



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN ANATÓMICO FUNCIONAL DE LAS NEURONAS
CORTICO-ESTRIATALES DEL TRACTO PIRAMIDAL EN RATAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

JOSÉ OSWALDO SÁNCHEZ LOBATO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. LUIS ALBERTO TELLEZ LIMA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Dr. ISAAC OBED PÉREZ MARTÍNEZ
FES-IZTACALA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, AGOSTO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis y proyecto experimental fue realizado en el laboratorio A-02 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, supervisada por el Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco con el apoyo de los proyectos UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN200822, y CONACyT: FDC_1702. Además del apoyo técnico de: Dra. Claudia Ibeth Pérez Díaz y Augusto Cuahutli Pacheco.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco por todo el apoyo en el desarrollo de este proyecto y por su apoyo en mi formación académica.

A la Dra. Claudia Ibeth Pérez Díaz, a la Dra. Ana Karen Pimentel Farfán y Augusto Cuahutli Pacheco por el apoyo en el laboratorio, la solución de problemas técnicos y por el apoyo en el cuidado y manejo de animales.

Al comité tutor integrado por el Dr. Luis Alberto Tellez Lima y el Dr. Isaac Obed Pérez Martínez por todas sus aportaciones y sugerencias en cada semestre para la mejora del presente trabajo y de mi desarrollo profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología por todas las instalaciones y la planta docente que me facilitaron y permitieron desarrollar el trabajo de investigación y mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante la maestría (Becario No. 1145843).

ÍNDICE

Resumen	III
Abstract	IV
1 Introducción	1
2 Antecedentes	3
2.1 <i>Neuronas Corticales e Interacciones Cortico-Estriatales</i>	3
2.2 <i>Estriado Dorsolateral</i>	5
2.3 <i>Optogenética y Virus retrógrados Adeno-asociados (AAV) como herramientas para estudiar al microcircuito corticoestriatal</i>	7
3 Planteamiento del problema	8
4 Hipótesis	9
5 Objetivos	9
5.1 <i>General</i>	9
5.2 <i>Particulares</i>	9
6 Diseño metodológico	9
6.1 <i>Animales</i>	10
6.2 <i>Infeción Viral</i>	10
6.3 <i>Trazado retrógrado fluorescente</i>	12
6.4 <i>Registros electrofisiológicos en animal anestesiado</i>	12
7 Resultados	15
7.1 <i>Caracterización anatómica de las neuronas del Tracto Piramidal con trazado retrogrado fluorescente</i>	15
7.2 <i>Caracterización de la actividad de las neuronas del Tracto Piramidal evocada por la estimulación optogenética</i>	17
7.3 <i>Manipulación optogenética de la actividad neuronal estriatal de las proyecciones ipsilaterales de las neuronas del Tracto Piramidal</i>	19
7.4 <i>Respuestas poblacionales corticales interestructurales evocadas diferencialmente por neuronas del tracto piramidal (PT) y neuronas intratelencefálicas (IT)</i>	23
7.5 <i>Subpoblaciones corticales</i>	27
7.6 <i>Respuestas poblacionales estriatales interestructurales evocadas diferencialmente por neuronas del tracto piramidal (PT) y neuronas intratelencefálicas (IT)</i>	29
7.7 <i>Subpoblaciones estriatales</i>	31
8 Discusión	32
9 Conclusión	36
10 Anexos	37

11 Bibliografia 47

Resumen

La corteza motora juega un papel principal en la generación de movimientos. Se ha sugerido que diferentes subpoblaciones de neuronas motoras corticales están implicadas en diferentes componentes del comportamiento final, como la velocidad, la dirección o la duración de los movimientos. Una de estas poblaciones son las neuronas cortico-estriatales del tracto piramidal (PT). La función específica de las neuronas PT aún no se comprende por completo, por lo tanto, este proyecto se centra en implementar un método basado en virus para expresar opsinas para el control optogenético en neuronas PT, caracterizarlas anatómicamente y funcionalmente, determinar los efectos de su estimulación en la actividad de redes neuronales corticales y estriatales y hacer una comparación con la estimulación selectiva de las neuronas corticales Intratelencefálicas (IT). Mediante el uso de una combinación de virus retrógrados complementarios inyectados secuencialmente en diferentes objetivos de las neuronas PT, encontramos que al inyectar la región dorsolateral del estriado y luego el tálamo motor ventrolateral, resultó en la tinción fluorescente en las regiones corticales y subcorticales consistentes con las proyecciones PT. Estos resultados se confirmaron con registros electrofisiológicos extracelulares corticales y estriatales en animales anestesiados. Encontramos que la manipulación selectiva de las neuronas PT e IT por trenes de estimulación en la corteza, generó distintos tipos de plasticidad de corto plazo en ambas poblaciones, y que las neuronas IT tienden a reclutar una importante actividad inhibitoria en la red neuronal cortical. También encontramos que, al utilizar protocolos de estimulación idénticos, las neuronas IT reclutan aproximadamente un 50 % de las neuronas estriatales registradas, mientras que las neuronas PT solo modulan aproximadamente al 17%. Finalmente, encontramos que las neuronas PT tienden a reclutar principalmente a neuronas espinosas medianas (MSNs). Nuestros resultados demuestran que, en condiciones de animal anestesiado, dos de los grupos principales de neuronas de proyección de la corteza motora generan distintos patrones de actividad estriatal, estas diferencias podrían estar relacionadas con una conectividad preferente hacia subgrupos específicos de neuronas estriatales. Estos datos sugieren que una participación diferencial de las neuronas PT e IT en la salida conductual final.

Abstract

The motor cortex plays a main role in the generation of movements. It has been suggested that different subpopulations of motor cortical neurons are implicated in different components of the final behavioral output, such as the speed, direction, or duration of movements. One of these populations are the cortico-striatal neurons of the pyramidal tract (PT). The specific function PT neurons is yet to be fully understood; therefore, this project is focused on implementing a viral-based method to express opsins for optogenetic control in PT neurons, anatomically and functionally characterize them, determine the effects of their stimulation on the activity of cortical and striatal neural networks, and make a comparison against selective stimulation of intratelencephalic (IT) cortical neurons. By using a combination of complementary retrograde viruses sequentially injected in different targets of PT neurons, we found that injecting the dorsolateral region of the striatum and then ventrolateral motor thalamus, resulted in the fluorescent staining in cortical and subcortical regions consistent with PT projections. These results were confirmed with cortical and striatal extracellular electrophysiological recordings in anesthetized animals. We found that selective manipulation of PT and IT neurons by trains of stimulation in the cortex generated different types of short-term plasticity in both populations, and that IT neurons tend to recruit significant inhibitory activity in the cortical neural network. We also found that, using identical stimulation protocols, IT neurons recruit approximately 50% of the recorded striatal neurons, while PT neurons only modulate approximately 17%. Finally, we found that PT neurons tend to primarily recruit medium spiny neurons (MSNs). Our results show that, under anesthetized animal conditions, two of the main groups of projection neurons of the motor cortex generate different patterns of striatal activity; these differences could be related to a preferential connectivity towards specific subgroups of striatal neurons. These data suggest a differential involvement of PT and IT neurons in the final behavioral output.

1 Introducción

Este estudio se enfoca en la corteza motora, estructura que juega un papel central en la planeación y generación del movimiento. Se sabe que algunas neuronas de la corteza motora primaria predicen la dirección de los movimientos (Georgopoulos, Schwartz & Kettner, 1986), y estudios previos realizados en primates, en donde se manipula la actividad neuronal de la corteza motora por medio de estimulación eléctrica prolongada, reportaron la generación de planes motores complejos (Graziano, 2016). Los estudios anteriores sugieren que las subpoblaciones neuronales específicas de la corteza motora tienen funciones particulares en la ejecución final de la conducta. Uno de los principales desafíos técnicos para conocer el papel específico de las distintas subpoblaciones neuronales implicadas en la generación del movimiento radica en la manipulación selectiva de las mismas. Por lo tanto, el presente estudio se encamina en comprender el papel de un grupo de neuronas corticales, en particular una población de neuronas cortico-estriatales conocidas como neuronas del tracto piramidal (PTn), en la función del microcircuito de la corteza motora primaria y secundaria. Para esto, primero nos enfocamos en el desarrollo de la metodología que nos permita hacer manipulaciones y mediciones de las neuronas de esta subpoblación, y realizar una comparación de esta con otras subpoblaciones, como las neuronas corticales intratelencefálicas.

En relación con el movimiento, hay estudios que indican que el estriado dorsolateral está relacionado con el control motor y representaciones integradoras continuas de la velocidad, la posición y el tiempo durante ejecución motora (Rueda-Orozco & Robbe, 2015). Sin embargo, la formación de hábitos y el control motor no solo dependen del estriado, pues existe una gran red interconectada entre la corteza y los ganglios basales (Alexander, DeLong & Strick, 1986), y dicha conectividad suele tener una jerarquía: primero, la conectividad de corteza a estriado es monosináptica, es decir, la conectividad presenta sinapsis química de una célula aferente a una célula eferente (Ganong, Barrett, Barman, Boitano & Brooks, 2015) y es unidireccional, es decir, feedforward (Gerfen & Surmeier, 2011). Segundo, la conectividad del estriado que retorna a corteza no es directa, sino que necesita de circuitos polisinápticos río abajo que involucran la participación del resto de los ganglios basales (Lanciego et al., 2012; Parent & Hazrati, 1995). Este arreglo parece ser crucial para las funciones del sistema cortico-estriatal en las funciones cognitivas y motoras, que incluyen,

por ejemplo, la selección de acciones, el control motor, el aprendizaje de secuencias y la formación de hábitos (Corbit, Ahmari & Gittis, 2017).

En estudios previos se ha descrito una red anatómica corticoestriatal donde las neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza primaria y secundaria relacionadas al área de las extremidades delanteras tienen actividad diversa relacionada a diferentes fases del movimiento de una tarea, como lo es el inicio del movimiento, el agarre, duración del movimiento, posición, fin del movimiento (Soma et al., 2017; Tennant et al., 2010; Saiki et al., 2014). Sin embargo, aún queda por conocer qué población dentro de las neuronas piramidales exhibe actividad relacionada a representaciones particulares del movimiento (Isomura, Harukuni, Takekawa, Aizawa & Fukai, 2009). Para resolver este problema, es necesario implementar modelos experimentales para la manipulación específica de subpoblaciones cortico-estriatales. Por lo tanto, primero se debe describir la organización anatómica de las neuronas piramidales hacia el estriado.

Hay cuatro principales neuronas corticales excitatorias de proyección: las neuronas corticotalámicas (CT) de la capa 6, estas proyectan subcorticalmente solo al tálamo y su núcleo reticular. Las neuronas del tracto piramidal (PT), que proyectan de manera unilateral al estriado, al tálamo, al núcleo subtalámico (STN) y de manera bilateral a múltiples regiones del tronco encefálico (Lévesque, Charara, Gagnon, Parent & Deschênes, 1996). Las neuronas intratelencefálicas (IT) que proyectan bilateralmente a través del cuerpo calloso dentro de los hemisferios cerebrales hacia la corteza (IT-CCor) (Wilson, 1987) y el estriado (IT-CStr). El estriado, principalmente la región dorsolateral, es única en recibir información de las neuronas IT y PT que se originan en las cortezas sensoriomotoras (M2, M1/S1) (Shepherd, 2013). Además, hay ausencia de comunicación interhemisférica directa entre el estriado izquierdo y el derecho. Las neuronas del tracto piramidal en la capa 5B proyectan a las estructuras subcorticales que controlan el movimiento, como el núcleo talámico ventral lateral, el colículo superior, el tronco del encéfalo y la médula espinal (Li, Chen, Guo, Gerfen & Svoboda, 2015). Por tanto, cabe preguntar, ¿qué representaciones del movimiento coordinado en el estriado, como lo puede ser la velocidad, trayectoria, posición y tiempo de ejecución, están coordinadas por regiones corticales con proyecciones ipsilaterales? Además, aun no se han revelado por completo las interacciones y dinámicas específicas de las proyecciones de las células IT y PT sobre el estriado en el contexto de los movimientos

coordinados de las extremidades delanteras. Se sabe de Park et al. (2022), que en ratones la actividad de las neuronas de IT codifica información sobre la cinemática del movimiento y que el silenciamiento optogenético de las neuronas PT de la capa 5 durante la ejecución del movimiento produce pequeñas reducciones en la amplitud y cambios en la trayectoria del movimiento. Por otro lado, estudios previos en nuestro laboratorio realizados en rata, han mostrado que la activación específica de neuronas cortico-estriatales IT produce incrementos en la duración del movimiento que están acompañados del reclutamiento de subpoblaciones neuronales específicas en el estriado dorsolateral (Pimentel-Farfan et al., 2022). Todos estos resultados sugieren que la composición final de los movimientos bimanualmente coordinados resulta de la actividad orquestada de diversas poblaciones cortico-estriatales.

Para lo tanto, para realizar la caracterización anatómico-funcional, implementaremos una estrategia expresando Cre recombinasa con adenovirus retrógrados en el estriado, y posteriormente, realizar una transfección con un adenovirus retrógrado que integre la canalrodopsina dependiente de Cre, en tálamo, de tal forma que de acuerdo a lo descrito previamente (Shepherd, 2013), tenemos la hipótesis que las neuronas PT y no las IT, expresarán exitosamente la canalrodopsina y permitirá la manipulación de este grupo específico de neuronas. Esto permitiría un modelo experimental de control optogenético para las neuronas PT en ratas y la evaluación de distintos aspectos de la dinámica poblacional corticoestriatal evocada por la estimulación de neuronas PT y la comparación con la dinámica poblacional corticoestriatal evocada por estimulación de las neuronas IT.

2 Antecedentes

2.1 Neuronas Corticales e Interacciones Cortico-Estriatales

Debido a sus conexiones dentro de la corteza y sus proyecciones a otras áreas subcorticales, las neuronas corticales que proyectan sus axones al estriado (corticoestriatales) pueden distinguirse en al menos dos tipos. El primer tipo, son las neuronas cuyos axones proyectan extratelencefálicamente, y estas son conocidas como del PT. Las PT proyectan al tronco del encéfalo y la medula espinal de forma bilateral, y de forma ipsilateral y unilateral proyectan al estriado, el tálamo, el núcleo subtalámico (STN), los núcleos pontinos y la Sustancia Nigra pars Compacta (SNc). El segundo es el tipo de neuronas cuyos axones proyectan de manera bilateral a los ganglios basales y la corteza, pero no fuera del telencéfalo, y se denomina tipo de proyección intratelencefálica (tipo IT) (Cowan & Wilson, 1994). Las neuronas IT no

proyectan a regiones extratelencefálicas como el tálamo o el tronco encefálico, se pueden encontrar en la capa 2/3 y típicamente solo tienen proyecciones corticocorticales (CCor), y también se encuentran en las capas 5A, 5B y 6, y tienen proyecciones CCor y CCstr como se muestra en la Figura 1.

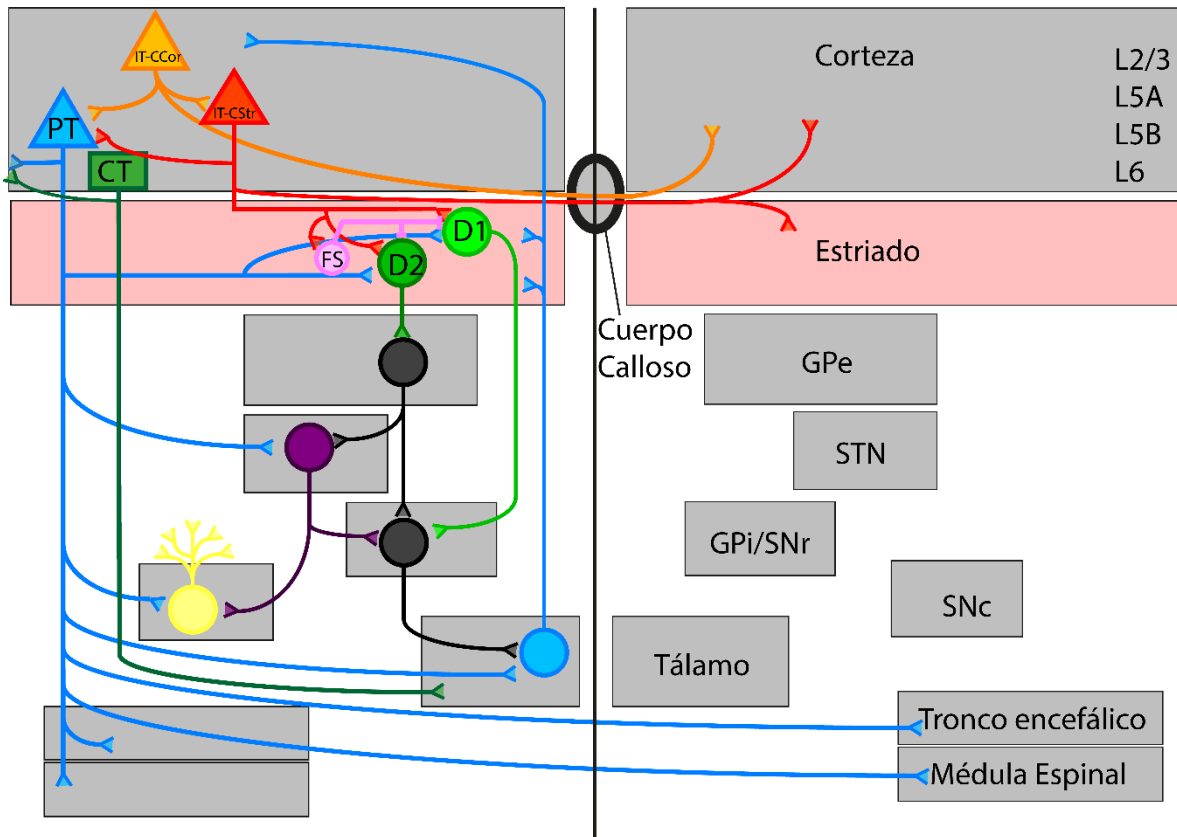


Figura 1. Neuronas corticales y sus proyecciones. En cada rectángulo se muestran los núcleos implicados en el circuito cortico-estriatal-talámico. En la zona de la corteza, se presentan las diferentes capas L2/3, L5A, L5B, L6 y se muestran las neuronas corticales PT (neuronas azules) y sus respectivas proyecciones ipsilaterales al estriado (en particular las neuronas espinosas de proyección, SPNs, de la vía Directa (D1, verde claro) y de la vía indirecta (D2, verde oscuro), STN, GPi/SNr, SNc (Neurona amarilla), Tálamo y sus proyecciones ipsi y contralaterales al tronco encefálico y la medula espinal. También se muestra un tipo de neurona Corticotálamica (CT) mostrada en forma de cuadrado color verde y se encuentra en la capa L6, proyecta al tálamo ipsilateralmente. En la corteza también se muestran las neuronas corticales IT-CCor (neuronas naranjas) que proyecta a la corteza contralateral, y las neuronas IT-CStr (neuronas rojas), que proyecta a la corteza contralateral y proyecta bilateralmente al estriado a través del Cuerpo Calloso. También se observa el circuito canónico de los ganglios basales, la vía directa e indirecta, y sus proyecciones a neuronas GABAérgicas de núcleos intrínsecos como el GPe (neurona negra) y neuronas excitatorias del núcleo STN (neurona morada), y su inervación de nuevo a neuronas GABAérgicas del GPi/SNr, que modulan la actividad de las neuronas talámicas (neuronas azules), que inervan de nuevo a corteza. Dentro de las neuronas estriatales, también se muestra en color rosado las interneuronas fast-spiking de color rosa, que modula la actividad local de las neuronas de la vía directa e indirecta del estriado. Figura basada en Shepherd, 2013.

En la Figura 1 se expone que el estriado, en particular la región dorsolateral, es el núcleo que recibe entradas tanto de IT como de PT y es fundamental dilucidar como las neuronas PT están involucradas en el comportamiento y cuál es su rol en la dinámica poblacional corticoestriatal.

Prácticamente toda la corteza cerebral proyecta hacia el estriado. Tanto la corteza ipsilateral como la contralateral envían proyecciones glutamatérgicas que establecen contactos sinápticos asimétricos principalmente con las espinas dendríticas de las neuronas espinosas de proyección (SPNs) estriatales (Véase Figura 1). Las neuronas de tipo PT proporcionan información ipsilateral al estriado, mientras que las neuronas de tipo IT inervan el estriado bilateralmente (Reiner, Jiao, Del Mar, Laverghetta & Lei, 2003; Reiner, 2010). Además, se ha reportado que las neuronas de tipo IT inervan principalmente las SPNs de la vía directa, mientras que las neuronas de tipo PT contactan principalmente las SPNs estriatales en el circuito indirecto (Lei, 2004).

2.2 *Estriado Dorsolateral*

El estriado es el principal núcleo de entrada de los ganglios basales, y se encarga de recibir información procedente de otras partes del cerebro, principalmente corteza y tálamo (Guo et al., 2015), y está constituido por un conjunto de neuronas, que interaccionan entre sí, generando patrones espaciotemporales de actividad de manera espontánea (Carrillo-Reid et al., 2008) o en respuesta de algún tipo de estímulo (Hidalgo-Balbuena et al., 2019).

En roedores, el estriado dorsal tiene dos subdivisiones anatómico-funcionales: El estriado dorsolateral o sensoriomotor (DLS), y el estriado dorsomedial o asociativo (DMS). Se ha propuesto que el estriado dorsomedial (DMS) estaría involucrado en la mediación de conductas dirigidas a objetivos que requieren un esfuerzo consciente. Mientras que el estriado dorsolateral (DLS) estaría involucrado en la ejecución de hábitos impulsados por estímulos (Yin & Knowlton, 2006; Alloway et al., 2017). Las neuronas en DLS reciben entradas masivas de la corteza sensoriomotora y responden a la estimulación sensorial activa y pasiva.

El estriado está constituido por neuronas de proyección e interneuronas. El 97% de las neuronas en el estriado son de proyección, caracterizadas por tener espinas dendríticas, de ahí su nombre *neuronas espinosas de proyección* (SPNs, por sus siglas en inglés). El 3% restante son interneuronas, GABAérgicas y colinérgicas. Los principales aferentes del

estriado son glutamatérgicos, que se derivan de la corteza y el tálamo (Shepherd & Grillner, 2010). Las SPNs son neuronas GABAérgicas, multipolares con dendritas orientadas radialmente cubiertas por espinas dendríticas. Las SPNs se dividen según sus objetivos de proyección: Las SPNs de la vía indirecta expresan el subtipo 2 del receptor de dopamina D₂R y receptor a adenosina tipo A_{2A}, y las SPNs de la vía directa, expresan receptores del subtipo 1 del receptor de dopamina D₁R.

Las interneuronas se agrupan comúnmente en cuatro categorías en base a sus perfiles neuroquímicos y características electrofisiológicas (Kawaguchi et al., 1995):

1. *Neuronas colinérgicas* que liberan acetilcolina. Desde un punto de vista electrofisiológico, estas neuronas presentan una descarga continua o disparo tónico, por lo que también se les conoce como neuronas tónicamente activas (TANs). Además, expresan la proteína Acetilcolin-transferasa, lo cual les otorga el nombre de neuronas ChAT.
2. Interneuronas GABAérgicas que contienen la proteína Parvalbúmina, la cual se une al calcio. Por esta razón, también se les conoce como neuronas PV. Su característica electrofisiológica distintiva es su rápida frecuencia de disparo, y por ello se denominan Interneuronas Fast-Spiking (FSIs; Interneuronas de disparo rápido).
3. Interneuronas GABAérgicas que expresan calretinina (CR), otra proteína que se une al calcio. Estas interneuronas también presentan una frecuencia de disparo rápida, aunque no tan alta como las FSIs.
4. Interneurona GABAérgicas nitrérgicas, las cuales liberan tanto GABA como óxido nítrico. Estas interneuronas exhiben un umbral de disparo bajo, lo que se conoce como LTS (Low threshold spiking). Además, expresan la enzima óxido nítrico sintasa y el péptido somatostatina (SST).

Las interneuronas modulan la actividad de las SPNs, reciben aferentes corticales y talámicas y están a su vez bajo un control dopaminérgico, formando un complejo microcircuito intraestriatal (Lanciego et al., 2012). En los microcircuitos del estriado aún no se conocen completamente las reglas de interacción y modulación entre los diferentes tipos neuronales. Por ejemplo, se ha propuesto que el disparo sincrónico de todas estas neuronas (tanto SPNs como interneuronas) en condiciones normales resulta ser un mecanismo para generar

funciones cognitivas, programas motores, entre otros (Uhlhaas, 2009). Además, puntualizando lo que se presentó anteriormente, el estriado es el núcleo subcortical donde convergen las neuronas PT e IT, las cuales inervan preferentemente neuronas de la vía indirecta y de la vía directa, respectivamente (Lei et al., 2004). Asimismo, el diámetro de sus proyecciones axonales en el estriado es diferente, siendo que las IT presentan un diámetro mayor a 1000 μm y las PT presentan un diámetro entre los 100-500 μm (Steiner & Tseng, 2017). En este contexto, otro aspecto fundamental, sería comprender como es que las distintas poblaciones cortico-estriatales afectan la dinámica del microcircuito estriatal. En este sentido, uno de los principales objetivos de nuestro proyecto es esclarecer el efecto de la activación específica de las neuronas PT e IT en la dinámica de poblaciones neuronales estriatales y corticales.

2.3 Optogenética y Virus retrógrados Adeno-asociados (AAV) como herramientas para estudiar al microcircuito corticoestriatal

Los productos de virus adenoasociados (AAV) son herramientas ideales para expresar o modificar genes en una amplia gama de tipos de células y tejidos, especialmente *in vivo*, con alta eficiencia y seguridad mejorada (Wang, Tai & Gao, 2019). Nosotros usaremos ratas Long-Evans silvestres (wild type) y se utilizará una estrategia de transfección con el uso de dos virus de manera secuencial reportada previamente en nuestro laboratorio (Pimentel-Farfán et al., 2022). El primero será un virus retrógrado, AAV-pgk-Cre, que insertará el gen de la proteína recombinante Cre, a neuronas que tengan proyecciones al sitio de infección. La proteína Cre se expresará bajo el promotor PGK. Dicho promotor está adyacente al gen *Pgk-1* que codifica la enzima 3-fosfoglicerato quinasa, reside en el cromosoma X en los mamíferos y siempre se expresa (McBurney et al., 1991). El segundo virus será inyectado un mes después de la primera inyección, se trata del virus retrógrado adenoasociado pAAV-EF1a-double floxed-hChR2 (H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA, el cual insertará el gen a neuronas que tengan proyecciones al sitio de infección, y la expresión, activada por Cre, de ChR2 humanizado con mutación H134R y fusionada con EYFP para activación optogenética. Estos AAV se produjeron con un serotipo retrógrado, que permite el acceso retrógrado a las neuronas de proyección. Estas preparaciones de AAV tienen una pureza adecuada para inyectarse en animales.

A diferencia del trabajo previo de nuestro grupo, en donde se tuvo el objetivo de manipular a las neuronas IT, en este trabajo buscaremos la manipulación de las neuronas PT. Para esto, las inyecciones se realizarán en el estriado dorsolateral y en núcleos talámicos motores conocidos por recibir proyecciones de las neuronas PT. La manipulación optogenética se llevará a cabo mediante la expresión de la proteína ChR2 humanizado con mutación H134R y fusionada con EYFP, un canal catiónico directamente dependiente de la luz y estas canalrodopsinas son proteínas de 7 hélices transmembrana (Nagel et al., 2005). Las técnicas optogenéticas permiten estudios excitabilidad celular específica a través de proteínas recombinantes, que son canales iónicos los cuales cambian su estructura molecular permitiendo el paso de iones cuando se incide luz a una longitud de onda específica, estos son expresados genéticamente y permiten el movimiento de iones a través de la membrana celular (Ferenczi, Tan & Huang, 2019).

3 Planteamiento del problema

La corteza motora está relacionada con la producción de movimientos voluntarios y movimientos complejos y se ha sugerido que las subpoblaciones neuronales específicas que integran la corteza motora tienen funciones particulares en la generación de la conducta, aunque el rol funcional de los distintos linajes neuronales que integran la corteza motora aun no es del todo claro. Se ha descrito que la corteza motora está integrada por cuatro principales neuronas de proyección, de las cuales, las neuronas IT y PT se caracterizan por tener proyecciones corticoestriatales. Además, estas subpoblaciones neuronales tienen características anatómicas y funcionales distintas, tales como la diferencia en sus objetivos de proyección, o si presentan un tipo de disparo fásico (IT) o tónico (PT). Por lo que las neuronas IT y PT podrían estar asociadas a distintos aspectos de la dinámica poblacional corticoestriatal y de la salida conductual final. Sin embargo, existen desafíos técnicos que obstaculizan el estudio particular de estas neuronas y su descripción particular en la conducta y de la dinámica del circuito cortical y estriatal, tales como la manipulación selectiva de las estas neuronas. Por lo tanto, es necesario generar estrategias de manipulación selectiva para comprender el papel funcional de las subpoblaciones de neuronas corticales. Para este estudio, primero nos enfocamos en el desarrollo de la metodología que nos permita hacer manipulaciones y mediciones de las neuronas PT. Después procedimos a caracterizarlas anatómicamente, describir la dinámica del microcircuito de la corteza motora primaria y

secundaria bajo la influencia de la estimulación selectiva de las neuronas PT, describir la dinámica de la red estriatal evocada por la estimulación de las poblaciones de neuronas corticoestriales PT, y en realizar una comparación de las PT con la subpoblación de las neuronas corticales IT.

4 Hipótesis

1. La activación selectiva de las neuronas PT y las neuronas IT producirá distintos tipos de actividad en redes corticales y estriales.
2. Las manipulaciones optogenéticas de las neuronas PT producirán cambios en la actividad neuronal para un subconjunto de neuronas estriales.

5 Objetivos

5.1 General

Caracterizar anatómicamente y funcionalmente a las neuronas corticoestriales del tracto piramidal y determinar los efectos de su estimulación en la actividad de redes neuronales corticales y estriales.

5.2 Particulares

- Desarrollar una metodología para expresar la canalrodopsina en las neuronas PT mediante la combinación de dos virus de tipo retrógrado en núcleos blancos donde proyectan las neuronas PT.
- Evaluar la participación de las neuronas PT e IT en la dinámica de los circuitos corticales y estriales.
- Evaluar la actividad de redes corticales y estriales evocada por la activación de las neuronas PT y compararla con la actividad evocada por la estimulación de neuronas IT.

6 Diseño metodológico

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (protocolo 102.A) y se ajustan a los principios descritos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH). Todas las coordenadas estereotáxicas se calculan basándose en el atlas cerebral de Paxinos y Watson y se expresan en milímetros con respecto al bregma.

6.1 Animales

Se ha utilizado un total de 28 ratas Long-Evans, de las cuales 9 ya se habían reportado en el estudio de Pimentel-Farfán, 2022, pero los datos obtenidos de estos animales para este trabajo no habían sido analizados en la publicación previa. Los animales fueron alojados en el bioterio de nuestro laboratorio en jaulas domésticas con temperatura estable (23°C) y humedad (66%) y bajo un ciclo constante de luz-oscuridad de 12:12 h (luces encendidas a las 8 am) y todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo durante la fase de luz. Los animales tuvieron libre acceso a alimentos y agua y fueron constantemente supervisados por el investigador y asesorados por personal especializado de las instalaciones generales de nuestro Instituto.

Se utilizaron 24 animales para experimentos optogenéticos, de los cuales 9 experimentos optogenéticos fueron experimentos reportados en el estudio de Pimentel-Farfán y se utilizaron 4 ratas para los experimentos de trazado con Fluoro Gold.

6.2 Infección Viral

Todos los virus se obtuvieron de Addgene. Para los experimentos de estimulación de neuronas cortico-estriatales, 15 animales recibieron inyecciones de 800 nl a 1,000 nl del virus AAV-pgk-Cre en el DLS (coordenadas: AP = -0.6; DL = \pm 3.5; V = - 4.4). Las inyecciones se separaron por al menos 1 mes para asegurar la expresión de proteínas (Fig. 2A). AAV-pgk-Cre fue un regalo de Patrick Aebischer (plásmido Addgene #24593; <http://n2t.net/addgene:24593>; RRID: Addgene_24593). Después, se procedió a administrar el virus pAAV-EF1a-double floxed-hChR2 (H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA en el núcleo ventrolateral del tálamo para asegurar la expresión de ChR2 en neuronas corticales PT (coordenadas: AP = -2; DL = \pm 2; V = 5.6) (Fig. 2B). pAAV-EF1a-double floxed-hChR2 (H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA fue un regalo de Karl Deisseroth (plásmido Addgene #20298; <http://n2t.net/addgene:20298>; RRID: Addgene_20298). Los 15 animales recibieron inyecciones de entre 500 a 600 nl. Las inyecciones fueron realizadas unilateralmente en las regiones de interés en 12 animales, y se realizaron inyecciones bilaterales en las regiones de interés en 3 animales. Todas las coordenadas fueron calculadas utilizando como referencia el atlas de Paxinos & Watson (2007). En la Figura 2 se esquematiza la metodología para manipular a las neuronas PT con la correcta infección viral mencionada, y las zonas donde se realizaron los registros electrofisiológicos.

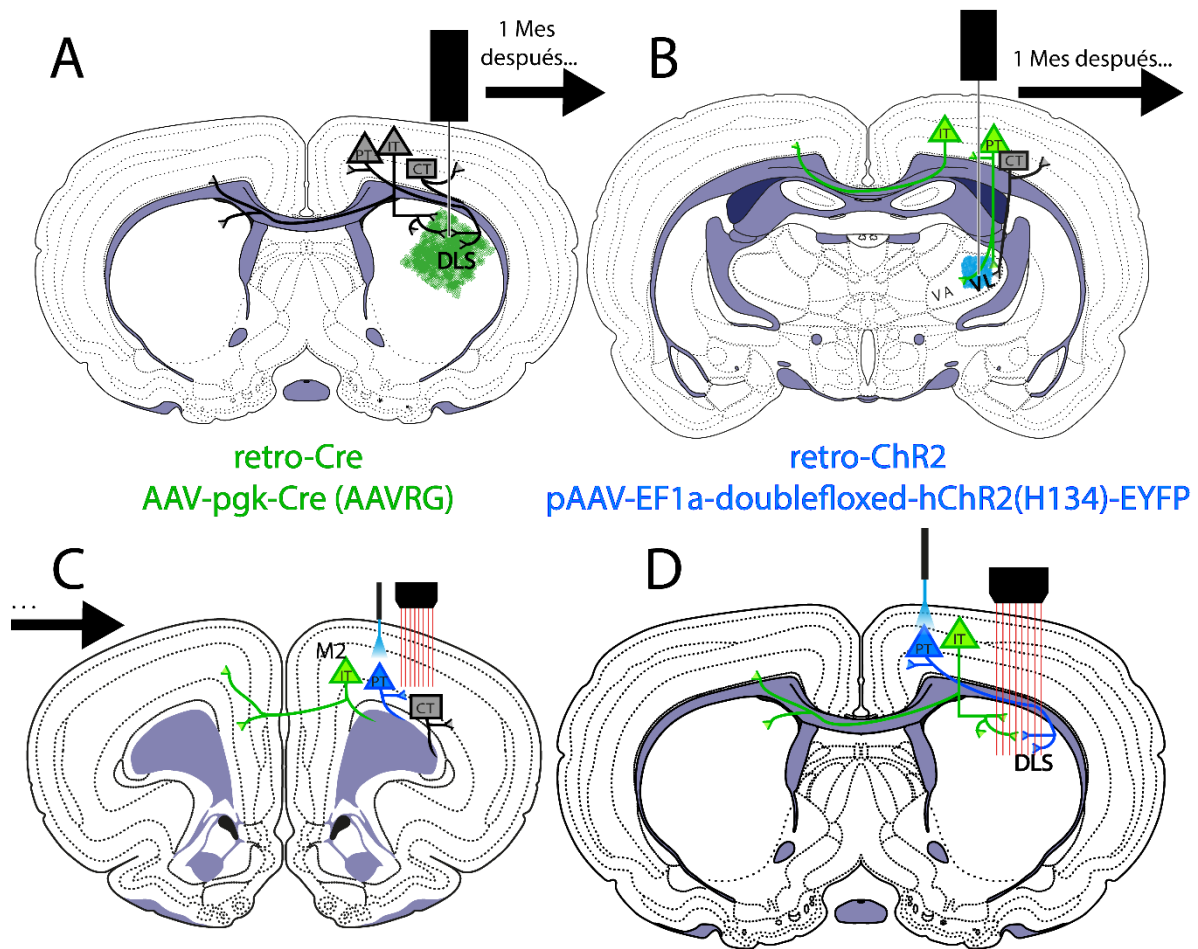


Figura 2. Esquema de infección viral y de registro electrofisiológico. **A.** Infección con el virus retro-Cre en el DLS y un mes de incubación. **B.** Infección viral ipsilateral al sitio de inyección anterior con el virus retro-ChR2 dependiente de la proteína Cre, en el Tálamo VL, y un mes de incubación. Células en **verde** son Cre⁺. Las neuronas CT no expresan Cre. **C.** Se procede a estimular optogenéticamente a las neuronas que expresaron ChR2 dependiente de Cre (neuronas PT-ChR2⁺, de color **azul**), y a registrar a neuronas de la Corteza M2. **D.** Se procede a estimular optogenéticamente a las neuronas PT-ChR2⁺, y a registrar a neuronas del DLS ipsilateralmente al sitio de infección.

Las infecciones virales se llevaron a cabo mediante cirugía estereotáxica en animal anestesiado. La anestesia se indujo con una solución de Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg). Durante la cirugía se monitoreo la respiración constantemente (~2 respiraciones/segundo), así como el reflejo nociceptivo y de ser necesario, se mantuvo el nivel de anestesia con Sevoflurano (0.2-2 %). Las administraciones se realizaron a través de una microjeringa Hamilton® (Neuro-Syringe 7001, 1 µL) acoplada a una bomba de infusión para microjeringas (modelo WPI-UMP3) con una velocidad de 100 nL/min. Al finalizar cada inyección se esperó 10 min antes de retirar la jeringa y suturar la piel del cráneo, además se realizaron los cuidados postoperatorios pertinentes.

6.3 Trazado retrógrado fluorescente

Se anestesiaron 4 ratas Long-Evans (300-400 g) con una solución de Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg), y se inyectó 1 μ l del trazador retrógrado neuronal FluoroGold (FG) en el núcleo Ventrolateral del Tálamo (coordenadas: AP = -2; DL= \pm 2; V = 5.6). Los tiempos de marcaje de este agente se presentan entre 4 a 14 días. Este trazador presenta una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 350-395 nm, y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 530-600 nm cuando se une a membranas a un pH fisiológico de 7.4. Los procedimientos quirúrgicos fueron iguales a las administraciones de virus. Todos los animales sometidos a este procedimiento fueron perfundidos y procesados a los 10 días de la inyección de FG.

6.4 Registros electrofisiológicos en animal anestesiado

Todos los procedimientos fueron similares a los reportados en estudios previos del laboratorio (Hidalgo-Balbuena et al., 2019; Báez-Cordero et al, 2020; Peña-Rangel et al., 2021; Pimentel-Farfan et al., 2022). En breve, los registros se realizaron en animales anestesiados con uretano (1 g/kg) montados un marco estereotáxico; se administraron dosis suplementarias (0.15 g/kg) durante el registro cuando fue necesario. Los registros con sondas de silicio (“silicon probe” sonda mostrada en Fig. 3A-B) se realizaron a través de una craneotomía (1.4 mm x 2.5 mm) centrada en 3.5 mm anterior y 1.9 mm lateral al bregma. Todas las coordenadas estereotáxicas se seleccionaron basándose en informes anteriores centrados en la región de las extremidades delanteras de la corteza M2 (Soma et al., 2017). También se usaron las mismas dimensiones de la craneotomía centrada a 0.6 mm anterior y 3.7 mm lateral al bregma para registrar la actividad estriatal, y las coordenadas estereotáxicas se seleccionaron basándose en informes anteriores centrados en la región de las extremidades delanteras del DLS (West et al., 1990). La confirmación histológica de la posición de la sonda de silicio en el cerebro se logró aplicando colorante de carbocianina lipofílica DiI (1 %; Sigma) en la parte posterior de las sondas antes de la inserción.

Protocolo de Estimulación óptica. Para opto estimular los sitios de interés se utilizaron fibras ópticas con un diámetro de 200 μ m, conectadas a una fuente de luz LED de 50 μ m de diámetro y que emite una luz azul con una longitud de onda de 465 nm. De acuerdo con el objetivo del estudio y como se muestra en Figura 3B, las fibras se dirigieron a M2 (coordenadas: AP = 3.5; ML = 1.9; V = 1.3; ipsilateralmente al sitio de registro) o directamente en el sitio de registro en M1 (coordenadas: AP = 2.0; ML = 3.6; V = 1.3).

Utilizamos dos protocolos de estimulación. Primero, un protocolo de 50 ensayos con un intervalo de 5 segundos, en donde cada ensayo consistía en un pulso de luz con una duración de 500 ms (Figura 3C). El segundo protocolo consistía en 50 ensayos donde se aplicaba un tren de 5 estímulos a una frecuencia de 3.3 Hz y cada estímulo tenía una duración de 5ms (Fig. 3D). La sonda de silicio se bajó lentamente para registrar la actividad neuronal desde la región de la extremidad delantera en M2 (0.8-1.8 mm de profundidad) o en el EDL (3-5 mm de profundidad). Para cada animal, realizamos registros en 2-3 profundidades (al menos 250 μ m entre cada profundidad). Inmediatamente después de los experimentos, se inyectó a los animales con una dosis letal de pentobarbital y se perfundieron transcardialmente. Los cerebros se extrajeron y procesaron para histología.

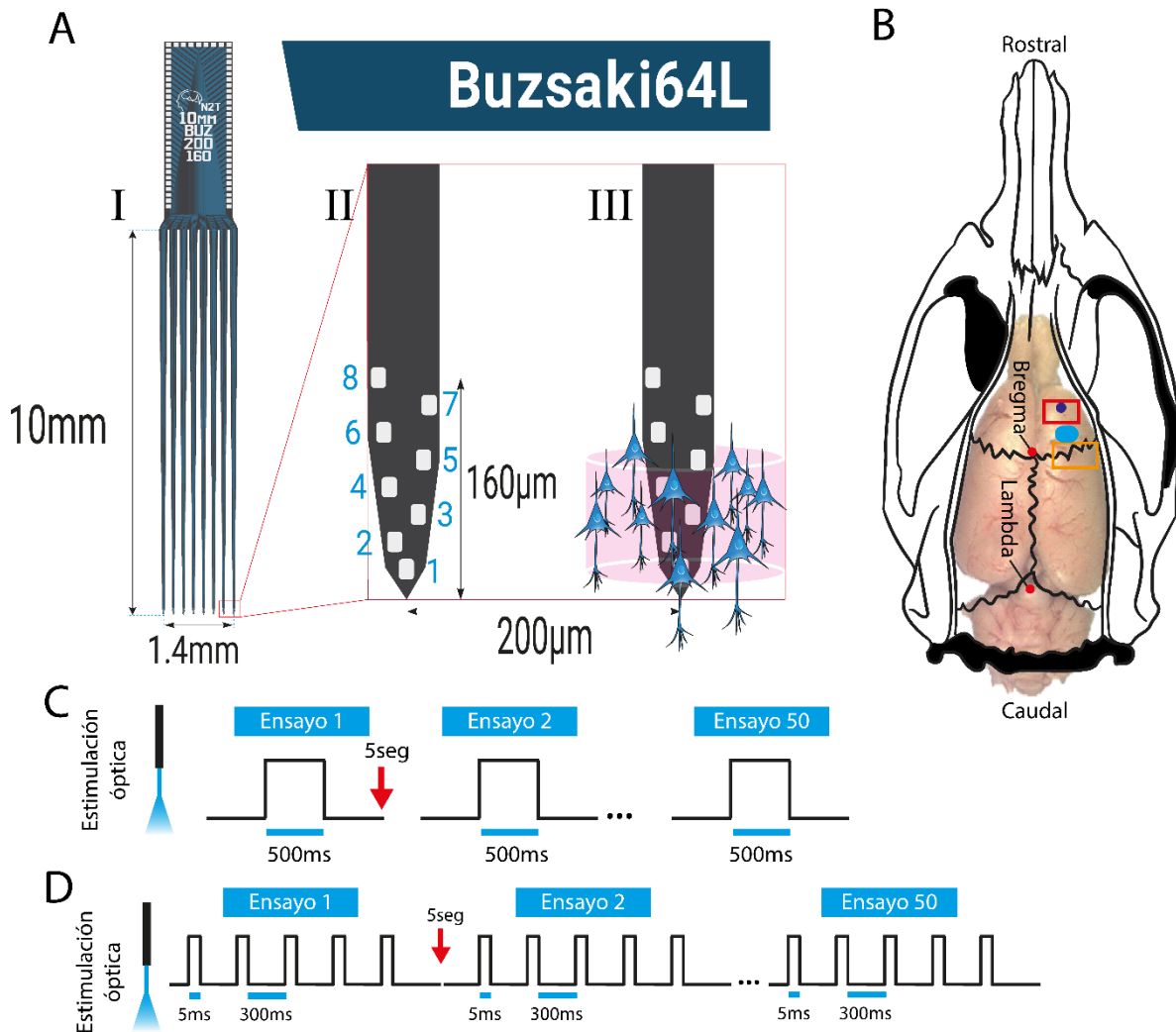


Figura 3. Registros fisiológicos y protocolos de estimulación óptica. **A.** Se muestra una sonda de silicón Buzsaki64L. **I)** A la izquierda, se muestra el esquema completo de la sonda de silicón con 8 puntas, y a la derecha, una amplificación de dos puntas, en donde **II)** la punta de la izquierda ejemplifica la distribución de los 8 microelectrodos, la distancia de $160\mu\text{m}$ en los que se distribuyen los microelectrodos y la distancia entre las puntas, y en la punta de la derecha, **III)** se esquematiza un ejemplo de topografía funcional de una población neuronal durante un registro; las posiciones relativas de las neuronas se determinan calculando el 'centro de masa' de la amplitud de pico registradas desde múltiples sitios. Los sitios de registro están espaciados $20\mu\text{m}$ verticalmente. Los registros a gran escala y el análisis de redes ofrecen la oportunidad de identificar la variación de los ensamblajes celulares dependiente del comportamiento y la red. **B.** Se muestran los sitios donde se hacen los registros electrofisiológicos y la estimulación óptica en rata. En el cuadro rojo es donde se hace la craneotomía para registros en corteza y el punto azul oscuro el sitio de estimulación óptica. El cuadro naranja es el sitio donde se hace la craneotomía para registros en estriado y el punto azul claro es donde se hace la estimulación óptica. **C.** El protocolo de estimulación óptica consiste en 50 ensayos, en cada ensayo se aplica un haz (o pulso) de luz, cada estímulo con una duración de 500 ms y con un intervalo entre cada estímulo de 5 s. **D.** El protocolo de estimulación óptica consiste en 50 ensayos, en cada ensayo se aplica un tren de 5 pulsos de luz con una duración de 5 ms espaciados entre ellos 300 ms y con un intervalo entre cada estímulo de 5 s.

7 Resultados

7.1 Caracterización anatómica de las neuronas del Tracto Piramidal con trazado retrogrado fluorescente

Con el objetivo manipular a las neuronas del tracto piramidal, decidimos en primera instancia realizar una caracterización anatómica de las neuronas PT por medio de un trazado retrogrado fluorescente, usando el marcador fluorescente FG en el núcleo ventrolateral (VL) del tálamo y en el núcleo ventral posterolateral (VPL) del tálamo (Fig. 4AI y Fig. 4BI). Usamos estos núcleos porque ya se ha reportado que las neuronas PT de M1 y piramidales de S1 proyectan ipsilateralmente hacia el VL y el VPL, respectivamente (Shepherd, 2013), siendo una de las diferencias particulares respecto a neuronas IT-CStr, que proyectan bilateralmente al estriado y contralateralmente a la corteza. Decidimos trazar dos núcleos talámicos con el objetivo de encontrar el núcleo ideal para comenzar la estrategia de infección viral. Una vez realizado el trazado retrogrado en 4 ratas Long Evans (2 ratas en el núcleo VL del tálamo y 2 en el núcleo VPL del tálamo), se obtuvieron imágenes histológicas que muestran la confirmación de la proyección unilateral de neuronas corticales al tálamo (Fig. 4A-II, Fig. 4A-IV, Fig. 4B-II y Fig. 4B-IV).

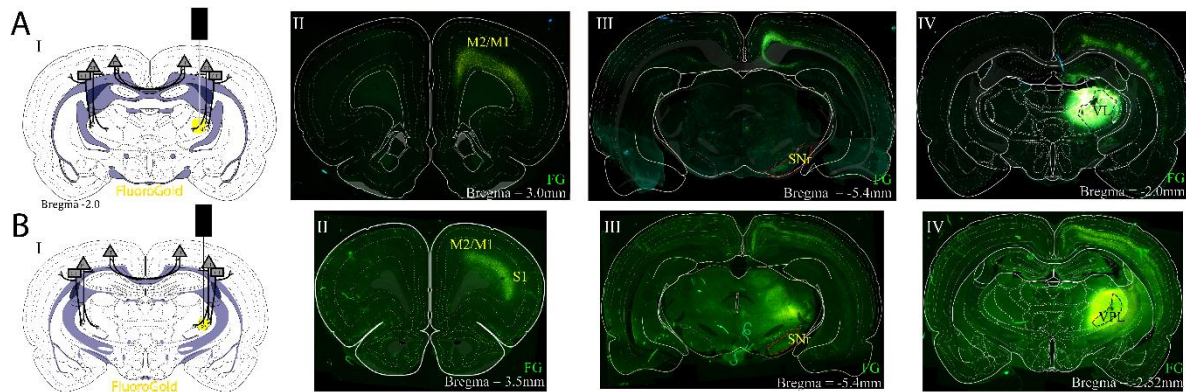


Figura 4. Trazado retrogrado de neuronas cortico-talámicas. A y B) Evidencia anatómica de neuronas corticales y nigrales que proyectan al Tálamo. (I) Esquemas de los sitios de inyección. (II) Fluorescencia del marcador FluoroGold, en neuronas de la corteza M2/M1, (III) neuronas de la Sustancia Nigra *pars reticulata* y (IV) en el núcleo talámico VL (en el caso de A) o el núcleo talámico VPL (en el caso de B).

La inyección de FG en el núcleo VPL del tálamo expone marcaje retrogrado en dos capas de fluorescencia, incluyendo la capa IV y como era de esperarse el marcaje se extendió hacia regiones sensoriales. Por otro lado, la inyección de FG en el VL solo se muestra una capa gruesa uniforme inferior con mayor marcaje hacia regiones prefrontales. Estos confirman

que las inyecciones cercanas al VPL podrían también alcanzar regiones somatosensoriales, mientras que en núcleo VL del tálamo se observa una capa amplia, siendo más amplio el marcaje en la capa V de la corteza. Como confirmación adicional de un trazado retrogrado exitoso, se evidencia la fluorescencia de neuronas de la Sustancia Nigra *pars reticulata*, núcleo de salida de los ganglios basales que también proyecta al tálamo (Fig. 4A-III y Fig. 4B-III), observándose mayor fluorescencia en el tálamo VL. Por lo tanto, decidimos que, si bien las inyecciones en el tálamo VL aún muestran cierto nivel de marcaje en regiones sensoriales (muy probablemente por difusión desde el sitio de inyección), este núcleo sería el más adecuado para aplicar la estrategia de infección con virus retrógrados.

En cuanto a la estrategia de infección con virus adenoasociados para expresar la proteína recombinante canalrodopsina 2 (ChR2) en neuronas PT (Fig. 5A-I), después de realizarse los registros electrofisiológicos de 6 ratas Long Evans, se obtuvieron imágenes histológicas de la corteza (Fig. 5A-II), el estriado que fue primer sitio de infección (Fig. 5A-III) y el tálamo VL, el segundo sitio de infección (Fig. 5A-IV) y se observa una clara fluorescencia unilateral e ipsilateral a los sitios de infección debido a la exitosa expresión de ChR2 y co-expresión de la proteína amarillo fluorescente (EYFP, *enhanced yellow fluorescent protein* por sus siglas en inglés). Las fotografías histológicas de fluorescencia con EYFP y con FG fueron tomadas en cortes coronales.

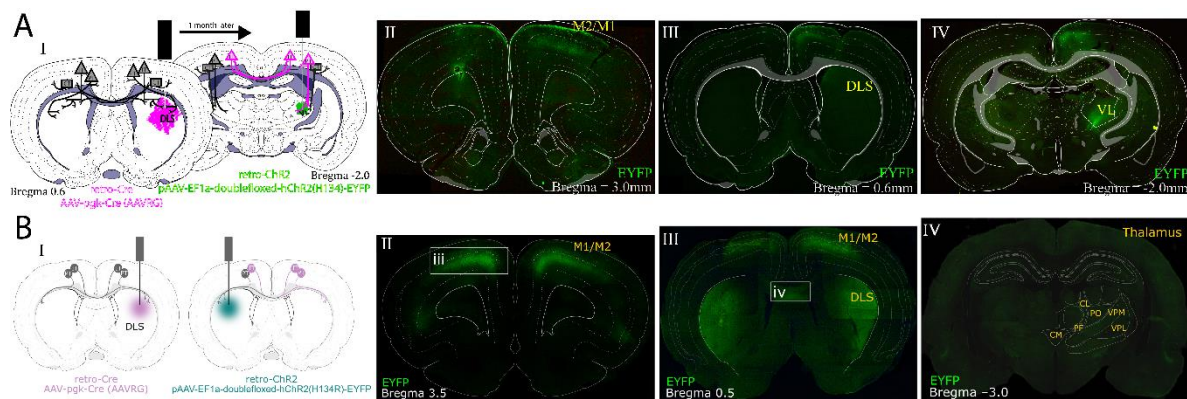


Figura 5. Infección viral retrogrado en neuronas PT e IT. **A)** **(I)** Esquema experimental de los sitios de infección. **(II)** Confirmación histológica de la infección de neuronas PT ipsilaterales de la expresión de la proteína amarilla fluorescente EYFP en la corteza M2/M1, **(III)** el tálamo VL y **(IV)** en el DLS. **B)** **(I)** Esquema experimental de los sitios de infección para manipular neuronas IT realizada por Pimentel-Farfán et al., (2022). **(II)** Confirmación histológica de la infección de neuronas IT bilaterales de la expresión de la proteína amarilla fluorescente EYFP en la corteza M2/M1, **(III)** y en el DLS **(III)** pero no en regiones talámicas **(IV)**. Esta figura tomó las histologías y esquemas de infección realizadas por Pimentel-Farfán et al., (2022).

La estrategia de infección viral para expresar ChR2 en neuronas PT fue replicada y adaptada de la estrategia de infección viral utilizada por Pimentel-Farfán (Fig. 5B-I) en el 2022. En ese trabajo se evidenció a las neuronas IT por medio de la expresión de EYFP en cortes coronales de corteza (Fig. 5B-II), de DLS (Fig. 5B-III) y de regiones talámicas (Fig. 5B-IV). En ese artículo se muestra que una infección unilateral en el DLS con el virus AAV-pgk-Cre y después de un mes, otra infección en el DLS contralateral con el virus pAAV-EF1a-double floxed-hChR2 (H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA, podía expresar ChR2 en las neuronas IT para hacer una manipulación selectiva de estas. La Figura 5 expone la disección anatómica de las proyecciones de las neuronas PT e IT, manteniéndose la marca fluorescente de manera ipsilateral en los experimentos diseñados para apuntar a las neuronas PT y de manera bilateral para las IT.

7.2 Caracterización de la actividad de las neuronas del Tracto Piramidal evocada por la estimulación optogenética

Con la finalidad de manipular a las neuronas corticoestriatales PT, se expresó la proteína ChR2 en dichas neuronas con la estrategia viral esquematizada en la Fig. 2. Para corroborar la funcionalidad de la opsina excitadora y proceder a caracterizar la actividad de las neuronas corticales, se realizaron registros extracelulares multiunitarios en la corteza de ratas anestesiadas con uretano (Figura 6A). Durante estos los registros, se estimuló a las neuronas PT de manera ipsilateral a los sitios de infección viral y al sitio de registro (Figura 6B). Para este proyecto se registraron 6 animales (los mismos de la histología) a una profundidad entre 1.5 y 2.0 mm en la corteza.

La estimulación optogenética de las neuronas PT de la corteza M2 produjo respuestas en la actividad de las neuronas corticales, caracterizadas por activaciones e inactivaciones fásicas de latencia corta y larga y con diversas duraciones. Los gráficos tipo ráster de 4 neuronas representativas con distintos patrones de respuesta se presentan en la figura 6C. Algunas neuronas, tras el protocolo de estimulación, incrementan de manera fásica su tasa de disparo (Figura 6C-I), otras incrementan su frecuencia de disparo solo durante la estimulación e inmediatamente regresan a su actividad basal (Figura 6C-II), algunas neuronas disminuyen su frecuencia de disparo tras la estimulación óptica de neuronas PT (Figura 6C-III), y finalmente, otras neuronas presentan una inhibición transitoria durante el estímulo y regresan a su actividad basal (Figura 6C-IV).

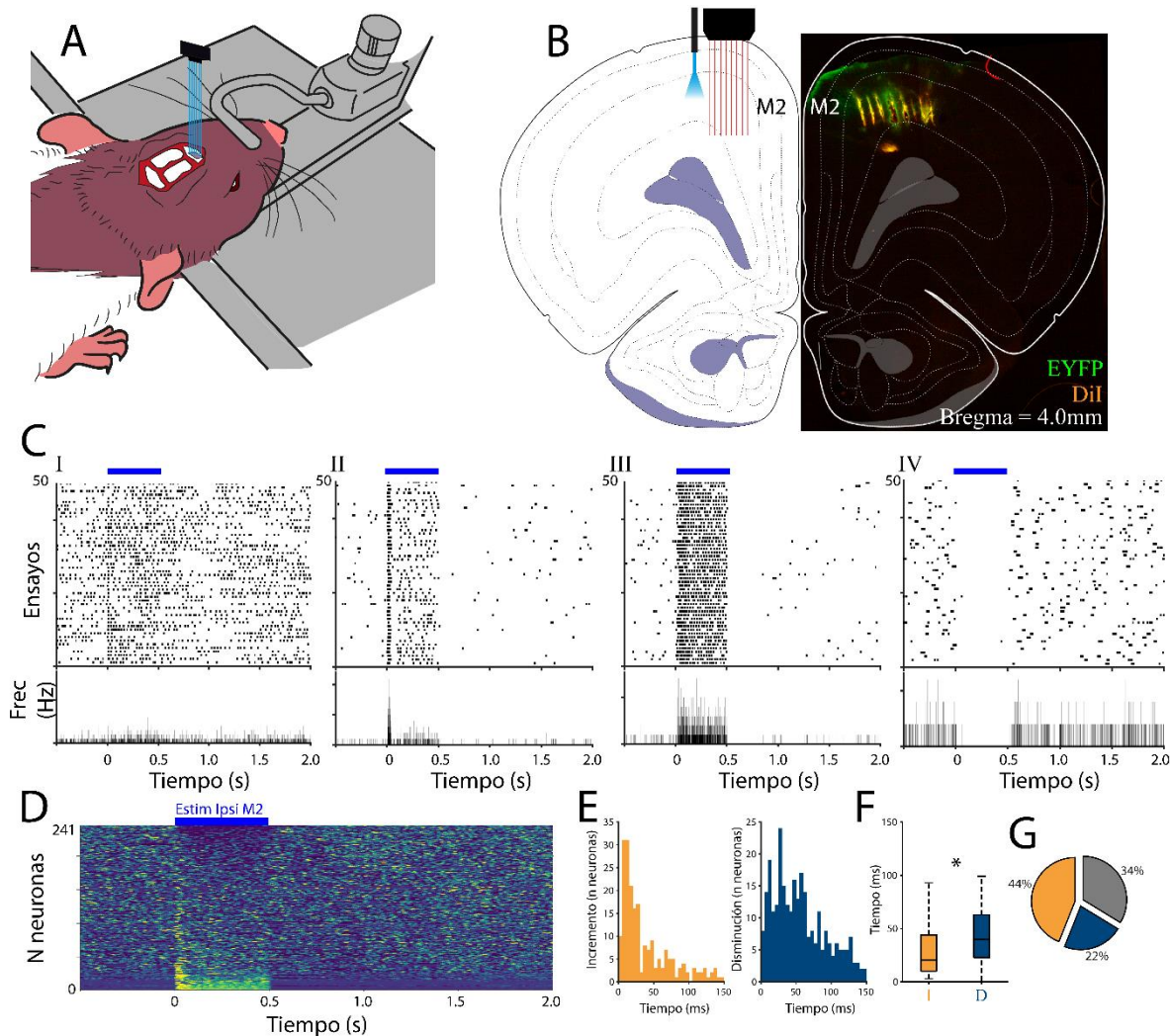


Figura 6. Estrategia de estimulación optogenética de neuronas corticoestriatales del tracto piramidal. **A)** Representación esquemática de registro electrofisiológico en animal anestesiado. **B)** Confirmación histológica de la infección de neuronas PT. Izquierda: Representación esquemática del registro de la corteza M2 y estimulación óptica en el sitio de registro. Derecha: fotografía de fluorescencia de un corte coronal de rata (corte AP=4.0mm), en verde se observa la transfección mediante la expresión de la proteína EYFP y en naranja la trayectoria de la sonda de silicón teñida con el trazador DiI. **C)** Raster plots representativos de cuatro diferentes neuronas e histogramas peri-estímulo de la frecuencia de disparo debajo de cada ráster, alineadas al primer estímulo óptico de 500 ms (línea azul). En el eje horizontal se muestra el tiempo, y en el eje vertical, el número de ensayos de una célula. **D)** Matriz poblacional que muestra la tasa de disparo promedio evocadas por la estimulación en la corteza M2 ipsilateral al sitio de registro para las neuronas registradas en la corteza M2 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 azul en la parte superior alineada a cero. **E)** Histogramas de latencia de respuesta para células que incrementaron (amarillo) o disminuyeron (azul) su tasa de disparo durante la estimulación. **F)** Box plot que comparan las latencias de respuesta. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (prueba de Wilcoxon, $p = 0.0014$). **G)** Gráfica pastel que muestra el porcentaje de células que incrementaron, disminuyeron y que no cambiaron su tasa de disparo significativamente durante la estimulación.

Después, construimos matrices de activación de neuronas corticales (Fig. 6D) donde se expone que, con el registro de los 6 animales anestesiados, se registraron $n = 241$ neuronas corticales M2, y con la estimulación óptica del protocolo de 1 pulso de 500ms de 465nm a ~ 2 mW, se encontró un incremento de la actividad de un grupo de neuronas (45%), la disminución de la actividad de otro grupo de neuronas (22%) y un tercer grupo que no respondió (33%) (Fig. 6E y Fig. 6G). Las latencias de respuestas entre las activaciones (con mediana de 19 ms) e inhibiciones (con mediana de 35 ms) mostraron diferencias significativas, siendo estas últimas, las de latencia más larga (Fig. 6F; Kruskal-Wallis, $X^2 = 10.16$, $P = 0.0014$). Estos datos sugieren que la estimulación óptica recluta rápidamente a un grupo de neuronas corticales (potencialmente las PT), que a su vez producirían distintos efectos en el microcircuito cortical, como el reclutamiento de otras neuronas glutamatérgicas o GABAérgicas y que se reflejaría en los distintos tipos de patrones desplegados en la figura 6.

7.3 Manipulación optogenética de la actividad neuronal estriatal de las proyecciones ipsilaterales de las neuronas del Tracto Piramidal

Para completar la caracterización de modelo de estimulación de neuronas PT corticoestriatales, era necesario demostrar que la activación de estas produciría un efecto en la actividad de neuronas estriatales. Con este objetivo, siguiendo el mismo mecanismo de infección de los resultados de la sección anterior, se expresó la proteína ChR2 en neuronas PT de 9 animales Long Evans y se procedió a realizar registros extracelulares multiunitarios correspondientes. Lo primero que se observó, es que la estimulación de neuronas PT no produjo claras respuestas en la actividad del EDL (primeros 3 registros; Figura 7A-B). Por lo tanto, se realizó un análisis histológico (Figura 7C) para determinar (1) la correcta infección en el núcleo talámico VL, (2) la precisión del sitio de registro en el DLS, y (3) la localización del sitio de estimulación en las neuronas PT genéticamente modificadas. Después de mapear los sitios con mejor densidad de neuronas PT (Fig. 7C-ii), se procedió a estimar la mejor coordenada respecto a Bregma y la mejor coordenada lateromedial para hacer los protocolos de estimulación óptica (Fig. 7C-iii).

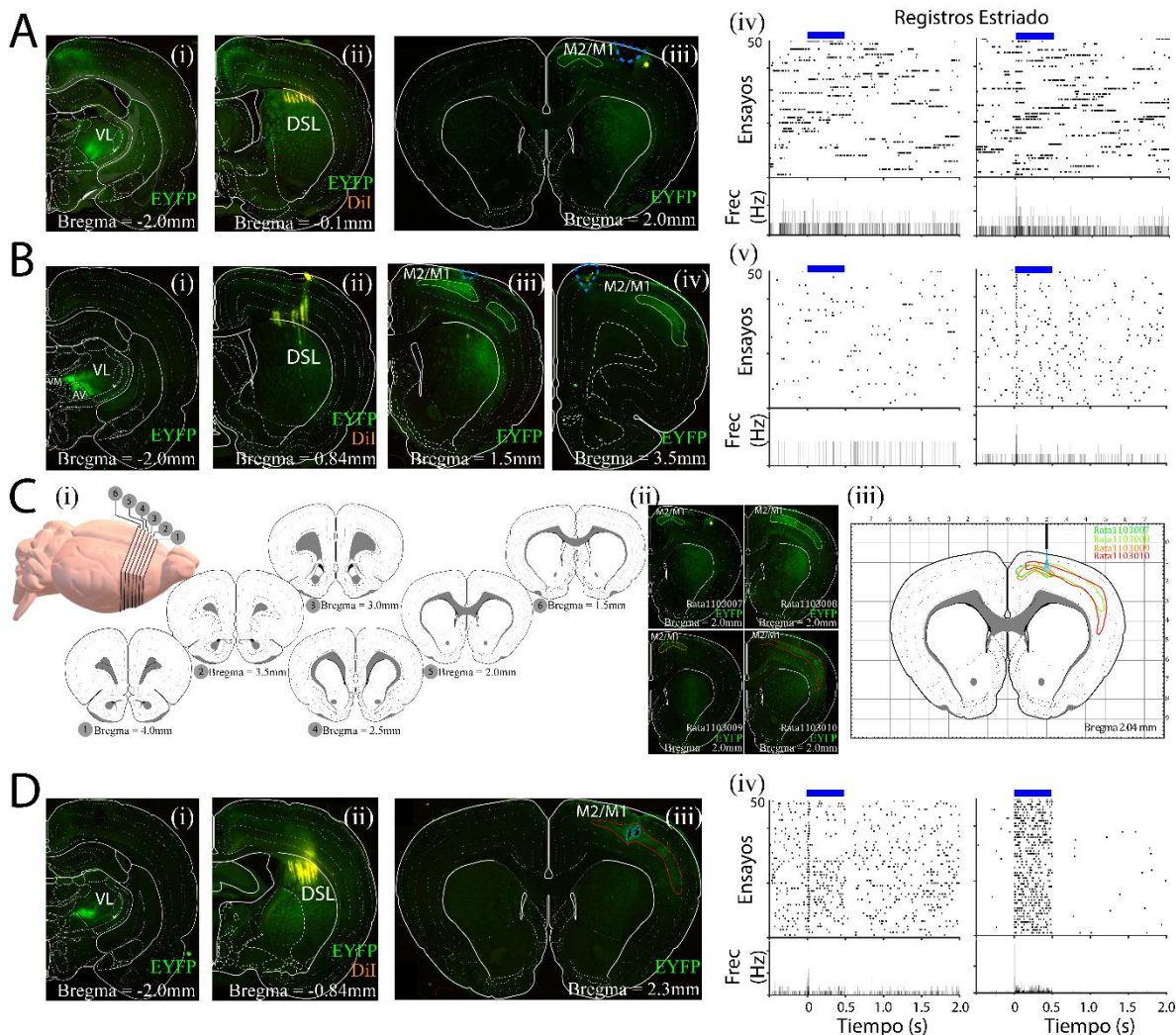


Figura 7. Mapeo histológico para encontrar la región ideal para la estimulación optogenética de neuronas PT en registros en DLS. (A, B) Confirmación histológica del sitio de (i) infección en VL, (ii) del sitio de registro y (iii) del sitio de estimulación, y gráficos ráster representativos de neuronas en DLS (v y iv). (C) (i) Estrategia de mapeo histológico para encontrar la mayor proporción de neuronas PT haciendo cortes cada 500 μm desde Bregma = 4.0 mm hasta -1.5 mm, (ii) Confirmación histológica de las mayores densidades de PT-ChR2⁺ de Bregma = 2.3 mm de 4 rebanadas y (iii) coordenada ideal de estimulación de neuronas PT respecto a la mejor densidad mostrada en la histología. (D) Confirmación histológica (i) del sitio de infección en VL, (ii) del sitio de registro, (iii) la coincidencia perfecta de fibra óptica en el sitio con la mayor proporción de neuronas PT y (iv) gráficos ráster representativos de neuronas en DLS que respondieron a la activación de neuronas PT por estimulación optogenética.

En los primeros 2 experimentos se observó que hubo una correcta infección en el núcleo VL del tálamo, aunque con algo de variabilidad en la fluorescencia, como se muestra en la Figura 7A-i y la Figura 7B-i. También se observó una buena precisión del sitio de registro (Figura 7A-ii y 7B-ii) pero donde se evidenció el problema fue en la precisión del sitio de estimulación en la densidad poblacional de neuronas PT-corticoestriales, puesto que la fibra

óptica se observó alejada del sitio de mayor fluorescencia (Figura 7A-iii, 7B-iii y 7B-iv). También se muestran 2 neuronas representativas de los experimentos de estos experimentos (Fig. 7A-iv y Fig. 7B-v), que expone actividad neuronal que no respondía robustamente a la estimulación óptica. Un cuarto experimento evidenció una robusta respuesta de la actividad neuronal estriatal bajo el protocolo de 1 pulso de 500 ms de 465 nm a ~24.9 mW estimulando la corteza motora M1 en Bregma 2.0 mm (como se observa en la Fig. 7D), mostrando una infección en el núcleo talámico VL y adyacente al núcleo talámico AV (Fig. 7D-i), una buena precisión en el sitio de registro al DLS (Fig. 7D-ii) y en el sitio de estimulación (Fig. 7D-iii) activando gran densidad de neuronas PT-ChR2⁺ y presentando una actividad robusta bajo la excitación mostrada en dos gráficos tipo ráster representativos de 2 neuronas (Fig. 7D-iv).

Por lo tanto, para los siguientes experimentos (n = 5 animales) utilizamos las siguientes coordenadas de estimulación para la fibra óptica en la corteza: anterior = 2.0 mm y lateromedial 2.0 mm (Fig. 8A-B). La estimulación optogenética de las neuronas PT de M1 también produjo una variedad de respuestas de las neuronas estriatales, caracterizadas por activaciones e inactivaciones, y se muestra en los gráficos tipo ráster de 4 neuronas representativas (Figura 8C). Al igual que en la corteza, tras el protocolo de estimulación algunas neuronas incrementaron su tasa de disparo solo al principio de la excitación (Figura 8C-I), otras incrementaron su tasa de disparo durante todo el intervalo de activación e inmediatamente regresaban a su actividad basal (Figura 8C-II), algunas neuronas incrementaron su tasa de disparo durante la estimulación, y cuando la estimulación terminó, rápidamente se inhibieron y aumentaron su actividad espontánea, en forma de rebote (Figura 8C-III) y finalmente, otras neuronas presentaron una inhibición transitoria durante el estímulo y regresaron a su actividad basal concluido este (Figura 8C-IV).

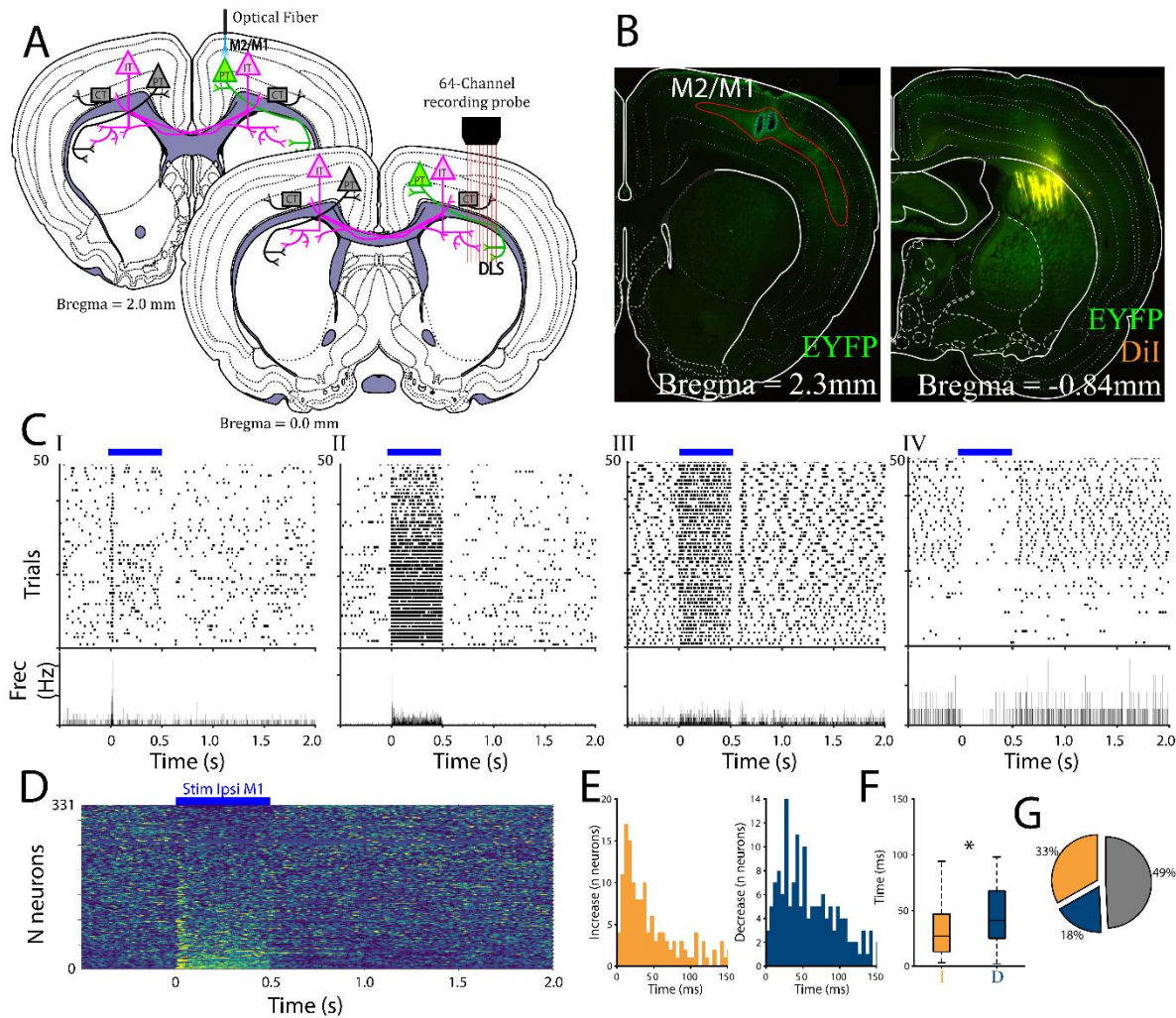


Figura 8. Registros electrofisiológicos de neuronas estriatales por estimulación de neuronas PT.

A) Representación esquemática de registro electrofisiológico y sitio de estimulación. **B)** Confirmación histológica de la infección de neuronas PT. Izquierda: Fotografía de un corte histológico coronal que muestra la estimulación en corteza M1 en la región donde hay mayor densidad de neuronas PT-ChR2⁺. Derecha: fotografía de fluorescencia de un corte coronal de rata, en verde se observa la transfección mediante la expresión de la proteína EYFP y en amarillo la trayectoria de la sonda de silicón teñida con el trazador DiI. **C)** Raster plots representativos de cuatro diferentes neuronas e histogramas peri-estímulo de la frecuencia de disparo debajo de cada ráster, alineadas al primer estímulo óptico de 500 ms (línea azul). En el eje horizontal se muestra el tiempo, y en el eje vertical, el número de ensayos de una célula. **D)** Matriz poblacional que muestra la tasa de disparo promedio evocadas por la estimulación en la corteza M1 ipsilateral al sitio de registro para las neuronas registradas en el DLS 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 azul en la parte superior alineada a cero. **E)** Histogramas de latencia de respuesta para células que incrementaron (amarillo) o disminuyeron (azul) su tasa de disparo durante la estimulación. **F)** Box plot que comparan las latencias de respuesta. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (prueba de Wilcoxon, $p = 0.0014$). **G)** Gráfica pastel que muestra el porcentaje de células que incrementaron, disminuyeron y que no cambiaron su tasa de disparo significativamente durante la estimulación.

Después, construimos matrices de activación de neuronas estriatales (Fig. 8D) donde se expone que, en 7 animales anestesiados, se registraron $n = 331$ neuronas estriatales, y la estimulación óptica de neuronas PT de M1, produjo un incremento de la actividad de un grupo de neuronas (33%), la disminución de la actividad de otro grupo de neuronas (18%) y un tercer grupo que no respondió (49%) (Fig. 8E y Fig. 8G). Similar a lo encontrado en los registros corticales, latencias de respuestas entre las activaciones (con mediana de 24 ms) e inhibiciones (con mediana de 45 ms) también mostraron diferencias significativas, siendo estas últimas, las de latencia más larga (Fig. 8F; Kruskal-Wallis, $X^2 = 18.39$, $P = 1.80321 \times 10^{-05}$).

7.4 Respuestas poblacionales corticales interestructurales evocadas diferencialmente por neuronas del tracto piramidal (PT) y neuronas intratelencefálicas (IT)

Para analizar con más detalle la dinámica poblacional de redes corticales y estriatales, en los experimentos previamente descritos también llevamos a cabo un protocolo de estimulación en trenes. Este consistía en un tren de 5 pulsos de luz de 5 ms espaciados entre ellos 300 ms, y con un intervalo entre cada tren de 5 segundos, hasta realizar 50 ensayos (Fig. 3D). Cuando estimulamos y registramos directamente en M2, encontramos unidades cuya actividad se sincronizaba con latencias cortas a cada uno de los estímulos del tren (Fig. 9B). En total, se registraron 242 neuronas en M2, y se realizó una matriz de actividad poblacional (Fig. 9C) donde se observa que durante la activación de neuronas PT en esta misma región, la respuesta poblacional se divide en dos grupos; el primer grupo consta de 61 neuronas que tienen una alta tasa de disparo alineado a cada uno de los cinco estímulos del tren. El grupo restante consta de 181 neuronas que no presentaron respuesta a los estímulos del tren. A diferencia de los protocolos anteriores, en este caso no hay reclutamiento de actividad inhibitoria, sugiriendo que la evocación de este tipo de actividad por neuronas PT requiere de la activación con duraciones más largas, como lo observamos en la figura 6.

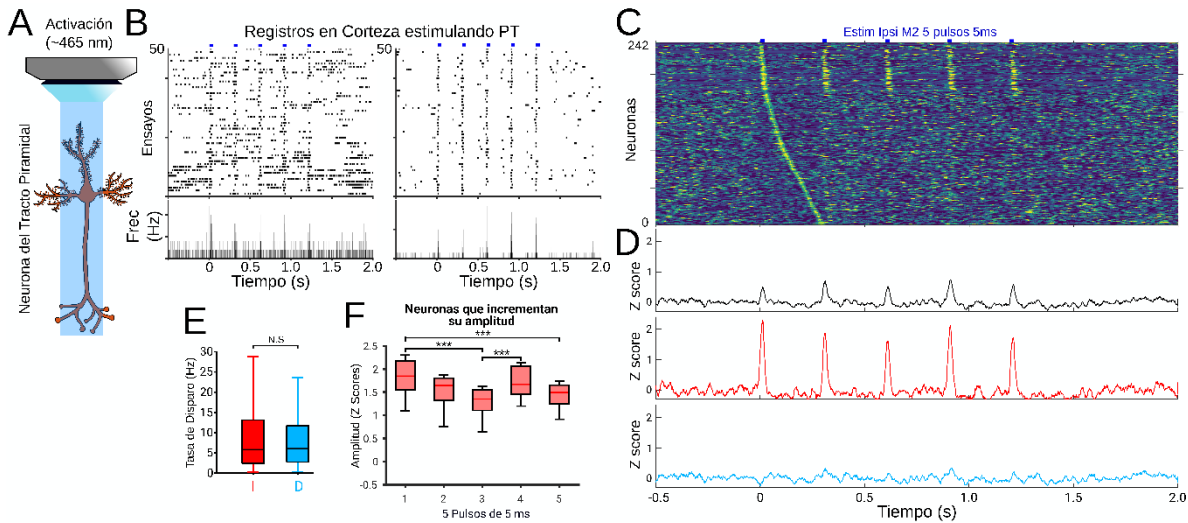


Figura 9. Respuesta poblacional cortical evocada por neuronas PT. **A)** Esquema de estimulación de neuronas PT con fibra óptica. **B)** Rasters plots representativos de dos neuronas corticales diferentes e histogramas peri-estímulo de la frecuencia de disparo debajo de cada ráster, alineadas a los trenes de 5 estímulos ópticos de 5ms espaciados 300 milisegundos (puntos azules). En el eje horizontal se muestra el tiempo, y en el eje vertical, el número de ensayos de una célula. **C)** Matriz poblacional que muestra la tasa de disparo promedio evocada por la estimulación en la corteza M2 ipsilateral al sitio de registro para las neuronas registradas en la corteza expresados como valores Z (código de color) y ordenadas según la tasa de disparo promedio máxima alcanzada durante trenes de estimulación de 5 ms. Los trenes de estimulación se indican con un punto horizontal azul, en la parte superior, alineado a cero y cada 300 ms. **D)** Histogramas de tasa de disparo promedio de todas las células (gráfica superior, en negro), de las neuronas que se activaron en secuencia alineados a los estímulos (gráfica de en medio, en rojo) y las neuronas que no se activaron después del estímulo (gráfica inferior, en azul). **E)** Box plot que compara las tasas de disparo de las poblaciones neuronales mostradas en **D**, comparando la tasa de disparo neuronas que se activaron después de cada estímulo (**I**) contra la tasa de disparo de neuronas que no se activaron después del primer estímulo (**D**). Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. **F)** Box plot que compara las amplitudes de las poblaciones **I** en valores Z. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75.

Después calculamos la tasa de disparo promedio (Fig. 9E) de las neuronas que se activaron en secuencia a cada pulso de luz (Fig. 9D en medio, $n = 61$, llamada población **I**), asumiendo que éstas serían las neuronas PT. Comparamos estos valores con la tasa de disparo de las neuronas que no se activaron en secuencia a cada pulso de luz (Fig. 9D en inferior, $n = 181$, llamada población **D**) y observamos que no se presentaron diferencias significativas entre ambas poblaciones (Fig. 9E; Kruskal-Wallis, $X^2 = 10.51$, $P = 0.4213$). También calculamos la amplitud promedio de respuesta expresada en valores Z para ambas poblaciones, I y D, y para cada estímulo del tren (Fig. 9F-G). Como era de esperarse, la población D no mostró cambios significativos, ya que en general no se observa una respuesta robusta evocada por la estimulación (Fig. 9G). Sin embargo, pudimos observar que la población **I** mostró diferencias

significativas entre el primer estímulo del tren y los estímulos 3 y 5 (Fig. 9F; Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 28.47$, $P = 6.57189 \times 10^{-07}$), sugiriendo que esta población es susceptible a mecanismos de plasticidad de corto plazo, en este caso, depresión de corto plazo.

Después nos preguntamos, si este tipo de actividad cortical poblacional se observa después de la estimulación de las neuronas PT sería distinta al estimular otras subpoblaciones, como las IT. Por lo que, analizamos datos tomados del estudio previo del laboratorio (Pimentel-Farfán et al., 2022), en donde estas dinámicas no se habían analizado (Fig. 10).

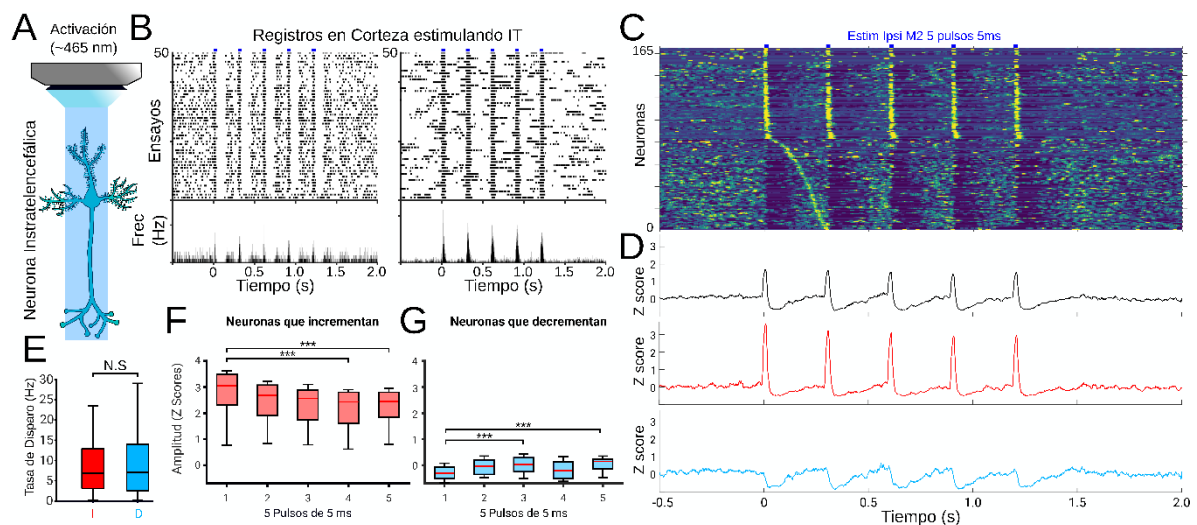


Figura 10. Respuesta poblacional cortical evocada por neuronas IT. **A)** Esquema de estimulación de neuronas PT con fibra óptica. **B)** Rasters plots representativos de dos neuronas corticales diferentes e histogramas peri-estímulo de la frecuencia de disparo debajo de cada ráster, alineadas a los trenes de 5 estímulos ópticos de 5ms espaciados 300 milisegundos (puntos azules). En el eje horizontal se muestra el tiempo, y en el eje vertical, el número de ensayos de una célula. **C)** Matriz poblacional que muestra la tasa de disparo promedio evocada por la estimulación en la corteza M2 ipsilateral al sitio de registro para las neuronas registradas en la corteza expresados como valores Z (código de color) y ordenadas según la tasa de disparo promedio máxima alcanzada durante trenes de estimulación de 5 ms. Los trenes de estimulación se indican con un punto horizontal azul, en la parte superior, alineado a cero y cada 300ms. **D)** Histogramas de tasa de disparo promedio de todas las células (gráfica superior, en negro), de las neuronas que se activaron en secuencia alineados a los estímulos (gráfica de en medio, en rojo) y las neuronas que no se activaron después del estímulo (gráfica inferior, en azul). **E)** Box plot que compara las tasas de disparo de las poblaciones neuronales mostradas en **D**, comparando la tasa de disparo neuronas que se activaron después de cada estímulo (**I**) contra la tasa de disparo de neuronas que no se activaron después del primer estímulo (**D**). Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. **F y G)** Box plot que compara las amplitudes de las poblaciones **I** y **D** en valores Z. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75.

La estimulación en trenes de neuronas IT también produjo claras respuestas visibles en múltiples neuronas (Fig. 10B). En estas condiciones, se registraron 165 neuronas, y se realizó

una matriz de actividad poblacional (valores Z en código de color; Fig. 10C) evocada por la estimulación de neuronas IT en M2 con el protocolo de un tren de 5 pulsos explicado anteriormente. En este caso también observamos un importante reclutamiento de actividad excitatoria, sin embargo, a diferencia de la actividad evocada por las neuronas PT, observamos también una importante respuesta inhibitoria (Fig. 10C-D). Procedimos a calcular la tasa de disparo promedio de las neuronas que se activaron de manera excitatoria y con latencia corta a cada pulso de luz (Fig. 10D en medio, $n = 83$) y comparamos esta con la tasa de disparo de las neuronas que presentaron inhibición o latencias más largas (Fig. 10D en inferior, $n = 82$). Este análisis no reveló diferencias significativas entre ambas poblaciones (Fig. 10E; Kruskal-Wallis, $X^2 = 3.61$, $P = 0.0575$). Finalmente calculamos la amplitud promedio de respuesta expresada en valores Z para ambas poblaciones, I y D, y para cada estímulo del tren (Fig. 10F-G). Similar al caso de las neuronas PT, la población **I** también mostró diferencias significativas entre el primer estímulo del tren y los estímulos 4 y 5 (Fig. 10F; Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 28.47$, $P = 6.57189 \times 10^{-07}$).

Los resultados anteriores indican que las neuronas PT e IT presentan frecuencias de disparo similares (Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 1.35$, $P = 0.7166$). Sin embargo, es claro que a diferencia de las neuronas PT, las IT evocaron respuestas inhibitorias en la población. Para analizar formalmente las posibles diferencias entre los patrones de actividad evocada por la estimulación de cada subpoblación (PT e IT) aplicamos un método de clasificación basado en el análisis de componentes principales (PCA; Fig. 11A) de los histogramas obtenidos de los gráficos tipo ráster de las figuras 9 y 10 para toda la población de células registradas en los experimentos PT e IT. El análisis reveló 4 patrones de activación en M2 (Fig. 11B-C). Algunos patrones presentaron períodos claros de mayor actividad o silenciosos caracterizados por valores de z-score positivos y negativos, respectivamente. Todos los patrones se presentaron tanto al estimular PT o IT, pero con diferencias en la ocurrencia (Fig. 11C). El patrón de actividad tipo 1 corresponde a neuronas que no presentaron respuesta a la estimulación óptica (Fig. 11D), y las neuronas de los experimentos PT-ChR2 presentaron una mayor prevalencia de este patrón (Fig. 11C; 83.47%). Por otro lado, las neuronas de los experimentos IT-ChR2⁺ presentaron mayor prevalencia de los patrones 3 (32.72%) y 4 (34.54%) correspondientes respuestas inhibitorias y excitatorias, respectivamente (Fig. 11C y D). Estos resultados sugieren que la dinámica de la red evocada

por ambas subpoblaciones es diferente, como podría esperarse por diferentes niveles de conectividad recíproca con elementos del circuito cortical (Ueta et al., 2013).

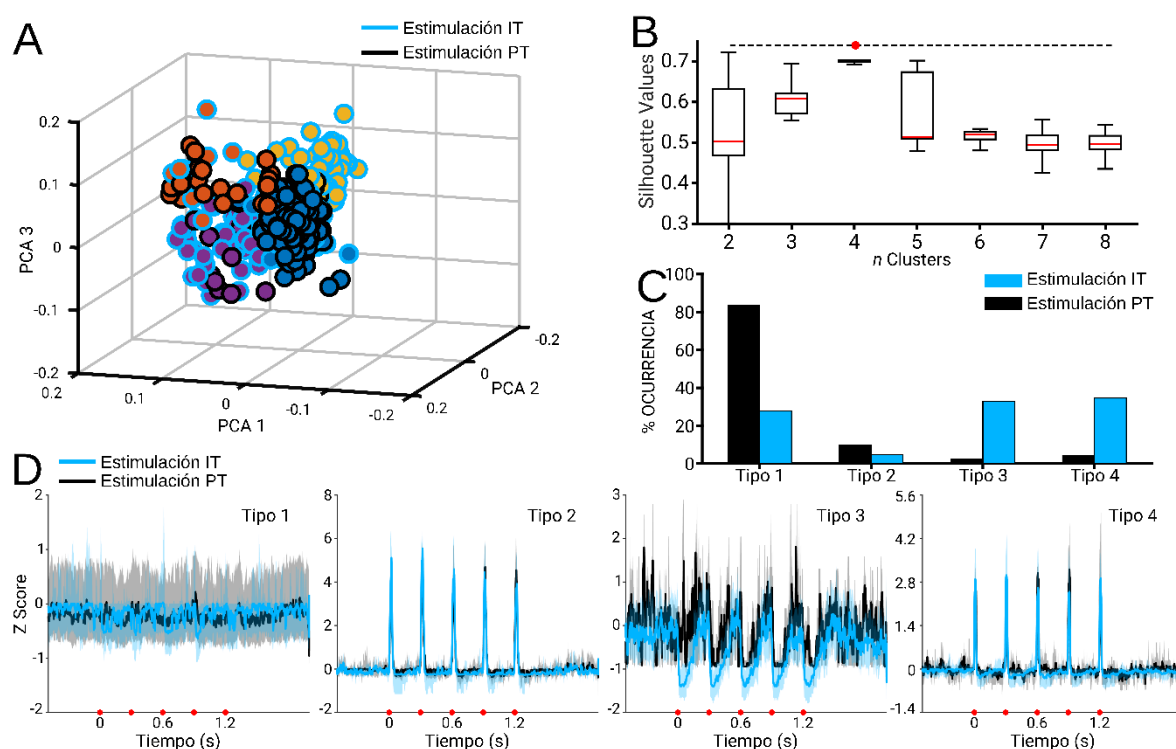


Figura 11. Patrones de respuestas evocadas en redes corticales tras estimulación de PT e IT. A) Se muestra la clasificación por PCA de los tipos de patrones existentes en la red cortical tras la influencia de PT e IT. **B)** Valores de Silhouette que muestran cual es el mejor cluster de la clasificación por PCA. **C)** Porcentaje de células que pertenecen a los patrones clasificados específicos de respuestas evocadas que se muestran en el PCA. **D)** Respuestas evocadas sensoriales promedio para células clasificadas como parte de patrones específicos en estimulación de PT (código negro para toda la figura) y estimulación de IT (código azul para toda la figura) registradas en la corteza motora secundaria. Las líneas sólidas y las áreas sombreadas representan la mediana y los percentiles 25 y 75, respectivamente.

7.5 Subpoblaciones corticales

Estudios previos han mostrado que el linaje neuronal de algunas poblaciones puede ser identificado a través del análisis de los componentes básicos de la forma de sus potenciales de acción registrados extracelularmente (Sirota et al., 2008; Peña-Rangel et al., 2021; Sun et al., 2021; Pimentel-Farfán et al., 2022). Por lo que, en un siguiente paso, nos preguntamos si las subpoblaciones de neuronas PT e IT identificadas por su latencia de respuesta a la estimulación óptica (latencias menores a 30 ms) podrían asociarse con la forma específica de sus potenciales de acción. Nuevamente utilizamos el método de clasificación basado en PCA

que se usa para identificar patrones evocados sensorialmente (Fig. 11), pero esta vez lo aplicamos a las formas de espigas promedio de unidades bien aisladas en la corteza M2.

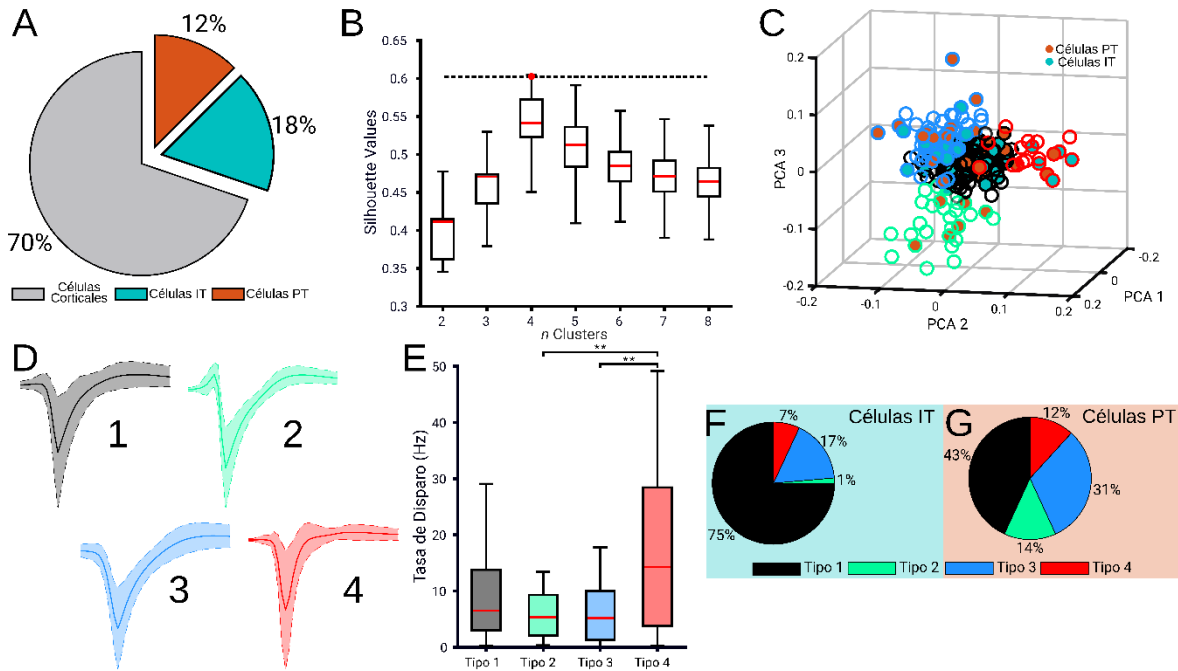


Figura 12. Actividad evocada en subpoblaciones de neuronas corticales. **A)** Gráfica pastel que muestra la proporción de neuronas corticales. **B)** Boxplot que compara Silhouette Values para determinar cuáles son los mejores clusters del PCA. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. Se muestra la cuarta forma de la espiga. **C)** Gráfica de Análisis de componentes principales que muestra las formas de las espigas con mayor varianza, que son 4 (contornos negro, verde, azul y rojo) y el relleno indica cuales de esas formas de potenciales de acción son propias de neuronas IT y PT (azul y naranja). **D)** Formas de potenciales de acción encontradas en los experimentos en corteza M2. **E)** Boxplot que compara tasas de disparo entre las formas de las espigas. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. **F)** Proporción de neuronas IT que presentan los 4 tipos de formas de espiga. **G)** Proporción de neuronas PT que presentan los 4 tipos de formas de espiga.

Del total de neuronas registradas en ambos tipos de experimentos, PT-ChR2 o IT-ChR2, las neuronas PT constituyeron un 12% y neuronas IT constituyeron un 18% (Fig. 12A). Al realizar la clasificación por análisis por PCA (Fig. 12C) y aplicar el análisis de Silhouette (Fig. 12B), se observó que la proyección más robusta era la que dividía las formas de las espigas en cuatro grupos (Fig. 12D). Al calcular las frecuencias de disparo promedio para cada grupo, se encontró que el grupo 4, caracterizado por espigas más delegadas (Fig. 12D), presentó las mayores frecuencias de disparo (Fig. 12E; Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 10.74$, $P = 0.0132$), por lo tanto, este grupo podría tratarse de interneuronas

de disparo rápido (Sirota et al., 2008). Finalmente, al analizar la incidencia de cada tipo de forma de espiga (Fig. 12D) en las poblaciones identificadas optogenéticamente como PT o IT, encontramos que la población de IT estaba principalmente constituida por neuronas con espigas tipo 1 (Fig. 12F). Por otro lado, las neuronas clasificadas optogenéticamente como PT tuvieron altas prevalencias de neuronas con espigas con formas tipo 1, 2 y 3 (Fig. 12G). En ambos casos, las proporciones más bajas fueron de las espigas tipo 4.

7.6 Respuestas poblacionales estriatales interestructurales evocadas diferencialmente por neuronas del tracto piramidal (PT) y neuronas intratelencefálicas (IT)

Lo siguiente que nos preguntamos fue si la estimulación en trenes de las neuronas PT e IT podría generar distintos patrones de actividad poblacional en el estriado dorsolateral. Por lo que obtuvimos la matriz de actividad poblacional estriatal evocada por la estimulación de ambas poblaciones (PT, Fig. 13A, IT Fig. 13D). En los experimentos PT→DLS se lograron registrar 331 neuronas, mientras que en los IT→DLS se registraron 280 unidades. En este caso para ambos experimentos, la estimulación de neuronas corticales únicamente evocó respuestas robustas de corta latencia, sin presencia de actividad inhibitoria. En el caso de las PT→DLS se observaron 67 neuronas que incrementaron su frecuencia de disparo ante cada estímulo del tren, mientras que en el caso de los experimentos IT→DLS fueron 132. Después analizamos las frecuencias de disparo de las neuronas responsivas (población I) y las comparamos con las no responsivas (población D). Esta comparación no produjo diferencias significativas (PT→DLS, Fig. 13B; IT→DLS, Fig. 13E). Finalmente, calculamos la amplitud de las respuestas ante cada estímulo del tren y encontramos que la estimulación de las neuronas PT produjo una clara adaptación de corto plazo en las respuestas estriatales, conforme avanzaban los estímulos del tren (Fig. 13C; Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 65.9$, $P = 1.65878 \times 10^{-13}$). Interesantemente, en el caso de la estimulación de neuronas IT, está no produjo un efecto de adaptación o facilitación (Fig. 13F; Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 2.7$, $P = 0.6097$), sugiriendo una diferencia entre los mecanismos de plasticidad de corto plazo cortico-estriatal evocados por la estimulación de estas vías.

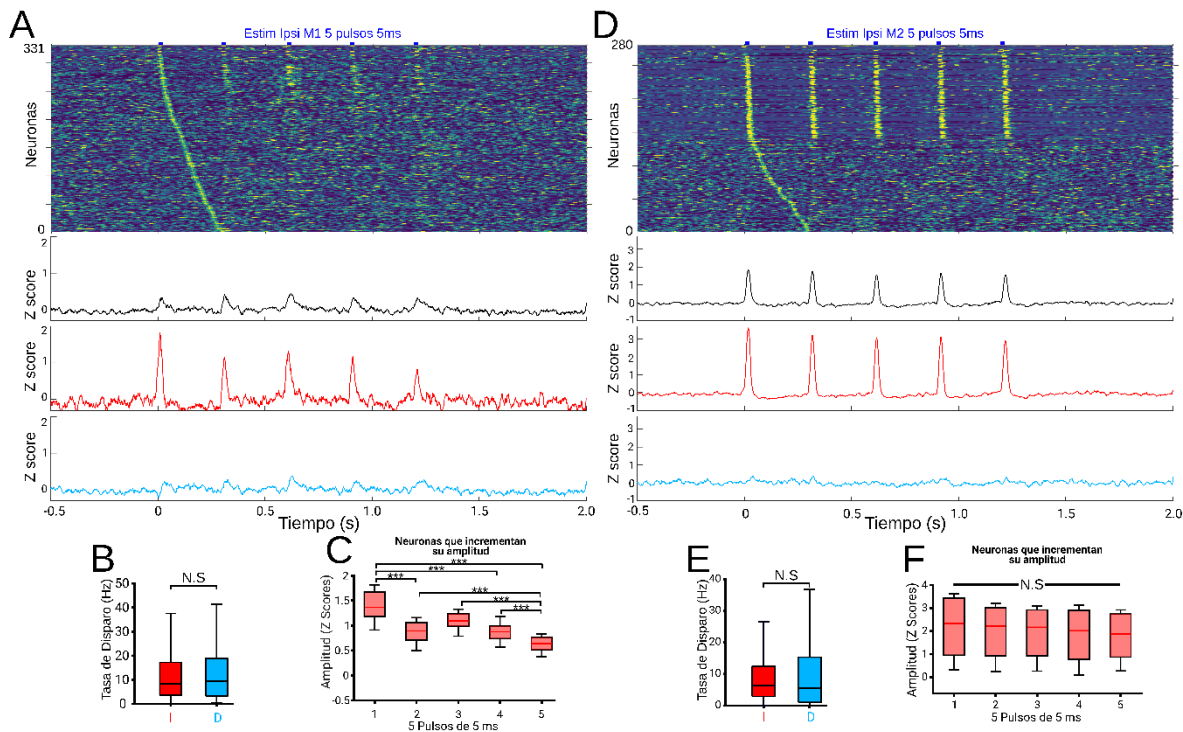


Figura 13. Respuesta poblacional estriatal evocada por neuronas PT e IT. A y D) Matriz poblacional que muestra la tasa de disparo promedio evocada por la estimulación de neuronas PT (en A) en la corteza M1 o neuronas IT (en F) en la corteza M2 ipsilateral al sitio de registro para las neuronas registradas en el DLS expresados como valores Z (código de color) y ordenadas según la tasa de disparo promedio máxima alcanzada durante trenes de estimulación de 5 ms. Los trenes de estimulación se indican con un punto horizontal azul, en la parte superior, alineado a cero y cada 300 ms. Debajo se muestran 3 histogramas de tasa de disparo promedio de todas las células (gráfica superior, en negro), de las neuronas que se activaron en secuencia alineados a los estímulos (gráfica de en medio, en rojo) y las neuronas que no se activaron después del estímulo (gráfica inferior, en azul). B y E) Box plot que compara las tasas de disparo de las poblaciones neuronales que se activaron después de cada estímulo (I) contra la tasa de disparo de neuronas que se activaron en secuencia después del primer estímulo (D). Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. C y F) Box plot que compara las amplitudes de las poblaciones I y D en valores Z. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75.

Después analizamos las diferencias entre los patrones de actividad evocada por la estimulación de cada subpoblación (PT e IT) sobre el DLS y aplicamos un método de clasificación basado en PCA, como se describió en la figura 11, de los histogramas obtenidos de los gráficos tipo ráster de la figura 13 para toda la población de células registradas en los experimentos PT e IT. El análisis reveló 2 patrones de activación en el DLS para los experimentos de estimulación de neuronas IT en M2 y para los experimentos de estimulación de PT en M1 (Fig. 14A-B).

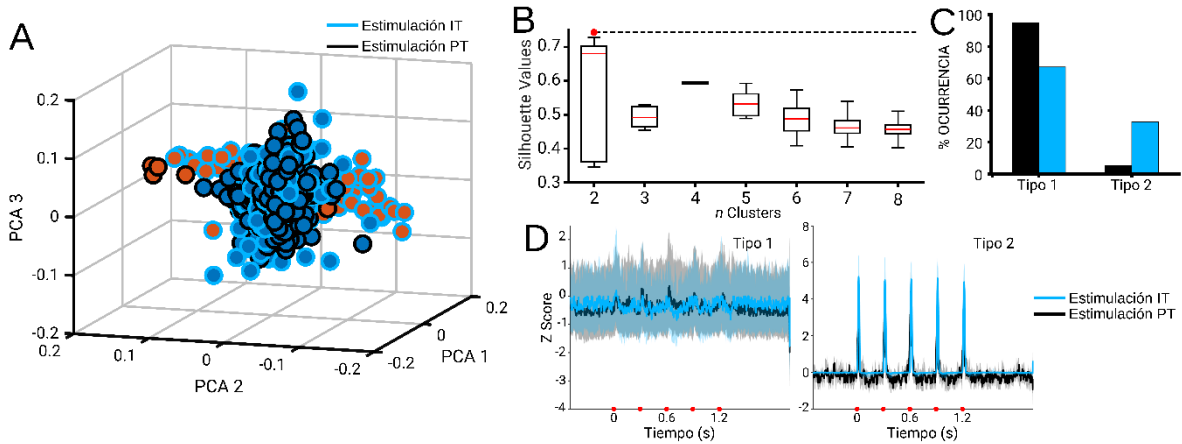


Figura 14. Patrones de respuestas evocadas en redes estriatales tras estimulación de PT e IT. A) Se muestra la clasificación por PCA de los tipos de patrones existentes en la red cortical tras la influencia de PT e IT. B) Valores de Silhouette que muestran cual es el mejor cluster de la clasificación por PCA. C) Porcentaje de células que pertenecen a los patrones clasificados específicos de respuestas evocadas que se muestran en el PCA. D) Respuestas evocadas sensoriales promedio para células clasificadas como parte de patrones específicos en estimulación de PT en M1 (código negro para toda la figura) y estimulación de IT en M2 (código azul para toda la figura) registradas en el DLS. Las líneas sólidas y las áreas sombreadas representan la mediana y los percentiles 25 y 75, respectivamente.

Los patrones presentaron períodos de mayor actividad o silenciosos caracterizados por valores de z-score positivos y negativos, respectivamente. Todos los patrones se presentaron tanto al estimular PT o estimular IT, pero con diferencias en la ocurrencia (Fig. 14C). El patrón de actividad tipo 1 corresponde a neuronas que no presentaron respuesta a la estimulación óptica (Fig. 14D), y las neuronas de los experimentos PT-ChR2→DLS presentaron una mayor prevalencia de este patrón (94.86%; Fig. 14C). Por otro lado, las neuronas de los experimentos IT-ChR2⁺→DLS presentaron mayor prevalencia del patrón de actividad tipo 2 (32.85%) correspondientes respuestas excitatorias, (Fig. 14C y D). Estos resultados demuestran que en condiciones de animal anestesiado la dinámica de la red estriatal evocada por la estimulación de ambas subpoblaciones corticales es diferente y que la dinámica de la red no es similar a la dinámica evocada en la corteza.

7.7 Subpoblaciones estriatales

Finalmente, realizamos un análisis por PCA (Fig. 14A) para identificar subpoblaciones celulares de acuerdo con la forma de las espigas. De acuerdo con lo reportado en un trabajo anterior (Pimentel-Farfán et al., 2022), el análisis de Silhouette encontró que la mejor proyección dividió a la población en 3 formas de espigas (Fig. 14 B, C; Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 2373.69$, $P < 0.001$).

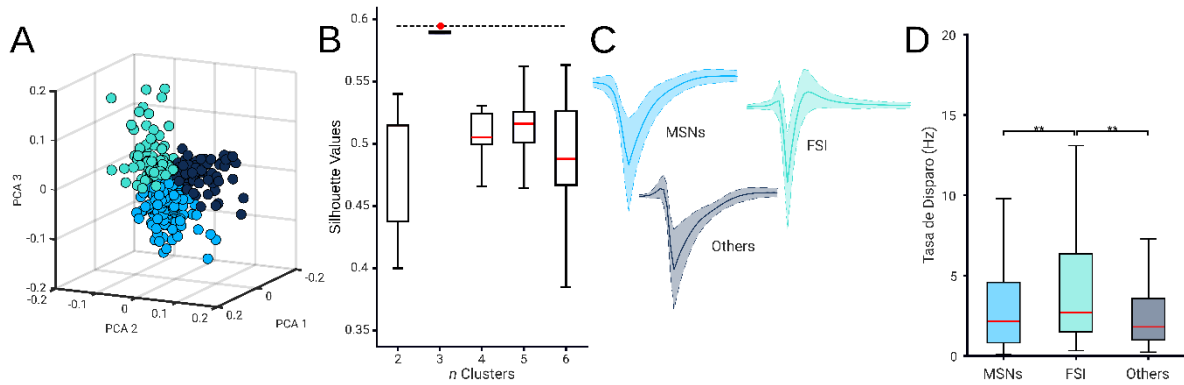


Figura 15. Respuesta poblacional estriatal evocada por neuronas PT. **A)** Gráfica de Análisis de componentes principales que muestra las formas de las espigas con mayor varianza. **B)** Boxplot que compara Silhouette Values para determinar los mejores clusters del PCA. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75. **C)** Formas de potenciales de acción encontradas en los experimentos en estriado dorsolateral. **D)** Boxplot que compara tasas de disparo entre las formas de las espigas. Las gráficas de barras indican la mediana y los percentiles 25 y 75.

También evaluamos su tasa de disparo y efectivamente encontramos que el grupo de neuronas con espigas más delgadas, potencialmente interneuronas de disparo rápido (FSIs, por sus siglas en inglés, *Fast-Spiking Interneurons*), presentaron las más altas frecuencias de disparo (Fig. 14 D), cuando se comparó con las potenciales neuronas espinosas medianas (MSNs, por sus siglas en inglés, *Medium-Spiny Neurons*) y las neuronas clasificadas como Others (Kruskal-Wallis y post hoc Tukey-Kramer, $X^2 = 12.27$, $P = 0.0022$). Finalmente, encontramos que el porcentaje de neuronas estriatales moduladas por neuronas PT fue del 10% para las neuronas MSNs, 3.2% son neuronas FSIs y 4% para neuronas clasificadas como Others. Esto contrasta con lo que se reportó sobre las neuronas estriatales moduladas por las neuronas IT, en donde 14% correspondía a neuronas MSNs, el 27% de neuronas FSIs, y el 9% a neuronas clasificadas como Others (Pimentel-Farfán et al., 2022). Estos datos sugieren que los efectos diferenciales en la dinámica neuronal estriatal evocada por la estimulación de neuronas PT e IT, podría deberse a una inervación diferencial a distintos elementos del microcircuito estriatal.

8 Discusión

Un objetivo clave del presente estudio fue determinar el núcleo ideal para la estrategia de infección viral para la expresión de ChR2-EYFP en neuronas PT cortico-estriatales. Esto nos ayudaría a realizar manipulaciones optogenéticas selectivas y así obtener registros electrofisiológicos. Por lo que, el uso del trazador FG confirmó anatómicamente que hacer

trazados retrógrados en el tálamo VL, nos mostraría una capa discreta profunda de la corteza relacionada a regiones motoras (probablemente la capa 5, encontrada entre M2/M1), pues ya se ha descrito que el núcleo del tálamo VL, es una de las principales áreas talámicas motoras que tienen una gran cantidad de conexiones recíprocas a la corteza motora (Jeljeli et al., 2003). Por otro lado, el trazado retrógrado en núcleo del VPL mostró una capa superior y una inferior, denotando las importantes conexiones recíprocas a la corteza sensorial (probablemente la capa superior es la capa 4, encontrada entre M1/S1) mencionando además que ya se ha descrito la respuesta de células del VPL que responden principalmente a entradas somatosensoriales, nociceptivas y viscerales (Al-Chaer et al., 1996, Bornschlegl & Asanuma, 1987).

Con lo anteriormente descrito, logramos obtener una idea del mejor sitio para realizar inyecciones en el tálamo en regiones relacionadas con las cortezas motoras y además una idea de cómo se verían inyecciones en las que el virus pudiera difundirse a regiones sensoriales. La Figura 5, muestra una comparación histológica entre las neuronas PT y las neuronas IT, y observamos que las neuronas IT que expresan ChR2⁺-EYFP emiten fluorescencia bilateralmente en la corteza y en el DLS, mientras que las neuronas PT que expresan ChR2⁺-EYFP emiten fluorescencia ipsilateralmente a su sitio de infección en la corteza y en el DLS, y en regiones talámicas, solo podemos observar fluorescencia de los experimentos de neuronas PT y no de los experimentos de neuronas IT. En los registros electrofisiológicos de la figura 6, manipulamos a las neuronas PT y caracterizamos grupos de neuronas con latencia corta que incrementan su actividad y neuronas de latencia larga que decrementan su actividad ante el estímulo lumínico de 500 ms. Estos valores de latencia fueron clave para decidir que, a una latencia menor a 30 ms, podremos detectar neuronas que responden inmediatamente a la luz y así determinar dentro de las redes corticales qué neuronas son propiamente PT (Sirota et al., 2008) o IT cuando analizamos los experimentos. Sin embargo, la manipulación de las neuronas PT para evocar respuestas en las neuronas estriatales involucró un particular desafío debido a la variabilidad de la expresión de la ChR2⁺ sobre las neuronas PT mostrada en la figura 7A-B. Por lo tanto, realizamos un mapeo histológico que evidenciase la localización de mayor abundancia de las neuronas PT (mostrada en la Fig. 7C y en anexos). Al realizar los siguientes experimentos con las coordenadas obtenidas después del análisis histológico, finalmente observamos la dinámica

poblacional estriatal modulada por neuronas PT. Cabe resaltar que la coordenada lateral donde se localizaron la mayoría de las neuronas PT corresponde a la región M1 de la corteza. Esto está de acuerdo con estudios de neuronas corticoespinales y su mayor presencia en regiones M1 de la corteza (Nelson et al., 2021).

Determinar los efectos de la estimulación de las neuronas PT en la actividad de redes neuronales corticales y estriatales es parte esencial del objetivo principal, por lo que realizamos un experimento que involucró trenes de estimulación óptica sobre neuronas PT y analizamos las respuestas poblacionales directamente en la corteza estimulada (Fig. 9). También tomamos los experimentos de trenes de estimulación sobre IT realizados por Dra. Ana Karen Pimentel Farfán, y realizamos los análisis correspondientes (Fig. 10). Lo más relevante es que en la red cortical, tanto en la estimulación selectiva de neuronas PT o IT, encontramos mecanismos de plasticidad, depresión de corto plazo. También encontramos que, en la corteza las neuronas IT reclutan una gran cantidad de actividad inhibitoria (Pimentel-Farfán et al., 2022), a diferencia de las neuronas PT que solo presentaron actividad excitatoria. En nuestros experimentos de estimulación selectiva también se expone que hay mayor reclutamiento de neuronas IT que de PT, y esto concuerda con reportes que muestran que las neuronas IT son más excitables que las neuronas PT (Gee et al., 2012) y se refuerza aún más cuando observamos que al clasificar los experimentos de las neuronas PT e IT por la forma de su tren de estimulación en la corteza M2, encontramos formas del tren de estimulación que muestran un componente inhibitorio y uno excitatorio (patrón tipo 3 y patrón tipo 4, respectivamente, Fig. 11C) y son presentadas en mayor porcentaje durante la estimulación de neuronas IT, mientras que hay otros grupos que mayoritariamente, no responden a la estimulación y correlaciona con un porcentaje mayor de neuronas PT (patrón tipo 1, Fig. 11C).

Con el objetivo de determinar si las neuronas corticales PT e IT podrían diferenciarse por la forma de su potencial de acción, aplicamos un método de reducción dimensional llamado Análisis de Componentes Principales (PCA) a la forma promedio del potencial de acción de cada neurona. Encontramos 4 subtipos neuronales en la corteza, que correlacionamos con latencias menores a 30 ms para saber cuáles pertenecían a neuronas PT o IT. Encontramos un tipo de forma de espiga, que se presenta con dominancia sobre las neuronas PT e IT, el

cual es llamado Tipo 1 (Fig. 12C). Quizá no haya diferencias entre las neuronas PT e IT debido a que ambas poblaciones neuronales son piramidales (Reiner, 2010). En este sentido, nuestra conclusión es que no es posible diferenciar a las neuronas PT e IT mediante el análisis de la forma del potencial de acción.

Evaluar la dinámica de las redes estriatales evocada por la activación selectiva de las neuronas PT e IT es fundamental en este estudio, por lo que realizamos la misma estrategia de los análisis corticales, pero en el estriado. El hallazgo más dominante es que en el estriado se conserva el mismo mecanismo de plasticidad mediante la estimulación de las neuronas PT, mostrándose una depresión sináptica de corto plazo. Pero no sucede lo mismo con la red estriatal bajo la estimulación de las neuronas IT, pues no se presenta ningún tipo de plasticidad. Observamos una dinámica similar en la red estriatal evocada por neuronas PT, pero no observamos el mismo componente inhibitorio en las matrices poblacionales de la tasa de disparo promedio en el DLS evocado por neuronas IT. Quizá la similitud de la dinámica de las redes estriatales y corticales evocada por la estimulación de PT se deba a la propiedad intrínseca de la conectividad de las neuronas PT en la corteza, que solo conectan entre ellas mismas y a otros núcleos, pero no hacia otras células corticales de proyección (Morishima, 2006), funcionando como un motivo conservado de conectividad, que se replica en el estriado. En cuando al número de neuronas estriatales reclutadas por la estimulación cortical, observamos que las neuronas IT reclutaron más neuronas estriatales que las neuronas PT. Probablemente esto se deba a la abundante arborización hacia el estriado que tienen las IT, cuyo radio de arborización es mayor a 1000 μm mientras que el radio de arborización de las neuronas PT es entre 100-500 μm (Shepherd & Grillner, 2010).

Finalmente, parte de la caracterización de la dinámica de la red estriatal influida por la estimulación selectiva de PT e IT, depende del grupo neuronal al que modulan. Por lo que para evaluar a qué subgrupo de neuronas modulan directamente las neuronas PT en el estriado, realizamos una clasificación por medio de PCA de la forma de las espigas estriatales, y consistente con reportes previos (Peña-Rangel et al., 2021; Pimentel-Farfán et al., 2022), encontramos que las neuronas podían agruparse en 3 clústeres correspondientes a MSNs, FSI y Others. Obtuvimos los porcentajes de células en el estriado que son moduladas por PT, y observamos que las neuronas PT modulan aproximadamente al 17% de las

neuronas estriatales en animal anestesiado, y que la mayoría de las neuronas moduladas por PT fueron MSNs putativas (aproximadamente el 58.82%) a diferencia de los reportado por Pimentel-Farfán en el 2022, que demostró que el 50% de neuronas estriatales fueron moduladas por IT en registros en animal en libre movimiento, y la mayoría (aproximadamente el 60%) fueron interneuronas de disparo rápido (FSIs putativas).

9 Conclusión

Desarrollamos una estrategia para la manipulación selectiva por medio de optogenética de las neuronas corticoestriatales del tracto piramidal, que implica la combinación de 2 virus de tipo retrogrado en núcleos blancos (el DLS y el Tálamo VL) donde proyectan las neuronas del tracto piramidal.

En corteza M2, encontramos que las neuronas PT son menos excitables que las neuronas IT, y que, a diferencia de las neuronas IT, las neuronas PT no generan patrones de inhibición.

Encontramos evidencia de plasticidad de corto plazo, en particular, a nivel cortical encontramos que la estimulación en forma de trenes de ambas poblaciones, PT e IT, generó depresión de corto plazo.

Mediante la forma de la respuesta poblacional cortical, encontramos que la estimulación de las IT generó un importante componente inhibitorio, mientras que la estimulación de las neuronas PT, no.

Caracterizamos a las neuronas corticales por la forma de su espiga, y encontramos que las neuronas PT e IT comparten mayoritariamente el mismo tipo de espiga (tipo 1), por lo que no es posible diferenciarlas mediante esta metodología.

A nivel de la respuesta poblacional en el estriado dorsolateral, la estimulación en tren de las neuronas PT género respuestas con depresión de corto plazo, mientras que la estimulación de las neuronas IT generó respuestas robustas a todos los estímulos del tren, sin evidencia de adaptación o facilitación de corto plazo.

Finalmente, encontramos que la manipulación selectiva de las neuronas PT modula aproximadamente el 17% de neuronas estriatales y de estas, la mayor proporción correspondería a neuronas espinosas medianas (aproximadamente el 58.82%). En contraste,

lo reportado por Pimentel-Farfán en el 2022 indica que las neuronas IT modulan aproximadamente el 50% de las neuronas estriatales y de estas la mayor proporción (aproximadamente el 60%) correspondería a interneuronas putativas de disparo rápido.

En conjunto, nuestros resultados demuestran claras diferencias en la dinámica poblacional estriatal evocada por la estimulación de las neuronas PT e IT, estas diferencias podrían explicarse por una inervación diferencial hacia distintos elementos del circuito estriatal. También sugieren que el papel que podrían jugar las neuronas PT e IT a nivel conductual sería distinto, una posibilidad que exploraremos en futuras investigaciones.

10 Anexos

Mapeo de estimulación de neuronas del tracto piramidal a lo largo de 4mm hasta 1.5 mm AP respecto a Bregma. Las siguientes imágenes muestran fluorescencia del reportero EYFP que surge de la correcta expresión de ChR2 en las neuronas PT. Son cortes coronales de 9 ratas Long Evans que fueron infectadas con la estrategia de combinación viral descrita en Métodos.

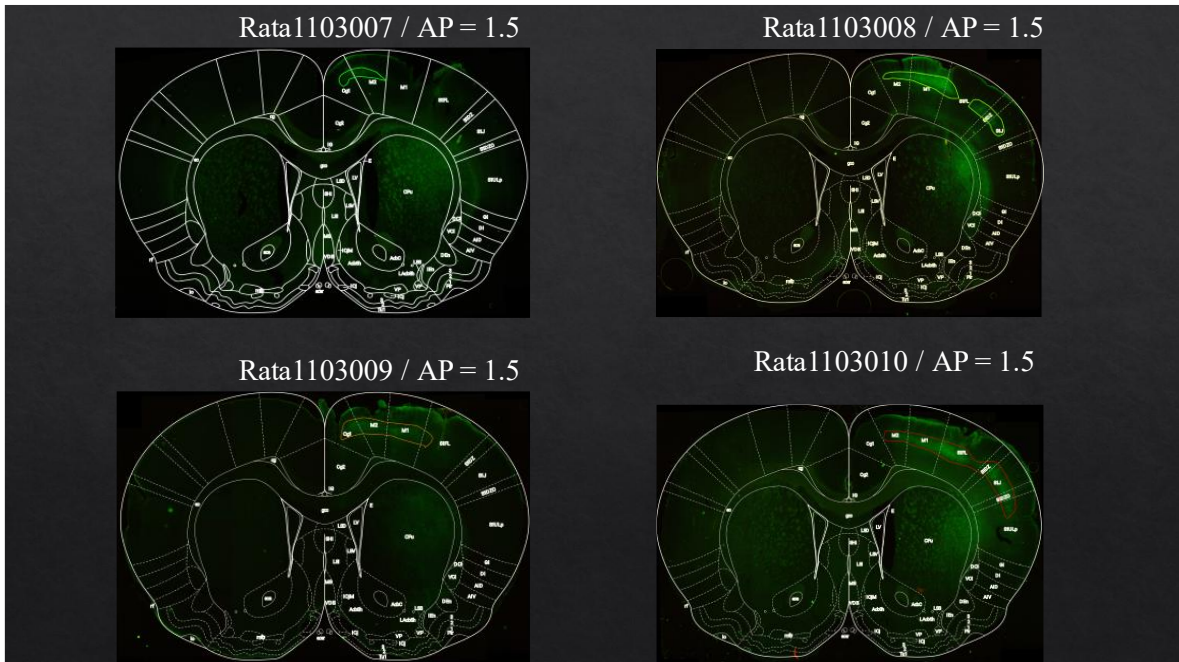


Figura 17 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 1.5 mm respecto a Bregma. Se muestran 4 Ratas: Rata1103007, Rata1103008, Rata1103009, Rata1103010.

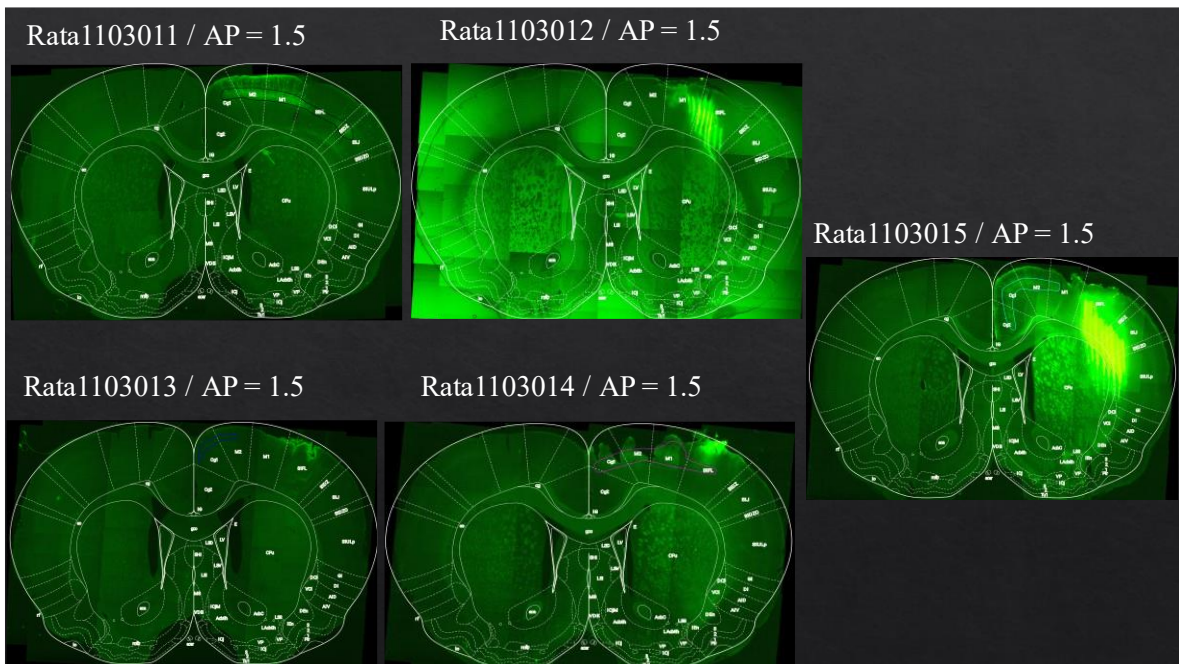


Figura 16 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 1.5 mm respecto a Bregma. Se muestran 5 Ratas: Rata1103011, Rata1103012, Rata1103013, Rata1103014, Rata1103015.

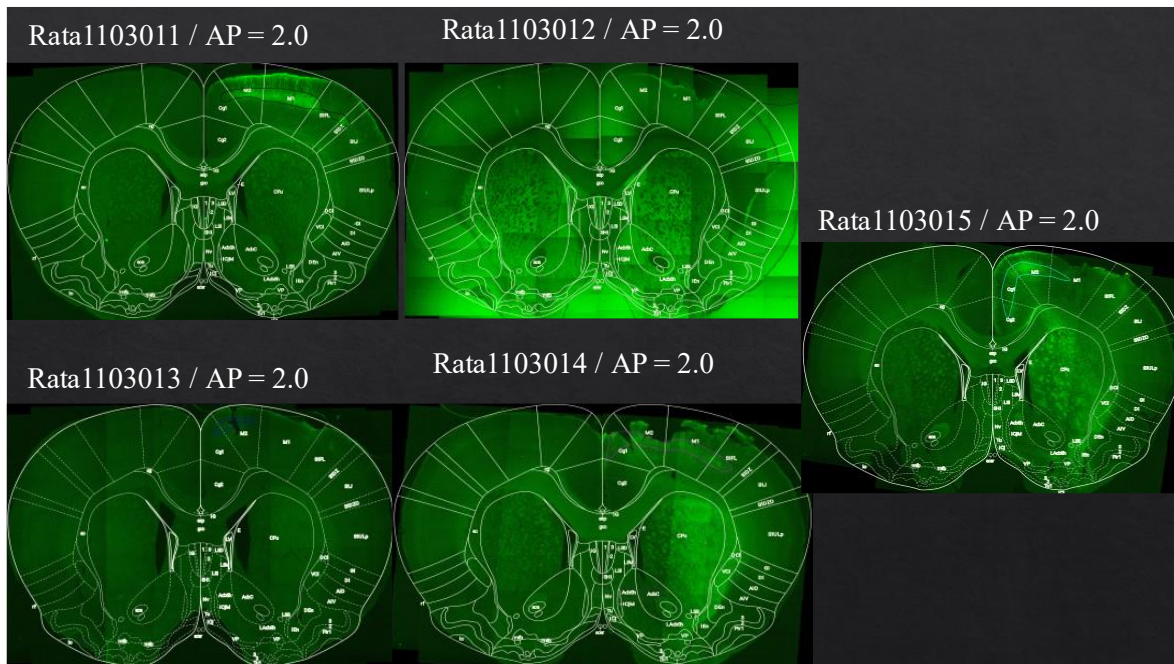


Figura 20 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 2.0 mm respecto a Bregma. Se muestran 5 Ratas: Rata1103011, Rata1103012, Rata1103013, Rata1103014, Rata1103015.

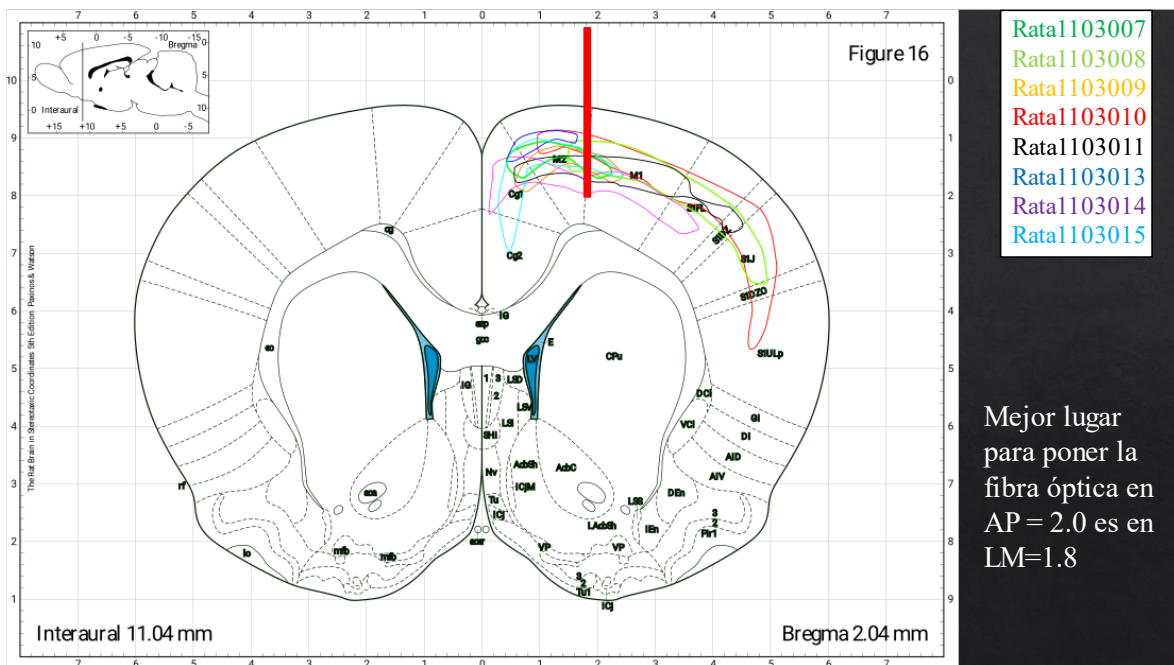


Figura 21 Complementaria. Localización de la mejor coordenada lateromedial (LM = 1.8) de la densidad de neuronas PT en la coordenada AP = 2.0 respecto a Bregma. Este es un mapa en el que hicimos coincidir expresión de EYFP de las 8 ratas anteriores (La Rata1103012 no tuvo ninguna expresión, por eso no se muestra en el diagrama) para encontrar donde era más probable encontrar neuronas PT.

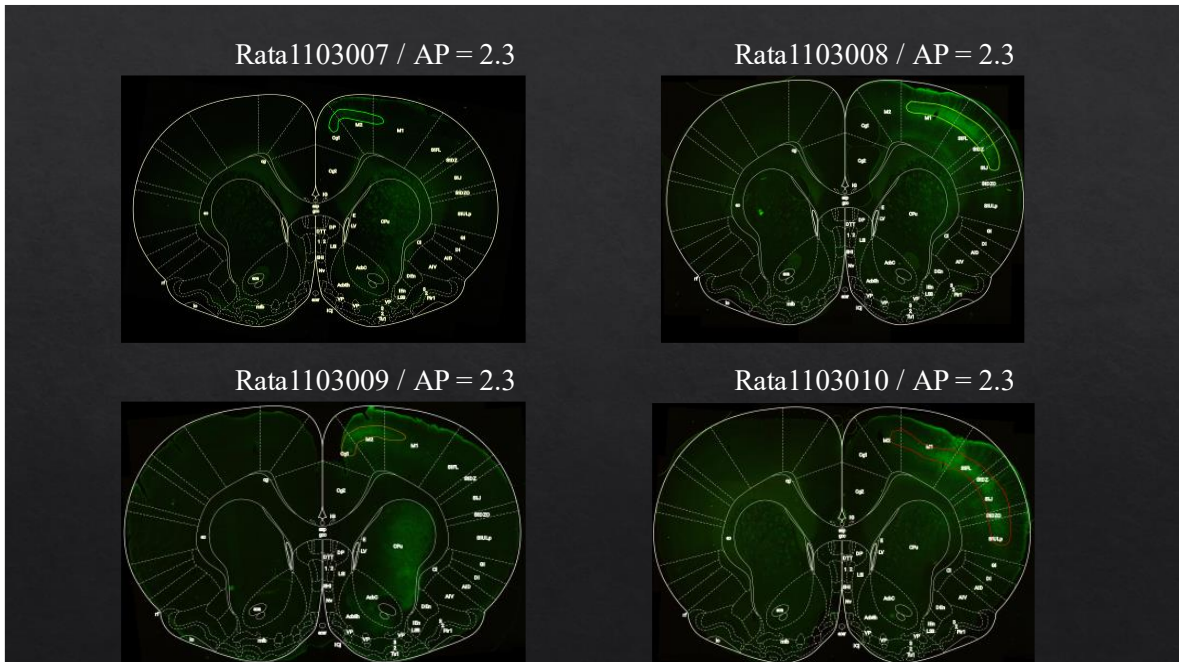


Figura 22 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 2.3 mm respecto a Bregma. Se muestran 4 Ratas: Rata1103007, Rata1103008, Rata1103009, Rata1103010.

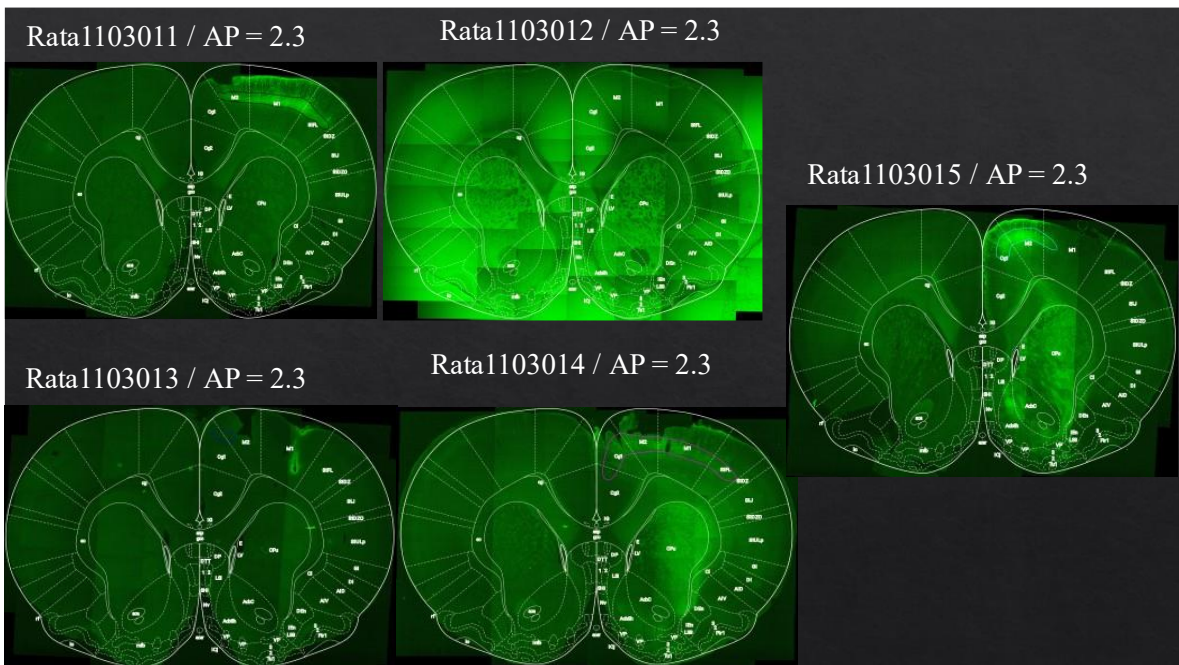


Figura 23 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 2.3 mm respecto a Bregma. Se muestran 5 Ratas: Rata1103011, Rata1103012, Rata1103013, Rata1103014, Rata1103015.

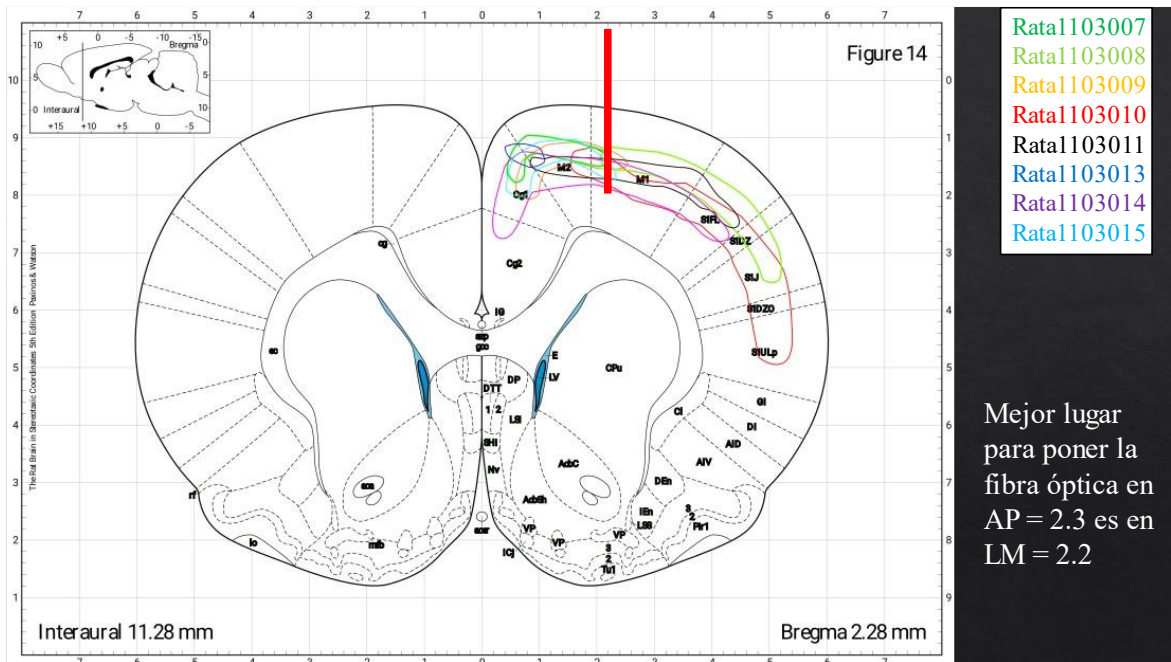


Figura 24 Complementaria. Localización de la mejor coordenada lateromedial (LM = 2.2) de la densidad de neuronas PT en la coordenada AP = 2.3 respecto a Bregma. Este es un mapa en el que hicimos coincidir expresión de EYFP de las 8 ratas anteriores (La Rata1103012 no tuvo ninguna expresión, por eso no se muestra en el diagrama) para encontrar donde era más probable encontrar neuronas PT.

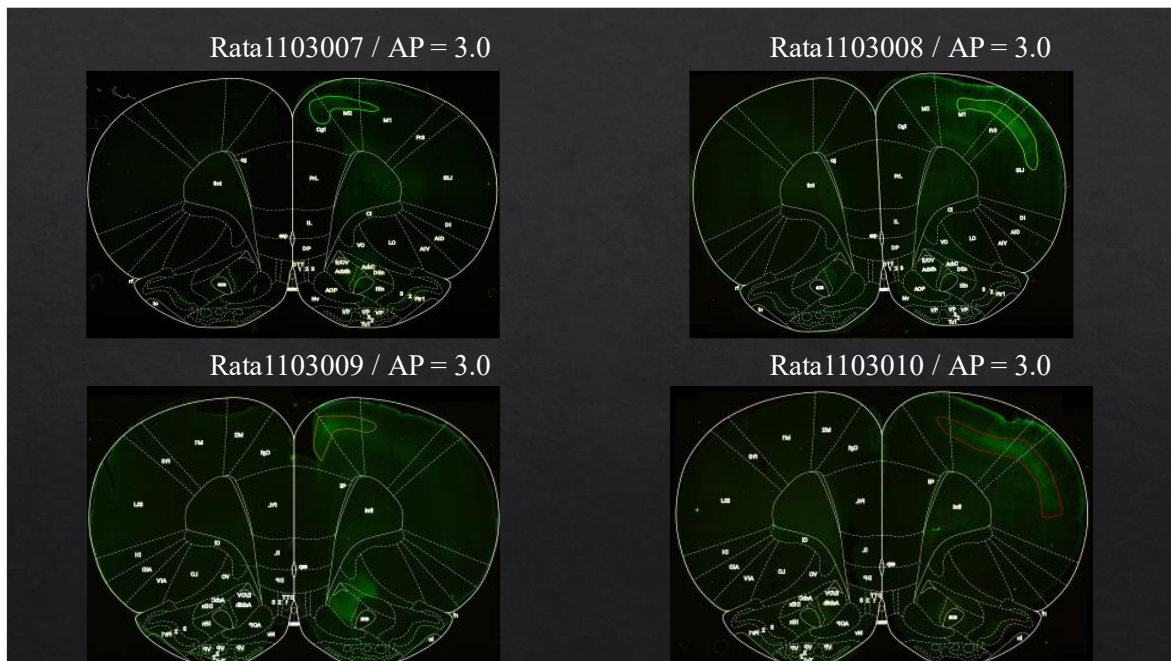


Figura 25 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 3.0 mm respecto a Bregma. Se muestran 4 Ratitas: Rata1103007, Rata1103008, Rata1103009, Rata1103010.

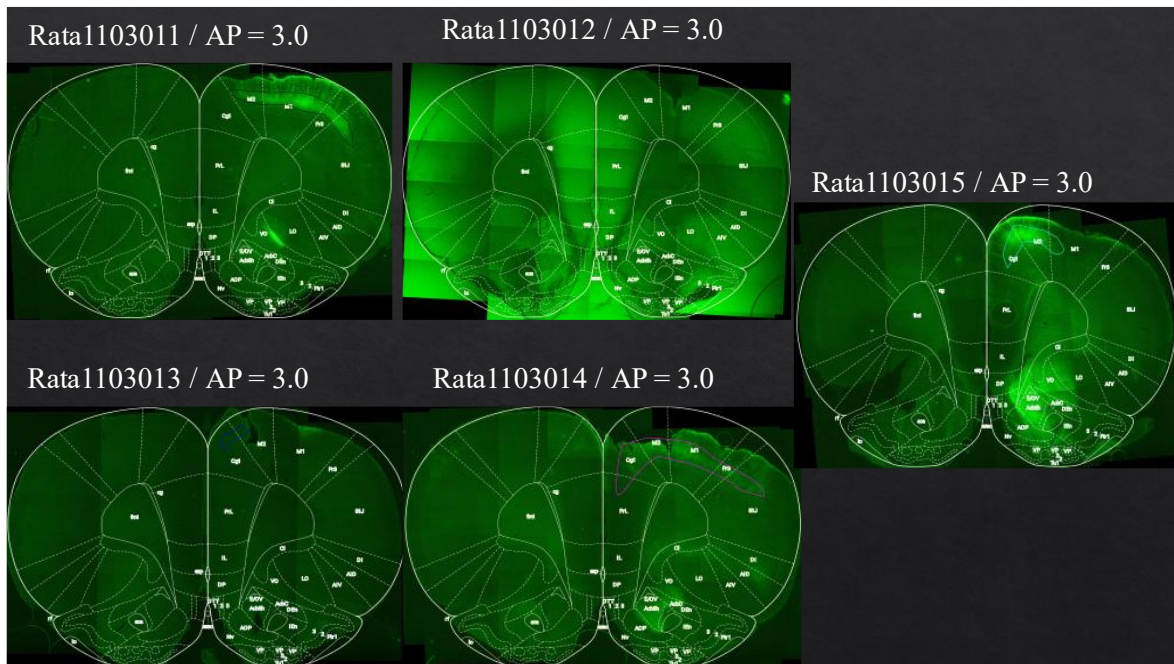


Figura 26 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 3.0 mm respecto a Bregma. Se muestran 5 Ratas: Rata1103011, Rata1103012, Rata1103013, Rata1103014, Rata1103015.

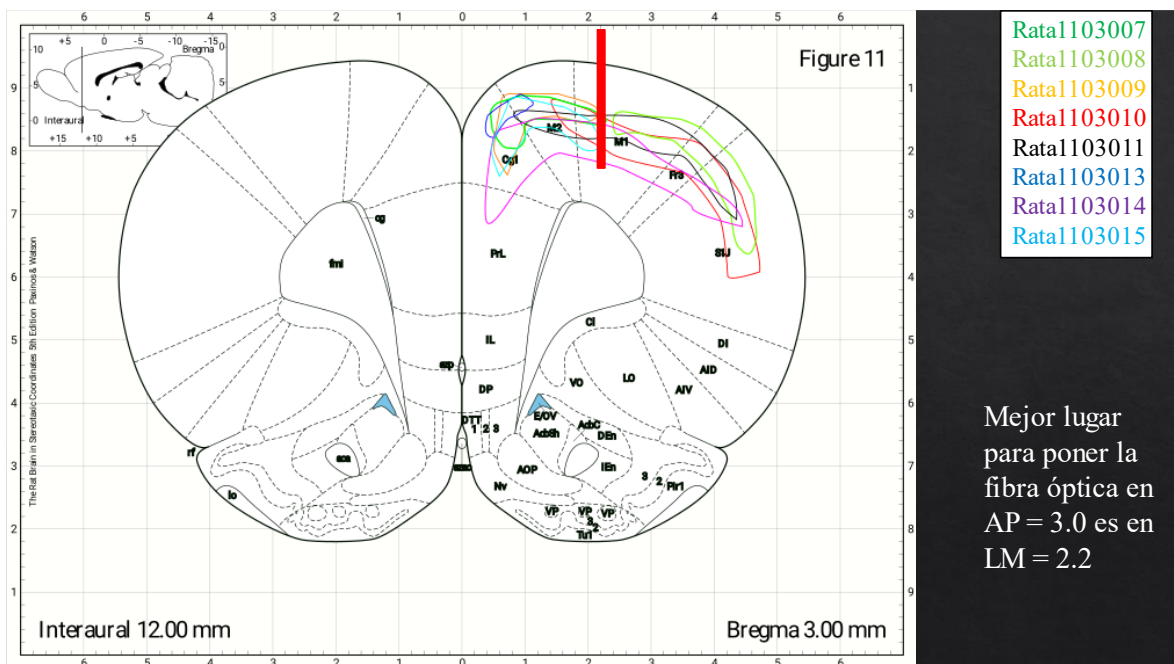


Figura 27 Complementaria. Localización de la mejor coordenada lateromedial (LM = 2.2) de la densidad de neuronas PT en la coordenada AP = 3.0 respecto a Bregma. Este es un mapa en el que hicimos coincidir expresión de EYFP de las 8 ratas anteriores (La Rata1103012 no tuvo ninguna expresión, por eso no se muestra en el diagrama) para encontrar donde era más probable encontrar neuronas PT.

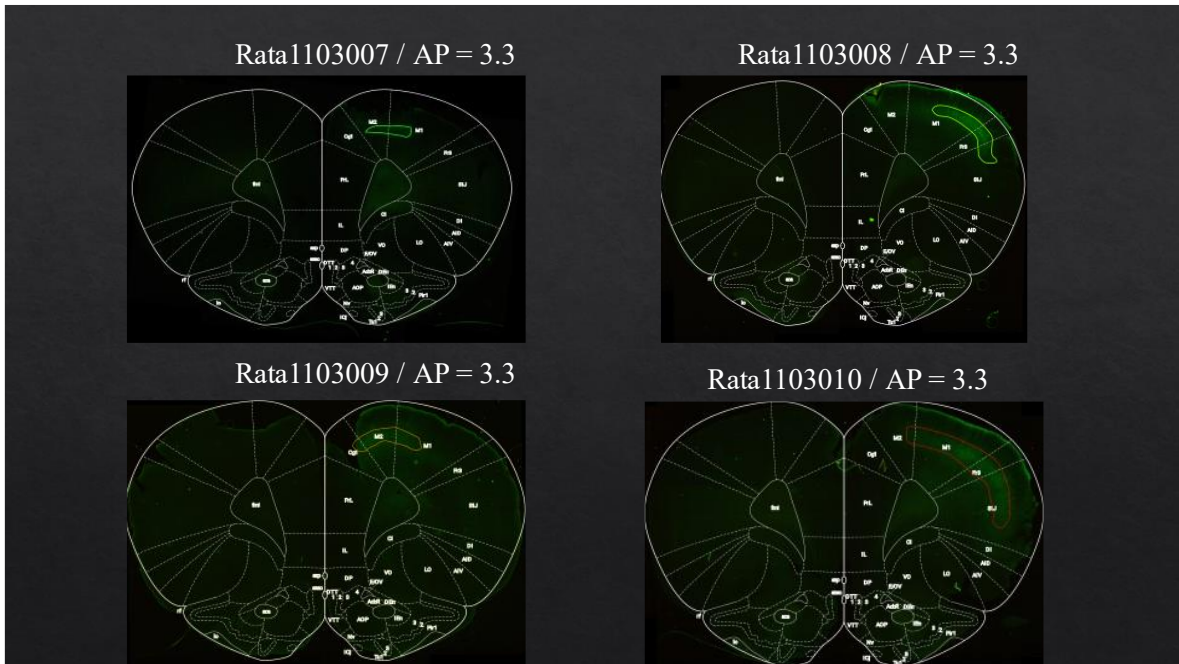


Figura 28 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 3.3 mm respecto a Bregma. Se muestran 4 Ratas: Rata1103007, Rata1103008, Rata1103009, Rata1103010.

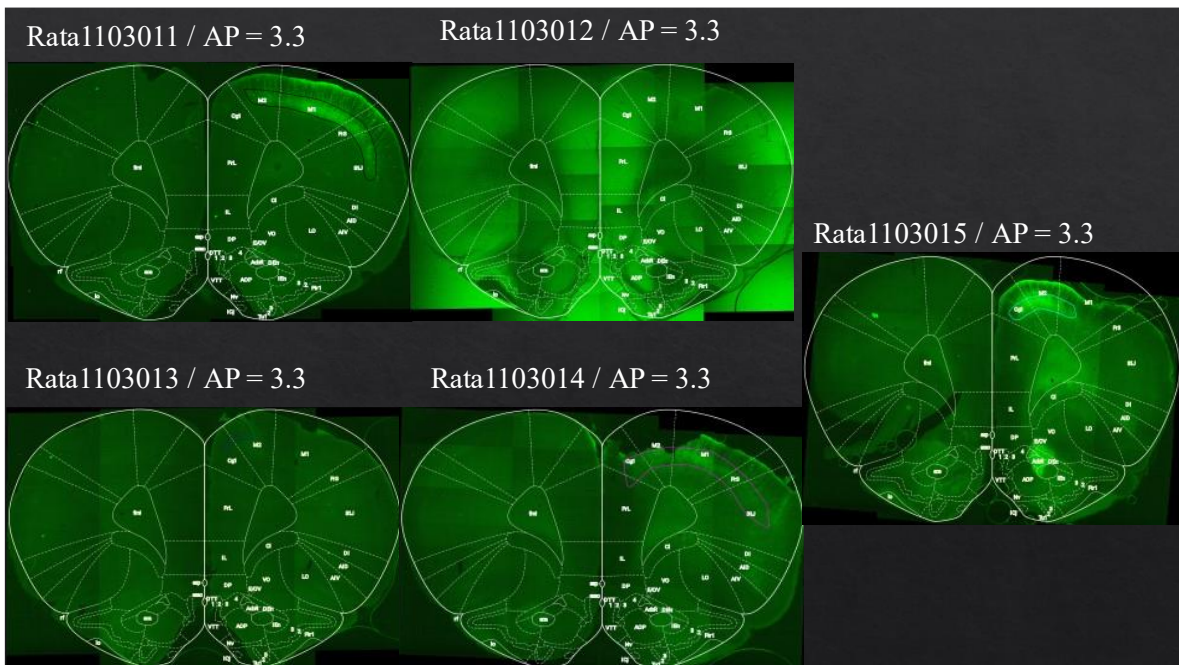


Figura 29 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 3.3 mm respecto a Bregma. Se muestran 5 Ratas: Rata1103011, Rata1103012, Rata1103013, Rata1103014, Rata1103015.

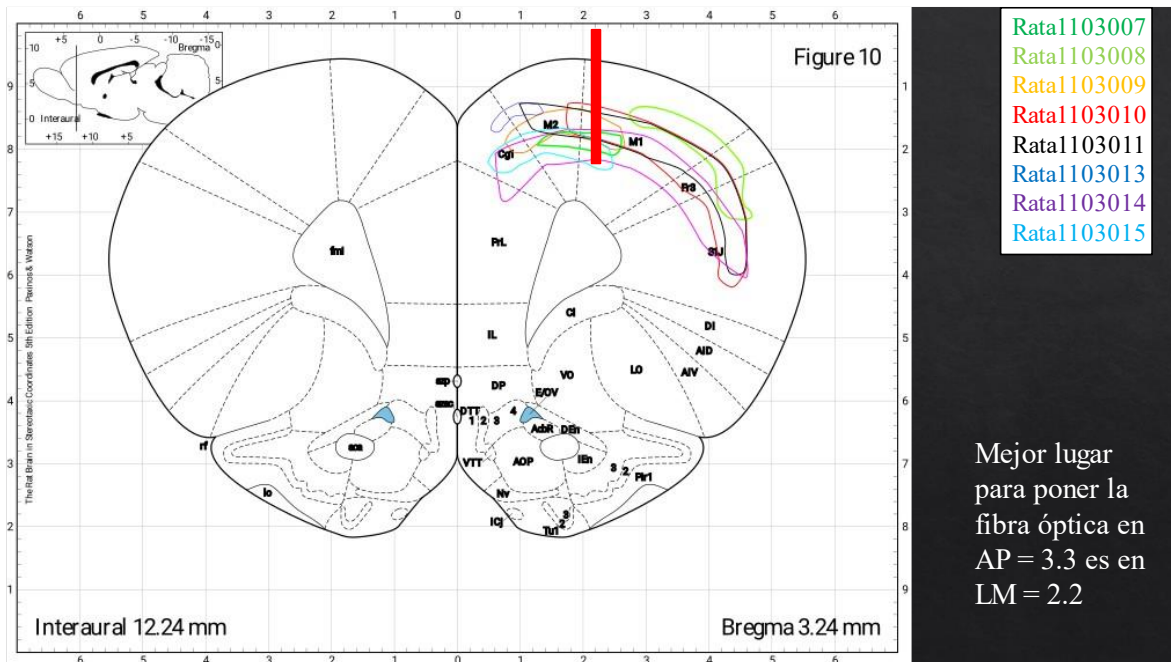


Figura 30 Complementaria. Localización de la mejor coordenada lateromedial (LM = 2.2) de la densidad de neuronas PT en la coordenada AP = 3.3 respecto a Bregma. Este es un mapa en el que hicimos coincidir expresión de EYFP de las 8 ratas anteriores (La Rata1103012 no tuvo ninguna expresión, por eso no se muestra en el diagrama) para encontrar donde era más probable encontrar neuronas PT.

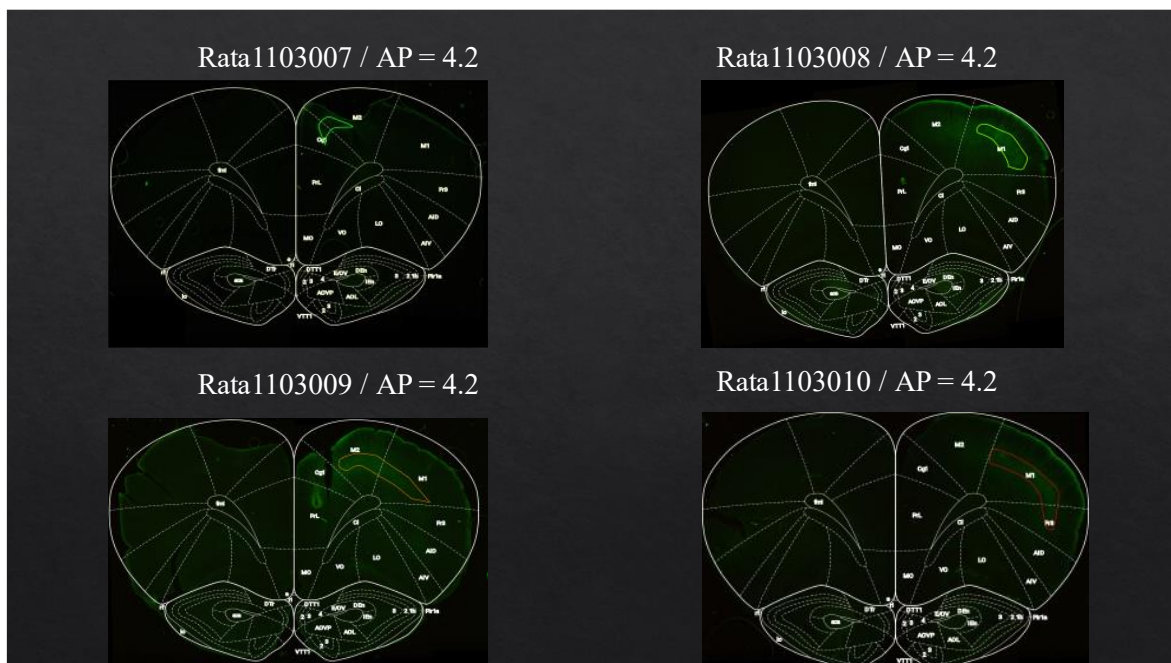


Figura 31 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 4.2 mm respecto a Bregma. Se muestran 4 Ratitas: Rata1103007, Rata1103008, Rata1103009, Rata1103010.

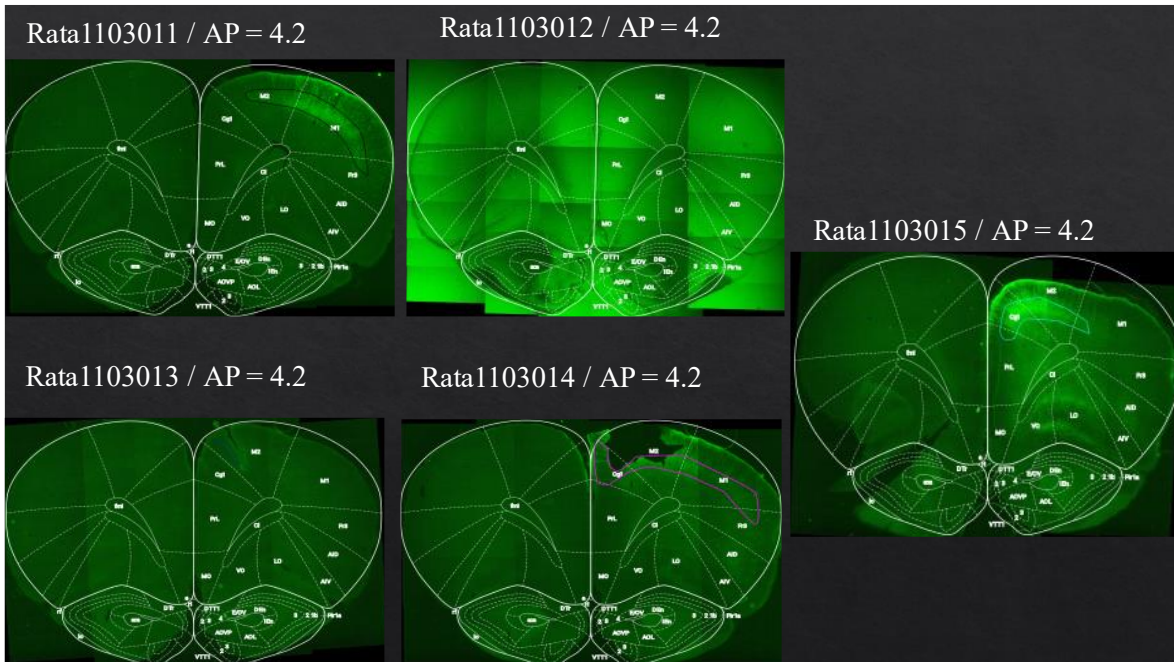


Figura 32 Complementaria. Cortes coronales en coordenadas AP = 4.2 mm respecto a Bregma. Se muestran 5 Ratas: Rata1103011, Rata1103012, Rata1103013, Rata1103014, Rata1103015.

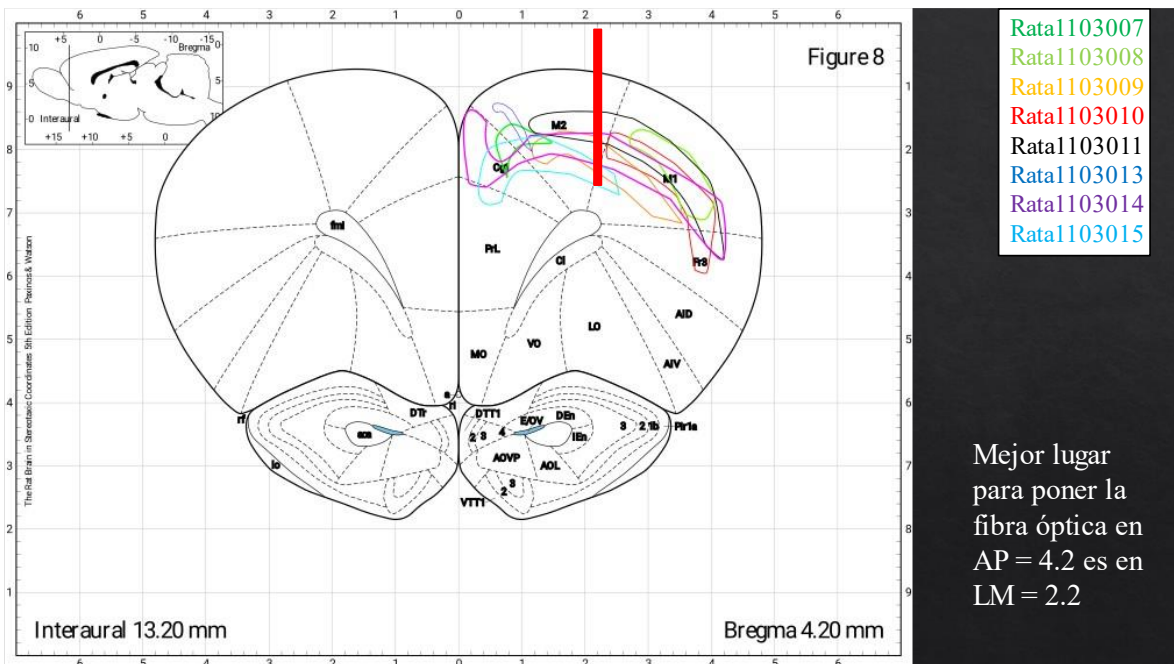


Figura 33 Complementaria. Localización de la mejor coordenada lateromedial (LM = 2.2) de la densidad de neuronas PT en la coordenada AP = 4.2 respecto a Bregma. Este es un mapa en el que hicimos coincidir expresión de EYFP de las 8 ratas anteriores (La Rata1103012 no tuvo ninguna expresión, por eso no se muestra en el diagrama) para encontrar donde era más probable encontrar neuronas PT.

11 Bibliografía

Alexander, G., DeLong, M., & Strick, P. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual Review Of Neuroscience*, 9(1), 357-381. doi: 10.1146/annurev.ne.09.030186.002041

Al-Chaer, E. D., Lawand, N. B., Westlund, K. N., & Willis, W. D. (1996). Visceral nociceptive input into the ventral posterolateral nucleus of the thalamus: A new function for the dorsal column pathway. *Journal of Neurophysiology*, 76(4), 2661–2674. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.4.2661>

Alloway, K. D., Smith, J. B., Mowery, T. M., & Watson, G. (2017). Sensory processing in the dorsolateral striatum: the contribution of thalamostriatal pathways. *Frontiers in systems neuroscience*, 11, 53. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00053>

Bornschlegl, M., & Asanuma, H. (1987). Importance of the projection from the sensory to the motor cortex for recovery of motor function following partial thalamic lesion in the monkey. *Brain Research*, 437(1), 121–130. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91533-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91533-2)

Cowan, R., & Wilson, C. (1994). Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *Journal Of Neurophysiology*, 71(1), 17-32. doi: 10.1152/jn.1994.71.1.17

Corbit, V., Ahmari, S., & Gittis, A. (2017). A corticostriatal balancing act supports skill learning. *Neuron*, 96(2), 253-255. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.046

Evarts, E. (1968). Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement. *Journal Of Neurophysiology*, 31(1), 14-27. doi: 10.1152/jn.1968.31.1.14

Ferenczi, E., Tan, X., & Huang, C. (2019). Principles of optogenetic methods and their application to cardiac experimental systems. *Frontiers In Physiology*, 10. doi: 10.3389/fphys.2019.01096

Ganong, W., Barrett, K., Barman, S., Boitano, S., & Brooks, H. (2015). *Review of medical physiology* (22nd ed., p. 129). New York: McGraw-Hill Medical.

Georgopoulos, A., Schwartz, A., & Kettner, R. (1986). Neuronal population coding of movement direction. *Science*, 233(4771), 1416-1419. doi: 10.1126/science.3749885

- Gerfen, C., & Surmeier, D. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review Of Neuroscience*, 34(1), 441-466. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113641
- Graziano, M. (2016). Ethological action maps: a paradigm shift for the motor cortex. *Trends In Cognitive Sciences*, 20(2), 121-132. doi: 10.1016/j.tics.2015.10.008
- Guo, Q., Wang, D., He, X., Feng, Q., Lin, R., Xu, F., Fu, L., & Luo, M. (2015). Whole-brain mapping of inputs to projection neurons and cholinergic interneurons in the dorsal striatum. *PLOS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123381>
- Hidalgo-Balbuena, A., Luma, A., Pimentel-Farfan, A., Peña-Rangel, T., & Rueda-Orozco, P. (2019). Sensory representations in the striatum provide a temporal reference for learning and executing motor habits. *Nature Communications*, 10(1). doi: 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. doi: 10.1038/nn.2431
- Jeljeli, M., Strazielle, C., Caston, J., & Lalonde, R. (2003). Effects of ventrolateral-ventromedial thalamic lesions on motor coordination and spatial orientation in rats. *Neuroscience Research*, 47(3), 309–316. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(03\)00224-4](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(03)00224-4)
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: Chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 527–535. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98374-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98374-8)
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), 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. *The Journal of Neuroscience*, 24(38), 8289–8299. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1990-04.2004>

- Li, N., Chen, T., Guo, Z., Gerfen, C., & Svoboda, K. (2015). A motor cortex circuit for motor planning and movement. *Nature*, *519*(7541), 51-56. doi: 10.1038/nature14178
- 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*(2), 311-315. doi: 10.1016/0006-8993(95)01333-4
- McBurney, M. W., Sutherland, L. C., Adra, C. N., Leclair, B., Rudnicki, M. A., & Jardine, K. (1991). The mouse P_{gk}-1 gene promoter contains an upstream activator sequence. *Nucleic acids research*, *19*(20), 5755–5761. <https://doi.org/10.1093/nar/19.20.5755>
- Morishima, M. (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>
- Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J., Adeishvili, N., Bamberg, E., & Gottschalk, A. (2005). Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current Biology*, *15*(24), 2279-2284. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.032
- 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>
- Parent, A., & Hazrati, L. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews*, *20*(1), 91-127. doi: 10.1016/0165-0173(94)00007-c
- Park, J., Phillips, J., Guo, J., Martin, K., Hantman, A., & Dudman, J. (2022). Motor cortical output for skilled forelimb movement is selectively distributed across projection neuron classes. *Science Advances*, *8*(10). doi: 10.1126/sciadv.abj5167
- Pimentel-Farfan, A., Báez-Cordero, A., Peña-Rangel, T., & Rueda-Orozco, P. (2022). Cortico-striatal circuits for bilaterally coordinated movements. *Science Advances*, *8*(9). doi: 10.1126/sciadv.abk2241

Reiner, A., Jiao, Y., Del Mar, N., Laverghetta, A., & Lei, W. (2003). Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. *The Journal Of Comparative Neurology*, 457(4), 420-440. doi: 10.1002/cne.10541

Reiner, A. (2010). Corticostriatal projection neurons – dichotomous types and dichotomous functions. *Frontiers In Neuroanatomy*, 4. doi: 10.3389/fnana.2010.00142

Rueda-Orozco, P., & Robbe, D. (2015). The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nature Neuroscience*, 18(3), 453-460. doi: 10.1038/nn.3924

Saiki, A., Kimura, R., Samura, T., Fujiwara-Tsukamoto, Y., Sakai, Y., & Isomura, Y. (2014). Different modulation of common motor information in rat primary and secondary motor cortices. *Plos ONE*, 9(6), e98662. doi: 10.1371/journal.pone.0098662

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. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(45), 10904–10916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1188-17.2017>

Shepherd, G., & Grillner, S. (2010). *Handbook of brain microcircuits* (1st ed.). Oxford [etc.]: Oxford University Press.

Shepherd, G. (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(4), 278-291. doi: 10.1038/nrn3469

Sirota, A., Montgomery, S., Fujisawa, S., Isomura, Y., Zugaro, M., & Buzsáki, G. (2008). Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron*, 60(4), 683–697. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.014>

Steiner, H., & Tseng, K.-Y. (2017). *Handbook of basal ganglia structure and function*. Elsevier/Academic Press.

Sun, S. H., Almasi, A., Yunzab, M., Zehra, S., Hicks, D. G., Kameneva, T., Ibbotson, M. R., & Meffin, H. (2021). Analysis of extracellular spike waveforms and associated receptive

fields of neurons in cat primary visual cortex. *The Journal of Physiology*, 599(8), 2211–2238. <https://doi.org/10.1113/jp280844>

Tennant, K., Adkins, D., Donlan, N., Asay, A., Thomas, N., Kleim, J., & Jones, T. (2010). The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cerebral Cortex*, 21(4), 865–876. doi: 10.1093/cercor/bhq159

Uhlhaas, P. (2009). Neural synchrony in cortical networks: history, concept and current status. *Frontiers In Integrative Neuroscience*, 3. doi: 10.3389/neuro.07.017.2009

Ueta, Y., Hirai, Y., Otsuka, T., & Kawaguchi, Y. (2013). Direction- and distance-dependent interareal connectivity of pyramidal cell subpopulations in the rat frontal cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00164>

Wang, D., Tai, P.W.L. & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* 18, 358–378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>

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>

Wilson, C. (1987). Morphology and synaptic connections of crossed corticostriatal neurons in the rat. *The Journal Of Comparative Neurology*, 263(4), 567–580. doi: 10.1002/cne.902630408

Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 464–476. <https://doi.org/10.1038/nrn1919>