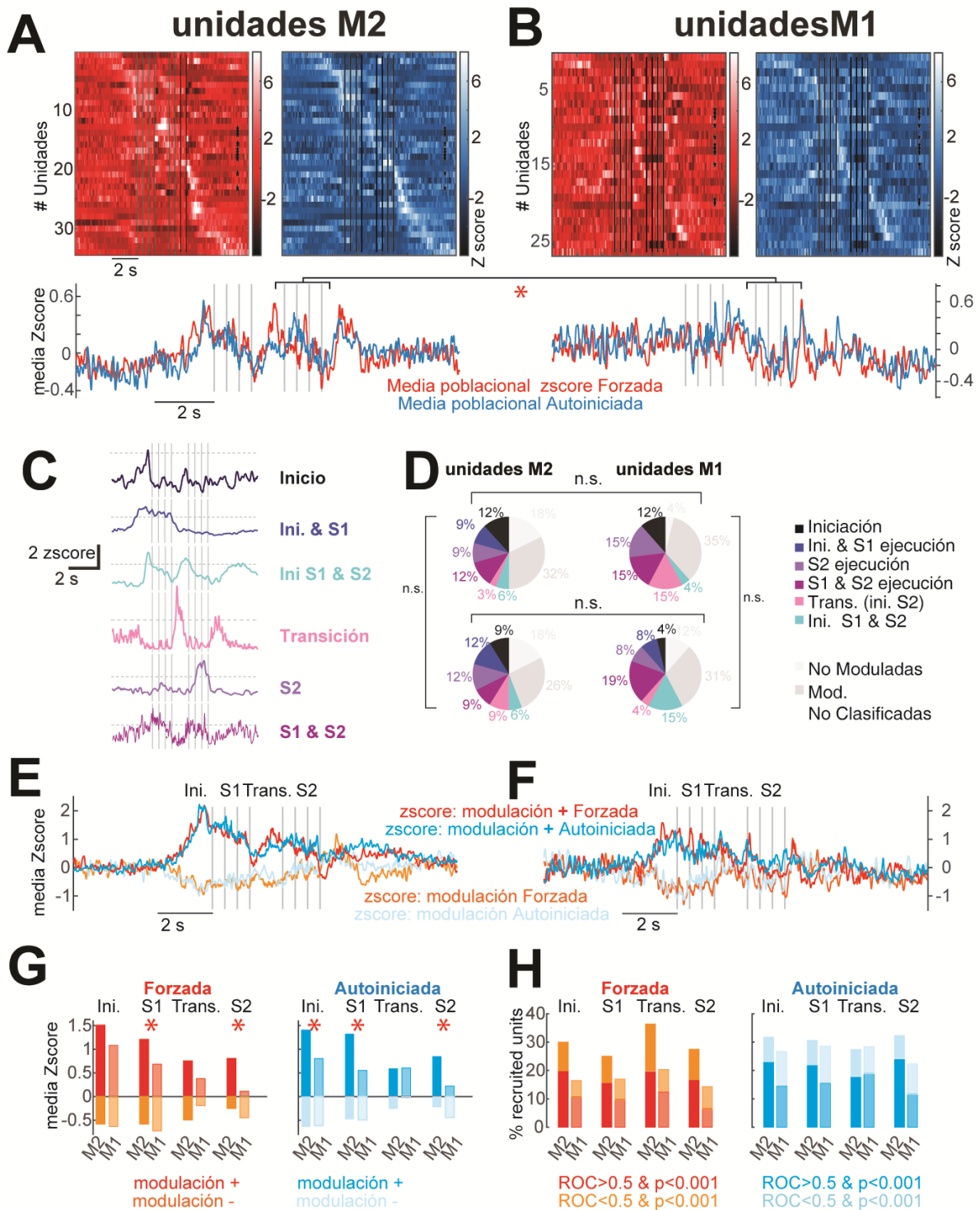


Figura 4. Modulación de la actividad en la corteza premotora y motora durante la ejecución de secuencias de acciones. Paneles superiores **(A)** y **(B)**: puntuación z de las unidades individuales. Abajo: puntuación z media de las unidades registradas en M2 (n=34) o M1(n=26) para secuencias forzadas (rojo) y autoiniciadas (azul). * p <0.05, prueba de puntuación z (ver métodos). **(C)** El disparo representativo de diferentes células presentadas en z-score, que ilustra las diferentes categorías de modulación durante la ejecución de las secuencias. **(D)** Porcentaje de células relacionadas con cada categoría de H. **(E)** y **(F)** Puntuación z media de las unidades moduladas M2 o M1 durante una ventana de 1 segundo antes de la primera presión en las secuencias separadas como positivamente (+) o unidades moduladas negativamente (-) en esa ventana para secuencias forzadas (rojo y naranja) o autoiniciadas (azul y cian) respectivamente. Las líneas verticales representan las presiones de palanca como en D. **(G)** Comparación de la puntuación z media de J y K, M2 frente a M1 para Forzado (unidades rojas moduladas positivamente, naranjas moduladas negativamente) y para secuencias autoiniciadas (oscuras y unidades de modulación positiva y negativa de color azul claro). * p <0.05, prueba X². **(H)** Porcentaje de unidades reclutadas (intervalos de 200 ms, una ventana deslizante de 10 ms) para M2 frente a M1 durante secuencias forzadas y autoiniciadas. Código de color como en L. Ini. = inicio, S1 = subsecuencia 1, Trans = transición y S2 = subsecuencia 2.

Tanto M2 como M1 contienen unidades que codifican la longitud de las secuencias de acciones.

Tras evaluar la modulación de ambas cortezas en la ejecución de secuencias forzadas y autoiniciadas, probamos la hipótesis de que neuronas en M2 y M1 codifican parámetros temporales de estas secuencias (Churchland et al., 2006; Hernández et al., 2010; Jin et al., 2009; Lucchetti y Bon, 2001; Mendoza et al., 2018; Murakami et al., 2014; Riehle y Requin, 1989; Riehle et al., 1994; Sakurai et al., 2004). Para evaluar esta posibilidad, realizamos regresiones lineales entre la duración de los segmentos de las secuencias (secuencia total, S1, transición o S2) y la actividad neuronal registrada de neuronas individuales en la corteza M2 o M1. Razonamos que, si estas cortezas contenían actividad que codificara la longitud de la secuencia, era plausible esperar que sus proyecciones cortico-estriatales transmitieran esta información al estriado.

La **figura 5A** muestra tres ejemplos de unidades que presentaron regresiones significativas ($R^2 > 0.6$, $p < 0.05$) en intervalos de tiempo específicos durante la ejecución de secuencias autoiniciadas (paneles de la fila central, sombras grises; hay que tener en cuenta que los intervalos de tiempo donde se probó el análisis de regresión podrían ser antes o durante la ejecución). La **figura 5B** presenta la proporción de unidades que presentaron regresiones

significativas señaladas por cinco preguntas: i) ¿La actividad antes de la primera presión (1 segundo antes) puede codificar la longitud de las secuencias?; ii) ¿La actividad media de la secuencia codifica la longitud de la secuencia?; iii, iv y v) ¿Existe una relación entre la duración de S1, la transición o la duración de S2 y la media de la tasa de disparo en estas épocas? La respuesta a estas cinco preguntas se presenta por unidad registrada ya sea en M2 o M1 (**Fig. 5B**, paneles superiores) y como el porcentaje de unidades que presentaron regresiones significativas por región (**Fig. 5B**, paneles inferiores). Cabe destacar que la mayor proporción de unidades que presentaron regresiones significativas se encontró entre la duración de las secuencias y la tasa de disparo antes del inicio tanto en M2 como en M1 (**Fig. 5B**, columnas i) o la duración de las secuencias y la tasa de disparo media durante las secuencias en M2 (**Fig. 5B**, columnas ii).

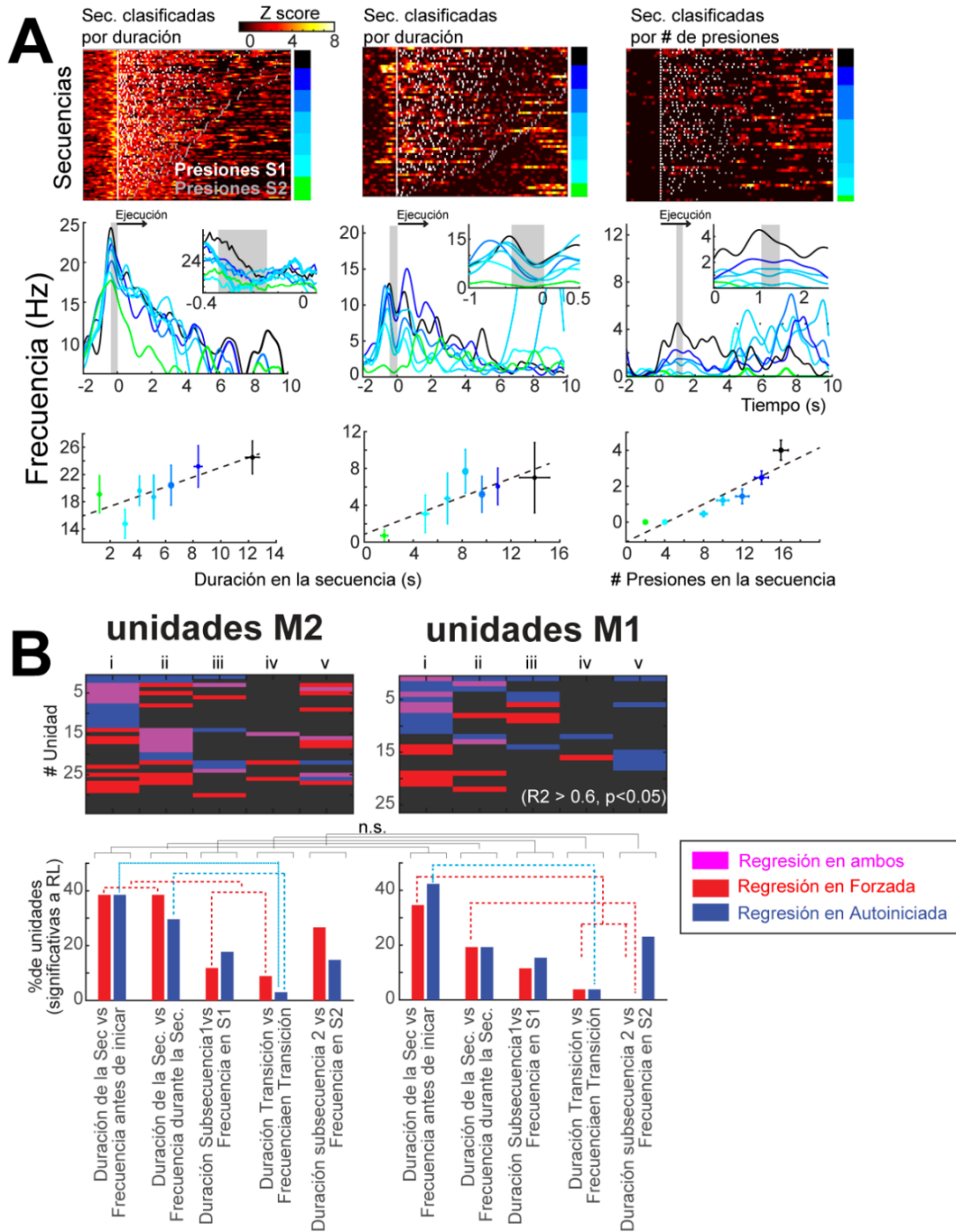


Figura 5. Tanto M2 como M1 contienen unidades que codifican la temporalidad de las secuencias de acciones. (A) Paneles superiores: ejemplos de 3 unidades registradas en M2. En cada ejemplo, cada línea es una secuencia autoiniciada que representa la actividad neuronal (en puntuación z, de negro a amarillo) y la presión de la palanca (subsecuencia1, puntos blancos; subsecuencia2 puntos grises). La barra de color a la derecha de cada gráfico muestra las categorías agrupadas trazadas en los paneles central e inferior. Paneles de la fila central: tasa de disparo media de cada categoría presentada en la fila superior. Fila inferior: ajustes de regresión del intervalo del tiempo representado en gris en los paneles de la fila central. **(B)** Paneles de fila superior, análisis de regresión significativa por unidad. Columnas: i) Regresión entre la tasa de disparo (TD) un segundo antes de iniciar de las secuencias (Sec.) frente a la duración de las secuencias, ii) TD durante las secuencias vs. duración de las secuencias; iii) TD en la subsecuencia1 (S1) frente a la duración de S1; vi) TD durante la transición frente al tiempo de transición y v) TD durante la subsecuencia2 (S2) frente a la duración de S2. Paneles inferiores, proporción de unidades que presentaron regresión significativa ($R^2 > 0.6$ y $p < 0.05$) durante las secuencias Forzada (rojo) o Autoiniciada (azul). Las líneas discontinuas representan comparaciones con una prueba chi-cuadrada.

En un intento por abordar si las neuronas cortico-estriatales de M2 o M1 codificaban parámetros de las secuencias, registramos *in vivo* a partir de neuronas cortico-estriatales foto-identificándolas de manera antidrómica (Díaz-Hernández et al., 2018; Lima et al. 2009). Para esto, primero confirmamos la región lateral del estriado (LS) que es inervada por proyecciones de M2 y M1 (Fig. 6A-D) (Hintiryan et al., 2016; Hunnicutt et al., 2016; Oh et al., 2014; Sohur et al., 2014).

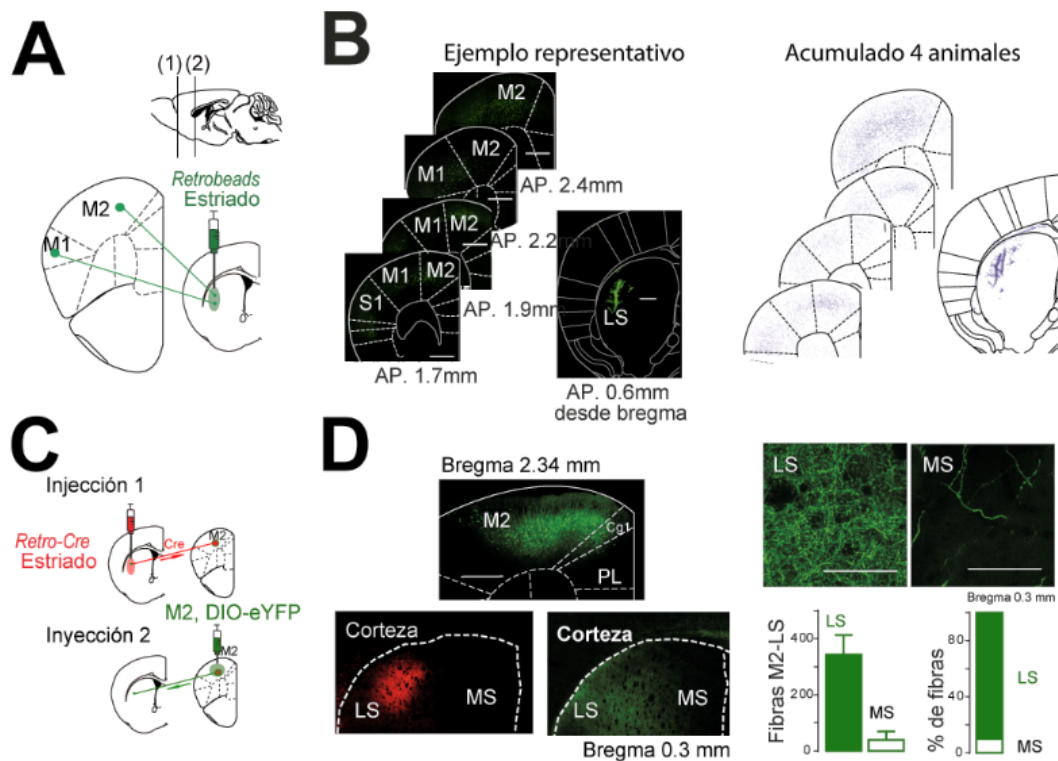


Figura 6. Confirmación de las células M2-M1 y sus proyecciones en el estriado lateral. (A) Esquema de trazado retrógrado de neuronas M2 y de M1 (izquierda) marcadas con *retrobeads* en el estriado lateral (derecha). (B) Paneles izquierdos, microfotografías coronales anteroposteriores que muestran células marcadas con *retrobeads* en M2 / M1 (izquierda) en el estriado lateral, escala de 500 micras. Paneles de la derecha, diagramas que muestran la suma de 4 animales que fueron inyectados con *retrobeads* en el estriado lateral en código de color binario. (C) Esquema de trazado anterógrado de la corteza premotora mediante la inyección de AAV-Retro-Cre-mCherry en el estriado lateral (inyección1) y AAV-DIO-eYFP en la corteza premotora (M2; inyección2). (D) Las microfotografías de la izquierda representan el ejemplo de un animal del experimento descrito en C. Corteza preliminar (PL), Corteza cingulada (Cg1). Escala 500 μ m. Microfotografías derechas: estriado lateral (LS) y el estriado medial (MS) mostrando las proyecciones premotoras cortico-estriatales marcadas en verde, escala 50 μ m. Las barras muestran la cuantificación de las fibras M2 que alcanzan el estriado lateral en AP. 0.3 de Bregma (coordinada donde se encontraron la mayoría de las puntas de las fibras de la inhibición optogenética).

Luego, entrenamos ratones en los que la proteína *Channelrodopsin* (ChR2) se expresó en neuronas corticales excitadoras en M2 y sus proyecciones al estriado (n = 4) o M1 (n = 2) (usando ratones *Emx1-Cre*) (Gorski et al., 2002; Guo et al., 2000). Esto seguido de la implantación de una matriz de electrodos por encima de la expresión de ChR2 y una fibra óptica en el LS para activar de forma antidrómica las unidades cortico-estriatales (**Fig. 7A-B**) (Friedman et al., 2015). Siguiendo este procedimiento, y luego de un desempeño estable en la ejecución de bloques de secuencias, se registró la actividad de las unidades de la corteza M2 o M1. Durante estas sesiones, registramos unidades corticales y foto-identificadas cortico-estriatales (PID). Una unidad PID era una unidad que, al finalizar la sesión, respondía a la estimulación de la luz con una latencia corta (<10 ms) (Díaz-Hernández et al., 2018). La latencia media de las neuronas registradas fue (M2 + M1 → LS) 5.1 ± 0.4 ms (n = 21; **Fig. 7B**, panel inferior derecho). Siguiendo estos criterios, identificamos 10 unidades PID cortico-estriatales en M2 y 11 en M1 (**Fig. 7C**). Al igual que en las unidades no PID (**Fig. 5B**), la mayor proporción de unidades PID presentó regresiones significativas entre la duración de las secuencias y la tasa de disparo antes del inicio, la duración y la tasa de disparo media durante la ejecución de las secuencias (columnas i-ii, **Fig. 7C**).

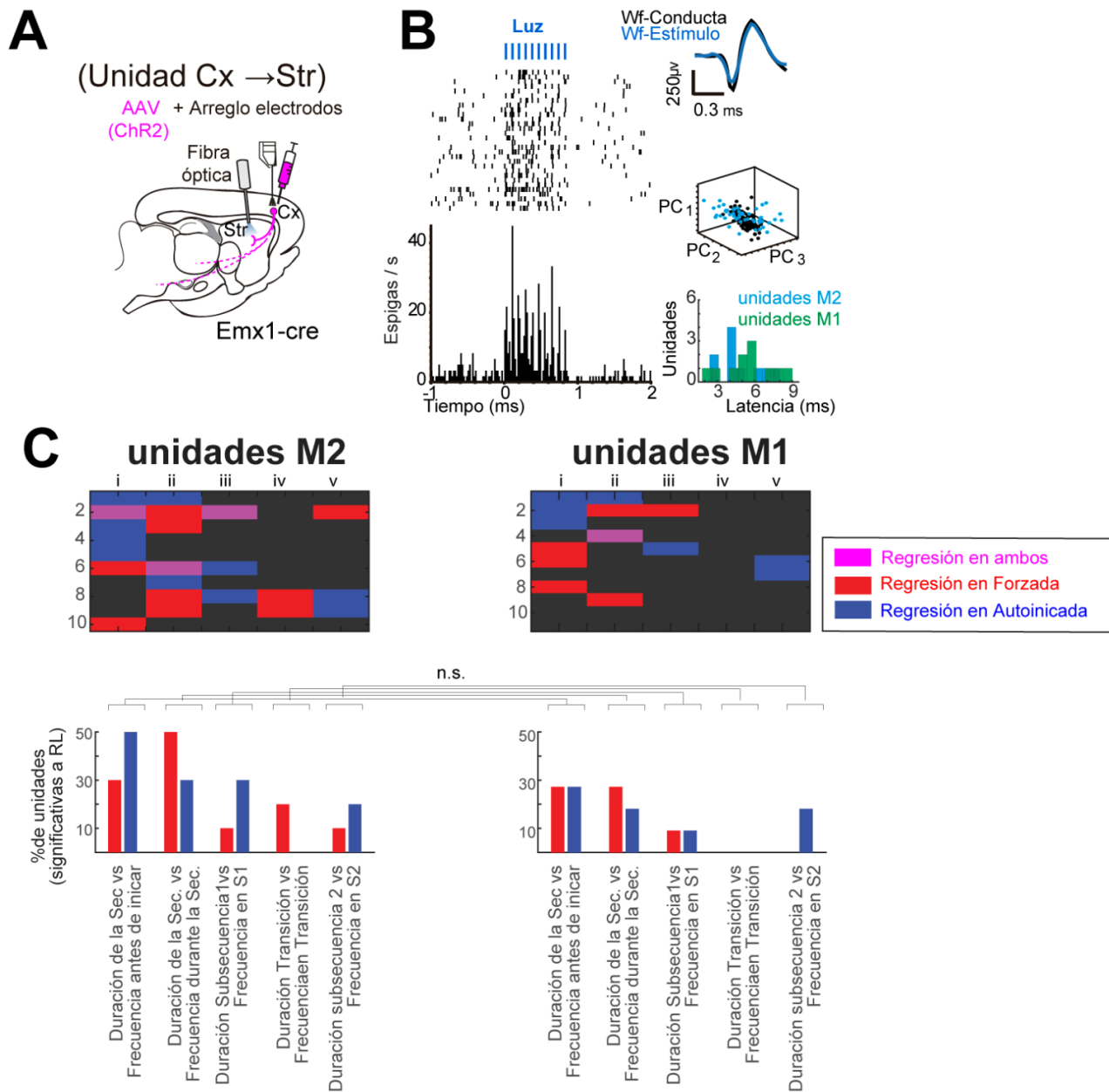


Figura 7. Las neuronas cortico-estriatales M2 y M1 fotoidentificadas codifican parámetros temporales de la ejecución de secuencias de acciones. (A) Diagrama del sitio de inyección para expresar chanelrodopsina-2 (ChR2) en la corteza M1 o M2 y sus proyecciones, el arreglo de electrodos (corteza M2 o M1) y la implantación de fibra óptica ipsilateral en el estriado lateral. (B) Ejemplo de diagrama del registro de una unidad fotoidentificada cortico-estriatal y el histograma del histograma peri-evento alineado al comienzo del primer pulso en un tren de luz azul (10 Hz; 2 mW, 473 nm). Paneles derechos: media de las formas de la espiga, análisis de componentes principales durante el comportamiento (negro) y durante el protocolo de fotoidentificación (azul) y la latencia de respuesta. (C) Paneles de filas superiores, análisis de regresión significativa por unidad. Columnas: i) entre la tasa de disparo (TD) un segundo antes de iniciar de las secuencias frente a la duración de las secuencias; ii) TD media durante las secuencias frente a la duración de las secuencias; iii) TD en la subsecuencia1 (S1) frente a la duración de S1; vi) TD durante la transición frente al tiempo de transición y v) TD durante la duración de la subsecuencia2 frente a la subsecuencia2. Paneles de la fila inferior: Proporción de unidades que presentaron regresión significativa ($R^2 > 0.6$ y $p < 0.05$) durante las secuencias Forzada (rojo) o Autoiniciada (azul). A pesar de las tendencias, no se encontró diferencia significativa en las proporciones intra-región o inter-región, $p < 0.05$, prueba chi-cuadrada.

Resumiendo, las **Fig. 4, 5 y 7** muestran que la actividad de M2 y M1 está relacionada con la ejecución de una secuencia de acciones. El análisis de la actividad normalizada de las unidades mostró que M2 tiene una modulación mayor que M1 durante la ejecución e incluso antes del inicio de las secuencias. Además, el análisis de regresión lineal mostró que tanto M2 como M1 contienen unidades que codifican la longitud de las secuencias de acciones.

La inhibición de las neuronas del estriado lateral antes de iniciar una secuencia de acciones afecta su ejecución.

El principal interés de este estudio fue establecer si las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora y motora contribuyen a la ejecución de estas secuencias. Para abordar este punto, primero verificamos si la actividad de las neuronas del estriado lateral (LS) en la región que recibe entradas de M2 y M1 (**Fig. 8, A-D**) contribuye a la ejecución de secuencias de acciones.

Entrenamos un grupo de animales en los que la opsina inhibitoria *archaerhodopsin* (Arch3.0) se inyectó bilateralmente en el LS seguido de la implantación de fibras ópticas por encima del sitio de inyección (**Fig. 8A**). Realizamos sesiones de inhibición optogenética (2 segundos de duración continua, 20 mW), en tres protocolos: antes de iniciar durante la ejecución y durante la transición entre subsecuencias (**Fig.8** columna **BG, HM y NR**, respectivamente).

Como resultado de estas manipulaciones, observamos que la inhibición antes de iniciar las secuencias retrasó la latencia para iniciar (**Fig. 8C**) y disminuyó la probabilidad de romper las secuencias autoiniciadas en la subsecuencia2 (**Fig. 8D**). La inhibición durante la ejecución de las secuencias mostró una tendencia a incrementar los cambios apresurados (**Fig. 8J**, panel 3) y también disminuyó las secuencias largas correctas S1 Autoiniciadas (**Fig. 8K**), lo que disminuyó el número de presiones. (**Fig. 8M**). La inhibición durante la transición aumentó el

tiempo de transición entre las subsecuencias forzadas y mostró una tendencia a aumentar en las transiciones de ensayos autoiniciados (**Fig. 8R**).

Note que las secuencias forzadas solo se presentan en las figuras para todas las manipulaciones optogenéticas cuando se detectaron efectos significativos; de lo contrario, solo se presentan en la tabla complementaria 1.

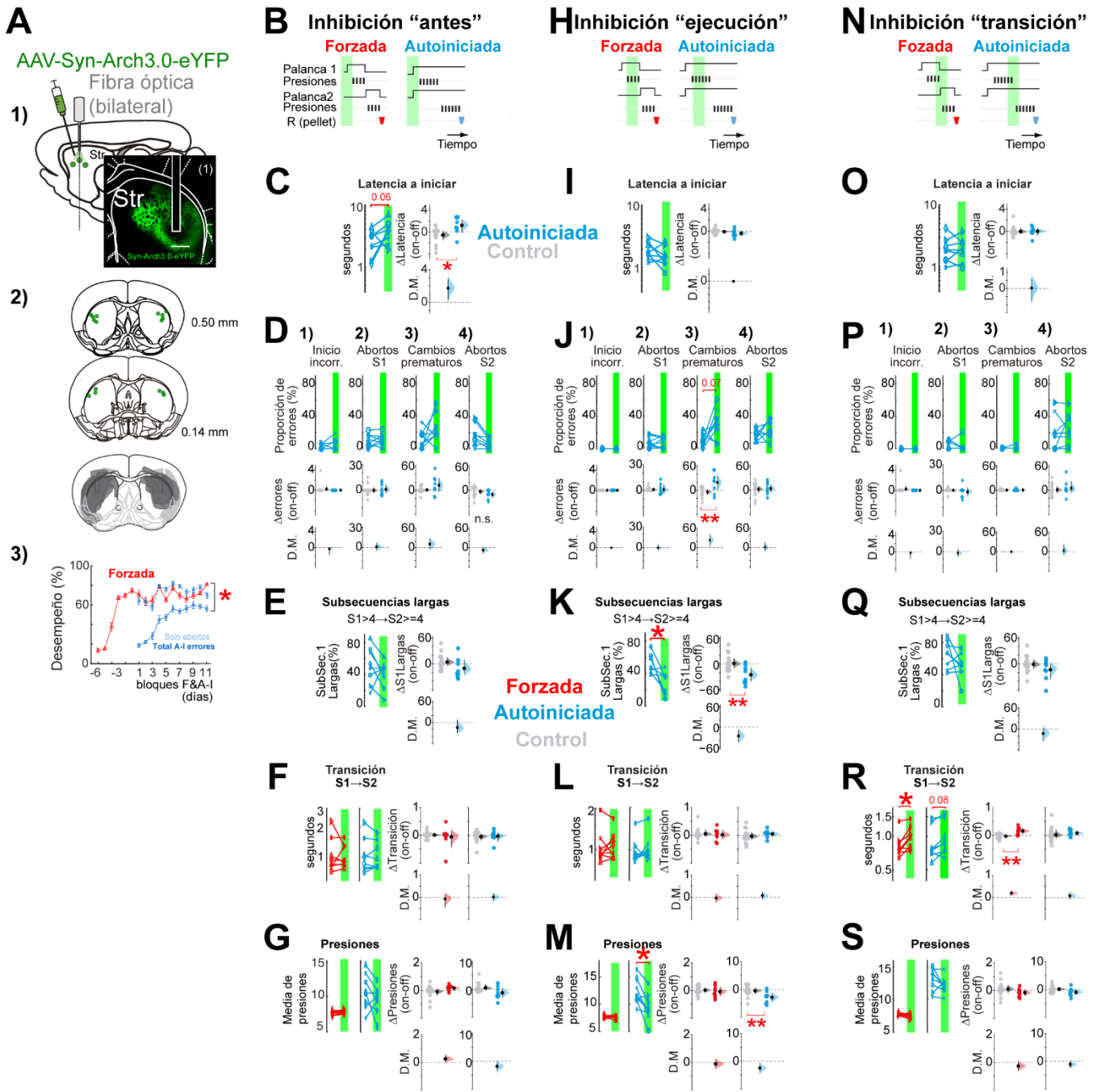


Figura 8. La inhibición de las neuronas del estriado lateral afecta el inicio y ejecución de las secuencias de acciones.

(A) Panel 1 inyección de *Arch3.0* (bajo el promotor de sinapsina; Syn-*Arch3.0*) en el estriado lateral (LS) y el sitio del implante de una fibra óptica. Microfotografía de una sección coronal a nivel estriatal representando la expresión de *Arch3.0* (un animal). Panel 2 ilustra las puntas de las fibras ópticas en el estriado lateral (LS) de 8 animales (puntos verdes). La sección coronal de las sombras en gris representa la extensión de expresión de *Arch3.0*. Panel 3, porcentaje de secuencias correctas (correctas / errores + correctas) durante el entrenamiento. (B), (H) y (N) Esquemas de los protocolos de inhibición. Las sombras verdes representan 2 segundos de luz continua, secuencias forzadas (rojo) y autoiniciadas (azul). B: inhibición antes del inicio, desencadenada por la rotura de un sensor infrarrojo, H: inhibición desencadenada por la primera presión en la ejecución, y N: inhibición desencadenada por la antepenúltima presión en la subsecuencia 1. (C) (I) (O) Efecto de la inhibición de las neuronas del LS sobre la latencia para iniciar secuencias forzadas o autoiniciadas. (D) (J) (P) (E) Paneles superiores 1-4, cuantificación por animal en ensayos *off* vs. *on* de la proporción de cada categoría de error. Paneles inferiores, relación de cambio on-off (Δ) de los datos pareados en la parte superior de cada panel, agregando el grupo control en gris. (E), (K) (Q) Como en C, I, O evaluando la proporción de veces para ejecutar subsecuencias largas-S1 ($S1 > 4 \rightarrow S2 > 4$). (F), (L) (R) Como en C, I, O evaluando el tiempo de transición entre subsecuencias forzadas y autoiniciadas. (G), (M) (S) Como en C, I, O evaluando el

número de presiones en secuencias forzadas y autoiniciadas En cada gráfico, cada línea representa el efecto medio por animal durante las pruebas de inhibición optogenética (activada; sombra verde) frente a las pruebas sin inhibición (desactivada; sin sombra) de la misma sesión. Prueba t- permutada pareada, * $p < 0.05$. Comparación de la relación de cambio *on-off*(Δ) frente a animales control eYFP (n=16) con prueba t- permutada no pareada, * $p < 0.05$. D.M. = Diferencia media del cambio en los valores *on-off*(Δ) contra el gpo. control. Los valores p exactos se describen en el texto y en la Tabla 1.

La inhibición de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora y motora, antes de iniciar una secuencia de acciones, retrasa la iniciación, pero solo las proyecciones de la corteza premotora afectan la ejecución.

Una vez comprobado que la actividad intacta del estriado lateral es requerida para la ejecución de secuencias, nos preguntamos si las proyecciones cortico-estriatales premotoras (M2 \rightarrow LS) o motoras (M1 \rightarrow LS) contribuían a la ejecución de estas secuencias. Para este propósito, verificamos la inhibición de las proyecciones cortico-estriatales usando Arch3.0 y pulsos de luz de 2 segundos (**Fig. 10A**). Esta duración del pulso de luz está en el rango adecuado lejos de las limitaciones biofísicas del uso de Arch3.0 para inhibiciones optogenéticas (Díaz-Hernández et al., 2018; Mahn et al., 2016). Además, debido a que sabemos que existen proyecciones corticales que proyectan a otros sitios subcorticales además del estriado (Cowan and Wilson, 1994), evaluamos la proporción de células marcadas en M2 / M1 que contienen axones corticofúgales que cruzan el área de nuestras manipulaciones (**Fig. 9**), observando una muy pequeña proporción de proyecciones corticofúgales de los principales centros de proyección de la corteza motora cruzando por donde hicimos nuestra manipulaciones (**Fig. 9D**).

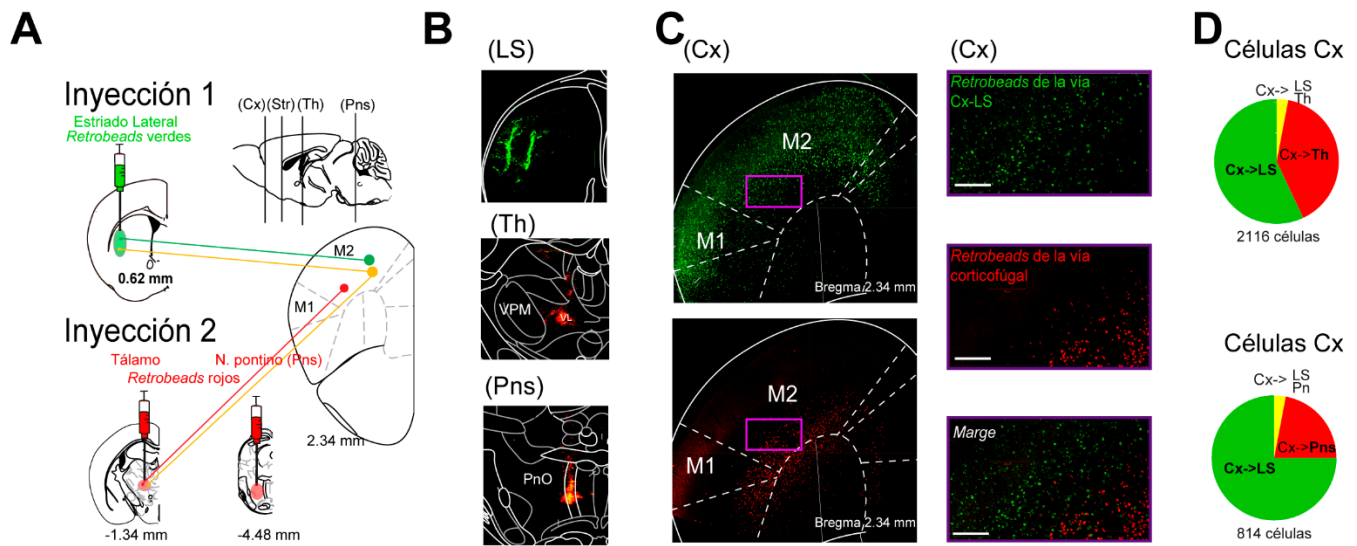


Figura 9. Células marcadas retrógradamente M2 / M1 del estriado lateral (LS), el tálamo (Th) y el puente (Pns). (A) Diagrama del experimento para trazar retrógradamente proyecciones corticofúgales hasta el tálamo o al núcleo pontino dejando colaterales en el estriado lateral (LS). Arriba a la izquierda: primera inyección del trazador retrógrado (*retrobeads* verdes) en el LS. Paneles inferiores, segunda inyección del trazador retrógrado (*retrobeads* rojos) en el tálamo o el puente. Arriba a la derecha, diagrama de una sección sagital que muestra el nivel anteroposterior del estriado, el tálamo o el puente (líneas verticales negras). Abajo a la derecha, un diagrama coronal que ilustra las neuronas de proyección cortical M2 hacia el estriado lateral (verde) o el tálamo (rojo), o las células que se proyectan hacia ambas (amarillo) regiones. (B) Microfotografías de los sitios de inyección con *retrobeads* en el estriado lateral (LS; verde) o el tálamo (Th; rojo) o el puente (Pns; rojo). (C) Paneles izquierdos, verde: células cortico-estriatales M2 / M1, rojo: células cortico-talámicas M2 / M1. Los paneles de la derecha son un acercamiento de los rectángulos morados de la izquierda. Barras de escala 200 μ m. (D) Porcentaje de células de proyección diana única y células que alcanzan el tálamo o la protuberancia dejando colaterales en el estriado lateral. Verde: proporción de células que solo se dirigen al estriado lateral, proporción de células rojas que se dirigen al tálamo (arriba) o al puente (abajo). En amarillo está la proporción de células de proyección al LS y el tálamo (arriba) o el LS y el puente (abajo) simultáneamente.

Posteriormente, y para probar si la contribución de las proyecciones cortico-estriatales son tiempo-dependientes (Li et al., 2016; Nakayama et al., 2018), realizamos inhibiciones optogenéticas de las proyecciones M2 \rightarrow LS o M1 \rightarrow LS, utilizando tres protocolos: a) antes del inicio (Fig. 11), b) durante la ejecución (Fig. 12) y c) durante la transición entre subsecuencias (Fig. 13). Para llevar a cabo estos experimentos, a un grupo de ratones Emx1-Cre se les inyectó un vector viral con el propósito de lograr la expresión de Arch3.0-eYFP bilateralmente en M2 (n=9) o M1(n=8) (o eYFP para animales control; n=9) y se implantaron bilateralmente con fibras ópticas en el LS (Fig. 10B). Después de la cirugía, se dejó a los animales recuperar durante tres días antes de reiniciar el entrenamiento y continuar hasta que el desempeño fuera estable

y proseguir con la sesión de inhibición optogenética (**Fig. 11B**). Durante estas sesiones, y dependiendo del protocolo, se aplicó aleatoriamente un pulso continuo (2 segundos) de luz verde en el 50% de las secuencias, lo que nos permitió comparar los efectos de la inhibición de la luz en cada animal dentro de la misma sesión.

Para el protocolo de inhibición "antes", nuestro objetivo fue evaluar si las proyecciones cortico-estriatales contribuían a la ejecución de las secuencias al interferir con la preparación de la ejecución de las secuencias. Para ello, aprovechamos el comportamiento estereotipado de los animales entrenados. Colocando un haz de luz infrarroja entre el comedero y la palanca (línea punteada, flecha roja, al salir del comedero; **Fig. 11A**). Al cruzar el haz infrarrojo era posible mandar un pulso de luz antes del inicio de las secuencias (Tecuapetla et al., 2016).

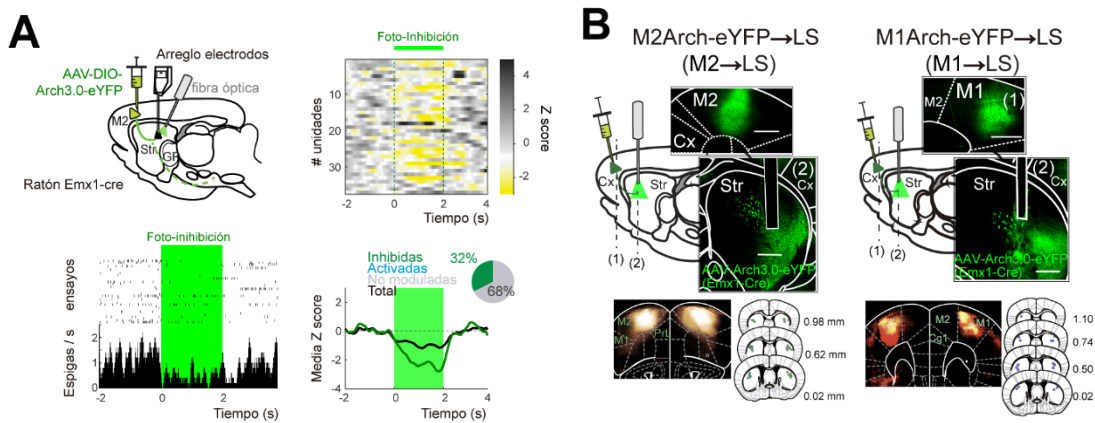


Figura 10. Inhibición de las células estriatales por la inhibición específica de las terminales corticales y posición de la punta de las fibras de los animales utilizados para los diferentes protocolos de inhibición (A) Diagrama superior izquierdo, sitio de inyección de Arch3.0 e implante de una matriz de electrodos + fibra óptica en el estriado lateral. Panel superior derecho, actividad de varias unidades registradas en el estriado en puntuación z alineadas a la inhibición de las proyecciones cortico-estriatales M2 en el estriado lateral (sombra verde). Abajo a la izquierda, histograma peri-evento representativo de la actividad de una unidad estriatal alineada con la inhibición de las proyecciones cortico-estriatales M2 (sombra verde). Abajo a la derecha, puntuación z media para las unidades que disminuyeron su actividad (verde) o para todas las unidades registradas (negro) durante la inhibición. Recuadro: gráfico circular que muestra la proporción de unidades moduladas y no moduladas (comparando el tiempo basal con la luz). **(B)** Paneles superiores: diagramas sagitales y microfotografías corticales de la inyección de Arch3.0 en las cortezas M2 (n=9) o M1 (n=8) y track de las fibras ópticas en el estriado lateral (Str). Barra de escala: 500 μm. Paneles inferiores: Microfotografía que muestra el promedio de expresión de Arch3.0 de los grupos correspondientes. Diagramas coronales representan la posición de las puntas de la fibra óptica en el estriado lateral (puntos grises: Arch3.0; puntos grises: eYFP).

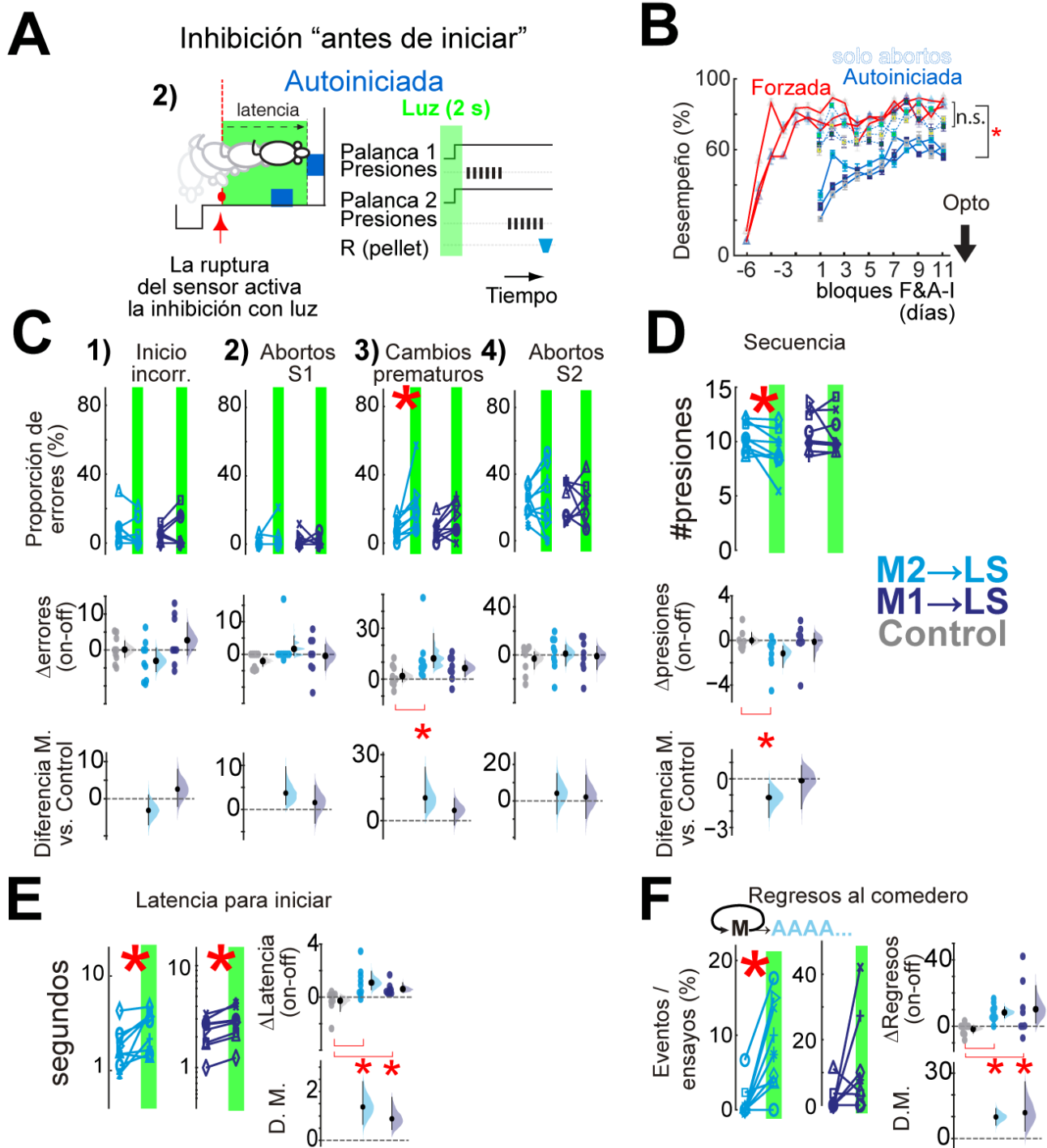


Figura 11. La inhibición de las proyecciones premotoras y motoras-estriatales antes de iniciar afectan la iniciación, pero solo la primera interrumpe la ejecución. (A) Esquema del protocolo de inhibición “antes” para secuencias Forzadas y Autoiniciadas. La inhibición de la luz (2 segundos continuos) se activa al romper el sensor infrarrojo (líneas rojas discontinuas –en los esquemas). **(B)** Porcentaje de secuencias correctas (correctas / errores + correctas) durante el entrenamiento. **(C)** Paneles superiores 1-4, cuantificación por animal en los ensayos *off* vs *on* de la proporción de cada categoría de error. Paneles inferiores, efecto del cambio de los datos pareados on-off (Δ) en la parte superior de cada panel. **(D)** Efecto de la inhibición sobre el número de presiones. Paneles inferiores: efecto del cambio de los datos pareados on-off (Δ). **(E)** Efecto de la inhibición de las proyecciones cortico-estriatales sobre la latencia para iniciar secuencias autoiniciadas. Panel derecho, efecto del cambio de los datos pareados on-off (Δ). **(F)** Efecto de la inhibición de las proyecciones cortico-estriatales sobre la proporción de veces que los animales cruzaron el sensor regresaban al comedero (ver [Video S4](#)). En los gráficos pareados, cada línea representa el efecto medio por animal durante los ensayos de inhibición optogenética (encendido; sombra verde) frente a ensayos sin

inhibición optogenética (apagado; sin sombra) de la misma sesión. Prueba t- permutada pareada, * p <0.05. Comparación de la relación de cambio *on-off*(Δ) frente a animales control eYFP (n=9) con prueba t- permutada no pareada, * p <0.05. D.M. = Diferencia media del cambio en los valores *on-off*(Δ) contra el gpo. control. Los valores p exactos se describen en el texto y en la Tabla 1.

La mayoría de los efectos por parte de la inhibición optogenética se produjeron en secuencias autoiniciadas. Por lo tanto, para las **figuras 11-13**, las secuencias forzadas solo se presentan cuando se detectaron efectos; de lo contrario, solo se presentan las secuencias autoiniciadas. No obstante, los datos de las inhibiciones en secuencias forzadas se encuentran en la tabla complementaria 1.

La inhibición de las proyecciones M2→LS antes del inicio aumentó los cambios prematuros entre subsecuencias (M2 → LS Autoiniciado-*On* = 20 ± 5 vs. M2 → LS Autoiniciado-*Off* = 8 ± 1 ; la diferencia media fue $12.2[95\%IC\ 6.8,27]$ y $p = 0.0001$, prueba t-pareada permutada 2-colas, **Fig. 11C**, panel 3, datos azul claro; ver **Video 3**). Este efecto fue específico de la inhibición de Arch3.0 ya que no se observó en los animales control (comparación de la relación $\Delta On-Off$ contra el grupo control; la diferencia media no-pareada fue $10.4[95\%IC\ 3.7,2.4]$ el valor p de una prueba t-no-pareada permutada 2-colas fue 0.022; **Fig. 11C**, panel 3, parte inferior). El aumento de los cambios prematuros se acompañó de una disminución de las presiones de las secuencias autoiniciadas (Autoiniciado-*On* = 9 ± 0.6 vs Autoiniciado-*Off* = 10 ± 0.4 ; la diferencia media fue $-1.16[95\%IC\ -2.42, -0.495]$ y $p = 0.016$, prueba t-pareada permutada 2-colas, **Fig. 11D**, panel 1, datos azul claro).

Este protocolo de inhibición también aumentó la latencia para iniciar (M2→LS Latencia-*On* = 2.9 ± 0.4 vs. M2 → LS Latencia-*Off* = 1.8 ± 0.3 ; la diferencia media fue $1.1[95\%IC\ 0.5, 1.9]$ y $p = 0.0026$, prueba t-pareada permutada 2-colas; **Fig. 11E**, panel izquierdo azul claro; las secuencias forzadas también incrementaron de manera significativa, **Tabla 1**). Un efecto también fue específico para la inhibición de Arch3.0, ya que no se observó en los animales

control (comparación con el grupo de eYFP, la diferencia media no-pareada fue 1.37[95%IC 0.6,2.4] el valor p de una prueba t-no-pareada permutada 2-colas fue 0.0028; **Fig. 11E**, panel de $\Delta On-Off$). Este aumento de la latencia se acompañó de un aumento en el regreso de los animales al comedero en los ensayos que recibieron inhibición de la luz. Como si la inhibición interrumpiera el inicio del orden serial adecuado (ver **Video S4**; Regresos al comedero- $On=9\pm 2\%$ vs. Regresos al comedero- $Off=1\pm 0.7\%$, la diferencia media fue 8.2[95%IC 5.1, 11.7] y $p = 0.006$, prueba t-pareada permutada 2-colas; comparación contra el grupo control-eYFP, la diferencia media no-pareada fue 9.8[95%IC 6.0,13.8] el valor p de una prueba t-no-pareada permutada 2-colas fue 0.0002; panel $\Delta On-Off$ **Fig. 11F**).

El aumento de los cambios prematuros y la disminución del número de presiones de las secuencias no se observaron cuando inhibimos las proyecciones $M1 \rightarrow LS$ (**Fig. 11C-D**, datos azul oscuro). Por el contrario, la inhibición de las proyecciones $M1 \rightarrow LS$ también aumentó la latencia para iniciar las secuencias autoiniciadas ($M1 \rightarrow LS$ Latencia- $On = 3.2 \pm 0.4$ vs. $M1 \rightarrow LS$ Latencia- $Off = 2.6 \pm 0.3$; la diferencia media fue 0.6[95%IC 0.4, 1.1] y $p = 0.009$, prueba t-pareada permutada 2-colas; **Fig. 11E**; comparación contra control: la diferencia media no-pareada fue 0.8[95%IC 0.4, 1.7] el valor p de una prueba t-no-pareada permutada 2-colas fue 0.003; panel $\Delta On-Off$ misma figura, datos azul oscuro vs. gris), y los retornos al comedero (comparación con el grupo control: : la diferencia media no-pareada fue 11.8[95%IC 3.3, 26.1] el valor p de una prueba t-no-pareada permutada 2-colas fue 0.02; panel $\Delta On-Off$ en la misma figura, azul oscuro vs. datos en gris; **Fig. 11F**).

En conjunto, estos resultados sugieren que las proyecciones $M2 \rightarrow LS$, pero no $M1 \rightarrow LS$ contribuyen a la ejecución/estructuración de una secuencia de acciones de orden serial autoiniciada, mientras que ambas proyecciones $M2 \rightarrow LS$ y $M1 \rightarrow LS$ contribuyen a la adecuada iniciación.

La inhibición de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora durante la ejecución disminuyeron las subsecuencias largas

Una predicción de la contribución de las proyecciones cortico-estriatales en la ejecución de secuencias de orden serial es que su contribución dependería del tiempo en la secuencia [ver **Fig. 3-5** y (Li et al., 2016; Nakayama et al., 2018)]. Por lo tanto, realizamos un segundo protocolo: inhibición en la "ejecución", lográndolo al presentar la inhibición liberada por la primera presión en S1 (**Fig. 12A**). Utilizando este protocolo, observamos que la inhibición de las proyecciones M2→LS no modificó la proporción de las diferentes categorías de errores (**Fig.12B**), ni el número de presiones en las secuencias (**Fig.12C**), pero sí disminuyó la proporción de hacer secuencias largas en la sub-secuencia1 (M2 → LS *On* = $35 \pm 5\%$ vs M2 → LS *Off* = $50 \pm 6\%$, la diferencia media fue $-14.6[95\%IC -18.9, -9.8]$ y $p = 0.002$, prueba t-pareada permutada 2-colas, paneles superiores **Fig.12D**; comparación contra el grupo control-eYFP: la diferencia media no-pareada fue $-18.4[95\%IC -28.3, -8.8]$ el valor p de una prueba t-no-pareada permutada 2-colas fue 0.003, **Fig. 12D**, panel inferior), sin efecto global sobre la duración o el número de presiones en las secuencias (ver **Tabla 1**). La inhibición de las proyecciones M1 → LS no produjo ningún efecto significativo con el protocolo de inhibición en la "ejecución" (**Fig. 12**, datos azul oscuro).

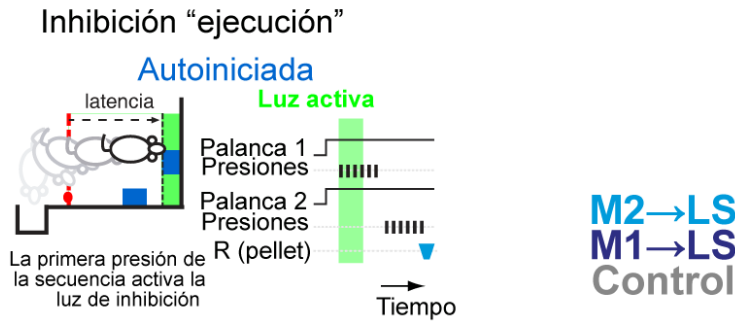
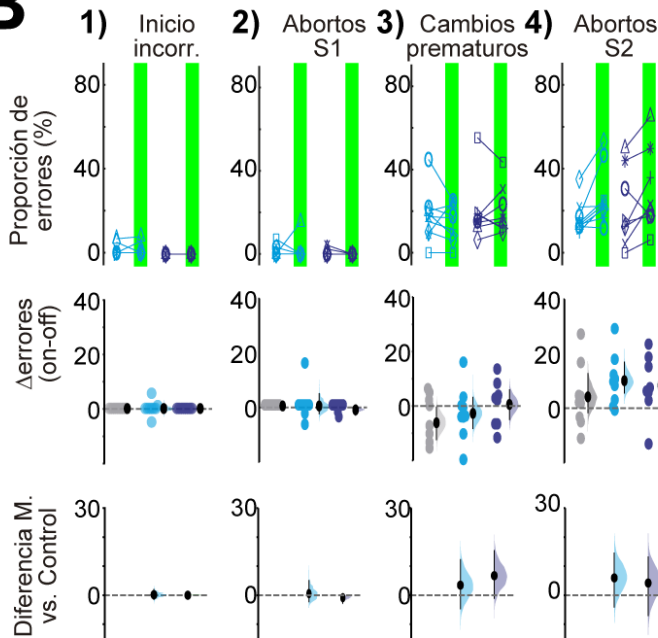
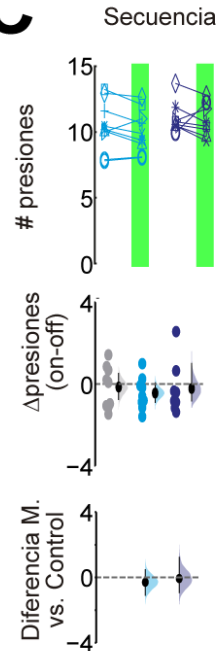
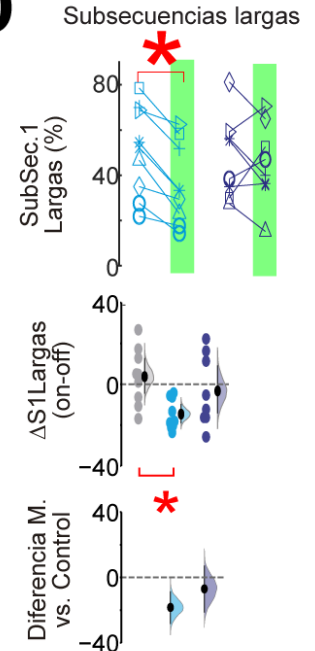
A**B****C****D**

Figura 12. La inhibición de las proyecciones premotoras cortico-estriatales al inicio de la ejecución disminuyó las secuencias Largas-S1. (A) Esquema del protocolo de inhibición en la “ejecución”, en este caso, la inhibición de la luz se desencadenó con la primera presión en la secuencia de secuencias forzadas o autoiniciadas. La sombra verde representa 2 segundos de inhibición continua con luz. **(B)** Paneles superiores 1-4, cuantificación por animal en los ensayos *off* vs *on* de la proporción de cada categoría de error para el grupo de animales inhibidos en las terminales de M2 (azul claro; n=9) y M1 (azul oscuro; n=8). Paneles inferiores, relación de cambio *on-off* (Δ) de los datos pareados en la parte superior de cada panel, agregando el grupo control en gris. **(C)** Efecto de la inhibición sobre el número de presiones (derecha) y por subsecuencia, Subsecuencia 1 = S1, Subsecuencia2 = S2. Paneles inferiores: relación de cambio *on-off* (Δ) de los datos pareados en la parte superior de cada panel, agregando el grupo control gris. **(D)** Al igual que en B y C, se evalúa la proporción de subsecuencias S1 largas S1 > 4 → S2 > = 4). En los gráficos pareados, cada línea representa el efecto medio por animal durante los ensayos de inhibición optogenética (encendido; sombra verde) frente a ensayos sin inhibición optogenética (apagado; sin sombra) de la misma sesión. Prueba t- permutada pareada, * p < 0.05. Comparación de la relación de cambio *on-off* (Δ) frente a animales control eYFP (n=9) con prueba t- permutada no pareada, * p < 0.05. Diferencia M. = Diferencia media del cambio en los valores *on-off* (Δ) contra el gpo. control. Los valores p exactos se describen en el texto y en la Tabla 1.

Estos resultados de la inhibición de las proyecciones M2 → LS o M1 → LS en la ejecución de las secuencias resaltan que la actividad de las proyecciones M2 → LS son importantes para

la longitud en una secuencia de acciones serial (particularmente para S1). Además, estos resultados también sugieren que, una vez se ejecuta una secuencia de acciones, las proyecciones M1→LS pueden no ser necesarias para ejecutar secuencias de orden serial.

La inhibición de las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora en el momento de la transición aumentan el tiempo de transición entre subsecuencias

Hasta aquí, hemos mostrado que las proyecciones cortico-estriatales de M2→LS contribuyen a iniciar y ejecutar de forma adecuada secuencias de orden serial autoiniciadas (**Fig. 11 y 12**). Sin embargo, en los experimentos anteriores, la inhibición de la luz no alcanzó el momento de la transición entre subsecuencias. Dado que una pequeña proporción de unidades de M2 o M1 mostró una modulación significativa durante el momento de transición (**Fig. 4C-D**), nos preguntamos si la inhibición justo antes de la transición podría revelar si las proyecciones M2→LS o M1→LS contribuyen a la correcta transición entre subsecuencias. Para abordar esta pregunta, realizamos el protocolo de inhibición en la "transición", en este pretendimos que la penúltima presión de la sub-secuencia1 desencadenara la inhibición de la luz durante dos segundos (**Fig. 13A**; en secuencias forzadas, esto ocurrió en la 3° presión (penúltima, y para secuencias autoiniciadas se calculó por animal un día antes).

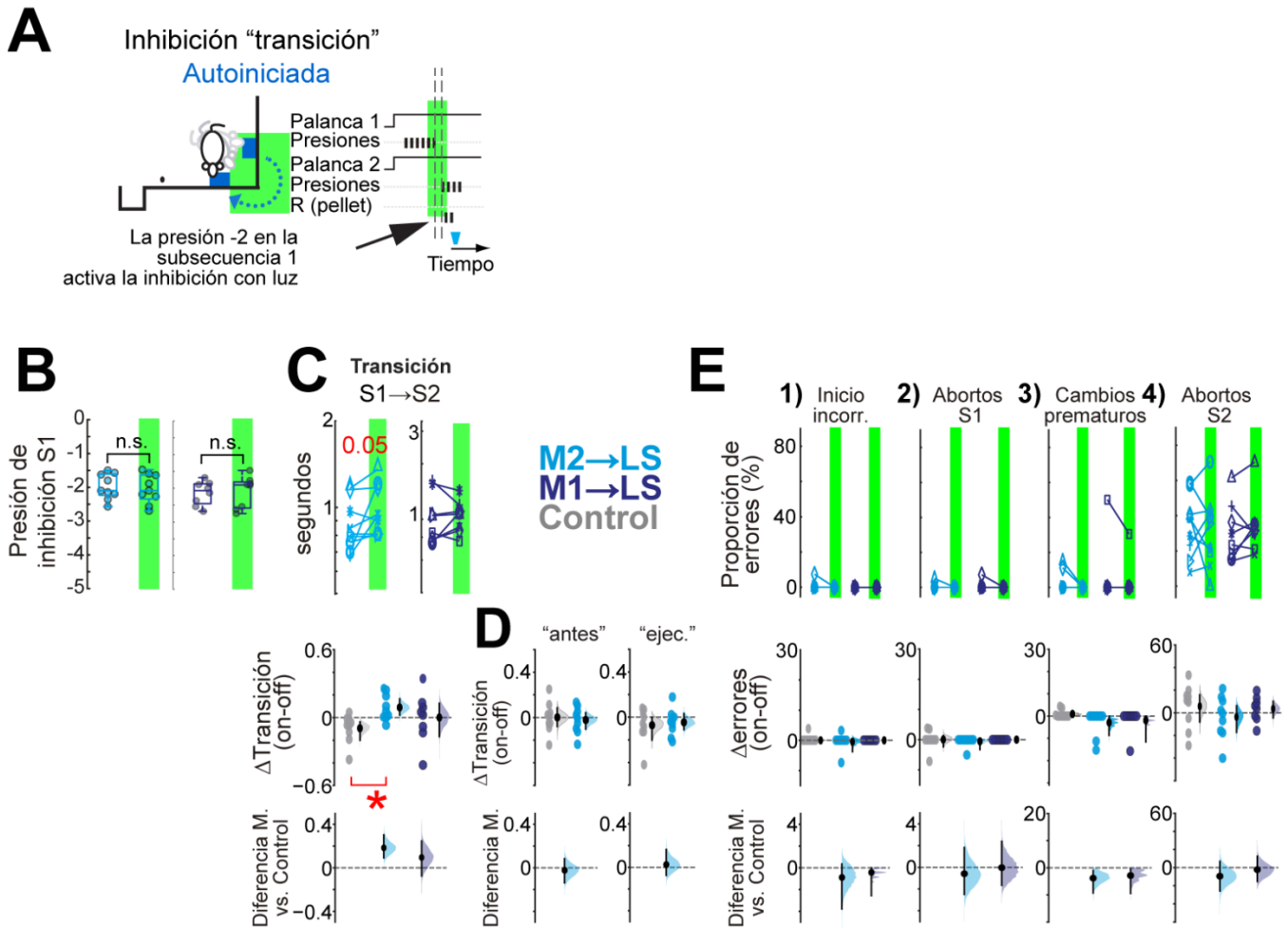


Figura 13. La inhibición de las proyecciones cortico-estriatales premotoras, pero no motoras en el momento de la transición aumenta el tiempo de transición dentro de una secuencia de orden serial. (A) Esquema del protocolo de inhibición en la "transición" en secuencias forzadas y autoiniciadas. La inhibición de la luz fue activada por la penúltima presión de la palanca de la subsecuencia 1. Las flechas punteadas y negras indican el período de transición. **(B)** Estimación de la presión que desencadenó la inhibición con luz para M2 (n=9) y M1 (n=8), azul claro y oscuro, respectivamente. **(C)** Paneles superiores, efecto de la inhibición de la proyección premotora o cortico-estriatal motora sobre el tiempo de transición para secuencias autoiniciadas. Panel inferior, la relación de cambio *on-off*(Δ) del panel superior más los datos de los animales control (gris; n=9). **(D)** Relación *on-off*(Δ) como en el panel inferior en C para los protocolos de inhibición "antes" y "ejecución" de M2→LS presentados en las figuras 4 y 5 respectivamente. **(E)** No se detectó ningún efecto por la inhibición de la proyección M2→LS o M1→LS en las diferentes categorías de errores. Paneles superiores 1-4, cuantificación por animal en los ensayos *off* vs *on* de la proporción de cada categoría de error. En los gráficos pareados, cada línea representa el efecto medio por animal durante los ensayos de inhibición optogénica (encendido; sombra verde) frente a ensayos sin inhibición optogénica (apagado; sin sombra) de la misma sesión. Prueba t- permutada pareada, * $p < 0.05$. Comparación de la relación de cambio Δ *on-off* frente a animales control eYFP (n=9; gris) con prueba t- permutada no pareada, * $p < 0.05$. Diferencia M. = Diferencia media del cambio en los valores *on-off*(Δ) contra el gpo. control. Los valores p exactos se describen en el texto y en la Tabla 1.

La **Figura 13B** muestra la media de la presión que desencadenó la inhibición en los animales de los grupos M2→LS o M1→LS (o en los ensayos *Off*); en promedio, fue la presión antepenúltima (-2) contando desde la última presión en la sub-secuencia 1 (M2→LS *On* = -2.0±0.1 vs. M2→LS *Off* = -1.9± 0.1, $p = 0.25$, prueba de Wilcoxon). Con este protocolo,

observamos que la inhibición de las proyecciones M2→LS, pero no M1→LS, tuvo una tendencia a aumentar la duración de la transición en las secuencias Autoiniciadas (M2 → LS Transición-On = 1.0 ± 0.06 vs M2 → LS Transición-Off = 0.8 ± 0.06 , la diferencia media fue 0.08 [95%IC 0.02, 0.16] y $p = 0.050$, prueba t-pareada permutada 2-colas; **Fig. 13C**, paneles superiores; comparación contra el grupo control-eYFP: la diferencia media no-pareada fue 0.18 [95%IC - 0.09, 0.3] el valor p de una prueba t-no-pareada permutada 2-colas fue 0.003; **Fig. 13C**, panel inferior). Este efecto fue específico del tiempo ya que ni el protocolo de inhibición "antes" ni el protocolo de "ejecución" produjeron un efecto similar (**Fig. 13D**). Este último efecto en la transición planteó la pregunta de si las proyecciones M2→LS tratan cada subsecuencia como segmentos independientes o los concatenan en una sola secuencia una vez que avanza el entrenamiento (Burgess et al., 2018; Geddes et al., 2018).

En resumen, mostramos que los ratones son capaces de realizar una secuencia de dos subsecuencias en orden serial y que las unidades de la corteza M2 como de M1 muestran actividad relacionada con el inicio y ejecución de una secuencia de acciones, teniendo M2 una mayor actividad al iniciar y ejecutar las subsecuencias (S1 y S2) que la corteza M1. Mostramos también que en términos de cuán correlacionada está la actividad de las unidades registradas con la longitud temporal de ambas cortezas muestran la misma proporción de unidades que codifican la longitud de la secuencia. Sin embargo, los registros electrofisiológicos no nos permitieron concluir si las proyecciones de premotora vs. motora contribuyen diferencialmente en la realización de una secuencia de acciones de orden serial. Por lo tanto, para distinguir si las proyecciones de alguna de estas cortezas tenían mayor contribución sobre la ejecución de secuencias realizamos inhibiciones optogenéticas de las terminales corticales en el estriado lateral. De estos experimentos observamos que, si inhibíamos las terminales tanto de la corteza M2 como M1 antes, de iniciar, se retrasaba la iniciación de las secuencias. Sin embargo, solo

la inhibición de M2→LS afecto la estructura serial de los elementos en una secuencia. Además, mostramos que una vez que los animales empezaron la secuencias las proyecciones cortico-estriatales ya no contribuyen en la secuencia. Por último, solo las inhibiciones de M2→LS, en el cambio entre subsecuencias, afecto la transición.

En conjunto, los resultados de los registros electrofisiológicos y los experimentos de inhibición revelaron que las proyecciones cortico-estriatales de M2 y M1 al estriado lateral tienen contribuciones específicas a la ejecución de las secuencias. Ambas proyecciones contribuyen al inicio, pero las de M2→LS contribuyen de manera más importante a la adecuada estructuración/ejecución y transición de secuencias de orden serial autoiniciadas. Destacando que la contribución de las M2→LS fue esencialmente durante el inicio de la ejecución, lo que sugiere que su contribución es relevante antes de iniciar y durante el inicio de en la ejecución, y disminuye a medida que avanza la ejecución de las secuencias.

Las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora son requeridas al inicio del aprendizaje para ejecutar adecuadamente secuencias de acciones autoiniciadas

Como se ha sugerido antes la corteza motora es requerida al inicio y no una vez consolidado el aprendizaje de una secuencia de movimientos (Hwang et al., 2019; Kawai et al., 2015), es por ello que preguntamos si las terminales M2→LS contribuyen a la ejecución de secuencias durante el inicio del aprendizaje de una secuencia de acciones autoiniciada. Para esto utilizamos un grupo de ratones Emx1-Cre a los cuales se les inyectó Arch3.0 en la corteza M2 y fibras ópticas en el estriado lateral (**Fig. 14A**). Después de 4 días de recuperación de la cirugía los animales se reiniciaron en el entrenamiento de secuencias como se mencionó antes (ver métodos). Una vez que los animales terminaron la fase de RF8, en la primera sesión de secuencias Forzadas se introdujo el protocolo de inhibición “antes” de iniciar (ver **Fig. 14B**).

Este protocolo de inhibición de las terminales cortico-estriatales de M2 se mantuvo en los 2 días restantes de entrenamiento Forzado y en los siguientes 6 días de bloques Forzado-Autoiniciado. Al cuantificar el porcentaje de secuencias correctas observamos que después de los días de inhibición el desempeño en secuencias autoiniciadas estuvo por debajo de los animales control incluso después de 15 días de entrenamiento en secuencias autoiniciadas (**Fig. 14C**, $p=0.003$, prueba U Mann-Whitney, panel A-I). Sin embargo, en secuencias forzadas, no se observó ningún cambio en el desempeño de los animales (**Fig. 14C**, $p=0.777$, prueba U Mann-Whitney panel F). Estos resultados muestran que las terminales de corteza premotora en el estriado lateral al inicio del aprendizaje son importantes para realizar secuencias autoiniciadas adecuadamente a lo largo del entrenamiento.

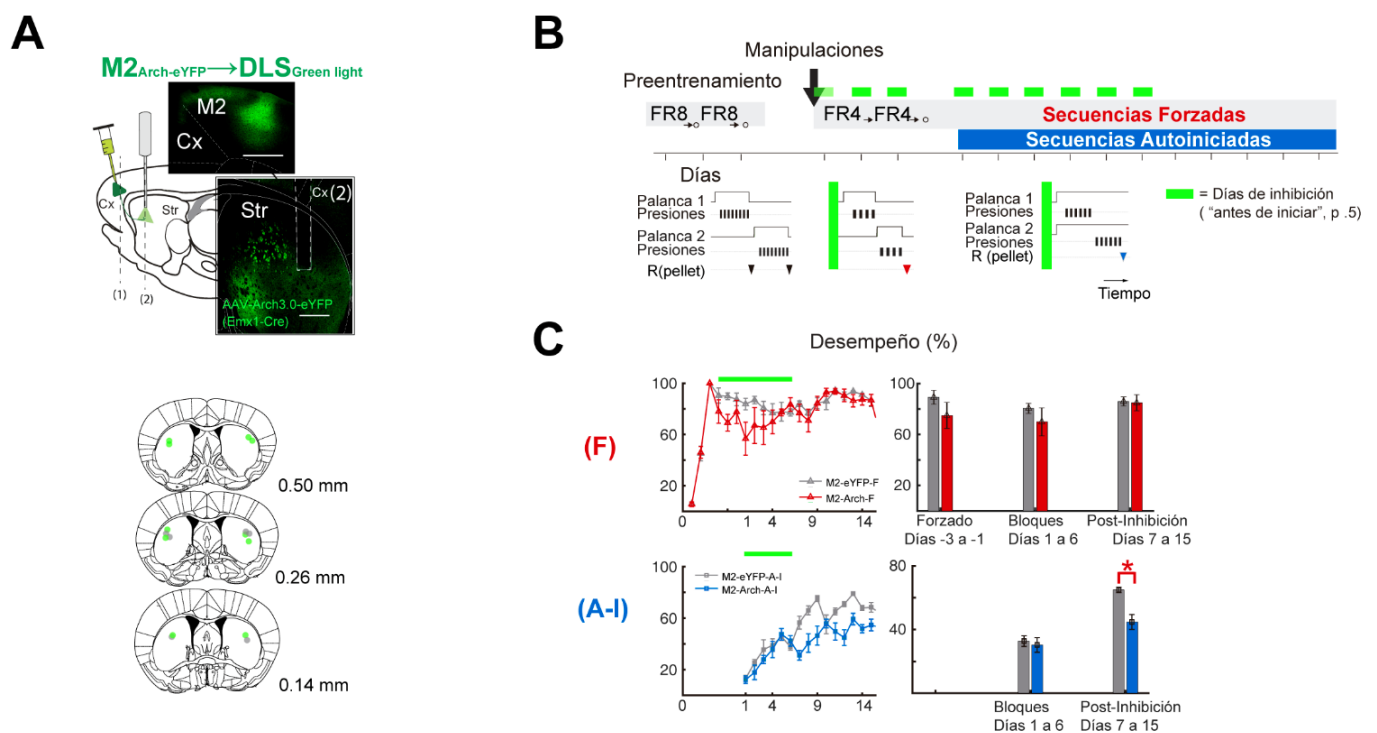


Figura 14. Las proyecciones premotoras cortico-estriatales son requeridas al inicio del aprendizaje para ejecutar adecuadamente secuencias autoiniciadas. (A) Paneles superiores: diagrama sagital y microfotografía cortical de la inyección de Arch3.0-eYFP en la corteza M2 (n=5) y track de la fibra óptica en el estriado lateral (Str). Barras de escala= 500 μ m. Paneles inferiores: Diagramas coronales que representan la posición de las puntas de la fibra óptica en el estriado lateral (puntos verdes: Arch3.0-eYFP; puntos grises: eYFP n=3). (B) Cronología del entrenamiento en secuencias de orden serial (ver métodos). Panel inferior, diagrama correspondiente de una secuencia en preentrenamiento, ensayos forzados y en bloques de Forzado-Autoiniciado. (C) Izquierda, Porcentaje de secuencias correctas en las secuencias forzadas (panel superior) y autoiniciadas (panel inferior). Derecha, promedio del porcentaje de secuencias correctas en los días de inhibición con luz (2 segundos, antes de iniciar,

aleatoriamente 50 % de las veces) correspondientes a las sesiones de secuencias forzadas (días -3 a -1), los días de secuencias Forzadas-Autoiniciadas (días 1 a 6) y los días después de la inhibición (días 7 a 15). * $p < 0.05$ prueba U Mann-Whitney.

Las proyecciones premotoras cortico-estriatales inervan con mayor fuerza sináptica las neuronas estriatales de la vía directa que las neuronas estriatales de la vía indirecta.

Para indagar en los mecanismos de modulación que las proyecciones de M2→LS puedan ejercer sobre las neuronas del estriado preguntamos si estas pudieran impactar diferencialmente sobre los dos subcircuitos de las neuronas de proyección estriatal: las vías estriatales directa (o estriatonigral) e indirecta (o estriatopalidal) (Wall et al., 2013).

Dada la posibilidad de registrar neuronas estriatales *ex vivo* de ambas vías por medio de marcadores fluorescentes (ver métodos), registramos intracelularmente neuronas estriatales en rebanadas coronales de cerebro de ratón *in vitro*. Para estos experimentos, cruzamos ratones de las líneas Emx1-Cre con ratones BAC D2-GFP. Los ratones resultantes nos permitieron expresar ChR2 en las neuronas de M2 y sus proyecciones al estriado, y al inyectar un trazador retrogrado rojo (retrobeads) en la sustancia negra, pudimos registrar en el estriado neuronas de la vía indirecta (GFP; iMSN) o la vía directa (retrobeads rojos; dMSN) mientras estimulábamos los axones M2→LS/ChR2 (**Fig. 15A-B**). Usando este procedimiento, registramos pares de neuronas en rebanadas de cerebro en el estriado lateral (una iMSN y una dMSN por rebanada; contrabalanceando el orden de registro por rebanada). Evocamos respuestas postsinápticas activando las terminales M2→LS/ChR2 con breves pulsos de luz (1 ms; **Fig. 15C**). A partir de estos experimentos, registramos un total de 6 pares de neuronas estriatales (en 6 rebanadas diferentes de 4 animales). La comparación de sus potenciales evocados postsinápticos mostró una mayor amplitud de corriente en neuronas dMSN que en iMSN (dMSN: 290 ± 100 vs iMSN = 30 ± 9 pA, prueba U de Mann Whitney, $p = 0.031$; **Fig. 15F**), pero sin diferencia en sus latencias de respuesta (dMSN: 3.3 ± 0.1 frente a iMSN = 3.8 ± 0.1 ms, prueba U de Mann

Whitney, $p > 0.05$; **Fig. 15F**). Estos potenciales postsinápticos evocados fueron bloqueados por el antagonista glutamatergico del receptor AMPA (**Fig. 15G**). De estos resultados se sugiere que las proyecciones M2→LS podrían tener conexiones sinápticas más fuertes sobre neuronas de la vía directa que sobre las de la vía indirecta *in vivo* cuando los animales están ejecutando las secuencias de acciones de orden serial.

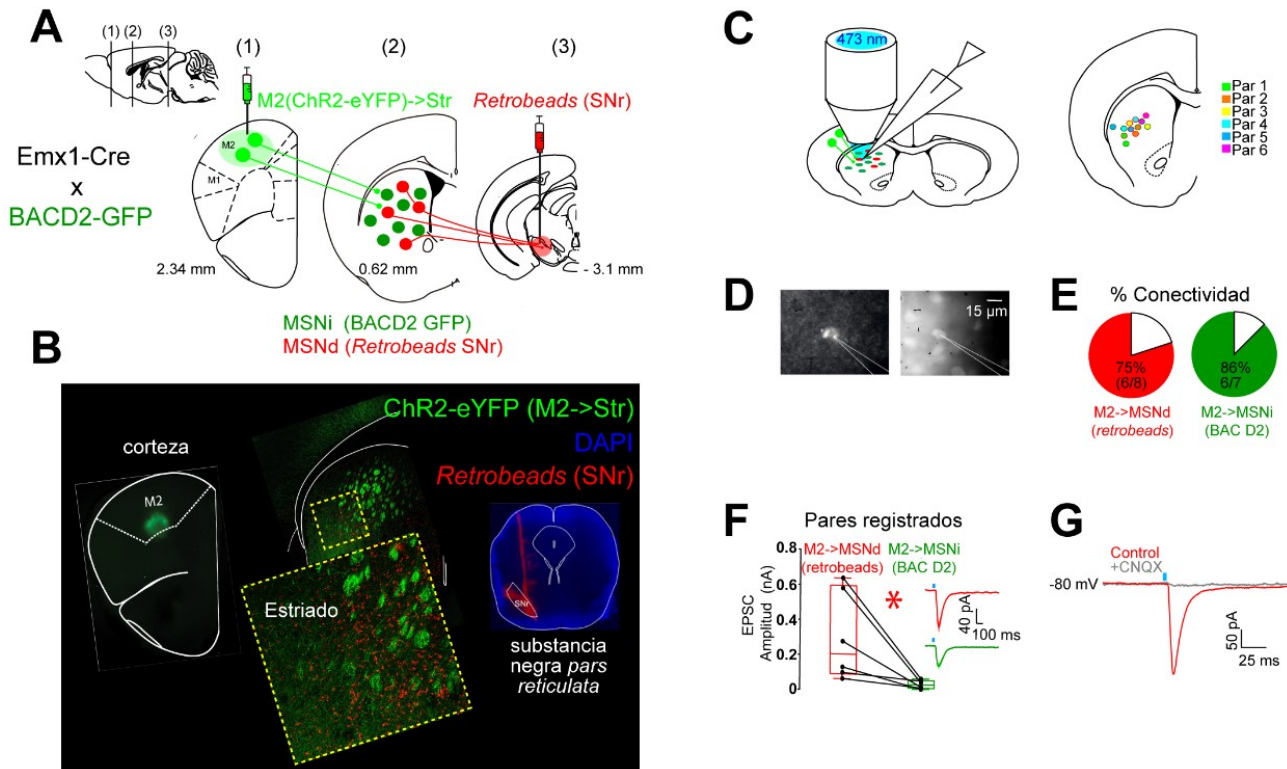


Figura 15. Las proyecciones premotoras cortico-estriales inervan con mayor fuerza sináptica la vía directa que las neuronas estriatales de la vía indirecta. (A) Diagrama de experimentos *ex vivo* para registrar la conectividad sináptica cortico-estriatal en los dos tipos de neuronas de proyección estriatal, estriatopallidal (iMSN) o estriatonigral (dMSN). Para ello, cruzamos par de ratones *Emx1-Cre x BACD2-GFP* e inyectamos *retrobeads* rojos en la sustancia negra (SNr) de estos animales para marcar con GFP y *red-retrobeads* las vías iMSN y dMSN, respectivamente. 1) Diagrama coronal que muestra la inyección de canalrodopsina-2 (ChR2) en la corteza premotora (M2). 2) Diagrama coronal que muestra las proyecciones de la corteza premotora sobre las neuronas iMSN (puntos verdes) o dMSN (puntos rojos) estriatales. 3) Diagrama coronal que muestra la inyección de *retrobeads* en el SNr. (B) Izquierda, microfotografía de la inyección de ChR2 en M2. En medio, una microfotografía de la parte lateral del estriado mostrando las proyecciones de la corteza premotora (eYFP; verde) y de las neuronas dMSN marcadas con *retrobeads* (rojo). Derecha, microfotografía de la inyección de *retrobeads* (rojo) en el SNr. (C) Izquierda, diagrama de estimulación con luz azul en el LS para producir corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC), al despolarizar los axones M2→estriatales-ChR2 en las células MSN registradas en configuración de célula completa. Derecha, ubicación de los pares de células registradas en el mismo corte en la región del estriado (4 animales). Cada color representa un par de células registradas (D) Microfotografías de un dMSN (izquierda) y un iMSN (derecha). Las líneas blancas representan el electrodo de registro. (E) Proporción de células dMSN o iMSN

que presentaron un EPSC en respuesta a la estimulación con luz azul de los axones M2→estriatales-ChR2. **(F)** Amplitud media de EPSC (pA) de las células dMSN (rojo) o iMSN (verde). Inserto, EPSC representativas registradas de la vía dMSN (n=6) o iMSN (n=6) en respuesta a la estimulación optogenética de los axones M2→estriatales-ChR2. El potencial de mantenimiento fue de -80 mV; la región sombreada indica el error estándar de la media. * p = 0.02, prueba de Wilcoxon. **(G)** Ejemplo de un EPSC registrado en una célula dMSN bloqueado por el antagonista de los receptores AMPA, CNQX.

DISCUSIÓN

Los resultados mostrados aquí establecen que las proyecciones M2→LS contribuyen en iniciar, estructurar elementos de una secuencia y en transitar entre subsecuencias dentro de una secuencia de acciones. Primero, mostramos que las neuronas de la región de la corteza M2 presentan actividad justo antes de iniciar las secuencias (**Figs. 3 y 4**) y que esta actividad podría codificar la temporalidad de una secuencia de acciones, incluyendo la actividad de neuronas cortico-estriatales foto-identificadas (**Figs. 5 y 7**). Segundo, mostramos que las proyecciones M2→LS contribuyen a iniciar y ejecutar una secuencia de acciones (**Figs 11 y 12**). Tercero, mostramos que las proyecciones M2→LS contribuyen de manera sutil en la transición entre subsecuencias (**Fig. 13**). Cuarto, mostramos que las proyecciones de la corteza M2→LS son requeridas al inicio del aprendizaje de una secuencia de acciones autoiniciada (**Fig. 14**). Quinto, mostramos que las proyecciones M2→LS presentan respuestas postsinápticas de mayor amplitud en las neuronas estriatales de la vía directa frente a la indirecta (**Fig. 15**).

Anteriormente se había demostrado que los ratones desarrollan y ejecutan tareas operantes de orden serial, incluida la presión en dos palancas (Geddes et al., 2018; Rothwell et al., 2015). En estas tareas no se había puesto a prueba si la inhibición del circuito cortico-estriatal era más importante al inicio, en la ejecución o durante la transición de subsecuencias de acciones. La tarea adaptada aquí permite manipulaciones separadas temporalmente en las

diferentes fases de una secuencia de dos subsecuencias (inicio, ejecución y transición entre subsecuencias; tiempo-dependientes), además, permite la comparación directa de dos procesos importantes en la iniciación del movimiento: un proceso que involucra un estímulo que desencadena la respuesta de empezar o terminar una secuencia (secuencias Forzadas) y un proceso que involucra el autoinicio de una secuencia de acciones sin estímulos que señalizan cuándo empezar la acción (secuencias Autoiniciadas). Primero entrenamos los animales en secuencias Forzadas y luego en bloques de secuencias Forzadas-Autoiniciadas (**Fig. 1**), ya que los animales entrenados solo en autoiniciadas abandonaban la tarea. El hecho de que los animales fueran más eficientes ejecutando secuencias Forzadas que Autoiniciadas se explica por la variedad de errores disponibles en las secuencias Autoiniciadas (**Fig. 2A**). Sin embargo, no se excluye una diferencia en el reclutamiento de estructuras cerebrales en secuencias Forzadas versus Autoiniciadas (Hernández et al., 2010; Romo y Schultz, 1992).

Con el objetivo de identificar si las proyecciones cortico-estriatales contribuyen a la actividad estriatal observada durante la iniciación, ejecución y transición entre secuencias de acciones (Geddes et al., 2018; Jin and Costa, 2010; Tecuapetla et al., 2016), fue importante mostrar que la actividad de las neuronas de la corteza era modulada durante el inicio y transición de las secuencias (**Figs. 4 y 5**). Se sabe que las neuronas en la corteza premotora de los primates presentan un incremento en la actividad segundos antes de comenzar una secuencia de movimientos específica (Shima and Tanji, 2000). Aquí mostramos que en la corteza M2 de ratones también hay un incremento en la actividad segundos antes de una secuencia de movimientos (**Figs. 4 y 5**). Sin embargo, no solo era importante mostrar que la actividad de la corteza M2 tenía actividad relacionada con iniciar una secuencia de acciones, además era importante determinar que las neuronas cortico-estriatales también presentaban una modulación relacionada con las secuencias. Lo cual se realizó a través de la foto-identificación

antidrómica (Lima et al., 2009). Identificamos una proporción de unidades M2→LS que segundos antes de iniciar las secuencias mostró regresiones con la temporalidad de las secuencias. Aunque al final registramos y analizamos una cantidad pequeña de unidades cortico-estriatales (nM2=10; nM1=11), esto nos permitió concluir que las neuronas del circuito M2→LS están directamente relacionadas con la temporalidad de una secuencia de acciones. Esta es la primera vez que se muestra evidencia de que las unidades de la corteza M2 de proyección al estriado lateral tienen este tipo de actividad en la realización de una secuencia de acciones.

Una de las funciones que se le ha atribuido a la corteza M2 es la estimación temporal. Mendoza y cols. (2018) previamente mostraron que el SMA en monos tiene actividad relacionada con almacenar en memoria una cantidad de tiempo específica y si este tiempo se alarga las neuronas del SMA distribuyen su actividad con el fin de que el pico máximo de actividad vaya acorde al tiempo que se está estimando, proceso al cual llamaron escalamiento temporal. Aunque nosotros no hicimos los análisis necesarios para poder corroborar este hecho, en la actividad de la corteza M2→LS encontramos algo similar: cuanto más larga era una secuencia de acciones mayor era la tasa de disparo para estas secuencias y cuanto más corta era la secuencia menor era la tasa de disparo. Debido a que nuestro objetivo era solo mostrar que la actividad de las proyecciones M2→LS tenían modulación y relación con parámetros de las secuencias, ~~por lo que~~ no profundizamos en más análisis para determinar si es que la actividad de las proyecciones M2→LS contribuyen en el escalamiento temporal de una secuencia de acciones.

Se ha observado que el incremento gradual llamado “*ramping*” que es característico en esta corteza, tiene una relación directa con el tiempo de espera de un reforzador o con la duración de un estímulo (Mendoza et al., 2018; Murakami et al., 2014). Estos antecedentes

están en línea con el hallazgo de una mayor proporción de unidades que tuvieron una regresión lineal entre la actividad un segundo antes de iniciar las secuencias y la duración de las secuencias (38%, de las unidades en M2; 50% de las unidades M2→LS foto-identificadas). Previamente la actividad en rampa se ha asociado a procesos que involucran la conectividad de otras regiones corticales y subcorticales, así como la reverberación del circuito Corteza-GB-Tálamo (Merchant et al., 2013). Es probable que durante este proceso la corteza M2 esté mandando la información de la planeación del movimiento a las regiones motoras (tallo cerebral y médula espinal) y dirigiendo el movimiento. Si esto es cierto, la interrupción de esta actividad de la corteza M2 y sus proyecciones a los GB sería suficiente para perturbar la ejecución de una secuencia de acciones. Aquí nosotros mostramos que si se interrumpe la actividad de las proyecciones M2→LS 1 segundo antes de iniciar hay una demora para iniciar, promovido por un desbalance en el orden serial de la secuencia, además de incrementar los cambios prematuros y el número de presiones en una secuencia de acciones, pero no así si inhibimos justo cuando los animales ya comenzaron la secuencia. Por lo que nuestros resultados están confirmando que esta actividad en rampa actúa como organizador de otras regiones corticales y subcorticales en la planeación de una secuencia de acciones.

Uno de los objetivos de desarrollar una tarea que involucrara dos subsecuencias fue dilucidar si la actividad neuronal cortical representaba las partes (subsecuencias) de una secuencia o si la representaba como una sola. Estudios previos en monos habían mostrado un incremento en la actividad del SMA segundos antes del movimiento para una sola subsecuencia de 1 o 3 elementos. Nosotros encontramos una mayor proporción de unidades significativas a la duración de la secuencia completa que a la duración de las subsecuencias individuales (S1 o S2) en el circuito M2→LS (**Figs. 5B y 7C**). Por lo que este resultado nos lleva a pensar que la actividad neuronal del circuito M2→LS no representa a las dos subsecuencias de forma

independiente, sino que representa las dos subsecuencias como una sola secuencia y que en algún momento del aprendizaje de esta habilidad nueva para los roedores concatenaron las dos subsecuencias en una sola.

Con los experimentos de registros electrofisiológicos en la corteza describimos que la actividad de las proyecciones M2→LS tienen actividad modulada antes de iniciar y al ejecutar una cadena de secuencias de acciones mostrando regresiones con la temporalidad de las secuencias, pero no determinamos si es que las proyecciones M2→LS son requeridas para iniciar, ejecutar y transitar en una secuencia de acciones. Para llevar a cabo este objetivo, inhibimos las terminales de la corteza en el estriado, mientras los animales realizaban las secuencias.

La inervación cortico-estriatal de M2 y M1 observadas aquí son consistentes con las previamente reportadas (Hunnicutt et al., 2016; Lee et al., 2019). Observamos que M2 inerva preferencialmente, pero no de manera excluyente el estriado lateral (**Figs. 6A-D** y **Fig. 9**), mientras que las proyecciones corticofúgales M2→Tálamo pasan preferentemente por el estriado dorsomedial (**Fig. 6A-D**), confirmando que los efectos de las modulaciones optogenéticas sobre la conducta fueron debidos principalmente a la modulación de entradas de la corteza M2 al estriado lateral y no por la modulación de proyecciones de paso.

Curiosamente, la inhibición de M2→LS o M1→LS, antes de iniciar, aumentó la latencia para iniciar las secuencias (**Fig. 11E**). Este aumento de la latencia fue acompañado por un aumento en el retorno de los animales al comedero en los ensayos de inhibición con la luz. Como si la inhibición interrumpiera el correcto inicio del orden de acciones (**Fig. 11F**; vea el **Video 4**). Estos resultados son consistentes con un modelo en el que se requieren las proyecciones cortico-estriatales M2→LS y M1→LS para el inicio adecuado de secuencias de acciones.

Mediante las inhibiciones optogenéticas determinamos que segundos antes de iniciar, y no una vez comenzada la secuencia (**Figs. 11, 12**), las terminales de la corteza M2 son requeridas para ejecutar adecuadamente una secuencia de acciones (**Figs. 11,12**). Este resultado no se había podido esclarecer previamente debido a que los procedimientos eran limitados, en el sentido de que se hacían inhibiciones permanentes (Rothwell et al., 2015) y no nos permitía concluir si el circuito M2→LS era requerido al inicio, en la ejecución o en la transición entre subsecuencias de acciones. Aquí en nuestra tarea, la posibilidad de tener subsecuencias más largas en la secuencia permitió medir el inicio incorrecto, las interrupciones y los cambios prematuros además del tiempo de transición entre las subsecuencias. Además, nuestras inhibiciones de M2→LS han sido espacial y temporalmente específicas y no mostraron un aumento en los cambios prematuros entre las subsecuencias cuando se inhibe antes del inicio, una disminución en las secuencias correctas Largas-S1 cuando se inhibe durante la ejecución y una lentitud del tiempo de transición cuando se inhibe alrededor de la transición.

En este estudio encontramos que las proyecciones M2→LS son importantes para la transición intra-secuencia. Recientemente se ha mostrado que el subcircuito de la vía indirecta de los GB contribuye en la transición entre subsecuencias (Geddes et al., 2018). Una de las principales regiones que proyectan a los GB, es la corteza (Wilson, 1989). Por lo que, los resultados que nosotros mostramos (**Fig. 13**) aportan evidencia que muestra que una de las regiones que podrían contribuir en la actividad de los GB observada en la transición entre secuencias de movimientos es la corteza M2→LS. El hecho de que la inhibición durante la transición de subsecuencias no afectara la estructura/ejecución de la subsecuencia2 arroja evidencia sobre la concatenación de dos subsecuencias como una sola.

Otro punto importante que se muestra aquí es la especificidad de los efectos principalmente en las secuencias autoiniciadas (ver **Tabla 1**). ¿Cómo es que las proyecciones

premotoras pueden diferenciar entre la ejecución de secuencias forzadas y autoiniciadas? Una posible explicación es que las proyecciones M2→LS podrían detectar si los animales se encontraban en bloques de secuencias Autoiniciadas, comprometiendo estas proyecciones con una mayor sensibilidad a las inhibiciones como consecuencia de la decisión voluntaria de la ejecución. Esta posibilidad está respaldada por estudios previos: 1) donde se demuestra que la corteza premotora incrementa su actividad en el periodo de demora en donde los monos tienen que esperar y mantener en memoria un estímulo táctil (para comparar y responder si un 2° estímulo es mayor o menor al primero), pero no aparece esta actividad si los monos no tienen que dar una respuesta y aun así son recompensados (respuesta pasiva); 2) donde se demuestra que neuronas de la corteza premotora incrementan su actividad solo cuando los monos realizan la acción de alcanzar voluntariamente una recompensa (sin estímulos que señalicen cuándo empezar el movimiento) y no muestran actividad cuando se señala cuándo empezar el movimiento (Hernández et al., 2010; Romo y Schultz, 1987; Thaler et al., 1988). Idea que es respaldada por la tendencia de las unidades fotoidentificadas cortico-estriatales M2 a mostrar una mayor proporción de unidades con regresión significativa en las secuencias autoiniciadas (**Fig. 7C**, columnas i, iii). Es importante destacar que observamos que la inhibición de M1→LS no afectó la ejecución de secuencias, en consonancia con la idea de que la actividad de M1 puede no ser necesaria para ejecutar secuencias una vez que se han aprendido (Kawai et al., 2015).

Además de las inhibiciones de las proyecciones cortico-estriatales, abordamos la posibilidad de que nuestras inhibiciones cortico-estriatales puedan afectar otras áreas del cerebro además del estriado lateral y para ello realizamos dos experimentos: 1) Inhibimos directamente las neuronas del estriado lateral con los mismos protocolos que con los cortico-estriatales (**Fig. 8**); 2) evaluamos si la región manipulada contiene axones cortico-fúgales de

M2 / M1 que llegan a otras áreas del cerebro (p. Ej., Tálamo / Puente; Th / Pns) (**Fig. 9**). El resultado del primer experimento mostró que la inhibición directa del LS durante la ejecución de las secuencias disminuyó la longitud de las secuencias correctas (secuencias Largas-S1) (**Fig. 8K**) y la inhibición del LS en el protocolo de "transición" aumentó el tiempo de transición entre subsecuencias (**Fig. 8R**). Estos efectos son similares con la inhibición de las proyecciones M2→LS. Contrario a la inhibición de las proyecciones M2→LS, este protocolo aumentó los cambios prematuros entre subsecuencias. Una posible explicación para esta última diferencia es que la actividad M2→LS puede ser necesaria para establecer la ejecución de secuencias que inciden en subcircuitos estriatales específicos (Wall et al., 2013). Sin embargo, nuestra inhibición directa del LS no diferencia entre los dos subcircuitos de los GB. En este sentido, la **Fig. 15** muestra que M2-LS inerva con mayor fuerza sináptica a las neuronas de proyección estriatal de la vía directa. Tal inervación preferencial ha sido sugerida previamente (Nelson et al., 2020; Wall et al., 2013) para dirigir la estructuración de secuencias en tareas de orden serial (Rothwell et al., 2015), aunque solo después del aprendizaje. El resultado del segundo experimento mostró que las células de las cortezas M2/M1 que proyectan a otras áreas cerebrales y pasan por el estriado lateral son un porcentaje menor (M2 / M1 → Str → Th 3%; M2 / M1 → Str → Pns 3%; **Fig. 9**). Esto, más la evidencia de que Arch3.0 tiene sus acciones inhibitoras principalmente a través de la inhibición local en lugar de afectar la propagación de los potenciales de acción (El-Gaby et al., 2016), sugiere que los efectos observados aquí fueron principalmente por la inhibición optogenética de las proyecciones cortico-estriatales desde M2 o M1 hacia el estriado lateral.

Con los resultados encontrados sobre la importancia de la actividad de la corteza antes de iniciar (**Fig. 4-7,11-13**), nos preguntamos si está actividad del circuito cortico-estriatal en las etapas tempranas del aprendizaje contribuía a consolidar el aprendizaje de una secuencia de

acciones. Debido a que la mayoría de los efectos observados por las manipulaciones optogenéticas fue sobre las secuencias autoiniciadas (**Figs. 11-13**) y sobre las proyecciones M2→LS (**Figs. 11-13**) realizamos experimentos de inhibición de estas terminales en la etapa del aprendizaje temprano, encontrando una disminución en el desempeño aún después 15 días de entrenamiento (**Fig. 14**). Previamente se había propuesto que la corteza motora es requerida al inicio, pero no una vez adquirido el aprendizaje (Kawai et al., 2015). Sin embargo, debido a las limitaciones técnicas no se había puesto a prueba la contribución específica del circuito cortico-estriatal ni de forma tiempo-dependiente (antes o durante la ejecución del movimiento), sin poder concluir de manera clara que el circuito M2 cortico-estriatal es requerido para aprender una secuencia motora y que justo la actividad que se produce antes de iniciar una secuencia de acciones es de vital importancia para adquirir este aprendizaje (**Fig. 16B**). Adicional a esto, también mostramos que las secuencias forzadas, no fueron afectadas por la inhibición en las etapas tempranas del aprendizaje (**Fig. 14C**). Esto sugiere que no hay una demanda cognitiva en el desarrollo y aprendizaje de secuencias forzadas y que las proyecciones de la corteza M2 no son importantes o requeridas para la realización de este tipo de secuencias. Estos resultados sumados a que no observamos efectos en las secuencias forzadas sugieren que la corteza premotora junto con sus proyecciones en el LS es requerida solo cuando hay una demanda cognitiva y no cuando la realización de una acción es pasiva (Hernández et al., 2010).

Finalmente, nosotros encontramos que en la corteza motora primaria y M1→LS también hay actividad previa que correlaciona con la duración de la secuencia y además con las inhibiciones de las terminales de M1 en el estriado concluimos que estas proyecciones también son importantes para iniciar una secuencia de acciones. El primero es un hallazgo que previamente no estaba bien establecido y es contrario a lo que sabíamos de la corteza motora primaria de que no es un área que involucre procesos cognitivos de alto nivel como es la

planeación del movimiento (Hernández et al., 2010; Wishaw et al., 1986, 1991). Aunque recientemente en humanos se ha mostrado una modulación de la corteza motora en la realización de una secuencia de movimientos (Berlot, et al., 2020). El segundo hallazgo es contrario a los resultados que han mostrado que la corteza motora ya no es requerida para realizar un movimiento una vez que se ha consolidado el aprendizaje de una nueva habilidad (**Fig. 16A**) (Kawai et al., 2015; Wishaw et al., 1986, 1991). Aquí nosotros utilizamos una inhibición temporal y espacial específica de las terminales corticales en el estriado y una tarea en la cual pudimos hacer inhibiciones puntuales en las diferentes fases de la ejecución además de que nuestra tarea requiere de una demanda cognitiva mayor debido a diferencia de la estudiada en aquel estudio. Es probable que en los ensayos autoiniciados la demanda cognitiva es todavía significativa para mantener el procesamiento de la corteza motora primaria activa y no se ha sobreentrenado (<40días) lo suficiente a los animales para que la conducta se vuelva habitual en donde no se requiere a la corteza (Gremel y Costa, 2013). Esto es apoyado por estudios en donde se muestra que la inactivación de las neuronas de la corteza motora en las etapas tempranas e intermedias del aprendizaje (20-25 días de entrenamiento) aún afecta el control motor pero ya no cuando se perturba la corteza en etapas tardías del aprendizaje (>40 días) (Hwang et al., 2019). En nuestra tarea cuando se empezó a inhibir a los animales fue en una etapa intermedia de acuerdo con Hwang et al., (2019) y es probable que también veamos un efecto debido a la demanda cognitiva que requiere nuestra tarea en las secuencias autoiniciadas.

CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio muestra que las proyecciones cortico-estriatales de la corteza premotora contribuyen al inicio y ejecución de secuencias autoiniciadas de acciones. Nuestros datos son compatibles con un modelo en el que tanto M2 como M1 contienen

modulación en la actividad relacionadas con la iniciación y ejecución de secuencias. Ambas proyecciones cortico-estriatales M2 / M1 contribuyen al inicio de secuencias. Sin embargo, las proyecciones cortico-estriatales M2→LS contribuyen principalmente a la correcta ejecución/estructuración de secuencias autoiniciadas (**Fig. 16C**). En conjunto, los hallazgos presentados aquí pueden tener implicaciones importantes para las condiciones patológicas en las que la generación de acciones autoiniciadas se ve afectada.

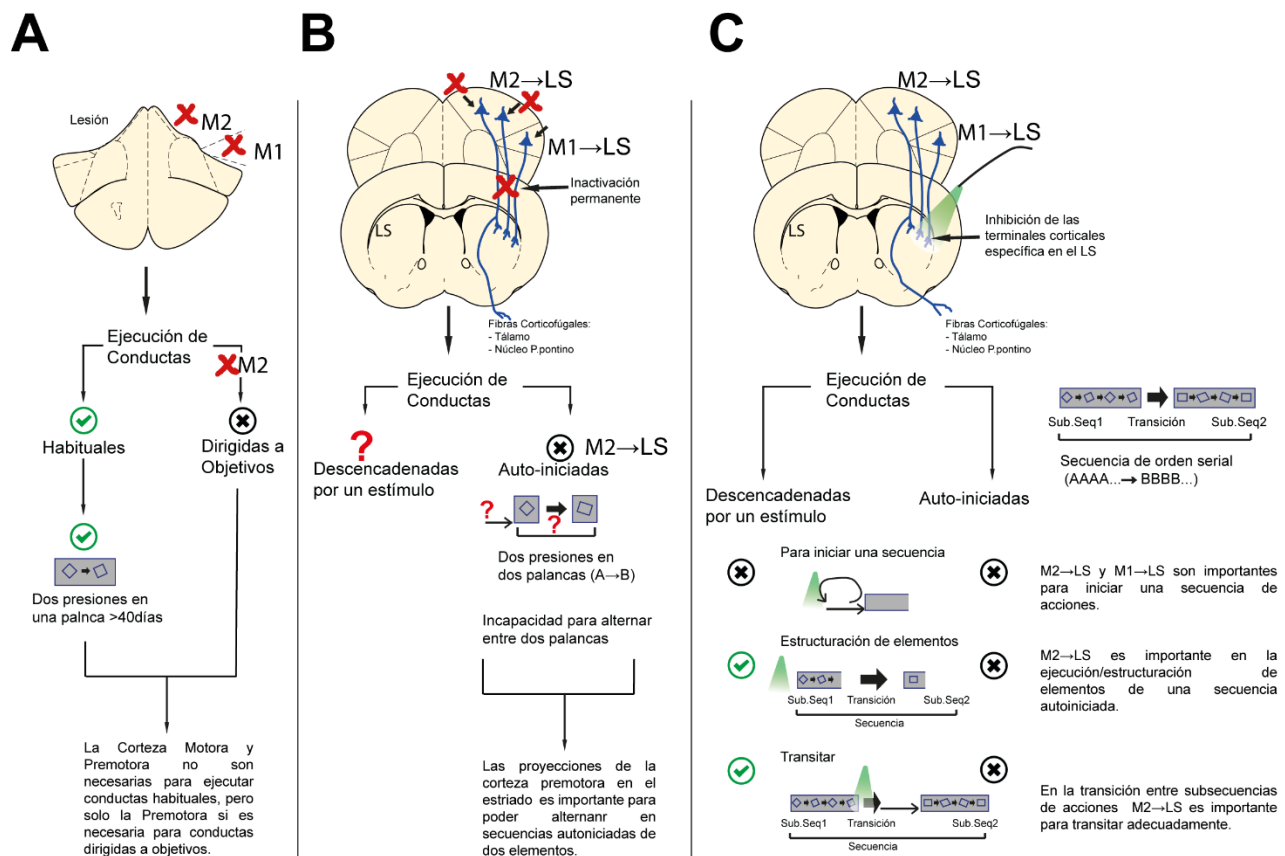


Figura 16. Comparación de los principales hallazgos en este proyecto frente a estudios previos. (A) Esquema ilustrando los resultados previos de la lesión de la corteza premotora y motora sobre la ejecución de conductas. X (en rojo) = Lesión de la corteza motora primaria (M1) y corteza premotora (M2). El símbolo en verde representa la habilidad conductual que se puede seguir ejecutando después de la extracción de estas cortezas. El símbolo de X (en negro) representa las conductas que no se pueden ejecutar con la extracción de esa corteza (Gremel y Costa 2013; Kawai et al., 2015). **(B)** Esquema ilustrando los resultados previos sobre la ejecución de conductas por el decremento permanente del potencial de acción de las neuronas corticales y sus proyecciones al estriado lateral (Rothwell et al., 2015). **(C)** Esquema general de los resultados encontrados en el presente proyecto. Cono verde = inhibición con luz mediante técnicas de optogenética específica de las terminales corticales en el LS.

El símbolo en verde representa la habilidad conductual que se puede seguir ejecutando después de la inhibición de estas terminales. El símbolo de X (en negro) representa las conductas que no se pueden ejecutar adecuadamente con la inhibición.

REFERENCIAS

- Aldridge J., Berridge, K.C., and Rosen, A.R. (2004) Basal ganglia neural mechanisms of natural movement sequences. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82: 732–739.
- Benecke R., Rothwell, J.P.R., Dick, B.L, and Marsden, C. D., (1987) Disturbance of sequential movements in patients with Parkinson’s disease. *Brain*. 110: 361-379
- Berlot,E., Popp,N.J ,Grafton, S.T., and Diedrichsen, J.(2020) The role of primary motor cortex in sequence learning resolving conflicting fMRI evidence from repetition suppression and pattern analysis. bioRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.21.261453>
- Martiros N., Burgess, A.A., and Graybiel, A.M. (2018) Inversely Active Striatal Projection Neurons and Interneurons Selectively Delimit Useful Behavioral Article Inversely Active Striatal Projection Neurons and Interneurons Selectively Delimit Useful Behavioral Sequences. *Curr. Biology* 560–573.
- Burguière, E., Monteiro, P., Feng, G., and Graybiel, A.M. (2013) Optogenetic Stimulation of Lateral Orbitofrontal-striatal Pathway suppresses compulsive behaviors. *Science*, 340, 1243–1246.
- Chen, P.Y., and Popovich, P.M. (2011) *Correlation: Parametric and Nonparametric Measures* (California: Sage University Papers Series on Quantitative Applications in the Social Sciences).
- Churchland, M.M., Santhanam, G., and Shenoy, K. V (2006) Preparatory Activity in Premotor and Motor Cortex Reflects the Speed of the Upcoming Reach. *J Neurophysiol* 96, 3130–3146.
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., and Costa, R.M. (2014) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242.

- Dhawale, A.K., Wolff, S.B.E., Ko, R., and Ölveczky, B.P. (2019) The basal ganglia can control learned motor sequences independently of motor cortex. bioRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/827261>
- Díaz-Hernández, E., Contreras-López, R., Sánchez-Fuentes, A., Rodríguez-Sibrán, L., Ramírez-Jarquín, J.O., and Tecuapetla, F. (2018) The Thalamostriatal Projections Contribute to the Initiation and Execution of a Sequence of Movements. *Neuron* 100, 739-752.e5.
- El-Gaby, M., Zhang, Y., Wolf, K., Schwiening, C.J., Paulsen, O., and Shipton, O.A. (2016) Archærhodopsin Selectively and Reversibly Silences Synaptic Transmission through Altered pH. *Cell Rep.* 16, 2259–2268.
- Friedman, A., Homma, D., Gibb, L.G., Amemori, K., Rubin, S.J., Hood, A.S., Riad, M.H., and Graybiel, A.M. (2015) A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. *Cell* 161, 1320–1333.
- Fujii, N., and Graybiel, A.M. (2005) Time-varying covariance of neural activities recorded in striatum and frontal cortex as monkeys perform sequential-saccade tasks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9032–9037.
- Geddes, C.E., Li, H., Correspondence, J., and Jin, X. (2018) Optogenetic Editing Reveals the Hierarchical Organization of Learned Action Sequences Article Optogenetic Editing Reveals the Hierarchical Organization of Learned Action Sequences. *Cell* 174, 32–43.
- Gorski, J. a, Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., and Jones, K.R. (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* 22, 6309–6314.
- Graybiel, A., M. (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Current opinión in Neurobiol. Learn. Mem.* 5, 733–741.
- Graybiel, A., M. (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 119–136.

- Guo, H., Hong, S., Jin, X.-L., Chen, R.-S., Avasthi, P.P., Tu, Y.-T., Ivanco, T.L., and Li, Y. (2000) Specificity and Efficiency of Cre-Mediated Recombination in Emx1–cre Knock-in Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 661–665.
- Hernández, A., Nácher, V., Luna, R., Zainos, A., Lemus, L., Alvarez, M., Vázquez, Y., Camarillo, L., and Romo, R. (2010) Decoding a Perceptual Decision Process across Cortex. *Neuron* 66, 300–314.
- Hikosaka, O., and Isoda, M. (2010) Switching from automatic to controlled behavior: cortico-basal ganglia mechanisms. *Trends Cogn. Sci.* 14, 154–161.
- Hintiryan, H., Foster, N.N., Bowman, I., Bay, M., Song, M.Y., Gou, L., Yamashita, S., Bienkowski, M.S., Zingg, B., Zhu, M., et al. (2016) The mouse cortico-striatal projectome *Nat. Neurosci.* 19, 1100-1114.
- Ho J., Tumkaya T., Sameer A., Choi H., Claridge A., (2019) Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. *Nature Methods* 16, 565-566
- Hunnicutt, B.J., Jongbloets, B.C., Birdsong, W.T., Gertz, K.J., Zhong, H., and Mao, T. (2016) A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *Elife* 5, 1–32.
- Inase, M., Sakai, S.T., and Tanji, J. (1996) Overlapping corticostriatal projections from the supplementary motor area and the primary motor cortex in the macaque monkey: An anterograde double labeling study. *J. Comp. Neurol.* 373, 283–296.
- Jin, X., and Costa, R.M. (2015) Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 33, 188–196.
- Jin, D.Z., Fujii, N., and Graybiel, A.M. (2009) Neural representation of time in cortico-basal ganglia circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19156–19161.
- Jin, X., Tecuapetla, F., and Costa, R.M. (2014) Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nat. Neurosci.* 17, 423–430.

- Kawai, R., Markman, T., Poddar, R., Ko, R., Fantana, A.L., Dhawale, A.K., Kampff, A.R., and Ölveczky, B.P. (2015) Motor Cortex Is Required for Learning but Not for Executing a Motor Skill. *Neuron* 86, 800–812.
- Kobak, D., Brendel, W., Constantinidis, C., Feierstein, C.E., Kepecs, A., Mainen, Z.F., Qi, X.-L., Romo, R., Uchida, N., and Machens, C.K. (2016) Demixed principal component analysis of neural population data. *Elife* 5.
- Kupferschmidt, D.A., Juczewski, K., Cui, G., Johnson, K.A., and Lovinger, D.M. (2017) Parallel, but Dissociable, Processing in Discrete Corticostriatal Inputs Encodes Skill Learning. *Neuron* 96, 476-489.e5.
- Lashley, K. (1951) The problem of serial order in behavior, in: *Cerebral Mechanisms in Behavior*, ed. Jeffress, L. A. (Wiley, New York), pp. 112–136
- Li, N., Daie, K., Svoboda, K., and Druckmann, S. (2016) Robust neuronal dynamics in premotor cortex during motor planning. *Nature* 532, 459–464.
- Lima, S.Q., Hromádka, T., Znamenskiy, P., and Zador, A.M. (2009) PINP: A New Method of Tagging Neuronal Populations for Identification during In Vivo Electrophysiological Recording. *PLoS One* 4, e6099.
- Long, M. A., Jin, D.Z., and Fee M. S., (2010) Support for a synaptic chain model of neuronal sequence generation. *Nature*. 468: 394-399
- Lucchetti, C., and Bon, L. (2001) Time-modulated neuronal activity in the premotor cortex of macaque monkeys. *Exp. Brain Res.* 141, 254–260.
- Mahn M, Prigge M, Ron S, Levy R, Yizhar O. (2016) Biophysical constraints of optogenetic inhibition at presynaptic terminals. *Nat. Neurosci.* 19, 554-556.
- Manouze H., Ghestem A., Poillerat V., Bennis M., Ba-M'hamed S., Benoliel J., Becker C., and Bernanrd C (2019) Effects of Single Cage Housing on Stress, Cognitive, and Seizure

Parameters in the Rat and Mouse Pilocarpine Models of Epilepsy. *eNeuro* 6: ENEURO.0179-18.2019.

- Mendoza, G., Méndez, J.C., Pérez, O., Prado, L., and Merchant, H. (2018) Neural basis for categorical boundaries in the primate pre-SMA during relative categorization of time intervals. *Nat. Commun.* 9, 1098.
- Merchant, H., Harrington, D. L., and Meck Warren H. (2013) Neural basis of the perception and estimation of time. *Annu. Rev. Neurosci.* 36, 313-336
- Murakami, M., Vicente, M.I., Costa, G.M., and Mainen, Z.F. (2014) Neural antecedents of self-initiated actions in secondary motor cortex. *Nat. Neurosci.* 17, 1574–1582.
- Mushiake, H., Inase, M., and Tanji, J. (1990) Selective coding of motor sequence in the supplementary motor area of the monkey cerebral cortex. *Exp. Brain Res.* 82, 208–210.
- Nakayama, H., Ibañez-Tallon, I., and Heintz, N. (2018) Cell-type-specific contributions of medial prefrontal neurons to flexible behaviors. *J. Neurosci.* 38, 4490–4504.
- Nakayama, Y., Yamagata, T., Tanji, J., and Hoshi, E. (2008) Transformation of a virtual action plan into a motor plan in the premotor cortex. *J. Neurosci.* 28, 10287–10297.
- Nelson, A., Abdelmesih, B., and Costa, R.M. (2020) Corticospinal neurons encode complex motor signals that are broadcast to dichotomous striatal circuits. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.31.275180>
- Nieder A., Diester I. and Tudusciuc O. (2006) Temporal and Spatial Processes in the Primate Parietal Cortex. *Science.* 313: 1431
- Ninokura Y., Mushiake H., and Tanji J. (2004) Integration of Temporal Order and Object Information in the Monkey lateral Prefrontal Cortex. *J Neurophysiol.* 95: 555-560
- Oh, S.W., Harris, J.A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., Wang, Q., Lau, C., Kuan, L., Henry, A.M., et al. (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* 508, 207–214.

- Passingham, R.E., Myers, C., Rawlins, N., Lightfoot, V., and Fearn, S. (1988) Premotor Cortex in the Rat. *Behav. Neurosci.* 102, 101–109.
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., and Rodriguez-oroz, M.C. (2010) Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 11, 760–772.
- Riehle, A., and Requin, J. (1989) Monkey primary motor and premotor cortex: single-cell activity related to prior information about direction and extent of an intended movement. *J. Neurophysiol.* 61, 534–549.
- Riehle, A., MacKay, W.A., and Requin, J. (1994) Are extent and force independent movement parameters? Preparation- and movement-related neuronal activity in the monkey cortex. *Exp. Brain Res.* 99, 56–74.
- Romo, R., and Schultz, W. (1992) Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. *Exp. Brain Res.* 91, 396–407.
- Rosenbaum, D.A., Cohen, R.G., Jax, S.A., Weiss, D.J., and Wel, R. Van Der (2007) The problem of serial order in behavior: Lashley's legacy. *Hum Mov Sci*, 26, 525–554.
- Rothwell, P.E., Hayton, S.J., Sun, G.L., Fuccillo, M.V., Lim, B.K., and Malenka, R.C. (2015) Input- and Output-Specific Regulation of Serial Order Performance by Corticostriatal Circuits. *Neuron* 88, 345–356.
- Sakai K., Kitaguchi K. and Hikosaka O. (2003) Chunking during human visuomotor sequence learning. *Exp Brain Res.* 152: 229-242.
- Sakurai, Y., Takahashi, S., and Inoue, M. (2004) Stimulus duration in working memory is represented by neuronal activity in the monkey prefrontal cortex. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1069–1080.

- Seeds A.,M., Ravbar, P., Chung P., Hampel S., Midgley F. M. Jr, Mensh B. D. and Simpson J. H. (2014) A suppression hierarchy among competing motor programs drives sequential grooming in *Drosophila*. *eLife*. 3:e02951
- Shima, K., and Tanji, J. (2000) Neuronal Activity in the Supplementary and Presupplementary Motor Areas for Temporal Organization of Multiple Movements Neuronal Activity in the Supplementary and Presupplementary Motor Areas for Temporal Organization of Multiple Movements. *J. Neurophysiol.* 84, 2148–2160.
- Shima, K., Isoda, M., Mushiake, H., and Tanji, J. (2007) Categorization of behavioural sequences in the prefrontal cortex. *Nature* 445, 315–318.
- Siniscalchi, M.J., Phoumthippavong, V., Ali, F., Lozano, M., and Kwan, A.C. (2016) Fast and slow transitions in frontal ensemble activity during flexible sensorimotor behavior. *Nat Neurosci* 19:1234-42.
- Smith, K.S., and Graybiel, A.M. (2013) A Dual Operator View of Habitual Behavior Reflecting Cortical and Striatal Dynamics. *Neuron*, 79:361-74.
- Sohur, U.S., Padmanabhan, H.K., Kotchetkov, I.S., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2014) Feature article: Anatomic and molecular development of corticostriatal projection neurons in mice. *Cereb. Cortex* 24, 293–303.
- Tanji, J., and Evarts, E. V. (1976) Anticipatory activity of motor cortex neurons in relation to direction of an intended movement. *J. Neurophysiol.* 39, 1062–1068.
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S.Q., and Costa, R.M. (2016) Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell* 166, 703–715.
- Wall, N., DeLaParra, M., Callaway, E., and Kreitzer, A.C. (2013) Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron* 79, 347–360.

- Wilson, C.J. (1989) The basal ganglia, in: *The Synaptic Organization of the Brain.*, 3rd Edition G.M. Shepherd (ed) Oxford Press, pp279-316.
- Whishaw, I.Q., O'Connor, W.T., and Dunnett, S.B. (1986). The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain* 109, 805–843.
- Whishaw, I.Q., Pellis, S.M., Gorny, B.P., and Pellis, V.C. (1991). The impairments in reaching and the movements of compensation in rats with motor cortex lesions: an endpoint, videorecording, and movement notation analysis. *Behav.*
- Zeigler, H.P., and Gallistel, C.R. (1981) *The Organization of Action: A New Synthesis.* *Am. J. Psychol.* 94, 190

Tabla Complementaria 1

	Panel	Estructura de los datos	Prueba estadística	p	n
Figura 1	D-Desempeño	Datos presentados en la figura Forzada	Friedman, Sesiones 1-11 Friedman, Sesiones 9-11	0.001** 0.3083	Ratón C57BL6/J (WT) N=8
		Datos presentados en la figura Autoiniciada	Friedman, Sesiones 1-11 Friedman, Sesiones 9-11	0.001** 0.6543	
		Datos presentados en la figura Forzada vs. Autoiniciada Forzada vs. Autoiniciada-Abortos	Mann-Whitney Mann-Whitney	0.0003* 0.552	
	D-Duración	Datos presentados en la figura Forzada	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.0035** 0.2359	
		Datos presentados en la figura Autoiniciada	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.001** 0.1357	
	D-Intervalo-entre-presiones (IPI)	Datos presentados en la figura Forzada	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.001** 0.0789	
		Datos presentados en la figura Autoiniciada	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.04* 0.2851	
	D-Presiones	Datos presentados en la figura Autoiniciada	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.001** 0.1495	
		Datos presentados en la figura Autoiniciada	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.2934 0.9674	
	D-Latencia	Forzada: Media ± SEM (s) Día -6: 2±0.5; Día -5: 1.7±0.3; Día -4: 1.8±0.1; Día -3: 1.4±0.3; Día -2: 1.3±0.2; Día -1: 1.5±0.1; Día 1: 1.6±0.1; Día 2: 1.6±0.2; Día 3: 1.6±0.3; Día 4: 1.7±0.3; Día 5: 1.1±0.2; Día 6: 1.4±0.1; Día 7: 1.4±0.1; Día 8: 1.1±0.2; Día 9: 1.1±0.1; Día10: 1.3±0.1; Día11: 1.1±0.1	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.07 1.0	
		Autoiniciada: Media ± SEM (s) Día 1: 2.2±0.3; Día 2: 1.7±0.2; Día 3: 1.9±0.4; Día 4: 1.8±0.2; Día 5: 1.2±0.2; Día 6: 1.6±0.1; Día 7: 1.2±0.1; Día 8: 1.2±0.2; Día 9: 1.4±0.2; Día10: 1.3±0.1; Día11: 1.5±0.3.	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesión 9 - 11	0.036* 0.355	
	D-Transición	Forzada: Media ± SEM (s) Día-6: 11±3; Día-5: 11±3; Día-4: 3±2; Día-3: 8±3; Día-2: 5±3; Día-1: 0.9±0.1; Día1: 1.1±0.1; Día 2: 1.2±0.1; Día 3: 1.2±0.1; Día 4: 1.3±0.2; Día 5: 1.1±0.1; Día6: 1.1±0.1; Día7: 1.0±0.1; Día8: 0.9±0.1; Día9: 1.0±0.1; Día10: 0.9±0.1; Día11: 0.9±0.1	Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.0001*** 0.530	
Autoiniciada: Mean ± SEM (s) Día11:0.9±0.1; Día-5: 11±3; Día-4: 3±2; Día-3: 8±3; Día-2: 5±3; Día-1: 0.9±0.1; Día: 1.6±0.2; Día2: 1.5±0.1; Día3: 1.5±0.4; Día4: 1.2±0.1; Día5: 1.0±0.2; Día6: 3.6±2; Día7: 1.3±0.2; Día8: 0.9±0.2; Día9: 1.2±0.2; Día10: 1.4±0.3; Día11: 1.0±0.1		Friedman, Sesiones 1 - 11 Friedman, Sesiones 9 - 11	0.0002*** 0.794		
Figura 2	A (1) Inicio incorrecto	Mediana (percentil 25-75; %) Día 1: 61 (53–68) vs. Día 11: 5(0.6–7.4)	Mann-Whitney	0.0078**	
	A (2) Abortos S1	Mediana (percentil 25-75; %) Pre: 38(34–1) vs. Forzada Día 1: 5(0–16) Pre: 38(34–1) vs. Autoiniciada Día11: 3.9(1-8)	Mann-Whitney	0.0018** 0.0023**	
		Pre: 38(34–1) vs. Forzada Día 11: 1.2(0–4.2) Pre: 38(34–1) vs. Autoiniciada Día 11: 5.7(0-7.6)	Mann-Whitney Mann-Whitney	0.0078** 0.0078**	
		Forzada Día 1 vs. Forzada Día 11 Autoiniciada Día1 vs. Autoiniciada Día11 Forzada Día 11 vs. Autoiniciada Día11	Mann-Whitney Mann-Whitney Mann-Whitney	0.3125 0.3828 0.4375	
		Mediana (percentil 25-75; %) Autoiniciada Día1: 7.6 (4.1–16.2) vs. Autoiniciada Día11: 10.9(3.7–8.1)	Mann-Whitney	0.7422	
	A (4) Abortos S2	Mediana (percentil 25-75; %) Pre: 57.4(36.5–62.1) vs. Forzada Día 1: 3.4(0–9.9) Pre: 57.4(36.5–62.1) vs. Autoiniciada Día11: 6.6(5.1–9.7)	Mann-Whitney Mann-Whitney	0.0007*** 0.0055**	
		Pre: 57.4(36.5–62.1) vs. Forzada Día 11: 8.4(0–36.8) Pre: 57.4(36.5–62.1) vs. Autoiniciada Día11: 16(9.5–29.2)	Mann-Whitney Mann-Whitney	0.0156* 0.039*	
		Forzada Día 1 vs. Forzada Día 11 Autoiniciada Día1 vs. Autoiniciada Día11 Forzada Día 11 vs. Autoiniciada Día11		0.1563 0.039* 0.078	
		Mediana (percentil 25-75; %) Forzada (S1=4 → S2=4): 86(77–94) Autoiniciada (S1=4 → S2=4): 0.9(0–8.2); Autoiniciada (S1=4 → S2=>4): 8(3.3–12.8) Autoiniciada (S1>4 → S2=>4): 50(46– 64)	Mann-Whitney S1=4 → S2=4 vs. S1=4 → S2>=4 S1=4 → S2=4 vs. S1>4 → S2>=4 S1=4 → S2=4 vs. S1>4 → S2>=4	0.8604 0.0002*** 0.012*	
	C	Mediana (percentil 25-75; %) Forzada: 1.3(0.9–1.5) vs. Autoiniciada: 1.3(1.1 – 2.2)	Mann-Whitney	0.55	
	D	Median (percentil 25-75; %) Forzada: 3.1(2.8–3.8) vs. Autoiniciada: 4.6(4.1–5.5) Forzada S1: 1.2(1.0–1.2), Forzada S2:1.0(0.7–1.1) Autoiniciada S1: 2.6(1.6–4.2), Autoiniciada S2: 1.2(0.9– 1.4).	Mann-Whitney Kruskal-Wallis (F S1, S2, A-I S1, S2) Mann-Whitney	0.0047** 0.0122*	
			Autoiniciada S1 vs. Autoiniciada S2 Autoiniciada S1 vs. Forzada S1 Autoiniciada S1 vs. Forzada S2	0.02* 0.01* 0.015*	

	E	Mediana (percentil 25-75; %) Forzada: 1(0.6–1.2) vs. Autoiniciada: 1(0.6–1.3)	Mann-Whitney	0.70	
	F	Median (percentil 25-75; %) Forzada: 0.3(0.3–0.3) vs. Autoiniciada: 0.4(0.3–0.5) Forzada _{S1} : 0.3(0.2–0.4), Forzada _{S2} : 0.3(0.2–0.4) Autoiniciada _{S1} : 0.4(0.3–0.4), Autoiniciada _{S2} : 0.4(0.3–0.5)	Mann-Whitney Kruskal-Wallis (F S1, S2, A-I S1, S2)	0.0281* 0.1345	
	G	Mediana (percentil 25-75; #) Forzada: 6.4(5.1–6.9) vs. Autoiniciada: 7.2(6.6–8.6) Forzada _{S1} : 4(4–4), Forzada _{S2} : 4(4–4) Autoiniciada _{S1} : 6(5–6.3), Autoiniciada _{S2} : 4(4–4.7)	Mann-Whitney Kruskal-Wallis (F S1, S2, A-I S1, S2) Mann-Whitney U test Autoiniciada _{S1} vs. Autoiniciada _{S2} Autoiniciada _{S1} vs. Forzada _{S1} Autoiniciada _{S1} vs. Forzada _{S2}	0.04* 0.0001*** 0.0002*** 0.0002*** 0.016a	
Figura 11	E (1) Inicio Incorrecto	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 0.5 ± 0.5 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 7.6 ± 2.9 vs. 4.6 ± 2.6 M1-LS: 4.4 ± 1.5 vs. 7.1 ± 3.6 Controles: 3 ± 1.3 vs. 3.1 ± 0.8 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.5 ± 0.5 M1-LS: 1 ± 0 Controles: 1 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.7 ± 0.2 M1-LS: 1.2 ± 0.3 Controles: 2.3 ± 0.8	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	1.0 1.0 1.0 0.15 0.312 0.859 1.0 0.15 0.211 0.88	Ratón Emx1-cre (+/-) AAV-Arch- M2-LS: N=9 AAV-Arch- M1-LS: N=8 AAV- eYFP-M2- LS: N=9 (Controles)
	E (2) Abortos S1	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 1.8 ± 0.9 M1-LS: 0.8 ± 0.8 vs. 2.3 ± 1.2 Controles: 0 ± 0 vs. 2.6 ± 1.4 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 1.1 ± 0.7 vs. 2.8 ± 2.3 M1-LS: 2.4 ± 1.4 vs. 2 ± 1.0 Controles: 2.0 ± 0.8 vs. 0 ± 0 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1 ± 0.01 M1-LS: 1 ± 0.03 Controles: 1 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.3 ± 0.4 M1-LS: 0.9 ± 0.02 Controles: 0.9 ± 0.008	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	0.25 0.25 0.25 1.0 1.0 0.125 0.88 0.94 0.19 0.29	
	E (3) Cambios prematuros	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 3.3 ± 3.3 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0.6 ± 0.6 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 8.6 ± 1.8 vs. 20 ± 5.1 M1-LS: 7.7 ± 2 vs. 14.3 ± 3.4 Controles: 11.2 ± 2.3 vs. 13 ± 3 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1 ± 0.03 vs. Controles M1-LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: 1 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 2.3 ± 0.5 vs. Controles M1-LS: 1.8 ± 0.3 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.2	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	1.0 1.0 1.0 0.003** 0.054 0.578 1.0 1.0 0.023* 0.108	
	E (4) Abortos S2	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 13.7 ± 3.3 vs. 7.8 ± 2.9 M1-LS: 12.6 ± 6.5 vs. 19.5 ± 7.5 Controles: 17.5 ± 4.4 vs. 14.4 ± 3.2 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 22.9 ± 2.7 vs. 23.9 ± 6.4 M1-LS: 24 ± 4 vs. 23 ± 4.3 Controles: 21 ± 5.7 vs. 17.9 ± 3.9 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.86 ± 0.07 vs. Controles M1-LS: 1 ± 0.03 vs. Controles	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	0.156 0.437 0.382 0.652 1.0 0.910 0.711 0.355	

		Controles: 0.8 ± 0.1 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.1 ± 0.1 vs. Controles M1-LS: 1.1 ± 0.2 vs. Controles Controles: 1 ± 0.1	“ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	0.422 0.869	
F (1) Secuencia		Media \pm SEM (# presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 8.3 ± 0.1 vs. 8.4 ± 0.2 M1-LS: 8.1 ± 0.2 vs. 8 ± 0.1 Controles: 8.1 ± 0.1 vs. 8 ± 0.1 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 10.3 ± 0.4 vs. 9.1 ± 0.6 M1-LS: 11.4 ± 0.6 vs. 11.3 ± 0.7 Controles: 10.3 ± 0.5 vs. 10.3 ± 0.5 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1 ± 0.03 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.02 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.88 ± 0.04 vs. Controles M1-LS: 0.99 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1 ± 0.02	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	0.164 0.64 0.589 0.019* 0.742 0.25 0.05 0.962 0.138 0.258 0.199	
F (2) Sub-Sec. 1		Media \pm SEM (# presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 4.1 ± 0.1 vs. 4 ± 0.03 M1-LS: 4 ± 0.02 vs. 3.9 ± 0.02 Controles: 4.1 ± 0.09 vs. 4 ± 0.07 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 6.4 ± 0.4 vs. 5.7 ± 0.5 M1-LS: 7 ± 0.4 vs. 7 ± 0.6 Controles: 6 ± 0.3 vs. 6.2 ± 0.4 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.01 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.05 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.008 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.05 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.06 vs. Controles Controles: 1 ± 0.04	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	0.5 0.125 0.218 0.054 0.46 0.910 0.997 0.601 0.579 0.161 0.673 0.423	
F (3) Sub-Sec. 2		Media \pm SEM (# presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 4.2 ± 0.1 vs. 4.3 ± 0.3 M1-LS: 4 ± 0.2 vs. 4 ± 0.1 Controles: 4 ± 0.1 vs. 4 ± 0.1 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 3.9 ± 0.1 vs. 3.3 ± 0.2 M1-LS: 4.2 ± 0.2 vs. 4.2 ± 0.3 Controles: 4.2 ± 0.3 vs. 4.2 ± 0.2 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1 ± 0.05 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1 ± 0.02 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.8 ± 0.05 vs. Controles M1-LS: 1 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1 ± 0.03	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	0.16 0.843 0.425 0.027* 0.64 1.0 0.05 0.605 0.321 0.031* 0.88 0.07	
G Latencia		Media \pm SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 1.4 ± 0.1 vs. 2.4 ± 0.3 M1-LS: 2.9 ± 0.6 vs. 3.6 ± 0.6 Controles: 2.0 ± 0.4 vs. 1.8 ± 0.3 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 1.8 ± 0.3 vs. 2.9 ± 0.4 M1-LS: 2.6 ± 0.3 vs. 3.2 ± 0.4 Controles: 1.9 ± 0.5 vs. 1.6 ± 0.3 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.8 ± 0.2 vs. Controles M1-LS: 1.4 ± 0.2 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.1 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.8 ± 0.4 vs. Controles M1-LS: 1.2 ± 0.04 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.09	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “	0.003** 0.25 0.359 0.007** 0.007** 0.57 0.0012** 0.074 0.02* 0.011*	
H Retornos al comedero		Media \pm SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0.7 ± 0.7 vs. 6 ± 3 M1-LS: 2 ± 1 vs. 13 ± 5 Controles: 1 ± 1 vs. 1 ± 0.7 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 0.7 ± 0.7 vs. 9 ± 2 M1-LS: 1 ± 1 vs. 12 ± 5	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “	0.25 0.093 0.75 0.0078** 0.093	

		<p>Controles: 2 ± 1 vs. 0.9 ± 0.6 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 5 ± 2.9 vs. Controles M1-LS: 2.4 ± 0.7 vs. Controles Controles: 2.4 ± 0.7 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 8.2 ± 1.8 vs. Controles M1-LS: 12 ± 5 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.4</p>	<p>“ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada “ “ “ “</p>	<p>0.25 0.347 0.451 0.0005*** 0.037*</p>	
Figura 8	A (3) Desempeño	<p>Media \pm SEM (%) Forzada: 81 ± 1.4 Autoiniciada: 54 ± 4.6 Autoiniciada-Abortos. 69 ± 2.2</p>	<p>Mann-Whitney Forzada vs. Autoiniciada Forzada vs. Autoiniciada-abortos</p>	<p>0.0001** 0.327</p>	<p>Ratón C57BL6/J (WT) AAV- Synapsine- Arch-M2- LS: N=8 Controles N= 16</p>
	C Latencia	<p>Media \pm SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 2.5 ± 0.2 vs. 4.2 ± 0.6 Controles: 2.5 ± 0.3 vs. 2.1 ± 0.33 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 2.6 ± 0.4 vs. 3.8 ± 0.5 Controles: 2.6 ± 0.4 vs. 2.0 ± 0.2 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.8 ± 0.4 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.1 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.73 ± 0.3 vs. Controles Controles: $0.9 \pm 0.$</p>	<p>prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada</p>	<p>0.039* 0.255 0.078 0.301 0.011* 0.034*</p>	
	D (1) Inicio Incorrecto	<p>Media \pm SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0.3 ± 0.3 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 2.2 ± 1 vs. 5.7 ± 2.4 Controles: 4.4 ± 1.6 vs. 4.6 ± 2.2 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: $.9 \pm 0.003$ Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.3 ± 0.3 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.06</p>	<p>prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada</p>	<p>1.0 1.0 0.187 0.916 0.536 0.091</p>	
	D (2) Abortos S1	<p>Media \pm SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 7.4 ± 4 vs. 9 ± 4 Controles: 0.8 ± 0.8 vs. 1.8 ± 0.8 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 9.5 ± 2 vs. 10 ± 2.5 Controles: 15.4 ± 0.7 vs. 15.2 ± 1 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.15 ± 0.13 vs. Controles Controles: 1 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0.2 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.01</p>	<p>prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada</p>	<p>0.437 0.625 0.640 1.0 0.141 0.824</p>	
	D (3) Cambios prematuros	<p>Media \pm SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 12.2 ± 3.8 vs. 25 ± 6.5 Controles: 10.3 ± 2.2 vs. 11.4 ± 2.4 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 2.2 ± 1 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.1</p>	<p>prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada</p>	<p>1.0 1.0 0.195 0.898 0.536 0.207</p>	
	D (4) Abortos S2	<p>Media \pm SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 20 ± 6.2 vs. 11 ± 3.7 Controles: 17.7 ± 3.4 vs. 14.9 ± 2.4 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 17.7 ± 5.2 vs. 7.2 ± 2 Controles: 22 ± 5.1 vs. 18.9 ± 3.2 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 0.9 ± 0.1 vs. Controles Controles: 0.86 ± 0.09 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 0.6 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.1</p>	<p>prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada</p>	<p>0.078 0.301 0.031* 0.534 0.926 0.023*</p>	
	E Secuencias largas-S1	<p>Media \pm SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 1.1 ± 1 Controles: 1.8 ± 1 vs. 0.9 ± 0.5</p>	<p>prueba t-pareada permutada “ “</p>	<p>1.0 0.625</p>	

	Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 50.3 ± 8.2 vs. 39.6 ± 6.1 Controles: 50 ± 4.6 vs. 54.2 ± 3.3 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.3 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.1	prueba t-pareada permutada “ “	0.382 0.638	
		prueba t- no-pareada permutada	0.536	
		prueba t- no-pareada permutada	0.207	
F Transición	Media ± SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 1.1 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.09 Controles: 1.0 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.1 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 1.1 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.1 Controles: 1.1 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.1 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.02 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.04 vs. Controles Controles 0.9 ± 0.03	prueba t-pareada permutada “ “	1.0 0.552	
		prueba t-pareada permutada “ “	0.843 0.469	
		prueba t- no-pareada permutada	0.926	
		prueba t- no-pareada permutada	0.736	
Presiones	Media ± SEM (# presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 7.6 ± 0.09 vs. 7.78 ± 0.08 Controles: 8.0 ± 0.1 vs. 7.9 ± 0.09 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 10.6 ± 0.8 vs. 9.4 ± 0.08 Controles: 10.6 ± 0.4 vs. 11.2 ± 0.7 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.008 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 0.9 ± 0.08 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.03	prueba t-pareada permutada “ “	0.07 0.756	
		prueba t-pareada permutada “ “	0.312 0.501	
		prueba t- no-pareada permutada	0.080	
		prueba t- no-pareada permutada	0.118	
I Latencia Inhibición en la ejecución	Media ± SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 1.6 ± 0.1 vs. 1.4 ± 0.1 Controles: 2.6 ± 0.2 vs. 3.1 ± 0.2 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 1.9 ± 0.2 vs. 1.5 ± 0.2 Controles: 2.9 ± 0.2 vs. 2.8 ± 0.3 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 0.8 ± 0.06 vs. Controles Controles: 1.2 ± 0.05 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 0.8 ± 0.1 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.04	prueba t-pareada permutada “ “	0.055 0.038*	
		prueba t-pareada permutada “ “	0.195 0.53	
		prueba t- no-pareada permutada	0.0006*	
		prueba t- no-pareada permutada	0.168	
J (1) Inicio Incorrecto Inhibición en la ejecución	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: 1 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: 1 ± 0	prueba t-pareada permutada “ “	1.0 1.0	
		prueba t-pareada permutada “ “	1.0 1.0	
		prueba t- no-pareada permutada	1.0	
		prueba t- no-pareada permutada	1.0	
J (2) Abortos S1 Inhibición en la ejecución	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 2.9 ± 1.4 vs. 6.6 ± 2.8 Controles: 1.4 ± 0.6 vs. 1.8 ± 0.9 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 6.8 ± 2.4 vs. 7.8 ± 2.4 Controles: 0.8 ± 0.8 vs. 1.9 ± 1.1 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.03 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.07 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.1 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.01	prueba t-pareada permutada “ “	0.468 0.812	
		prueba t-pareada permutada “ “	0.937 0.125	
		prueba t- no-pareada permutada	0.201	
		prueba t- no-pareada permutada	0.483	
J (3) Cambios prematuros Inhibición en la ejecución	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0.2 ± 0.2 vs. 0.6 ± 0.4 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 10.6 ± 3.2 vs. 30.4 ± 6.9 Controles: 20.1 ± 3.9 vs. 15.8 ± 2.9 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.02	prueba t-pareada permutada “ “	1.0 0.5	
		prueba t-pareada permutada “ “	0.078 0.207	
		prueba t- no-pareada permutada	0.338	

		Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 2.8 ± 1.0 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.08	prueba t- no-pareada permutada Mann-Whitney	0.092	
J (4) Abortos S2	Inhibición en la ejecución	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 17.7 ± 4 vs. 22.5 ± 5.8 Controles: 19.9 ± 2.7 vs. 18.8 ± 3.5 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 17.1 ± 2.5 vs. 21.9 ± 4.6 Controles: 17 ± 3.4 vs. 19.9 ± 3 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 2.0 ± 0.6 vs. Controles Controles: 1.3 ± 0.3 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.5 ± 0.3 vs. Controles Controles: 1.4 ± 0.2	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.468 0.719 0.937 0.283 0.374 0.782	
K Secuencias largas-S1	Inhibición en la ejecución	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0.7 ± 0.7 vs. 0.8 ± 0.8 Controles: 0.2 ± 0.2 vs. 1.0 ± 0.8 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 53 ± 4.2 vs. 27.6 ± 4.9 Controles: 52.6 ± 5.5 vs. 53.5 ± 4.3 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 0.5 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.1	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	1.0 0.5 0.023* 0.846 1.0 0.013*	
L Transición	Inhibición en la ejecución	Media ± SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 1.0 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.07 Controles: 1.1 ± 0.12 vs. 1.1 ± 0.1 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 0.9 ± 0.08 vs. 1.0 ± 0.09 Controles: 1.1 ± 0.1 vs. 1.1 ± 0.1 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.07 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.03 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.05 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.04	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.742 0.301 0.25 0.351 0.926 0.342	
	Presiones	Media ± SEM (# Presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 7.6 ± 0.08 vs. 7.6 ± 0.1 Controles: 7.6 ± 0.04 vs. 7.7 ± 0.06 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 12.2 ± 9.4 vs. 9.4 ± 0.9 Controles: 11.3 ± 0.8 vs. 10.9 ± 0.5 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 0.9 ± 0.01 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 0.7 ± 0.06 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.03	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.640 0.679 0.015* 0.605 0.560 0.013*	
O Latencia	Inhibición en la Transición	Media ± SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 1.9 ± 0.2 vs. 1.8 ± 0.2 Controles: 3.2 ± 0.3 vs. 3 ± 0.3 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 2.0 ± 0.3 vs. 2.0 ± 0.3 Controles: 2.9 ± 0.2 vs. 2.9 ± 0.2 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 0.9 ± 0.07 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.05 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.1	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.742 0.277 0.945 0.255 0.873 0.690	
P (1) Inicio Incorrecto	Inhibición en la Transición	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: 1 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1 ± 0 vs. Controles Controles: 1 ± 0	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 0.536	

Figura 12	P (2) Abortos S1 Inhibición en la Transición	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0.6 ± 0.6 vs. 5.5 ± 2.3 Controles: 0 ± 0 vs. 0.4 ± 0.4 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 4.3 ± 1.6 vs. 2.5 ± 2.5 Controles: 0.4 ± 0.4 vs. 0.4 ± 0.3 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.004 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.1 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.1	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.125 1.0 0.75 1.0 0.107 0.182	
	P (3) Cambios prematuros Inhibición en la Transición	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 1.0 ± 1.0 vs. 3.9 ± 2.1 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 0 ± 0 vs. 0.6 ± 0.6 Controles: 0.9 ± 0.7 vs. 1.4 ± 0.9 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.02 vs. Controles Controles: 1 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.02	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.375 1.0 0.25 0.143 0.706	
	P (4) Abortos S2 Inhibición en la Transición	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 16.8 ± 3.2 vs. 15.9 ± 3.6 Controles: 24.3 ± 3.9 vs. 25.4 ± 4.4 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 19.7 ± 7.6 vs. 25.6 ± 6.8 Controles: 26.5 ± 4.6 vs. 28 ± 3.5 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.0 ± 0.2 vs. Controles Controles: 1.3 ± 0.3 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.1 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.2 ± 0.1	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.945 0.946 0.375 0.876 0.736 0.736	
	Q Secuencias largas-S1 Inhibición en la Transición	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 1.7 ± 1.7 vs. 0.5 ± 0.5 Controles: 3.5 ± 0.02 vs. 6.2 ± 0.2 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 65.5 ± 5.9 vs. 51.8 ± 5.6 Controles: 54.9 ± 3.5 vs. 54 ± 5 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 0.9 ± 0.01 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 0.84 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.08	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	1.0 0.218 0.195 0.719 0.284 0.408	
	R Transición Inhibición en la Transición	Media ± SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 0.8 ± 0.07 vs. 0.9 ± 0.08 Controles: 1.2 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 0.8 ± 0.1 vs. 0.9 ± 0.1 Controles: 1.1 ± 0.1 vs. 1.1 ± 0.1 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 1.2 ± vs. 0.06 Controles: 0.9 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 1.1 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.03	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.039* 0.234 0.054 0.958 0.005** 0.092	
	Presiones Inhibición en la Transición	Media ± SEM (# Presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> LS: 7.7 ± 0.04 vs. 7.5 ± 0.1 Controles: 7.8 ± 0.1 vs. 7.9 ± 0.1 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> LS: 13 ± 0.6 vs. 12.1 ± 0.4 Controles: 11.3 ± 0.4 vs. 11.4 ± 0.4 Forzada: <i>On - Off</i> LS: 0.9 ± 0.01 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> LS: 0.9 ± 0.03 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.02	prueba t-pareada permutada “ “ prueba t-pareada permutada “ “ prueba t- no-pareada permutada prueba t- no-pareada permutada	0.195 0.375 0.078 0.876 0.133 0.118	
	B (1) Inicio Incorrecto	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i>	prueba t-pareada permutada “ “ “ “	1.0 1.0 1.0	Ratón Emx1-cre (+/-)

		M2-LS: 1.2 ± 0.9 vs. 1.4 ± 1.0 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1 ± 0 vs. Controles M1-LS: 1 ± 0.08 vs. Controles Controles: 1 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0 vs. Controles Controles: 1 ± 0	prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-no-pareada permutada " " prueba t-no-pareada permutada " "	0.75 1.0 1.0 1.0 1.0 0.735 1.0	AAV-Arch-M2-LS: N=9 AAV-Arch-M1-LS: N=8 AAV-eYFP-M2-LS: N=9 (Controles)
B (2) Abortos S1	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 M1-LS: 1.3 ± 0.9 vs. 1.2 ± 0.8 Controles: 0.8 ± 0.5 vs. 0.8 ± 0.8 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 1.1 ± 0.8 vs. 1.7 ± 1.7 M1-LS: 0.8 ± 0.5 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1 ± 0 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.03 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.1 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0.02 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0 vs. Controles Controles: 1 ± 0	prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-no-pareada permutada " " prueba t-no-pareada permutada " "	1.0 1.0 1.0 1.0 0.5 1.0 1.0 0.439 0.735 0.411		
B (3) Cambios prematuros	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 2.8 ± 2.4 vs. 2.1 ± 1.7 M1-LS: 0.6 ± 0.6 vs. 0 ± 0 Controles: 0.3 ± 0.3 vs. 2.1 ± 1.6 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 17.4 ± 4.1 vs. 14.7 ± 2.9 M1-LS: 19.8 ± 5.2 vs. 20.4 ± 4.1 Controles: 20.8 ± 4.9 vs. 14.6 ± 4.9 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.03 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.01 vs. Controles Controles: 1.4 ± 0.4 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0.2 vs. Controles M1-LS: 1.1 ± 0.1 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.08	prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-no-pareada permutada " " prueba t-no-pareada permutada " "	1 1.0 0.5 0.25 0.843 0.109 0.347 0.282 0.504 0.370		
B (4) Abortos S2	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 15.5 ± 5.5 vs. 16.1 ± 3.6 M1-LS: 18.9 ± 3.6 vs. 15.9 ± 3.5 Controles: 20.9 ± 3.8 vs. 21.6 ± 5.2 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 16.6 ± 2.5 vs. 26.7 ± 4.5 M1-LS: 21.1 ± 6.5 vs. 29.4 ± 6.9 Controles: 18.8 ± 1.9 vs. 22.9 ± 3.2 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.3 ± 0.3 vs. Controles M1-LS: 0.8 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.5 ± 0.3 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.6 ± 0.1 vs. Controles M1-LS: 1.8 ± 0.5 vs. Controles Controles: 1.3 ± 0.2	prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-no-pareada permutada " " prueba t-no-pareada permutada " "	0.640 0.546 1.0 0.011* 0.078 0.496 0.796 0.370 0.190 0.480		
C Secuencia	Media ± SEM (# presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 8.0 ± 0.2 vs. 8.0 ± 0.1 M1-LS: 7.7 ± 0.1 vs. 7.8 ± 0.1 Controles: 7.7 ± 0.1 vs. 7.6 ± 0.09 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 10.4 ± 0.5 vs. 10 ± 0.5 M1-LS: 11.1 ± 0.9 vs. 10.8 ± 0.9 Controles: 10.8 ± 0.9 vs. 10.7 ± 0.6 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.02 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.03 vs.	prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-pareada permutada " " " " prueba t-no-pareada permutada " " prueba t-no-pareada permutada " "	0.652 0.742 0.425 0.164 0.382 0.652 0.436 0.276 0.730 0.672		
C Sub-sec.1	Media ± SEM (# presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 4.0 ± 0.03 vs. 4.1 ± 0.1 M1-LS: 4.0 ± 0.05 vs. 4.0 ± 0.03 Controles: 4.2 ± 0.1 vs. 4.0 ± 0.03	prueba t-pareada permutada " " " "	0.5 0.812 0.437		

		Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 6.1 ± 0.5 vs. 5.7 ± 0.4 M1-LS: 6.5 ± 0.5 vs. 6.6 ± 0.4 Controles: 6.4 ± 0.7 vs. 6.3 ± 0.5 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.01 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.02 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.05	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	0.097 0.742 0.820 0.254 0.764 0.604 0.541	
	C Sub-sec. 2	Media ± SEM (# presiones) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 3.9 ± 0.2 vs. 3.9 ± 0.1 M1-LS: 3.7 ± 0.06 vs. 3.7 ± 0.07 Controles: 3.7 ± 0.08 vs. 3.6 ± 0.08 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 4.3 ± 0.2 vs. 4.1 ± 0.2 M1-LS: 4.5 ± 0.3 vs. 4.2 ± 0.3 Controles: 4.2 ± 0.2 vs. 4.2 ± 0.1 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0.01 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0.02 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.03 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.04 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.05	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	1.0 0.460 0.652 0.382 0.195 0.820 0.489 0.321 0.666 0.167	
	D Secuencias largas-S1	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 4.2 ± 3.6 vs. 3.1 ± 2.3 M1-LS: 4.5 ± 1.9 vs. 1.7 ± 1.2 Controles: 2.6 ± 2.6 vs. 2.6 ± 2 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 50.5 ± 6.5 vs. 35.9 ± 5.8 M1-LS: 46.8 ± 6.8 vs. 43.5 ± 6.5 Controles: 45.2 ± 6 vs. 49 ± 5 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.04 vs. Controles M1-LS: 0.8 ± 0.07 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.02 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.7 ± 0.04 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.1 ± 0.1	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	0.75 0.125 1.0 0.003** 0.710 0.496 0.876 0.126 0.001** 0.321	
Figura 13	B Última presión en S1	Media ± SEM (#) Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: -1.9 ± 0.1 vs. -2 ± 0.1 M1-LS: -2.1 ± 0.1 vs. -2.1 ± 0.1	Wilcoxon “ “	0.468 0.562	Ratón Emx1-cre (+/-)
	C Transición	Media ± SEM (s) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 1.0 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.1 M1-LS: 1.2 ± 0.2 vs. 1.1 ± 0.1 Controles: 0.9 ± 0.1 vs. 0.9 ± 0.1 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 0.8 ± 0.06 vs. 0.9 ± 0.06 M1-LS: 1.0 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.07 Controles: 0.9 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.03 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0.08 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.02 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.1 ± 0.05 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0.07 vs. Controles Controles: 0.9 ± 0.02	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	0.25 0.546 0.910 0.039* 0.945 0.0546 0.489 0.370 0.004** 0.235	AAV-Arch-M2-LS: N=9 AAV-Arch-M1-LS: N=8 AAV-eYFP-M2-LS: N=9 (Controles)
	E (1) Inicio Incorrecto	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 0.8 ± 0.8 vs. 0.3 ± 0.3 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0.4 ± 0.4 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0 vs. Controles M1-LS: 1 ± 0 vs. Controles	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 0.735 1.0	

		Controles: 1 ± 0		
E (2) Abortos S1	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 M1-LS: 2.1 ± 1 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 0.5 ± 0.5 vs. 0 ± 0 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0.7 ± 0.7 vs. 0.8 ± 0.5 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1 ± 0 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.01 vs. Controles Controles: 1 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.0 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	1.0 0.25 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 0.164 0.653 0.776	
E (3) Cambios prematuros	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 M1-LS: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Controles: 0 ± 0 vs. 0 ± 0 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 2.9 ± 1.9 vs. 0 ± 0 M1-LS: 5.8 ± 5.8 vs. 3.9 ± 3.9 Controles: 1.6 ± 1.2 vs. 2.5 ± 1.6 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0 vs. Controles M1-LS: 1.0 ± 0 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 0.9 ± 0.01 vs. Controles M1-LS: 0.9 ± 0.04 vs. Controles Controles: 1.0 ± 0.04	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	1.0 1.0 1.0 0.5 1.0 0.25 1.0 1.0 0.07 0.141	
E (4) Abortos S2	Media ± SEM (%) Forzada <i>Off</i> vs. Forzada <i>On</i> M2-LS: 15.6 ± 4.6 vs. 18.3 ± 4.4 M1-LS: 18.8 ± 4.8 vs. 12.8 ± 3 Controles: 24.7 ± 5.8 vs. 22.9 ± 3.7 Autoiniciada <i>Off</i> vs. Autoiniciada <i>On</i> M2-LS: 33.8 ± 5.9 vs. 30.2 ± 7.1 M1-LS: 30.6 ± 5.8 vs. 34.2 ± 5.6 Controles: 23.3 ± 5.4 vs. 29 ± 3.9 Forzada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.5 ± 0.3 vs. Controles M1-LS: 0.8 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.2 ± 0.2 Autoiniciada: <i>On - Off</i> M2-LS: 1.0 ± 0.2 vs. Controles M1-LS: 1.2 ± 0.1 vs. Controles Controles: 1.4 ± 0.2	prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-pareada permutada “ “ “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “ prueba t-no-pareada permutada “ “	0.640 0.578 0.742 0.734 0.382 0.425 0.268 0.557 0.386 0.605	