



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

**Participación de los sistemas corticoespinal y corticorrubral en la
ejecución de movimiento.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA
Juliana Loza Vaqueiro

TUTOR:
Dr. José Gerardo Rojas Piloni
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología,
Instituto de Neurobiología, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dra. Florencia Assaneo Verona
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología,
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez
Facultad de Estudios Superiores de Iztacala

INB, Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, Querétaro, octubre 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Índice de figuras	4
Agradecimientos académicos	5
Agradecimientos.....	6
Resumen	7
Abstract	8
Antecedentes	9
Marco Teórico	10
Corteza Sensoriomotora	10
Corteza Motora:.....	10
Corteza Somatosensorial:.....	11
Neuronas del tracto piramidal	11
Tracto Corticoespinal	12
Tracto Corticorrubral	13
Lesiones y plasticidad de los tractos corticoespinal y corticorrubral	14
Planteamiento del Problema.....	15
Hipótesis.....	16
Objetivos	16
Objetivo General	16
Objetivos específicos	16
Material y Métodos.....	17
Animales.....	17
Conducta	17
Tarea Conductual.....	18
.....	20
Cirugías	21
Inyecciones de virus pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2	21
Implantación de la fibra óptica	22
Inhibición optogenética a través de fotoestimulación	23
Inhibición por optogenética	23
Registro de la cinemática del movimiento de palanqueo	24
.....	24
Histología	25
Análisis de Datos.....	26
Análisis conductual.....	26

Identificación de las trayectorias de los palanqueos	27
Clasificación de las trayectorias de acuerdo con el grado de aprendizaje.....	28
Análisis de los parámetros cinemáticos de las trayectorias	29
Análisis de curvas ROC	30
Resultados	31
Resultados conductuales	31
Aciertos.....	31
Omisiones	31
Errores anticipados	32
Clasificación de las trayectorias de acuerdo con su grado de aprendizaje.....	34
Parámetros cinemáticos de las ratas en las diferentes etapas de aprendizaje	35
Duración	35
Tiempo de descenso	35
Amplitud	35
Tiempo de reacción.....	36
Velocidad.....	36
Aceleración.....	36
Inhibiciones optogenéticas.....	38
Expresión del virus pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2	38
Implantación de la fibra óptica	39
Resultados conductuales de los grupos fotoinhibidos.....	40
Corticoespinales.....	40
Aciertos.....	40
Omisiones	40
Errores anticipados	40
Errores fuera de tiempo	40
Corticorubrales.....	42
Aciertos.....	42
Omisiones	42
Errores anticipados	42
Errores fuera de tiempo	42
Resultados cinemáticos de los grupos fotoinhibidos	44
Corticoespinales.....	44
Duración	44
Tiempo de descenso	44
Amplitud	44
Tiempo de reacción.....	44

Velocidad.....	45
Aceleración.....	45
Corticorubrales.....	47
Duración	47
Tiempo de descenso.....	47
Amplitud	47
Tiempo de reacción.....	47
Velocidad.....	48
Aceleración.....	48
Análisis de curvas ROC por animal	50
Corticoespinal.....	50
Corticorubral.....	50
.....	51
.....	52
Discusión	53
1. Aprendizaje sensoriomotor	53
1.1 Aprendizaje de un movimiento de palanqueo	53
1.2 Optimización de un movimiento de palanqueo	54
2. Inhibición optogenética	54
2.1. Expresión del virus	54
2.2. Fotoinhibición del tracto corticoespinal	55
2.3. Fotoinhibición del tracto corticorubral	56
3. Contribución de las neuronas del tracto piramidal en el movimiento	57
Conclusiones.....	58
Bibliografía	59

Índice de figuras

<i>Figura 1. Caja para la tarea conductual.</i>	18
<i>Figura 2. Tarea conductual.</i>	19
<i>Figura 3. Clasificación de los ensayos.</i>	20
<i>Figura 4. Estrategia de inyección viral.</i>	22
<i>Figura 5. Implantación de la fibra óptica</i>	24
<i>Figura 6. Esquema de la instalación del sensor infrarrojo para el registro de las trayectorias</i>	25
<i>Figura 7. Diseño experimental</i>	25
<i>Figura 8. Programa OpenEphys para adquisición de señales de interés.</i>	27
<i>Figura 9. Normalización y binarización de los datos.</i>	28
<i>Figura 10. Parámetros cinemáticos.</i>	30
<i>Figura 11. Resultados del desempeño conductual.</i>	33
<i>Figura 12. Representación de las trayectorias de palanqueos correctos de las ratas en diferentes fases de aprendizaje.</i>	34
<i>Figura 13. El movimiento de palanqueo se perfecciona conforme avanza el entrenamiento.</i>	37
<i>Figura 14. Expresión del virus pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2.</i>	38
<i>Figura 15. Implantación de la fibra óptica.</i>	39
<i>Figura 16. La fotoinhibición de las neuronas corticoespinales influye en los aciertos de la tarea conductual.</i>	41
<i>Figura 17. La efectividad de la tarea conductual no se afecta con la fotoinhibición de las neuronas corticoespinales.</i>	43
<i>Figura 18. Las neuronas corticoespinales influyen en la duración, amplitud y velocidad del movimiento</i>	46
<i>Figura 19. La fotoinhibición de las neuronas corticorrubrales influye en la amplitud, el tiempo de reacción y la velocidad del movimiento.</i>	49
<i>Figura 20. Valores de las curvas ROC significativos por rata del grupo de corticoespinales</i>	51
<i>Figura 21. Valores de las curvas ROC significativos por rata del grupo de corticorrubrales.</i>	52
<i>Figura 22. Mapas de densidad neuronal del TCE y TCR en ratas</i>	55

Agradecimientos académicos

Esta tesis se desarrolló gracias al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) que me otorgó la beca CVU1094565 a lo largo de toda mi maestría. A los proyectos CONAHCyT Ciencia BásicaA1-S-8686 (GR-P), UNAM-DGAPA-PAPIME PE205821 (RO-M), PAPIIT IN201121 (GR-P).

A mi comité tutor Dra. Florencia Assaneo Verona y Dr. Issac Obed Pérez Martínez por sus valiosas observaciones y aportaciones en el proyecto.

A Rafael Olivares Moreno, Cutberto Dorado, Nydia Hernández, Ericka de los Ríos, Lourdes Palma, Martín García Servín, Christian Josué Delgado Guzman y Edgar Bolaños por su asistencia técnica durante el desarrollo de la tesis.

Agradecimientos

A mis papás, Arturo y Marisa, por su nobleza, esfuerzo y el corazón que le han puesto en todo lo que me han dado. Por siempre creer en mí ciegamente, impulsarme y darme apoyo incondicional en toda mi vida. Nada de esto sería posible sin ustedes.

A mis hermanos, Isabel, Arturo y Fer, ustedes que son mi fuente de inspiración, mi soporte incondicional y los que siempre me han cuidado, enseñado y guiado a lo largo de toda mi vida.

Al Dr. Gerardo Rojas Piloni, por ser un excelente mentor, guía e inspirarme diariamente a apasionarme, explorar, jugar, cuestionar y conocer lo bonito de hacer investigación.

A Rafa, por su disposición en cada momento, por la pasión que le entrega a cada una de las cosas que hace y por supuesto, por su ayuda incondicional.

A Paola, Vero, Moisés y Martín, por su apoyo en el laboratorio desde el día que llegue, por las extensas pláticas, risas, café y cervezas compartidas.

Al Laboratorio de Integración Sensoriomotora A-13 por hacer el mejor laboratorio en el que hubiera deseado aprender durante la maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter, por darme tantas oportunidades de crecimiento académico a lo largo de estos años.

A la Dra. Mónica López Hidalgo y a todo su laboratorio, por el acompañamiento y el compartir a lo largo de toda la maestría.

A Paulina y Leyma, por su preocupación, cuidado y estar en mis días más difíciles, hicieron de la casa un hogar.

A mis amigos de la maestría, Chuy, César, Sara, Valeria que se convirtieron en mi familia en estos dos años y me otorgaron muchos momentos de diversión y acompañamiento.

A mis amigas, Xiomara, Sara y Magali que a pesar de no estar diario conmigo, el compartir una plática hace sentir lo contrario.

Resumen

La corteza sensoriomotora (cortezas somatosensoriales y motoras) desempeña un papel diferente en la modulación de los movimientos voluntarios, la regulación de las aferencias sensoriales y la organización de la información motora en las estructuras subcorticales relacionadas con el control motor. Aún se desconoce en gran medida si los diferentes roles de la corteza sensoriomotora son llevados a cabo por subpoblaciones diferentes de Neuronas del Tracto Piramidal (NTP). En este estudio, analizamos el papel funcional de dos clases de NPT de la capa 5b que proyectan hacia la médula espinal (neuronas del tracto corticoespinal) y el núcleo rojo (neuronas del tracto corticorrubral).

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar la participación de los tractos corticoespinal y corticorrubral durante la ejecución de un movimiento voluntario de palanqueo, con la finalidad de determinar si estos dos tractos tienen una participación diferencial o complementaria durante diferentes fases y parámetros cinemáticos del movimiento.

Comparamos la inhibición selectiva optogenética de las neuronas corticoespinales (CS) o corticorrubrales (CR) de la corteza sensoriomotora durante los movimientos de presionar una palanca. Así, analizamos el rendimiento del movimiento durante la preparación, el tiempo de reacción, el inicio y toda la ejecución en ratas Wistar hembra entrenadas en una tarea condicionada operante.

Durante la fase de entrenamiento, las trayectorias de movimiento muestran gradualmente menos variabilidad y se vuelven más estereotipadas. Sin embargo, la fotoinhibición de las neuronas CS y CR modifica diferencialmente los parámetros cinemáticos: duración y velocidad de las trayectorias de movimiento, lo que sugiere que ambas clases de NPT tienen roles diferentes en la integración sensoriomotora.

Abstract

The sensorimotor (somatosensory and motor cortices), has a different role modulating voluntary movements, regulating the sensory afferences and organizing the motor information into the subcortical structures related to motor control. It is largely unknown if the different roles of sensorimotor cortex are carried out by distinct subtypes of pyramidal Tract Neurons (PTN). Here, we analyzed the functional role of two classes of PTNs of layer 5b projecting to the spinal cord (corticospinal tract neurons) and red nucleus (corticorubral tract neurons).

The main objective of this study was to characterize the involvement of the corticospinal and corticorubral tracts during the execution of a voluntary rocking movement, to determine whether these two tracts have a differential or complementary participation during different phases and kinematic parameters of the movement.

We compared selective optogenetic inhibition of sensorimotor cortex corticospinal (CS) or corticorubral (CR) neurons during lever pressing movements to analyze movement performance during preparation, reaction time, onset, and all the execution in 8 female Wistar rats trained in an operant conditioned task.

During the training phase, movement trajectories gradually display less variability and become more stereotyped. However, the photoinhibition of CS and CR neurons differentially modify the kinematic parameters: duration, and velocity of the movement trajectories, suggesting that both classes of PTNs have different roles for sensorimotor integration.

Antecedentes

El estudio del control motor es uno de los temas fundamentales para las neurociencias. Existen múltiples tractos relacionados con el control y ejecución de movimientos voluntarios gruesos y finos, siendo el tracto corticoespinal (TCE) el más estudiado hasta la fecha. Este tracto tiene su origen en las cortezas somatosensoriales y motoras, principalmente. Sus proyecciones descienden por la cápsula interna y pedúnculos cerebrales antes de alcanzar la zona ventral del bulbo raquídeo donde cruzan la línea media formando la decusación de las pirámides. La localización de las fibras del TCE en la médula espinal va a diferir dependiendo de la especie. En el caso de los roedores en su mayoría llegan al asta dorsal y en menor medida al asta lateral y ventral de la médula espinal (Olivares-Moreno et al., 2021; Ueno et al., 2018; Lemon, 2008). La existencia de diversas proyecciones corticales a la médula espinal, vía el TCE, sugiere una posible organización de dichos circuitos que involucran la integración sensoriomotora (Lemon, 2008). Experimentos recientes han demostrado que el TCE organiza las diferentes eferencias de la corteza hacia la médula espinal, de forma jerárquica durante las diferentes fases del control motor (Olivares-Moreno et al., 2017a, 2019; Ueno et al., 2018).

Otra estructura relevante en el control motor es el tracto corticorrubral (TCR) el cual recibe diversas eferencias corticales, principalmente de la corteza motora. En los primeros estudios, se describe que las proyecciones del TCR, tienen una organización somatotópica (Rinvik & Walberg, 1963), teniendo una participación en los movimientos ejecutados principalmente por las extremidades anteriores al iniciar y finalizar el movimiento (Jarratt & Hyland, 1999). Por otro lado, se planteaba que el TCR no tenía una participación directa con la movilidad, si no, que era un tracto por el cual viajaba la información encargada de la regulación inhibitoria de entradas de información que se dirigían al tracto rubroespinal (TRE) (Humphrey & Rietz, 1976). No obstante, en estudios más recientes, se conoce que conduce información que participa en el control de los movimientos más finos de la muñeca al ejecutar una tarea motora (Ishida et al., 2016, 2019a). Uno de los últimos hallazgos descritos para este tracto, es su participación posterior a una lesión del TCE, donde se ha observado que adquiere un papel preponderante en la recuperación de funcionalidad para la ejecución de tareas motoras, posterior a un periodo de rehabilitación (Ishida et al., 2019) o tras la exposición a entrenamiento físico (Zhang, Ch. et al, 2017).

Es así como, en el actual proyecto, se busca explicar cómo es que el TCE y el TCR colaboran en conjunto, mediante la evaluación cinemática de una actividad motora de palanqueo. Asimismo, se busca identificar qué fases de la ejecución motora, previamente aprendida, se ven afectadas en la ausencia de cada una de las dos vías, por medio de la inhibición optogenética por fotoestimulación.

Marco Teórico

Corteza Sensoriomotora

La corteza sensoriomotora (cortezas somatosensoriales y motora primaria) es la encargada de la integración y ejecución de los movimientos. Esta corteza se encarga de modular las aferencias sensoriales y, simultáneamente organiza la información motora de estructuras subcorticales relacionadas con el control motor, movimiento voluntario, y muscular (Kalambogias & Yoshida, 2021; Moreno-López et al., 2016). Dentro de la corteza sensoriomotora podemos encontrar diferentes poblaciones de neuronas, pero aquellas que principalmente son encargadas de la modulación y control del movimiento se encuentran en la capa 5, las cuales, tiene diferentes características funcionales, morfológicas y genéticas (Economo et al., 2018; Rojas-Piloni et al., 2017a). Estas subpoblaciones de las neuronas hacen referencia a una posible diferenciación en la funcionalidad y participación en la planeación y ejecución del movimiento en sus diferentes etapas (Economo et al., 2018; Isomura et al., 2009), siendo capaces de procesar y segregar dicha información a las distintas estructuras subcorticales relacionadas con dichos procesos. Las conexiones directas entre la corteza sensoriomotora y la médula espinal representan una parte de los posibles tractos que pueden participar la planeación y ejecución del movimiento como las vías corticotalámicas, corticoestriatales, corticoespinales, corticoreticulares y corticorrubrales. (Basista & Yoshida, 2020)

Corteza Motora:

La corteza motora tiene una participación importante para la coordinación, postura y movimientos corporales, así como en el aprendizaje de nuevos movimientos (Macías et al., 2022; Papale & Hooks, 2018; Qian et al., 2019). Esta corteza contiene en su mayoría neuronas piramidales e interneuronas, que suelen tener una participación diferencial dependiendo de la etapa de aprendizaje (Macías et al., 2022; Serradj et al., 2023), movimientos específicos (Veuthey et al., 2020), o músculos activados (Warriner et al., 2022).

Dentro de la corteza motora de roedores se han identificado, por medio de microestimulación intracortical, trazadores neuronales y más recientemente por canales de rodopsina tipo 2 que son sensibles a la fotoestimulación a través de optogenética. (Akintunde & Buxton, 1992; Asboth et al., 2018; Ishida et al., 2016; Qian et al., 2019) dos áreas motoras encargadas del movimiento de las extremidades delanteras conocidas como: 1) Área rostral de la extremidad delantera 2) Área caudal de la extremidad delantera. Ambas áreas están relacionadas y se cree que tienen una conexión por la cual ejecutan diferentes acciones en el movimiento y además la activación de una suele activar la otra.

Corteza Somatosensorial:

El procesamiento de la información sensorial tiene una organización jerárquica y requiere de la integración de múltiples estructuras desde el sistema nervioso periférico (SNP) hasta el sistema nervioso central (SNC) (Grimsley et al., 2013). Diferentes estímulos, como visuales, olfativos, táctiles, propioceptivos, etc., son procesados principalmente por la corteza somatosensorial primaria (S1) y secundaria en los roedores (S2). Estudios más recientes han sugerido que la corteza somatosensorial no solo se encarga del procesamiento de la información sensorial, sino que también puede regular directamente los patrones motores y proporcionar retroalimentación constante para la corrección de los movimientos (Petersen, 2021). Esto se lleva a cabo a través de diferentes tractos descendentes, como el TCE (Macias et al., 2022), el TCR y el tracto corticopontino (TCP) (Lopez-Virgen et. al 2023).

Estos hallazgos indican que la ejecución de los movimientos voluntarios no es exclusiva de la corteza motora primaria (M1), ya que la corteza somatosensorial (S1) también desempeña un papel directo en su ejecución y retroalimentación (Petersen, 2021; Macias et al., 2022; Lopez-Virgen et al., 2023). Esto resalta la importancia de la interacción entre la corteza somatosensorial y la corteza motora en la generación y regulación precisa de los movimientos voluntarios.

Neuronas del tracto piramidal

La neocorteza de los mamíferos contiene neuronas piramidales excitatorias e interneuronas locales (principalmente inhibitorias). Las neuronas piramidales son el tipo de neuronas más abundantes y existen prácticamente en todas las capas de la corteza con excepción de la capa 1. Un grupo heterogéneo está constituido por las ubicadas en la capa 5b de la corteza conocidas como neuronas empenachadas de la capa 5 o neuronas del tracto piramidal (NTP) (Currie et al., 2022; Economo et al., 2018; Ramaswamy & Markram, 2015; Rojas-Piloni et al., 2017a). Las NTP tienen el soma de forma piramidal y como característica particular del axón y sus dendritas basales y apicales, diferenciándose de las neuronas intratelencefálicas (IT), las cuales tienen axones y dendritas que se comunican interhemisféricamente. Además, las NTP tienen como característica que proyecta a diferentes núcleos subcorticales como la médula espinal, núcleos talámicos posteromedial, colículo superior, núcleo pontino, núcleo rojo (NR) y cuerpo estriado. Estas neuronas se ha visto que principalmente proyectan de manera individual a estos núcleos subcorticales, sin embargo, pueden llegar a tener colaterales que proyectan a más de un blanco (Kita and Kita, 2012).

Este grupo de neuronas se conoce que tienen la capacidad de tener control sobre la ejecución de los movimientos voluntarios debido a su comunicación directa con la médula espinal y

los núcleos subcorticales relacionados con la motricidad. Se sugiere que se segregan en diferentes subpoblaciones neuronales que tienen como propiedad diferentes características y funciones de acuerdo con el blanco de proyección al cual derivan. (Akintunde et al., 1992; Groh A. et al., 2009; Rojas-Piloni et al., 2017; Economo et al., 2018). Estas neuronas, reciben información de neuronas inhibitorias y excitatorias intracorticales, cortico-corticales y de estructuras subcorticales, siendo capaces de integrar información sensorial proveniente de los distintos circuitos de los blancos subcorticales a los cuales proyectan. Además, de tener características morfológicas, genéticas, moleculares y fisiológicas distintas, dependiendo de estos blancos (Rojas-Piloni et al., 2017b).

Tracto Corticoespinal

Una clase particular de NTP forman el TCE, siendo esta la conexión más directa de la corteza cerebral con la médula espinal. Esta proyección participa en el control motor ejecutando una de las principales funciones sobre el movimiento voluntario a nivel cortical, subcortical y en médula espinal (Miller, 1987; Moreno-López et al., 2016; Welniarz et al., 2017). Además de esta función también se ha reportado que tiene control descendente de las aferencias, regulación de nocicepción, movimientos voluntarios distales, reflejos y las actividad inhibitoria o excitatoria de las motoneuronas y control autónomico. (Lemon & Griffiths, 2005; Lopez et al., 2021)

El TCE ha sido el más estudiado para el control y ejecución del movimiento, sus proyecciones derivan de la capa 5b de la corteza sensoriomotora, incluyendo el área motora primaria (M1), área motora secundaria (M2), área motora somatosensorial primaria (S1) y área somatosensorial secundaria (S2) (Hira et al., 2013; Kalambogias & Yoshida, 2021; Nelson et al., 2021), para finalmente contactar con la médula espinal. El TCE conforman diferentes poblaciones y subsistemas que se encargan de regular ordenadamente las aferencias sensoriales y generar las eferencias motoras a lo largo de lámina intermedia y ventral de la sustancia gris de la médula espinal contactando con interneuronas premotoras (Lemon, 2008; Moreno-López et al., 2016; Nelson et al., 2021). La participación del TCE ha sido estudiada en diferentes especies, sin embargo, este tracto cuenta con diferentes características entre los mamíferos y primates (Basista & Yoshida, 2020).

Actualmente, se reconoce que las neuronas del TCE están organizadas según su hodología, sugiriendo que cumplen con diferentes funciones en la ejecución motora debido a la clasificación jerárquica. Las neuronas del TCE forman parte de una red compleja que regula diferentes circuitos espinales relacionados con el control sensoriomotor (Macías et al., 2022; Moreno-López et al., 2016; Olivares-Moreno et al., 2019). La organización jerárquica del TCE permite la transmisión de señales motoras desde la corteza cerebral hacia la médula espinal, donde interactúan con las motoneuronas y contribuyen al control preciso de los movimientos (Lemon et. al., 2008).

Tracto Corticorrubral

El tracto corticorrubral (TCR), está constituido por otra de las subpoblaciones de las NTP. Este tracto a diferencia de TCE ha sido poco explorado. Se conoce, que sus proyecciones derivan de la corteza sensoriomotora para finalmente contactar con el núcleo rojo (Basile et. al., 2021).

El núcleo rojo, el cuál es el blanco de proyección del TCR, está conformado de dos regiones, la parvocelular y la magnocelular. La región parvocelular del núcleo rojo (pNR), se ubica de manera rostral y es caracterizada por neuronas pequeñas (20 μ m) y medianas (20-25 μ m). Este manda proyecciones a la oliva inferior y posteriormente al núcleo dentado del cerebelo (Basile et al., 2021). Por otro lado, la región magnocelular del núcleo rojo (mNR), se encuentra más caudalmente y contiene neuronas de tamaño gigante (>40 μ m). De esta región deriva el TRE, el cual manda sus proyecciones al lado contralateral de la médula espinal decusando por el *tegmentum* ventral del mesencéfalo (Basile et al., 2021; Cacciola et al., 2019; Ishida et al., 2016, 2019; Olivares-Moreno et al., 2021).

El TCR es reconocido principalmente por su participación en los movimientos de las extremidades anteriores. Se ha observado que las neuronas del TCR muestran una mayor actividad al inicio y al final de los movimientos de alcance (Jarratt & Hyland, 1999). Sin embargo, investigaciones más recientes han revelado nuevas contribuciones del TCR. Se ha descubierto que el TCR puede actuar como una vía alterna una vez que el TCE ha sido lesionado, desempeñando un papel crucial en la recuperación del movimiento de las extremidades anteriores (Ishida et al., 2016, 2019) y en la locomoción (Asboth et al., 2018) después de un período de rehabilitación. Además, mediante la aplicación de inhibición optogenética selectiva, se ha observado que la manipulación del TCR puede alterar la trayectoria de un movimiento previamente aprendido y aumentar los tiempos de reacción (Lopez-Virgen et al., 2022).

Lesiones y plasticidad de los tractos corticoespinal y corticorrubral

Los accidentes cerebro-vasculares (AVC), traumatismos craneoencefálicos (TCE) y las lesiones medulares (LM) son unas de las principales causas que el sistema motor y sensorial se pueden ver afectados. (Basile et al., 2021; Ishida et al., 2016, 2019a; Morris et al., 2011; Qian et al., 2019; Siegel et al., 2015). Estas patologías, suelen ser reflejadas con disfunciones en la planeación y ejecución del movimiento (Ueno et al., 2012). Existen diferentes mecanismos y vías que influyen a regenerar ciertos circuitos neurales los cuales contribuyen a una recuperación funcional del movimiento (Hira et al., 2013; Ueno et al., 2012). Estos mecanismos incluyen plasticidad sináptica, neurogénesis y nuevos brotes axonales, reportados en médula espinal, así como, una reorganización cortical y en estructuras subcorticales involucradas con la ejecución y planeación de la motricidad (Asboth et al., 2018; Ishida et al., 2016; Qian et al., 2019).

Las vías alternas que se han reportado que se involucran en la recuperación de la motricidad producidas por lesiones del TCE son principalmente la vía CR, rubroespinal, corticoreticular (Asboth et al., 2018; Glover & Baker, 2022; Isa et al., 2019). Dependiendo de la zona de lesión, ya sea, cortical, medular o en estructuras subcorticales involucradas con la motricidad, se verán involucradas vías alternas para la recuperación de la movilidad y la funcionalidad en mamíferos (Asboth et al., 2018; Ishida et al., 2016, 2019a; Rachwani et al., 2015). La pérdida y por lo tanto la rehabilitación de la motricidad dependerá del sitio, extensión y gravedad de la lesión.

La vía corticorrubral junto con la rubroespinal son los principales tractos que se ha demostrado que participa en la recuperación funcional de las extremidades, posterior a una lesión en la vía corticoespinal, relevando la función de esta posteriormente a 7 días después de llevar rehabilitación (Isa et al., 2019; Ishida et al., 2016, 2019a).

La recuperación espontánea, o después de una rehabilitación, se debe principalmente a la plasticidad de las fibras intactas del TCE que quedan en la zona de la lesión y por las fibras del TCR y corticofugales que están cercanas a la zona, además, de la plasticidad del tracto rubroespinal posterior a una piradoctomia.(Siegel et al., 2015)

Planteamiento del Problema

Las lesiones de la vía corticoespinal es uno de los principales motivos por los cuales la motricidad voluntaria gruesa y fina se pueden ver afectadas, además de ser una condición discapacitante. No obstante, existen diversas vías que se han reportado que contribuyen a la ejecución del movimiento, como la corticorrubral. Sin embargo, se desconoce con total claridad la contribución que tienen en el movimiento ambas proyecciones y como su ausencia puede afectar en un movimiento aprendido. Así que, en el presente proyecto, se busca conocer si la inhibición del TCR afectará la ejecución de un movimiento de palanqueo previamente aprendido e identificar si este está involucrado en el aprendizaje de dicho movimiento.

Previamente se ha planteado que el TCR es una de las principales vías que están involucradas en la ejecución y recuperación del movimiento posterior a una lesión de la vía corticoespinal. Se ha observado que este tracto suele reclutarse en un periodo aproximado de 7 días posterior a una lesión, solventando los movimientos realizados anteriormente por el TCE en ratas (Isa et al., 2019; Ishida et al., 2016, 2019a; Morris et al., 2011; Qian et al., 2019), sugiriendo que esta vía tiene un papel fundamental en la ejecución de movimientos finos de las extremidades anteriores (Morris et al., 2011). Debido a que actualmente se conoce que grupos de neuronas que conforman el tracto piramidal están organizados jerárquicamente, se busca justificar como el TCR está involucrado y organizado dentro de la ejecución del movimiento.

Hipótesis

H1. Si las neuronas corticoespinales y corticorrubrales constituyen sistemas distintos para el control sensoriomotor, entonces, la interrupción del flujo de información en sus vías de proyección afectará diferencialmente los parámetros cinemáticos de un movimiento.

H0: La interrupción del flujo de información de las neuronas corticoespinales y corticorrubrales no afecta diferencialmente los parámetros cinemáticos de un movimiento.

Objetivos

Objetivo General

Determinar el papel de las neuronas corticoespinales y corticorrubrales sobre los parámetros cinemáticos de un movimiento de palanqueo.

Objetivos específicos

1. Analizar los cambios que sufre la dinámica temporal de un movimiento de palanqueo durante el proceso de aprendizaje en un paradigma de condicionamiento operante.
2. Analizar el papel que tiene las vías corticoespinal y corticorrubral sobre la dinámica temporal de un movimiento de palanqueo mediante la inhibición optogenética selectivas de estas vías.
3. Analizar los cambios en el desempeño de un movimiento de palanqueo durante el proceso de un aprendizaje motor.
4. Analizar las diferencias que tienen las vías corticoespinal y corticorrubral sobre el desempeño de un movimiento de palanqueo.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 21 días de edad, mantenidas en condiciones de temperatura y luz controlada ($23\pm^{\circ}\text{C}$, con un ciclo de 12 h de iluminación y 12 h de oscuridad iniciando a las 7:00 h), con acceso a alimento *ad libitum* (Lab Diet-5001). Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio y se manipularon 3 a 4 días previos a la tarea conductual con la finalidad de habituarlos. En la habituación, los animales fueron tomados y manipulados por el experimentador aproximadamente por 15 a 20 minutos diarios donde los pesaba y posteriormente los colocaba en diferentes puntos de la caja habitación hasta que estos ya permitían ser tocados. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (protocolo No. 073) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Conducta

Las ratas se expusieron a una restricción de agua 24 horas antes del inicio de la primera sesión de entrenamiento, la cual se mantuvo durante todos los días excepto los fines de semana durante los cuales se dejaba agua y comida *ad libitum*. Para fines del presente estudio se trabajó con una restricción aguda, en la cual los animales reciben agua durante la sesión y una hora posterior *ad libitum* a la tarea conductual.

La tarea conductual fue realizada en cajas color negro de policarbonato con unas dimensiones de 39 cm de ancho x 47 cm de largo x 20 cm de alto, dentro de un cuarto totalmente oscuro. Las cajas (Figura 1) estaban conformadas por una luz ubicada en la pared posterior, a la izquierda de la luz se encuentra una palanca estándar (Lafayette Instrument modelo 80110) a 1.5 cm del piso, arriba de esta se encuentra ubicado la punta de un bebedero el cual está conectado al lado derecho de la palanca a 6 cm del piso conectado a una bomba peristáltica (Lafayette Instrument modelo 80204P (Figura 1). La sesión experimental era controlada automáticamente por medio del programa Animal Behavior Environment Test (ABET II Standard, Lafayette Instrument versión 2.16.1), encargado de controlar todos los componentes de entradas (input) y salidas (output) dentro de las cajas de conducta con la finalidad de registrar los eventos en tiempo real que ocurren durante la sesión.

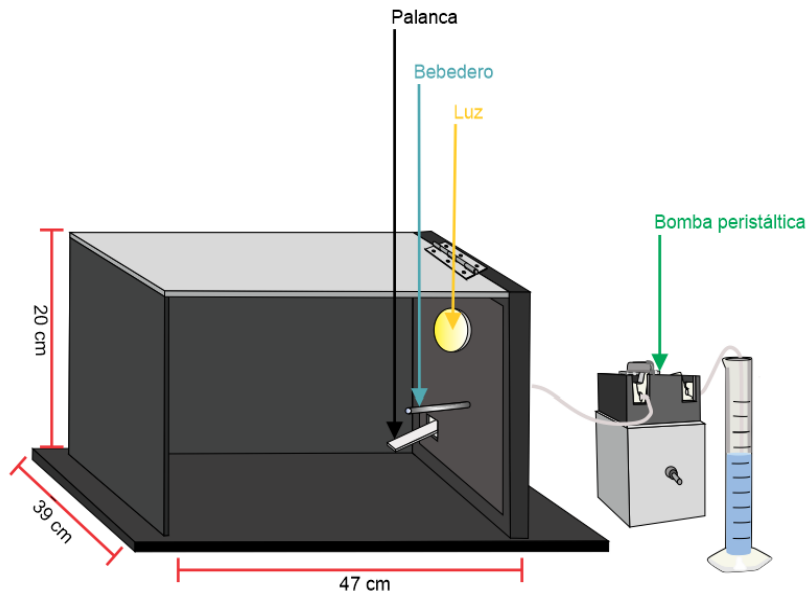


Figura 1. Caja para la tarea conductual. La palanca se muestra en color blanco, el bebedero en color azul y la luz en color amarillo.

Tarea Conductual

Los animales fueron entrenados por medio del condicionamiento operante en libre movimiento, la cual permite la ejecución de un movimiento voluntario de palanqueo con la pata delantera izquierda en respuesta a un estímulo lumínico. Previamente a esta tarea, los animales tuvieron 3 sesiones de adaptación al entrenamiento donde se les presentaba un estímulo lumínico continuo durante toda la sesión, permitiendo así la asociación del estímulo y el movimiento de palanqueo para recibir el reforzador. Durante esta fase de adaptación, cada vez que la rata presionaba la palanca recibía un estímulo reforzante de 15 μ L de agua.

Posterior a la fase de adaptación al entrenamiento inicio la ejecución de la tarea conductual. La tarea consistió en ensayos en los que aparecía un estímulo lumínico (duración de 700 ms en las primeras 5 sesiones, 1000 ms las siguientes 10 sesiones y 1300 ms las últimas 13 sesiones). Posterior al apagado del estímulo lumínico inicia un tiempo de respuesta de 2000 ms, en el cual el animal debe ejecutar el movimiento de palanqueo para así recibir el reforzador. Una vez terminado el ensayo, comienza un tiempo entre ensayos que varía aleatoriamente entre 2000 ms a 4000 ms (Figura 2). Un ensayo era considerado correcto cuando el animal respetaba el tiempo del estímulo lumínico y ejecutaba el movimiento de palanqueo durante el tiempo de respuesta (Figura 3a). Un ensayo incorrecto era considerado de tipo anticipado cuando el animal realizaba el movimiento de palanqueo durante el estímulo lumínico, provocando la suspensión de dicho estímulo (Figura 3b) o

de un error tipo “fuera de tiempo” cuando el movimiento de palanqueo era ejecutado durante el tiempo entre ensayos. Cuando ocurrían este tipo de ensayos incorrectos, el animal era penalizado y se enviaba a un tiempo fuera (tiempo aleatorio entre 2000ms – 5000 ms) antes de iniciar nuevamente un ensayo. Por último, era considerado una omisión cuando el animal no atendía el estímulo lumínico y no ejecutaba el movimiento de palanqueo (Figura 3d).

Los entrenamientos se llevaron a cabo en 5 sesiones a la semana con una duración de 60 minutos cada una. En cada sesión se contabilizaban el número de palanqueos, número de recompensas, las luces a lo largo de la sesión y las omisiones.

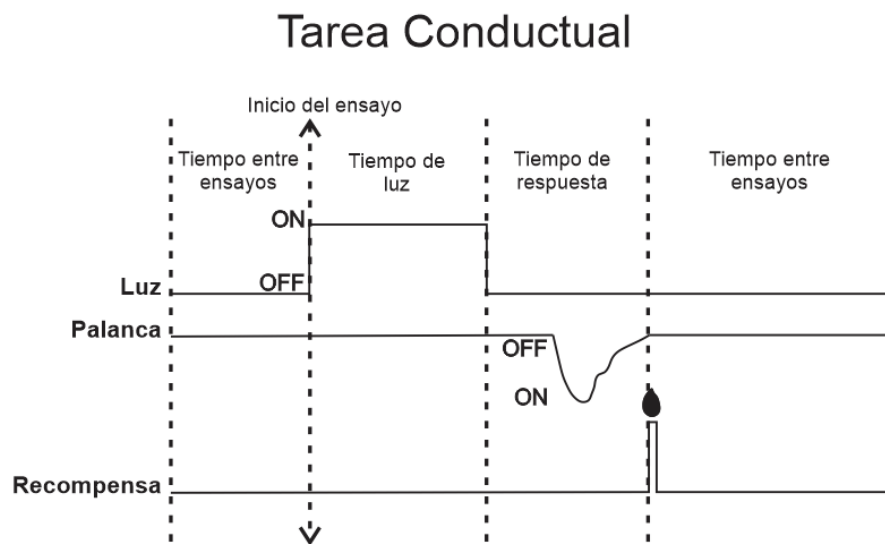
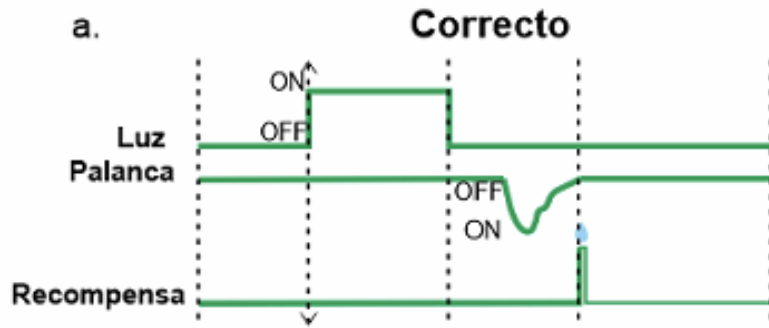
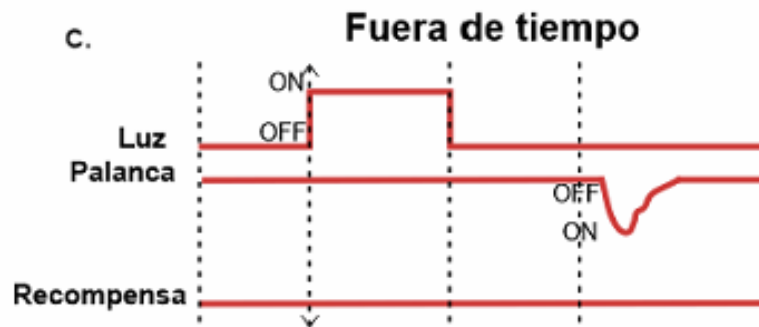
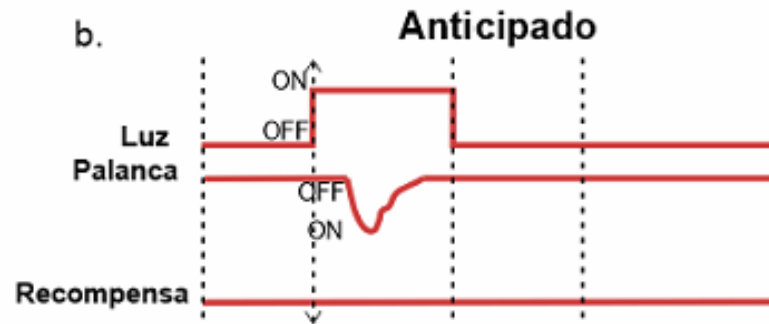


Figura 2. Tarea conductual. La tarea consistía en un tiempo de luz (700 ms-1300ms), tiempo de respuesta (2000 ms) y el tiempo entre ensayos (2000 ms-4000 ms).

Ensayo correcto



Ensayo incorrecto



Ensayo omiso

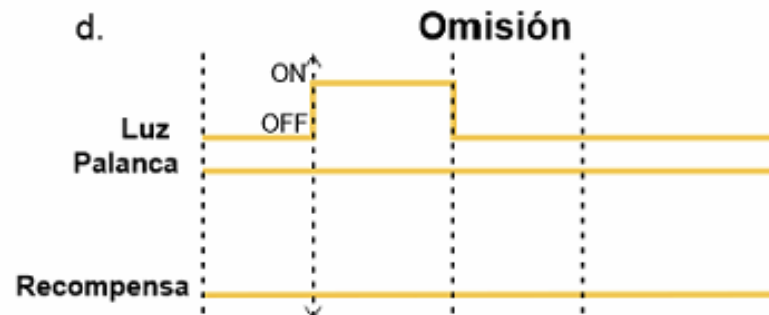


Figura 3. Clasificación de los ensayos. A. Ensayo correcto; B. Ensayo anticipado; C. Ensayo fuera de tiempo; D. Omisión.

Cirugías

Inyecciones de virus pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (1.2% en O₂) (Sofloran® Vet) y se colocaron en el aparato estereotáxico. Se inyectaron 2 ml de solución salina subcutánea y se recubrieron los ojos con vaselina.

Para las ratas del grupo del TCE se rasuran desde la zona costal hasta la zona occipital, posteriormente se anestesiaron con isoflurano y se montaron en el aparato estereotáxico. Se inyectó lidocaína intramuscular en los dos músculos parietales y se fijó la cola a un poste para tensar la columna vertebral. Se realizó un corte longitudinal en la parte media del dorso desde la apófisis espinosa de C2 hasta la apófisis espinosa de T1. Se separó el tejido conjuntivo y la musculatura de la parte dorsal hasta llegar a los músculos paravertebrales de la columna cervical, y ser retirados. Se limpió la zona vertebral y el espacio intervertebral con apoyo de solución salina y un hisopo para tener visibilidad de la médula espinal. Se retiró la duramadre, dejando expuesta la médula espinal y se inyectó el virus retrógrado pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2 (120 nl) por medio de presión utilizando un capilar calibrado en C4-C5 y C5-C6 del lado izquierdo de la médula espinal (AP: 0.600; ML:1.00). Después de aplicar presión, se deja la punta del capilar durante 5 minutos esperando que descienda y perfunda de manera adecuada el virus (Figura 4a). Finalmente, se retiró la punta y se suturaron los músculos dorsales con hilo para suturar (Atramat® Silk USP 3-0) y posteriormente se cerró la piel (Atramat® Nylon USP 6-0).

Para las ratas del grupo del TCR se rasuró la zona del cráneo para posteriormente depilar la parte superior del cráneo. Se colocaron dos inyecciones en el músculo parietal de lidocaína (Piscaína 2%) (0.3 ml y se dejó actuar 1 minuto. Se realizó una incisión longitudinal en la piel, posteriormente se hizo una limpieza del tejido conjuntivo y graso que recubre el cráneo por medio de una legra. Una vez limpio y visible el cráneo se realizó un trépano con un taladro dental en las coordenadas de núcleo rojo (AP: 5.7; ML: 1.00; DV: 6.5), para posteriormente realizar la inyección del virus pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2 directamente en núcleo rojo. Se dejó la punta en el sitio de inyección durante 5 minutos y posteriormente se retiró (Figura 4b). Finalmente, se suturó la piel del cráneo con (Atramat® Nylon USP 6-0). Para el control de dolor se administró TRAMADOL® (25 mg/kg) cada 12 h y para prevención de infecciones se administró Metamizol Sódico (0.1 ml/100 g) cada 12 horas por 3 días post-quirúrgicos.

Implantación de la fibra óptica

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (Sofloran® Vet), posteriormente se rasuró el cráneo y se colocaron en aparato estereotáxico. Se inyectaron 2 ml de solución salina (0.9%) subcutánea y se recubrieron los ojos con vaselina. Se depiló el pelaje residual de la zona del cráneo, posteriormente se realizó un corte longitudinal y se limpió el tejido conjuntivo y graso de la parte superior del cráneo. Se realizó un trépano con un taladro dental en las coordenadas de la corteza M1 (AP: 2.20; ML: 2.00; DV: 1.00), mismo sitio donde la fibra (Doric lenses® de 1 mm de longitud) fue implantada (Figura 4). Una vez implantada la fibra esta fue recubierta por medio de cemento dental (Ortho-Jet Power), permitiendo fijarla y ser manipulada durante las sesiones de inhibición optogenética.

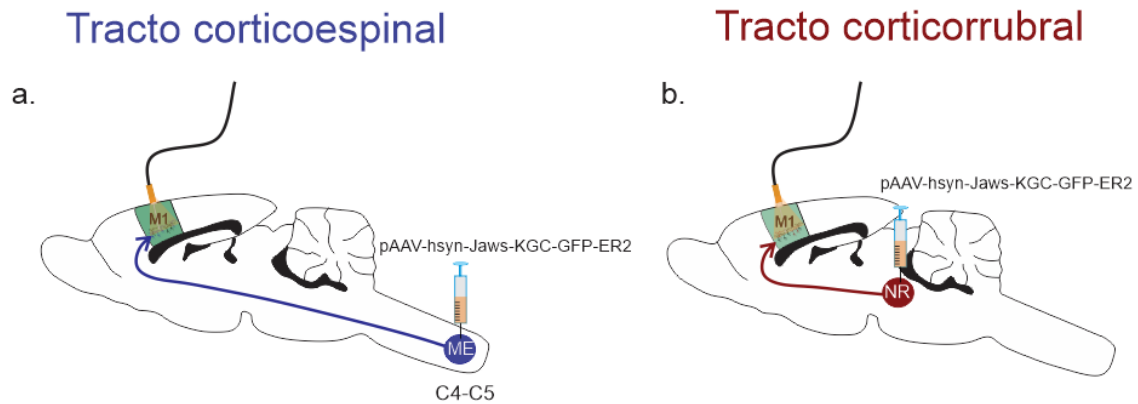
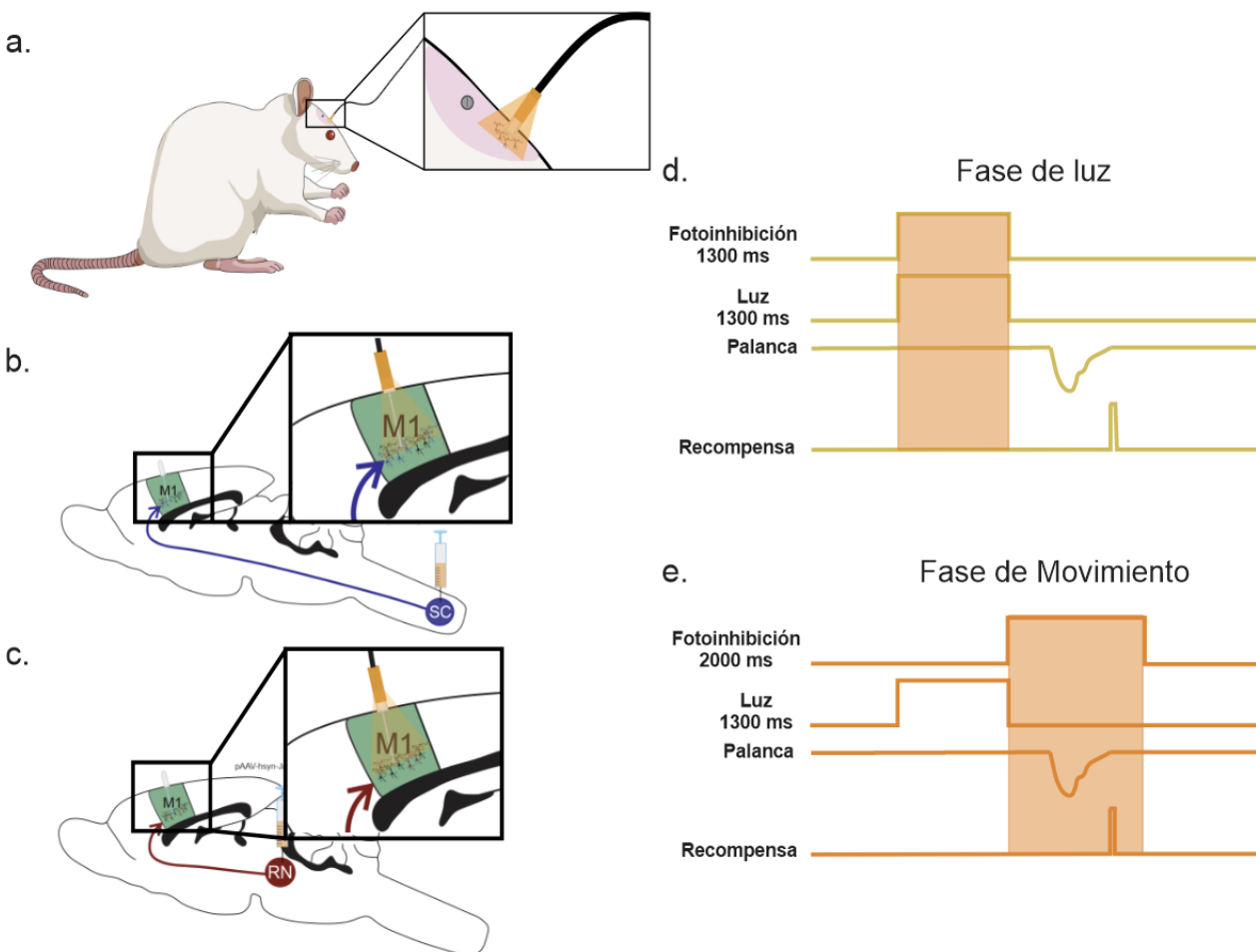


Figura 4. Estrategia de inyección viral. **a.** Inyección en la médula espinal izquierda C4-C5 para la expresión específica de las neuronas del TCE. **b.** Inyección en el núcleo rojo derecho para la expresión específica de las neuronas del TCR. M1: Corteza motora primaria; NR: Núcleo Rojo; ME: Médula Espinal.

Inhibición optogenética a través de fotoestimulación

Inhibición por optogenética

Para la inhibición de las neuronas del TCE y TCR se realizó por medio de optogenética. Se utilizó el equipo Plexon (PlexBright® Optogenetic Stimulation System) controlado por el software Radiant®, a través de pulsos de luz anaranjada (620 nm; 90mW/mm²) en 2 fases del movimiento de la tarea motora previamente aprendida (Figura 5): 1) Fase durante la luz: El estímulo inhibitorio estuvo presente durante 1300 ms de manera simultánea mientras el estímulo lumínico se encontraba encendido (Figura 5d). 2) Durante el movimiento: correspondiente al tiempo de respuesta con una duración de 2000ms (Figura 5e). (Chuong et al., 2014)



Se realizaron 5 sesiones experimentales con una duración de 50 minutos en dos grupos 1) grupo del tracto corticoespinal; 2) grupo del tracto corticorrubral. A ambos grupos a lo largo de las sesiones se les aplicaron las 2 fases de inhibición optogenética durante 10 minutos cada una, además, de una fase control con la misma duración.

Registro de la cinemática del movimiento de palanqueo

Para el registro de la cinemática del movimiento de palanqueo se colocaron sensores infrarrojos sobre la palanca para registrar la trayectoria vertical de un movimiento de palanqueo durante la tarea conductual (Figura 6). Dichos sensores fueron conectados y registrados de manera analógica a través del programa open ephys (Open Ephys Acquisition Board ®) con una frecuencia de muestreo de 5000 Hz.

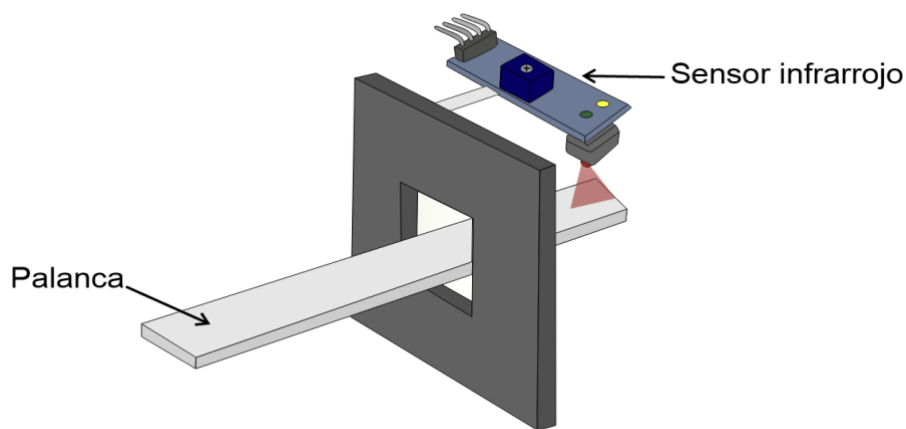


Figura 6. Esquema de la instalación del sensor infrarrojo para el registro de las trayectorias del movimiento de palanqueo.

Histología

Al finalizar las sesiones de inhibición optogenética a través de fotoestimulación, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (PISABENTAL®) 45 mg/kg i.p. y perfundidos intracardiamente con 150 ml de PB (Phosphate Buffer) al 0.1 M y posteriormente 150 ml PFA (paraformaldeído). Las médulas y cerebros se almacenaron por tres días en PFA a 4°C.

Los cerebros y médulas fueron cortados coronalmente en el vibratomo (Leica® VT1200 S) a 70 µm de grosor. Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos para capturar fotografías en un microscopio de fluorescencia (Apotome Zeiss AXIO Imager.Z1 con objetivo 10x (ZEISS Plan- APOCHROMAT, NA: 0.45) para observar los sitios de inyección, fibra y expresión del virus.

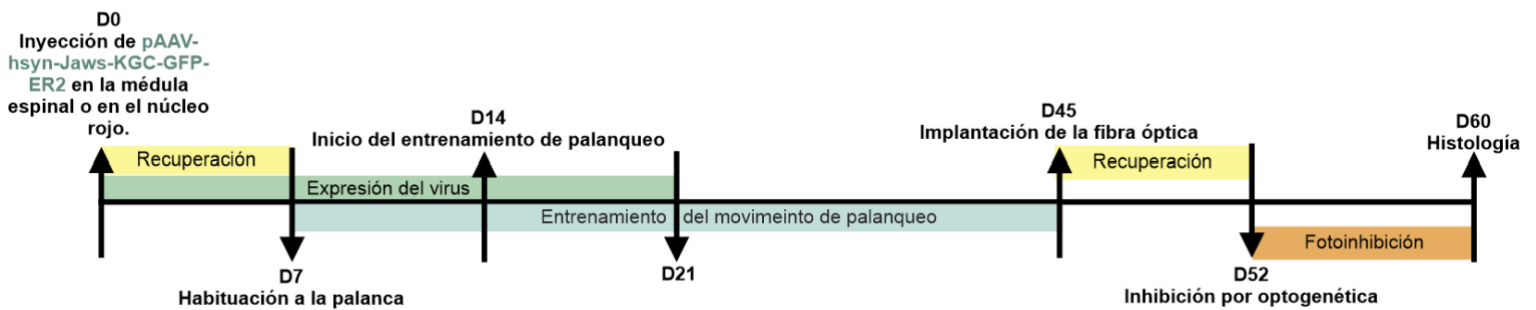


Figura 7. Diseño experimental.

Análisis de Datos

Análisis conductual

Para el análisis conductual se tomaron en cuenta las 28 de sesiones de entrenamiento de un movimiento de palanqueo, de los cuales se consideraron dos formas de evaluarla:

1. Efectividad: Se consideran todos los ensayos dentro de una sesión y se obtiene el porcentaje de aciertos, omisiones y errores de tipo “anticipado”.

$$100 \% \text{ Efectividad} = \frac{\% \text{Aciertos} + \% \text{Omisiones} + \% \text{Errores (anticipados)}}{\text{Total de ensayos}}$$

2. Desempeño: Se consideran el total de palanqueos dentro de una sesión y se obtiene el porcentaje de aciertos, errores de tipo “anticipado” y errores de tipo “fuera de

$$100 \% \text{ Desempeño} = \frac{\% \text{Aciertos} + \% \text{Errores (anticipados)} + \% \text{Errores (fuera de tiempo)}}{\text{Total de palanqueos}}$$

tiempo”.

Se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para el análisis conductual durante las fases de entrenamiento. Para los datos paramétricos se promediaron todos los aciertos, omisiones y errores por grupo ($n = 14$) y se le aplicó una ANOVA de medidas repetidas con una prueba post-hoc de Tukey's donde se tomó la primera sesión de entrenamiento como control para evaluar el aprendizaje y saber a partir de que sesión de entrenamiento los aciertos, las omisiones y los errores comenzaban a ser significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Posteriormente se hizo una clasificación de las fases de entrenamiento donde se consideraron las primeras tres sesiones (1 – 3 sesión) de entrenamiento como “ratas novatas” y las últimas tres sesiones (26 – 28 sesión) como “ratas expertas” para aplicar una T-Student para comparar entre ambos grupos.

Identificación de las trayectorias de los palanqueos

Se extrajo el registro de las 3 señales digitales de la luz y 3 analógicas de la palanca obtenidas a través del programa de OpenEphys en un archivo de extensión “.oebin” (Figura 8).

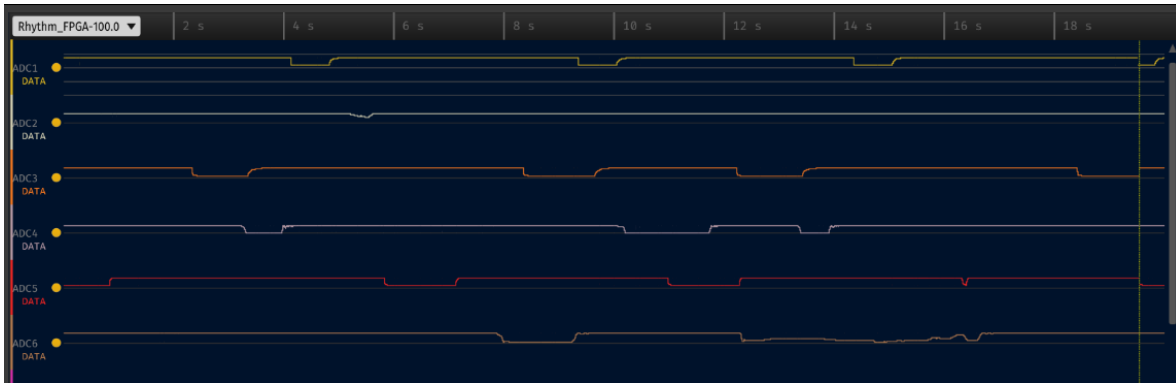


Figura 8. Programa OpenEphys para adquisición de señales de interés. Los canales ADC1, ADC3, ADC5 corresponden a la obtención de la señal digital de las luces.

Posterior a la adquisición del registro y obtención de los datos se leyeron y analizaron con un código realizado particularmente para la tarea conductual a analizar en MATLAB Simulink®. Una vez visualizados los canales en MATLAB todas las señales cada una de las señales fueron suavizadas, se identificó el umbral y se normalizaron. Todos los canales se alinearon a la primera luz que apareció para determinar este como el tiempo cero para todas las señales.

Después estas se binarizaron, siendo “0” cuando no había activación del estímulo lumínico/palanca y “1” cuando se detectaba el mayor cambio de voltaje en el tiempo, indicando el inicio del estímulo lumínico/palanca. (Figura 9). Una vez binarizados los datos se establecieron ventanas temporales entre los inicios de los estímulos lumínicos para la identificación de las trayectorias de las palancas y poder clasificarlas en:

- Palanqueos correctos
- Palanqueos incorrectos (anticipados)
- Palanqueos incorrectos (fuera de tiempo)

Una vez identificados cada uno de estos tipos de palanqueos se alinearon al inicio de la trayectoria todos los palanqueos según su clasificación y se analizaron los diferentes parámetros cinemáticos.

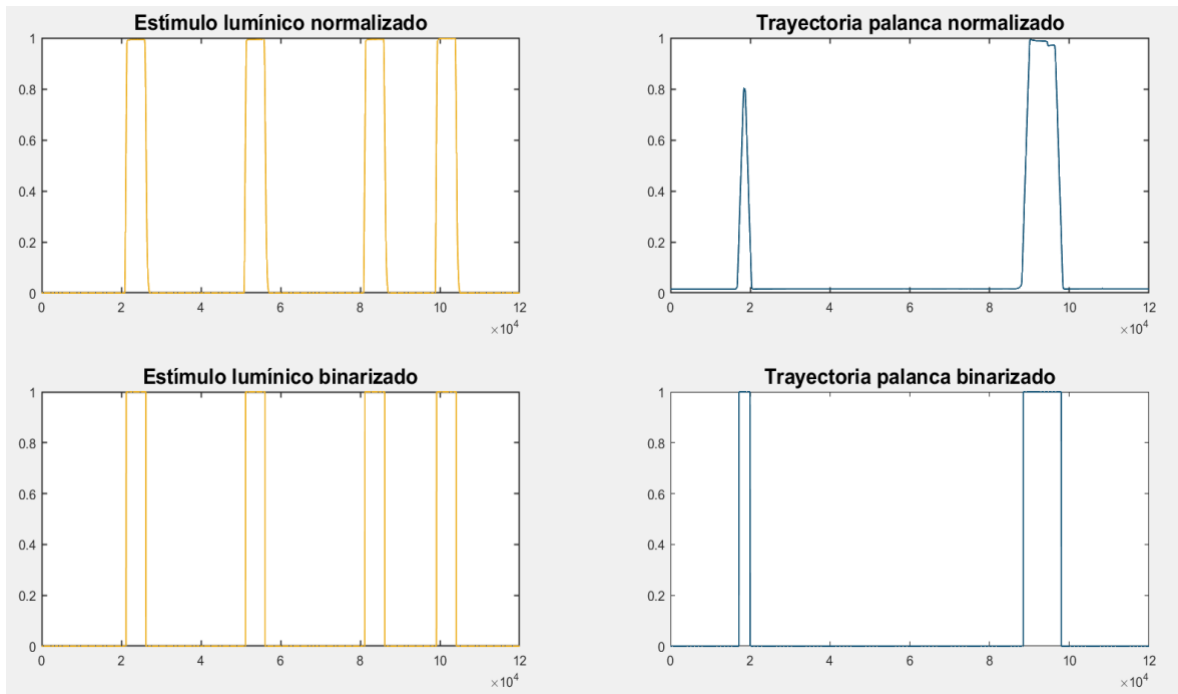


Figura 9. Normalización y binarización de los datos. a. Normalización de los estímulos lumínicos; b. Normalización de las trayectorias de las palancas; c. Binarización de los estímulos lumínicos; d. Binarización de las trayectorias de las palancas

Clasificación de las trayectorias de acuerdo con el grado de aprendizaje

Se realizó una clasificación de las trayectorias del movimiento de palanqueo de acuerdo con su grado de aprendizaje considerándose novatos de la sesión 1 a la 3, intermedias de la sesión 13 a la 15 y avanzadas de la sesión 26 a la 28. Posteriormente se evaluaron los parámetros cinemáticos de cada una de estas clasificaciones.

Análisis de los parámetros cinemáticos de las trayectorias

Los parámetros que se consideraron para el análisis cinemático fueron la duración del palanqueo, tiempo de descenso, amplitud, tiempo de reacción, velocidad, aceleración y correlación entre las trayectorias (Figura 10).

a. Duración:

La duración del palanqueo es considerada cuando al presionar la palanca pasa el umbral de 2mm y regresa a la línea base de la señal.

b. Tiempo de descenso:

Se considera el tiempo de descenso cuando al presionar la palanca pasa el umbral de 2 mm y llega al punto máximo de descenso de la trayectoria.

c. Amplitud:

La amplitud del movimiento se consideró desde la línea base hasta el punto máximo de descenso de la trayectoria.

d. Tiempo de reacción:

El tiempo de reacción es considerado desde que se apaga el estímulo lumínico (señal go) a que la rata presiona la palanca.

e. Velocidad y Aceleración:

La velocidad y aceleración fueron obtenidas a través de la fórmula de velocidad y aceleración instantánea respectivamente.

f. Correlación de palanqueos:

Para la correlación de los palanqueos se consideraron todas las trayectorias de los palanqueos aplicándose una matriz de correlación el cual permite medir y mostrar las relaciones entre cada una de las variables simultáneamente.

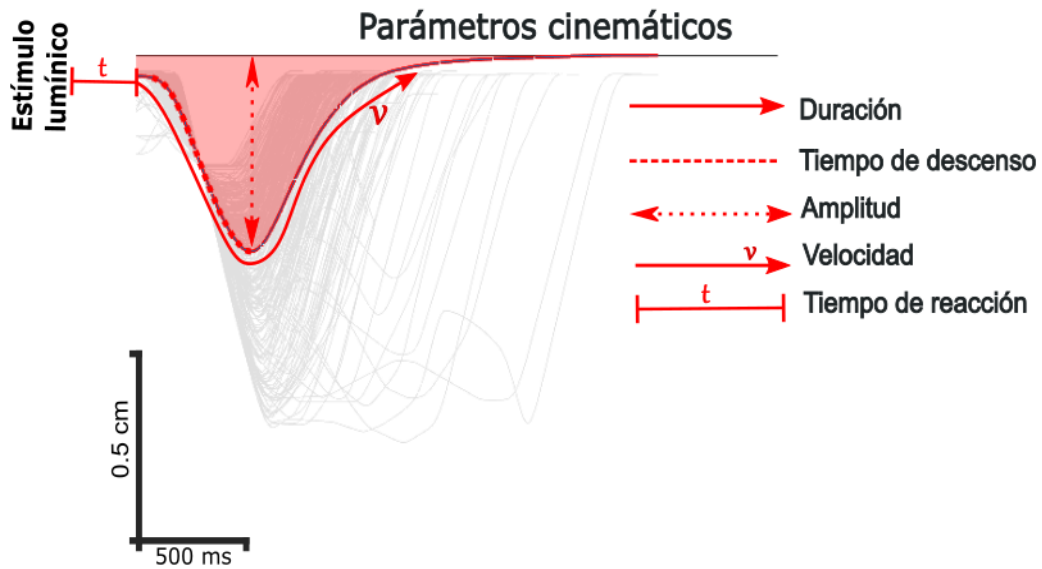


Figura 10. Parámetros cinemáticos.

Para el análisis de los parámetros cinemáticos de todos los palanqueos se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Para los datos con distribución normal se aplicó la prueba paramétrica de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey's y para aquellos que no cumplían con la normalidad se aplicó la prueba para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis con una prueba post-hoc de Dunn's.

Análisis de curvas ROC

Se realizó el análisis de las trayectorias de los palanqueos foto-inhibidos por optogenética para la comparación por ratas del palanqueo en la fase control, en la fase de luz y en la fase de movimiento. Para ello, se realizaron la reconstrucción de las trayectorias de los palanqueos en cada una de las fases de los protocolos de optogenética. Posteriormente, se promediaron todos los palanqueos para realizar una reconstrucción de la trayectoria promedio por cada uno de los animales en todas las sesiones de fotoinhibición y poder ser comparado el palanqueo de la fase control con las otras dos fases del protocolo (fase de luz y movimiento).

Con la reconstrucción de las trayectorias, se comparó ambas curvas: 1. Control vs. Luz; 2. Control vs. Movimiento. Para el análisis de estas curvas, se permutaron los datos 1000 veces para obtener el valor Área Bajo la Curva del valor ROC (AUROC) y saber en qué punto de la trayectoria de las fases inhibidas difería de la trayectoria control de cada uno de los animales. Se consideró que la trayectoria difería de la fase control cuando el valor de $p \leq 0.05$.

Resultados

Resultados conductuales

Durante la tarea conductual, se entrenaron a 14 ratas de las cuales se obtuvieron los aciertos, errores al apagar la luz y las omisiones de cada una de las 28 sesiones de entrenamiento. Para fines de comparación estadística se aplicó para los resultados distribuidos paramétricamente una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de medidas repetidas de Dunnett's para cada uno de los parámetros a evaluar de la conducta. Asimismo, se realizó una prueba t-student para comparar el desempeño de las ratas novatas (Sesión 1 a la 3) y a las ratas expertas (Sesión 26 a la 28).

Aciertos

Se observó que los aciertos por grupo comienzan a aumentar posterior a la primera sesión de entrenamiento. A partir de la sesión 8, hay un incremento significativo en el porcentaje de aciertos respecto a la primera sesión de entrenamiento ($n = 14$; ANOVA de medidas repetidas $F = 4.046$; $p = <0.0001$; Dunnett's sesión 1 vs sesión 8: $p = .0456$). En las últimas tres sesiones se alcanzaron el $37.84\% \pm 17.53$ de los aciertos indicando que las ratas han aprendido la tarea (Figura 11a). Al comparar las ratas novatas (sesión 1) contra las expertas (sesión 28) se observó que al ser expertas estas aumentaban sus aciertos significativamente ($n = 14$; Prueba t-Student para datos no pareados: $t = 9$, $df = 82$; $p = 0.0001$) (Figura 11b).

Omisiones

El número de omisiones fue en decremento durante el entrenamiento, teniendo una diferencia significativa entre la primera y séptima sesión de entrenamiento ($n = 14$: ANOVA de medidas repetidas $F = 4.525$; $p = <0.0001$; Dunnett's sesión 1 vs sesión 5: $p = .0110$). Se observó un decremento de omisiones de las primeras tres sesiones de entrenamiento con un $80.96\% \pm 13.55$ respecto a las últimas tres sesiones de entrenamiento a un $41.98\% \pm 21.60$ (Figura 11c). Este mismo fenómeno se observa en la comparación de ratas novatas contra expertas las cuales, disminuyeron significativamente el porcentaje de omisiones ($n = 14$; Prueba t-Student para datos no pareados: $t = 9.908$, $df = 82$; $p < 0.0001$) (Figura 11d).

Errores anticipados

En las primeras tres sesiones de entrenamiento, las ratas presentan un porcentaje de errores del $7.8\% \pm 5$; sin embargo, a partir de la sesión 5 ($n = 14$: ANOVA de medidas repetidas $F = 3.476$; $p = 0.0001$; Dunnett's sesión 1 vs sesión 5: $p = .0411$) estas incrementaron sus errores, manteniéndose de manera constante con un promedio del $17.83\% \pm 7.873$ en las últimas 3 sesiones. En cuanto a la comparación del grupo de ratas novatas contra las expertas no se observó una diferencia significativa ($n = 14$; Prueba t-Student para datos no pareados: $t = 7.511$, $df = 82$; $p < 0.0625$) (Figura 11f).

El incremento gradual de los aciertos, acompañado de un mantenimiento en errores y las omisiones con un importante decremento, permite concluir que la tarea conductual fue aprendida por las ratas.

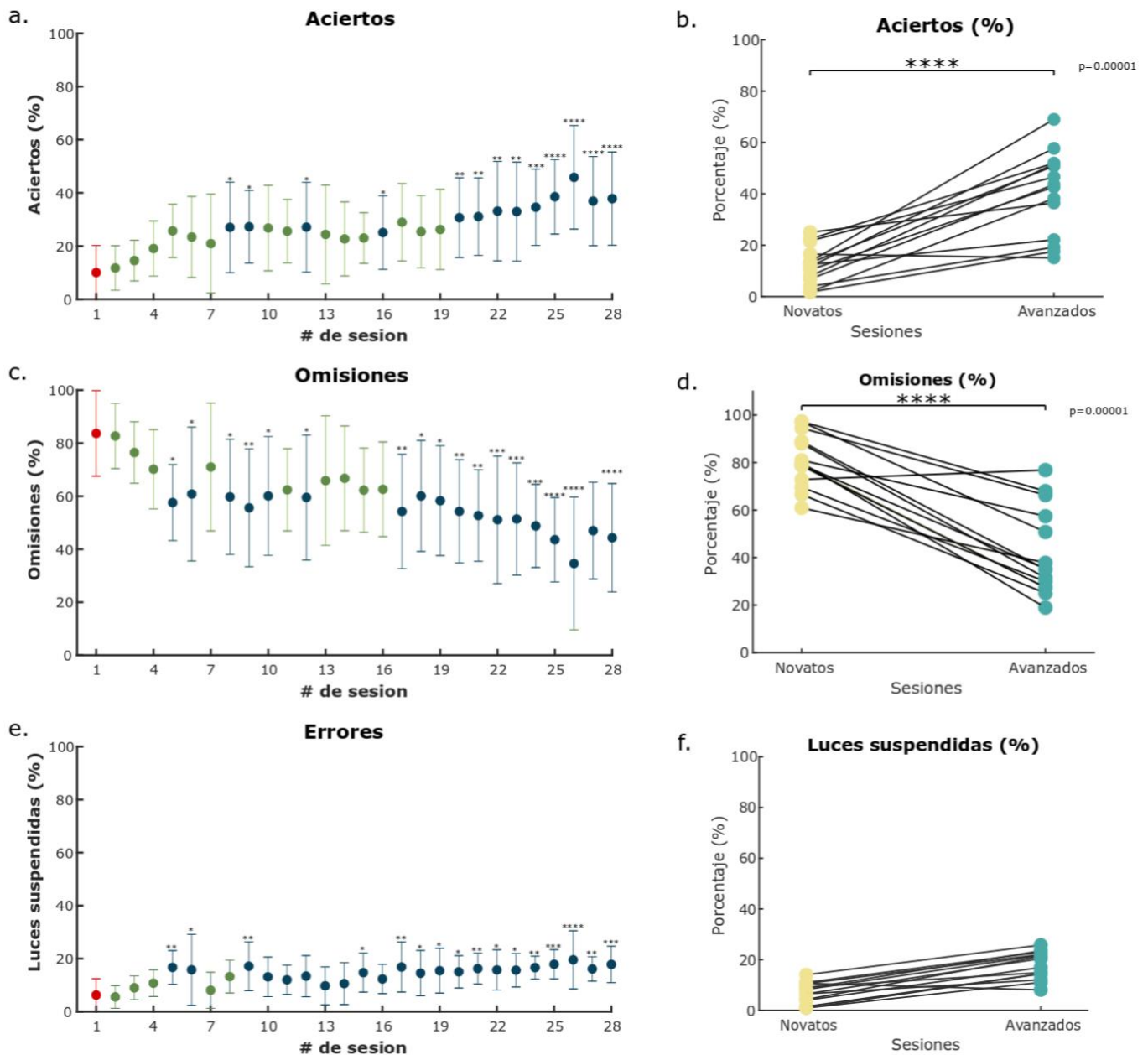


Figura 11. **Resultados del desempeño conductual.** Código de color indica: en rojo la primera sesión de entrenamiento con la que fueron comparadas las demás sesiones de entrenamiento; en verde la sesiones que no tuvieron cambios significativos respecto a la primera sesión y en azul marino aquellas sesiones que tuvieron diferencias significativas respecto a la primera sesión de entrenamiento. a. Porcentaje de aciertos por grupo; b. Comparación de aciertos de ratas novatas contra las expertas; c. Porcentaje de omisiones por grupo; d. Comparación de omisiones de ratas novatas contra las expertas; e. Porcentaje de errores al suspender la luz; f. Errores de ratas novatas contra las expertas. (n = 14; ANOVA de una vía con prueba post-hoc Dunnett's).

Clasificación de las trayectorias de acuerdo con su grado de aprendizaje

Se realizó una clasificación de acuerdo con el grado de aprendizaje en ratas novatas (sesiones 1 a la 3), intermedias (sesiones 13 a la 15) y avanzadas (sesiones 26 a la 28), se analizaron las trayectorias del movimiento de palanqueo de cada una de ellas. La figura 12 ejemplifica las trayectorias de movimiento de una rata según su grado de aprendizaje del movimiento donde se observa que en las sesiones donde los animales eran novatos presentan movimientos menos estereotipados (Figura 12) y la correlación de los palanqueos entre ellos es menor ($R = 0.5943$). En etapas intermedias (Figura 12b) se empieza a ver una homogeneidad en las trayectorias aumentando su grado de correlación entre los palanqueos ($R = 0.726$). Finalmente podemos observar que las ratas expertas (Figura 12c) tenían una mayor correlación entre si ($R = 0.8550$) y las trayectorias se muestran más estereotipadas.

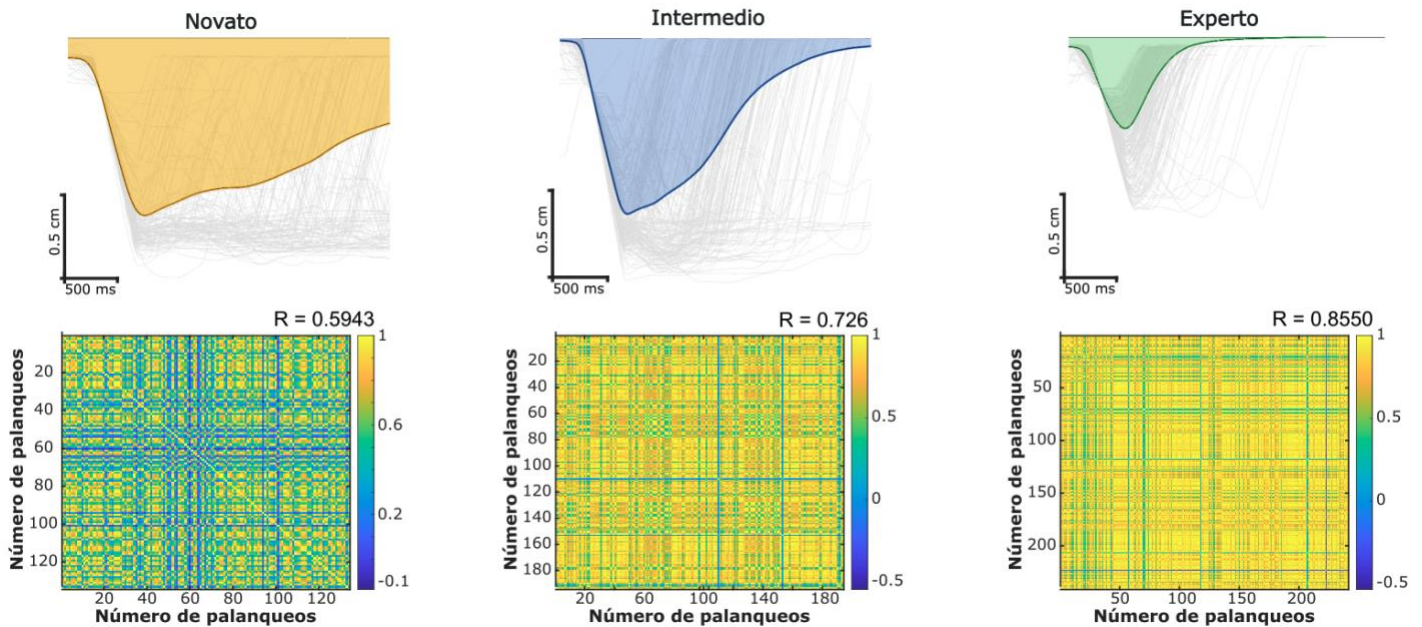


Figura 12. Representación de las trayectorias de palanqueos correctos de las ratas en diferentes fases de aprendizaje. a. Trayectorias de ratas novatas y su nivel de correlación; b. Trayectorias de ratas intermedias y su grado de correlación; c. Trayectoria de ratas expertas y su nivel de correlación.

El código de color indica en colores cálidos (amarillos) una mayor correlación entre los palanqueos y en colores fríos (azules) una menor correlación entre los palanqueos.

Parámetros cinemáticos de las ratas en las diferentes etapas de aprendizaje

Duración

La duración de los palanqueos fue decreciendo conforme las sesiones de entrenamiento transcurrían, encontrándose diferencia significativa entre las ratas novatas vs intermedias y entre las ratas intermedias vs avanzadas. Las ratas novatas obtuvieron un promedio de duración de palanqueo de 0.9210 ± 1.150 s; las intermedias una media de 0.9060 ± 0.8832 s y las avanzadas 0.7665 ± 0.7382 s. (n = 14; Kruskal-Wallis H = 93.91; p = <0.0001; Dunn's novatos vs avanzados p = <0.0001; Dunn's intermedios vs avanzados p = <0.0001) (Figura 13a).

Tiempo de descenso

El tiempo de descenso del palanqueo de las ratas novatas fue de 0.5504 ± 0.18939 s; las intermedias de 0.5416 ± 0.1713 s y de las avanzadas 0.5276 ± 0.1596 s mostrándose una diferencia significativa en el tiempo de descenso del palanqueo entre los novatos vs. intermedios (n = 14; Kruskal-Wallis H = 124; p = <0.0001 ; Dunn's p = <0.0001), novatos vs. avanzados (n = 14; Dunn's p = <0.0001) e intermedios vs. avanzados (n = 14; ANOVA de una vía F = 27.57 ; p = <0.0001 ; Dunn's p = 0.0003) demostrándose que conforme van aprendiendo la tarea motora el tiempo de bajada se vuelve más rápido (Figura 13b).

Amplitud

Conforme a la amplitud con la que la palanca descendía para realizar la trayectoria cuando las ratas novatas tenían una media de 1.020 ± 0.3061 cm; en etapas intermedias de 1.059 ± 0.2866 cm y en avanzadas el movimiento disminuía su amplitud a 0.8540 ± 0.3097 cm, encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos de aprendizaje (n = 14; Kruskal-Wallis H = 907.4; p = <0.0001; Dunn's novatos vs intermedios: p = 0.0001; Dunn's novatos vs avanzados p = <0.0001; Dunn's intermedios vs avanzados: p = <0.0001) (Figura 13c).

Tiempo de reacción

Los tiempos de reacción fueron disminuyéndose conforme transcurrían las sesiones de entrenamiento comenzando en los novatos con $0.4782 \text{ s} \pm 0.2740 \text{ s}$, intermedios con $0.4215 \pm 0.2851 \text{ s}$ y avanzados con $0.3547 \pm 0.2623 \text{ s}$ siendo estos tiempos significativamente diferentes entre los tres grupos de aprendizaje ($n = 14$; Kruskal-Wallis $H = 158.9$; $p = <0.0001$; Dunn's novatos vs intermedios $p = 0.0003$; Dunn's novatos vs avanzados $p = <0.0001$; Dunn's intermedios vs avanzados: $p = <0.0001$) (Figura 13d).

Velocidad

La velocidad de los palanqueos a lo largo de las sesiones fue disminuyendo debido a que los novatos palanqueaban a $79.06 \pm 42.30 \text{ cm/s}$, los intermedios $77.17 \pm 44.23 \text{ cm/s}$ y los avanzados $69.55 \pm 52.70 \text{ cm/s}$, con una diferencia significativa entre los grupos de los novatos vs los avanzados y los intermedios vs avanzados ($n = 14$; Kruskal-Wallis $H = 329.3$; $p = <0.0001$; Dunn's novatos vs. intermedios $p = 0.0247$; Dunn's novatos vs avanzados $p = <0.0001$; Dunn's intermedios vs avanzados $p = <0.0001$) (Figura 13e).

Aceleración

Al igual que la velocidad la aceleración de los palanqueos disminuyó conforme pasaban las sesiones de entrenamiento siendo que los novatos aceleraban con una media de $0.09837 \pm 48.94 \text{ cm/s}^2$, los intermedios con $0.3181 \pm 43.51 \text{ cm/s}^2$ y los avanzados con $0.01492 \pm 35.84 \text{ cm/s}^2$. A pesar de la disminución de la aceleración no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. (Figura 13f).

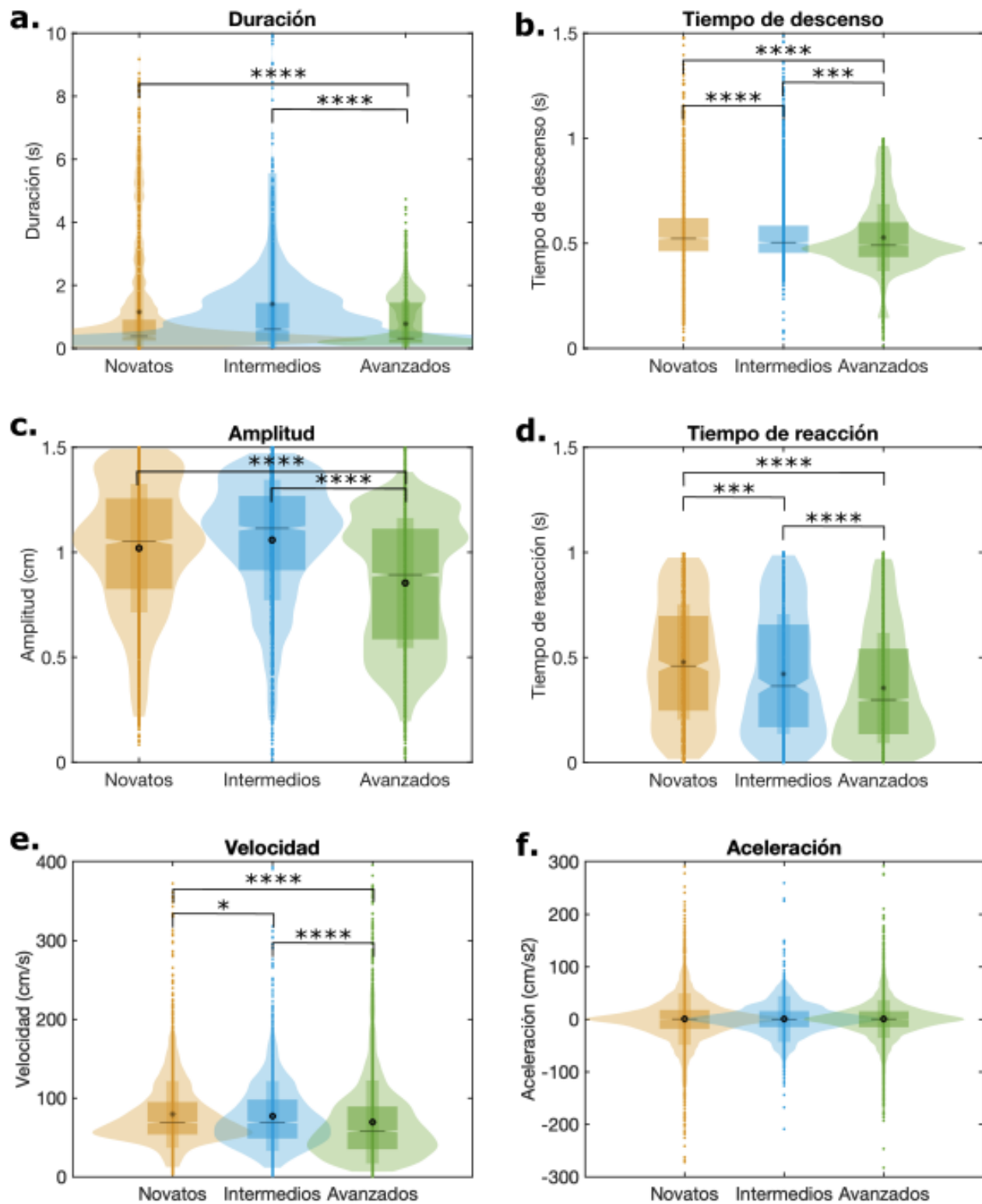


Figura 13. El movimiento de palanqueo se perfecciona conforme avanza el entrenamiento. En código de color se muestra: En mostaza a las ratas novatas; color azul a las ratas intermedias y en color verde a las ratas avanzadas. a. Duración del movimiento; b. Tiempo de descenso de la palanca; c. Amplitud del movimiento; d. Tiempos de reacción; e. Velocidad; f. Aceleración. (n = 14; prueba Kruskal-Wallis con prueba post-hoc Dunn's)

En los gráficos de cajas se representa con: asterisco (*) el promedio de cada uno de los grupos; línea horizontal (-) la mediana; cada uno de los puntos (.) son los datos en bruto. Los bigotes representan la desviación estándar de los datos. Los violines observamos la distribución de los datos.

Inhibiciones optogenéticas

Expresión del virus pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2

Se corroboró la expresión del virus retrógrado por medio de la confirmación del sitio de inyección del virus del grupo de corticoespinales en C5 (Figura 14a) y la expresión de este virus en M1 y M2 en Bregma 2.20 (Figura 14b) con una mayor predominancia de la expresión de estas neuronas marcadas retrógradamente en M1. Para el grupo de las corticorrubrales se muestra el sitio de inyección en el núcleo rojo derecho (Figura 14d) y la expresión de este virus en M1 y M2 en Bregma 2.20 (Figura 14e) con una mayor expresión a de este grupo de neuronas en M2.

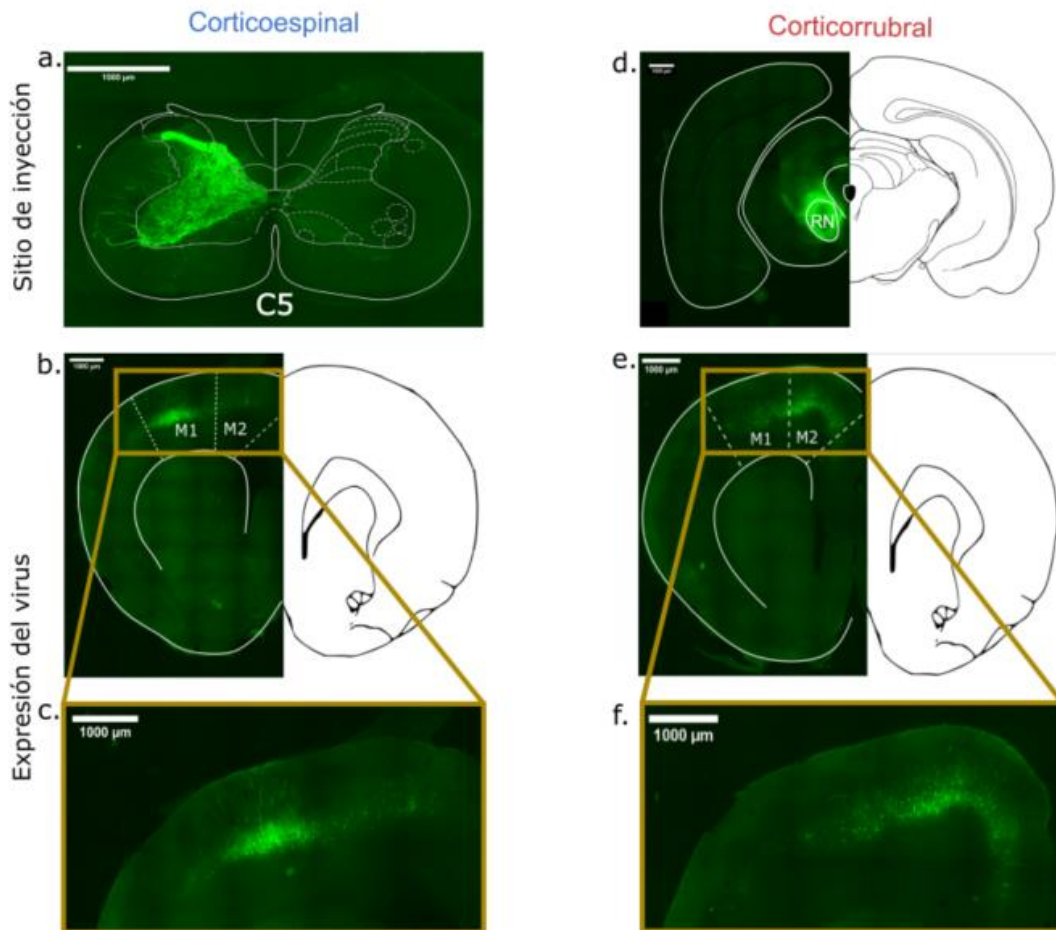


Figura 14. Expresión del virus pAAV-hsyn-Jaws-KGC-GFP-ER2. A. Sitio de inyección del grupo corticoespinal a nivel de C5; b. Expresión del virus en Bregma 2.20 en cortezas M1 y M2; c. Amplificación del sitio de expresión de las neuronas corticoespinales; d. Sitio de inyección del grupo de corticorrubrales en núcleo rojo derecho; e. Expresión del virus en Bregma 2.20 en cortezas M1 y M2; f. Amplificación del sitio de expresión de las neuronas corticorrubrales.

Implantación de la fibra óptica

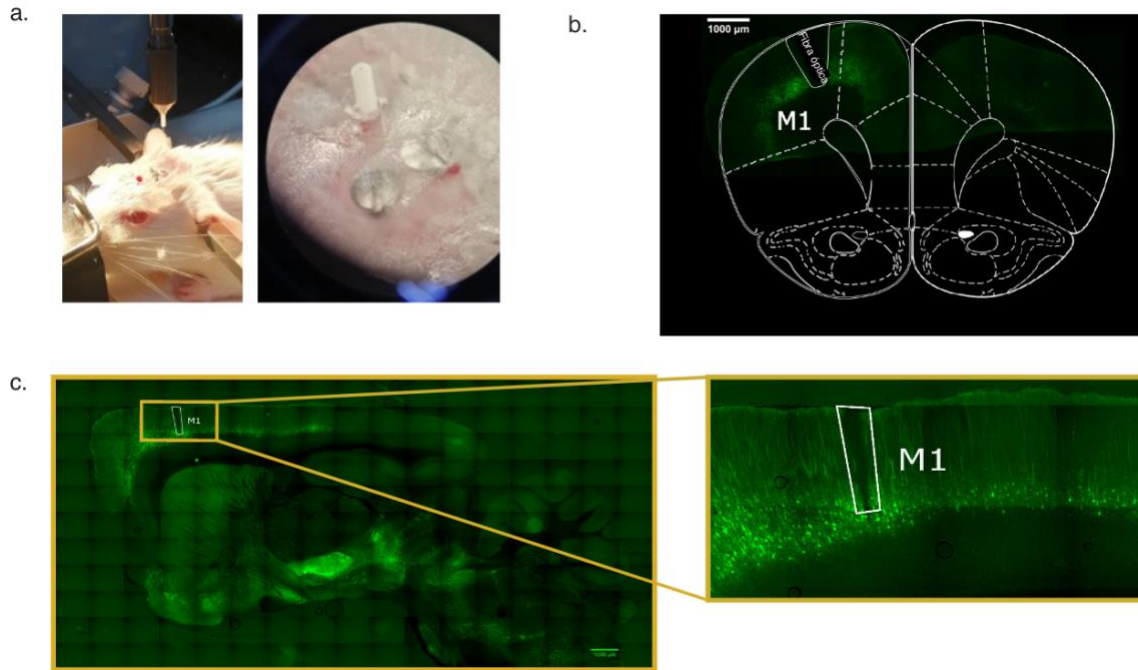


Figura 15. Implantación de la fibra óptica. a. Implantación de fibra óptica en estereotáxico; b. Corte coronal 2.20 um respecto a Bregma; c. Corte sagital del cerebro en ML: 2.00 um par corroboración de implantación de la fibra en la capa 5b.

f

Resultados conductuales de los grupos fotoinhibidos

Corticoespinales

Aciertos

Se obtuvieron 170.6 ± 43.63 aciertos durante la fase control; en la fase de inhibición de luz 106.8 ± 47.74 aciertos y en la fase de movimiento de 116.4 ± 53.70 aciertos. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de inhibición ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas $F = 8.410$; $p = 0.0386$; Tukey's control vs. luz $p = 0.0338$) (Figura 16a).

Omisiones

Se obtuvieron 196.3 ± 95.86 omisiones en el grupo control; en la fase de inhibición de luz se obtuvieron 165.2 ± 81.40 omisiones y en la fase de movimiento de 153.8 ± 85.17 omisiones. Se observó una disminución en las omisiones en ambas fases de inhibición, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas $F = 0.2769$; $p = 0.7633$) (Figura 16b).

Errores anticipados

En la fase control se obtuvieron 92.40 ± 34.46 errores; en la fase de luz los errores disminuyeron a 80.60 ± 43.70 errores y en la fase de movimiento a 80.80 ± 41.59 errores. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de inhibición ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas $F = 0.1418$; $p = 0.8692$) (Figura 16c).

Errores fuera de tiempo

Se obtuvieron 187.2 ± 89.14 errores en la fase control; en la fase de luz 165.2 ± 81.40 errores y en la fase de movimiento 152.8 ± 85.17 errores. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de inhibición ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas $F = 0.6630$; $p = 0.5150$) (Figura 16d).

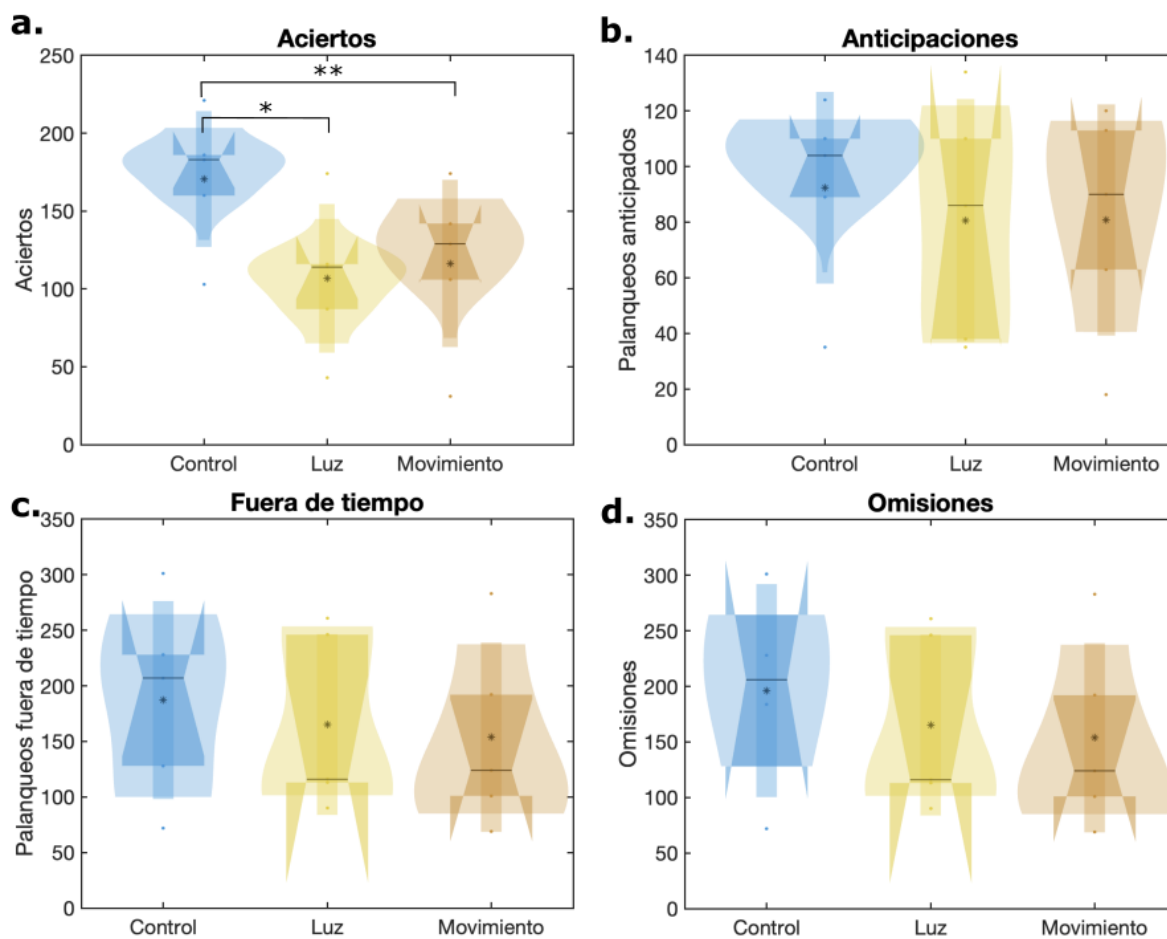


Figura 16. La fotoinhibición de las neuronas corticoespinales influye en los aciertos de la tarea conductual. El código de color indica en azul al grupo control de corticoespinales; en amarillo al grupo inhibido durante la etapa de luz y en naranja al grupo inhibido durante el movimiento. a. Aciertos; b. Anticipaciones de los palanques; c. Palanques fuera de tiempo. d. Omisiones de los ensayos. (n = 4; prueba ANOVA medidas repetidas con prueba post-hoc Tukey's).

En los gráficos de cajas se representa con: asterisco (*) el promedio de cada uno de los grupos; la línea horizontal (-) la mediana; cada uno de los puntos (.) son los datos en bruto; y cada uno de sus cuartiles. Los bigotes representan la desviación estándar de los datos. Los violines observamos la distribución de los datos.

Corticorubrales

Aciertos

Se obtuvieron 187 ± 48.28 aciertos durante la fase control; en la fase de inhibición de luz 145 ± 31.76 aciertos y en la fase de movimiento de 142.7 ± 55.14 aciertos. A pesar de la disminución en los aciertos en ambas fases de inhibición no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de inhibición ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas $F = 1.804$; $p = 0.3094$) (Figura 17a).

Omisiones

Se obtuvieron 132 ± 24.43 omisiones en el grupo control; en la fase de inhibición de luz se obtuvieron 88.67 ± 37.42 omisiones y en la fase de movimiento de 119.3 ± 29.30 omisiones. No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes fases de inhibición ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas $F = 1.187$; $p = 0.3937$) (Figura 17b).

Errores anticipados

En la fase control se obtuvieron 71.67 ± 4.163 errores; en la fase de luz los errores disminuyeron a 44.33 ± 10.21 errores y en la fase de movimiento a 54 ± 27.71 errores. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de inhibición ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas $F = 2.194$; $p = 0.2719$) (Figura 17c).

Errores fuera de tiempo

Se obtuvieron 71.67 ± 4.163 errores en la fase control; en la fase de luz 113.3 ± 33.23 errores y en la fase de movimiento 119 ± 28.93 errores. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de inhibición ($n = 4$; ANOVA de medidas repetidas $F = 8.044$; $p = 0.1027$) (Figura 17d).

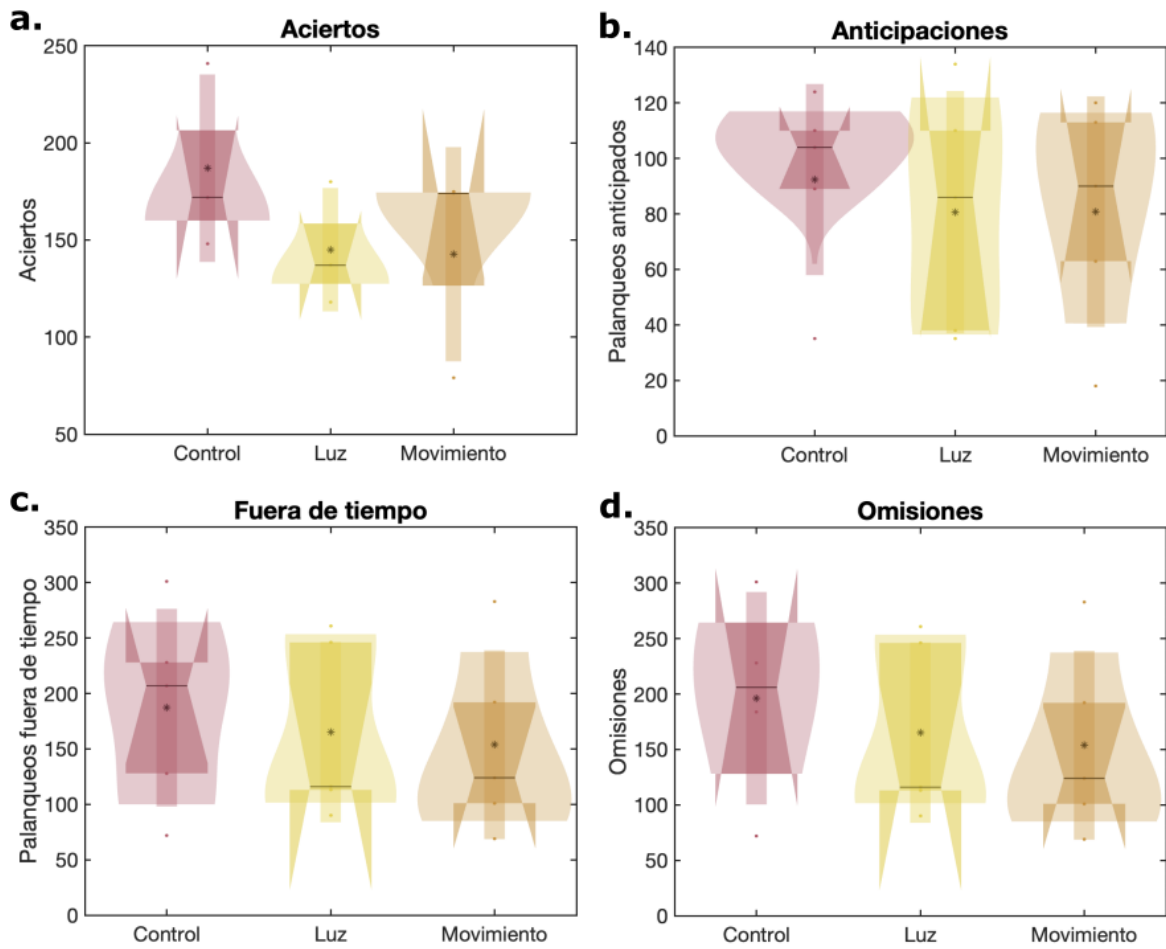


Figura 17. La efectividad de la tarea conductual no se afecta con la fotoinhibición de las neuronas corticoespinales. El código de color indica en vino al grupo control de corticorrubrales; en amarillo al grupo inhibido durante la etapa de luz y en naranja al grupo inhibido durante el movimiento. A. Aciertos; B. Anticipaciones de los palanqueos; C. Palanqueos fuera de tiempo. D. Omisiones de los ensayos. ($n = 4$; ANOVA medidas repetidas con prueba post-hoc Dunn's).

En los gráficos de cajas se representa con: asterisco (*) el promedio de cada uno de los grupos; la línea horizontal (-) la mediana; cada uno de los puntos (.) son los datos en bruto; y cada uno de sus cuartiles. Los bigotes representan la desviación estándar de los datos. Los violines observamos la distribución de los datos.

Resultados cinemáticos de los grupos fotoinhibidos

Corticoespinales

Duración

La duración de los palanqueos aumento significativamente por efecto de la fotoinhibición optogenética. En la fase control la duración fue de 1.219 ± 1.742 s; en la fase de luz de 1.919 ± 1.035 s y en la fase de movimiento de 2.218 ± 2.333 s. (n = 4; Kruskal-Wallis H = 17.72; p = 0.0027; Dunn's control vs luz p = 0.0002; Dunn's control vs movimiento p = 0.0046). (Figura 18a).

Tiempo de descenso

El tiempo de descenso disminuyó significativamente en la fase de inhibición de la luz, mientras que en la fase de inhibición del movimiento aumentó significativamente el tiempo con el cual descendían la palanca. En la fase control la duración de descenso fue de $0.4029 \text{ s} \pm 0.2176$; en la fase de luz de $0.5436 \text{ s} \pm 0.3285$ y en la fase de movimiento de $0.3385 \text{ s} \pm 0.3956$. (n = 4; Kruskal-Wallis H = 126.3; ; p = <0.0001; Dunn's control vs luz p = <0.0001 ; Dunn's control vs movimiento p = 0.0312) (Figura 18b).

Amplitud

La amplitud de la palanca disminuyó significativamente en ambos protocolos de fotoinhibición. En la fase control fue de $1.077 \text{ cm} \pm 0.3956$; la fase de luz de $0.7855 \text{ cm} \pm 0.4229$ y en la fase de movimiento de $0.9594 \text{ cm} \pm 0.3024$. (n = 4; Kruskal-Wallis H = 45.77; p = <0.0001; Dunn's control vs luz p = <0.0001; Dunn's control vs movimiento p = 0.0005) (Figura 18c).

Tiempo de reacción

No se observaron diferencias significativas en los tiempos de reacción por efecto de la inhibición en los dos protocolos aplicados. El tiempo de reacción en la fase control fue de $0.6563 \text{ s} \pm 0.3956$; en la fase de luz de $0.7097 \text{ s} \pm 0.3956$ 0.5789 y en la fase de movimiento de $0.6651 \text{ s} \pm 0.3956$ 0.5702 . (n = 4; Kruskal-Wallis = 2.662; p = 0.2642) (Figura 18d).

Velocidad

La velocidad se vio afectada significativamente con una disminución en ambas fases de la inhibición optogenética. La velocidad de los palanqueos en la fase control fue de $105 \text{ cm/s} \pm 99.41$; en la fase de luz de $49.63 \text{ cm} \pm 52.55$ y en la fase de movimiento de $44.97 \text{ cm} \pm 40.79$. ($n = 4$; Kruskal-Wallis $H = 142.1$; $p = <0.0001$; Dunn's control vs luz $p = <0.0001$; Dunn's control vs movimiento $p = <0.0001$) (Figura 18e).

Aceleración

No se encontraron diferencias significativas en la aceleración en ninguna de las fases de inhibición. La aceleración de los palanqueos del grupo de corticoespinales en la fase control tenía una media de $0.5206 \text{ cm/s}^2 \pm 34.53$; en la fase de luz de $0.5335 \text{ cm/s}^2 \pm 64.05$ y en la fase de movimiento de $0.3408 \text{ cm/s}^2 \pm 22.25$. ($n = 4$; Kruskal-Wallis $H = 0.6188$) (Figura 18f).

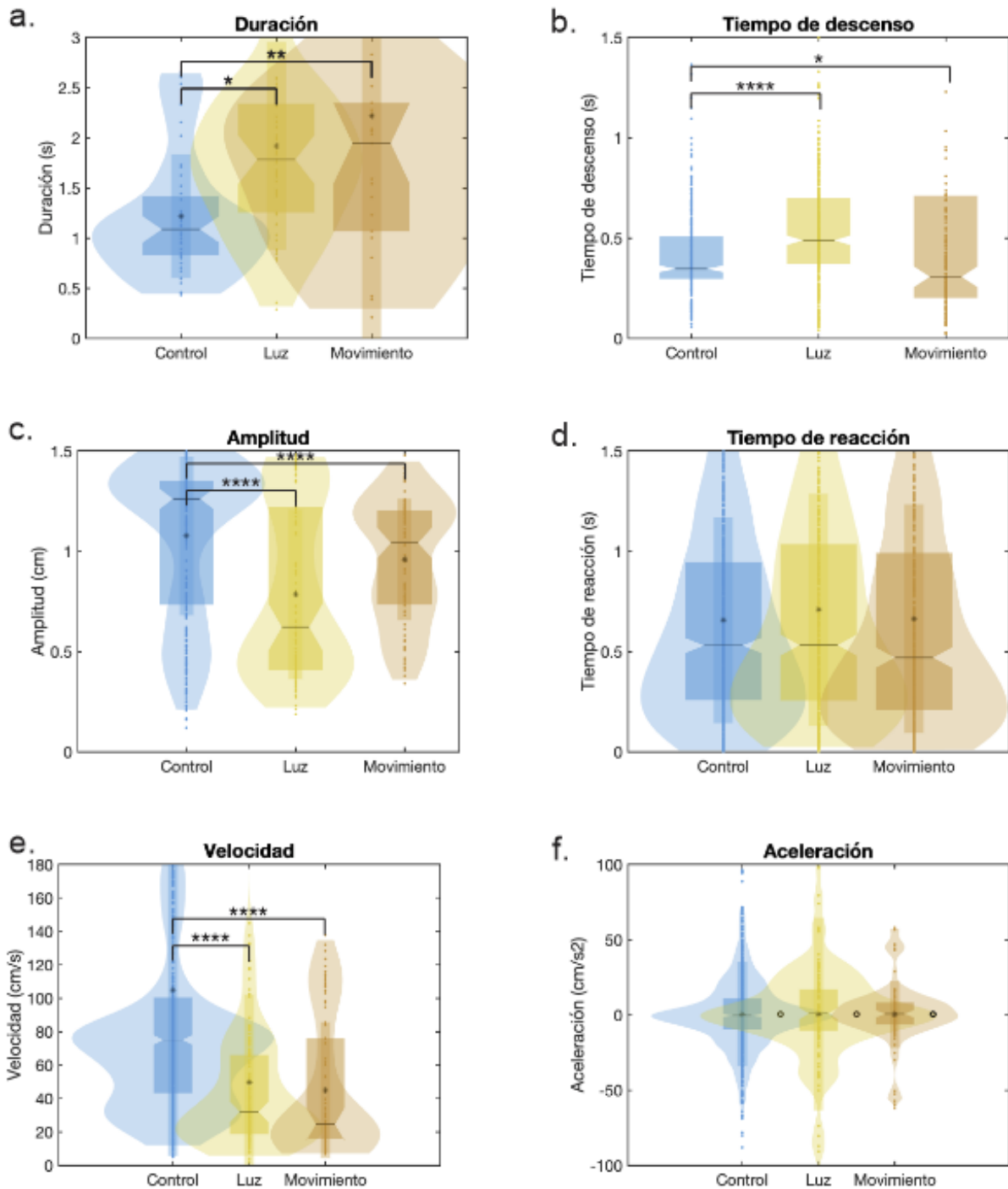


Figura 18. Las neuronas corticoespinales influyen en la duración, amplitud y velocidad del movimiento. El código de color indica en azul para el grupo control de corticoespinales; en amarillo para la fase de inhibición durante la luz y el naranja para la fase de inhibición de movimiento. A. Duración de los palanqueos en las tres fases de inhibición; B. Tiempo de descenso del palanqueo; C. Amplitud del movimiento de palanqueo; D. Tiempo de reacción para oprimir la palanca; E. Velocidad del movimiento de palanqueo; F. Aceleración del movimiento de palanqueo. (n =4; Kruskal-Wallis con prueba post-hoc Dunn's)

En los gráficos de cajas se representa con: asterisco (*) el promedio de cada uno de los grupos; la línea horizontal (-) la mediana; cada uno de los puntos (.) son los datos en bruto; y cada uno de sus cuartiles. Los bigotes representan la desviación estándar de los datos. Los violines observamos la distribución de los datos.

Corticorrubrales

Duración

No se observaron diferencias significativas en la duración de la palanca entre los grupos de inhibición. La duración de los palanqueos en la fase control fue de 1.883 ± 1.281 s; en la fase de luz de 3.100 ± 3.103 s y en la fase de movimiento de 1.752 ± 0.9281 s. ($n = 4$; Kruskal-Wallis $H = 3.750$; $p = 0.1534$). (Figura 19a).

Tiempo de descenso

El tiempo de descenso mostró una disminución significativa en la fase de inhibición de la luz. El tiempo de descenso en la fase control fue de $0.47479 \text{ s} \pm 0.3215$; en la fase de luz de $0.5907 \text{ s} \pm 0.4857$ y en la fase de movimiento de $0.4992 \text{ s} \pm 0.2687$. ($n = 4$; Kruskal-Wallis $H = 55.69$; $p = <0.0001$; Dunn's control vs luz $p = <0.0001$) (Figura 19b).

Amplitud

La amplitud del movimiento de palanqueo mostró una disminución significativa cuando el movimiento fue inhibido en la fase de luz. La amplitud del movimiento durante la fase control fue de $0.8752 \text{ cm} \pm 0.4160$; durante la fase de luz de $0.7746 \text{ cm} \pm 0.3893$ y en la fase de movimiento de $0.9864 \text{ cm} \pm 0.2950$. ($n = 4$; Kruskal-Wallis $H = 20.62$; $p = <0.0001$; Dunn's control vs luz $p = <0.0023$; Dunn's control vs. movimiento $p = 0.0417$) (Figura 19c).

Tiempo de reacción

El tiempo de reacción aumentó en ambas fases de la inhibición del movimiento, sin embargo, mostró una diferencia significativa cuando este fue inhibido en la fase de luz. El tiempo de reacción del grupo control tiene una media de $0.6308 \text{ s} \pm 0.3215$; el grupo de luz de $0.7667 \text{ s} \pm 0.5474$ y el de movimiento de $0.7051 \text{ s} \pm 0.5437$. ($n = 4$; Kruskal-Wallis $H = 16.29$ $p = 0.0003$; Dunn's control vs luz $p = 0.0001$) (Figura 19d).

Velocidad

La velocidad mostró una disminución significativa cuando el movimiento fue inhibido en ambas fases, la de luz y la del todo el movimiento. La velocidad de los palanqueos en la fase control fue de $81.88 \text{ cm/s} \pm 87.71$; en la fase de luz de $53.73 \text{ cm} \pm 64$ y en la fase de movimiento de $30.87 \text{ cm} \pm 18.86$. ($n = 4$; Kruskal-Wallis $H = 105.7$; $p = <0.0001$; Dunn's control vs luz $p = <0.0001$; Dunn's control vs movimiento $p = <0.0001$) (Figura 19e).

Aceleración

No se encontraron diferencias significativas en la aceleración en ninguna de los grupos de inhibición. La aceleración de los palanqueos del grupo de corticoespinales en la fase control tenía una media de $-0.40 \text{ cm/s}^2 \pm 59.05$; en la fase de luz de $-1.385 \text{ cm/s}^2 \pm 72.33$ y en la fase de movimiento de $1.391 \text{ cm/s}^2 \pm 26.87$. ($n = 4$; Kruskal-Wallis = 0.5671) (Figura 19f).

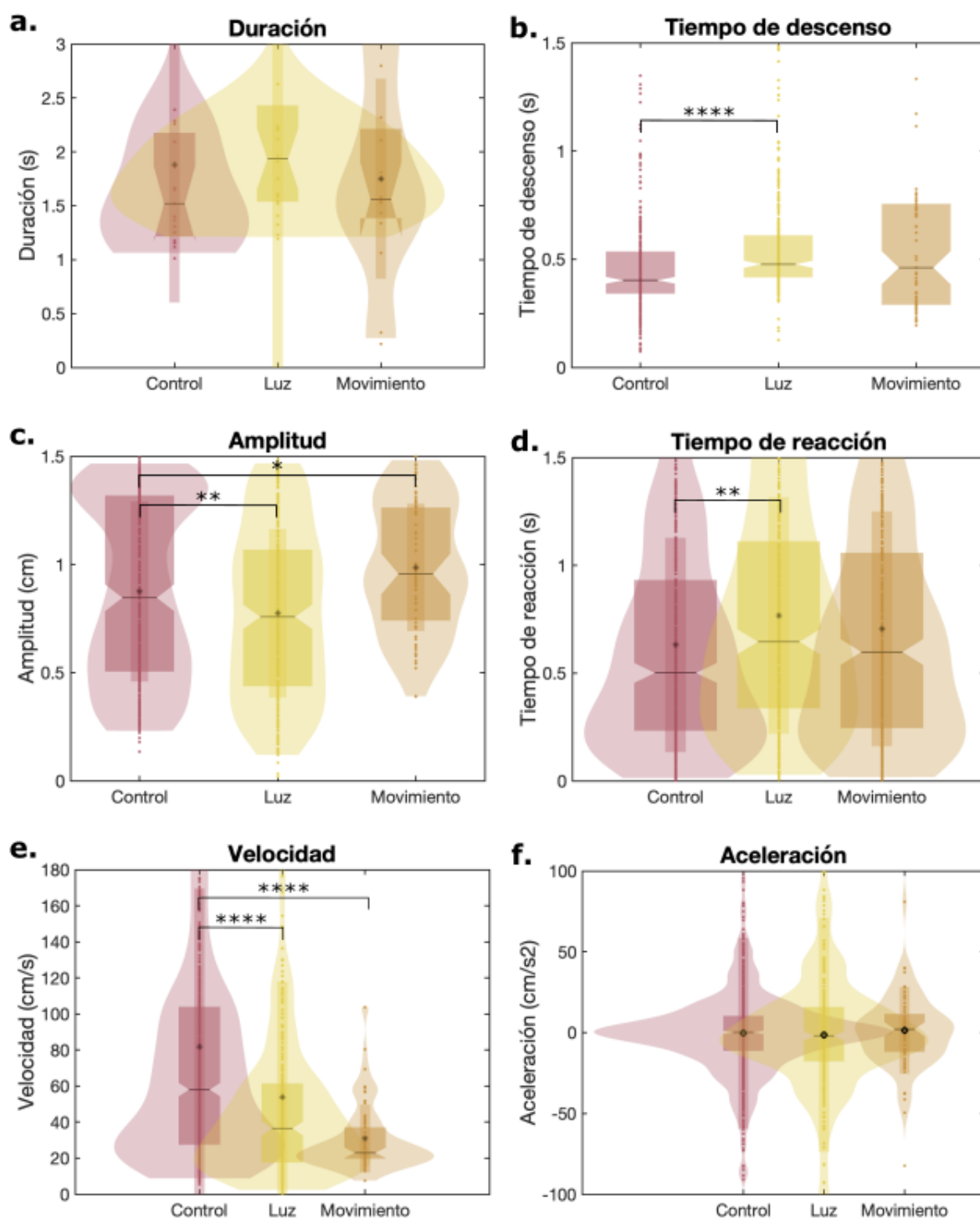


Figura 19. La fotoinhibición de las neuronas corticorrubrales influye en la amplitud, el tiempo de reacción y la velocidad del movimiento. El código de color indica en vino para el grupo control de corticorrubrales; en amarillo para la fase de inhibición durante la luz y el naranja para la fase de inhibición durante el movimiento. A. Duración de los palanqueos en las tres fases de inhibición; B. Tiempo de descenso del palanqueo; C. Amplitud del movimiento de palanqueo; D. Tiempo de reacción para oprimir la palanca; E. Velocidad del movimiento de palanqueo; F. Aceleración del movimiento de palanqueo. (n = 4; Kruskal-Wallis con prueba post-hoc Dunn's)

En los gráficos de cajas se representa con: asterisco (*) el promedio de cada uno de los grupos; la línea horizontal (—) la mediana; cada uno de los puntos (.) son los datos en bruto; y cada uno de sus cuartiles. Los bigotes representan la desviación estándar de los datos. Los violines observamos la distribución de los datos.

Análisis de curvas ROC por animal

Corticoespinal

Para el grupo de inhibición del TCE se encontró que las ratas del grupo inhibidas del TCE tres de los animales muestran una diferencia significativa antes del inicio del movimiento y a lo largo de toda la trayectoria en ambas fases de inhibición del movimiento, con excepción de la rata CE4, la cual, muestra una diferencia significativa a lo largo de toda la trayectoria en ambas fases de inhibición del movimiento (n = 4; Análisis ROC; $p = < 0.05$) (Figura 20)

Corticorubral

Para el grupo de inhibición del TCR se encontraron diferencias significativas en la fase de inhibición de luz en todos los animales al inicio del movimiento, mientras que para la fase de movimiento en tres de ellas se encontró diferencia significativa durante el inicio del movimiento y únicamente en una de ellas el final del movimiento se encontró alterado al final del palanqueo. (n = 4; Análisis ROC; $p = < 0.05$) (Figura 21)

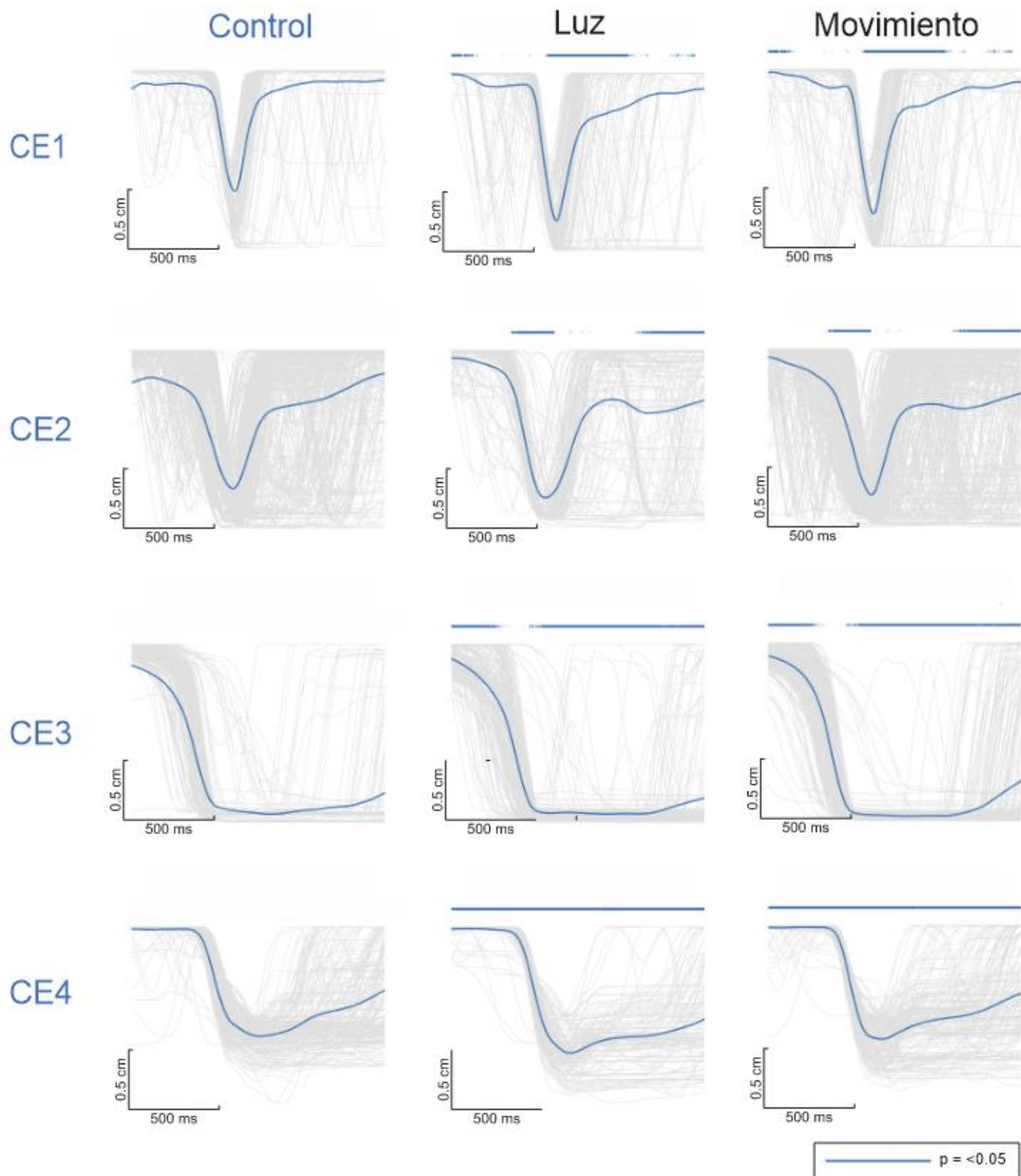


Figura 20. Curvas ROC por rata del grupo de corticoespinales. Se muestran los análisis de curvas ROC de las cuatro ratas inhibidas optogenéticamente en la fase control, fase de luz y de movimiento. Las trayectorias en color gris representan las trayectorias de las ratas durante todas las sesiones de inhibición optogenética y la trayectoria en color azul marino demuestra la trayectoria promedio del animal en cada una de las fases (CE1 = Animal del grupo corticoespinal 1; CE2 = Animal del grupo corticoespinal 2; CE3 = Animal del grupo corticoespinal 3; CE4 = Animal del grupo corticoespinal 4) (n = 4; prueba AUROC $p < 0.05$)

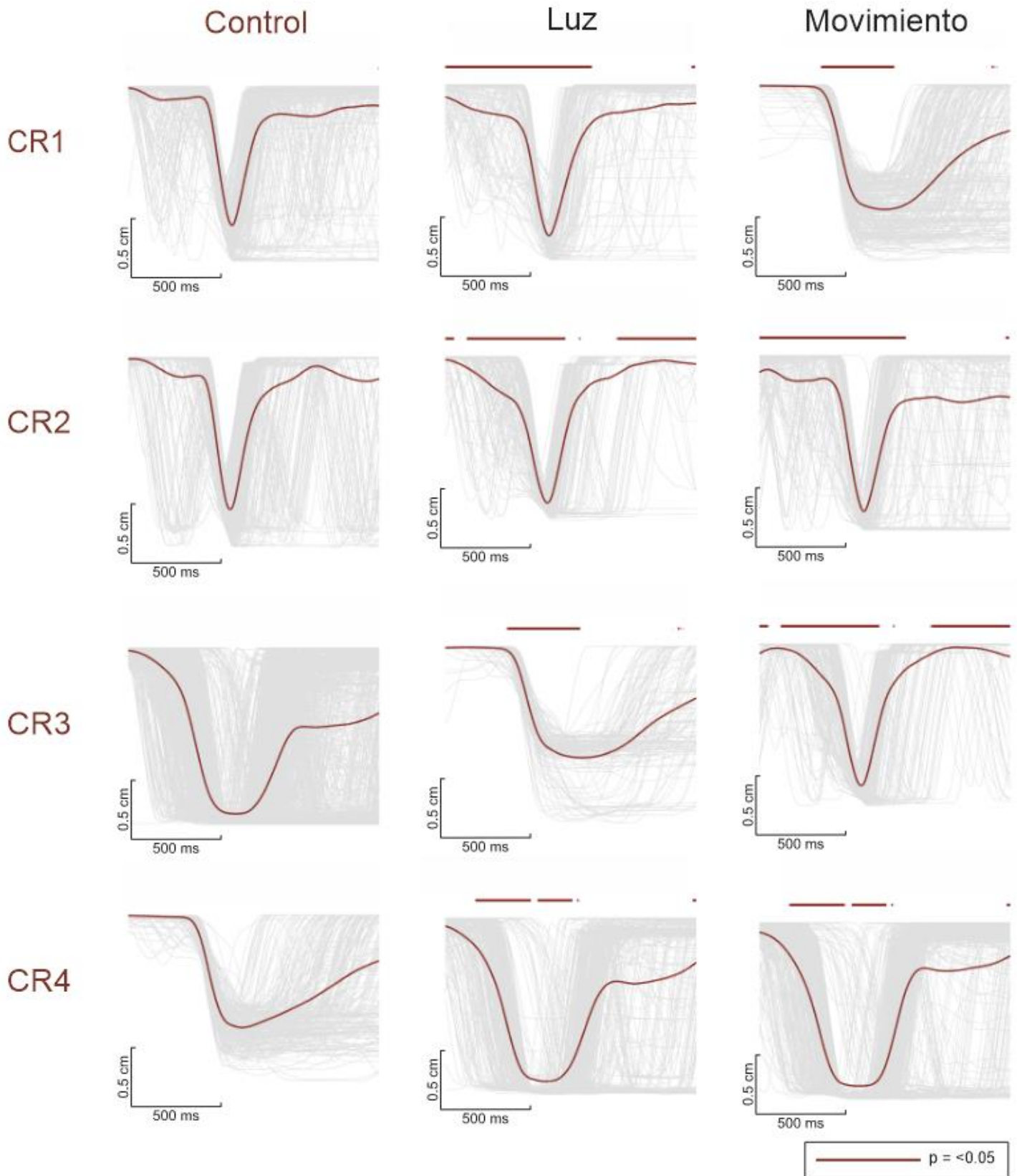


Figura 21. Curvas ROC por rata del grupo de corticorrubrales. Se muestran los análisis de curvas ROC de las cuatro ratas inhibidas optogenéticamente en la fase control, fase de luz y de movimiento. Las trayectorias en color gris representan las trayectorias de las ratas durante todas las sesiones de inhibición optogenética y la trayectoria en color vino marino demuestra la trayectoria promedio del animal en cada una de las fases (CR1 = Animal del grupo corticorrubral 1; CR2 = Animal del grupo corticorrubral 2; CR3 = Animal del grupo corticorrubral 3; CR4 = Animal del grupo corticorrubral 4) (n = 4; prueba AUROC $p < 0.05$)

Discusión

1. *Aprendizaje sensoriomotor*

1.1 *Aprendizaje de un movimiento de palanqueo*

En el presente trabajo, por medio de un modelo de condicionamiento operante en libre movimiento, se entrenaron a ratas hembra Wistar para realizar un movimiento voluntario de palanqueo después de percibir un estímulo lumínico. El entrenamiento se llevó a cabo por medio de aproximaciones sucesivas de la duración del estímulo lumínico para asociar que esta era la señal go y poder realizar el movimiento palanqueo, utilizando como estímulo reforzador el agua.

El aprendizaje motor consiste en el perfeccionamiento de un movimiento a través del entrenamiento. Se sabe que un movimiento se hace más diestro durante el aprendizaje debido a que diferentes características como la duración, velocidad, ejecución, entre otras mejoran (Papale & Hooks, 2018; Peters, Lee, et al., 2017a; Peters, Liu, et al., 2017; Serradj et al., 2023). En nuestra tarea conductual, durante el aprendizaje de la tarea motora de palanqueo, las ratas transcurrieron por diferentes etapas. Inicialmente, el aprendizaje tiene un aspecto sensorial, donde las ratas se expusieron a aproximaciones sucesivas de la luz para relacionarlo con una señal "go". Posteriormente, un aprendizaje tiene un aspecto de asociación sensoriomotora (señal sensorial y movimiento de palanqueo). Finalmente, una etapa de desempeño de la tarea motora, donde los animales integraron todos los estímulos con el movimiento de palanqueo y pudo mejorar los diferentes aspectos cinemáticos. (Makino et al., 2016) Es así como, las ratas durante el proceso de aprendizaje fueron incrementando sus aciertos conforme iban transcurriendo las sesiones de entrenamiento, encontrándose una diferencia significativa a partir de la sesión 8 de entrenamiento (Figura 11a). Las omisiones de las luces fueron disminuyendo a lo largo de los entrenamientos siendo estas significativamente diferentes a partir de la sesión 5 de entrenamiento (Figura 11c). Por otro lado, los errores se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de todas las sesiones (Figura 11e).

Para caracterizar la evolución del desempeño conductual a lo largo de las sesiones, se compararon las ratas novatas en las primeras tres sesiones de entrenamiento (sesión 1 a sesión 3) con las mismas ratas en un estado más avanzado (sesión 26 a la sesión 28). Así, corroboramos que las ratas aumentaron sus aciertos hasta llegar alrededor del 40% (Figura 11b). En las omisiones se pudo observar cómo estas ratas disminuyeron de un 80% de las luces omitidas hasta el 40% (Figura 11d).

1.2 Optimización de un movimiento de palanqueo

Con la finalidad de analizar la optimización del movimiento de palanqueo se separaron en tres grupos de aprendizaje a las ratas. La etapa donde las ratas eran novatas (sesión 1 a sesión 3); la etapa intermedia (sesión 13 a la 15); y la etapa avanzada del aprendizaje (sesión 26 a la 28). Conforme las sesiones transcurrían, gradualmente las trayectorias de los palanqueos se hicieron más homogéneas entre ellas, aumentando su índice de correlación entre las sesiones (Figura 12). Asimismo, la duración (Figura 13a), la amplitud del palanqueo (Figura 13c), el tiempo de reacción (Figura 13d) y la velocidad (13e) se vieron perfeccionados con una disminución en sus tiempos, demostrándose que el movimiento de palanqueo cada vez era más estereotipado conforme iban pasando las sesiones de entrenamiento y las ratas estaban en una fase más avanzada (Figura 12).

2. Inhibición optogenética

2.1. Expresión del virus

Para una mayor especificidad en la inhibición optogenética se inyectó un virus retrógrado e la médula espinal para el grupo de corticoespinales y en el núcleo rojo para el grupo de neuronas corticorrubrales. En concordancia con lo previamente reportado (Akintunde & Buxton, 1992; Miller, 1987; Moreno-López et al., 2016; Nelson et al., 2021; Olivares-Moreno et al., 2017a, 2019) encontramos que las neuronas del tracto corticoespinal se distribuyen a lo largo de la corteza M1, M2, S1, S2, entre otras. No obstante, las neuronas del TCR, se encontraron en menor porcentaje (Akintunde & Buxton, 1992; Brown, 1974; Lopez-Virgen et al., 2022; Qian et al., 2019) a lo largo de las cortezas M1, M2, S1 y S2 en ratones y ratas.

Para fines de este proyecto, se decidió realizar la implantación de la fibra óptica en la corteza motora primaria (AP:2.20; ML: 3.00; DV: 1.5) para poder realizar una comparación del papel que desempeña cada una de estas subpoblaciones de neuronas en la ejecución de un movimiento de palanqueo. Como se puede observar la abundancia de las neuronas del TCE se encuentran en mayor abundancia en M1 (Figura 14 b y c) a diferencia de las neuronas del TCR que se distribuyen con mayor medida en M2 (Figura 14 e y f). La misma distribución de las neuronas del TCE y TCR fue descrita en nuestro laboratorio previamente (Rodríguez-Moreno, 2022) por medio de inyecciones retrógradas observándose que las neuronas del TCE se encuentran con una mayor densidad en la corteza sensorial primaria para la extremidad anterior, mientras que la mayor densidad de neuronas del TCR se encontraban en mayor medida en M1. Por esto mismo, se puede confirmar el TCE y TCR conforman diferentes subpoblaciones de las NTP (Figura 21).

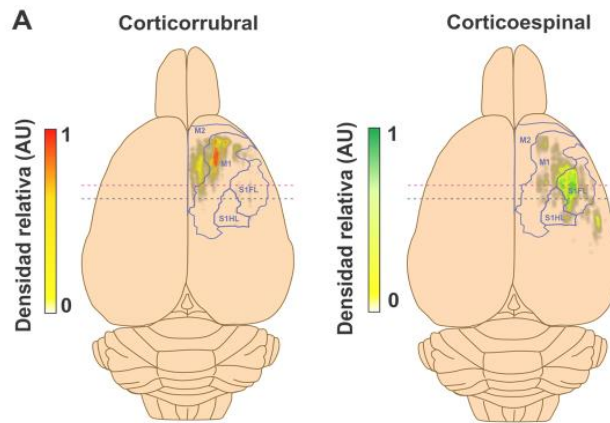


Figura 22. Mapa de densidad neuronal. A. Densidad neuronal del TCR; B. Densidad neuronal del TCE. (n = 3) (Tomado de Rodríguez-Moreno, 2022).

2.2. Fotoinhibición del tracto corticoespinal

A pesar de que, en este trabajo solo se vieron afectados los aciertos durante ambas fases de inhibición, en los demás parámetros de evaluación de la efectividad no se encontraron diferencias significativas. Anteriormente, se ha reportado que la inhibición de las neuronas corticoespinales en experimentos en roedores con cabeza fija durante el aprendizaje y en un movimiento aprendido alteran la ejecución de este, por medio de la disminución en los aciertos de las tareas, así como de la correlación de las trayectorias con la que se ejecuta la tarea motora (Peters, Lee, et al., 2017b; Serradj et al., 2023). En este trabajo, observamos que nuestros animales al estar en un paradigma de libre movimiento dentro de la caja conductual, disminuyeron en general la productividad en la ejecución de la tarea motora. Una de las razones por la cual el animal pudo haber disminuido su efectividad durante la tarea motora es debido a que no se encontraba fijado de la cabeza frente a la palanca todo el tiempo cuando se ejecutaba la inhibición, siendo que el animal decidía no palanquear o que en el inicio del ensayo este se encontraba en otro punto de la caja explorando.

En los experimentos selectivos de los tractos por fotoinhibición para el grupo de corticoespinales (Figura 18 y Figura 20) se vieron afectados 4 parámetros en las diferentes fases de inhibición del movimiento. La duración del palanqueo (Figura 18a) y el tiempo de descenso (Figura 18b), aumentaron su duración indiferentemente de la fase del movimiento en la que era inhibido el movimiento, volviéndose un movimiento mucho más lento a lo largo de la trayectoria confirmado adicionalmente por la disminución de la velocidad (Figura 18e) y amplitud de la palanca (Figura 18c).

Varios estudios ya demostraron estos sucesos donde la corteza motora y las neuronas del TCE son capaces de modular y codificar diferentes aspectos del movimiento como es la duración, dirección, velocidad, trayectorias y fuerza muscular con la cual se ejecuta un movimiento. (Hwang et al., 2019; Kondo et al., 2018; Warriner et al., 2022). En este sentido, se ha sugerido que existe una

diversidad funcional de las neuronas del TCE. Es así como las neuronas corticoespinales que proyectan al asta ventral y dorsal de la médula espinal, se encuentran segregadas y por lo tanto se sugiere que participan en el control del movimiento de manera diferencial (Olivares-Moreno et al., 2017b, 2019). Además de reportarse una participación de ellas tanto al inicio como durante toda la ejecución del movimiento (Peters et al., 2017).

Se confirmó que el fenómeno observado en los parámetros cinemáticos analizados grupales coincidían de manera individual para cada una de las diferencias significativas realizado con el análisis de curvas ROC. La perturbación del movimiento se llevaba a cabo en el inicio del movimiento y durante el movimiento, coincidiendo con las diferencias significativas que se observan en los parámetros cinemáticos durante la fase de luz y fase de movimiento. Estos datos confirman que el fenómeno observado de manera grupal se repite de manera individual en cada una de las ratas analizadas (Figura 20).

2.3. Fotoinhibición del tracto corticorrubral

Por otro lado, la inhibición selectiva del tracto corticorrubral (Figura 19) altero los parámetros cinemáticos de manera preferencial cuando el láser se encendía en la fase de luz. Así, el tiempo de descenso que hizo más prolongado (Figura 19b), el tiempo de reacción aumentó (Figura 19d) y la amplitud (Figura 19c) y velocidad (Figura 19e) disminuyeron.

Existe poca información sobre el papel del TCR en la motricidad, sin embargo, en estudios en gatos se ha visto que el núcleo rojo juega un papel importante en el inicio y final de un movimiento de alcance (Jarratt & Hyland, 1999), así como en la ausencia del TCE o en una lesión del mismo, el TCR es aquel que revela la función para llevar a cabo un movimiento de la extremidad (Isa et al., 2019; Ishida et al., 2016).

A diferencia del TCE, la inhibición en la fase de luz de las neuronas del TCR demostraron tener un incremento en el tiempo de reacción antes de presionar la palanca. En antiguos estudios en gatos (Amalric et al., 1983), se encontró resultado similar al demostrarse una participación de las neuronas de NR las cuales disparaban durante el tiempo de reacción antes de soltar una palanca.

La perturbación del movimiento observado de manera individual en el análisis ROC para las ratas del grupo del TCR se se observó al inicio del movimiento, coincidiendo con las diferencias significativas que se observan en los parámetros cinemáticos durante la fase de luz, reafimándose que la interrupción del flujo de información de este tracto altera la planeación y el inicio del movimiento (Figura 21).

3. **Contribución de las neuronas del tracto piramidal en el movimiento**

Este estudio demostró que las neuronas del TCE y TCR, subpoblaciones de neuronas piramidales originadas en M1 juegan un rol esencial en el desempeño motor del movimiento de palanqueo, impactando diversos parámetros cinemáticos. Estos hallazgos sugieren que estas poblaciones neuronales contribuyen de manera diferente en la integración sensoriomotora, lo que indica que la corteza cerebral puede reorganizar circuitos neuronales para ejecutar un movimiento previamente aprendido, incluso bajo condiciones de inhibición (Mathis et al., 2017; Moreno-López et al., 2016).

La diversidad funcional de las NTP ha sido descrita con anterioridad, donde dependiendo de su blanco de proyección estas cumplen con diferentes características anatómicas (Rojas-Piloni et al., 2017a), Además de estas características que identifican a las NTP, otros autores han descrito que dependiendo de su blanco de proyección, estas pueden tener una diferente participación en la ejecución de un movimiento.

En este sentido, se han incluso clasificado a las NTP de acuerdo con su modulación en distintas fases del movimiento, siendo algunas preparatorias y otras de ellas ejecutoras (Economou et al., 2018). Los resultados del presente trabajo, concuerdan con esta idea, ya que se podrían considerar como preparatorias a las neuronas del TCR, las cuales se vieron afectadas en la fase de luz; mientras que las neuronas TCE serían mayormente ejecutoras, pues su participación en el palanqueo se vio más afectada durante ambas fases de inhibición.

Finalmente, este proyecto es uno de los primeros en analizar las diferencias funcionales de los distintos tipos de neuronas piramidales en el control sensoriomotor. Y permite abrir varios cuestionamientos que deberán responder futuros estudios, como son:

1. ¿Cómo participan distintas poblaciones de neuronas CE en el aprendizaje motor?
2. ¿Cómo se ven involucradas las neuronas CR en el aprendizaje motor?
3. ¿Cómo la inhibición de neuronas del TCE y TCR afectan el aprendizaje de un movimiento?
4. ¿Cuáles subgrupos de neuronas del TCE ejercen copias motoras para la ejecución de un movimiento?

Conclusiones

- Las ratas incrementaron los aciertos, disminuyeron las omisiones mantuvieron los errores a lo largo de las sesiones de entrenamiento, comprobándose que adquirieron un aprendizaje de la tarea motora.
- El movimiento de palanqueo se optimizó y perfeccionó los parámetros cinemáticos evaluados a lo largo de las sesiones de entrenamiento.
- La fotoinhibición de los tractos corticoespinal y corticorrubral afecta de manera diferencial un movimiento de palanqueo.
- Las neuronas del tracto piramidal tienen un papel diferencial de acuerdo con su blanco de proyección.
 - a) La fotoinhibición de las neuronas del tracto corticoespinal en M1 afecta los parámetros cinemáticos aumentando la duración junto con el tiempo de descenso, y disminuyendo tanto la amplitud como la velocidad de un movimiento de palanqueo en ambas fases de inhibición.
 - b) La fotoinhibición de las neuronas del tracto corticorrubral en M1 afecta los parámetros cinemáticos disminuyendo la amplitud junto con la velocidad del movimiento y aumentando el tiempo de reacción para ejecutar el movimiento de palanqueo, únicamente en la fase de inhibición de la luz.

Bibliografía

1. Akintunde, A., & Buxton, D. F. (1992). Origins and collateralization of corticospinal, corticopontine, corticorubral and corticostriatal tracts: a multiple retrograde fluorescent tracing study. *Brain Research*, *586*(2), 208–218. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91629-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91629-S)
2. Amalric, M., Condé, H., Dormont, J. F., Farin, D., & Schmied, A. (1983). Cat Red Nucleus Changes of Activity During the Motor Initiation in a Reaction Time Task*. In *Exp Brain Res* (Vol. 52).
3. Asboth, L., Friedli, L., Beauparlant, J., Martinez-Gonzalez, C., Anil, S., Rey, E., Baud, L., Pidpruzhnykova, G., Anderson, M. A., Shkorbatova, P., Batti, L., Pagès, S., Kreider, J., Schneider, B. L., Barraud, Q., & Courtine, G. (2018). Cortico-reticulo-spinal circuit reorganization enables functional recovery after severe spinal cord contusion. *Nature Neuroscience*, *21*(4), 576–588. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0093-5>
4. Basile, G. A., Quartu, M., Bertino, S., Serra, M. P., Boi, M., Bramanti, A., Anastasi, G. P., Milardi, D., & Cacciola, A. (2021). Red nucleus structure and function: from anatomy to clinical neurosciences. *Brain Structure and Function*, *226*(1), 69–91. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02171-x>
5. Basista, M. J., & Yoshida, Y. (2020). Comparing the function of the corticospinal system in different species: Organizational differences for motor specialization? *Neuroscience*, *450*, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.05.050>
6. Brown, L. T. (1974). Corticorubral projections in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *154*(2), 149–167. <https://doi.org/10.1002/cne.901540204>
7. Cacciola, A., Milardi, D., Basile, G. A., Bertino, S., Calamuneri, A., Chillemi, G., Paladina, G., Impellizzeri, F., Trimarchi, F., Anastasi, G., Bramanti, A., & Rizzo, G. (2019). The cortico-rubral and cerebello-rubral pathways are topographically organized within the human red nucleus. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48164-7>
8. Chuong, A. S., Miri, M. L., Busskamp, V., Matthews, G. A. C., Acker, L. C., Sørensen, A. T., Young, A., Klapoetke, N. C., Henninger, M. A., Kodandaramaiah, S. B., Ogawa, M., Ramanlal, S. B., Bandler, R. C., Allen, B. D., Forest, C. R., Chow, B. Y., Han, X., Lin, Y., Tye, K. M., ... Boyden, E. S. (2014). Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nature Neuroscience*, *17*(8), 1123–1129. <https://doi.org/10.1038/nn.3752>
9. Currie, S. P., Ammer, J. J., Premchand, B., Dacre, J., Wu, Y., Eleftheriou, C., Colligan, M., Clarke, T., Mitchell, L., Faisal, A. A., Hennig, M. H., & Duguid, I. (2022). Movement-specific signaling is differentially distributed across motor cortex layer 5 projection

- neuron classes. *Cell Reports*, 39(6), 110801.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110801>
10. Economo, M. N., Viswanathan, S., Tasic, B., Bas, E., Winnubst, J., Menon, V., Graybiel, L. T., Nguyen, T. N., Smith, K. A., Yao, Z., Wang, L., Gerfen, C. R., Chandrashekar, J., Zeng, H., Looger, L. L., & Svoboda, K. (2018). Distinct descending motor cortex pathways and their roles in movement. *Nature*, 563(7729), 79–84.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0642-9>
 11. Glover, I. S., & Baker, S. N. (2022). Both Corticospinal and Reticulospinal Tracts Control Force of Contraction. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 42(15), 3150–3164. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0627-21.2022>
 12. Grimsley, C. A., Sanchez, J. T., & Sivaramakrishnan, S. (2013). Midbrain local circuits shape sound intensity codes. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(OCT), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00174>
 13. Hira, R., Ohkubo, F., Tanaka, Y. R., Masamizu, Y., Augustine, G. J., Kasai, H., & Matsuzaki, M. (2013). Alternative routes for recovery of hand functions after corticospinal tract injury in primates and rodents. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00055>
 14. Hwang, E. J., Dahlen, J. E., Hu, Y. Y., Aguilar, K., Yu, B., Mukundan, M., Mitani, A., & Komiyama, T. (2019). Disengagement of motor cortex from movement control during long-term learning. *Science Advances*, 5(10), 1–13.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aay0001>
 15. Isa, T., Mitsuhashi, M., & Yamaguchi, R. (2019). *Alternative routes for recovery of hand functions after corticospinal tract injury in primates and rodents*. 32(6), 836–843.
<https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000749>
 16. Ishida, A., Isa, K., Umeda, T., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Hida, H., & Isa, T. (2016). Causal link between the cortico-rubral pathway and functional recovery through forced impaired limb use in rats with stroke. *Journal of Neuroscience*, 36(2), 455–467.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2399-15.2016>
 17. Ishida, A., Kobayashi, K., Ueda, Y., Shimizu, T., Tajiri, N., Isa, T., & Hida, H. (2019a). Dynamic Interaction between Cortico-Brainstem Pathways during Training-Induced Recovery in Stroke Model Rats. *Journal of Neuroscience*, 39(37), 7306–7320.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0649-19.2019>
 18. Ishida, A., Kobayashi, K., Ueda, Y., Shimizu, T., Tajiri, N., Isa, T., & Hida, H. (2019b). Dynamic Interaction between Cortico-Brainstem Pathways during Training-Induced Recovery in Stroke Model Rats. *Journal of Neuroscience*, 39(37), 7306–7320.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0649-19.2019>

19. Isomura, Y., Harukuni, R., Takekawa, T., Aizawa, H., & Fukai, T. (2009). Microcircuitry coordination of cortical motor information in self-initiation of voluntary movements. *Nature Neuroscience*, *12*(12), 1586–1593. <https://doi.org/10.1038/nn.2431>
20. Jarratt, H., & Hyland, B. (1999). Neuronal activity in rat red nucleus during forelimb reach-to-grasp movements. *Neuroscience*, *88*(2), 629–642. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00227-9)
21. Kalambogias, J., & Yoshida, Y. (2021). Converging integration between ascending proprioceptive inputs and the corticospinal tract motor circuit underlying skilled movement control. *Current Opinion in Physiology*, *19*, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.10.007>
22. Kondo, T., Saito, R., Otaka, M., Yoshino-Saito, K., Yamanaka, A., Yamamori, T., Watakabe, A., Mizukami, H., Schnitzer, M. J., Tanaka, K. F., Ushiba, J., & Okano, H. (2018). Calcium Transient Dynamics of Neural Ensembles in the Primary Motor Cortex of Naturally Behaving Monkeys. *Cell Reports*, *24*(8), 2191-2195.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.057>
23. Lemon, R. N. (2008). Descending pathways in motor control. *Annual Review of Neuroscience*, *31*(Cm), 195–218. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125547>
24. Lemon, R. N., & Griffiths, J. (2005). Comparing the function of the corticospinal system in different species: Organizational differences for motor specialization? *Muscle and Nerve*, *32*(3), 261–279. <https://doi.org/10.1002/mus.20333>
25. Lopez, Y. M.-, Bichara, C., Delbecq, G., Isope, P., Erausquin, M. C.-, Cellulaires, N., & Strasbourg, C. U. De. (2021). *The corticospinal tract primarily modulates sensory inputs in the mouse lumbar cord*. 1–19.
26. Lopez-Virgen, V., Olivares-Moreno, R., de Lafuente, V., Concha, L., & Rojas-Piloni, G. (2022). Different subtypes of motor cortex pyramidal tract neurons projects to red and pontine nuclei. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.1073731>
27. Macías, M., Lopez-Virgen, V., Olivares-Moreno, R., & Rojas-Piloni, G. (2022). Corticospinal neurons from motor and somatosensory cortices exhibit different temporal activity dynamics during motor learning. *Frontiers in Human Neuroscience*, *16*(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.1043501>
28. Makino, H., Hwang, E. J., Hedrick, N. G., & Komiyama, T. (2016). Circuit Mechanisms of Sensorimotor Learning. In *Neuron* (Vol. 92, Issue 4, pp. 705–721). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.029>
29. Miller, M. W. (1987). The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Experimental Brain Research*, *67*(2), 339–351. <https://doi.org/10.1007/BF00248554>

30. Moreno-López, Y., Olivares-Moreno, R., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2016). Sensorimotor integration by corticospinal system. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(MAR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00024>
31. Morris, R., Tosolini, A. P., Goldstein, J. D., & Whishaw, I. Q. (2011). Impaired arpeggio movement in skilled reaching by rubrospinal tract lesions in the rat: A behavioral/anatomical fractionation. *Journal of Neurotrauma*, 28(12), 2439–2451. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1708>
32. Nelson, A., Abdelmesih, B., & Costa, R. M. (2021). Corticospinal populations broadcast complex motor signals to coordinated spinal and striatal circuits. *Nature Neuroscience*, 24(December). <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00939-w>
33. Olivares-Moreno, R., López-Hidalgo, M., Altamirano-Espinoza, A., González-Gallardo, A., Antaramian, A., Lopez-Virgen, V., & Rojas-Piloni, G. (2019). Mouse corticospinal system comprises different functional neuronal ensembles depending on their hodology. *BMC Neuroscience*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0533-5>
34. Olivares-Moreno, R., Moreno-Lopez, Y., Concha, L., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2017a). The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Structure and Function*, 222(9), 3945–3958. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1447-6>
35. Olivares-Moreno, R., Moreno-Lopez, Y., Concha, L., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2017b). The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Structure and Function*, 222(9), 3945–3958. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1447-6>
36. Olivares-Moreno, R., Rodriguez-Moreno, P., Lopez-Virgen, V., Macías, M., Altamira-Camacho, M., & Rojas-Piloni, G. (2021). Corticospinal vs Rubrospinal Revisited: An Evolutionary Perspective for Sensorimotor Integration. *Frontiers in Neuroscience*, 15(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.686481>
37. Papale, A. E., & Hooks, B. M. (2018). Circuit changes in motor cortex during motor skill learning. *Neuroscience*, 368, 283–297. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.09.010>
38. Peters, A. J., Lee, J., Hedrick, N. G., O'neil, K., & Komiyama, T. (2017a). Reorganization of corticospinal output during motor learning. *Nature Neuroscience*, 20(8), 1133–1141. <https://doi.org/10.1038/nn.4596>
39. Peters, A. J., Lee, J., Hedrick, N. G., O'neil, K., & Komiyama, T. (2017b). Reorganization of corticospinal output during motor learning. *Nature Neuroscience*, 20(8), 1133–1141. <https://doi.org/10.1038/nn.4596>

40. Peters, A. J., Liu, H., & Komiyama, T. (2017). Learning in the Rodent Motor Cortex. *Annual Review of Neuroscience*, *40*, 77–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031407>
41. Qian, J., Wu, W., Xiong, W., Chai, Z., Xu, X. M., & Jin, X. (2019). Longitudinal optogenetic motor mapping revealed structural and functional impairments and enhanced corticorubral projection after contusive spinal cord injury in Mice. *Journal of Neurotrauma*, *36*(3), 485–499. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5713>
42. Rachwani, J., Santamaria, V., Saavedra, S. L., & Woollacott, M. H. (2015). The development of trunk control and its relation to reaching in infancy: A longitudinal study. *Frontiers in Human Neuroscience*, *9*(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00094>
43. Ramaswamy, S., & Markram, H. (2015). Anatomy and physiology of the thick-tufted layer 5 pyramidal neuron. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(JUNE), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00233>
44. Rojas-Piloni, G., Guest, J. M., Egger, R., Johnson, A. S., Sakmann, B., & Oberlaender, M. (2017a). Relationships between structure, in vivo function and long-range axonal target of cortical pyramidal tract neurons. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00971-0>
45. Rojas-Piloni, G., Guest, J. M., Egger, R., Johnson, A. S., Sakmann, B., & Oberlaender, M. (2017b). Relationships between structure, in vivo function and long-range axonal target of cortical pyramidal tract neurons. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00971-0>
46. Serradj, N., Marino, F., Moreno-lópez, Y., Bernstein, A., Agger, S., Soliman, M., Sloan, A., & Hollis, E. (2023). *Task-specific modulation of corticospinal neuron activity during motor learning in mice*. 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38418-4>
47. Siegel, C. S., Fink, K. L., Strittmatter, S. M., & Cafferty, W. B. J. (2015). Plasticity of intact Rubral projections mediates spontaneous recovery of function after corticospinal tract injury. *Journal of Neuroscience*, *35*(4), 1443–1457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3713-14.2015>
48. Ueno, M., Hayano, Y., Nakagawa, H., & Yamashita, T. (2012). Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain*, *135*(4), 1253–1267. <https://doi.org/10.1093/brain/aws053>
49. Ueno, M., Nakamura, Y., Li, J., Gu, Z., Niehaus, J., Maezawa, M., Crone, S. A., Goulding, M., Baccei, M. L., & Yoshida, Y. (2018). Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell Reports*, *23*(5), 1286–1300.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.137>

50. Veuthey, T. L., Derosier, K., Kondapavulur, S., & Ganguly, K. (2020). Single-trial cross-area neural population dynamics during long-term skill learning. *Nature Communications*, *11*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17902-1>
51. Warriner, C. L., Fageiry, S., Saxena, S., Costa, R. M., & Miri, A. (2022). Motor cortical influence relies on task-specific activity covariation. *Cell Reports*, *40*(13). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111427>
52. Welniarz, Q., Dusart, I., & Roze, E. (2017). The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Developmental Neurobiology*, *77*(7), 810–829. <https://doi.org/10.1002/dneu.22455>