



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

INTEGRACIÓN BILATERAL EN EL ESTRIADO DORSOLATERAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS PRESENTA

ANA KAREN PIMENTEL FARFÁN
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TUTOR PRINCIPAL
DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DR. VICTOR HUGO DE LAFUENTE FLORES
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto fue desarrollado en el laboratorio A02 “Neurofisiología de los hábitos” del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla bajo la dirección del Dr. Pavel E. Rueda Orozco con el apoyo de los proyectos de UNAM-DGAPA-PAPIIT: IA201918, IA201020, CONACyT FDC_1702.

La sustentante perteneció al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y recibió una beca por parte del CONACyT con el número 463747.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Neurobiología, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Posgrado en Ciencias Biomédicas.

Al Dr. Pavel E. Rueda Orozco por su mentoría y confianza durante estos cinco años, sus enseñanzas son invaluableles.

A la Dra. María Teresa Peña Rangel y a la Dra. Claudia I. Pérez por su gran apoyo en el desarrollo de los experimentos.

Augusto Cuahutli Pacheco por su dedicación en el cuidado de los animales.
A las integrantes del laboratorio A02, Annie, Paola, Bárbara, Ana Elizabeth, Diana, Ana Silvia, Perla, Mario y Oswaldo por haber hecho de estos años mejores.

A los integrantes del Comité Tutor, el Dr. Óscar Próspero García y el Dr. Víctor Hugo de Lafuente Flores por sus aportaciones y buenas preguntas.

A las integrantes del Jurado de Examen de Grado, la Dra. Violeta Gisselle López Huerta, la Dra. Alejandra Evelyn Ruíz Contreras, la Dra. María Florencia Assaneo y el Dr. Francisco Xavier Sotres Bayón, por dar lectura a la presente tesis y enriquecerla con sus comentarios.

A las responsables de las Unidades de Apoyo del Instituto de Neurobiología: el MVZ Martín García y la Dra. Alejandra Castilla del Laboratorio Universitario de Bioterio, el Dr. Juan José Ortiz Retana de la Unidad de Resonancia Magnética, la Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano y la Dra. Elsa Nydia Hernández de la Unidad de Microscopía, la Dra. Anaid Antaramian Salas y la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica, a María del Carmen Mendoza López y a Nuri Aranda López de la Unidad de Enseñanza.

Dedicatoria

*A mi madre y hermanos, a mi familia, a mis amigas y amigos,
A quienes están y a quienes se han ido,
Porque, no importa de qué modo, dejaron algo de su esencia en mí.*

Índice

Abstract	vii
Resumen	viii
Resumen gráfico	ix
Lista de abreviaturas	x
Lista de figuras	xi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 <i>Anatomía de los ganglios basales</i>	3
2.1.1. El estriado en el aprendizaje procedimental	5
2.1.2. Representaciones en el estriado dorsolateral: secuencias de acciones y cinemática del movimiento	7
2.2. <i>Aferencias cortico-estriatales</i>	10
2.2.1. Interacciones cortico-estriatales.....	14
2.2.2. Redes neuronales de los movimientos bimanuales	15
3. Justificación	17
4. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos	17
5. Métodos	19
5.1. <i>Animales</i>	19
5.2. <i>Modelo conductual y aparato de entrenamiento</i>	20
5.2.2. Moldeamiento	22
5.2.3. Análisis de las trayectorias	23
5.3. <i>Lesiones</i>	25
5.3.1. Lesiones farmacológicas y cuantificación de las lesiones	25
5.3.2. Imagen por resonancia magnética	25
5.3.3. Procesamiento de IRM T2	25
5.4. <i>Optogenética</i>	26
5.4.1. Virus retrógrados	26
5.4.2. Manipulaciones optogenéticas	26
5.5. <i>Electrofisiología</i>	27
5.5.1. Registros agudos en animal anestesiado	27
5.5.2. Implantes y registros crónicos de animales en libre movimiento	29

5.5.3.	Adquisición y procesamiento de datos electrofisiológicos	30
5.5.4.	Análisis de actividad neuronal en animales anestesiados	30
5.5.5.	Análisis de la actividad neuronal en animales en libre movimiento..	30
5.5.6.	Análisis estadísticos.....	31
6.	Resultados.....	33
6.1.	<i>Diseño y estandarización de una tarea de coordinación bimanual para ratas</i>	<i>33</i>
6.2.	<i>Lesión unilateral del estriado dorsolateral y evaluación de su efecto en el movimiento bimanual.....</i>	<i>35</i>
6.3.	<i>Manipulación optogenética de la actividad neuronal de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales (M2-IT) durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual.....</i>	<i>42</i>
6.4.	<i>Registro de la actividad de las neuronas del EDL durante la estimulación optogenética de las proyecciones M2-IT y de la ejecución de la tarea de coordinación bimanual.....</i>	<i>46</i>
6.5.	<i>Participación de las poblaciones neuronales del EDL durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual y evaluación de su respuesta ante la estimulación de las neuronas M2-IT.....</i>	<i>53</i>
7.	Discusión.....	55
8.	Limitaciones y perspectivas	59
9.	Resumen de resultados.....	61
10.	Conclusión	61
11.	Referencias	62
12.	Anexos.....	72
13.	Figuras suplementarias	79

Abstract

Movement initiation and control require the orchestrated activity of sensorimotor cortical and subcortical regions. However, the exact contribution of specific pathways and their interactions to the final behavioral outcome is still under study. Here, by combining structural lesions, pathway-specific optogenetic manipulations, and freely moving electrophysiological recordings in freely moving rats, we studied cortico-striatal interactions in the context of forelimb bilaterally coordinated movements. We provide evidence indicating that bilateral actions are initiated by motor cortical regions where intratelencephalic bilateral cortico-striatal projections (bcs-IT) recruit the sensorimotor striatum to provide stability and duration to already commanded bilateral movements. Furthermore, striatal spiking activity was correlated with movement duration and kinematic parameters of the execution. Notoriously, bcs-IT stimulation affected only the representation of movement duration but spared that of kinematics. Our findings confirm the modular organization of information processing in the striatum and its involvement in moment-to-moment movement control but not initiation or selection.

Keywords: bimanual coordinated movements, bilateral cortico-striatal neurons, dorsolateral striatum.

Resumen

El inicio y control del movimiento requiere de la actividad coordinada entre regiones sensoriomotoras corticales y subcorticales. Sin embargo, la contribución específica de esas vías y sus interacciones para el resultado final del movimiento aún no es concluyente. En este proyecto combinamos lesiones estructurales, manipulaciones optogenéticas de vías cortico-estriatales específicas y registros en libre movimiento en ratas con el objetivo de estudiar las interacciones cortico-estriatales en el contexto de movimientos bilateralmente coordinados de las patas delanteras. Encontramos evidencia que indica que el movimiento bilateral se inicia en regiones motoras corticales, donde las neuronas intratelencefálicas cortico-estriatales reclutan al estriado sensoriomotor para proveer estabilidad y modular la duración al movimiento bimanual previamente iniciado. Además, la actividad estriatal de neuronas únicas en el estriado dorsolateral correlaciona con la duración del movimiento bimanual y con parámetros cinemáticos de la ejecución. Notablemente, la estimulación de las neuronas cortico-estriatales bilaterales incrementó la duración del movimiento bimanual, pero mantuvo intacta la representación de los parámetros cinemáticos de la ejecución de la tarea. Estos hallazgos confirman el procesamiento modular de información en el estriado y su rol para monitorear los movimientos momento-a-momento pero no como selector de éstos.

Palabras clave: movimientos bimanualmente coordinados, neuronas cortico estriatales bilaterales, estriado dorsolateral.

Resumen gráfico

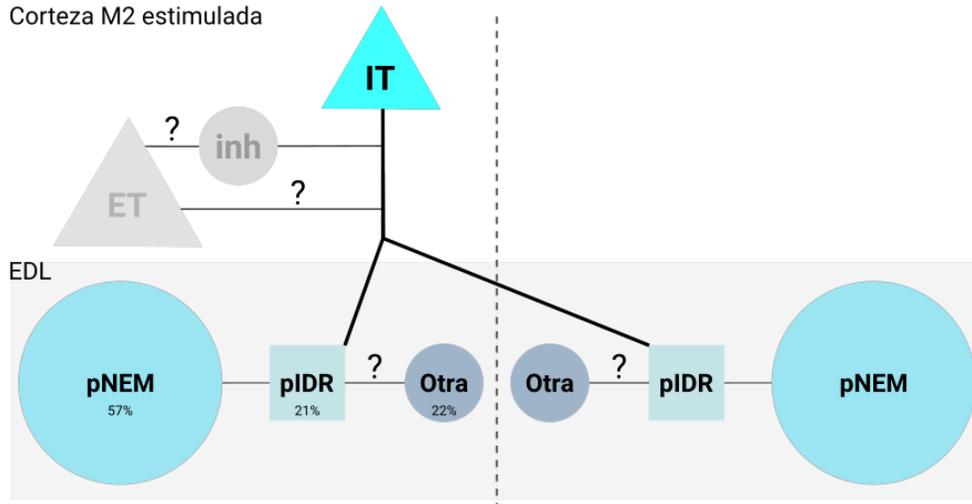
Las neuronas cortico-estriatales bilaterales son indispensables para coordinar los movimientos bimanuales y el estriado dorsolateral modula los componentes unilaterales del movimiento

Neuronas que codifican la cinemática
13% (101) off / 13% (107) on

Neuronas bimanuales
22% (172) off / 23% (181) on



Corteza M2 estimulada



Lista de abreviaturas

cc	Cuerpo caloso
DA	Dopamina
EDL	Estriado dorsolateral
EDM	Estriado dorsomedial
ET	Neuronas extratelencefálicas
EV	Estriado ventral
EYFP	Proteína amarilla fluorescente (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
GB	Ganglios basales
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
IDR	Interneuronas de disparo rápido
IT	Neuronas intratelencefálicas
M1	Corteza motora primaria
M2	Corteza motora secundaria
NEMs	Neuronas espinosas medianas
NST	Núcleo subtalámico
S1	Corteza somatosensorial primaria
SNpc	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNpr	Sustancia nigra <i>pars reticulata</i>

Lista de figuras

Figura 1. Esquema del modelo clásico de los GB en el cerebro de roedor.....	4
Figura 2. Distribución laminar de las neuronas excitadoras de proyección en roedores.....	11
Figura 3. Densidad de proyecciones de regiones motoras y somatosensoriales..	13
Figura 4. Caja de entrenamiento para la tarea de coordinación bimanual y aparatos para el registro conductual.....	21
Figura 5. Fase de moldeamiento en la tarea de coordinación bimanual.....	22
Figura 6. Trayectorias representativas y análisis del movimiento bimanual y unimanual.....	24
Figura 7. Esquema del protocolo de infecciones virales.....	26
Figura 8. Protocolos experimentales para el registro de actividad neuronal y estimulación optogenética en animales anestesiados y en libre movimiento.....	28
Figura 9. Parámetros conductuales colectados durante registros en libre movimiento.....	32
Figura 10. Curvas de aprendizaje en la tarea de coordinación bimanual.....	34
Figura 11. La lesión del estriado dorsolateral afecta el desempeño de la tarea de coordinación bimanual.....	36
Figura 12. La lesión unilateral del estriado dorsolateral afecta parámetros de la ejecución unilateralmente.....	37
Figura 13. La lesión unilateral en el EDL desestabiliza la ejecución de la tarea de coordinación bimanual en animales sobre entrenados.....	38
Figura 14. Lesiones unilaterales en M1 o M2 no producen cambios en el aprendizaje de la tarea coordinación bimanual.....	40
Figura 15. La lesión unilateral de M2 en animales expertos (sobrentrenados) no afecta el desempeño de la tarea de coordinación bimanual.....	41
Figura 16. Estrategia para la estimulación optogenética de las proyecciones bilaterales cortico-estriatales de M2.....	43
Figura 17. La estimulación unilateral de las proyecciones bilaterales de M2 incrementa la duración del movimiento.....	45
Figura 18. Activación secuencial de la actividad del EDL durante los movimientos bimanualmente coordinados.....	47
Figura 19. La representación cinemática en el EDL no se afecta por la estimulación de las proyecciones cortico-estriatales de M2.....	49

Figura 20. Las representaciones de la duración del movimiento en el EDL son afectadas por la estimulación M2	51
Figura 21. Representación de la tarea de coordinación bimanual en subpoblaciones del EDL	54
Figura 22. La lesión unilateral del estriado dorsolateral afecta parámetros de la ejecución unilateralmente.....	79
Figura 23. La representación cinemática en el EDL no es afectada por la estimulación continua de M2-IT.....	80

1. Introducción

El estriado, el principal núcleo de entrada de los ganglios basales, es una estructura bilateral en cuya porción dorsolateral converge información somatosensorial y motora. Existe evidencia que apoya la idea de que el estriado funciona como un selector de acciones (Barnes et al., 2005; Jin & Costa, 2010; Martiros et al., 2018), con base en la función antagónica de las vías de las neuronas principales en la producción del movimiento, y a que su actividad neuronal se incrementa al inicio y al término de una secuencia de acciones. Por otro lado, se ha demostrado que el estriado codifica parámetros cinemáticos de los movimientos como la velocidad, la posición, el espacio y el tiempo (Barter et al., 2015; Kim et al., 2019; Panigrahi et al., 2015; Rueda-Orozco & Robbe, 2015), lo que implicaría que esta estructura es capaz de monitorear y modular las acciones momento-a-momento.

Una estrategia que podría ser útil para discernir si la función del estriado es seleccionar, iniciar y terminar acciones, o modular momento-a-momento los movimientos es a través del estudio de un movimiento bimanual que recluta una red bilateral cortico-tálamo-estriatal (Gooijers & Swinnen, 2014; Kraft et al., 2007; Rueda-Delgado et al., 2014). A pesar de que la evidencia funcional indica que en el estriado se encuentra actividad neuronal previa y posterior a la secuencia de acciones (conocida en inglés como *bracketing*; Barnes et al., 2005; Jog et al., 1999; Martiros et al., 2018), un movimiento que requiere el uso coordinado de los dos efectores superiores (patas delanteras), necesitaría de la comunicación entre las dos estructuras que las comanden. No obstante, dada la anatomía estriatal, podríamos inferir que la ejecución de este movimiento no podría ser iniciada por el estriado, debido a que no existen conexiones interhemisféricas entre estos. Sin embargo, la corteza sensoriomotora envía densas proyecciones bilaterales con información motora y somatosensorial (Reiner et al., 1988; Wall et al., 2013) que podrían coordinar el inicio de la ejecución del movimiento bimanual en ambos estriados para que éstos a su vez provean de la modulación cinemática necesaria para la ejecución exitosa del movimiento.

Para probar si la coordinación del movimiento de los dos efectores superiores es provista por la actividad de las proyecciones cortico-estriatales o si esta surge únicamente en el estriado combinamos estrategias conductuales, lesiones y manipulaciones optogenéticas con registros electrofisiológicos de alta densidad en animales anestesiados y en libre movimiento. Primero, diseñamos y estandarizamos una tarea de coordinación bimanual para ratas, donde los animales debían desplazar dos palancas independientes con cada una de sus patas y mantenerlas presionadas por un tiempo determinado para conseguir un reforzador. Con esta estrategia es posible evaluar el movimiento conjugado e independiente de las patas delanteras con alta precisión espaciotemporal. Después, evaluamos el papel del estriado dorsolateral (EDL) en la ejecución del movimiento bilateral de los efectores superiores. Para ello realizamos lesiones unilaterales del EDL, de manera tal que si estuviera comandando el inicio de la acción bimanual, la lesión unilateral sería suficiente para afectar el inicio del movimiento y la ejecución de ambas extremidades. En estos experimentos encontramos que la lesión unilateral del EDL disminuye la correlación e incrementa la duración del movimiento. El análisis unilateral de la trayectoria de cada palanca reveló que la lesión sólo afecta el movimiento unilateralmente. Lo cual disminuye la correlación, incrementa la variabilidad tanto en los tiempos de inicio y como las trayectorias a lo largo de los ensayos, sin afectar a la otra pata. Dicho efecto indica que el EDL no estaría implicado en el control de inicio de un movimiento bilateral pero sí en la ejecución. Este efecto se encontró al dañar el EDL antes y después de un entrenamiento prolongado (>100 días) (la lesión después del entrenamiento tuvo secuelas motoras más severas). El efecto de la lesión es exclusivo del estriado, dado que lesionar unilateralmente la corteza antes o después del entrenamiento no afectó la ejecución de la tarea. Lo anterior confirma que una corteza funcional es suficiente para coordinar la ejecución del movimiento bilateral.

Posteriormente probamos si la manipulación unilateral de la actividad neuronas cortico-estriatales bilaterales (M2-IT) afectan el movimiento de ambas patas delanteras. Encontramos que la estimulación unilateral de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales M2-IT incrementa la correlación del movimiento de las

patas delanteras sólo en el 49% de las sesiones. Independientemente del efecto de la estimulación sobre la correlación del movimiento bilateral, observamos un incremento consistente en la duración del movimiento de ambas patas para la mayoría de las sesiones (89%). Cabe resaltar que la estimulación unilateral de las proyecciones M2-IT (independientemente del hemisferio estimulado) modifica la actividad de un grupo de neuronas estriatales relacionadas con la duración del movimiento bimanual (22%, 172/780) sin modificar la actividad neuronal asociada a la representación cinemática del movimiento general durante la ejecución de la tarea (14%, 112/780). Estos datos aportan evidencia del papel del estriado como procesador de la información a través de módulos, que controla las variables cinemáticas del movimiento momento-a-momento, y no como selector de acciones.

2. Antecedentes

2.1 Anatomía de los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales bilaterales que se encuentran altamente conservados en los mamíferos (Hagan et al., 2012; Heilbronner et al., 2016). De hecho, presentan similitudes anatómicas y de conectividad entre primates (humanos y no-humanos) y roedores (ratas y ratones), los últimos siendo modelos utilizados frecuentemente en investigación básica. Los GB se componen del núcleo estriado (caudado y putamen en primates), el globo pálido en su porción externa (GPe) e interna (GPi), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra dividida en *pars compacta* (SNpc) y *pars reticulata* (SNpr). El estriado es el principal núcleo de entrada de los GB, en ratas contiene 2.79 millones de neuronas (Oorschot, 1996), de las cuales el 95% son neuronas de proyección denominadas espinosas medianas (NEMs) que sintetizan ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el resto son interneuronas colinérgicas o GABAérgicas (Kreitzer, 2009; Tepper et al., 2010). Las NEMs se pueden distinguir por varios marcadores moleculares, siendo el más común el tipo de receptor a dopamina (DA) las neuronas de la vía directa expresan el receptor de DA tipo 1 (NEMs-D1) y las neuronas de la vía indirecta expresan el receptor de DA tipo 2 (NEMs-D2) (Figura 1) (Albin et al., 1989; DeLong, 1990).

El modelo clásico de los GB propone que la vía directa promueve el movimiento mientras que la vía indirecta lo reprime (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). En un escenario muy simplificado de la comunicación entre los GB, al activarse las NEMs-D1 (vía directa), inhiben a la SNpr y al GPi, núcleos que en condiciones basales tienen actividad tónica y mantienen inhibido al tálamo motor, lo que produce un mecanismo de desinhibición talámica a través de la inhibición que las NEMs-D1 ejercen sobre la actividad tónica inhibitoria de los núcleos de salida, lo que favorece movimiento (Figura 1A) (Albin et al., 1989; DeLong & Wichmann, 2009). Por otro lado, cuando las NEMs-D2 (vía indirecta) se activan, inhiben al GPe lo que a su vez desinhibe al NST; éste último envía proyecciones excitadoras (glutamatérgicas) hacia los núcleos de salida de los GB, y con ello, incrementa la inhibición sobre el tálamo motor lo que resulta en la inhibición del movimiento (Figura 1B).

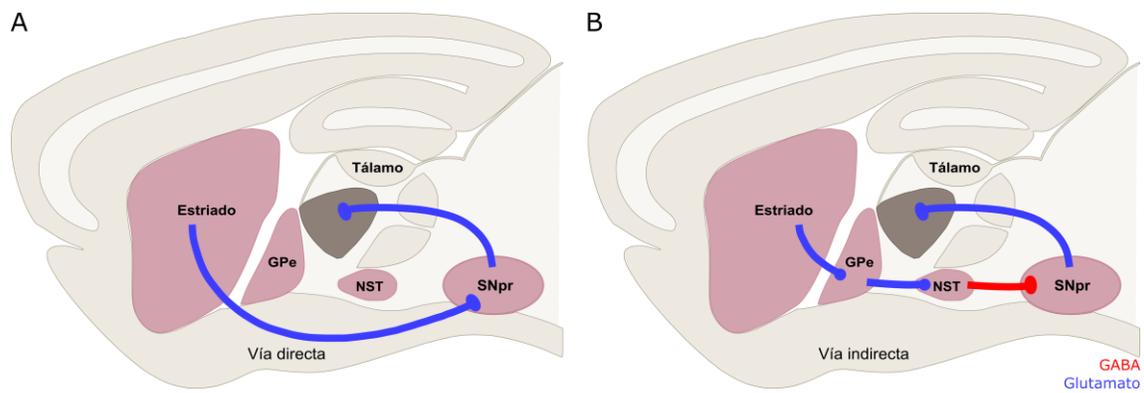


Figura 1. Esquema del modelo clásico de los GB en el cerebro de roedor

A) Vía directa: las conexiones de las NEM-D1 dirigen sus proyecciones GABAérgicas (azul) directamente a los núcleos de salida de los GB, el GPi y la SNr B) Vía indirecta: las NEMs-D2 proyectan al GPe, y éste al NST, quien a su vez envía proyecciones glutamatérgicas (rojo) a los núcleos de salida.

Estas hipótesis, que inicialmente fueron propuestas a partir de las observaciones en condiciones patológicas (Enfermedad de Parkinson, EP) (Albin et al., 1989; DeLong, 1990), han sido recientemente comprobadas con protocolos de estimulación optogenética de cada población de NEMs. La estimulación de la vía directa (NEM-D1) incrementa el movimiento mientras que la activación de la vía indirecta (NEM-D2) lo inhibe (Kravitz et al., 2010). Desde esta perspectiva, la función de las vías de los GB para la producción del movimiento es antagónica. Sin

embargo, otra evidencia muestra que ambas vías se activan concurrentemente cuando el animal inicia una tarea operante (Cui et al., 2013).

Aunque la función de cada vía estriatal en la ejecución del movimiento aún no es concluyente (Cui et al., 2013; Kupferschmidt et al., 2017), la identificación de regiones funcionales en el estriado nos da una idea del papel que juega este núcleo en procesos cognitivos, emocionales y motores (Dudman & Krakauer, 2016; Graybiel, 2008; Thorn et al., 2010). En el estriado convergen entradas excitadoras (glutamatérgicas) de la corteza y del tálamo (Doig et al., 2010; Dori et al., 1992; Reiner et al., 2003). Las proyecciones corticales tienen una organización topográfica lo que permite dividir al estriado en regiones funcionales (Thorn et al., 2010) que son: estriado ventral (EV), estriado dorsomedial (EDM) y estriado dorsolateral (EDL) (Redgrave et al., 2010).

El EV, también conocido como límbico, tiene embebido al núcleo accumbens, recibe proyecciones de las cortezas orbitofrontal y anterior del cíngulo (red límbica), el EDM o asociativo tiene aferencias de la corteza prefrontal y del área motora suplementaria (AMS) (red asociativa); finalmente, el EDL o sensoriomotor posee las terminales de las cortezas motoras y somatosensoriales (red sensoriomotora) (Graybiel, 2008; Lanciego et al., 2012; Yin & Knowlton, 2006). Estas regiones funcionales son relevantes en distintas fases del aprendizaje procedimental (Yin & Knowlton, 2006).

2.1.1. El estriado en el aprendizaje procedimental

Los circuitos cortico-estriatales tienen una función fundamental para el control motor, desde el aprendizaje de nuevos movimientos hasta que se convierten en estereotipados y habituales, por ejemplo anudarse las agujetas o andar en bicicleta (Graybiel, 2008; Yin & Knowlton, 2006). Durante la fase inicial del aprendizaje de un hábito motor, la conducta no es automática y está guiada por el reforzador (Balleine & Dickinson, 1998). De la transición entre una conducta guiada por el reforzador (acción-resultado) y el hábito, independiente del reforzador (estímulo-respuesta) se reclutan distintas porciones del estriado (Yin & Knowlton, 2006).

En la fase inicial del aprendizaje de acción-resultado, el EV está altamente involucrado por su papel central en la codificación la recompensa en tareas operantes (Hernandez et al., 2002; Mohebi et al., 2019; Schultz, 2016). En esta fase, se ejecutan movimientos aleatorios, y la convergencia de la señalización cortical y la dopaminérgica del núcleo accumbens en el estriado promueve la asignación de la valencia a los movimientos relevantes (Mohebi et al., 2019; Reynolds et al., 2001). En la segunda fase, las acciones dejan de ser aleatorias gracias a la apropiada asociación entre las acciones motoras y sus consecuencias (contingencia entre la conducta y su recompensa) (Balleine & Dickinson, 1998; Schultz, 2016). En la tercera fase, el EDM es el que está más involucrado y facilita las acciones dirigidas a objetivos (Kupferschmidt et al., 2017; Thorn et al., 2010; Vandaele et al., 2019; Yin et al., 2009). En la cuarta fase, el EDM disminuye su actividad y el EDL está involucrado principalmente en la consolidación de movimientos altamente estereotipados y habituales (Graybiel, 2008; Lanciego et al., 2012; Yin & Knowlton, 2006). El papel diferencial de las porciones dorsales del estriado en distintas fases del aprendizaje ha sido explicado por un lado por las proyecciones cortico-estriatales que lo inervan (Kupferschmidt et al., 2017), por la distribución anatómica (Matsuda et al., 2009) y por la forma de liberación de neurotransmisor de las terminales dopaminérgicas (Balleine et al., 2007; Hamid et al., 2021). Desde esta perspectiva, durante el aprendizaje de un hábito motor, en el estriado se desarrolla un proceso secuencial que involucra a las distintas regiones funcionales, colocando al EDL como el último eslabón encargado de ejecutar movimientos habituales, altamente estereotipados e independientes de la presencia de la recompensa (Redgrave et al., 2010; Smith & Graybiel, 2013).

En el EDL se pueden encontrar una gran variedad de representaciones tales como: el inicio y el término de secuencias de acciones (Barnes et al., 2005; Jin & Costa, 2010; Jog et al., 1999; Martiros et al., 2018), la codificación de la cinemática de los movimientos (la velocidad, la posición y el tiempo) (Bartholomew et al., 2016; Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Panigrahi et al., 2015; Rueda-Orozco & Robbe, 2015; Sales-Carbonell et al., 2018) e información multisensorial o contextual relacionada con el movimiento (Carelli & West, 1991; Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Rueda-

Orozco & Robbe, 2015; Shi et al., 2004; West et al., 1990). Dada la diversidad de información que alberga, se requieren estrategias cada vez más específicas para entender mejor la función primordial de esta estructura.

2.1.2. Representaciones en el estriado dorsolateral: secuencias de acciones y cinemática del movimiento

En el EDL se generan patrones de actividad neuronal durante la adquisición de la memoria procedimental (Barnes et al., 2005; Jog et al., 1999; Rueda-Orozco & Robbe, 2015). El proceso para producir estos patrones requiere de la repetición de la secuencia de acciones en donde es indispensable tanto la precisión temporal (Hidalgo-Balbuena et al., 2019) como el orden de los elementos (Yin, 2010), a partir de fragmentos de movimientos se forman unidades de comportamiento que conforman a la secuencia motora, proceso conocido como inglés como *chunking* (Jin et al., 2014; Jin & Costa, 2015).

La principal característica de esos patrones de actividad neuronal es delimitar los bordes de la secuencia de acciones, los cuales se identifican por un incremento de la tasa de disparo de las NEMs al inicio y al término de la secuencia motora, independientemente de la unidad de comportamiento ejecutada (v.g. giro a la derecha o a la izquierda en el laberinto en T, presionar palancas en distintas secuencias) (Barnes et al., 2005; Jin & Costa, 2010; Jog et al., 1999; Martiros et al., 2018). El porcentaje de neuronas que codifica el inicio/término de la secuencia de acciones incrementa con el entrenamiento (Jog et al., 1999), lo que sugiere que el EDL sufre cambios plásticos que le dan identidad a la secuencia entrenada. La actividad neuronal de las NEMs inicialmente está esparcida a lo largo de la duración de la tarea y, con el entrenamiento continuo, la actividad se focaliza únicamente al inicio y al término, se desvanece durante el periodo de extinción y se reinstala con el reentrenamiento (Barnes et al., 2005). Los cambios en la representación neuronal de la tarea en el EDL muestran la equivalencia de la conducta explorar-explotar, en la primera fase del aprendizaje corresponde al ensayo y error, y la segunda fase al aprendizaje exitoso donde se aprovecha la experiencia para maximizar el reforzamiento (Barnes et al., 2005).

Este mismo patrón de activación de inicio/término de las NEMs en el EDL (que además no depende de la expectativa de la recompensa) también se produce en otras tareas como la presión secuencial de palancas (Martiros et al., 2018). Inicialmente, se pensó que la disminución de la tasa de disparo a la mitad del ensayo en cada secuencia de acciones podría indicar que la actividad estriatal ya no era necesaria; sin embargo, posteriormente se encontró que las interneuronas GABAérgicas de disparo rápido (IDR) incrementan su tasa de disparo en los periodos en que las NEMs están inhibidas durante ese periodo del ensayo (Jin & Costa, 2010; Martiros et al., 2018). La activación alternada de estas poblaciones neuronales ocurre únicamente en los ensayos correctos y, similar a lo reportado en otros experimentos, es independiente de los movimientos que componen a la secuencia (Jin & Costa, 2010; Martiros et al., 2018). Esto sugiere que las poblaciones de interneuronas y neuronas principales del circuito estriatal interactúan para la formación de los límites que componen a una unidad conductual.

En experimentos donde la ejecución del movimiento no fue finamente monitoreada, no encontraron correlación entre la actividad neuronal de las NEMs o de las IDR con ningún parámetro conductual (giro del cuerpo o presión de la palanca) o cinemáticos (velocidad, aceleración o desaceleración) (Barnes et al., 2005; Jin & Costa, 2010; Jog et al., 1999; Martiros et al., 2018), lo que parece ser un sesgo por el método utilizado y no por la ausencia de esas representaciones en el EDL. Eso se demostró más adelante en tareas donde la obtención de la recompensa depende de la precisión en la ejecución del movimiento y de la modulación de la aceleración (v.g. una rata corre en una caminadora con un tiempo meta fijo para obtener una recompensa). En la tasa de disparo de las NEMs se pueden encontrar: 1) activación secuencial de las neuronas a lo largo de la duración de todo el ensayo y 2) correlación (positiva o negativa) con parámetros de la ejecución del movimiento como la velocidad, la posición y el tiempo. La representación de esas variables en la actividad neuronal se encontró en células únicas, pero también se encontraron neuronas que codificaban distintas variables simultáneamente (Rueda-Orozco & Robbe, 2015; Sales-Carbonell et al., 2018).

En otros experimentos se probó que el EDL tiene una representación interna de la distancia que guía la conducta de persecución de un objeto en movimiento, donde las IDR pueden representar la distancia entre la cabeza del animal y el blanco a perseguir, mientras que las NEMs codifican la velocidad. Las IDR proyectan hacia las NEMs por lo que regulan la actividad neuronal relacionada con la velocidad. Además, las NEMs que codifican velocidad también codifican la dirección del movimiento y otras variables cinemáticas como la aceleración (Kim et al., 2019).

Más evidencia se ha sumado al papel del EDL como controlador de la velocidad de los movimientos, donde la activación con optogenética de poblaciones específicas de las NEMs en el EDL producen cambios en la velocidad. Por ejemplo, las NEMs-D1 al ser estimuladas optogenéticamente producen movimientos cuya velocidad incrementa linealmente en función de la frecuencia de estimulación (Bartholomew et al., 2016). En otros experimentos, donde la estimulación optogenética de las NEMs-D1 o las NEMs-D2 se desencadena una vez iniciado el movimiento (e.g., un ratón con cabeza fija mueve una palanca hacia adelante o hacia atrás) es suficiente para modificar (incrementar o disminuir) la velocidad bidireccionalmente. Es decir: en movimientos rápidos, la estimulación de las NEMs-D1 los acelera y la activación de las NEMs-D2 los enlentece; en movimientos lentos, la estimulación de las NEMs-D1 los hace más lentos y la activación de las NEMs-D2 los hace rápidos (Yttri & Dudman, 2016). Por otro parte, en condiciones patológicas como en la Enfermedad de Parkinson (producida por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc), se puede encontrar que estas neuronas pierden la representación del vigor (velocidad o amplitud del movimiento) (Panigrahi et al., 2015). Además, la contribución de las aferencias estriatales (corticales y talámicas) de carácter somatosensorial son indispensables para el componente temporal de la ejecución motora y, a diferencia de la evidencia previa donde no encontraron actividad neuronal en el estriado que codificara eventos distintos al inicio/término de la secuencia de acciones, a partir de la actividad estriatal (y no de la cortical), se decodificó con precisión una secuencia de estímulos somáticos (Hidalgo-Balbuena et al., 2019).

Englobando la información, el EDL tiene una gran variedad de representaciones, por un lado genera una plantilla de la acción para desencadenar una secuencia de movimientos como una unidad conductual con un inicio y un fin (independientemente de los movimientos que componen a la secuencia), produce una reorganización de la respuesta neuronal de las redes estriatales dispuestas a la adquisición de nuevas habilidades motoras (Barnes et al., 2005; Jin & Costa, 2010; Jog et al., 1999; Martiros et al., 2018). Además, codifica parámetros cinemáticos de movimiento propios y de objetos en movimiento (Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Kim et al., 2019; Rueda-Orozco & Robbe, 2015). Esto indica que el EDL es un elemento importante en la modulación de la ejecución y de la calidad de los movimientos, cuyo comando podría provenir de las regiones corticales.

2.2. Aferencias cortico-estriatales

Dentro de la función del estriado en el aprendizaje descrito en el apartado previo, las aferencias cortico-estriatales y tálamo-estriatales juegan un papel fundamental. El EDL recibe aferencias bilaterales de las cortezas motoras y somatosensoriales (v.g. M1, M2, S1) (Alloway et al., 2010; Isomura et al., 2009; Reiner et al., 2003; Soma et al., 2017) y unilaterales tanto de subpoblaciones corticales (Afsharpour, 1985; Brown & Hestrin, 2009; Harris & Shepherd, 2015; Johansson & Silberberg, 2020; Kawaguchi, 2017) como de núcleos talámicos que envían información sensorial desde el núcleo ventro-posterolateral (VPL) y del ventro-posteromedial (VPM) del tálamo (Díaz-Hernández et al., 2018; Erro et al., 2001, 2002; Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Rouiller & Welker, 2000). De acuerdo con los relevos canónicamente descritos de la vía somatosensorial, una vez que la información llega a estos núcleos talámicos primarios, se envía a la corteza somatosensorial y posteriormente al estriado; sin embargo, se ha demostrado que tanto el VPL como el VPM proyectan directamente al EDL con latencias de respuesta similares a las encontradas en la corteza (Erro et al., 2001, 2002; Hidalgo-Balbuena et al., 2019).

Las neuronas corticales de proyección o células excitadoras constituyen el 80% o más de las neuronas corticales, establecen sinapsis asimétricas (glutamatérgicas) con las NEMs y pueden ser divididas de acuerdo con su morfología y distribución en las seis capas corticales (Doig et al., 2010; Dori et al., 1992; Reiner et al., 2003). Estas células se han clasificado en tres grandes grupos: el primero comprende a las neuronas intratelencefálicas (IT), las cuales se encuentran en las capas 2 a 6 y envían sus axones únicamente dentro del telencéfalo (corteza, estriado, amígdala y claustró) y son las únicas que proyectan al hemisferio contralateral (Carman et al., 1965; Reiner et al., 2003, 2010; Sohur et al., 2014; Winnubst et al., 2019). El segundo grupo son las neuronas del tracto piramidal o neuronas extratelencefálicas (ET) (Cowan & Wilson, 1994; Lévesque et al., 1996), son neuronas piramidales de la capa 5B, las neuronas de esa lámina se conectan con distintas regiones cerebrales como: el tronco encefálico (e.g., colículo superior, núcleo pedúnculo pontino), la espina dorsal, el mesencéfalo, y también tiene proyecciones ipsilaterales hacia la corteza, el estriado y el tálamo motor. Finalmente, las neuronas cortico-talámicas que se encuentran en la capa 6 proyectan únicamente al tálamo (e.g. núcleo ventral lateral) (Harris & Shepherd, 2015; Rouiller & Welker, 2000).

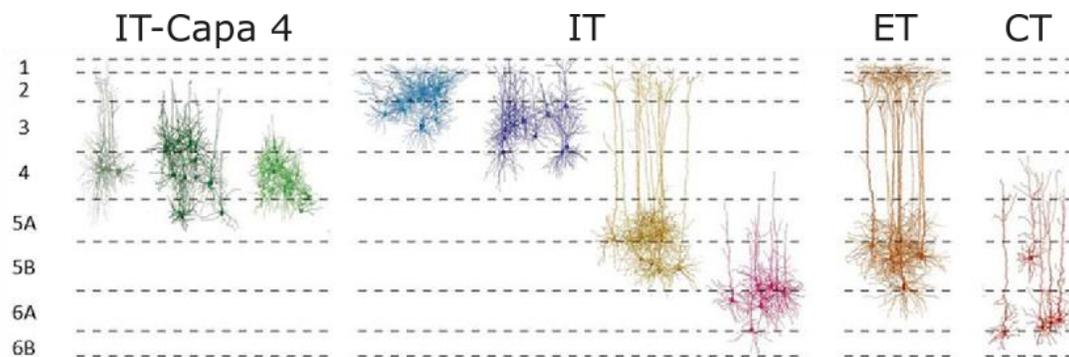


Figura 2. Distribución laminar de las neuronas excitadoras de proyección en roedores.

Morfología de las neuronas excitadoras de la corteza de barril. **IT-Capa 4**: los tres tipos morfológicos de neuronas IT en la capa 4: piramidales, piramidal estrellada y células espinosas esteladas, **IT**: neuronas intratelencefálicas de las capas 2, 3, 5A/B y 6. **ET**: neuronas extratelencefálicas de la capa 5B. **CT**: neuronas cortico-talámicas de la lámina 6. (Tomado y modificado de: Harris & Sheperd, 2015).

Las neuronas ET son neuronas de gran tamaño (18-19 μm , diámetro similar en roedores y primates) que se encuentran principalmente en la capa 5b (80%) ,

tienen una arborización prominente con una dendrita apical robusta y definida que alcanza la capa 1 de la corteza (Gilman et al., 2017; Reiner et al., 2003), mientras que las neuronas IT son neuronas más pequeñas (en roedores: 12-13 μm y en primates: 14-16 μm), se alojan principalmente en las capas 3 (35%) y 5a (40%) de la corteza, tienen dendritas apicales con una arborización fina y delgada que no alcanza la capa 1 (Figura 2) (Harris & Shepherd, 2015; Jones et al., 1977; Lévesque et al., 1996; Oswald et al., 2013; Reiner et al., 2003, 2010) .

Para los objetivos de este proyecto nos interesamos en las neuronas IT, que aunque pueden ser encontradas en la mayoría de las capas corticales (de la capa 2 a la capa 6) (Figura 2), nos enfocaremos en las neuronas que se alojan predominantemente en la capa 5, dado que es en esa capa donde encuentra mayor proporción de neuronas IT en las cortezas motoras (e.g. M1 y M2) (Carman et al., 1965; Hedreen, 1977; McGeorge & Faull, 1987; Reiner et al., 2003). Con un marcaje anterógrado unilateral, se puede apreciar claramente que las proyecciones de las neuronas IT viajan a través del cuerpo calloso y de la cápsula interna, dejando sus terminales en la porción dorsolateral del estriado (Figura 3A) (Reiner et al., 2003, 2010; Sohur et al., 2014).

Las técnicas actuales permiten hacer reconstrucciones de células completas y así seguir sus procesos dendríticos y axonales, Lin y colaboradores (2018) reconstruyeron en su totalidad seis neuronas IT de M2 de la capa 5, encontraron que tienen el axón más largo reportado hasta ahora (318.43 mm de longitud, aunque se encontró un rango amplio). Las neuronas IT muestran distintos patrones de conexión; es decir, algunas tienen proyecciones ipsilaterales más prominentes que las contralaterales. Además, a nivel de la comunicación intra-cortical (en la corteza motora primaria [M1], el área dorsal premotora y el área motora suplementaria [AMS]) las neuronas del mismo tipo forman conexiones recurrentes con las neuronas locales de su misma clase. Es decir, las neuronas IT se comunican con otras neuronas IT e influyen sobre las neuronas ET, mientras que las neuronas ET se comunican exclusivamente con neuronas de su mismo tipo (otras neuronas ET) (Morishima & Kawaguchi, 2006), lo que nos permite hipotetizar que cada tipo celular tiene funciones diferenciales en el movimiento.

Las neuronas IT tienen propiedades electrofisiológicas distinguibles de otras neuronas piramidales, tienen tasa de disparo baja (1.4 espigas por segundo), con una forma de espiga similar a otras neuronas piramidales, pero con un ancho medio (half-width) más amplio (1.1-1.5 ms) y con una amplitud baja (68 mV), también tienen una velocidad de conducción lenta (~9 ms en respuesta antidrómica a la estimulación del estriado contralateral) y un umbral para disparar potenciales de acción alto (~35 mV). Su potencial de membrana basal presenta estados fluctuantes periódicos (0.3-1.5 Hz) despolarizados e hiperpolarizados (Morishima et al., 2011; Morishima & Kawaguchi, 2006; Oswald et al., 2013; Wilson, 1987).

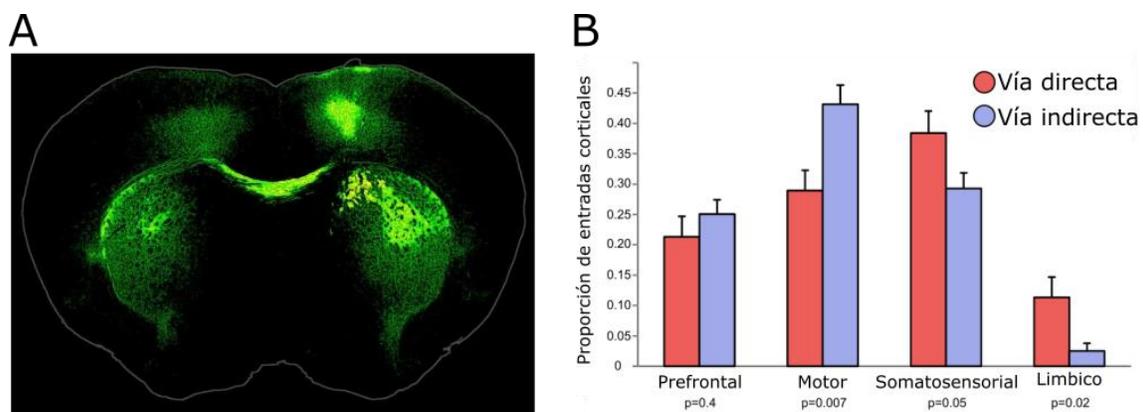


Figura 3. Densidad de proyecciones de regiones motoras y somatosensoriales

A) Imagen histológica del cerebro de un ratón que expresa la proteína verde fluorescente en las neuronas cortico-estriatales. La inyección del vector viral fue unilateral en la corteza M2 y se observa la fluorescencia a través del cuerpo calloso y bilateralmente en el estriado dorsolateral (Imagen tomada del Allen Brain Atlas: [Http://connectivity.brain.org](http://connectivity.brain.org)). B) Proporción de aferencias corticales en las dos poblaciones de las neuronas principales del estriado (rojo: vía directa, azul: vía indirecta). (Tomado y modificado de Wall et al., 2013). Note que las cortezas motoras y somatosensoriales son las que envían mayor número de entradas al EDL.

La evidencia anatómica indica que las neuronas corticales de proyección tienen distintos patrones de conexión sobre las NEMs. A partir del uso de vectores virales retrógrados, sin distinguir entre neuronas IT y ET, se encontró que las proyecciones cortico-estriatales de la lámina 5 de M2 representan el ~53% de entradas para las NEM-D1 y el ~58% para las NEM-D2, mientras que de M1 corresponde al ~75% de entradas para las NEM-D1 y el ~77% para las NEM-D2 (Figura 3B) (Wall et al., 2013). Además, hay una distribución diferencial de estas proyecciones en el eje anteroposterior en el EDL, las proyecciones cortico-estriatales que se conectan con las NEMs-D2 se encuentran en regiones más

anteriores (0.9 mm de Bregma), mientras que aquellas que interactúan con NEMs-D1 se encuentran más posteriores (0.6 mm de Bregma) (Wall et al., 2013).

Se ha mostrado que existe un fenómeno de convergencia en la información cortico-estriatal en función del número de neuronas corticales y estriatales (razón 6:1, 17 millones de neuronas corticales para 2.8 millones de NEMs) (Oorschot, 1996). Las neuronas IT establecen contactos sinápticos principalmente con la cabeza de las espinas de las NEMs (más del 50%) y con algunas dendritas (Reiner et al., 2010). En otros estudios, usando microscopía electrónica, se ha encontrado que las IT establecen sinapsis axo-espinosas principalmente con las NEMs-D1 (Deng et al., 2015). Los contactos sinápticos de las terminales de las neuronas IT fueron más comunes sobre las NEM-D1 y tuvieron un diámetro menor (0.42 μm , comparados con las ET) (Lei et al., 2004). Por otro lado, la evidencia electrofisiológica en registros simultáneos de las NEMs de cada vía (en configuración de célula completa), indica que la estimulación optogenética de las neuronas IT activa ambos tipos NEMs indistintamente (Baillon et al., 2008; Deng et al., 2015; Kress et al., 2013). Por lo que los sesgos anatómicos encontrados no se reproducen a nivel electrofisiológico.

Se ha hipotetizado que las neuronas IT envían señales de planeación motora y de sensación hacia el estriado, mientras que la colateral de las neuronas ET representan la copia eferente de los comandos motores, lo que podría contribuir al mecanismo de retroalimentación (*feedback*) para afinar los movimientos (Cowan & Wilson, 1994; Turner & DeLong, 2000). Dadas las características anatómicas de las neuronas IT son excelentes candidatas para sincronizar la actividad estriatal durante la ejecución de un movimiento bilateral.

2.2.1. Interacciones cortico-estriatales

Una de las principales características del EDL es la gran convergencia de información somatosensorial y motora. Por lo que debemos abordar las funciones descritas para la corteza y el estriado en interacción para la producción de movimiento y el aprendizaje motor. Se ha sugerido que la corteza motora es fundamental para el aprendizaje de nuevas secuencias motoras (Dudman &

Krakauer, 2016; Kawai et al., 2015), donde la corteza funge como el tutor del estriado; es decir, una vez que el movimiento se ha vuelto estereotipado se puede prescindir de la corteza (Dhawale et al., 2021; Kawai et al., 2015) y la actividad neuronal secuencial que codifica los parámetros cinemáticos de la ejecución de la tarea persiste (Dhawale et al., 2021; Rueda-Orozco & Robbe, 2015). Sin embargo, en otro tipo de tareas, como en movimientos de alcance, una vez aprendida la tarea, entre M1 y el EDL emerge una actividad coordinada de baja frecuencia (medida con el potencial local de campo) durante la ejecución del movimiento grueso del brazo (Lemke et al., 2019).

A pesar de que las neuronas IT son más abundantes que las neuronas ET y son capaces de comunicar ambos hemisferios (Harris & Shepherd, 2015), su estudio específico en el control motor ha sido escaso. En experimentos donde se han utilizado técnicas optogenéticas que permiten la manipulación específica de grupos de neuronas, se ha encontrado que la actividad de las neuronas IT tienen mayor correlación con la amplitud del movimiento de las patas delanteras en ratones, corroborado por la disminución de la amplitud tras su inhibición, mientras que actividad de las ET representan la dirección del movimiento de los movimientos (Park et al., 2019). Por lo que su función específica en la producción y coordinación de los movimientos aún está por dilucidarse.

2.2.2. Redes neuronales de los movimientos bimanuales

Los movimientos bimanuales requieren el uso coordinado de las dos manos con un acople espaciotemporal preciso (Rueda-Delgado et al., 2014; Swinnen et al., 1988) En humanos, se ha mostrado que los movimientos bimanuales reclutan una red funcional que incluye regiones asociadas al control y la planeación motora como: el área motora suplementaria (Kraft et al, 2007; Wu et al., 2010), la corteza motora primaria (M1, Kraft et al, 2007), la corteza premotora (Smith & Staines, 2006), el putamen (principal núcleo de entrada de los ganglios basales, parte del estriado en roedores) (DeBare et al., 2003; Kraft et al, 2007) y el cerebelo (Kraft et al, 2007).

El área motora suplementaria (AMS) fue la primera estructura asociada con la coordinación bimanual. Fue descrito por Luria (1966) en pacientes que

presentaban lesiones en la región frontal o frontal-medial del cerebro (donde se encuentra el AMS), esos pacientes tenían problemas para realizar dos tareas distintas con cada mano o alteración de la coordinación entre estas (Wiesendanger et al., 1994). Experimentos más recientes en humanos mediante estrategias no invasivas, muestran que la ejecución de los movimientos bimanuales induce un incremento de la señal hemodinámica en el AMS (Kraft et al, 2007; Wu et al., 2010). En modelos animales (primates no humanos y roedores) se ha mostrado que las regiones corticales motoras (M1, M2) tienen actividad diferencial cuando se realizan movimientos bimanuales (comparada con la actividad producida en los unimanuales) (Donchin et al., 1998; Kazennikov et al., 1999; Soma et al., 2017; Tanji et al., 1988). Además, en estas regiones corticales ocurre la codificación de parámetros cinemáticos de los movimientos bimanuales, y la dirección preferente de los mismos (Georgopoulos et al., 1986; Georgopoulos & Carpenter, 2015).

Las cortezas M1 y M2 poseen a las neuronas IT cuyas características anatómicas y funcionales les permiten coordinar las estructuras que comparten sus aferencias en ambos hemisferios, en estas cortezas se puede encontrar tipos de respuesta relacionados con movimientos bimanuales y unimanuales (Soma et al., 2017). Por ejemplo, las neuronas de M1 tienen mayor representación del movimiento contralateral que las neuronas de M2. Específicamente, las neuronas IT tanto de M1 como de M2 tienen una gran proporción de neuronas con codificación bilateral (M1-IT, 44%; M2-IT, 58%) (Soma et al., 2017). El movimiento rápido y sostenido de una palanca en ratas desencadena respuestas neuronales fásicas lateralizadas al hemisferio contralateral al movimiento, y respuestas neuronales tónicas sin preferencia en la lateralidad, lo que indica que las neuronas M2-IT controlan los movimientos contralaterales e ipsilaterales de forma contrabalanceada, mientras que las neuronas M1-ET controlan preferentemente los movimientos contralaterales como la salida final (Isomura et al., 2009; Soma et al., 2017). Además, estas áreas están interconectadas a nivel cortical y se ha mostrado que la estimulación de M2 (área frontal de la pata delantera) tiene efectos que facilitan de la actividad de las neuronas M1 (área caudal de la pata delantera) y el

movimiento (Touvykine et al., 2020) por lo que la coordinación bimanual podría ser el resultado de la interacción interhemisférica entre M2 y M1 hacia el EDL.

3. Justificación

La coordinación bimanual es necesaria para una gran variedad de los movimientos que realizamos diariamente, su desempeño exitoso requiere del acople espaciotemporal de los efectores superiores. Este acople necesita de estructuras cerebrales que funcionen en conjunto para minimizar la variabilidad de los movimientos de cada efector. A pesar del gran interés científico por entender los mecanismos neuronales que subyacen a la coordinación de los miembros superiores, la base fisiológica de los movimientos aun es inconclusa. Una de las razones se debe a que la investigación se ha centrado en evaluar esta clase de tareas en primates no-humanos y humanos, donde la manipulación de poblaciones específicas de neuronas dentro de los circuitos implicados es limitada o imposible. Por esta razón, para este proyecto se propuso utilizar un modelo animal en roedores cuya versatilidad permitiera evaluar cuantitativamente y con precisión espaciotemporal a los movimientos bimanuales, además explorar aquellas estructuras cerebrales que participan en su coordinación y la modificación de la circuitería neural durante el aprendizaje de la tarea. Se comenzó con la disección de la red neural de la coordinación bimanual, evaluando la participación del EDL dada su relevante distribución anatómica para recibir e integrar información bilateral que podrían ser indispensable para la ejecución de movimientos bimanualmente coordinados. Posteriormente, se manipuló a las neuronas cortico-estriatales bilaterales y se evaluó su participación específica en este tipo de movimientos.

4. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos

La evidencia electrofisiológica indica que en el EDL existen representaciones tanto de selección, inicio y término de secuencias de acciones, como de parámetros cinemáticos del movimiento. Mientras que la evidencia anatómica muestra que no existen conexiones interhemisféricas estriado-estriado, por lo que el mecanismo probable por el cual ambos estriados podrían sincronizarse para iniciar un movimiento bimanualmente coordinado sería a través de las proyecciones cortico-

estriatales bilaterales que recibe de cortezas sensoriomotoras, (especialmente M2-EDL). Por lo tanto, se plantearon las siguientes preguntas:

- ¿El EDL participa en la codificación de parámetros cinemáticos o en el inicio-término de los movimientos bimanuales?
- ¿El EDL requerirá del comando de regiones corticales en el circuito motor como la corteza M2 para coordinar la salida de los efectores superiores?

Hipótesis:

- La lesión unilateral del estriado dorsolateral afectará parámetros cinemáticos del movimiento bimanual sin modificar el inicio.
- La estimulación unilateral de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales de M2 tendrá un efecto bilateral en el movimiento.
- La estimulación unilateral de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales de M2 reclutará diferentes poblaciones neuronales en el estriado.

Objetivo general

- Evaluar el papel del estriado dorsolateral y de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales en la selección y ejecución de acciones bilateralmente coordinadas.

Objetivos particulares

- Diseñar y estandarizar una tarea de coordinación bimanual para ratas.
- Lesionar unilateralmente el estriado dorsolateral y evaluar su efecto en el movimiento bimanual.
- Manipular optogenéticamente la actividad neuronal de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales (M2-IT) durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual.
- Registrar la actividad de las neuronas del EDL durante la estimulación optogenética de las proyecciones M2-IT y la ejecución de la tarea de coordinación bimanual.

- Diferenciar la participación de las distintas poblaciones neuronales del EDL durante la ejecución de la tarea y su respuesta ante la estimulación de las neuronas M2-IT.

5. Métodos

Los experimentos fueron aprobados por el comité de Bioética Animal del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y conforme a los principios de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Institutes of Health, NIH). Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y para evitar su sufrimiento innecesario. Las coordenadas estereotáxicas se calcularon basados en los atlas de Paxinos y Watson o de L.W. Swanson y se reportan en milímetros con respecto a bregma.

5.1. Animales

Animales. Se utilizaron 75 ratas Long-Evans para el desarrollo de este proyecto. Los animales fueron alojados en el bioterio satélite dentro del laboratorio A02 del Instituto de Neurobiología en cajas-habitación con temperatura (23°C) y humedad (66%) estables bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (luz de 8-20 h). Los animales tuvieron acceso libre de agua, alimento y fueron supervisados constantemente por personal especializado del Instituto de Neurobiología. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante la fase lumínica del ciclo luz-oscuridad. Sesenta y tres ratas macho (300-650 g) fueron entrenadas en la tarea de coordinación bimanual. Estos animales fueron sometidos a un protocolo de restricción de líquidos en el cual solamente consumían agua durante la sesión de entrenamiento (20-30 ml en 40-60 min, una sesión por día). El peso de los animales fue monitoreado diariamente y se mantuvo por arriba del 85% del peso previo al inicio de la restricción. En caso de que los animales no consumieran la porción de agua correspondiente durante el entrenamiento, tuvieron acceso a agua durante un periodo breve posterior a éste. Los animales fueron entrenados 6 días por semana con 24 h de acceso libre a agua en el séptimo día. Los animales fueron asignados a los siguientes grupos: control entrenamiento corto (n=22), control entrenamiento

largo (n=17), lesión del EDL unilateral (n=8) o bilateral (n=6), lesión unilateral de M1 (n=4) o de M2 (n=6) antes del entrenamiento. Seis animales del protocolo largo fueron lesionados unilateralmente en el EDL y cinco animales del protocolo corto fueron lesionados en M2 después del entrenamiento, cinco animales del protocolo corto fueron utilizados para los experimentos de optogenética. Cuatro animales bien entrenados fueron usados para los experimentos de optogenética y registrados en libre movimiento durante la ejecución de la tarea. Siete ratas fueron usadas para los registros en el protocolo de animal anestesiado (3 hembras y 1 macho) registro en el EDL y estimulación en la corteza M2 contralateral y las restantes (3 hembras) fueron utilizadas para los registros en M2 y la estimulación directa en el sitio de registro.

5.2. Modelo conductual y aparato de entrenamiento

Aparato. Se diseñó una caja de entrenamiento y se estandarizó un modelo conductual. Para la caja se utilizaron perfiles de aluminio y acrílico transparente (50x50x50 cm). En la pared frontal se colocó en el centro un bebedero con una luz verde sobre de él y a 8 cm de cada lado se colocó un par de palancas de acero inoxidable que sobresalen 5 cm de la pared y sobre ellas una luz blanca, cada par de palancas está a 10 cm del piso y a 3 cm de distancia entre ellas (Figura 4A-B).

Cada palanca de acero inoxidable fue acoplada a una tarjeta de conversión analógico-digital para registrar la posición en los ejes X-Y (Figura 4A). La señal de voltaje de las palancas y del reforzador (LED verde) fue digitalizada y almacenada a 250 Hz a través de una tarjeta de National Instruments (NI PXIe-6363) y de rutinas de LabView hechas en el laboratorio (Figura 4C-D). Cada ensayo correcto fue reforzado con una gota de agua (~90 μ l) entregada en el bebedero y liberada a través de una válvula solenoide.

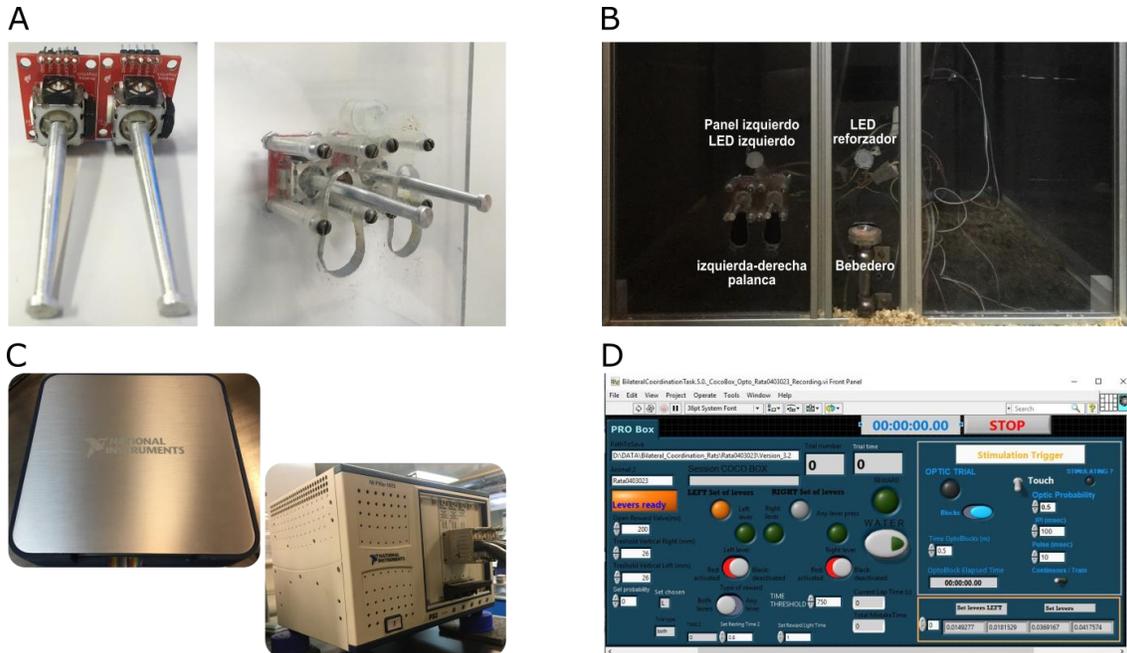


Figura 4. Caja de entrenamiento para la tarea de coordinación bimanual y aparatos para el registro conductual

A) Panel izquierdo: palancas de acero inoxidable acopladas a una tarjeta de conversión analógico-digital. Panel derecho: palancas instaladas en la pared desmontable. B) Caja de entrenamiento para la tarea de coordinación bimanual, se indica el sitio de las palancas, los LEDs y el bebedero. Las medidas fueron calculadas en función de la anatomía de la rata adulta. C) Tarjetas de National Instruments para la adquisición de la conducta. D) Software diseñado específicamente para esta tarea en el ambiente de programación Labview para manipular y almacenar las variables de la tarea.

5.2.1. Tarea de coordinación bimanual

Los animales fueron entrenados para sujetar ambas palancas (una con cada pata) y desplazarlas simultáneamente en el eje vertical (Y) al menos 2.6 cm por un tiempo fijo determinado previamente (50, 500, 750 ms). Los ensayos fueron auto-iniciados, y no hubo tiempo límite para obtener el reforzador. La luz blanca sobre las palancas indicaba la disponibilidad del set de palancas para realizar un ensayo; la luz verde (1 seg) encendía cuando se había cumplido la regla espaciotemporal (ensayo correcto) y la recompensa estaba disponible. Durante ese momento, la luz blanca permaneció apagada por 800 ms, la rata no podía obtener otro reforzador hasta terminado ese periodo. Entre cada ensayo, los animales debían soltar las palancas por al menos un segundo previo al inicio de un nuevo ensayo. En una sesión de entrenamiento las ratas realizan entre 200 y 300 ensayos y beben entre 18 y 27 ml de agua.

5.2.2. Moldeamiento

Para la adquisición de una nueva habilidad motora se requiere de un periodo de entrenamiento donde las reglas necesarias para alcanzar la conducta meta se establecen. Esta fase se conoce como moldeamiento (Domjan, 2010), requiere de la supervisión del experimentador y se implementó mediante un esquema de aproximaciones sucesivas.

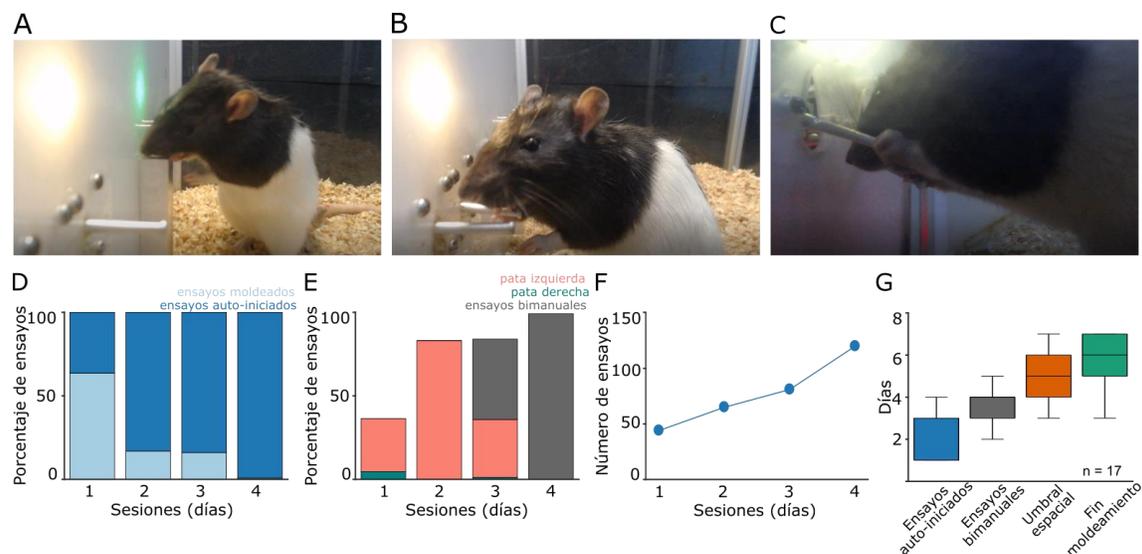


Figura 5. Fase de moldeamiento en la tarea de coordinación bimanual

A) Primer día de moldeamiento, el animal tiene que asociar la luz verde con la entrega de la recompensa (gota de agua). B) El animal tiene que aprender que sólo recibirá reforzador cuando se acerque a la zona de las palancas, toque o desplace alguna. C) El animal recibirá el reforzador únicamente si desplaza ambas palancas verticalmente hasta alcanzar el umbral espacial (2.6 cm) y el umbral temporal (50 ms). D) Porcentaje de ensayos de un animal representativo guiados por el investigador (azul claro) y auto iniciados (azul oscuro). E) Porcentaje de ensayos autoiniciados realizados con la pata izquierda (verde), derecha (coral) o bimanuales (gris). F) Número de ensayos realizados durante la fase de moldeamiento. G) Progresión de la fase de moldeamiento del grupo de animales control del protocolo largo.

Las ratas fueron expuestas a la caja de entrenamiento (40 min) un día antes del inicio de la restricción de agua. Durante la siguiente sesión, las ratas fueron entrenadas para obtener un reforzador (gota de agua ~90 μ l) cuando se aproximaban al bebedero (ensayos moldeados) (Figura 5A y D). En sesiones subsecuentes, los animales aprendieron a obtener el reforzador por acercarse a la zona de las palancas, tocar o desplazar cualquier palanca (>0.1 cm) (Figura 5B). En general, los animales tardaron entre una y tres sesiones a presionar cualquier palanca (ensayos auto-iniciados) (Figura 5B-G). Después los animales aprendieron a desplazar las palancas simultáneamente (ensayos bimanuales) (Figura 5D-G),

con un incremento progresivo del umbral vertical hasta alcanzar el umbral espacial meta (2.6 cm) (Figura 5C-G), aprender esto les tomó entre cuatro y seis días. Una vez conseguido ese paso, se fijó el tiempo de mantenimiento (50 ms) y se concluyó con la fase de moldeamiento (Figura 5G). El periodo de moldeamiento requirió entre cuatro y siete días, tanto para los animales control, como para los animales lesionados. A partir del día siguiente del término de la fase de moldeamiento, se evaluó la curva de aprendizaje de la ejecución del movimiento bimanual que se muestra en la sección de resultados.

5.2.3. Análisis de las trayectorias

Las mediciones conductuales fueron calculadas a partir de los valores crudos de la posición de las palancas utilizando rutinas de Matlab elaboradas específicamente para ese propósito (Figura 6A). Se segmentaron los primeros 100 pares de trayectorias del cambio de posición de cada palanca 4 seg antes y 2 seg después de la entrega de la recompensa de los primeros 100 ensayos reforzados (Figura 6B, izquierda). La correlación bilateral fue calculada a partir del coeficiente de correlación de Pearson entre la trayectoria de la palanca derecha e izquierda (Figura 6B, derecha). Qué pata toca primero cada palanca fue calculado como la diferencia en ms entre el tiempo de inicio de movimiento de la palanca izquierda y la palanca derecha, el valor negativo indica que inició con la pata derecha y el valor positivo con pata izquierda. La sincronía del movimiento bilateral (BOS) se definió como la diferencia absoluta de tiempo entre el inicio del desplazamiento de una pata contra la otra en el movimiento reforzado (Figura 6B, derecha). La variabilidad (rango intercuartilar) del BOS a lo largo de la sesión fue definida como BMOV. La duración del movimiento se definió como el tiempo que las palancas permanecen presionadas por debajo del umbral vertical (>2.6 cm) después de que se entregó el reforzador, se obtuvo individualmente para cada palanca y se promedió (Figura 6B, derecha). El esfuerzo se definió como el tiempo (promedio de cada pata) que las palancas permanecieron presionadas por debajo del umbral vertical para obtener la recompensa en cada ensayo (Figura 6A, recuadro punteado). La velocidad se calculó como la diferencia instantánea en la posición en bins de 4 ms, se obtuvo el valor máximo para cada trayectoria y se promedió.

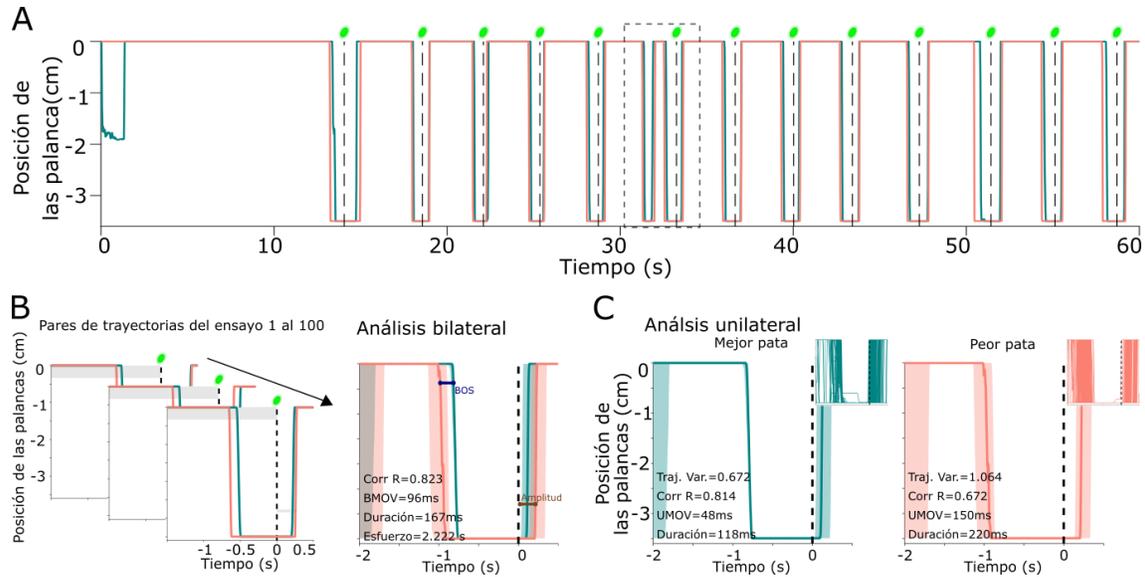


Figura 6. Trayectorias representativas y análisis del movimiento bimanual y unimanual

A) Trayectorias del cambio de posición de cada palanca que representan movimiento cada pata, se muestran 13 ensayos consecutivos en 1 min. La línea negra punteada representa el momento en que el reforzador está disponible en el bebedero simultáneo al encendido de la luz verde, indicando que se cumplió la regla espaciotemporal. El rectángulo con líneas punteadas indica un ensayo con más de un intento para conseguir una recompensa. B) Análisis bilateral de las trayectorias separadas en pares alineados al tiempo de disponibilidad del reforzador (izquierda), se muestran los valores promedio de correlación, de sincronía del movimiento bilateral (BOS), la variabilidad del BOS en la sesión (BMOV), la duración del movimiento y el esfuerzo de los primeros 100 ensayos de una sesión representativa de un animal control. C) Lo mismo mostrado en B para el análisis unimanual de las trayectorias. El recuadro se muestra los primeros 100 ensayos realizados por cada pata (verde: izquierda y coral: derecha).

Para las mediciones unilaterales, se seleccionaron y se separaron las primeras 100 trayectorias de cada palanca (izquierda y derecha). Se calculó la correlación (Pearson) para todos los pares posibles de trayectorias de cada palanca y se obtuvo la mediana por sesión, se calculó la variabilidad promedio de las trayectorias, y la variabilidad de los tiempos de inicio del movimiento (UMOV), para lo cual primero se obtuvo el rango intercuartil del tiempo de inicio de movimiento ensayo-por-ensayo. La duración del movimiento unimanual se calculó a partir del tiempo que la palanca permaneció presionada después de la entrega del reforzador (Figura 6C). A partir del valor promedio de correlación de los ensayos unilaterales se definió a la mejor pata como aquella con mayores valores de correlación ensayo-con-ensayo (Figura 6C verde) y la otra como la peor pata (Figura 6C coral).

5.3. Lesiones

5.3.1. Lesiones farmacológicas y cuantificación de las lesiones

Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo anestesia profunda inducida con Ketamina/Xilacina (85/5 mg/kg) y mantenida con sevoflurano (0.5-2 %) en casos necesarios. Las lesiones se realizaron con la infusión de NMDA (Sigma, 200 mM en solución salina esterilizada; 1 μ l en cada inyección) unilateral o bilateralmente en el EDL (AP=0.6; ML=3.5; DV=4.4), unilateral o bilateralmente en M2 (AP=3.5; ML= \pm 1.9; DV=1.3) o en M1 (AP=1; ML=2.4; DV=1.4). Todas las coordenadas estereotáxicas están reportadas en milímetros con respecto a Bregma de acuerdo con el atlas.

5.3.2. Imagen por resonancia magnética

Las lesiones fueron evaluadas mediante imágenes por resonancia magnética (IRM) bajo anestesia profunda con la misma dosis de Ketamina/Xilacina utilizada para las cirugías. Las IRM fueron adquiridas con un escáner de 7T Bruker Pharmascan 70/16 Us (Bruker, Ettlingen, Alemania). Se obtuvieron volúmenes anatómicos T2 de alta resolución usando una adquisición rápida de eco de espín con secuencia de ecos reenfocados (Turbo RARE) con los siguientes parámetros: tiempo de repetición=2, campo visual=18x20 mm², dimensión de la matriz 144x160, grosor de la rebanada=0.5 mm, resolución de vóxel=0.8x0.8x0.5 mm³.

5.3.3. Procesamiento de IRM T2

Para cuantificar el tamaño de las lesiones, las imágenes T2 fueron procesadas usando una rutina personalizada para incrementar el contraste. Los volúmenes IRM T2 fueron reorientados a un espacio estándar, se le aplicó un filtro de medias no local 3-D optimizado seguido de una normalización de la intensidad no uniforme para la corrección del sesgo en el campo. Finalmente, con el programa libre ITK Snap se segmentó manualmente el área lesionada y se obtuvo la máscara binaria para cada región de interés (DLS, M1, M2). El límite de la lesión fue definido como el cambio de la intensidad del vóxel comparado con el hemisferio contralateral o con una región no lesionada.

5.4. Optogenética

5.4.1. Virus retrógrados

Todos los virus fueron obtenidos de Addgene (Watertown, Massachusetts, Estados Unidos de América). Para los experimentos de estimulación de las neuronas IT, los animales recibieron una inyección de 1 μ l en cada EDL (AP=0.6, ML= \pm 3.5, DV=-4.4). Las inyecciones fueron separadas por al menos un mes para asegurar la expresión de la proteína. Primero se inyectó el virus retrógrado AAV-pgk-Cre para inducir la expresión de la proteína CRE recombinasa bajo el promotor de la proteína fosfoglicerato cinasa en un estriado, este virus fue donado por Patrick Aebischer (Addgene plasmid #24593; <http://n2t.net/addgene:24593>; RRID: Addgene_24593). Una vez cumplido el mes, inyectamos el virus retrógrado pAAV-EF1a-doublefloxed-hChR2(H134R)-EYFP en el estriado contralateral a la primera inyección, este virus fue donado por Karl Deisseroth (Addgene plasmid #20298; <http://n2t.net/addgene:20298>; RRID: Addgene_20298) (Figura 7). Al concluir los experimentos conductuales los animales fueron sacrificados y el cerebro fue extraído para su procesamiento histológico.

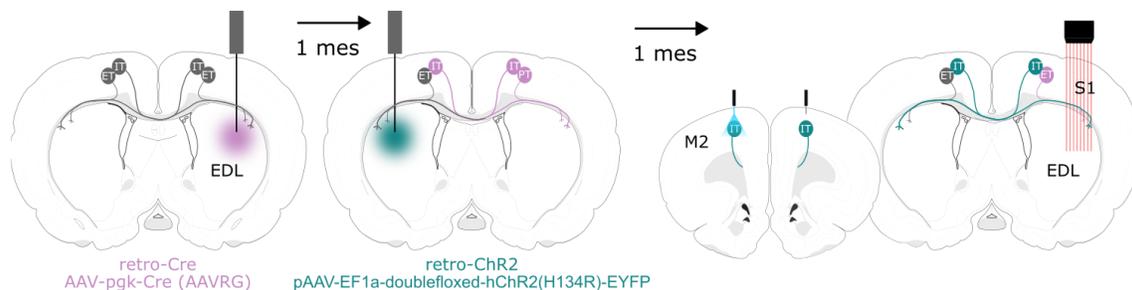


Figura 7. Esquema del protocolo de infecciones virales

En el panel izquierdo se muestra el esquema de la primera cirugía, donde se inyecta unilateralmente en el EDL un virus que inducirá retrógradamente la expresión de la proteína Cre-recombinasa en todas las neuronas que proyecten a ese estriado. En el panel central se ejemplifica la segunda cirugía, que se lleva a cabo un mes después de la primera, donde se inyecta un virus que reconocerá a las neuronas que expresan la proteína Cre-recombinasa y en esas expresará la canal rodopsina 2, por lo que su blanco son exclusivamente las neuronas con proyecciones bilaterales. En el panel derecho se muestra el ejemplo de la tercera cirugía, esta puede ser exclusivamente para implantar fibras ópticas para estimulación optogenética o incluir la colocación de sondas de silicio para registros agudos o crónicos de la actividad neuronal cortical y estriatal.

5.4.2. Manipulaciones optogenéticas

La estimulación óptica fue realizada unilateralmente. Para los experimentos de animal anestesiado, se utilizaron dos protocolos de estimulación: 1) 50 trenes de 5

estímulos cada uno (duración del estímulo: 5 ms, frecuencia: 3.3 Hz, intervalo inter-tren: 5 seg) y 2) 50 estímulos de 500 ms cada 5 seg con la potencia máxima de estimulación (~24.9 mW) (Figura 8A). Para los experimentos conductuales, se utilizó un rango mínimo de intensidad de estimulación (0.3 a 1 mW), los animales no trabajaban adecuadamente con intensidades mayores a 1.2 mW. La estimulación pasiva no produjo ningún movimiento perceptible de ninguna parte del cuerpo. En la mayoría de las sesiones, la estimulación era iniciada cuando el animal desplazaba cualquiera de las palancas al menos 0.1 mm y se detuvo cuando se entregó el reforzador (una vez que el animal había cumplido con el tiempo de mantenimiento de 750 ms) (Figura 8B superior). En esta condición se estimularon el 50% de los ensayos aleatoriamente. En otras sesiones, se utilizó un protocolo por “bloques” donde el LED se encendió por periodos de 30 seg de estimulación continúa alternados por periodos de 30 seg sin estimulación (Figura 8B inferior). Todos los instrumentos para estimulación optogenética fueron obtenidos de Plexon, incluyendo los drivers PlexBright LD-1 de un canal, los módulos de LED PlexBright (azul, 465 nm), los conmutadores PlexBright Dual LED, los cables para fibras ópticas y las fibras ópticas para implantar.

5.5. Electrofisiología

5.5.1. Registros agudos en animal anestesiado

Los animales fueron anestesiados con uretano (1 g/kg) y fueron montados en un esterotáxico, en caso necesario, se proporcionaron dosis extra de uretano (0.15 g/kg) durante el registro. Los registros con arreglos de microelectrodos, conocidos como sondas de silicio (silicon probes, Neuronexus, Buszaki-64), fueron realizados a través de una craneotomía (1.4 mm x 2.5 mm) centrada en 0.6 mm anterior y 3.7 lateral a Bregma. La sonda de silicio fue teñida en la parte posterior a los electrodos con el colorante fluorescente Dil (1%, Sigma) para la confirmación histológica del sitio de registro.

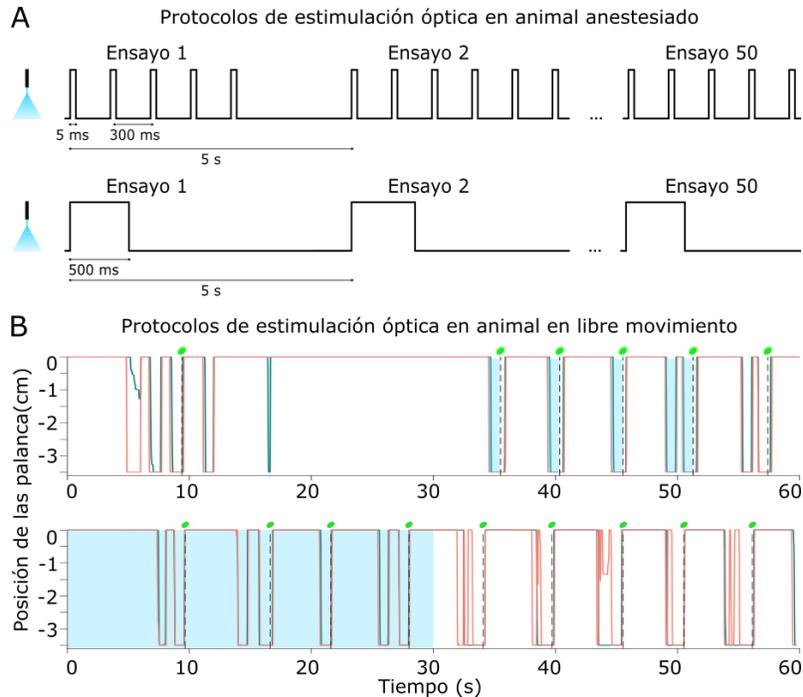


Figura 8. Protocolos experimentales para el registro de actividad neuronal y estimulación optogenética en animales anestesiados y en libre movimiento

A) Protocolos de estimulación óptica, 50 ensayos de trenes de 5 estímulos de 5 ms a 3.3 Hz (superior) y 50 ensayos de un estímulo único de 500 ms (inferior). B) Protocolos de estimulación óptica durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual, en la parte superior se muestra la estimulación al toque, que requiere que el animal desplace cualquier palanca (izquierda o derecha) al menos 0.1 mm en el eje vertical. En la parte inferior se muestra la estimulación en bloques, donde la luz transitaba en periodos de encendido y apagado de 30 s independientemente de la conducta del animal.

Para los registros en animal anestesiado se colocó una fibra óptica (200 μm) en la corteza M2 (AP=3.5; ML=1.9; DV=1.3) contralateral al sitio de registro (n=2 ratas) y se realizó una craneotomía en el EDL para colocar una sonda de silicio previamente teñida. La sonda de silicio se colocó en el centro de la craneotomía, y se bajó lentamente hasta llegar a la profundidad deseada en el EDL. En otro grupo experimental, se realizó la craneotomía en M2 (1.5 mm x 2.4 mm) centrada en 3.5 mm anterior y 1.9 lateral con respecto a Bregma (n=3 ratas) y se colocó la fibra óptica directamente en el sitio de registro. Para los experimentos de optogenética en animales en libre movimiento, se implantaron dos de fibras ópticas en M2 (una en cada hemisferio) y se fijó la sonda de silicio (los detalles de la cirugía se explican en la siguiente sección). Los registros se realizaron sobre la región de la pata delantera en S1 (0.8-1.6 mm de profundidad) y en el EDL (3.5-4.5 mm de profundidad). En cada animal se realizaron de dos a tres registros en S1 y de tres a

cinco en el estriado con al menos 250 μm de profundidad entre ellas. Inmediatamente después de los experimentos, los animales fueron eutanizados con una dosis letal de pentobarbital sódico y perfundidos transcárdialmente, los cerebros fueron extraídos y alojados en paraformaldehído al 4%, y procesados para histología.

5.5.2. Implantes y registros crónicos de animales en libre movimiento

Cuatro animales bien entrenados fueron usados para estos experimentos. Los animales fueron previamente transfectados con ambos virus para estimular específicamente las proyecciones cortico-estriatales (vea sección de Virus retrógrados). Al menos un mes después de la última cirugía de transfección (Figura 7), los animales fueron anestesiados profundamente con sevoflurano, se realizó una craneotomía (1.4 mm x 2.5 mm centrada a 0.6 mm anterior y 3.7 lateral a bregma) y una durotomía, se implantó una sonda de silicio de 64 canales acoplada a un micromanipulador en el área de la pata delantera de S1 sobre el EDL. Dos tornillos miniatura fueron implantados sobre el cerebelo y sirvieron como tierra y referencia. En la misma cirugía, se colocaron dos fibras ópticas sobre M2 (AP=3.5; ML=1.9; DV= 1.3). El micromanipulador, el conector y las fibras ópticas fueron fijadas con cemento (C&B Metabond) y acrílico dental (Meliodent). Después de la cirugía se administró un analgésico profiláctico (Meloxicam, 0.5 mg/kg). Pasado un periodo de recuperación (de al menos 6 días), el arreglo de microelectrodos fue bajado lentamente para alcanzar los sitios de registro (75-150 μm por día). Los registros de S1 fueron realizados en dos animales (Rat 24 y 28) entre 1.4 y 1.6 mm por debajo de la superficie del cerebro. Los registros del EDL fueron realizados en tres animales (Rat 23, 24 y 27) entre 3.1 y 5 mm por debajo de la superficie del cerebro. Un total de 196 unidades fueron registradas en S1 durante 8 sesiones. Un total de 988 unidades fueron registradas en el EDL durante 56 sesiones, de las cuales en 51 la estimulación optogenética se desencadenó con la presión de las palancas (Figura 8B superior), en las cinco sesiones restantes (Rat 23) se realizó estimulación en bloques (30 seg encendido/ 30 seg apagado) (Figura 8B inferior) y se registraron 112 unidades. Al finalizar cada sesión de registro, los animales fueron mantenidos en la caja de entrenamiento (15 y 20 min) para ser estimulados

pasivamente como se describió previamente con el protocolo se utilizado en los experimentos en animal anestesiado (Figura 8A).

5.5.3. Adquisición y procesamiento de datos electrofisiológicos

Las señales electrofisiológicas de banda ancha (0.1-8000 Hz), tanto en animal anestesiado como en libre movimiento, fueron obtenidos con sondas de silicio de 64 canales (NeuroNexus, Buzsaki-64), amplificados 1000 veces a través de un sistema de amplificación Intan RHD2000 y adquiridos a 20 kHz. El procesamiento de los datos se realizó a partir de la señal cruda. Se utilizaron Neuroscope y NDManager (<http://neurosuite.sourceforge.net>). La clasificación de espigas neuronales se realizó semiautomáticamente usando el programa de clusterización KlustaKwik (<http://klustakwik.sourceforge.net>) (Harris et al., 2000) y la aplicación gráfica de Klusters (<http://klusters.sourceforge.net>) (Hazan et al., 2006).

5.5.4. Análisis de actividad neuronal en animales anestesiados

Para determinar la latencia de respuesta ante la estimulación optogenética, la actividad neuronal fue segmentada en bins de 1 ms. Se realizaron histogramas peri-estímulo para cada neurona de 3 seg de duración (1 seg antes y 2 seg con respecto al inicio del estímulo) y un límite de confianza del 99% con respecto a la línea basal (1 seg previo al estímulo). La respuesta a la estimulación fue considerada significativa si excedía el límite de confianza de al menos 1 ms, el tiempo del primer bin con actividad fue definido como la latencia de respuesta.

5.5.5. Análisis de la actividad neuronal en animales en libre movimiento

Para las gráficas de barrido (*raster plots*) y las matrices de color, se extrajeron las espigas de cada neurona en cada ensayo, se segmentaron en bins de 1 ms en una ventana de 8 seg y se centraron al momento de la entrega del reforzador (4 seg antes y 4 seg después). Los trenes de espigas de los ensayos estimulados y no-estimulados fueron suavizados con un filtro kernel Gausiano con desviación estándar de 50 ms. Se promedió el histograma peri-estímulo para cada neurona y se transformó a valores Z. *Neuronas moduladas por M2-IT*. Para estimar el número de neuronas estriatales que fueron moduladas significativamente por la estimulación óptica de las neuronas M2-IT se calculó la tasa de disparo promedio

durante los 750 ms antes de la entrega del reforzador (umbral temporal) y se comparó la tasa de disparo entre los ensayos no-estimulados y los estimulados (U de Mann-Whitney; $p < 0.05$). Para el cálculo de las correlaciones cinemáticas y de la ejecución de la tarea (i.e. correlación bilateral, duración, esfuerzo), los ensayos fueron divididos en ventanas no sobrepuestas de 100 ms. La frecuencia de disparo fue calculada para cada ventana (conteo de espigas dividido entre 0.1) y suavizadas con un kernel Gausiano con una desviación estándar de 200 ms.

La trayectoria de la posición de la cabeza del animal fue extraída automáticamente a través de videos (30 cuadros por seg) con un programa diseñado en el laboratorio para ese propósito en el ambiente de LabView (Vision, National Instruments) y promediadas en ventanas de 100 ms (Figura 9A). La aceleración (3 ejes) del movimiento de la cabeza fue extraída directamente del acelerómetro integrado al amplificador digital de registro (Intan Technologies RHD2132) (Figura 9B). Las trayectorias del movimiento de las palancas fueron obtenidas como se describió previamente (Figura 6A y Figura 9C). Los ensayos fueron ordenados de acuerdo con su longitud, en la parte superior se encuentran los ensayos más largos y en la inferior los más cortos (Figura 9). Los coeficientes de correlación de Pearson, correlación parcial y correlación múltiple entre la actividad neuronal, la posición, la velocidad y la aceleración de la cabeza y posición de las palancas fueron calculados para cada célula.

5.5.6. Análisis estadísticos

La actividad electrofisiológica y los datos conductuales se presentan como la media y los rangos inter-cuartilares (25 y 75). La significancia estadística de cada grupo, tanto en los datos conductuales como en los electrofisiológicos, fue calculada usando pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis). Las comparaciones múltiples fueron corregidas mediante la prueba poshoc Bonferroni. Los análisis estadísticos fueron realizados con rutinas estándar incluidas en Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, Estados Unidos de América). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor p fue < 0.05 .

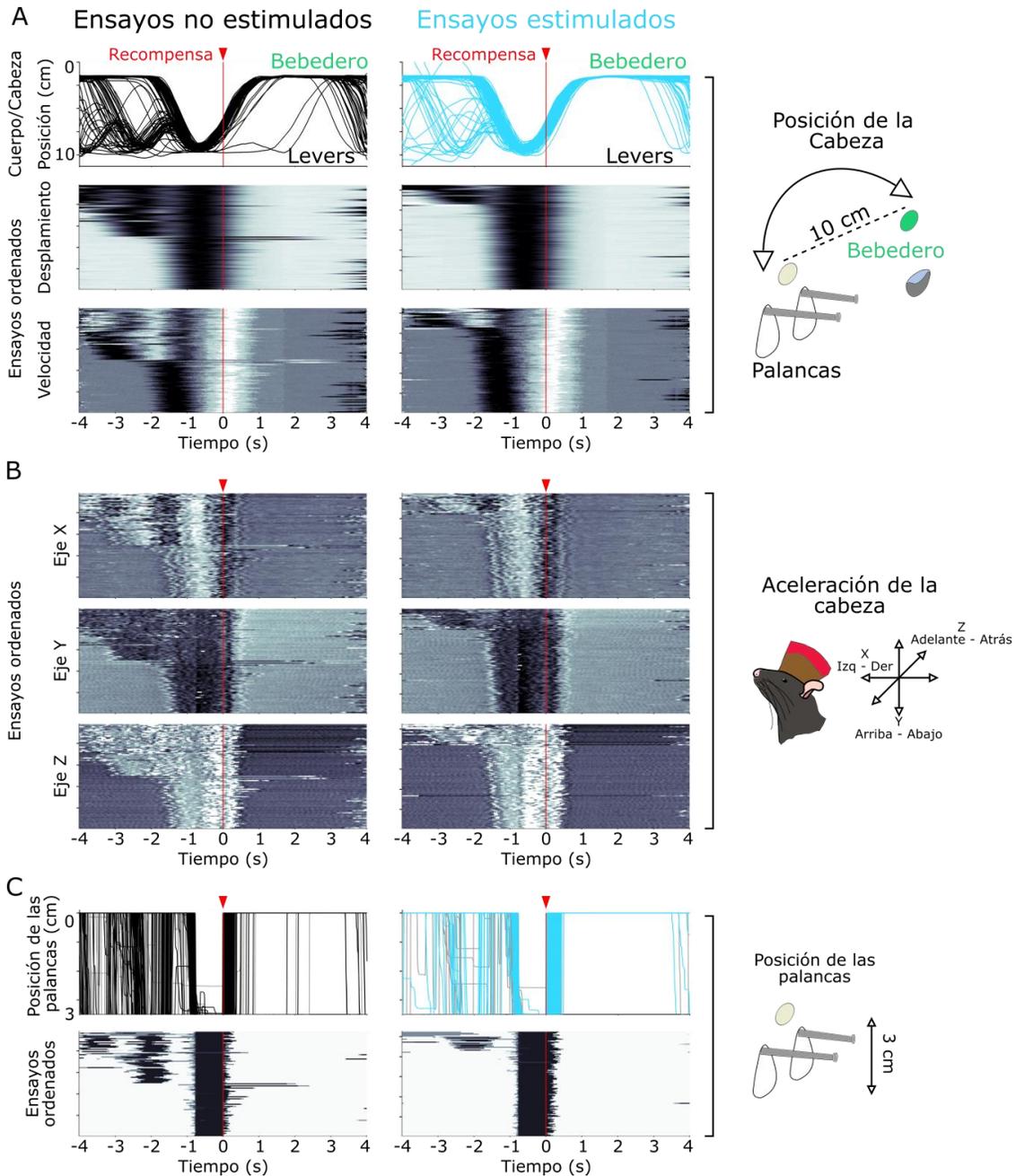


Figura 9. Parámetros conductuales colectados durante registros en libre movimiento

A) Trayectorias del movimiento (panel superior), posición instantánea ensayo-por-ensayo (panel intermedio) y velocidad (panel inferior) de la transición de la cabeza/cuerpo entre el bebedero y las palancas. B) Aceleración instantánea ensayo-por-ensayo con código de color (colores claros indican aceleración máxima y colores oscuros aceleración mínima) en los tres ejes de movimiento de la cabeza registrados desde el acelerómetro del amplificador del registro. C) Trayectorias del movimiento de las palancas (panel superior izquierdo, palanca izquierda en negro y derecha en gris; panel superior derecho, palanca izquierda en azul y derecha en gris). Posición instantánea de las palancas ensayo-por-ensayo (colores claros corresponden a la posición 0 cm y los oscuros a la posición -2.6 cm). La columna izquierda corresponde a los ensayos no estimulados (negro) y la derecha a los ensayos estimulados (azul). Los ensayos están ordenados de acuerdo con la duración de los mismos, los más largos se muestran en la parte superior y los más cortos en la parte inferior. Los parámetros conductuales mostrados en esta figura corresponden a una sesión representativa elegida aleatoriamente.

6. Resultados

6.1. Diseño y estandarización de una tarea de coordinación bimanual para ratas

El primer objetivo de este proyecto fue diseñar y estandarizar una tarea de coordinación bimanual para ratas, donde los animales debían aprender una regla espaciotemporal en la que desplazaban dos palancas verticalmente (umbral espacial: 2.6 cm) (una palanca con cada pata) y las mantenían presionadas por un periodo determinado (umbral temporal: 50, 500 o 750 ms) para obtener un reforzador (Figura 10A-B). Para eso se entrenó a un grupo de animales intactos (n=22) durante 100 sesiones para evaluar su curva de aprendizaje (Figura 10C). Al inicio del entrenamiento, los animales realizaban movimientos descoordinados (Figura 10C izquierda), pero con el entrenamiento, las trayectorias del movimiento de las palancas se volvieron menos variables, hasta sobreponerse (Figura 10D centro y derecha). Con este protocolo se obtuvieron mediciones de movimiento bimanual y unimanual durante la curva de aprendizaje (Figura 6). El entrenamiento mejoró la correlación bimanual (Figura 10E). Además, se identificó que al inicio del entrenamiento, las ratas presionaban primero la palanca derecha (palanca/pata derecha) y después la izquierda (Figura 10F). Este sesgo podría explicarse por la localización de las palancas y el bebedero en la caja de entrenamiento (Figura 4B y Figura 10A). Las palancas se encuentran a la izquierda del panel, lo que provoca que la palanca más cercana al bebedero sea la derecha, además durante las transiciones entre las palancas y el bebedero, los animales se colocan entre ambos, para optimizar su desempeño. Tanto la diferencia del tiempo de inicio del movimiento bimanual (BOS, Figura 10G) como su variabilidad (BMOV, Figura 10H) disminuyeron con el entrenamiento, esta última es un buen indicador de que tan bien coordinada está la acción bilateral.

El entrenamiento también disminuyó la duración del movimiento, definido como el tiempo que las ratas mantienen las palancas presionadas una vez que el reforzador fue entregado; es decir, que no sueltan las palancas a pesar de que la regla espaciotemporal se ha cumplido (Figura 10I). La velocidad (obtenida del promedio entre la velocidad máxima de la pata izquierda y la derecha) se mantuvo estable a lo largo del entrenamiento (Figura 10J). El esfuerzo, definido como el

tiempo total que los animales presionan las palancas para obtener un solo reforzador (ver ejemplo en: Figura 6A) también disminuyó con el entrenamiento (Figura 10K).

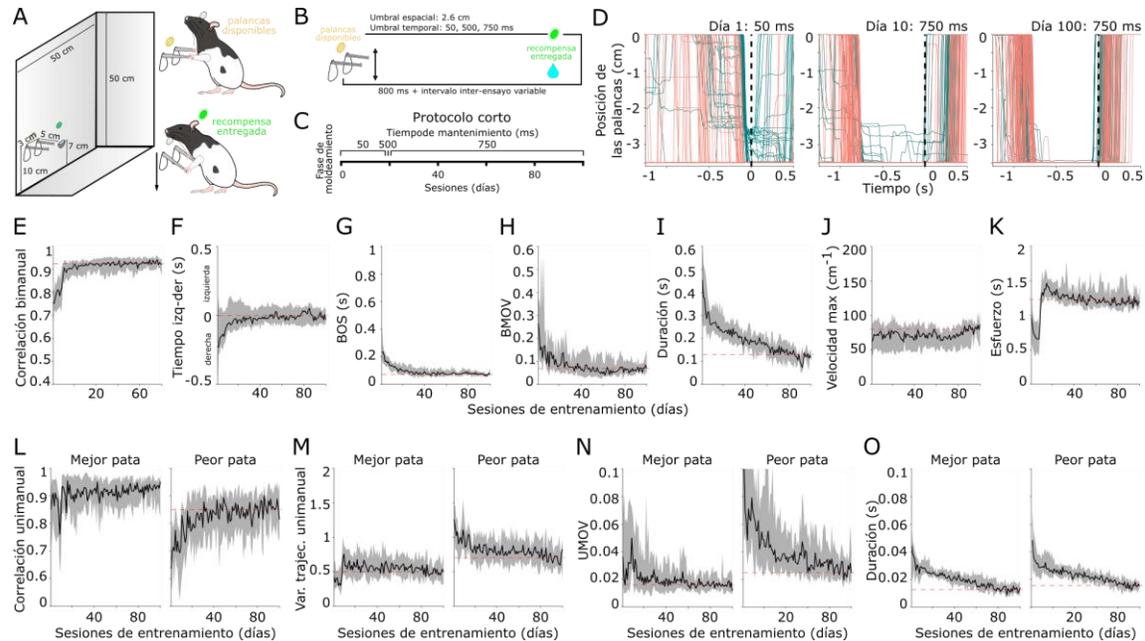


Figura 10. Curvas de aprendizaje en la tarea de coordinación bimanual

A) Caja de entrenamiento y representación esquemática de la tarea de coordinación bimanual, el animal debía sujetar cada palanca con cada una de sus patas delanteras, presionarlas 2.6 cm (umbral espacial) y mantenerlas así durante un tiempo de mantenimiento determinado (umbral temporal) para obtener una recompensa. B) Secuencia de eventos en un ensayo. La disponibilidad de las palancas se indicó con una luz blanca, una vez cumplida la regla espaciotemporal se encendió la luz verde y se entregó la recompensa. La luz blanca se encendió nuevamente 800 ms después de la entrega del reforzador para indicar que se podía iniciar otro ensayo. El intervalo inter-ensayo es variable porque las conductas son autoiniciadas. C) Línea del tiempo de las fases de aprendizaje donde se indica los días de cambio en el umbral temporal. D) Trayectorias representativas de la pata izquierda (verde) y la pata derecha (coral) en los ensayos reforzados de tres diferentes sesiones de un animal intacto. El umbral temporal de la sesión se indica en la parte superior. Las trayectorias están alineadas al momento que se entregó el reforzador (línea negra punteada). Note que el entrenamiento produce sobreposición de las trayectorias de las palancas. (E-K) Curvas de aprendizaje en las mediciones bilaterales: E) correlación bimanual, F) palanca que se mueve primero, G) diferencia de tiempo de inicio (BOS), H) variabilidad de los tiempos de inicio, I) duración del movimiento, J) velocidad máxima, K) esfuerzo. (L-O) Curvas de aprendizaje de las variables unilaterales separadas en función de la variabilidad de la trayectoria. La pata con menor variabilidad ensayo-por ensayo será la mejor y la otra pata será la peor. L) correlación unimanual, M) variabilidad de la trayectoria unimanual, N) la variabilidad de los tiempos de inicio unimanual (UMOV) y la duración del movimiento unimanual. Los datos de las curvas de aprendizaje se presentan en mediana (línea sólida) y percentiles 25 y 75 (área sombreada).

Las mediciones del movimiento individual de cada palanca (pata) permitieron evaluar su estereotipia a lo largo del aprendizaje. Se identificó que el desarrollo de la estereotipia fue diferente para cada pata, lo que permitió clasificarlas de acuerdo con su coeficiente de correlación a lo largo de los ensayos. La pata que presentó valores altos de correlación ensayo-con-ensayo se identificó como la mejor pata y

la de menores valores como la peor pata (Figura 10L). De acuerdo con esto, la peor pata mostró mayor variabilidad en sus trayectorias (Figura 10M panel derecho), en el tiempo de inicio del movimiento (Figura 10N panel derecho) y de duración del movimiento (Figura 10O) comparada con la mejor pata. Este protocolo fue utilizado no solo en mi proyecto, sino también en otros proyectos del grupo, resultando en una primera publicación en la que soy segunda autora (Báez-Cordero et al., 2020).

6.2. Lesión unilateral del estriado dorsolateral y evaluación de su efecto en el movimiento bimanual

Una vez que se comprobó que las ratas podían aprender la tarea de coordinación bimanual y que la evolución de los parámetros cuantificados sigue una curva de aprendizaje normal, se continuó con el objetivo de lesionar unilateralmente el EDL y evaluar su efecto en el movimiento bimanual. Este objetivo se planteó considerando que el EDL está implicado en el inicio/término de secuencias de acciones y en el control momento-a-momento de la trayectoria del movimiento. En un movimiento bimanual desconocemos su implicación en estos dos procesos del control motor, por lo que la hipótesis es que lesión unilateral del EDL podría afectar el inicio/término y el control momento-a-momento de la trayectoria únicamente de la pata contralateral al EDL lesionado, mientras que una lesión bilateral debería afectar el movimiento de ambos efectores. Para eso se utilizaron dos grupos de animales que fueron lesionados antes del entrenamiento en la tarea. El primero, con una lesión unilateral en el EDL derecho ($n=8$) y el segundo con una lesión bilateral en el EDL ($n=6$) que fueron comparados con un grupo de animales intactos ($n=17$) y se evaluaron por 100 sesiones (Figura 11A-B). En la primera fase de entrenamiento el tiempo de mantenimiento (umbral temporal) fue establecido en 50 ms, lo que requiere un movimiento rápido (balístico) para obtener el reforzador. En la segunda fase se fijó un tiempo de 750 ms lo que exige además del movimiento balístico, movimientos más largos que probablemente requieran retroalimentación (Figura 11A). En ambas fases del entrenamiento, los animales lesionados de ambos grupos tuvieron un valor de correlación bimanual menor que los animales intactos (Figura 11C) lo que indica que las lesiones producen movimientos descoordinados. Consistentemente con el hallazgo previo, los animales de todos los grupos

presionaron primero la palanca derecha (Figura 11D), efecto que se corrige en los animales intactos probablemente causado por la preferencia del sistema a realizar movimientos sincrónicos en espejo, pero se mantiene a lo largo del entrenamiento en ambos grupos de animales lesionados de lo que podría relacionarse con la dificultad de alcanzar la palanca izquierda, efecto que se refleja en una mayor diferencia en el tiempo de inicio del movimiento bimanual (BOS, Figura 11E) y mayor variabilidad (BMOV, Figura 11F).

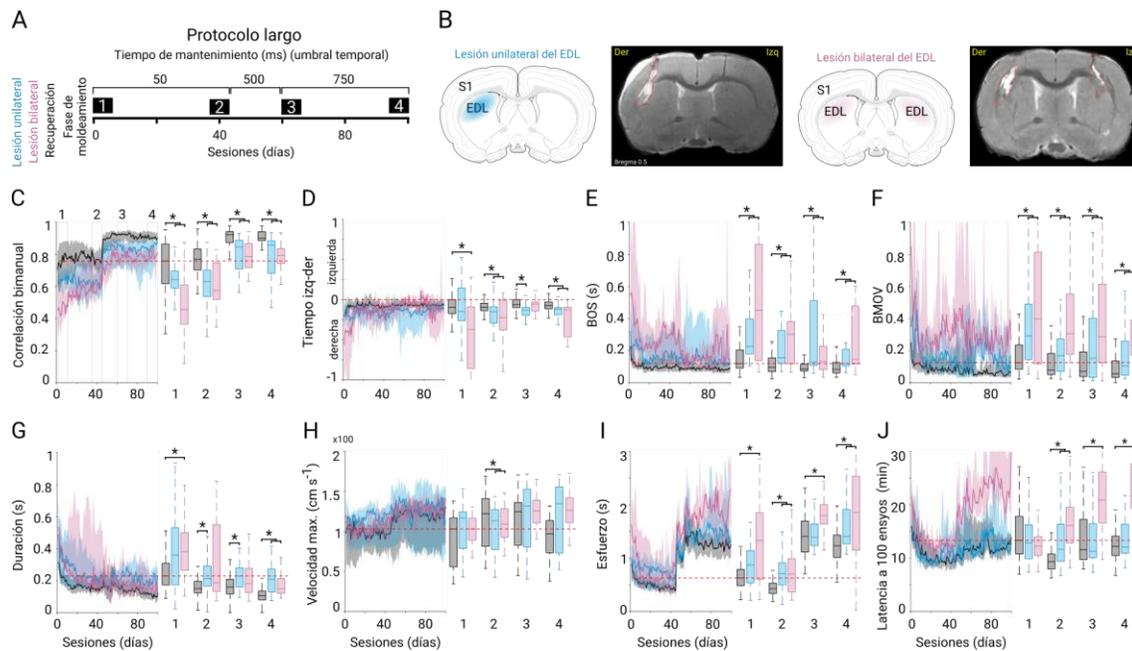


Figura 11. La lesión del estriado dorsolateral afecta el desempeño de la tarea de coordinación bimanual
 A) Línea temporal de las lesiones, las fases del entrenamiento y las comparaciones estadísticas. (B-C) Representación esquemática (panel superior) y de la imagen por resonancia magnética (panel inferior) del sitio lesionado en el EDL unilateral (B, izquierda) o bilateralmente (B, derecha). (C-H) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y comparaciones de sesiones específicas en las gráficas de caja y bigote (panel derecho) para el grupo no lesionado (negro, n=17), el grupo lesionado unilateralmente en el EDL (azul, n=8) y el grupo lesionado bilateralmente en el EDL (rosa, n=6) para las siguientes variables: C) correlación bimanual (K-W; $\chi^2=671.113$ p<0.001), D) palanca que se mueve primero ($\chi^2=157.343$ p<0.001), E) diferencia en el tiempo de inicio del movimiento bilateral (BOS) ($\chi^2=344.867$ P<0.001), F) variabilidad del tiempo de inicio (BMOV) ($\chi^2=232.325$ p<0.001), G) duración del movimiento ($\chi^2=324.084$ p<0.001), H) velocidad máxima bilateral ($\chi^2=172.648$ p<0.001), I) esfuerzo ($\chi^2=717.574$ p<0.001) y J) latencia para 100 ensayos ($\chi^2=334.235$ p<0.001). Los datos se presentan como mediana (línea sólida) y los percentiles 25 y 75 (área sombreada). Las gráficas de barras representan la mediana y los percentiles 25 y 75 de grupos de 10 sesiones en diferentes momentos de la curva de aprendizaje indicados en A y en C. Se señalan con asteriscos y líneas unidas únicamente las diferencias significativas entre los grupos que corresponden al mismo bloque en la curva de aprendizaje. La línea roja punteada se colocó para establecer una referencia visual y está alineada la mediana del primer bloque de sesiones para el grupo no lesionado.

La duración del movimiento también aumentó como efecto de las lesiones (Figura 11G), lo que sugiere que el EDL es necesario para controlar apropiadamente

la duración de los movimientos. El esfuerzo fue alto para los dos grupos de animales lesionados, principalmente para los lesionados bilateralmente (Figura 11I). La latencia para conseguir 100 ensayos fue similar entre el grupo intacto y el grupo de lesión unilateral en el EDL, mientras que en el grupo de lesión bilateral del EDL fue mayor, principalmente donde el tiempo de mantenimiento fue más largo (Figura 11J). Esto indica que los animales con lesión unilateral son capaces de desarrollar estrategias para conseguir suficientes recompensas, pero los animales con lesión bilateral tienen problemas para mantener las palancas presionadas (ver Tabla 1).

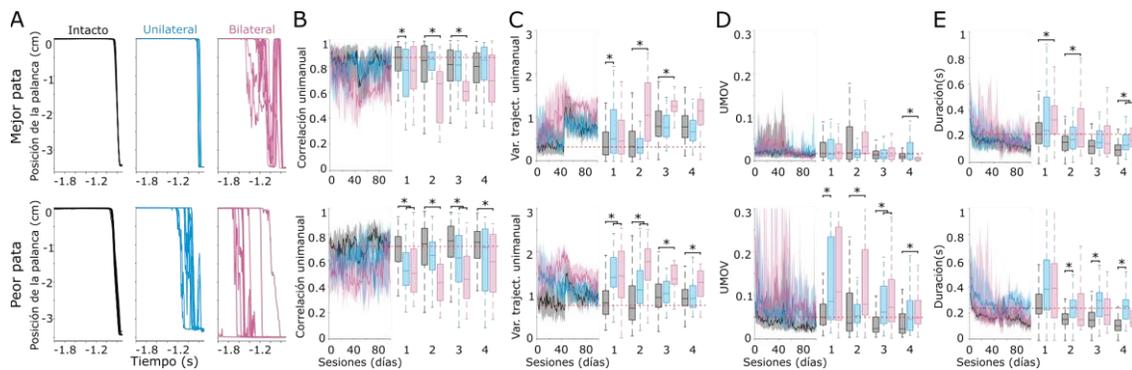


Figura 12. La lesión unilateral del estriado dorsolateral afecta parámetros de la ejecución unilateralmente. Trayectorias promedio de las últimas 10 sesiones de entrenamiento (91-100) de tres animales representativos separadas en según la variabilidad de las trayectorias ensayo con ensayo a lo largo de la sesión para la mejor pata (panel superior) y la peor pata (panel inferior) en un animal no lesionado (negro), uno lesionado unilateralmente en el EDL (azul) y uno lesionado bilateralmente en el EDL. (B-D) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y comparaciones de sesiones específicas en las gráficas de caja y bigote (panel derecho) (De acuerdo con la Figura 10A y 10C) para el grupo no lesionado (negro, n=17), el grupo lesionado unilateralmente en el EDL (azul, n=8) y el grupo lesionado bilateralmente en el EDL para las siguientes variables: B) correlación unilateral (K-W; $X^2=120.901$ p<0.001 arriba, $X^2=193.289$ p<0.001 abajo), C) variabilidad de la trayectoria unilateral ($X^2=292.214$ p<0.001 arriba, $X^2=250.754$ p<0.001 abajo) D) variabilidad unilateral de tiempos de inicio (UMOV) ($X^2=93.404$ p<0.001 arriba, $X^2=160.688$ p<0.001 abajo) y E) duración unilateral ($X^2=234.227$ p<0.001 arriba, $X^2=338.882$ p<0.001 abajo). Los datos se presentan como mediana (línea sólida) y los percentiles 25 y 75 (área sombreada). Las gráficas de barras representan la mediana y los percentiles 25 y 75 de grupos de 10 sesiones en diferentes momentos de la curva de aprendizaje indicados en la Figura 10A y 10C. Se señalan con asteriscos y líneas unidas únicamente las diferencias significativas entre los grupos que corresponden al mismo bloque en la curva de aprendizaje. La línea roja punteada se colocó para establecer una referencia visual e indica la mediana del primer bloque de sesiones para el grupo no lesionado.

Estos resultados indican que la lesión estriatal, tanto unilateral como bilateral, afecta el desempeño de la tarea de coordinación bimanual; sin embargo, aún se desconocía el efecto sobre el movimiento individual de cada una de las patas. Para evaluarlo se calcularon los valores de correlación ensayo-por-ensayo de las trayectorias de cada pata a lo largo de las sesiones de entrenamiento (Figura 6C). Según los valores de correlación se clasificó aquella con mayores valores de

correlación (menor variabilidad ensayo-con-ensayo) como la mejor pata y la otra como la peor pata (Figura 12A). Esta distinción se hizo de esta manera debido a que las lesiones se realizaron antes del inicio del entrenamiento, por lo que resultaba imposible identificar a la mejor pata previo a la lesión.

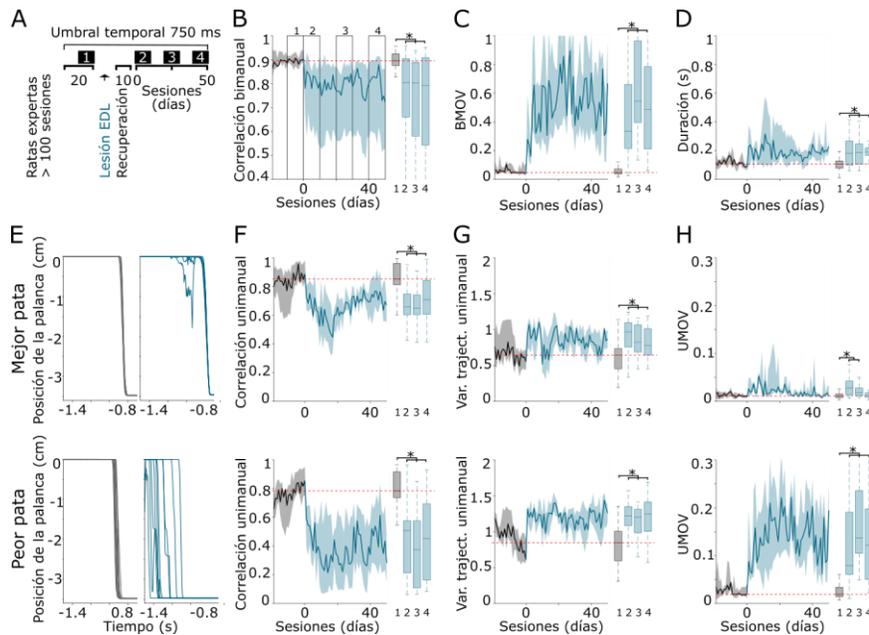


Figura 13. La lesión unilateral en el EDL desestabiliza la ejecución de la tarea de coordinación bimanual en animales sobre entrenados

A) Línea temporal de las sesiones, las fases de entrenamiento y las comparaciones estadísticas. (B-D) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y comparaciones específicas en las gráficas de caja y bigote (panel derecho) para los animales expertos ($n=6$) en la tarea de coordinación bimanual antes de la lesión (línea y caja color negro) y después de la lesión unilateral del EDL (línea y caja azul) para las siguientes variables: B) correlación bimanual ($X^2=36.023$, $p<0.001$), C) variabilidad del tiempo de inicio (BMOV; $X^2=105.597$ $p<0.001$), D) duración del movimiento ($X^2=33.098$ $p<0.001$). E) Trayectorias promedio de 10 sesiones para la mejor pata (arriba) y la peor pata (abajo) antes de la lesión (91-100, izquierda) y después de la lesión (41-50, derecha) de un animal representativo. (F-H) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y comparaciones de sesiones específicas en las gráficas de caja y bigote (panel derecho) (de acuerdo con el panel A y B) para las siguientes variables: F) correlación unimanual ($X^2=53.124$ $p<0.001$ arriba, $X^2=73.284$ $p<0.001$ abajo), G) variabilidad de la trayectoria unimanual ($X^2=33.970$ $p<0.001$ arriba, $X^2=58.633$ $p<0.001$ abajo) y H) variabilidad unimanual de tiempos de inicio (UMOV) ($X^2=34.889$ $p<0.001$ arriba, $X^2=106.030$ $p<0.001$ abajo). Los datos se presentan como mediana (línea sólida) y los percentiles 25 y 75 (área sombreada). Las gráficas de caja y bigote representan la mediana y los percentiles 25 y 75 de grupos de 10 sesiones en diferentes momentos de la curva de aprendizaje indicados en el panel A y B. Se señalan con asteriscos y líneas unidas únicamente las diferencias significativas. La línea roja punteada se colocó para establecer una referencia visual y está alineada a la mediana del primer bloque de sesiones.

Notablemente, se observa que la lesión unilateral disminuye la correlación unimanual y aumenta la variabilidad de la peor pata, mientras que la lesión bilateral afecta el desempeño en ambos efectores superiores (Figura 12B-C). La variabilidad de los tiempos de inicio de movimiento unimanual de la mejor pata (UMOV, Figura 12D arriba) es baja en los tres grupos de animales, y a pesar de que el movimiento

de los animales lesionados bilateralmente es más tortuoso (tiene varias presiones o intentos) (Figura 12A); el último movimiento (el que será reforzado) se ejecuta con alta precisión ensayo-con-ensayo. Mientras que para la peor pata (Figura 12D abajo) este valor está incrementado en ambos grupos de animales lesionados. La duración del movimiento es mayor para la pata buena en los animales con lesión bilateral (Figura 12E arriba), y para la peor pata en los animales lesionados unilateralmente (Figura 12E abajo) (ver Tabla 2).

Para corroborar si la lesión unilateral del EDL afectaba el movimiento de la pata contralateral al sitio lesionado se cuantificaron estos parámetros separando por la palanca izquierda y la derecha dado que siempre se lesionó el EDL derecho. Contrario a lo esperado, se encontró que el movimiento de la pata derecha (ipsilateral a la lesión) fue el menos afectado (Figura 22). Esto puede deberse a la disposición de las palancas y del bebedero (Figura 4), donde las palancas estando a la izquierda del panel y el bebedero a su derecha produce que la mayoría de los animales presionen primero la palanca derecha (la más cercana al bebedero) y después la palanca izquierda (Figura 12D) y a que probablemente los animales realicen otros ajustes posturales compensatorios que no fueron cuantificados a lo largo del entrenamiento.

A partir de estos resultados se decidió evaluar si los efectos producidos por las lesiones previas al aprendizaje de la tarea se replicaban en animales que habían sido sobre entrenados (ratas expertas, Figura 13A). En las variables bilaterales se encontró aumento en la correlación bimanual (Figura 13B), en la variabilidad de los tiempos de inicio (Figura 13C) y en la duración (Figura 13D) del movimiento. Al cuantificar las variables unilaterales, se encontró algo inesperado, tanto la mejor pata (Figura 13E-H arriba) como la peor pata (Figura 13E-H abajo) tienen alteraciones en el movimiento unilateral de ambos efectores superiores después de la lesión, aunque uno de ellos (la peor pata) está claramente más afectado, esto podría indicar que el entrenamiento extensivo produce una representación de ambas patas en el EDL, aunque se preserva la dominancia de la mejor pata (ver Tabla 3).

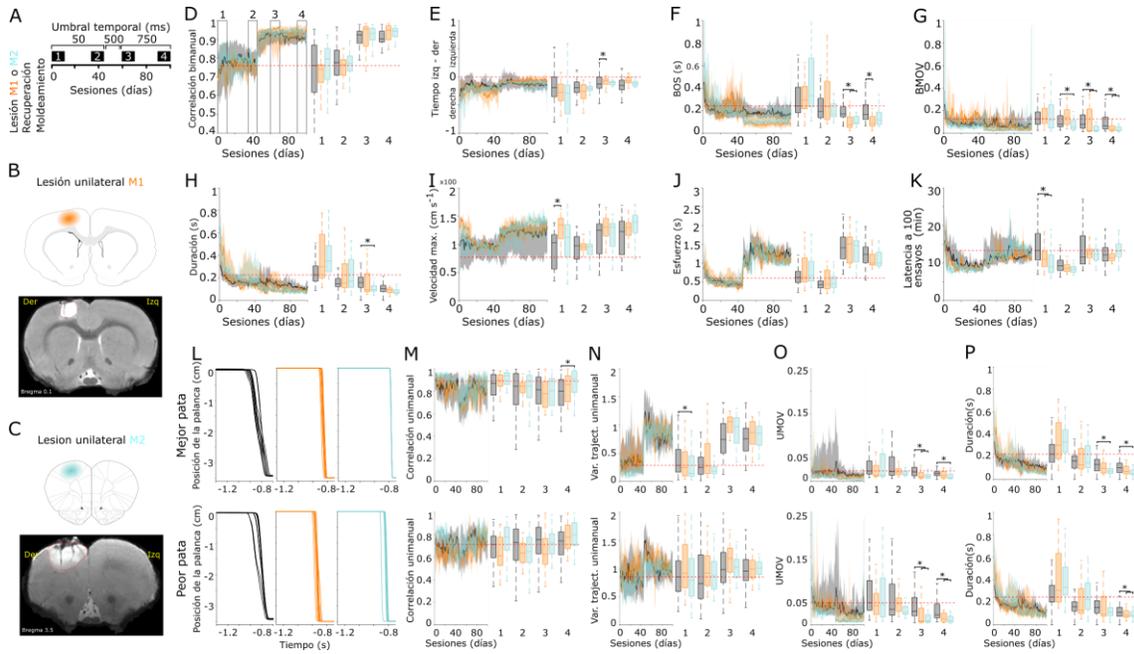


Figura 14. Lesiones unilaterales en M1 o M2 no producen cambios en el aprendizaje de la tarea coordinación bimanual

A) Representación esquemática de la línea temporal para las lesiones, las fases del entrenamiento y las sesiones para comparaciones estadísticas. (B-C) Representación esquemática de la región lesionada unilateralmente (arriba) y de una imagen por resonancia magnética representativa (abajo) en la corteza motora primaria (M1, B) y en la corteza motora secundaria (M2, C). (D-K) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y gráficas de caja y bigote con las comparaciones de sesiones específicas para cada grupo, control (negro, n=17), lesión en M1 (naranja, n=4) y lesión en M2 (turquesa, n=6) para las siguientes variables: D) correlación bimanual ($K-W$; $X^2=578.804$ $p<0.001$), E) palanca que se mueve primero ($X^2=111.388$ $p<0.001$), F) diferencia en el tiempo de inicio del movimiento bilateral (BOS) ($X^2=247.224$ $P<0.001$), G) variabilidad del tiempo de inicio (BMOV) ($X^2=197.397$ $p<0.001$), H) duración del movimiento ($X^2=413.060$ $p<0.001$), I) velocidad máxima bilateral ($X^2=229.073$ $p<0.001$), J) esfuerzo ($X^2=683.302$ $p<0.001$) y K) latencia para 100 ensayos ($X^2=327.141$ $p<0.001$). L) Trayectorias promedio de las últimas 10 sesiones de entrenamiento (91-100) de tres animales representativos separadas según la variabilidad de las trayectorias ensayo con ensayo a lo largo de la sesión para la mejor pata (panel superior) y la peor pata (panel inferior) en un animal no lesionado (negro), uno lesionado unilateralmente en M1 (naranja) y uno lesionado unilateralmente en M2. (M-P) Curvas de aprendizaje para M) la correlación unilateral ($X^2=64.194$ $p<0.001$ arriba, $X^2=65.404$ $p<0.001$ abajo), N) variabilidad de la trayectoria unilateral ($X^2=331.316$ $p<0.001$ arriba, $X^2=44.854$ $p<0.001$ abajo) O) variabilidad unilateral de tiempos de inicio (UMOV) ($X^2=183.572$ $p<0.001$ arriba, $X^2=239.465$ $p<0.001$ abajo) y P) duración unilateral ($X^2=363.210$ $p<0.001$ arriba, $X^2=386.708$ $p<0.001$ abajo). Los datos se presentan como mediana (línea sólida) y los percentiles 25 y 75 (área sombreada). Las gráficas de barras representan la mediana y los percentiles 25 y 75 de grupos de 10 sesiones en diferentes momentos de la curva de aprendizaje indicados en A y en C. Se señalan con asteriscos y líneas unidas únicamente las diferencias significativas entre los grupos que corresponden al mismo bloque en la curva de aprendizaje. La línea roja punteada se colocó para establecer una referencia visual y está alineada la mediana del primer bloque de sesiones para el grupo no lesionado.

Estos resultados indican que el comando de inicio del movimiento bimanual no se encuentra en el EDL, sino probablemente en una región aferente que sea capaz de coordinar a ambos estriados, como la corteza que envía proyecciones bilaterales al EDL. Para probarlo, primero se realizaron lesiones unilaterales en las cortezas M1 y M2 antes del aprendizaje de la tarea (n=10; M1: n=4 y M2: n=6) y

luego después del mismo (n=5). Si la ejecución de la tarea de coordinación bimanual no es afectada por la ausencia de las cortezas motoras de un hemisferio podría deberse a que la presencia de estas en el otro hemisferio es suficiente para generar el comando motor coordinado hacia el EDL.

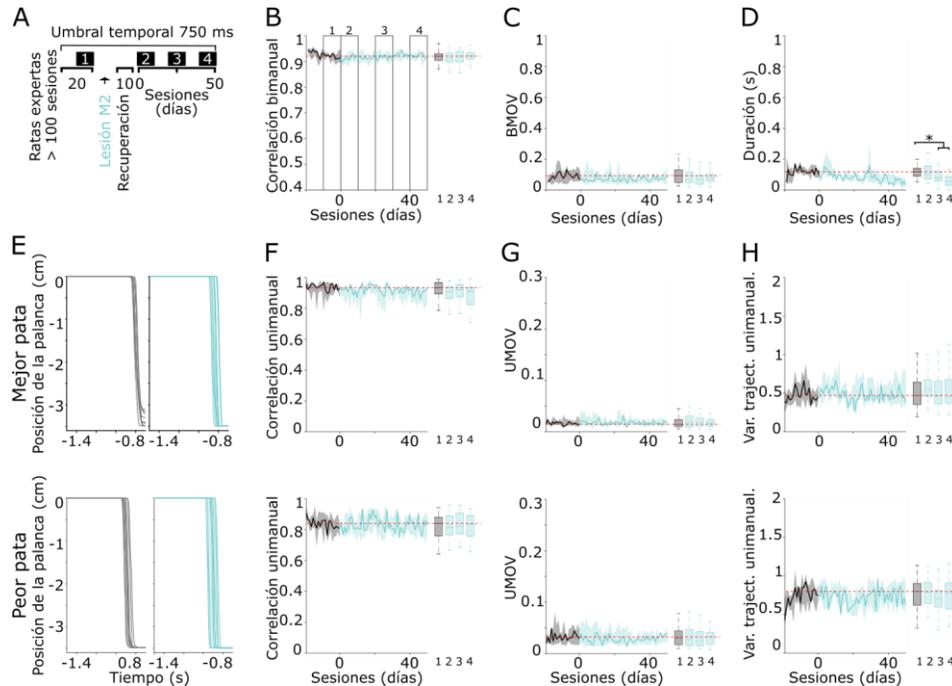


Figura 15. La lesión unilateral de M2 en animales expertos (sobrentrenados) no afecta el desempeño de la tarea de coordinación bimanual

A) Línea temporal de las sesiones, la lesión y las comparaciones estadísticas. (B-D) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y comparaciones específicas en las gráficas de caja y bigote (panel derecho) para los animales expertos (n=5) en la tarea de coordinación bimanual antes de la lesión (línea y caja color negro) y después de la lesión unilateral del EDL (línea y caja turquesa) para las siguientes variables: B) correlación bimanual ($X^2=1.798$, $p=0.635$), C) variabilidad del tiempo de inicio (BMOV; $X^2=5.247$ $p=0.154$), D) duración del movimiento ($X^2=44.933$ $p<0.001$). E) Trayectorias promedio de 10 sesiones para la mejor pata (arriba) y la peor pata (abajo) antes de la lesión (91-100, izquierdo) y después de la lesión (41-50, derecho) de un animal representativo. (F-H) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y comparaciones de sesiones específicas en las gráficas de caja y bigote (panel derecho) (de acuerdo con el panel A y B) para las siguientes variables: F) correlación unilateral ($X^2=7.325$ $p=0.062$ arriba, $X^2=0.798$ $p=0.806$ abajo), G) variabilidad unilateral de tiempos de inicio (UMOV) ($X^2=1.043$ $p<0.790$ arriba, $X^2=1.665$ $p<0.644$ abajo) y H) variabilidad de la trayectoria unilateral ($X^2=3.989$ $p<0.262$ arriba, $X^2=3.744$ $p<0.290$ abajo). Los datos se presentan como mediana (línea sólida) y los percentiles 25 y 75 (área sombreada). Las gráficas de caja y bigote representan la mediana y los percentiles 25 y 75 de grupos de 10 sesiones en diferentes momentos de la curva de aprendizaje indicados en el panel A y B. Se señalan con asteriscos y líneas unidas únicamente las diferencias significativas. La línea roja punteada se colocó para establecer una referencia visual y está alineada a la mediana del primer bloque de sesiones.

A diferencia de los hallazgos de las lesiones estriatales, en los grupos de animales lesionados en la corteza antes del aprendizaje, la mayoría de las mediciones bilaterales se mantuvieron sin cambios (Figura 14D-K), excepto la diferencia de tiempo al inicio (BOS, Figura 14D) y la variabilidad de tiempo al inicio

(BMOV, Figura 14G) que disminuyeron significativamente. Consistentemente, las mediciones de las variables unilaterales se mantuvieron cercanas a los valores del control (BOS, Figura 14L-N) (ver Tabla 4). Mientras que la variabilidad unimanual (UMOV) y la duración muestran una disminución significativa con respecto al control (Figura 14O-P) (ver Tabla 5). Por otro lado, las lesiones unilaterales de la corteza M2 en animales expertos en la tarea únicamente produjo cambios en la duración del movimiento bilateral (Figura 15D, ver Tabla 6). Estos resultados indican que la ejecución de los animales expertos en la tarea de coordinación bimanual puede mantenerse por la función de la corteza que permaneció intacta, probablemente por la presencia de neuronas IT en esa corteza que proyectan a ambos hemisferios.

6.3. Manipulación optogenética de la actividad neuronal de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales (M2-IT) durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual

Este hallazgo permitió explorar el objetivo de manipular las proyecciones cortico-estriatales bilaterales durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual. Para conseguirlo se utilizó una estrategia viral que permitió manipular la actividad de la población específica de neuronas corticales bilaterales (Figura 7). Consistente con la evidencia anatómica sobre las proyecciones bilaterales de las neuronas IT, se observó la expresión de la proteína amarillo fluorescente (EYFP, *enhanced yellow fluorescent protein* por sus siglas en inglés) en ambos hemisferios, con marcaje en la corteza (M1 y M2), en el estriado y en sus axones a través del cuerpo caloso, pero no regiones con proyecciones unilaterales como el tálamo (Figura 16A).

Para corroborar la funcionalidad de la opsina excitadora (ChR2) se realizaron registros electrofisiológicos en el EDL mientras se estimulaba la corteza M2 con luz azul (465 nm a ~24.9 mW en animal anestesiado y 0.3-1 mW en libre movimiento, Figura 8). Se encontró una respuesta consistente en neuronas únicas ante estímulos continuos y ante trenes de estimulación tanto en animales anestesiados (Figura 16B) como en animales en libre movimiento (Figura 16C) con latencias de respuesta cortas (< 20 ms; Figura 16D). El número de neuronas registrado en animales en libre movimiento (n=818) con estimulación ipsilateral (n=318) o contralateral (n=600) al sitio de registro permitió construir matrices de activación de

las neuronas del EDL donde se aprecia que la estimulación de las neuronas IT-M2 produce que un grupo de neuronas se inhiba y otro grupo se active (Figura 16E).

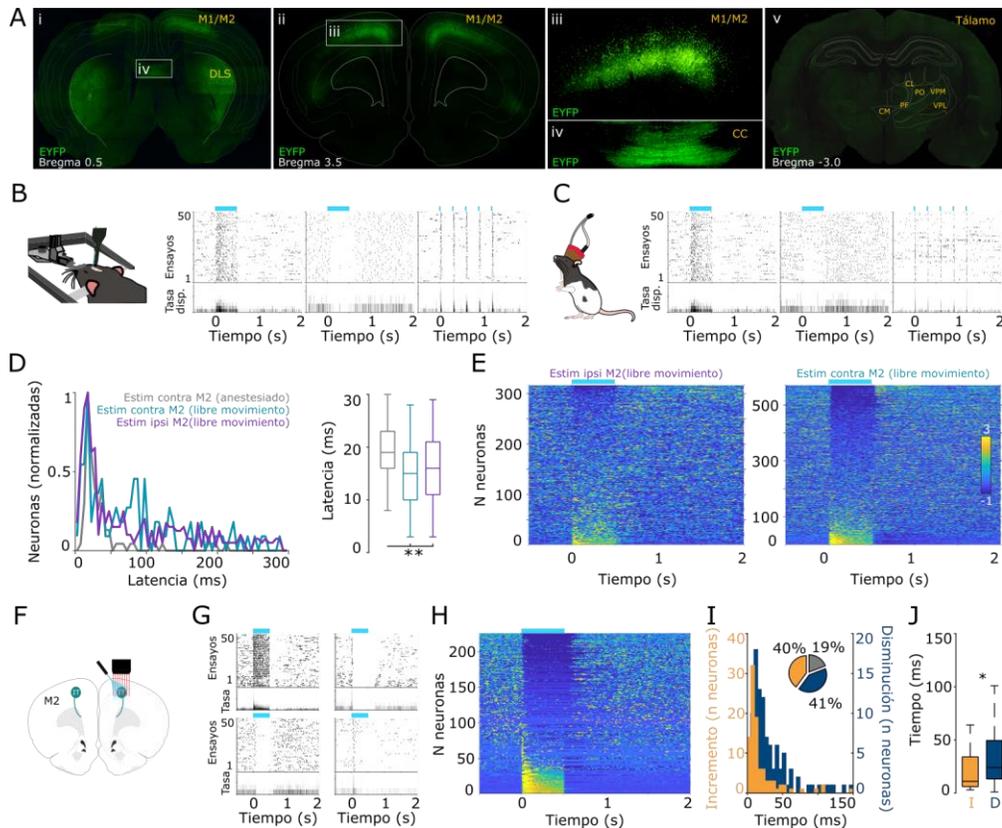


Figura 16. Estrategia para la estimulación optogenética de las proyecciones bilaterales cortico-estriales de M2

A) Confirmación histológica de la infección en neuronas bilaterales (ver Figura 6). La expresión de la proteína amarilla fluorescente (EYFP) en ambos estriados (i), en la corteza (ii, iii) y en el cuerpo caloso (iv). Note la ausencia de fluorescencia en el tálamo (v). (B-C) representación esquemática (panel izquierdo) y gráfica de barrido (raster plot, derecho) de los registros electrofisiológicos y estimulaciones ópticas en animal anestesiado (B) y en libre movimiento (C). Gráficas de barrido con la actividad de neuronas representativas del EDL y su respuesta a la estimulación óptica (50 ensayos de 500 ms, izquierdo y central; o 50 trenes de 5 estímulos de 5 ms, derecho) en la corteza M2 contralateral al sitio de registro. D) Histogramas de la latencia de respuesta para todas las células registradas en el EDL en animales anestesiados o en libre movimiento, curvas normalizadas a pico máximo de la distribución. Comparación de latencias menores a 30 ms. E) Tasas de disparo promedio evocadas por la estimulación en la corteza M2 ipsilateral (izquierdo) y contralateral (derecho) para las neuronas registradas en el EDL de animales en libre movimiento ($n=3$) expresados como valores Z (código de color) y ordenadas según la tasa de disparo promedio máxima alcanzada durante la estimulación de 500 ms. El periodo de estimulación se indica con una barra horizontal en la parte superior alineada a cero. F) Representación esquemática del registro en la corteza M2 y estimulación óptica en el sitio de registro. G) Gráficas de barrido (como en C). H) Histogramas de latencia de respuesta para las células que incrementaron (amarillo) o disminuyeron (azul) su tasa de disparo durante la estimulación. El inserto muestra el porcentaje de células que incrementaron, disminuyeron y que no cambiaron su tasa de disparo significativamente durante la estimulación. I) Comparación de latencias de respuesta. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. Las diferencias significativas se indican con asteriscos y líneas unidas para las comparaciones específicas (Bonferroni post hoc, $p<0.05$).

Con el objetivo de estimar el número de neuronas responsivas a la estimulación en la corteza M2, se registró y se estimuló simultáneamente a las neuronas M2 (n=226) en 3 animales anestesiados (Figura 16F). Se encontró que con la estimulación lumínica (1 pulso de 500 ms de 465 nm a ~24.9 mW) incrementó la actividad de un grupo de neuronas (40%), otro la disminuyó (42%) y otro no respondió (19%). Las latencias de respuesta fueron menores para las neuronas que se activan que para las que se inhiben (Figura 16J).

Una vez confirmado que la estrategia optogenética utilizada produce respuestas robustas en M2 con estimulación local y en el EDL con estimulación contralateral e ipsilateral al sitio registrado, se procedió a abordar los siguientes objetivos: 1) manipular optogenéticamente las proyecciones cortico-estriatales bilaterales y 2) registrar la actividad de neuronas estriatales individuales durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual.

Se utilizó un grupo de animales expertos en la tarea (n=9), de los cuales cinco fueron implantados bilateralmente únicamente con fibras ópticas en la corteza M2 y cuatro fueron además implantados con un arreglo de microelectrodos y registrados en el EDL del hemisferio derecho. En este grupo de experimentos, se estimuló unilateralmente la corteza M2 derecha o izquierda en sesiones independientes (Figura 17A-B). El 50% de los ensayos fueron seleccionados aleatoriamente para ser estimulados y la estimulación se desencadenó con el desplazamiento mínimo (0.1 cm, 465 nm con un rango de potencia: 0.3 – 1 mW) de cualquiera de las palancas y se mantuvo constante hasta que se cumplió la regla espaciotemporal y terminó cuando se entregó el reforzador (Figura 8B arriba y Figura 17C).

Se observó que la estimulación de la proyección M2-IT produjo efectos contrarios entre animales (Figura 17D-E, ver animales ejemplo) en las variables bimanuales de correlación bimanual (Figura 17D) y de la variabilidad en los tiempos de inicio (BMOV, Figura 17E), pero produjo un efecto robusto de incremento de la duración del movimiento bimanual (Figura 17F) que se aprecia en las trayectorias de un animal representativo (Figura 17C).

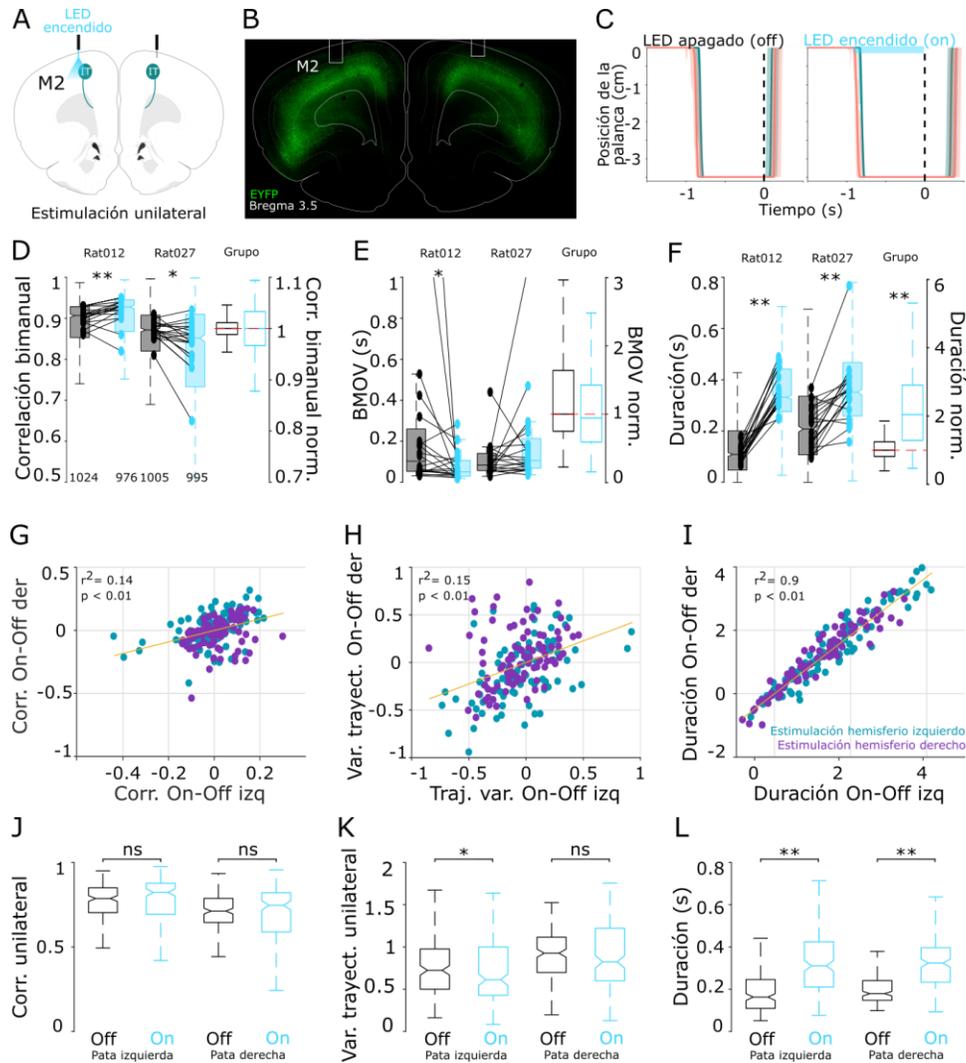


Figura 17. La estimulación unilateral de las proyecciones bilaterales de M2 incrementa la duración del movimiento

A) Representación esquemática de la estimulación unilateral de M2. B) Corroboración histológica de la posición de las fibras ópticas y de la expresión de EYFP en M2. C) Trayectorias representativas (media: línea sólida, área sombreada: percentil 25 y 75) para la pata izquierda (verde) y derecha (coral) alineadas a la entrega del reforzador (línea punteada en cero) separados entre ensayos no estimulados (izquierda) y estimulados (derecha) de una sesión de entrenamiento. La duración de la estimulación óptica está indicada con un rectángulo azul y fue desencadenada por el desplazamiento mínimo (0.1 mm) de cualquier palanca y se detuvo al conseguir la regla espaciotemporal (línea negra punteada). D) Correlación bimanual, E) variabilidad del tiempo de inicio (BMOV) y F) la duración del movimiento de dos animales representativos (cajas rellenas) y del grupo (cajas vacías). Las gráficas de caja y bigote representan la mediana y los percentiles 25 y 75 para todos los ensayos indicados en la parte inferior de (D), los pares de puntos unidos por líneas corresponden las medianas para cada sesión de cada animal. Los datos de cada sesión fueron normalizados con el valor promedio de los ensayos no estimulados. (G-I) Gráficas de correlación de los valores promedio por sesión de la sustracción de los ensayos estimulados y los no-estimulados de la pata izquierda (Y) y la pata derecha (X) para la correlación unilateral (G), la variabilidad de la trayectoria (H) y la duración unilateral (I) en las sesiones estimuladas en el hemisferio izquierdo (azul) o el derecho (morado). Mediciones unilaterales del coeficiente de correlación (J), la variabilidad de la trayectoria (K) y la duración del movimiento para la pata izquierda y derecha durante los ensayos no estimulados (negro) y los estimulados (azul). Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75 de los ensayos estimulados y no-estimulados. Las diferencias significativas, obtenidas con la prueba U de Mann Whitney, se indican con asteriscos y líneas unidas para las comparaciones específicas (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Aunado a lo anterior, los cambios en la correlación y en la variabilidad de la trayectoria unimanual, calculados mediante la diferencia de la mediana obtenida de estos valores en cada sesión para cada pata en los ensayos estimulados menos los no estimulados, fueron inconsistentes lo que se muestra con un valor de correlación bajo (Figura 17G-H) y con una disminución de la trayectoria unilateral sólo para la pata izquierda (Figura 17J). Mientras que similar al resultado del aumento de la duración bilateral, la correlación entre la diferencia en el cambio de duración en los ensayos estimulados y no estimulados entre ambas patas fue muy alta (Figura 17I) y se confirmó que el efecto de la estimulación unilateral de M2-IT se manifestó en ambos efectores superiores individualmente (Figura 17L, ver Tabla 7 y Tabla 8).

6.4. Registro de la actividad de las neuronas del EDL durante la estimulación optogenética de las proyecciones M2-IT y de la ejecución de la tarea de coordinación bimanual

Los resultados previos muestran que la activación unilateral de las neuronas M2-IT es suficiente para coordinar los movimientos bimanuales, por lo que las neuronas del EDL podrían ser reclutadas no para comandar, sino para modular el movimiento. Al registrar la actividad de las neuronas estriatales durante la ejecución de la tarea y evaluar su respuesta a la estimulación optogenética de las proyecciones cortico-estriatales bilaterales, se encontró que las neuronas del EDL tienen diferentes patrones de modulación durante la tarea de coordinación bimanual (actividad neuronal alineada al momento en que se entregó el reforzador) (línea punteada roja, Figura 18A). Algunas neuronas muestran cambios en su tasa de disparo (incremento o disminución) ante la estimulación óptica. De acuerdo con la evidencia previa, la tarea de coordinación bimanual produce patrones de activación neuronal (n=818) en secuencia que abarcan todo el ensayo (Figura 18B izquierda).

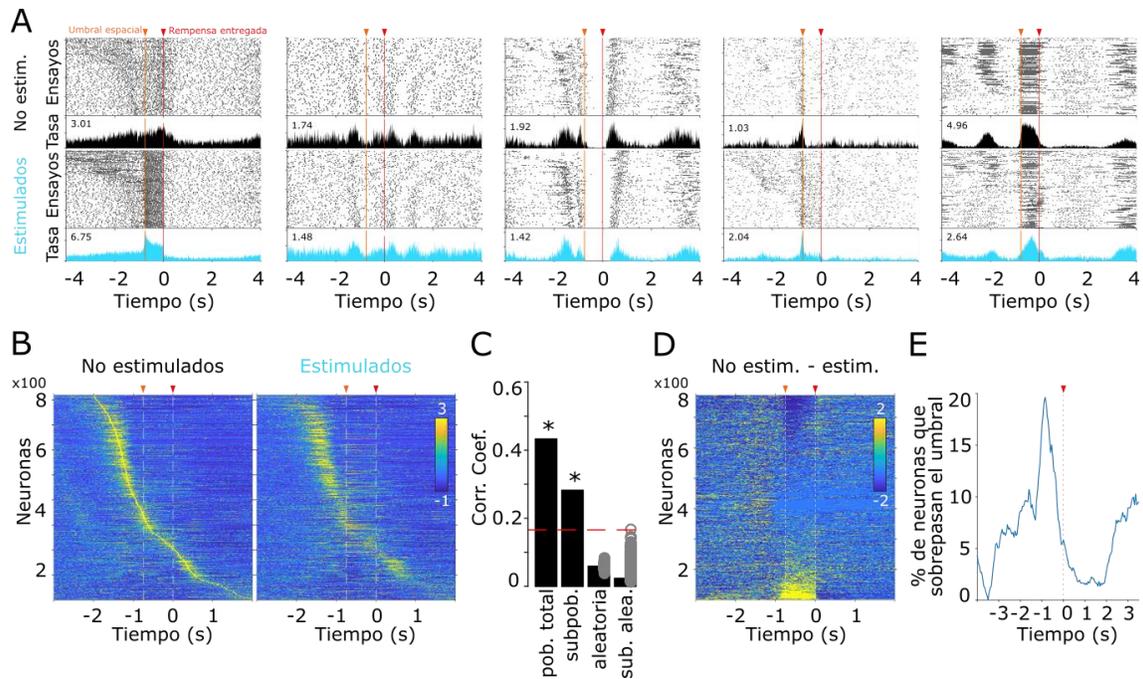


Figura 18. Activación secuencial de la actividad del EDL durante los movimientos bimanualmente coordinados.

A) Pares de gráficas de barrido (*raster plots*, arriba) e histogramas peri-eventos promedio que muestran cinco neuronas representativas con diferentes patrones de respuesta durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual en los ensayos no-estimulados (arriba) y estimulados (abajo). La actividad neuronal (espigas o potenciales de acción) fue alineada al momento en que se entregó la recompensa (cabeza de flecha roja). Los ensayos están ordenados de acuerdo con la duración del movimiento bimanual, los ensayos más largos (con más esfuerzo y más número de intentos) están en la parte superior de la gráfica de barrido. El momento en que se alcanzó el umbral espacial (2.6 cm de desplazamiento de las palancas) se señala con la cabeza de flecha naranja. Se indica la tasa máxima de disparo en Hz para esa neurona en cada tipo de ensayo. B) Matrices en valores Z de la tasa de disparo promedio de la población de neuronas registradas ordenadas al momento en el que alcanzaron su mayor tasa de disparo entre -2 y 2 segundos alrededor de la entrega del reforzador. C) Coeficiente de correlación entre los patrones de disparo de células individuales durante los ensayos no-estimulados y estimulados. Las correlaciones fueron comparadas con la correlación entre la matriz no-estimulada y la estimulada con un orden aleatorio de las neuronas, se realizaron 1000 iteraciones (puntos grises) para obtener el intervalo de confianza (línea roja punteada). D) Matriz de la sustracción de los ensayos no-estimulados y los estimulados, ordenados de acuerdo con la diferencia máxima cercana a los 700 ms previos a la entrega de la recompensa. E) Porcentaje de células que expresan un cambio absoluto de valor Z mayor a dos desviaciones estándar. Las diferencias se calcularon en ventanas consecutivas de 500 ms en pasos de 50 ms. La línea roja punteada indica el momento en que se entregó la recompensa (cumplimiento de regla espaciotemporal).

Es de notar que la secuencia de activación neuronal no se modificó por la estimulación de las neuronas M2-IT (Figura 18B derecha), lo cual fue confirmado con los valores de correlación de cada célula entre los ensayos no-estimulados y los estimulados (Figura 18C) y se sí se aleatoriza el orden de las neuronas (1000 iteraciones para obtener el intervalo de confianza). Posteriormente, se calculó la proporción de neuronas que respondieron a la estimulación, para eso se sustrajo la

actividad normalizada en valores Z entre los ensayos no-estimulados y los estimulados, como se vio previamente (Figura 16E) la estimulación de M2-IT produjo tanto incremento como disminución de la actividad de las neuronas del EDL (Figura 18D) en el 20% de las neuronas, alcanzando la diferencia máxima cercano a los 750 ms que corresponden al umbral temporal (Figura 18E). Estos resultados muestran, por un lado, que la estimulación optogenética produce modulación efectiva durante la ejecución de la tarea y, por el otro lado, que la activación secuencial de las neuronas del EDL permanece intacta, lo que indicaría que los efectos de la estimulación de M2-IT se asocia con la actividad de subpoblaciones de células con mayor preferencia por las variables relacionadas con el movimiento bimanual.

Después se exploró si las representaciones cinemáticas que se alojan en el EDL (Rueda-Orozco & Robbe, 2015) eran alteradas por la estimulación de las M2-IT. Para eso se analizaron variables conductuales estereotipadas que se producen por las transiciones del animal entre las palancas y el bebedero. Por medio de videos se analizó la posición y la rotación de la cabeza con el acelerómetro que contiene el amplificador de registro y a través del cambio en la posición de las palancas el movimiento bimanual (Figura 9). Para estos análisis se utilizaron 780 neuronas registradas durante 45 sesiones que tuvieron la calidad de video apropiada. De acuerdo con la literatura previa (Kim et al., 2019; Rueda-Orozco & Robbe, 2015), se encontraron neuronas con correlaciones lineales (positivas o negativas) con la posición (Figura 19A) o velocidad de la cabeza/cuerpo (Figura 19B). El análisis de correlación parcial, que incluyó tiempo, posición de las palancas, velocidad de las palancas, posición de la cabeza/cuerpo, velocidad de la cabeza/cuerpo y la aceleración en los tres ejes, reveló que la posición y la velocidad de la cabeza fueron las variables que explicaban la mayor variabilidad (en promedio 6.4 % y 4.9 % respectivamente) en la tasa de disparo (Figura 19C).

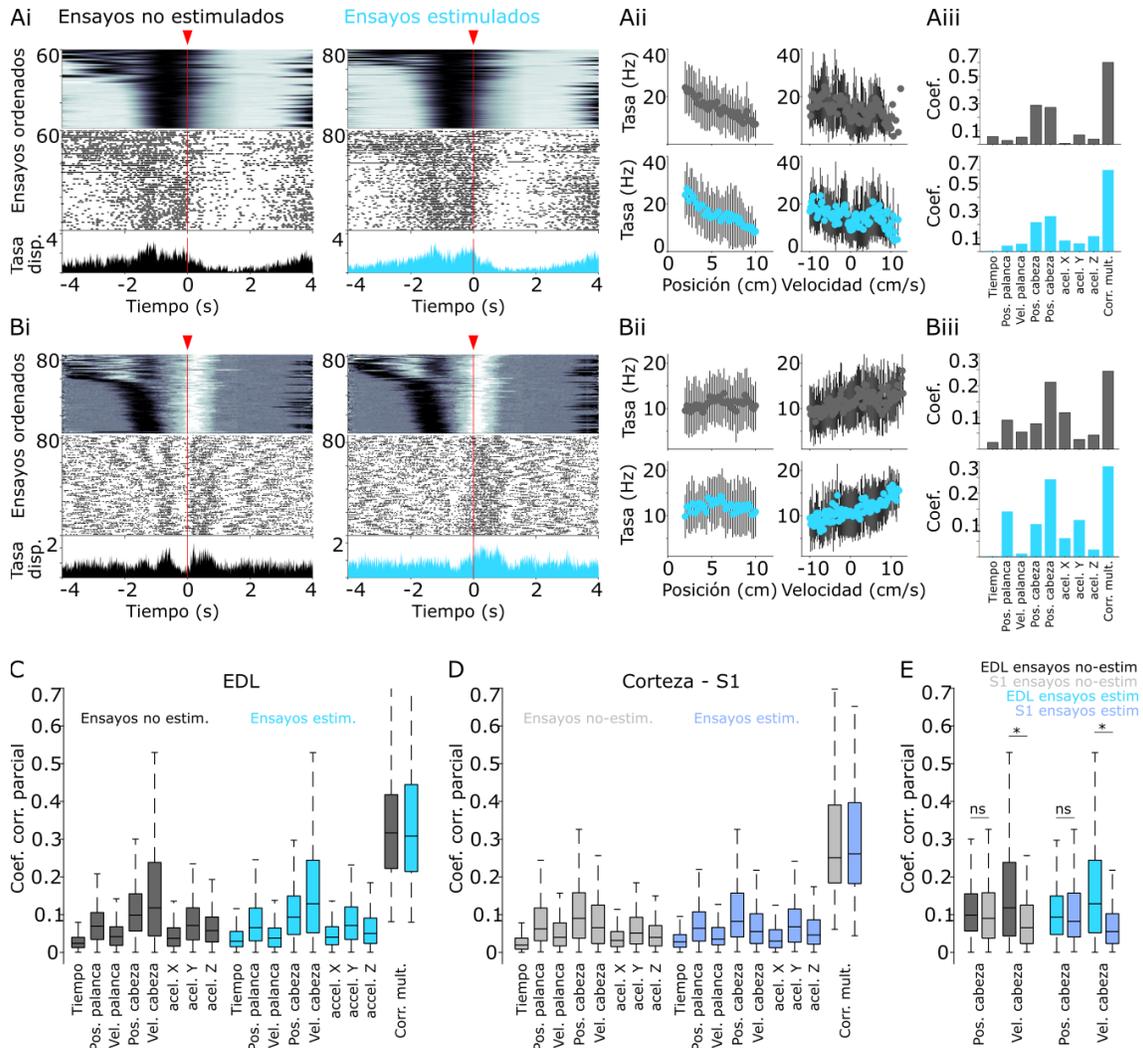


Figura 19. La representación cinemática en el EDL no se afecta por la estimulación de las proyecciones cortico-estriatales de M2

(A-B) Dos células representativas cuya tasa de disparo se correlacionó con la posición (A) o la velocidad (B) de la cabeza/cuerpo. Matrices con código de color ensayo-por-ensayo de la posición instantánea (Ai) y la velocidad (Bi). Gráficas de barrido (raster plots) e histogramas peri-evento promedio alineados a la entrega de la recompensa (cabeza de flecha roja) de los ensayos no-estimulados (panel izquierdo) y los estimulados (panel derecho). Los ensayos están ordenados con respecto a la duración del movimiento de la cabeza/cuerpo. (Aii-Bii) Gráficas de correlación entre la tasa de disparo y la posición (izquierda) o la velocidad (derecha) (media \pm d.e.) para los ensayos no-estimulados (arriba) y los ensayos estimulados (abajo). (Aiii-Biii) Coeficientes de correlación parcial y correlación múltiple entre la tasa de disparo y las variables conductuales. (C-E) Coeficientes de correlación parcial y múltiple (valores absolutos) entre la tasa de disparo de la población de neuronas registradas en EDL (C) o en S1 (D) y las variables conductuales durante los ensayos no-estimulados y los estimulados. E) Comparación de los coeficientes de correlación parcial y las variables conductuales del EDL y S1. Las gráficas de caja y bigote representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las diferencias significativas se indican por asteriscos y líneas que unen las comparaciones específicas (Bonferroni post hoc, $p < 0.05$).

Para comprobar si esta codificación es específica de las neuronas del EDL se calculó el coeficiente de correlación parcial de la actividad de las neuronas registradas en S1 (196 unidades en 8 sesiones) y se encontraron valores similares de correlación para la mayoría de las variables (Figura 19D), excepto para la velocidad de la cabeza/cuerpo que presentó valores menores que las neuronas del EDL (Figura 19E).

Los resultados previos muestran que la estimulación de la vía cortico-estriatal bilateral M2-IT no tiene una influencia particular en los parámetros cinemáticos de las transiciones generales del cuerpo (Figura 19E), efecto que se corrobora con la estimulación en bloques, donde los animales son estimulados independientemente de su conducta (Figura 23). En este experimento tampoco se observó un efecto en la representación de parámetros cinemáticos. Sin embargo, la misma estimulación produce efectos claros en la duración del movimiento bimanual (Figura 17). Después se comprobó si los parámetros relacionados con las palancas podrían estar representadas en la actividad del EDL y si estas representaciones serían moduladas por la estimulación de las neuronas M2-IT. Se calculó el promedio de la tasa de disparo de cada célula inmediatamente antes de la entrega del reforzador (750 ms) y se correlacionó con la correlación bimanual o la duración para todos los ensayos de la sesión, los no estimulados o los estimulados. Se encontraron células cuya tasa de disparo tiene altos coeficientes de correlación con las variables bimanuales (esfuerzo, correlación bimanual y duración) (Figura 20A-C).

Posteriormente se calculó la fracción de células moduladas por la estimulación de M2-IT y que fueron también moduladas significativamente por alguna variable bilateral (correlación bimanual, esfuerzo o duración) o cinemática (posición o velocidad). Para crear un intervalo de confianza estadístico, se extrajo aleatoriamente un número de neuronas no moduladas por la estimulación de M2-IT similar al de las neuronas moduladas y se calculó la fracción de estas que fue significativamente modulada por las variables bimanuales o cinemáticas (este procedimiento se repitió 1000 veces). Cerca del 60% de las neuronas del EDL que fueron moduladas por la estimulación M2-IT, también lo fueron para las variables bimanuales. Mientras que para el resto de la población (no moduladas por la

estimulación M2-IT) este valor fue cercano al 30% y se mantuvo por debajo del intervalo de confianza (Figura 20D izquierda). Este resultado es similar para los ensayos estimulados y los no estimulados.

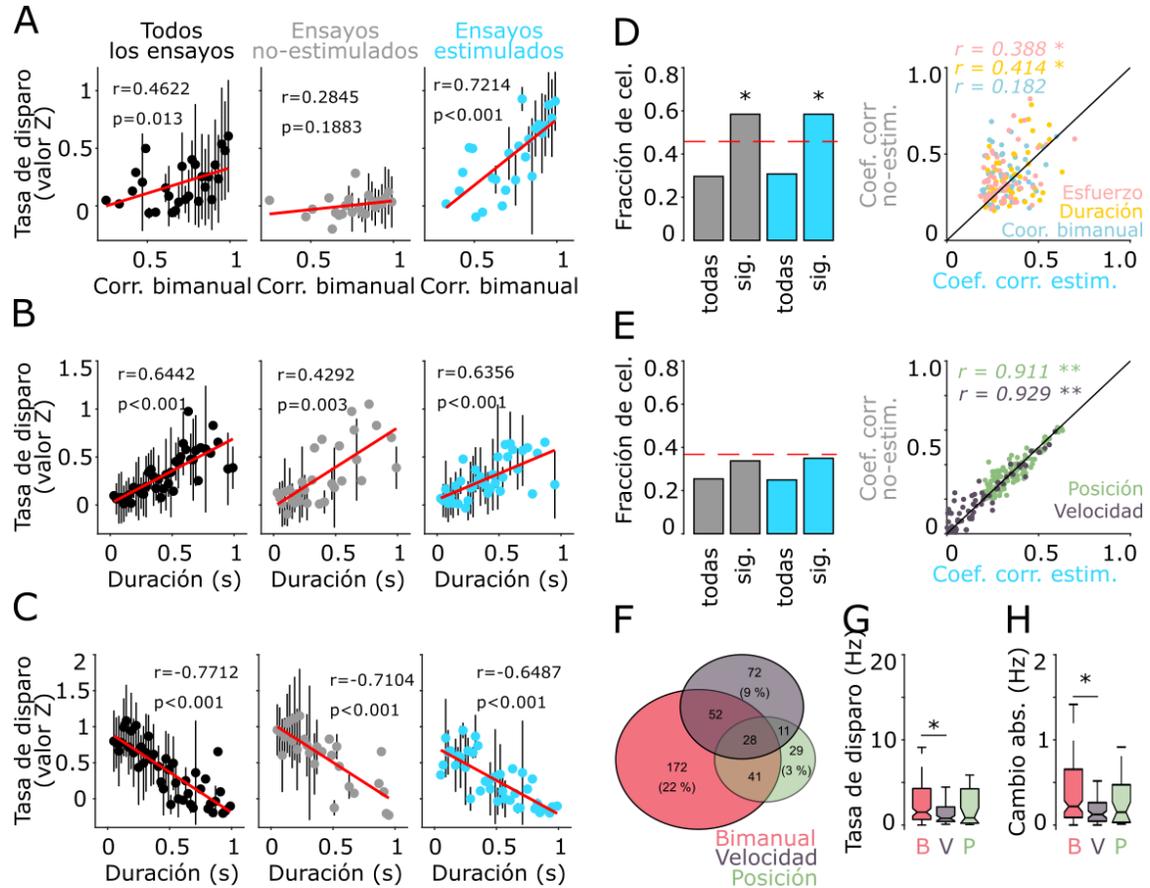


Figura 20. Las representaciones de la duración del movimiento en el EDL son afectadas por la estimulación M2

(A-C) Gráficas de correlación entre la tasa de disparo de tres neuronas representativas y la correlación bimanual (A) o la duración (B-C) en todos los ensayos, los no-estimulados y los estimulados. (D-E) Gráficas de barras (izquierda) de la fracción de células que correlacionan significativamente con las variables del movimiento bimanual (D) y las cinemáticas (E) para la población entera y la subpoblación que fue significativamente modulada por la estimulación de M2 durante los ensayos no-estimulados (gris) y los estimulados (azul). La línea roja representa el intervalo de confianza (99.5), Los asteriscos señalan los valores que sobrepasan el intervalo de confianza. Gráficas de los coeficientes de correlación (derecha) entre los ensayos no-estimulados o estimulados y las variables de coordinación bimanual (D) o las cinemáticas (E). Las correlaciones significativas se indican con asteriscos junto al valor de R. F) Diagramas de Venn que indican la proporción de células que tiene correlación significativa con las variables de coordinación bimanual o las cinemáticas: velocidad o posición de la cabeza/cuerpo de la población total de neuronas ($n=780$). G) Tasa de disparo basal para cada subpoblación de células (K-W; $\chi^2=23.11$ $p < 0.001$). H) Cambio absoluto de la tasa de disparo inducido por la estimulación de M2-IT para cada subpoblación de células (K-W; $\chi^2=12.58$ $p < 0.001$). Las diferencias significativas se indican con asteriscos y líneas que indican las comparaciones específicas (Post hoc Bonferroni, $p < 0.05$).

Por otro lado, para las variables cinemáticas, tanto de la población total como de las neuronas moduladas por M2-IT presentaron porcentajes similares por debajo del intervalo de confianza (Figura 20E izquierda). Se calcularon los coeficientes de correlación de la población de neuronas moduladas por la estimulación M2-IT entre los ensayos estimulados y no estimulados. Las variables cinemáticas mostraron correlaciones perfectas (por arriba de 0.9, Figura 20E derecha), lo que confirma que la estimulación no modificó la representación de estos parámetros. Por el contrario, en el caso de los parámetros relacionados con la presión de las palancas, estos valores cayeron por debajo de 0.45 (Figura 20D derecha,) lo que indica que la estimulación modificó estos parámetros. La mayor proporción de neuronas (>50%) tuvieron correlación con variables bimanuales o cinemáticas (405/780 neuronas moduladas por la tarea). Cerca de la mitad de las neuronas relacionadas con la tarea (172/405 neuronas) fueron moduladas por variables bimanuales. El 29% (121/405 neuronas) de la población de las neuronas moduladas compartieron variables bimanuales con variables cinemáticas, el resto de las neuronas (27%, 112/405 neuronas) fueron exclusivamente cinemáticas (velocidad y/o posición) (Figura 20F). Se calculó el promedio de la tasa de disparo durante la misma ventana (750 ms antes de la entrega del reforzador) para los grupos de células modulados por las variables bimanuales o cinemáticas, se encontró que las neuronas moduladas por parámetros bimanuales incrementan significativamente su tasa de disparo comparado con las moduladas por la velocidad o por la posición (Figura 20G). Este efecto se confirma con el cambio absoluto de la tasa de disparo, donde las neuronas moduladas por variables bimanuales tienen valores mayores que los otros subgrupos de células (Figura 20H) lo que confirma que este grupo de células es el más sensible a la estimulación de M2-IT. Estos resultados indican que la estimulación M2-IT en la región cortical seleccionada, recluta un grupo particular de neuronas estriatales y, que incluso, las representaciones cinemáticas típicamente observadas en el EDL no se vean afectadas.

6.5. Participación de las poblaciones neuronales del EDL durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual y evaluación de su respuesta ante la estimulación de las neuronas M2-IT

Para cumplir con el último objetivo de diferenciar la participación de las distintas poblaciones neuronales en el EDL en la tarea de coordinación bimanual se realizó un análisis de los subgrupos de neuronas basado en la forma de sus potenciales de acción (espigas). Con este análisis se pudo distinguir si las neuronas sensibles a la estimulación pertenecen a un subgrupo neuronal en particular. Cabe mencionar que con este método no se puede aseverar el linaje neuronal únicamente con la forma del potencial de acción, para esto se requeriría el uso de marcadores moleculares o la reconstrucción completa de la célula registrada, técnicas que quedan fuera de los alcances de este proyecto, por lo cual las nombramos neuronas putativas. Se utilizó un algoritmo de reducción dimensional por componentes principales de la forma promedio de la espiga para cada neurona, se proyectaron los primeros tres componentes (que explican la mayor variabilidad) y se aplicó un método de separación por clústeres (k-means) para generar de dos a ocho grupos con forma de espiga similares (7000 iteraciones), de cada iteración se obtuvo el valor de Silhouette. Con este algoritmo se calcula el valor de cohesión entre los grupos, se observa que la división en tres clústeres fue la que obtuvo mayores valores de Silhouette (Figura 21A), por lo que dividir en tres grupos es lo ideal. Se muestra la proyección de los tres subgrupos (Figura 21B) y la forma de espiga correspondiente para cada uno (Figura 21C).

Se encontraron tres grupos de neuronas, las cuales se clasificaron como: neuronas espinosas medianas putativas (pNEM), interneuronas de disparo rápido putativas (pIDR) y “otras”. Las pNEM corresponden al clúster más grande (60%, 468/780 neuronas) presentan tasa de disparo baja (0.94 Hz) y forma de la espiga ancha, el segundo grupo pIDR presenta tasas de disparo altas (5.78 Hz) y forma de espiga angosta (21%, 164/780 neuronas). El resto de las neuronas se asignaron al grupo “otras” (22%, 171/780 neuronas) con tasa de disparo (0.68 Hz) y ancho de la forma de espiga similar al de las pNEM (Figura 21D-E).

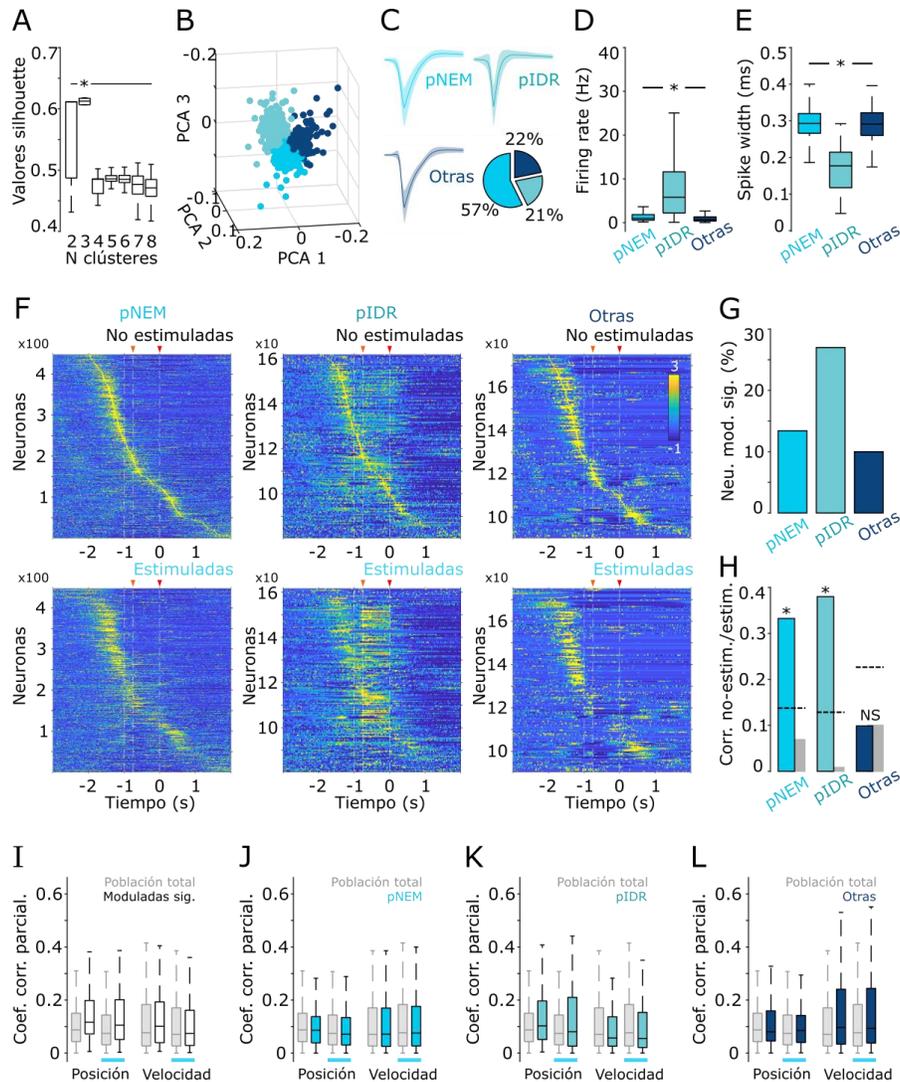


Figura 21. Representación de la tarea de coordinación bimanual en subpoblaciones del EDL

A) Valores de Silhouette de 1000 iteraciones de proyecciones de los PCA de 2 a 8 grupos (k-means) de las formas de espiga promedio para todas las células registradas durante la ejecución de la tarea de coordinación bimanual. B) La mejor proyección de los PCA que corresponde a tres clústers (código de color). C) Formas de espiga promedio de todas las células clasificadas según la mejor proyección (A-B). Las formas de la espiga se nombraron neuronas espinosas medianas putativas (pNEM), interneuronas de disparo rápido putativas (pIDR) u otras. La gráfica de pastel muestra el porcentaje de cada subpoblación. Tasa de disparo promedio (D) y ancho de la espiga (potencial de acción) (E) para cada subpoblación. F) Matrices de activación de la tasa de disparo en valores Z de todas las neuronas registradas de cada subpoblación y ordenadas al momento en que alcanzaron su máxima tasa de disparo entre -2 y 2 seg alineados a la entrega del reforzador para los ensayos no-estimulados (arriba) y estimulados (abajo). G) Porcentaje de neuronas significativamente moduladas por la estimulación M2-IT de las tres subpoblaciones. H) Coeficientes de correlación entre los patrones de disparo de neuronas individuales en ensayos estimulados y no estimulados. Las correlaciones se compararon con la distribución de coeficientes de correlación obtenidos del orden aleatorio de las neuronas (1000 iteraciones para obtener el intervalo de confianza). (I-L) Coeficientes de correlación parcial (valores absolutos) para todas las neuronas moduladas significativamente (I), y las subpoblaciones de pNEM (J), pIDR (K) y otras (L) durante los ensayos no-estimulados y estimulados. Las gráficas de caja y bigote representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las diferencias significativas se indican con asteriscos y líneas que indican las comparaciones específicas (Post hoc Bonferroni, $p < 0.05$).

Al evaluar las secuencias de activación por grupo neuronal se encontró que los tres grupos se activan secuencialmente y su respuesta cubre completamente el ensayo (Figura 21F arriba). Se puede apreciar que la estimulación M2-IT modifica el patrón de activación cercano a los 750 ms en dos poblaciones, las neuronas pIDR y las “otras” (Figura 21F abajo). La cuantificación formal de las neuronas moduladas muestra que el mayor porcentaje de neuronas sensibles a la estimulación son las pIDR (Figura 21G) y que la secuencia de activación se ve afectada únicamente en el grupo de “otras” neuronas (Figura 21H) causado por la inhibición de estas neuronas durante la estimulación. No se encontraron diferencias en la codificación cinemática de la población (Figura 21I-L). Esto sugiere que la activación de M2-IT recluta a un subgrupo de neuronas en el EDL, principalmente de IDR, quienes a su vez modulan el microcircuito estriatal para modificar la duración del movimiento.

7. Discusión

Los movimientos bimanuales son muy importantes en la conducta animal, son utilizados diariamente para funciones básicas de supervivencia como la alimentación y su ejecución exitosa depende de la coordinación espaciotemporal entre los efectores superiores (Diedrichsen et al., 2010; Rueda-Delgado et al., 2014; Swinnen et al., 1988). El desarrollo de protocolos que permitan medir con alta especificidad y detalle los movimientos bimanuales puede ayudar a comprender mejor sus bases neuronales; así como, descifrar la contribución de las regiones corticales y subcorticales en el control motor.

En esta tesis se exploró la capacidad de ratas para aprender una tarea de coordinación bimanual donde a través de las mediciones de variables bimanuales y unimanuales (Figura 6) se pudiera extraer una curva de aprendizaje estándar (Figura 10) donde el entrenamiento produjera disminución en la variabilidad de la ejecución movimiento de ambos efectores superiores y el acople espaciotemporal entre ellos. Previamente, se ha identificado que el sistema nervioso tiene sesgos por cierto tipo de patrones con una preferencia particular por los movimientos simétricos en espejo (Diedrichsen et al., 2010; Kelso et al., 1983; Swinnen &

Duysens, 2004). Con este protocolo se pudo observar una progresión natural de los animales a desarrollar los movimientos bimanuales cada vez más coordinados.

Una vez estandarizado el protocolo conductual, se investigó la participación de la proyección cortico-estriatal bilateral (M2-IT) en los movimientos bimanualmente coordinados en ratas. Se encontró que las regiones corticales motoras (M2) coordinan los movimientos bimanuales, mientras que el EDL es reclutado para darle estabilidad y duración a la trayectoria. Estas conclusiones se basaron primero en los resultados de experimentos con animales lesionados unilateral y bilateralmente en el EDL (Figura 11 y Figura 12; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), donde las lesiones afectaron la ejecución del movimiento bimanual, reflejado en la disminución de la correlación bilateral, el incremento de la diferencia de tiempo al inicio del movimiento (BOS) y la variabilidad de los tiempos de inicio (BMOV), causado por la alteración de la precisión en el movimiento de una pata para las lesiones unilaterales, o de ambas patas para las lesiones bilaterales (Figura 12). Además, este efecto fue robusto incluso en los animales sobreentrenados lesionados unilateralmente en el EDL (Figura 13). Esto sugiere que la lesión del EDL afecta principalmente el control de un efector individual, lo que impacta indirectamente en el movimiento bimanual. Por lo que si la función del estriado fuera coordinar a los dos efectores, la ausencia de solo uno (lesión unilateral del EDL) debería alterar el inicio del movimiento de ambos efectores y el desarrollo de sus trayectorias; sin embargo, afecta principalmente a uno, lo que se ajusta a la evidencia del papel del estriado como modulador momento-a-momento de los movimientos (Dudman & Krakauer, 2016; Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Rueda-Orozco & Robbe, 2015). Por lo que el comando y control de los movimientos bilaterales debería de organizarse en las regiones aferentes al estriado como la corteza motora.

Aunado a esta evidencia, la lesión unilateral de la corteza motora M1 y M2 antes (Figura 14) o después (Figura 15) del aprendizaje de la tarea de coordinación bimanual tiene efectos mínimos en el movimiento de ambos efectores superiores. Es de notar que en reportes previos las lesiones en M1 si afectan movimientos de

alcance de la pata contralateral a la sitio dañado (Touvykine et al., 2016); sin embargo, en esta tarea de coordinación bimanual, las medidas de sincronía del inicio del movimiento están por debajo del control (Figura 14F-J), esto podría deberse a que se ha mostrado que la corteza M2 mantiene la representación tanto de la pata contra como de la ipsilateral posterior a una lesión (Touvykine et al., 2016), lo que confirma la hipótesis de que una corteza motora funcional es suficiente para coordinar a ambos estriados.

Para corroborar que la corteza M2 es capaz de modular unilateralmente la actividad del estriado de ambos hemisferios, se llevaron a cabo experimentos de manipulación optogenética de la vía cortico-estriatal bilateral M2-IT que indican que la estimulación unilateral de las proyecciones bilaterales de M2-IT es capaz de producir efectos bilaterales, principalmente en la duración del movimiento de ambos efectores (Figura 17). De lo anterior, pese a que este efecto conductual fue acompañado por cambios en la actividad neuronal relacionada con el movimiento bimanual (Figura 20 y Figura 21) la activación secuencial de las neuronas del EDL durante la ejecución de la tarea se mantuvo intacta (Figura 18). Estos resultados podrían significar que la vía cortico-estriatal está organizada de forma modular (Lemke et al., 2019) donde: por un lado, la cinemática del movimiento se codifica por un grupo de neuronas en el EDL que no es sensible a la estimulación de las neuronas M2-IT; por otro lado, los detalles del movimiento bimanual son codificados por otro grupo de neuronas en el EDL que responden a la estimulación de las neuronas M2-IT, fijando, por ejemplo, la duración del movimiento (Park et al., 2020). A pesar de que el efecto de la activación de las neuronas M2-IT es claro conductualmente (Figura 17), como a nivel neuronal local y en el EDL (Figura 16), no se puede descartar que la estimulación unilateral de M2-IT no produzca activación antidrómica de la corteza contralateral a corteza estimulada. Por lo que, de acuerdo con la conectividad cortico-cortical, podría favorecer la ejecución de un movimiento bimanual exitoso (Deffeyes et al., 2015; Soma et al., 2017; Touvykine et al., 2020).

La estimulación de las M2-IT no afectan la representación de las variables cinemáticas en la actividad estriatal (Figura 18). Ante este hallazgo, se podría

pensar que la proporción de neuronas responsivas a la estimulación en M2 no es suficiente para activar a la población de células en el EDL que codifica a los parámetros cinemáticos. Sin embargo, la estimulación local de M2-IT y el registro de la corteza M2 recluta al 80% de las neuronas corticales (Figura 16), lo que confirmaría que el protocolo de estimulación utilizado y la estrategia optogenética aquí implementada es robusta y recluta poblaciones neuronales en el EDL que se modulan diferencialmente en la tarea. Por un lado, las neuronas insensibles a la luz que codifican la cinemática del movimiento (Figura 19) (Kim et al., 2019; Rueda-Orozco & Robbe, 2015) y, por el otro las sensibles a la luz que se codifican el movimiento de los efectores superiores y modulan la longitud (duración) del mismo (Figura 20). Estos resultados apoyan que en el EDL se codifica la información a través de módulos comandados por M2 que pueden surgir paralelamente durante la ejecución de una tarea (Lemke et al., 2019; Sjöbom et al., 2020).

La estimulación unilateral de las neuronas M2-IT produjo ese efecto diferencial en las neuronas moduladas por la tarea (Figura 20). En este punto cabe discutir dos elementos, el primero es qué efecto puede tener sobre la población de las neuronas de M2-IT sobre las otras poblaciones de neuronas corticales (IT, ET e interneuronas inhibitorias) (Figura 16) donde, de acuerdo a la literatura previa, las neuronas de disparo regular (sin distinguir entre IT o ET) tienen una alta proporción de activación (~33%) durante el periodo de mantenimiento en una tarea de presión de pedales, mientras que pocas neuronas de las IDR (~11%) se activan en este periodo (Soma et al., 2017). El segundo es que a pesar de que consideremos una conexión jerárquica serial entre M2 y el EDL, la estimulación no produce una activación (excitación) generalizada de las neuronas del EDL, sino que recluta subpoblaciones de neuronas (Figura 18, Figura 19 y Figura 20). Al clasificar a las neuronas estriatales con base en la forma de su espiga, se encontró que esta estimulación de M2 tiene una amplia incidencia sobre las IDR (Figura 21), esto coincide con un reporte recientemente publicado donde se muestra que las IDR reciben las entradas más fuertes de las cortezas motoras (Johansson & Silberberg, 2020).

Queda fuera del alcance de este proyecto la participación de las NEMs de cada vía, la directa y la indirecta, en la ejecución de esta tarea. Sería interesante descifrar cómo se modulan ambas vías estriatales en las distintas fases del movimiento (desplazamiento fásico/balístico y mantenimiento), ya que la mayoría de las neuronas moduladas por la tarea pertenecen a la categoría pNEM. De acuerdo con la evidencia anatómica, las neuronas IT que provienen de cortezas motoras (M1/M2) tienen conexiones más abundantes con las NEM-D2 que con las neuronas NEM-D1 (Wall et al., 2013), aunque los mecanismos de integración en la dinámica de un movimiento aún es incierta. Además, se ha sugerido recientemente que ambas poblaciones de NEMs pueden influir en los ajustes posturales necesarios para ejecutar una tarea de alcance (reaching task) (Lopez-Huerta et al., 2021). Es de resaltar que las neuronas más sensibles a la estimulación fueron las pIDR y las “otras”. Como se observó, debido al estímulo lumínico, hubo incremento de la tasa de disparo en 30% de las neuronas pIDR, mientras que hubo un decremento en las “otras”, lo que causó que perdieran su secuencia de activación durante el periodo de estimulación (Figura 21). Estos efectos nos invitan a explorar más profundamente los mecanismos de comunicación neuronal entre las poblaciones del EDL y lograr distinguir con mayor detalle la influencia de cada tipo es indispensable para complementar la interpretación de la comunicación cortico-estriatal en los movimiento bimanuales (Kreitzer, 2009; Tepper et al., 2010).

8. Limitaciones y perspectivas

A pesar del esfuerzo por manipular específicamente un grupo de neuronas que se comunicara bilateralmente con el EDL, aún quedan ciertos puntos a considerar. Primero, dadas las características anatómicas de las neuronas M2-IT no podemos descartar que la estimulación optogenética unilateral produzca activación antidrómica u ortodrómica de la corteza contralateral y que eso podría favorecer los efectos positivos en la duración del movimiento bimanual, de acuerdo a los mecanismos de conectividad cortico-corticales (Deffeyes et al., 2015; Soma et al., 2017; Touvykine et al., 2020). Segundo, no contamos con las herramientas optogenéticas para inhibir específicamente a la población de las neuronas M2-IT;

sin embargo, de tenerlas esperaríamos que los movimientos bimanuales fueran más cortos (Park et al., 2019). Es decir, el efecto contrario al que produjo la estimulación (Figura 17).

A nivel de conectividad, la estimulación optogenética de las neuronas M2-IT produjo respuestas complejas en la corteza estimulada (Figura 16), lo que seguramente modifica la interacción con otros grupos neuronales como las neuronas ET o interneuronas inhibitorias. De acuerdo con literatura previa, la actividad de las neuronas IT influye sobre la actividad de las ET (Morishima & Kawaguchi, 2006), por lo que no podríamos descartar que tengan participación en la ejecución de esta tarea. Gran proporción de las neuronas ET proyectan principalmente al EDL y secundariamente a otros núcleos motores (e.g. colículo superior, núcleo pedúnculo pontino), además de tener aferencias principalmente de regiones sensoriomotoras corticales (e.g. S1, M1, M2) y talámicas (e.g. VPL, VPM, VAL), por lo que forman un circuito sensoriomotor especializado cuya actividad neuronal se relaciona con el inicio, el término y la dirección del movimiento (Nelson et al., 2021). En esta tarea, dadas sus proyecciones unilaterales, esperaríamos que su manipulación tuviera un efecto unimanual.

Además, logramos identificar que las neuronas estriatales trabajan por medio de dos módulos: uno que no modulado por la luz y que codifica la cinemática del movimiento general; otro modulado por la luz y que codifica para las variables bimanuales (cuyas neuronas más sensibles a los efectos de la luz fueron las IDR). Pese a estos logros, no fuimos capaces de distinguir entre las poblaciones de NEMs y las otras, cuya gran diferencia fue su respuesta durante el periodo de estimulación, pero no en su tasa de disparo o forma de la espiga. Para dilucidar esto, requerimos otras estrategias con las que podamos manipular las entradas específicas para las principales poblaciones de neuronas en el EDL, probablemente con el uso de ratas transgénicas para cada población (NEM-D1, NEM-D2 e IDR) combinado con vectores virales trans-sinápticos (Nelson et al., 2021; Wall et al., 2013).

9. Resumen de resultados

- Las ratas aprendieron un movimiento bimanual y lograron un acople espacio temporal entre los efectores superiores naturalmente.
- La lesión unilateral del EDL produjo deficiencia en el movimiento bimanual por la afección del movimiento de una pata delantera.
- La lesión bilateral del estriado afectó el movimiento de ambas patas delanteras.
- La lesión unilateral de la corteza motora (M1/M2) no afectó el movimiento de presión las patas delanteras.
- La activación específica y unilateral de las neuronas M2-IT incrementó la duración del movimiento bimanual bilateralmente.
- La estimulación de las M2-IT no modificó la representación de la activación secuencial de las neuronas del EDL.
- La estimulación de las M2-IT moduló preferentemente a las IDR estriatales.

10. Conclusión

Estos resultados sugieren que las neuronas cortico-estriatales bilaterales M2-IT son indispensables para coordinar los movimientos bimanuales y el EDL para modular los componentes unilaterales del movimiento.

11. Referencias

- Afsharpour, S. (1985). Topographical projections of the cerebral cortex to the subthalamic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 236(1), 14–28. <https://doi.org/10.1002/cne.902360103>
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Alloway, K. D., Smith, J. B., Beauchemin, K. J., & Olson, M. L. (2010). Bilateral Projections from Rat M1 Whisker Cortex to the Neostriatum, Thalamus, and Claustrum. *J Comp Neurol*, 515(5), 548–564. <https://doi.org/10.1002/cne.22073>.Bilateral
- Báez-Cordero, A. S., Pimentel-Farfan, A. K., Peña-Rangel, T. M., & Rueda-Orozco, P. E. (2020). Unbalanced Inhibitory/Excitatory Responses in the Substantia Nigra Pars Reticulata Underlie Cannabinoid-Related Slowness of Movements. *The Journal of Neuroscience*, 40(30), 5769–5784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0045-20.2020>
- Baillon, B., Mallet, N., Bézard, E., Lanciego, J. L., & Gonon, F. (2008). Intratelencephalic corticostriatal neurons equally excite striatonigral and striatopallidal neurons and their discharge activity is selectively reduced in experimental parkinsonism. *European Journal of Neuroscience*, 27(March), 2313–2321. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06192.x>
- Balleine, B. W., Delgado, M. R., & Hikosaka, O. (2007). *The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making*. 27(31), 8161–8165. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1554-07.2007>
- Balleine, B. W., & Dickinson, A. (1998). *Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates*. 37, 407–419.
- Barnes, T. D., Kubota, Y., Hu, D., Jin, D. Z., & Graybiel, A. M. (2005). Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature*, 437(7062), 1158–1161. <https://doi.org/10.1038/nature04053>
- Barter, J. W., Li, S., Sukharnikova, T., Rossi, M. A., Bartholomew, R. A., & Yin, H. H. (2015). Basal ganglia outputs map instantaneous position coordinates during behavior. *Journal of Neuroscience*, 35(6), 2703–2716. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3245-14.2015>
- Bartholomew, R. A., Li, H. E., Gaidis, E. J., Stackmann, M., Shoemaker, C. T., Rossi, M. A., & Yin, H. H. (2016). Striatonigral control of movement velocity in mice. *European Journal of Neuroscience*, 43(8), 1097–1110. <https://doi.org/10.1111/ejn.13187>
- Brown, S. P., & Hestrin, S. (2009). Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature*, 457(7233), 1133–1136. <https://doi.org/10.1038/nature07658>

- Carelli, R. M., & West, M. O. (1991). Representation of the body by single neurons in the dorsolateral striatum of the awake, unrestrained rat. *Journal of Comparative Neurology*, 309(2), 231–249. <https://doi.org/10.1002/cne.903090205>
- Carman, J. B., Cowan, W. M., Powell, T. P., & Webster, K. E. (1965). A bilateral cortico-striate projection. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 28, 71–77. <https://doi.org/10.1136/jnnp.28.1.71>
- Cowan, R. L., & Wilson, C. J. (1994). Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *Journal of Neurophysiology*, 71(1), 17–32. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.1.17>
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494(7436), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11846>
- Deffeyes, J. E., Touvykine, B., Quessy, S., & Dancause, N. (2015). Interactions between rostral and caudal cortical motor areas in the rat. *Journal of Neurophysiology*, 113(10), 3893–3904. <https://doi.org/10.1152/jn.00760.2014>
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V)
- DeLong, M. R., & Wichmann, T. (2009). Update on models of basal ganglia function and dysfunction. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15(1), S237–S240. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70822-3](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70822-3)
- Deng, Y., Lanciego, J., Goff, L. K. Le, Coulon, P., Salin, P., Kachidian, P., Lei, W., Del Mar, N., & Reiner, A. (2015). Differential organization of cortical inputs to striatal projection neurons of the matrix compartment in rats. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00051>
- Dhawale, A. K., Wolff, S. B. E., Ko, R., & Ölveczky, B. P. (2021). The basal ganglia control the detailed kinematics of learned motor skills. *Nature Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00889-3>
- Díaz-Hernández, E., Contreras-López, R., Sánchez-Fuentes, A., Rodríguez-Sibrían, L., Ramírez-Jarquín, J. O., & Tecuapetla, F. (2018). The Thalamostriatal Projections Contribute to the Initiation and Execution of a Sequence of Movements. *Neuron*, 100(3), 739–752.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.052>
- Diedrichsen, J., Shadmehr, R., & Ivry, R. B. (2010). The coordination of movement: optimal feedback control and beyond. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2009.11.004>

- Doig, N. M., Moss, J., & Bolam, J. P. (2010). Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *Journal of Neuroscience*, 30(44), 14610–14618. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1623-10.2010>
- Domjan, M. (2010). *Principios de aprendizaje y conducta* (6a. ed.). Cengage Learning.
- Donchin, O., Gribova, A., Steinberg, O., Bergman, H., & Vaadia, E. (1998). Primary motor cortex is involved in bimanual coordination. *Nature*, 395(6699), 274–278. <https://doi.org/10.1038/26220>
- Dori, I., Dinopoulos, A., Cavanagh, M. E., & Parnavelas, J. G. (1992). Proportion of glutamate- and aspartate-immunoreactive neurons in the efferent pathways of the rat visual cortex varies according to the target. *Journal of Comparative Neurology*, 319(2), 191–204. <https://doi.org/10.1002/cne.903190202>
- Dudman, J. T., & Krakauer, J. W. (2016). The basal ganglia: From motor commands to the control of vigor. *Current Opinion in Neurobiology*, 37, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.02.005>
- Erro, M. E., Lanciego, J. L., Arribas, J., & Giménez-Amaya, J. M. (2001). Striatal input from the ventrobasal complex of the rat thalamus. *Histochemistry and Cell Biology*, 115(6), 447–454. <https://doi.org/10.1007/s004180100273>
- Erro, M. E., Lanciego, J. L., & Giménez-Amaya, J. M. (2002). Re-examination of the thalamostriatal projections in the rat with retrograde tracers. *Neuroscience Research*, 42(1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(01\)00302-9](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(01)00302-9)
- Georgopoulos, A. P., & Carpenter, A. F. (2015). Coding of movements in the motor cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.012>
- Georgopoulos, A. P., Schwartz, A. B., & Kettner, R. E. (1986). Neuronal population coding of movement direction. *Science*, 233(March), 1416–1419.
- Gilman, J. P., Medalla, M., & Luebke, J. I. (2017). Area-Specific Features of Pyramidal Neurons — a Comparative Study in Mouse and Rhesus Monkey. *Cerebral Cortex*, 27(March), 2078–2094. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw062>
- Gooijers, J., & Swinnen, S. P. (2014). Interactions between brain structure and behavior: The corpus callosum and bimanual coordination. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 43, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.008>
- Graybiel, A. M. (2008). Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 359–387. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851>
- Hagan, C. E., Bolon, B., & Keene, C. D. (2012). Nervous System. In *Comparative Anatomy and Histology* (First Edit, pp. 339–394). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00020-2>

- Hamid, A. A., Frank, M. J., & Moore, C. I. (2021). Wave-like dopamine dynamics as a mechanism for spatiotemporal credit assignment. *Cell*, *184*(10), 2733–2749.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.046>
- Harris, K. D., & Shepherd, G. M. G. (2015). The neocortical circuit: Themes and variations. *Nature Neuroscience*, *18*(2), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nn.3917>
- Hazan, L., Zugaro, M., & Buzsáki, G. (2006). Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *Journal of Neuroscience Methods*, *155*(2), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.017>
- Hedreen, J. C. (1977). Corticostriatal cells identified by the peroxidase method. *Neuroscience Letters*, *4*(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(77\)90115-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(77)90115-X)
- Heilbronner, S. R., Rodriguez-Romaguera, J., Quirk, G. J., Groenewegen, H. J., & Haber, S. N. (2016). Circuit-Based Corticostriatal Homologies Between Rat and Primate. *Biological Psychiatry*, *80*(7), 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.05.012>
- Hernandez, P. J., Sadeghian, K., & Kelley, A. E. (2002). *Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens*. 1327–1331. <https://doi.org/10.1038/nn973>
- Hidalgo-Balbuena, A. E., Luma, A. Y., Pimentel-Farfan, A. K., Peña-Rangel, T. M., & Rueda-Orozco, P. E. (2019). Sensory representations in the striatum provide a temporal reference for learning and executing motor habits. *Nature Communications*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12075-y>
- Isomura, Y., Harukuni, R., Takekawa, T., Aizawa, H., & Fukai, T. (2009). Microcircuitry coordination of cortical motor information in self-initiation of voluntary movements. *Nature Neuroscience*, *12*(12), 1586–1593. <https://doi.org/10.1038/nn.2431>
- Jin, X., & Costa, R. M. (2010). Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature*, *466*(7305), 457–462. <https://doi.org/10.1038/nature09263>
- Jin, X., & Costa, R. M. (2015). Shaping action sequences in basal ganglia circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, *33*(1), 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.011>
- Jin, X., Tecuapetla, F., & Costa, R. M. (2014). Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nature Neuroscience*, *17*(3), 423–430. <https://doi.org/10.1038/nn.3632>
- Jog, M. S., Kubota, Y., Connolly, C. I., Hillegaard, V., & Graybiel, A. M. (1999). Building neural representations of habits. *Science Reports*, *286*(November), 1745–1750.

- Johansson, Y., & Silberberg, G. (2020). The Functional Organization of Cortical and Thalamic Inputs onto Five Types of Striatal Neurons Is Determined by Source and Target Cell Identities. In *Cell Reports* (Vol. 30, Issue 4, pp. 1178-1194.e3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.095>
- Jones, E. G., Coulter, J. D., Burton, H., & Porter, R. (1977). Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibers arising in the sensory-motor cortex of monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, *173*, 53–80. <https://doi.org/10.1002/cne.901730105>
- Kawaguchi, Y. (2017). Pyramidal cell subtypes and their synaptic connections in layer 5 of rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*, *27*(12), 5755–5771. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx252>
- Kawai, R., Markman, T., Poddar, R., Ko, R., Fantana, A. L., Dhawale, A. K., Kampff, A. R., & Ölveczky, B. P. (2015). Motor Cortex Is Required for Learning but Not for Executing a Motor Skill. *Neuron*, *86*(3), 800–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.024>
- Kazennikov, O., Hyland, B., Corboz, M., Babalian, A., Rouiller, E. M., & Wiesendanger, M. (1999). Neural activity of supplementary and primary motor areas in monkeys and its relation to bimanual and unimanual movement sequences. *Neuroscience*, *89*(3), 661–674. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00348-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00348-0)
- Kelso, J. A. S., Putnam, C. A., & Goodman, D. (1983). On the space-time structure of human interlimb co-ordination. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section A*, *35*(2), 347–375. <https://doi.org/10.1080/14640748308402139>
- Kim, N., Li, H. E., Hughes, R. N., Watson, G. D. R., Gallegos, D., West, A. E., Kim, I. H., & Yin, H. H. (2019). A striatal interneuron circuit for continuous target pursuit. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10716-w>
- Kraft, E., Chen, A. W., Flaherty, A. W., Blood, A. J., Kwong, K. K., & Jenkins, B. G. (2007). The role of the basal ganglia in bimanual coordination. *Brain Research*, *1151*(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.142>
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, *466*(7306), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience*, *32*, 127–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135422>
- Kress, G. J., Yamawaki, N., Wokosin, D. L., Wickersham, I. R., Shepherd, G. M. G., & Surmeier, D. J. (2013). Convergent cortical innervation of striatal projection neurons. *Nature Neuroscience*, *16*(6), 665–667.

<https://doi.org/10.1038/nn.3397>

- Kupferschmidt, D. A., Juczewski, K., Cui, G., Johnson, K. A., & Lovinger, D. M. (2017). Parallel, but Dissociable, Processing in Discrete Corticostriatal Inputs Encodes Skill Learning. *Neuron*, 96(2), 476-489.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.040>
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a009621–a009621. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Lei, W., Jiao, Y., Del Mar, N., & Reiner, A. (2004). Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *Journal of Neuroscience*, 24(38), 8289–8299. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1990-04.2004>
- Lemke, S. M., Ramanathan, D. S., Guo, L., Won, S. J., & Ganguly, K. (2019). Emergent modular neural control drives coordinated motor actions. *Nature Neuroscience*, 22(7), 1122–1131. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0407-2>
- Lévesque, M., Charara, A., Gagnon, S., Parent, A., & Deschênes, M. (1996). Corticostriatal projections from layer V cells in rat are collaterals of long-range corticofugal axons. *Brain Research*, 709, 311–315.
- Lin, H. M., Kuang, J.-X., Sun, P., Li, N., Lv, X., & Zhang, Y. H. (2018). Reconstruction of intratelencephalic neurons in the mouse secondary motor cortex reveals the diverse projection patterns of single neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00086>
- Lopez-Huerta, V. G., Denton, J. A., Nakano, Y., Jaidar, O., Garcia-Munoz, M., & Arbuthnott, G. W. (2021). Striatal bilateral control of skilled forelimb movement. *Cell Reports*, 34(3), 108651. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108651>
- Martiros, N., Burgess, A. A., & Graybiel, A. M. (2018). Inversely Active Striatal Projection Neurons and Interneurons Selectively Delimit Useful Behavioral Sequences. *Current Biology*, 28(4), 560-573.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.031>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009). Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *Journal of Neuroscience*, 29(2), 444–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>
- McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1987). The organization and collateralization of corticostriate neurones in the motor and sensory cortex of the rat brain. *Brain Research*, 423, 318–324.
- Mohebi, A., Pettibone, J. R., Hamid, A. A., Wong, J. M. T., Vinson, L. T., Patriarchi, T., Tian, L., Kennedy, R. T., & Berke, J. D. (2019). Dissociable dopamine dynamics for learning and motivation. *Nature*, 570(7759), 65–70.

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1235-y>

- Morishima, M., & Kawaguchi, Y. (2006). Recurrent connection patterns of corticostriatal pyramidal cells in frontal cortex. *Journal of Neuroscience*, *26*(16), 4394–4405. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0252-06.2006>
- Morishima, M., Morita, K., Kubota, Y., & Kawaguchi, Y. (2011). Highly differentiated projection-specific cortical subnetworks. *Journal of Neuroscience*, *31*(28), 10380–10391. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0772-11.2011>
- Nelson, A., Abdelmesih, B., & Costa, R. M. (2021). Corticospinal populations broadcast complex motor signals to coordinated spinal and striatal circuits. *Nature Neuroscience*, *24*(12), 1721–1732. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00939-w>
- Oorschot, D. E. (1996). Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: A stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *Journal of Comparative Neurology*, *366*(4), 580–599. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960318\)366:4<580::AID-CNE3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960318)366:4<580::AID-CNE3>3.0.CO;2-0)
- Oswald, M. J., Tantirigama, M. L. S., Sonntag, I., Hughes, S. M., & Empson, R. M. (2013). Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00174>
- Panigrahi, B., Martin, K. A., Li, Y., Graves, A. R., Vollmer, A., Olson, L., Mensh, B. D., Karpova, A. Y., & Dudman, J. T. (2015). Dopamine Is Required for the Neural Representation and Control of Movement Vigor. *Cell*, *162*(6), 1418–1430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.014>
- Park, J., Coddington, L. T., & Dudman, J. T. (2020). Basal Ganglia Circuits for Action Specification. *Annual Review of Neuroscience*, *43*(September), 485–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050452>
- Park, J., Phillips, J. W., Martin, K. A., Hantman, A. W., & Dudman, J. T. (2019). Flexible routing of motor control signals through neocortical projection neuron classes. *Bior.*
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M. C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M. R., & Obeso, J. A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(11), 760–772. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>
- Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., & Young, A. B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(15), 5733–5737. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5733>
- Reiner, A., Hart, N. M., Lei, W., & Deng, Y. (2010). Corticostriatal projection neurons

- Dichotomous types and dichotomous functions. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00142>
- Reiner, A., Jiao, Y., Del Mar, N., Laverghetta, A. V., & Lei, W. (2003). Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 457(4), 420–440. <https://doi.org/10.1002/cne.10541>
- Reynolds, J. N. J., Hyland, B. I., & Wickens, J. R. (2001). A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature*, 413, 67–70. www.nature.com
- Rouiller, E. M., & Welker, E. (2000). A comparative analysis of the morphology of corticothalamic projections in mammals. *Brain Research Bulletin*, 53(6), 727–741. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00364-6](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00364-6)
- Rueda-Delgado, L. M., Solesio-Jofre, E., Serrien, D. J., Mantini, D., Daffertshofer, A., & Swinnen, S. P. (2014). Understanding bimanual coordination across small time scales from an electrophysiological perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 47, 614–635. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.003>
- Rueda-Orozco, P. E., & Robbe, D. (2015). The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nature Neuroscience*, 18(3), 453–462. <https://doi.org/10.1038/nn.3924>
- Sales-Carbonell, C., Taouali, W., Khalki, L., Pasquet, M. O., Petit, L. F., Moreau, T., Rueda-Orozco, P. E., & Robbe, D. (2018). No Discrete Start/Stop Signals in the Dorsal Striatum of Mice Performing a Learned Action. *Current Biology*, 28(19), 3044–3055.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.038>
- Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 23–32. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.1/wschultz>
- Shi, L. H., Luo, F., Woodward, D. J., & Chang, J. Y. (2004). Neural responses in multiple basal ganglia regions during spontaneous and treadmill locomotion task in rats. *Experimental Brain Research*, 157(3), 303–314. <https://doi.org/10.1007/s00221-004-1844-y>
- Sjöbom, J., Tamtè, M., Halje, P., Brys, I., & Petersson, P. (2020). Cortical and striatal circuits together encode transitions in natural behavior. *Science Advances*, 6(October), 1–12. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc1173>
- Smith, K. S., & Graybiel, A. M. (2013). A dual operator view of habitual behavior reflecting cortical and striatal dynamics. *Neuron*, 79(2), 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.038>
- Sohur, U. S., Padmanabhan, H. K., Kotchetkov, I. S., Menezes, J. R. L., & Macklis, J. D. (2014). Feature article: Anatomic and molecular development of corticostriatal projection neurons in mice. *Cerebral Cortex*, 24(2), 293–303. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs342>

- Soma, S., Saiki, A., Yoshida, J., Ríos, A., Kawabata, M., Sakai, Y., & Isomura, Y. (2017). Distinct laterality in forelimb-movement representations of rat primary and secondary motor cortical neurons with intratelencephalic and pyramidal tract projections. *Journal of Neuroscience*, *37*(45), 10904–10916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1188-17.2017>
- Swinnen, S. P., & Duysens, J. (Eds.). (2004). *Neuro-behavioral determinants of interlimb coordination: A multidisciplinary approach*. Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9056-3>
- Swinnen, S. P., Walter, C. B., & Shapiro, D. C. (1988). The coordination of limb movements with different kinematic patterns. *Brain and Cognition*, *8*(3), 326–347. [https://doi.org/10.1016/0278-2626\(88\)90058-9](https://doi.org/10.1016/0278-2626(88)90058-9)
- Tanji, J., Okano, K., & Sato, K. C. (1988). Neuronal activity in cortical motor areas related to ipsilateral, contralateral, and bilateral digit movements of the monkey. *Journal of Neurophysiology*, *60*(1), 325–343. <https://doi.org/10.1152/jn.1988.60.1.325>
- Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T., & Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, *4*(DEC), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00150>
- Thorn, C. A., Atallah, H., Howe, M., & Graybiel, A. M. (2010). Differential Dynamics of Activity Changes in Dorsolateral and Dorsomedial Striatal Loops during Learning. *Neuron*, *66*(5), 781–795. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.036>
- Touvykine, B., Elgbeili, G., Quessy, S., & Dancause, N. (2020). Interhemispheric modulations of motor outputs by the rostral and caudal forelimb areas in rats. *Journal of Neurophysiology*, *123*(4), 1355–1368. <https://doi.org/10.1152/jn.00591.2019>
- Touvykine, B., Mansoori, B. K., Jean-Charles, L., Deffeyes, J. E., Quessy, S., & Dancause, N. (2016). The effect of lesion size on the organization of the ipsilesional and contralesional motor cortex. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, *30*(3), 280–292. <https://doi.org/10.1177/1545968315585356>
- Turner, R. S., & DeLong, M. R. (2000). Corticostriatal activity in primary motor cortex of the macaque. *Journal of Neuroscience*, *20*(18), 7096–7108. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-18-07096.2000>
- Vandaele, Y., Mahajan, N. R., Ottenheimer, D. J., Richard, J. M., Mysore, S. P., & Janak, P. H. (2019). Distinct recruitment of dorsomedial and dorsolateral striatum erodes with extended training. *ELife*, *8*, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.49536>
- Wall, N. R., De La Parra, M., Callaway, E. M., & Kreitzer, A. C. (2013). Differential Innervation of Direct- and Indirect-Pathway Striatal Projection Neurons. *Neuron*, *79*(2), 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.014>

- West, M. O., Carelli, R. M., Pomerantz, M., Cohen, S. M., Gardner, J. P., Chapin, J. K., & Woodward, D. J. (1990). A region in the dorsolateral striatum of the rat exhibiting single-unit correlations with specific locomotor limb movements. *Journal of Neurophysiology*, *64*(4), 1233–1246. <https://doi.org/10.1152/jn.1990.64.4.1233>
- Wiesendanger, M., Kaluzny, P., Kazennikov, O., Palmeri, A., & Perrig, S. (1994). Temporal coordination in bimanual actions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *72*(5), 591–594. <https://doi.org/10.1139/y94-084>
- Wilson, C. J. (1987). Morphology and synaptic connections of crossed corticostriatal neurons in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *263*(4), 567–580. <https://doi.org/10.1002/cne.902630408>
- Winnubst, J., Bas, E., Ferreira, T. A., Wu, Z., Economo, M. N., Edson, P., Arthur, B. J., Bruns, C., Rokicki, K., Schauder, D., Olbris, D. J., Murphy, S. D., Ackerman, D. G., Arshadi, C., Baldwin, P., Blake, R., Elsayed, A., Hasan, M., Ramirez, D., ... Chandrashekar, J. (2019). Reconstruction of 1,000 Projection Neurons Reveals New Cell Types and Organization of Long-Range Connectivity in the Mouse Brain. *Cell*, *179*(1), 268-281.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.042>
- Yin, H. H. (2010). The sensorimotor striatum is necessary for serial order learning. *Journal of Neuroscience*, *30*(44), 14719–14723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3989-10.2010>
- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). *The role of the basal ganglia in habit formation*. *7*(June), 464–476. <https://doi.org/10.1038/nrn1919>
- Yin, H. H., Mulcare, S. P., Hilário, M. R. F., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M. I., Hansson, A. C., Lovinger, D. M., & Costa, R. M. (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature Neuroscience*, *12*(3), 333–341. <https://doi.org/10.1038/nn.2261>
- Yttri, E. A., & Dudman, J. T. (2016). Opponent and bidirectional control of movement velocity in the basal ganglia. *Nature*, *533*(7603), 402–406. <https://doi.org/10.1038/nature17639>

12. Anexos

		Control			EDL unilateral			EDL bilateral		
		P25	med	P75	P25	med	P75	P25	med	P75
Correlación bimanual	1	0.61	0.76	0.86	0.59	0.64	0.69	0.36	0.45	0.60
	2	0.70	0.77	0.84	0.53	0.63	0.70	0.51	0.57	0.74
	3	0.87	0.92	0.94	0.71	0.85	0.89	0.71	0.79	0.86
	4	0.88	0.90	0.94	0.69	0.86	0.89	0.74	0.79	0.83
Tiempo der-izq	1	-176	-95	0	-265	-149	146	-863	-374	-90
	2	-138	-96	-46	-296	-152	-89	-378	-227	-8
	3	-100	-64	0	-197	-134	-97	-143	-56	-29
	4	-114	-74	-29	-188	-119	-99	-468	-128	-96
BOS (ms)	1	90	120	204	178	226	398	137	451	863
	2	68	96	156	119	156	326	117	301	381
	3	72	85	116	107	126	512	81	133	227
	4	60	82	126	104	119	208	116	146	478
BMOV (ms)	1	78	126	188	147.5	291	550	116	398	815
	2	56	78.5	155	101	190	294	177	306	554
	3	44	78	162	61	141	484	124	287	615
	4	36	64	142	63	128	296	172	231	392
Duración (ms)	1	172	228	308	172	359	531	263	381	500
	2	122	150	196	164	212	292	131	186	550
	3	116	159.5	208	158	227	280	125	179	276
	4	79	106	135	129	208	272	120	149	212
Velocidad máxima (cm s⁻¹)	1	56	103	117	79	117	125	89	103	117
	2	73.5	97	113	77	113	128	92	109	128
	3	83	125	136	81	132	153	111	126	139
	4	81	122	141	73	135	156	111	126	142
Esfuerzo (ms)	1	482	628	788	535	872	1144	602	1332	1856
	2	336	429	532	498	710	915	366	699	991
	3	1114	1409	1698	1233	1395	1644	1643	1799	2008
	4	1012	1232	1434	1265	1407	1918	1150	1856	2542
Latencia a 100 ensayos (min)	1	11	13	18	10	13	16	13	16	19
	2	8	9	11	9	12	16	10	12	14
	3	8	12	17	10	11	16	17	21	26
	4	10	12	14	11	12	16	19	22	28

Tabla 1. Valores de comparaciones de las variables bilaterales de los animales lesionados antes del entrenamiento ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

		Control			Lesión EDL unilateral			Lesión EDL bilateral			
		P25	med	P75	P25	med	P75	P25	med	P75	
Mejor pata	Correlación unimanual	1	0.76	0.86	0.95	0.56	0.77	0.93	0.62	0.76	0.95
		2	0.67	0.84	0.95	0.77	0.85	0.91	0.37	0.66	0.76
		3	0.68	0.81	0.92	0.68	0.81	0.91	0.53	0.60	0.78
		4	0.67	0.79	0.90	0.69	0.84	0.94	0.53	0.68	0.88
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	1	0.17	0.34	0.69	0.20	0.53	1.20	0.18	0.49	0.96
		2	0.12	0.36	0.71	0.20	0.33	0.54	0.48	1.07	1.81
		3	0.59	0.82	1.17	0.58	0.79	1.07	1.15	1.28	1.40
		4	0.56	0.80	1.06	0.49	0.70	0.96	0.85	1.17	1.43
	UMOV (ms)	1	12	20	45	8	19	52	7	24	42
		2	7	21	81	11	18	29	19	36	69
		3	8	16	25	7	12	29	6	15	33
		4	8	13	20	7	19	45	4	8	11
	Duración (ms)	1	152	225	312	131	252	506	226	333	440
		2	100	164	210	113	184	278	126	226	420
		3	76	133	178	118	160	249	77	153	289
		4	60	104	144	106	140	221	128	177	274
Peor pata	Correlación unimanual	1	0.60	0.71	0.79	0.42	0.53	0.67	0.36	0.51	0.69
		2	0.57	0.73	0.85	0.53	0.64	0.75	0.30	0.44	0.58
		3	0.63	0.76	0.87	0.44	0.63	0.80	0.32	0.46	0.64
		4	0.62	0.74	0.83	0.37	0.71	0.85	0.36	0.60	0.80
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	1	0.59	0.85	1.13	1.12	1.43	1.88	0.97	1.46	2.03
		2	0.46	0.73	1.24	0.83	1.14	1.59	1.36	1.79	2.08
		3	0.75	0.98	1.28	0.85	1.06	1.34	1.28	1.40	1.72
		4	0.78	0.95	1.16	0.74	0.96	1.25	1.00	1.32	1.58
	UMOV (ms)	1	35	53	83	47	89	236	45	110	258
		2	21	39	108	40	56	81	58	82	207
		3	19	27	53	38	64	123	42	75	139
		4	16	26	61	22	48	91	37	52	91
	Duración (ms)	1	202	245	352	231	389	612	172	395	586
		2	122	160	204	175	253	308	112	159	356
		3	104	155	214	180	304	364	120	196	317
		4	74	110	156	162	259	310	104	136	228

Tabla 2 Valores de comparaciones de las variables unilaterales de los animales lesionados en el EDL antes del entrenamiento ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

		Lesión EDL unilateral				
		1	2	3	4	
	Correlación bimanual	P25	0.87	0.66	0.58	0.90
		Med	0.89	0.80	0.80	0.79
		P75	0.92	0.90	0.88	0.90
	BMOV (ms)	P25	36	214	964	785
		Med	47	336	545	489
		P75	71	660	395	210
	Duración (ms)	P25	78	99	104	167
		Med	105	181	187	191
		P75	128	266	247	219
Mejor pata	Correlación unimanual	P25	0.81	0.60	0.60	0.61
		Med	0.85	0.66	0.65	0.71
		P75	0.96	0.74	0.74	0.84
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	P25	0.45	0.75	0.69	0.64
		Med	0.64	0.96	0.82	0.77
		P75	0.73	1.09	1.06	1.01
	UMOV (ms)	P25	7.25	42.50	27.87	9.12
		Med	11.00	27.50	17.50	12.00
		P75	15.62	42.50	27.85	18.00
Peor pata	Correlación unimanual	P25	0.73	0.21	0.11	0.16
		med	0.78	0.51	0.37	0.43
		P75	0.92	0.58	0.57	0.69
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	P25	0.59	1.08	0.98	1.00
		med	0.84	1.21	1.20	1.24
		P75	1.00	1.35	1.31	1.41
	UMOV (ms)	P25	33.73	60.37	104.62	49.75
		med	19.12	79.00	137.00	122.00
		P75	13.87	190.75	235.75	197.5

Tabla 3. Valores de comparaciones de las variables bilaterales y unilaterales de los animales lesionados en el EDL después del entrenamiento ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.

		Control			Lesión M1 unilateral			Lesión M2 bilateral		
		P25	med	P75	P25	med	P75	P25	med	P75
Correlación bimanual	1	0.61	0.76	0.86	0.66	0.74	0.76	0.68	0.79	0.84
	2	0.70	0.77	0.84	0.71	0.76	0.80	0.72	0.77	0.81
	3	0.87	0.92	0.94	0.90	0.95	0.96	0.89	0.94	0.95
	4	0.88	0.90	0.94	0.90	0.95	0.97	0.91	0.94	0.95
Tiempo der-izq	1	-176	-95	0	-211	-138	-64	-330	-144	-72
	2	-138	-96	-46	-193	-127	-67	-123	-100	-82
	3	-100	-64	0	-66	-36	-16	-72	-48	-40
	4	-114	-74	-29	-53	-35	-3	-82	-58	-40
BOS (ms)	1	90	120	204	108	146	208	116	166	333
	2	68	96	156	60	117	230	70	84	129
	3	72	85	116	24	36	72	40	46	74
	4	60	82	126	30	41	73	38	58	92
BMOV (ms)	1	78	126	188	85	129	220	45	117	250
	2	56	78.5	155	76	138	207	32	53	112
	3	44	78	162	18	22	214	18	23	63
	4	36	64	142	20	33	65	20	24	56
Duración (ms)	1	172	228	308	201	301	589	253	353	490
	2	122	150	196	113	156	328	116	173	366
	3	116	159.5	208	77	95	239	83	95	132
	4	79	106	135	69	95	110	61	70	96
Velocidad Máxima (cm s⁻¹)	1	56	103	117	110	134	146	78	112	135
	2	73.5	97	113	90	95	101	81	96	100
	3	83	125	136	115	130	146	96	131	137
	4	81	122	141	115	130	138	120	140	152
Esfuerzo (ms)	1	482	628	788	499	615	1139	517	663	1051
	2	336	429	532	316	433	816	348	446	644
	3	1114	1409	1698	998	1510	1702	1035	1473	1605
	4	1012	1232	1434	950	1001	1243	928	1002	1298
Latencia a 100 ensayos (min)	1	11	13	18	9	11	13	7	9	12
	2	8	9	11	8	9	10	7	8	9
	3	8	12	17	11	12	14	11	12	14
	4	10	12	14	10	11	12	12	13	15

Tabla 4. Valores de comparaciones de las variables bilaterales de los animales lesionados en la corteza antes del entrenamiento ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

		Control			Lesión M1 unilateral			Lesión M2 bilateral			
		P25	med	P75	P25	med	P75	P25	med	P75	
Mejor pata	Correlación unimanual	1	0.76	0.86	0.95	0.84	0.90	0.95	0.86	0.94	0.97
		2	0.67	0.84	0.95	0.79	0.84	0.88	0.74	0.85	0.94
		3	0.68	0.81	0.92	0.65	0.78	0.89	0.67	0.80	0.91
		4	0.67	0.79	0.90	0.70	0.86	0.94	0.79	0.91	0.98
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	1	0.17	0.34	0.69	0.09	0.24	0.52	0.08	0.13	0.45
		2	0.12	0.36	0.71	0.18	0.26	0.61	0.16	0.21	0.38
		3	0.59	0.82	1.17	0.72	0.88	1.11	0.66	0.92	1.08
		4	0.56	0.80	1.06	0.66	0.86	1.06	0.64	0.85	0.98
	UMOV (ms)	1	12	20	45	7	8	31	6	9	57
		2	7	21	81	13	18	25	11	16	24
		3	8	16	26	3	6	13	2	5	10
		4	8	13	20	3	8	17	2	3	11
	Duración (ms)	1	152	225	312	183	305	506	240	331	442
		2	100	164	210	91	129	276	104	150	301
		3	76	133	178	56	99	147	53	74	96
		4	60	104	144	47	70	118	40	53	84
Peor pata	Correlación unimanual	1	0.60	0.71	0.79	0.53	0.61	0.78	0.66	0.78	0.87
		2	0.57	0.73	0.85	0.55	0.64	0.72	0.55	0.65	0.78
		3	0.63	0.76	0.87	0.54	0.63	0.77	0.63	0.73	0.81
		4	0.62	0.74	0.83	0.68	0.78	0.89	0.70	0.80	0.91
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	1	0.59	0.85	1.13	0.65	0.91	1.42	0.50	0.79	1.18
		2	0.46	0.73	1.24	0.69	0.92	1.22	0.63	0.87	1.12
		3	0.75	0.98	1.28	0.93	1.18	1.36	0.83	1.02	1.16
		4	0.78	0.95	1.16	0.82	0.99	1.14	0.89	1.00	1.12
	UMOV (ms)	1	35	53	83	22	42	69	17	46	104
		2	21	39	108	32	42	55	27	36	50
		3	19	27	53	6	8	32	5	7	20
		4	16	26	61	7	13	26	5	9	19
	Duración (ms)	1	202	245	352	201	306	635	262	334	514
		2	122	160	204	99	130	322	136	228	374
		3	104	155	214	76	96	253	80	113	153
		4	74	110	156	66	85	125	72	84	116

Tabla 5. Valores de comparaciones de las variables unilaterales de los animales lesionados en la corteza antes del entrenamiento *Error! No se encuentra el origen de la referencia.*

		Lesión corteza unilateral				
		1	2	3	4	
	Correlación bimanual	P25	0.90	0.90	0.90	0.91
		Med	0.92	0.91	0.92	0.92
		P75	0.93	0.93	0.94	0.93
	BMOV (ms)	P25	48	48	36	56
		Med	92	66	69	76
		P75	132	118	95	104
	Duración (ms)	P25	90	72	59	30
		Med	118	105	79	54
		P75	140	156	120	88
Mejor pata	Correlación unimanual	P25	0.89	0.86	0.87	0.82
		Med	0.93	0.91	0.92	0.91
		P75	0.97	0.94	0.95	0.93
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	P25	0.35	0.45	0.36	0.37
		Med	0.47	0.55	0.46	0.45
		P75	0.64	0.67	0.65	0.68
	UMOV (ms)	P25	10	9	10	11
		Med	15	19	18	17
		P75	24	30	27	24
Peor pata	Correlación unimanual	P25	0.76	0.77	0.77	0.76
		med	0.84	0.81	0.82	0.83
		P75	0.88	0.89	0.91	0.89
	Variabilidad de la trayectoria unimanual	P25	0.62	0.64	0.59	0.57
		med	0.79	0.79	0.71	0.77
		P75	0.91	0.91	0.81	0.91
	UMOV (ms)	P25	17	15	15	18
		med	30	27	25	32
		P75	44	46	42	41

Tabla 6. Valores de comparaciones de las variables bilaterales y unilaterales de los animales lesionados en la corteza después del entrenamiento **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

		Rat012		Rat027		Grupo norm	
		OFF	ON	OFF	ON	OFF	ON
Correlación bimanual	P25	0.85	0.87	0.82	0.73	0.99	0.97
	Med	0.91	0.93	0.87	0.85	1.00	1.00
	P75	0.93	0.95	0.91	0.91	1.01	1.03
BMOV (ms)	P25	53	29	57	69	0.75	0.59
	Med	103	50	84	106	1.00	0.94
	P75	260	107	141	213	1.64	1.42
Duración (ms)	P25	46	440	336	258	0.81	1.29
	Med	106	330	208	352	1.00	2.04
	P75	198	274	336	468	1.25	2.93

Tabla 7. Valores de comparaciones de las variables bilaterales en los experimentos de estimulación unilateral en los dos animales representativos y en el grupo normalizado **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

		Izquierda		Derecha	
		OFF	ON	OFF	ON
Correlación unimanual	P25	0.70	0.69	0.64	0.58
	Med	0.79	0.82	0.73	0.75
	P75	0.85	0.87	0.78	0.82
Variabilidad de la trayectoria unimanual	P25	0.50	0.43	0.70	0.59
	Med	0.72	0.61	0.92	0.82
	P75	0.98	1.00	1.11	1.22
Duración (ms)	P25	108.08	210.57	147.27	233.00
	Med	162.84	310.57	178.08	323.41
	P75	245.69	425.25	239.69	396.68

Tabla 8. Valores de comparaciones de las variables unilaterales en los experimentos de estimulación unilateral **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

13. Figuras suplementarias

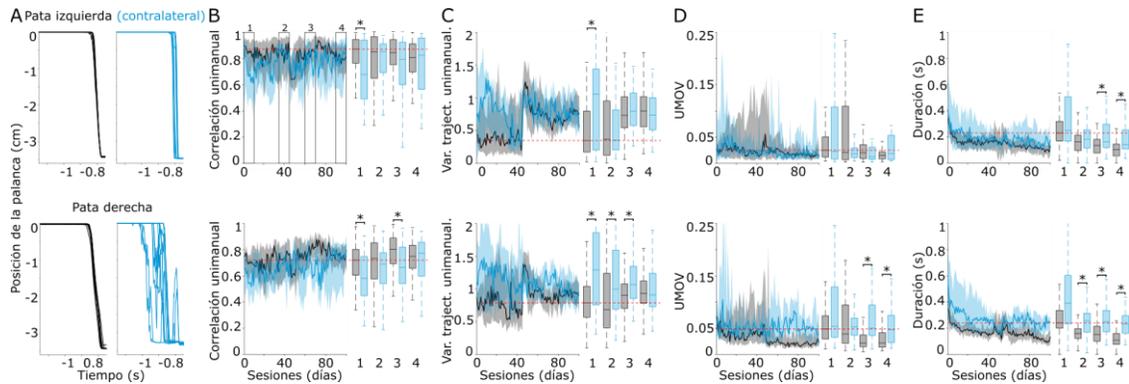


Figura 22. La lesión unilateral del estriado dorsolateral afecta parámetros de la ejecución unilateralmente
 A) Trayectorias promedio de las últimas 10 sesiones de entrenamiento (91-100) de dos animales representativos separadas en la pata izquierda (contralateral al sitio lesionado, panel superior) y la pata derecha (panel inferior) en un animal no lesionado (negro) y uno lesionado unilateralmente en el EDL (azul). (B-D) Curvas de aprendizaje (panel izquierdo) y comparaciones de sesiones específicas en las gráficas de caja y bigote (panel derecho) (De acuerdo con la Figura 10A y 10C) para el grupo no lesionado (negro, n=17) y el grupo lesionado unilateralmente en el EDL (azul, n=8) para las siguientes variables: B) correlación unilateral (K-W; $X^2=32.987$ $p<0.001$ arriba, $X^2=74.886$ $p<0.001$ abajo), C) variabilidad de la trayectoria unilateral ($X^2=107.976$ $p<0.001$ arriba, $X^2=78.644$ $p<0.001$ abajo) D) variabilidad unilateral de tiempos de inicio (UMOV) ($X^2=26.684$ $p<0.001$ arriba, $X^2=150.693$ $p<0.001$ abajo) y E) duración unilateral ($X^2=193.747$ $p<0.001$ arriba, $X^2=257.3892$ $p<0.001$ abajo). Los datos se presentan como mediana (línea sólida) y los percentiles 25 y 75 (área sombreada). Las gráficas de barras representan la mediana y los percentiles 25 y 75 de grupos de 10 sesiones en diferentes momentos de la curva de aprendizaje indicados en la Figura 10A y 10C. Se señalan con asteriscos y líneas unidas únicamente las diferencias significativas entre los grupos que corresponden al mismo bloque en la curva de aprendizaje. La línea roja punteada se colocó para establecer una referencia visual e indica la mediana del primer bloque de sesiones para el grupo no lesionado.

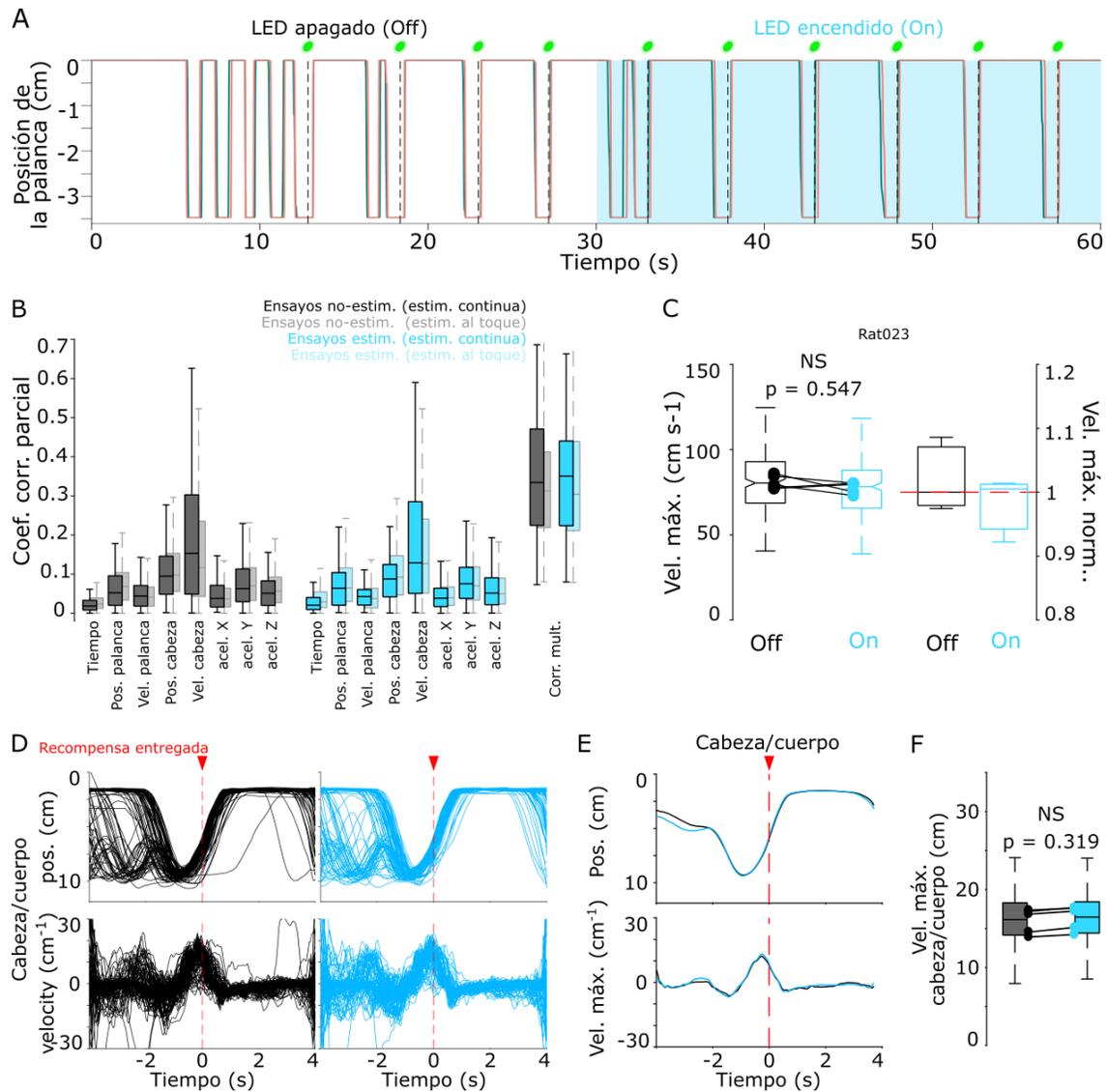


Figura 23. La representación cinemática en el EDL no es afectada por la estimulación continua de M2-IT
 A) Representación esquemática de 60 s de una sesión de entrenamiento con estimulación en bloques. La pata izquierda (verde) y derecha (coral). Las líneas punteadas (negro) indican la entrega del reforzador. La duración de la estimulación óptica está indicada con sombreado azul (30 s on/ 30 s off). B) Coeficientes de correlación parcial y múltiple (valores absolutos) para todas las neuronas registradas en el EDL en el protocolo de estimulación en bloques (Figura 8). Los datos mostrados en sombra en la parte posterior corresponden a los obtenidos por la estimulación al toque (Figura 19). Las gráficas de caja y bigote indican la media y los percentiles 25 y 75 de los ensayos no-estimulados y estimulados. No se encontraron diferencias significativas (Post hoc Bonferroni, $p > 0.05$). C) Velocidad máxima de desplazamiento de las palancas de un animal representativo. D) Trayectorias de posición (panel superior) y de velocidad (panel inferior) para la transición de la cabeza/cuerpo entre el bebedero (posición en 0 cm) y las palancas (posición en 10 en el panel superior) durante las sesiones de estimulación en bloque. Los ensayos fueron alineados a la entrega de la recompensa (cabeza de flecha roja). E) Promedio de las trayectorias mostradas en (D). F) Velocidad máxima de cabeza/cuerpo durante los ensayos no-estimulados y estimulados. U de Mann Whitney.