



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Caracterización de los circuitos paralelos o divergentes de salida
del tálamo**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

Biól. Luis Antonio Rodríguez Sibrian

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. María del Carmen Vivar Estudillo
CINVESTAV

Dr. Francisco Sotres Bayón
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México, noviembre 2019



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.

Agradecimientos académicos

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una educación de excelencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero que me apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación. Beca CVU: 855905.

A la división de neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, en particular al laboratorio de sub-circuitos neuronales. A mis compañeros del laboratorio por su colaboración y consejos, cada uno me aportó algo que se volvió parte de mi desarrollo personal y que sin duda siempre vivirá en mi memoria.

A mi tutor, Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar gracias por su apoyo como mentor, incentivar mi desarrollo personal, fomentar siempre la mejora técnica e intelectual durante el aprendizaje y el desarrollo que conllevó mi proceso de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. María del Carmen Vivar Estudillo y el Dr. Francisco Sotres Bayón, por su guía, observaciones y consejos que me permitieron el desarrollo y mejoramiento de mi proyecto de investigación. Me apoyaron mucho en mi crecimiento profesional.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por su asesoramiento y disposición en el manejo de roedores del bioterio, así como su apoyo técnico con el material y equipo de laboratorio.

A la Dra. Elvira Galarraga Palacio y los miembros de su laboratorio, por facilitarme y asesorarme en el uso de equipo de vibratomo para desarrollar mis experimentos de electrofisiología.

A la M. en IBB Gabriela Xóchitl Ayala Méndez, a la Biól. Ariadna Aparicio Juárez, a la Dra. Claudia Rivera Cerecedo y al Dr. Héctor Malagón Rivero por su apoyo, profesionalismo y asesoramiento en el manejo de ratones transgénicos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia por hacer posible la obtención de fotomicrografías.

A mis sinodales el Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza, Dr. Gerardo Rojas Piloni, Dra. Violeta Gisselle López Huerta, Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza y Dra. Diana Escalante Alcalde por sus observaciones en la culminación de éste trabajo.

Dedicatorias

Este trabajo está dedicado principalmente a las personas que siempre me han demostrado su amor y su apoyo, primero que nada, a mis padres José Luis Rodríguez García y Maura Brillit Sibrian Zelada, gracias por amarme tal cual soy, cuidarme y darme todas las herramientas que han permitido llegar a este punto de mi vida, toda la satisfacción y todo el esfuerzo no son nada si no tuviera su presencia en cada momento de mi camino. Papá gracias por siempre guiarme por camino próspero, gracias por abrir tu mente y gracias por enseñarme que siempre debo ser yo mismo y estar orgulloso de quien soy y de lo que he logrado. Mamá gracias por tu inmenso amor, por cuidarme, por tu vida y por tu travesía, eres el rostro que siempre recuerdo en los momentos difíciles. A mi hermana Naira Yeletza Rodríguez Sibrian gracias por aconsejarme, por compartirme tus historias que me han brindado mucha fortaleza en esta última parte de este camino. Gracias a ustedes porque siempre han sido y serán mis pilares más fuertes, los amo.

En segundo lugar quiero agradecer a las personas que estuvieron en mi camino durante este recorrido, que me ayudaron y me dieron fuerza, risas, amor, apoyo, quienes me escucharon y aconsejaron, sin duda alguna soy la suma de lo que muchas personas me han aportado y ustedes han estado ahí, quiero agradecer en especial a Itzel, gracias por caminar conmigo en mis peores momentos, gracias por regañarme cuando lo necesitaba y por apacharme también, me encanta molestarte pero recuerda siempre que eres un cuásar. A Alexis porque más que ser mi primo has sido mi amigo o incluso mi mejor amigo, hemos vivido todas nuestras etapas juntos y estoy muy orgulloso de caminar a lado de alguien tan grande como tú. A mis amigos Laura, Ceci, Alex, Nelly, Estuardo, Mike, Beatriz, Susi, Karen, Caro, Montse, por formar parte de este proceso por compartirme parte de sus vidas.

Dedico este capítulo de mi vida a todas las personas que forman parte de mi conjunto infinito, gracias por llegar, gracias por estar, gracias por el amor, gracias a los que permanecen y también gracias a los que se fueron.

“Pero soy de los que creen que en las cosas pequeñas está todo. El niño es pequeño y contiene al hombre; el cerebro es estrecho y alberga al pensamiento; el ojo es sólo un punto, y abarca leguas...”

Alejandro Dumas

CONTENIDO

ABREVIACIONES	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	10
Clasificación de los diferentes núcleos del tálamo.....	10
Tipos neuronales del tálamo.....	12
Proyecciones tálamo→ corticales.....	13
Proyecciones tálamo→ estriatales.....	14
Clasificación de las neuronas del tálamo de acuerdo a los sub-circuitos de retroalimentación estriatales.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:.....	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
Objetivos específicos.....	18
METODOLOGÍA.....	19
1. Modelo de estudio.....	19
2. Marcaje retrógrado.....	19
2.1. Marcaje con Retrobeads	19
3. Expresión de Channelrhodopsina-2 para identificar si las neuronas talámicas interactúan sinápticamente dentro del tálamo.	21
4. Inyección estereotáxica.....	24
5. Procesamiento de imágenes.....	25
6. Registros electrofisiológicos en célula completa	25
RESULTADOS.....	29
Resultados Parte 1	29
Marcaje de las neuronas talámicas que proyectan a la corteza motora primaria (M1) versus el estriado dorso lateral (DLS)	29
1.2 Marcaje de las neuronas talámicas desde la corteza motora secundaria (M2) versus el estriado dorso lateral (DLS).....	32

1.3 Marcaje de las neuronas tálamicas proyectando a la corteza somatosensorial (S1) versus el estriado dorso lateral (DLS)	36
1.4 Comparación de neuronas multiblanco entre las diferentes cortezas y el DLS	39
Resultados Parte 2.....	41
2.1 Las neuronas tálamo→ corticales no reciben conexiones sinápticas funcionales de las neuronas tálamo→ estriatales.....	41
2.2 Las neuronas tálamo→ estriatales no reciben conexiones sinápticas funcionales de las neuronas tálamo→ corticales (M1)	43
2.3 La comparación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas tálamicas en función del sitio blanco de proyección no las diferencia.	44
DISCUSIÓN	47
Una proporción de las neuronas de proyección del tálamo constituyen circuitos divergentes al estriado y a la corteza, enviando conexiones sinápticas simultáneamente a ambos blancos	47
¿Cuál es la relevancia biológica de la existencia de neuronas multiblanco en los sistemas tálamo→ corticales y tálamo→ estriatales?	48
La mayoría de las neuronas talámicas de proyección son de proyección paralela, únicamente a la corteza, o al estriado dorso lateral, y no se comunican entre sí	52
Las neuronas de los núcleos ventrales versus las de los núcleos intralaminares del tálamo proyectan a la corteza y al estriado de acuerdo con lo esperado, excepto para el caso de las neuronas marcadas desde M1-DLS.....	52
CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS.....	56

ABREVIACIONES

- **AAV1**: Virus Adeno-asociado serotipo 1
- **CL**: Núcleo Central-lateral talámico
- **CM**: Núcleo Central-medial talámico
- **Cre**: Enzima Cre recombinasa
- **Cx**: Corteza
- **DLS**: Estriado dorsolateral
- **eYFP**: Proteína amarillo fluorescente mejorada
- **mCherry**: Proteína mCherry fluorescente
- **M1**: Corteza motora primaria
- **M2**: Corteza motora secundaria
- **PC**: Núcleo Paracentral talámico
- **PF**: Núcleo Parafascicular talámico
- **R_{in}**: Resistencia de entrada
- **RMP**: Potencial de membrana en reposo
- **Str**: Estriado
- **S1**: Corteza somatosensorial primaria
- **Th**: Tálamo
- **VL**: Núcleo Ventral-lateral talámico
- **VPL**: Núcleo Ventral-posterior-lateral talámico
- **VPM**: Núcleo Ventral-posterior-medial talámico

RESUMEN

Para entender el funcionamiento del cerebro es crucial conocer su arquitectura y conexiones. El tálamo es una de las mayores estructuras de relevo de información a diferentes regiones telencefálicas. Se sabe que las proyecciones tálamo→ estriatales son importantes para el aprendizaje y control motor. Y se sabe que releva información sensorimotora a la corteza, lo cual es crucial para las funciones ejecutivas de la misma. Los modelos anatómicos se basan principalmente en marcar las proyecciones tálamo→ corticales, y muy poco en la relevancia que tienen las proyecciones tálamo→ estriatales. Actualmente, existen algunos trabajos que han investigado proyecciones talámicas multiblanco hacia regiones telencefálicas, centrándose en las proyecciones talámicas a regiones asociativas y límbicas del estriado y la corteza. En este estudio investigamos las neuronas que parten del tálamo a estructuras que se han asociado con funciones sensorimotoras.

En este proyecto nos preguntamos si el tálamo contiene neuronas multiblanco que proyecten simultáneamente al estriado sensorimotor, región dorsolateral del estriado (DLS) y a la corteza motora (M1, M2) o somatosensorial (S1). O si por el contrario las neuronas talámicas proyectan de manera paralela a estos blancos. Para responder esta pregunta usamos trazadores neuronales retrógrados en cerebro de ratón e identificamos que la mayoría de las neuronas talámicas proyecta de manera paralela a los núcleos blanco investigados. Sin embargo, también existen neuronas multiblanco en todos los núcleos, cuyos porcentajes variaron del 3 al 15% de neuronas marcadas por núcleo.

En consecuencia y como segunda pregunta de este proyecto investigamos si las proyecciones del tálamo interaccionan funcionalmente a nivel del tálamo. Para contestar esto realizamos registros opto-electrofisiológicos *ex vivo* concluyendo que los circuitos de salida del tálamo no interaccionan localmente a través de sinapsis químicas.

El conocimiento de la existencia de neuronas talámicas multiblanco y su mapeo específico a los circuitos sensorimotores aportan información anatómica novedosa y sugieren que estas neuronas multiblanco podrían enviar información de manera simultánea al estriado y a la corteza. Esto representa una aportación a la descripción de los circuitos que median la interacción entre el tálamo - la corteza y los ganglios basales. Estos Circuitos son importantes para el aprendizaje y ejecución de control motor.

INTRODUCCIÓN

Un abordaje a la comprensión del cerebro se da en términos de las interacciones entre redes neuronales. Los estudios anatómicos de conectividad son cruciales en la investigación de la función de los circuitos neuronales (Bohland *et al.*, 2009; Guzowski *et al.*, 2005; Lerner *et al.*, 2016). El estudio de la anatomía y conexiones de los circuitos neuronales es importante para entender el funcionamiento del cerebro y en su caso, sus disfunciones. Es este estudio investigamos a los circuitos que surgen del tálamo que interaccionan con regiones sensorimotoras del cerebro.

El tálamo es el mayor relevo de la corteza cerebral. Nuestra percepción del mundo exterior está basada en señales sensoriales que hacen relevo en el tálamo. Esta estructura contiene grupos de células encargadas de pasar directa o indirectamente información sensorial a la corteza cerebral, mediando funciones de: percepción sensorial, atención, sueño y vigilia, memoria y cognición (Crunelli *et al.*, 2016; Murray *et al.* 2006). Desregulaciones en la función del tálamo tienen manifestaciones que van desde la pérdida de sensibilidad, desórdenes de movimiento, ataxia, síndromes de dolor, desórdenes visuales, una gran variedad de condiciones neuropsicológicas hasta coma (Snell 2007).

Actualmente existen estudios que han mapeado los circuitos tálamo→corticales, en estos se ha identificado la magnitud de la inervación que tiene con cortezas. A partir de estos estudios se ha identificado que existen núcleos que tienen predilección por cortezas específicas, las cuales están asociadas con ciertos dominios funcionales, por ejemplo: de asociación, límbicos o sensorimotores. También se sabe que el tálamo y la corteza pueden tener actividad sostenida, es decir, que existe retroalimentación entre ambas estructuras pudiendo modular su actividad, de este modo, el tálamo es de gran importancia para mantener la actividad cortical (Collins *et al.*, 2018; Hunnicutt *et al.*, 2014).

El tálamo también inerva a estructuras subcorticales como el estriado, quien es la entrada principal a los ganglios basales (Gerfen *et al.*, 2010). La información que envía tálamo al estriado es necesaria para el control motor (Díaz-Hernández *et al.*, 2018; Parker *et al.*, 2016), para guiar conductas perseverativas (Do-Monte *et al.*,

2017), para la detección de eventos sensoriales significativos (Matsumoto *et al.*, 2001) y/o para guiar la detección de conductas guiadas por un objetivo (Brandfield *et al.*, 2013). Los estudios que han investigado las proyecciones tálamo→ corticales y tálamo→ estriatales han sugerido sitios de origen de estas proyecciones en núcleos específicos del tálamo, de esto se sabe que hay sitios comunes en el tálamo donde se originan tanto neuronas con proyecciones tálamo→ corticales como tálamo→ estriatales. Algunos estudios, centrados en porciones límbicas y asociativas de la corteza y los ganglios basales han observado que existen 2 patrones de proyecciones hacia la corteza, neuronas que proyectan a una sola área (paralelas) y neuronas divergentes que proyectan a múltiples áreas asociadas con circuitos límbicos y asociativos (Hunnicuttt *et al.*, 2016; Kuramoto *et al.*, 2017; Macchi G. *et al.*, 1984; Otake and Nakamura, 1998), sin embargo, a la fecha no se sabe si existen neuronas multiblanco que partan del tálamo a los circuitos sensorimotors de la corteza y el estriado. La presencia de neuronas multiblanco en los circuitos sensorimotors podría significar que el tálamo posee circuitos para influenciar el aprendizaje/ejecución de conductas motoras.

ANTECEDENTES

Clasificación de los diferentes núcleos del tálamo

De acuerdo con J. E. Rose (1942) el tálamo se puede subdividir en epitálamo que incluye el núcleo habenular y complejo pineal (Concha and Wilson, 2001), tálamo dorsal (al que algunos le denominan “el tálamo”) y tálamo ventral (que incluye a el núcleo reticular talámico y una pequeña parte del núcleo geniculado ventral-lateral). Se sabe que el tálamo es una estructura cerebral conservada a lo largo de la evolución, las divisiones de epitálamo, tálamo dorsal y ventral pueden encontrarse en todos los grupos de vertebrados tanto en ciclóstomos (vertebrados sin mandíbula) como en gnatóstomos (Vertebrados con mandíbula) (Butler, 2008; Kaas, 2014).

En este trabajo nos enfocamos en estudiar el tálamo dorsal (núcleos intralaminares y ventrales), al que le llamaremos “tálamo”. El tálamo consta de múltiples núcleos que se agrupan de acuerdo a su posición (**Figura 1**).

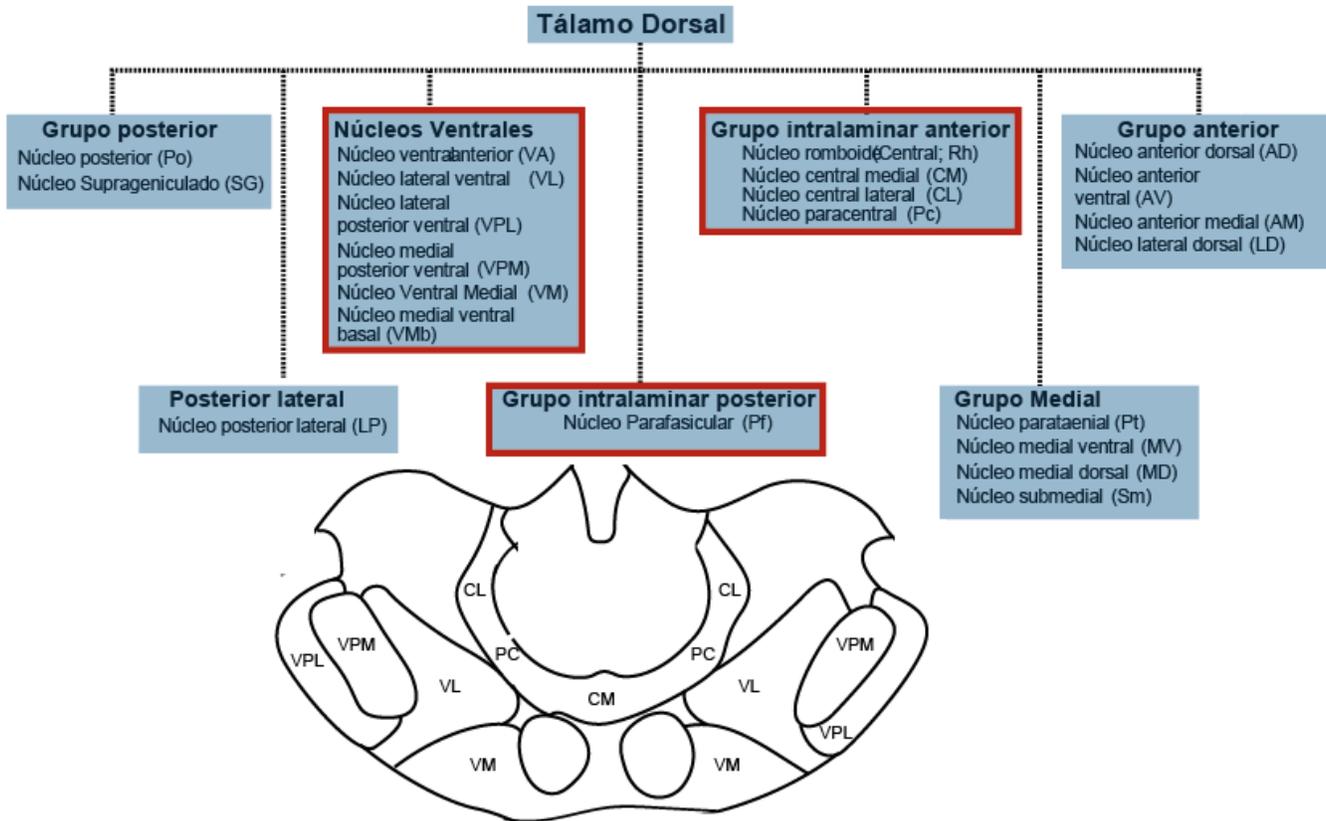


Figura 1: Esquema de las divisiones del tálamo dorsal en mamíferos. Arriba: División en grupos de núcleos, con los núcleos mayores comunes a todas las especies, basada en la clasificación de J. E. Rose (1942). Tomada y modificada de Jones Edward G. 2007. Abajo: esquema de una sección coronal de tálamo mostrando los núcleos de interés para este estudio.

El tálamo puede ser dividido en dos formas, la primera es: de acuerdo con el tipo característico de señal aferente en el que está involucrado (visual, auditiva, somatosensorial, cerebral) y la segunda: funcionalmente por los sitios a donde proyecta (S. Murray *et al.*, 2006). Con respecto a esta última clasificación se reconocen dos clases de neuronas de proyección: las neuronas de los núcleos intralaminares y las de los núcleos ventrales. Las primeras presentan una predominante proyección al estriado y las últimas a la corteza (Hunnicut *et al.*, 2014, 2016; Pan *et al.*, 2010).

Por otro lado, el tálamo dorsal también puede ser dividido clásicamente de forma anatómica por la topografía de los núcleos que lo conforman, de este modo

el tálamo se divide en Tálamo anterior, el cual contiene núcleos talámicos anteriores, cuya función está principalmente relacionada con el sistema límbico y está vinculada con el tono emocional y los mecanismos de memoria reciente. Hacia la parte posterior encontramos el tálamo medial, los núcleos ubicados en ésta sección del tálamo se relacionan con de la integración de una gran variedad de información sensitiva, así como de la relación de ésta información con las sensaciones emocionales (Herrero *et al.*, 2002; Snell 2007). En la parte ventral encontramos a los núcleos talámicos ventrales, estos núcleos están conectados con el estriado y diferentes cortezas, principalmente motoras y sensoriales, se sabe que estos núcleos influyen en la actividad de la corteza (Collins *et al.*, 2018; Snell 2007). Además de que estos núcleos reciben aferencias sensoriales de los tractos sensitivos ascendentes (Snell 2007).

Otro grupo de núcleos también contenidos en el tálamo son los núcleos intralaminares, núcleos pequeños dentro de la lámina medular interna, los cuales proyectan hacia la corteza y los ganglios basales, estos se han asociado con los niveles de conciencia y los estados de alerta de un individuo formando parte de circuitos, de control motor, pero también asociativos y límbicos (Herrero *et al.*, 2002; Snell 2007).

Tipos neuronales del tálamo

Dentro del tálamo se distingue a neuronas con axones que proyectan al telencéfalo, éstas neuronas son de relevo por que reciben entradas sensoriales y proyectan a neuronas de respuesta motora. Las neuronas de proyección son diferentes de aquellas que solo tienen axones que se ramifican localmente, a estas últimas se les denomina interneuronas. Las Interneuronas son GABAérgicas, y las neuronas de proyección son glutamatérgicas (Wang *et al.*, 2010). En el tálamo las células de relevo son probablemente las células más importantes, ya que, en mamíferos representan del 70-99% de la población de células (dependiendo del núcleo y la especie) (S. Murray *et al.*, 2006).

Proyecciones tálamo → corticales

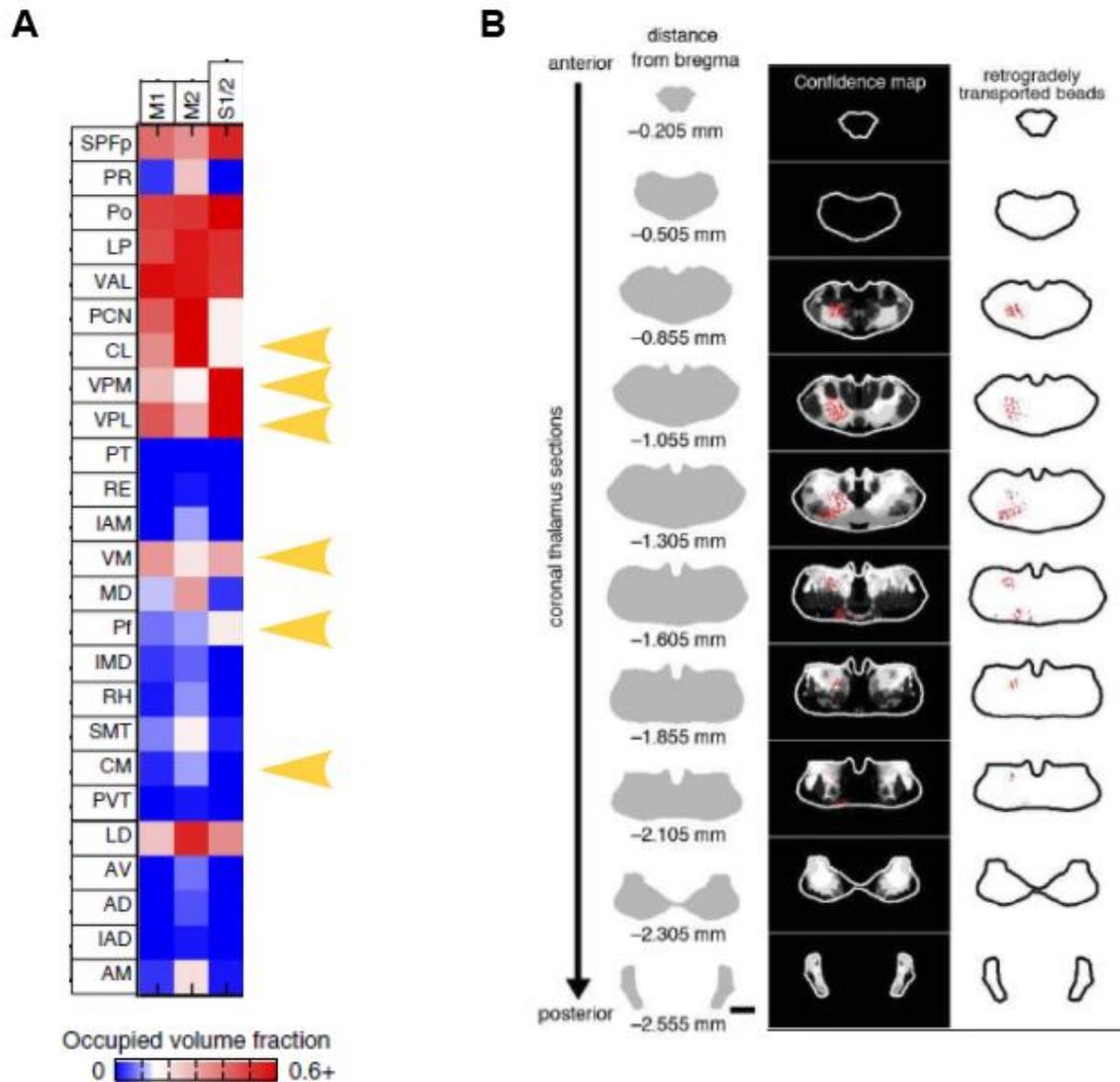


Figura 2: Núcleos tálamicos que proyectan a las cortezas motora (M1), premotora (M2) o somatosensorial (S1).

A) Proporción de las proyecciones de núcleos tálamicos a las diferentes cortezas. La unidad de medida “occupied volume fraction” se calculó como el solapamiento de los datos de Allen Brain atlas con datos obtenidos a partir de inyecciones en el tálamo, este producto muestra la porción de cada núcleo que proyecta a la corteza. Con flechas amarillas se resalta los núcleos que nosotros estudiamos en esta tesis.

B) Marca de retrobeads en el tálamo, previamente inyectados en corteza M1, presentados a diferentes niveles anteroposteriores en vista coronal. Tomada y modificada de Hunnicutt *et al* 2014.

El tálamo contiene neuronas (principalmente ubicadas en núcleos talámicos de la línea media) que inervan múltiples sitios corticales y a otras regiones telencefálicas como los ganglios basales (Kuramoto *et al.*, 2017; Otake and Nakamura, 1998; Macchi G. *et al.*, 1984).

En el estudio más extenso de la conectividad tálamo→ cortical (Th→ Cx) que se ha hecho hasta la fecha, Hunnicutt *et al.* (2014), generó un resumen de la densidad de proyecciones tálamicas sobre diferentes cortezas [e.g. motora (M1), premotora (M2) y somatosensorial (S1/2) en la **Figura 2A**].

De este y otros estudios es evidente que los núcleos de mayor inervación a la corteza son los núcleos ventrales del tálamo (Cicirata *et al.*, 1986; Hunnicutt *et al.*, 2014; York, 1974).

Dentro de la relevancia funcional de la inervación tálamo→ corteza esta su participación como relevo de información sensorial, como monitores de las instrucciones motoras (Collins *et al.*, 2018; Crunelli *et al.*; S. Murray *et al.*, 2006; Viaene *et al.*, 2010), y las oscilaciones de estas células son cruciales en los estados corticales de sueño y vigila (Steriade *et al.*, 1988). La interpretación de estas funciones de las neuronas tálamicas no integra el hecho de que neuronas talámicas que proyectan a la corteza pudiesen estar conectadas simultáneamente a los ganglios basales directamente con axones divergentes, es decir, que sean neuronas multiblanco (ver **Figura 4** más adelante).

Proyecciones tálamo→ estriatales

Las proyecciones del tálamo a los ganglios basales se identifican como una de las principales vías de activación de este sistema (Wilson CJ *et al.* 1983). El sistema de los ganglios basales está constituido por una serie de núcleos subcorticales que son esenciales para el control de movimientos voluntarios, y comportamientos guiados por recompensas (Berendse and Groenewegen, 1990; Herrero *et al.*, 2002). La principal estación de entrada a los ganglios basales es el estriado, el cual integra información tanto de la corteza como a el tálamo (Berendse and Groenewegen, 1990; Herrero *et al.*, 2002). Actualmente se piensa que el estriado posee 3 compartimentos funcionales, constituidos por los circuitos

sensorimotors (that reside in the dorsolateral striatum in rodents), associative and limbic (dorsomedial and ventral respectively) (Balleine *et al.*, 2009; Belin *et al.*, 2009; Gruber and McDonald, 2012; Thorn *et al.*, 2010; Yin and Knowlton, 2006).

Thalamo→striatal projections originate from many nuclei, but not all process sensory information. Thalamic nuclei primarily involved in transmitting sensory information to the striatum are: the posterior nucleus (Pom), the central medial-parafascicular complex (CM/Pf), the lateral posterior (LP) and the dorsal lateral. Most research has focused on the CM/Pf complex because it contains more thalamo→striatal neurons than any other region (Galvan and Smith, 2011).

In a subsequent study where Hunnicutt characterized thalamic innervation of the striatum (Hunnicutt *et al.* 2016), the same group generated a study characterizing thalamo→striatal projections (Hunnicutt *et al.* 2016), in this one they integrated their experimental data with data from the *Allen Brain Atlas*. In this study they identified thalamic zones projecting to the striatum, to the cortex and to both sites simultaneously (see **Figure 3**).

Origins of thalamic efferent projections

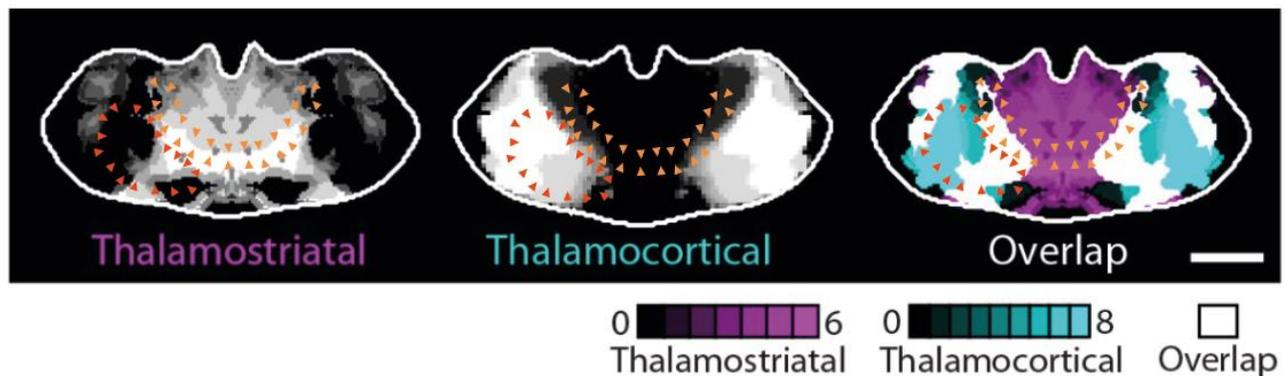


Figura 3: Orígenes de las proyecciones tálamo→cortical y tálamo→estriatal. Área del tálamo y la localización de las proyecciones tálamo→cortical, tálamo→estriatal y superposición de las áreas. Las flechas rojas indican la delimitación de los núcleos ventrales y las naranjas la delimitación de los núcleos intralaminares. Tomado y modificado de Hunnicutt *et al.* 2016.

De este trabajo dos tipos de evidencia son muy relevantes para nuestro estudio: 1) Existen zonas en el tálamo que se diferencian por proyectar al estriado o a la corteza 2) Existen zonas del tálamo que contiene neuronas que proyectan tanto a la corteza como al estriado (color blanco en el panel de la derecha, **Figura 3**). De manera importante, las zonas del tálamo que mostraron proyectar simultáneamente a las cortezas y al estriado fueron las que corresponden principalmente a los grupos de núcleos del tálamo denominados intralaminares y ventrales (flechas amarillas en la **Figura 2**).

Clasificación de las neuronas del tálamo de acuerdo a los sub-circuitos de retroalimentación estriatales

La interacción entre el tálamo y la corteza cerebral (principalmente la neocorteza) ha dominado el campo de los estudios talámicos y es comúnmente olvidado que el tálamo está también conectado con otras estructuras telencefálicas como: el lóbulo piriforme, amígdala, hipocampo y los ganglios basales. De todas estas estructuras la de mayor preponderancia en proyecciones de entrada del tálamo es el estriado [núcleos: caudado, putamen, accumbens (Jones Edward G. 2007)]. La figura 4 muestra un último modo de clasificar a las proyecciones del tálamo agrupando los circuitos y estructuras de acuerdo a sus proyecciones estriatales.

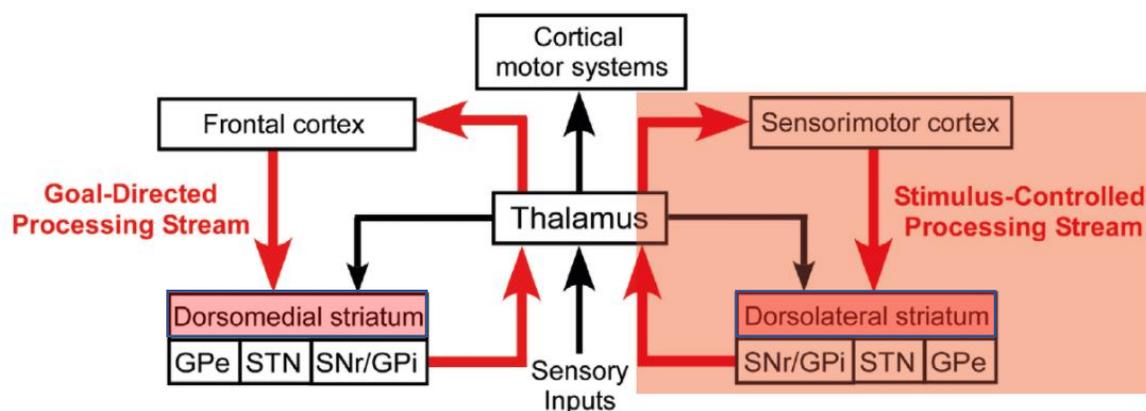


Figura 4: Conexiones del tálamo hacia los circuitos controlados por estímulos (derecha) y los circuitos de control sobre la generación de conductas dirigidas por objetivos (izquierda). Tomada y modificada de Alloway *et al.*, 2017.

Esta división enfatiza una clasificación hecha de acuerdo con la inervación tálamo→ estriado y con la manera con la que está involucrada en el control de acciones dirigidas por objetivos o acciones guiadas por estímulos (**Figura 4**) (Alloway *et al.*, 2017).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para entender las contribuciones del tálamo es necesario comprender cómo el tálamo regula a sus estructuras blanco. Las proyecciones tálamo→ corticales y tálamo→ estriatales se implican en procesos de integración sensorial y/o de control motor, por lo que es de importancia crítica dilucidar si estos sub-circuitos son paralelos o divergentes o localmente inter-regulados.

Sabe que el tálamo proyecta a la corteza y al estriado. Dentro del tálamo hay zonas que proyectan tanto a la corteza como al estriado, sin embargo, hasta la fecha no se conoce si las neuronas del tálamo involucradas en circuitos sensorimotors proyectan simultáneamente a la corteza y hacia el estriado (es decir, neuronas cuyo axón inerve simultáneamente tanto al estriado como a la corteza) o en su defecto, si las neuronas tálamicas conforman circuitos de salida exclusivamente paralelos, existe la posibilidad de que se autorregulen localmente antes de modular sus núcleos blanco.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

- 1. ¿Existen neuronas talámicas que proyecten simultáneamente al estriado y a la corteza dentro de los circuitos sensorimotors?**

Dada la posibilidad de que las neuronas tálamicas puedan constituir circuitos paralelos que inerven exclusivamente a la corteza o al tálamo también nos planteamos la siguiente pregunta:

2. ¿Existe interacción entre las neuronas talámicas que proyectan hacia el estriado dorsolateral y las que proyectan a la corteza (M1, M2 y S1)?

Para contestar estas preguntas se plantearon las siguientes hipótesis.

HIPÓTESIS

Dentro de las proyecciones tálamo→ corticales y tálamo→ estriatales existen somas de neuronas que proyectan a ambas estructuras (estriado y corteza) formando circuitos divergentes y somas de neuronas que proyectan en forma separada a ambas estructuras. Dado el papel del tálamo como estructura de relevo se propone que la mayor parte de las neuronas de proyección del tálamo lo hagan de manera paralela, no obstante, en el caso de núcleos talámicos que se reconocen como parte de circuitos motrices, límbicos y de asociación se espera una mayor presencia de neuronas divergentes. Así mismo se propone que los circuitos paralelos pudieran comunicarse entre sí para poder transmitir información simultánea a ambos blancos.

Para poner a prueba esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Identificar si las proyecciones de neuronas tálamo→ corticales y tálamo→ estriatales que inervan a los circuitos sensorio-motores (M1, M2 y S1 en corteza y el DLS en el estriado) parten de las mismas neuronas talámicas o son circuitos paralelos con posible intercomunicación local.

Objetivos específicos

- I) Identificar a las neuronas talámicas que proyectan hacia la corteza (M1, M2 y S1) y el estriado (DLS).
 - a) Por medio de marcajes retrógrados con retrobeads fluorescentes
 - b) Por medio de la expresión de proteínas reporteras de manera retrógrada y anterógrada usando vectores virales.

II) Identificar, si las proyecciones tálamo→ corticales y tálamo→ estriales interactúan funcionalmente a nivel del tálamo (registros electrofisiológicos in vitro).

METODOLOGÍA

Todos los procedimientos han sido aprobados por la comisión interna del manejo de animales del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (permiso CICUAL FTA121-17).

1. Modelo de estudio

Se utilizaron ratones C57BL/6J y ratones Vglut2-Cre de sexo indistinto de entre mes y medio y dos meses de edad, los cuales fueron reproducidos en el bioterio local del instituto. Los ratones Vglut2-Cre expresan la enzima Cre recombinasa bajo el promotor del gen para la expresión del transportador vesicular de glutamato tipo II, el cual se expresa en neuronas tálamicas (Fremeau *et al.*, 2001).

2. Marcaje retrógrado

Para responder la pregunta: ¿Existen neuronas talámicas que proyecten simultáneamente al estriado (DLS) y a la corteza (M1, M2 y S1)? se inyectaron trazadores neuronales retrógrados en cortezas (M1, M2, S1) y estriado (DLS) en cerebro de ratón.

2.1. Marcaje con Retrobeads

Se usaron retrobeads en dos colores de fluorescencia cuyas características de excitación y emisión se resumen en la siguiente tabla.

Wavelength (nm)		
Retrosphere™ Color:	Excitation Max (nm)	Emission Max (nm)
Green	460	505
Red	530	590

Tabla 1. Espectro de excitación y emisión de los retrobeads usados en este estudio. Tomada de Lumafluor Inc página web: <https://lumafluor.com/Information.php>.

Los retrobeads son microesferas de látex de aproximadamente 0.02-0.2 μm de diámetro, una vez que se inyectan en el tejido cerebral muestran poca difusión lo que permite sitios de inyección definidos. Una vez que son transportados al soma la marca persiste *in vivo* por al menos 10 semanas y un año después de la fijación sin presentar citotoxicidad o fototoxicidad (Katz L.C *et al.*, 1984).

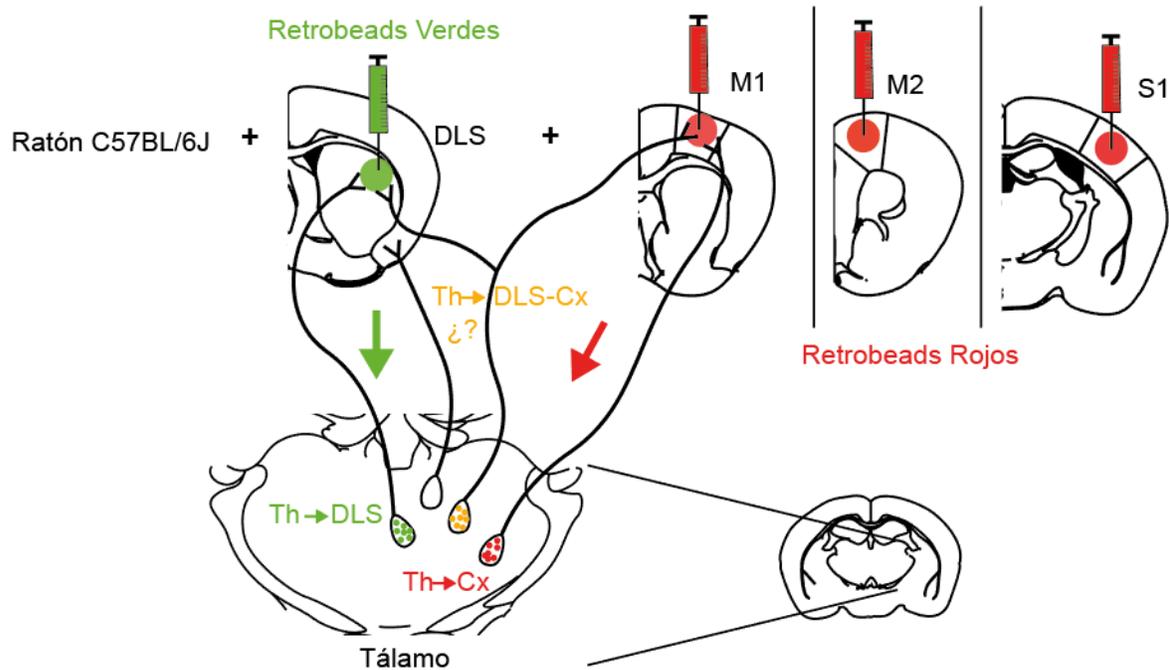


Figura 5: Esquema de los sitios de inyección en experimentos independientes DLS-M1, DLS M2, DLS-S1. Arriba en verde se representa la inyección de retrobeads en estriado DLS y a la derecha en rojo la inyección en la corteza (ya sea M1, M2 o S1) de ratones independientes para cada corteza. Los ratones usados para este propósito fueron WT de la cepa C57BL/6J. En los diagramas inferiores se representa la marca retrógrada a encontrar en los núcleos talámicos, tras inyectar retrobeads en los sitios mencionados de arriba.

El mecanismo propuesto por el cual los retrobeads son internalizados a la célula es debido a que pueden unirse de manera no covalente a muchas proteínas como anticuerpos, y es posible que estas microesferas puedan entrar en la hendidura sináptica y mediante interacciones con moléculas presentes en la superficie sináptica y grupos hidrofóbicos en la superficie de las esferas podrían provocar un evento de endocitosis y una vez adentro las vesículas endocitadas sean transportadas por el transporte retrógrado rápido (Katz L.C *et al.*, 1984).

Actualmente está documentado que los retrobeads se internalizan a través de la existencia de contactos sinápticos o fibras dañadas, no son transportados por fibras de paso intactas (Katz L.C *et al.*, 1984) (**Figura 5**).

3. Expresión de Channelrhodopsina-2 para identificar si las neuronas talámicas interactúan sinápticamente dentro del tálamo.

En este estudio se usaron 4 constructos virales, un par en una primera estrategia experimental y un segundo par en una segunda estrategia experimental. Se inyectaron virus Adeno-asociados serotipo 1 (AAV1) Cre dependientes en corteza y estriado. Estudios previos indican que las neuronas pueden tomar retrógradamente este serotipo de virus desde sus axones (probabilidad de entre 2-9%) y expresar proteínas reporteras de interés en los somas de las neuronas después de 8-21 días (Aschauer *et al.*, 2013).

Para poder preguntar si las neuronas talámicas interactúan sinápticamente se transfectó a las neuronas talámicas con la proteína Channelrhodopsina 2 (ChR2) por medio de virus Adeno-asociados.

La Channelrhodopsina pertenece a una familia de proteínas llamadas opsinas las cuales son canales iónicos cuyos poros se abren mediante un cambio conformacional provocado por la incidencia de luz. En particular la ChR2 es un canal catiónico sensible a luz, consta de 7 dominios transmembranales y absorbe luz gracias a la interacción con el cofactor retinol (**Figura 6**), el cual sufre un cambio conformacional al contacto con la luz azul ($\lambda = 470$ nm), ante este cambio conformacional provoca el flujo de iones de sodio al interior de las células (Britt *et al.*, 2012).

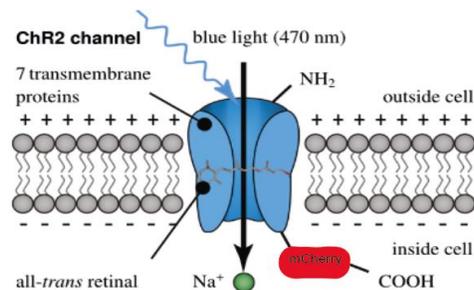


Figura 6: Modelo de la Channelrhodopsina 2 (ChR2) acoplada a mCherry, ChR2 es funcional al incidir luz azul sobre el cofactor retinol provocando la apertura del canal y la consecuente entrada de iones Na⁺. Tomada y modificada de Abilez *et al.*, 2011.

En una primera estrategia experimental que tuvo la finalidad de transfectar neuronas tálamo→ estriatales con ChR2 y marcar neuronas tálamo→ corticales con una proteína reportera de un color diferente (**Figura 7A**), se inyectaron dos constructos virales por animal, uno en el DLS y el otro en alguna de las cortezas de interés (ver **Figura 5**). El virus para expresar ChR2 fue: AAV1.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-mCherry.WPRE.hGH. El virus utilizado para solo expresar eYFP de manera retrograda fue: AAV1.EF1a.DIO.eYFP. WPRE.hGH.

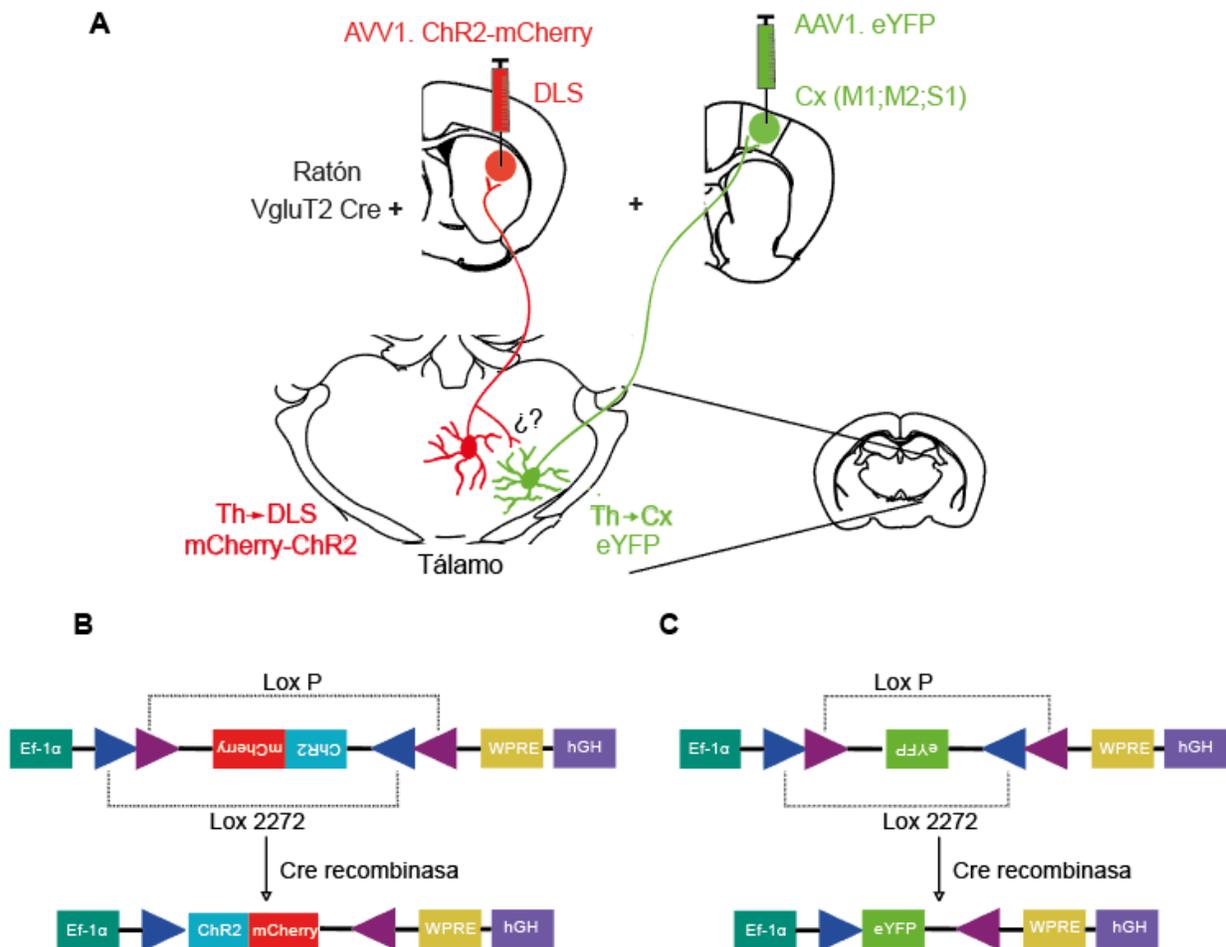


Figura 7: Estrategia 1 de expresión de proteínas de manera retrograda por medio de virus.

A) Arriba: Esquema de la estrategia experimental 1, se muestran los sitios de inyección en estriado, DLS (AAV1.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-mCherry) y Cx (ya sea M1, M2 o S1, AAV1.EF1a.DIO.eYFP. WPRE.hGH). **B)** Esquema del constructo viral para Channelrhodopsina 2 y su recombinación por la enzima Cre. **C)** Esquema del constructo viral para eYFP y su recombinación por la enzima Cre.

La expresión de las proteínas de interés estuvo dirigida por el promotor EF1a para expresar ChR2 en neuronas (Abilez *et al* 2011). Como candado adicional la secuencia a expresar estuvo invertida y flanqueada por sitios Lox, haciendo que solo se expresara en neuronas que contenían a la enzima Cre recombinasa. La enzima Cre recombinasa reconoce los sitios Lox e invierte la secuencia en el sentido correcto para que se pueda llevar a cabo la expresión de la secuencia de interés (**Figura 7B**).

Al inyectar el virus de eYFP en la corteza, además de marcar retrógradamente a las neuronas talámicas, se observó que un pequeño porcentaje de las neuronas corticales tomaron el virus y expresaron la proteína. Se sabe que las neuronas corticales poseen una proyección cortico→ talámica, por lo que, para probar si las neuronas tálamo→ corticales conectan funcionalmente con las neuronas tálamo→ estriatales se ideó una segunda estrategia experimental, con la finalidad de dotar de ChR2 exclusivamente a las neuronas tálamo→ corticales, sin que exista interferencia de las neuronas cortico→ talámicas.

En esta segunda estrategia experimental, se transfectó a neuronas tálamo→ corticales con un virus para expresar la enzima Cre en el tálamo, esto mediante un virus retrógrado inyectado en la corteza, seguido a esto se realizó una inyección en el tálamo con un virus Cre-dependiente para expresar ChR2-eYFP en las neuronas que expresarían Cre (ver **Figura 8**). Después, para marcar las neuronas tálamo→ estriatales, se inyectaron retrobeads rojos en el DLS (**Figura 8**).

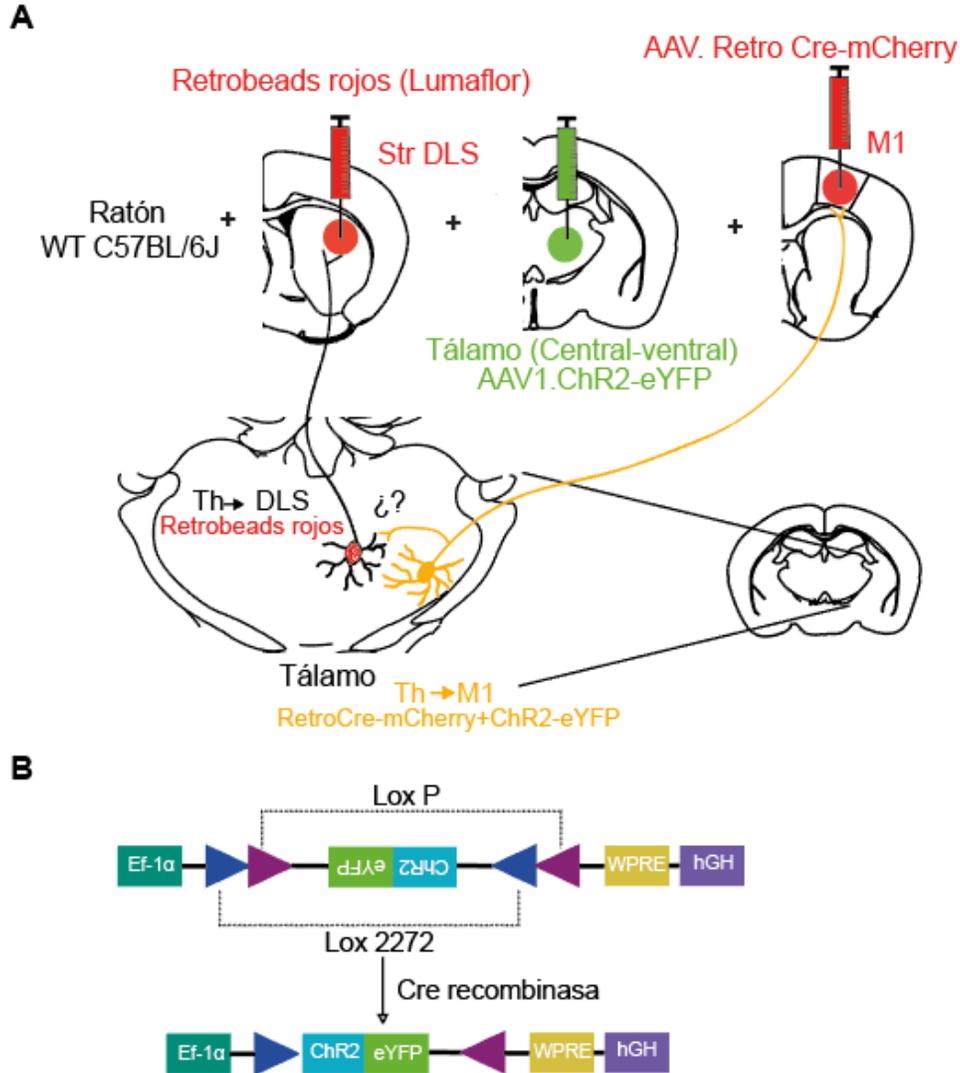


Figura 8: Estrategia 2 de expresión de proteínas de manera retrograda por medio de virus. A) Esquema de los sitios de inyección en estriado, DSL (Retrobeads rojos), Cx (M1: pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre), Tálamo centro-ventral (AAV1.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE. hGH) B) Esquema de estrategia experimental 2. C) Esquema del constructo viral para Channelrhodopsina 2 y su recombinación por la enzima Cre.

4. Inyección estereotáxica

Tanto las inyecciones de retrobeads como la de vectores virales se realizó mediante cirugía estereotáxica. Para la inyección de retrobeads en cada animal se inyectó 350 nL en el DLS (coordenadas: AP 0.5, ML 2.6, DV 2) y 350 nL en alguna de las cortezas de interés (M1, M2 o S1; Coordenadas M1: AP 1.10, ML 1.7, DV 0.7, M2: AP 1.94, ML 0.7, DV 0.7, S1: AP -1, ML 3, DV 1). Siempre que se hicieron inyecciones dobles, el color de retrobeads fue diferente (por ejemplo, verde en

estriado DSL y rojo en corteza M1, **Figura 5**). Una vez inyectados los retrobeads, los animales se mantuvieron en condiciones de vivarium estándar por 10 días antes de la extracción del cerebro. En el caso de la inyección de vectores virales (AVV1) se inyectó 350 nL en la zona de interés. Una vez realizada la inyección de AVV1 se esperó por 21 días antes de extraer el cerebro de los animales.

5. Procesamiento de imágenes

Una vez que se cumplió el tiempo requerido para el transporte retrógrado los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina 85%/Xilacina 15% y perfundidos transcardialmente con PBS al 0.1 M, y posteriormente con PFA al 4%. Se extrajeron los cerebros y fueron rebanados coronalmente en secciones de 100 μm con un vibratomo (Vibratome series 1000), las secciones coronales obtenidas fueron montadas en portaobjetos con MOWIOL. Posteriormente cada una de las muestras fue observada en microscopio de epifluorescencia para seleccionar las muestras a llevar al confocal. Una vez seleccionadas las zonas de interés se obtuvieron imágenes en microscopía confocal. Se tomaron 2 tipos de imágenes: mapas macro de la rebanada de x: 2215.39 μm , y: 1668.83 μm . De estas primeras imágenes se seleccionaron áreas para la toma de Z-stack: 10-30 μm , una imagen cada 1 μm . Posteriormente se cuantificó a todas las células marcadas retrógradamente contenidas en estos stacks, mediante la herramienta “gradilla” del software “ImageJ”.

6. Registros electrofisiológicos en célula completa

Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilacina (85%/15% respectivamente) y transcardialmente perfundidos con solución de sacarosa helada saturada con 95/5% O_2/CO_2 , con la siguiente concentración en mM: 60 NaCl, 100 Sacarosa, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 5 MgCl_2 , 20 Glucosa, 1 CaCl_2 , 3 Piruvato, 1 Ácido ascórbico, posterior a ello se extrajo el cerebro y se cortaron secciones coronales de 200-250 μm con un vibratomo (3000 Ted pella) en la misma solución. Una vez cortadas, las secciones fueron transferidas a un recipiente con líquido cefalorraquídeo artificial, composición en mM: 125 NaCl, 3 KCl, 1.25

NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2.6 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 15 Glucosa saturado con 95/5% O₂/CO₂, y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron registros en configuración de célula completa con pipetas de borosilicato (6-10 MΩ), rellenas con solución interna, concentraciones en mM: 10 NaCl, 10 HEPES, 10 EGTA/KOH, 120 KMeSO₃, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 2.4 Na⁺-ATP, 1.2 Na⁺-GTP y 0.3 de biocitina (pH 7.2, 290 mOsmol/L). El *liquid junction potential* fue de 11 mV con esta solución.

Los valores de potencial de membrana, umbral, y amplitud reportados en los resultados no se corrigieron para este valor de liquid junction potential. Para los registros las neuronas fueron visualizadas mediante un filtro infrarrojo con un microscopio vertical (Scientifica electrophysiology) y una cámara digital (Evolution VF FAST mono 12 bits 32-0103B124) (**Figura 10**). Los registros fueron adquiridos a través de un amplificador PC-501A (Warner Instrument Corp.) y digitalizados a través de un NIDAQ (CB 68LP, National Instruments) en el software Im-Patch (software de acceso abierto diseñado en LabView: <http://impatch.ifc.unam.mx/>).

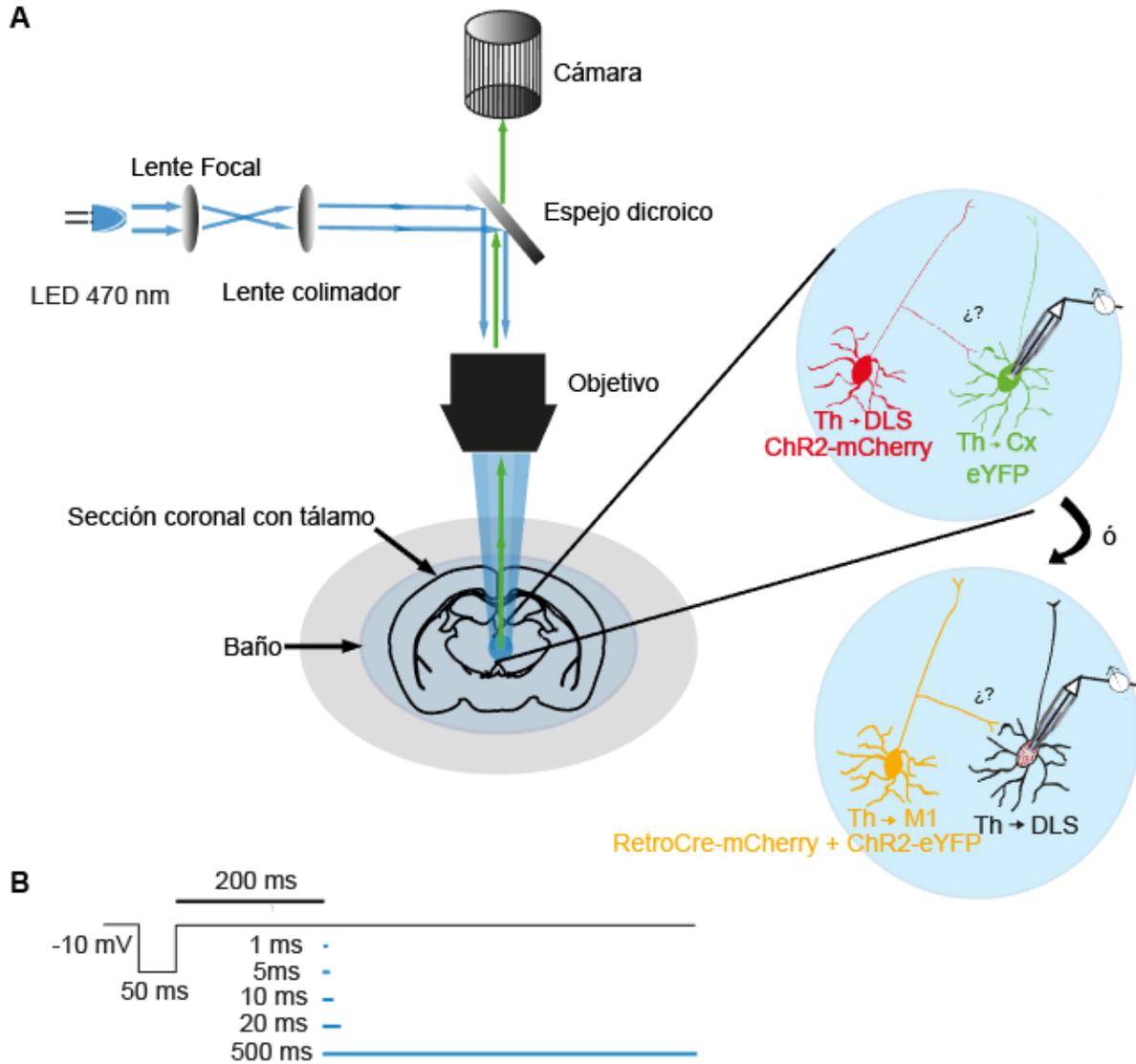


Figura 10: Diseño experimental para registros electrofisiológicos en rebanadas.

A) Estrategia de registro, modo en que la luz incide sobre una rebanada coronal de cerebro conteniendo al tálamo, de un ratón previamente transfectado como se describe en las secciones 3-4 de la metodología.

B) Esquema de opto-estimulación y registros de células del tálamo usando en fijación de voltaje.

Para conocer las propiedades electrofisiológicas de las células registradas, como el potencial de membrana en reposo (RMP), resistencia de entrada (R_{in}), umbral del potencial de acción, amplitud y ancho del potencial de acción (al 50%), las células fueron registradas en fijación de corriente sujetas a protocolos de inyección de pulsos cuadrados de corriente (**Figura 11A**). La resistencia de entrada se calculó como la pendiente de la recta generada de las curvas I-V antes de que se generasen potenciales de acción. El umbral del potencial de acción se calculó de acuerdo al método II de Sekerli *et al.*, 2004, en el cual se gráfica la derivada del voltaje con respecto al tiempo (dV/dt) contra el voltaje, en este gráfico, el punto donde dV/dt comienza a incrementar representa el valor de V del umbral del potencial de acción. La amplitud de la espiga se calculó como el valor de voltaje entre el umbral del potencial de acción y el máximo del potencial de acción. Por último, se calculó la anchura (en ms) a la mitad de la amplitud del potencial de acción.

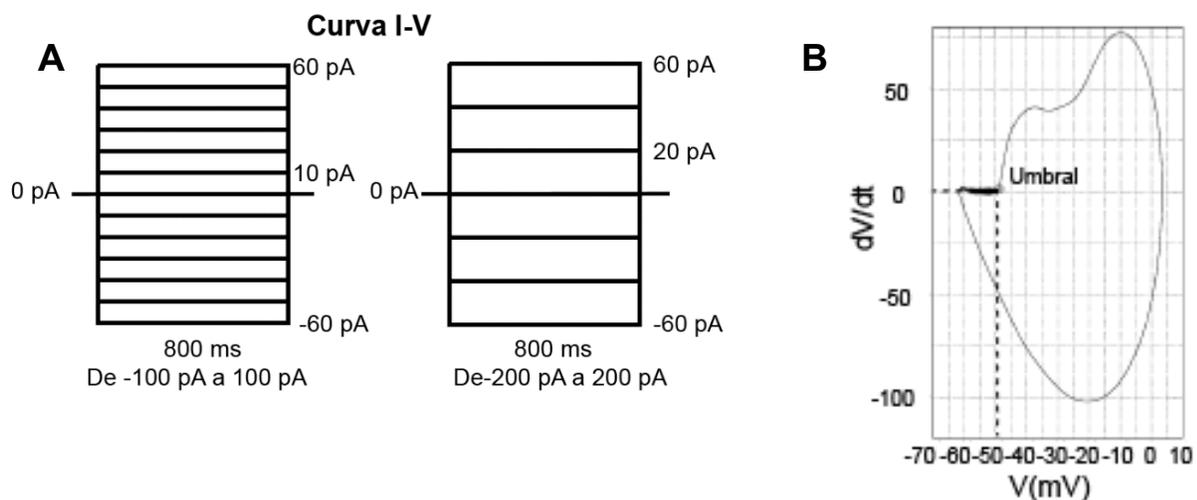


Figura 11: **A)** Protocolos de inyección de corriente. **B)** Gráfico representativo para estimar el umbral de disparo, el punto señalado con las líneas punteadas donde dV/dt comienza a incrementar es equivalente al umbral del potencial de acción. Tomada y modificada de Sekerli *et al.*, 2004.

RESULTADOS

A continuación, en las secciones “Resultados Parte 1” (1.1-1.4) se cubren los resultados que contestan a la pregunta 1 y en la sección “Resultados Parte 2” (2.1-2.3) los que corresponden a la segunda pregunta.

Resultados Parte 1

Marcaje de las neuronas tálamicas que proyectan a la corteza motora primaria (M1) versus el estriado dorso lateral (DLS)

Para identificar si las neuronas del tálamo proyectan de manera paralela o divergente a la corteza y el estriado realizamos inyecciones dobles de marcadores retrógrados (retrobeads, un color en la corteza y otro en el estriado) e identificamos a las neuronas marcadas en el tálamo. La **Figura 13** muestra fotomicrografías ejemplo de los sitios de inyección de retrobeads en M1 (rojo) y el DLS (verde), y la marca retrograda que se encontró en los núcleos talámicos.

Al realizar las cuantificaciones de las neuronas marcadas en el tálamo se observó, sin importar el grupo de núcleos al que pertenecen (intralaminares o ventrales) un mayor número de neuronas de proyección al estriado dorsolateral comparado con la corteza M1 ($n=3$ animales, $Th_{intralaminares} \rightarrow DLS= 100 \pm 23$ versus $Th_{intralaminares} \rightarrow M1= 21 \pm 6$; núcleos ventrales: $Th_{ventrales} \rightarrow DLS= 39 \pm 2$ versus $Th_{ventrales} \rightarrow M1= 16 \pm 2$, $p < 0.05$ en ambos casos, Prueba U de Mann Whitney, **Figura 14 C** panel izquierdo). Del mismo modo al calcular las proporciones de las neuronas marcadas por núcleo se observó que del total de neuronas marcadas tanto los núcleos intralaminares como los ventrales proyectan en mayor porcentaje al DLS ($n=3$ animales, $Th_{intralaminares} \rightarrow DLS= 76.9\%$ versus $Th_{intralaminares} \rightarrow M1= 16.4\%$; núcleos ventrales: $Th_{ventrales} \rightarrow DLS= 64.1\%$ versus $Th_{ventrales} \rightarrow M1= 26.8\%$, $p < 0.05$ en ambos casos, prueba χ^2 , **Figura 14 C** panel izquierdo).

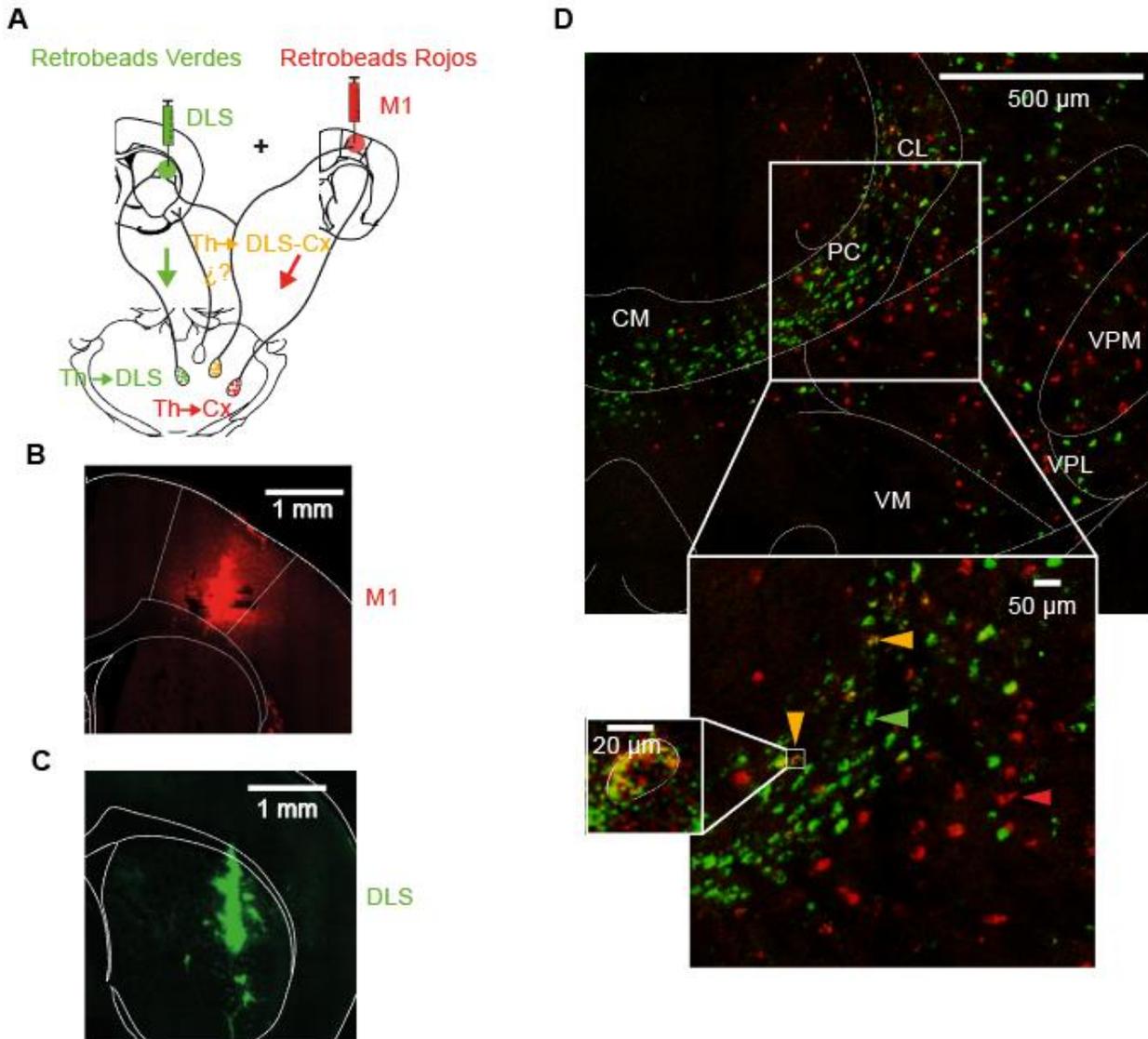


Figura 13: Marcaje retrogrado de neuronas en el tálamo desde la corteza motora (M1) y el estriado dorsolateral (DLS).

A) Esquema de los sitios de inyección de retrobeads en M1 y DLS, y el posible marcaje retrogrado de las neuronas talámicas. **B y C)** Inyección de retrobeads rojos en M1 y retrobeads verdes en el DLS. **D)** Marca retrógrada en núcleos talámicos. Las flechas rojas indican una neurona Th→ M1, flechas verdes: Th→ DLS y flechas amarillas: neuronas multiblanco Th→ M1-DLS. Abajo magnificación de la marca y abajo a la izquierda magnificación del soma de una neurona con retrobeads rojos y verdes.

Al cuantificarlas, el número de neuronas multiblanco (neuronas que presentaron ambas marcas retrogradadas; n= 3 animales) observamos que en número fueron pocas: e.g. 3 ± 1 en el núcleo CM a 15 ± 2 en el núcleo PF. No se encontraron diferencias en el número de neuronas multiblanco de los núcleos intralaminares

comparado con los ventrales (n= 3 animales, neuronas multiblanco de los Intralaminares= 8 ± 2 comparadas con neuronas multiblanco de los ventrales= 5 ± 1 , $p > 0.05$, prueba U de Mann Whitney; **Figura 14 B-Derecha**).

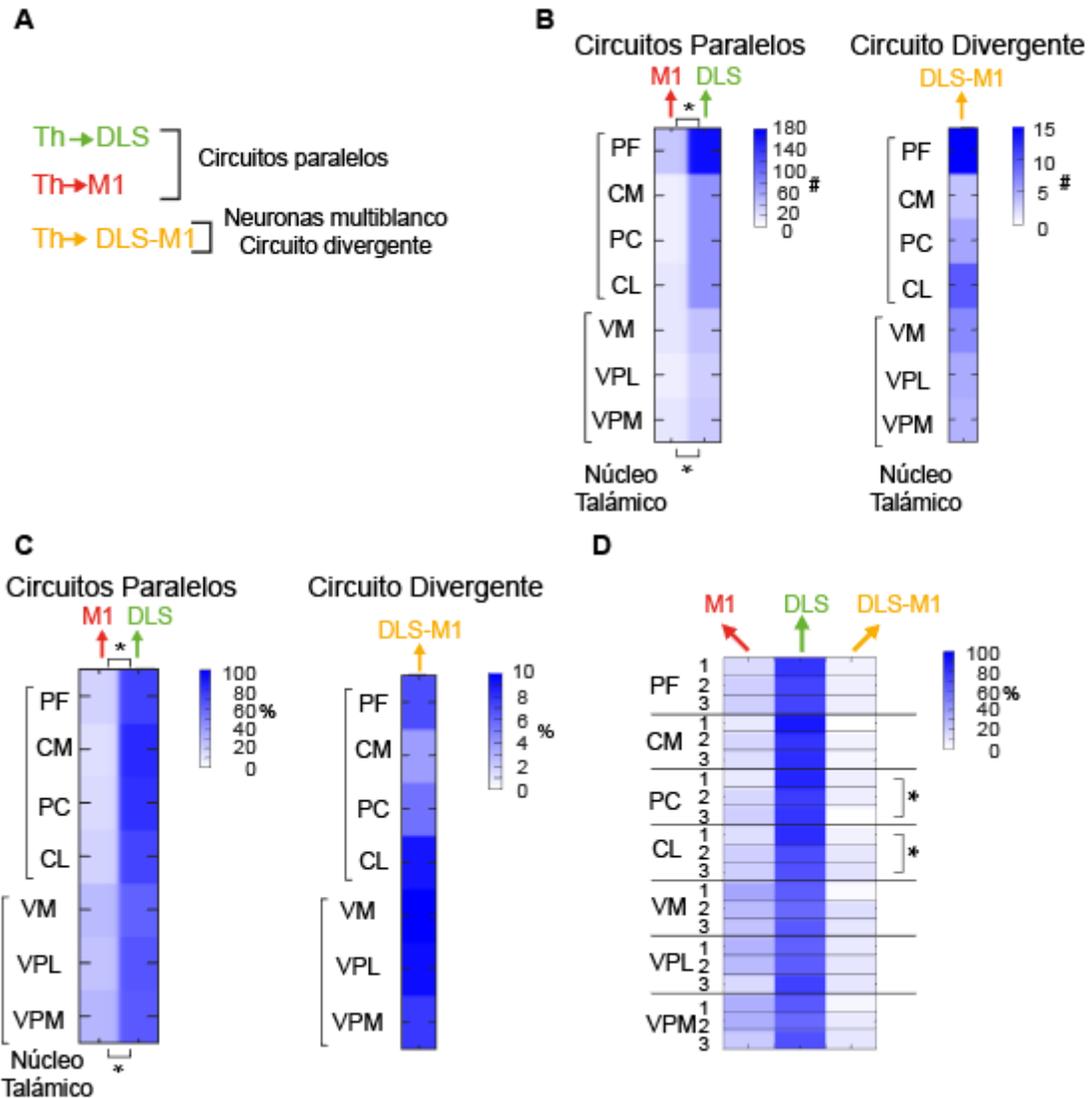


Figura 14. Cuantificación de las neuronas del tálamo proyectando de manera paralela o convergente a la corteza motor (M1) y al estriado dorsolateral (DLS).

A) Anotación del sitio de proyección en circuitos paralelos Th → M1 y Th → DLS, y circuitos divergentes Th → M1-DLS. **B)** Izquierda: número de neuronas que proyectan a M1 y DLS en todos los núcleos estudiados, intralaminares: PF, CM, PC, CL y ventrales: VM, VPL, VPM. Derecha: número de neuronas multiblanco (que proyectan a M1 y DLS simultáneamente). **C)** Mismos datos de B normalizados al número total de células marcadas por núcleo. **D)** Desglose de los datos presentados en B en los tres niveles anteroposteriores cuantificados.

Los núcleos talámicos cuantificados se agruparon en intralaminares (PF, CM, PC, CL) y ventrales (VM, VPL, VPM).

Al calcular la proporción de neuronas multiblanco, con respecto al total de neuronas marcadas por núcleo, se observó que las proporciones de neuronas multiblanco oscilaron de entre el 3.9% en el núcleo CM al 9.9% en el núcleo VM (**Figura 14C**, derecha), no se encontraron diferencias entre las proporciones de neuronas multiblanco entre los núcleos intralaminares comparadas con las proporciones de los núcleos ventrales (neuronas multiblanco de los núcleos Intralaminares 6.57% versus neuronas multiblanco de los núcleos ventrales 9.0%, n= 3 animales, $p>0.05$, prueba χ^2 ; **Figura 14 C** derecha). El análisis de la proporción de células marcadas en el eje anteroposterior (a 3 diferentes niveles) mostró diferencias únicamente en los núcleos PC y CL (n=3 animales, $p>0.05$, test de χ^2 ; **Figura 14 D**).

1.2 Marcaje de las neuronas tálamicas desde la corteza motora secundaria (M2) versus el estriado dorso lateral (DLS)

Del mismo modo que para M1, cuando se inyectaron retrobeads en M2 y el DLS (**Figura 15**), se encontró que hay neuronas de proyección a M2, neuronas de proyección a DLS y neuronas multiblanco, (**Figura 15D**).

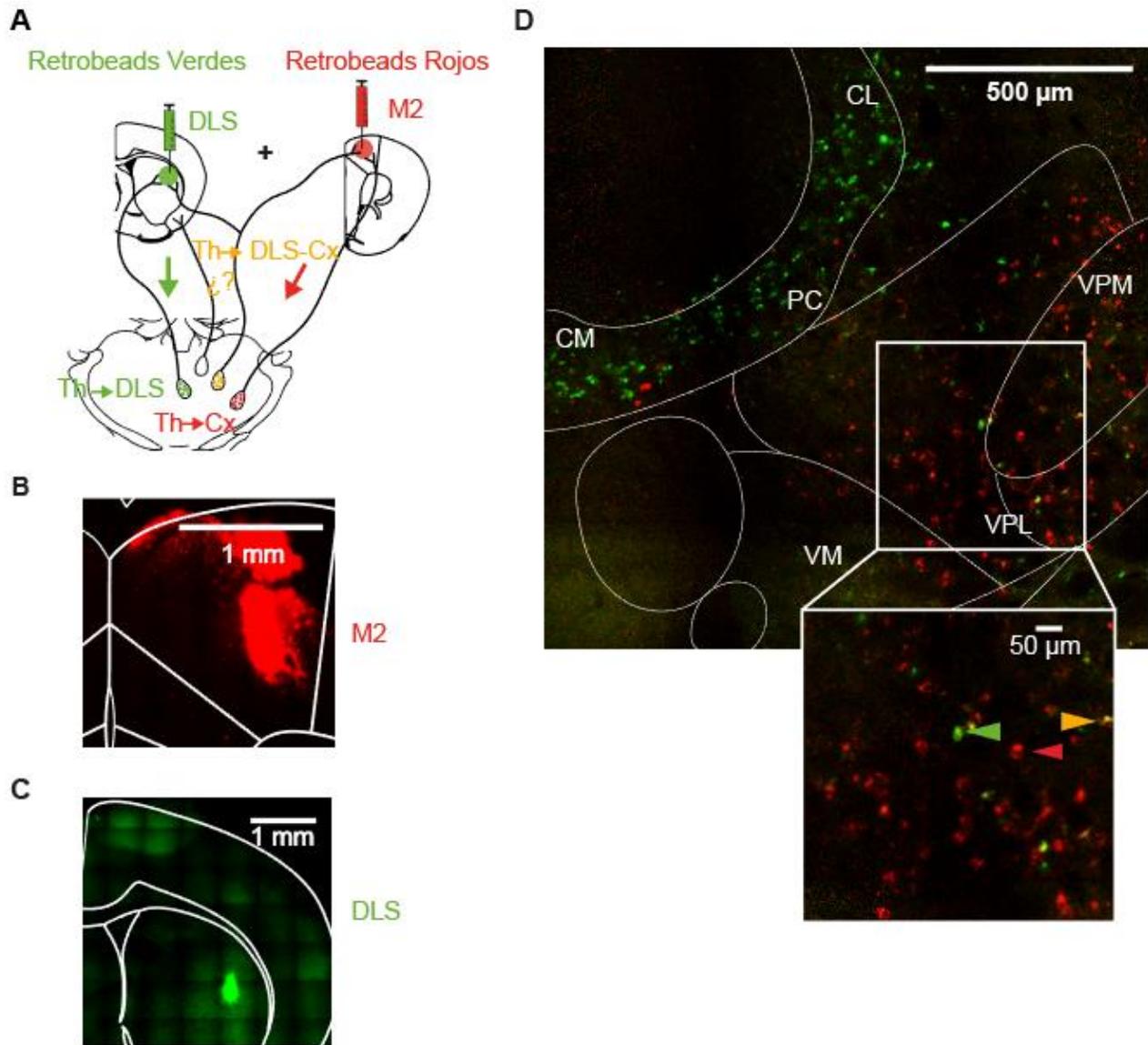


Figura 15: Marcaje retrogrado de neuronas en el tálamo desde la corteza motora (M2) y el estriado dorsolateral (DLS).

A) Esquema de los sitios de inyección de retrobeads en M2 y DLS, y el posible marcaje retrogrado de las neuronas talámicas. **B y C)** Inyección de retrobeads rojos en M2 y verdes en el DLS. **D)** Parte superior: Marca retrógrada en núcleos talámicos, abajo magnificaciones de un área ocupada por neuronas marcadas con retrobeads y magnificación de una neurona marcada con ambos colores, es decir, una neurona multiblanco. Flechas rojas indican una neurona Th → M2, Flechas verdes: Th → DLS y flechas amarillas: neuronas multiblanco Th → M2-DLS.

El número de neuronas con marca retrógrada cuantificadas en los núcleos talámicos mostro que los núcleos intralaminares proyectan en mayor medida al DLS que a M2 (n= 3 animales, $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{DLS} = 63 \pm 10$ versus $Th_{\text{ventrales}} \rightarrow \text{M2} = 12 \pm 0.6$ $p < 0.05$, prueba U de Mann Whitney, **Figura 16B** Izquierda), sin embargo, para esta combinatoria, los núcleos ventrales mostraron un mayor número con marca retrograda desde la corteza M2 (n= 3 animales, $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{DLS} = 11 \pm 1$ versus $Th_{\text{ventrales}} \rightarrow \text{M2} = 40 \pm 10$ $p < 0.05$, prueba U de Mann Whitney, **Figura 16B** Izquierda). Del mismo modo se observó una mayor proporción de neuronas marcadas en los núcleos intralaminares desde el DLS (n= 3 animales, $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{DLS} = 79.8\%$ versus $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{M2} = 15.2\%$, $p < 0.05$, prueba χ^2 , **Figura 16 C** panel izquierdo) y los núcleos ventrales mostraron un mayor porcentaje de marca desde M2 (n= 3 animales, $Th_{\text{ventrales}} \rightarrow \text{DLS} = 21.8\%$ versus $Th_{\text{ventrales}} \rightarrow \text{M2} = 74.4\%$, $p < 0.05$, prueba de χ^2 , **Figura 16 C** panel izquierdo).

En cuanto a las neuronas multiblanco en esta combinatoria, su presencia fue observada en todos los núcleos estudiados, observando que el número de neuronas multiblanco de los núcleos intralaminares fue mayor que en los ventrales (n= 3 animales, neuronas multiblanco de los Intralaminares= 3.9 ± 0.8 versus neuronas multiblanco de los ventrales= 13 ± 0.2 , $p < 0.05$, prueba U de Mann Whitney; **Figura 16B** derecha). No se encontraron diferencias en la proporción de neuronas multiblanco entre los núcleos intralaminares *versus* ventrales (n= 3 animales, neuronas multiblanco intralaminares= 4.8% versus en los ventrales= 3.7% , $p > 0.05$, test de χ^2 ; **Figura 16 B** derecha). El análisis con respecto al eje antero-posterior, solo en el núcleo VPL mostró un gradiente ($p < 0.05$, prueba χ^2 , **Figura 16C**).

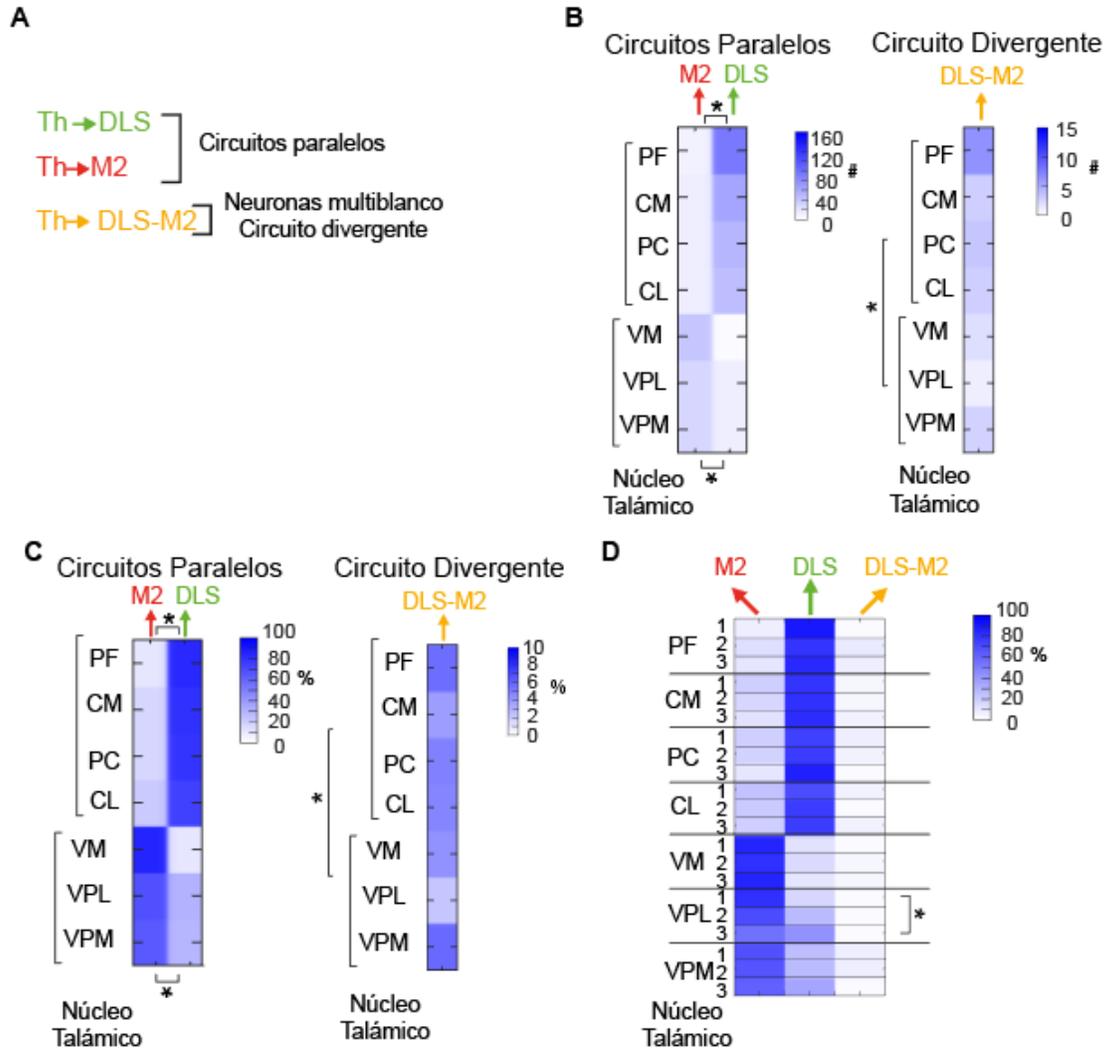


Figura 16. Cuantificación de las neuronas del tálamo proyectando de manera paralela o convergente a corteza premotora (M2) y al estriado dorsolateral (DLS).

- A)** Anotación del sitio de proyección en circuitos paralelos Th → M1 y Th → DLS, y circuitos divergentes Th → M1-DLS.
- B)** Izquierda: número de neuronas que proyectan a M2 y DLS en todos los núcleos estudiados, intralaminares: PF, CM, PC, CL y ventrales: VM, VPL, VPM. Derecha: número de neuronas multiblanco (que proyectan a M2 y DLS simultáneamente).
- C)** Mismos datos de B normalizados al número total de células marcadas por núcleo.
- D)** Desglose de los datos presentados en B en los tres niveles anteroposteriores cuantificados. Los núcleos talámicos cuantificados se agruparon en intralaminares (PF, CM, PC, CL) y ventrales (VM, VPL, VPM).

1.3 Marcaje de las neuronas tálamicas proyectando a la corteza somatosensorial (S1) versus el estriado dorso lateral (DLS)

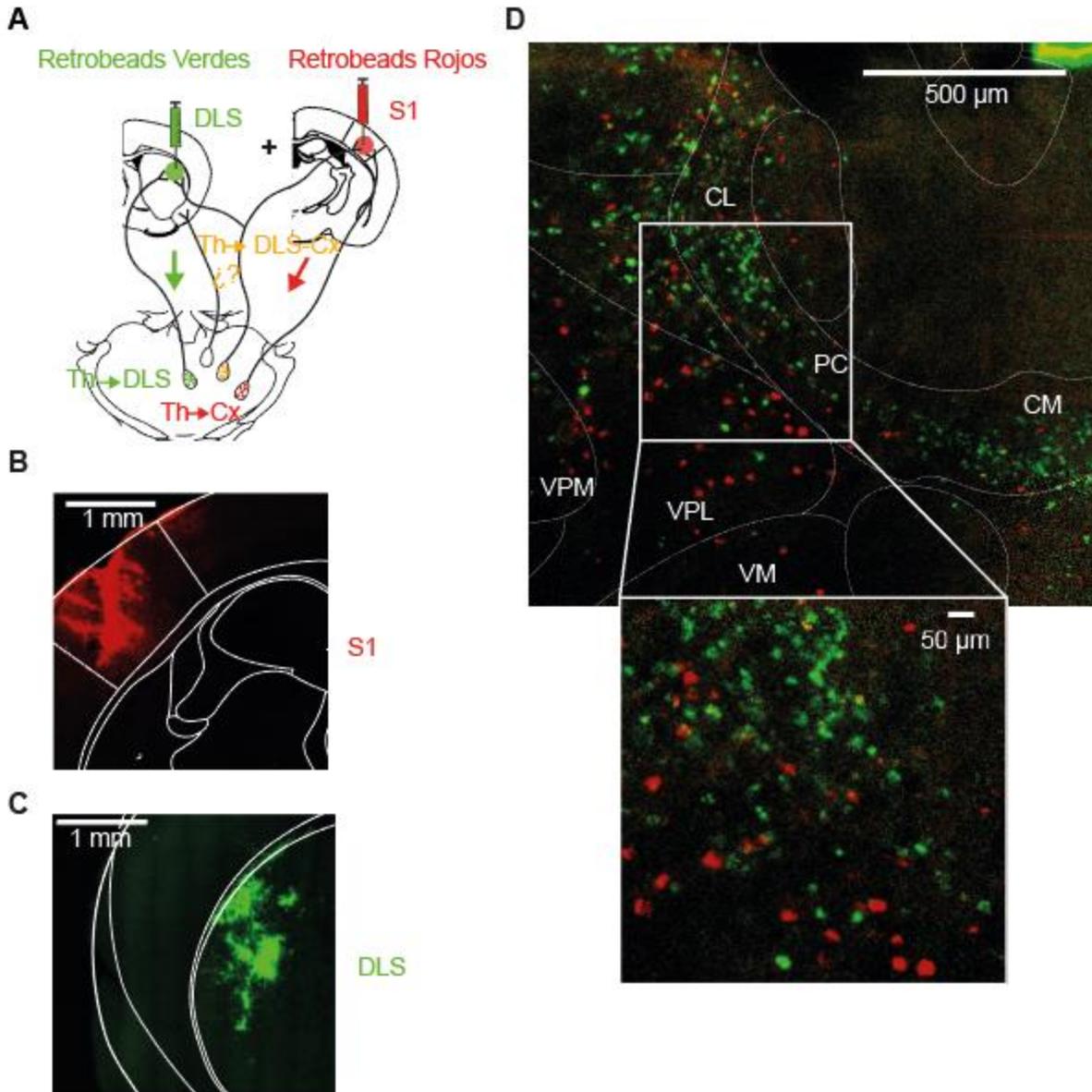


Figura 17: Marcaje retrogrado de neuronas en el tálamo desde la corteza somatosensorial (S1) y el estriado dorsolateral (DLS)

- A)** Arriba: Esquema de los sitios de inyección de retrobeads en M2 y DLS, abajo se representa el posible marcaje de las neuronas talámicas.
B y C) Inyección de retrobeads en M2 (rojo), o en el DLS (verde).
D) Marca retrógrada en núcleos talámicos. Flechas rojas indican una neurona Th→ S1, Flechas verdes: Th→ DLS y flechas amarillas: neuronas multiblanco Th→ S1-DLS.

Posterior a las combinatorias anteriores se probó inyectar retrobeads en corteza S1 y el DLS. Del mismo modo que para las combinatorias M1-DLS y M2-DLS, se observaron neuronas tálamicas que únicamente proyectan a S1, neuronas que únicamente proyectan al DLS y neuronas multiblanco. La **Figura 17** muestra un ejemplo de las neuronas marcadas en el tálamo de manera retrograda desde S1 o el DLS.

Las cuantificaciones de neuronas con marca retrógrada dentro de los núcleos talámicos en la combinatoria S1-DLS mostró que los núcleos intralaminares proyectan en mayor medida hacia al DLS, en comparación con S1 ($n= 3$ animales, $Th_{intralaminares} \rightarrow DLS = 86 \pm 18$ versus $Th_{intralaminares} \rightarrow S1 = 30 \pm 3$ $p < 0.05$, prueba U de Mann Whitney, **Figura 18B**, Izquierda). Los núcleos ventrales mostraron mayor número de neuronas que proyectan a S1 que al DLS ($n= 3$ animales, núcleos ventrales: $Th_{ventrales} \rightarrow DLS = 18 \pm 1$ versus $Th_{ventrales} \rightarrow S1 = 83 \pm 5$, $p < 0.05$, prueba U de Mann Whitney, **Figura 18B**, Izquierda).

Similar a las combinatorias anteriores, se encontraron neuronas multiblanco en todos los núcleos estudiados (**Figura 18B**, derecha). La comparación del número de neuronas multiblanco en los núcleos intralaminares contra las de los núcleos ventrales mostró que los primeros contienen más neuronas multiblanco en número ($n= 3$ animales, neuronas multiblanco de los Intralaminares= 13 ± 0.2 en comparación con neuronas multiblanco de los ventrales= 9 ± 0.6 , $p < 0.05$, prueba U de Mann Whitney; **Figura 18B** derecha). El número de neuronas normalizado al número total marcadas por núcleo mostró diferencia entre los núcleos intralaminares versus ventrales ($n= 3$ animales, neuronas multiblanco de los Intralaminares= 10% versus neuronas multiblanco de los ventrales= 8.4%, $p < 0.05$, prueba de χ^2 ; **Figura 16B** derecha). En cuanto al eje antero-posterior, en el núcleo PF mostró una disminución en la proporción de neuronas de proyección a S1 y un aumento en la proporción de las neuronas de proyección al DLS ($n=3$, $p < 0.05$, test de χ^2 , **Figura 18D**). Otro núcleo en el que se encontró un gradiente de células marcadas con respecto al eje antero-posterior fue el VM, mostrando un aumento en la proporción de neuronas de proyección a S1 y una disminución en la proporción de neuronas de proyección a DLS ($n=3$, $p < 0.05$, prueba χ^2 , **Figura 18D**).

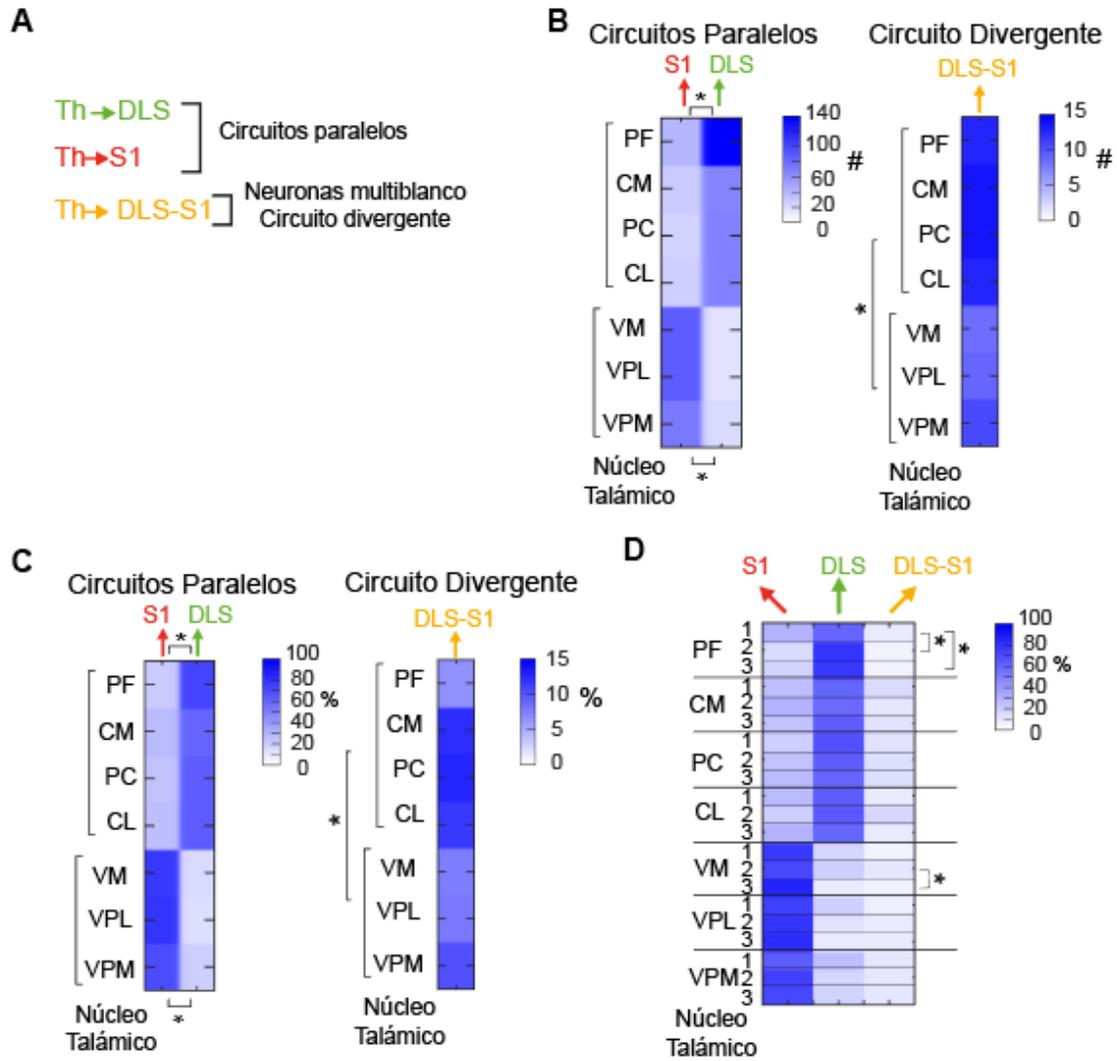


Figura 18 Cuantificación de las neuronas del tálamo proyectando de manera paralela o convergente a corteza somatosensorial (S1) y al estriado dorsolateral (DLS).

- A)** Anotación del sitio de proyección en circuitos paralelos Th→ M1 y Th→ DLS, y circuitos divergentes Th→ M1-DLS.
- B)** Izquierda: número de neuronas que proyectan a S1 y DLS en todos los núcleos estudiados, intralaminares: PF, CM, PC, CL y ventrales: VM, VPL, VPM. Derecha: número de neuronas multiblanco (que proyectan a S1 y DLS simultáneamente).
- C)** Mismos datos de B normalizados al número total de células marcadas por núcleo.
- D)** Desglose de los datos presentados en B en los tres niveles anteroposteriores cuantificados. Los núcleos talámicos cuantificados se agruparon en intralaminares (PF, CM, PC, CL) y ventrales (VM, VPL, VPM).

1.4 Comparación de neuronas multiblanco entre las diferentes cortezas y el DLS

Como se observó en los apartados anteriores 1.1-1.3 las neuronas multiblanco existen en las 3 combinatorias estudiadas: M1-DLS, M2-DLS y S1-DLS (**Figuras 13-18**). La comparación entre las diferentes combinatorias analizadas mostró que las neuronas multiblanco de los núcleos intralaminares del tálamo proyectando a S1-DLS son más que las que proyectan a M2-DLS, sin mostrar diferencias contra las de M1-DLS ($Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{S1-DLS}$: 13 ± 0.2 , $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{M1-DLS}$: 8 ± 2 y $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{M2-DLS}$: 3.9 ± 0.8 , $n=3$ animales, $p<0.05$, prueba U de Mann Whitney, **Figura 19A**, parte superior del gráfico). De manera diferencial no se observaron diferencias en el número de neuronas multiblanco de los núcleos ventrales del tálamo que proyectan a las diferentes cortezas ($Th_{\text{ventrales}} \rightarrow \text{S1-DLS}$: 9 ± 0.6 , $Th_{\text{ventrales}} \rightarrow \text{M1-DLS}$: 5 ± 0.7 , $Th_{\text{ventrales}} \rightarrow \text{M2-DLS}$: 2 ± 0.5 , $n=3$ animales, $p<0.05$, prueba U de Mann Whitney, **Figura 19A**, parte inferior del gráfico).

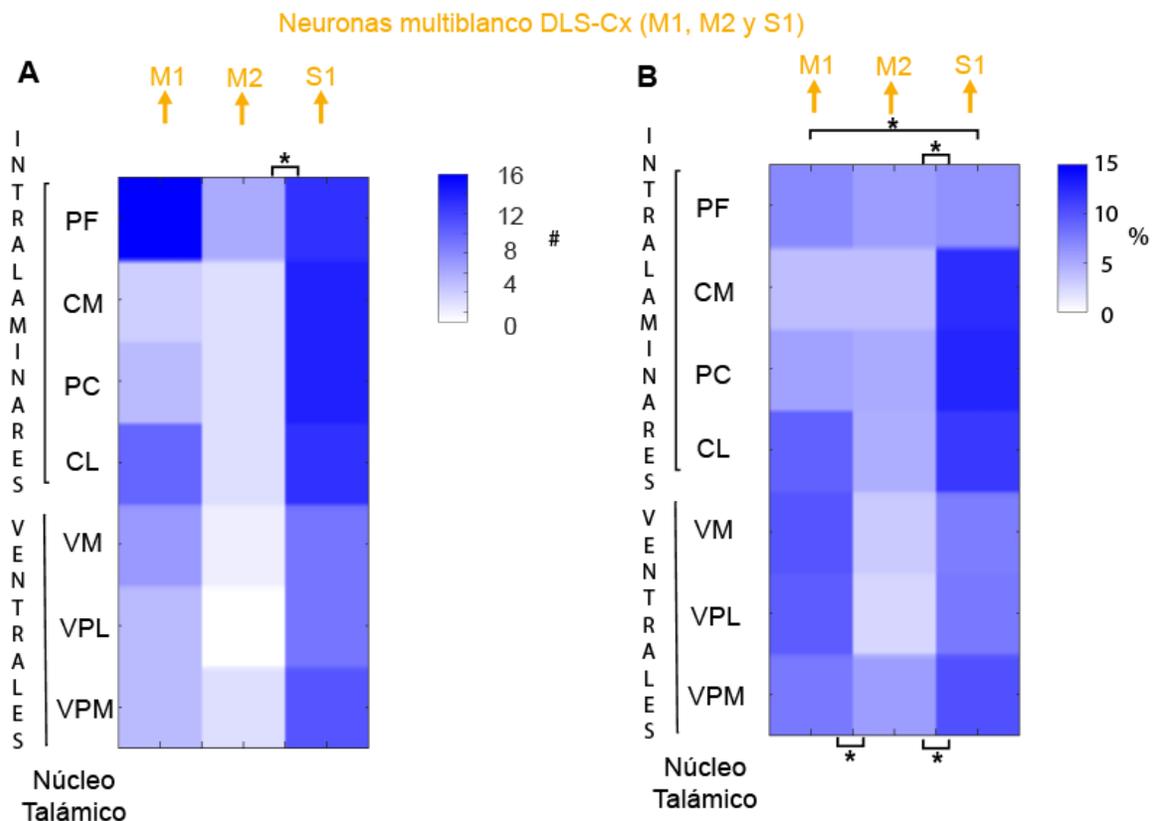


Figura 19. Neuronas proyectando simultáneamente a la corteza y el estriado.

A) Número de neuronas multiblanco de los núcleos intralaminares del tálamo (parte superior: PF, CM, PC, CL) y núcleos ventrales (VM, VPL y VPM) proyectando a M1-DLS, M2-DLS o S1-DLS.

B). Mismos datos que en A normalizados al número de neuronas marcadas por núcleo.

La comparación entre la proporción de neuronas multiblanco por corteza normalizada al total de neuronas marcadas por núcleo mostró que en los núcleos intralaminares existe una mayor proporción de neuronas que proyectan a S1-DLS en comparación con las otras cortezas ($Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{S1-DLS}$: 10%, $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{M1-DLS}$: 6.5%, $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{M2-DLS}$: 4.8%, $n=3$ animales, $p<0.05$, prueba χ^2 , **Figura 19A**, parte superior del gráfico). La misma normalización en los núcleos ventrales mostro que la proporción de neuronas multiblanco que proyectan a S1-DLS y M1-DLS es mayor que las que proyectan a M2-DLS ($Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{S1-DLS}$: 8.4%, $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{M1-DLS}$: 9% y $Th_{\text{intralaminares}} \rightarrow \text{M2-DLS}$: 3.7%, $n=3$ animales, $p<0.05$, test de χ^2 , **Figura 19A**, parte superior del gráfico).

Resultados Parte 2

2.1 Las neuronas tálamo→ corticales no reciben conexiones sinápticas funcionales de las neuronas tálamo→ estriatales

Para poder contestar si existe una interacción sináptica a nivel del tálamo de las neuronas que proyectan al estriado (Th→ DLS) sobre las que proyectan a la corteza (Th→ Cx) se marcó retrógradamente a ambos tipos neuronales utilizando virus adeno-asociados.

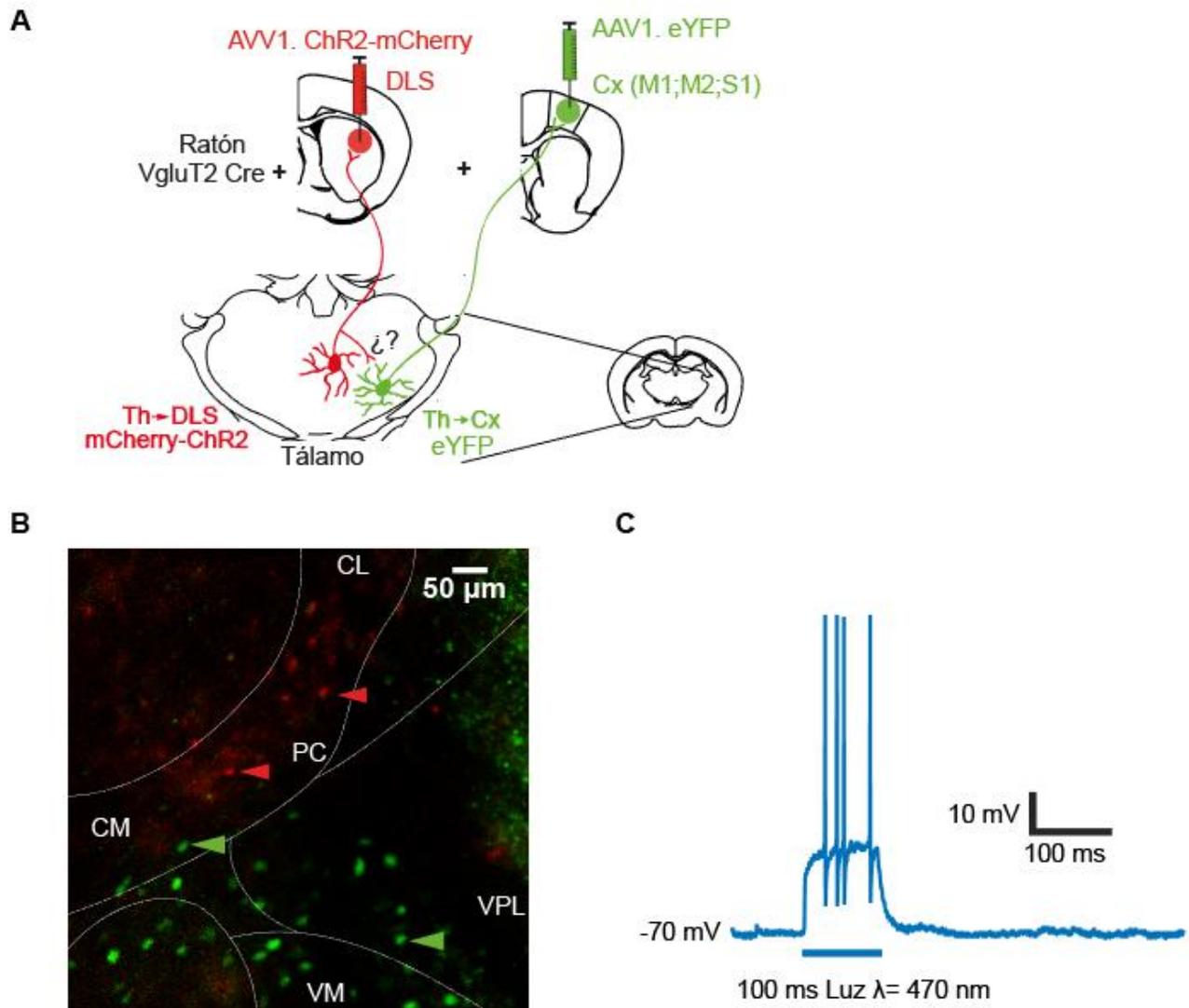


Figura 20: Registros optoelectrofisiológicos.

A) Esquema de los sitios de inyección de virus en M1 y DLS y de neuronas transfectadas retrógradamente: Th→ DLSChR2-mCherry y Th→ M1eYFP. **B)** Neuronas talámicas transfectadas retrógradamente, flechas rojas indican neuronas: Th→ DLSChR2-mCherry y flechas verdes muestran

neuronas Th→ M1_{eYFP}. **C)** Registro de una neurona Th→ DLS_{ChR2-mCherry} mostrando la respuesta en voltaje ante pulsos de luz azul (8 mW) de 100 ms.

En el primer caso se expresó ChR2-mCherry (Th→ DLS_{ChR2-mCherry}) y en el segundo se expresó eYFP (Th→ Cx_{eYFP}). La **figura 20** muestra un ejemplo de la marca retrograda observada en los núcleos talámico y el registro de una neurona Th→ DLS_{ChR2-mCherry} en respuesta a pulsos de luz.

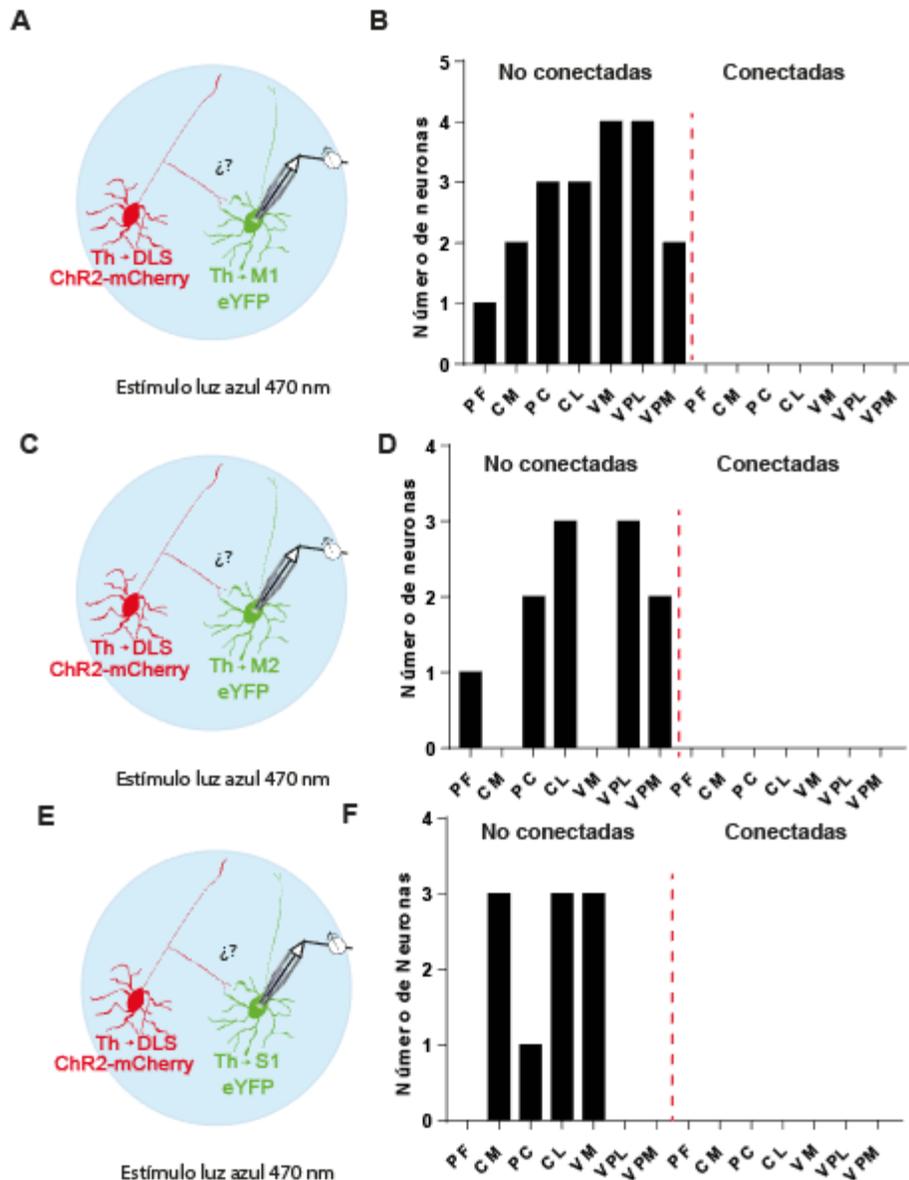


Figura 21: Las neuronas tálamo estriales no conectan sinápticamente sobre las neuronas tálamo→ corticales.

A, C y E) Esquema de registro y estimulación: neuronas Th→ DLS_{ChR2-mCherry} transfectadas con ChR2-mCherry (rojo), neuronas Th→ Cx transfectadas con eYFP (verde), para las tres combinatorias exploradas

B, D y F) Número de neuronas registradas por núcleo talámico que no presentaron conectividad sináptica proveniente de las neuronas tálamo-estriatales. PF: parafascicular, CM: centromedial, PC: paracentral, CL: centrolateral, VM: ventromedial, VPL: ventral posterior lateral, VPM: ventral posterior.

Una vez verificada la funcionalidad de ChR2 procedimos a registrar neuronas Th→ Cx_{eYFP} de tres grupos: Th→ M1_{eYFP}, Th→ M2_{eYFP}, Th→ S1_{eYFP} mientras se activaba a las neuronas Th→ DLS_{ChR2-mCherry} (**Figura 20A**). De un total de 19 Th→ M1_{eYFP}, 11 Th→ M2_{eYFP} y 10 Th→ S1_{eYFP} neuronas registradas en los diferentes núcleos del tálamo en ninguna de estas se detectó conexión sináptica funcional proveniente de las neuronas Th→ DLS_{ChR2-mCherry} (**Figura 21B**).

2.2 Las neuronas tálamo→ estriatales no reciben conexiones sinápticas funcionales de las neuronas tálamo→ corticales (M1)

Continuando con la pregunta de si existe conectividad funcional de las neuronas tálamicas de proyección entre sí, preguntamos si las neuronas tálamo→ corticales conectan funcionalmente con las neuronas tálamo→ estriatales. Para esto se marcó con retrobeads rojos a las neuronas tálamo-estriatales (Th→ DLS_{retrobeads}) y se transfectó Cre desde la corteza (M1) en neuronas tálamo→ corticales, que en una segunda inyección fueron transfectadas para expresar ChR2 directamente en el tálamo (Th→M1_{RetroCre-mCherry-ChR2-eYFP}). Al igual que en los casos anteriores, no se encontró evidencia de que las neuronas tálamo→ corticales formasen conexiones sinápticas funcionales sobre las neuronas tálamo→ estriatales (n= 4, **Figura 22**).

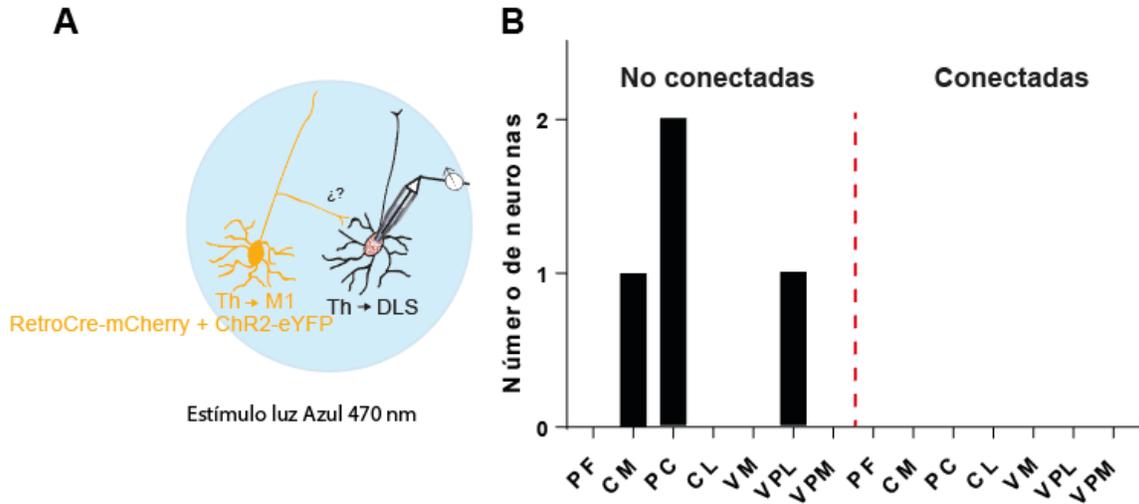


Figura 22: Las neuronas tálamo corticales a M1 no conectan sinápticamente sobre las neuronas tálamo→ estriatales.

A. Esquema de registro y estimulación: neuronas tálamo→ corticales (Th→ M1) transfectadas con RetroCre-mCherry + ChR2-eYFP (en amarillo). Neuronas tálamo→ estriatales (Th→DLS) marcadas con retrobeads rojos.

B) Número de neuronas n=4 Th→ DLS por núcleo talámico que no presentaron conectividad sináptica proveniente de las neuronas Th→ M1.

PF: parafascicular, CM: centromedial, PC: paracentral, CL: centrolateral, VM: ventromedial,

2.3 La comparación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas tálamicas en función del sitio blanco de proyección no las diferencia.

Actualmente existen estudios que han caracterizado la propiedades electrofisiológicas de las neuronas tálamicas en función de su tipo de disparo (Jhangiani-jashanmal *et al.*, 2018), sin embargo a la fecha no se han caracterizado las propiedades de las neuronas tálamicas según el sitio al que proyectan. Por lo tanto, nos dimos a la tarea de comparar las propiedades electrofisiológicas de las neuronas tálamicas registradas, según su sitio de proyección (ver tabla2). Las propiedades electrofisiológicas que se compararon fueron: potencial de membrana en reposo (PMR), resistencia de entrada (R_{in}), umbral del potencial de acción, amplitud del potencial acción y ancho a la mitad de la amplitud (**Figura 23**).

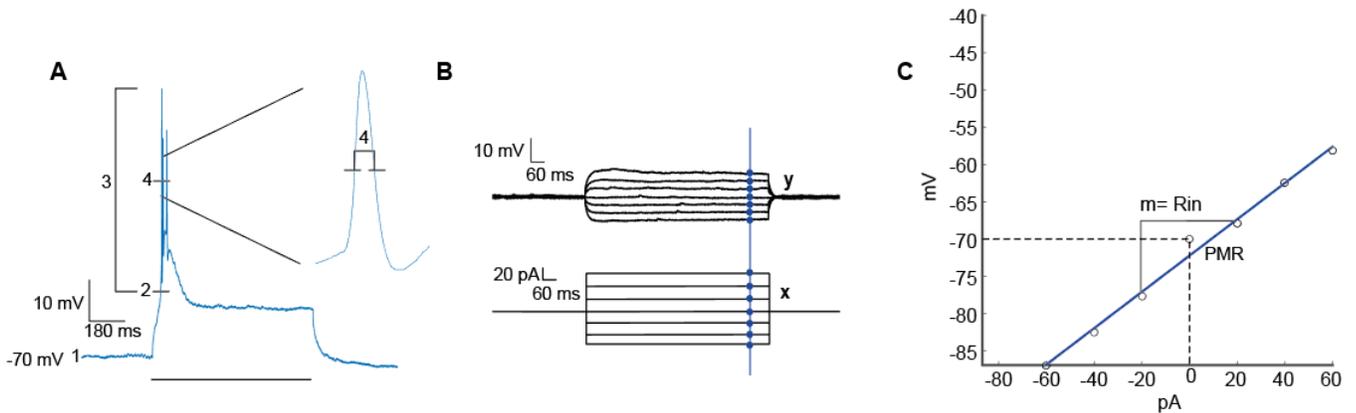


Figura 23: Respuestas del voltaje de una neurona representativa del tálamo en respuesta a inyección de pulsos cuadrados de corriente y ejemplificación de la estimación de la relación corriente-voltaje.

A) Ejemplo del cambio en voltaje generado en una neurona Th→S1 tras aplicar un pulso de corriente de 40 pA de amplitud y 500 ms de duración (línea horizontal abajo); los números indican los parámetros que se tomaron en cuenta para las características electrofisiológicas: 1-Potencial de membrana en reposo, 2- Umbral del potencial de acción, 3-Amplitud del potencial de acción, 4-Ancho a la mitad de la amplitud. Inserto a la derecha muestra una amplificación del potencial de acción.

B) Respuestas en voltaje ante la inyección de pulsos cuadrados de corriente para obtener los valores de la curva corriente-voltaje (IV) mostrada en C. PMR= Potencial de membrana en reposo, m =pendiente, R_{in} = resistencia de entrada, mV = milivolts, pA pico amperes.

La tabla 2 resume la comparación de estos parámetros mostrando que ningún parámetro logra diferenciarlas dependiendo del sitio blanco con el que conectan.

	PMR (mV)	R _{in} (MΩ)	Umbral espiga (mV)	Amplitud espiga (mV)	Ancho a la mitad de la amplitud (ms)
Th→M1					
n= 9					
Promedio ±Error (Max/Min)	-61 ± 1.6 (-69/-53)	216 ± 235 (401/97)	-36 ± 4 (-49/-26)	64 ± 3.72 (85/46.39)	1.8 ± 0.3 (4/0.8)
Th→M2					
n= 7					
Promedio ±Error (Max/Min)	-69 ± 2.8 (-76/-53)	235 ± 33 (358/134)	-40 ± 2.92 (-49/-38)	67 ± 4.56 (87/52)	1.69± 0.2 (3/1.1)
Th→S1					
n=6					
Promedio ±Error (Max/Min)	-64 ± 1.6 (-68/-59)	224 ± 24 (322/122)	-43 ± 1.23 (-46/-39)	64 ± 4.08 (77/53)	1.5 ± 0.1 (1.9/1.2)
Th→M1-DLS					
n=5					
Promedio ±Error (Max/Min)	-67 ± 1.3 (-70/-63)	191 ± 21 (260/135)	-35 ± 3.77 (-46/-28)	60 ± 2.17 (66/53)	1.2 ± 0.1 (1.6/1)

Tabla 2. Tabla con el resumen de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas tálamicas analizadas en función de su sitio blanco de proyección, PMR-potencial de membrana en reposo, R_{in}-Resistencia de entrada, (Max-Min)-Valores máximos y mínimos registrados. Ninguna de las comparaciones obtuvo p<0.05, prueba U de Mann Whitney.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis nos dimos a la tarea de estudiar los circuitos tálamo→ corticales y tálamo→ estriatales, identificando que existen neuronas talámicas que conectan con más de una estructura: neuronas multiblanco que comunican a estructuras que están involucradas con procesos sensorimotors. La existencia de estas neuronas inervando simultáneamente al DLS y a las cortezas M1, M2 y S1 dentro de diferentes núcleos del tálamo no se conocía. Como segunda contribución también observamos que existen neuronas que proyectan únicamente a un sitio (neuronas paralelas) ya sea al DLS o alguna de las cortezas estudiadas. Una tercera contribución es el sumar evidencia que podría indicar que no existen contactos sinápticos entre las neuronas paralelas dentro del tálamo, lo que podría sugerir que estos circuitos poseen un alto nivel de especificidad al transmitir información en los blancos específicos de salida.

Una proporción de las neuronas de proyección del tálamo constituyen circuitos divergentes al estriado y a la corteza, enviando conexiones sinápticas simultáneamente a ambos blancos

Estudios previos han encontrado neuronas talámicas multiblanco hacia estructuras encontradas dentro de circuitos asociativos y límbicos del estriado y las cortezas prefrontal y cingulada (Kuramoto *et al.*, 2017), sin embargo a la fecha no se conocía la existencia de neuronas multiblanco que proyectaran hacia regiones sensorimotoras de los circuitos cortico-estriatales. En este estudio mostramos evidencia de la existencia de neuronas multiblanco proyectando a los circuitos sensorimotors cortico-estriatales, caracterizando la proporción de estas dentro de los núcleos talámicos intralaminares (PF, CM, PC y CL) y ventrales (VM, VPL, VPM).

Para la combinatoria M1-DLS no se encontraron diferencias en el número o proporción de neuronas multiblanco entre los núcleos intralaminares y ventrales (**Figura 14**). Por el contrario, para las combinatorias de M2-DLS y S1-DLS (**Figura 16 y 18**) tanto el número como la proporción de neuronas multiblanco fue mayor en

los núcleos intralaminares en comparación con los núcleos ventrales. De manera importante la corteza que tuvo mayor proporción de neuronas multiblanco fue S1, seguido de M1 y M2 (**Figuras 19**). El resumen de estas proporciones se presenta en la **Figura 24**.

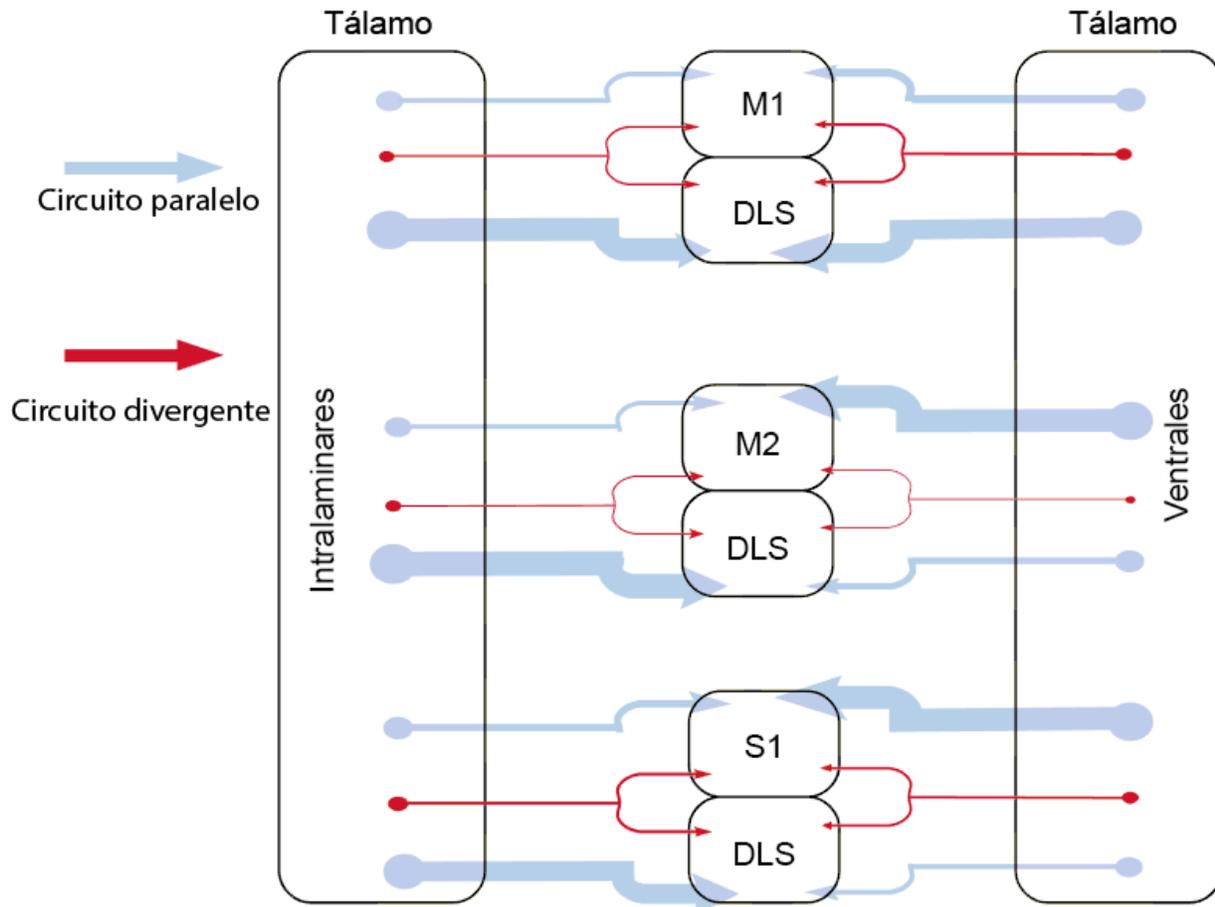


Figura 24. Conectividad del tálamo con regiones telencefálicas asociadas en circuitos sensorimotrices de la corteza y el estriado. En el esquema se muestra los núcleos talámicos intralaminares (lado izquierdo) y los núcleos ventrales (lado derecho) y su conexión con las cortezas estudiadas, neuronas paralelas ya sea Th→ Cx o neuronas Th→ DLS representadas en azul y neuronas multiblanco Th→ Cx-DLS en rojo, el grosor de las líneas hace referencia a la cantidad de neuronas que proyectan a cada sitio.

¿Cuál es la relevancia biológica de la existencia de neuronas multiblanco en los sistemas tálamo→ corticales y tálamo→ estriales?

Sabemos que el tálamo participa en los circuitos tálamo-corteza-estriado. En los modelos clásicos se piensa que es por medio de esta interacción que el tálamo

envía aferencias hacia la corteza y ésta en turno envía conexiones de regreso al tálamo pasando por el estriado (Hunnicuttt *et al.*, 2014) (ver **figura 25**). El tálamo también envía información hacia otros blancos telencefálicos como lo son los ganglios basales, y en particular al núcleo estriado (Díaz-Hernández *et al.*, 2018; Hunnicutt *et al.*, 2016). El estriado también recibe aferencias de la corteza, y termina modulando la actividad del tálamo a través de las salidas de los ganglios basales [e.g. a través del globo pálido y la substantia nigra pars reticulata (Silkis, 2001)]. En turno el tálamo modula a las neuronas de la corteza que envían información procesada a través del tracto piramidal. En conjunto estos circuitos se encargan de transmitir y procesar la información del medio para generar una respuesta ante ello. La documentación de que el tálamo pueda comunicarse simultáneamente con el estriado y con la corteza es relevante porque: 1) no se tiene considerado en los modelos de interacción actual entre el la corteza-los ganglios basales y el tálamo y 2) porque las neuronas multiblanco podrían fungir como monitores de las actividades sensorimotoras debido a que conectan tanto con los ganglios basales como con la corteza.

La observación de que el tálamo contiene un mayor número de neuronas multiblanco que proyectan al DLS-S1 sugiere que las funciones de estas neuronas multiblanco son de mayor importancia al transmitir señales a ambas estructuras postsinápticas. Esto podría explicarse con la sugerencia de que las cortezas motoras aparecieron después que las cortezas somatosensoriales en mamíferos(Kaas, 2014).

. En concreto esto se dedujo de estudios en mamíferos marsupiales del género *opossum* los cuales se ha propuesto poseen un nicho ecológico, morfología, tamaño corporal y cerebral similar a la del primer ancestro mamífero común más antiguo (Harris and Weinberg, 2012), observando en estos animales la ausencia de corteza motora, y observando que la micro-estimulación de S1 en estos organismos evoca movimientos (Dooley *et al.*, 2015; Frost *et al.*, 2000). El hecho de que S1 sea la corteza que más posee neuronas multiblanco podría derivar de que en los primeros mamíferos S1 era la corteza encargada de procesar la información sensorial y generar respuestas motoras (Dooley *et al.*, 2015), por ello es posible que S1

evolutivamente hablando haya requerido de la presencia de neuronas multiblanco que dieran información sobre el procesamiento de la información sensorial e instrucciones motoras a diferentes estructuras cerebrales que integran, procesan y dan respuesta a esta información.

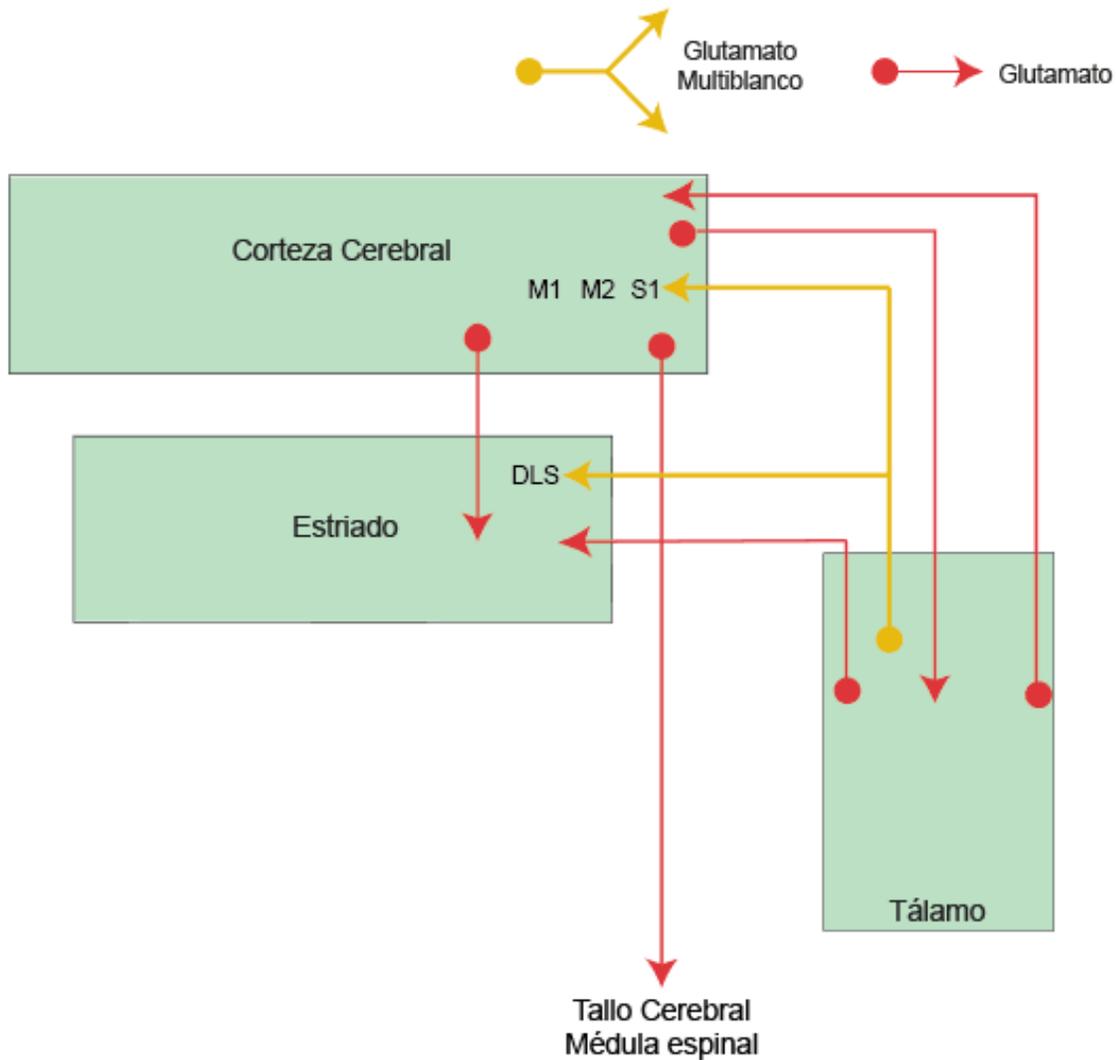


Figura 25. Conectividad del circuito tálamo-cortical-ganglios basales.

En el esquema se muestran las estructuras cerebrales que están involucradas en los circuitos tálamo-cortical-ganglios basales, las conexiones entre cada una de ellas y el tipo de neurotransmisor en cada proyección. En amarillo se señalan las aportaciones de este trabajo: Las neuronas talámicas multiblanco que proyectan tanto a la corteza como al estriado (Th→ Cx-DLS). Tomada y modificada de Mink, 2006.

Dentro de los modelos que ilustran las proyecciones neuronales de las estructuras que conforman el circuito tálamo-cortical ganglios basales, una de las proyecciones talámicas clásicamente estudiadas es la proyección tálamo→ cortical, por otro lado la proyección tálamo→ estriatal ha sido pobremente estudiada y en ocasiones suele excluirse del modelo clásico del circuito (Mink, 2006). Actualmente existe una menor proporción de estudios caracterizado la interacción tálamo-estriado (Bradfield *et al.*, 2013; Díaz-Hernández *et al.*, 2018; Parker *et al.*, 2016). En este trabajo aportamos al modelo clásico de proyecciones talámicas que además de existir neuronas que son paralelas (Th→ Cx o Th→ DLS) existen neuronas multiblanco (**Figura 25**, flechas amarillas). El conocimiento de cómo el tálamo transmite e integra información, además de la arquitectura de sus circuitos, nos puede abrir información de cómo este sistema participa en procesos biológicos complejos como la consciencia (Murray *et al* 2006), la generación de acciones y además nos puede ayudar a comprender procesos patológicos. Por ejemplo en la enfermedad de Parkinson, una característica de esta enfermedad es la pérdida de neuronas dopaminérgicas y sus inervaciones en regiones de los ganglios basales (Mink, 2006), sin embargo, también existe desregulación de la inervación dopaminérgica a la corteza y el tálamo, en particular se ha observado que existe una disminución en las tasas de disparo de neuronas talámicas en zonas ventrales motoras (Galvan and Smith, 2011; Molnar *et al.*, 2019). Uno de los núcleos donde se encontró un mayor número de neuronas multiblanco fueron los núcleos VPM y el PF, por lo que estas neuronas podrían tener un papel crucial tanto en la generación de acciones, como en procesos patológicos como la enfermedad de Parkinson (Lee, 2016; Molnar *et al.*, 2019).

El sistema de proyecciones del tálamo podría poseer un mecanismo por el cual sus blancos de salida podrían estar censando lo que ocurre en otros sitios de proyección del tálamo y quizá funcionar como monitores de instrucciones sensorimotoras, esto podría ser mediante las neuronas multiblanco, que, aunque representaron el menor número de neuronas, estuvieron presentes en todos los núcleos talámicos abarcados en este estudio.

La mayoría de las neuronas talámicas de proyección son de proyección paralela, únicamente a la corteza, o al estriado dorso lateral, y no se comunican entre sí

De los resultados de marcaje retrógrado se observó que la mayor parte de las neuronas talámicas son paralelas, es decir, que solo proyectan a un sitio, ya sea la corteza o el estriado (ver **Figura 25**). Asimismo, los resultados opto-electrofisiológicos mostraron que no existe comunicación entre las neuronas talámicas de proyección a Cx o a él estriado en sus porciones sensorimotoras. Esto es consistente con un estudio reciente de núcleo PF, en el cual se delimitaron sus dominios límbicos, asociativos y somatosensoriales, se vio que estos circuitos no están localmente interconectados (Mandelbaum *et al.*, 2019). Los resultados de esta investigación se suman a lo antes mencionado, siendo el enfoque de este proyecto las porciones sensorimotoras de la corteza y el estriado.

El hecho de que las neuronas talámicas de proyección no se comuniquen entre sí implica que existe cierta especificidad en estos circuitos, podría significar que la información que transmiten las neuronas talámicas ya sea a la corteza o al estriado sea de naturaleza distinta, esto además sustentado por el hecho de que existen dominios dentro de los núcleos talámicos que se diferencian por ser de naturaleza límbica, asociativa y somatosensorial. La división de estos dominios se ha visto a nivel anatómico, electrofisiológico y transcripcional (Mandelbaum *et al.*, 2019) sin embargo, es algo que aún necesita ser estudiado.

Las neuronas de los núcleos ventrales versus las de los núcleos intralaminares del tálamo proyectan a la corteza y al estriado de acuerdo con lo esperado, excepto para el caso de las neuronas marcadas desde M1-DLS

Nuestros resultados y en particular la primera combinatoria estudiada (neuronas que proyectaban a M1-DLS) mostraron que tanto los núcleos intralaminares como los ventrales poseen un mayor número y proporción de neuronas que proyectan hacia el DLS (**Figura 14**). Mientras que para los núcleos intralaminares esto era esperado (Macchi G. *et al.*, 1984) el que esto sucediera en

los núcleos ventrales es contrastante con lo existente en la literatura, ya que diversos estudios han mostrado que los núcleos ventrales proyectan principalmente a la corteza (Hunnicut *et al.* en 2014, Meyer *et al.*, 2010). Esta aparente discrepancia se puede deber a el hecho de que la metodología usada en tales estudios ha sido mediante el uso de estrategias de marcaje neuronal anterógrado lo cual nos muestra la densidad de terminales axónicas dejadas por estas neuronas talámicas en la corteza y otras áreas, de estos estudios se ha observado que la densidad axónica es mayor en la corteza en comparación a la densidad dejada en otras zonas telencefálicas (Hunnicut *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2010). En este estudio encontramos que el número y proporción de neuronas que proyectan a M1 es menor que hacia el DLS (**Figura 14**). Las diferencias entre lo que se ha encontrado en estudios de marcaje anterógrado *versus* lo encontrado en este estudio podría ocurrir debido a que el axón enviado por estas neuronas hacia M1 se ramifique en mayor medida en corteza que los axones enviados a DLS, sin embargo, esto aún necesita ser probado.

Existen diferentes tipos de trazadores neuronales retrógrados, no obstante, existe un problema particular del uso de estos, tal problema se da cuando se tratan de estudiar colaterales axónicos, ya que algunos trazadores neuronales retrógrados tienden a subestimar la presencia de estos colaterales (Schofield *et al.*, 2009). En un estudio previo compararon la eficiencia de distintos trazadores neuronales cuando se quieren evidenciar axones colaterales, los resultados arrojaron que los retrobeads muestran el mayor porcentaje (>96%) de eficiencia al marcar colaterales (Schofield *et al.*, 2009), por lo que el uso de retrobeads es una buena estrategia cuando se quieren estudiar las proyecciones de neuronas con axones colaterales.

Por último, para las otras dos combinaciones de proyección talámica (Th→ M2/DLS; **Figura 15** y Th→ S1/DLS; **Figura 17**), el número de neuronas en los núcleos ventrales, que proyectan a las cortezas fue mayor en comparación con el número y proporción de neuronas que proyectan al DLS, esto de acuerdo con la literatura existente (Hunnicut *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2010; Tlamsa and Brumberg, 2010).

Por otro lado, en una investigación reciente estudiado los campos sensorimotores de la corteza y el tálamo, en particular S1 y el núcleo talámico VPL, se notó que existen efectos conductuales al estimular las fibras del núcleo VPL que llegan al estriado, y que a su vez las neuronas que producen éste efecto son moduladas por las aferencias sensoriales que surgen de las extremidades anteriores, de este modo los campos receptivos del tálamo y sus proyecciones al estriado influyen la conducta, se sabe que el núcleo VPL es preferentemente de dominio sensorial (Hidalgo-Balbuena *et al.*, 2019). En nuestra investigación encontramos que para la combinatorias de Th→ S1/DLS y Th→ M2/DLS, los núcleos ventrales proyectaron en mayor proporción a la corteza, sin embargo, hablando de números, también proyectaron fuertemente al DLS. Por el caso contrario en la combinatoria de Th→ M1/DLS mostró tener mayor proporción de neuronas que proyectan al DLS tanto en los núcleos intralaminares como en los ventrales, esto apoya el argumento de que el tálamo puede influenciar la conducta; y que lesionar las proyecciones del núcleo VPL hacia el estriado provoca efectos conductuales y que está proyección podría ser suficiente para proporcionar un contexto temporal mientras se realiza movimiento (Hidalgo-Balbuena *et al.*, 2019) esto a su vez podría apoyar la idea de que tanto las proyecciones paralelas (Th→ DLS o Th→ Cx) y las proyecciones divergentes (Th→ DLS-Cx) son circuitos altamente específicos que dan información tanto sensorial como temporal al momento de la realización de una acción.

CONCLUSIONES

1. Las neuronas tálamicas multiblanco que simultáneamente inervan al estriado y a la corteza constituyen entre el 3-15%, esto en función de los núcleos analizados.
 - Los núcleos intralaminares “contienen” más neuronas multiblanco que los ventrales inervando en mayor medida a S1-DLS que a M1-DLS o M2-DLS.

2. La mayoría de las neuronas talámicas de proyección son de proyección paralela, únicamente a la corteza, o al estriado dorso lateral, variando su proporción en función del núcleo estudiado.
 - Los núcleos intralaminares proyectan preferentemente al DLS 65-79%.
 - Los núcleos ventrales proyectan preferentemente a las cortezas M2 y S1 (76-75%, respectivamente) no así a M1 (26%).

3. En cuanto a si los circuitos tálamo→ cortical y tálamo→ estriatal (dorsolateral) se comunican entre ellos, la evidencia experimental recabada suma evidencia de que estos circuitos no interaccionan entre sí a nivel del tálamo.

REFERENCIAS

1. Abilez Oscar J., Wong Jonathan, Prakash Rohit, Deisseroth Karl, Zarins Christopher K. and Ellen Kuhl. (2011). Multiscale Computational Models for Optogenetic Control of Cardiac Function. *Biophysical Journal* Volume 101,1326–1334.
2. Alloway, K.D., Smith, J.B., Mowery, T.M., and Watson, G.D.R. (2017). Sensory Processing in the Dorsolateral Striatum: The Contribution of Thalamostriatal Pathways. *11*, 1–19.
3. Aschauer Dominik F, Kreuz Sebastian, Rumpel Simon. (2013). Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. *PLOS ONE*. September 2013 Volume 8, Issue 9, e76310.
4. Balleine BW M Liljeholm and SB Ostlund. (2009). The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research* 199:43–52.
5. Belin, D., Jonkman, S., Dickinson, A., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (2009). Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: Relevance for the understanding of addiction. *199*, 89–102.
6. Berendse HW and Groenewegen HJ. (1990). Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *The Journal of Comparative Neurology* 299:187.
7. Bradfield Laura A.,Bertran-Gonzalez Jesus, W.Balleine. (2013). The Thalamostriatal Pathway and Cholinergic Control of Goal-Directed Action: Interlacing New with Existing Learning in the Striatum. Volume 79, Issue 1, Pages 153-166.
8. Bradfield, L.A., Hart, G., and Balleine, B.W. (2013). The role of the anterior , mediodorsal , and parafascicular thalamus in instrumental conditioning. *7*, 1–15.
9. Britt Jonathan P, McDevitt Ross A and Antonello Bonci. (2012). Use of channelrhodopsin for activation of CNS neurons. *Curr Protoc Neurosci*; CHAPTER: Unit2.16.

10. Bohland, J.W., Wu, C., Barbas, H., Bokil, H., Bota, M., Breiter, H.C., Cline, H.T., Doyle, J.C., Freed, P.J., Greenspan, R.J., et al. (2009). A proposal for a coordinated effort for the determination of brainwide neuroanatomical connectivity in model organisms at a mesoscopic scale. *PLoS Comput. Biol.* 5.
11. Butler, A.B. (2008). Evolution of the thalamus: A morphological and functional review. *Thalamus Relat. Syst.* 4, 35–58.
12. Cicirata, F., Angaut, P., Cioni, M., Serapide, M.F., and Papale, A. (1986). Functional organization of thalamic projections to the motor cortex. An anatomical and electrophysiological study in the rat. *Neuroscience* 19, 81–99.
13. Collins, D.P., Anastasiades, P.G., Marlin, J.J., Carter, A.G., Collins, D.P., Anastasiades, P.G., Marlin, J.J., and Carter, A.G. (2018). Reciprocal Circuits Linking the Prefrontal Cortex with Dorsal and Ventral Thalamic Nuclei. *Neuron* 366–379.
14. Concha, M.L., and Wilson, S.W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* 199, 63–84.
15. Crunelli Vincenzo, Connelly William Martin and Usrey W. Martin. (2016). *Thalamic Function - Beyond a Simple Relay*. Frontiers Media SA. 231 pages.
16. Díaz-Hernández, E., Contreras-López, R., Sánchez-Fuentes, A., Rodríguez-Sibrian, L., Ramírez-Jarquín, J.O., and Tecuapetla, F. (2018). The Thalamostriatal Projections Contribute to the Initiation and Execution of a Sequence of Movements. *Neuron* 100, Issue 3, 739-752.e5.
17. Do-Monte Fabricio H., Minier-Toribio Angelica, Quiñones-Laracuenta Kelvin, Medina-Colon Estefania M., and J. Quirk Gregory. (2017) Thalamic Regulation of Sucrose Seeking during Unexpected Reward Omission. *Neuron* 94, Issue 2, 388–400.
18. Franca, J.G., Seelke, A.M.H., Cooke, D.F., and Krubitzer, L.A. (2015). Evolution of mammalian sensorimotor cortex: Thalamic projections to parietal cortical areas in *Monodelphis domestica*. *Front. Neuroanat.* 8, 1–21.

19. Fremeau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J and Edwards RH. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*; 31:247–260.
20. Frost, S.B., Milliken, G.W., Plautz, E.J., Masterton, R.B., and Nudo, R.J. (2000). Somatosensory and motor representations in cerebral cortex of a primitive mammal (*Monodelphis domestica*): A window into the early evolution of sensorimotor cortex. *J. Comp. Neurol.* 421, 29–51.
21. Galvan, A., and Smith, Y. (2011). The primate thalamostriatal systems: Anatomical organization, functional roles and possible involvement in Parkinson's disease. *Basal Ganglia* 1, 179–189.
22. Gerfen CR, Bolam JP. (2010). The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*, 1st edn. New York: Elsevier.
23. Gruber, A.J., and McDonald, R.J. (2012). Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Front Behav Neurosci.* 6, 1–26.
24. Guzowski, J.F., Timlin, J.A., Roysam, B., Bruce, L., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2005). Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current Opinion in Neurobiology* 599–606.
25. Harris, K.M., and Weinberg, R. (2012). *Mammalian Brain*. Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* 4, 1–30.
26. Hidalgo-Balbuena, A.E., Luma, A.Y., Pimentel-Farfan, A.K., Peña-Rangel, T., and Rueda-Orozco, P.E. (2019). Sensory representations in the striatum provide a temporal reference for learning and executing motor habits. *Nat. Commun.* 10, 1–15.
27. Hunnicutt, B.J., Long, B.R., Kusefoglou, D., Gertz, K.J., Zhong, H., and Mao, T. (2014). resource A comprehensive thalamocortical projection map at the mesoscopic level. *Nat. Publ. Gr.* 17, 1276–1285.
28. Hunnicutt, B.J., Jongbloets, B.C., Birdsong, W.T., Gertz, K.J., Zhong, H., and Mao, T. (2016). A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals

- novel functional organization. *Elife* 5.
29. Jhangiani-jashanmal, I.T., Yamamoto, R., Gungor, N.Z., and Paré, D. (2018). Electroresponsive properties of rat central medial thalamic neurons. *J Neurophysiol* 07102, 1533–1541.
 30. Jones Edward G. (2007). *The Thalamus*. Cambridge University Press, Second edition, volumen I. United Kingdom. 702 pages.
 31. Kaas, J.H. (2014). The Evolution of somatosensory and motor cortex in primates. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 281, 1148–1156.
 32. Kaas, J.H. (2014). The Evolution of Brains from Early Mammals to Humans. *Interdiscip Rev Cogn Sci*; 4(1): 33–45.
 33. Kuramoto, E., Pan, S., Furuta, T., Tanaka, Y.R., Iwai, H., Yamanaka, A., Ohno, S., Kaneko, T., Goto, T., and Hioki, H. (2017). Individual Mediodorsal Thalamic Neurons Project to Multiple Areas of the Rat Prefrontal Cortex : A Single Neuron-Tracing Study Using Virus Vectors. 185, 166–185.
 34. Lerner, T.N., Ye, L., and Deisseroth, K. (2016). Communication in Neural Circuits : Tools , Opportunities , and Challenges. *Cell* 164, 1136–1150.
 35. Luo, L., Callaway, E.M., and Svoboda, K. (2008). Genetic Dissection of Neural Circuits. *Neuron* 57, 634–660
 36. Mandelbaum, G., Taranda, J., Haynes, T.M., Robertson, K., Osten, P., Sabatini, B.L., Mandelbaum, G., Taranda, J., Haynes, T.M., Hochbaum, D.R., et al. (2019). Distinct Cortical-Thalamic-Striatal Circuits through the Parafascicular Nucleus Article Distinct Cortical-Thalamic-Striatal Circuits through the Parafascicular Nucleus. *Neuron* 102, 636-652.e7.
 37. Marcchi G. Bentiglovio M. Molinari M. Manciacchi D.(1984). The thalamo-caudate versus the thalamo-cortical projections as studied in the cat with fluorescent retrograde double labeling. *Exp Brain Res* 54:225-239.
 38. Matsumoto Naoyuki *et al.* (2001). Neurons in the Thalamic CM-Pf Complex Supply Striatal Neurons with Information About Behaviorally Significant Sensory Events. The American Physiological Society, 0022-3077/0.
 39. Meyer, H.S., Wimmer, V.C., Hemberger, M., Bruno, R.M., Kock, C.P.J. De, Frick, A., Sakmann, B., and Helmstaedter, M. (2010). Cell Type--Specific

- Thalamic Innervation in a Column of Rat Vibrissal Cortex. *Cerebral Cortex* 2287–2303.
40. Mink, J.W. (2006). Functional anatomy of the basal ganglia. *Handb. Dystonia* 45–56.
 41. Molnar, G.F., Pilliar, A., Lozano, A.M., and Dostrovsky, J.O. (2019). Differences in Neuronal Firing Rates in Pallidal and Cerebellar Receiving Areas of Thalamus in Patients With Parkinson's Disease, Essential Tremor, and Pain. *J Neurophysiol* 3094–3101.
 42. Otake, K., and Nakamura, Y. (1998). Single Midline Thalamic Neurons Projecting To Both The Ventral Striatum And The Prefrontal Cortex In The Rat. *Neuroscience* 86, 635–649.
 43. Pan, W.X., Mao, T., and Dudman, J.T. (2010). Inputs to the dorsal striatum of the mouse reflect the parallel circuit architecture of the forebrain. *Front. Neuroanat.* 4, 1–14.
 44. Parker, P.R.L., Lalive, A.L., and Kreitzer, A.C. (2016). Pathway-Specific Remodeling of Thalamostriatal Synapses in Parkinsonian Mice. *Neuron* 89, 734–740.
 45. S. Murray Sherman and R. W. Guillery. (2006). *The Thalamus and its role in the cortical function.* The MIT Press, Second edition. United States of America. 484 pages.
 46. Schofield, B.R., Schofield, R.M., Sorensen, K. a., and Motts, S.D. (2009). On the use of retrograde tracers for identification of Axon Collaterals With Multiple Fluorescent retrograde tracers. *Neuroscience* 146, 773–783.
 47. Steriade Mircea and Llinás Riascos Rodolfo. American. (2019). The functional states of the Thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiological Reviews* 68, 649-742.
 48. Tlamsa, A.P., and Brumberg, J.C. (2010). Organization and morphology of thalamocortical neurons of mouse ventral lateral thalamus. *Somatosensory and Motor Research* 0220. 34–43.
 49. Thorn, C.A., Atallah, H., Howe, M., and Graybiel, A.M. (2010). Article Differential Dynamics of Activity Changes in Dorsolateral and Dorsomedial

- Striatal Loops during Learning. *Neuron* 66, 781–795.
50. Viaene, A.N., Petrof, I., and Sherman, S.M. (2010). Synaptic Properties of Thalamic Input to Layers 2/3 and 4 of Primary Somatosensory and Auditory Cortices. *J. Neurophysiol.* 105, 279–292.
 51. Viaene, A.N., Petrof, I., and Sherman, S.M. (2011). Synaptic Properties of Thalamic Input to the Subgranular Layers of Primary Somatosensory and Auditory Cortices in the Mouse. *J. Neurosci.* 31, 12738–12747.
 52. Wang, X., Vaingankar, V., Sanchez, C.S., Sommer, F.T., and Hirsch, J.A. (2010). Thalamic interneurons and relay cells use complementary synaptic mechanisms for visual processing. *Nat. Publ. Gr.* 14, 224–231.
 53. Wilson C. J. Chang H. T. and Kita S. T. (1983). Origins of post synaptic potentials evoked in spiny neostriatal projection neurons by thalamic stimulation in the rat. *Exp Brain Res*,51:217-226.
 54. Yin, H.H., and Knowlton, B.J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews* 7, 464–476.
 55. York, N. (1974). Organization of projection from the thalamic nuclei to the motor cortex in the cat relay. *Brain Res* 71, 515–522.