



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIRCUITOS DE INTERACCIONES CEREBELO – GANGLIOS BASALES

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

RUBÉN DARÍO CONTRERAS LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR

COMITÉ TUTOR

DR. PAVEL RUEDA OROZCO

DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, CDMX, ABRIL DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
CEREBELO	11
<i>Cerebelo →Tálamo →Corteza</i>	14
GANGLIOS BASALES	14
<i>Ganglios basales →Tálamo →Corteza</i>	16
AFERENCIAS DEL CEREBELO Y GANGLIOS BASALES HACIA REGIONES EN EL TÁLAMO	16
INTERACCIÓN CEREBELO-GANGLIOS BASALES	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
METODOLOGÍA	22
MARCAJE TRANSINÁPTICO DEL CEREBELO HACIA EL ESTRIADO A TRAVÉS DEL TÁLAMO (DCN→TH→ESTR)	22
INYECCIONES VECTORES VIRALES.	23
REGISTRO DE CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EVOCADAS POR LA ACTIVACIÓN DE TERMINALES AXÓNICAS DCN→TÁLAMO O DCN→TÁLAMO→ESTRIADO	24
CONTEO DE CÉLULAS EN LA VÍA DCN→TÁLAMO→ESTRIADO	25
CUANTIFICACIÓN DE PROCESOS CELULARES EN LA VÍA DCN→TÁLAMO	26
ENTRENAMIENTO DE RATONES PARA REALIZAR DESPLAZAMIENTOS UNIDIRECCIONALES Y COMPLEJOS EN UNA PALANCA	27
<i>Habitación:</i>	27
<i>Pre-entrenamiento:</i>	27
<i>Entrenamiento desplazamiento unidireccional (8mm atrás, trayectoria 1)</i>	28
<i>Entrenamiento desplazamiento secuencial (atrás-adelante)</i>	28
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	29
PARÁMETROS EVALUADOS DURANTE LOS DESPLAZAMIENTOS DE LA PALANCA	30
VIDEO ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN EL MOVIMIENTO	31
INHIBICIÓN OPTOGENÉTICA DE LAS PROYECCIONES SINÁPTICAS <i>IN VIVO</i>	32
REGISTRO DE ACTIVIDAD DE CALCIO <i>IN VIVO</i>	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
RESULTADOS	35
LA ACTIVACIÓN DE LAS PROYECCIONES DCN→TÁLAMO→ESTRIADO MODULA AL ESTRIADO CON ALTA PROBABILIDAD	35

LAS PROYECCIONES DE LOS DCN→TÁLAMO HACIA EL ESTRIADO DORSAL OCURRE PRINCIPALMENTE A TRAVÉS DE LOS NÚCLEOS CENTRAL LATERAL, PARAFASCICULAR, Y VENTRAL LATERAL -----	41
EJECUCIÓN DE MOVIMIENTOS DE ALCANCE, Y DESPLAZAMIENTOS UNIDIRECCIONALES O EN SECUENCIA CON AYUDA DE UNA PALANCA -----	43
ESTRATEGIA PARA LA INHIBICIÓN DE LAS PROYECCIONES INDIVIDUALES DCN→TÁLAMO Y LAS PROYECCIONES DCN→TÁLAMO→ESTRIADO -----	49
LA INHIBICIÓN DE LAS PROYECCIONES INDIVIDUALES AL DCN→TÁLAMO AFECTAN EL MOVIMIENTO DE ALCANCE O LOS DESPLAZAMIENTOS UNIDIRECCIONALES, MIENTRAS QUE LA INHIBICIÓN DE LA PROYECCIÓN DCN→TÁLAMO→ESTRIADO SOLO AFECTA EL MOVIMIENTO DE ALCANCE -----	54
INHIBICIÓN DE LAS PROYECCIONES DISINÁPTICAS DCN→TÁLAMO→ESTRIADO AFECTA LA ACTUALIZACIÓN DEL DESPLAZAMIENTO UNIDIRECCIONAL A DESPLAZAMIENTOS EN SECUENCIA -----	59
LAS PROYECCIONES DCN→TÁLAMO SON REQUERIDAS MÁS ALLÁ DEL CONTROL DE MOVIMIENTO EN LÍNEA: ALTERACIONES NO-MOTORAS DURANTE LA ACTUALIZACIÓN-----	62
LA INHIBICIÓN DE LAS PROYECCIONES DCN→TÁLAMO→DLS AFECTA EL MOVIMIENTO DE ALCANCE Y LA EJECUCIÓN DE DESPLAZAMIENTOS EN SECUENCIA AUN EN EL ENTRENAMIENTO TARDÍO -----	64
REGISTRO DE TRANSITORIOS DE GCAMP EN CÉLULAS DE LA VÍA DCN→PF MUESTRAN MODULACIÓN DURANTE LOS DESPLAZAMIENTOS UNIDIRECCIONALES Y EN SECUENCIA-----	68
REGISTRO DE LA SEÑAL GLOBAL DE GCAMP EN AXONES DE LA VÍA DCN→Th→DLS MUESTRA MODULACIÓN DURANTE LA EJECUCIÓN DE DESPLAZAMIENTOS UNIDIRECCIONALES Y EN SECUENCIA -----	70
DISCUSIÓN -----	72
CONCLUSIONES-----	79
LIMITACIONES DEL ESTUDIO -----	79
BIBLIOGRAFÍA -----	81
ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE DOCTORADO-----	86

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), espacio donde he crecido en los últimos muchos años.

Al personal del Instituto de Fisiología Celular (IFC) y al programa de posgrado en Ciencias Biomédicas.

Al financiamiento con identificación 332379 otorgado por parte de CONACyT durante mis estudios de doctorado.

A los financiamientos otorgados al laboratorio: CONACyT 220412; Fronteras de la Ciencia CONACyT 2019/154039 y 2022; DGAPA-PAPIIT-UNAM IA200815, IN226517, IN203420, IN203123, cátedra Moshinsky.

Durante la realización de este trabajo tuve la posibilidad de compartir mi experiencia académica y experimental con el licenciado en Psicología Eduardo Durán Salas, de la cual se desprende su trabajo de tesis titulado “El cerebelo se comunica disinápticamente con el estriado a través de núcleos específicos del tálamo”. Los datos presentados en la tesis del licenciado Eduardo Durán Salas son parte de la figura 10G y 10H de la presente tesis doctoral.

A mis padres, hermosos y queridos. Sin ustedes esto no hubiera siquiera, iniciado.

A mi **madre**: Llegamos al final; no era como esperábamos. Te seguiré compartiendo todo mi trayecto, hasta que alguien más cuente el nuestro o podamos iniciar uno nuevo, juntos.

A mi **padre**: Seguimos caminando; siempre me impulsas a avanzar más. Tus historias son un mapa para mí, te admiro.

A mi **hermano**: te amo profundamente. Nos hemos hecho adultos. Sigo viéndote como mi pequeño hermano a cuidar. Extraño jugar contigo, quiero seguir viéndote muchos, muchos años más.

A mi **esposa**, aún no me acostumbro a llamarte así; prefiero, mi confidente de vida. Nadie me conoce como tú. Siempre que me siento a la sombra de un árbol veo los muchos caminos, ramas que pude haber recorrido... Sin duda, volvería a repetir este camino contigo. A conquistar Berkeley... Rana, Oso y Tubis.

Al capitán de la nave **Chus**: su ayuda y cariño me han mantenido en este camino. Siempre un placer conversar con usted, aprendo de su experiencia.

Al doctor **Fatuel Tecuapetla**, aprendí a navegar entre el ruido de las ideas y darle sentido hasta crear una historia.

A los doctores **Pavel Rueda Orozco** y **Francisco Sotres Bayón** por sus consejos y constantes críticas académicas al trabajo de doctorado.

A la doctora **Magdalena Giordano Noyola**, siempre me mostraste caminos alternos a los que yo miraba, creo que tomé alguno de ellos.

A la doctora **Verónica Rodríguez Córdova**, gracias por dejarme experimentar en tu laboratorio y darme un ambiente sano de trabajo; fue una de las mejores experiencias de mi vida.

Al doctor **Víctor Manuel Magdaleno Madrigal**, mi primera experiencia de laboratorio y mi primer Maestro. No creo haberlo hecho todo bien, pero siempre estuve atento a tus enseñanzas. Tienes un grado de responsabilidad en lo que soy.

Al doctor **Alejandro Valdés Cruz**, te tengo un profundo cariño. Siempre estoy atento a tus palabras y consejos, también tienes un grado de responsabilidad en lo que soy.

Al doctor **Edgar Díaz Hernández**, amigo entrañable de vida. Nunca te he podido ganar y creo que ya terminé por aceptarlo, siempre estás un paso delante de mí, estos últimos años me has apoyado mucho. Moriremos en una cancha de frontón. Te respeto.

Al doctor **Gerónimo Velázquez**, amigo entrañable de vida. Recuerdo el primer café expreso que me invitaste, sigo tomándolo. Tenemos la misma raíz, me reconozco en ti.

Al Maestro **Anil Verma**. Amigo entrañable de vida. Tus constantes críticas y pensamientos han influido en mi manera de trabajar. Me gusta tu sinceridad. Te respeto.

Al maestro **José María Cornejo**, amigo entrañable de vida. Gracias por tu sinceridad, siempre te he visto como un maestro. Te admiro. Tienes un grado de responsabilidad en lo que soy.

Al maestro **Juan Carlos Escotto**, amigo entrañable de vida. Disfruto conversar contigo, en los últimos años tu amistad ha sido parte de mi equilibrio. Deseo conservar tu amistad.

A la doctora **Ana Karen Pimentel**, amiga entrañable de vida. Doctora, caminas muy rápido, apenas puedo seguir tus pasos. Siempre recordaré una de las mejores etapas de mi vida a tu lado.

Al Maestro **Vicente Camacho Téllez**. Amigo entrañable de vida. Necesitamos reunirnos, hay muchas charlas pendientes. Te extraño.

A la doctora **Erandi Velázquez**, amiga entrañable de vida. Te tengo un profundo cariño, hace mucho que no charlamos, extraño platicar contigo.

Al doctor **Héctor Alatraste León**. Amigo entrañable de vida. Disfruto los silencios largos contigo y tu sarcasmo. Nos falta mucho por hacer.

A la doctora **Kathia Ramírez**. Amiga entrañable de vida. Admiro el ímpetu que tienes, respeto tu trabajo.

Al licenciado **Eduardo Duran**. Espero mi estancia contigo te haya hecho crecer.

## RESUMEN

La comunicación sináptica de la vía Cerebelo-Tálamo-Estriado se ha visto implicada en conductas dirigidas a objetivos y las alteraciones en esta vía se ha relacionado con distonía cerebelosa. Sin embargo, la conexión anatómica a través de núcleos específicos del tálamo y su contribución en la ejecución de movimientos no ha sido investigada. En este trabajo, se usaron trazadores transinápticos y retrógrados, registros *ex vivo* en rebanadas de cerebro, e inhibiciones optogenéticas durante la ejecución de movimientos unidireccionales o en secuencia para demostrar que los núcleos profundos del cerebelo influyen sobre el estriado dorsal con alta probabilidad, y que esta vía es requerida durante movimientos en secuencia. Mostramos que esta comunicación ocurre principalmente a través del núcleo parafascicular (PF), centrolateral (CL), y ventral lateral (VL), observando que las vías DCN→VL y DCN→CL contribuyen durante la ejecución de movimientos unidireccionales, mientras que la vía DCN→PF y DCN→Tálamo→Estriado contribuyen durante la ejecución de movimientos en secuencia. Estos hallazgos remarcan contribuciones específicas de las diferentes vías DCN→Tálamo→Estriado durante la ejecución de movimientos controlados.

## ABSTRACT

Cerebellar-thalamo-striatal synaptic communication has been implicated in a wide range of behaviors, including goal-directed actions, and is altered in cerebellar dystonia. However, its detailed connectivity through the thalamus and its contribution to the execution of forelimb movements is unknown. Here, we use transsynaptic and retrograde tracing, ex vivo slice recordings, and optogenetic inhibitions during the execution of simple or sequential joystick displacements to demonstrate that the deep cerebellar nuclei (DCN) influence the dorsal striatum with a very high probability. We show this mainly occurs through the centrolateral (CL), parafascicular (PF), and ventrolateral (VL) nuclei of the thalamus. Observing that the DCN→VL and DCN→CL pathways contribute to the execution of simple forelimb displacements while the DCN→PF and DCN→thalamo→striatal pathways contribute to the appropriate execution of forelimb reaching and sequential displacements. These findings highlight specific contributions of the different cerebellar-thalamo-striatal paths to the control of skilled forelimb movement.

# INTRODUCCIÓN

El cerebelo y el estriado han sido tradicionalmente pensados como parte de circuitos paralelos que participan en la regulación del control de movimiento. Lesiones o inactivaciones en cualquiera de estas estructuras provoca dificultades en la ejecución de movimientos de alcance, en la adaptación de parámetros cinemáticos del movimiento, pérdida de coordinación y balance del cuerpo (Amrani et al., 1996; Kato & Kimura, 1992; Manni & Dow, 1963; Molinari et al., 1990; Paz et al., 1982; Sakayori et al., 2019) y en la ejecución de secuencias motoras (Hikosaka et al., 1998; Lu et al., 1998; Miyachi et al., 1997; Tecuapetla et al., 2016).

El rol de las conexiones Cerebelo→Tálamo→Corteza ha sido ampliamente explorado en movimientos voluntarios, planeación motora, y mecanismos de inicio de movimientos (Bosch-Bouju et al., 2013; Chabrol et al., 2019; Dacre et al., 2021; Gao et al., 2018; Nashef et al., 2018; Popa et al., 2013; Proville et al., 2014; Sakata et al., 1966; Wagner et al., 2019), pero las conexiones Cerebelo→Tálamo→Subcorticales han sido vagamente explorados.

Recientemente, se ha propuesto una vía subcortical (DCN→Tálamo→Estriado) entre los núcleos profundos del cerebelo (DCN), principal salida del cerebelo, y el núcleo estriado, principal entrada de los ganglios basales, a través del tálamo (Chen et al., 2014; Hoshi et al., 2005; Ichinohe et al., 2000; Xiao et al., 2018). Esta conexión se ha relacionado con la adaptación cinemática del movimiento (Seidler et al., 2006), conductas dirigidas a objetivos (Xiao et al., 2018), y aprendizaje de secuencias (Tzvi et al., 2014); la disfunción de esta vía puede resultar en distonía (Chen et al., 2014). Sin embargo, la eficacia de la comunicación entre los DCN y el estriado, y si esta comunicación ocurre por múltiples vías (Gornati et al., 2018), o si estas vías contribuyen a la ejecución de movimientos sigue siendo desconocido.

En este trabajo se diseñaron una serie de experimentos para poner a prueba la hipótesis de que los DCN interactúan con el estriado a través de múltiples proyecciones di-sinápticas a través del

tálamo, y que estas conexiones contribuyen a la ejecución controlada de movimientos aprendidos.

## ANTECEDENTES

El cerebelo y ganglios basales, canónicamente, son parte de circuitos independientes que permiten desarrollar movimientos controlados (Doya, 2000). La lesión o inactivación de cualquiera de estas estructuras provoca dificultades en movimientos de alcance, coordinación, balance, adaptación cinemática (Amrani et al., 1996; Kato & Kimura, 1992; Manni & Dow, 1963; Molinari et al., 1990; Paz et al., 1982; Sakayori et al., 2019) y en la ejecución de movimientos en secuencia (Hikosaka et al., 1998; Lu et al., 1998; Miyachi et al., 1997; Tecuapetla et al., 2016).

El estudio del cerebelo se ha centrado principalmente en el circuito vestibular-cerebelo, médula espinal-cerebelo, y cortical-cerebelo (**Figura 1**), sin embargo, el circuito ganglios basales-cerebelo se ha estudiado poco.

### Cerebelo

El cerebelo permite el control motor, principalmente, a través del circuito vestibular-cerebeloso para censar la posición de la cabeza y del cuerpo, participa en la coordinación de músculos axiales y músculos extensores de las extremidades, lo que permite coordinar movimientos oculares, cabeza y tener balance durante la marcha o mantenimiento de posturas (Brooks et al., 2015; Kandel et al., 2021).

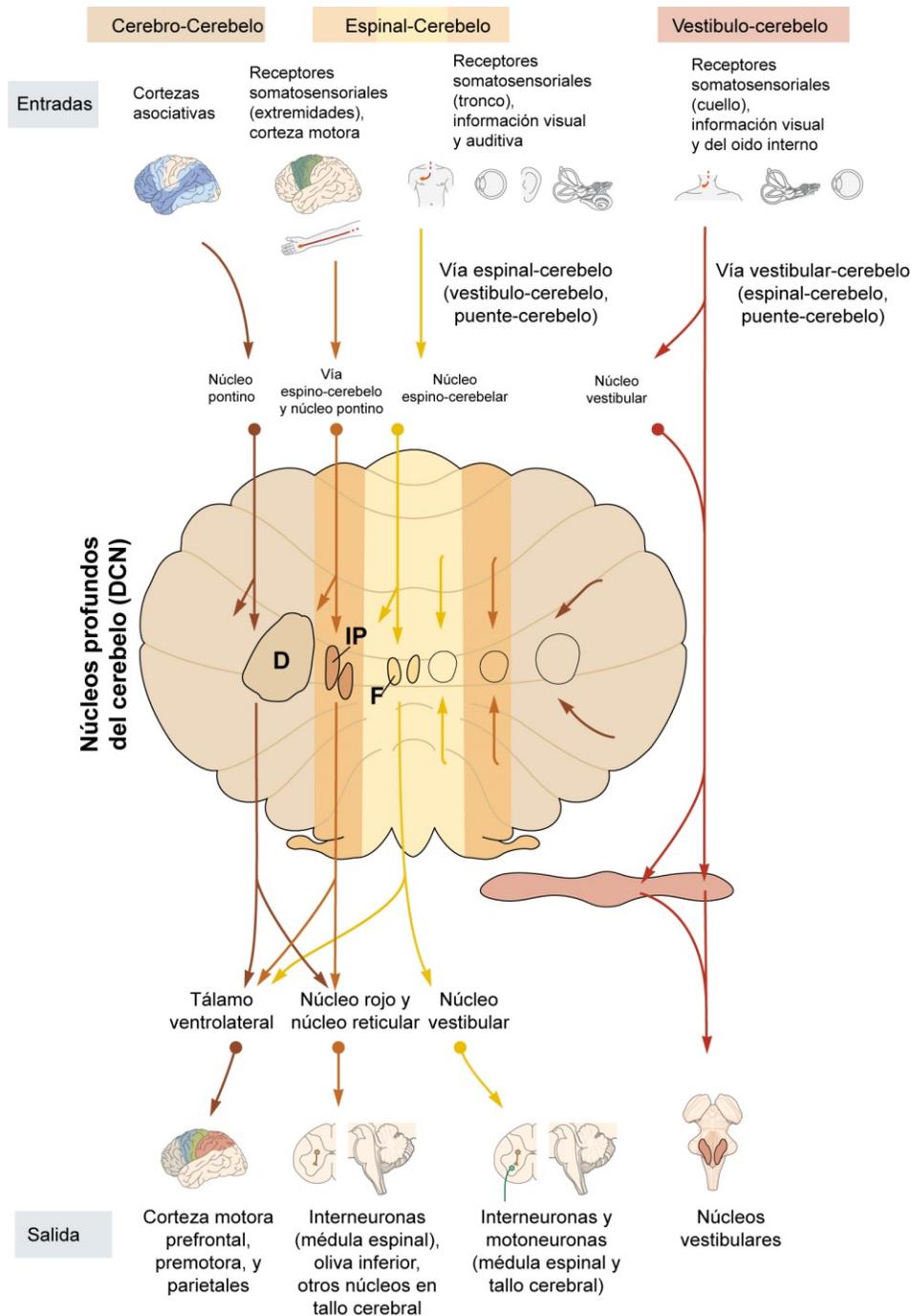
Otro circuito que involucra al cerebelo es el circuito médula espinal-cerebeloso. Este recibe aferencias con información somato-sensorial a través los tractos espino-cerebeloso dorsales y ventrales, esta vía provee información de los músculos y propio-receptores en las articulaciones. El cerebelo a través de su principal salida, los núcleos profundos del cerebelo (DCN), activa tónicamente a sus terminales postsinápticas, y a través de varios relevos como el núcleo rojo o la región ventral lateral del tálamo permite la activación de grandes grupos musculares que

permiten controlar la posición y balance del cuerpo durante movimientos voluntarios (Kandel et al., 2021; Sathyamurthy et al., 2020) .

Otro circuito del cerebelo es el cortical-cerebeloso, se relaciona con la planeación de movimientos, aprendizaje y ejecución de programas motores. La principal comunicación del cerebelo con la corteza es con la región pre-motora y motora primaria, las cuales reciben información de los DCN a través del tálamo (Th) (principalmente a través de la región ventral lateral, VL); la corteza cerebral envía proyecciones de regreso al cerebelo a través de núcleos en el puente (Gao et al., 2018; Kandel et al., 2021; Proville et al., 2014) .

Durante la ejecución de movimientos voluntarios aprendidos se requiere el cerebelo intacto y la coordinación de los circuitos mencionados para que la secuencia de los componentes del movimiento, por ejemplo la planeación, y la coordinación de músculos y articulaciones durante la ejecución de un movimiento sea ejecutada con precisión temporal y espacial (Bastian et al., 1996; Becker & Person, 2019; Berger et al., 2020; Gao et al., 2018; Sathyamurthy et al., 2020).

La mayor parte de investigación sobre los circuitos del cerebelo se centran en el circuito cortical-cerebeloso sin embargo, hallazgos recientes proponen la existencia de otro circuito subcortical: el circuito cerebelo - ganglios basales, el cual puede tener implicaciones propias (Chen et al., 2014; Hoshi et al., 2005; Ichinohe et al., 2000; Xiao et al., 2018). A la fecha, hay poca información acerca de este último en comparación con los otros circuitos que implican al cerebelo. Es importante resaltar que la comunicación cerebelo – ganglios basales también es a través del tálamo, igual que en el circuito cortical – cerebelo, esto abre la pregunta de si es el mismo tipo de información la que se envía a través del tálamo a la corteza versus los ganglios basales o son rutas diferentes con información diferente.



**Figura 1. Resumen de los principales circuitos del cerebelo involucrados en el control motor a excepción del circuito cerebelo – ganglios basales.**

En la parte superior se observan las entradas de información hacia el cerebelo para cada circuito del cerebelo (Cerebro-Cerebelo; Espinal-Cerebelo; Vestíbulo-Cerebelo). En la mitad, se observa una vista coronal del cerebelo en donde se aprecia la corteza del cerebelo y los núcleos profundos del cerebelo. En la parte inferior se observa el destino de las salidas de información desde el cerebelo. Las líneas indican el sentido del flujo de información. D: núcleo dentado; IP: núcleo interpositus; F: núcleo fastigial. Figura tomada y editada del capítulo “The Cerebellum” en “Principles of neural sciences” (Kandel et al., 2021).

## **Cerebelo→Tálamo→Corteza**

La conectividad cerebro-cerebelo ha sido parte de una extensa investigación, estudios anatómicos y funcionales realizados en gatos ha mostrado que hay mapas de conectividad entre la corteza motora y somato-sensorial entre el cerebelo y la corteza cerebral, siendo los núcleos del puente y la oliva inferior los principales revelos de la corteza cerebral hacia la corteza del cerebelo, mientras que el cerebelo envía proyecciones a la corteza cerebral a través del tálamo ventral (Allen & Tsukahara, 1974).

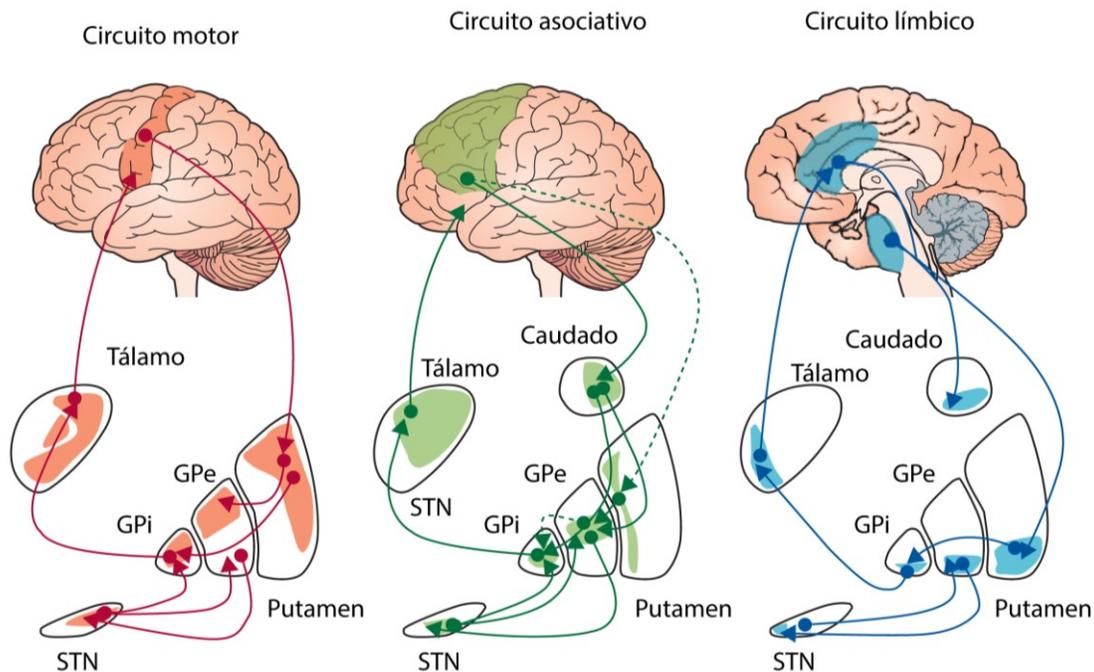
Estos circuitos sensorio-motores han sido observados en primates (Bostan et al., 2013) y roedores (Proville et al., 2014), siendo requeridos durante la ejecución de movimientos voluntarios, y para desencadenar el inicio de movimiento dependiente de contexto (Dacre et al., 2021). Estudios recientes muestran que el cerebelo se comunica con otras áreas de la corteza cerebral como la corteza premotora con la cual establece un circuito necesario para el mantenimiento de la actividad preparatoria en una tarea de discriminación sensorial (Gao et al., 2018).

El cerebelo establece comunicación sináptica con amplias regiones en el tálamo (por ejemplo, ventrales e intralaminares) (Aumann & Horne, 1996; Fujita et al., 2020; Gornati et al., 2018), y se ha observado que los axones de estas conexiones DCN→tálamo dejan proyecciones en cortezas frontales, corteza insular, corteza cingulada, corteza orbital (Middleton & Strick, 2001; Xiao et al., 2018). Estos datos indican que el cerebelo no solo es relevante para el control motor, sino también para tareas con demandas cognitivas y emocionales (King et al., 2019).

## **Ganglios basales**

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales que forman parte de los circuitos corteza – ganglios basales – tálamo que gobiernan el control motor. Los ganglios basales reciben entradas sinápticas de la corteza cerebral y del tálamo. El estriado, núcleo más grande de los ganglios basales (caudado/putamen en primates) recibe la mayor cantidad de aferentes

corticales y talámicas. Se reconocen tres sub-circuitos dentro del circuito corteza – ganglios basales – tálamo, ubicándose territorios anatómicos específicos para cada uno de estos: el circuito motor, asociativo y límbico (**Figura 2**) (Hunnicutt et al., 2016; Obeso et al., 2008).



**Figura 2. Resumen de los principales circuitos de los ganglios basales.**

De izquierda a derecha se muestran el circuito motor, asociativo y límbico. Los colores indican en forma esquemática las regiones involucradas en cada circuito. Las flechas indican el sentido del flujo de información. STN: núcleo subtalámico; GPi; globo pálido interno; GPe: Globo pálido externo. Figura tomada y editada de (Obeso et al., 2008).

El núcleo estriado contiene principalmente neuronas de proyección llamadas espinosas medianas por su forma anatómica, el resto son células con proyecciones intra-estriatales, involucradas en microcircuitos al interior del núcleo. Las células de proyección se caracterizan por tener diferencias funcionales y anatómicas, expresando receptores a dopamina D1 o receptores D2, esta segregación las identifica como neuronas de la vía directa e indirecta respectivamente.

Los núcleos de salida de los ganglios basales envían conexiones sinápticas hacia el tálamo, y en turno a la corteza. La función de estas vías está relacionada con el inicio y termino de acciones, secuencia de acciones, aprendizaje motor, vigor de movimientos, y la codificación de parámetros cinemáticos del movimiento (Dhawale et al., 2021; Díaz-Hernández et al., 2018; Sánchez-Fuentes et al., 2021; Tecuapetla et al., 2016).

### **Ganglios basales→Tálamo→Corteza**

En el tálamo el núcleo PF y el núcleo ventromedial (VM) reciben proyecciones de los principales núcleos de salida de los ganglios basales, la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y el globo pálido interno (GPi). Con ayuda de trazadores retrógrados y anterógrados transinápticos se ha observado que el núcleo PF recibe aferencias del SNr con subdivisiones anatómicas-funcionales y estas envían proyecciones a diferentes regiones sensorio-motoras y asociativas de la corteza, por otro lado, las regiones en el núcleo VM que reciben aferencias de las SNr proyectan principalmente a regiones motoras de la corteza cerebral (Foster et al., 2021; Lanciego et al., 2012).

### **Aferencias del cerebelo y ganglios basales hacia regiones en el tálamo**

El tálamo es una estructura con aproximadamente 30 núcleos, los cuales pueden proyectar a diferentes regiones corticales, núcleos de ganglios basales, y recibe proyecciones de la corteza cerebral, ganglios basales, cerebelo, tallo cerebral.

En mamíferos, el tálamo puede ser dividido en secciones (Rikhye et al., 2018):

**Región anterior:** contiene a los núcleos anteromedial, anterolateral, anterodorsal, y laterodorsal

**Región línea media:** contiene a los núcleos paratenial, paraventricular, y laterodorsal.

**Región intralaminar:** contiene a los núcleos centrolateral, centromedial, parafascicular, núcleos mediales dorsales.

**Región ventral:** contiene a los núcleos del complejo ventral basal, núcleo ventral medial.

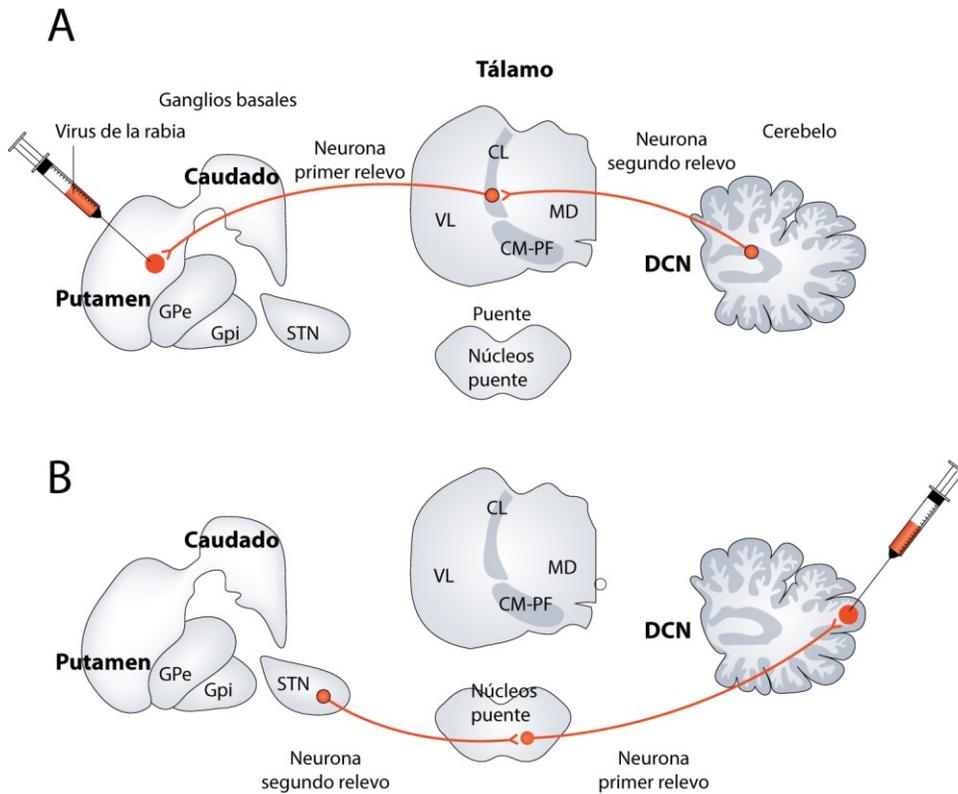
**Región posterior:** contiene a los núcleos posteromedial, posterior lateral, pulvinar, geniculado medial, geniculado lateral.

El cerebelo establece comunicación sináptica con la región ventral e intralaminar (Aumann & Horne, 1996; Fujita et al., 2020; Gornati et al., 2018), de igual manera los núcleos de salida de los ganglios basales establecen comunicación sináptica con la región ventral e intralaminar (Foster et al., 2021; Lanciego et al., 2012), sin embargo, las proyecciones de cerebelo y ganglios basales están segregadas en la región ventral del tálamo (Bosch-Bouju et al., 2013) lo que sugiere que ejercen funciones diferentes en el las mismas regiones del tálamo.

## **Interacción cerebelo-ganglios basales**

Las rutas previamente descritas para el cerebelo y ganglios basales describen rutas paralelas con segregación a nivel del tálamo, sin embargo, descripciones anatómicas en ratas con trazadores anterógrados inyectados en los núcleos profundos del cerebelo y retrógrados inyectados en el núcleo estriado mostraron regiones en el tálamo en donde los dos marcadores convergen (Ichinohe et al., 2000); estos resultados también fueron observados al inyectar partículas virales de la rabia en monos, las cuales realizan transinápsis retrograda dependiente del tiempo de expresión (Hoshi et al., 2005), revelando que la región intralaminar del tálamo es un sitio de interacción entre los núcleos profundos del cerebelo y el estriado (**Figura 3**).

En este estudio (Hoshi et al., 2005) también se observaron células marcadas en la región ventral lateral del tálamo (VL). Esto concluye que existe comunicación subcortical di-sináptica entre el cerebelo y los ganglios basales (el estriado) a través del tálamo, exigiendo repensar la forma en que estos dos sistemas, implicados en el control motor, pueden comunicarse durante funciones motoras y no motoras.



**Figura 3. Circuito Cerebelo-Ganglios basales.**

**A)** Se observa la vía disináptica de los núcleos profundos del cerebelo (DCN) a los ganglios basales a través del tálamo; izquierda: se muestra la inyección del trazador transináptico retrogrado (virus de la rabia).

**B)** Se observa la vía disináptica de los ganglios basales al cerebelo a través del puente; derecha: inyección virus de la rabia. Figura tomada y editada de (Bostan & Strick, 2018).

Con respecto a la verificación funcional de la vía cerebelo - tálamo - estriado se han reportado latencias muy cortas de activación desde los núcleos profundos del cerebelo hasta el estriado, con respuestas variadas (excitación, inhibición, excitación-inhibición) (Chen et al., 2014), y también se ha documentado que la activación del cerebelo modula a la vía directa e indirecta y neuronas colinérgicas en el estriado (Xiao et al., 2018).

Adicionalmente, la funcionalidad de la vía cerebelo - tálamo - estriado se mostró en un modelo de distonía inducida en la corteza del cerebelo, a través de bloquear las bombas de sodio en las células de Purkinje, en este modelo se observó que la actividad eléctrica del cerebelo se tornó irregular y que esta actividad aberrante se generalizó al núcleo estriado provocando distonía en

los ratones; en el mismo estudio se mostró que lesionar o inactivar el núcleo central lateral del tálamo en este modelo mostró mejora en los síntomas de distonía (Chen et al., 2014), evidenciando que la actividad del cerebelo puede propagarse hacia el estriado.

El requerimiento de esta vía intacta para permitir repertorios conductuales, fue realizada en ratones a los que se entrenó en un laberinto en T para recoger comida en cualquiera de dos brazos, posteriormente se realizó un protocolo de alternancia forzada que consistió en que en cada ensayo la comida se coloca en el brazo diferente al que eligió en el ensayo anterior, esta tarea requiere que el ratón adquiriera una regla (la posición de la comida cambia en cada ensayo, dependiente de la elección que se realizó en el ensayo anterior), hasta alcanzar al menos un 70% de ensayos correctos; posteriormente en un día de prueba se inactivó los axones provenientes de la vía DCN→Th(CL-PF)→Estriado, observando que los ratones alternaron menos en sus ensayos durante la inactivación. Es decir los sujetos experimentales fueron perseverantes en su conducta al inactivar esta vía, este hallazgo sugirió que la inactivación de esta vía no permite que actualicen su conducta apropiadamente para obtener la recompensa (Xiao et al., 2018).

De estos dos últimos antecedentes dos núcleos talámicos han sido evidenciados en la comunicación cerebelo - estriado, el núcleo central lateral (Chen et al., 2014) y el núcleo parafascicular del tálamo (Xiao et al., 2018), a llamar la atención, el estudio de transinapsis en monos, aunque en menor medida, reporto la presencia de células marcadas en la región ventral del tálamo (Hoshi et al., 2005), sin embargo se desconoce si esta comunicación a través del tálamo ventral es funcional.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los hallazgos anatómicos, funcionales y conductuales observados en la interacción Cerebelo → Tálamo → Estriado modifica la idea de que los ganglios basales y el cerebelo son circuitos paralelos, por el contrario abre la posibilidad de un modelo de comunicación subcortical de estos dos sistemas involucrados en el control motor. Los antecedentes mencionados sugieren que el cerebelo influye sobre la principal entrada de información de los ganglios basales, el estriado, produciendo cuestionamientos sobre las funciones en que el cerebelo pueda influir sobre los ganglios basales en conductas motoras y no motoras.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la contribución de las proyecciones del cerebelo al tálamo ventral e intralaminar durante la ejecución y adquisición de habilidades motoras?

¿Cuál es la contribución de las proyecciones subcorticales di-sinápticas DCN→Tálamo→Estriado durante la ejecución y adquisición de habilidades motoras?

## HIPÓTESIS

- El cerebelo envía información con precisión temporal, espacial y dependiente de la tarea motora demandada, por tanto la inhibición de las proyecciones DCN→VL; DCN→CL; DCN→PF afectará de manera diferente la ejecución de un desplazamiento unidireccional en comparación con un desplazamiento secuencial.
- La conexión subcortical disináptica DCN→Tálamo→Estriado será requerida para la correcta ejecución de habilidades motoras.
- La ejecución de un desplazamiento unidireccional y secuencial tiene componentes cinemáticos diferentes, por tanto la inhibición de la vía subcortical DCN→Tálamo→Estriado tendrá efectos diferentes en cada desplazamiento.

## OBJETIVOS

- Determinar las proyecciones del cerebelo hacia el tálamo y evaluar si estas proyecciones convergen sobre neuronas que proyectan directamente a los ganglios basales.
- Establecer una tarea motora con alta resolución temporal que contenga dos habilidades motoras diferentes (desplazamiento unidireccional; desplazamiento secuencial).
- Estudiar la contribución de las proyecciones del cerebelo al tálamo (DCN→VL; DCN→CL; DCN→PF) en la ejecución y adquisición de estas habilidades motoras.
- Estudiar la contribución de las proyecciones subcorticales disinápticas del cerebelo al estriado (DCN→Tálamo→Estriado) en la ejecución y adquisición de estas habilidades motoras.

# METODOLOGÍA

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Número de protocolo FTA-121-17), y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

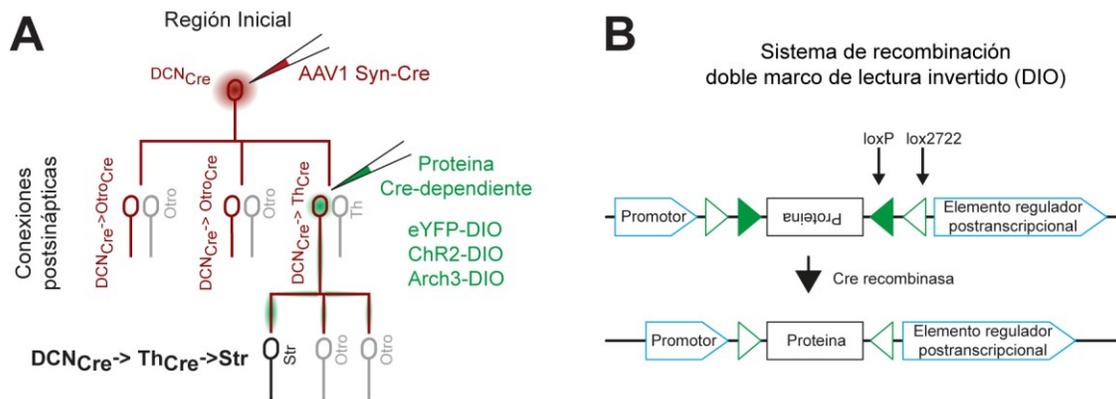
Los experimentos fueron realizados en ratones (2-3 meses de edad) machos y hembras de la cepa C57BL/6J o ratones transgénicos VGlut2-Cre (apareamientos de por al menos 6 generaciones con ratones de la cepa C57BL/6J; los animales Cre fueron donados por el Dr. Rui M. Costa, del *Champalimaud centre for the unknown*, Portugal); los ratones VGlut2-Cre se mantuvieron como heterocigotos y fueron obtenidos de colonias generadas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Los ratones fueron criados con ciclo luz/oscuridad de 12h (cambio de ciclo a las 6:00 am/pm) que tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida previo a iniciar los experimentos conductuales.

Se realizaron una serie de experimentos para poder responder los objetivos específicos previamente planteados, a continuación, se desarrollará la metodología usada para responder cada objetivo.

## **Marcaje transináptico del cerebelo hacia el estriado a través del tálamo (DCN→Tálamo→Estriado)**

Para probar la conexión di-sináptica se usó un vector viral que permite expresar la proteína Cre recombinasa (AAV1 hSyn-Cre) en las células de la región inicial y en sus conexiones sinápticas anterógradas a través de un salto transináptico, permitiendo la expresión de Cre en la postsinapsis (para este trabajo en la vía DCN<sub>Cre</sub>→Tálamo<sub>Cre</sub>), posteriormente fue posible inyectar un segundo vector viral dependiente de la presencia de Cre para expresar proteínas que nos permitieron identificar (proteína fluorescente reportera) o manipular (opsinas inhibitorias o

excitatorias) la vía di-sináptica (**Figura 4A**). Con esta estrategia viral bajo el sistema de recombinación Cre-lox (**Figura 4B**) se identificó y manipuló la vía  $DCN_{Cre} \rightarrow Th_{Cre} \rightarrow Estriado$ .



**Figura 4. Esquema de método de marcaje transináptico anterógrado.**

**A)** La sombra roja muestra el sitio de inyección del vector viral transináptico anterógrado (AAV1 Syn-Cre) para expresar la proteína Cre en el sitio de inyección y en sus contactos post-sinápticos, posteriormente, la sombra verde muestra la inyección de un segundo vector viral para expresar en función de la presencia de la Cre, finalmente se observa la expresión de la proteína de interés en las proyecciones axonales en el relevo transináptico ( $DCN \rightarrow Th \rightarrow Estriado$ ).

**B)** Se observa el mecanismo de expresión condicional a partir del sistema doble marco de lectura invertido (DIO), en la parte superior se muestra la secuencia invertida de la proteína de interés y los sitios de recombinación de la proteína Cre, en la parte inferior se observa el giro de la secuencia para la proteína de interés después de la recombinación con Cre.

## Inyecciones vectores virales.

Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de oxígeno (1 litro/min) e isoflurano (1-2%), después de verificar que los ratones estuvieran completamente anestesiados su cráneo fue expuesto y se realizaron craneotomías. Usando un inyector (NanojectII, Drummond scientific) programado para inyectar 23 nL cada 5 segundos, se inyectaron 400 nL de vector viral transináptico anterógrado (AAV1.hSyn.Cre.WPRE.hGH; Addgene) en los DCN. Dos semanas después se hizo una segunda cirugía en donde se inyectaron 600 nL (VL=200 nL; CL=200 nL; PF=200 nL) de vector viral para expresar ChR2 (pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA, Vector core, UPENN) o eYFP (AAV1.EF1a.DIO.eYFP.WPRE.hG, Vector core, UPENN)

dependiente de la proteína Cre, en el tálamo contralateral. Al finalizar la cirugía los ratones fueron mantenidos en sus cajas entre 13-16 días para permitir la expresión de Chr2 o eYFP.

**Inyección de retrobeads.** Para los estudios anatómicos en donde se visualizó marcaje retrogrado, se inyectaron 400 nL de retrobeads (Lumafuor, USA). Esferas de látex que aprovechan el transporte retrogrado de la célula en el estriado dorsal lateral. Los ratones fueron mantenidos en sus cajas entre 13-16 días para permitir el marcaje retrogrado.

## **Registro de corrientes postsinápticas evocadas por la activación de terminales axónicas DCN→Tálamo o DCN→Tálamo→Estriado**

Después de 13-16 días de expresión para la proteína ChR2, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (120 mg/kg, i.p.; Anestek) y xilacina (30mg/kg, i.p.; Bayer), posteriormente se realizó perfusión intracardiaca de solución de corte (a punto de congelación, para incrementar la viabilidad del tejido durante el proceso de obtención de rebanadas) la cual contiene (en concentración mM): 242 sacarosa, 2.5 KCl, 7 MgCl<sub>2</sub>, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucosa, 1 ácido ascórbico, y 3 piruvato de sodio. Para los registros en rebanadas de estriado se obtuvieron cortes coronales y para registros en el tálamo fueron cortes horizontales. Las rebanadas obtenidas fueron transferidas a solución de registro la cual contiene (en concentración mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.56 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 glucosa; la solución fue saturada con una mezcla de 95/5% (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>), 310 mOsmol/L, pH 7.4. Las rebanadas se incubaron por al menos 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se transfirieron a la cámara de registro con perfusión continua de solución de registro (3-5 ml/min).

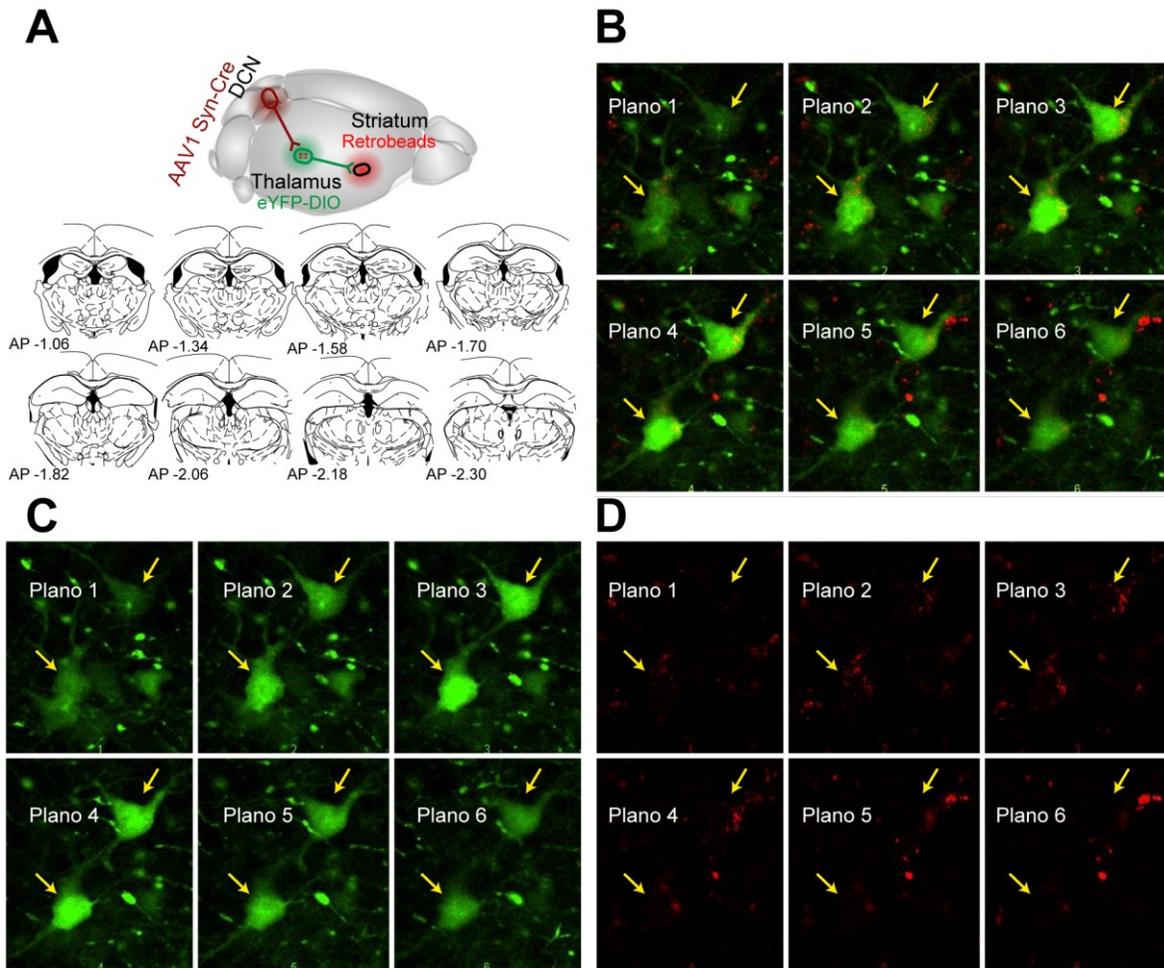
Las corrientes postsinápticas se obtuvieron en configuración de célula completa y fueron evocadas con un pulso de luz azul (1ms, 456 nm; LED pE-100, CoolLED; instalado en el microscopio de registro), para evaluar la conexión di-sináptica DCN→Tálamo→Estriado se registraron pares de células consecutivamente en la región DLS y DMS de la misma rebanada. Los registros se adquirieron con micro-pipetas de borosilicato (Harvard apparatus 30-0057) con

resistencias medidas en la cámara de registro de 3-6 MΩ. La solución interna durante el registro contenía (en concentración mM): 120 KMeSO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2.41 Na<sub>2</sub>ATP, 1.14 NaGTP, 3.18 biocitina, 10 NaCl, la concentración osmótica fue de 290 mOsmol/L.

Las neuronas se visualizaron usando un filtro infrarrojo en un microscopio vertical (Scientifica electrophysiology) y una cámara digital (Evolution VF FAST). Los registros en configuración de célula completa fueron adquiridos a través de un amplificador (PC-501A Warner Instrument Corp.), una tarjeta NIDAQ (CB 68LP, National Instruments), y el programa Im-Patch (<http://impatch.ifc.unam.mx/>).

## Conteo de células en la vía DCN→Tálamo→Estriado

Después del marcaje transináptico de la vía DCN<sub>cre</sub>→Th<sub>cre-eYFP</sub> (método arriba) y de la inyección de retrobeads en la región dorsal lateral del estriado (marcaje de las células DCN<sub>cre</sub>→Th<sub>cre-eYFP+retrobeads</sub>→Estriado), se obtuvieron rebanadas coronales de 100 micrómetros de todo el tálamo, las cuales se montaron y sellaron en portaobjetos (**Figura 5A**). Para contar las células marcadas se obtuvieron imágenes confocal (LSM710, Zeiss, con un objetivo W plan-Apochromat 20X/1.0 DIC VIS-IR M27 75mm; z-stacks de cubriendo 30 micrómetros) en dos canales cubriendo un área de 1.5 a 3 mm<sup>2</sup> [una foto cada 6 micrómetros (**Figura 5B**)], y resolución de 1024 x 1024 píxeles. Para el análisis se usó el programa *Image J* y se realizó un conteo visual de las células. Con esta estrategia se contaron las células DCN→Talámicas (DCN<sub>cre</sub>→Th<sub>cre-eYFP</sub>) y las células del tálamo que recibieron entradas del cerebelo y proyectaban al estriado (DCN<sub>cre</sub>→Th<sub>cre-eYFP+retrobeads</sub>→Estriado), para confirmar la presencia de retrobeads al interior de las células, se revisó cada foto del z-stack (**Figura 5B-D**).



**Figura 5. Método de identificación de células con doble marcaje.**

- A) Esquema ilustrando la inyección del vector viral AAV1 Syn-Cre en los DCN; eYFP en el tálamo; y retrobeads en el Estriado dorsal. En la parte inferior se muestran los cortes coronales a diferentes niveles del tálamo en donde se tomaron fotomicrografías.
- B) Se muestran fotografías con microscopía confocal a diferentes planos en el eje Z para cubrir el soma de células con doble marcaje (eYFP + retrobeads).
- C) Igual que en B, pero sólo se muestra la expresión de la proteína eYFP.
- D) igual que en B, pero sólo se muestra la presencia de retrobeads, nótese que la marca más intensa de retrobeads correlaciona con el centro de la célula con eYFP (plano 3 y 4).

## Cuantificación de procesos celulares en la vía DCN→Tálamo

Se usaron ratones VGlut2 inyectados unilateralmente con 400 nL de vector viral (AAV1.EF1a.DIO.Eyfp.WPRE.Hg; Vector core, UPENN) para expresar la proteína eYFP en los DCN, después de 14 días de expresión se obtuvieron rebanadas coronales de 100 micrómetros de grosor. Se tomaron imágenes con microscopia confocal (z-stacks) de un área de 250  $\mu\text{m}^2$  y de

6  $\mu\text{m}$  en el eje z (una foto cada micrómetro en z), resolución de 1024 x 1024 píxeles de la región ventral lateral (VL), ventral medial (VM), central lateral (CL), parafascicular (PF) y central lateral (CM) del tálamo. Para estas imágenes se usó un objetivo W Plan-Apochromat 63X/1.0 M27. Se obtuvo una imagen compuesta de los planos en z y se obtuvo la máxima proyección en z, posteriormente se aplicó un filtro Hessian antes de realizar la cuantificación de los procesos celulares, finalmente se realizó el conteo de los procesos usando una gradilla aleatoria de 10x10  $\mu\text{m}$  (Grider et al., 2006).

## **Entrenamiento de ratones para realizar desplazamientos unidireccionales y complejos en una palanca**

El procedimiento de entrenamiento fue dividido en los siguientes bloques.

### **Habitación:**

Inicialmente se privó de agua en los ratones y se manipularon por el experimentador durante 3 días; posteriormente, durante 2 días, se realizaron aproximaciones sucesivas al tubo de fijación de cabeza (*headfixed*), al dispensador de agua, luces rojas de la caja y a los sonidos del motor que desplaza la palanca. Una vez que los animales tomaban agua del dispensador y no había orina o excretas fueron sujetados de la cabeza por 5 minutos tres veces por día durante dos días. Durante la fase de habituación los ratones recibieron 1ml de agua vía el dispensador, y cuando no tomaban suficiente del dispensador, el experimentador les daba agua a través de una pipeta cercana a su boca hasta completar 1ml.

### **Pre-entrenamiento:**

Los ratones fueron fijados de la cabeza durante 30 minutos una vez al día, con ayuda de un motor la palanca se presentaba al inicio de la sesión y se retraía cada que los ratones conseguían el desplazamiento requerido para obtener una recompensa (intervalo entre ensayos: 6 segundos), o si el ratón sujetaba continuamente 4 segundos la palanca sin conseguir el desplazamiento requerido (intervalo entre ensayos incorrectos: 10 segundos). Durante todo el

experimento no hubo ninguna señal que indicará que la palanca estaba disponible y la posición inicial de la palanca siempre era la misma durante en cada ensayo (cero para los ejes X y Y, determinado por los potenciómetros dentro de la palanca; frecuencia de muestreo en los ejes X y Y fue a 250 Hz), la lectura de los ejes cambiaba solo hasta que los ratones realizaran un desplazamiento de ella.

Durante los primeros días si el ratón tocaba la palanca se obtenía una recompensa (gota de agua de 50 $\mu$ L), posteriormente durante los días 3-5, se pidió a los ratones realizar desplazamiento de 0.5, 1.0 hasta 2.0mm. La lectura de los potenciómetros para los ejes X y Y fueron grabadas a través de una placa Arduino (Arduino UNO), los ratones no podían ver la posición de la palanca, por lo tanto, en esta fase se acercaba lo suficientemente para que los movimientos aleatorio o exploratorios de las extremidades anteriores del ratón logran tocar la palanca.

## **Entrenamiento desplazamiento unidireccional (8mm atrás, trayectoria 1)**

Los ratones fueron fijados de la cabeza durante 30 minutos y se pedía que realizaran desplazamientos de 2mm, 4mm, 6mm, 8mm en bloques de tres días. El desplazamiento de 8mm se consideraba aprendido cuando los ratones conseguían al menos 50% o más de ensayos correctos y latencia de inicio de movimiento < 1 segundo en el último día de esta fase. Dos errores se identificaron en esta fase, '**No-inicio**': desplazamiento de la palanca menor a 1mm, y '**No-completo T1**': desplazamiento menor a la distancia requerida.

## **Entrenamiento desplazamiento secuencial (atrás-adelante)**

Los ratones fueron fijados de la cabeza durante 30 minutos y dos nuevas reglas fueron incorporadas: 1) el primer desplazamiento tenía que alcanzar una zona umbral (>4mm y <8mm), y 2) los ratones tenían que regresar la palanca a la posición inicial. Estas reglas permanecieron para el resto del experimento. Si los ratones desplazaban la palanca sin conseguir el

desplazamiento correcto se consideraba error, sin embargo, la palanca seguía disponible y activa para que pudiera comenzar un nuevo intento.

La retroalimentación de un movimiento incorrecto se indicaba por la ausencia de la entrega de recompensa, o cuando el ratón sujetaba por más de 4 segundos continuos la palanca sin conseguir el desplazamiento requerido. Cuatro errores fueron identificados en esta fase: '**No-inicio**': desplazamiento de la palanca menor a 1mm; '**No-Umbra1**': un desplazamiento mayor a 1mm, pero que no llegó a 4mm; '**Overshoot**': un desplazamiento mayor a 8 mm; '**No-regreso**': un desplazamiento >4mm y <8mm sin que el movimiento regresara a la posición inicial.

En esta fase la palanca siempre estuvo expuesta y solo se retiraba cuando el ratón sujetaba continuamente la palanca sin conseguir el desplazamiento requerido. Diariamente se registró la relación de ensayos y parámetros cinéticos del desplazamiento, si los ratones no conseguían al menos un 40% de ensayos correctos, los ratones eran removidos del experimento (45 ratones completaron el entrenamiento total de 51 ratones que iniciaron). Durante esta fase no hubo ningún estímulo o señal que los ratones usaran como retroalimentación durante la ejecución de los desplazamientos requeridos.

## Registros electrofisiológicos *in vivo*

Para investigar el efecto de la inhibición ontogenética de las proyecciones DCN→Th→Est sobre células en el núcleo estriado, ratones C57BL/6J fueron inyectados bilateralmente con 400 nL de AAV1.hSyn.Cre.WPRE.hGH en los DCN, y 200nL de AAV-Arch-Cre en cada núcleo del tálamo (VL,CL, y PF).

Un mes después, un optrodo a medida [fibra óptica con diámetro de 300  $\mu$ M (Thorlabs, Inc) acoplada a un micro-arreglo de electrodos (16 canales, Innovative Neurophysiology, Durham, NC), fue implantado en el DLS. Después de 4 días de recuperación, se adquirieron registros extracelulares mientras el ratón estaba en una caja de campo abierto (40x40 cm de área, y 30cm de alto).

Los registros electrofisiológicos fueron adquiridos a 30KHz (Cereplex Direct, Black Rock Microsystems, UT) y procesados con un filtro pasa-alta (750 Hz) para extraer la actividad-espigas. Se realizó un protocolo de inhibición optogenética con luz de 556nm, pulsos continuos de 2 segundos en al menos 30 ensayos (tiempo entre ensayos, 30-40 segundos).

Las unidades fueron clasificadas manualmente en línea a través de umbrales de actividad, (*hopos*, *Cerebrus*, Blackrock Microsystems, UT), y re-clasificación fuera de línea a través de análisis de componentes principales (Offline Sorter, Plexon); finalmente los datos fueron exportados a MATLAB y se realizaron análisis basados en códigos propios. La actividad de disparo-espiga de cada unidad fue alineada al inicio del pulso de luz y se realizó un análisis de desplazamiento de ventana (ventana: 200ms, desplazamiento: 25ms), los valores fueron normalizados (z-score).

Para determinar el porcentaje de neuronas moduladas por los pulsos de luz se comparó la tasa de disparo de cada ventana contra un tiempo de línea basal (2 segundos previos al inicio de la luz vs 2 segundos desde el inicio del pulso de luz), a través de método de desplazamiento de ventana (ventana: 25ms, desplazamiento: 200ms). Las unidades con valores  $P < 0.001$  (prueba Wilcoxon) fueron clasificadas como moduladas. La latencia de inhibición se consideró al identificar el primer desplazamiento con significancia estadística ( $p < 0.01$ , prueba Wilcoxon) comparando línea base (-0.5 a 0 segundos) contra el periodo de luz usando desplazamiento de ventanas (ventana: 500ms, desplazamiento: 10ms).

Para determinar posibles diferencias de los valores Z entre la línea base y el periodo de luz, se realizó un análisis de los valores Z comparando -2 a 0 seg. *versus* 0 a 2 seg. (Chen & Popovich, 2002; Sánchez-Fuentes et al., 2021).

## **Parámetros evaluados durante los desplazamientos de la palanca**

Un desplazamiento se definió como el movimiento/toque continuo de la palanca y se reiniciaba cuando el ratón soltaba la palanca por 50ms o más. Los desplazamientos fueron analizados

individualmente para obtener los siguientes parámetros. 'Duración': tiempo desde el inicio del toque hasta el momento de soltar la palanca; 'Desplazamiento': diferencia entre la posición final y la posición inicial de la palanca; 'Distancia': suma acumulada del cambio de posición durante todo el desplazamiento; 'Velocidad promedio': cambio en posición (desplazamiento) dividido entre el tiempo del desplazamiento (duración); 'Max velocidad': el pico máximo obtenido de la curva de velocidad de cada desplazamiento; 'Tortuosidad': distancia dividida por el desplazamiento.

Durante la fase de desplazamiento unidireccional (T1), se identificaron ensayos correctos (desplazamiento máximo hacia atrás =8mm) y los restantes fueron errores (No-inicio; No-completo T1); para la fase de desplazamiento secuencial (T2), se identificaron ensayos correctos (desplazamiento atrás >=4mm y <8mm, seguido de desplazamiento hacia adelante <=1mm) y los restantes fueron (No-inicio; No-umbral; Mov-excedido; No-regreso), para evaluar el error Mov-excedido-Tipo2 (movimiento atrás > desplazamiento promedio atrás de día anterior) medido el último día de entrenamiento, el umbral de máximo desplazamiento fue obtenido del promedio de trayectorias del día previo.

## Video análisis de alteraciones en el movimiento

Los ratones fueron video grabados durante los días de manipulación optogenética con una cámara Point Grey (Point Grey FL3-U3-13S2C-CS) a una frecuencia de muestreo de 120 fotogramas por segundo. Estos videos permitieron la identificación y cuantificación de alteraciones durante movimiento de alcance (*reaching*) o sujeción/desplazamiento (*gripping*). Alcance: desplazamiento de las extremidades anteriores desde el momento de reposo hasta el momento de tocar la palanca. Agarre: momento desde que se sujeta la palanca hasta el final del desplazamiento de la palanca.

Para la figura 16 se realizó un análisis de diferencia de pixeles [(fotograma +1) - (fotograma actual)] seleccionando la región donde se muestran las extremidades anteriores en el video

desde el momento en que inicia el pulso de luz y un segundo después; tiempo que cubría todo el tiempo de la trayectoria realizada.

Los datos de las trayectorias individuales fueron agrupados (Luz – No luz) y se realizó un análisis de espectro de potencia por frecuencia. Adicionalmente, se realizó un análisis visual binario (0=no; 1=sí), para identificar la presencia de alteraciones (similar a temblor como se muestra en el **video S4** en el panel derecho) en el movimiento de alcance de la palanca. Alcance alterado: movimiento o sacudida de cualquiera de las extremidades anteriores con una amplitud mayor a la línea base (determinado visualmente por el experimentador, ver **video S4**). Agarre alterado: ocurrió cuando cualquiera de las extremidades se deslizaba sobre la palanca o cuando las falanges presentaban una apertura.

## **Inhibición optogenética de las proyecciones sinápticas *in vivo***

Para inhibir las proyecciones DCN→Tálamo, se expresó la proteína Arch3.0-eYFP (rAAV5/hsyn-eArch3.0-eYFP, UNC) bilateralmente en los DCN, seguido del implante de fibras ópticas (diámetro: 300 µm, Thorlabs) en el tálamo VL, CL, y PF (**Figura 13B**).

Para inhibir las proyecciones DCN→Tálamo→Estriado se expresó la proteína Arch3.0-eYFP bilateralmente en el tálamo con ayuda de la expresión de la proteína Cre proveniente de la expresión transináptica de Cre (AAV1.hSyn.Cre.WPRE.hGH) desde el cerebelo (ver método; **Figura 4**), seguido del implante de fibras ópticas (diámetro: 300 µm, Thorlabs) en el estriado dorsal lateral (**Figura 13C**).

La estimulación optogenética (2 segundos luz prendida, 556nm, activado a través de la placa Arduino UNO) se dio con un láser (MSL-FN-556, CNI lasers) y el paso de luz se controló con un obturador de alta velocidad (SH05, Thorlabs), el haz de luz se colimó con un cabezal rotatorio con dos salidas (Doric lenses). En cada experimento se verificó el poder de la luz en el extremo de la fibra con ayuda de un medidor (PM 100D-S130C, Thorlabs), el poder fue ajustado para obtener valores alrededor de 12-15mW en el extremo de la punta de la fibra implantada.

Se realizaron tres protocolos de inhibición dentro de la misma sesión y solo podía ocurrir un protocolo por cada ensayo. 1) Antes: el obturador se abría para permitir el paso de luz, en el momento en que la palanca se presentaba, durante la fase aprendida del movimiento la latencia para tocar la palanca e iniciar el movimiento era <1 segundo, por tanto, este protocolo cubría el tiempo antes de iniciar el movimiento y posterior. 2) Inicio: el obturador se abría al momento de tocar la palanca. 3) Iniciado: el obturador se abría una vez que el ratón había iniciado el movimiento y llevaba un desplazamiento de 2mm para el movimiento hacia atrás unidireccional (T1) y 4mm para el desplazamiento secuencial atrás-adelante (T2).

## **Registro de actividad de calcio *in vivo***

En ratones C57BL/6J se inyectó unilateralmente 400 nL de vector viral (AAV1-hSyn-Cre) en los DCN para expresar mediante transinápsis en el tálamo la proteína Cre, en seguida, se inyectó 500 nL de un vector viral para expresar el sensor de calcio dependiente de la proteína Cre (AAV.Syn.Flex.GCaMP6s.WPRE.SV40, #100845, Addgene) en el PF contralateral (Chen et al., 2013). Dos semanas después, un micro endoscopio (Lens Probe, diámetro: 1mm, longitud: 8.4mm, Inscopix) fue implantado en el PF o en el DLS; finalmente, una barra de metal fue implantada para poder fijar la cabeza del ratón. Los ratones tuvieron una semana de recuperación post-cirugía y luego fueron entrenados en la tarea conductual.

Las señales de calcio se adquirieron con un microscopio confocal (The Bergamo II Series, Thorlabs), acoplado a un objetivo 10X (C-Apochromat 10X/0.45W, ZEISS Microscopy), laser de 488nm (CMLS-1, Thorlabs), a una resolución de 348x384 pixeles con una frecuencia de muestreo de 10Hz. Los tiempos de registro de la señal de calcio y la conducta fueron registrados con una tarjeta Arduino (Arduino MEGA). Los fotogramas fueron transformados a TIFF, y se realizó corrección de movimiento (TurboReg-plugin) con FIJI (Schindelin et al., 2012). Las neuronas fueron extraídas usando el método MIN1PIPE (Lu et al., 2018). La actividad de calcio

en los axones en el DLS fue medida como el promedio del total de luz colectado a través del microendoscopio en cada fotograma.

El fotoblanqueo fue calculado al ajustar una curva exponencial de dos términos y posteriormente sustraer la actividad de los axones. Una neurona se consideró modulada cuando la comparación estadística entre el valor promedio de la línea base (-1.5seg a -1.0seg) era diferente de los valores promedio de la ventana evaluada.

## **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron en la paquetería MATLAB o Graphpad prism 6. Se usó la prueba de Chi-cuadrada para comparar proporciones, la prueba Wilcoxon para comparaciones pareadas y la prueba U de la Mann Whitney para comparaciones entre los grupos experimentales y el grupo control. Cuando se hicieron comparaciones múltiples, los valores p fueron corregidos de acuerdo al método FDR (Benjamini & Yekutieli, 2001).

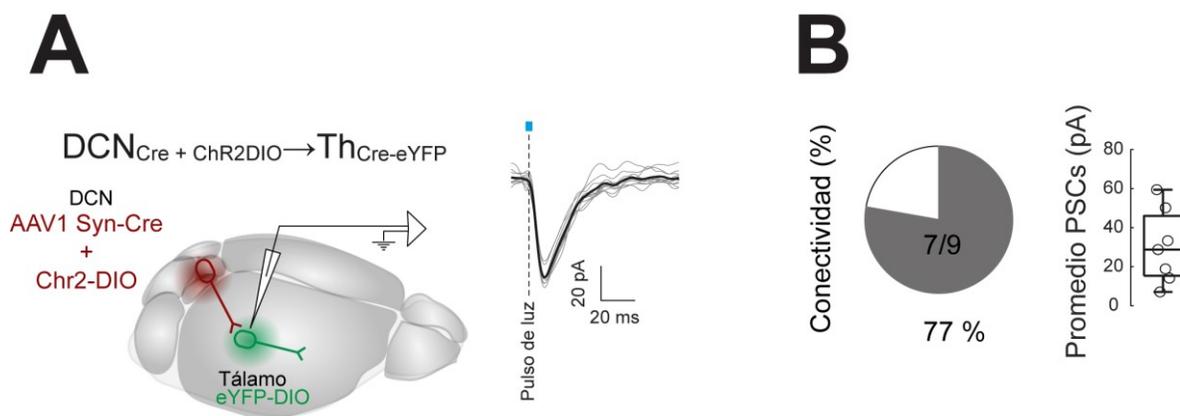
Para analizar los efectos de las manipulaciones optogenéticas durante las diferentes etapas de la tarea conductual se usó la prueba Kruskall Wallis, con post hoc Dunnet para comparaciones múltiples. Se realizaron análisis de permutaciones (10,000) en donde se asignó aleatoriamente la identidad de cada grupo. Cuando se reporta ANOVA, se usó el método Bonferroni para comparaciones múltiples.

# RESULTADOS

El objetivo del trabajo es conocer si los DCN interactúan con el estriado a través del tálamo durante la ejecución de desplazamientos unidireccionales o en secuencia, para responder esto se realizaron tres experimentos principales. Primero, se identificó la probabilidad con la que las neuronas en el estriado responden a la activación de las proyecciones del DCN→Tálamo→Estriado. Segundo, Se identificaron las regiones en el tálamo que reciben proyecciones de los DCN y posteriormente envían proyecciones al estriado DCN→Tálamo→Estriado. Tercero, se investigó la contribución de la vía DCN→Tálamo→ Estriado durante la ejecución de desplazamientos unidireccionales o en secuencia a través del desplazamiento de una palanca. A continuación, se muestran los resultados encontrados.

## **La activación de las proyecciones DCN→tálamo→Estriado modula al estriado con alta probabilidad**

Para investigar la eficacia de la conexión disináptica desde los DCN hacia el estriado se inyectó un vector viral transináptico en los DCN, lo que permite la expresión de la proteína Cre en las células post-sinápticas en el tálamo, aunque este método ha sido reportado previamente (Zingg et al., 2017; Zingg et al., 2020) se verificó su eficacia al inyectar una mezcla de virus AAV1-hsyn-Cre + Chr2-DIO<sub>Cre</sub> (1:1) en los DCN, en estos mismos ratones se inyectó el vector viral eYFP-DIO<sub>Cre</sub> en el tálamo con el objetivo de visibilizar a las células con marcaje transináptico (**Figura 6A**); de este experimento se observó que el 77% de las células registradas tuvieron corrientes post-sinápticas (**Figura 6B**).



**Figura 6. Conectividad funcional del método de marcaje transináptico.**

**A)** Izquierda: Diagrama del procedimiento usado para marcar células en el tálamo que reciben proyecciones de los DCN y la expresión de ChR2 en los axones DCN→Th. Se inyectó una mezcla de AAV1 Syn-Cre + Chr2-DIO en los DCN, y eYFP-DIO en el tálamo. ~13 días después se obtuvieron rebanadas y se realizaron registros en células con marca positiva a eYFP en el tálamo. Derecha: trazo representativo de la corrientes postsinápticas (PSCs) evocadas por la estimulación con luz azul en las proyecciones DCN<sub>Cre</sub>-ChR2→Th<sub>Cre-eYFP</sub>.

**B)** Porcentaje de células en el tálamo (5 registradas en el VL y 4 en el PF) que presentaron PSCs después del pulso de luz azul. En la derecha, promedio de la amplitud de las PSCs de cada célula registrada en el tálamo.

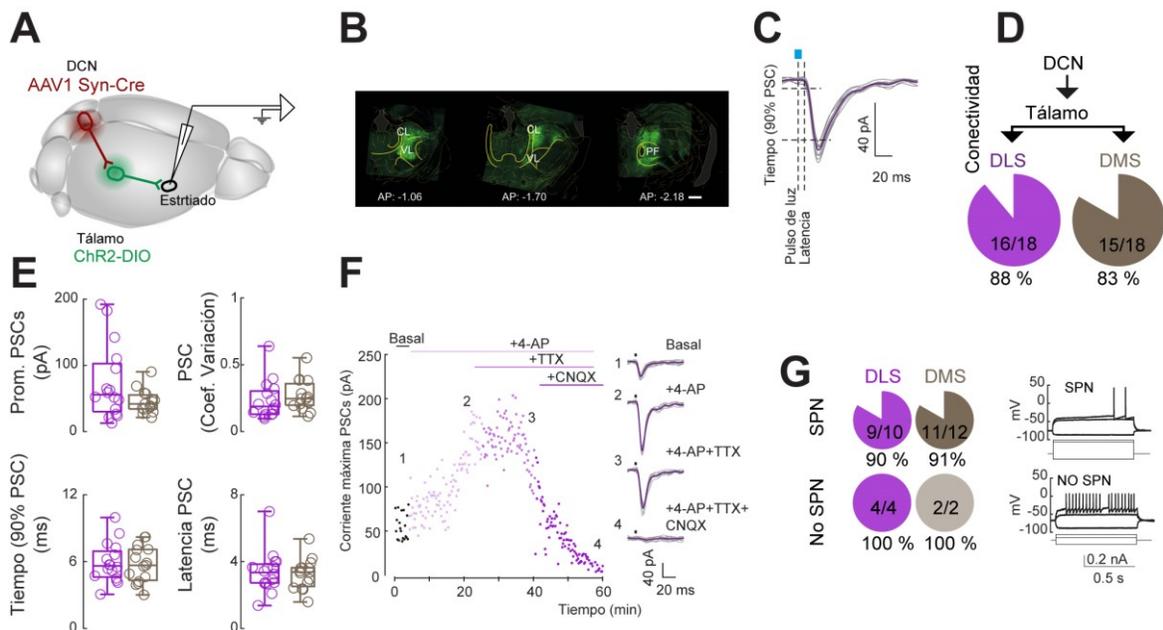
Para conocer la probabilidad de conexión de la vía DCN→Th→Str se inyectó el vector viral AAV1-hsyn-Cre en los DCN para expresar transinápticamente la proteína Cre en el tálamo, posteriormente se inyectó el vector viral AAV1-ChR2-DIO<sub>Cre</sub> en el tálamo (**Figura 7A**), específicamente en la regiones ventral lateral (VL), central lateral (CL) y parafascicular (Pf) para expresar la proteína channelrhodopsin-2 (ChR2-DIO<sub>Cre</sub>) (**Figura 7A-B**). Después de 10 días se realizaron registros de célula completa en células del estriado dorsal, mientras se estimulaba a los axones de las proyecciones DCN→Th→Str a través del objetivo en el microscopio, para evocar corrientes postsinápticas (**Figura 7C**).

Se evocaron corrientes post-sinápticas en el 88% (16/18) de las células registradas en la región dorsal lateral (DLS) y 83% (15/18) en la región medial (DMS), no se observaron diferencias en la proporción de conexión entre la región DLS y DMS (**Figura 7D**), ni en sus características electrofisiológicas como amplitud promedio de la corriente, coeficiente de variación de la

corriente, tiempo para obtener la máxima corriente o la latencia para observar una corriente post-sináptica (**Figure 7E**).

Se registró una célula a la que se administró fármacos para bloquear corrientes de potasio (4-AP), corrientes de sodio (TTX), y antagonistas de receptores AMPA/kainato (CNQX), este método permite aislar la corriente postsináptica y confirmar la dependencia glutamatérgica de la corriente (**Figure 7F**).

Finalmente, se identificó que la conectividad puede ocurrir en células espinosas de proyección (SPN) en el DLS (90%) o en el DMS (91%), y en interneuronas putativas (No SPN) tanto en el DLS (100%) como en el DMS (100) (**Figure 7G**).



**Figura 7. La activación de las proyecciones DCN→Th→Estríado modulan al estríado con alta probabilidad.**

**A)** Diagrama del procedimiento usado para expresar channelrhodopsin-2 (ChR2) en las proyecciones tálamo-estriatales que reciben entradas desde los DCN. Se inyectó el vector AAV Syn-Cre en los DCN, y el vector para expresar ChR2-DIO fue inyectado en el tálamo (VL/CL/PF). Aproximadamente 13 días después, se obtuvieron rebanadas de cerebro del núcleo estriado para realizar registros electrofisiológicos en configuración de célula completa.

**B)** Microfotografías representativas de rebanadas coronales, mostrando los sitios de inyección a nivel del VL, CL, PF. Escala 500 micras.

**C)** Trazo representativo de corrientes postsinápticas evocadas (PSCs) por la estimulación de las proyecciones DCN<sub>Cre</sub>→Th<sub>Cre-ChR2</sub>→Estríado.

**D)** Porcentaje de células estriatales en las que se evocaron PSCs después del pulso de estimulación con luz. DLS: estriado dorsal lateral; DMS: estriado dorsal medial.

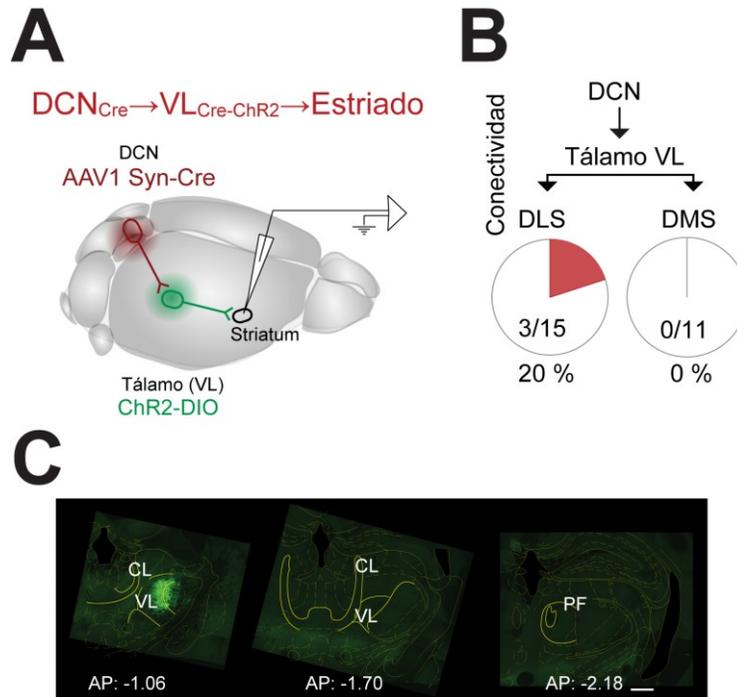
**E)** Propiedades electrofisiológicas de las PSCs.

**F)** Curso temporal de la amplitud de las PSCs evocadas en una célula durante la administración de fármacos para aislar la corriente postsináptica.

**G)** Diagramas de pastel: Proporción de células estriatales de proyección (SPN) y células de no proyección (No-SPN) que presentaron PSCs. Derecha: Trazos representativos de cambios de voltaje en respuesta a la inyección de corriente para identificar SPN vs No-SPN. El número de las células en (D) es diferente del número en (G) debido a que no fue posible obtener registro de voltaje en todas las células.

La proporción de conexión hacia la región dorsal del estriado es debida a la activación de axones provenientes de la región ventral lateral (VL) e intralaminar del tálamo (CL,PF), sin embargo existe un reporte anatómico argumentando que la región ventral lateral del tálamo que recibe proyecciones de los DCN no deja proyecciones en el estriado (Kuramoto et al., 2009), este dato cobra importancia debido a que canónicamente se indica que la región ventral lateral del tálamo que recibe de los DCN envía proyecciones a regiones corticales, por lo tanto obtener evidencia de proyecciones hacia el estriado dorsal sugeriría un papel diferente de la comunicación DCN→VL→Str.

Tomando ventaja de la técnica de transinapsis, se expresó la proteína Cre en las regiones postsinápticas del tálamo, similar a los experimentos DCN→Th→Str, pero en esta ocasión se inyectó el segundo vector viral dirigido solo a la región ventral lateral del tálamo (**Figura 8A y 8C**). Se observó que esta conexión es funcional hacia el DLS y tiene una probabilidad del 20% (**Figura 8B**).



**Figura 8. Conectividad di-sináptica de los DCN al estriado a través del tálamo ventral lateral (DCN→VL→Estriado).**

**A)** Diagrama del procedimiento para expresar channelrhodopsin-2 (ChR2) en las proyecciones VL→Estriado que reciben entradas de los DCN (DCN<sub>Cre</sub>→VL<sub>Cre-ChR2</sub>→Estriado).

**B)** Proporción de células estriatales que presentaron corrientes postsinápticas después de la estimulación de los axones DCN→VL→Estriado en el estriado.

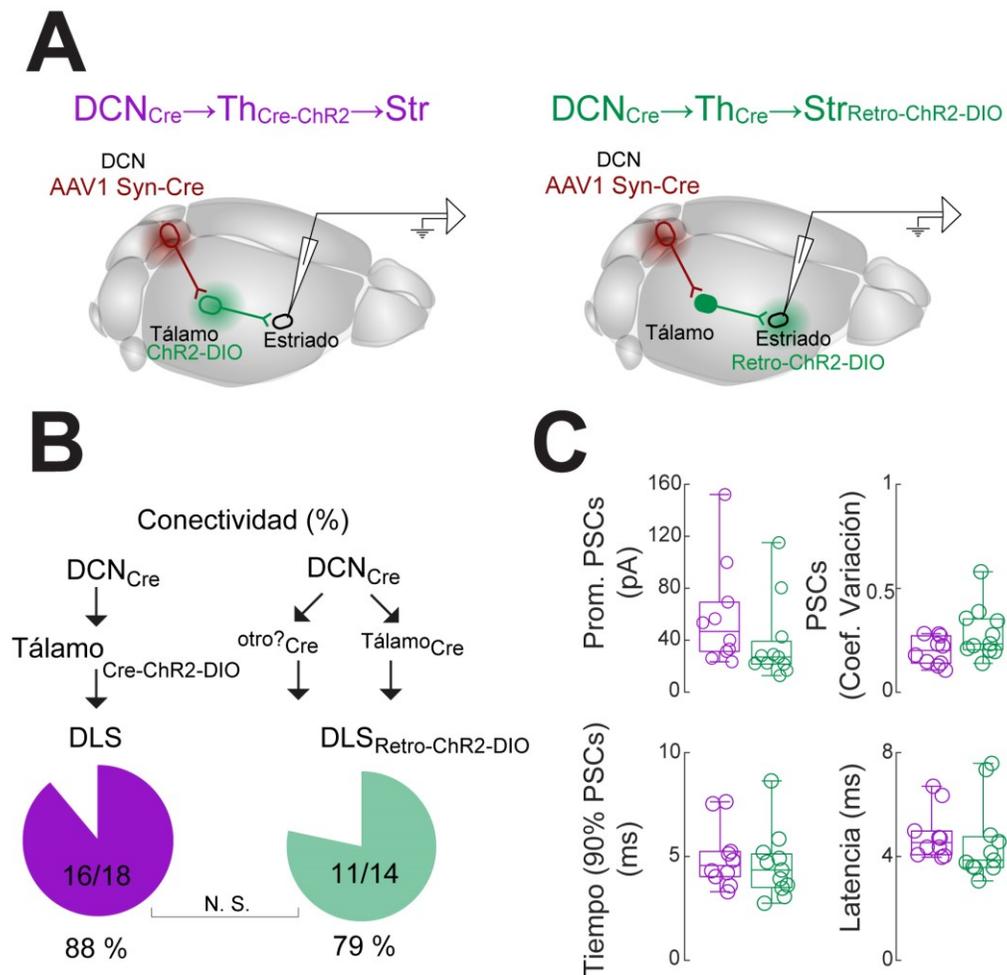
**C)** Fotomicrografías mostrando la expresión de ChR2 en el tálamo a nivel del VL y ausente a nivel del CL y PF. Escala 500 micras.

Finalmente, como experimento control del probable marcaje de otras regiones diferentes al tálamo debido a que las inyecciones pudieran difundirse a otros núcleos que envíen proyecciones al estriado, se realizó otro experimento en donde se inyectó el vector viral AAV1-hsyn-Cre en los DCN para expresar la proteína Cre en las células post-sinápticas, en este caso se inyectó un segundo vector viral retrogrado (RetroChR2-DIO<sub>Cre</sub>) directamente en el DLS.

La estrategia anterior permitió registrar corrientes post-sinápticas en las células del estriado activadas por axones provenientes del tálamo y otras probables fuentes post-sinápticas de los DCN, de este experimento se observó que la probabilidad de conexión es similar entre la estrategia de inyectar directamente a las células post-sinápticas del tálamo (DCN<sub>Cre</sub>→Th<sub>Cre</sub>-

ChR2→Str; **Figura 9B** paneles en color púrpura) e inyectar retrógradamente desde el núcleo estriado para marcar las células post-sinápticas del tálamo y otras probables fuente post-sinápticas (DCN<sub>Cre</sub>→Th<sub>Cre</sub>+extraTh<sub>Cre</sub>→Str; **Figura 9B** paneles en color verde).

No se observaron diferencias ni en la probabilidad de conexión, ni en las características electrofisiológicas entre ambas estrategias (**Figura 9C**), lo que confirma que la principal vía de comunicación entre los DCN y el estriado es el tálamo.



**Figura 9. Conectividad funcional de la vía DCN→Th→Estriado a través de dos estrategias diferentes.**

**A)** Diagrama ilustrando el registro electrofisiológico de células en el estriado después de inyección del vector viral transináptico AAV1 Syn-Cre en los DCN y la inyección del vector viral ChR2-DIO en el tálamo (izquierda) o la inyección en el estriado dorsal de Retro-ChR2-DIO para marcar retrógradamente al tálamo y otras posibles fuentes.

B) Porcentaje de células registradas en el estriado dorsal lateral (DLS) que tuvieron corrientes postsinápticas (PSCs) después de la activación mediada por ChR2 en las proyecciones DCN→Th→DLS con las dos estrategias evaluadas.

C) Comparación de las propiedades electrofisiológicas registradas en cada célula con las dos estrategias de marcaje.

## Las proyecciones de los DCN→Tálamo hacia el estriado dorsal ocurre principalmente a través de los núcleos central lateral, parafascicular, y ventral lateral

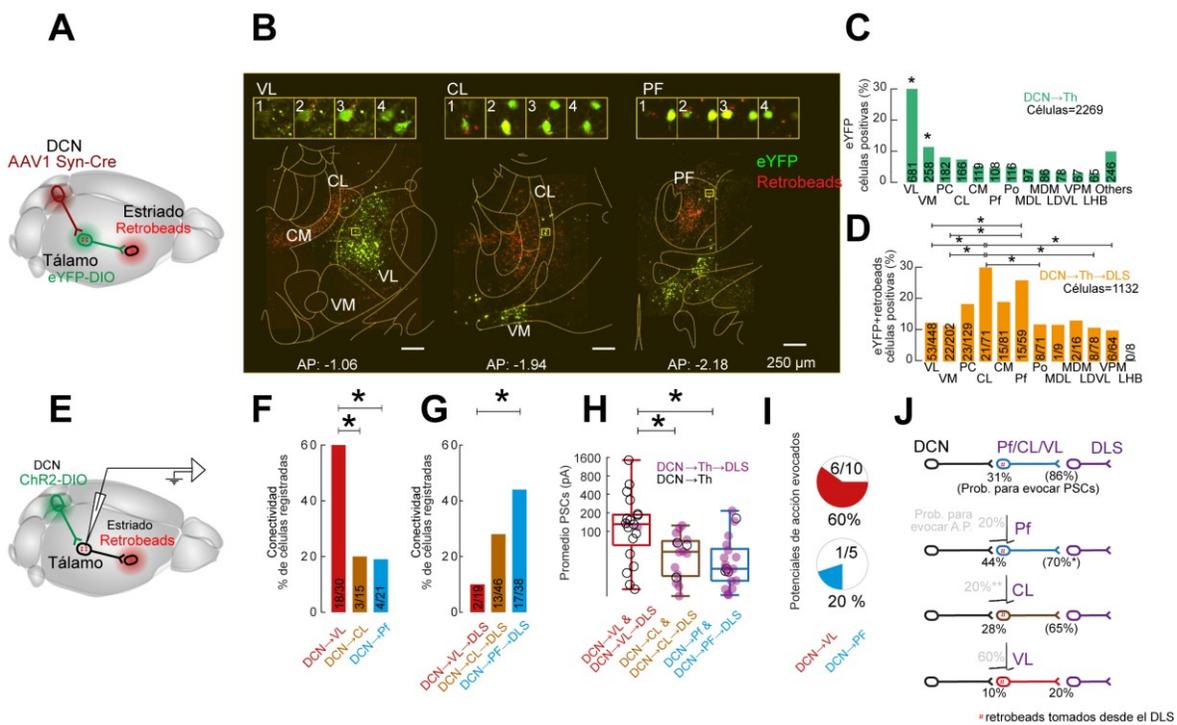
La región del DLS recibe proyecciones principalmente de cortezas sensorio-motoras (Yin, 2010), y debido a que este estudio está centrado en evaluar el sistema sensorio-motor, se decidió identificar las regiones en el tálamo que reciben proyecciones de los DCN y que envían al DLS. El virus transináptico AAV1-hSyn-Cre fue inyectado en los DCN para expresar la proteína Cre en la post-sinapsis, posteriormente se inyectó un segundo vector viral para expresar la proteína reportera eYFP dependiente de la proteína Cre en el tálamo (VL, PF, CL, 200 nL en cada uno), finalmente se inyectaron 400 nL de retrobeads en el DLS (**Figura 10A**); esta estrategia permite identificar células en el tálamo con eYFP + retrobeads (DCN→Th→DLS), y células sólo con eYFP (DCN→Th) (**Figura 10B**).

Con este experimento se encontró que la región ventrolateral (VL) y ventromedial (VM) del tálamo fueron los núcleos con mayor número de células con el marcador eYFP (**Figura 2C**), resultados similares a lo reportado previamente (Aumann & Horne, 1996; Aumann et al., 1994; Gao et al., 2018; Gornati et al., 2018), sin embargo, cuando se contaron las células con ambos marcadores se observó que el núcleo CL y PF tuvieron un mayor número (CL vs. VL, VM, VPM, Po, LDVL; y PF vs. VL, VM;  $p < 0.05$ , prueba  $\chi^2$ , **Figura 10D**), lo que indica que estos núcleos son mediadores de la comunicación di-sináptica entre los DCN y la región sensorio-motora del estriado dorsal.

Con base en estos resultados, se seleccionaron tres núcleos (VL; CL y PF) para realizar registros de célula completa y corroborar la conectividad sugerida por la anatomía. Para esto se inyectó ChR2-DIO<sub>Cre</sub> en ratones VGlut2 que expresan la proteína Cre en los DCN, posteriormente se

inyectaron retrobeads en el DLS (**Figura 10E**). Se observó que el núcleo VL presentó una mayor probabilidad de evocar corrientes post-sinápticas sobre células con eYFP en comparación con el núcleo CL y PF (DCN→VL=60%; DCN→CL=20%; DCN→PF=19%; **Figure 10F**), interesantemente se observó que el núcleo PF tuvo una mayor probabilidad de obtener respuesta cuando se registraron células con eYFP + retrobeads (DCN→VL→DLS=10%; DCN→CL→DLS =28%; DCN→PF→DLS =44%; DCN→PF→DLS vs. DCN→VL→DLS,  $p<0.05$ , prueba Chi<sup>2</sup>; **Figure 10G**).

Cuando se comparó la amplitud promedio de las corrientes, se observó que el núcleo VL presentó una mayor amplitud en comparación con el núcleo CL y PF (**Figura 10H**), finalmente se observó que la corriente sináptica evocada puede generar potenciales de acción en los núcleos evaluados, siendo mayor para el núcleo VL (**Figura 10I**). La figura 10J presenta un resumen de los datos anatómicos y funcionales obtenidos de nuestros experimentos y datos reportados previamente (**Figura 10J**).



**Figura 10. Las proyecciones DCN→tálamo inervan al estriado dorsal, principalmente, a través de los núcleos ventrolateral, centrolateral, y parafascicular.**

**A)** Diagrama del procedimiento usado para marcar células en el tálamo que reciben proyecciones de los DCN y que proyectan al estriado dorsal. Se inyectó AAV1 Syn-Cre en los DCN, eYFP-DIO en el tálamo (VL/CL/VL), y retrobeads en el estriado dorsolateral. Treinta días después, se obtuvieron rebanadas de cerebro de todo el tálamo para determinar el número de células con eYFP (DCN→Tálamo), y eYFP + retrobeads (DCN→Th→DLS).

**B)** Fotomicrografías de rebanadas coronales de cerebro en diferentes niveles antero-posterior del tálamo de un animal. Insertos muestran 4 diferentes planos focales en el eje Z (2  $\mu$ m cada uno) de las regiones de interés para visualizar la presencia intracitoplasmática de retrobeads en las células con doble marcaje.

**C)** Células eYFP positivas localizadas dentro de diferentes núcleos en el tálamo, n=5 animales. \*p<0.05, prueba  $\chi^2$ .

**D)** Células eYFP+retrobeads positivas, n=4 animales. \*p<0.05, prueba  $\chi^2$ .

**E)** Se inyectó ChR2-DIO en los DCN de ratones VGlut2-Cre, y retrobeads en el DLS. Aproximadamente, 15 días después se obtuvieron rebanadas a nivel del tálamo para realizar registros electrofisiológicos de células en el VL, CL y PF.

**F)** Porcentaje de células eYFP positivas con corrientes postsinápticas. \*p<0.05, prueba  $\chi^2$

**G)** Porcentaje de células eYFP+retrobeads positivas con corrientes postsinápticas. \*p<0.05, prueba  $\chi^2$ .

**H)** Comparación del promedio de las corrientes postsinápticas registradas en el VL, CL, y PF que proyectan al estriado (círculos purpura) o a otras regiones (círculos vacíos). \*p<0.05, prueba Kruskal Wallis.

**I)** Probabilidad de que la corriente postsináptica evocada genere potenciales de acción en células VL y PF.

**J)** Resumen de las probabilidades para evocar corrientes postsinápticas (PSCs) o potenciales de acción. \*70% probabilidad de que la activación de axones del núcleo PF evoque PSCs en el DLS, observado en Díaz-Hernandez et al (Díaz-Hernández et al., 2018). \*\*20% de probabilidad de que la activación de axones DCN→CL genere potenciales de acción en células del CL, observado en Gornati et al. (Gornati et al., 2018).

## **Ejecución de movimientos de alcance, y desplazamientos unidireccionales o en secuencia con ayuda de una palanca**

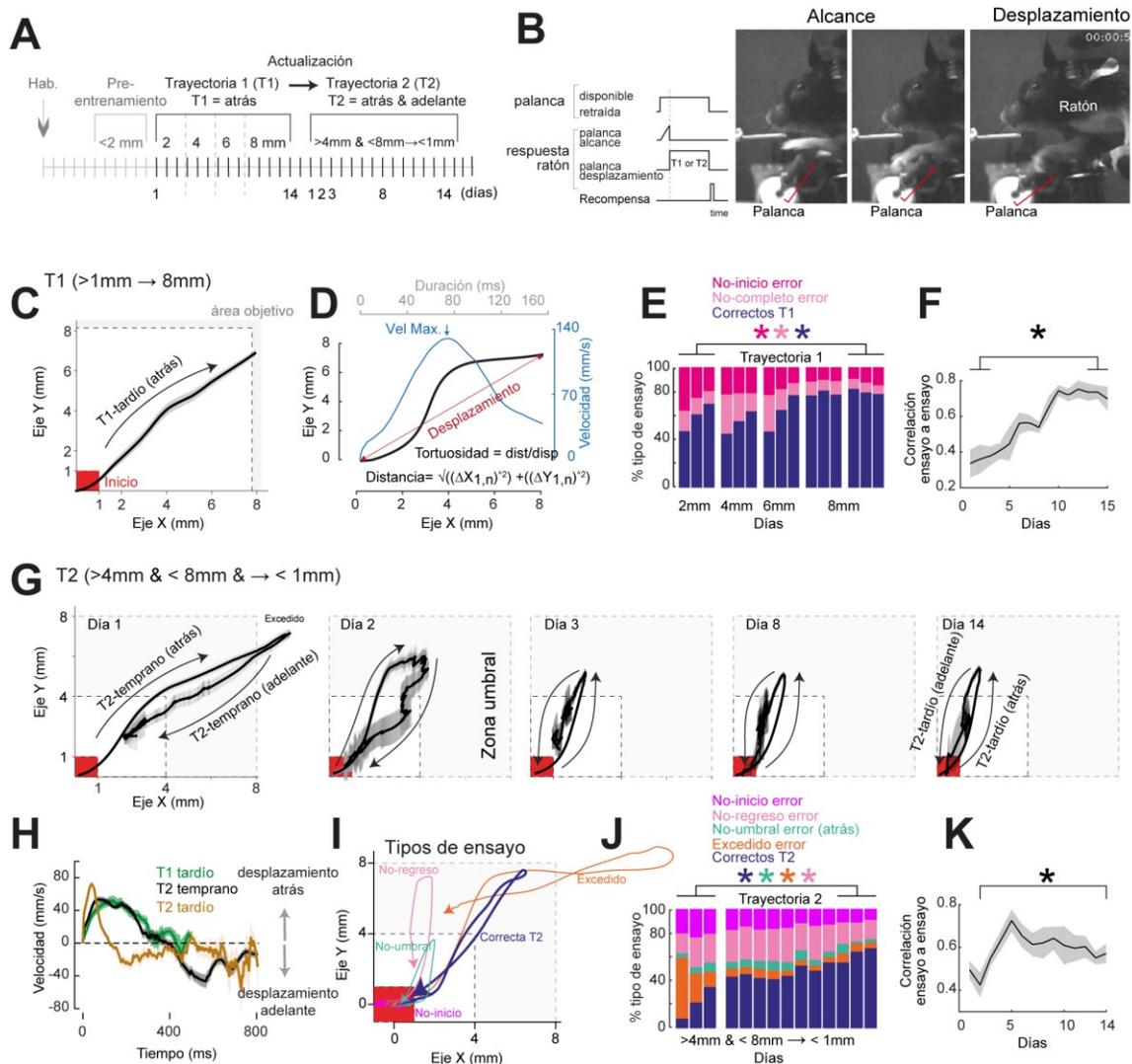
Los resultados mostrados hasta aquí hacen repensar la importancia de la comunicación subcortical desde el cerebelo; la visión canónica de las proyecciones de los DCN al tálamo ha centrado la discusión en las proyecciones hacia la corteza cerebral y sus efectos motores, sin embargo, no hay información acerca de la comunicación subcortical durante la ejecución de desplazamientos complejos en secuencia, o durante la actualización de habilidades motoras.

Para indagar en estos puntos se diseñó una tarea en la que los ratones son entrenados a realizar un desplazamiento unidireccional de 8mm (T1), y una vez aprendido este movimiento, se cambiaron las reglas de ejecución (actualización) pidiéndole a los ratones el incorporar un nuevo movimiento hasta realizar un desplazamiento hacia atrás y otro hacia adelante en secuencia (T2) (Figura 11A).

Durante la ejecución de los desplazamientos se identificó el momento en que los ratones iniciaban el movimiento de alcance de la palanca, el desplazamiento de la palanca, y el momento de la recompensa (**Figura 11B**). Un ejemplo del desplazamiento unidireccional se muestra en la **Figura 11C**, las trayectorias fueron analizadas individualmente para obtener parámetros como duración, velocidad, distancia, desplazamiento, velocidad máxima y turtuosidad (**Figura 11D**), a lo largo del entrenamiento los ratones lograron estabilizar el número de ensayos correctos y disminuyeron los errores de no-inicio y no-objetivo1 (ensayos correctos,  $p=0.01$ ; error no-inicio,  $p=0.01$ ; error no-objetivo1,  $p=0.01$ ; prueba Wilcoxon pareada) (**Figura 11E**), incrementando la correlación entre trayectorias a lo largo de los días de entrenamiento ( $p < 0.0001$ , prueba Friedman, **Figura 11F**).

Una vez que los ratones alcanzaban al menos un 50% de ensayos correctos durante el desplazamiento unidireccional, día 14, los ratones fueron entrenados a actualizar el desplazamiento unidireccional aprendido a un desplazamiento en secuencia de ida y regreso (**Figura 11G**). En esta fase, dos reglas fueron incorporadas y permanecieron durante los 15 días posteriores de ejecución del movimiento en secuencia; primera, los ratones tenían que identificar una zona umbral de desplazamiento para el primer movimiento ( $>4\text{mm}$  &  $<8\text{mm}$ ; sombras grises en **Figura 11G**); segunda, los ratones tenían que regresar la palanca a la zona de inicio (cuadro rojo en **Figura 11G**).

Después de 14 días de entrenamiento las curvas de velocidad correspondientes a la trayectoria unidireccional (**Figura 11G**, curva en negro) y en secuencia (**Figura 11G**, curva en café) muestran formas diferentes, evidenciando que el desplazamiento unidireccional y en secuencia son desplazamientos diferentes. Durante la adquisición de la trayectoria en secuencia se presentaron ensayos correctos y diferentes errores: error no-inicio; error no-umbral1; error no-regreso; error tiro-largo (**Figura 11I**); los cuales cambiaron a lo largo del entrenamiento (**Figura 11J**) y la correlación entre las trayectorias aumentó (**Figura 11K**).



**Figura 11.** Ejecución de movimientos de alcance a una palanca y posterior desplazamiento unidireccional o en secuencia.

**A)** Línea temporal del entrenamiento de ratones para ejecutar un desplazamiento unidireccional (trayectoria 1) y posteriormente, actualizarlo a ejecutar un desplazamiento en secuencia (trayectoria 2).

**B)** Izquierda: esquema de la tarea describiendo los estados de la palanca, y la respuesta de los ratones para realizar movimientos de alcance y los desplazamientos requeridos (trayectoria 1 o 2). Derecha: fotogramas de los ratones durante la ejecución del movimiento de alcance y desplazamiento de la palanca.

**C)** Trazo promedio del desplazamiento unidireccional (8mm) de la palanca por un animal. El cuadro rojo indica el umbral a rebasar para considerar un desplazamiento.

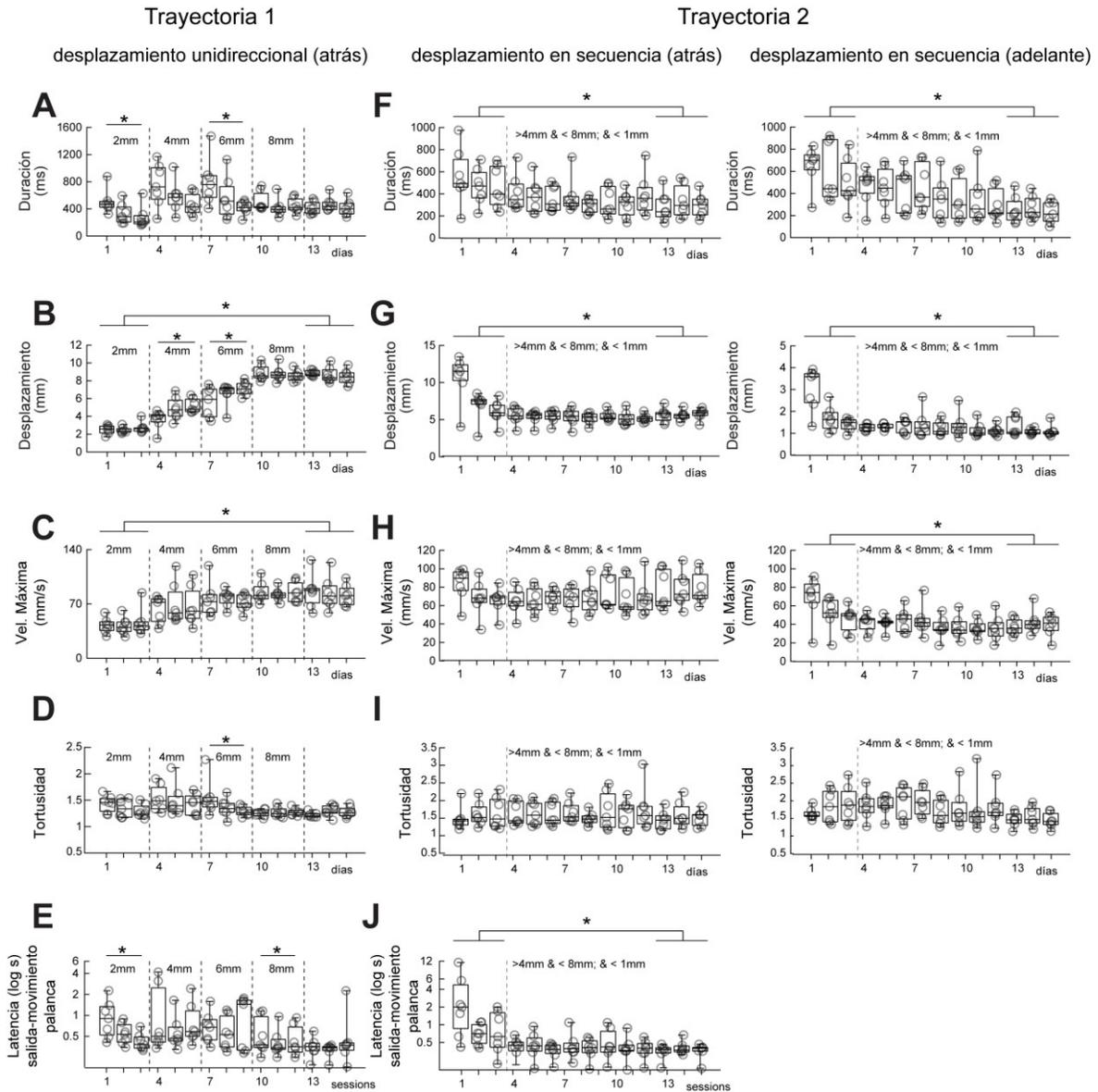
**D)** Ejemplo de un desplazamiento (línea negra). Se muestran las mediciones obtenidas: velocidad (línea azul), duración (eje gris), desplazamiento (línea roja).

**E)** Proporción de ensayos correctos y errores a lo largo del entrenamiento, n=7 ratones. \*p<0.05, prueba Wilcoxon pareada.

**F)** Correlación de las trayectorias ensayo a ensayo para los desplazamientos unidireccionales. \*p<0.05 prueba Wilcoxon pareada entre el promedio de correlaciones obtenidas durante los desplazamientos de 2mm y 8mm. Comparación en cada sesión de las trayectorias (ver métodos). Se muestra promedio ± error estándar.

- G) Ejemplo de la fase de actualización de un desplazamiento unidireccional hacia uno en secuencia (día 1, 2, y 3), y durante la fase tardía (día 8 y 14).
- H) Curvas describiendo la velocidad promedio de los desplazamientos unidireccional tardío (T1, verde, día 14), en secuencia temprano (T2, negro, día 1), y en secuencia tardío (T2, café, día 14). Nótese la similitud entre las curvas negra y verde.
- I) Ejemplo de los posibles desplazamientos realizados durante el desplazamiento en secuencia.
- J) Proporción de ensayos correctos y errores durante los desplazamientos en secuencia.
- K) Correlación de las trayectorias ensayo a ensayo para la trayectoria 2. \* $p < 0.05$ , prueba Wilcoxon pareada entre el segundo día y el último.

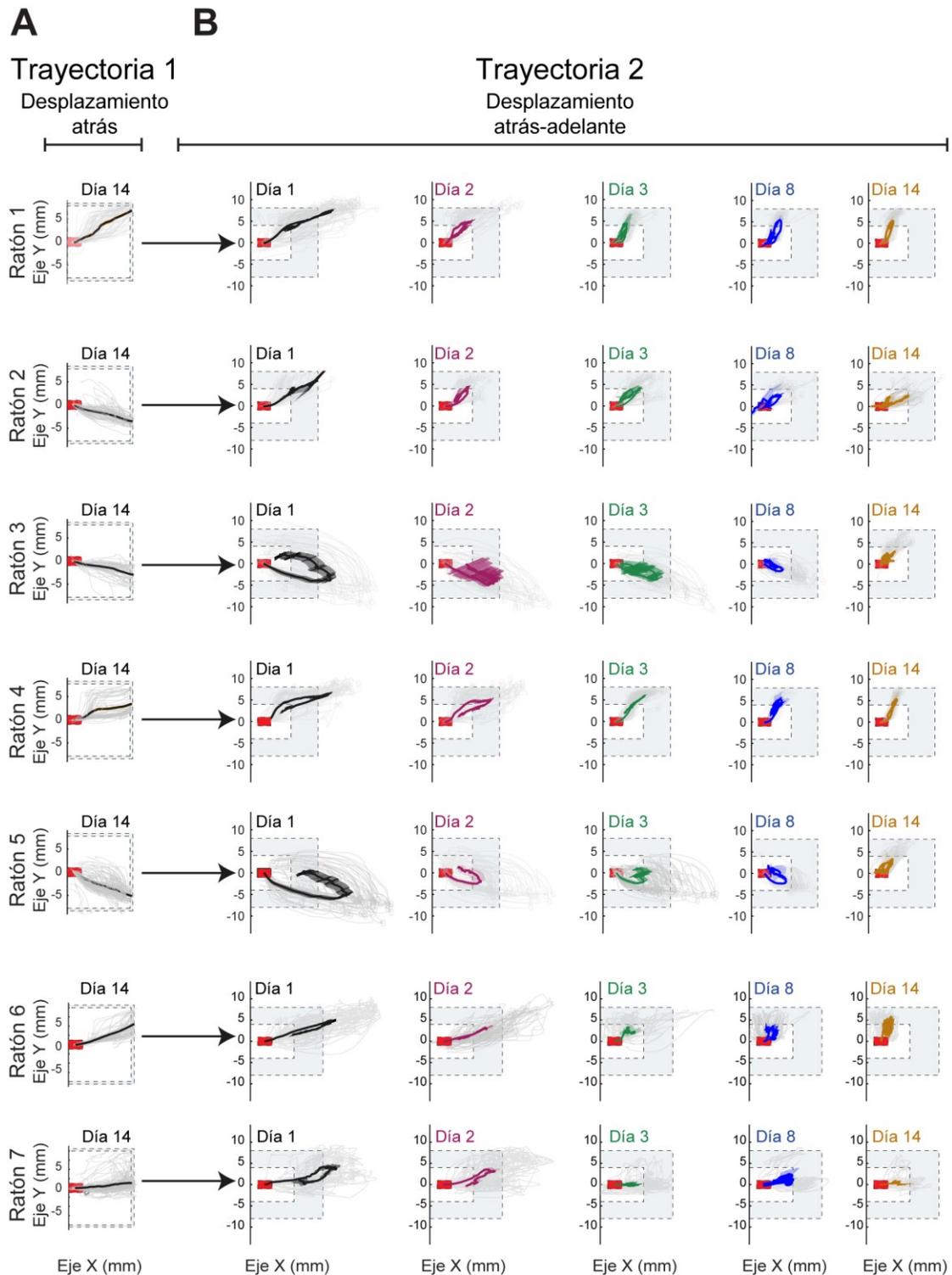
Para estandarizar la estrategia conductual presentada en la **figura 11** se evaluaron 7 animales en donde se registró y analizó la duración, desplazamiento, velocidad máxima, tortuosidad, y latencia para iniciar las trayectorias unidireccionales (**Figura 12A-E**), estos mismos animales realizaron la actualización del desplazamiento unidireccional a desplazamiento en secuencia y las trayectorias fueron analizadas (**Figura 12F-J**).



**Figura 12.** Variables evaluadas durante la ejecución del desplazamiento unidireccional (trayectoria 1) y en secuencia (trayectoria 2).

- A) Duración de los desplazamientos unidireccionales a lo largo del entrenamiento. Las líneas punteadas indican el cambio de bloque para cada requerimiento del desplazamiento.
- B) Igual que en A para desplazamiento.
- C) Igual que en A para velocidad máxima.
- D) Igual que en A para tortuosidad.
- E) Igual que en A para latencia para mover la palanca medida desde la salida hasta el inicio de movimiento.
- F) Duración de los desplazamientos en secuencia atrás-adelante (columna izquierda y derecha respectivamente) a lo largo del entrenamiento.
- G) Igual que en F para desplazamiento.
- H) Igual que en F para velocidad máxima.
- I) Igual que en F para tortuosidad.
- J) Igual que en F para latencia.

Se pudo observar que los ratones lograron realizar el desplazamiento unidireccional (**Figura 13A**) y cada uno de ellos desarrollo su propia estrategia para actualizar el desplazamiento unidireccional a en secuencia (**Figura 13B**).



**Figura 13. Desplazamientos unidireccionales durante la fase tardía, posterior actualización a desplazamiento en secuencia y finalmente en la fase tardía.**

A) En gris se muestran las trayectorias individuales para cada animal y en negro se muestra el promedio de los desplazamientos por animal durante el último día de entrenamiento en el desplazamiento unidireccional. El cuadro rojo indica la zona umbral para detectar el inicio de un movimiento.

B) En gris se muestran las trayectorias individuales del desplazamiento en secuencia para cada animal; en negro el promedio para el día uno, en vino para el día 2 y en verde para el día 3 de la fase de actualización. En color azul se muestra un periodo intermedio en la fase de aprendizaje y finalmente en café la trayectoria promedio durante el último día de entrenamiento.

## **Estrategia para la inhibición de las proyecciones individuales DCN→Tálamo y las proyecciones DCN→Tálamo→Estriado**

Reportes previos han mostrado que lesiones en los DCN o del estriado dorsal afectan el movimiento de alcance o parámetros cinemáticos de desplazamiento de las extremidades anteriores (Amrani et al., 1996; Dhawale et al., 2021; Kato & Kimura, 1992; Lopez-Huerta et al., 2021).

Comúnmente se sugiere que los ganglios basales son requeridos durante la ejecución de desplazamientos en secuencia y acciones dirigidas a objetivos, y el cerebelo es requerido en la coordinación motora. Bajo estos supuestos evaluamos dos hipótesis: 1) la comunicación cerebelo – estriado contribuye a la ejecución de desplazamientos en secuencia. 2) Las vías particulares DCN→tálamo (DCN→VL; DCN→CL; DCN→PF) tienen contribuciones específicas durante la ejecución de movimientos con las extremidades anteriores.

Para evaluar estas hipótesis desarrollamos una estrategia de inhibición optogenética de terminales sinápticas, en donde se inyectó un vector viral para expresar la proteína Arch3.0 (opsina que al estar en presencia de luz verde [565nm longitud onda] inhibe el disparo neuronal (Chow et al., 2010; Díaz-Hernández et al., 2018; El-Gaby et al., 2016) en los DCN y sus proyecciones. Para lograr inhibir específicamente las diferentes proyecciones DCN→tálamo, se implantaron fibras ópticas de 300 micras sobre el núcleo VL (DCN<sub>Arch-eYFP</sub>→VL), CL (DCN<sub>Arch-eYFP</sub>→CL), y PF (DCN<sub>Arch-eYFP</sub>→PF) en diferentes grupos de animales (**Figura 14B**).

En otro grupo de animales, se inhibió a las transinápsis DCN→Th→estriado expresando la proteína Cre en los DCN y en sus células post-sinápticas del tálamo, seguido de la expresión de Arch3.0 dependiente de Cre en el tálamo (DCN<sub>Cre</sub>→Th<sub>Arch-eYFP</sub>→DLS); implantando fibras ópticas en el DLS (**Figura 14C**). Para estos experimentos se verificó que la inyección cubriera los DCN (**Figura 14A**), y que la posición bilateral de las fibras ópticas estuviera sobre los núcleos a inhibir (**Figura 14D**). Se corrieron grupos control para cada núcleo en donde se inyectó sólo la proteína eYFP (**Figura 14E**).

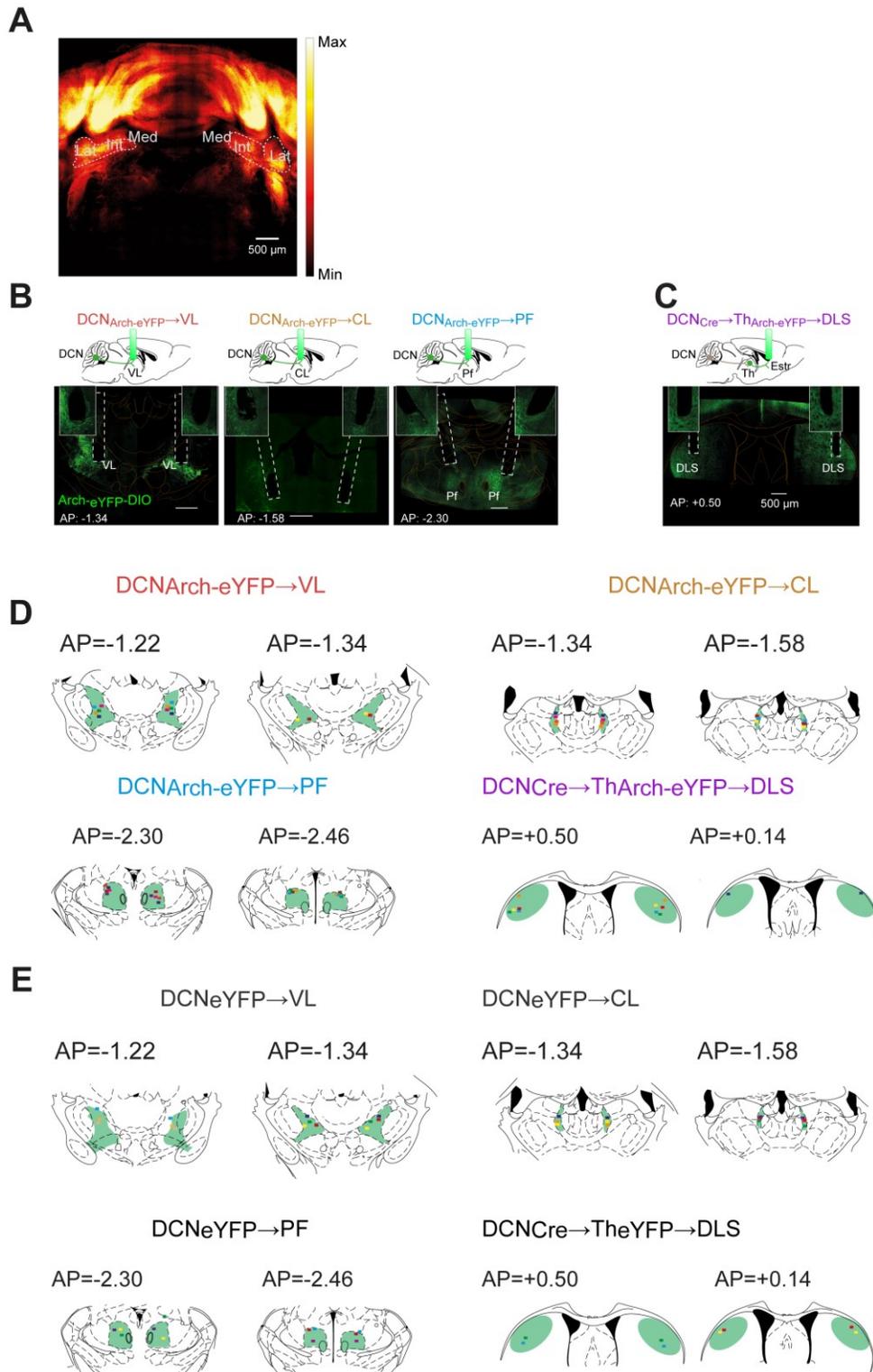
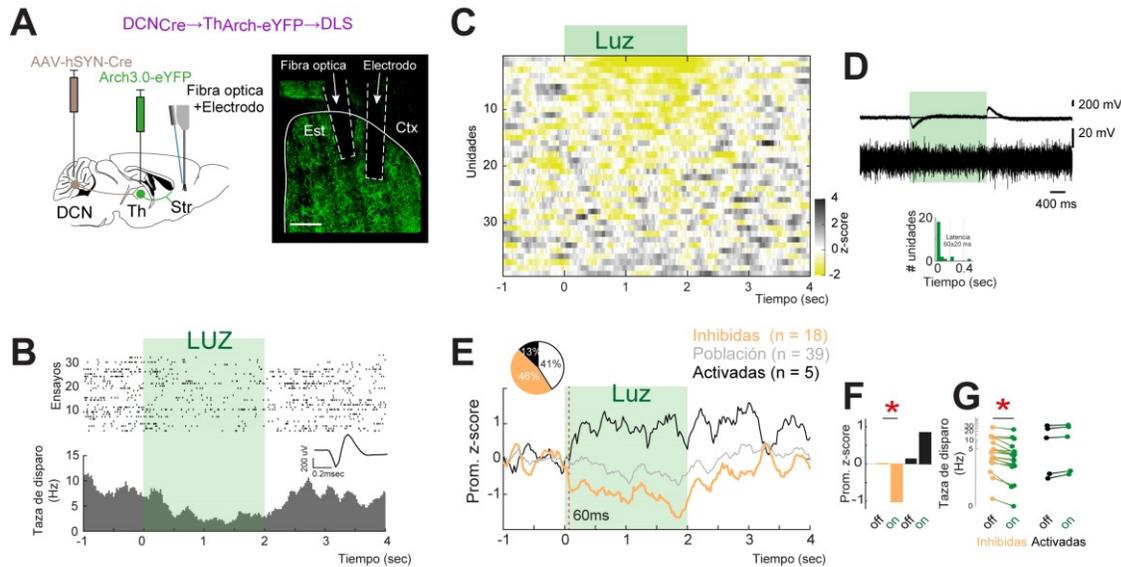


Figura 14. Posición de las puntas de las fibras ópticas implantadas en los animales evaluados durante los protocolos de inhibición optogenética.

- A)** Máxima proyección de fotografías confocales de rebanadas coronales a nivel del cerebelo, 10 animales en los que se expresó Arch3.0-eYFP en los núcleos profundos del cerebelo (DCN).
- B)** Paneles superiores: diagramas de la posición de las fibras ópticas para inhibir las proyecciones mono-sinápticas de los DCN en el núcleo ventral lateral ( $DCN_{Arch-eYFP} \rightarrow VL$ ), central lateral ( $DCN_{Arch-eYFP} \rightarrow CL$ ), o parafascicular ( $DCN_{Arch-eYFP} \rightarrow PF$ ) del tálamo. Abajo: Fotomicrografías representativas de rebanadas coronales mostrando la posición bilateral de las fibras ópticas implantadas (líneas punteadas) en un animal para cada grupo; se observan las proyecciones que expresan la proteína Arch3.0.
- C)** Panel superior: diagrama de la posición de las fibras ópticas para inhibir las proyecciones di-sinápticas ( $DCN_{Cre} \rightarrow Th_{Arch-eYFP} \rightarrow DLS$ ) en el estriado dorsal lateral (DLS). Abajo: Fotomicrografía representativa de rebanadas coronales mostrando la posición bilateral de las fibras ópticas implantadas (líneas punteadas); se observa las proyecciones provenientes de la transinápsis en el tálamo (VL, CL, y PF; procedimiento similar a la Figura 7) que expresan la proteína Arch3.0.
- D)** Posición de las puntas de las fibras ópticas de los animales que fueron incluidos en los análisis de la manipulación optogenética para los grupos que expresan la proteína Arch3.0.
- E)** Igual que en D, pero para los grupos que expresan sólo la proteína eYFP. VL: ventral lateral, CL: central lateral, PF parafascicular.

Se verificó que la iluminación con luz verde (565nm) a través de la fibra óptica inhibiera la actividad basal de las células que reciben las transinapsis  $DCN \rightarrow Th \rightarrow$ . Para ello, se usó la estrategia de transinápsis igual que en el grupo de la **Figura 14C** y se implantó un optrodo (fibra óptica + electrodo) en el DLS (**Figura 15A**). Se administraron pulsos de luz (**Figura 15B**) similares en amplitud y duración a los administrados durante los protocolos de inhibición optogenética. Se pudo observar una disminución en la frecuencia de disparo basal en el 48% de las neuronas registradas (**Figura 15C-G**).



**Figura 15. Modulación de la actividad estriatal por la inhibición optogenética de las proyecciones DCN<sub>Cre</sub>→ThArch-eYFP→DLS.**

**A)** Izquierda: Diagrama de una rebanada sagital de cerebro mostrando la estrategia de marcaje transináptico, y posición del optrodo de registro en el estriado dorsal. Inyección viral AAV1 Syn-Cre en los DCN, seguido de la inyección de Arch3.0 en el tálamo. Se muestra la posición de la fibra óptica y electrodo de registro en el estriado. Derecha: fotografía de rebanada coronal de cerebro mostrando la posición de la fibra óptica y electrodo en el estriado dorsal lateral (DLS). Escala, 500 micras.

**B)** Gráfica de ocurrencia con histograma peri-evento de la actividad de una célula con alineación al momento en que se da el pulso de luz, similar al empleado durante los protocolos de inhibición en los grupos experimentales DCN→Th→DLS. Inserto muestra la forma de onda obtenida de la célula registrada.

**C)** Mapa de color mostrando la actividad de 39 células obtenidas en 6 sesiones (electrodo se avanzó en cada sesión 50 micras) y registradas mientras el ratón estaba en libre movimiento en un campo abierto. Alineamiento corresponde al inicio del pulso de luz inhibitorio.

**D)** Registro del LFP durante la estimulación de luz. Los trazos superiores muestran el registro crudo de la señal electrofisiológica con (negro) y sin (gris) filtro pasabajas. El trazo filtrado esta expandido abajo para mejor visualización.

**E)** Promedio de la actividad (Z-score) para las unidades inhibidas (naranja), activadas (negro), y todas las unidades (gris). Inserto de gráfico de pastel muestra la proporción de células inhibidas, activadas y no moduladas.

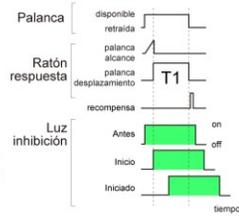
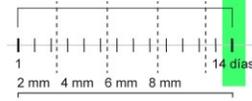
**F)** Comparación de la medida z-score durante la línea base contra el periodo de luz en las unidades inhibidas o activadas (ver método).

**G)** Comparación pareada de la taza de disparo de las células inhibidas y activadas. \* $p < 0.05$ , prueba Wilcoxon. DCN: núcleos cerebeloso profundos, Th: Tálamo, DSL: estriado dorsolateral, Ctx: corteza cerebral.

## La inhibición de las proyecciones individuales al DCN→Tálamo afectan el movimiento de alcance o los desplazamientos unidireccionales, mientras que la inhibición de la proyección DCN→Tálamo→Estriado solo afecta el movimiento de alcance

La evaluación de la inhibición durante la ejecución del desplazamiento unidireccional se realizó el día 14 después de haber iniciado el entrenamiento (**Figura 17A**). Se tomó ventaja de la estereotipia en el movimiento y se dieron pulsos de luz verde, con un 20% de probabilidad, a la salida de la palanca con duración de 2 segundos (**Figura 17A**); para este día los animales realizaban desplazamientos con latencias de inicio de movimiento alrededor de 500 ms (**Figura 12E**) y ejecución de todo el movimiento alrededor de 500 ms (**Figura 12A**), lo que permitió que el pulso de luz cubriera todo el movimiento.

Durante la fase de aprendizaje, en ausencia de inhibición, no hubo diferencias entre los grupos ni con expresión de la proteína Arch3.0 o solo la proteína eYFP (**Figura 16**, en escala de grises para grupos solo con eYFP y en color los grupos con Arch3.0). Como grupo control se mezcló a todos los ratones a los que se había expresado sólo la proteína eYFP, ya que no se observó ninguna diferencia entre ellos, ni en la forma de adquirir el desplazamiento unidireccional, ni durante la fase de inhibición de las proyecciones DCN→VL<sub>eYFP</sub>, DCN→CL<sub>eYFP</sub>, DCN→PF<sub>eYFP</sub>, DCN<sub>cre</sub>→Th<sub>eYFP</sub>→DLS (**Figura 16**, grupos en escala de grises).

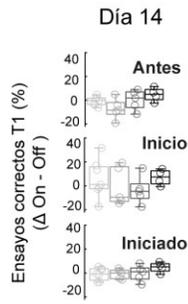
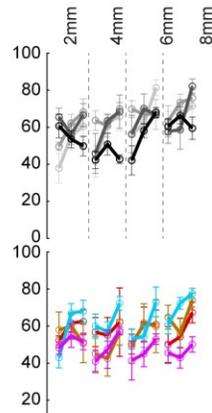
**A****Inhibición T1-tardío**Trayectoria 1  
(atrás + adelante)

$DCN_{eYFP} \rightarrow VL$   
 $DCN_{eYFP} \rightarrow CL$   
 $DCN_{eYFP} \rightarrow PF$   
 $DCN_{Cre} \rightarrow Th_{eYFP} \rightarrow DLS$

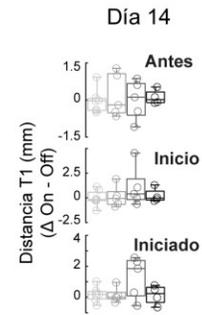
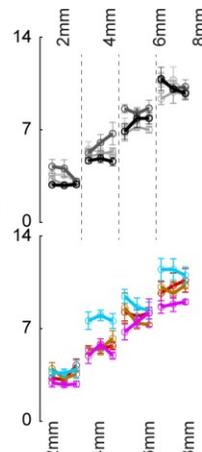
$DCN_{Arch-eYFP} \rightarrow VL$   
 $DCN_{Arch-eYFP} \rightarrow CL$   
 $DCN_{Arch-eYFP} \rightarrow PF$   
 $DCN_{Cre} \rightarrow Th_{Arch-eYFP} \rightarrow DLS$

**B**

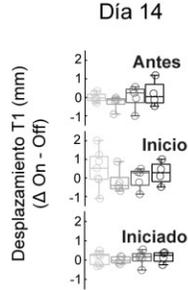
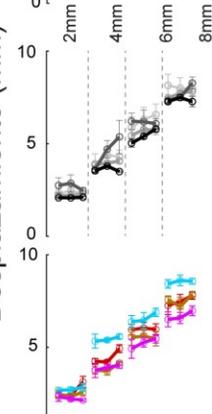
Ensayos correctos (%)

**C**

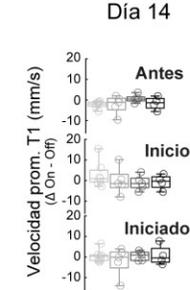
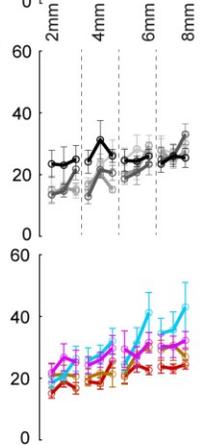
Distancia (mm)

**D**

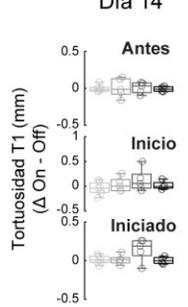
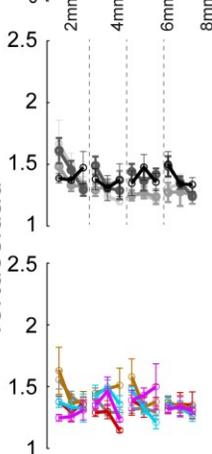
Desplazamiento (mm)

**E**

Velocidad prom. (mm/s)

**F**

Tortuosidad



**Figura 16. Comparación a lo largo del entrenamiento para los grupos con expresión de la proteína Arch-3.0 y grupos control con sólo la expresión de eYFP.**

**A)** Izquierda: Línea temporal indicando el día de manipulación durante la fase tardía del entrenamiento en el desplazamiento unidireccional. Derecha: Esquema indicando que la luz inhibitoria fue administrada durante el experimento en tres condiciones, antes de iniciar el desplazamiento, al inicio del desplazamiento y una vez iniciado el desplazamiento.

**B)** Izquierda: porcentaje de ensayos correctos a lo largo del entrenamiento para los grupos control (Solo expresión eYFP, líneas en escala de grises) y para los grupos con Arch-3.0 (líneas en color). Derecha: porcentaje de ensayos correctos. De arriba hacia abajo, efecto de la inhibición administrada antes, al inicio o una vez iniciado el desplazamiento.

**C)** Igual que en B, pero para distancia.

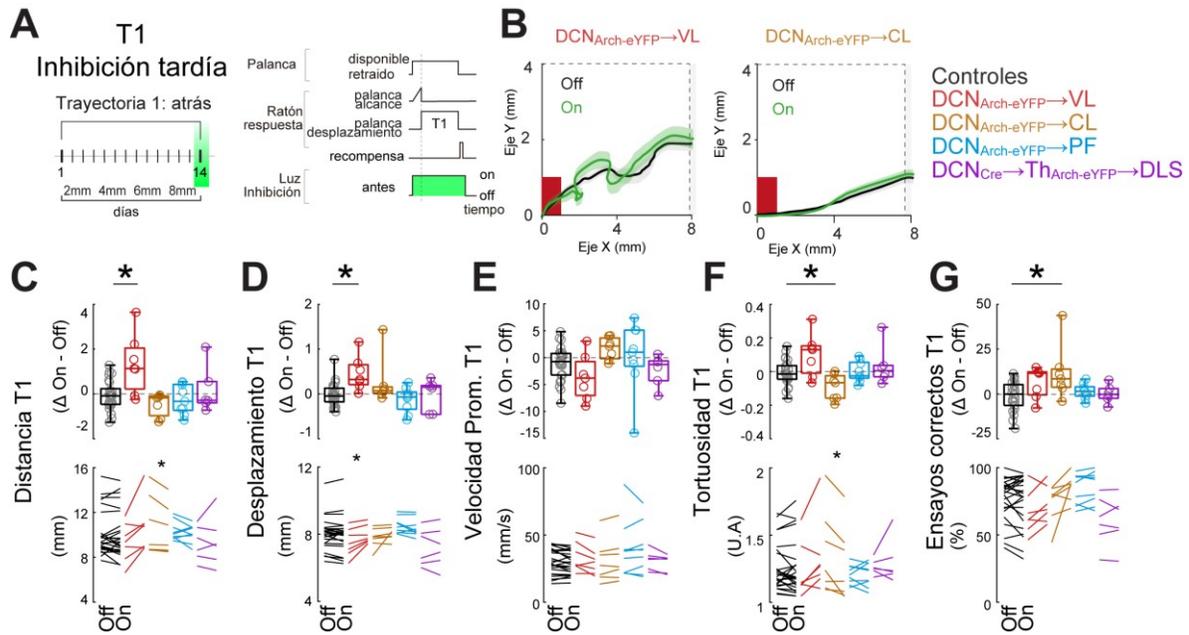
**D)** Igual que en B, pero para desplazamiento.

**E)** Igual que en B, pero para velocidad promedio.

**F)** Igual que en B, pero para tortuosidad.

Se observó que la inhibición optogenética administrada antes de iniciar el movimiento tuvo efectos sobre el grupo DCN→VL<sub>Arch eYFP</sub> y DCN→CL<sub>Arch eYFP</sub>. En el primero incrementó la distancia total y el desplazamiento del movimiento ( $\Delta\text{On-Off}_{\text{distancia}} = 1.3 \pm 0.5$  y  $\Delta\text{On-Off}_{\text{desplazamiento}} = 0.45 \pm 0.14$ ,  $p < 0.05$ ; prueba Kruskal Wallis; **Figura 17B-D**), lo que sugiere disimetría en el movimiento; mientras que en el segundo disminuyó la tortuosidad del desplazamiento ( $\Delta\text{On-Off}_{\text{tortuosidad}} = -0.09 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ , prueba Kruskal Wallis, **Figura 17F**), dando como resultado un movimiento suavizado, y un aumento en el número de trayectorias correctas ( $p < 0.05$ , prueba Kruskal Wallis; **Figura 17G**).

Nótese que ni la inhibición sobre la vía DCN→PF, ni sobre las proyecciones di-sinápticas DCN→Th→DLS provocó alteraciones en el movimiento (**Figura 17C-G**, cajas purpura).



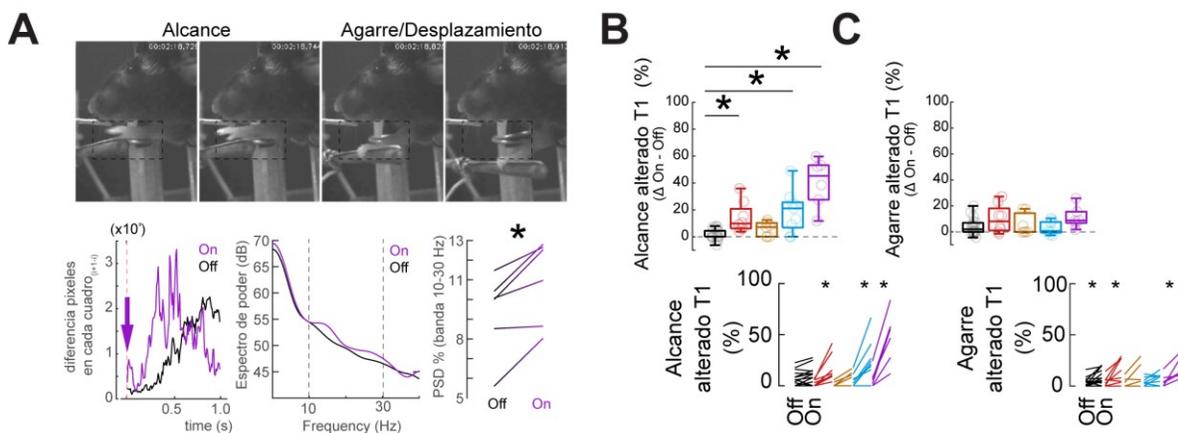
**Figura 17.** Inhibición individual de las vías DCN→Tálamo afecta de manera diferente la ejecución del desplazamiento unidireccional, mientras que la vía disináptica al estriado no afecta la ejecución.

- A)** Izquierda: línea temporal indicando el día de inhibición (verde) durante la fase aprendida del movimiento unidireccional. Derecho: Esquema de la tarea indicando que la luz inhibitoria fue presentada en el momento en que la palanca se presenta, antes de iniciar el movimiento.
- B)** Ejemplos de desplazamiento promedio con (verde, On) y sin (negro, Off) inhibición.
- C)** Efecto de la inhibición optogenética sobre la distancia evaluada en el desplazamiento unidireccional. Arriba: comparación de diferencia entre la condición con luz y sin luz ( $\Delta$ On-Off) para todos los grupos. \* $p < 0.05$ , prueba Kruskal Wallis, post hoc Dunnett. Abajo: Gráficos pareados mostrando el promedio de la distancia obtenido en la condición sin luz y con luz para todos los grupos.
- D)** Igual que en C, pero para desplazamiento.
- E)** Igual que en C, pero para velocidad promedio.
- F)** Igual que en C, pero para tortuosidad.
- G)** Igual que en C, pero para ensayos correctos.

Debido a que no hubo ninguna alteración motora en la vía di-sináptica DCN→Th→DLS durante las inhibiciones optogenéticas en el desplazamiento unidireccional, se analizaron los videos para evaluar si había alteraciones durante el movimiento de alcance de la palanca. Se realizó un análisis de diferencia de pixeles (ver método) sobre el área del video en donde ocurría el movimiento de las extremidades anteriores para alcanzar la palanca. Sobre estos datos se analizó el espectro de poder para identificar si había diferencia del movimiento, se observó que

había un incremento en el espectro de poder en la banda de 10 a 30 Hz (**Figura 18A**), congruente con trabajos previos que reportan temblor cerebeloso (Pan et al., 2020).

Se calculó el porcentaje de ensayos con alteraciones en el movimiento de alcance y se observó que la inhibición de vías individuales (DCN→VL; DCN→PF) o la inhibición general de las proyecciones disinápticas (DCN→Th→DLS) incrementó la presencia de alteraciones en el movimiento de alcance (**Figura 18B**), también se observó que el porcentaje de alteraciones en la sujeción de la palanca no cambió con este protocolo de inhibición (**Figura 18C**).



**Figura 18.** La inhibición de la vía DCN→Th→DLS afecta el movimiento de alcance.

**A)** Arriba: fotogramas ilustrando un ratón al realizar el movimiento de alcance y desplazamiento unidireccional. Abajo izquierda: diferencia de pixeles acumulada tomada de las regiones de interés en los fotogramas (cuadros en líneas punteadas cubriendo las extremidades). Abajo centro: espectrograma de ensayos individuales compuestos de la diferencia de pixeles. Abajo derecha: comparación pareada del espectro de poder analizado en la banda 10-30Hz durante la condición sin (Off) y con (On) luz.

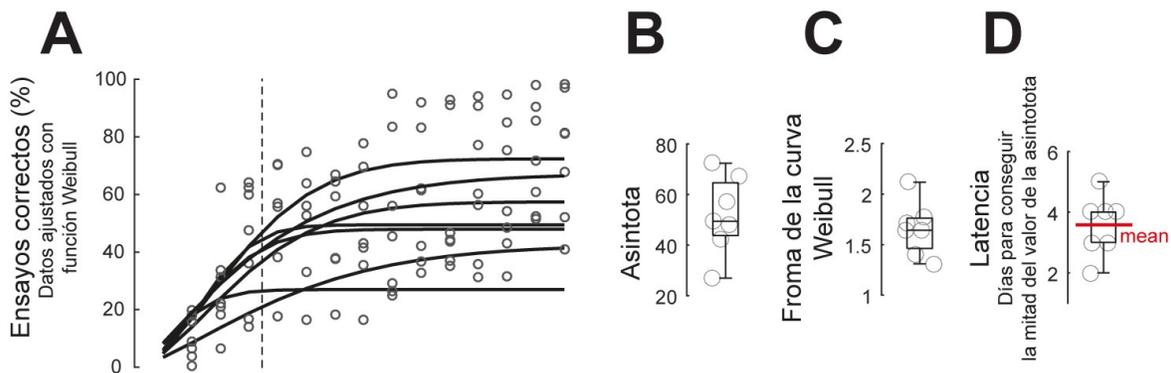
**B)** Proporción de ensayos que presentaron alteración en el movimiento de alcance.

**C)** Proporción de ensayos con alteración en el agarre mientras se realizó el desplazamiento.

Estos resultados muestran que las proyecciones DCN→Tálamo contribuyen a la ejecución apropiada del desplazamiento unidireccional, mientras que la vía disináptica no influye en la ejecución del desplazamiento unidireccional, pero sí durante el movimiento de alcance.

## Inhibición de las proyecciones disinápticas DCN→Tálamo→Estriado afecta la actualización del desplazamiento unidireccional a desplazamientos en secuencia

Para evaluar la contribución de las proyecciones mencionadas sobre la actualización de desplazamientos unidireccionales a secuenciales los ratones fueron entrenados un día más en la ejecución de desplazamientos unidireccionales (sin inhibición optogénica), y posteriormente se cambió al entrenamiento para desplazar la palanca hacia atrás - adelante en secuencia. Durante el cambio de unidireccional a secuencial se administró inhibición optogénica durante los primeros tres días; estos primeros 3 días representan el periodo de cambio en que la curva de aprendizaje llega a la mitad de la asíntota en el aprendizaje (**Figura 19A**).



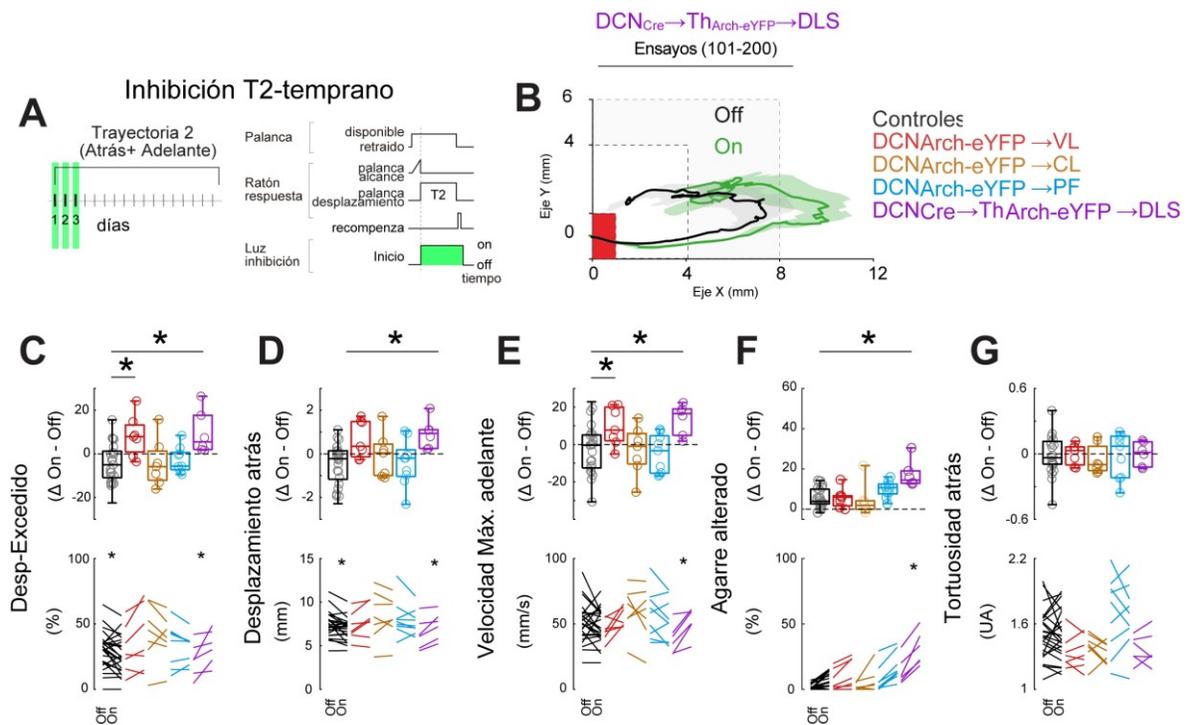
**Figura 19.** Curvas de aprendizaje durante la actualización de unidireccional a la trayectoria en secuencia (atrás-adelante), mismos animales mostrados en la figura 11.

- A) Ensayos correctos a lo largo de la adquisición de la trayectoria en secuencia con ajuste de la función Weibull ( $y=A(1-2-[(x/L)^S])$ ); A= asíntota; L= latencia; S=Inicio de crecimiento de la curva) (Gallistel et al., 2004; Harris, 2011). La línea punteada separa los primeros tres días de adquisición.  
 B) Asíntota: valor máximo alcanzado con el ajuste Weibull en la curva de aprendizaje.  
 C) Forma de la curva con ajuste Weibull.  
 D) Latencia para conseguir la mitad del valor de la asíntota.

Para conocer si estas vías eran requeridas durante la ejecución de desplazamientos en secuencia, se inhibieron las proyecciones de la vía DCN→Th→DLS o DCN→Th durante los primeros tres días de entrenamiento (en el 40% de los intentos se dieron pulsos de luz verde

durante 2 segundos acoplada al momento de iniciar el movimiento (**Figura 20A**); este protocolo se seleccionó para inhibir desde el inicio del movimiento y hasta su término debido a que durante esta fase la latencia de inicio fue mayor a dos segundos (ver **Figura 12J**).

De este experimento se observó que la inhibición de la vía DCN→Th→DLS y DCN→VL afectó la ejecución del desplazamiento en secuencia durante la fase de actualización. Ejemplos de estos efectos son presentados en la **Figura 20B** y **video S5**, nótese que estos efectos fueron observados en una ventana específica de ensayos durante esta fase (ensayos 94-240; **Figura 21A-C**, sombra purpura).



**Figura 20. Las proyecciones DCN→Th→DLS contribuyen a la actualización de un desplazamiento unidireccional a en secuencia.**

**A)** Izquierda: Línea temporal remarcando que las manipulaciones ocurrieron durante los primeros 3 días de la fase de actualización de un desplazamiento unidireccional (trayectoria 1) a uno en secuencia (trayectoria 2). Derecha: Esquema indicando que la luz inhibitoria fue dada al momento de iniciar el desplazamiento.

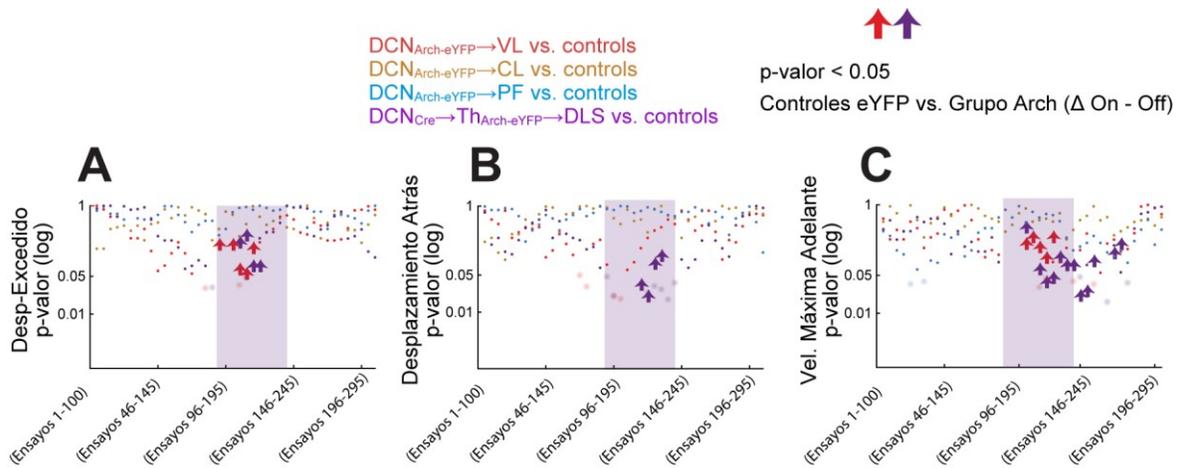
**B)** Trayectorias representativas durante ensayos con (verde) y sin (negro) inhibición.

**C)** Efecto de la inhibición optogenética sobre el error-excedido del desplazamiento. Arriba: valor de la diferencia del error-excedido ( $\Delta$ On-Off) para todos los grupos, \* $p < 0.05$ , prueba Kruskal Wallis, post hoc Dunnnett. Abajo: Gráficos pareado del promedio de errores observados por animal en ensayos con (On) y sin (Off) inhibición optogenética.

- D) Igual que en C, pero para desplazamiento hacia atrás.
- E) Igual que en C, pero para velocidad máxima del desplazamiento hacia adelante.
- F) Igual que en C, pero para los eventos de agarre alterado.
- G) Igual que en C, pero para la tortuosidad del desplazamiento.

La inhibición en el grupo DCN→Th→DLS o DCN→VL presento movimientos excedidos, mayor desplazamiento y un aumento en la velocidad máxima en el movimiento de regreso (DCN→Th→DLS<sub>overshoot</sub> ΔOn-off=9.8± 4%, DCN→VL<sub>overshoot</sub> ΔOn-off=8.2± 3%, DCN→Th→DLS<sub>desplazamiento</sub> ΔOn-off=0.9± 0.2mm, DCN→Th→DLS<sub>vel max.</sub> ΔOn-off=13± 3mm/s, DCN→VL<sub>vel max.</sub> ΔOn-off=9.6± 3mm/s, p<0.05, prueba Kruskal Wallis, **Figuras 20C-E**, valores p específicos de estadístico pueden consultarse en **tabla S1**).

El análisis de los videos mostró que la inhibición en el grupo DCN→Th→DLS provocó alteraciones en la sujeción de la palanca (ΔOn-Off= 17±2%, **Figura 20F**). En esta fase la inhibición no afectó la tortuosidad del movimiento (**Figura 20G**) o los errores de no-inicio, no-umbral1, no-regreso (p>0.05, prueba Kruskal Wallis, **Tabla S1**).



**Figura 21.** Ensayos específicos donde la inhibición de la vía DCN→Th→DLS afectó los desplazamientos durante la actualización de los desplazamientos unidireccionales a en secuencia.

- A) Primeros 300 ensayos durante la fase de actualización. Cada punto representa el p-valor de la prueba U de Mann-Whitney comparando una ventana de 100 ensayos entre el grupo control y los grupos Arch para la variable desplazamiento-excedido, con un desplazamiento de la ventana cada 5 ensayos. La sombra purpura representa la región de ensayos en los que se presentaron los principales efectos.
- B) Igual que en A, pero para desplazamiento atrás.
- C) Igual que en A, pero para velocidad máxima. Las flechas indican el incremento o disminución en los valores ΔOn-Off.

En suma, estos resultados muestran que las proyecciones DCN→Th→DLS y DCN→VL contribuyen durante la ejecución de los desplazamientos (en línea) y durante la actualización del desplazamiento unidireccional a en secuencia.

## **Las proyecciones DCN→Tálamo son requeridas más allá del control de movimiento en línea: alteraciones no-motoras durante la actualización**

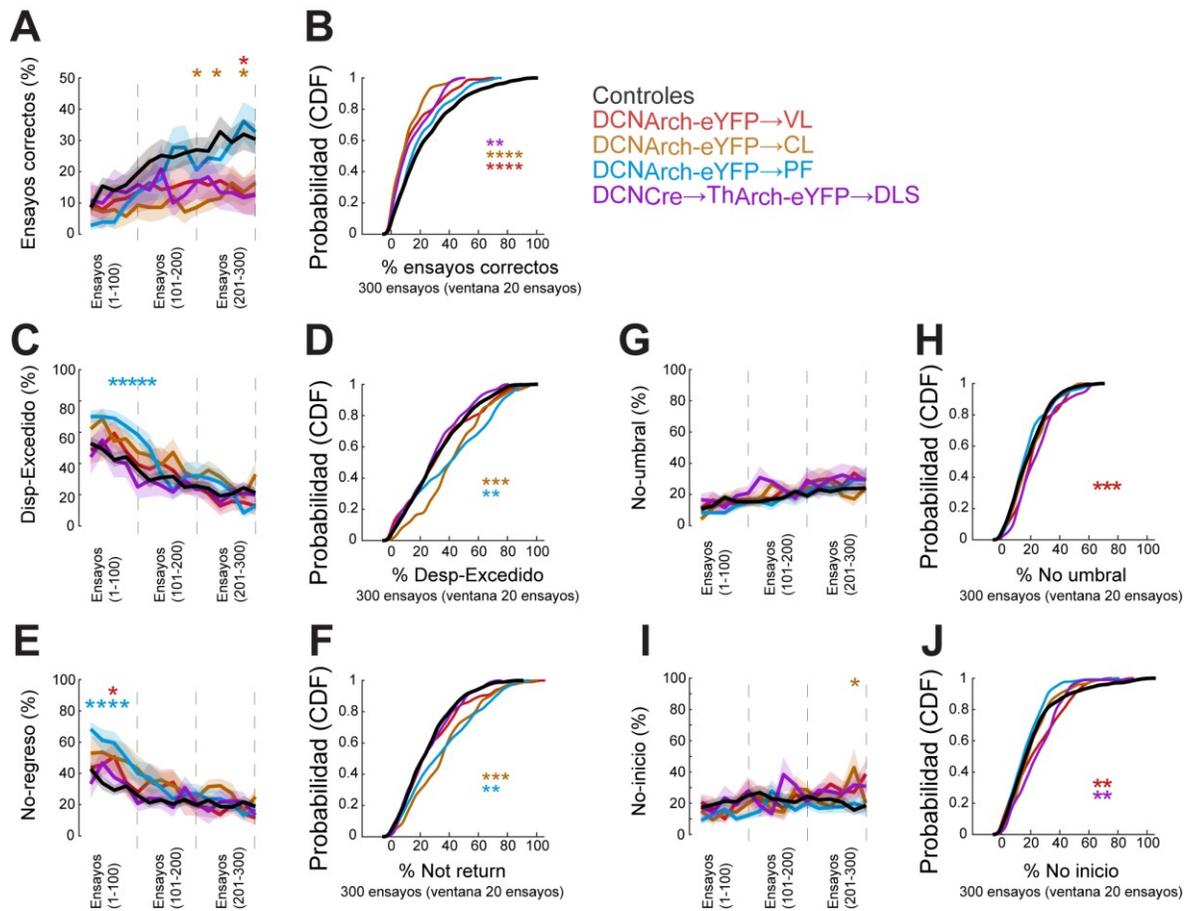
Para investigar si la inhibición provocaba afectaciones no motoras en la fase de actualización, diferente a la observada con el análisis durante la ejecución en línea (comparaciones  $\Delta$ On-Off), se agruparon todas las trayectorias con inhibición y sin inhibición (concatenando las trayectorias realizadas durante los primeros tres días de actualización, ~300 trayectorias, los ratones realizaron  $130 \pm 40$  trayectorias por día).

Al analizar los ensayos correctos en estos datos se observó un efecto de interacción ( $F_{(56,630)}=1.65$ ,  $p=0.002$ ; prueba ANOVA medidas repetidas), con una disminución en el porcentaje de trayectorias correctas a lo largo del entrenamiento en los grupos DCN→VL y DCN→CL en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ , prueba Bonferroni post hoc; asteriscos en **Figura 22A**). Estos mismos datos analizados con una función de distribución acumulada (CDF) mostraron que la probabilidad de obtener trayectorias correctas disminuyó en los grupos DCN→VL, DCN→CL, y también se reveló una menor probabilidad de ensayos correctos en el grupo DCN→Th→DLS ( $p<0.0001$ ;  $p<0.0001$ ;  $p<0.005$ , respectivamente; prueba Kolmogorov-Smirnov, **Figura 22B**, curvas desplazadas a la izquierda en relación con el grupo control).

El análisis en los errores desplazamiento-excedido (una medida que indica la prevalencia del desplazamiento unidireccional) y en los errores no-regreso (una medida que indica la adquisición de la nueva regla) reveló que el grupo DCN→PF presentó una mayor cantidad de estos errores en los primeros ensayos de la fase de actualización comparado con los controles ( $p=0.007$ ,  $p=0.008$ , respectivamente; ANOVA medidas repetidas Bonferroni, post hoc, **Figura 22C y 22E**).

Este grupo al igual que el grupo DCN→CL mostraron una mayor probabilidad de tener estos errores; ambas curvas (CDF) están desplazadas a la derecha comparado con la CDF del grupo control ( $p < 0.007$ ,  $p = 0.008$ , prueba Kolmogorov-Smirnov, **Figura 22D y 22F**, respectivamente).

Finalmente, se observó que la inhibición en los grupos DCN→Th→DLS y el DCN→VL provocaron una mayor probabilidad de que ocurrieran errores de no-inicio y no-umbral1 ( $p < 0.02$ , prueba Kolmogorov Smirnov, **Figura 22H-J**). En resumen, se observó que las proyecciones DCN→Th→DLS y las proyecciones DCN→Tálamo, principalmente la vía DCN→PF tiene contribuciones específicas durante la actualización de un desplazamiento unidireccional a secuencial.



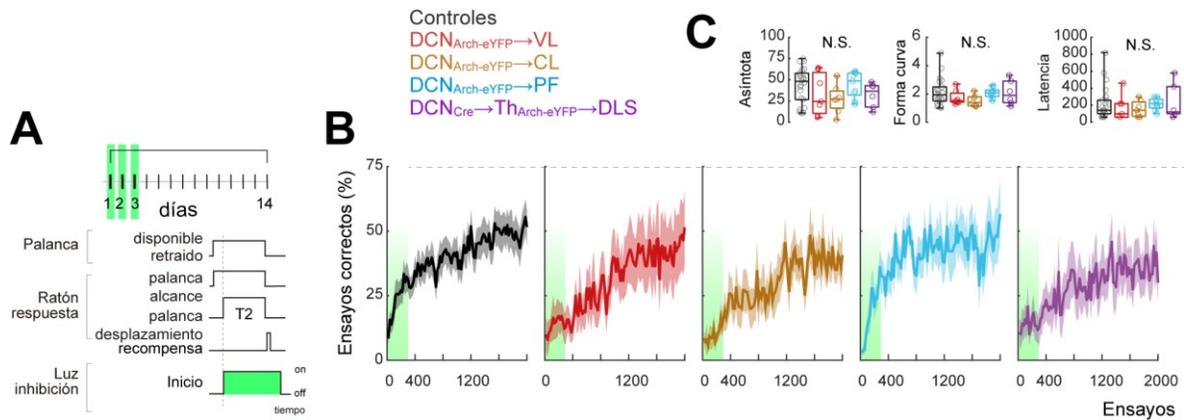
**Figura 22.** Efectos no motores de las proyecciones DCN→Th y DCN→Th→DLS en la actualización del desplazamiento unidireccional a en secuencia.

- A) Porcentaje de ensayos correctos dentro de los primeros 300 ensayos acumulados con y sin inhibición ordenados en bloques (de 20 ensayos) en la fase de actualización (primeros 3 días del cambio de desplazamiento unidireccional a en secuencia).
- B) Función de distribución acumulada (probabilidad) tomando los datos de ensayos correctos en A.
- C) Igual que A, para el error de desplazamiento excedido.
- D) Probabilidad error de desplazamiento excedido, tomando los datos de C.
- E) Igual que A, para el error no-regreso.
- F) Probabilidad error no-regreso, tomando los datos de E.
- G) Igual que A, para el error no-umbral.
- H) Probabilidad error no-umbral, tomando los datos de G.
- I) Igual que A, para el error no-inicio.
- J) Probabilidad error no-inicio, tomando los datos de I.

## La inhibición de las proyecciones DCN→Tálamo→DLS afecta el movimiento de alcance y la ejecución de desplazamientos en secuencia aun en el entrenamiento tardío

Los resultados previos mostraron que la vía DCN→Th→DLS participa en el control de la ejecución de los desplazamientos en secuencia en la fase de actualización (**Figura 20-21**), pero no durante la ejecución de un desplazamiento unidireccional en etapas tardías de entrenamiento (**Figura 17**). Con base en estos hallazgos, nos preguntamos si la vía DCN→Th→DLS era requerida aun durante la ejecución de desplazamientos en secuencia en etapas tardías del entrenamiento.

Para probar esta idea, después de los primeros tres días de inhibición optogenética (fase de actualización) se continuó entrenando a los mismos ratones durante 11 días (en estos días no hubo ningún protocolo de inhibición) hasta llegar a 14 días en la ejecución del desplazamiento en secuencia y se realizó una última sesión de inhibición optogenética (**Figura 23A**). Se revisó si las curvas de aprendizaje fueron diferentes ( $p > 0.05$ , ANOVA medidas repetidas, **Figura 23B**), y al comparar parámetros como asíntota, forma de crecimiento, o latencia de las curvas de aprendizaje no se observaron diferencias entre los grupos (**Figura 23C**). Sugiriendo que todos los grupos llegaron al entrenamiento tardío de manera similar.



**Figura 23. La inhibición en la fase de actualización no afectó el aprendizaje del desplazamiento en secuencia.**

**A)** Arriba izquierda: Línea temporal indicando en verde la manipulación en el entrenamiento temprano del desplazamiento en secuencia, y posterior entrenamiento sin inhibición hasta llegar al día 14. Abajo izquierda: Esquema indicando que la luz inhibitoria fue administrada al inicio del movimiento.

**B)** Porcentaje de ensayos correctos a lo largo de todo el entrenamiento, se tomaron hasta 2000 (aproximadamente cada ratón realizó  $130 \pm 30$  ensayos por día) ensayos para evaluar la curva de forma similar en todos los grupos. Las sombras verdes muestran los ensayos analizados para la figura 19 y 20.

**C)** Parámetros obtenidos de analizar las curvas de aprendizaje con el ajuste de función Weibull; asíntota de la curva, forma de crecimiento de la curva, y latencia para conseguir la mitad del valor de la asíntota.

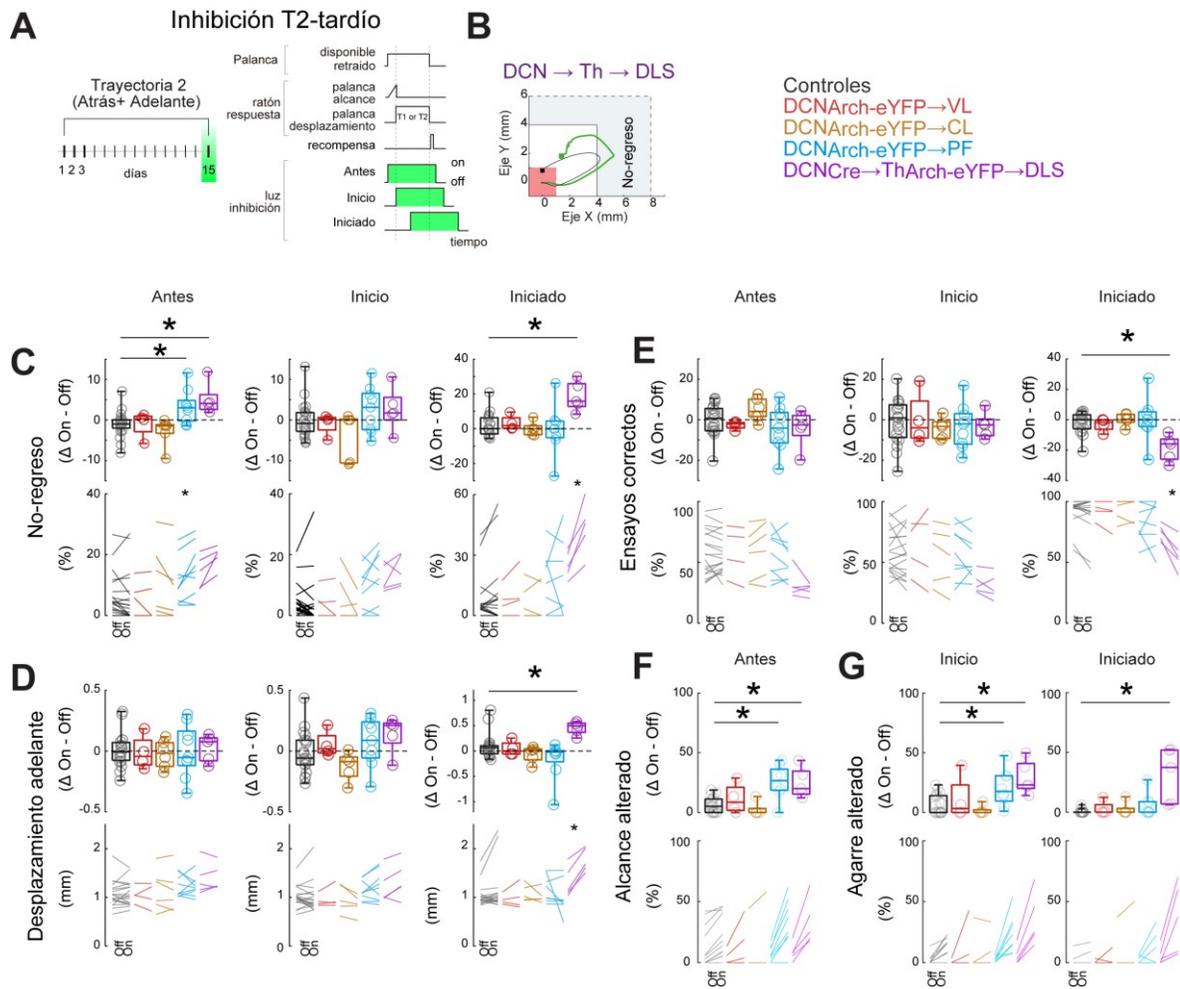
Posteriormente, todos los animales recibieron una sesión final de inhibición optogenética, durante esta sesión se dieron tres protocolos: inhibición antes de iniciar el movimiento; al inicio del movimiento; y cuando el movimiento ya había iniciado (**Figura 24A**).

La inhibición de la disinápsis  $DCN \rightarrow Th \rightarrow DLS$  antes de iniciar el movimiento o después de haberlo iniciado incrementó el error no-regreso ( $\Delta On-Off_{Antes} = 2.4 \pm 1\%$ ;  $\Delta On-Off_{Iniciado} = 15 \pm 1\%$ ;  $p=0.008$  y  $p=0.001$ , prueba Kruskal Wallis, **Figura 24C**, primera y tercera columna), y un tipo de error llamado sobretiro tipo 2 ( $\Delta On-Off_{Antes} = 14.9 \pm 5\%$ ;  $p=0.04$ , prueba Kruskal Wallis). Este último protocolo de inhibición provocó que el nuevo movimiento incorporado (regreso) terminara alejado de la zona de regreso (**Figura 24D**), lo que provocó una disminución en el número de ensayos correctos ( $\Delta On-Off = -18 \pm 3\%$ ;  $p=0.01$ , prueba Kruskal Wallis, **Figura 24E**, tercera columna).

El análisis de los videos de esta última inhibición mostró que la inhibición de las vías DCN→Th→DLS o DCN→PF administrada antes de iniciar el movimiento afectó el movimiento de alcance de la palanca ( $DCN→Th→DLS_{\Delta On-Off} = 24 \pm 5\%$ ,  $DCN→PF_{\Delta On-Off} = 25 \pm 4\%$ ; prueba Kruskal Wallis, **Figura 24F**), este movimiento no se alteró ni en la inhibición dada al inicio o cuando ya había iniciado el movimiento, sin embargo estos últimos protocolos sí afectaron la sujeción de la palanca ( $DCN→Th→DLS_{\Delta On-Off(inicio)} = 29 \pm 6\%$ ,  $DCN→PF_{\Delta On-Off(inicio)} = 20 \pm 5\%$ ,  $p < 0.004$  y  $p < 0.01$ ;  $DCN→Th→DLS_{\Delta On-Off(iniciado)} = 31 \pm 10\%$ ,  $p < 0.001$ , prueba Kruskal Wallis, **Figura 24G**).

Estos resultados muestran que las proyecciones disinápticas DCN→Th→DLS y la vía DCN→PF contribuyen al movimiento de alcance y la ejecución de desplazamientos en secuencia, aun la fase tardía de entrenamiento, con un efecto mayor observado en el movimiento de regreso durante la ejecución de los desplazamientos en secuencia. Nótese que la inhibición de estas vías no afectó la ejecución del desplazamiento unidireccional, pero sí son requeridas durante la ejecución de los desplazamientos en secuencia.

En resumen, los resultados de la inhibición optogenética provee tres hallazgos. 1) la conexión disináptica entre los DCN y el estriado (DCN→Th→DLS), y la proyección DCN→PF contribuyen a la apropiada ejecución del movimiento de alcance de la palanca. 2) La vía DCN→Th→DLS y DCN→VL contribuyen en el control motor en línea para permitir una apropiada actualización de desplazamientos unidireccionales a secuenciales. 3) La vía DCN→Th→DLS y DCN→PF son requeridas en la fase de actualización y siguen siendo requeridas cuando el desplazamiento en secuencia ya es estable.



**Figura 24.** La inhibición de la vía DCN→Th→DLS afecta el movimiento de alcance y el desplazamiento en secuencia en el entrenamiento tardío.

- A)** Izquierda: Línea temporal remarcando el día de la manipulación en la fase tardía del entrenamiento en secuencia. Derecha: Esquema indicando que la inhibición optogenética fue dada en tres condiciones: antes de iniciar el movimiento, al momento de tocar la palanca, y cuando el movimiento ya había iniciado.
- B)** Desplazamiento en secuencia representativo del efecto con (verde) y sin (negro) luz inhibitoria. El ensayo sin inhibición (negro) muestra una trayectoria correcta, mientras que el ensayo con inhibición optogenética (verde) muestra el error no-regreso observado al inhibir la vía disináptica DCN→Th→DLS.
- C)** De izquierda a derecha: efecto de la inhibición optogenética en la presencia del error no-regreso cuando la luz se presentó antes de iniciar, al inicio, y una vez iniciado el movimiento. Arriba: valores de la diferencia entre la condición con y sin luz ( $\Delta$ On-Off), \* $p < 0.05$ , prueba Kruskal Wallis, post hoc Dunnnett. Abajo: Gráficos pareados mostrando el promedio del efecto en la condición sin (Off) y con (On) luz; \* $p < 0.05$ , prueba Wilcoxon.
- D)** Igual que en C, para el desplazamiento hacia adelante.
- E)** Igual que en C, para el porcentaje de ensayos correctos.
- F)** Proporción de ensayos que presentaron alteraciones en el movimiento de alcance durante la inhibición.
- G)** Proporción de ensayos que presentaron alteraciones en el agarre de la palanca durante los periodos de inhibición.

## Registro de transitorios de GCaMP en células de la vía DCN→PF muestran modulación durante los desplazamientos unidireccionales y en secuencia

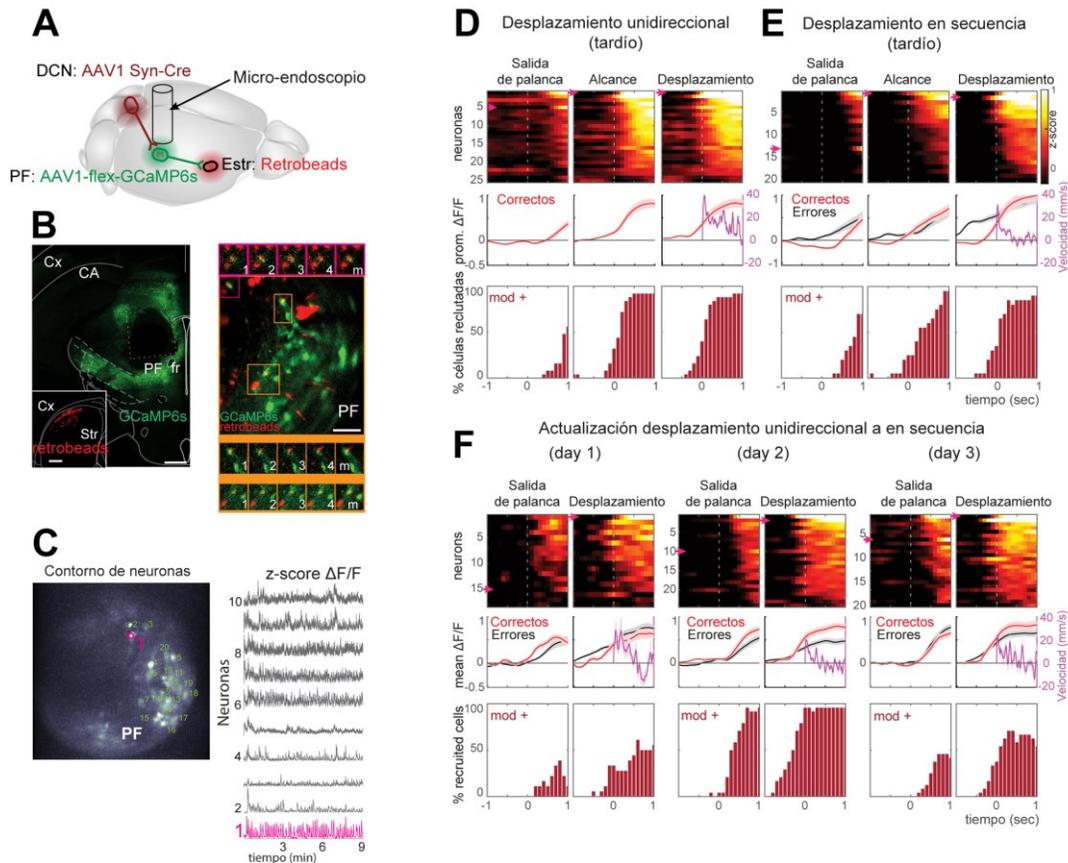
Para validar la modulación de las proyecciones DCN→Th→DLS durante la ejecución del desplazamiento unidireccional en comparación con el movimiento en secuencia, se realizó un par de experimentos adicionales. 1) Se monitoreo la actividad de neuronas DCN→PF (por medio de GCaMP) y 2) se monitoreo la actividad de los axones de la vía DCN→Th→DLS (también por GCaMP) mientras los animales ejecutaban los desplazamientos unidireccionales, y fase de actualización a desplazamientos en secuencia. Para conseguir esto, se usó la estrategia de marcaje transináptico, en este caso expresando GCaMP en las neuronas DCN→PF en el tálamo.

En un animal se monitoreo la vía DCN→PF. En breve, se expresó la proteína Cre en los DCN del cerebelo (similar a la figura 2) y en las células postsinápticas del tálamo, específicamente en el PF, se inyectó el vector viral AAV-GCaMP-DIO para expresar la proteína GCaMP en neuronas DCN→PF; un par de semanas después se implantó un microendoscopio en el núcleo PF (**Figura 25A-B**). Este ratón fue entrenado en la tarea conductual.

Se monitoreo los transitorios de GCaMP de las células DCN→PF durante la ejecución de desplazamientos unidireccionales, observando que hasta un 88% de las células registradas se activaron durante el movimiento de alcance y el desplazamiento unidireccional (promedio (%) de células reclutadas en una ventana de 0 a 400 ms comparado con la línea base de -1.5 a -1.0 segundos; salida palanca=0%; movimiento de alcance=64%; desplazamiento=71%, **Figura 25D**), y hasta un 85% de células durante el desplazamiento en secuencia de la palanca (salida palanca=2%; movimiento de alcance=40%; desplazamiento=71%; **Figura 25E**).

De resaltar, durante la fase de actualización del desplazamiento unidireccional a en secuencia se observó que en el segundo día hubo un incremento de células moduladas comparado con el primer y tercer día (**Figura 25F**, panel medial). Este resultado es compatible con el hallazgo de

que la inhibición optogenética afecto las trayectorias en una ventana entre las trayectorias 96-240 (Figura 20-21), sugiriendo que la comunicación DCN→PF es requerida en momentos específicos durante la fase de aprendizaje de habilidades motoras.



**Figura 25. Registro de la actividad neuronal por registros de GCaMP en células DCN→PF, durante la ejecución de desplazamientos unidireccionales o en secuencia.**

**A)** Esquema ilustrando el sitio de registro y la estrategia de marcaje transináptico para expresar la proteína GCaMP. Se muestra la inyección en los DCN de AAV1 Syn-Cre, y una segunda inyección en el núcleo parafascicular (PF) del vector GCaMP-DIO, también se aprecia una tercera inyección del trazador retrobeads en el estriado dorsal, finalmente la posición del micro-endoscopio a través del cual se registró la señal de calcio.

**B)** Izquierda: Fotomicrofotografía de una rebanada coronal de cerebro a nivel del PF mostrando la posición del micro-endoscopio, la marca verde muestra la expresión de GCaMP; el inserto muestra el sitio de inyección de retrobeads en el estriado dorsal. Derecha: Células registradas con la expresión de la proteína GCaMP (verde) y la señal de los retrobeads (rojo). Escala 50 micras.

**C)** Izquierda: fotograma del registro en vivo de la señal GCaMP a través del micro-endoscopio y el microscopio confocal. Los números indican las unidades detectadas en la sesión. Derecha: Señal transitoria de calcio mostrada en 10 células (el trazo en roza indica el registro de una célula en la que se observó la presencia de la señal GCaMP y retrobeads dentro de la misma célula).

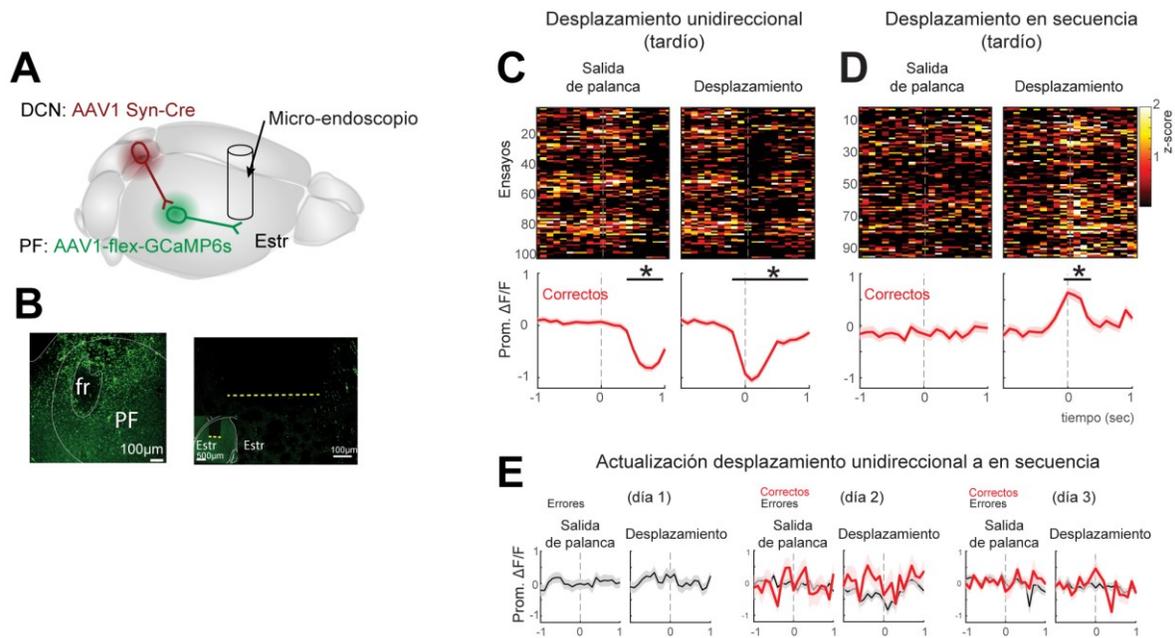
**D)** Fila superior: Promedio de los valores-z de la señal de GCaMP para cada neurona durante la sesión de aprendizaje tardío en el desplazamiento unidireccional. Cada columna corresponde al alineamiento de la señal en tres momentos: salida de la palanca, durante el movimiento de alcance de la palanca, y durante

el desplazamiento de la palanca. La fila de en medio muestra el promedio de la señal de fluorescencia. La fila inferior muestra el porcentaje de células moduladas durante cada momento de alineación.  
E) Igual que en C, para el desplazamiento en secuencia durante la fase tardía del entrenamiento.  
F) Igual que en C, para la fase de actualización (primeros 3 del entrenamiento en secuencia) del desplazamiento unidireccional a en secuencia.

## Registro de la señal global de GCaMP en axones de la vía DCN→Th→DLS muestra modulación durante la ejecución de desplazamientos unidireccionales y en secuencia

Similar al experimento anterior, en otro ratón se monitoreo la señal de GCaMP en los axones de la vía DCN→Th→DLS. En breve, se expresó la proteína Cre en las células de los DCN y sus postsinápsis del tálamo, posteriormente se inyectó el vector viral AAV-GCaMP-DIO en el núcleo PF del tálamo (**Figura 26A**), un par de semanas después se implantó un microesdocopio en el DLS para monitorear los cambios en la señal de calcio de los axones de la vía DCN→PF→DLS (**Figura 26A-B**).

Se observó que la señal global en los axones disminuyó durante el desplazamiento unidireccional ( $-0.84 \pm 0.03$  comparado con los valores-z de la línea base,  $p < 0.05$ , comparación pareada, prueba Wilcoxon, **Figura 26C**), y por el contrario durante el desplazamiento en secuencia en la fase tardía de entrenamiento hubo un incremento en la señal de calcio ( $0.39 \pm 0.05$  comparado con los valores-z de la línea base,  $p < 0.05$ , comparación pareada, prueba Wilcoxon, **Figura 26D**), sugiriendo que la vía DCN→Th→DLS se modula de manera diferencial dependiendo del programa motor que se realiza.



**Figura 26. Registro de transitorios de GCaMP, durante la ejecución de los desplazamientos unidireccionales o en secuencia, en los axones de la vía di-sináptica DCN→Th→DLS.**

**A)** Esquema ilustrando el sitio de registro y la estrategia de marcaje transináptico para expresar la proteína GCaMP. Se muestra la inyección en los DCN de AAV1 Syn-Cre, y una segunda inyección en el núcleo parafascicular (PF) del vector GCaMP-DIO, finalmente la posición del micro-endoscopio a través del cual se registró la señal de calcio en el núcleo estriado para registrar los axones de la vía DCN→PF→DLS.

**B)** Izquierda: Microfotografía mostrando la expresión de GCaMP en el núcleo parafascicular del tálamo (PF). Derecha: Microfotografía mostrando la punta del micro-endoscopio y la presencia de axones con la expresión de GCaMP (verde).

**C)** Fila superior: Registro poblacional de la señal de calcio en cada ensayo durante el desplazamiento unidireccional en el aprendizaje tardío, las columnas muestran el alineamiento al momento de salida de la palanca y durante la ejecución del desplazamiento. Fila inferior: Promedio de la diferencia en la señal de fluorescencia.

**D)** Igual que en C, para el registro durante la fase tardía del desplazamiento en secuencia.

**E)** Promedio de la diferencia de la señal de fluorescencia en el día 1,2, y 3 de la fase de actualización, cada columna muestra el alineamiento al momento de la salida de la palanca y durante el desplazamiento.

## Discusión

Los resultados presentados aquí muestran que los DCN interactúan con el DLS a través de múltiples núcleos en el tálamo, y que estas vías contribuyen a la apropiada ejecución de movimientos de alcance y desplazamientos en secuencia.

Los principales hallazgos reportados en este estudio son:

- 1) la porción dorsal del estriado es modulada con alta probabilidad por la activación de los DCN (alrededor de un 85%) (**Figura 7**).
- 2) Los principales relevos en la comunicación disináptica de los DCN al DLS son el núcleo controlateral, parafascicular y ventral lateral del tálamo (**Figura 10**).
- 3) Las proyecciones DCN→Th→DLS y DCN→PF contribuyen a la apropiada ejecución de movimientos de alcance, mientras que las proyecciones DCN→tálamo a través del núcleo controlateral y ventral lateral contribuyen a la ejecución de desplazamientos unidireccionales (**Figura 17**).
- 4) En la fase de actualización de desplazamientos unidireccionales a en secuencia, las vías DCN→Th→Th→DLS y DCN→VL contribuyen durante la ejecución del movimiento en línea (**Figura 20**), mientras que la vía DCN→PF tiene contribuciones no motoras (**Figura 22**).
- 5) La contribución de las proyecciones DCN→Th→DLS al movimiento de alcance y durante la ejecución de desplazamientos en secuencia permanece en etapas tardías de la ejecución de desplazamientos secuenciales (**Figura 24**).

La estrategia de marcaje transináptico para expresar *Cre* a través de vectores virales con serotipo AAV1 ha mostrado que la transinapsis ocurre a través de comunicación sináptica (PSC) con un 100% de eficacia, sin embargo, en la vía DCN→Th observamos que solo el 78% de las células marcadas en el tálamo (DCN→Th) tenían PSC provenientes de los DCN (**Figura 6B**). Una explicación es que las rebanadas de cerebro en la vía DCN→Th en las que evaluamos las PSC fueron más delgadas comparadas con la reportadas en Zingg y cols (200 vs. 350 micras respectivamente). En nuestro caso se usaron rebanadas de 200 micras para facilitar el registro

de células en animales >2 meses de edad, posiblemente esta estrategia cortó las conexiones sobre las dendritas distales en las células registradas.

La comunicación de los DCN al estriado a través del tálamo ha sido explorada previamente (Chen et al., 2014; Hoshi et al., 2005; Ichinohe et al., 2000; Xiao et al., 2018). No obstante, somos los primeros en mostrar la alta probabilidad de comunicación (>83%) de los DCN a la porción dorsal del estriado, tanto a la región sensorio-motora (DLS) como asociativa (DMS). Esta comunicación disináptica ocurre principalmente a través de los núcleos CL y PF, mostramos por primera vez que la región ventral lateral del tálamo también es un núcleo de relevo al DLS (20%), pero no al DMS (0%) (**Figura 8B**).

Estos datos apoyan un modelo en donde el cerebelo proporciona información a los ganglios basales durante la ejecución de tareas dirigidas a objetivos y sensoriomotoras, a través de núcleos intralaminares y motores del tálamo (Balleine et al., 2009; Redgrave et al., 2010; Xiao et al., 2018).

La posibilidad de un marcaje extra DCN→Th→DLS fue considerada. Las inyecciones fueron optimizadas para que el exceso de vector viral se desplazara hacia la parte dorsal del cerebelo (**Figura 14A**), que no proyecta mono-sinápticamente hacia el tálamo o el estriado (Pisano et al., 2021), también se probó si otros núcleos además del tálamo podrían contribuir a la comunicación con el DLS (inyección retro-ChR2 en el DLS y expresión de Cre en las postsinápsis de los DCN), al comparar la expresión focal de ChR2 en el tálamo y la expresión retrograda de ChR2 desde el núcleo estriado no se encontraron diferencias en la probabilidad de evocar corrientes sinápticas (**Figura 9C**), lo que indica fuertemente que los hallazgos presentados en este trabajo son a través de las proyecciones DCN→Th→DLS.

Este estudio también identificó funcionalmente, los relevos de los DCN al DLS en el tálamo. Se observó que el núcleo CL y PF tienen una mayor probabilidad de conexión en la vía disináptica (**Figura 10D y 10G**), pero una baja probabilidad de generar potenciales de acción (**Figura 10I**),

mientras que el VL tiene una menor probabilidad de conexión (**Figura 10G**), pero una mayor probabilidad de evocar potenciales de acción (**Figura 10I**), estos datos contrapuestos pueden estar indicando que la región ventral lateral aunque tiene menor conexión hacia el DLS (**Figura 8C**), tiene mayor labilidad de ser activada, probablemente porque se requiera que este activa continuamente durante demandas sensorio-motoras ya que no se observó conectividad en el DMS.

Los núcleos intralaminares tienen mayor probabilidad de conexión tanto en el DLS como en el DMS, probablemente la comunicación a través de esta vía requiera de mayor precisión temporal para su activación. En esta misma idea, la evidencia previa (Xiao et al., 2018) y en este trabajo de que la conexión DCN→Th→DLS inerva a células de proyección e interneuronas (**Figura 7G**) sugiere que la micro-circuitería del estriado es reclutada por el cerebelo, sin embargo, se requieren mayores esfuerzos e investigación para detallar la influencia del cerebelo en la micro-circuitería del estriado.

La actividad en los DCN es importantes durante la actualización y ejecución de movimientos aprendidos (Amrani et al., 1996; Becker & Person, 2019; Brooks et al., 2015; Dacre et al., 2021; Darmohray et al., 2019; Sathyamurthy et al., 2020; Wagner et al., 2019), y usando la estrategia de marcaje transináptico que permite evaluar la comunicación a larga distancia (di-sinapsis) evaluamos la contribución de la vía DCN→Th→DLS durante la ejecución de movimientos con cualidades diferentes (alcance, desplazamiento unidireccional, y en secuencia).

Se seleccionó una tarea motora que involucra movimientos de alcance y desplazamiento de una palanca que nos permitiera monitorear con alta resolución temporal los desplazamientos ejecutados con las extremidades anteriores. Además, examinamos la contribución de las diferentes proyecciones DCN→Th→estriado fueron evaluada a lo largo de diferentes estadios del aprendizaje, esto debido a que se ha reportado que la participación de los DCN puede variar dependiendo de la fase del aprendizaje (Bostan & Strick, 2018; Dhawale et al., 2021; Tzvi et al.,

2014; Wagner et al., 2019). Finalmente, a pesar de no requerir que el desplazamiento de la palanca fuera dirigido a un blanco específico, cada sujeto logró desarrollar su propia estrategia, presentando trayectorias con una gran similitud entre ellas.

Sorprendentemente, la inhibición de las proyecciones DCN→Th→DLS o DCN→PF afectó el movimiento de alcance de la palanca (con movimientos parecidos a los identificados en temblor cerebeloso en ratones). Sin embargo, esta misma inhibición no afectó el desplazamiento unidireccional de la palanca, probablemente el peso de la palanca durante el desplazamiento compense los movimientos anormales observados durante el desplazamiento de alcance; trabajos previos han reportado que al agregar peso durante la ejecución de desplazamientos puede mejorar la ejecución los mismos (Chase et al., 1965; Hower et al., 1972).

Una explicación para la alteración observada en la vía DCN→Th→DLS puede ser que los DCN coordinen patrones de actividad en las salidas del estriado para una correcta ejecución del movimiento de alcance aprendido, es sabido que el bloqueo de la actividad en el estriado cambia la actividad eléctrica en los músculos de los brazos y modifica la precisión de los movimientos (Kato & Kimura, 1992).

Las proyecciones DCN→Th→DLS contribuyen a una apropiada ejecución de los movimientos de alcance, y las proyecciones de los DCN al VL y CL contribuyen a la ejecución de desplazamientos unidireccionales de la palanca, pero solo ocurre cuando la inhibición ocurre antes de que los ratones inicien el desplazamiento (**Figura 17**), esto sugiere una participación temporal específica de las conexiones estudiadas.

Este hallazgo es compatible con el requerimiento de los DCN para mantener la actividad preparatoria observada en la corteza cerebral (DCN→VL→Corteza) para una correcta ejecución de movimientos (Gao et al., 2018), y permite pensar que el estriado puede presentar actividad preparatoria a través de la proyección DCN→VL→DLS (**Figura 10G-H** y **Figura 8B**) o DCN→PF→DLS (la inhibición de esta vía instala alteraciones en el movimiento de alcance)

relacionado a una correcta ejecución de movimientos de alcance y desplazamientos aprendidos, también apoya la importancia de los DCN al inicio de movimientos (Dacre et al., 2021; Díaz-Hernández et al., 2018).

Un hallazgo importante de este trabajo son los efectos específicos observados al inhibir las vías individuales DCN→Tálamo: la inhibición de la proyección DCN→VL (que principalmente inerva la corteza (Gao et al., 2018), pero deja conexiones colaterales funcionales dentro del estriado) o DCN→CL (que principalmente proyecta al estriado (Smith et al., 2014) tuvieron un impacto diferencial durante la ejecución de los desplazamientos unidireccionales [el primero generó disimetría del movimiento (**Figura 17C-D**), mientras que el último suavizó los movimientos (**Figura 17F-G**)]; mientras que la vía DCN→PF no alteró el desplazamiento unidireccional (**Figura 17C-G**), pero sí el movimiento de alcance.

Esta especificidad en la vía DCN→Th→Str o DCN→Th apoya la idea de que los DCN proveen información distinta hacia núcleos específicos del tálamo. Estos datos se respaldan en reportes que indican que los diferentes núcleos en los DCN inervan diferencialmente a la región intralaminar o ventral dentro del tálamo (Aumann et al., 1994; Fujita et al., 2020), y con el hecho de que la actividad de los DCN correlaciona con movimientos específicos de las extremidades durante la marcha (Sarnaik & Raman, 2018). Sin embargo, experimentos que registren la actividad de las vías individuales son necesarios para clarificar los detalles de estas contribuciones específicas al control de movimientos aprendidos (ver **Figura 25** y **Figura 26**).

De manera notable, aunque la inhibición de las proyecciones DCN→Th→DLS afectó el movimiento de alcance, este no afectó la ejecución de desplazamientos unidireccionales. Esto sugiere que esta vía no contribuye directamente al movimiento, pero sí participa en dirigir las extremidades hacia un objetivo (alcanzar la palanca), posiblemente los requerimientos de la vía son dependientes de las demandas motoras; posiblemente esta vía sea requerida en la

ejecución de desplazamientos en secuencia, como es el caso para vías Tálamo-DLS (Díaz-Hernández et al., 2018).

Para probar la contribución de la vía DCN→Th→DLS, los mismos sujetos que habían aprendido a realizar desplazamientos unidireccionales fueron entrenados para ejecutar un desplazamiento en secuencia. Sorprendentemente, cuando se inhibieron las proyecciones del DCN durante la fase de actualización (**Figura 20**), solo la manipulación sobre las vías DCN→Th→DLS o DCN→VL afectó la ejecución de los desplazamientos en línea (comparaciones  $\Delta$ On-Off; **Figura 20B-F**). A resaltar, estos efectos ocurrieron durante una ventana específica de ensayos (ensayos ~96-240, principalmente durante el segundo día de la fase de actualización), coincidentemente con una disminución en la correlación entre ensayos en ese día (**Figura 11K**). La contribución de los DCN durante una ventana específica de ensayos ya ha sido reportada previamente (Brooks et al., 2015; Darmohray et al., 2019; Sathyamurthy et al., 2020; Wagner et al., 2019).

El incremento en la velocidad máxima observado durante la fase de actualización (**Figure 20E**) parece contradictorio con disminuciones en la velocidad observados en estudios donde hay lesión o se bloquea la actividad de salida de las extremidades (Bastian et al., 1996; Holmes, 1939; Nashef et al., 2018), el incremento reportado en este trabajo va de la mano con descripciones de alteraciones en la ejecución de movimientos compuestos con desplazamientos en dirección reversa, en este tipo de movimientos sujetos con lesiones en el cerebelo presentan movimientos con poca rapidez y en su lugar una mayor velocidad (Holmes, 1939).

En la tarea implementada, el desplazamiento en secuencia demanda que los animales actualicen las habilidades previamente adquiridas. Esto requiere el desenganche de la regla previa (actualización). Probablemente, el incremento en errores de desplazamiento-excesivo y no inicio en los grupos DCN→PF y DCN→CL (**Figura 22C-F**), principalmente del segundo, refleja la importancia del tálamo intralaminar para permitir el desenganche de la regla aprendida, reforzando un papel cognitivo (no motor) de la vía cerebelo→PF→estriado.

Estos resultados sugieren que durante la fase de actualización las proyecciones de los DCN contribuyen en la selección de movimientos adaptativos a través de la vía DCN→VL y DCN→Th→DLS, mientras que las vías DCN→PF y DCN→CL contribuyen con procesos de flexibilidad cognitiva, como previamente se ha sugerido (Xiao et al., 2018).

Por último, la última inhibición mostró que la proyección DCN→Th→DLS continua siendo requerida en la ejecución de desplazamientos en secuencia evaluada en la fase tardía del aprendizaje (**Figura 24**), e interesantemente con mayor importancia en la segunda parte del desplazamiento en secuencia (revelado por el incremento en los errores de no-regreso (**Figura 24C**) y por efectos más intensos observados cuando la inhibición fue dada después de haber iniciado el desplazamiento en secuencia).

Estos hallazgos apoyan la idea de que el DLS recibe información continua a través de las vías DCN→Tálamo durante el aprendizaje de desplazamientos complejos (Dhawale et al., 2021; Wolff et al., 2022) y que los DCN pueden estar proporcionando información cinemática para la apropiada ejecución de desplazamientos complejos de las extremidades. También son compatibles con la idea de que el estriado y el cerebelo son requeridos para movimientos de alcance aprendidos y para la ejecución de desplazamientos en secuencia (Amrani et al., 1996; Berger et al., 2020; Díaz-Hernández et al., 2018; Geddes et al., 2018; Hikosaka et al., 1998; Lopez-Huerta et al., 2021; Rothwell et al., 2015; Seidler et al., 2006; Sánchez-Fuentes et al., 2021), y sugiere que el estriado, a través del tálamo (que recibe información de los DCN y otras fuentes) contribuye al inicio y la ejecución de movimientos aprendidos (Dhawale et al., 2021; Díaz-Hernández et al., 2018).

## Conclusiones

Las conclusiones del presente estudio son que los DCN modulan al estriado con alta probabilidad a través de múltiples núcleos, principalmente el núcleo central lateral, parafascicular y ventral lateral (este último con menor probabilidad), y que cada una de estas vías contribuye diferentemente durante la ejecución de desplazamientos de las extremidades. La vía DCN→parafascicular contribuye al control del movimiento de alcance, mientras que las vías DCN→ventral lateral y DCN→central lateral contribuyen al control de parámetros cinemáticos en línea durante la ejecución de desplazamientos unidireccionales. Todas estas vías convergen información al estriado, a través de las proyecciones di-sinápticas DCN→Th→DLS para la correcta ejecución, y proveen información para la correcta ejecución de movimientos de alcance y para la ejecución de desplazamientos complejos en secuencia.

## Limitaciones del estudio

Aunque se marcaron las proyecciones DCN→Th→Estriado y se realizaron registros de estos axones mostrando modulaciones específicas durante la ejecución de desplazamientos unidireccionales o desplazamientos en secuencia, otras fuentes de activación que pueden modular estas células tiene que ser consideradas [en ejemplo, pedúnculo-pontino→Tálamo→Estriado (Inagaki et al., 2022), o corteza→Th→Estriado (Mandelbaum et al., 2019)].

Para determinar con precisión la fuerza con la que los DCN dirigen a las proyecciones DCN→Th→DLS, se requeriría registrar a los DCN y otras posibles fuentes de entradas al tálamo que llegan sobre células Tálamo→Estriatales.

Otro punto para considerar al interpretar los resultados presentados en este trabajo es la posibilidad que las inhibiciones, particularmente las administradas dentro del tálamo pueden afectar a las proyecciones Th→Estriado, pero también a las proyecciones Th→Corteza, como ha sido mostrada durante el registro de actividad preparatoria en la vía DCN→Th→Corteza (Gao et

al., 2018; Inagaki et al., 2022), sin embargo, es crucial notar que la inhibición dentro del estriado para la vía DCN→Th→DLS ocurre sobre axones locales ya que se ha mostrado que la inhibición optogénica con la proteína Arch no afecta axones en colaterales axónicas (Díaz-Hernández et al., 2018; El-Gaby et al., 2016).

## Bibliografía

- Allen, G. I., & Tsukahara, N. (1974). Cerebrocerebellar communication systems. *Physiol Rev*, 54(4), 957-1006. <https://doi.org/10.1152/physrev.1974.54.4.957>
- Amrani, K., Dykes, R. W., & Lamarre, Y. (1996). Bilateral contributions to motor recovery in the monkey following lesions of the deep cerebellar nuclei. *Brain Res*, 740(1-2), 275-284. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00899-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00899-2)
- Aumann, T. D., & Horne, M. K. (1996). Ramification and termination of single axons in the cerebellothalamic pathway of the rat. *J Comp Neurol*, 376(3), 420-430. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961216\)376:3<420::AID-CNE5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961216)376:3<420::AID-CNE5>3.0.CO;2-4)
- Aumann, T. D., Rawson, J. A., Finkelstein, D. I., & Horne, M. K. (1994). Projections from the lateral and interposed cerebellar nuclei to the thalamus of the rat: a light and electron microscopic study using single and double anterograde labelling. *J Comp Neurol*, 349(2), 165-181. <https://doi.org/10.1002/cne.903490202>
- Balleine, B. W., Liljeholm, M., & Ostlund, S. B. (2009). The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav Brain Res*, 199(1), 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.034>
- Bastian, A. J., Martin, T. A., Keating, J. G., & Thach, W. T. (1996). Cerebellar ataxia: abnormal control of interaction torques across multiple joints. *J Neurophysiol*, 76(1), 492-509. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.1.492>
- Becker, M. I., & Person, A. L. (2019). Cerebellar Control of Reach Kinematics for Endpoint Precision. *Neuron*, 103(2), 335-348.e335. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.007>
- Benjamini, Y., & Yekutieli, D. (2001). The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency. *The Annals of Statistics*, 29(4), 1165-1188.
- Berger, D. J., Masciullo, M., Molinari, M., Lacquaniti, F., & d'Avella, A. (2020). Does the cerebellum shape the spatiotemporal organization of muscle patterns? Insights from subjects with cerebellar ataxias. *J Neurophysiol*, 123(5), 1691-1710. <https://doi.org/10.1152/jn.00657.2018>
- Bosch-Bouju, C., Hyland, B. I., & Parr-Brownlie, L. C. (2013). Motor thalamus integration of cortical, cerebellar and basal ganglia information: implications for normal and parkinsonian conditions. *Front Comput Neurosci*, 7, 163. <https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00163>
- Bostan, A. C., Dum, R. P., & Strick, P. L. (2013). Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends Cogn Sci*, 17(5), 241-254. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.03.003>
- Bostan, A. C., & Strick, P. L. (2018). The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network. *Nat Rev Neurosci*, 19(6), 338-350. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0002-7>
- Brooks, J. X., Carriot, J., & Cullen, K. E. (2015). Learning to expect the unexpected: rapid updating in primate cerebellum during voluntary self-motion. *Nat Neurosci*, 18(9), 1310-1317. <https://doi.org/10.1038/nn.4077>
- Chabrol, F. P., Blot, A., & Mrcic-Flogel, T. D. (2019). Cerebellar Contribution to Preparatory Activity in Motor Neocortex. *Neuron*, 103(3), 506-519.e504. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.022>
- Chase, R. A., Cullen, J. K., Sullivan, S. A., & Ommaya, A. K. (1965). Modification of intention tremor in man. *Nature*, 206(983), 485-487. <https://doi.org/10.1038/206485a0>
- Chen, C. H., Fremont, R., Arteaga-Bracho, E. E., & Khodakhah, K. (2014). Short latency cerebellar modulation of the basal ganglia. *Nat Neurosci*, 17(12), 1767-1775. <https://doi.org/10.1038/nn.3868>
- Chen, P., & Popovich, P. (2002). *Correlation. Parametric and non parametric measures*. Sage university paper series on quantitative applications in the social sciences.

- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., . . . Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, *499*(7458), 295-300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A. S., Qian, X., Chuong, A. S., Li, M., . . . Boyden, E. S. (2010). High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*, *463*(7277), 98-102. <https://doi.org/10.1038/nature08652>
- Dacre, J., Colligan, M., Clarke, T., Ammer, J. J., Schiemann, J., Chamosa-Pino, V., . . . Duguid, I. (2021). A cerebellar-thalamocortical pathway drives behavioral context-dependent movement initiation. *Neuron*, *109*(14), 2326-2338.e2328. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.05.016>
- Darmohray, D. M., Jacobs, J. R., Marques, H. G., & Carey, M. R. (2019). Spatial and Temporal Locomotor Learning in Mouse Cerebellum. *Neuron*, *102*(1), 217-231.e214. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.038>
- Dhawale, A. K., Wolff, S. B. E., Ko, R., & Ölveczky, B. P. (2021). The basal ganglia control the detailed kinematics of learned motor skills. *Nat Neurosci*, *24*(9), 1256-1269. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00889-3>
- Doya, K. (2000). Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control. *Curr Opin Neurobiol*, *10*(6), 732-739. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00153-7](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00153-7)
- Díaz-Hernández, E., Contreras-López, R., Sánchez-Fuentes, A., Rodríguez-Sibrían, L., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2018). The Thalamostriatal Projections Contribute to the Initiation and Execution of a Sequence of Movements. *Neuron*, *100*(3), 739-752.e735. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.052>
- El-Gaby, M., Zhang, Y., Wolf, K., Schwiening, C. J., Paulsen, O., & Shipton, O. A. (2016). Archaelhodopsin Selectively and Reversibly Silences Synaptic Transmission through Altered pH. *Cell Rep*, *16*(8), 2259-2268. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.057>
- Foster, N. N., Barry, J., Korobkova, L., Garcia, L., Gao, L., Becerra, M., . . . Dong, H. W. (2021). The mouse cortico-basal ganglia-thalamic network. *Nature*, *598*(7879), 188-194. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03993-3>
- Fujita, H., Kodama, T., & du Lac, S. (2020). Modular output circuits of the fastigial nucleus for diverse motor and nonmotor functions of the cerebellar vermis. *Elife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.58613>
- Gallistel, C. R., Fairhurst, S., & Balsam, P. (2004). The learning curve: implications of a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(36), 13124-13131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404965101>
- Gao, Z., Davis, C., Thomas, A. M., Economo, M. N., Abrego, A. M., Svoboda, K., . . . Li, N. (2018). A cortico-cerebellar loop for motor planning. *Nature*, *563*(7729), 113-116. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0633-x>
- Geddes, C. E., Li, H., & Jin, X. (2018). Optogenetic Editing Reveals the Hierarchical Organization of Learned Action Sequences. *Cell*, *174*(1), 32-43.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.012>
- Gornati, S. V., Schäfer, C. B., Eelkman Rooda, O. H. J., Nigg, A. L., De Zeeuw, C. I., & Hoebeek, F. E. (2018). Differentiating Cerebellar Impact on Thalamic Nuclei. *Cell Rep*, *23*(9), 2690-2704. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.098>
- Grider, M. H., Chen, Q., & Shine, H. D. (2006). Semi-automated quantification of axonal densities in labeled CNS tissue. *J Neurosci Methods*, *155*(2), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.12.021>
- Harris, J. A. (2011). The acquisition of conditioned responding. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, *37*(2), 151-164. <https://doi.org/10.1037/a0021883>

- Hewer, R. L., Cooper, R., & Morgan, M. H. (1972). An investigation into the value of treating intention tremor by weighting the affected limb. *Brain*, 95(3), 579-590. <https://doi.org/10.1093/brain/95.3.579>
- Hikosaka, O., Miyashita, K., Miyachi, S., Sakai, K., & Lu, X. (1998). Differential roles of the frontal cortex, basal ganglia, and cerebellum in visuomotor sequence learning. *Neurobiol Learn Mem*, 70(1-2), 137-149. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3844>
- Holmes, G. (1939). The cerebellum of man. In (Vol. 62): *Brain*.
- Hoshi, E., Tremblay, L., Féger, J., Carras, P. L., & Strick, P. L. (2005). The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat Neurosci*, 8(11), 1491-1493. <https://doi.org/10.1038/nn1544>
- Hunnicutt, B. J., Jongbloets, B. C., Birdsong, W. T., Gertz, K. J., Zhong, H., & Mao, T. (2016). A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *Elife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19103>
- Ichinohe, N., Mori, F., & Shoumura, K. (2000). A di-synaptic projection from the lateral cerebellar nucleus to the laterodorsal part of the striatum via the central lateral nucleus of the thalamus in the rat. *Brain Res*, 880(1-2), 191-197. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02744-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02744-x)
- Inagaki, H. K., Chen, S., Ridder, M. C., Sah, P., Li, N., Yang, Z., . . . Svoboda, K. (2022). A midbrain-thalamus-cortex circuit reorganizes cortical dynamics to initiate movement. *Cell*, 185(6), 1065-1081.e1023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.006>
- Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H., & Siegelbaum, S. A. (2021). *Principles of Neural Science*. McGrawHill.
- Kato, M., & Kimura, M. (1992). Effects of reversible blockade of basal ganglia on a voluntary arm movement. *J Neurophysiol*, 68(5), 1516-1534. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.5.1516>
- King, M., Hernandez-Castillo, C. R., Poldrack, R. A., Ivry, R. B., & Diedrichsen, J. (2019). Functional boundaries in the human cerebellum revealed by a multi-domain task battery. *Nat Neurosci*, 22(8), 1371-1378. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0436-x>
- Kuramoto, E., Furuta, T., Nakamura, K. C., Unzai, T., Hioki, H., & Kaneko, T. (2009). Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron-tracing study using viral vectors. *Cereb Cortex*, 19(9), 2065-2077. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn231>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(12), a009621. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Lopez-Huerta, V. G., Denton, J. A., Nakano, Y., Jaidar, O., Garcia-Munoz, M., & Arbutnott, G. W. (2021). Striatal bilateral control of skilled forelimb movement. *Cell Rep*, 34(3), 108651. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108651>
- Lu, J., Li, C., Singh-Alvarado, J., Zhou, Z. C., Fröhlich, F., Mooney, R., & Wang, F. (2018). MIN1PIPE: A Miniscope 1-Photon-Based Calcium Imaging Signal Extraction Pipeline. *Cell Rep*, 23(12), 3673-3684. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.062>
- Lu, X., Hikosaka, O., & Miyachi, S. (1998). Role of monkey cerebellar nuclei in skill for sequential movement. *J Neurophysiol*, 79(5), 2245-2254. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.5.2245>
- Mandelbaum, G., Taranda, J., Haynes, T. M., Hochbaum, D. R., Huang, K. W., Hyun, M., . . . Sabatini, B. L. (2019). Distinct Cortical-Thalamic-Striatal Circuits through the Parafascicular Nucleus. *Neuron*, 102(3), 636-652.e637. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.035>
- Manni, E., & Dow, R. S. (1963). SOME OBSERVATIONS ON THE EFFECTS OF CEREBELLECTOMY IN THE RAT. *J Comp Neurol*, 121, 189-194. <https://doi.org/10.1002/cne.901210204>
- Middleton, F. A., & Strick, P. L. (2001). Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. *J Neurosci*, 21(2), 700-712. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-02-00700.2001>

- Miyachi, S., Hikosaka, O., Miyashita, K., Kárádi, Z., & Rand, M. K. (1997). Differential roles of monkey striatum in learning of sequential hand movement. *Exp Brain Res*, 115(1), 1-5. <https://doi.org/10.1007/pl00005669>
- Molinari, M., Petrosini, L., & Gremoli, T. (1990). Hemicerebellectomy and motor behaviour in rats. II. Effects of cerebellar lesion performed at different developmental stages. *Exp Brain Res*, 82(3), 483-492. <https://doi.org/10.1007/BF00228790>
- Nashef, A., Cohen, O., Israel, Z., Harel, R., & Prut, Y. (2018). Cerebellar Shaping of Motor Cortical Firing Is Correlated with Timing of Motor Actions. *Cell Rep*, 23(5), 1275-1285. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.035>
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Benitez-Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C., & Rodriguez, M. (2008). Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23 Suppl 3, S548-559. <https://doi.org/10.1002/mds.22062>
- Pan, M. K., Li, Y. S., Wong, S. B., Ni, C. L., Wang, Y. M., Liu, W. C., . . . Kuo, S. H. (2020). Cerebellar oscillations driven by synaptic pruning deficits of cerebellar climbing fibers contribute to tremor pathophysiology. *Sci Transl Med*, 12(526). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1769>
- Paz, C., Reygadas, E., & Fernández-Guardiola, A. (1982). Sleep alterations following total cerebellectomy in cats. *Sleep*, 5(3), 218-226. <https://doi.org/10.1093/sleep/5.3.218>
- Pisano, T. J., Dhanerawala, Z. M., Kislin, M., Bakshinskaya, D., Engel, E. A., Hansen, E. J., . . . Wang, S. S. (2021). Homologous organization of cerebellar pathways to sensory, motor, and associative forebrain. *Cell Rep*, 36(12), 109721. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109721>
- Popa, D., Spolidoro, M., Proville, R. D., Guyon, N., Belliveau, L., & Léna, C. (2013). Functional role of the cerebellum in gamma-band synchronization of the sensory and motor cortices. *J Neurosci*, 33(15), 6552-6556. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5521-12.2013>
- Proville, R. D., Spolidoro, M., Guyon, N., Dugué, G. P., Selimi, F., Isope, P., . . . Léna, C. (2014). Cerebellum involvement in cortical sensorimotor circuits for the control of voluntary movements. *Nat Neurosci*, 17(9), 1233-1239. <https://doi.org/10.1038/nn.3773>
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., . . . Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 11(11), 760-772. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>
- Rikhye, R. V., Wimmer, R. D., & Halassa, M. M. (2018). Toward an Integrative Theory of Thalamic Function. *Annu Rev Neurosci*, 41, 163-183. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-062144>
- Rothwell, P. E., Hayton, S. J., Sun, G. L., Fuccillo, M. V., Lim, B. K., & Malenka, R. C. (2015). Input- and Output-Specific Regulation of Serial Order Performance by Corticostriatal Circuits. *Neuron*, 88(2), 345-356. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.035>
- Sakata, H., Ishijima, T., & Toyoda, Y. (1966). Single unit studies on ventrolateral nucleus of the thalamus in cat: its relation to the cerebellum, motor cortex and basal ganglia. *Jpn J Physiol*, 16(1), 42-60. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.16.42>
- Sakayori, N., Kato, S., Sugawara, M., Setogawa, S., Fukushima, H., Ishikawa, R., . . . Kobayashi, K. (2019). Motor skills mediated through cerebellothalamic tracts projecting to the central lateral nucleus. *Mol Brain*, 12(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0431-x>
- Sarnaik, R., & Raman, I. M. (2018). Control of voluntary and optogenetically perturbed locomotion by spike rate and timing of neurons of the mouse cerebellar nuclei. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.29546>

- Sathyamurthy, A., Barik, A., Dobrott, C. I., Matson, K. J. E., Stoica, S., Pursley, R., . . . Levine, A. J. (2020). Cerebellospinal Neurons Regulate Motor Performance and Motor Learning. *Cell Rep*, 31(6), 107595. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107595>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Seidler, R. D., Noll, D. C., & Chintalapati, P. (2006). Bilateral basal ganglia activation associated with sensorimotor adaptation. *Exp Brain Res*, 175(3), 544-555. <https://doi.org/10.1007/s00221-006-0571-y>
- Smith, Y., Galvan, A., Ellender, T. J., Doig, N., Villalba, R. M., Huerta-Ocampo, I., . . . Bolam, J. P. (2014). The thalamostriatal system in normal and diseased states. *Front Syst Neurosci*, 8, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00005>
- Sánchez-Fuentes, A., Ramírez-Armenta, K. I., Verma-Rodríguez, A. K., Díaz-Hernández, E., Aguilar-Palomares, A., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2021). The Contribution of Premotor Cortico-Striatal Projections to the Execution of Serial Order Sequences. *eNeuro*, 8(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0173-21.2021>
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S. Q., & Costa, R. M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell*, 166(3), 703-715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.032>
- Tzvi, E., Münte, T. F., & Krämer, U. M. (2014). Delineating the cortico-striatal-cerebellar network in implicit motor sequence learning. *Neuroimage*, 94, 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.004>
- Wagner, M. J., Kim, T. H., Kadmon, J., Nguyen, N. D., Ganguli, S., Schnitzer, M. J., & Luo, L. (2019). Shared Cortex-Cerebellum Dynamics in the Execution and Learning of a Motor Task. *Cell*, 177(3), 669-682.e624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.019>
- Wolff, S. B. E., Ko, R., & Ölveczky, B. P. (2022). Distinct roles for motor cortical and thalamic inputs to striatum during motor skill learning and execution. *Sci Adv*, 8(8), eabk0231. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk0231>
- Xiao, L., Bornmann, C., Hatstatt-Burklé, L., & Scheiffele, P. (2018). Regulation of striatal cells and goal-directed behavior by cerebellar outputs. *Nat Commun*, 9(1), 3133. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05565-y>
- Yin, H. H. (2010). The sensorimotor striatum is necessary for serial order learning. *J Neurosci*, 30(44), 14719-14723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3989-10.2010>
- Zingg, B., Chou, X. L., Zhang, Z. G., Mesik, L., Liang, F., Tao, H. W., & Zhang, L. I. (2017). AAV-Mediated Anterograde Transsynaptic Tagging: Mapping Corticocollicular Input-Defined Neural Pathways for Defense Behaviors. *Neuron*, 93(1), 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.045>
- Zingg, B., Peng, B., Huang, J., Tao, H. W., & Zhang, L. I. (2020). Synaptic Specificity and Application of Anterograde Transsynaptic AAV for Probing Neural Circuitry. *J Neurosci*, 40(16), 3250-3267. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2158-19.2020>

## Artículos publicados durante doctorado

- ❖ Pérez-López JL, **Contreras-López R**, Ramírez-Jarquín JO, Tecuapetla F. Direct Glutamatergic Signaling From Midbrain Dopaminergic Neurons Onto Pyramidal Prefrontal Cortex Neurons. *Front Neural Circuits*. 2018 Aug 29;12:70. doi: 10.3389/fncir.2018.00070. PMID: 30210308; PMCID: PMC6123373.
- ❖ Díaz-Hernández E, **Contreras-López R**, Sánchez-Fuentes A, Rodríguez-Sibrían L, Ramírez-Jarquín JO, Tecuapetla F. The Thalamostriatal Projections Contribute to the Initiation and Execution of a Sequence of Movements. *Neuron*. 2018 Nov 7;100(3):739-752.e5 doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.052. Epub 2018 Oct 18. PMID: 30344045.
- ❖ **Contreras-López R**, Alatríste-León H, Díaz-Hernández E, Ramírez-Jarquín JO, Tecuapetla F. The Deep cerebellar nuclei to striatum disynaptic connection contributes to skilled forelimb movement. *Cell Rep*. 2023. Accepted.