



Programa de Doctorado en Neurociencias

Contribution of the stria medullaris to the habenular complex: from the prethalamic eminence to the habenula

Iris Juárez Leal

Director de la tesis

Dr. D. Eduardo de Puelles Martínez de la Torre

Codirector/a de la tesis

Dr. D. Diego Echevarría Aza

Universidad Miguel Hernández de Elche

- 2023 -





This Doctoral Thesis, entitled “Contribution of the stria medullaris to the habenular complex: from the prethalamic eminence to the habenula”, is presented as a compendium of the following publications:

- Stria medullaris innervation follows the transcriptomic division of the habenula. Scientific Reports. DOI: 10.1038/s41598-022-14328-1. Iris Juárez-Leal, Estefanía Carretero-Rodríguez, Francisca Almagro-García, Salvador Martínez, Diego Echevarría, Eduardo Puelles.



Dr. Eduardo de Puelles Martínez de la Torre, Director, and Dr. Diego Echevarría Aza, co-director of the doctoral thesis entitled “Contribution of the stria medullaris to the habenular complex: from the prethalamic eminence to the habenula”.

CERTIFIES:

That Mrs. Iris Juárez Leal has carried out under our supervision the work entitled “Contribution of the stria medullaris to the habenular complex: from the prethalamic eminence to the habenula” in accordance with the terms and conditions defined in her Research Plan and in accordance with the Code of Good Practice of the University Miguel Hernández of Elche, satisfactorily fulfilling the objectives foreseen for its public defence as a doctoral thesis.

We sign for appropriate purposes,

Thesis director

Thesis co-director

Dr. D. Eduardo de Puelles Martínez de la Torre

Dr. D. Diego Echevarría Aza



Ms. Elvira de la Peña García, Coordinator of the Neurosciences PhD programme at the Institute of Neurosciences in Alicante, a joint centre of the Miguel Hernández University (UMH) and the Spanish National Research Council (CSIC),

INFORMS:

That Mrs. Iris Juárez Leal has carried out under the supervision of our PhD Programme the work entitled “Contribution of the stria medullaris to the habenular complex: from the prethalamic eminence to the habenula” in accordance with the terms and conditions defined in its Research Plan and in accordance with the Code of Good Practice of the University Miguel Hernández de Elche, fulfilling the objectives satisfactorily for its public defence as a doctoral thesis.

Which I sign for the appropriate purposes,

Dr Elvira de la Peña García

Coordinator of the PhD Programme in Neurosciences

E-mail: elvirap@umh.es

Tel: +34 965 919533

Av Ramón y Cajal s/n

SANT JOAN CAMPUS

www.in.umh.es

Fax: +34 965 919549

03550 SANT JOAN D'ALACANT- SPAIN

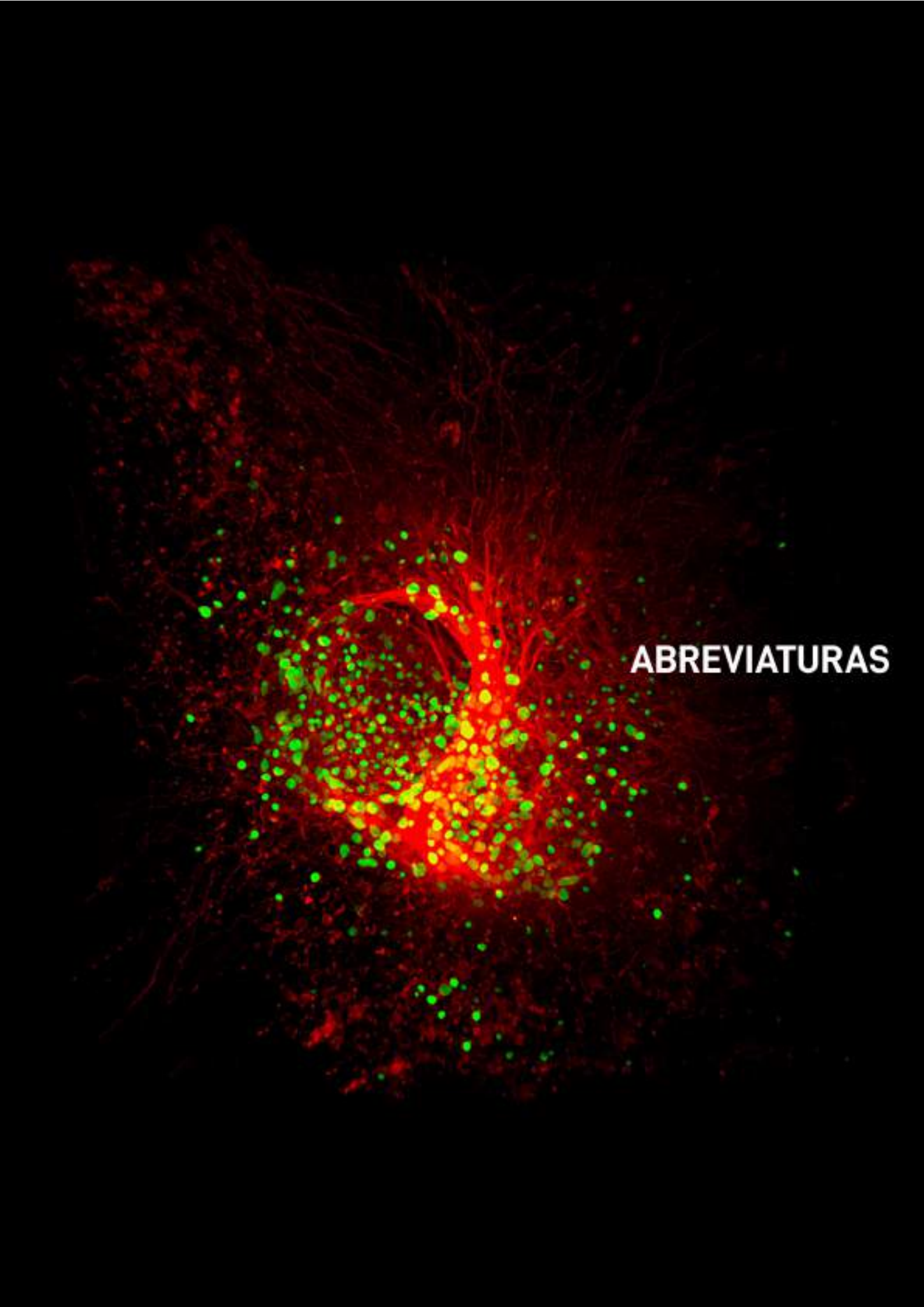
A la meua familia

A Pablo, Bonzo i a Marc

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	15
Abstract.....	17
Introducción y Objetivos.....	23
1. Sistema Límbico.....	23
2. Complejo habenular.....	27
2.1 División de la habénula	28
2.2 Desarrollo del complejo habenular desde el modelo prosomérico	30
2.3 Funciones de la habénula	32
2.4 Conectividad de la habénula: aferencias y eferencias.....	34
2.5 Núcleos que proyectan a la habénula a través de la estría medular	38
2.6 Eminencia pretálamica	39
3. Marcadores específicos de la estría medular	41
3.1 Sarcolipina.....	43
3.2 Eomes.....	44
Objetivos	46
Materiales y métodos	51
Discusión	71
Conclusiones	87
Conclusions.....	89
Referencias bibliográficas	95
Anexos.....	119
Anexo 1	119

La inervación de la estría medular siguiendo la división transcriptómica de la habénula.....	119
Stria medullaris innervation follows the transcriptomic division of the habenula	119
Anexo 2 A.....	153
Distribución de <i>Sarcolipina</i> en el cerebro de ratón adulto y en desarrollo.	153
Sarcolipin distribution in developing and adult mouse brain	153
Anexo 2 B.....	175
Contribución de neuronas <i>Eomes</i> positivas pretalámicas a las proyecciones aférentes de la habénula.....	175
Migration of Tbr2-positive cells (<i>Eomes</i>) from the prethalamic eminence to the	
Agradecimientos.....	209



ABREVIATURAS

Imagen propiedad de Iris Juárez Leal. Fibras de la estría medular de un ratón Eomes^{mTnG} a E18.5, donde se puede ver en verde (GFP) los somas y en rojo (RFP) los axones de las células. Adquisición de la imagen: Microscopio confocal spinning disk Dragonfly.

Abreviaturas

	Abreviaturas	Abreviatures
ABC	Complejo Avidina-Biotina	Avidin-biotin complex
ac	Comisura anterior	Anterior commissure
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
ADNc	Copia de ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid copy
AH	Hipotálamo anterior	Anterior hypothalamus
AHN	Núcleo hipotalámico anterior	Anterior hypothalamic nucleus
APT	Núcleo pretectal anterior	Anterior pretectal nucleus
ARN	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	Messenger ribonucleic acid
BAC	Núcleo cama de la comisura anterior	Bed nuclei of the anterior commissure
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BDE	Bencil eter	Benzyl ether
BMP	Núcleo amigdalino basomedial	Basomedial amygdaloid nucleus
Bmp	Proteínas morfogenéticas de hueso	Bone morphogenetic proteins
bp	Pares de bases	Base pairs
BrdU	Bromodesoxiuridina	Bromodeoxyuridine
Br3a	Homeobox 1 con dominio POU Clase 4	POU Class 4 Homeobox 1
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine Serum Albumin
BST	Núcleo cama de la stria terminal	Bed nuclei of the stria terminallis

Ca²⁺	Calcio	Calcium
CaM	Calmodulina	Calmodulin
Cb	Cerebelo	Cerebellum
cc	Cuerpo calloso	Corpus callosum
CEAc	Núcleo amigdalar central, parte capsular	Central amygdalar nucleus, capsular part
CEAI	Núcleo amigdalar central, parte clateral	Central amygdalar nucleus, lateral part
CEAm	Núcleo amigdalar central, parte medial	Central amygdalar nucleus, medial part
Chat	Colinacetiltransferasa	Choline acetyltransferase
CM	Núcleo centromedial	Centromedian nucleus
CR	Calretinina	Calretinin
CSP	Prosencéfalo secundario caudal	Caudal secondary prosencephalon
csp	Tracto corticoespinal	Corticospinal tract
cth	Tracto corticotálámico	Corticothalamic tract
Cx	Corteza cerebral	Cerebral cortex
D	Diencéfalo	Diencephalon
DAB	3,3'-Diaminobenzidina	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-Fenilindol	4'-6'-Fiamidino-2-Phenylindole
DC	Giro dentado	Dental gyrus
DLG	Núcleo geniculado lateral dorsal	Dorsal lateral geniculate nucleus
DMH	Núcleo dorsomedial del hipotálamo	Dorsomedial nucleus of the hypothalamus

DpG	Capa gris profunda del colículo superior	Deep gray layer of superior colliculus
E	Estadio	Stage
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPD	Núcleo entopeduncular dorsal	Dorsal entopeduncular nucleus
EtOH	Etanol	Ethanol
Fgf8	Factor de crecimiento fibroblástico 8	Fibroblast Growth Factor 8
fx	Fórnix	Fornix
GFP	Proteína fluorescente verde	Green Fluorescence Protein
GPI	Globo pálido, segmento interno	Globus pallidus, internal segment
H	Rombencéfalo	Hindbrain
Hb	Habénula	Habenula
hc	Hipocampo	Hippocampus
Hy	Hipotálamo	Hypothalamus
H₂O	Agua	Water
H₂O₂	Agua oxigenada	Oxygenated water
IC	Colículo inferior	Inferior colliculus
Ig	Inmunoglobulina G	Immunoglobulin G
IHC	Inmunohistoquímica	Immunohistochemistry
InG	Capa intermedia del colículo superior	Intermediate layer of superior colliculus
IP	Progenitores intermedios	Intermediate progenitors
Ip	Núcleo interpeduncular	Interpeduncular nucleus
ISH	Hibridación In situ	In situ hybridization

IZ	Zona intermedia	Intermediate zone
LHA	Área hipotalámica lateral	Lateral hypothalamic area
LHb	Habénula lateral	Lateral Habenula
LHbL	División lateral de la Habénula lateral	Lateral division of lateral habenula
LHbLB	Subnúcleo basal de la división medial de la Habénula lateral	Basal subnucleus of the medial division of lateral habenula
LHbLMc	Subnúcleo magnocelular de la división lateral de la Habénula lateral	Magnocellular subnucleus of the lateral division of lateral habenula
LHbLMg	Subnúcleo marginal de la división lateral de la Habénula lateral	Marginal subnucleus of lateral division of lateral habenula
LHbLO	Subnúcleo oval de la división lateral de la Habénula lateral	Oval subnucleus of lateral division of lateral habenula
LHbLPc	Subnúcleo parvocelular de la división lateral de la Habénula lateral	Parvocellular subnucleus of lateral habenula lateral division
LHbM	División medial de la Habénula lateral	Medial division of the lateral habenula
LHbMC	Subnúcleo central de la división medial de la Habénula lateral	Central subnucleus of the medial division of lateral habenula
LHbMMg	Subnúcleo marginal de la división medial de la Habénula lateral	Marginal subnucleus of the medial division of lateral habenula
LHbMPc	Subnúcleo parvocelular de la división medial de la Habénula lateral	Parvocellular subnucleus of the medial division of lateral habenula
LHbMS	Subnúcleo superior de la división medial de la habénula lateral	Superior subnucleus of the medial division of lateral habenula
LPO	Área lateral preóptica	Lateral preoptic area
LSc	Núcleo septal lateral, parte caudal	Lateral septal nucleus, caudal part
LSr	Núcleo septal lateral, parte rostral	Lateral septal nucleus, rostral part
M	Mesencéfalo	Mesencephalon/ Midbrain

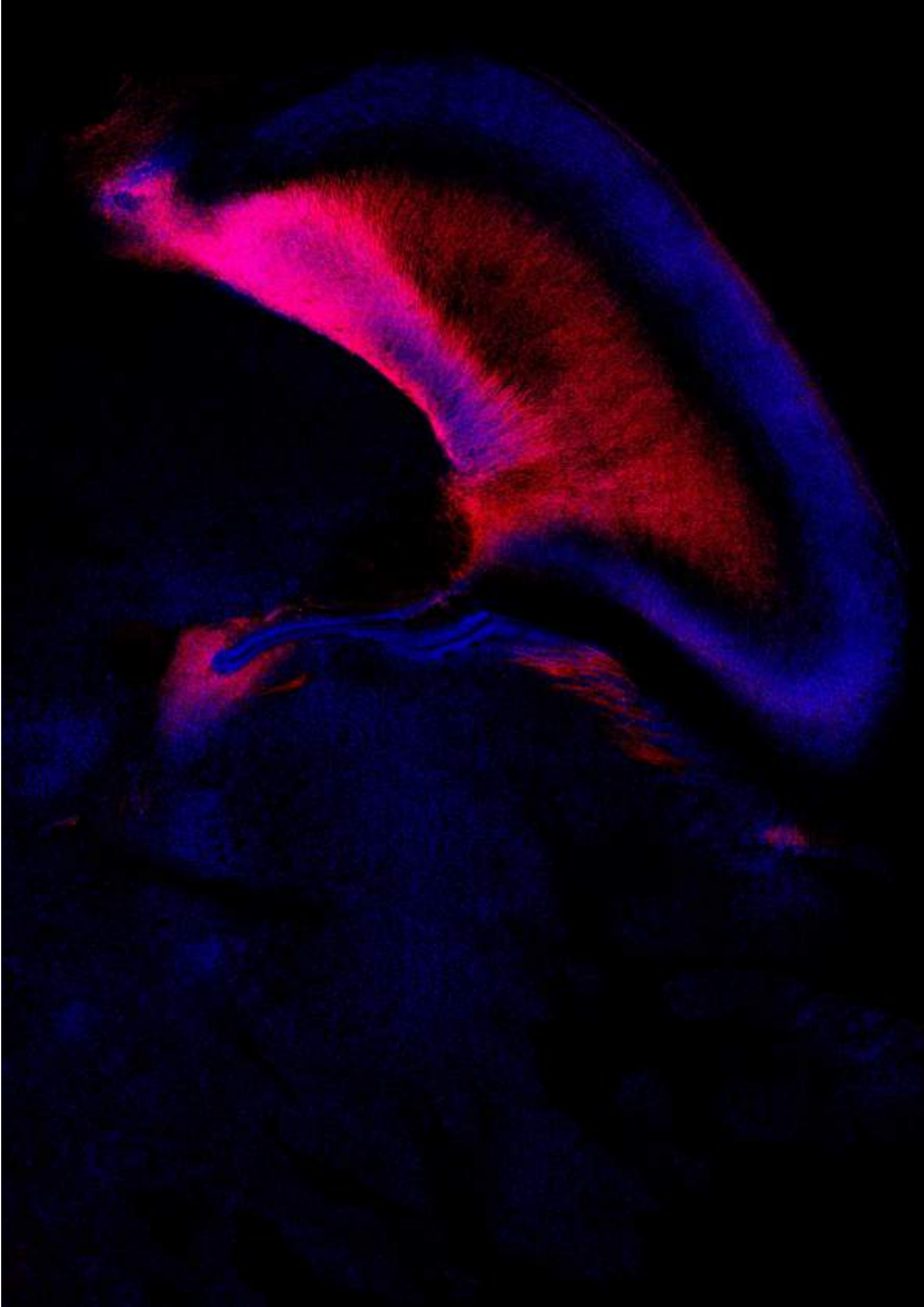
MA	Núcleo magnocelular	Magnocellular nucleus
MHb	Habénula medial	Medial habenula
MHbD	Subnúcleo dorsal de la división lateral de la Habénula medial	Dorsal subnucleus of the lateral division of the lateral habenula
MHbL	División lateral de la Habénula medial	Lateral division of the medial habenula
MHbM	División medial de la Habénula medial	Medial division of the medial habenula
MHbS	Subnúcleo superior de la división medial de la Habénula medial	Superior subnucleus of the medial division of the medial habenula
MHbV	Parte ventral de la habénula media	Ventral part of the medial habenula
MHbVc	Subnúcleo central de la parte ventral de la división lateral de la Habénula medial	Central subnucleus of the ventral part of the lateral division of the medial habenula
MHbVI	Subnúcleo lateral de la división lateral de la Habénula medial	Lateral subnucleus of the lateral division of the medial habenula
MHbVM	Subnúcleo medial de la parte ventral de la división medial de la Habénula medial	Medial subnucleus of the ventral part of the medial division of the medial habenula
mlf	Tracto del fascículo longitudinal medial	Medial longitudinal fascicle tract
mM	Milimolar	Milimolar
MnPO	Núcleo preóptico mediano	Median preoptic nucleus
MPN	Núcleo preóptico medial	Medial preoptic nucleus
MPO	Área preóptica medial	Medial preoptic area
MS	Núcleo septal medial	Medial septal nucleus
mT	tdTomato en la membrana	tdTomato membrane

mtg	Tracto mamilotegmental	Mamillotegmental tract
mth	Tracto mamilotalámico	Mamillothalamic tract
NaOH	Hodróxido de sodio	Sodium hydroxide
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium	Nitro-blue tetrazolium chloride
NDB	Núcleo de la banda diagonal	Diagonal band nucleus
NF	Neurofilamento	Neurofilament
nG	Proteína fluorescente verde en el núcleo	Green fluorescent protein in the nucleus
Ob	Bulbo olfatorio	Olfactory bulb
OIR	Oficina de investigación responsable	Research Office responsible
O/N	Durante la noche	Overnight
P	Postnatal	Postnatal
p	Prosómero	Prosomere
p1	Prosómero 1	Prosomere 1
p2	Prosómero 2	Prosomere 2
p3	Prosómero 3	Prosomere 3
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate Buffered Saline
PBST	Tampón fosfato salino con tritón/tween	Phosphate Buffered Saline with triton/tween
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	Polymerase chain reaction
PeF	Núcleo perifornical	Perifornical nucleus
PFA	Paraformaldehido	Paraformaldehyde
PH	Núcleo hipotalámico posterior	Posterior hypothalamic nucleus
ph	Potencial de hidrógeno	Hydrogen potential

PLN	Fosfolamban	Phospholamban
PMCA	Ca ²⁺ ATPasa de la membrana plasmática	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase
PN	Neurona de proyección	Projection neuron
PS	Septum posterior	Posterior septum
PT	Pretectum	Pretectum
PTh	Pretálamo	Prethalamus
PThE	Eminencia pretalámica	Prethalamic eminence
PVA	Núcleo paraventricular anterior del tálamo	Anterior paraventricular nucleus of thalamus
PVH	Núcleo hipotalámico paraventricular	Paraventricular hypothalamic nucleus
rAAV	Virus adenoasociados recombinantes	Recombinant adeno-associated virus
RCH	Área retroquiásmática	Retrochiasmatic area
RE	Núcleos de reuniens	Nucleus of reuniens
RGP	Progenitores de la glía radial	Radial glia progenitors
RMTg	Núcleo tegmental rostromedial	Rostromedial tegmental nucleus
RFP	Proteína fluorescente rojo	Red fluorescence protein
rpm	Revoluciones por minuto	Revolutions per minute
RSCx	Corteza retrosplenial	Retrosplenial cortex
RT	Núcleo reticular del tálamo	Reticular nucleus of the thalamus
SBPV	Zona subparaventricular	Subparaventricular zone
SC	Colículo superior	Superior colliculus
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo sarco/endoplásmico	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase

SF	Núcleo septofimbrial	Septofimbrial nucleus
SI	Sustancia innominada	Substantia innominata
SIn	Sarcolipina	Sarcolipin
sm	Estría medular	Stria medullaris
SNC	Sistema nervioso central	Central nervous system
SNCc	Sustancia Negra pars compacta	Substantia Nigra pars compacta
SNr	Sustancia Negra pars reticulada	Substantia Nigra pars reticulata
SP	Prosencéfalo secundario	Secondary prosencephalon
SSC	Sal citrato de sodio	Salt sodium citrate
Str	Estriado	Striatum
SuG	Capa gris superficial del colículo superior	Superficial gray layer of superior colliculus
SVZ	Zona subventricular	Subventricular zone
T	Telencéfalo	Telencephalon
T^a	Temperatura	Temperature
TAE	Disolución tampón formada por Tris, acetato y ácido etilendiaminotetraacético	Buffer solution consisting of Tris, acetate, ethylenediaminetetraacetic acid
Tbr1	T-box cerebral	T-box brain
Tbr2	Gen Eomesodermin	Eomesodermin gene
Th	Tálamo	Thalamus
tst	Tracto tectoespinal	Tectospinal tract
VLPO	Núcleo preóptico ventrolateral	Ventrolateral preoptic nucleus
VPL	Núcleo posterolateral ventral del tálamo	Ventral posterolateral nucleus of the thalamus

VPM	Núcleo ventral posteromedial del tálamo	Ventral posteromedial nucleus of the thalamus
VTA	Área tegmental ventral	Ventral tegmental area
WNT	Wingless-int	Wingless-int
xg	Fuerza centrífuga (gravedad)	Centrifugal forces (gravity)
ZLI	Zona limitans intratalámica	Zona limitans intrathalamica
I-X	Lóbulos del vermis cerebeloso de 1 a 10	Cerebellar vermis lobules 1 to 10
μl	Microlitro	Microlitro
μm	Micrómetro	Micrometer





RESUMEN/ABSTRACT

Imagen propiedad de Iris Juárez Leal. Corte sagital de un cerebro de ratón $Eomes^{mTnG}$ a E14.5 donde se puede ver marcado con verde (GFP) los somas de las células y en rojo (RFP) los axones. Adquisición de la imagen: Microscopio confocal SPEII.

Resumen

El complejo habenular es un sistema altamente conservado en todos los vertebrados, que conecta el prosencéfalo límbico con el mesencéfalo y el rombencéfalo rostral. Nuestro objetivo estaba relacionado con ampliar el conocimiento existente en relación con las aferencias hacia la habénula a través de la estría medular, estudiando tanto los núcleos que proyectan al complejo habenular, así como el origen y migración de la mayoría de dichas proyecciones desde la eminencia pretalámica.

En primer lugar, nos planteamos analizar si las proyecciones de la estría medular siguen el patrón transcriptómico de la habénula teniendo en cuenta el núcleo de origen de estas. Nuestra revisión sobre el origen de cada uno de los núcleos, nos han permitido identificar que la mayoría de los axones que llegan a la habénula respetan el mapa transcriptómico previamente descrito por Wagner et al., 2016, siendo dicha división más definida en las terminaciones de la habénula medial y presentando un cambio a una distribución menos restringida en el caso de las proyecciones que terminan en la habénula lateral. Nuestros resultados revelaron la necesidad de realizar nuevos tipos de experimentos conductuales para diseccionar las diferentes funciones asociadas al complejo habenular y su correlación con las distintas poblaciones neuronales que las generan.

En segundo lugar, nos propusimos estudiar la distribución de *Sarcolipina* y comprobar su utilidad como marcador de las proyecciones septales a la habénula. Corroboramos la presencia del gen de *Sarcolipina* en el cerebro de ratón mediante la extracción de ADNc y posterior amplificación de la señal con una PCR. Mediante el ratón reportero transgénico *Sarcolipina*, describimos su patrón de expresión en el cerebro en desarrollo a partir de E16.5 y hasta estadios postnatales de P14, llegando a la conclusión que no es el marcador más adecuado para describir y estudiar la estría medular, pero dado el amplio patrón de localización de las células *Sarcolipina* -positivas, es factible pensar que cumple una función básica en el metabolismo del calcio.

Por último, nos planteamos estudiar la distribución de *Eomes*, describiendo posibles migraciones tangenciales neuronales y su papel en las proyecciones hacia la habénula. Para ello, utilizamos un ratón transgénico *Eomes* (GFP nuclear y RFP axonal) para describir la trayectoria de las neuronas de proyección y las diferentes corrientes migratorias desde la eminencia pretalámica. Nuestros resultados demostraron, al igual que las migraciones recientemente descritas en pollo mediante el gen *Tbr1* (Alonso et al., 2021) las tres corrientes migratorias hacia territorios hipotalámicos, del área preóptica y del área septal. Dichos territorios, además, están relacionados con los núcleos de origen de la estría medular.

Es importante seguir realizando investigaciones que puedan dilucidar los mecanismos relacionados tanto con su desarrollo, como con su función y con la interconexión entre estructuras, para poder entender mejor los mecanismos que subyacen a las patologías asociadas a dichas estructuras.

Abstract

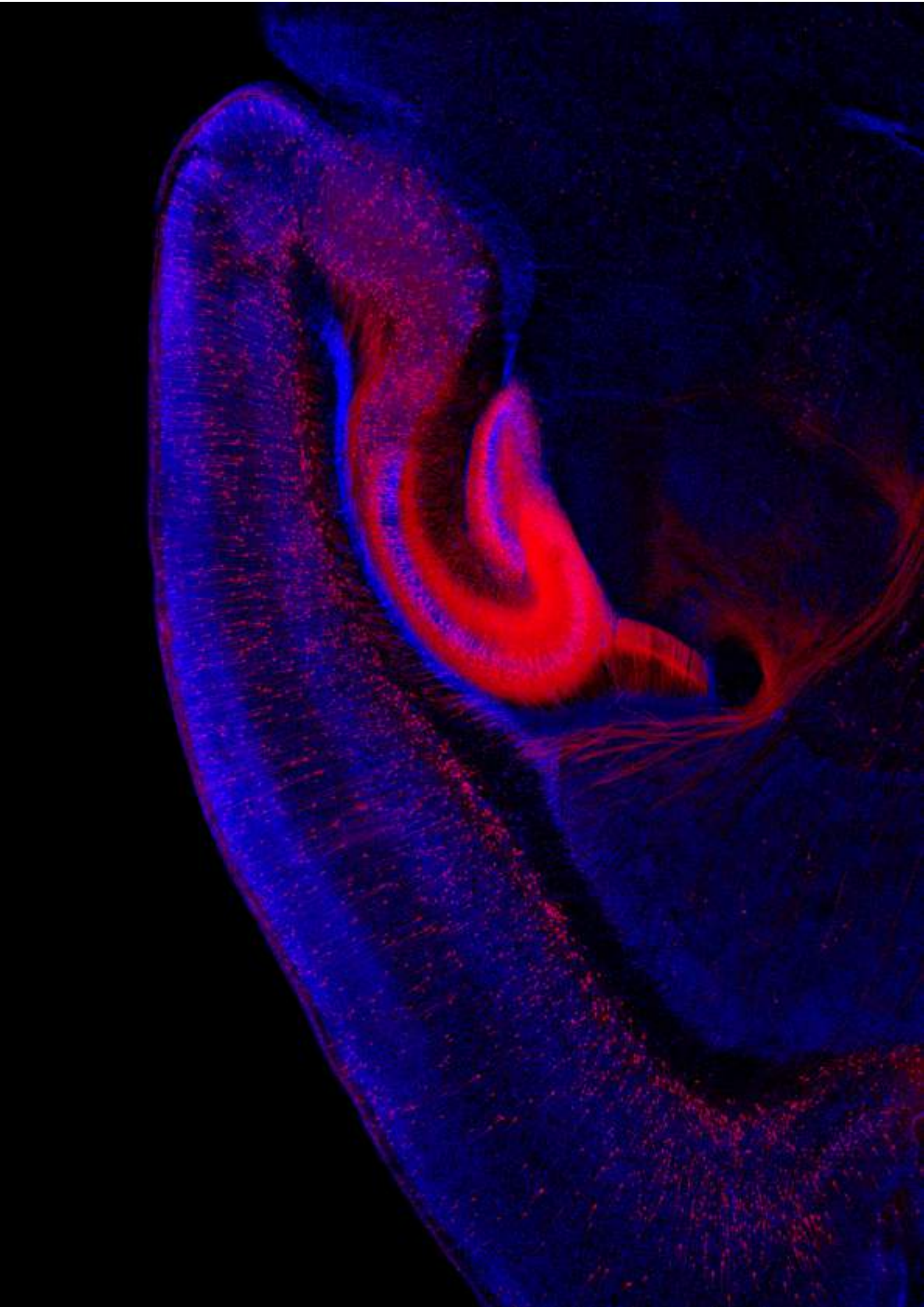
The habenular complex is a highly conserved system in all vertebrates, connecting the limbic forebrain with the midbrain and rostral hindbrain. Our aim was related to extend the existing knowledge regarding the afferents to habenula through the stria medullaris, studying both the nuclei that project to the habenular complex, as well as the origin and migration of most of these projections from the prethalamic eminence.

First, we set out to analyze whether sm projections follow the transcriptomic pattern of habenula, considering the nucleus of origin of these projections. Our review of the origin of each of the nuclei allowed us to identify that most of the axons that reach the habenula respect the transcriptomic map previously described by Wagner et al., 2016, with the division being more defined in the medial habenula terminations and presenting a shift to a less restricted distribution in the case of projections that terminate in the lateral habenula. Our results revealed the need for new types of behavioral experiments to dissect the different functions associated with the habenular complex and their correlation with the different neuronal populations that generate them.

Second, we set out to study the distribution of Sarcolipin and to test its usefulness as a marker of septal projections to habenula. We corroborated the presence of the Sarcolipin gene in the mouse brain by cDNA extraction and subsequent PCR amplification of the signal. Using the Sarcolipin transgenic reporter mouse, we described the expression pattern of Sarcolipin in the developing brain from E16.5 to postnatal stages of P14, concluding that it is not the most appropriate marker to describe and study stria medullaris, but given the broad localization pattern of Sarcolipin-positive cells, it is feasible to think that it plays a basic role in Calcium metabolism.

Finally, we set out to study the distribution of *Eomes*, describing possible neuronal tangential migrations and their role in projections to the habenula. For this purpose, we used an *Eomes* transgenic mouse (nuclear GFP and axonal RFP) to describe the trajectory of projection neurons and the different migratory currents from the prethalamic eminence. Our results demonstrated, like the migrations recently described in chicken using the *Tbr1* gene (Alonso 2021), the three migratory streams towards hypothalamic, preoptic area and septal area territories. These territories are also related to the nuclei of origin of stria medullaris.

It is important to continue research to elucidate the mechanisms related to their development, their function and the interconnection between structures, in order to better understand the mechanisms underlying the pathologies associated with these structures.





INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Imagen propiedad de Iris Juárez Leal. Corte sagital de un cerebro de ratón $Sln^{cre+/+}$ a P3 donde se puede ver marcado con rojo (RFP) las células Sarcolipina positivas. Adquisición de la imagen: Microscopio confocal SPEII.

Introducción y Objetivos

1. Sistema Límbico

Históricamente, el sistema límbico ha sido definido y descrito haciendo referencia a su ubicación, las estructuras que los conforman y las funciones en las estaba implicado en un intento de comprender cómo funcionan los sistemas que controlan el comportamiento emocional.

En la década de 1850, Paul Broca utilizó el término "le grand lobe limbique" para referirse a la parte de la corteza cerebral que forma un borde (limbo en latín) alrededor del cuerpo caloso y el diencéfalo en la cara medial de los hemisferios. Además, consideraba que los bulbos olfativos eran la principal fuente de información para el lóbulo límbico. Más tarde, en 1949, el médico y neurocientífico estadounidense Paul D. MacLean la denominó lóbulo límbico (Neuroscience (Third Edition) D. Purves et al., 2004; Rolls, 2015; Torrico and Abdijadid, 2022).



Figura 1. El “lóbulo límbico” descrito por Paul Broca. Incluye la corteza de la cara medial del hemisferio cerebral que forma un borde alrededor del cuerpo calloso y el diencéfalo, incluyendo la circunvolución cingulada (situada sobre el cuerpo calloso) y la circunvolución parahipocampal. Históricamente, el bulbo olfatorio y la corteza olfativa (no ilustrados aquí) también se han considerado elementos importantes del lóbulo límbico. Adaptación de Neuroscience, Dale Purves.

Parte del empeño en las investigaciones, se centraban en tratar de asignar áreas cerebrales y estructuras a funciones específicas asociadas a dichas estructuras o sistemas. Fue en 1937 cuando James Papez propuso por primera vez que existen circuitos cerebrales específicos dedicados a la experiencia y la expresión emocional. Para entender qué partes del cerebro desempeñan esta función, empezó a explorar los aspectos mediales del hemisferio cerebral. Algunas de las estructuras descritas originalmente por Papez se han demostrado que no tienen una clara función asociada al comportamiento y a las emociones, así como otras estructuras que no se incluyeron, sí cumplen un papel trascendental en dicho sistema, como son la corteza prefrontal orbital y medial y la amígdala (Neuroscience (Third Edition) D. Purves et al., 2004).

En sus investigaciones, Papez demostró que la corteza cingulada y el hipotálamo están interconectados mediante proyecciones desde los cuerpos mamilares (parte del hipotálamo posterior) al núcleo anterior del tálamo dorsal, que a su vez se proyecta al giro cingulado. El giro cingulado (y muchas otras regiones corticales) se proyecta al hipocampo. Por último, demostró que el hipocampo se proyecta a través del fórnix (un gran haz de fibras) de vuelta al hipotálamo (tubérculos mamilares). Papez sugirió que estas vías proporcionaban las conexiones necesarias para el control cortical de la expresión emocional, y se conocieron como el "circuito Papez". (Neuroscience (Third Edition) D. Purves et al., 2004; Vogt, 2019; Torrico and Abdijadid, 2022)

Nauta consideraba límbicas las áreas corticales telencefálicas que están conectadas recíprocamente a áreas subcorticales que se extienden rostralmente desde el septum y

caudalmente hacia el tronco encefálico (Roxo et al., 2011). A su vez, excluyó de los circuitos el lóbulo límbico de Broca, que abarcaba los giros cingulado y parahipocámpico, que eran una parte esencial del circuito “emocional” de Papez y del sistema límbico definido por MacLean. Nauta, además, incluyó el hipotálamo y el mesencéfalo, mientras que Nieuwenhuys y colegas, añadieron una serie de estructuras pertenecientes al rombencéfalo (Nieuwenhuys, 2009).

Como se ha descrito anteriormente, los componentes del sistema límbico varían según diferentes descripciones neuroanatómicas de los diferentes autores en función del avance en las investigaciones.



Figura 2. Principales vías del sistema límbico. Imagen que muestra un corte sagital del cerebro humano con las conexiones y vías que forma el sistema límbico. Adaptación de Sistema Nervioso Central, Nieuwenhuys, 2009.

Actualmente, las estructuras incluidas en el sistema límbico se encuentran en la región general que limita con el hemisferio cerebral y el tronco encefálico, lateral al tálamo, por debajo de la corteza cerebral, pero por encima del tronco encefálico (Catani et al., 2013). El sistema límbico procesa la información sensorial del entorno externo e interno para determinar, a través de la memoria y la motivación, las respuestas emocionales, autónomas, motoras y cognitivas importantes para la autoconservación y la supervivencia (Richard, S. 2009).

Clínicamente, algunos trastornos específicos se producen cuando partes del sistema límbico sufren una lesión. Aunque, los avances en neurociencias han permitido comprender mejor el papel de cada uno de sus componentes, la organización límbica y sus múltiples conexiones, la comprensión del sistema límbico dista mucho de ser completa (Morgane et al., 2005b; Torrico and Abdijadid, 2022).

En cuanto a las funciones asociadas al sistema límbico son la regulación de la conducta emocional, en su aspecto más general. Está compuesto por circuitos que regulan sensaciones emocionales y conductas de autoprotección (alimentación, lucha, etc.), circuitos involucrados en estados expresivos, sentimientos de sociabilidad y de procreación (Nieuwenhuys, 2009). Posteriormente se ha asociado, además, con procesos emocionales de memoria y motivación, estrés, respuestas de adicción, de refuerzo y de recompensa. (Hariri et al., 2000; Morgane et al., 2005b). En general, el sistema límbico colabora en varios procesos relacionados con la cognición, como la memoria espacial, el aprendizaje, la motivación, el procesamiento emocional y el procesamiento social. (Hariri et al., 2000). El concepto de “un” sistema límbico necesita de una revisión y ampliación en términos de conectividad entre los subsistemas límbicos que han sido previamente descritos y de las funciones subyacentes de dichos subsistemas, además de la variedad de sistemas de control de neurotransmisores que modulan con precisión estas vías, con el objetivo de brindar información más detallada de la organización límbica (Morgane et al., 2005a; Vogt, 2019).

Dentro de las estructuras que conforman el sistema límbico se encuentra el complejo habenular, siendo de gran importancia en el sistema nervioso central por considerarse una estación de relevo entre distintas áreas cerebrales y por recibir y establecer conexiones con sistemas neuromoduladores principales.

2. Complejo habenular

Entre las poblaciones diencefálicas del sistema límbico nos encontramos con la habénula (Hb). Se trata de un sistema altamente conservado en todos los vertebrados, que conecta el prosencéfalo límbico con el mesencéfalo y el rombencéfalo rostral.

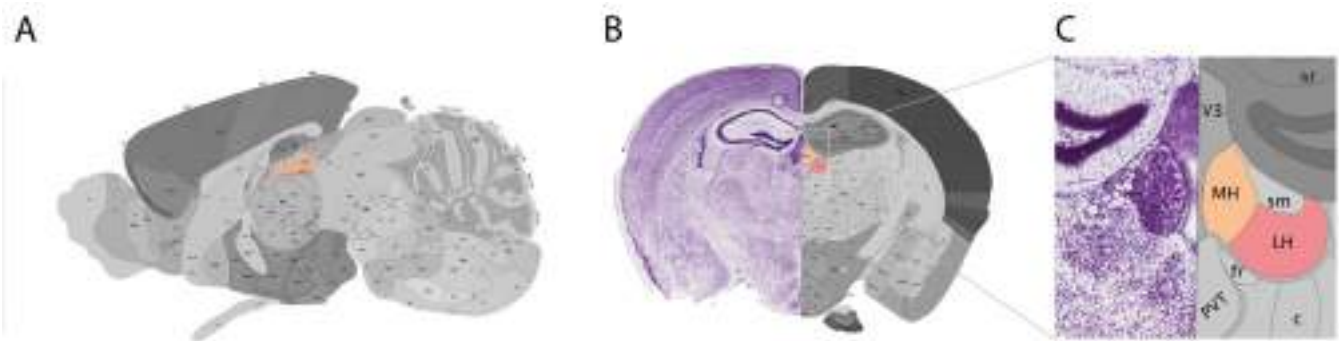


Figura 3: Localización de la Hb. (A) Imagen de un corte sagital de un cerebro de ratón adulto con la Hb coloreada para su localización. (B) Imagen de una sección coronal de un cerebro de ratón adulto con la ampliación (C) del área dónde se encuentra la Hb, tanto la porción medial (MHb) como la lateral (LHb), así como como su aferencia, la estría medular (sm) y su eferencia, el tracto retroflejo (nombrado en la imagen como fr, pero al que nosotros abreviaremos como rft). Imagen modificada de la base de datos Allen Brain Atlas [atlas.brain-map.org].

Esta población está constituida por dos núcleos principales, el medial (MHb) y el lateral, (LHb; Andres et al., 1999). Se encuentra en la parte más dorsal de la placa alar del prosómero 2 (Charles Watson-The Mouse Nervous System-Academic Press 2012; Puelles and Rubenstein, 2003). La Hb recibe proyecciones desde el prosencéfalo basal, vía la estria medular (sm), y proyecta al mesencéfalo basal y rombencéfalo prepontino a través del fascículo retroflejo (rft) (Sutherland, 1982; Morgane et al., 2005a).

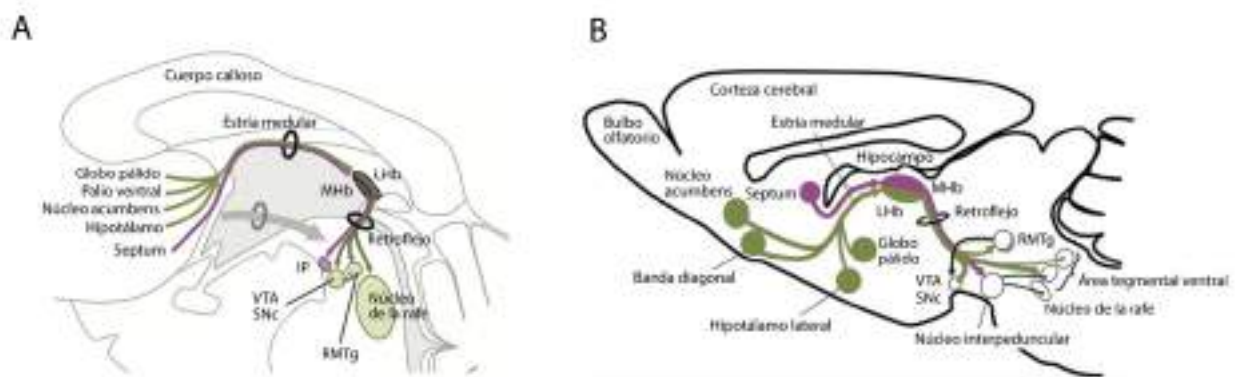


Figura 4: Localización del complejo habenular, aferencias y eferencias. (A) Esquema de un corte sagital de cerebro humano con la localización de la Hb, la sm y el rft, así como de los núcleos de origen de las fibras aferentes y los núcleos diana de las fibras eferentes. (B) Esquema de corte sagital de cerebro de ratón adulto mostrando las mismas estructuras y tractos. Abreviaturas: IP: núcleo interpeduncular; LHb: habénula lateral; MHb: habénula medial; RMTg: núcleo tegmental rostromedial; VTA: área tegmental ventral. Adaptación de Aizawa et al., 2013 (ratón) y Aizawa et al., 2019 (humano).

2.1 División de la habénula

Clásicamente, la Hb se dividía en las porciones medial y lateral del LHb y en las porciones rostral y caudal del MHb (Herkenham and Nauta, 1977; Herkenham and Nauta, 1979). Mediante el análisis citoarquitectónico del complejo habenular en el cerebro de la rata, la LHb se dividió posteriormente en 9 subnúcleos y la MHb en 5 subnúcleos (Andres et al.,

1999). Esta subdivisión fue confirmada años después por la distribución de neurotransmisores en los subnúcleos realizada por (Aizawa et al., 2012). Según los criterios topográficos, citoquímicos, morfológicos e inmunocitoquímicos, la subdivisión habenular descrita en rata anteriormente, también se demostró en el cerebro de ratón (Wagner et al., 2014). Un estudio de caracterización transcriptómica detallada corroboró la subdivisión de los subnúcleos descritos previamente en el Hb de ratón (Wagner et al., 2016). En relación a dichos estudios, finalmente se describió que la LHb mostraba una división medial que incluía subnúcleos centrales (LHbMC), marginales (LHbMMg), parvocelulares (LHbMPc) y superiores (LHbMS) y una división lateral que incluía: subnúcleos lateral (LHbL), basal (LHbLB), magnocelular (LHbLMc), marginal (LHbLMg), oval (LHbLO) y parvocelular (LHbLPc). La MHb se subdividió en partes dorsal (MHbD), superior (MHbS), ventral medial (MHbVm), ventral central (MHbVc) y ventral lateral (MHbVI).

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de secuenciación de ARN unicelulares ha permitido estudiar en profundidad el perfil de expresión de neuronas pertenecientes a la Hb de forma disociada (Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020a). Estos análisis dieron como resultado la identificación mediante un perfil transcriptómico de 12 grupos neuronales que coincidían en gran medida con las subdivisiones morfológicas y transcriptómicas habenulares. Algunos de ellos pertenecían a subnúcleos específicos y otros a subdivisiones dentro de un subnúcleo particular. Este resultado puso de manifiesto la gran complejidad que presentan las subpoblaciones neuronales del complejo Hb (Hashikawa et al., 2020; Wallace et al., 2020b).

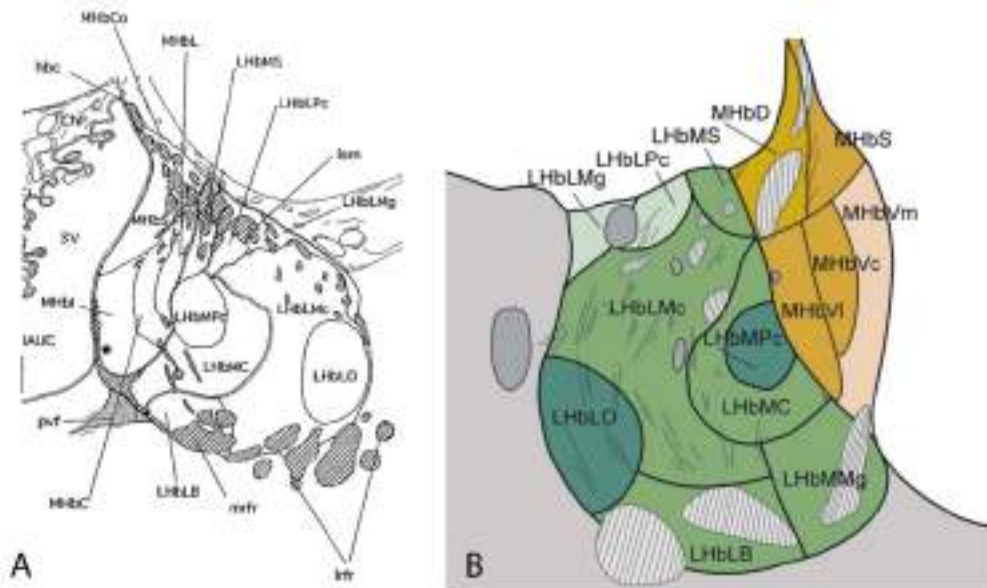


Figura 5: Subdivisiones de la Hb. (A) Imagen de la subdivisión de la Hb en rata propuesta por Andrés et al., 1999. (B) Imagen de la adaptación de las subdivisiones propuestas por Andrés, al cerebro del ratón propuesto por Wagner et al., 2016.

Esta nueva clasificación de los subnúcleos habenulares mucho más compleja que la anterior nos llevó a preguntarnos si las fibras provenientes de la sm, con sus múltiples orígenes, podrían mostrar una topografía que se ajustará a este nuevo orden citoarquitectónico.

2.2 Desarrollo del complejo habenular desde el modelo prosomérico

El sistema de conducción diencefálico se compone de tres estructuras: la sm, el complejo habenular y el rft (Sutherland, 1982). Dichas estructuras están evolutivamente conservadas y presentes en prácticamente todos los vertebrados, que desempeñan un papel importante en la conexión del cerebro anterior con el resto del sistema nervioso central (Chatterjee and Li, 2012; Roberson and Halpern, 2018).

En el modelo prosomérico, el diencefalo se subdivide en tres territorios transversales: prosómero 1 (p1), prosómero 2 (p2) y prosómero 3 (p3), cada uno de los cuales presenta una identidad molecular y un destino característicos (Charles Watson-The Mouse Nervous System-Academic Press, 2012; Rubenstein 1994; Puelles et al., 1987, 2013a; Bulfone et al., 1993; Rubenstein et al., 1994, 1998). En el cerebro adulto, estas unidades transversales diencefálicas contienen los siguientes complejos anatómicos en sus placas alares el pretectum (en p1), el tálamo y el epitálamo en p2), el pretálamo y la eminencia pretalámica (PThE; en p3) (Charles Watson-The Mouse Nervous System-Academic Press, 2012; Puelles and Rubenstein, 2003).

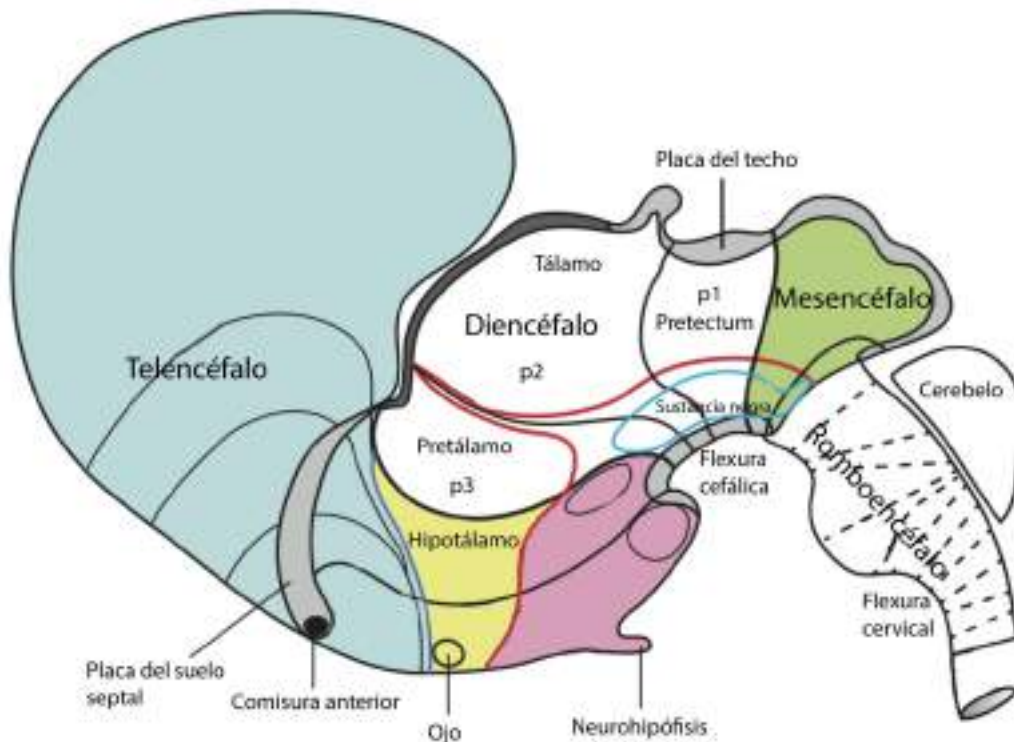


Figura 6: Segmentación del cerebro en desarrollo del modelo prosomérico. Diagrama de una vista lateral de la organización segmentaria del cerebro en desarrollo de ratón. El telencéfalo se divide en

el pallium y las regiones subpalliales [estriado, pallidum, dominio diagonal y área preóptica]. La placa septal (sombreado gris) se extiende desde el techo telencefálico hasta la comisura anterior en desarrollo. En el hipotálamo terminal se están diferenciando la vesícula ocular, la neurohipófisis y los cuerpos mamaros. En el hipotálamo peduncular se está desarrollando el núcleo subtalámico. La línea roja representa el límite alar-basal, también en el mesencéfalo y el diencefalo. Adaptación de Puelles et al., 2013.

El dominio p2 da lugar, entre otras estructuras, a la Hb, por lo que la formación de la Hb depende de la adecuada especificación y regionalización del diencefalo y sus prosómeros (Chatterjee and Li, 2012; Roberson and Halpern, 2018). El organizador diencefálico medio es una fuente de morfógenos como Wnt, Fgf y Shh y está implicado en la frontera entre p2 y p3, así como en el modelado de p2 (Roberson and Halpern, 2018). Por otro lado, el gen Pou4f1 (también conocido como Brn3a) se expresa en la Hb en desarrollo y es esencial para su desarrollo (Xiang et al., 1996; Quina et al., 2009). La Hb, a pesar de ser muy heterogénea y compleja en su composición, tiene una identidad molecular que se distingue de otras regiones del cerebro. Los estudios genéticos han identificado moléculas que son importantes para el desarrollo de los rasgos neurológicos de la Hb, como la fasciculación y la orientación de los axones (Giger et al., 2000; Kantor et al., 2004; Quina et al., 2009). Sin embargo, sigue sin resolverse cómo se especifica la identidad habénular (Chatterjee and Li, 2012).

2.3 Funciones de la habénula

Debido a la complejidad y heterogeneidad en su composición, como se ha descrito anteriormente, se sabe que la Hb está implicada en gran variedad de funciones que modulan diversos estados, como son el miedo y la ansiedad, la aversión y la recompensa, el dolor, el sueño y los comportamientos reproductivos y agresivos (Sutherland, 1982; Hikosaka, 2010; Hennigan et al., 2015; Baño-Otálora and Piggins, 2017; Cerniauskas et

al., 2019; Lazaridis et al., 2019; Boulos et al., 2020). La actividad habenular también ha sido implicada en condiciones clínicamente relevantes, con una desregulación intensamente asociada a los trastornos depresivos (Shumake et al., 2003; Sartorius and Henn, 2007; Li et al., 2011; Liu et al., 2017; Jester-Broms, 2018; Aizawa and Zhu, 2019), a la enfermedad mental (Fakhoury, 2017; Bühler and Carl, 2021) y a la adicción a las drogas (Fakhoury and Domínguez López, 2014; Velasquez et al., 2014; Loonen and Ivanova, 2016; Batalla et al., 2017; Fakhoury, 2018).

En términos más específicos, la MHb se ha asociado con la mediación de respuestas analgésicas, autonómicas, de recompensa, ansiedad y miedo (Gardon et al., 2014; Hsu et al., 2014, 2016a). Más concretamente, el aspecto dorsal del MHb se ha relacionado con la motivación para el ejercicio, la regulación del estado hedónico, el circuito de refuerzo intrínseco y las conductas aversivas (Hsu et al., 2014; Koppensteiner et al., 2016a; Lee et al., 2019). El aspecto ventral del MHb se ha implicado en la adicción a las drogas, la ansiedad y la depresión (Hsu et al., 2013; Yamaguchi et al., 2013; McLaughlin et al., 2017; Lee et al., 2019). Por lo tanto, la MHb de vertebrados está relacionada con el comportamiento emocional (Hsu et al., 2014, 2016b; Koppensteiner et al., 2016b; Lee et al., 2019). Por otro lado, se ha comprobado mediante la eliminación selectiva (por inyección de toxinas) del núcleo triangular del septum (TS) y por tanto la eliminación de su proyección a la MHb, probando que produce en el ratón adulto, un deterioro específico de los trastornos relacionados con la ansiedad y el miedo (Yamaguchi et al., 2013).

Por el contrario, el LHb ha sido considerado como un sistema anti-recompensa y aparece asociado al control conductual y motivacional. De hecho, el LHb está implicado en la regulación del estado de ánimo, estrés, los circuitos circadianos, el comportamiento maternal y el comportamiento agresivo (Pobbe and Zangrossi, 2008; Stamatakis et al., 2016; Mathis and Lecourtier, 2017; Mendoza, 2017; Mizumori and Baker, 2017; Gold and Kadriu, 2019; Lazaridis et al., 2019; Li et al., 2021a; Nuno-Perez et al., 2021). Los resultados obtenidos en experimentos conductuales apuntan a una relación del LHb con la respuesta de indefensión aprendida, así como con la conducta de recompensa, aversión o castigo (Hong and Hikosaka, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Hikosaka, 2010; Li

et al., 2011; Proulx et al., 2014; Stamatakis et al., 2016; Flanigan et al., 2017, 2020). Aunque la adicción tiene una estrecha relación con el correcto funcionamiento de la MHb, hay estudios que consideran la implicación de la LHb en dicha patología (H (Gill et al., 2013; Li et al., 2021b).

Esta implicación en las funciones descritas provoca que la falta de función total o parcial de esta estructura neuronal esté íntimamente relacionada con enfermedades psiquiátricas como la depresión profunda (asociada a comportamientos como la reducción en la actividad motora voluntaria, alteración en niveles de dopamina y serotonina, alteración del ciclo circadiano, etc.), la psicosis y esquizofrenia asociada al consumo de drogas, así como los comportamientos relacionados con la obtención de recompensas y la evitación o la conducta aversiva relacionada con el refuerzo negativo (Juárez-Leal et al., 2022). El consumo continuo de cocaína y anfetamina provocan una degeneración localizada del rft en ratas. También, en pacientes con esquizofrenia crónica se ha encontrado una mayor prevalencia de calcificaciones de la Hb (Hikosaka, 2010), haciendo visible la importancia de profundizar en investigaciones que estudien en detalle, tanto las patologías que aparecen como daño colateral al consumo de sustancias, como las patologías que desarrollan por una alteración en el desarrollo y/o la función de una o varias estructuras cerebrales.

2.4 Conectividad de la habénula: aferencias y eferencias

La formación de conexiones precisas entre los axones aferentes y sus neuronas asociadas es esencial para el ensamblaje de circuitos neuronales y la correcta función del sistema nervioso central. La organización del cerebro ya sea en forma de núcleos neuronales o en estructuras laminadas y su conectividad intrínseca, requieren de la expresión restringida de señales instructivas específicas (Tessier-Lavigne and Goodman 1996)

El gran conjunto de estudios funcionales de las estructuras que conforman el sistema nervioso central no siempre se ha acompañado de estudios de conectividad durante el desarrollo embrionario. Los mecanismos celulares y moleculares implicados en la toma de decisiones por parte de las fibras de la sm son prácticamente desconocidos. En los últimos años, en cambio, ha habido una serie de publicaciones que han ampliado el conocimiento sobre dichos mecanismos en el caso del rft (Moreno-Bravo et al., 2016; Company et al., 2021b, 2021a)

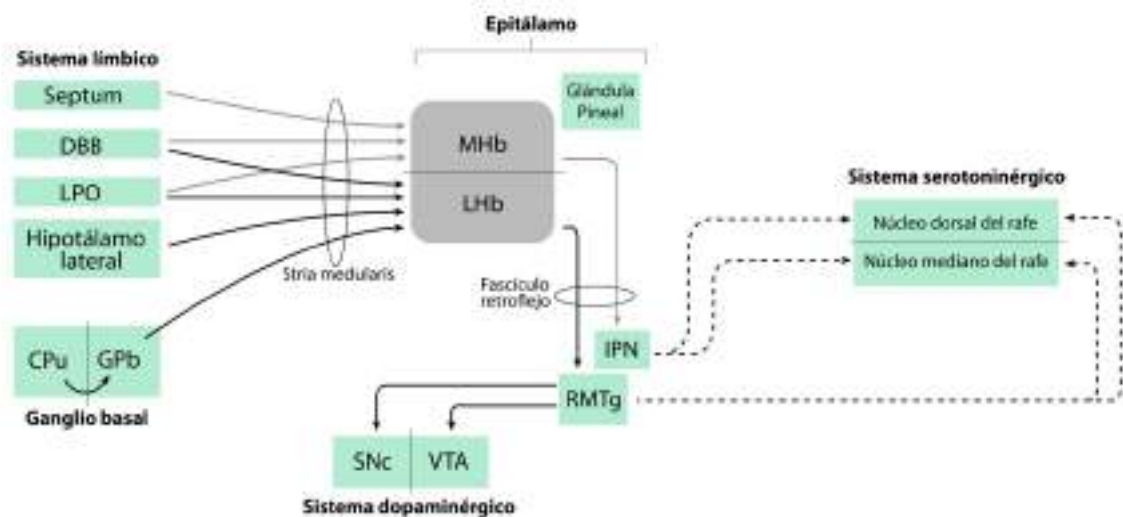


Figura 7: Aferencias y eferencias a la Hb. Esquema que representa los distintos núcleos que proyectan axones a través de la sm hacia la Hb, y los núcleos diana de las proyecciones eferentes de la Hb, así como las proyecciones colaterales desde dichas estructuras, propuesto por Hikosaka et al., 2010. Adaptación de Hikosaka et al., 2010.

Fascículo retroflejo

El fascículo rft es la principal eferencia de la Hb. La Mhb proyecta principalmente al núcleo interpeduncular (IP) donde los axones cruzan varias veces la placa del suelo del r1 para inervarlo (Santiago Ramón y Cajal, 1909). A su vez, el IP inerva dianas secundarias, como el rafe medio, el área tegmental ventral y los núcleos tegmentales dorsales (Shibata and Suzuki, 1984). Los axones de la Lhb inervan varios núcleos diana en el mesencéfalo,

como la sustancia negra pars compacta y área tegmental ventral (Araki et al., 1988; Brinschwitz et al., 2010), el rombencéfalo rostral, como el complejo del rafe (Wang & Aghajanian 1977) y locus cerúleo (Herkenham and Nauta, 1979a).

Moreno-Bravo et al., 2016 definió la compleja trayectoria axonal, redefiniendo el obsoleto concepto de que el fascículo rft era un tracto recto debido a la deformación secundaria provocada por la flexura cefálica. Describió que el primer paso de los axones desde la MHb es crecer de forma fasciculada y dorsoventral, presumiblemente atraídos por una interacción de Netrin1 (Ntn1)-DCC de la región ventral (Funato et al., 2000) y rechazados de forma antero-posterior por la interacción entre neuropilinas y semaforinas de las placas alares diencefálicas (Funato et al., 2000; Sahay et al., 2003; Kantor et al., 2004). Una vez que llegan al tegmento del tálamo, son rechazados por la placa del suelo, a través de una interacción Robo1-Slit2 (Moreno-Bravo et al., 2016). Los axones se re-dirigen entonces caudalmente hacia el tegmento mesencefálico y luego a la placa basal del rombencéfalo 1, hasta sinaptar con el núcleo interpeduncular (IP).

Posteriormente, Company et al., 2021b confirmó el papel de sustancia negra pars compacta y del área tegmental ventral como objetivos intermedios y como responsables de orquestar la localización precisa de molécula de Ntn1, y por tanto relacionada con la generación de la señal necesaria para que los axones del rft provenientes de la MHb que expresan DCC, realicen la flexión caudal. Posteriormente, Company et al., 2022 demostraron el papel del gen Amigo2 en la fasciculación (que no en la navegación) del tracto rft.

Estría medular

La sm es el principal tracto aferente al complejo Hb. Este tracto altamente fasciculado contiene fibras originadas en diferentes poblaciones neuronales localizadas en el prosencéfalo secundario (hipotálamo y vesícula telencefálica; (Herkenham' And and Nauta, n.d.; Herkenham and Nauta, 1979b; Bulfone et al., 1993; Puelles and Rubenstein, 2003; Ferran et al., 2015). El sm fasciculado recorre la cara más dorsal del prosómero pretalámico, conocida como eminencia pretalámica, transportando axones desde sus múltiples orígenes, caudalmente hacia el prosómero talámico para alcanzar el complejo Hb.

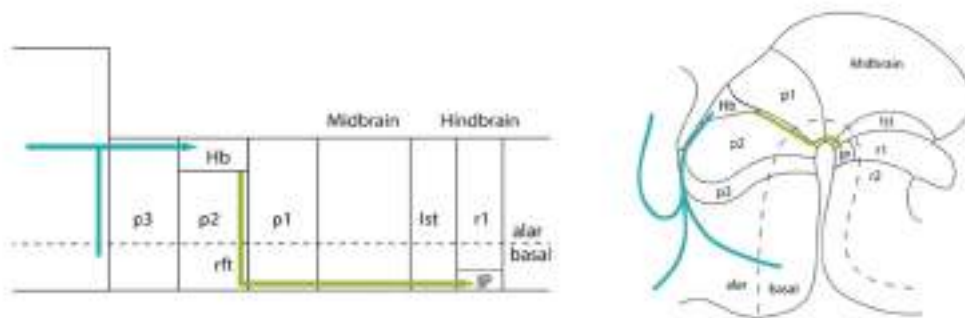


Figura 8: Diagrama del prosencéfalo secundario con las vías aferentes y eferentes de la Hb. El recorrido de la sm aparece en color azul aguamarina y el recorrido del rft en color verde. Adaptación de Moreno-Bravo et al., 2016.

La sm constituye una de las conexiones principales entre las eferentes provenientes del sistema límbico cortical, subcortical e hipotalámico y la Hb. Esta última sirve de estación intermedia con las poblaciones nucleares del tectum mesencefálico y rombencefálico.

De ahí su relevancia en la clínica por la gran variedad de funciones básicas que controla como el control del sistema dopaminérgico, serotoninérgico, ritmos circadianos, cognición, etc. (Sutherland, 1982; Hikosaka, 2010; Loonen and Ivanova, 2016). Cualquier alteración en la formación de esta circuitería desemboca en graves alteraciones psiquiátricas y neurológicas como la depresión, ansiedad y adicción a las drogas (Sartorius and Henn, 2007; Velasquez et al., 2014; Hennigan et al., 2015; Li et al., 2017; Lazaridis et al., 2019).

Comprender los procesos necesarios tanto para el desarrollo como para el correcto funcionamiento del complejo cableado de entrada (aferencia) como de salida (eferencia) de la Hb, es esencial para poder entender las consecuencias clínicas en patologías asociadas a dichas estructuras.

2.5 Núcleos que proyectan a la habénula a través de la estría medular

Estas aferentes, a pesar de tener diferentes orígenes, se concentran en un único tracto, la sm. Los axones contenidos en este tracto se pueden dividir en dos grupos, dependiendo de si su objetivo es la MHb o la LHb. Las fibras que terminan en la LHb tienen su origen en la región preóptica, el pálido, el estriado, la amígdala extendida y el hipotálamo lateral. Las fibras que terminan en la MHb se originan principalmente en el núcleo TS y en el núcleo septofimbrial (Herkenham and Nauta, 1977; Geisler and Trimble, 2008; Viswanath et al., 2014). A nivel de sinapsis, los primeros estudios identificaron entradas sinápticas excitatorias mixtas purinérgicas y glutamatérgicas al MHb desde el septum posterior en la rata (Edwards et al., 1992). Esta inervación diferenciada hace que los dos subnúcleos habenulares estén implicados en diferentes funciones superiores.

Se ha descrito que las fibras sm se originan en los territorios hipotalámico, palidal y septal. Según se informa, el MHb recibe entradas del núcleo TS, el núcleo septofimbrial, el área septal, el núcleo del lecho de la comisura anterior (BAC) y de neuronas entopedunculares

hipotalámicas (Herkenham and Nauta, n.d.; Viswanath et al., 2014; Wallace et al., 2017; Watanabe et al., 2018; Hu et al., 2020). El LHb, como se describió por primera vez, está innervado por, el núcleo entopeduncular (erróneamente identificado como ganglios basales y núcleo accumbens), las regiones preópticas y al septum (Herkenham and Nauta, 1977). Esta descripción fue posteriormente confirmada y completada, concluyendo que el LHb recibe inputs de la sustancia innominada (SI; (Knowland and Lim, 2018), núcleo entopeduncular dorsal (EPD; Hong and Hikosaka, 2008; Shabel et al., 2012; Li et al., 2019; Wallace et al., 2020a) y área hipotalámica lateral (LHA; Stamatakis et al., 2016; Lecca et al., 2017; Lazaridis et al., 2019). Cabe destacar que recientemente se ha descrito que casi todas las poblaciones neuronales que proyectan al Hb en aves están colonizadas por neuronas glutamatérgicas de migración tangencial originadas en la eminencia pretalámica (Alonso et al., 2020a, 2021). Existen tres corrientes migratorias heterocrónicas, por las que la eminencia pretalámica puebla regiones hipotalámicas, preópticas, palidales y septales (Watanabe et al., 2018a; Alonso et al., 2021). El patrón específico de innervación producido por las diferentes poblaciones neuronales aferentes en los subnúcleos LHb o MHb ha sido poco estudiado. Sólo se ha descrito previamente la innervación específica del LHbLO por el EPD (Kowski et al., 2008; Wallace et al., 2020a).

2.6 Eminencia pretalámica

La PThE (algunos autores se refieren a ella como "eminencia talámica") es una región diencefálica en el subdominio más dorsal del pretálamo, que corresponde a p3 en el modelo prosomérico para el desarrollo del cerebro anterior de los vertebrados (Alonso et al., 2020a). El PThE ha sido considerado previamente como una parte dorsal del p4, fue reconocido como un dominio dorsal al pretálamo, ocupando allí una posición análoga a la de la Hb relativa al tálamo (Puelles and Rubenstein, 2003), atravesado longitudinalmente por la sm, una característica típica para los límites interprosencefálicos (Alonso et al., 2021). Este tracto fasciculado, discurre por la cara más dorsal del prosómero pretalámica, llevando axones desde sus múltiples orígenes, caudalmente hacia el prosómero talámica para alcanzar el complejo habenular (Juárez-Leal et al., 2022). El

PThE es un centro de señalización en el ratón en desarrollo, en el papel de organizador del diencefalo (Abbott and Jacobowitz, 1999; Adutwum-Ofosu et al., 2016). Además, esta zona se ha propuesto como fuente neurogénica de células de Cajal-Retzius y del bulbo olfatorio, siendo el bulbo olfatorio la vía más larga reportada para la migración de neuronas de proyección en el cerebro anterior (Huilgol et al., 2013; Ruiz-Reig et al., 2017a; Alonso et al., 2020a).

El pretálamo se considera el sitio neurogénico de las neuronas GABAérgicas que poblarán el tálamo en el cerebro adulto (Inamura et al., 2011) y, por tanto, expresa genes que codifican factores de transcripción implicados en la neurogénesis GABAérgica, pero observaron que el PThE es negativa para genes relacionados con la neurogénesis GABAérgica y, en cambio, positiva para genes que participan en la neurogénesis glutamatérgica como Pax6, Neurog2 y Tbr2 (Schoorjans and Guillemot, 2002.; Mattar et al., 2004; Englund et al., 2005; Ruiz-Reig et al., 2017b; Hevner, 2019; Puelles, 2019).

En el área septal, se encuentra la misma diversidad celular y Watanabe et al., 2018b basando su estudio en dicha heterogeneidad neuronal, observó diferencias en la composición neuronal entre el septum posterior glutamatérgico y otros núcleos septales GABAérgicos, demostrando finalmente la migración rostro-dorsal de células desde el PThE hacia el septum posterior para originar el núcleo TS y el BAC, siendo núcleos de proyección a la Hb a través de la sm. Además, un estudio publicado recientemente en pollo demostró que tres corrientes celulares migratorias salen del PThE hacia rostral, dirigiéndose a múltiples sitios en el hipotálamo, el subpallium y el área septocomisural, basándose en el análisis descriptivo del desarrollo de la expresión cerebral del gen Tbr1 en embriones de pollo y utilizando el procedimiento de injerto quimérico homotópico codorniz-pollo (Alonso et al., 2021).

Previamente a los hallazgos encontrados por Watanabe et al. y Alonso et al., una de las hipótesis que nos planteamos era la posibilidad de que la sm utilizara la PThE como diana intermedia, basándonos en la información que disponíamos acerca de cómo el rft utiliza

la sustancia negra pars compacta como diana intermedia para continuar su camino hacia el núcleo interpeduncular, y así simplificar la complejidad de su trayectoria. Una trayectoria tan compleja y larga como la que presenta la sm, daba lugar a plantear dicha posibilidad puesto que la PThE se encontraba en una ubicación muy estratégica y coincidiendo con la ruta de la sm, que cabía esperar que estuviera produciendo las moléculas necesarias para la correcta navegación de los axones en crecimiento en dirección hacia la Hb. No obstante, serían necesarios más estudios que amplíen la información relacionada con dicha estructura y las posibles funciones aún no descritas.

3. Marcadores específicos de la estría medular

Dada la complejidad en cuanto a sus orígenes y la trayectoria de los axones que conforman la sm, resultaba de vital importancia identificar moléculas que nos permitieran distinguir entre las distintas fibras que conforman dicho tracto y poder estudiarlo con mayor profundidad. Para ello, se realizó una amplia búsqueda bibliográfica y de expresión génica en la base de datos de Allen Brain Atlas (Allen Mouse Brain Atlas, mouse.brain-map.org) para identificar todas aquellas moléculas que pudieran resultar de utilidad para el estudio y descripción de este grupo de axones.

En cuanto a estudios previos que identificaran marcadores específicos de la sm, nos encontramos con el realizado por Abbott et al., 1999, utilizando la Calretinina. Previamente los estudios habían descrito típicamente desde el punto de vista morfológico, utilizando la tinción de Nissl, pero la descripción que realiza acerca de las células positivas en la PThE, de aparición a E11.5 y aparición de primeras fibras de la sm en dirección a la Hb a E13.5, que aportó una valiosa información acerca de dichas estructuras.

Existen marcadores más generales, como son los neurofilamentos, fundamentales para el crecimiento radial de los axones y determinar su calibre, sirviendo como marcadores de los axones neuronales. Este es el caso de neurofilamento (NF), que resulta de utilidad para

estudiar la sm, pero en su conjunto, puesto que es positiva a NF así como el resto de tractos del cerebro del ratón. Cabe destacar, que NF resulta de gran utilidad para poder detectar neurodegeneración o lesión en estructuras cerebrales (Graham et al., n.d.; Yuan and Nixon, 2021). La lesión y la pérdida neuroaxonal provocan la liberación de componentes del citoesqueleto, incluidos los neurofilamentos, en el líquido cefalorraquídeo y la sangre periférica. Una vez liberados, los neurofilamentos son altamente inmunogénicos, induciendo una respuesta específica de anticuerpos (Zmira et al., 2020).

Algo similar ocurre con glicoproteína axonal transitoria-1 (Tag1), debido a que se expresa en cuerpos celulares de motoneuronas y en axones, sobre todo durante las primeras fases de diferenciación durante el desarrollo embrionario (Suter et al., 2020), por lo que es de utilidad, al igual que NF, para estudiar la sm pero a su vez no es específico para marcar de forma específica los distintos axones.

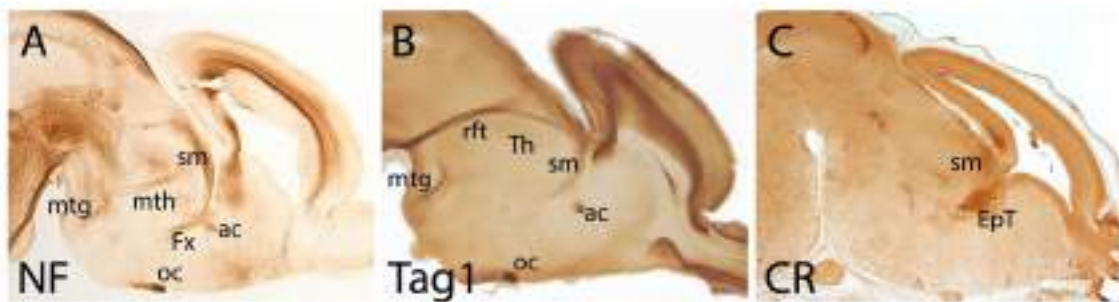


Figura 9: Marcadores de la sm. Cortes sagitales de cerebros embrionarios de ratón en a E17.5 mostrando una inmunohistoquímica contra Neurofilamento (A), Tag1 (B) y CR (C). El neurofilamento se distribuye en varios tractos axonales, siendo el sm entre ellos. La distribución de Tag1 es más específica estando también presente en el rft y en las fibras corticofugales. Cr se expresa específicamente en la PThE y en la sm. Abreviaturas: EpT: eminencia pretalámica; mth: tracto mamilotalámico; rft: tracto retroflejo; sm: estría medular; Th: tálamo.

Por otro lado, encontramos dos proteínas, la *Sarcoplipina* y *Eomes* que parecían ser específicas de los axones provenientes de los territorios septales, pudiendo estudiar la sm en mayor profundidad, por tanto, decidimos analizar dichas proteínas en profundidad.

3.1 *Sarcolipina*

La *Sarcolipina* (*Sln*) es una pequeña proteína asociada originalmente al retículo endo/sarcoplásmico (Wawrzynow et al., 1992). Originalmente se describió que su función es modular el canal de la ATPasa de Calcio (Ca^{2+}) del retículo sarcoplásmico (SERCA1 (Atp2a1); Odermatt et al., 1997, 1998). *Sln* junto con su homóloga Phospholamdan (PLN), otro regulador de SERCA1, interactúa con el elemento regulador de esta bomba de Ca^{2+} (MacLennan et al., 2003). El papel de *Sln* es inhibir la captación de Ca^{2+} por SERCA1 desde el citoplasma al retículo sarcoplásmico (Odermatt et al., 1998). Esta inhibición impide la contracción muscular (Tupling et al., 2002) y desempeña un papel en la termogénesis sin escalofríos del músculo esquelético (Bombardier et al., 2013; Gamu et al., 2014, 2015; Bal et al., 2017, 2021). Por lo tanto, desempeña un papel importante en la termogénesis muscular y el metabolismo energético de todo el cuerpo (Gamu et al., 2014, 2015). *Sln* se expresa específicamente no sólo en los músculos, sino también en las cámaras auriculares cardíacas (Minamisawa et al., 2003). Originalmente se describió como no expresada en el cerebro humano adulto (Odermatt et al., 1997), pero los datos obtenidos de experimentos de RNAseq en ratón han demostrado su presencia (Vied et al., 2016; Papathanou et al., 2019). Mientras que SERCA1 se localiza principalmente en células musculares, SERCA2 (Atp2a2) y SERCA3 (Atp2a3), otros miembros muy similares de esta familia genética, se expresan en el cerebro. También se ha demostrado la interacción de *Sln* con SERCA2 (Asahi et al., 2003; MacLennan et al., 2003).

El Ca^{2+} participa en funciones neuronales vitales como la transmisión de señales, la actividad sináptica, la migración neuronal, etc. Es introducido en la neurona por canales iónicos dependientes de voltaje y movilizado desde los reservorios intracelulares por canales intracelulares como la familia SERCA (Brini et al., 2014; Cali et al., 2014; Rathod et al., 2021). Este movimiento de Ca^{2+} aumenta su nivel citosólico donde es controlado por las mitocondrias y las proteínas de unión a Ca^{2+} . Por lo tanto, el retículo endoplásmico juega un papel vital en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} (Karagas and Venkatachalam, 2019), al igual que sus bombas y reguladores de Ca^{2+} . Las alteraciones

en esta homeostasis dan lugar a un deterioro de la plasticidad neuronal, disfunción sináptica y muerte neuronal y se ha relacionado con varias enfermedades neurodegenerativas (Zü and Reiser, n.d.; Brini et al., 2014; Karagas and Venkatachalam, 2019).

En el desarrollo embrionario del sistema nervioso central, el Ca^{2+} desempeña un papel durante el refinamiento sináptico neuronal. La presencia de ondas de Ca^{2+} en el cerebro en desarrollo es necesaria para estabilizar y refinar los contactos sinápticos entre las neuronas jóvenes (Rosenberg and Spitzer, 2011; Alhajeri et al., 2022). En el cerebro adulto, además de su papel como señal intracelular, el Ca^{2+} interviene en la activación de señales antiapoptóticas, aunque cuando su concentración mitocondrial es elevada, a su vez produce apoptosis, lo que está relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer (Sánchez et al, 2010; Brini et al., 2014; Cali et al., 2014; Hallacli et al., 2022). Es factible pensar que todas las proteínas relacionadas con el tráfico de Ca^{2+} deben ser necesarias para regular su múltiple función.

3.2 *Eomes*

Tbr1 y su homólogo *Tbr2* tienen un dominio de expresión restringido y conservado en el palio telencefálico en el pollo al igual que en el ratón (Bulfone et al., n.d.). Ambos tienen funciones relacionadas con la regulación de los primeros pasos en el compromiso y/o diferenciación del destino de las neuronas de proyección (Englund et al., 2005b; Hevner, 2019b).

Tbr2 (gen de la *eomesodermina*; *Eomes*), la expresión se encuentra precozmente en E10.0 en las partes paliales (corticales) del telencéfalo que incluyen el primordio de la corteza olfativa, el neocórtex, el hipocampo y partes del septo y la amígdala. También se expresa en la conexión del palio con el diencefalo, territorio conocido como PThE (Bulfone et al., 1999).

Eomes es un factor de transcripción T-box con una importante función en el desarrollo y necesario para la diferenciación y especificación de subtipos de neuronas de proyección glutamatérgicas en una variedad de regiones cerebrales (Bulfone et al., n.d.; Fink et al., 2006; Hodge et al., 2013). *Eomes* regula el transcriptoma activando o reprimiendo cientos de genes diana directos (*Insm1*, *Pax6*, *Tbr1*, etc.) y responsables de la génesis de los progenitores intermedios (PI). Sin *Eomes* los PI anormales se acumulan transitoriamente en números elevados (Hevner, 2019c). En ausencia de *Eomes*, los IP se agotan a pesar del aumento de la proliferación de células madre neurales y la neurogénesis se detiene como resultado de una diferenciación neuronal fallida (Hodge et al., 2008a, 2012a). La pérdida de la función de *Eomes* compromete gravemente el desarrollo del giro dental y la inactivación condicional de *Eomes* durante el desarrollo temprano del cerebro causa microcefalia y graves déficits de comportamiento (Arnold et al., 2008a).

Objetivos

1. Analizar si las proyecciones de la sm siguen el patrón transcriptómico de la Hb teniendo en cuenta el núcleo de origen de las mismas.
2. Estudiar la distribución de *Sarcolipina* y comprobar su utilidad como marcador de las proyecciones septales a la Hb.
3. Estudiar la distribución de *Eomes*, describiendo posibles migraciones tangenciales neuronales y su papel en las proyecciones hacia la habénula.





MATERIAL Y MÉTODOS

Imagen propiedad de Iris Juárez Leal. Cerebro de ratón adulto en criotomo, realizando cortes coronales para posterior inmunohistoquímica. Adquisición de la imagen: Cámara Nikon D850.

Materiales y métodos

Experimentación animal

Toda la manipulación de los ratones y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directivas de los gobiernos español (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013) y de la Unión Europea (Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 2003) sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Los protocolos fueron aprobados por el Oficina de Investigación Responsable (OIR) de la Universidad Miguel Hernández (2016/VSC/PEA/00190).

Todas las líneas de ratones utilizadas comparten fondo genético C57BL/6J, y han sido obtenidas de la Unidad de Sant Joan d'Alacant del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. En el citado animalario, los animales se encuentran en condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$ y 40-45% de humedad) con ciclos de 12 horas de luz/ oscuridad. La comida y agua están disponibles ad libitum.

Líneas de modelos murinos

- *Sln^{cre/+}*: La cepa de ratón *Sln^{cre/+}* fue generada y cedida por el laboratorio del Dr. Atsushi Nakano en la Universidad de Ucla, Estados Unidos (Nakano et al., 2011; Shimura et al., 2016). El ADNc de la recombinasa cre se colocó en el locus endógeno del exón 2 de *Sln* mediante recombinación homóloga.

- **R26R-CAG-TdTomato:** La cepa de ratón R26R-CAG-TdTomato fue adquirida en los laboratorios Jackson (cepa con número de referencia 007905). Los ratones R26R-CAG-TdTomato expresan una fluorescencia tdTomato robusta tras la recombinación mediada por cre.
- **Knock-in $Gad^{67gfp/+}$:** La cepa de ratón $Gad^{67gfp/+}$ fue adquirida en los laboratorios Jackson (cepa con número de referencia 007677). ADNc que codifica GFP mejorada (EGFP; ClonTech, Palo Alto, CA) se dirigió al locus que codifica $GAD67$ mediante recombinación homóloga (Tamamaki et al., 2003).
- **$Sln^{cre/+}$; $tdTomato^{lox/+}$:** La cepa de ratón $Sln^{cre/+}$; $tdTomato^{lox/+}$ fue generada mediante el cruce de machos de ratón heterocigotos ($tdTomato^{lox/+}$) con hembras homocigotas ($Sln^{cre/+}$) y $Sln^{cre/+}$; $tdTomato^{lox/+}$.
- **$tdTomato^{lox/+}$; $Gad^{67gfp/+}$:** La cepa de ratón $tdTomato^{lox/+}$; $Gad^{67gfp/+}$ fue generada mediante el cruce de una hembra doblemente heterocigoto ($Sln^{cre/+}$; $Gad^{67gfp/+}$) con un macho heterocigoto ($tdTomato^{lox/+}$).
- **$Eomes^{mTomH2BGFP}$:** La cepa de ratón $Eomes^{mTomH2BGFP}$ ($Eomes^{mTnG}$) fue cedida por Simone Probst and Sebastian Arnold del Instituto de Farmacología y Toxicología Experimental y Clínica, de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Friburgo en Alemania (Probst et al., 2017). La línea fue creada mediante un constructo que incluye un $tdTomato$ unido a la membrana (mT) y un H2B: GFP nuclear (nG).

Obtención y procesamiento de las muestras

Todos los animales postnatales utilizados fueron sacrificados entre P0 y P21. Los embriones (E12,5 a E18,5) utilizados se obtuvieron por laparotomía de hembras preñadas

y utilizando de una lupa estereoscópica (modelo LEICA EZ4D). El día del tapón vaginal se contabilizó como día embrionario 0,5 (E0,5).

Los ratones fueron sacrificados por decapitación o dislocación cervical dependiendo de la edad del animal (embriones, ratones postnatales o adultos). En el caso de los estadios embrionarios, se sacrifica a la hembra preñada por dislocación cervical y se aíslan los embriones del útero. Posteriormente, se lavaron con solución salina PBS1x (solución salina tamponada con fosfato 10x: 137 mM NaCl, 2,7 mM HCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,5), se disecaron los cerebros y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% (solución de paraformaldehído 95%, Merck-Sigma; #158127-5000G) en PBS 1x durante toda la noche (O/N) a 4°C. Al día siguiente, las muestras se lavaron en PBS tres veces y luego se almacenaron en PBS (Azida sódica al 0.01%) a 4°C en el caso de ser utilizados de inmediato, o bien, se deshidrataron progresivamente en una batería de etanoles (EtOH; Montplet #ALCH0321F5) 25%, 50%, 70% y 100%. Se realizaba 1 cambio de 40 minutos en cada alcohol excepto en el EtOH 100% que se realizan 2 cambios. Posteriormente se almacenaban a 4°C o -20°C hasta su próximo uso.

Deteccción de ARNm

Se realizó el protocolo de extracción de ARNm, ADNc y posterior amplificación de señal mediante PCR para detectar la presencia de *Sarcolipina (Sln)* en el cerebro. Para ello, se extrajeron un corazón, un hígado y dos cerebros embrionarios de ratón E18,5 y se almacenaron a -80°C en microtubos Eppendorf (Thermo Fisher Scientific; 11598232) por separado. Posteriormente se trituraron y se añadió progresivamente en pequeñas cantidades para integrarlo correctamente 1ml de Ribozol (Invitrogen; 15596018) se dejó reposar a temperatura (T^a) ambiente durante 5 minutos para favorecer la lisis. A continuación, añadimos por cada muestra 200µl de Cloroformo (Prolabo; VWR), se agitaron manualmente los tubos y acto seguido se centrifugó a 12.000 xg (fuerza

centrífuga) durante 15 segundos a 4°C. Se recogió la fase acuosa y se pasó a un nuevo microtubo Eppendorf, añadiendo 500µl de Isopropanol (Panreac; 141090) y se incubó a Tª ambiente y se centrifugó de nuevo a 12.000 xg durante 15 segundos a 4°C. Finalmente, se lavó con EtOH 70° y se dejó reposar en frío (nevera 4°C). Se centrifugó de nuevo a 7500 xg durante 5 minutos y se retiró el EtOH de 70° y se deja reposar el microtubo Eppendorf boca abajo. Se añade 50 µl de agua libre de Rnasa (Agua Sigma; Sigma-Aldrich; w4502-1L.) para medir la concentración de la muestra con NanoDrop™ (espectrofotómetro para el análisis de micro-volúmenes de ácidos nucleicos; Thermo Fisher Scientific).

Para la síntesis de ADNc, utilizamos High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; 4368814) con el programa cDNAKIT durante 2 horas (agua 3,7µl; Buffer 2µl; dNTRS 0,8µl; Primers 2µl; enzima retrotranscriptasa 1µl; inhibidor de ARNasa 0,5µl; ARN de muestra 10µl). (Referencia RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (50) Cat.No.74804. QIAGEN).

Genotipado

Protocolo de PCR:

Tras la extracción del ADN, se añade 1µl del mismo, 1µl de primers y 13µl de Kappa mix (H2O, polimerasa, dNTPs y cofactores; Merck; KK5609) a cada tubo de PCR.

Línea *Sln*^{cre/+}

Para amplificar la señal de *Sln*, se utilizaron los siguientes Primers (100mM 1:10) para el genotipado:

Primers:

- Sarco-F: directo 5'- ACGGGAAGGGTTGGCAAGTCA-3'
- Sarco-R: reverso 5'-GTGTGGGT- CAGAGATGCTGGA-3'
- Sarco-F: directo 5'- ACGGGAAGGGTTGGCAAGTCA-3'
- Sarco-creR: reverso 5'-TCCTCTTCTTCTTGGGCATGG-3'

Condiciones PCR:

Desnaturalización 95°C - 3 segundos

Desnaturalización 95°C - 15 segundos

Hibridación 64,5°C - 15 segundos.

Elongación 72°C -10 segundos

35 ciclos

Elongación final 72°C - 10 minutos y 12°C.

Ancho de banda:

Las bandas esperadas fueron para $Sln^{cre/+}$: 200 pb y 400 pb para el tipo salvaje.

Línea *Eomes^{mTnG}*

Para amplificar la señal de *Eomes*, se utilizaron los siguientes Primers (100mM 1:10) para el genotipado:

Primers:

- IMP126: GAGGGAGGAAGGGGACATTA
- IMP 128: AGACTGCCCGGAAACTTCTT
- SP078: GAGGGAGGAAGGGGACATTAC
- SP079: CTTTGATCACTTCCTCGCCCTTG

Condiciones PCR:

Desnaturalización 95°C - 3 segundos

Desnaturalización 94°C - 15 segundos

Hibridación 58°C - 20 segundos.

Elongación 72°C -30 segundos

35 ciclos

Elongación final 72°C - 10 minutos y 12°C.

Ancho de banda:

Las bandas esperadas para *Eomes^{mTnG}* son 175 pb y 327 pb para el tipo salvaje.

Para analizar los resultados de cada reacción, los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis. Se preparó Agarosa 1% (0,5 mg) (Condalab; 8010.00) con Green Safe Premium (NZYTech; #MB13201) en 50 ml TAE 1% Buffer (TAE 50X: Tris base 242gr, Ácido acético glacial 57,1ml, EDTA 0.5M; pH 100ml) y se realizó la electroforesis a 110 milivoltios (mV) 20 minutos. Posteriormente las bandas del gel son visualizadas en una lámpara de luz ultravioleta (modelo TFX-20-M).

Histología

Inclusión y corte en parafina

En primer lugar, los cerebros y/o embriones almacenados en EtOH 100% son inmersos en butanol (Panreac; #131082.1611; realizando 2 cambios de 15 minutos) para eliminar toda traza de EtOH. A continuación, las muestras son incubadas en parafina líquida (Polysciences; #24198 -1Gold Standard Peel-A-Way) a 60°C, donde se realizan 6 cambios de 30 minutos con el fin de eliminar totalmente los restos de butanol.

Una vez incluida la muestra se deposita la misma en un molde de plástico con forma de cubo (Sigma-Aldrich; E6032-1CS) donde se orienta el embrión y se deja solidificar la parafina a temperatura ambiente. Una vez sólida la parafina, se extrae el bloque del molde, se talla y se procede a obtener las secciones, con un grosor de 10µm, realizándose los cortes con un microtomo (modelo Microm HM 335 E). Posteriormente, los cortes son depositados en un baño (modelo 610.1030.00; Falc Instruments) sobre agua destilada a 37-40°C para que el tejido se hidrate y puedan ser posteriormente montados sobre un portaobjetos (Portaobjetos StarFrost Advances Adhesive; KTVS111711APNDX), en series paralelas con la ayuda de un pincel. Una vez se termina el proceso de montaje, se dejan secar en una estufa a 37°C durante al menos un día y se almacenan a temperatura ambiente hasta su utilización.

Inclusión y corte en agarosa

En primer lugar, se rehidratan progresivamente los cerebros mediante lavados de 30-60 minutos en EtOH a concentración decreciente (100%, 75%, 50%, 25%) y PBS 1X. A continuación, se prepara agarosa (Merck-Sigma; A9414) al 4% en PBS 1x, calentándola en un microondas hasta su completa disolución, se vierte en placas y se incluyen los cerebros en la orientación adecuada. Una vez orientados y para facilitar una rápida solidificación del bloque, se colocan las placas con la agarosa sobre una bandeja con hielo. Una vez solidificado, se talla el bloque de agarosa y se cortan con el vibratomo (modelo VT1000S Leica) a 100µm. Los cortes se recogen con la ayuda de un pincel y se almacenan

en los pocillos de una placa debidamente etiquetada en PBS 1X y azida sódica (Sigma Aldrich; S2002) al 0.02M hasta su utilización.

Inmunohistoquímica

Para cortes en parafina:

Para desparafinar los cortes, se introdujeron 40 minutos en una estufa a 95°C y posteriormente se dejaron inmersos en xilol (Panreac; 141769.2711), realizando 2 cambios de 10 minutos. Una vez desparafinados, los cortes son rehidratados en una serie decreciente de EtOH al 100%, 96%, 70%, siendo el último paso la inmersión en agua. Cada paso es de 5 minutos.

Posteriormente, se procede a la re-exposición de los epítomos. Para ello, se hierven los portaobjetos en un tampón de citrato sódico (Sigma-Aldrich; S4641) a 0,01M pH6 en agua. El hervido se lleva a cabo en un microondas convencional a 750 vatios de potencia en 4 tiempos, un primer tiempo de 4 min y otros 3 tiempos de 3 min, añadiendo más citrato sódico a mitad del proceso.

A continuación, los cortes son lavados en PBST, PBS 1X con Tritón (Tritón X-100; Merck-sigma; 9002-93-1,) al 0,1% para eliminar los restos de citrato sódico. Una vez terminado este paso se procesa a inactivar la peroxidasa endógena, incubando el tejido con peróxido de hidrógeno H₂O₂ (Sigma- Aldrich; 95321-500l) al 1,5% durante 30 min a temperatura ambiente protegiendo el vaso con la solución y los cortes de la luz. Posteriormente, las secciones se lavaron tres veces en PBST y se bloquearon las uniones inespecíficas del anticuerpo primario utilizando una solución de bloqueo compuesta por lisina (Sigma Aldrich; L-5626-1kg) al 10%, albúmina de suero bovino (BSA; Sigma Aldrich; A7906) al 1% y azida al 0,1% en PBS e incubando el tejido durante toda la noche

(O/N) a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios a la concentración adecuada diluidos en solución de bloqueo. Al día siguiente el tejido se lava tres veces en PBST.

Para la inmunohistoquímica colorimétrica, las muestras se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario biotinilado apropiado (consultar en la tabla de anticuerpos secundarios Tabla 2) diluido a 1:200 en PBST a temperatura ambiente. Se lavaron a continuación tres veces con PBST y se incubaron con el complejo Avidina-Biotina (ABC; Vector Laboratories; PK4000) diluido a 1:500 en PBST. Al añadirlo a los portaobjetos, la avidina se une al secundario biotinilado y ancla la peroxidasa al lugar de expresión de la proteína. Se lavaron de nuevo 3 veces en PBST y otras 3 en PBS1x para pasar al último paso del revelado, en el que se utiliza como sustrato cromóforo de la peroxidasa, 1 ml de DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate; Termo Fisher; 112090000) con H₂O₂ al 0,6% por cada 100 ml de PBS 1X. Por último, se lavó con PBS1x para detener la reacción y se deshidratan los portaobjetos en una serie creciente de EtOH hasta llevarlos a 100% EtOH, desde donde se pasan a xilol, para luego colocar el cubreobjetos con Eukitt Clasic Mounting Medium (Aname; 15322-10) y dejarlos secar varios días en una estufa a 37°C en horizontal.

Para cortes en agarosa:

Se sigue el mismo protocolo que para cortes en parafina, sin realizar la parte de desparafinar, la rehidratación en EtOH y el hervido con citrato. Tras la incubación del anticuerpo primario, se realizan más lavados en PBST en los cortes flotantes y se continúa con la inmunohistoquímica del segundo día. El montaje en los portaobjetos se realiza una vez finalizado el protocolo de inmunohistoquímica.

Inmunofluorescencia:

En el caso de la inmunofluorescencia en cortes flotantes, se incuba el tejido con el anticuerpo secundario a una concentración 1:500 (conjugado a un fluoróforo que reconoce al anticuerpo primario), durante una hora a temperatura ambiente, en agitación y protegido de la luz. De esta forma, mediante la excitación del fluoróforo a una determinada longitud de onda, obtenemos una señal que nos permite localizar nuestra proteína de interés. (Consultar los anticuerpos secundarios utilizados en la Tabla 3).

Tras la incubación del anticuerpo secundario se realizan tres lavados con PBS 1X de unos 10 minutos con el objetivo de eliminar el posible residuo de anticuerpo secundario y se incuba el tejido diez minutos con DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol; Termo Fisher; 11540206) a temperatura ambiente y en agitación con el objetivo de marcar los núcleos celulares y facilitar la localización de las estructuras de interés. Posteriormente se retira el DAPI y se realizan tres lavados con PBS 1X de unos 10 minutos. Por último, se colocan los cortes flotantes en el portaobjetos con ayuda de un pincel y se cubre con Glicerol Jelly a 42°C en el caso de la inmunohistoquímica y Mowiol- NPG a 4°C en el caso de la inmunofluorescencia. El Glicerol Jelly lo preparamos de forma casera, mezclando gelatina al 5% [104072 de Merck] en una solución de glicerol al 50% en agua, se calienta a 50°C, para su completa disolución y se ajusta el pH a 7 con NaOH. El Mowiol-NPG (475904; Sigma Aldrich) se prepara disolviendo 40g de Mowiol en 160ml de buffer K₂HPO₄ se mezcla durante 16h y tras esto se añade 80 ml de glicerol al 99% tras lo que se vuelve a mezclar. Tras esto se prepara el NPG (protector de la fluorescencia), disolviendo 2,5g en 100 ml de glicerol 99%. Por último, se mezcla 1 parte de NPG por cada 10 de Mowiol y se almacena a 4°C.

Anticuerpo	Concentración	Referencia	Casa comercial
αBrdU (mouse)	1:200	M 0744	Dako
αGFP (mouse)	1:500	A-11120	Molecular Probes

αIslet-1 (mouse)	1:200	39.4D5	Hybridoma bank
αNF (rabbit)	1:500	AB1987	Chemicon
αRFP (rabbit)	1:500	ab62341	Abcam
αVGlut2 (Guinea Pig)	1:500	AB5907	Chemicon

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios usados en las técnicas de inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Concentración	Referencia	Casa comercial
αGoat IgG (rabbit)	1:200	BA-5000	Vector
αMouse IgG (goat)	1:200	BA-9200	Vector

Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Concentración	Referencia	Casa comercial
αGuinea Pig (goat) Alexa Fluor 488	1:500	A11073	Invitrogen
αMouse (goat) Alexa Fluor Cy5 Far Red	1:500	A 10524	Molecular Probes
αMouse (goat) Alexa Fluor 488	1:500	A 11055	Molecular Probes

αRabbit (donkey)			
Alexa Fluor 594	1:500	A 21207	Molecular Probes
αRabbit (donkey)			
Alexa Fluor 488	1:500	A 21206	Molecular Probes

Tabla 3. Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencia.

Hibridación In Situ (ISH)

Síntesis de la sonda de ARN de *Sarcophilina*.

Inicialmente se parte del plásmido circular dónde se encuentra insertada la secuencia del gen que queremos localizar en la IHS. Se realiza la digestión con las enzimas de restricción adecuadas sobre 10 μ g de ADNc a una temperatura de 37°C durante 2 horas. Tras esto se comprueba el producto de la digestión en un gel de agarosa por electroforesis a 120mV durante 15 minutos. Posteriormente se mide la concentración, ya que para realizar la síntesis de sonda se necesita 1 μ g de ADN lineal. La reacción de síntesis se produce tras la mezcla de 2 μ l de NTPs10X (5.65 μ l de H₂O, 2 μ l de ATP 100mM/L, 2 μ l de CTP 40mM, 2 μ l de GTP 40mM, 1,35 μ l de UTP 40mM y 7 μ l de UTP-Digoxigenina; ROCHE), 2 μ l de inhibidor de la RNasa, 2 μ l de buffer de transcripción y 2 μ l de la polimerasa correspondiente. Todo en un volumen total de 20 μ l e incubado a 37°C durante 2h. Se añade 1 μ l de DNasa y se incuba 15 minutos a 37°C para eliminar el DNA que no ha sido transcrito a ARN y que puede producir marcaje inespecífico. Inmediatamente se añade inhibidor de la RNasa para proteger la sonda y que no se degrade. Por último, se mide la concentración de sonda y se comprueba en un gel de agarosa al 1% por electroforesis a 110v durante 20 minutos. Para la sonda de *Slh*, nos interesa la banda de 400pb, por tanto, se corta el gel con bisturí y se utiliza el Gel Extraction Kit (referencia). Se corta el fragmento de interés, se pesa y se coloca en tubos transparentes con Buffer QG. Completar!

ISH para cortes flotantes

Se seleccionaron los cerebros y se inició la re-hidratación del tejido de forma progresiva con una batería decreciente de EtOH al 100%, 75%, 50% y 25% siendo el último paso la inmersión en PBS 1x. Posteriormente se enjuagaron dos veces en PBST (PBS con 0,1% de Tween 20). Se realizan 3 lavados de 20 min en una mezcla de detergentes (IGEPAL 1% (NP-40), SDS 1%, Sodium deoxycholate 0.5%, Tris 50mM pH8, EDTA 1mM y NaCl 150mM) con el fin de permeabilizar el tejido. Para la postfijación, se fija durante 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4% en PBST. A continuación, se realizan 3 lavados con PBST y se aplica la mezcla de pre-hibridación compuesto por Salt 10x (ClNa, Tris-ClH, Tris-Base, NaHPO₄, Na₂HPO₄, EDTA 0,5 M) usado al 1x, Formamida desionizada (VWR-Amresco 0606-950ml 50%), Dextran Sulfato 50% (AMRE0198-250gr; VWR-Amresco), tRNA 10mg/ml, solución Denhardt's (Biotech; D-0062; 1x), añadiendo agua milliQ (W4502-1L, Sigma Aldrich) hasta el volumen de preparación. Se incuba dos horas a temperatura ambiente, dentro de una cámara húmeda con una solución de 50% de formamida ionizada y SSC1x (Stock 20X: ClNa 175g, Sodium Citrate 88,2g para 1 litro de agua y ajustado a pH 7 con NaOH) a 65°C durante una hora. A continuación, se incuba durante toda la noche (O/N) con el buffer de hibridación y la sonda, en este caso la de *Slh*. Al día siguiente, se realizan varios lavados con para el eliminar el ARN no enlazado sobrante (50% formamida desionizada, 5x SSC y 1% SDS a pH5.3) y se lavaron 3 veces con MABT 1x (NaCl 150 mM, ácido maleico 100 mM, Sigma -Aldrich), NaOH (Sigma-Aldrich) para pH 7,5 y Tween 20 0,1%) y a continuación de dejó en MABT 1x a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, el tejido se incuba con MABT 1x, suero de oveja al 10%, (Sigma-Aldrich; #S3772) y al 20% de solución bloqueante (Roche; #11096176001) durante dos horas para pasar a la incubación O/N en agitación de la misma disolución de bloqueo unida a un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics; #11093274910). Al día siguiente, la muestra se lava con MABT 1x 9 veces con duración de una hora cada lavado y se deja en MABT 1x O/N. Para el revelado (reacción colorimétrica), el tejido se lava en NTMT pH 9,5 (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,2 M; MgCl₂ 0,05 M y Tween 20 al 0,1%) 4 veces durante 10 minutos cada vez y posteriormente se incuba en NBT (Cloruro de nitroblue tetrazolium; 100mg/ml), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; 50mg/ml; Boehringer, Mannheim) y NTMT

pH 9,5 para que se produzca el precipitado sólido y se pueda visualizar el resultado. Se lava la muestra varias veces en PBST y se procede al montaje de los cortes flotantes el portaobjetos. Se cubren con cristal y Glicerol Jelly.

Base de datos Allen Brain Atlas

Allen Brain Atlas

El Allen Brain Atlas (© 2021 Allen Institute for Brain Science. Mouse Brain Connectivity. Disponible en: <https://connectivity.brain-map.org>. Es un recurso online en el que se puede consultar un atlas de conectividad del ratón adulto como una base de datos de imágenes de proyecciones axonales etiquetadas por trazadores virales (rAAV) y visualizadas mediante tomografía de dos fotones en serie, teniendo un total de 2994 experimentos para visitar.

Este recurso contiene varias herramientas para buscar entre sus experimentos: la herramienta “Source Search”, permite la búsqueda de experimentos por sitio de inyección (Filter source Structures) filtrando por la línea de ratón, el tipo de trazador y la presencia de Imágenes de Señal Intrínseca. La herramienta “Target Search” permite una búsqueda retrógrada, localizando los experimentos en base a las proyecciones localizadas en las estructuras de interés. Por último, la “Spatial Search”, permite al usuario elegir una señal objetivo o un lugar de inyección basado en una selección de vóxeles que recupera todos los experimentos con señal positiva.

El resumen de la inyección incluye las estructuras de inyección primaria y secundaria, las coordenadas Bregma de la inyección estereotáxica, la cepa del ratón, el tipo de trazador y el resumen de la inyección calculado (%) para el rAAV. El visor de imágenes permite navegar por el experimento en 2-D y desplazarse por los 140 cortes coronales de cada

experimento. El histograma muestra la señal cuantificada en cada estructura, ya sea por volumen de proyección (mm³) o por densidad de proyección, lo que significa la fracción del área ocupada por la señal en comparación con toda la estructura. Las cepas de ratón utilizadas incluían líneas de tipo salvaje y transgénicas de cre. Sin embargo, el rAAV utilizado no incluía secuencias específicas para interactuar con la endonucleasa cre.

Adult Mouse Connectivity Atlas / Atlas de conectividad de ratones adultos

En la etapa de identificación, se revisaron 754 experimentos, utilizando la búsqueda de sitios de inyección, de las áreas Septal (30), Hipotalámica (258), Palidal (67), Estriatal (131) y Talámica (268), de acuerdo con los núcleos aferentes a la habénula identificados previamente. Estos núcleos se revisaron comprobando tanto las imágenes de sección como la ventana de densidad de proyección (visor 3D) de cada experimento, con el fin de corroborar las terminaciones etiquetadas en la habénula. Se volvieron a examinar los cortes coronales de cada caso confirmado para comprobar el recorrido de las fibras etiquetadas y las terminaciones tanto en MHb como en LHb. (La información referente a este apartado se puede consultar en la Tabla Suplementaria del artículo del apartado de Anexos)

Para la selección de los experimentos, se utilizaron los siguientes criterios: volumen de virus inyectado < 0,2 mm³ y coordenadas de inyección dentro de los límites anatómicos del núcleo de interés. Se excluyeron los experimentos con un volumen masivo de virus inyectado, o el etiquetado de 4 o más estructuras al área de interés. Para sistematizar la selección de imágenes a través del Hb entre los experimentos, se seleccionaron tres niveles de sección coronal tomados 3, 6 y 9 secciones rostralmente a la comisura habenuar. Todo el proceso se realizó a través de un análisis por pares, tanto la selección como el cribado de los experimentos fue realizado por dos investigadores, según los criterios de inclusión y exclusión. Para ello, una vez recogidos todos los experimentos, cada investigador seleccionó uno o dos experimentos de cada conjunto que cumplían los criterios. Tras la primera selección, ambos investigadores pusieron en común los resultados para llegar a una lista consensuada de experimentos que eran adecuados en relación con los criterios

de selección. Se anotó el número de experimento, la cantidad de virus inyectado y las coordenadas Bregma de la inyección. (La información referente a este apartado se puede consultar en la Tabla Suplementaria del artículo del apartado de Anexos)

Todas las imágenes de expresión génica se descargaron del Allen Institute for Brain Science. [<https://mouse.brain-map.org/>], Mouse Brain (ISH Data).

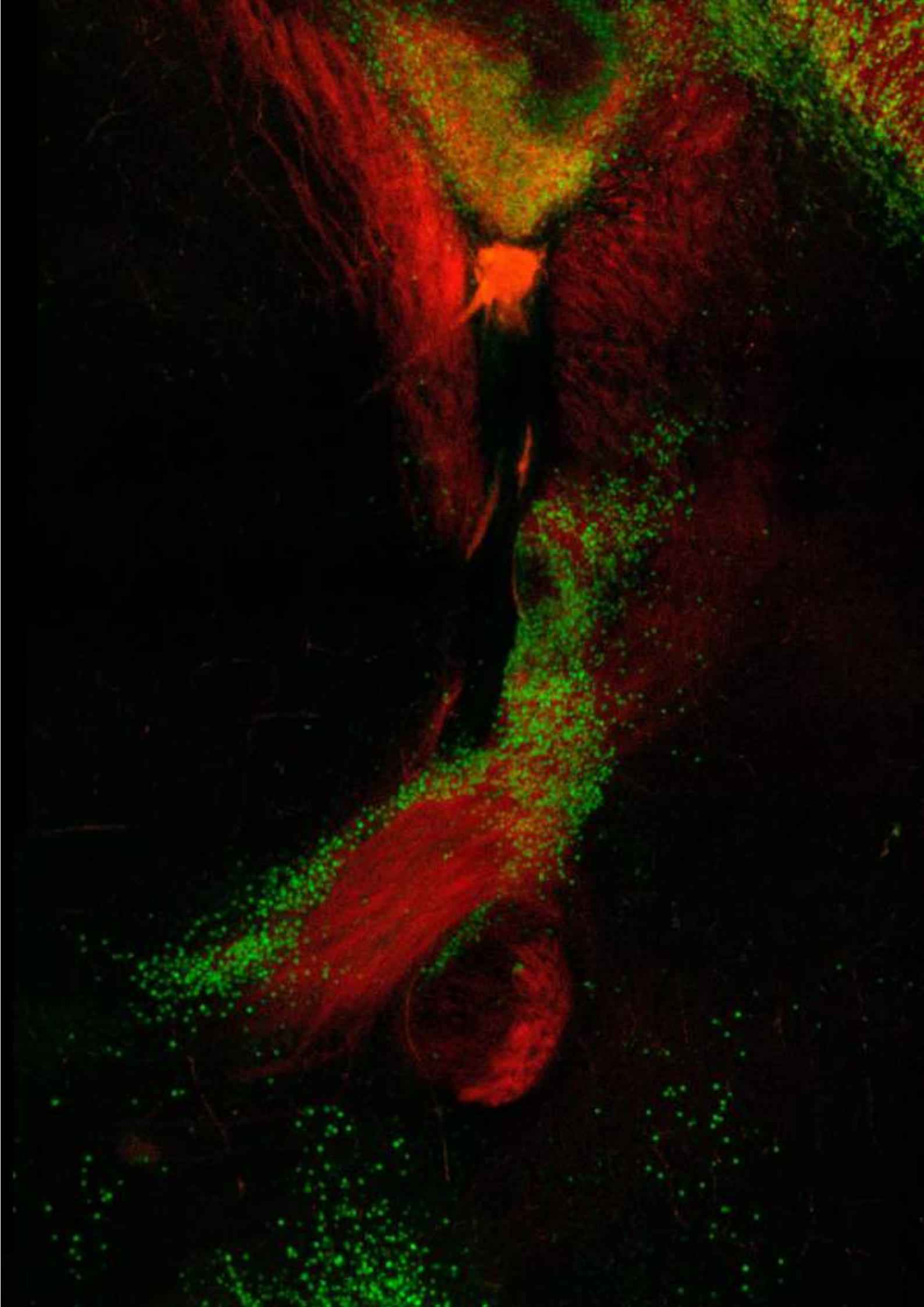
Adquisición y procesamiento de las imágenes


Para los estudios de expresión con DAB, las imágenes de campo claro (Bright-Field) se obtuvieron con un microscopio Leica DM6000B.

Para las imágenes de co-localización (inmunofluorescencias) se utilizaron los siguientes equipos: Microscopio Confocal Vertical Leica SPEII, con platina motorizada que permite la adquisición de imágenes en mosaico y multiposición. Está equipado con cuatro láseres (405nm, 488nm, 561nm y 635nm) y cuatro objetivos (10x seco y 20x, 40x y 63x de aceite). Por otro lado, se utilizó un Microscopio widefield invertido Leica Thunder Imager completamente motorizado, para la captura de imágenes con seccionamiento óptico mediante Computational Clearing en muestras fijadas o vivas. Iluminación LED con 8 líneas de excitación desde UV a rojo lejano. Objetivos secos 5x/0.12, 10x/0.32 y 20x/0.80, y de aceite 40x/1.30 y 63x/1.40.

Para el procesamiento de las imágenes y la edición de las mismas, se utilizaron estaciones de procesamiento de alto rendimiento HIVE, una estación de trabajo centralizada de gama alta para el procesamiento de imágenes y computación de alto rendimiento.

Se utilizó Adobe Photoshop (versión 20.0.7) para el programa de edición fotográfica y Adobe Illustrator (versión 26.2.1) para generar las figuras.





DISCUSIÓN

Imagen propiedad de Iris Juárez Leal. Ampliación de un corte sagital de un cerebro de ratón Eomes^{mTnG} a P0 donde se puede ver marcado con verde (GFP) los somas de las células y en rojo (RFP) los axones. Adquisición de la imagen: Microscopio confocal SPEII.

Discusión

El complejo habenular es un sistema altamente conservado en todos los vertebrados, que conecta el prosencéfalo límbico con el mesencéfalo y el rombencéfalo rostral. Es importante seguir realizando investigaciones que puedan dilucidar los mecanismos relacionados tanto con su desarrollo, como con su función y con la interconexión entre estructuras, para poder entender mejor los mecanismos que subyacen a las patologías asociadas a dichas estructuras.

Nuestro objetivo estaba relacionado con ampliar el conocimiento existente en relación con las aferencias hacia la Hb a través de la sm, estudiando tanto los núcleos que proyectan al complejo habenular, así como el origen y migración de la mayoría de dichas proyecciones desde la PThE.

En primer lugar, nos planteamos analizar si las proyecciones de la sm siguen el patrón transcriptómico de la Hb teniendo en cuenta el núcleo de origen de estas. Nuestra revisión sobre el origen de cada uno de los núcleos, nos han permitido identificar que la mayoría de los axones que llegan a la Hb respetan el mapa transcriptómico previamente descrito por (Wagner et al., 2016), siendo dicha división más definida en las terminaciones de la MHb y presentando un cambio a una distribución menos restringida en el caso de las proyecciones que terminan en la LHb. Nuestros resultados revelaron la necesidad de realizar nuevos tipos de experimentos conductuales para diseccionar las diferentes funciones asociadas al complejo habenular y su correlación con las distintas poblaciones neuronales que las generan.

En segundo lugar, nos propusimos estudiar la distribución de *Sln* y comprobar su utilidad como marcador de las proyecciones septales a la Hb. Corroboramos la presencia del gen de *Sln* en el cerebro de ratón mediante la extracción de ADNc y posterior amplificación de la señal con una PCR. Mediante el ratón reportero transgénico *Sln*, describimos el patrón de expresión de *Sln* en el cerebro en desarrollo a partir de E16.5 y hasta estadios postnatales de P14, llegando a la conclusión que no es el marcador más adecuado para

describir y estudiar la sm, pero dado el amplio patrón de localización de las células *Sln* - positivas, es factible pensar que cumple una función básica en el metabolismo del Ca^{2+} .

Por último, nos planteamos estudiar la distribución de *Eomes*, describiendo posibles migraciones tangenciales neuronales y su papel en las proyecciones hacia la habénula. Para ello, utilizamos un ratón transgénico *Eomes* (GFP nuclear y RFP axonal) para describir la trayectoria de las neuronas de proyección y las diferentes corrientes migratorias desde la PThE. Nuestros resultados demostraron, al igual que las migraciones recientemente descritas en pollo mediante el gen *Tbr1* (Alonso et al., 2021) las tres corrientes migratorias hacia territorios hipotalámicos, del área preóptica y del área septal. Dichos territorios, además, están relacionados con los núcleos de origen de la sm.

La inervación de la estría medular siguiendo la división transcriptómica de la habénula

La Hb es una población neuronal compleja integrada en una posición funcional central en el sistema límbico de los vertebrados. Su principal aferencia es la sm y su principal eferencia el fascículo retroflejo. Este complejo neuronal está formado por dos componentes principales, la habénula medial y la habénula lateral.

Estudios transcriptómicos y de RNAseq unicelular han desvelado la complejidad morfológica de ambos componentes. Los estudios de RNAseq transcriptómico unicelular de Hashikawa et al., 2020 y Wallace et al., 2020 han corroborado diferentes componentes subnucleares del complejo habenular. El MHb se divide en una parte dorsal que incluye los subnúcleos MHbD y MHbS y una parte ventral compuesta por las unidades MHbVm, MHbVc y MHbVl. Por otro lado, el LHb se divide en una región dorsal que incluye el LHbMS, el LHbLPc y el LHbLMg, una parte central que incluye los componentes mediales LHbMPc y LHbMC, un componente central LHbLMc y una porción lateral LHbLO, y finalmente una porción ventral con las unidades LHbMMg y LHbLB. Estos estudios identificaron los subnúcleos MHb por la expresión de un gen específico, pero los

componentes LHb se reconocieron por una combinación de varios patrones de expresión génica. Cada componente MHb distinto muestra homogeneidad interna, mientras que los subnúcleos LHb muestran una heterogeneidad interna sustancial. La naturaleza diversa de sus neuronas indica un modo intrincado de desarrollo. Se puede hipotetizar que los subnúcleos LHb están compuestos por diferentes subconjuntos de neuronas que ocupan diversos destinos mediante procesos de migración diferenciales.

En relación con las aferencias habenules, el MHb está innervado por cuatro poblaciones neuronales: el núcleo cama de la estría terminal (BST), el septofimbrial (SF), el triangular del septum TS y el septal medial (MS). Es destacable que casi todas las poblaciones neuronales que proyectan al MHb pertenecen al territorio septal. Esta innervación está fuertemente compartimentada y los cuatro conjuntos diferentes de axones se dirigen a subnúcleos específicos de la MHb. El BST (división medio central) innerva específicamente el MHbS, el SF se dirige al MHbVI y al MHbD, el TS alcanza el MHbD y el MHbVm y, por último, el MS innerva el MHbVc. Se ha descrito que la innervación de la MHb por la TS va acompañada de fibras procedentes del núcleo del lecho de la comisura anterior (BAC; Yamaguchi et al., 2013; Watanabe et al., 2018, pero no se encontró ninguna inyección específica de BAC en la base de datos de Allen.

Por lo tanto, la MHb dorsal está bajo la influencia de BST, TS y SF, mientras que la MHb ventral está controlada por SF, TS y MS. Funcionalmente, la región dorsal de la MHb (MHbD y MHbS) está relacionada con la motivación para el ejercicio, la regulación del estado hedónico y el aprendizaje de refuerzo primario (Hsu et al., 2014, 2016a; Koppensteiner et al., 2016c). Por lo tanto, estas funciones pueden estar reguladas por la innervación del BST, TS/BAC y SF. El hecho de que ambos subnúcleos estén innervados por poblaciones neuronales diferentes sugiere que las funciones relacionadas con ellos pueden estar separadas entre ambos subnúcleos. Se necesitan nuevos experimentos conductuales más selectivos para diseccionar la función específica de cada subnúcleo MHb dorsal. La región MHb ventral está relacionada con la ansiedad, la depresión y el aprendizaje en la adicción (Yamaguchi et al., 2013). Este territorio MHb se subdivide en tres subnúcleos de medial a lateral (MHbVm, Vc y VI). Cada uno de estos subnúcleos está innervado por poblaciones neuronales selectivas. Los subnúcleos ventromedial, central y lateral se

proyectan sobre el TS/BAC, MS y SF, respectivamente. Esta inervación selectiva también indica, como en el MHb dorsal, que cada subnúcleo ventral puede estar implicado en una función diferente o que es necesaria la colaboración entre ellos para los fenómenos conductuales citados. Como se ha dicho antes, se deben realizar experimentos conductuales más específicos para comprender adecuadamente el papel de cada subnúcleo MHb ventral.

Las aferencias LHb mostraron una amplia gama de orígenes. Las distribuciones axonales fueron menos específicas para los distintos subnúcleos LHb y, por lo general, mostraron un patrón difuso. No obstante, observamos que las proyecciones preópticas y del AH cubren el aspecto medial del LHb, mientras que diversas aferencias de los núcleos hipotalámicos pedunculares alcanzan preferentemente el territorio central, y las proyecciones del SI, el núcleo entopeduncular (EPD) y el núcleo reticular se dirigen a los componentes laterales del LHb. Este patrón relativamente difuso de inervación coincide con la compleja organización subnuclear interna descrita por los experimentos transcriptómicos de RNAseq (Wagner et al., 2016; Hashikawa et al., 2020). A diferencia de los grupos neuronales del MHb, los subnúcleos del LHb requieren una combinación de marcadores para su caracterización. Anteriormente mencionamos la posibilidad de migraciones neuronales tangenciales entremezcladas dentro de los componentes LHb como una explicación plausible de sus peculiares características parcialmente compartidas.

Identificamos el LPO y el MPO en el área preóptica, el núcleo AH en el hipotálamo terminal alar y la sustancia innominada (SI) en el área subpallial como territorios que se proyectan al LHb. Sus axones convergen en el territorio medial del LHb. La proyección del LPO al LHb incluye neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas. El equilibrio entre estos dos neurotransmisores modula el equilibrio recompensa/aversión en el proceso de aprendizaje (Barker et al., 2017). Las proyecciones MPO y AH en el LHb fueron descritas previamente (Anderson et al., 1980; Risold and Swanson, 1995), pero sin referencia a subnúcleos específicos o a la función habenular. Localizamos fibras PVH, DMH y LHA procedentes del hipotálamo peduncular en la zona central del LHb. La proyección LHA en el LHb fue descrita previamente (Poller et al., 2013; Stamatakis et al., 2016; Rossi et al.,

2021) y se relacionó con la regulación de la alimentación y el equilibrio recompensa/aversión en el proceso de aprendizaje (Stamatakis et al., 2016). No se encontró información específica sobre las proyecciones PVH y DMH en el LHb. Por último, identificamos la entrada de EPD y SI al LHb. Estos núcleos distribuyen sus proyecciones preferentemente desde las zonas medial a lateral del LHb. Es destacable que el LHbLO se distingue entre todos los núcleos del LHb debido a una inervación fuertemente específica por el EPD. Las neuronas del LHbLO, junto con las del LHbMS, muestran propiedades electrofisiológicas únicas en comparación con el resto de las neuronas del LHb. Responden a la Dopamina con un incremento de su frecuencia de disparo en contraste con el resto de las neuronas del LHb. (Kowski et al., 2008). Por lo tanto, esta unidad constituye no sólo una estructura morfológica diferenciada del LHb sino una entidad funcional distintiva por sí misma (Kowski et al., 2008; Wallace et al., 2020a). Las proyecciones excitatorias del EPD al LHbLO están relacionadas con errores de predicción de recompensa modulados por neurotransmisores (Shabel et al., 2012; Wallace et al., 2020a). La alta calidad de las imágenes del Allen Brain Atlas permitió un alto nivel de ampliación. En la mayoría de los experimentos analizados pudimos detectar varicosidades en las fibras positivas que podrían apuntar a botones axonales. Sin embargo, para confirmar este hecho, debería realizarse un doble marcaje con proteínas sinápticas para confirmar la presencia de botones axonales en los diferentes territorios.

Hay que destacar que recientemente se ha descrito en el pollo que la PThE, la subregión dorsal del pretálamo que se encuentra justo rostral a la región talámica habenular, aporta neuronas excitadoras por migración tangencial durante el desarrollo embrionario a casi todas las poblaciones descritas como proyectantes al complejo Hb (Alonso et al., 2020, 2021). Se demostró un origen migratorio en la evidencia pretalámica para el núcleo BAC habenulopetal de ratón (Watanabe et al., 2018a). La migración descrita a la formación EPD hipotalámica peduncular explica muy bien que esta población neuronal mixta excitatoria/inhibitoria haya sido asignada erróneamente al territorio palidal como parte del GPi de roedores (Wallace et al., 2017, 2020b; Alonso et al., 2020, 2021). Por lo tanto, las funciones asignadas al GPi palidal (Hong and Hikosaka, 2008; Li et al., 2019) parecen corresponder al EPD hipotalámico.

Hay que señalar que nuestro análisis presenta ciertas limitaciones debido a que sólo hemos utilizado los datos obtenidos de la base de datos Allen Brain Atlas. En algunos de los casos se habrían necesitado inyecciones más específicas y precisas (sin ser volúmenes masivos) o el uso de trazadores virales específicos para etiquetar tipos neuronales concretos. Para tratar de eliminar el sesgo que proporcionaba esta información, se comparó el esquema de marcaje con la de los núcleos adyacentes afectados. Además, los resultados se acercan en gran medida a experimentos relacionados con el comportamiento axonal de dichas poblaciones. No obstante, no prevemos que estos experimentos específicos modifiquen fuertemente las conclusiones de dicho estudio.

La heterogeneidad neuronal molecular entre los subnúcleos MHb y LHb se correlaciona con la distribución de diferentes neurotransmisores. En general, el LHb se divide en dos áreas (medial y lateral) atendiendo a sus diferentes funciones psicobiológicas. El área lateral está relacionada con la conducta de evitación ante estímulos aversivos mientras que la parte medial se ha implicado en respuestas de desesperación, indefensión, anhedonia y en el sueño y los ritmos circadianos (Aizawa and Zhu, 2019b). Nuestros resultados hodológicos abren la posibilidad de desarrollar líneas de investigación que desvelen las funciones específicas de los diferentes subnúcleos tanto del LHb como del MHb.

Distribución de *Sarcolipina* en el cerebro de ratón adulto y en desarrollo.

Sln es un pequeño canal de calcio (Ca^{2+}) que se puede encontrar en la membrana mitocondrial y está implicado en la actividad de la bomba ATPasa (SERCA), no sólo como una bomba que regula los niveles citosólicos de Ca^{2+} en todos los tejidos, sino como un medio para modular el metabolismo energético en los músculos (Bal and Periasamy, 2020a). No se esperaba que esta proteína se expresara en otros tejidos que no fueran los musculares, como se ha descrito previamente (Wawrzynow et al., 1992; Odermatt et al., 1997; Desmond et al., 2017; Bal and Periasamy, 2020b; Valentim et al., 2022) pero hemos demostrado su presencia en el cerebro.

El Ca^{2+} desempeña un papel fundamental como señalizador intracelular. Su tráfico intracelular está implicado en varias funciones celulares como la liberación de neurotransmisores de las neuronas, la contracción de las células musculares, la fertilización (en la ovulación) y la diferenciación y morfogénesis celular durante el desarrollo (Alhajeri et al., 2022).

En el desarrollo embrionario del sistema nervioso central, el Ca^{2+} desempeña un papel durante el refinamiento sináptico neuronal. La presencia de ondas de Ca^{2+} en el cerebro en desarrollo es necesaria para estabilizar y refinar los contactos sinápticos entre las neuronas jóvenes (Rosenberg and Spitzer, 2011; Alhajeri et al., 2022). En el cerebro adulto, además de su papel como señal intracelular, el Ca^{2+} interviene en la activación de señales antiapoptóticas, aunque cuando su concentración mitocondrial es elevada, a su vez produce apoptosis, lo que está relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer (Sánchez et al, 2010; Brini et al., 2014; Cali et al., 2014; Hallaçli et al., 2022). Es factible pensar que todas las proteínas relacionadas con el tráfico de Ca^{2+} deben ser necesarias para regular su múltiple función. Entre estas proteínas, hemos identificado a *Sln* como uno de los componentes que pueden ser necesarios para este control en el sistema nervioso.

Phospholamban (PLN) y *Sln* son proteínas de membrana homólogas que regulan la actividad de la bomba de Ca^{2+} SERCA. Varios estudios han descrito el papel de estas proteínas con las isoformas 1 y 2 de SERCA (Hellstern et al., 2001; Gorski et al., 2017), mientras que una revisión posterior especifica además que *PLN* aumenta la actividad máxima de la bomba, mientras que *Sln* disminuye la actividad máxima del transporte de Ca^{2+} mediado por SERCA en el corazón (Barbot et al., 2021; Li et al., 2021a). Paralelamente, una de las proteínas asociadas a las bombas de membrana PMCA es la *Calmodulina (CaM)* (Boczek et al., 2021) y su papel en el cerebro está ampliamente estudiado. La *CaM* es una proteína de unión que desempeña un papel crucial en la regulación de la actividad sináptica de las proteínas y en el mantenimiento de la plasticidad neuronal. Por lo tanto, cualquier cambio en la actividad de estas proteínas podría estar relacionado con el desarrollo y la progresión de trastornos

neurodegenerativos y enfermedades mentales (Boczek et al., 2021; Bohush et al., 2021). En la base de datos Allen Brain [<https://mouse.brain-map.org/>], podemos encontrar que la expresión de *CaM* en el cerebro en desarrollo aumenta a partir de E16.5, coincidiendo con el patrón de expresión de *Sln*, y que la expresión se estabiliza en etapas postnatales (concretamente P14). Desafortunadamente, no hay información en esta base de datos sobre la expresión en desarrollo de *Sln* o *PLN*. A diferencia de *Sln*, *PLN* en el cerebro adulto no tiene un patrón de expresión destacable, ya que apenas hay expresión en la ISH encontrada en la base de datos Allen Brain Atlas [<https://mouse.brain-map.org/experiment/show/69116799>].

Las múltiples funciones desempeñadas por este ion en la mediación de señales pueden explicarse principalmente por su dinámica espaciotemporal, que se mantiene estrechamente controlada por mecanismos que controlan su entrada a través de la membrana plasmática y su almacenamiento en depósitos intracelulares. (Alhajeri et al., 2022). Dado el amplio patrón de localización de las células *Sln* -positivas, es factible pensar que cumple una función básica en el metabolismo del Ca^{2+} , más que una función muy específica de un único circuito.

Los estudios de falta o ganancia de función de *Sln* se concentraron en la falta de mantenimiento de la homeostasis metabólica en el músculo esquelético y se relaciona con trastornos metabólicos (Butler et al., 2015; Fajardo et al., 2016; Bal and Periasamy, 2020b; Mengeste et al., 2022). Se ha demostrado que la desregulación del Ca^{2+} dependiente de SERCA2 ha sido implicada en varios trastornos que afectan a la función cognitiva, incluyendo la enfermedad de Darier, la esquizofrenia, la isquemia cerebral (Britzolaki et al., 2018) y enfermedades neurodegenerativas como se ha descrito previamente (Sánchez et al., 2010; Brini et al., 2014; Calì et al., 2014; Hallaçli et al., 2022). Por lo tanto, sería importante estudiar posibles alteraciones neuronales en los modelos de ratón de falta o ganancia de función incluyendo estudios conductuales para dilucidar el papel de *Sln* en el cerebro.

Dada la amplia distribución de *Sln* en el cerebro en estadios postnatales y adulto, y su aparición tardía (E16.5) en estadios embrionarios, consideramos que no es la mejor

herramienta para estudiar la sm en su aspecto más general, existiendo otros marcadores (*Eomes*, *CR*) más adecuados. Pero sí cabe desatacar, que resulta de utilidad para poder estudiar la división de los axones de la sm entre las proyecciones que tienen como diana la MHb y las proyecciones de la LHb, debido a que sólo se expresa en aquellas que proyectan desde el TS hasta la MHb, siendo éste un dato interesante y que aporta información relevante debido a que, hasta el momento, todos los marcadores mostraban todas las proyecciones de la sm sin discriminar entre los distintos haces de axones.

Contribución de neuronas *Eomes* positivas pretalámicas a las proyecciones aferentes de la habénula.

Como ya se ha descrito, el PThE es un territorio especial con una alta capacidad de proliferación que produce un gran número de neuronas. Su localización adyacente al plexo coroideo del tercer ventrículo presenta grandes similitudes con el labio rómbico del rombencéfalo (origen de las neuronas granulares cerebelosas, las neuronas pontinas y las neuronas olivares inferiores). El hecho de que el PThE presente una expresión temprana de morfogénesis y factores de transcripción bien conocidos, así como marcadores génicos consistentes con la generación local de neuronas glutamatérgicas (*Pax6*, *Tbr2*, y *Calb2*, *Tbr1*, *Lhx5*, *Trp73*, *Grm1*, *vGlut2*, *Tfap2a*, *Gdf10*, y *Lhx9*) en esta región confirmaría que se trata de un centro organizador de gran importancia en el cerebro (Abbott and Jacobowitz, 1999; Martínez and Puelles, 2000; Puelles et al., 2000; Puelles and Rubenstein, 2003; Abellan et al., 2010; Shimogori et al., 2010; Ruiz-Reig et al., 2017b; Alonso et al., 2020b). También actuaría como origen de señales de las familias de genes *Wnt*, *Fgf*; *Bmp* en el para el desarrollo de las regiones cerebrales circundantes (Aduwum-Ofosu et al., 2016).

Ya se ha demostrado que desde la PThE se emprenden complejas migraciones tangenciales. Recientemente, se ha descrito de forma reflexiva en pollito (Alonso et al., 2021) mediante el gen *Tbr1* (de la misma familia que *Eomes*). En este estudio se describieron tres fenómenos migratorios que denominamos corrientes migratorias peripeduncular, yuxtapeduncular y eminentio-septal, dependiendo de los territorios a los

que se dirigen las células Tbr1 positivas. Las primeras corrientes que se detectan son la peripeduncular y después la yuxtapeduncular con poca diferencia de tiempo (aproximadamente un día). Los núcleos donde primero llegaron células Tbr1 positivas fueron EA, POA y DB, y posteriormente LH y EPD. Posteriormente, las células de migración eminente-septal comienzan a alcanzar el territorio septal, principalmente el TS.

En ratón, la migración hacia el hipotálamo lateral ha sido parcialmente descrita (Abbott and Jacobowitz, 1999) situándose en el estadio de ratón en E12.5. Más recientemente, la migración eminentio-septal ha sido bien descrita (Watanabe et al., 2018b). Nuestro objetivo era describir completamente las migraciones utilizando como herramienta la línea de ratones transgénicos *Eomes*^{mTnG} con *tdTomato* unido a membrana y una GFP nuclear (Probst et al., 2017). Una herramienta perfecta para seguir la migración de las neuronas Eomes positivas originadas en la PThE.

En E12.5 ya se observa un gran número de células en el territorio de la PThE y en esta etapa ya se aprecia la migración de células hacia el área preóptica, así como hacia el hipotálamo lateral. Posteriormente, y coincidiendo con los resultados obtenidos en pollos estudiados (Alonso et al., 2021) aparece la migración eminentio-septal, que, en el caso del ratón, persiste incluso en los primeros estadios postnatales.

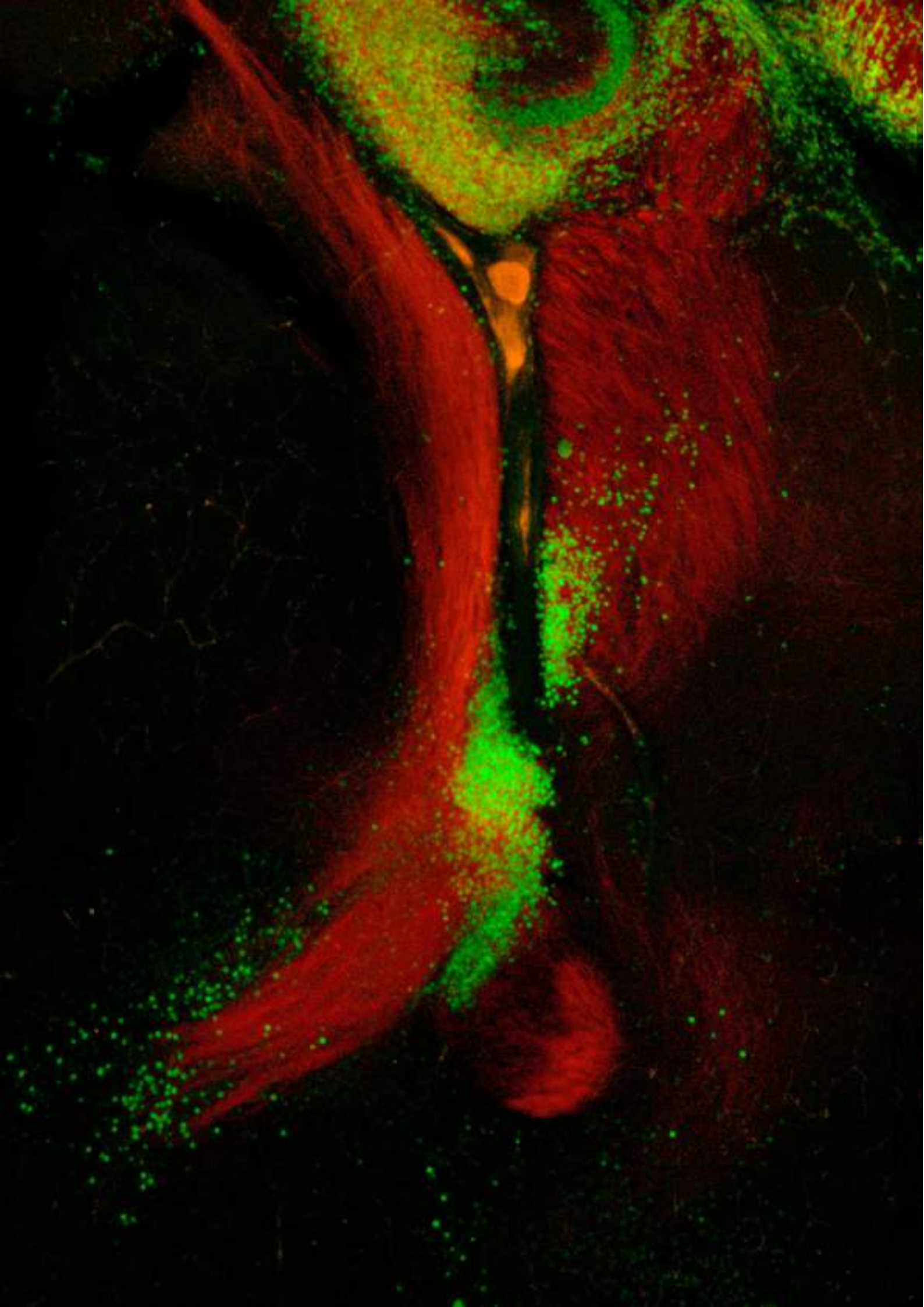
Estos datos coinciden además con la primera descripción realizada por Abbott y Jacobowitz en 1999 del patrón de expresión de la *Calretinina* (CR) y de la ventana temporal de aparición de las primeras fibras de la sm. En este estudio nombran por primera vez una migración de células CR LH-positivas en E12.5, la aparición de los primeros axones de proyección de la sm en E13.5. Abbott sugiere la gran importancia de la PThE.

Cabe destacar que la expresión de Eomes se apaga progresivamente durante el desarrollo postnatal. En los cerebros adultos, su expresión sólo se mantiene en el bulbo olfatorio, el núcleo triangular del septo y en los lóbulos caudales del cerebelo. Este hecho significaría que en las demás áreas su importante papel ya ha concluido.

Esta información coincide con la proporcionada por Abbott ya en el año 1999, y afirma que la aparición de la expresión de *CR* durante el desarrollo del SNC murino seguida de su desaparición se ha observado ya en otros sistemas neuronales. En estadios postnatales, los haces de fibras axonales *CR* positivas ya no eran visibles en el tronco encefálico y postuló una primera hipótesis sobre si la desaparición, pudiese ser el resultado de la muerte celular programada de las células *CR* positivas. Sin embargo, la falta de evidencia de la existencia de cuerpos celulares en degeneración eliminó como posible dicha hipótesis. Propuso entonces dos posibles opciones: que, a medida que avanza el desarrollo, el proceso de señalización deje de ser necesario y la expresión de *CR* disminuyan, o bien que, las células *CR* de la PThE se diseminen por diversas regiones como el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio. Siendo el mismo territorio y células que comparten expresión, podemos considerar las mismas hipótesis relacionadas con las células *Eomes* positivas.

Es posible que la tecnología de knockout génica (o falta de función) pueda proporcionar mecanismos para estudiar la función o las funciones que desempeña *Eomes* en el desarrollo del SNC. Además, dado que el gen se apaga y se acaba perdiendo dicha expresión, no podemos saber qué ocurre con dichas células en estadios postnatales avanzados o en el ratón adulto, por lo que sería necesario investigar dichas células con técnicas que permitan su estudio de forma permanente.

Sorprendentemente, las poblaciones neuronales que se proyectan a la habénula a través de la sm reciben neuronas *Eomes*-positivas migradas desde la región PThE. Este complejo proceso migratorio introduce una mayor complejidad en la organización interna de estos diferentes núcleos neuronales. También desvela un papel vital de la PThE como fuente de neuronas glutamatérgicas (Englund et al., 2005b; Fink et al., 2006; Alonso et al., 2020, 2021) necesarias para el correcto funcionamiento de la red habenular límbica. Esta complejidad debe ser analizada y tenida en cuenta en los estudios conductuales en los que están implicados estos circuitos y poblaciones.





CONCLUSIONES

Imagen propiedad de Iris Juárez Leal. Ampliación de un corte sagital de un cerebro de ratón $Eomes^{mTnG}$ a P0 donde se puede ver marcado con verde (GFP) los somas de las células y en rojo (RFP) los axones. Adquisición de la imagen: Microscopio confocal SPEII.

Conclusiones

1. Las proyecciones hacia la habénula medial a través de la estría medular siguen una distribución topográfica que coincide con la subdivisión transcriptómica.
2. Las proyecciones hacia la habénula lateral a través de la estría medular siguen una distribución menos restringida y no coinciden con la subdivisión transcriptómica.
3. Los subnúcleos oval de la habénula lateral y el superior de la habénula medial tienen expresión de neuronas *GABAérgicas* lo que parece formar parte de un circuito inhibitorio intrínseco de la habénula.
4. Existe la presencia del gen de *Sarcolipina* en el cerebro de ratón y está relacionado con los circuitos implicados en el metabolismo de calcio.
5. La *Sarcolipina* distingue entre las proyecciones de la sm con diana en la habénula medial respecto de las proyecciones a la habénula lateral siendo negativa su expresión para las proyecciones hacia la lateral.
6. El gen *Eomes* es de gran utilidad para estudiar el patrón de expresión de la estría medular desde estadios embrionarios hasta los primeros estadios postnatales.
7. El gen *Eomes* permite identificar las migraciones de las células provenientes de la eminencia pretalámica hacia territorios septales, hipotalámicos y del área preóptica.
8. Los núcleos que reciben células *Eomes* positivas provenientes de la eminencia pretalámica son núcleos de origen de las proyecciones hacia la habénula.

Conclusions

1. Projections to the medial habenula via the stria medullaris follow a topographical distribution that coincides with the transcriptomic subdivision.
2. Projections to the lateral habenula through the stria medullaris follow a less restricted distribution and do not coincide with the transcriptomic subdivision.
3. The oval subnuclei of the lateral habenula and the superior subnucleus of the medial habenula have expression of GABAergic neurons which seems to be part of an intrinsic inhibitory circuit of the habenula.
4. Sarcolipin gene is present in the mouse brain and is related to circuits involved in calcium metabolism.
5. Sarcolipin distinguishes between stria medullaris projections targeting the medial habenula from projections to the lateral habenula and is negatively expressed for projections to the lateral habenula.
6. The *Eomes* gene is very useful to study the expression pattern of the stria medullaris from embryonic to early postnatal stages.
7. The *Eomes* gene allows the identification of cell migrations from the prethalamic eminence to septal, hypothalamic and preoptic territories.
8. Nuclei that receive *Eomes*-positive cells from the prethalamic eminence are nuclei of origin of projections to the habenula.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

Abbott LC, Jacobowitz DM. (1999). Developmental expression of calretinin-immunoreactivity in the thalamic eminence of the fetal mouse. *Int J Dev Neurosci*. 1999 Jul;17(4):331-45. doi: 10.1016/s0736-5748(99)00037-4. PMID: 10479068.

Abellan, A., Menuet, A., Dehay, C., Medina, L., and Rétaux, S. (2010). Differential expression of LIM-homeodomain factors in cajal-retzius cells of primates, rodents, and birds. *Cerebral Cortex* 20, 1788–1798. doi: 10.1093/cercor/bhp242.

Aduwum-Ofosu, K. K., Magnani, D., Theil, T., Price, D. J., and Fotaki, V. (2016). The molecular and cellular signatures of the mouse eminentia thalami support its role as a signalling centre in the developing forebrain. *Brain Struct Funct* 221, 3709–3727. doi: 10.1007/s00429-015-1127-3.

Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., and Okamoto, H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *Journal of Comparative Neurology* 520, 4051–4066. doi: 10.1002/cne.23167.

Aizawa H, Zhu M. (2019). Toward an understanding of the habenula's various roles in human depression. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019 Oct;73(10):607-612. doi: 10.1111/pcn.12892. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31131942

Alhajeri, M. M., Alkhanjari, R. R., Hodeify, R., Khraibi, A., and Hamdan, H. (2022). Neurotransmitters, neuropeptides and calcium in oocyte maturation and early development. *Front Cell Dev Biol* 10. doi: 10.3389/fcell.2022.980219.

Alonso, A., Trujillo, C. M., and Puelles, L. (2020). Longitudinal developmental analysis of prethalamic eminence derivatives in the chick by mapping of *Tbr1* in situ expression. *Brain Struct Funct* 225, 481–510. doi: 10.1007/s00429-019-02015-3.

Alonso, A., Trujillo, C. M., and Puelles, L. (2021). Quail-chick grafting experiments corroborate that *Tbr1*-positive eminential prethalamic neurons migrate along three streams into hypothalamus, subpallium and septocommissural areas. *Brain Struct Funct* 226, 759–785. doi: 10.1007/s00429-020-02206-3.

- Andres, K. H., von Düring, M., and Veh, R. W. (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *Journal of Comparative Neurology* 407, 130–150. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990428)407:1<130::AID-CNE10>3.0.CO;2-8.
- Araki M, McGeer PL, Kimura H. (1988). The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res.* 1988 Feb 16;441(1-2):319-30. doi: 10.1016/0006-8993(88)91410-2. PMID: 2451982.
- Arnold, S. J., Huang, G. J., Cheung, A. F. P., Era, T., Nishikawa, S. I., Bikoff, E. K., et al. (2008). The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev* 22, 2479–2484. doi: 10.1101/gad.475408.
- Asahi M, Sugita Y, Kurzydowski K, De Leon S, Tada M, Toyoshima C, MacLennan DH. (2003). Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5040-5. doi: 10.1073/pnas.0330962100. Epub 2003 Apr 11. PMID: 12692302; PMCID: PMC154294.
- Bal, N. C., Gupta, S. C., Pant, M., Sopariwala, D. H., Gonzalez-Escobedo, G., Turner, J., et al. (2021). Is Upregulation of Sarcolipin Beneficial or Detrimental to Muscle Function? *Front Physiol* 12. doi: 10.3389/fphys.2021.633058.
- Bal, N. C., Singh, S., Reis, F. C. G., Maurya, S. K., Pani, S., Rowland, L. A., et al. (2017). Both brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis processes are activated during mild to severe cold adaptation in mice. *Journal of Biological Chemistry* 292, 16616–16625. doi: 10.1074/jbc.M117.790451.
- Baño-Otálora, B., and Piggins, H. D. (2017). Contributions of the lateral habenula to circadian timekeeping. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 46–54. doi: 10.1016/j.pbb.2017.06.007.
- Batalla, A., Homberg, J. R., Lipina, T. v., Sescousse, G., Luijten, M., Ivanova, S. A., et al. (2017). The role of the habenula in the transition from reward to misery in substance use and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 80, 276–285. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.03.019.

- Bombardier, E., Smith, I. C., Gamu, D., Fajardo, V. A., Vigna, C., Sayer, R. A., et al. (2013). Sarcosine trumps β -adrenergic receptor signaling as the favored mechanism for muscle-based diet-induced thermogenesis. *FASEB Journal* 27, 3871–3878. doi: 10.1096/fj.13-230631.
- Boulos, L. J., ben Hamida, S., Bailly, J., Maitra, M., Ehrlich, A. T., Gavériaux-Ruff, C., et al. (2020). Mu opioid receptors in the medial habenula contribute to naloxone aversion. *Neuropsychopharmacology* 45, 247–255. doi: 10.1038/s41386-019-0395-7.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 2787–2814. doi: 10.1007/s00018-013-1550-7.
- Brinschwitz, K., Dittgen, A., Madai, V. I., Lommel, R., Geisler, S., and Veh, R. W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.050.
- Bühler, A., and Carl, M. (2021). Zebrafish tools for deciphering habenular network-linked mental disorders. *Biomolecules* 11, 1–18. doi: 10.3390/biom11020324.
- Bulfone A, Martinez S, Marigo V, Campanella M, Basile A, Quaderi N, Gattuso C, Rubenstein JL, Ballabio A. (1999). Expression pattern of the Tbr2 (Eomesodermin) gene during mouse and chick brain development. *Mech Dev.* 1999 Jun;84(1-2):133-8. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00053-2. PMID: 10473127.
- Bulfone, A., Puellas, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R., and Rubenstein, J. L. R. (1993). Spatially Restricted Expression of Dlx-1, Dlx-2, Dlx-3, and Wnt-3 in the Embryonic Day 12.5 Mouse Forebrain Defines Potential Transverse and Longitudinal Segmental Boundaries.
- Calì, T., Ottolini, D., and Brini, M. (2014). Calcium signaling in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 357, 439–454. doi: 10.1007/s00441-014-1866-0.
- Catani, M., Dell'Acqua, F., and Thiebaut de Schotten, M. (2013). A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 37, 1724–1737. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.001.

Cerniauskas, I., Winterer, J., de Jong, J. W., Lukacsovich, D., Yang, H., Khan, F., et al. (2019). Chronic Stress Induces Activity, Synaptic, and Transcriptional Remodeling of the Lateral Habenula Associated with Deficits in Motivated Behaviors. *Neuron* 104, 899-915.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2019.09.005.

Charles Watson, George Paxinos, Luis Puelles (2012). *The Mouse Nervous System*. Elsevier.

Chatterjee, M., and Li, J. Y. H. (2012). Patterning and compartment formation in the diencephalon. *Front Neurosci*. doi: 10.3389/fnins.2012.00066.

Company, V., Andreu-Cervera, A., Madrigal, M. P., Andrés, B., Almagro-García, F., Chédotal, A., et al. (2021a). Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons. *Front Cell Dev Biol* 9. doi: 10.3389/fcell.2021.682067.

Company, V., Moreno-Cerdá, A., Andreu-Cervera, A., Murcia-Ramón, R., Almagro-García, F., Echevarría, D., et al. (2021b). Wnt1 Role in the Development of the Habenula and the Fasciculus Retroflexus. *Front Cell Dev Biol* 9. doi: 10.3389/fcell.2021.755729.

Company, V., Murcia-Ramón, R., Andreu-Cervera, A., Aracil-Pastor, P., Almagro-García, F., Martínez, S., et al. (2022). Adhesion molecule Amigo2 is involved in the fasciculation process of the fasciculus retroflexus. *Developmental Dynamics* 251, 1834–1847. doi: 10.1002/dvdy.513.

Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr. (1990) Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience*. 1990;36(1):121-44. doi: 10.1016/0306-4522(90)90356-9. PMID: 2215915.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A. M., Bulfone, A., et al. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *Journal of Neuroscience* 25, 247–251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.

- Fakhoury, M. (2017). The habenula in psychiatric disorders: More than three decades of translational investigation. *Neurosci Biobehav Rev* 83, 721–735. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.02.010.
- Fakhoury, M. (2018). The dorsal diencephalic conduction system in reward processing: Spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behavioural Brain Research* 348, 115–126. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.018.
- Fakhoury, M., and Domínguez López, S. (2014). The Role of Habenula in Motivation and Reward. *Advances in Neuroscience* 2014, 1–6. doi: 10.1155/2014/862048.
- Ferran, J. L., Puelles, L., and Rubenstein, J. L. R. (2015). Molecular codes defining rostrocaudal domains in the embryonic mouse hypothalamus. *Front Neuroanat* 9. doi: 10.3389/fnana.2015.00046.
- Fink, A. J., Englund, C., Daza, R. A. M., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., et al. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: Transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *Journal of Neuroscience* 26, 3066–3076. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5203-05.2006.
- Flanigan, M., Aleyasin, H., Takahashi, A., Golden, S. A., and Russo, S. J. (2017). An emerging role for the lateral habenula in aggressive behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 79–86. doi: 10.1016/j.pbb.2017.05.003.
- Flanigan, M. E., Aleyasin, H., Li, L., Burnett, C. J., Chan, K. L., LeClair, K. B., et al. (2020). Orexin signaling in GABAergic lateral habenula neurons modulates aggressive behavior in male mice. *Nat Neurosci* 23, 638–650. doi: 10.1038/s41593-020-0617-7.
- Funato, H., Saito-Nakazato, Y., and Takahashi, H. (2000). Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated semaphorin 3F and netrin-1. *Mol Cell Neurosci* 16, 206–220. doi: 10.1006/mcne.2000.0870.
- Gamu, D., Bombardier, E., Smith, I. C., Fajardo, V. A., Russell Tupling, A., Bombardier, E., et al. (2014). Sarcolipin Provides a Novel Muscle-Based Mechanism for Adaptive Thermogenesis. Available at: www.acsm-essr.org.

Gamu, D., Trinh, A., Bombardier, E., and Tupling, A. R. (2015). Persistence of diet-induced obesity despite access to voluntary activity in mice lacking sarcolipin. *Physiol Rep* 3. doi: 10.14814/phy2.12549.

Gardon, O., Faget, L., Chu Sin Chung, P., Matifas, A., Massotte, D., and Kieffer, B. L. (2014). Expression of mu opioid receptor in dorsal diencephalic conduction system: New insights for the medial habenula. *Neuroscience* 277, 595–609. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.053.

Geisler, S., and Trimble, M. (2008). The lateral habenula: No longer neglected. *CNS Spectr* 13, 484–489. doi: 10.1017/S1092852900016710.

Giger et al. Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M. (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron*. 2000 Jan;25(1):29-41. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80869-7. PMID: 10707970.

Gill, M. J., Ghee, S. M., Harper, S. M., and See, R. E. (2013). Inactivation of the lateral habenula reduces anxiogenic behavior and cocaine seeking under conditions of heightened stress. *Pharmacol Biochem Behav* 111, 24–29. doi: 10.1016/j.pbb.2013.08.002.

Gold, P. W., and Kadriu, B. (2019). A major role for the lateral habenula in depressive illness: Physiologic and molecular mechanisms. *Front Psychiatry* 10. doi: 10.3389/fpsy.2019.00320.

Graham NSN, Zimmerman KA, Moro F, Heslegrave A, Maillard SA, Bernini A, Miroz JP, Donat CK, Lopez MY, Bourke N, Jolly AE, Mallas EJ, Soreq E, Wilson MH, Fatania G, Roi D, Patel MC, Garbero E, Nattino G, Baciuc C, Fainardi E, Chierigato A, Gradisek P, Magnoni S, Oddo M, Zetterberg H, Bertolini G, Sharp DJ. (2021). Axonal marker neurofilament light predicts long-term outcomes and progressive neurodegeneration after traumatic brain injury. *Sci Transl Med*. 2021 Sep 29;13(613):eabg9922. doi: 10.1126/scitranslmed.abg9922. Epub 2021 Sep 29. PMID: 34586833.

Hallacli, E., Kayatekin, C., Nazeen, S., Wang, X. H., Sheinkopf, Z., Sathyakumar, S., et al. (2022). The Parkinson's disease protein alpha-synuclein is a modulator of processing bodies and mRNA stability. *Cell* 185, 2035-2056.e33. doi: 10.1016/j.cell.2022.05.008.

Hariri, A. R., Bookheimer CA, S. Y., and Mazziotta, J. C. (2000). Modulating emotional responses: effects of a neocortical network on the limbic system. Lippincott Williams & Wilkins.

Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Rossi, M. A., Basiri, M. L., Liu, Y., Johnston, N. L., et al. (2020). Transcriptional and Spatial Resolution of Cell Types in the Mammalian Habenula. *Neuron* 106, 743-758.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.011.

Hennigan, K., D'Ardenne, K., and McClure, S. M. (2015). Distinct midbrain and habenula pathways are involved in processing aversive events in humans. *Journal of Neuroscience* 35, 198–208. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0927-14.2015.

Herkenham M, Nauta WJ. (1977) Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J Comp Neurol.* 1977 May 1;173(1):123-46. doi: 10.1002/cne.901730107. PMID: 845280.

Herkenham, M., and Nauta, W. J. H. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1979 Sep 1;187(1):19-47. doi: 10.1002/cne.901870103. PMID: 226566.

Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *J Anat* 235, 616–625. doi: 10.1111/joa.12939.

Hikosaka, O. (2010). The habenula: From stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11, 503–513. doi: 10.1038/nrn2866.

Hodge, R. D., Garcia, A. J., Elsen, G. E., Nelson, B. R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., et al. (2013). Tbr2 expression in Cajal-Retzius cells and intermediate neuronal progenitors is required for morphogenesis of the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 33, 4165–4180. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4185-12.2013.

Hodge, R. D., Kowalczyk, T. D., Wolf, S. A., Encinas, J. M., Rippey, C., Enikolopov, G., et al. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *Journal of Neuroscience* 28, 3707–3717. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4280-07.2008.

Hodge, R. D., Nelson, B. R., Kahoud, R. J., Yang, R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., et al. (2012). Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to

intermediate progenitors and neurons. *Journal of Neuroscience* 32, 6275–6287. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0532-12.2012.

Hong, S., and Hikosaka, O. (2008). The Globus Pallidus Sends Reward-Related Signals to the Lateral Habenula. *Neuron* 60, 720–729. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.035.

Hsu, Y. W. A., Morton, G., Guy, E. G., Wang, S. D., and Turner, E. E. (2016). Dorsal medial habenula regulation of mood-related behaviors and primary reinforcement by tachykinin-expressing habenula neurons. *eNeuro* 3, 118–126. doi: 10.1523/ENEURO.0109-16.2016.

Hsu, Y. W. A., Tempest, L., Quina, L. A., Wei, A. D., Zeng, H., and Turner, E. E. (2013). Medial habenula output circuit mediated by $\alpha 5$ nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. *Journal of Neuroscience* 33, 18022–18035. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2927-13.2013.

Hsu, Y. W. A., Wang, S. D., Wang, S., Morton, G., Zariwala, H. A., de la Iglesia, H. O., et al. (2014). Role of the dorsal medial habenula in the regulation of voluntary activity, motor function, hedonic state, and primary reinforcement. *Journal of Neuroscience* 34, 11366–11384. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1861-14.2014.

Hu, H., Cui, Y., and Yang, Y. (2020). Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat Rev Neurosci* 21, 277–295. doi: 10.1038/s41583-020-0292-4.

Huilgol, D., Udin, S., Shimogori, T., Saha, B., Roy, A., Aizawa, S., et al. (2013). Dual origins of the mammalian accessory olfactory bulb revealed by an evolutionarily conserved migratory stream. *Nat Neurosci* 16, 157–165. doi: 10.1038/nn.3297.

Inamura, N., Ono, K., Takebayashi, H., Zalc, B., and Ikenaka, K. (2011). Olig2 lineage cells generate gabaergic neurons in the prethalamic nuclei, including the zona incerta, ventral lateral geniculate nucleus and reticular thalamic nucleus. *Dev Neurosci* 33, 118–129. doi: 10.1159/000328974.

Jester-Broms, J. (2018). Characterization of habenular neurocircuitry. A potential novel target for treating depression. Lund University: Faculty of Medicine

- Juárez-Leal, I., Carretero-Rodríguez, E., Almagro-García, F., Martínez, S., Echevarría, D., and Puelles, E. (2022). Stria medullaris innervation follows the transcriptomic division of the habenula. *Sci Rep* 12. doi: 10.1038/s41598-022-14328-1.
- Kantor, D. B., Chivatakarn, O., Peer, K. L., Oster, S. F., Inatani, M., Hansen, M. J., et al. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 44, 961–975. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.002.
- Karagas, N. E., and Venkatachalam, K. (2019). Roles for the endoplasmic reticulum in regulation of neuronal calcium homeostasis. *Cells* 8. doi: 10.3390/cells8101232.
- Knowland, D., and Lim, B. K. (2018). Circuit-based frameworks of depressive behaviors: The role of reward circuitry and beyond. *Pharmacol Biochem Behav* 174, 42–52. doi: 10.1016/j.pbb.2017.12.010.
- Koppensteiner, P., Galvin, C., and Ninan, I. (2016). Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Molecular and Cellular Neuroscience* 77, 105–112. doi: 10.1016/j.mcn.2016.10.006.
- Kowski, A. B., Geisler, S., Krauss, M., and Veh, R. W. (2008). Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 507, 1465–1478. doi: 10.1002/cne.21610.
- Lazaridis, I., Tzortzi, O., Weglage, M., Martin, A., Xuan, Y., Parent, M., et al. (2019). A hypothalamus-habenula circuit controls aversion. *Mol Psychiatry* 24, 1351–1368. doi: 10.1038/s41380-019-0369-5.
- Lee, H. W., Yang, S. H., Kim, J. Y., and Kim, H. (2019). The role of the medial habenula cholinergic system in addiction and emotion-associated behaviors. *Front Psychiatry* 10. doi: 10.3389/fpsy.2019.00100.
- Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C. D., Schulz, D., et al. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535–541. doi: 10.1038/nature09742.
- Li, H., Pullmann, D., and Jhou, T. C. (2019). Valence-encoding in the lateral habenula arises from the entopeduncular region. doi: 10.7554/eLife.41223.001.

- Li, Y., Wang, Y., Xuan, C., Li, Y., Piao, L., Li, J., et al. (2017). Role of the lateral habenula in pain-associated depression. *Front Behav Neurosci* 11. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00031.
- Li, Z. L., Wang, Y., Zou, H. W., Jing, X. Y., Liu, Y. J., and Li, L. F. (2021). GABA(B) receptors within the lateral habenula modulate stress resilience and vulnerability in mice. *Physiol Behav* 230. doi: 10.1016/j.physbeh.2021.113311.
- Liu, W. H., Valton, V., Wang, L. Z., Zhu, Y. H., and Roiser, J. P. (2017). Association between habenula dysfunction and motivational symptoms in unmedicated major depressive disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci* 12, 1520–1533. doi: 10.1093/scan/nsx074.
- Loonen, A. J. M., and Ivanova, S. A. (2016). Circuits regulating pleasure and happiness: The evolution of the amygdalar-hippocampal-habenular connectivity in vertebrates. *Front Neurosci* 10. doi: 10.3389/fnins.2016.00539.
- MacLennan DH, Asahi M, Tupling AR. (2003). The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;986:472-80. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07231.x. PMID: 12763867.
- Martínez, S., and Puelles, L. (2000). “Neurogenetic Compartments of the Mouse Diencephalon and some Characteristic Gene Expression Patterns,” in, 91–106. doi: 10.1007/978-3-540-48002-0_4.
- Mathis, V., and Lecourtier, L. (2017). Role of the lateral habenula in memory through online processing of information. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 69–78. doi: 10.1016/j.pbb.2017.07.004.
- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* 12, 77–84. doi: 10.1038/nn.2233.
- Mattar, P., Britz, O., Johannes, C., Nieto, M., Ma, L., Rebeyka, A., et al. (2004). A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev Biol* 273, 373–389. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.06.013.
- McLaughlin, I., Dani, J. A., and de Biasi, M. (2017). The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *J Neurochem* 142, 130–143. doi: 10.1111/jnc.14008.

Mendoza, J. (2017). Circadian neurons in the lateral habenula: Clocking motivated behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 55–61. doi: 10.1016/j.pbb.2017.06.013.

Minamisawa, S., Wang, Y., Chen, J., Ishikawa, Y., Chien, K. R., and Matsuoka, R. (2003). Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *Journal of Biological Chemistry* 278, 9570–9575. doi: 10.1074/jbc.M213132200.

Mizumori, S. J. Y., and Baker, P. M. (2017). The Lateral Habenula and Adaptive Behaviors. *Trends Neurosci* 40, 481–493. doi: 10.1016/j.tins.2017.06.001.

Moreno-Bravo, J. A., Martinez-Lopez, J. E., Madrigal, M. P., Kim, M., Mastick, G. S., Lopez-Bendito, G., et al. (2016). Developmental guidance of the retroflex tract at its bending point involves Robo1-Slit2-mediated floor plate repulsion. *Brain Struct Funct* 221, 665–678. doi: 10.1007/s00429-014-0932-4.

Morgane, P. J., Galler, J. R., and Mokler, D. J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 75, 143–160. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.01.001.

Nieuwenhuys, R., Voogd J., van Huijzen C. (2009). *El Sistema Nervioso Central Humano*. 4^o Edición. Panamericana.

Nuno-Perez, A., Trusel, M., Lalive, A. L., Congiu, M., Gastaldo, D., Tchenio, A., et al. (2021). Stress undermines reward-guided cognitive performance through synaptic depression in the lateral habenula. *Neuron* 109, 947-956.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2021.01.008.

Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., et al. (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12360–12369. doi: 10.1074/jbc.273.20.12360.

Odermatt, A., Taschner, P. E. M., Scherer, S. W., Beatty, B., Khanna, V. K., Cornblath, D. R., et al. (1997). Characterization of the Gene Encoding Human Sarcolipin (SLN), a Proteolipid Associated with SERCA1: Absence of Structural Mutations in Five Patients with Brody Disease measurement of any alteration in SERCA1 function. 541.

- Papathanou, M., Dumas, S., Pettersson, H., Olson, L., and Wallén-Mackenzie, Å. (2019). Off-target effects in transgenic mice: characterization of dopamine transporter (DAT)-cre transgenic mouse lines exposes multiple non-dopaminergic neuronal clusters available for selective targeting within limbic neurocircuitry. *eNeuro* 6. doi: 10.1523/ENEURO.0198-19.2019.
- Pobbe, R. L. H., and Zangrossi, H. (2008). Involvement of the lateral habenula in the regulation of generalized anxiety- and panic-related defensive responses in rats. *Life Sci* 82, 1256–1261. doi: 10.1016/j.lfs.2008.04.012.
- Probst, S., Daza, R. A., Bader, N., Hummel, J. F., Weiß, M., Tanriver, Y., et al. (2017). A dual-fluorescence reporter in the Eomes locus for live imaging and medium-term lineage tracing. *Genesis* 55. doi: 10.1002/dvg.23043.
- Proulx, C. D., Hikosaka, O., and Malinow, R. (2014). Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci* 17, 1146–1152. doi: 10.1038/nn.3779.
- Puelles, L. (2019). Survey of midbrain, diencephalon, and hypothalamus neuroanatomic terms whose prosomeric definition conflicts with columnar tradition. *Front Neuroanat* 13. doi: 10.3389/fnana.2019.00020.
- Puelles, L., Amat, J. A., and Martinez-Iie-La-Torre, M. (1987). Segment-Related, Mosaic Neurogenetic Pattern in the Forebrain and Mesencephalon of Early Chick Embryos: I. Topography of AChE-Positive Neuroblasts up to Stage HH18.
- Puelles, L., Harrison, M., Paxinos, G., and Watson, C. (2013). A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36, 570–578. doi: 10.1016/j.tins.2013.06.004.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., et al. (2000). Pallial and Subpallial Derivatives in the Embryonic Chick and Mouse Telencephalon, Traced by the Expression of the Genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1* THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 424:409-438 (2000).

Puelles, L., and Rubenstein, J. L. R. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26, 469–476. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00234-0.

Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick; William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia James O. McNamara, S. Mark Williams. (2004). *Neuroscience*, 3^o Edition

Quina, L. A., Wang, S., Ng, L., and Turner, E. E. (2009). Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *Journal of Neuroscience* 29, 14309–14322. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2430-09.2009.

Rathod, N., Bak, J. J., Primeau, J. O., Fisher, M. E., Espinoza-fonseca, L. M., Lemieux, M. J., et al. (2021). Nothing regular about the regulins: Distinct functional properties of SERCA transmembrane peptide regulatory subunits. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/ijms22168891.

Roberson, S., and Halpern, M. E. (2018). Development and connectivity of the habenular nuclei. *Semin Cell Dev Biol* 78, 107–115. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.10.007.

Rolls, E. T. (2015). Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system. *Cortex* 62, 119–157. doi: 10.1016/j.cortex.2013.12.005.

Rosenberg, S. S., and Spitzer, N. C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, 1–13. doi: 10.1101/cshperspect.a004259.

Roxo, M. R., Franceschini, P. R., Zubaran, C., Kleber, F. D., and Sander, J. W. (2011). The limbic system conception and its historical evolution. *Scientific World Journal* 11, 2427–2440. doi: 10.1100/2011/157150.

Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puelles L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science*. 1994 Oct 28;266(5185):578-80. doi: 10.1126/science.7939711. PMID: 7939711.

Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci*. 1998;21:445-77. doi: 10.1146/annurev.neuro.21.1.445. PMID: 9530503.

Ruiz-Reig, N., Andrés, B., Huilgol, D., Grove, E. A., Tissir, F., Tole, S., et al. (2017). Lateral Thalamic Eminence: A Novel Origin for mGluR1/Lot Cells. *Cerebral Cortex* 27, 2841–2856. doi: 10.1093/cercor/bhw126.

Sahay, A., Molliver, M. E., Ginty, D. D., and Kolodkin, A. L. (2003). Development/Plasticity/Repair Semaphorin 3F Is Critical for Development of Limbic System Circuitry and Is Required in Neurons for Selective CNS Axon Guidance Events.

Sánchez JC, López-Zapata DF, Romero-Leguizamón CR. (2010). Mecanismos de transporte de calcio en neuroprotección y neurotoxicidad [Calcium transport mechanisms in neuroprotection and neurotoxicity]. *Rev Neurol*. 2010 Nov 16;51(10):624-32. Spanish. PMID: 21069641.

Santiago Ramón y Cajal (1909). *Histologie du Système nerveux de l'homme & des vertébrés*. A. Maloine Editeur

Sartorius, A., and Henn, F. A. (2007). Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. *Med Hypotheses* 69, 1305–1308. doi: 10.1016/j.mehy.2007.03.021.

Schuurmans C, Guillemot F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol*. 2002 Feb;12(1):26-34. doi: 10.1016/s0959-4388(02)00286-6. PMID: 11861161.

Shabel, S. J., Proulx, C. D., Trias, A., Murphy, R. T., and Malinow, R. (2012). Input to the Lateral Habenula from the Basal Ganglia Is Excitatory, Aversive, and Suppressed by Serotonin. *Neuron* 74, 475–481. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.037.

Shibata, H., and Suzuki, T. (1984). Efferent projections of the interpeduncular complex in the rat, with special reference to its subnuclei: a retrograde horseradish peroxidase study.

Shimogori, T., Lee, D. A., Miranda-Angulo, A., Yang, Y., Wang, H., Jiang, L., et al. (2010). A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat Neurosci* 13, 767–775. doi: 10.1038/nn.2545.

Shumake, J., Edwards, E., and Gonzalez-Lima, F. (2003). Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior *The*

habenula may play an important role in depression. Available at: www.elsevier.com/locate/brainres.

Stamatakis, A. M., van Swieten, M., Basiri, M. L., Blair, G. A., Katak, P., and Stuber, G. D. (2016). Lateral hypothalamic area glutamatergic neurons and their projections to the lateral habenula regulate feeding and reward. *Journal of Neuroscience* 36, 302–311. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-15.2016.

Suter, T. A. C. S., Blagburn, S. v., Fisher, S. E., Anderson-Keightly, H. M., D'Elia, K. P., and Jaworski, A. (2020). TAG-1 Multifunctionality Coordinates Neuronal Migration, Axon Guidance, and Fasciculation. *Cell Rep* 30, 1164-1177.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.085.

Sutherland RJ. (1982). The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci Biobehav Rev.* 1982 Spring;6(1):1-13. doi: 10.1016/0149-7634(82)90003-3. PMID: 7041014.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science.* 1996 Nov 15;274(5290):1123-33. doi: 10.1126/science.274.5290.1123. PMID: 8895455.

Torrìco TJ, Abdijadid S. (2022). Neuroanatomy, Limbic System. 2022 Jul 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 30860726.

Tupling, A. R., Asahi, M., and MacLennan, D. H. (2002). Sarcoplipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44740–44746. doi: 10.1074/jbc.M206171200.

Velasquez, K. M., Molfese, D. L., and Salas, R. (2014). The role of the habenula in drug addiction. *Front Hum Neurosci* 8. doi: 10.3389/fnhum.2014.00174.

Vied, C., Ray, S., Badger, C. D., Bundy, J. L., Arbeitman, M. N., and Nowakowski, R. S. (2016). Transcriptomic analysis of the hippocampus from six inbred strains of mice suggests a basis for sex-specific susceptibility and severity of neurological disorders. *Journal of Comparative Neurology* 524, 2696–2710. doi: 10.1002/cne.23989.

- Viswanath, H., Carter, A. Q., Baldwin, P. R., Molfese, D. L., and Salas, R. (2014). The medial habenula: Still neglected. *Front Hum Neurosci* 7. doi: 10.3389/fnhum.2013.00931.
- Vogt, B. A. (2019). “Cingulate cortex in the three limbic subsystems,” in *Handbook of Clinical Neurology* (Elsevier B.V.), 39–51. doi: 10.1016/B978-0-444-64196-0.00003-0.
- Wagner, F., French, L., and Veh, R. W. (2016). Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct Funct* 221, 39–58. doi: 10.1007/s00429-014-0891-9.
- Wagner, F., Stroh, T., and Veh, R. W. (2014). Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. *Journal of Comparative Neurology* 522, 2650–2662. doi: 10.1002/cne.23554.
- Wallace, M. L., Huang, K. W., Hochbaum, D., Hyun, M., Radeljic, G., and Sabatini, B. L. (2020). Anatomical and single-cell transcriptional profiling of the murine habenular complex. *Elife* 9. doi: 10.7554/eLife.51271.
- Wallace, M. L., Saunders, A., Huang, K. W., Philson, A. C., Goldman, M., Macosko, E. Z., et al. (2017). Genetically Distinct Parallel Pathways in the Entopeduncular Nucleus for Limbic and Sensorimotor Output of the Basal Ganglia. *Neuron* 94, 138-152.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.017.
- Wang RY, Aghajanian GK. (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science*. 1977 Jul 1;197(4298):89-91. doi: 10.1126/science.194312. PMID: 194312.
- Watanabe, K., Irie, K., Hanashima, C., Takebayashi, H., and Sato, N. (2018). Diencephalic progenitors contribute to the posterior septum through rostral migration along the hippocampal axonal pathway. *Sci Rep* 8. doi: 10.1038/s41598-018-30020-9.
- Wawrzynow, A., Theibert, J. L., Murphy, C., Jona, I., Martonosi, A., and Collins, J. H. (1992). Sarcosylipin, the “Proteolipid” of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum, Is a Unique, Amphipathic, 31-Residue Peptide.

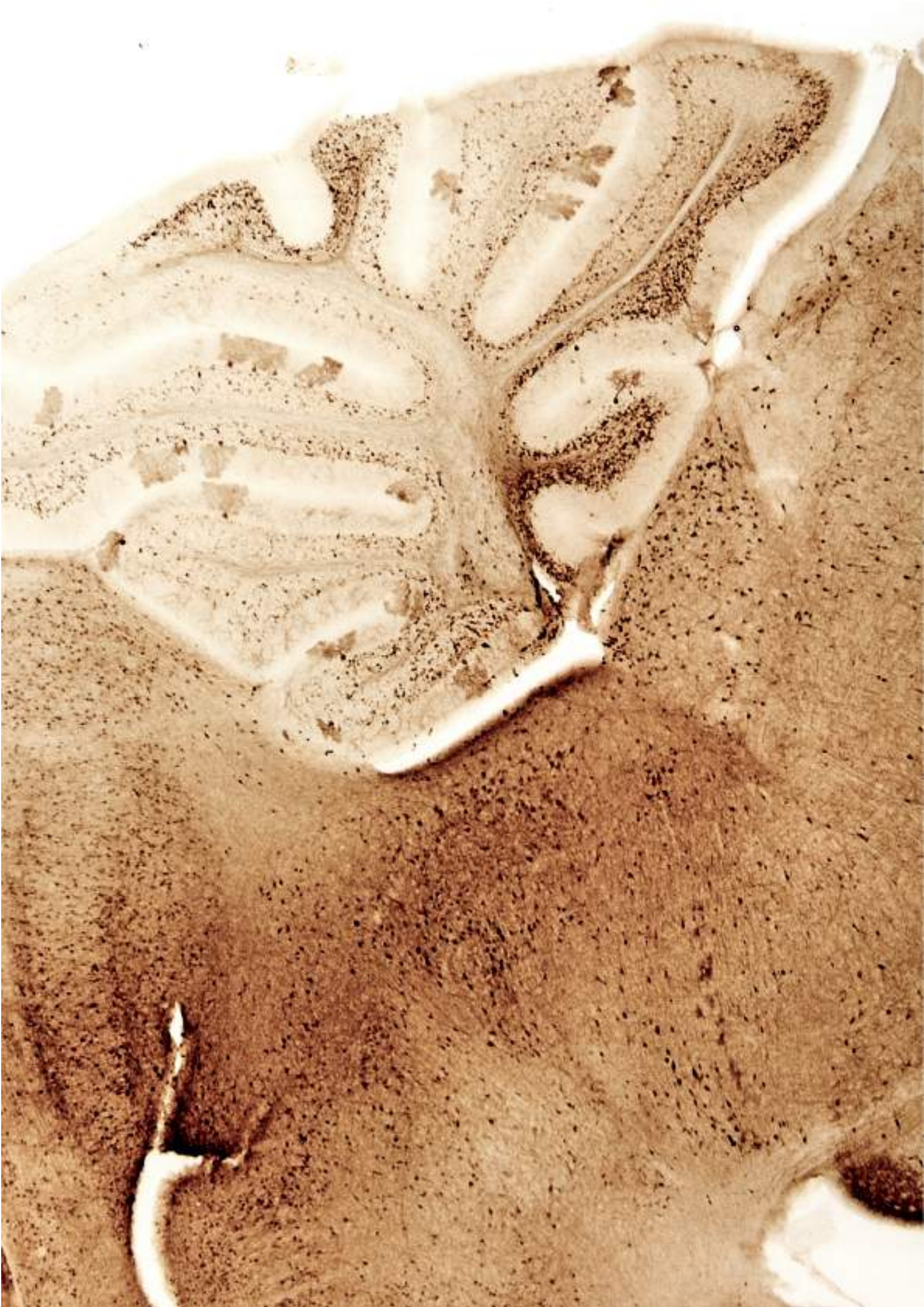
Xiang, M., Gan, L., Zhou, L., Klein1ii, W. H., and Nathans, J. (1996). Targeted deletion of the mouse POU domain gene Brn-3a causes a selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling.

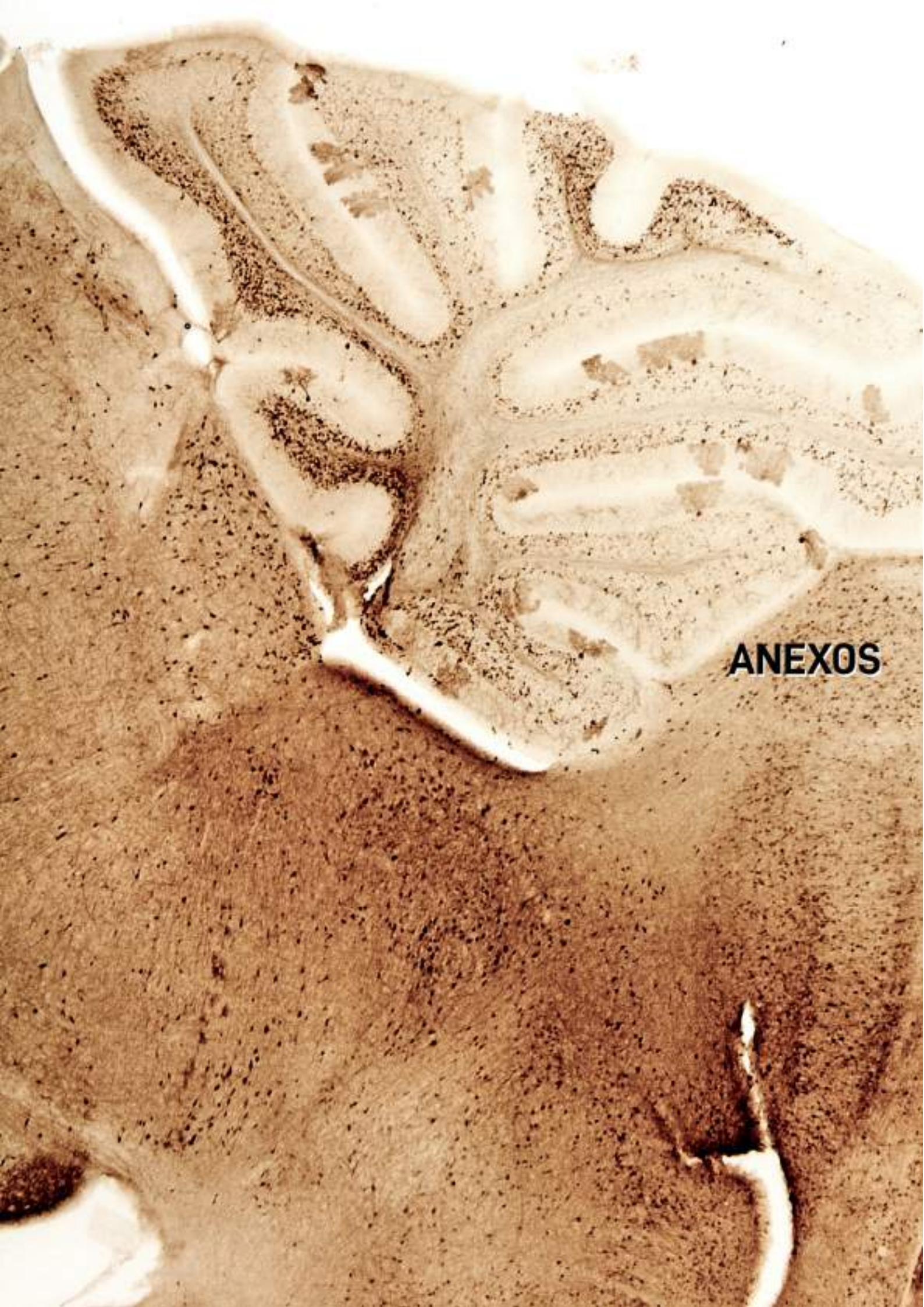
Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T., and Nakanishi, S. (2013). Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* 78, 537–544. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.035.

Yuan, A., and Nixon, R. A. (2021). Neurofilament Proteins as Biomarkers to Monitor Neurological Diseases and the Efficacy of Therapies. *Front Neurosci* 15. doi: 10.3389/fnins.2021.689938.

Zmira, O., Halpern, A. I., and Drori, T. (2020). Anti-neurofilament antibodies and neurodegeneration: Markers and generators. *J Neuroimmunol* 344. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577248.

Zündorf G, Reiser G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Apr 1;14(7):1275-88. doi: 10.1089/ars.2010.3359. Epub 2010 Oct 6. PMID: 20615073; PMCID: PMC3122891.





ANEXOS

Imagen propiedad de Iris Juárez Leal. Corte sagital de un cerebro de ratón $Sln^{cre+/+}$ a P14 donde se puede ver marcado con DAB las células Sarcolipina positivas. Adquisición de la imagen: Lupa Leica DM600B.

Anexos

Anexo 1

La inervación de la estría medular siguiendo la división transcriptómica de la habénula

Stria medullaris innervation follows the transcriptomic division of the habenula

Iris Juárez-Leal¹, Estefanía Carretero-Rodríguez², Francisca Almagro-García¹, Salvador Martínez¹, Diego Echevarría¹, Eduardo Puelles¹.

¹Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain.


²Universidad Miguel Hernández del Elche.

Sci Rep **12**, 10118 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14328-1>



OPEN

Stria medullaris innervation follows the transcriptomic division of the habenula

Iris Juárez-Leal, Estefanía Carretero-Rodríguez, Francisca Almagro-García, Salvador Martínez, Diego Echevarría & Eduardo Puelles 

The habenula is a complex neuronal population integrated in a pivotal functional position into the vertebrate limbic system. Its main afference is the stria medullaris and its main efference the fasciculus retroflexus. This neuronal complex is composed by two main components, the medial and lateral habenula. Transcriptomic and single cell RNAseq studies have unveiled the morphological complexity of both components. The aim of our work was to analyze the relation between the origin of the axonal fibers and their final distribution in the habenula. We analyzed 754 tracing experiments from Mouse Brain Connectivity Atlas, Allen Brain Map databases, and selected 12 neuronal populations projecting into the habenular territory. Our analysis demonstrated that the projections into the medial habenula discriminate between the different subnuclei and are generally originated in the septal territory. The innervation of the lateral habenula displayed instead a less restricted distribution from preoptic, terminal hypothalamic and peduncular nuclei. Only the lateral oval subnucleus of the lateral habenula presented a specific innervation from the dorsal entopeduncular nucleus. Our results unveiled the necessity of novel sorts of behavioral experiments to dissect the different functions associated with the habenular complex and their correlation with the distinct neuronal populations that generate them.

The habenula (Hb), an important brain region linking the limbic forebrain to the midbrain and rostral hindbrain¹, is divided into lateral habenula (LHb) and medial habenula (MHb) (Andres et al.⁵). It is located in the most dorsal part of the alar plate of prosomere 2 (Puelles and Rubenstein¹²) and receives projections from the forebrain, via the stria medullaris (sm), and projects to the basal mesencephalon and rostral rhombencephalon through the fasciculus retroflexus (fr; Sutherland²).

It was classically divided into medial and lateral portions of the LHb and rostral and caudal portions of the MHb (Herkenham and Nauta^{3,4}; Fig. 1A). By cytoarchitectural analysis of the habenular complex in the rat brain, the LHb was later divided into 9 subnuclei and the MHb into 5 subnuclei (Andres et al.⁵; Fig. 1B). This subdivision was confirmed by neurotransmitter distribution⁶. According to topographic, cytochemical, morphological and immunocytochemical criteria, the habenular subdivision described in rat was also shown in the mouse brain⁷. A detailed transcriptomic characterization corroborated the subnuclei previously described in the mouse Hb (Wagner et al.⁸; Fig. 1C). Accordingly, the LHb was described as displaying a medial division that included central (LHbMC), marginal (LHbMMg), parvocellular (LHbMPc) and superior (LHbMS) subnuclei and a lateral division that included: lateral (LHbL), basal (LHbLB), magnocellular (LHbLMc), marginal (LHbLMg), oval (LHbLO) and parvocellular (LHbLPc) subnuclei. The MHb was subdivided into dorsal (MHbD), superior (MHbS), ventral medial (MHbVm), ventral central (MHbVc) and ventral lateral (MHbVl) parts.

In recent years, the development of single cell RNAseq techniques has allowed the study of the expression profile of dissociated habenular neurons^{9,10}. These analyses resulted in the identification by a transcriptomic profile of 12 neuronal clusters that largely coincided with the habenular morphological and transcriptomic subdivisions. Some of them belonged to specific subnuclei and others to subdivisions inside a particular subnucleus. This result unveiled the high complexity displayed by the neuronal subpopulations of the Hb complex^{9,10}.

The sm is the main afferent tract to the Hb complex. This highly fasciculated tract contains fibers originated from different neuronal populations located in the secondary prosencephalon (hypothalamus and telencephalic vesicle; Herkenham and Nauta³; Puelles and Rubenstein^{11–13}). The fasciculated sm courses through the most dorsal aspect of the prethalamic prosomere, known as the prethalamic eminence, carrying axons from its multiple origins, caudally into the thalamic prosomere to reach the Hb complex.

Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández de Elche-CSIC, 03550 Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain. ✉email: epuelles@umh.es

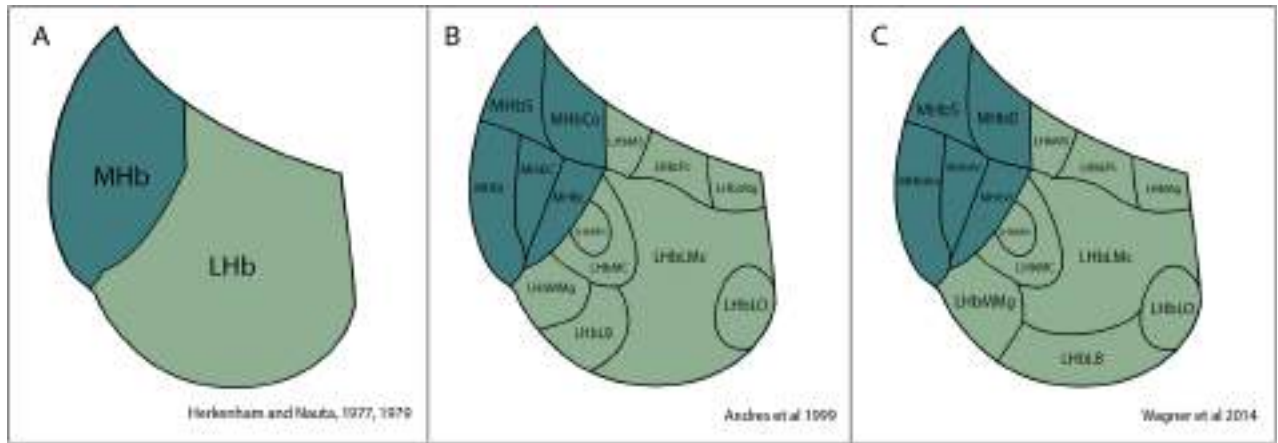


Figure 1. Habenular subdivision scheme. (A) Herkenham and Nauta in 1977 and 1979 described the subdivision of the habenular complex in two main components, mHb and LHb. (B) Andres and collaborators in 1999 divided the mHb by cytoarchitecture in 5 domains, corresponding the MHbS and the MHbCo to the dorsal mHb and the MHbI, MHbC and the MHbL to the ventral mHb. The LHb was subdivided as well in 9 components that included LHbMS, LHbLPC, LHbLMg in the dorsal aspect, LHbMPC, LHbMC, LHbLMc and LHbLO in the medial stratum and LHbMMg and MHbLB in the ventral part. (C) Wagner and collaborators in 2014 completed this organization by renaming the three ventral components of the mHb as MHbVm, MHbVv and MHbVl and by adding a final subdivision in the ventral aspect of the LHb that was the LHbLB domain. Abbreviations: LHb, lateral habenula; LHbLB: LHbL basal subnucleus; LHbLMc: LHbL magnocellular subnucleus; LHbLO: LHbL oval subnucleus; LHbLPC: LHbL parvocellular subnucleus; LHbMC: LHbM central subnucleus; LHbMPC: LHbM parvocellular subnucleus; LHbMS: LHbM superior subnucleus; MHb: medial habenula; MHbC: MHb central subnucleus; MHbD: MHb dorsal subnucleus; MHbI: MHb inferior subnucleus; MHbL: MHb lateral subnucleus; MHbS: MHb superior subnucleus; MHbVc: MHb ventral central subnucleus; MHbVl: MHb ventral lateral subnucleus; MHbVm; MHb ventral medial subnucleus.

It has been described that sm fibers originate in the hypothalamic, pallidal and septal territories. The MHb reportedly receives inputs from the triangular septal nucleus (TRS), the septofimbrial nucleus (SF), the septal area, the bed nucleus of the anterior commissure (BAC), and from hypothalamic entopeduncular neurons^{3,14–17}. The LHb, as first described, is innervated by, the entopeduncular nucleus (erroneously identified as basal ganglia and nucleus accumbens), preoptic regions and septum³. This description was later confirmed and completed, concluding that the LHb receives inputs from the substantia innominata (SI; Golden et al.¹⁸; Knowland et al.¹⁹), dorsal entopeduncular nucleus (EPD)^{17,20–22} and lateral hypothalamic area (LHA)^{23–25}. It must be highlighted that it was recently described that almost all the neuronal populations projecting to the Hb in the chick are colonized by tangentially migrated glutamatergic neurons originated from the prethalamic eminence^{26,27}. There are three heterochronic migratory streams, by which the prethalamic eminence populates hypothalamic, preoptic, pallidal and septal regions^{16,27}. The specific pattern of innervation produced by the different afferent neuronal populations in the LHb or MHb subnuclei has been poorly studied. Only the specific innervation of the LHbLO by the EPD has been described previously^{17,28}.

A selective source of innervation thus possibly underlies different functions associated to the Hb components. In general, the MHb has been associated with the mediation of analgesic, autonomic, reward, anxiety and fear responses^{29,30}. More specifically, the dorsal aspect of the MHb has been related to exercise motivation, regulation of the hedonic state, intrinsic reinforcement circuit and aversive behaviors^{31–33}. The ventral aspect of the MHb has been involved in drug addiction, anxiety, and depression^{15,31}. Therefore, the vertebrate MHb is related to emotional behavior^{30,32,33}. In contrast, the LHb has been considered as an anti-reward system and appears associated to behavioral and motivational control. In fact, the LHb is involved in regulation of aversion, stress, sleep, mood and maternal behavior^{23,34,35}. Results obtained in behavioral experiments point out to a LHb relation with learned helplessness response as well as reward, aversion or punishment behavior^{36–40} and depression^{41–45}.

Our present aim is to analyze the possible differential innervation of the multiple habenular subnuclei considering the differential origin of their afferent fibers. The observed distribution was confronted with the subnuclear organization and location of limbic system functions associated to the habenula.

Results

First, we selected several gene expression patterns, inspired by published single cell RNAseq experiments^{9,10} as examples of Hb subnuclear organization markers (Quina et al.⁴⁶). The images, from rostral to caudal, were color-coded and overlapped by Adobe Software. In the MHb, *Asic4* nicely labelled the MHbS and the MHbD subnuclei, while *Spon1* was expressed in the MHbVl subnucleus and *Myo16* in the remaining MHb ventral components (central and medial; Fig. 2A, A', A''). The *Cubn* and *Wif1* expression allowed us to discern between the two dorsal MHb components. Being *Cubn* expressed in the MHbS and *Wif1* in the MHbD (Fig. 2B, B', B''). *Kcnmb4* was mainly expressed in the MHbVl and MHbVc allowing us to discern between the positive MHbVc and negative MHbVm (Fig. 2B, B', B''), both populations where positive for *Myo16*. *Kcnmb4* was also expressed in

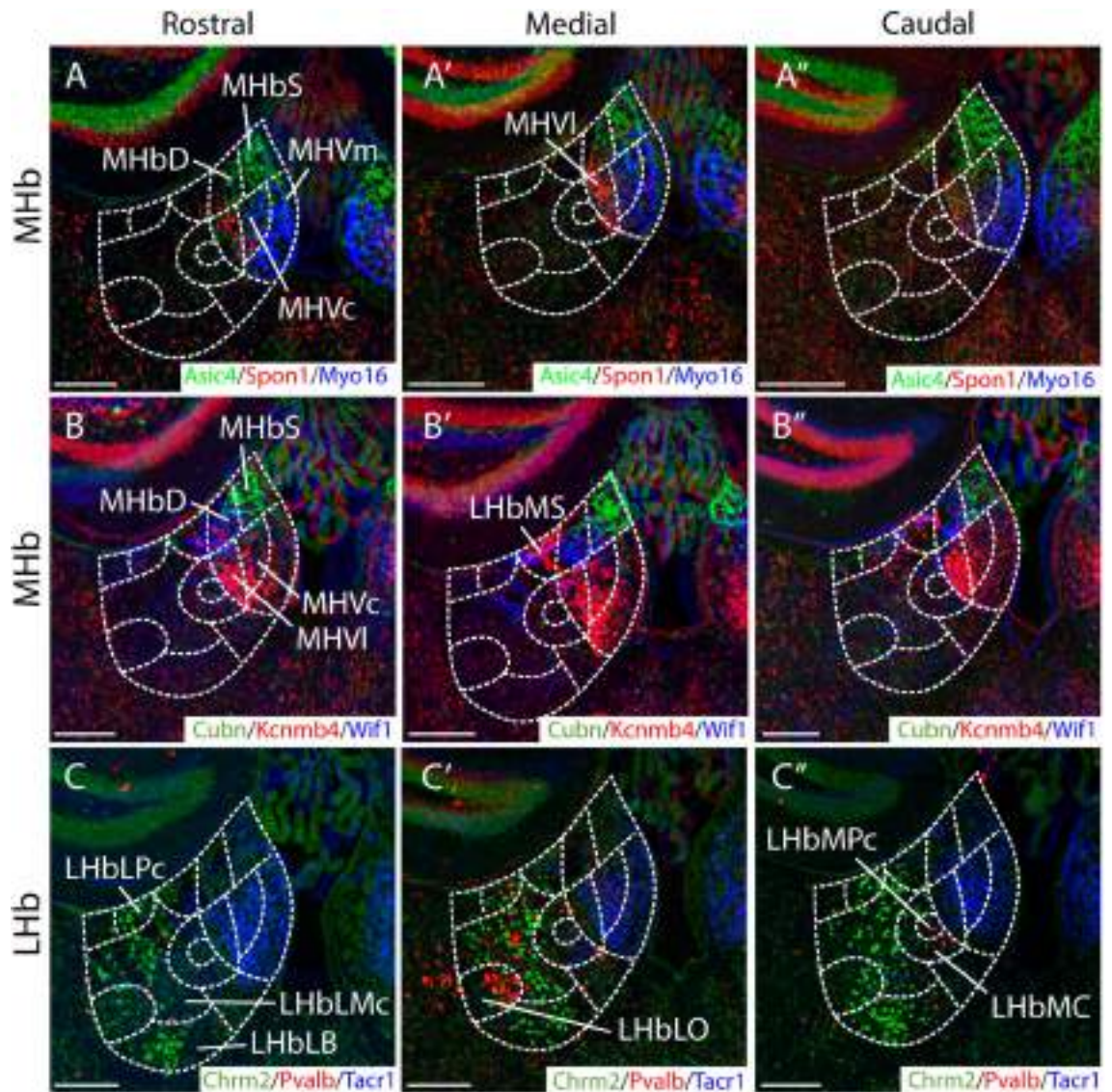


Figure 2. Transcriptomic subdivision of the habenula. (A, A', A'') Coronal sections, from rostral to caudal, of adult mouse brain displaying fluorescence overlap of *Asic4*, *Spon1* and *Myo16* gene expression in MHb. *Asic4* is specific of MHbS and MHbD subnuclei and *Spon1* is expressed in MHbVI. While *Myo16* is expressed in MHbVc and MHbVm (B, B', B'') Coronal sections, from rostral to caudal, of adult mouse brain displaying fluorescence overlap of *Cubn*, *Kcnmb4* and *Wif1* genes expression. *Cubn* is expressed in the MHbS while *Wif1* is expressed in the MHbD. *Kcnmb4* is mainly expressed in the MHbVI and MHbVc as well as in the LHbMs. (C, C' and C'') Coronal sections, from rostral to caudal, of adult mouse brain displaying fluorescence overlap of *Chrm2*, *Pvalb* and *Tacr1* genes. *Chrm2* displayed a scattered pattern in the central LHb, including the LHbLPC, LHbLMc and LHbLB subnuclei. *Pvalb* was expressed in the LHbLO and LHbMPC and LHbMC. *Tacr1* was expressed in the three ventral components of the ventral MHb. Abbreviations: LHb, lateral habenula; LHbLB: LHbL basal subnucleus; LHbLMc: LHbL magnocellular subnucleus; LHbLO: LHbL oval subnucleus; LHbLPC: LHbL parvocellular subnucleus; LHbMC: LHbM central subnucleus; LHbMPC: LHbM parvocellular subnucleus; LHbMS: LHbM superior subnucleus; MHb: medial habenula; MHbD: MHb dorsal subnucleus; MHbS: MHb superior subnucleus; MHbVc: MHb ventral central subnucleus; MHbVI: MHb ventral lateral subnucleus; MHbVm: MHb ventral-medial subnucleus. Scale bar: 200 μ m. Image credit: Allen Institute for Brain Science. [<https://mouse.brain-map.org/>].

the LHbMS (Fig. 2B, B', B''). The three ventral components of the MHb shared the expression of *Tacr1* (Fig. 2C, C', C''). Finally, in the LHb, *Chrm2* was expressed in the medial region, including the LHbLPC, LHbLMc and LHbLB (Fig. 2C, C', C''). While *Pvalb* was expressed in the LHbLO and in the LHbMPC and LHbMC (Fig. 2C, C', C''). Once we identified all the different subnuclei of the Hb at the three selected section levels, we proceeded with the analysis of the connectivity experiments.

Neuronal populations targeting the medial habenula. We confirmed four neuronal populations that target the MHb. They mainly belong to the septal region and are the triangular septal nucleus (TS), the medial septal nucleus (MS), the septofimbrial nucleus (SF) and the bed nucleus of the stria terminalis, medio-central division (BST). The TS (Fig. 3A) projects to the MHbVm, LHbMS and the MHbD. The GFP + axonal terminals extend along the anteroposterior axis of the habenular complex (Fig. 3B–B’). The proximity of the MS and the median preoptic nucleus (MnPO) did not allow us to find experiments restricted to MS (Fig. 3C). In a first analysis MS/MnPO terminals reached the MHbVc and partially the MHbVm and MHbD (Fig. 3D–D’). The injections in the SF also affected the MnPO (Fig. 3E). The terminal labelling overlap between the MS and SF experiments allowed us to ascribe the MnPO projection area to the LHbMMg (Fig. 3D’ and F’). The SF nucleus would thus project to the MHbVI and the MHbD (Fig. 3F–F’). The contralateral MHbS was partially labelled due to positive fibers crossing through the habenular commissure (Fig. 3F’). SF also projected to the LHb, with terminals found in the LHbMPc and LHbMC (Fig. 3F). Finally, we identified an injection in the BST (Fig. 3G), medio central division, that specifically labelled the MHbS (Fig. 3H–H’).

In summary, the MHb dorsal area is principally innervated by TS, SF and medio central BST while the three ventral MHb subnuclei have differential innervations. The medial part is innervated by the TS, the central part by the MS and the lateral part by the SF. Note that in the case of the MHbD we cannot exclude that some of the positive fibers are not terminals but passing fibers to others nuclei due to the location of the sm.

Neuronal populations targeting the lateral habenula. The LHb receives projections originated from different brain regions. We detected terminals originated from the preoptic area and others parts of the subpallium, terminal and peduncular hypothalamus. The GFP + fibers displayed a diffuse distribution in the LHb when compared to the MHb pattern.

We found four populations from the preoptic area, terminal hypothalamus and subpallial area: the lateral preoptic area (LPO), the medial preoptic area (MPO) and the anterior hypothalamic nucleus (AHN) and the substantia innominate (SI). The LPO injection in the preoptic area (Fig. 4A) illustrated the main projection into the LHbLMc and LHbLB (Fig. 4B, B’). We also found scattered axons in the LHbMMg, LHbMPc and LHbMC (Fig. 4B–B’). Some fibers were also detected in the dorsal LHb including LHbMS, LHbLpc and LHbLMg. Therefore, LPO fibers innervate the medial-central and dorsal LHb areas. The MPO injections always included surrounding territories. We selected an injection that affected partially the MPO and also labelled the medial preoptic nucleus (MPN; Fig. 4C). The database contains specific MPN injections that did not display any habenular projections. Therefore, the projections observed only in the medial aspect of the LHb, concerning the LHbMMg and LHbMPc must be due largely to the MPO (Fig. 4D–D’). In the terminal hypothalamus, the AHN injection (Fig. 4E), that also affected a perifornical nucleus (PeF; peduncular hypothalamic population) displayed projections into the medial area of the LHb, including the LHbMMg, LHbMPc and LHbMC subnuclei (Fig. 4F–F’). Thus, the LHb medial territory is mainly innervated by LPO, MPO and AHN populations. The LPO also targets the LHb central territory (Fig. 4B–B’). The subpallial area contains a neuronal population that targets the LHb, namely SI, intermediate stratum of the diagonal domain. The injection in the SI labelled the magnocellular preoptic nucleus (MA; Fig. 4G), and the fibers were distributed in a diffuse pattern throughout the LHb (Fig. 4H–H’). In the latter’s medial part, the axons concentrated in the LHbLB and LHbLMc subnuclei (Fig. 4H’) and in its caudal part, the fibers also occupied the LHbMS and LHbLpc (Fig. 4H’).

Four neuronal populations were identified in the peduncular hypothalamus: the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH), the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH), the lateral hypothalamic area (LHA) and the dorsal entopeduncular nucleus (EPD). The PVH injection (Fig. 5A) demonstrated a strongly diffuse projection into all the LHb (Fig. 5B–B’). Only in the LHb medial region, the GFP + fibers displayed a more specific pattern within the LHbMMg, LHbMC and LHbMPc (Fig. 5B’). The DMH injection (Fig. 5C) showed a specific terminal pattern that affected mainly the medial LHb territory, including likewise the LHbMMg, LHbMPc and LHbMC (Fig. 5D–D’). The LHA was labelled at the level of the AHN and the resulting projection (Fig. 5E) displayed again a diffuse distribution in the LHb territory (Fig. 5F, F’). Caudally, the terminals concentrated in the LHb central territory particularly in LHbMMg, LHbLB and LHbLpc (Fig. 5F–F’). Accordingly, the DMH targets the LHb medial area while the PVH and LHA distribute in the LHb central territory. The EPD injection (Fig. 5G) labelled fibers that specifically innervated the medial portion of the LHbLO (Fig. 5H’) with a minor projection into neighboring rostral and caudal LHb parts (Fig. 5H–H’).

Habenular neuronal cell type distribution. The Hb single cell RNAseq experiments^{9,10} demonstrated the presence of various neurotransmitters-related cell types in this neuronal complex. We checked these neurotransmitter-related patterns testing whether their distribution coincides with habenular subnuclear subdivisions.

Excitatory glutamatergic neurons were predominant in both MHb and LHb. *vGluT1* signal was prevalent in all the MHb (Fig. 6A) while *vGluT2* expression appeared in both habenular nuclei (Fig. 6B). *Choline acetyltransferase* expression labelled cholinergic neurons distributed in the ventral MHb subnuclei (MHbVm, MHbVc and MHbVI; Fig. 6C). *Cholecystokinin* signal was restricted to the dorsal MHb (MHbS and MHbD; Fig. 6D). The inhibitory marker *Gad65* appeared in LHbMPc and partially also in LHbMC as dispersed positive cells (Fig. 6E), while *Gad67* transcripts were localized specifically in the MHbS (Fig. 6F). *Parvalbumin*, specific marker of a subtype of inhibitory gabaergic neurons, was expressed in LHbMPc, LHbMc, LHbLMc and in LHbLO (Fig. 6G). Finally, *Somatostatin* was located in MHbVm, MHbVc and MHbVI as well as in the LHbMS and LHbLpc (Fig. 6H).

Therefore, specialized neurons with specific neurotransmitters are grouped in the different subnuclei described by transcriptomic methodology, and they also are innervated by different neuronal populations.

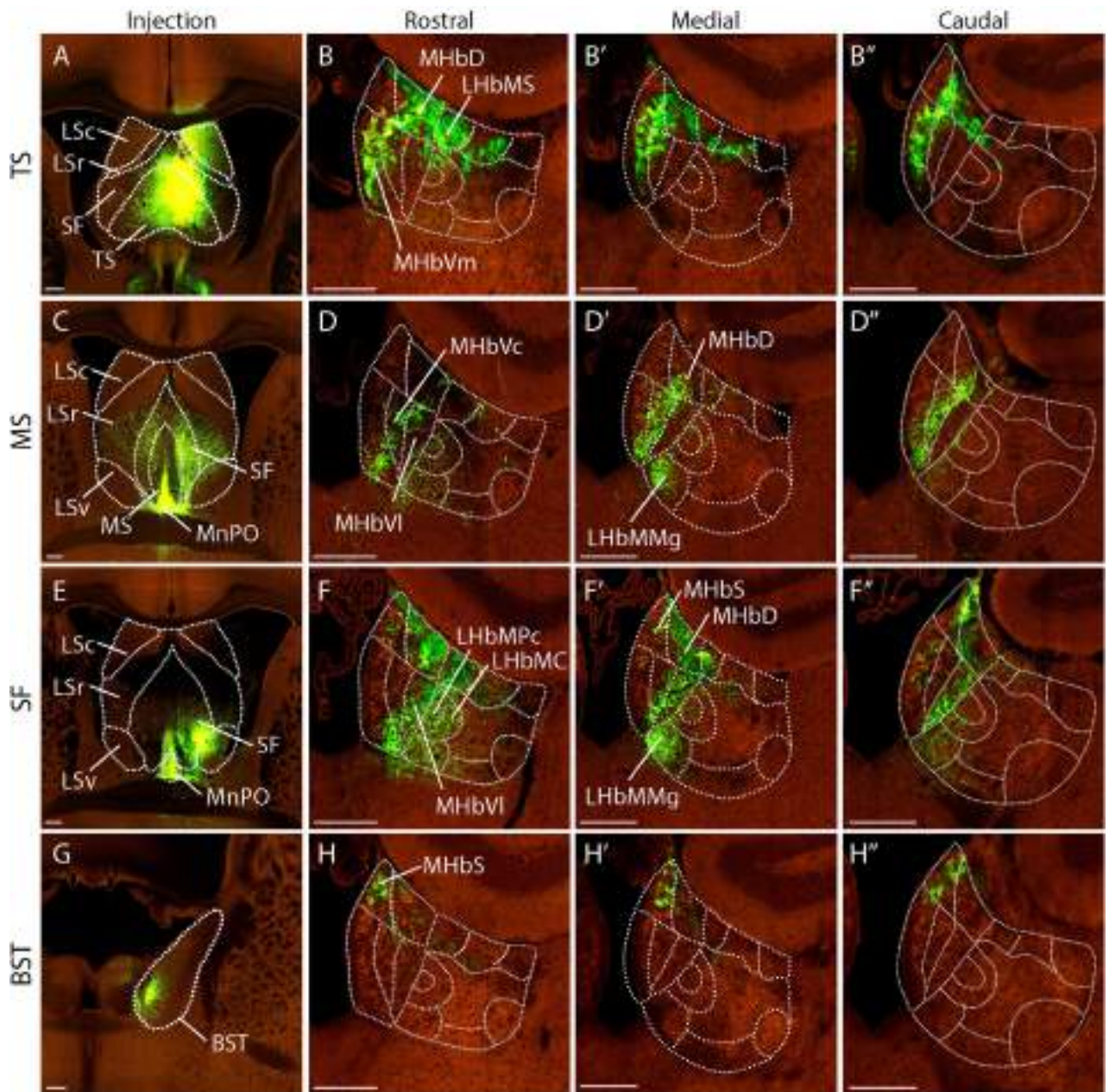


Figure 3. Septal projections to the MHB. (A) Injection site in the triangular nucleus of septum (TS; Experiment n°: 125,830,911, identified as Lateral septum rostral part, LSr). (B–B'') Adult mouse habenula coronal sections, from rostral to caudal, showing the fiber distribution originated from the TS nucleus. (C) Injection site in the medial septal nucleus (MS; Experiment n°: 147,162,736). (D–D'') Adult mouse brain coronal sections of the habenula rostral to caudal, displaying the fibers distribution coming from the MS nucleus. (E) Injection site in the septofimbrial nucleus (SF; Experiment n°: 554,021,622). (F–F'') Adult mouse brain coronal sections of the habenula rostral to caudal, showing the fibers distribution originated from the SF nucleus. (G) Injection site in the bed nuclei of the stria terminalis (BST; Experiment n° 159,433,187. (H–H'') Adult mouse brain coronal sections of the habenula rostral to caudal, displaying the fibers distribution coming from the BST nucleus, being the only nucleus that is not from septal territory. Abbreviations: BST: bed nuclei of the stria terminalis; LSc: lateral septal nucleus, caudal part; LSr: lateral septal nucleus, rostral part; MS: medial septal nucleus; LHbLMc: LHbL magnocellular subnucleus; LHbMMg: LHbM marginal subnucleus; LHbMPC: LHbM parvocellular subnucleus; MhbD: Mhb dorsal subnucleus; MhbS: Mhb superior subnucleus; MhbVc: Mhb ventral central subnucleus; MhbVI: Mhb ventral lateral subnucleus; MhbVm: Mhb ventral medial subnucleus; MnPO: median preoptic nucleus; SF: septofimbrial nucleus; TS: triangular nucleus of septum. Scale bar: 200 μ m. Image credit: Allen Institute for Brain Science. [<https://connectivity.brain-map.org/>].

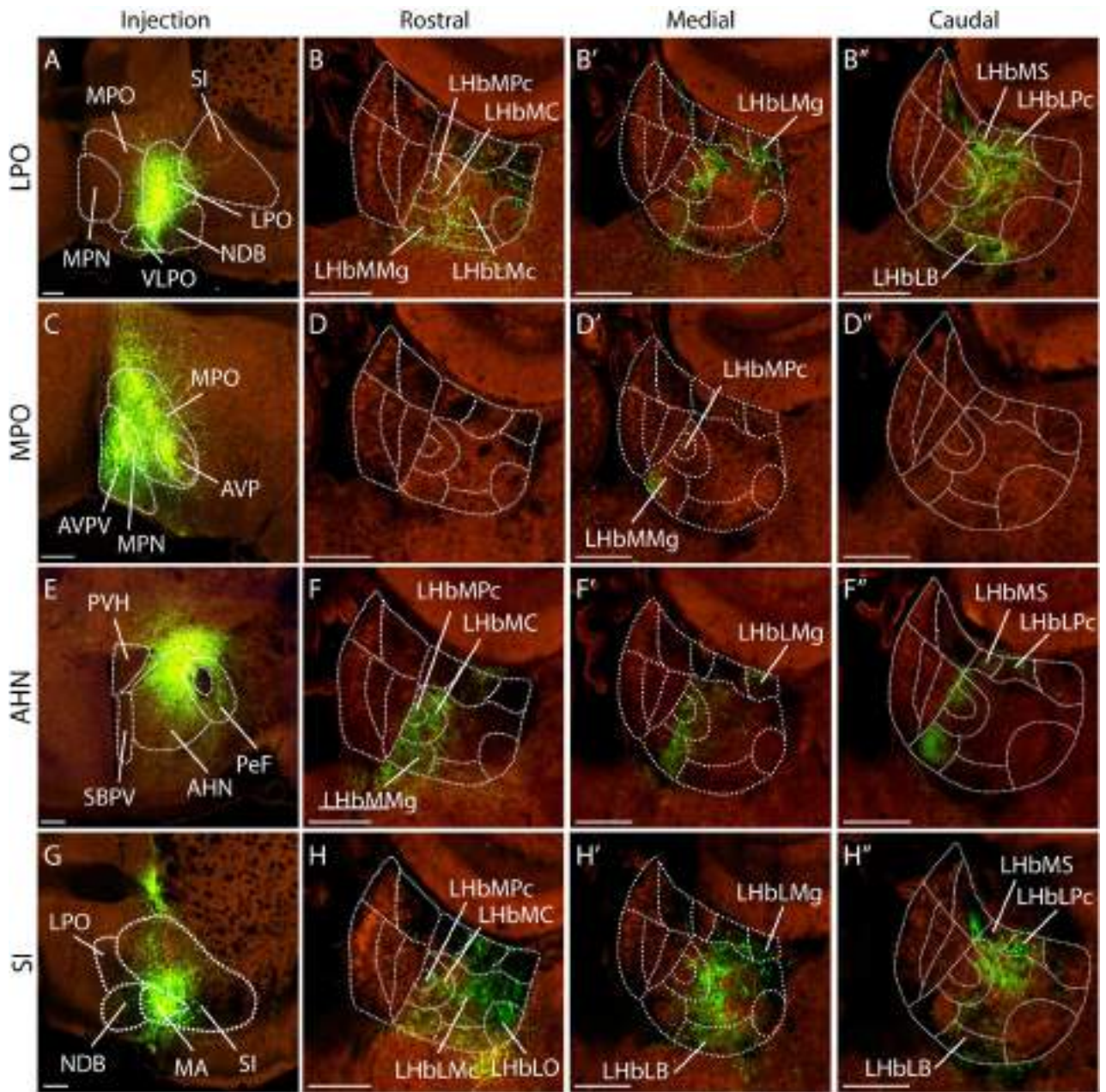


Figure 4. Preoptic area, terminal hypothalamic and pallidal projections to the LHb. **(A)** Injection site in the lateral preoptic area (LPO; Experiment n°: 293,942,188). **(B–B’)** Adult mouse habenula coronal sections, from rostral to caudal, showing the fibers distribution originated from the LPO nucleus. **(C)** Injection site in the medial preoptic area (MPO; Experiment n°: 299,247,009). **(D–D’)** Adult mouse habenula coronal sections, from rostral to caudal, displaying the fibers distribution coming from the MPO nucleus. **(E)** Injection site in the anterior hypothalamic nucleus (AHN; Experiment n°: 292,035,484). **(F–F’)** Adult mouse habenula coronal sections, from rostral to caudal, showing the fibers distribution originated from the AHN nucleus. **(G)** Injection site in the substantia innominata (SI; Experiment n°: 302,739,608). **(H–H’)** Adult mouse habenula coronal sections, from rostral to caudal, showing the fiber distribution originated from the SI nucleus. Abbreviations: AHN: anterior hypothalamic nucleus; AVPV: anteroventral periventricular nucleus; AVP: Anteroventral preoptic nucleus; LHb, lateral habenula; LHbLB: LHbL basal subnucleus; LHbLMc: LHbL magnocellular subnucleus; LHbLMg: LHbL marginal subnucleus; LHbLO: LHbL oval subnucleus; LHbLPC: LHbL parvocellular subnucleus; LHbM: LHb medial territory; LHbMC: LHbM central subnucleus; LHbMMg: LHbM marginal subnucleus; LHbMPc: LHbM parvocellular subnucleus; LHbMS: LHbM superior subnucleus; LPO: lateral preoptic area; MA: magnocellular nucleus; MHb: medial habenula; MHbD: MHb dorsal subnucleus; MPO medial preoptic area; MPN: medial preoptic nucleus; NDB: diagonal band nucleus; PeF: perifornical nucleus; SBPV: subparaventricular zone; SI: substantia innominate; VLPO: ventrolateral preoptic nucleus. Scale bar: 200 μ m. Image credit: Allen Institute for Brain Science. [<https://connectivity.brain-map.org/>].

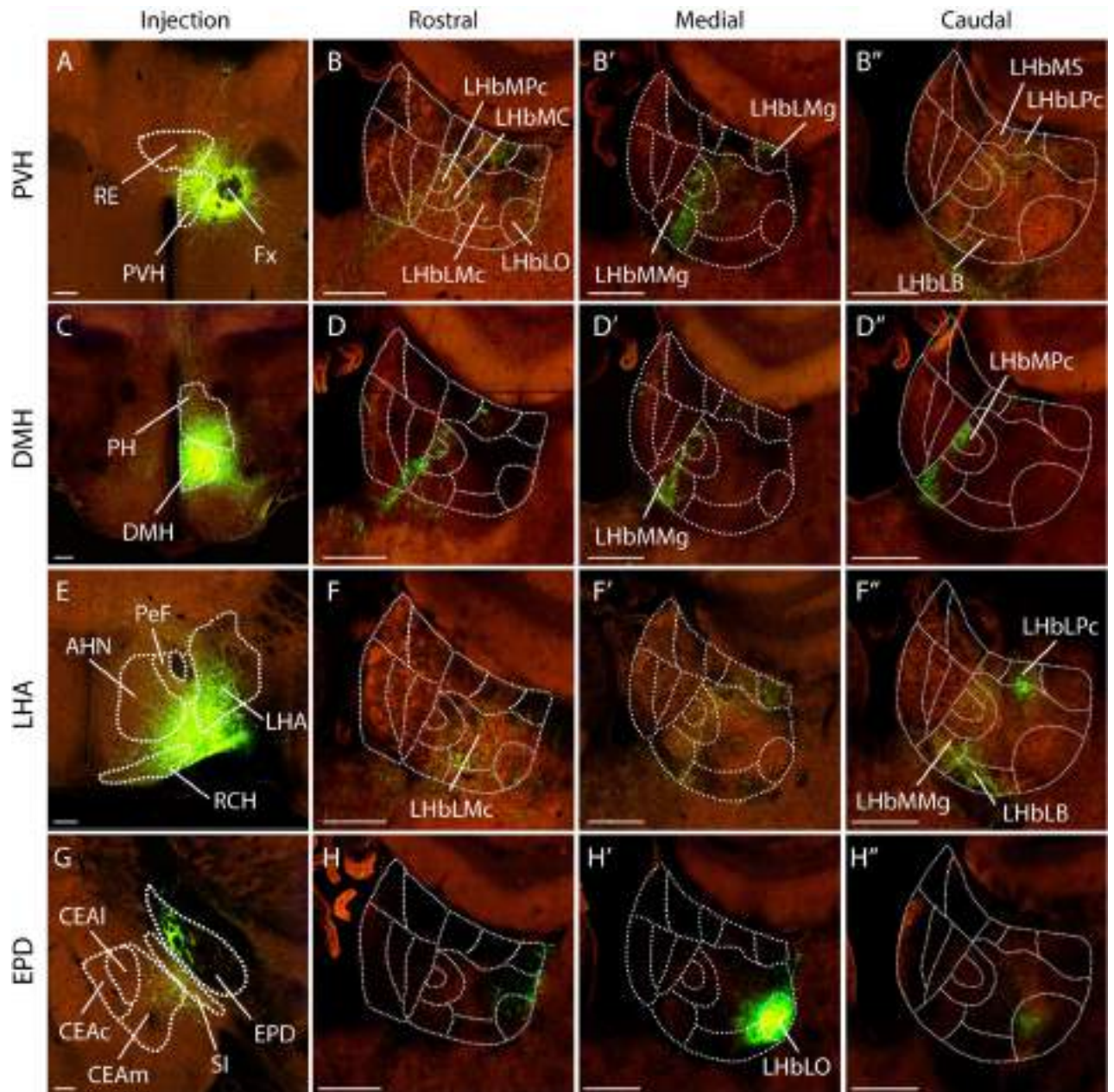


Figure 5. Peduncular hypothalamic projections to the LHb. (A) Injection site in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH; Experiment n°: 581,641,279). (B–B'') Adult mouse habenula coronal sections, from rostral to caudal, showing the fiber distribution originated from the PVH nucleus. (C) Injection site in the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH; Experiment n°: 178,283,239). (D–D'') Adult mouse habenula coronal sections, rostral to caudal, displaying the fibers distribution coming from the DMH nucleus. (E) Injection site in the lateral hypothalamic area (LHA; Experiment n°: 485,239,207). (F–F'') Adult mouse habenula coronal sections, rostral to caudal, showing the fibers distribution originated from the LHA nucleus. (G) Injection site in the dorsal entopeduncular nucleus (EPD; Experiment n°: 539,498,984, identified as internal segment of globus pallidus; GPi). (H–H'') Adult mouse habenula coronal sections, rostral to caudal, displaying the fibers distribution coming from the EPD nucleus. Abbreviations: AHN: anterior hypothalamic nucleus; DMH: dorsomedial nucleus of the hypothalamus; EPD, dorsal entopeduncular nucleus; Fx: fornix; LHA: lateral hypothalamic area; LHb, lateral habenula; LHbLB: LHbL basal subnucleus; LHbLMc: LHbL magnocellular subnucleus; LHbLMg: LHbL marginal subnucleus; LHbLO: LHbL oval subnucleus; LHbLPc: LHbL parvocellular subnucleus; LHbM: LHb medial territory; LHbMC: LHbM central subnucleus; LHbMMg: LHbM marginal subnucleus; LHbMPc: LHbM parvocellular subnucleus; LHbMS: LHbM superior subnucleus; PH: posterior hypothalamic nucleus; PVH: paraventricular hypothalamic nucleus; RCH: retrochiasmatic area; RE: nucleus of reuniens. Scale bar: 200 μ m. Image credit: Allen Institute for Brain Science. [<https://connectivity.brain-map.org/>].

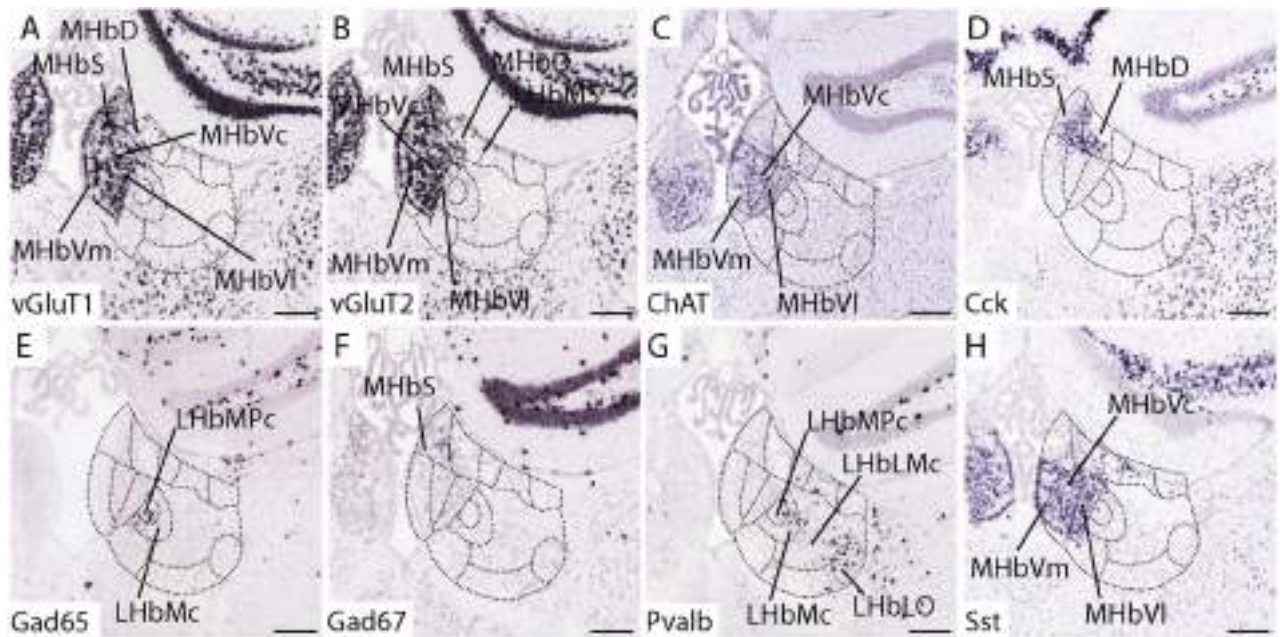


Figure 6. Habenular neuronal cell type distribution. Adult mouse habenula coronal sections displaying the location of specific cell type markers by in situ hybridization. Excitatory neurotransmitters (A–D). (A) *vGluT1* gene, displayed in ventral and dorsal MHb; (B) *vGluT2* gene, displayed principally in the MHb and in a lateral Lhb as a scattered pattern. (C) *ChAT* gene, displayed in the ventral MHb. (D) *Cck* gene, expressed in the dorsal MHb. Inhibitory neurotransmitters (E–H). (E) *Gad65* gene, displayed in Lhb with a specific expression in LHbMPC and LHbMc subnuclei. (F) *Gad67* gene, displayed in a specific pattern in the MHbS subnuclei. (G) *Pvalb* gene, expressed in specific pattern in the LHbMPC, LHbMc and LHbLO subnuclei, also some scattered positive cells were detected in LHbLMc. (H) *Sst* gene, displayed in the ventral MHb part. Abbreviations: Lhb, lateral habenula; LHbLMc: LHbL magnocellular subnucleus; LHbLO: LHbL oval subnucleus; LHbM: LHb medial territory; LHbMc: LHbM central subnucleus; LHbMPC: LHbM parvocellular subnucleus; LHbMS: LHbM superior subnucleus; MHb: medial habenula; MHbD: MHb dorsal subnucleus; MHbS: MHb superior subnucleus; MHbVc: MHb ventral central subnucleus; MHbVI: MHb ventral lateral subnucleus; MHbVm: MHb ventral medial subnucleus. Scale bar: 200 μ m. Image credit: Allen Institute for Brain Science. [<https://mouse.brain-map.org/>].

Discussion

The single cell transcriptomic RNAseq studies of Hashikawa et al.¹⁰ and Wallace et al.⁹ have corroborated different subnuclear components of the habenular complex. The MHb is divided into a dorsal part that includes the MHbD and MHbS subnuclei and a ventral part composed by the MHbVm, MHbVc and MHbVI units. On the other hand, the Lhb is divided into a dorsal region that involves the LHbMS, LHbLPC and LHbLMg, a central part that includes medial LHbMPC and LHbMC components, a central LHbLMc component and a lateral LHbLO portion, and finally a ventral portion with LHbMMg and LHbLB units. These studies identified the MHb subnuclei by the expression of a specific gene but the Lhb components were recognized by a combination of several gene expression patterns. Each distinct MHb component displays internal homogeneity, while the Lhb subnuclei show substantial internal heterogeneity. The diverse nature of their neurons indicates an intricate mode of development. It may be hypothesized that the Lhb subnuclei are composed of different subsets of neurons that occupy diverse destinations by differential migration processes.

In relation to habenular afferences, the MHb is innervated by four neuronal populations (BST, SF, TS and MS). It is remarkable that almost all the neuronal populations projecting to the MHb belong to the septal territory. This innervation is strongly compartmentalized and the four different sets of axons target specific MHb subnuclei. The BST (medio central division) specifically innervates the MHbS, the SF targets the MHbVI and the MHbD, the TS reaches the MHbD and MHbVm and finally, the MS innervates the MHbVc. It has been described that the TS innervation of the MHb is accompanied by fibers from the bed nucleus of the anterior commissure (BAC; Yamaguchi et al.⁴⁷; Watanabe et al.¹⁶), but no specific BAC injection was found in the Allen database. Therefore, the dorsal MHb is under the influence of BST, TS and SF, while the ventral MHb is controlled by SF, TS and MS. Functionally, the dorsal MHb region (MHbD and MHbS) is related to exercise motivation, hedonic state regulation and primary reinforcement learning^{30,32,33}. Therefore, these functions may be regulated by BST, TS/BAC and SF innervation. The fact that both subnuclei are innervated by different neuronal populations suggests that the functions related to them may be separated between both subnuclei. New and more selective behavioral experiments are needed to dissect the specific function of each dorsal MHb subnucleus. The ventral MHb region is related to anxiety, depression and drug addiction learning⁴⁷. This MHb territory is subdivided in three subnuclei from medial to lateral (MHbVm, Vc and VI). These subnuclei are each innervated by selective neuronal

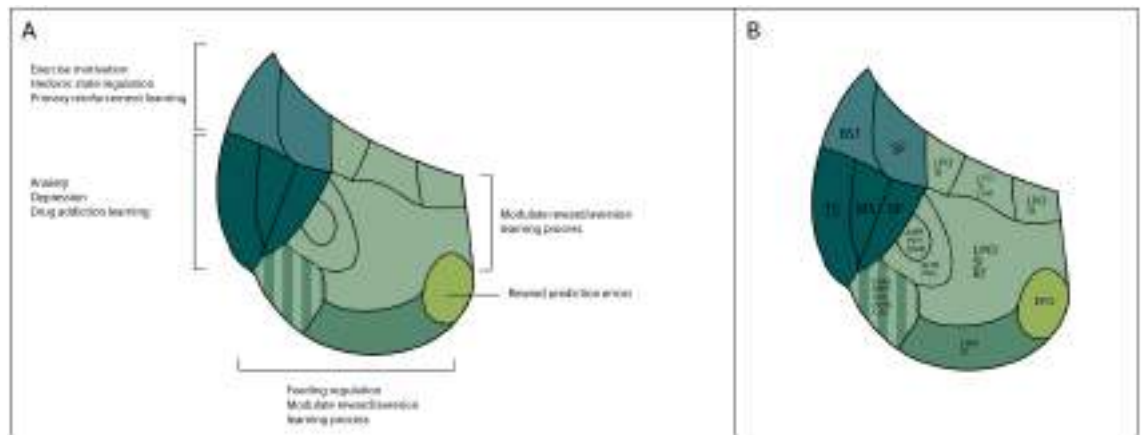


Figure 7. Habenular functions scheme. **(A)** Representation of the habenular functions in relation with the different habenular territories. The limbic functions associated to the habenula are strongly linked with specific subnuclei. **(B)** Representation of the projecting neuronal populations in the different habenular subnuclei. Both schemes allowed us to link projecting populations with the different functions associated to the habenular subnuclei. Abbreviations: AHN: anterior hypothalamic nucleus; BST: bed nuclei of the stria terminalis; DMH: dorsomedial nucleus of the hypothalamus; EPD, dorsal entopeduncular nucleus; LHA: lateral hypothalamic area; LPO: lateral preoptic area; MPO medial preoptic area; MPO medial preoptic area; MS: medial septal nucleus; PVH: paraventricular hypothalamic nucleus; SF: septofimbrial nucleus; SI: substantia innominata; TS: triangular nucleus of septum.

populations. The ventromedial, central and lateral subnuclei are projected upon by the TS/BAC, MS and SF, respectively. This selective innervation also indicates, as in the dorsal MHb, that each ventral subnucleus may be involved in a different function or that collaboration among them is needed for the cited behavioral phenomena (Fig. 7A, B). As stated before, more specific behavioral experiments must be done to properly understand the role of each ventral MHb subnuclei.

The LHb afferences displayed a wide range of origins. The axonal distributions were less specific for the different LHb subnuclei and usually displayed a diffuse pattern. Nevertheless, we noted that preoptic and AH projections cover the medial aspect of the LHb, whereas diverse afferents from peduncular hypothalamic nuclei reach preferentially the central territory, and SI, EPD and reticular nucleus projections target the lateral components of the LHb. This relatively diffuse pattern of innervation coincides with the complex internal subnuclear organization described by the transcriptomic RNAseq experiments^{8–10}. In contrast with the MHb neuronal clusters, the LHb subnuclei required a combination of markers for characterization. We mentioned above the possibility of intermixed neuronal tangential migrations within the LHb components as a plausible explanation of their peculiar partly shared characteristics.

We identified the LPO and MPO in the preoptic area, the AH nucleus in the alar terminal hypothalamus and SI in the subpallial area as territories that project into the LHb. Their axons converged within the medial LHb territory. The LPO projection into the LHb reportedly includes gabaergic and glutamatergic neurons. The balance between these two neurotransmitters modulates the reward/aversion equilibrium in the learning process⁴⁸. The MPO and AH projections into the LHb were previously described^{49,50} but without reference to specific subnuclei or habenular function (Fig. 6A, B). We located PVH, DMH and LHA fibers from the peduncular hypothalamus in the central area of the LHb. The LHA projection into the LHb was previously described^{25,51,52} and was related with feeding regulation and reward/aversion equilibrium in the learning process²⁵. No specific information about the PVH and DMH projections into the LHb was found (Fig. 7A,B). Finally, we identified EPD and SI input to the LHb. These nuclei distribute their projections preferentially from medial to lateral areas of the LHb. It is remarkable that the LHbLO is distinguished among all the LHb nuclei due to a strongly specific innervation by the EPD. The LHbLO neurons, together with the LHbMS, display unique electrophysiological properties when compared to the rest of LHb neurons. They respond to Dopamine with an increment of their firing rate in contrast with the rest of LHb neurons⁵³. Therefore, this unit constitutes not only a differentiated morphological structure of the LHb but a distinctive functional entity by itself^{17,53}. The EPD excitatory projections into LHbLO are related with reward prediction errors modulated by neurotransmitters (Shabel et al.²²; Wallace et al.¹⁷; Fig. 7A,B). The high quality of Allen Brain Atlas images allowed a high level of magnification. In most of the experiments analyzed we were able to detect varicosities in the positive fibers that could point to axonal boutons. Nevertheless, in order to confirm this fact, double labeling with synaptic proteins should be performed to confirm the presence of axonal boutons in the different territories.

It must be highlighted that it was recently described in chick that the prethalamic eminence, the dorsal subregion of prethalamus found just rostral to the habenular thalamic region, contributes excitatory neurons by tangential migration during embryonic development to almost all the populations described as projecting into the Hb complex^{26,27}. A migratory origin in the prethalamic evidence was demonstrated for the mouse habenulopetal BAC nucleus¹⁶. The described migration into the peduncular hypothalamic EPD formation nicely explains that this mixed excitatory/inhibitory neuronal population has usually been wrongly assigned to the pallidum territory

as part of the rodent GPI^{9,17,26,27}. Therefore, the functions assigned to the pallidal GPI^{20,22} seem to correspond to the hypothalamic EPD.

It must be noted that our analysis presents certain limitations due to the fact that we have only used the data obtained from Allen Brain database. In some of the cases it would have been needed more specific and accurate injections or the use of specific viral tracers to label specific neuronal types. Nevertheless, we do not foresee that these specific experiments would strongly modify the conclusions of our work.

The molecular neuronal heterogeneity among the MHB and LHB subnuclei correlates with the distribution of different neurotransmitters. In general, the LHB is divided in two areas (medial and lateral) attending to its different psychobiological functions. The lateral area is related to avoidance behavior to aversive stimuli while the medial part has been involved in despair, helplessness, anhedonia responses and in sleep and circadian rhythms⁵⁴. Our hodological results open the possibility to develop research lines that uncover the specific roles of the different subnuclei of both LHB and MHB.

Methods

Allen brain atlas. The Allen Mouse Brain Atlas (© 2021 Allen Institute for Brain Science. Mouse Brain Connectivity. Available at: <https://connectivity.brain-map.org>) offers Adult Mouse Connectivity Atlas as an image database of axonal projections labeled by viral (rAAV) tracers and visualized using serial two-photon tomography from 2994 experiments.

This resource contains several tools to search through its experiments. The Source Search tool, allows the search of experiments by injection site (Filter source Structures) filtered by mouse line, tracer type and the presence of Intrinsic Signal Images. The Target Search tool allows a "virtual retrograde" search that localizes experiments based on projections located in the structures of interest. Finally, the Spatial Search allows the user to choose either a target signal or injection site based on a voxel selection that retrieves all the experiments with positive signal. The injection summary includes primary and secondary injection structures, the stereotaxic injection Bregma coordinates, the mouse strain, tracer type and the calculated injection summary (%) for the rAAV. The Image Viewer allows to browse the experiment in 2-D and panning through the 140 coronal slices of each experiment. The histogram shows the quantified signal in each structure either by projection volume (mm³) or by projection density, which means the fraction of the area occupied by signal compared to the whole structure. The mouse strains used included wild type and transgenic cre lines. Nevertheless, the rAAV used did not include specific sequences to interact with the cre endonuclease.

Adult mouse connectivity atlas. At the identification stage, 754 experiments (Supplementary Table S1) were revised, using the injection site search, from Septal (30), Hypothalamic (258), Pallidal (67), Striatal (131), and Thalamic (268) areas, according with the habenula-afferent nuclei identified previously. These nuclei were screened by checking both the section images and the projection density window (3D viewer) of each experiment, in order to corroborate the labelled terminations in the habenula. The coronal slices from each confirmed case were reexamined to check the labelled fiber pathway and the terminations in both MHB and LHB.

For the selection of experiments, the following criteria were used: virus volume injected < 0.2 mm³ and injection coordinates within anatomical boundaries of the core of interest. Experiments with a massive virus volume injected, or labelling of 4 or more structures to the area of interest, were excluded. In order to systematize the image selection through the Hb between the experiments, we selected three coronal section levels taken 3, 6 and 9 sections rostrally to the habenular commissure. The entire process was carried out through peer analysis, both the selection and screening of the experiments was carried out by two researchers, according to the inclusion and exclusion criteria. For this reason, once all the experiments were collected, each researcher selected one or two experiments from each set that met the criteria. After the first screening, both researchers pooled the results to reach a consensus list of experiments that were suitable in relation to the selection criteria. The experiment number, the amount of virus injected and the Bregma coordinates of the injection were noted (Supplementary Table S1).

All the gene expression images were downloaded from Allen Institute for Brain Science. [<https://mouse.brain-map.org/>], Mouse Brain (ISH Data). Adobe Photoshop (version 22.1.1) was used for the photo editing program and Adobe Illustrator (version 25.1) was used to generate the figures.

Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available in The Allen Mouse Brain Atlas (© 2021 Allen Institute for Brain Science. Mouse Brain Connectivity and Mouse Brain Map (Available at: <https://connectivity.brain-map.org> and <https://mouse.brain-map.org>) repository. The accession number to each experiment are contained in Supplementary Table S1.

Received: 30 March 2022; Accepted: 6 June 2022

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14328-1>

References

- Seigneur, E., Polepalli, J. S. & Südhof, T. C. Cbln2 and Cbln4 are expressed in distinct medial habenula-interpeduncular projections and contribute to different behavioral outputs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E10235–E10244 (2018).
- Sutherland, R. J. The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **6**, 1–13 (1982).
- Herkenham, M. & Nauta, W. J. H. Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J. Comp. Neurol.* **173**, 123–145 (1977).
- Herkenham, M. & Nauta, W. J. H. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **187**, 19–47 (1979).

5. Andres, K., Von Düring, M. & Veh, R. Subnuclear organization of the rathabenular complexes. *J. Comp. Neurol.* **407**, 130–150 (1999).
6. Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T. & Okamoto, H. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J. Comp. Neurol.* **520**, 4051–4066 (2012).
7. Wagner, F., Stroh, T. & Veh, R. W. Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. *J. Comp. Neurol.* **522**, 2650–2662 (2014).
8. Wagner, F., French, L. & Veh, R. W. Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct. Funct.* **221**, 39–58 (2016).
9. Wallace, M. L. *et al.* Anatomical and single-cell transcriptional profiling of the murine habenular complex. *Elife* **9**, 1–22 (2020).
10. Hashikawa, Y. *et al.* Transcriptional and spatial resolution of cell types in the mammalian habenula. *Neuron* **106**, 743–758.e5 (2020).
11. Puelles, L. & Rubenstein, J. L. R. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* **16**, 472–479 (1993).
12. Puelles, L. & Rubenstein, J. L. R. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* **26**, 469–476 (2003).
13. Puelles, L. & Rubenstein, J. L. R. A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model. *Front. Neuroanat.* **9**, 27 (2015).
14. Viswanath, H., Carter, A. Q., Baldwin, P. R., Molfese, D. L. & Salas, R. The medial habenula: still neglected. *Front. Hum. Neurosci.* **7**, 1–6 (2014).
15. Hsu, Y. W. A. *et al.* Medial habenula output circuit mediated by $\alpha 5$ nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. *J. Neurosci.* **33**, 18022–18035 (2013).
16. Watanabe, K., Irie, K., Hanashima, C., Takebayashi, H. & Sato, N. Diencephalic progenitors contribute to the posterior septum through rostral migration along the hippocampal axonal pathway. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
17. Wallace, M. L. *et al.* Genetically distinct parallel pathways in the entopeduncular nucleus for limbic and sensorimotor output of the basal ganglia. *Neuron* **94**, 138–152.e5 (2017).
18. Golden, S. A. *et al.* Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward. *Nature* **534**, 688–692 (2016).
19. Knowland, D. *et al.* Distinct ventral pallidal neural populations mediate separate symptoms of depression. *Cell* **170**, 284–297.e18 (2017).
20. Hong, S. & Hikosaka, O. The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron* **60**, 720–729 (2008).
21. Li, H., Pullmann, D. & Jhou, T. C. Valence-encoding in the lateral habenula arises from the entopeduncular region. *Elife* <https://doi.org/10.7554/eLife.41223> (2019).
22. Shabel, S. J., Proulx, C. D., Trias, A., Murphy, R. T. & Malinow, R. Input to the lateral habenula from the basal ganglia is excitatory, aversive, and suppressed by serotonin. *Neuron* **74**, 475–481 (2012).
23. Lazaridis, I. *et al.* A hypothalamus-habenula circuit controls aversion. *Mol. Psychiatry* **24**, 1351–1368 (2019).
24. Lecca, S. *et al.* Aversive stimuli drive hypothalamus-to-habenula excitation to promote escape behavior. *Elife* <https://doi.org/10.7554/eLife.30697> (2017).
25. Stamatakis, A. M. *et al.* Lateral hypothalamic area glutamatergic neurons and their projections to the lateral habenula regulate feeding and reward. *J. Neurosci.* **36**, 302–311 (2016).
26. Alonso, A., Trujillo, C. M. & Puelles, L. Longitudinal developmental analysis of prethalamic eminence derivatives in the chick by mapping of Tbr1 in situ expression. *Brain Struct. Funct.* **225**, 481–510 (2020).
27. Alonso, A., Trujillo, C. M. & Puelles, L. Quail-chick grafting experiments corroborate that Tbr1-positive eminential prethalamic neurons migrate along three streams into hypothalamus, subpallium and septocommissural areas. *Brain Struct. Funct.* **226**, 759–785 (2021).
28. Kowski, A. B., Geisler, S., Krauss, M. & Veh, R. W. Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. *J. Comp. Neurol.* **507**, 1465–1478 (2008).
29. Gardon, O. *et al.* Expression of mu opioid receptor in dorsal diencephalic conduction system: new insights for the medial habenula. *Neuroscience* **277**, 595–609 (2014).
30. Hsu, Y. W. A., Morton, G., Guy, E. G., Wang, S. D. & Turner, E. E. Dorsal medial habenula regulation of mood-related behaviors and primary reinforcement by tachykinin-expressing habenula neurons. *eNeuro* **3**, 118–126 (2016).
31. Lee, H. W., Yang, S. H., Kim, J. Y. & Kim, H. The role of the medial habenula cholinergic system in addiction and emotion-associated behaviors. *Front. Psychiatry* **10**, 1–8 (2019).
32. Koppensteiner, P., Galvin, C. & Ninan, I. Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Mol. Cell. Neurosci.* **77**, 105–112 (2016).
33. Hsu, Y. W. A. *et al.* Role of the dorsal medial habenula in the regulation of voluntary activity, motor function, hedonic state, and primary reinforcement. *J. Neurosci.* **34**, 11366–11384 (2014).
34. Stamatakis, A. & Stuber, G. Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat. Neurosci.* **15**, 1105–1107 (2012).
35. Gold, P. W. & Kadriu, B. A major role for the lateral habenula in depressive illness: physiologic and molecular mechanisms. *Front. Psychiatry* **10**, 1–7 (2019).
36. Li, B. *et al.* Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* **470**, 535–541 (2011).
37. Li, K. *et al.* β CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression. *Science* **341**, 1016–1020 (2013).
38. Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat. Neurosci.* **12**, 77–84 (2009).
39. Hikosaka, O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 503–513 (2010).
40. Proulx, C. D., Hikosaka, O. & Malinow, R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat. Neurosci.* **17**, 1146–1152 (2014).
41. Zheng, Z. *et al.* Hypothalamus-habenula potentiation encodes chronic stress experience and drives depression onset. *Neuron* **110**, 1400–1415.e6 (2022).
42. Yang, Y., Wang, H., Hu, J. & Hu, H. Lateral habenula in the pathophysiology of depression. *Curr. Opin. Neurobiol.* **48**, 90–96 (2018).
43. Cui, Y., Yang, Y., Dong, Y. & Hu, H. Decoding depression: insights from glial and ketamine regulation of neuronal burst firing in lateral habenula. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **83**, 141–150 (2018).
44. Hu, H. Advances in molecular and circuitry mechanisms of depressive disorder—a focus on lateral habenula. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 1180 (ed. Fang, Y.) 135–146 (Springer, 2019).
45. Hu, H., Cui, Y. & Yang, Y. Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 277–295 (2020).
46. Quina, L. A., Wang, S., Ng, L. & Turner, E. E. Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *J. Neurosci.* **29**, 14309–14322 (2009).
47. Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T. & Nakanishi, S. Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* **78**, 537–544 (2013).

48. Barker, D. J. *et al.* Lateral preoptic control of the lateral habenula through convergent glutamate and GABA transmission. *Cell Rep.* **21**, 1757–1769 (2017).
49. Risold, P. Y., Canteras, N. S. & Swanson, L. W. Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **348**, 1–40 (1994).
50. Anderson, C. H. & Shen, C. L. Efferents of the medial preoptic area in the guinea pig: an autoradiographic study. *Brain Res. Bull.* **5**, 257–265 (1980).
51. Rossi, M. A. *et al.* Transcriptional and functional divergence in lateral hypothalamic glutamate neurons projecting to the lateral habenula and ventral tegmental area. *Neuron* **109**, 3823–3837.e6 (2021).
52. Poller, W. C., Madai, V. I., Bernard, R., Laube, G. & Veh, R. W. A glutamatergic projection from the lateral hypothalamus targets VTA-projecting neurons in the lateral habenula of the rat. *Brain Res.* **1507**, 45–60 (2013).
53. Kowski, A. B., Veh, R. W. & Weiss, T. Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience* **161**, 1154–1165 (2009).
54. Aizawa, H. & Zhu, M. Toward an understanding of the habenula's various roles in human depression. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **73**, 607–612 (2019).

Acknowledgements

We thank Pablo Ferao Egea for photography and figure design advice as well as Luis Puelles for critical reading of the manuscript.

Author contributions

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Conceived and designed the experiments: I.J.L., S.M., D.E. and E.P.; Performed the experiments: I.J.L., E.C.R. and F.A.G.; Analyzed the data: I.J.L., E.C.R., D.E. and E.P.; Wrote the article: I.J.L. and E.P.; Obtained funding: S.M., E.P. and D.E.

Funding

Work supported by MINECO/AEI/FEDER (BFU2013-48230) to E. Puelles and D. Echevarría; MINECO/AEI/FEDER (SAF2017-83702-R; PID2020-118171RB-I00), GVA (PROMETEO/2018/041), ISCIII (“RD16/001/0010”), co-funded by ERDF/ESF, “Investing in your future”, and FTPGB (FTPGB18/SM) to S. Martinez. The Institute of Neurosciences is a “Centre of Excellence Severo Ochoa (SEV-2017-0723)”.

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14328-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Material suplementario Anexo 1

Supplementary Table S1

Selected and revised connectivity experiments

The first table represent the selected experiments from The Allen Mouse Brain Atlas (© 2021 Allen Institute for Brain Science. Mouse Brain Connectivity. Available at: <https://connectivity.brain-map.org>). It recollects all the information related to the experiments displayed in the Figures 2-4. The second table represent all the revised experiments, from The Allen Mouse Brain Atlas (© 2021 Allen Institute for Brain Science. Mouse Brain Connectivity, listed by the injected nucleus and grouped by their territory.

Selected experiments

Figure 2: Septal Nuclei (pallial and subpallial)

Nucleus	Experiment No.	Injection Slice	Rostral Slice	Medial Slice	Caudal Slice	Injection Volume	Coordinates
TS	125830911	58/140	67/140	70/140	73/140	0.27 mm ³	Bregma (-0.1, 0.1, 2.3, 0)
SF	147162736	51/140	63/140	66/140	69/140	0.18 mm ³	Bregma (0.14, 2.55, 4.30)
MS	554021622	55/140	68/140	71/140	74/140	0.13 mm ³	Bregma (0.62, 0.02, 3.4, 0)
BST	159433187	56/140	65/140	68/140	71/140	0.01 mm ³	Bregma (0.1, 0.4, 3.67, 0)

Figure 3: Preoptic area, terminal hypothalamus and basal ganglia

Nucleus	Experiment No.	Injection Slice	Rostral Slice	Medial Slice	Caudal Slice	Injection Volume	Coordinates
LPO	293942188	53/140	63/140	66/140	69/140	0.09 mm ³	Bregma (0.5, 0.81, 4.84, 0)
MPO	299247009	52/140	65/140	68/140	71/140	0.12 mm ³	Bregma (0.5, 0.15, 4.75, 0)
AHN	292035484	65/140	66/140	69/140	72/140	0.19 mm ³	Bregma (-0.46, 0.5, 4.8, 0)
SI	302739608	40/140	63/140	66/140	69/140	0.07 mm ³	Bregma(0.62, 1.2, 4.85, 0)

Figure 4: Peduncular hypothalamus

Nucleus	Experiment No.	Injection Slice	Rostral Slice	Medial Slice	Caudal Slice	Injection Volume	Coordinates
PVH	581641279	59/140	65/140	68/140	71/140	0.07 mm ³	Bregma (0.38, 0.02, 4.2, 0)
DMH	178283239	79/140	67/140	70/140	73/140	0.12 mm ³	Bregma(-1.5, 0.35, 5.2, 0)
LHA	485239207	65/140	68/140	71/140	74/140	0.10 mm ³	Bregma(-0.46, 1.15, 5.45, 0)
EPD	539498984	68/140	67/140	70/140	73/140	0.03 mm ³	Bregma(-0.94, -2.25, 4.47, 0)

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
Gpe	511942270	Pallidum	Dorsal Region
Gpe	265944167	Pallidum	Dorsal Region
Gpe	158373958	Pallidum	Dorsal Region
Gpe	159942097	Pallidum	Dorsal Region
Gpe	647574144	Pallidum	Dorsal Region
Gpe	265943460	Pallidum	Dorsal Region
Gpe	300318924	Pallidum	Dorsal Region
Gpi	305024724	Pallidum	Dorsal Region
Gpi	539498984	Pallidum	Dorsal Region
Gpi	278501857	Pallidum	Dorsal Region
SI	157659671	Pallidum	Ventral Region
SI	161460864	Pallidum	Ventral Region
SI	478491810	Pallidum	Ventral Region
SI	302736304	Pallidum	Ventral Region
SI	126841788	Pallidum	Ventral Region
SI	298835152	Pallidum	Ventral Region
SI	146045723	Pallidum	Ventral Region
SI	159650350	Pallidum	Ventral Region
SI	478581786	Pallidum	Ventral Region
SI	305026861	Pallidum	Ventral Region
SI	147632458	Pallidum	Ventral Region
SI	273026584	Pallidum	Ventral Region
SI	300111087	Pallidum	Ventral Region
SI	126711445	Pallidum	Ventral Region
SI	138058320	Pallidum	Ventral Region
SI	299245589	Pallidum	Ventral Region
SI	549362997	Pallidum	Ventral Region
SI	125436508	Pallidum	Ventral Region
SI	304762245	Pallidum	Ventral Region
MA	No experiments	Pallidum	Ventral Region
NDB	167200755	Pallidum	Medial Region
NDB	286319739	Pallidum	Medial Region
NDB	158257355	Pallidum	Medial Region
NDB	292961470	Pallidum	Medial Region
NDB	515191874	Pallidum	Medial Region
NDB	177605425	Pallidum	Medial Region
NDB	504173156	Pallidum	Medial Region
BST	298835859	Pallidum	Caudal Region
BST	305645843	Pallidum	Caudal Region
BST	308386222	Pallidum	Caudal Region
BST	301947600	Pallidum	Caudal Region
BST	522078446	Pallidum	Caudal Region
BST	241280698	Pallidum	Caudal Region
BST	241279971	Pallidum	Caudal Region
BST	159375036	Pallidum	Caudal Region
BST	176886238	Pallidum	Caudal Region
BST	305026146	Pallidum	Caudal Region

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
BST	300236763	Pallidum	Caudal Region
BST	265138021	Pallidum	Caudal Region
BST	147049515	Pallidum	Caudal Region
BST	159433187	Pallidum	Caudal Region
BST	204832917	Pallidum	Caudal Region
BST	146747721	Pallidum	Caudal Region
BST	167026321	Pallidum	Caudal Region
BST	117312486	Pallidum	Caudal Region
BST	175739085	Pallidum	Caudal Region
BST	267764292	Pallidum	Caudal Region
BST	304760810	Pallidum	Caudal Region
BST	194948535	Pallidum	Caudal Region
BST	181786681	Pallidum	Caudal Region
BST	171068025	Pallidum	Caudal Region
BST	267763584	Pallidum	Caudal Region
BAC	No experiments	Pallidum	Caudal Region

Total Pallidum 67

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
TRS	287950390	Septal	Caudal Part
TRS	182341627	Septal	Caudal Part
SF	147162736	Septal	Caudal Part
SH	No experiments	Septal	Caudal Part
LSc	301672044	Septal	Caudal Part
LSc	527808181	Septal	Caudal Part
LSc	160294327	Septal	Caudal Part
LSc	120436988	Septal	Caudal Part
LSr	267810394	Septal	Rostral Part
LSr	178486024	Septal	Rostral Part
LSr	168094300	Septal	Rostral Part
LSr	300164356	Septal	Rostral Part
LSr	300841699	Septal	Rostral Part
LSr	272917631	Septal	Rostral Part
LSr	293434703	Septal	Rostral Part
LSr	265946352	Septal	Rostral Part
LSr	125830911	Septal	Rostral Part
LSr	301672755	Septal	Rostral Part
LSr	160398593	Septal	Rostral Part
LSr	100141435	Septal	Rostral Part
LSv	113783321	Septal	Rostral Part
LSv	182887258	Septal	Ventral Part
LSv	303537993	Septal	Ventral Part
LSv	167654731	Septal	Ventral Part
MS	265944939	Septal	Ventral Part
MS	113696423	Septal	Ventral Part
MS	156819600	Septal	Ventral Part
MS	278259822	Septal	Ventral Part
MS	100141597	Septal	Ventral Part

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
MS	303580293	Septal	Ventral Part
MS	554021622	Septal	Ventral Part

Total Septal 30

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
ACB	168615344	Striatum	Ventral Region
ACB	146470726	Striatum	Ventral Region
ACB	167904966	Striatum	Ventral Region
ACB	171411651	Striatum	Ventral Region
ACB	175373569	Striatum	Ventral Region
ACB	168614604	Striatum	Ventral Region
ACB	300078901	Striatum	Ventral Region
ACB	170785775	Striatum	Ventral Region
ACB	127255254	Striatum	Ventral Region
ACB	175732001	Striatum	Ventral Region
ACB	293008559	Striatum	Ventral Region
ACB	287533790	Striatum	Ventral Region
ACB	265136608	Striatum	Ventral Region
ACB	309740347	Striatum	Ventral Region
ACB	287993060	Striatum	Ventral Region
ACB	300110369	Striatum	Ventral Region
ACB	286486329	Striatum	Ventral Region
FS	No experiments	Striatum	Ventral Region
OT	167904255	Striatum	Ventral Region
OT	292962283	Striatum	Ventral Region
CP	113036264	Striatum	Dorsal Region
CP	513775257	Striatum	Dorsal Region
CP	485846989	Striatum	Dorsal Region
CP	180982124	Striatum	Dorsal Region
CP	117317884	Striatum	Dorsal Region
CP	120762196	Striatum	Dorsal Region
CP	267762146	Striatum	Dorsal Region
CP	159552290	Striatum	Dorsal Region
CP	114399934	Striatum	Dorsal Region
CP	113505468	Striatum	Dorsal Region
CP	272824561	Striatum	Dorsal Region
CP	113766038	Striatum	Dorsal Region
CP	127711803	Striatum	Dorsal Region
CP	160537796	Striatum	Dorsal Region
CP	158916311	Striatum	Dorsal Region
CP	264095536	Striatum	Dorsal Region
CP	160537018	Striatum	Dorsal Region
CP	120570964	Striatum	Dorsal Region
CP	146553266	Striatum	Dorsal Region
CP	127762867	Striatum	Dorsal Region
CP	148198052	Striatum	Dorsal Region
CP	124059700	Striatum	Dorsal Region
CP	159941339	Striatum	Dorsal Region

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
CP	505807398	Striatum	Dorsal Region
CP	155736539	Striatum	Dorsal Region
CP	159329308	Striatum	Dorsal Region
CP	112307754	Striatum	Dorsal Region
CP	100142580	Striatum	Dorsal Region
CP	265929968	Striatum	Dorsal Region
CP	112458831	Striatum	Dorsal Region
CP	159223001	Striatum	Dorsal Region
CP	127140981	Striatum	Dorsal Region
CP	293366741	Striatum	Dorsal Region
CP	158019342	Striatum	Dorsal Region
CP	126853068	Striatum	Dorsal Region
CP	303478748	Striatum	Dorsal Region
CP	293366035	Striatum	Dorsal Region
CP	183009881	Striatum	Dorsal Region
CP	158020947	Striatum	Dorsal Region
CP	156670520	Striatum	Dorsal Region
CP	307910595	Striatum	Dorsal Region
CP	292620968	Striatum	Dorsal Region
CP	575683020	Striatum	Dorsal Region
CP	175732996	Striatum	Dorsal Region
CP	127224133	Striatum	Dorsal Region
CP	160540013	Striatum	Dorsal Region
CP	287994474	Striatum	Dorsal Region
CP	175072215	Striatum	Dorsal Region
CP	157911832	Striatum	Dorsal Region
CP	301180385	Striatum	Dorsal Region
CP	155737254	Striatum	Dorsal Region
CP	301620241	Striatum	Dorsal Region
CP	514505957	Striatum	Dorsal Region
CP	307909888	Striatum	Dorsal Region
CP	309739641	Striatum	Dorsal Region
CP	161176690	Striatum	Dorsal Region
CP	286649703	Striatum	Dorsal Region
CP	278434443	Striatum	Dorsal Region
CP	287995180	Striatum	Dorsal Region
CP	272697238	Striatum	Dorsal Region
CP	293473098	Striatum	Dorsal Region
CP	286311648	Striatum	Dorsal Region
CP	307692311	Striatum	Dorsal Region
CP	292959343	Striatum	Dorsal Region
CP	310175667	Striatum	Dorsal Region
CP	477924853	Striatum	Dorsal Region
CP	308395312	Striatum	Dorsal Region
AAA	175372863	Striatum	Amygdalar
BA	No experiments	Striatum	Amygdalar
IA	No experiments	Striatum	Amygdalar

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
CEA	265648940	Striatum	Amygdalar
CEA	127761449	Striatum	Amygdalar
CEA	181890477	Striatum	Amygdalar
CEA	554022330	Striatum	Amygdalar
CEA	304970618	Striatum	Amygdalar
CEA	146795148	Striatum	Amygdalar
CEA	286774064	Striatum	Amygdalar
CEA	278179088	Striatum	Amygdalar
CEA	112459547	Striatum	Amygdalar
CEA	241279261	Striatum	Amygdalar
CEA	573639461	Striatum	Amygdalar
CEA	181889764	Striatum	Amygdalar
CEA	120281646	Striatum	Amygdalar
CEA	539641136	Striatum	Amygdalar
CEA	265945645	Striatum	Amygdalar
CEA	267152406	Striatum	Amygdalar
CEA	277856332	Striatum	Amygdalar
CEA	204907355	Striatum	Amygdalar
CEA	513498584	Striatum	Amygdalar
CEA	543875354	Striatum	Amygdalar
MEA	175072921	Striatum	Amygdalar
MEA	165034344	Striatum	Amygdalar
MEA	180981417	Striatum	Amygdalar
MEA	182041643	Striatum	Amygdalar
MEA	267547788	Striatum	Amygdalar
MEA	170860801	Striatum	Amygdalar
MEA	125361005	Striatum	Amygdalar
MEA	272819994	Striatum	Amygdalar
MEA	168363874	Striatum	Amygdalar
MEA	293469501	Striatum	Amygdalar
MEA	305645132	Striatum	Amygdalar
MEA	157550122	Striatum	Amygdalar
MEA	146985623	Striatum	Amygdalar
MEA	549361039	Striatum	Amygdalar
MEA	304694870	Striatum	Amygdalar
MEA	305124396	Striatum	Amygdalar
MEA	170946889	Striatum	Amygdalar
MEA	286303000	Striatum	Amygdalar
MEA	564357489	Striatum	Amygdalar
MEA	299896150	Striatum	Amygdalar
MEA	309386361	Striatum	Amygdalar
MEA	287666431	Striatum	Amygdalar
MEA	549805072	Striatum	Amygdalar
MEA	303578324	Striatum	Amygdalar
	Total	Striatum	131
Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
SO	147790922	Hypothalamus	Periventricular Zone

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
SO	587294457	Hypothalamus	Periventricular Zone
SO	286726065	Hypothalamus	Periventricular Zone
SO	178488152	Hypothalamus	Periventricular Zone
SO	147968866	Hypothalamus	Periventricular Zone
ASO	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	176432524	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	581641279	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	127470976	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	302221478	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	266840498	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	183459175	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	540685246	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	147136518	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	112951097	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	287044088	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	146983504	Hypothalamus	Periventricular Zone
PVH	267997620	Hypothalamus	Periventricular Zone
Pva	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Zone
Pvi	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	263369222	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	175738378	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	181891892	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	176431817	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	232311236	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	286726777	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	178282527	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	286318327	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	232310521	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	146554676	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	159751184	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	298105299	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	171482142	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	158142090	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	241278553	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	146660999	Hypothalamus	Periventricular Zone
ARH	586447435	Hypothalamus	Periventricular Zone
ADP	309794438	Hypothalamus	Periventricular Region
ADP	293114113	Hypothalamus	Periventricular Region
AVP	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
AVPV	138059031	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	266174751	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	304617742	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	518015408	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	287538943	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	178283239	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	306271212	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	113314337	Hypothalamus	Periventricular Region

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
DMH	160296448	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	265813096	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	160317628	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	298833739	Hypothalamus	Periventricular Region
DMH	182336846	Hypothalamus	Periventricular Region
MEPO	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	158738180	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	113554719	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	175263771	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	119846838	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	182459635	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	298049545	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	294005186	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	158315810	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	299247009	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	277800288	Hypothalamus	Periventricular Region
MPO	292123352	Hypothalamus	Periventricular Region
OV	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
PD	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
PS	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
PVp	168005102	Hypothalamus	Periventricular Region
PVp	264078267	Hypothalamus	Periventricular Region
PVp	168362462	Hypothalamus	Periventricular Region
PVp	167117360	Hypothalamus	Periventricular Region
Pvpo	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
SBPV	304473503	Hypothalamus	Periventricular Region
SCH	287665706	Hypothalamus	Periventricular Region
SCH	293431163	Hypothalamus	Periventricular Region
VMPO	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
VLPO	No experiments	Hypothalamus	Periventricular Region
AHN	181057754	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	180674463	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	523705737	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	126116142	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	175106053	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	182842391	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	146660293	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	267928135	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	159375743	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	127649713	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	266490034	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	286727483	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	305092904	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	292035484	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	301673462	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	305677409	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	299408890	Hypothalamus	Medial Zone

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
AHN	300167479	Hypothalamus	Medial Zone
AHN	515198413	Hypothalamus	Medial Zone
LM	298104533	Hypothalamus	Medial Zone
LM	157952778	Hypothalamus	Medial Zone
LM	520619072	Hypothalamus	Medial Zone
MM	158314987	Hypothalamus	Medial Zone
MM	126710740	Hypothalamus	Medial Zone
MM	182182936	Hypothalamus	Medial Zone
MM	307655867	Hypothalamus	Medial Zone
MM	168364580	Hypothalamus	Medial Zone
MM	304720034	Hypothalamus	Medial Zone
MM	287173396	Hypothalamus	Medial Zone
MM	127396760	Hypothalamus	Medial Zone
MM	558673113	Hypothalamus	Medial Zone
MM	304720741	Hypothalamus	Medial Zone
MM	148197327	Hypothalamus	Medial Zone
MM	273055501	Hypothalamus	Medial Zone
SUM	581350498	Hypothalamus	Medial Zone
SUM	114045733	Hypothalamus	Medial Zone
SUM	519164644	Hypothalamus	Medial Zone
SUM	304947804	Hypothalamus	Medial Zone
TMv	520336173	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	127909584	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	287246555	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	120280191	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	114472860	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	305270515	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	294355509	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	293549729	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	301061596	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	301989585	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	160399309	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	182460343	Hypothalamus	Medial Zone
MPN	587060515	Hypothalamus	Medial Zone
PMd	No experiments	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	294316542	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	146659588	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	299654968	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	263780018	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	179904203	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	520342605	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	157952068	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	286728896	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	515520455	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	167656152	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	267398651	Hypothalamus	Medial Zone
PMv	298178912	Hypothalamus	Medial Zone

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
PVHd	299759881	Hypothalamus	Medial Zone
PVHd	304998039	Hypothalamus	Medial Zone
PVHd	300923916	Hypothalamus	Medial Zone
PVHd	166532512	Hypothalamus	Medial Zone
PVHd	147051682	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	158258062	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	313325371	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	267540168	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	264319363	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	478095541	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	176886958	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	175106769	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	292211026	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	573330828	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	303708513	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	503324388	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	277854208	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	308641549	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	552759734	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	540139629	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	277854916	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	266489212	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	503036583	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	182337561	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	286556208	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	114290225	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	277615922	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	157549402	Hypothalamus	Medial Zone
VMH	286319033	Hypothalamus	Medial Zone
PH	175374275	Hypothalamus	Medial Zone
PH	164986046	Hypothalamus	Medial Zone
PH	573624241	Hypothalamus	Medial Zone
PH	268208632	Hypothalamus	Medial Zone
PH	176898557	Hypothalamus	Medial Zone
PH	159649643	Hypothalamus	Medial Zone
PH	268204599	Hypothalamus	Medial Zone
PH	127710392	Hypothalamus	Medial Zone
PH	551738231	Hypothalamus	Medial Zone
PH	159222295	Hypothalamus	Medial Zone
PH	112425523	Hypothalamus	Medial Zone
PH	278260569	Hypothalamus	Medial Zone
PH	100141434	Hypothalamus	Medial Zone
PH	292480129	Hypothalamus	Medial Zone
PH	293255030	Hypothalamus	Medial Zone
PH	266248065	Hypothalamus	Medial Zone
PH	557973149	Hypothalamus	Medial Zone
PH	267213793	Hypothalamus	Medial Zone

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
PH	555011865	Hypothalamus	Medial Zone
PH	168616827	Hypothalamus	Medial Zone
PH	302086846	Hypothalamus	Medial Zone
PH	266837456	Hypothalamus	Medial Zone
PH	302087552	Hypothalamus	Medial Zone
PH	300927483	Hypothalamus	Medial Zone
LHA	165035106	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	114046440	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	305379705	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	158373181	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	176887774	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	156195758	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	170860092	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	113313632	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	127470271	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	113444277	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	304674547	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	278508779	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	298048079	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	117302771	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	112372418	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	293368154	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	113369603	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	278510197	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	485239207	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	298048787	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	298078515	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	113506174	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	287667137	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	113225519	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	286882342	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	267213087	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	171020416	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	515410820	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	568768472	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	142653395	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	293254286	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	265125894	Hypothalamus	Lateral Zone
LHA	267396430	Hypothalamus	Lateral Zone
LPO	113553300	Hypothalamus	Lateral Zone
LPO	517975511	Hypothalamus	Lateral Zone
LPO	302016815	Hypothalamus	Lateral Zone
LPO	293942188	Hypothalamus	Lateral Zone
PSTN	165974379	Hypothalamus	Lateral Zone
PSTN	264696942	Hypothalamus	Lateral Zone
PeF	No experiments	Hypothalamus	Lateral Zone
RCH	No experiments	Hypothalamus	Lateral Zone

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
STN	564688610	Hypothalamus	Lateral Zone
STN	544455391	Hypothalamus	Lateral Zone
STN	146986331	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	176888661	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	264320076	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	264248605	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	112228391	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	177890956	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	547202505	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	304948510	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	551756337	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	267397226	Hypothalamus	Lateral Zone
TU	113037759	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	175018829	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	126190743	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	113095845	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	171066613	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	264697714	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	168663472	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	174788109	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	171065906	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	170263370	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	162018879	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	304858700	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	301539438	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	170858675	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	508539001	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	287492899	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	156315468	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	522255595	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	306270474	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	286662551	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	511549277	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	299760587	Hypothalamus	Lateral Zone
ZI	305321883	Hypothalamus	Lateral Zone
Total		Hypothalamus	258

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
VAL	113884251	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VAL	300237470	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VAL	310193233	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	157063074	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	174736554	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	127797441	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	538834292	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	267929554	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	170859382	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	273025872	Thalamus	Sensory-motor cortex related

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
VM	306444486	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	268205344	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VM	180707817	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	268399868	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	478581080	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	268206050	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	312240825	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	277958616	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	100141223	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	552280478	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	158375425	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	156202979	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPM	180628971	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPMpc	162018169	Thalamus	Sensory-motor cortex related
VPMpc	301735080	Thalamus	Sensory-motor cortex related
SPFm	278261300	Thalamus	Sensory-motor cortex related
SPFm	159258618	Thalamus	Sensory-motor cortex related
MG	305269070	Thalamus	Sensory-motor cortex related
MG	180520257	Thalamus	Sensory-motor cortex related
MG	178489574	Thalamus	Sensory-motor cortex related
MG	299996344	Thalamus	Sensory-motor cortex related
MG	183329991	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	298004028	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	292320572	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	480692170	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	298003295	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	479268685	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	478258719	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	479670988	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	100141598	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	263241470	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	479891303	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	278070717	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	156198187	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	479671695	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	642811309	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	642177206	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	293942897	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	266248776	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	293914766	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	287458895	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	293787288	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	301735795	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	642480973	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	642180077	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	287458189	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LGd	514513838	Thalamus	Sensory-motor cortex related

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
LP	146658879	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LP	572388249	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LP	167439900	Thalamus	Sensory-motor cortex related
LP	504100025	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	507708083	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	292319865	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	166267651	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	183282970	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	266585624	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	183175010	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	267493760	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	183282261	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	293914056	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	301466249	Thalamus	Polymodal association cortex related
LP	183174303	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	267999740	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	183011353	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	174781014	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	100147785	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	292212456	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	182515576	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	182892855	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	180708524	Thalamus	Polymodal association cortex related
PO	301674988	Thalamus	Polymodal association cortex related
SGN	182805258	Thalamus	Polymodal association cortex related
SGN	113165340	Thalamus	Polymodal association cortex related
SGN	272873704	Thalamus	Polymodal association cortex related
SGN	300688721	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	267609756	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	100142569	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	479267539	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	175818392	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	292321278	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	114427219	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	146046430	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	286553311	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	292478008	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	614435699	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	182805965	Thalamus	Polymodal association cortex related
AV	605092364	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	158840459	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	167571459	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	146658170	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	506947040	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	514333422	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	266174045	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	573035760	Thalamus	Polymodal association cortex related

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
AM	606278526	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	592698832	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	592698087	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	601900484	Thalamus	Polymodal association cortex related
AM	156393801	Thalamus	Polymodal association cortex related
IAD	168095041	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	267608343	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	305425490	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	175817683	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	113784293	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	272969333	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	113554008	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	272967913	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	309702727	Thalamus	Polymodal association cortex related
LD	298833033	Thalamus	Polymodal association cortex related
IMD	182185289	Thalamus	Polymodal association cortex related
IMD	299624500	Thalamus	Polymodal association cortex related
IMD	179902786	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	181895006	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	268076421	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	480703321	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	175739791	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	277849256	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	278067445	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	166264185	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	267928844	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	484504171	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	267610466	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	114291646	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	175740500	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	294356922	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	267607635	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	168300739	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	173206592	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	293367448	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	553747363	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	272875838	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	284665639	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	272830456	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	168301446	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	558697990	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	272875132	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	156931568	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	272970747	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	264707643	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	578332611	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	116904684	Thalamus	Polymodal association cortex related

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
MD	524266253	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	268399145	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	168002780	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	278400363	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	168004394	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	183058837	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	183329222	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	286485585	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	301324895	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	267494468	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	300889379	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	301060890	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	609475139	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	293365328	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	286646170	Thalamus	Polymodal association cortex related
MD	298001595	Thalamus	Polymodal association cortex related
SMT	268163228	Thalamus	Polymodal association cortex related
SMT	147787606	Thalamus	Polymodal association cortex related
SMT	273025166	Thalamus	Polymodal association cortex related
PR	496965687	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	278510903	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	183225830	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	313324664	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	298050269	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	127255962	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	301209502	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	184158996	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	263106751	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	120875111	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	272874417	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	184157585	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	204908781	Thalamus	Polymodal association cortex related
PVT	299448592	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	159432479	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	159331462	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	123662982	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	305449231	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	176897793	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	305125123	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	167373923	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	266839077	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	545428296	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	171067319	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	180568155	Thalamus	Polymodal association cortex related
PT	126843200	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	174957972	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	175019536	Thalamus	Polymodal association cortex related

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
RE	175374982	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	204832205	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	538833505	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	265286700	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	278500868	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	310976160	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	184158290	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	265947058	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	607316031	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	170784358	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	496964969	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	607289053	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	528732005	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	294040662	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	113504763	Thalamus	Polymodal association cortex related
RE	167025578	Thalamus	Polymodal association cortex related
CM	301538025	Thalamus	Polymodal association cortex related
CM	158841171	Thalamus	Polymodal association cortex related
CM	303710632	Thalamus	Polymodal association cortex related
CM	147135107	Thalamus	Polymodal association cortex related
CM	183057424	Thalamus	Polymodal association cortex related
CM	182888003	Thalamus	Polymodal association cortex related
PCN	183071513	Thalamus	Polymodal association cortex related
PF	267959197	Thalamus	Polymodal association cortex related
PF	263785543	Thalamus	Polymodal association cortex related
PF	299732738	Thalamus	Polymodal association cortex related
PF	300642574	Thalamus	Polymodal association cortex related
PF	272968624	Thalamus	Polymodal association cortex related
PF	266693274	Thalamus	Polymodal association cortex related
PF	309580808	Thalamus	Polymodal association cortex related
PIL	127396051	Thalamus	Polymodal association cortex related
PIL	586054741	Thalamus	Polymodal association cortex related
PIL	287880821	Thalamus	Polymodal association cortex related
PIL	301063301	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	127090378	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	117316260	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	299894738	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	127468854	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	171065200	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	287446625	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	552973699	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	127085005	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	292960052	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	156252954	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	171064488	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	301421253	Thalamus	Polymodal association cortex related
RT	554651619	Thalamus	Polymodal association cortex related

Experiments revised

Nuclei	Experiment nº	Structure	Region/Part/Area
RT	156254369	Thalamus	Polymodal association cortex related
LGv	267538006	Thalamus	Polymodal association cortex related
LGv	147212977	Thalamus	Polymodal association cortex related
LGv	299623794	Thalamus	Polymodal association cortex related
LGv	525796603	Thalamus	Polymodal association cortex related
LGv	157765542	Thalamus	Polymodal association cortex related
LGv	278398949	Thalamus	Polymodal association cortex related
LGv	301991713	Thalamus	Polymodal association cortex related
MH	300236056	Thalamus	Polymodal association cortex related
MH	300843826	Thalamus	Polymodal association cortex related
MH	268321927	Thalamus	Polymodal association cortex related
MH	265287564	Thalamus	Polymodal association cortex related
LH	292623457	Thalamus	Polymodal association cortex related
LH	147353537	Thalamus	Polymodal association cortex related
LH	301057735	Thalamus	Polymodal association cortex related
LH	551351756	Thalamus	Polymodal association cortex related
LH	510125001	Thalamus	Polymodal association cortex related
LH	510124187	Thalamus	Polymodal association cortex related
Total		Thalamus	268

Experiments reviewed	
Pallidum	67
Septal	30
Striatum	131
Hypothalamus	258
Thalamus	268
Total	754

Anexo 2 A

Distribución de *Sarcolipina* en el cerebro de ratón adulto y en desarrollo.

Sarcolipin distribution in developing and adult mouse brain

Iris Juárez-Leal¹, Abraham Andreu-Cervera¹, Francisca Almagro-García¹, Salvador Martínez¹, Diego Echevarría¹, Eduardo Puelles¹

¹Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain.

**El Anexo 2 A es un artículo que se encuentra en fase de revisión, forma parte de los resultados de la tesis doctoral y da respuesta a los objetivos planteados previamente.*

Abstract

Sarcolipin (*Sln*) is a small calcium channel that can be found in the mitochondrial membrane and is implicated in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase channel. Its role is to inhibit the Ca²⁺ uptake by this pump activity from the cytoplasm into the sarcoplasmic reticulum. *Sln* plays an important role in muscle thermogenesis and whole-body energy metabolism but its presence and function in the brain has not yet been demonstrated. Our aim is to confirm the *Sln* presence in the mouse central nervous system and to describe its expression pattern in the pre and postnatal developing brain using a *Sln*^{cre/cre}; *tdTomato*^{flax/+} reporter line. We confirmed the *Sln* expression in the murine brain detecting the *Sln* mRNA in postnatal muscular and cerebral samples. The *Sln* expression in the reporter line was first detected at E16.5 in the prenatal development and was extended to all brain regions with a specific pattern. Given the broad localization pattern of *Sln* -positive cells, it is feasible to think that it fulfills a basic function in Ca⁺ trafficking, rather than a specific function of a single circuit. It would be interesting to deep our knowledge in the possible roles of *Sln* in neuronal function including behavioral studies.

Keywords: *Sarcolipin*; SERCA; Brain;

Introduction

Sarcolipin (*Sln*) is a small protein originally associated with the endo/sarcoplasmic reticulum (Wawrzynow et al., 1992). It was originally described that its function is to modulate the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase channels (SERCA1 and 2) (Odermatt et al., 1997, 1998; Gamu et al., 2014; Desmond et al., 2017; Britzolaki et al., 2018a). *Sln* together with Phospholamdan, another SERCA regulator, interacts with the regulatory element of this Ca^{2+} pump (MacLennan 2003, n.d.; Hellstern et al., 2001; Gorski et al., 2017; Liu et al., 2022a). The *Sln* role is to inhibit the Ca^{2+} uptake by SERCA from the cytoplasm into the sarcoplasmic reticulum (Odermatt et al., 1998). This inhibition impairs the muscular contraction (Tupling et al., 2002) and plays a role in skeletal muscle no shivering thermogenesis (Bombardier et al., 2013; Bal et al., 2016, 2017, 2018, 2021; Bal and Periasamy, 2020). Therefore, it plays an important role in muscle thermogenesis and whole-body energy metabolism (Gamu et al., 2014, 2015). *Sln* is specifically expressed not only in the muscles but in the cardiac atrial chambers (Minamisawa et al., 2003). Originally it was described as not expressed in the adult human brain (Odermatt et al., 1997) but data obtained from RNAseq experiments in mice have demonstrated its presence (Vied et al., 2016; Papatheodorou et al., 2020). While SERCA1 is mainly located in muscular cells, SERCA2 (*Atp2a2*) and SERCA3 (*Atp2a3*), other highly similar members of this genetic family, are expressed in the brain. The interaction of *Sln* with SERCA2 has been also demonstrated (Tupling et al., 2002; MacLennan et al., 2003.).

Ca^{2+} participates in vital neuronal functions as signal transmission, synapsis activity, neuronal migration, etc. It is introduced in the neuron by voltage dependent ion channels and mobilized from the intracellular reservoirs by intracellular channels as the SERCA family (Brini et al., 2014; Cali et al., 2014; Rathod et al., 2021). This Ca^{2+} movement increases its cytosolic level where it is controlled by the mitochondria and the Ca^{2+} binding proteins. Therefore, the endoplasmic reticulum plays a vital role in the intracellular Ca^{2+} homeostasis (Karagas and Venkatachalam, 2019) as does its Ca^{2+} pumps and regulators. Alterations in this homeostasis results in impaired neuronal plasticity, synaptic dysfunction and neuronal death and it has been related to several

neurodegenerative diseases and mental diseases (Gleichmann and Mattson, n.d.; Zü and Reiser, n.d.; Brini et al., 2014; Cali et al., 2014; Britzolaki et al., 2018b; Karagas and Venkatachalam, 2019; Boczek et al., 2021).

Our aim is first to confirm the *Sln* presence in the mouse central nervous system and second to describe its expression pattern in the pre and postnatal developing brain. For that purpose, we have used a mouse line that drives the expression of the cre endonuclease by the promotor of *Sln* crossed with the tdTomato reporter line.

Materials and Methods

Mouse strains

All mouse manipulation and experimental procedures were performed according to the directives of the Spanish and European Union governments, and the protocols were approved by the Universidad Miguel Hernández OIR Committee (2016/VSC/PEA/00190). The three mouse lines used is already described: *Sln^{cre/+}* strain (Nakano et al., 2011) *R26R-CAG-TdTomato* strain, from Jackson laboratories (strain 007905) and *Gad67^{sgfp/+}* strain (Tamamaki et al., 2003). The mouse embryos and postnatal animals examined were of two types: *Sln^{cre/+}; tdTomate^{fllox/+}* and *Sln^{cre/+}; tdTomate^{fllox/+}; Gad67^{sgfp/+}*. Mice were sacrificed by decapitation or cervical dislocation depending on the age of the animal (postnatal or adult mice). Then, the brains were dissected and fixed in 4% PFA overnight at 4°C. All postnatal animals used were sacrificed at P0 to P14. Animals from P0 to P4 were sacrificed by decapitation. From the P4 stage onwards they were perfused. The embryos (E12.5 to E18.5) used were obtained by laparotomy from pregnant females. The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0.5 (E0.5).

Sarcolipin mRNA detection

We extracted and mash/shred one heart, one liver and two embryo mice brains at E18.5 in 1ml of Ribozol. Then, we add for each sample 200µl of Cloroform and shake it up (12.000 gx for 15 seconds at 4°C), 500µl of Isopropanol and shake it up again (12.000 gx for 15 seconds at 4°C), and finally, we wash with Etanol 70° and add Sigma water to measure the sample with NanoDrop. For cDNA synthesis, we used High-Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit with the program cDNAKIT during 2 hours (water 3,7 μ l; Buffer 2 μ l; dNTRS 0,8 μ l; Primers 2 μ l; retrotranscriptase enzyme 1 μ l; RNAsa inhibitor 0,5 μ l; sample RNA 10 μ l). The genotyping PCR protocol was realized as previously described (Shimura et al., 2016).

Immunohistochemistry

Samples were agarose-embedded and sectioned at 100 μ m by vibratome. For Immunohistochemistry (IHC), it was performed as previously described (Murcia-Ramón). The primary antibodies used were: α RFP (1:200; ab6234/Abcam), α GFP (1:500; A-11120/Molecular Probes), α VGlut2 (1:1000; AB5907/Chemicon), α NF (1:1000; AB7794/ Abcam).

Imaging experiments

The gene expression image from figure 1 was downloaded from Allen Institute for Brain Science. [<https://mouse.brain-map.org/>], Mouse Brain (ISH Data). For DAB expression studies, bright field images were obtained from a Leica DM6000B microscope. For co-localization studies, images were processed from a Leica SPEII vertical confocal microscope (DFC500). Adobe Photoshop (version 20.0.7) was used for the photo editing program and Adobe Illustrator (version 26.2.1) was used to generate the figures.

Results

First of all, taking the advantage of the Allen Brain databases, we confirmed the *Sln* expression in the murine brain. In a sagittal section of an adult mouse brain (Fig. 1A), the *Sln* expression was detected in different brain regions. Positive cells were located in the isocortex, hippocampus, olfactory bulb, septal region, cerebellum and scattered cells in the hypothalamus, thalamus, midbrain and hindbrain. Surprisingly, the triangular nucleus of the septum displayed strongly labelled cells (arrow in Fig. 1A). In order to confirm the presence of *Sln* mRNA in the cerebral tissue, we collected hepatic, muscular and cerebral tissue and extracted the complete RNA and transformed it into cDNA. In

these extracts, we developed a PCR with *Sln* specific primers and detected the *Sln* mRNA in the muscular and cerebral samples (Fig. 1B).

Figure 1

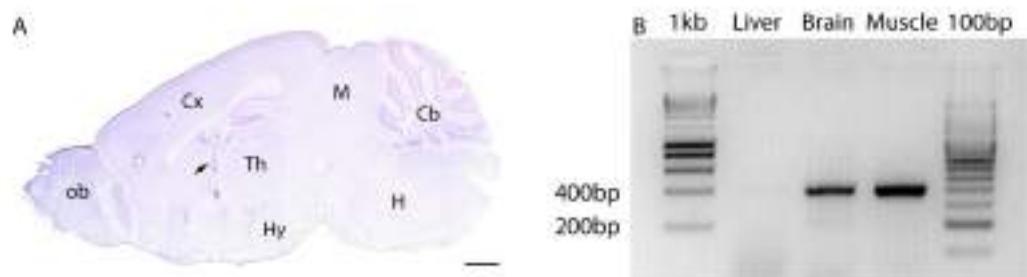


Figure 1: Sarcosine mRNA detection. (A) Sagittal section of adult mouse brain displaying *Sln* gene expression by in situ hybridization (Experiment n°: 68545596). Positive cells were located in the isocortex, hippocampus, olfactory bulb, septal region, cerebellum and scattered cells in the hypothalamus, thalamus, midbrain and hindbrain. *Sln* is specifically highly expressed in the triangular nucleus of septum (arrow). (B) *Sln* mRNA detection in hepatic, muscular and cerebral samples. Abbreviations: Cb: cerebellum; Cx: cortex; H: hindbrain; Hp: hypothalamus; Mb: Midbrain; Ob: olfactory bulb; Th: thalamus. Scale bar: 1000 μ m. Image credit: Allen Institute for Brain Science. [<https://mouse.brain-map.org/>]

Once, the *Sln* expression in the brain was proved, we decided to study its localization along pre and postnatal development. This objective was accomplished by the use of a *Sln* cre induced endonuclease transgenic mouse line crossed with a tomato reporter line.

In the forebrain prenatal development, *Sln* was first detected at E16.5 stage in the mantle layer of the cortex, as well as in the hippocampus and in the anterior olfactory bulb area (Fig. 2A). At E18.5, *Sln* positive neurons are located in all the cortical mantle layer. The expression in hippocampus and anterior olfactory area is increased and the Tomato protein presence is extended along the axons, being the fornix and the anterior commissure positive (Fig. 2B). In postnatal stages, the *Sln* expression was further expanded. At P0-P3, the cortical mantle layer is fully occupied by positive neurons, many of them displayed a pyramidal shape and their positive axons are detected in the

corticospinal tract and in the corticothalamic fibers (Fig. 2C, E, F). The positive neurons displayed a compacted distribution in the retrosplenial cortex and were spared in the rest of the cortical area (Fig. 2C, D, E) being more numerous in the deep layers. The hippocampus is strongly positive (Fig. 2C, D, E, F) as well as the olfactory bulb and the olfactory anterior area (Fig. 2C). The fornix and the anterior branch of the anterior commissure are strongly positive (arrows in Fig. 2C) as well as the corpus callosum and the hippocampal commissure (Fig. 2D).

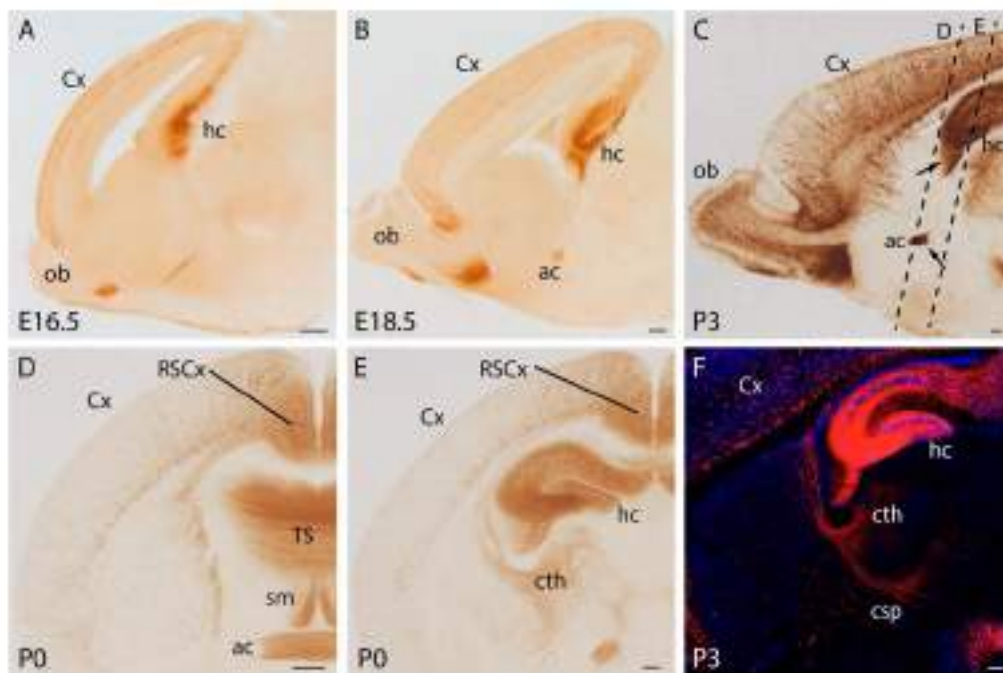


Figure 2: Sarcophilin expression in forebrain development. (A, B) Sagittal sections of E16.5 and E18.5 embryonic mouse $Sln^{cre/+}; tdTomate^{flox/+}$ brains stained by immunohistochemistry against RFP. The RFP protein was located in the cortical mantle layer, hippocampus, and anterior olfactory bulb area. (C, F) Sagittal sections of postnatal (P3) mouse $Sln^{cre/+}; tdTomate^{flox/+}$ brains stained by immunohistochemistry and immunofluorescence against RFP. The RFP was located also in the corticospinal tract and the corticothalamic fibers. (D, E) Postnatal (P0) mouse $Sln^{cre/+}; tdTomate^{flox/+}$ brain coronal sections (section plane indicated in C by dashed lines), displaying the RFP positive fibers distribution of the cortical area. Abbreviations: ac: anterior commissure; csp: corticospinal tract; cth: corticothalamic tract;

Cx: cortex; hc: hippocampus; Ob: olfactory bulb; RSCx: retrosplenial cortex. Scale bar: 200 μ m.

Once we described the *Sln* distribution in the cortex, we aimed to unveil the nature of the positive neurons. In order to identify the interneurons, we crossed our transgenic line with a *Gad67^{sfp/+}* line, where all the *Gad67* interneurons express GFP. The presence of excitatory neurons was performed by immunofluorescence against *VGluT2* protein. In the retrosplenial cortex, the massive presence of *Sln* neurons suggested an expected variety in their nature. We found scattered *Sln* positive neurons with a GABAergic phenotype (Fig. 3A, B) as well as *Sln* positive neurons with a glutamatergic phenotype (Fig. 3C, D). This mixed phenotype was also observed in the neocortex (Fig. 3E, F) and in the Hippocampus (Fig. 3G, H). The presence of *Sln* positive pyramidal neurons was expected as we had observed the corticospinal tract and the corticothalamic fibers positive for *Sln* as it was described above.

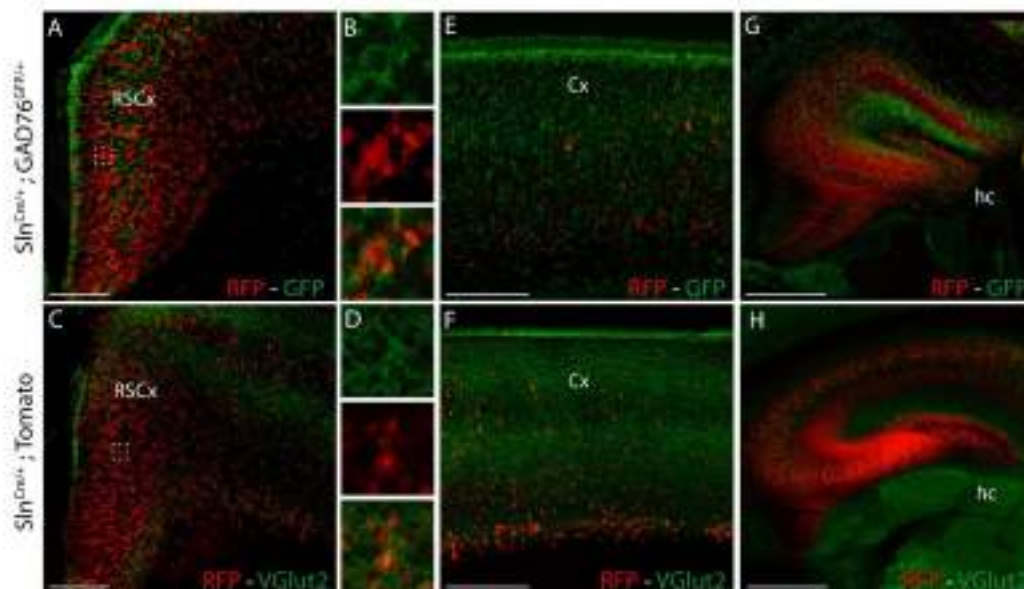


Figure 3: Characterization of *Sln* positive neurons. (A-H) Coronal sections of postnatal (P3) mouse *Sln^{cre/+}; tdTomato^{flax/+}; Gad67^{GFP/+}* brain stained by GFP (A, B, E, G), to identify

inhibitory neurons, and VGlut2 (C, D, F, H), to identify excitatory neurons, immunofluorescence in cerebral cortex (A-F) and hippocampus (G-H). Dashed square indicates magnificated area in B and D. Abbreviations: Cx: cortex; hc: hippocampus; RSCx: retrosplenial cortex. Scale bar: 200 μ m.

In the diencephalon, we observed a strong staining of prethalamic, thalamic and epithalamic territories due to the innervation of these areas by *Sln* positive neurons (Fig. 4A-B). In the epithalamus, the medial Habenula presents a dense positive innervation by the stria medullaris while the lateral Habenula is negative (Fig. 4A). In the thalamus, most of its nuclei presented a strong *Sln* innervation, only the ventral posteromedial nucleus and dorsolateral geniculate nucleus were devoid of this innervation (Fig. 4A, B). The paraventricular nucleus, central nucleus and the territory surrounding the mammillothalamic fibers displayed *Sln* positive neurons (Fig. 4A'). The pretectal territory displayed a broad *Sln* innervation (Fig. 4A, B) with some nuclei as the anterior pretectal nucleus strongly labelled (Fig. 4B, B'). In the pretectal and hypothalamic territories we detected sparse some positive neurons (Fig. 4B). In the midbrain, we observed dense groups of *Sln* positive neurons in the three gray layers (superficial, intermediate and deep) of the superior colliculus (Fig. 4C), the periaqueductal gray and the reticular formation also displayed scattered positive neurons (Fig. 4C). The Substantia nigra pars reticulata contained a major number of positive neurons while the Substantia nigra pars compacta was almost free of them (Fig. 4C). Close to the mesencephalic tegmental midline, neurons integrated in the Interstitial column, as the Interstitial nucleus of Cajal, were also positive (arrow in Fig. 4C, C').

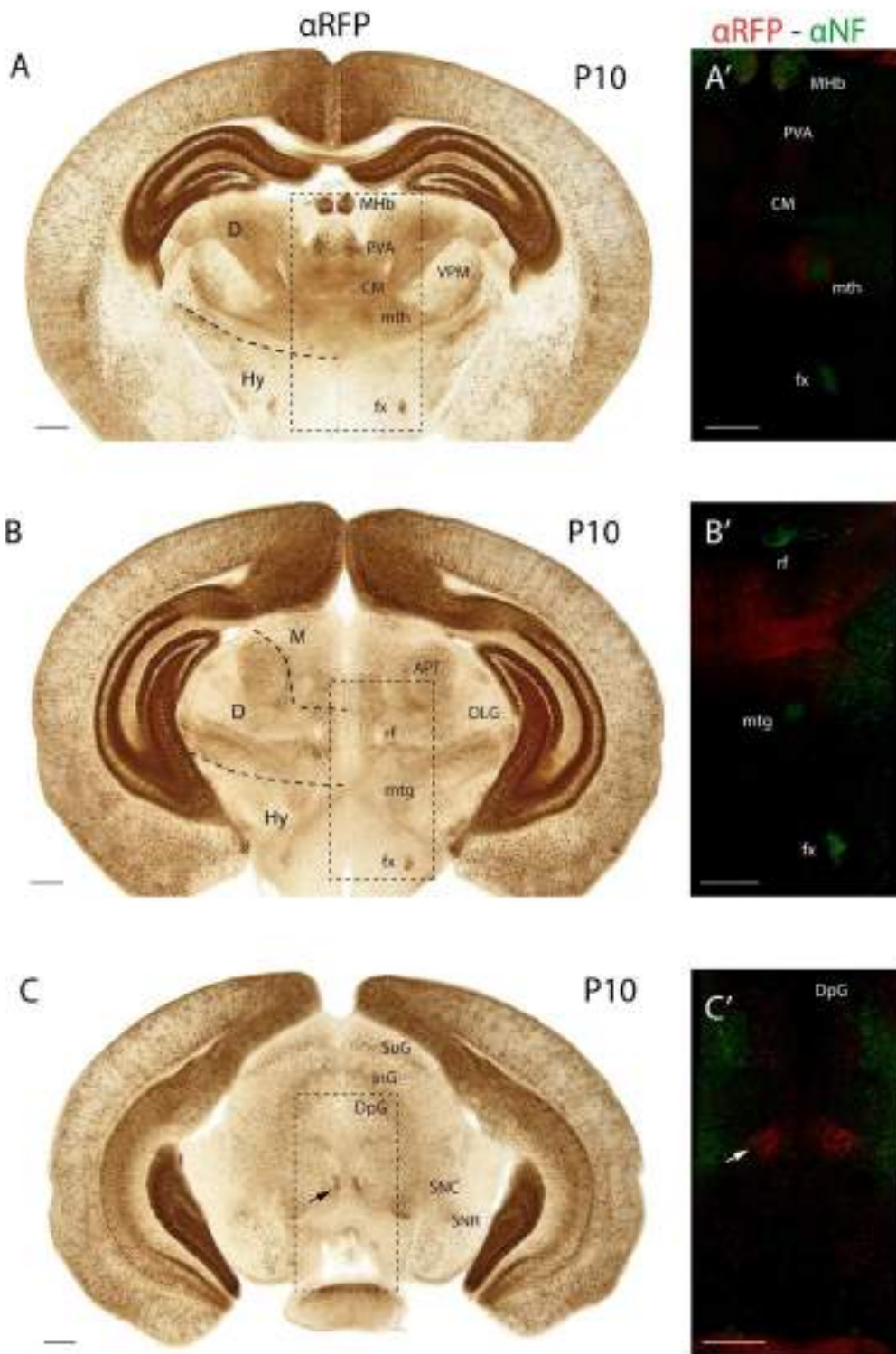


Figure 4: Sarcolipin expression in diencephalic development. (A-C'). Coronal sections of postnatal (P3) mouse *Sln*^{cre/+}; *tdTomate*^{fllox/+} brain stained by RFP immunocytochemistry (A-C) and RFP plus Neurofilament (Nf) double immunofluorescence (A'-C'). RFP protein was located in prethalamic, thalamic and epithalamic territories due to the innervation of these areas by *Sln* positive neurons. Dashed square indicates magnificated area in A'-C'. Abbreviations: APT: anterior pretecal nucleus; CM: centromedian nucleus; D: diencephalon; DLG: dorsal lateral geniculate nucleus; DpG: deep gray layer of superior colliculus; fx: fornix; Hy: hypothalamus; InG: intermediate layer of superior colliculus; M: midbrain; MHb: medial habenula; mth; mammillothalamic tract; mtg: mammillotegmental tract; PVA: anterior paraventricular nucleus of thalamus; SNC: substantia nigra pars compacta; SNR: substantia nigra pars reticulata; SuG: superficial gray layer of superior colliculus; VPM: ventral posteromedial nucleus. Scale bar: 500µm.

In the hindbrain, we found positive neurons distributed in all the territory. In the cerebellum, the *Sln* positive neurons presented a specific pattern that was observed postnatally. At P0, we found just a couple of positive neurons (Fig. 5A). At P3, this number was increased, and positive neurons were observed in the granular layer concentrated in the VI, VII, IX and X lobules (Fig. 5B). This specific pattern was maintained at P7 but included scattered positive Purkinje neurons (Fig. 5C). At P14, the pattern described was confirmed with the positive granular neurons concentrated in four specific lobules and scattered positive Purkinje neurons presented in all the lobules (Fig. 5D).

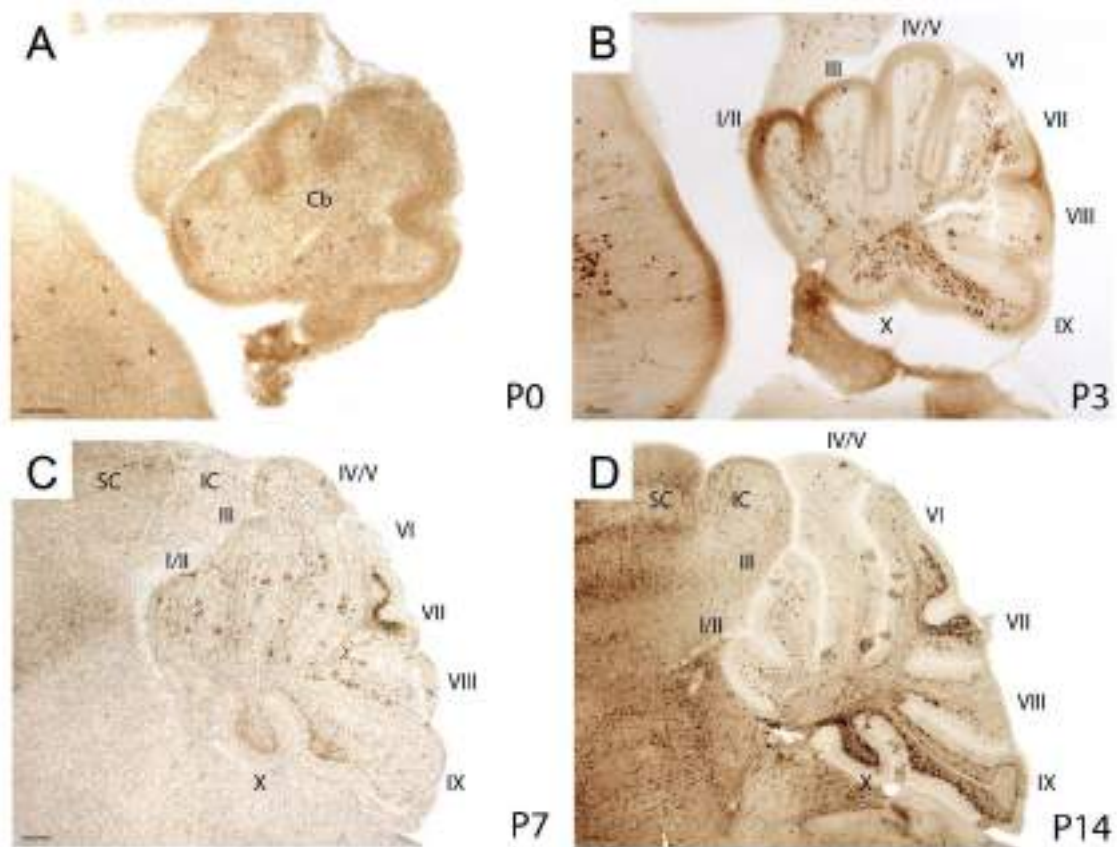


Figure 5: Sarcophilin expression in hindbrain development. (A-D) Sagittal sections of postnatal (P0-P14) mouse *Sln^{cre/+}; tdTomate^{flax/+}* brain displayed by RFP immunocytochemistry the specific pattern of *Sln* distribution in the cerebellum. Abbreviations: Cb: cerebellum; IC: inferior colliculus; SC: superior colliculus; I-X: cerebellar vermis lobules 1 to 10. Scale bar: 200 μ m.

Finally, we pointed out the *Sln* positive tracts, the anterior branch of the anterior commissure originated in the olfactory bulb is strongly positive while the posterior branch is negative (Fig. 6A). The fornix generated in the hippocampus is also positive (Fig. 6A). In the diencephalon, we located the medial longitudinal fascicle originated from the interstitial column (Fig. 6B). The corticospinal tract coming from the primary motor cortex was nicely observed (Fig. 6C), including its decussation at the end of the hindbrain (arrow in Fig. 6C).

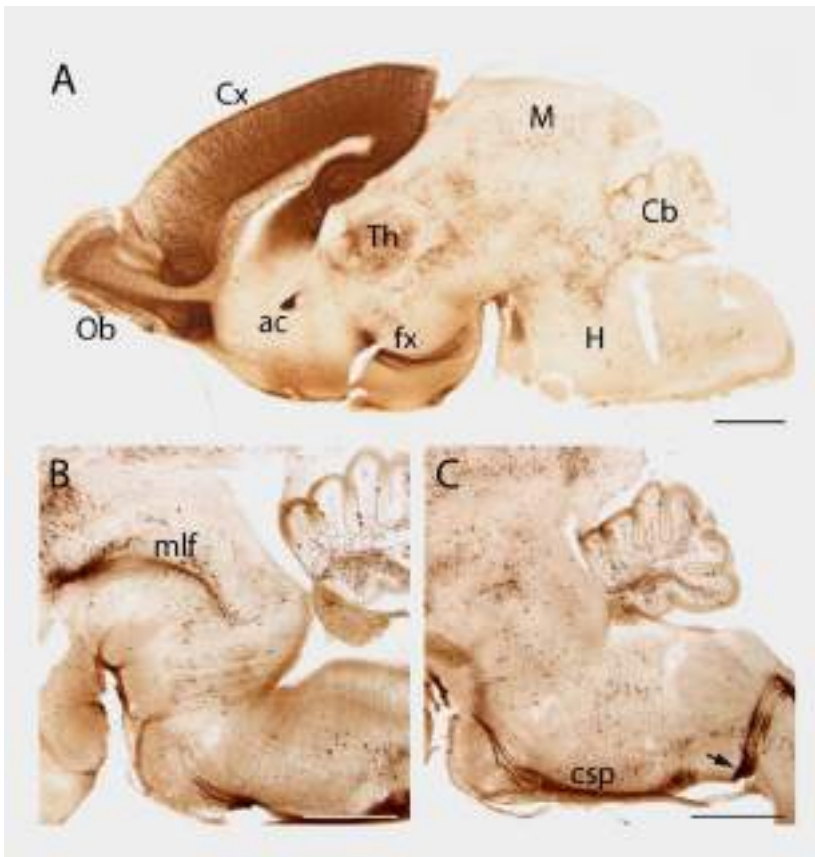


Figure 6: *Sln* positive tracts. (A-C) Sagittal sections of postnatal (P3) mouse *Sln*^{cre/+}; *tdTomate*^{flox/+} brain stained by RFP immunochemistry. The anterior branch of the anterior commissure, the fornix, the medial longitudinal fascicle in the diencephalon and the corticospinal tract are strongly RFP positive. Abbreviations: ac: anterior commissure; Cb: cerebellum; csp: corticospinal tract; Cx: cortex; fx: fornix; H: hindbrain; M: midbrain; mlf: medial longitudinal fascicle tract; Ob: olfactory bulb; Th: thalamus. Scale bar: 1000 μ m.

Discussion

Sln is a small calcium channel that can be found in the mitochondrial membrane and is implicated in ATPase SERCA pump activity, not only as a pump that regulates cytosolic calcium (Ca^{2+}) levels in all tissues, but as a mean to modulate energy metabolism in muscles (Bal and Periasamy, 2020). This protein was not expected to be expressed in other than muscle tissues as previously described (Wawrzynow et al., 1992; Odermatt et al.,

1997; Desmond et al., 2017; Bal and Periasamy, 2020; Valentim et al., 2022) but we have demonstrated its presence in the brain.

Ca^{2+} plays a pivotal role as an intracellular signaler. Its intracellular trafficking is involved in various cellular functions such as releasing neurotransmitters from neurons, contraction of muscle cells, fertilization, and cell differentiation and morphogenesis during development (Alhajeri et al., 2022).

In central nervous system embryonic development, Ca^{2+} plays a role during neuronal synaptic refinement. The presence of Ca^{2+} waves in the developing brain is necessary to stabilize and refine the synaptic contacts between the young neurons (Rosenberg and Spitzer, 2011; Alhajeri et al., 2022). In adult brain, on top on its role as an intracellular signal, Ca^{2+} plays a role in the activation of anti-apoptotic signals, although when its mitochondrial concentration is elevated, it in turn produces apoptosis, which is related to neurodegenerative diseases such as Parkinson's or Alzheimer's disease (Sánchez 2010, n.d.; Brini et al., 2014; Cali et al., 2014; Hallaçli et al., 2022). It is feasible to think that all the proteins related to Ca^{2+} trafficking must be needed to regulate its multiple function. Among these proteins, we have identified *Sln* as one of the components that may be needed for this control in the nervous system.

Phospholamban (PLN) and *Sln* are homologous membrane proteins that regulates the activity of the calcium pump SERCA. Several studies have described the role of these proteins with SERCA isoforms 1 and 2 (Hellstern et al., 2001; Gorski et al., 2017), while a later review further specify that *PLN* increase the maximal activity of the pump, whereas *Sln* decrease the maximal activity of SERCA mediated calcium transport in the heart (Barbot et al., 2021; Liu et al., 2022b). Parallely, one of the proteins associated with PMCA membrane pumps is *Calmodulin (CaM)* (Boczek et al., 2021) and its the role in the brain is extensively studied. *CaM* is a binding protein that plays a crucial role in the regulation of the synaptic activity of proteins and in the maintenance of neuronal plasticity. Therefore, any changes in activity of these proteins might be linked to the development and progression of neurodegenerative disorders and mental diseases (Boczek et al., 2021; Bohush et al., 2021). In the Allen Brain database [<https://mouse.brain-map.org/>], we can

find that *CaM* expression in the developing brain is increasing from E16.5, coinciding with expression pattern of *Sln*, and that expression stabilizes in postnatal stages (specifically P14). Unfortunately, there are no information in this database about the developmental expression of *Sln* or *PLN*. Unlike *Sln*, *PLN* in the adult brain does not have a remarkable expression pattern, since there is hardly any expression in the ISH found in the Allen Brain database [<https://mouse.brain-map.org/>].

The multiple roles played by this ion in mediating signals can be primarily explained by its spatiotemporal dynamics that are kept tightly checked by mechanisms that control its entry through plasma membrane and its storage on intracellular stores. (Alhajeri et al., 2022). Given the broad localization pattern of *Sln*-positive cells, it is feasible to think that it fulfills a basic function in Ca^{2+} metabolism, rather than a very specific function of a single circuit.

The *Sln* lack or gain of function studies were concentrated in the lack of maintenance of the metabolic homeostasis in skeletal muscle and is related with metabolic disorders (Butler et al., 2015; Fajardo et al., 2016; Bal and Periasamy, 2020; Mengeste et al., 2022). It has been shown that SERCA2 dependent Ca^{2+} dysregulation has been implicated in several disorders that affect cognitive function, including Darier's disease, schizophrenia, cerebral ischemia (Britzolaki et al., 2018b) and neurodegenerative diseases as previously described (Sánchez 2010, n.d.; Brini et al., 2014; Cali et al., 2014; Hallaçli et al., 2022). Therefore, it would be important to study possible neural alterations in the lack or gain of function mouse models including behavioral studies to elucidate the *Sln* role in the brain.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Conceived and designed the experiments: Iris Juárez-Leal, Salvador Martinez, Diego Echevarría and Eduardo Puelles; Performed the experiments: Iris Juárez-Leal, Abraham Andreu-Cervera and Francisca Almagro-García; Analyzed the data: Iris Juárez-Leal, Abraham Andreu-Cervera, Diego Echevarría and Eduardo Puelles; Wrote the article: Iris Juárez-Leal and Eduardo Puelles; Obtained funding: Salvador Martinez, Eduardo Puelles and Diego Echevarría.

Funding

Work supported by MINECO/AEI/FEDER (BFU2013-48230) to E. Puelles and D. Echevarría; MINECO/AEI/FEDER (SAF2017-83702-R; PID2020-118171RB-I00), GVA (PROMETEO CIPROM/2021/018), ISCIII (RD21/0017/0017), co-funded by ERDF/ESF, “Investing in your future” to S. Martinez. The Institute of Neurosciences is a “Centre of Excellence Severo Ochoa (SEV-2017-0723)”.

Acknowledgments

We thank Pablo Ferao Egea for photography and figure design advice.

References

- Alhajeri, M. M., Alkhanjari, R. R., Hodeify, R., Khraibi, A., and Hamdan, H. (2022). Neurotransmitters, neuropeptides and calcium in oocyte maturation and early development. *Front Cell Dev Biol* 10. doi: 10.3389/fcell.2022.980219.
- Bal, N. C., Gupta, S. C., Pant, M., Sopariwala, D. H., Gonzalez-Escobedo, G., Turner, J., et al. (2021). Is Upregulation of Sarcolipin Beneficial or Detrimental to Muscle Function? *Front Physiol* 12. doi: 10.3389/fphys.2021.633058.
- Bal, N. C., Maurya, S. K., Singh, S., Wehrens, X. H. T., and Periasamy, M. (2016). Increased Reliance on Muscle-based Thermogenesis upon Acute Minimization of Brown Adipose Tissue Function. *Journal of Biological Chemistry* 291, 17247–17257. doi: 10.1074/jbc.M116.728188.
- Bal, N. C., and Periasamy, M. (2020). Uncoupling of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase pump activity by sarcolipin as the basis for muscle non-shivering thermogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375. doi: 10.1098/rstb.2019.0135.
- Bal, N. C., Sahoo, S. K., Maurya, S. K., and Periasamy, M. (2018). The Role of Sarcolipin in Muscle Non-shivering Thermogenesis. *Front Physiol* 9. doi: 10.3389/fphys.2018.01217.
- Bal, N. C., Singh, S., Reis, F. C. G., Maurya, S. K., Pani, S., Rowland, L. A., et al. (2017). Both brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis processes are activated during mild to severe cold adaptation in mice. *Journal of Biological Chemistry* 292, 16616–16625. doi: 10.1074/jbc.M117.790451.
- Barbot, T., Beswick, V., Montigny, C., Quiniou, É., Jamin, N., and Mouawad, L. (2021). Deciphering the Mechanism of Inhibition of SERCA1a by Sarcolipin Using Molecular Simulations. *Front Mol Biosci* 7. doi: 10.3389/fmolb.2020.606254.
- Boczek, T., Sobolczyk, M., Mackiewicz, J., Lisek, M., Ferenc, B., Guo, F., et al. (2021). Crosstalk among calcium atpases: Pmca, serca and spca in mental diseases. *Int J Mol Sci* 22, 1–23. doi: 10.3390/ijms22062785.
- Bohush, A., Leśniak, W., Weis, S., and Filipek, A. (2021). Calmodulin and its binding proteins in parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 22, 1–14. doi: 10.3390/ijms22063016.

Bombardier, E., Smith, I. C., Gamu, D., Fajardo, V. A., Vigna, C., Sayer, R. A., et al. (2013). Sarcolipin trumps β -adrenergic receptor signaling as the favored mechanism for muscle-based diet-induced thermogenesis. *FASEB Journal* 27, 3871–3878. doi: 10.1096/fj.13-230631.

Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 2787–2814. doi: 10.1007/s00018-013-1550-7.

Britzolaki, A., Saurine, J., Flaherty, E., Thelen, C., and Pitychoutis, P. M. (2018). The SERCA2: A Gatekeeper of Neuronal Calcium Homeostasis in the Brain. *Cell Molecular Neurobiology* 38, 981–994. doi: 10.1007/s10571-018-0583-8.

Butler, J., Smyth, N., Broadbridge, R., Council, C. E., Lee, A. G., Stocker, C. J., et al. (2015). The effects of sarcolipin over-expression in mouse skeletal muscle on metabolic activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 569, 26–31. doi: 10.1016/j.abb.2015.01.027.

Calì, T., Ottolini, D., and Brini, M. (2014). Calcium signaling in Parkinson's disease. *Cell Tissue Research* 357, 439–454. doi: 10.1007/s00441-014-1866-0.

Desmond, P. F., Labuza, A., Muriel, J., Markwardt, M. L., Mancini, A. E., Rizzo, M. A., et al. (2017). Interactions between small ankyrin 1 and sarcolipin coordinately regulate activity of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1). *Journal of Biological Chemistry* 292, 10961–10972. doi: 10.1074/jbc.M117.783613.

Fajardo, V. A., Smith, I. C., Bombardier, E., Chambers, P. J., Quadrilatero, J., and Tupling, A. R. (2016). Diaphragm assessment in mice overexpressing phospholamban in slow-twitch type I muscle fibers. *Brain Behavior* 6. doi: 10.1002/brb3.470.

Gamu, D., Bombardier, E., Smith, I. C., Fajardo, V. A., Russell Tupling, A., Bombardier, E., et al. (2014). Sarcolipin Provides a Novel Muscle-Based Mechanism for Adaptive Thermogenesis. Available at: www.acsm-essr.org.

Gamu, D., Trinh, A., Bombardier, E., and Tupling, A. R. (2015). Persistence of diet-induced obesity despite access to voluntary activity in mice lacking sarcolipin. *Physiological Reports* 3. doi: 10.14814/phy2.12549.

Gleichmann, M., and Mattson, M. P. (n.d.). Neuronal Calcium Homeostasis and Dysregulation.

Gorski, P. A., Ceholski, D. K., and Young, H. S. (2017). “Structure-function relationship of the serca pump and its regulation by phospholamban and sarcolipin,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Springer New York LLC), 77–119. doi: 10.1007/978-3-319-55858-5_5.

Hallacli, E., Kayatekin, C., Nazeen, S., Wang, X. H., Sheinkopf, Z., Sathyakumar, S., et al. (2022). The Parkinson’s disease protein alpha-synuclein is a modulator of processing bodies and mRNA stability. *Cell* 185, 2035-2056.e33. doi: 10.1016/j.cell.2022.05.008.

Hellstern, S., Pegoraro, S., Karim, C. B., Lustig, A., Thomas, D. D., Moroder, L., et al. (2001). Sarcolipin, the Shorter Homologue of Phospholamban, Forms Oligomeric Structures in Detergent Micelles and in Liposomes. *Journal of Biological Chemistry* 276, 30845–30852. doi: 10.1074/jbc.M102495200.

Karagas, N. E., and Venkatachalam, K. (2019). Roles for the endoplasmic reticulum in regulation of neuronal calcium homeostasis. *Cells* 8. doi: 10.3390/cells8101232.

Liu, A. Y., Aguayo-Ortiz, R., Guerrero-Serna, G., Wang, N., Blin, M. G., Goldstein, D. R., et al. (2022a). Homologous cardiac calcium pump regulators phospholamban and sarcolipin adopt distinct oligomeric states in the membrane. *Comput Struct Biotechnol J* 20, 380–384. doi: 10.1016/j.csbj.2021.12.031.

Liu, A. Y., Aguayo-Ortiz, R., Guerrero-Serna, G., Wang, N., Blin, M. G., Goldstein, D. R., et al. (2022b). Homologous cardiac calcium pump regulators phospholamban and sarcolipin adopt distinct oligomeric states in the membrane. *Comput Struct Biotechnol J* 20, 380–384. doi: 10.1016/j.csbj.2021.12.031.

MacLennan DH, Asahi M, Tupling AR. (2003). The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;986:472-80. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07231.x. PMID: 12763867.

Mengeste, A. M., Katare, P., Dalmao Fernandez, A., Lund, J., Bakke, H. G., Baker, D., et al. (2022). Knockdown of sarcolipin (SLN) impairs substrate utilization in human skeletal muscle cells. *Mol Biol Rep* 49, 6005–6017. doi: 10.1007/s11033-022-07387-0.

- Minamisawa, S., Wang, Y., Chen, J., Ishikawa, Y., Chien, K. R., and Matsuoka, R. (2003). Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *Journal of Biological Chemistry* 278, 9570–9575. doi: 10.1074/jbc.M213132200.
- Nakano, H., Williams, E., Hoshijima, M., Sasaki, M., Minamisawa, S., Chien, K. R., et al. (2011). Cardiac origin of smooth muscle cells in the inflow tract. *J Mol Cell Cardiol* 50, 337–345. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.10.009.
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., et al. (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12360–12369. doi: 10.1074/jbc.273.20.12360.
- Odermatt, A., Taschner, P. E. M., Scherer, S. W., Beatty, B., Khanna, V. K., Cornblath, D. R., et al. (1997). Characterization of the Gene Encoding Human Sarcolipin (SLN), a Proteolipid Associated with SERCA1: Absence of Structural Mutations in Five Patients with Brody Disease measurement of any alteration in SERCA1 function. 541.
- Papatheodorou, I., Moreno, P., Manning, J., Fuentes, A. M. P., George, N., Fexova, S., et al. (2020). Expression Atlas update: From tissues to single cells. *Nucleic Acids Res* 48, D77–D83. doi: 10.1093/nar/gkz947.
- Rathod, N., Bak, J. J., Primeau, J. O., Fisher, M. E., Espinoza-fonseca, L. M., Lemieux, M. J., et al. (2021). Nothing regular about the regulins: Distinct functional properties of SERCA transmembrane peptide regulatory subunits. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/ijms22168891.
- Rosenberg, S. S., and Spitzer, N. C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, 1–13. doi: 10.1101/cshperspect.a004259.
- Sánchez JC, López-Zapata DF, Romero-Leguizamón CR. (2010). Mecanismos de transporte de calcio en neuroprotección y neurotoxicidad [Calcium transport mechanisms in neuroprotection and neurotoxicity]. *Rev Neurol*. 2010 Nov 16;51(10):624-32. Spanish. PMID: 21069641.

Shimura, D., Kusakari, Y., Sasano, T., Nakashima, Y., Nakai, G., Jiao, Q., et al. (2016). Heterozygous deletion of sarcolipin maintains normal cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310, 92–103. doi: 10.1152/ajpheart.00411.2015.-Sarcolipin.

Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J. I., Obata, K., and Kaneko, T. (2003). Green Fluorescent Protein Expression and Colocalization with Calretinin, Parvalbumin, and Somatostatin in the GAD67-GFP Knock-In Mouse. *Journal of Comparative Neurology* 467, 60–79. doi: 10.1002/cne.10905.

Tupling, A. R., Asahi, M., and MacLennan, D. H. (2002). Sarcolipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44740–44746. doi: 10.1074/jbc.M206171200.

Valentim, M. A., Brahmhatt, A. N., and Tupling, A. R. (2022). Skeletal and cardiac muscle calcium transport regulation in health and disease. *Biosci Rep* 42. doi: 10.1042/BSR20211997.

Vied, C., Ray, S., Badger, C. D., Bundy, J. L., Arbeitman, M. N., and Nowakowski, R. S. (2016). Transcriptomic analysis of the hippocampus from six inbred strains of mice suggests a basis for sex-specific susceptibility and severity of neurological disorders. *Journal of Comparative Neurology* 524, 2696–2710. doi: 10.1002/cne.23989.

Wawrzynow, A., Theibert, J. L., Murphy, C., Jona, I., Martonosi, A., and Collins, J. H. (1992). Sarcolipin, the “Proteolipid” of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum, Is a Unique, Amphipathic, 31-Residue Peptide.

Zündorf G, Reiser G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Apr 1;14(7):1275-88. doi: 10.1089/ars.2010.3359. Epub 2010 Oct 6. PMID: 20615073; PMCID: PMC3122891.

Anexo 2 B

Contribución de neuronas *Eomes* positivas pretalámicas a las proyecciones aferentes de la habénula.

Migration of Tbr2-positive cells (*Eomes*) from the prethalamic eminence to the origin nuclei of the stria medullaris

Iris Juárez-Leal¹, Verónica Company¹, Abraham Andreu-Cervera¹, Francisca Almagro-García¹, Salvador Martínez¹, Diego Echevarría¹, Eduardo Puelles¹

¹Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain.

**El Anexo 2 B es un artículo que se encuentra en fase de revisión, forma parte de los resultados de la tesis doctoral y da respuesta a los objetivos planteados previamente.*

Abstract

The prethalamic eminence (PThE) is a signalling centre in the developing mouse brain, playing a role as an organiser of the diencephalon so as participating in the neurogenesis of glutamatergic genes. Cells migration to triangular septal nuclei and the bed nucleus of the anterior commissure as already was described in mice. Recently shown in chick the existence of three migratory streams, one to the preoptic area, another pathway to the lateral hypothalamus, as well as the above-mentioned migration to the septum.

Tbr2 (*eomesodermin* gene; *Eomes*) is a transcription factor with an important developmental function required for the differentiation and specification of projection neurons and is specifically expressed in PThE. Therefore, our aim is to describe these migrations in mouse, using the *Eomes* transgenic mouse as a tool. We identified at stage E12.5 the first migration to the preoptic area, followed by the lateral hypothalamus and the septal area. Until postnatal stages, we detected migrating cells towards septal territories. Surprisingly, populations projecting to the habenula via the stria medullaris appear to receive *Eomes*-positive neurons migrated from the PThE region. We believe that this data must have an associated functional significance, which should be studied in depth.

Keywords: *Eomes*; *Tbr2*; stria medullaris; habenula

Introduction

The prethalamic eminence (PThE) (some authors refer to it as “thalamic eminence”) is a diencephalic region in the most dorsal subdomain of the prethalamus, which corresponds to prosomere 3 (p3) in the prosomeric model for vertebrate forebrain development. (Alonso et al., 2020b). The PThE has been previously considered as a dorsal part of p4, was recognized as a domain dorsal to the prethalamus, occupying there a position analogous to that of the habenula relative to the thalamus (Puelles and Rubenstein, 2003), traversed longitudinally by the stria medullaris (sm), a typical characteristic for the interprosencephalic boundaries. (Alonso et al., 2020b). This fasciculated tract, courses through the most dorsal aspect of the prethalamic prosomere, carrying axons from its multiple origins, caudally into the thalamic prosomere to reach the habenular (Hb) complex (Juárez-Leal et al., 2022). The PThE is a signaling center in the developing mouse, in the role of an organizer of the diencephalon (Abbott and Jacobowitz, 1999; Aduwum-Oforu et al., 2016). Moreover, this area has been proposed as a neurogenic source of Cajal–Retzius and olfactory bulb (Ob) cells, being the Ob the longest reported path for projection neuron migration in the forebrain (Huilgol et al., 2013; Ruiz-Reig et al., 2017a; Alonso et al., 2020a).

The prethalamus is considered the neurogenic site of GABAergic neurons that will populate the thalamus in the adult brain (Inamura et al., 2011) and thus expresses genes encoding transcription factors involved in GABAergic neurogenesis, but observed that PThE is negative for genes related to GABAergic neurogenesis and, in contrast, positive for genes that participate in glutamatergic neurogenesis such as Pax6, Neurog2, and Tbr2 (Schoorjans and Guillemot 27, 2002.; Mattar et al., 2004; Englund et al., 2005a; Ruiz-Reig et al., 2017; Hevner, 2019; Puelles, 2019).

In septal area, same cellular diversity is found and (Watanabe et al., 2018b) work was based in this neuron heterogeneity, observed differences in the neuronal composition

between the glutamatergic posterior septum and other GABAergic septal nuclei, demonstrating finally the rostro-dorsal migration of cells from the PThE toward the posterior septum to originate the triangular septal nucleus (TS) and bed nuclei of the anterior commissure (BAC), being nuclei of projection to the habenula through the stria medullaris. Furthermore, a study recently published in chicken (chick) demonstrated three migratory cellular streams exit the PThE rostralward, targeting multiple sites in the hypothalamus, subpallium and septocommissural area, based on descriptive developmental analysis of *Tbr1* gene brain expression in chick embryos and using the homotopic quail-chick chimeric grafting procedure (Alonso et al., 2021).

Tbr1 and its homologous *Tbr2* (*eomesodermin* gene; *Eomes*) have a restricted and conserved domain of expression in the telencephalic pallium in chick same as in mouse. (Bulfone et al., 1999). Both have related functions to regulate early steps in projection neuron fate commitment or differentiation (Englund et al., 2005c; Hevner, 2019a). *Eomes*, expression is found early at E10.0 in the pallial (cortical) parts of the telencephalon which include primordia of the olfactory cortex, neocortex, hippocampus, and parts of the septum and amygdala. It is also expressed in the pallium's connection with the diencephalon, territory known as prethalamic eminence (PThE) (Bulfone et al., 1999). *Eomes* is a T-box transcription factor with an important developmental function and a necessary for glutamatergic projection neuron (PN) differentiation and subtype specification and subtype specification in a variety of brain regions (Bulfone et al., 1999; Hodge et al., 2008; Hevner, 2019). *Eomes* regulates the transcriptome by activating or repressing hundreds of direct target genes (*Insm1*, *Pax6*, *Tbr1*, ...) and responsible of the genesis of Intermediate Progenitors (IP). Without *Tbr2*, abnormal IPs transiently accumulate in elevated numbers (Hevner, 2019a). In the absence of *Eomes*, INPs are depleted despite augmented neural stem cell proliferation, and neurogenesis is halted as the result of failed neuronal differentiation (Hodge et al., 2008b). Loss of *Eomes* function severely compromises Dental Gyrus development and conditional inactivation of *Tbr2* during early brain development causes microcephaly and severe behavioral deficits (Arnold et al., 2008b).

Once the three migrations in the chick are known (Alonso et al., 2021) and not all of them being described in mice, we set out to describe them during embryonic development and first postnatal stages. For this purpose, we used a *Eomes* transgenic line as a tool, which expresses nuclear GFP and RFP in the plasma membrane, in order to track *Eomes*-positive neurons originating from the PThE.

Materials and Methods

Mouse strains

All mouse manipulation and experimental procedures were performed according to the directives of the Spanish and European Union governments, and the protocols were approved by the Universidad Miguel Hernández OIR Committee (2016/VSC/PEA/00190). The mouse line used is: *Eomes^{mTomH2BGFP}* (*Eomes^{mTnG}*) strain. Its construct includes a membrane-bound tdTomato (mT) and a nuclear H2B: GFP (nG) and is already described in (Probst et al., 2017).

Mice were sacrificed by decapitation or cervical dislocation depending on the age of the animal (postnatal or adult mice). Then, the brains were dissected and fixed in 4% PFA overnight at 4°C. All postnatal animal used were sacrificed at P0 to P56. Animals from P0 to P4 were sacrificed by decapitation. From the P4 stage onwards they were perfused. The embryos (E12.5 to E16.5) used were obtained by laparotomy from pregnant females. The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0.5 (E0.5).

The genotyping PCR protocol was realized as previously described (Probst et al., 2017).

Immunohistochemistry

Samples were agarose-embedded and sectioned at 100 µm by vibratome. For Immunohistochemistry (IHC), it was performed as previously described (Murcia-Ramón). The primary antibodies used were: αGFP (1:500; A-11120/Molecular Probes), αIslet (1:200; 39.4D5/ Hybridoma bank), αRFP (1:200; ab6234/Abcam).

Imaging experiments

For co-localization studies, images were processed from a Leica SPEII vertical confocal microscope (DFC500). For the "Time Lapse" experiments, two pieces of equipment were used, firstly the LightsheetZ.1 Zeiss Microscope, for semi-transparent live samples. Secondly, Confocal Spinning Disk Dragonfly for real-time capture of dynamic processes was used. Adobe Photoshop (version 20.0.7) was used for the photo editing program and Adobe Illustrator (version 26.2.1) was used to generate the figures.

Results

At E12.5, *Eomes* positive neurons are detected in a longitudinal stripe along the midbrain and caudal diencephalon (arrow in Fig. 1A). Also, in the PThE, where a group of RFP positive axons fasciculate to form the stria medullaris (Fig. 1A, B, C). The mantle layer of the telencephalic pallial domain, including the olfactory bulb and the hippocampus, presented a dense distribution of *Eomes* positive neurons (Fig. 1A, B, C). In this territory, the early generated cortical axons appeared also positive (Fig. 1C). On top of these primary territories, positive neurons are observed in the preoptic area (Fig. 1A, B, C) and in the alar peduncular hypothalamus (Fig. A, D), as described in the chick, these two areas are colonized by *Eomes* positive neurons originated in the PThE. We confirmed the alar peduncular hypothalamic identification by ISLET1 protein distribution in the adjacent prethalamic territory (Fig. 1D).

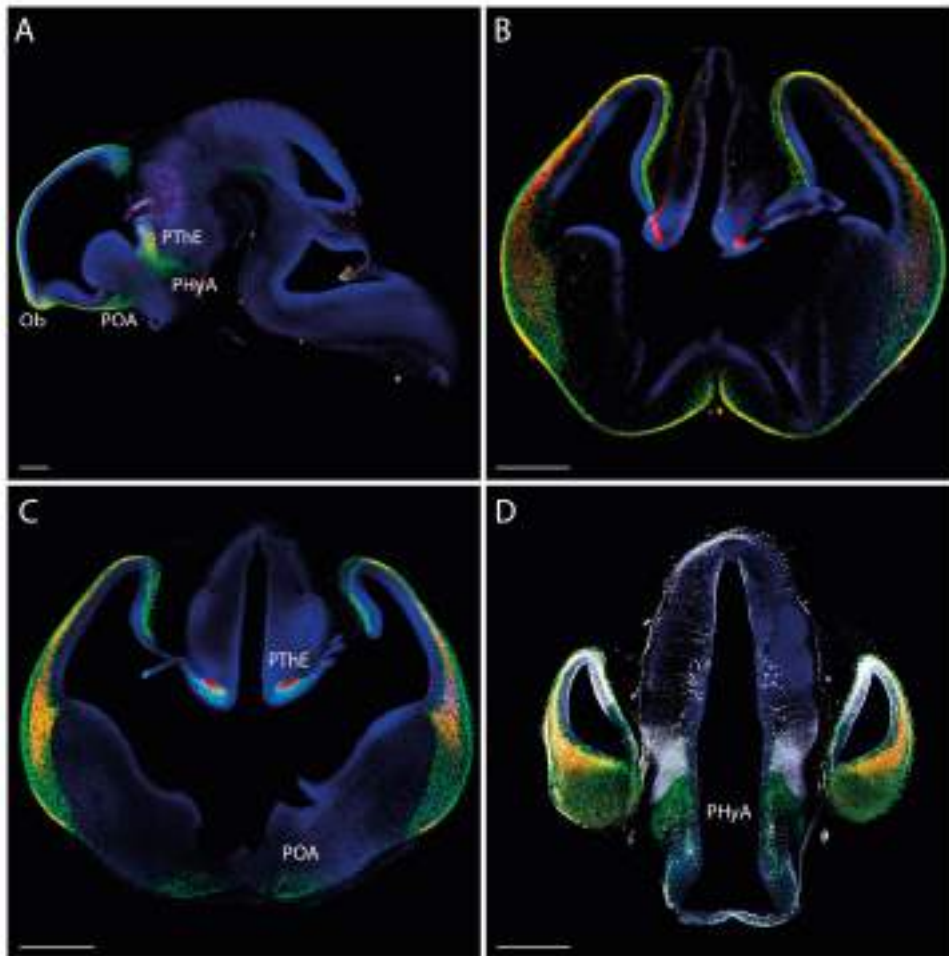


Figure 1: First *Eomes* positive cells migration. (A) Sagittal section of E12.5 embryonic mouse *Eomes*^{mTnG} brain stained by immuno fluorescence against GFP and RFP. (B-D) Coronal sections of E12.5 embryonic mouse *Eomes*^{mTnG} brains stained by immuno fluorescence against GFP, RFP and Islet (D). PThE, where a group or RFP positive axons fasciculate to form the stria medullaris (A, B, C). Positive neurons are observed in the preoptic area (A, B, C) and in the alar peduncular hypothalamus (A, D). We confirmed the alar peduncular hypothalamic identification by ISLET1 (D). Abbreviations: Ob: olfactory bulb; PHyA: alar part of peduncular hypothalamus; POA: preoptic alar plate; PThE: prethalamic eminence. Scale bar: 500 μ m.

The primary territories are maintained, at E14.5, (Fig. 2A, B) and a new area of localization appeared in the cerebellar anlage (arrow in Fig. 2A, B). The cortical territory and the hippocampus are further developed, and its mantle layer is full of *Eomes* positive neurons (Fig. 2C, D). Its developing white matter appeared full of positive axons as well as the lateral olfactory tract originated in the positive olfactory bulb (arrow in Figure 2C). The alar peduncular hypothalamus display a group of positive neurons, also the amygdala territory is populated by a dense group of *Eomes* positive neurons, special mention to the basomedial amygdalar nucleus (Fig. 2D).

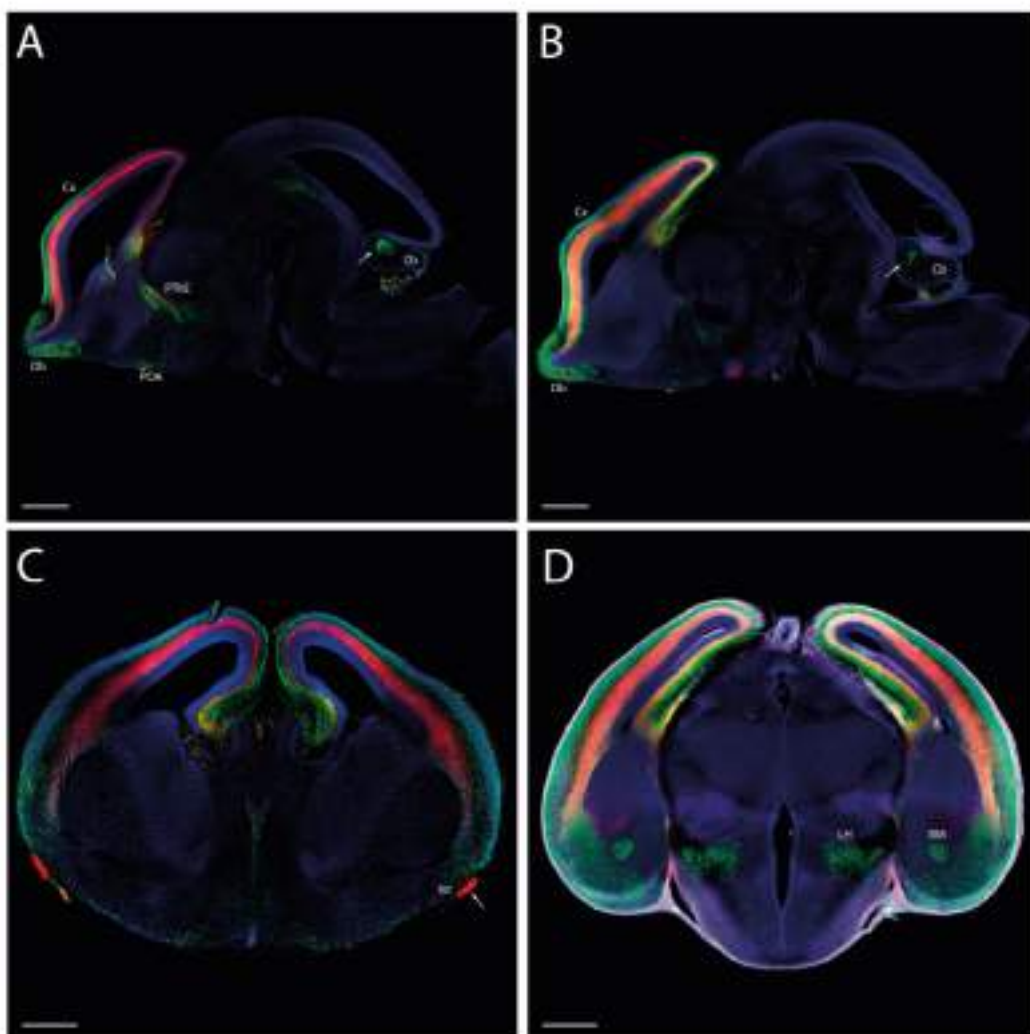


Figure 2: *Eomes* positives neurons at E14.5. (A, B) Sagittal sections of E14.5 embryonic mouse *Eomes^{mTnG}* brains stained by immunofluorescence against GFP and RFP. (C, D) Coronal sections of E12.5 embryonic mouse *Eomes^{mTnG}* brains stained by

immunofluorescence against GFP, RFP and Islet (D). The primary territories are maintained, and a new area of localization appeared in the cerebellar anlage, also the lateral olfactory tract origin and the basomedial amygdalar nucleus. Abbreviations: BM: basomedial amygdaloid nucleus; Cb: cerebellum; Cx: cortex; LH: lateral hypothalamus; lot: lateral olfactory tract; Ob: olfactory tract; PHyA: alar part of peduncular hypothalamus; POA: preoptic alar plate; PThE: prethalamic eminence. Scale bar: 500µm.

Later in development, at E16.5, the cortical areas maintained their *Eomes* expression while the preoptic area and the alar peduncular hypothalamus displayed a reduction in positive neurons, due to the inactivation of *Eomes* transcription (Fig. 3A, B), while the alar terminal hypothalamus maintain a higher number of positive neurons. At this stage, the eminentio-septal stream become more robust (arrow Fig. 3B) and a numerous positive group of neurons migrate under the interventricular foramen towards the septal territory to populate the triangular nucleus of the septum (Fig. 3C). The alar peduncular hypothalamus, adjacent to the prethalamus labelled with ISLET1, presented a reduced number of positive cells when compared with previous stages (Fig. 3D). The fascicles and tracts originated in *Eomes* positive territories presented a strong presence of RFP protein, we observed the corticospinal tract, fornix, stria medullaris and lateral olfactory tract (Fig. 3D). (Abbott⁶ and Jacobowitz⁷, n.d.; Puelles and Rubenstein, 2003; Alonso et al., 2020a, 2021)

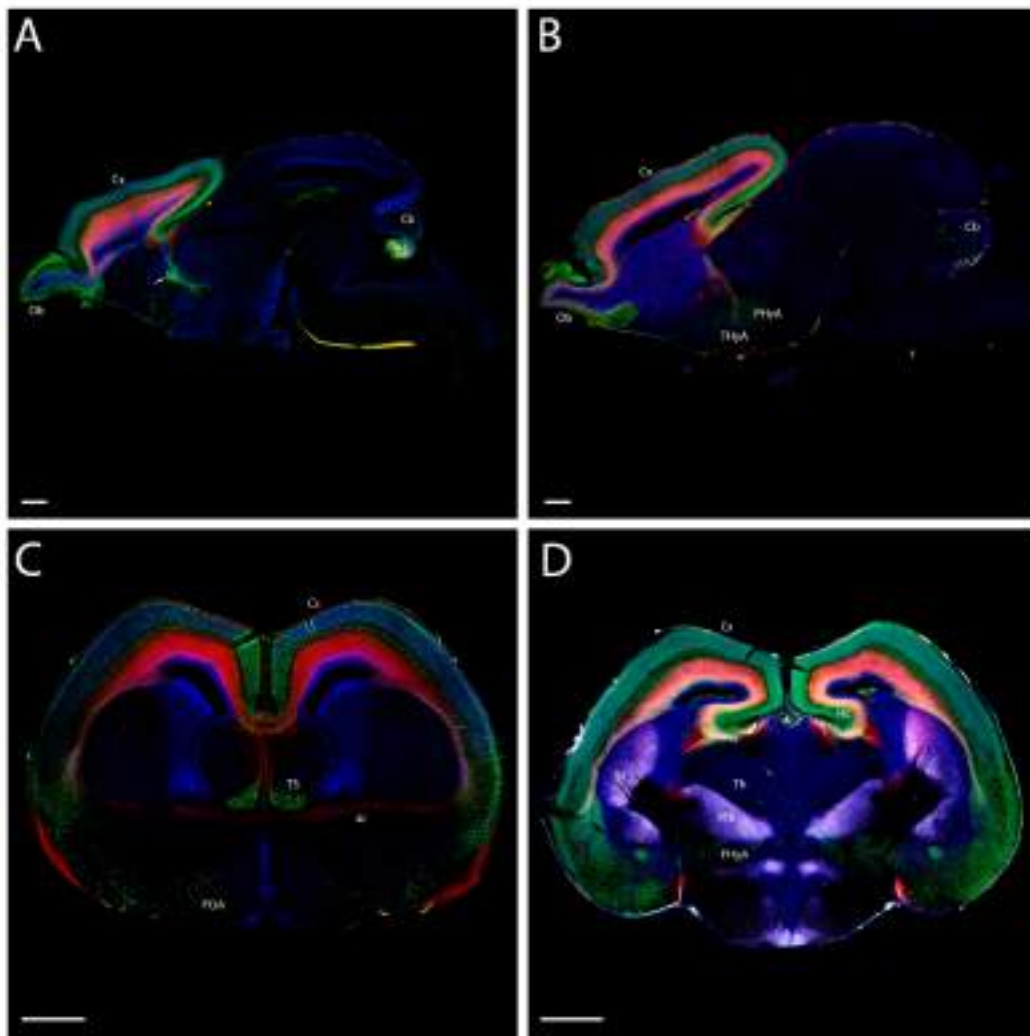


Figure 3: Eomes positive neurons at E16.5. (A, B) Sagittal sections of E16.5 embryonic mouse *Eomes^{mTnG}* brains stained by immunofluorescence against GFP and RFP. (C, D) Coronal sections of E12.5 embryonic mouse *Eomes^{mTnG}* brains stained by immunofluorescence against GFP, RFP and Islet (D). the alar peduncular hypothalamus displayed a reduction in positive neurons (A, B), while the alar terminal hypothalamus maintains a higher number of positive neurons. At this stage, the eminentio-septal stream become more robust. Abbreviations: ac: anterior commissure; Cb: cerebellum; Cx: cortex; Ob: olfactory tract; PHyA: alar part of peduncular hypothalamus; POA: preoptic alar plate; PThE: prethalamus; TH: thalamus; THyA: alar part of terminal hypothalamus; TS: triangular septal nucleus. Scale bar: 500 μ m.

The eminentio-septal migratory stream was maintained postnatally with an increased number of migrated neurons. At P0, a big number of positive neurons are already detected in the septal territory (Fig. 4A, B).

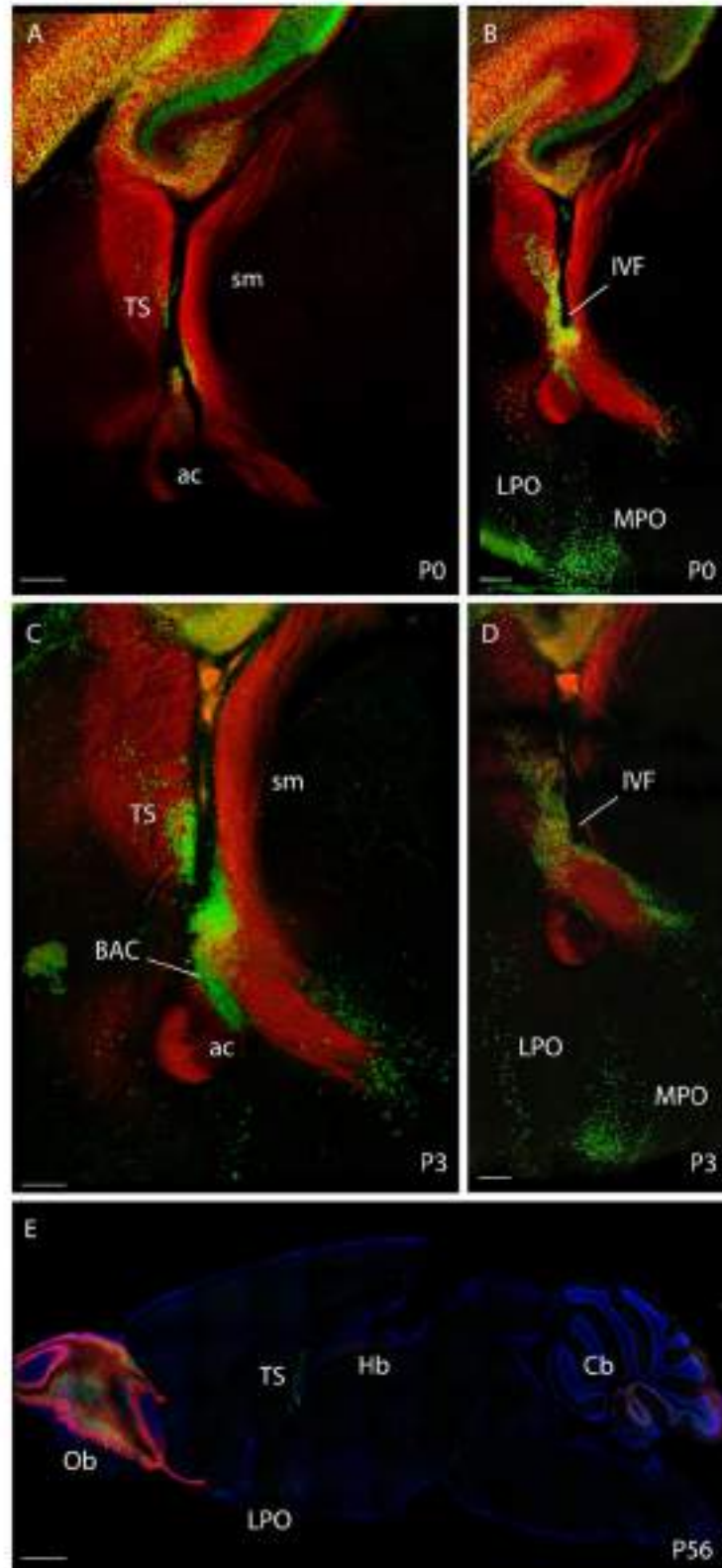


Figure 4: Postnatal and adult *Eomes* expression pattern. (A, B) Sagittal sections of P0 mouse *Eomes*^{mTnG} brains stained by immunofluorescence against GFP and RFP. (C, D) Sagittal sections of P3 mouse *Eomes*^{mTnG} brains. (E) Sagittal section of P56 adult mouse *Eomes*^{mTnG} brains stained by immunofluorescence against GFP and RFP. The eminentio-septal migratory stream was maintained postnatally with an increased number of migrated neurons (A-D) and in adult brain, the expression of *Eomes* is maintained in the olfactory bulb, triangular nucleus of the septum, the preoptic area and in the granular layer of the caudal lobes of the cerebellum (E). Abbreviations: ac: anterior commissure; BAC: bed nucleus of the anterior commissure; Cb: cerebellum; Hb: habenula; IVF: interventricular foramen; LPO: lateral preoptic area; MPO: median preoptic area; Ob: olfactory tract; sm: stria medullaris; TS: triangular septal nucleus. Scale bar: 200 μ m (A-D); 1000 μ m (E).

Discussion

As it has been already described, the PThE is a special territory with a high proliferation capacity that produce a huge number of neurons. Its location adjacent to the third ventricle choroidal plexus present high similarities with the rhombic lip in the hindbrain (origin of the cerebellar granular neurons, the pontine neurons and the inferior olive neurons). The fact that the PThE presents early expression of morphogenes and well known transcription factors as well as gene markers consistent with the local generation of glutamatergic neurons (*Pax6*, *Tbr2*, *Calb2*, *Tbr1*, *Lhx5*, *Trp73*, *Grm1*, *vGlut2*, *Tfap2a*, *Gdf10*, *Lhx9*) in this region would confirm that this is an organizing center with high importance in the brain (Abbott and Jacobowitz, 1999; Martínez and Puelles, 2000; Puelles et al., 2000; Puelles and Rubenstein, 2003; Abellan et al., 2010; Shimogori et al., 2010; Ruiz-Reig et al., 2017b; Alonso et al., 2020b). I would also act as an origin of signals of *Wnt*, *Fgf*, *Bmp* gene families in the for the development of surrounding brain regions (Adutwum-Oforu et al., 2016).

It has been already demonstrated that complex tangential migrations are undertaken from the PThE. Recently, it has been thoughtfully described in chick (Alonso et al., 2021) by means of the *Tbr1* gene (of the same family as *Eomes*). In this study described three migration phenomena that called by us the peripeduncular, juxtapeduncular and eminentio-septal migratory streams, depending on the territories that *Tbr1* positive cells

goes into. The first currents to be detected are the peripeduncular and then the juxtapeduncular currents with little time difference (about one day). The nuclei where first arrived positive *Tbr1* cells were EA, POA and DB, and posteriorly LH and EPD. Subsequently, eminentio-septal migration cells start reaching septal territory.

In mouse, the migration into the lateral hypothalamus has been partially described (Abbott and Jacobowitz, 1999) being placed in the mouse stage at E12.5. More recently, the eminentio-septal migration has been nicely described (Watanabe et al., 2018b). We aimed to fully describe the migrations using as a tool the transgenic mouse line *Eomes*^{mTnG} with membrane-bound tdTomato and a nuclear GFP (Probst et al., 2017). A perfect tool to follow the migration of the *Eomes* positive neurons originated in the PThE.

At E12.5 we already see a large number of cells in the PThE territory and at this stage we can already appreciate the migration of cells towards the preoptic area as well as towards the lateral hypothalamus. Subsequently, and coinciding with the results obtained in chickens studied (Alonso et al., 2021) eminentio-septal migration appears, which in the case of the mouse, persists even in the first postnatal stages.

These data also coincide with the first description by Abbott and Jacobowitz in 1999 of the calretinin (CR) expression pattern and the time window of appearance of the first stria medullaris fibers. In this study they name for the first time of a migration of LH-positive CR cells at E12.5, the appearance of the first projection axons of the stria medullaris at E13.5. Abbott suggests the great importance of PThE and hypothesizes possible functions in the CNS: intraneuronal calcium buffering; action as a trophic factor during neuronal development and action as a neuroprotective agent.

We assume there is a function associated to the expression of the *Eomes* gen, as we detected in postnatal stages up to adult mice, that the gene expression was literally turned off -except for the TS, Hb, Ob and Cb - indicating that the gen successfully played its role and stop expressing. Due to the relevance of this data, we strongly believe that this functional significance should be studied in depth. Being these projections excitatory in nature (Englund et al., 2005a; Fink et al., 2006; Alonso et al., 2020a, 2021) lead us to believe that the associated functions are of a great importance.

Remarkably, populations projecting to the habenula through the stria medullaris appear to receive *Eomes*-positive neurons migrated from the PThE region. This is a complex process involving different nuclei changing the perspective of their relationship, adding an extra importance to the PThE, so as the Hb receiving its projections, being this information important for further studies on the behavioral transcendence when there is a malfunction on those nuclei mentioned.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Conceived and designed the experiments: Iris Juárez-Leal, Salvador Martinez, Diego Echevarría and Eduardo Puelles; Performed the experiments: Iris Juárez-Leal, Abraham Andreu-Cervera, Verónica Company and Francisca Almagro-García; Analyzed the data: Iris Juárez-Leal, Abraham Andreu-Cervera, Diego Echevarría and Eduardo Puelles; Wrote the article: Iris Juárez-Leal and Eduardo Puelles; Obtained funding: Salvador Martinez, Eduardo Puelles and Diego Echevarría.

Funding

Work supported by MINECO/AEI/FEDER (BFU2013-48230) to E. Puelles and D. Echevarría; MINECO/AEI/FEDER (SAF2017-83702-R; PID2020-118171RB-I00), GVA (PROMETEO CIPROM/2021/018), ISCIII (RD21/0017/0017), co-funded by ERDF/ESF, “Investing in your future” to S. Martinez. The Institute of Neurosciences is a “Centre of Excellence Severo Ochoa (SEV-2017-0723)”.

Acknowledgments

We thank Pablo Ferao Egea for photography and figure design advice.

References

- Abbott LC, Jacobowitz DM. (1999). Developmental expression of calretinin-immunoreactivity in the thalamic eminence of the fetal mouse. *Int J Dev Neurosci*. 1999 Jul;17(4):331-45. doi: 10.1016/s0736-5748(99)00037-4. PMID: 10479068.
- Abellan, A., Menuet, A., Dehay, C., Medina, L., and Rétaux, S. (2010). Differential expression of LIM-homeodomain factors in cajal-retzius cells of primates, rodents, and birds. *Cerebral Cortex* 20, 1788–1798. doi: 10.1093/cercor/bhp242.
- Aduwum-Ofori, K. K., Magnani, D., Theil, T., Price, D. J., and Fotaki, V. (2016). The molecular and cellular signatures of the mouse eminentia thalami support its role as a signalling centre in the developing forebrain. *Brain Struct Funct* 221, 3709–3727. doi: 10.1007/s00429-015-1127-3.
- Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., and Okamoto, H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *Journal of Comparative Neurology* 520, 4051–4066. doi: 10.1002/cne.23167.
- Aizawa H, Zhu M. (2019). Toward an understanding of the habenula's various roles in human depression. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019 Oct;73(10):607-612. doi: 10.1111/pcn.12892. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31131942
- Alhajeri, M. M., Alkhanjari, R. R., Hodeify, R., Khraibi, A., and Hamdan, H. (2022). Neurotransmitters, neuropeptides and calcium in oocyte maturation and early development. *Front Cell Dev Biol* 10. doi: 10.3389/fcell.2022.980219.
- Alonso, A., Trujillo, C. M., and Puelles, L. (2020). Longitudinal developmental analysis of prethalamic eminence derivatives in the chick by mapping of Tbr1 in situ expression. *Brain Struct Funct* 225, 481–510. doi: 10.1007/s00429-019-02015-3.
- Alonso, A., Trujillo, C. M., and Puelles, L. (2021). Quail-chick grafting experiments corroborate that Tbr1-positive eminential prethalamic neurons migrate along three

streams into hypothalamus, subpallium and septocommissural areas. *Brain Struct Funct* 226, 759–785. doi: 10.1007/s00429-020-02206-3.

Andres, K. H., von Düring, M., and Veh, R. W. (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *Journal of Comparative Neurology* 407, 130–150. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990428)407:1<130::AID-CNE10>3.0.CO;2-8.

Araki M, McGeer PL, Kimura H. (1988). The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. *Brain Res.* 1988 Feb 16;441(1-2):319-30. doi: 10.1016/0006-8993(88)91410-2. PMID: 2451982.

Arnold, S. J., Huang, G. J., Cheung, A. F. P., Era, T., Nishikawa, S. I., Bikoff, E. K., et al. (2008a). The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev* 22, 2479–2484. doi: 10.1101/gad.475408.

Arnold, S. J., Huang, G. J., Cheung, A. F. P., Era, T., Nishikawa, S. I., Bikoff, E. K., et al. (2008b). The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev* 22, 2479–2484. doi: 10.1101/gad.475408.

Asahi M, Sugita Y, Kurzydowski K, De Leon S, Tada M, Toyoshima C, MacLennan DH. (2003). Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5040-5. doi: 10.1073/pnas.0330962100. Epub 2003 Apr 11. PMID: 12692302; PMCID: PMC154294.

Bal, N. C., Gupta, S. C., Pant, M., Sopariwala, D. H., Gonzalez-Escobedo, G., Turner, J., et al. (2021). Is Upregulation of Sarcolipin Beneficial or Detrimental to Muscle Function? *Front Physiol* 12. doi: 10.3389/fphys.2021.633058.

Bal, N. C., Singh, S., Reis, F. C. G., Maurya, S. K., Pani, S., Rowland, L. A., et al. (2017). Both brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis processes are activated during mild to severe cold adaptation in mice. *Journal of Biological Chemistry* 292, 16616–16625. doi: 10.1074/jbc.M117.790451.

Baño-Otálora, B., and Piggins, H. D. (2017). Contributions of the lateral habenula to circadian timekeeping. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 46–54. doi: 10.1016/j.pbb.2017.06.007.

- Batalla, A., Homberg, J. R., Lipina, T. v., Sescousse, G., Luijten, M., Ivanova, S. A., et al. (2017). The role of the habenula in the transition from reward to misery in substance use and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 80, 276–285. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.03.019.
- Bombardier, E., Smith, I. C., Gamu, D., Fajardo, V. A., Vigna, C., Sayer, R. A., et al. (2013). Sarcosine trumps β -adrenergic receptor signaling as the favored mechanism for muscle-based diet-induced thermogenesis. *FASEB Journal* 27, 3871–3878. doi: 10.1096/fj.13-230631.
- Boulos, L. J., ben Hamida, S., Bailly, J., Maitra, M., Ehrlich, A. T., Gavériaux-Ruff, C., et al. (2020). Mu opioid receptors in the medial habenula contribute to naloxone aversion. *Neuropsychopharmacology* 45, 247–255. doi: 10.1038/s41386-019-0395-7.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 2787–2814. doi: 10.1007/s00018-013-1550-7.
- Brinshawitz, K., Dittgen, A., Madai, V. I., Lommel, R., Geisler, S., and Veh, R. W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.050.
- Bühler, A., and Carl, M. (2021). Zebrafish tools for deciphering habenular network-linked mental disorders. *Biomolecules* 11, 1–18. doi: 10.3390/biom11020324.
- Bulfone A, Martinez S, Marigo V, Campanella M, Basile A, Quaderi N, Gattuso C, Rubenstein JL, Ballabio A. (1999). Expression pattern of the *Tbr2* (Eomesodermin) gene during mouse and chick brain development. *Mech Dev.* 1999 Jun;84(1-2):133-8. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00053-2. PMID: 10473127.
- Bulfone, A., Puellas, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R., and Rubenstein, J. L. R. (1993). Spatially Restricted Expression of *D/x-1*, *D/x-Z* (*Tes-1*), *Gbx-2*, and *Writ-3* in the Embryonic Day 12.5 Mouse Forebrain Defines Potential Transverse and Longitudinal Segmental Boundaries.

- Calì, T., Ottolini, D., and Brini, M. (2014). Calcium signaling in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 357, 439–454. doi: 10.1007/s00441-014-1866-0.
- Catani, M., Dell'Acqua, F., and Thiebaut de Schotten, M. (2013). A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 37, 1724–1737. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.001.
- Cerniauskas, I., Winterer, J., de Jong, J. W., Lukacsovich, D., Yang, H., Khan, F., et al. (2019). Chronic Stress Induces Activity, Synaptic, and Transcriptional Remodeling of the Lateral Habenula Associated with Deficits in Motivated Behaviors. *Neuron* 104, 899–915.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2019.09.005.
- Charles Watson, George Paxinos, Luis Puelles (2012). *The Mouse Nervous System*. Elsevier.
- Chatterjee, M., and Li, J. Y. H. (2012). Patterning and compartment formation in the diencephalon. *Front Neurosci*. doi: 10.3389/fnins.2012.00066.
- Company, V., Andreu-Cervera, A., Madrigal, M. P., Andrés, B., Almagro-García, F., Chédotal, A., et al. (2021a). Netrin 1-Mediated Role of the Substantia Nigra Pars Compacta and Ventral Tegmental Area in the Guidance of the Medial Habenular Axons. *Front Cell Dev Biol* 9. doi: 10.3389/fcell.2021.682067.
- Company, V., Moreno-Cerdá, A., Andreu-Cervera, A., Murcia-Ramón, R., Almagro-García, F., Echevarría, D., et al. (2021b). Wnt1 Role in the Development of the Habenula and the Fasciculus Retroflexus. *Front Cell Dev Biol* 9. doi: 10.3389/fcell.2021.755729.
- Company, V., Murcia-Ramón, R., Andreu-Cervera, A., Aracil-Pastor, P., Almagro-García, F., Martínez, S., et al. (2022). Adhesion molecule Amigo2 is involved in the fasciculation process of the fasciculus retroflexus. *Developmental Dynamics* 251, 1834–1847. doi: 10.1002/dvdy.513.
- Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr. (1990) Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience*. 1990;36(1):121-44. doi: 10.1016/0306-4522(90)90356-9. PMID: 2215915.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A. M., Bulfone, A., et al. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *Journal of Neuroscience* 25, 247–251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.

Fakhoury, M. (2017). The habenula in psychiatric disorders: More than three decades of translational investigation. *Neurosci Biobehav Rev* 83, 721–735. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.02.010.

Fakhoury, M. (2018). The dorsal diencephalic conduction system in reward processing: Spotlight on the anatomy and functions of the habenular complex. *Behavioural Brain Research* 348, 115–126. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.018.

Fakhoury, M., and Domínguez López, S. (2014). The Role of Habenula in Motivation and Reward. *Advances in Neuroscience* 2014, 1–6. doi: 10.1155/2014/862048.

Ferran, J. L., Puelles, L., and Rubenstein, J. L. R. (2015). Molecular codes defining rostrocaudal domains in the embryonic mouse hypothalamus. *Front Neuroanat* 9. doi: 10.3389/fnana.2015.00046.

Fink, A. J., Englund, C., Daza, R. A. M., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., et al. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: Transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *Journal of Neuroscience* 26, 3066–3076. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5203-05.2006.

Flanigan, M., Aleyasin, H., Takahashi, A., Golden, S. A., and Russo, S. J. (2017). An emerging role for the lateral habenula in aggressive behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 79–86. doi: 10.1016/j.pbb.2017.05.003.

Flanigan, M. E., Aleyasin, H., Li, L., Burnett, C. J., Chan, K. L., LeClair, K. B., et al. (2020). Orexin signaling in GABAergic lateral habenula neurons modulates aggressive behavior in male mice. *Nat Neurosci* 23, 638–650. doi: 10.1038/s41593-020-0617-7.

Funato, H., Saito-Nakazato, Y., and Takahashi, H. (2000). Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated semaphorin 3F and netrin-1. *Mol Cell Neurosci* 16, 206–220. doi: 10.1006/mcne.2000.0870.

Gamu, D., Bombardier, E., Smith, I. C., Fajardo, V. A., Russell Tupling, A., Bombardier, E., et al. (2014). Sarcolipin Provides a Novel Muscle-Based Mechanism for Adaptive Thermogenesis. Available at: www.acsm-essr.org.

Gamu, D., Trinh, A., Bombardier, E., and Tupling, A. R. (2015). Persistence of diet-induced obesity despite access to voluntary activity in mice lacking sarcolipin. *Physiol Rep* 3. doi: 10.14814/phy2.12549.

Gardon, O., Faget, L., Chu Sin Chung, P., Matifas, A., Massotte, D., and Kieffer, B. L. (2014). Expression of mu opioid receptor in dorsal diencephalic conduction system: New insights for the medial habenula. *Neuroscience* 277, 595–609. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.053.

Geisler, S., and Trimble, M. (2008). The lateral habenula: No longer neglected. *CNS Spectr* 13, 484–489. doi: 10.1017/S1092852900016710.

Giger et al. Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M. (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron*. 2000 Jan;25(1):29-41. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80869-7. PMID: 10707970.

Gill, M. J., Ghee, S. M., Harper, S. M., and See, R. E. (2013). Inactivation of the lateral habenula reduces anxiogenic behavior and cocaine seeking under conditions of heightened stress. *Pharmacol Biochem Behav* 111, 24–29. doi: 10.1016/j.pbb.2013.08.002.

Gold, P. W., and Kadriu, B. (2019). A major role for the lateral habenula in depressive illness: Physiologic and molecular mechanisms. *Front Psychiatry* 10. doi: 10.3389/fpsy.2019.00320.

Graham NSN, Zimmerman KA, Moro F, Heslegrave A, Maillard SA, Bernini A, Miroz JP, Donat CK, Lopez MY, Bourke N, Jolly AE, Mallas EJ, Soreq E, Wilson MH, Fatania G, Roi D, Patel MC, Garbero E, Nattino G, Baciuc C, Fainardi E, Chierigato A, Gradisek P, Magnoni S, Oddo M, Zetterberg H, Bertolini G, Sharp DJ. (2021). Axonal marker neurofilament light predicts long-term outcomes and progressive neurodegeneration after traumatic brain injury. *Sci Transl Med*. 2021 Sep 29;13(613):eabg9922. doi: 10.1126/scitranslmed.abg9922. Epub 2021 Sep 29. PMID: 34586833.

Hallacli, E., Kayatekin, C., Nazeen, S., Wang, X. H., Sheinkopf, Z., Sathyakumar, S., et al. (2022). The Parkinson's disease protein alpha-synuclein is a modulator of processing bodies and mRNA stability. *Cell* 185, 2035-2056.e33. doi: 10.1016/j.cell.2022.05.008.

Hariri, A. R., Bookheimer CA, S. Y., and Mazziotta, J. C. (2000). Modulating emotional responses: effects of a neocortical network on the limbic system. Lippincott Williams & Wilkins.

Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Rossi, M. A., Basiri, M. L., Liu, Y., Johnston, N. L., et al. (2020). Transcriptional and Spatial Resolution of Cell Types in the Mammalian Habenula. *Neuron* 106, 743-758.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.011.

Hennigan, K., D'Ardenne, K., and McClure, S. M. (2015). Distinct midbrain and habenula pathways are involved in processing aversive events in humans. *Journal of Neuroscience* 35, 198–208. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0927-14.2015.

Herkenham M, Nauta WJ. (1977) Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J Comp Neurol*. 1977 May 1;173(1):123-46. doi: 10.1002/cne.901730107. PMID: 845280.

Herkenham, M., and Nauta, W. J. H. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 1979 Sep 1;187(1):19-47. doi: 10.1002/cne.901870103. PMID: 226566.

Hevner, R. F. (2019a). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *J Anat* 235, 616–625. doi: 10.1111/joa.12939.

Hikosaka, O. (2010). The habenula: From stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11, 503–513. doi: 10.1038/nrn2866.

Hodge, R. D., Garcia, A. J., Elsen, G. E., Nelson, B. R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., et al. (2013). Tbr2 expression in Cajal-Retzius cells and intermediate neuronal progenitors is required for morphogenesis of the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience* 33, 4165–4180. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4185-12.2013.

Hodge, R. D., Kowalczyk, T. D., Wolf, S. A., Encinas, J. M., Rippey, C., Enikolopov, G., et al. (2008a). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2

expression and coordinate regulation of neuronal output. *Journal of Neuroscience* 28, 3707–3717. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4280-07.2008.

Hodge, R. D., Nelson, B. R., Kahoud, R. J., Yang, R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., et al. (2012). *Tbr2* is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *Journal of Neuroscience* 32, 6275–6287. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0532-12.2012.

Hong, S., and Hikosaka, O. (2008). The Globus Pallidus Sends Reward-Related Signals to the Lateral Habenula. *Neuron* 60, 720–729. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.035.

Hsu, Y. W. A., Morton, G., Guy, E. G., Wang, S. D., and Turner, E. E. (2016). Dorsal medial habenula regulation of mood-related behaviors and primary reinforcement by tachykinin-expressing habenula neurons. *eNeuro* 3, 118–126. doi: 10.1523/ENEURO.0109-16.2016.

Hsu, Y. W. A., Tempest, L., Quina, L. A., Wei, A. D., Zeng, H., and Turner, E. E. (2013). Medial habenula output circuit mediated by $\alpha 5$ nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. *Journal of Neuroscience* 33, 18022–18035. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2927-13.2013.

Hsu, Y. W. A., Wang, S. D., Wang, S., Morton, G., Zariwala, H. A., de la Iglesia, H. O., et al. (2014). Role of the dorsal medial habenula in the regulation of voluntary activity, motor function, hedonic state, and primary reinforcement. *Journal of Neuroscience* 34, 11366–11384. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1861-14.2014.

Hu, H., Cui, Y., and Yang, Y. (2020). Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat Rev Neurosci* 21, 277–295. doi: 10.1038/s41583-020-0292-4.

Huilgol, D., Udin, S., Shimogori, T., Saha, B., Roy, A., Aizawa, S., et al. (2013). Dual origins of the mammalian accessory olfactory bulb revealed by an evolutionarily conserved migratory stream. *Nat Neurosci* 16, 157–165. doi: 10.1038/nn.3297.

Inamura, N., Ono, K., Takebayashi, H., Zalc, B., and Ikenaka, K. (2011). *Olig2* lineage cells generate gabaergic neurons in the prethalamic nuclei, including the zona incerta, ventral lateral geniculate nucleus and reticular thalamic nucleus. *Dev Neurosci* 33, 118–129. doi: 10.1159/000328974.

Jester-Broms, J. (2018). Characterization of habenular neurocircuitry. A potential novel target for treating depression. Lund University: Faculty of Medicine

Juárez-Leal, I., Carretero-Rodríguez, E., Almagro-García, F., Martínez, S., Echevarría, D., and Puelles, E. (2022). Stria medullaris innervation follows the transcriptomic division of the habenula. *Sci Rep* 12. doi: 10.1038/s41598-022-14328-1.

Kantor, D. B., Chivatakarn, O., Peer, K. L., Oster, S. F., Inatani, M., Hansen, M. J., et al. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 44, 961–975. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.002.

Karagas, N. E., and Venkatachalam, K. (2019). Roles for the endoplasmic reticulum in regulation of neuronal calcium homeostasis. *Cells* 8. doi: 10.3390/cells8101232.

Knowland, D., and Lim, B. K. (2018). Circuit-based frameworks of depressive behaviors: The role of reward circuitry and beyond. *Pharmacol Biochem Behav* 174, 42–52. doi: 10.1016/j.pbb.2017.12.010.

Koppensteiner, P., Galvin, C., and Ninan, I. (2016a). Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Molecular and Cellular Neuroscience* 77, 105–112. doi: 10.1016/j.mcn.2016.10.006.

Koppensteiner, P., Galvin, C., and Ninan, I. (2016b). Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Molecular and Cellular Neuroscience* 77, 105–112. doi: 10.1016/j.mcn.2016.10.006.

Kowski, A. B., Geisler, S., Krauss, M., and Veh, R. W. (2008). Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 507, 1465–1478. doi: 10.1002/cne.21610.

Lazaridis, I., Tzortzi, O., Weglage, M., Martin, A., Xuan, Y., Parent, M., et al. (2019). A hypothalamus-habenula circuit controls aversion. *Mol Psychiatry* 24, 1351–1368. doi: 10.1038/s41380-019-0369-5.

Lee, H. W., Yang, S. H., Kim, J. Y., and Kim, H. (2019). The role of the medial habenula cholinergic system in addiction and emotion-associated behaviors. *Front Psychiatry* 10. doi: 10.3389/fpsy.2019.00100.

- Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C. D., Schulz, D., et al. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535–541. doi: 10.1038/nature09742.
- Li, H., Pullmann, D., and Jhou, T. C. (2019). Valence-encoding in the lateral habenula arises from the entopeduncular region. doi: 10.7554/eLife.41223.001.
- Li, Y., Wang, Y., Xuan, C., Li, Y., Piao, L., Li, J., et al. (2017). Role of the lateral habenula in pain-associated depression. *Front Behav Neurosci* 11. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00031.
- Li, Z. L., Wang, Y., Zou, H. W., Jing, X. Y., Liu, Y. J., and Li, L. F. (2021). GABA(B) receptors within the lateral habenula modulate stress resilience and vulnerability in mice. *Physiol Behav* 230. doi: 10.1016/j.physbeh.2021.113311.
- Liu, W. H., Valton, V., Wang, L. Z., Zhu, Y. H., and Roiser, J. P. (2017). Association between habenula dysfunction and motivational symptoms in unmedicated major depressive disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci* 12, 1520–1533. doi: 10.1093/scan/nsx074.
- Loonen, A. J. M., and Ivanova, S. A. (2016). Circuits regulating pleasure and happiness: The evolution of the amygdalar-hippocampal-habenular connectivity in vertebrates. *Front Neurosci* 10. doi: 10.3389/fnins.2016.00539.
- MacLennan DH, Asahi M, Tupling AR. (2003). The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;986:472-80. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07231.x. PMID: 12763867.
- Martínez, S., and Puelles, L. (2000). “Neurogenetic Compartments of the Mouse Diencephalon and some Characteristic Gene Expression Patterns,” in, 91–106. doi: 10.1007/978-3-540-48002-0_4.
- Mathis, V., and Lecourtier, L. (2017). Role of the lateral habenula in memory through online processing of information. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 69–78. doi: 10.1016/j.pbb.2017.07.004.
- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* 12, 77–84. doi: 10.1038/nn.2233.

Mattar, P., Britz, O., Johannes, C., Nieto, M., Ma, L., Rebeyka, A., et al. (2004a). A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev Biol* 273, 373–389. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.06.013.

McLaughlin, I., Dani, J. A., and de Biasi, M. (2017). The medial habenula and interpeduncular nucleus circuitry is critical in addiction, anxiety, and mood regulation. *J Neurochem* 142, 130–143. doi: 10.1111/jnc.14008.

Mendoza, J. (2017). Circadian neurons in the lateral habenula: Clocking motivated behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 55–61. doi: 10.1016/j.pbb.2017.06.013.

Minamisawa, S., Wang, Y., Chen, J., Ishikawa, Y., Chien, K. R., and Matsuoka, R. (2003). Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *Journal of Biological Chemistry* 278, 9570–9575. doi: 10.1074/jbc.M213132200.

Mizumori, S. J. Y., and Baker, P. M. (2017). The Lateral Habenula and Adaptive Behaviors. *Trends Neurosci* 40, 481–493. doi: 10.1016/j.tins.2017.06.001.

Moreno-Bravo, J. A., Martinez-Lopez, J. E., Madrigal, M. P., Kim, M., Mastick, G. S., Lopez-Bendito, G., et al. (2016). Developmental guidance of the retroflex tract at its bending point involves Robo1-Slit2-mediated floor plate repulsion. *Brain Struct Funct* 221, 665–678. doi: 10.1007/s00429-014-0932-4.

Morgane, P. J., Galler, J. R., and Mokler, D. J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 75, 143–160. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.01.001.

Nieuwenhuys, R., Voogd J., van Huijzen C. (2009). *El Sistema Nervioso Central Humano*. 4º Edición. Panamericana.

Nuno-Perez, A., Trusel, M., Lalive, A. L., Congiu, M., Gastaldo, D., Tchenio, A., et al. (2021). Stress undermines reward-guided cognitive performance through synaptic depression in the lateral habenula. *Neuron* 109, 947-956.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2021.01.008.

Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., et al. (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle

sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12360–12369. doi: 10.1074/jbc.273.20.12360.

Odermatt, A., Taschner, P. E. M., Scherer, S. W., Beatty, B., Khanna, V. K., Cornblath, D. R., et al. (1997). Characterization of the Gene Encoding Human Sarcolipin (SLN), a Proteolipid Associated with SERCA1: Absence of Structural Mutations in Five Patients with Brody Disease measurement of any alteration in SERCA1 function. 541.

Papathanou, M., Dumas, S., Pettersson, H., Olson, L., and Wallén-Mackenzie, Å. (2019). Off-target effects in transgenic mice: characterization of dopamine transporter (DAT)-cre transgenic mouse lines exposes multiple non-dopaminergic neuronal clusters available for selective targeting within limbic neurocircuitry. *eNeuro* 6. doi: 10.1523/ENEURO.0198-19.2019.

Pobbe, R. L. H., and Zangrossi, H. (2008). Involvement of the lateral habenula in the regulation of generalized anxiety- and panic-related defensive responses in rats. *Life Sci* 82, 1256–1261. doi: 10.1016/j.lfs.2008.04.012.

Probst, S., Daza, R. A., Bader, N., Hummel, J. F., Weiß, M., Tanriver, Y., et al. (2017). A dual-fluorescence reporter in the Eomes locus for live imaging and medium-term lineage tracing. *Genesis* 55. doi: 10.1002/dvg.23043.

Proulx, C. D., Hikosaka, O., and Malinow, R. (2014). Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci* 17, 1146–1152. doi: 10.1038/nn.3779.

Puelles, L. (2019). Survey of midbrain, diencephalon, and hypothalamus neuroanatomic terms whose prosomeric definition conflicts with columnar tradition. *Front Neuroanat* 13. doi: 10.3389/fnana.2019.00020.

Puelles, L., Amat, J. A., and Martinez-Iie-La-Torre, M. (1987). Segment-Related, Mosaic Neurogenetic Pattern in the Forebrain and Mesencephalon of Early Chick Embryos: I. Topography of AChE-Positive Neuroblasts up to Stage HH18.

Puelles, L., Harrison, M., Paxinos, G., and Watson, C. (2013). A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36, 570–578. doi: 10.1016/j.tins.2013.06.004.

Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., et al. (2000). Pallial and Subpallial Derivatives in the Embryonic Chick and Mouse Telencephalon, Traced by the Expression of the Genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1* THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 424:409-438 (2000).

Puelles, L., and Rubenstein, J. L. R. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26, 469–476. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00234-0.

Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick; William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia James O. McNamara, S. Mark Williams. (2004). *Neuroscience*, 3^o Edition

Quina, L. A., Wang, S., Ng, L., and Turner, E. E. (2009). *Brn3a* and *Nurr1* mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *Journal of Neuroscience* 29, 14309–14322. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2430-09.2009.

Rathod, N., Bak, J. J., Primeau, J. O., Fisher, M. E., Espinoza-fonseca, L. M., Lemieux, M. J., et al. (2021). Nothing regular about the regulins: Distinct functional properties of SERCA transmembrane peptide regulatory subunits. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/ijms22168891.

Roberson, S., and Halpern, M. E. (2018). Development and connectivity of the habenular nuclei. *Semin Cell Dev Biol* 78, 107–115. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.10.007.

Rolls, E. T. (2015). Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system. *Cortex* 62, 119–157. doi: 10.1016/j.cortex.2013.12.005.

Rosenberg, S. S., and Spitzer, N. C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, 1–13. doi: 10.1101/cshperspect.a004259.

Roxo, M. R., Franceschini, P. R., Zubarán, C., Kleber, F. D., and Sander, J. W. (2011). The limbic system conception and its historical evolution. *ScientificWorldJournal* 11, 2427–2440. doi: 10.1100/2011/157150.

Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puelles L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science*. 1994 Oct 28;266(5185):578-80. doi: 10.1126/science.7939711. PMID: 7939711.

Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci.* 1998;21:445-77. doi: 10.1146/annurev.neuro.21.1.445. PMID: 9530503.

Ruiz-Reig, N., Andrés, B., Huilgol, D., Grove, E. A., Tissir, F., Tole, S., et al. (2017). Lateral Thalamic Eminence: A Novel Origin for mGluR1/Lot Cells. *Cerebral Cortex* 27, 2841–2856. doi: 10.1093/cercor/bhw126.

Sahay, A., Molliver, M. E., Ginty, D. D., and Kolodkin, A. L. (2003). Development/Plasticity/Repair Semaphorin 3F Is Critical for Development of Limbic System Circuitry and Is Required in Neurons for Selective CNS Axon Guidance Events.

Sánchez JC, López-Zapata DF, Romero-Leguizamón CR. (2010). Mecanismos de transporte de calcio en neuroprotección y neurotoxicidad [Calcium transport mechanisms in neuroprotection and neurotoxicity]. *Rev Neurol.* 2010 Nov 16;51(10):624-32. Spanish. PMID: 21069641.

Santiago Ramón y Cajal (1909). *Histologie du Système nerveux de l'homme & des vertébrés.* A. Maloine Editeur

Sartorius, A., and Henn, F. A. (2007). Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. *Med Hypotheses* 69, 1305–1308. doi: 10.1016/j.mehy.2007.03.021.

Schuurmans C, Guillemot F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol.* 2002 Feb;12(1):26-34. doi: 10.1016/s0959-4388(02)00286-6. PMID: 11861161.

Shabel, S. J., Proulx, C. D., Trias, A., Murphy, R. T., and Malinow, R. (2012). Input to the Lateral Habenula from the Basal Ganglia Is Excitatory, Aversive, and Suppressed by Serotonin. *Neuron* 74, 475–481. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.037.

Shibata, H., and Suzuki, T. (1984). Efferent projections of the interpeduncular complex in the rat, with special reference to its subnuclei: a retrograde horseradish peroxidase study.

Shimogori, T., Lee, D. A., Miranda-Angulo, A., Yang, Y., Wang, H., Jiang, L., et al. (2010). A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat Neurosci* 13, 767–775. doi: 10.1038/nn.2545.

Shumake, J., Edwards, E., and Gonzalez-Lima, F. (2003). Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior The habenula may play an important role in depression. Available at: www.elsevier.com/locate/brainres.

Stamatakis, A. M., van Swieten, M., Basiri, M. L., Blair, G. A., Katak, P., and Stuber, G. D. (2016). Lateral hypothalamic area glutamatergic neurons and their projections to the lateral habenula regulate feeding and reward. *Journal of Neuroscience* 36, 302–311. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1202-15.2016.

Suter, T. A. C. S., Blagburn, S. v., Fisher, S. E., Anderson-Keightly, H. M., D'Elia, K. P., and Jaworski, A. (2020). TAG-1 Multifunctionality Coordinates Neuronal Migration, Axon Guidance, and Fasciculation. *Cell Rep* 30, 1164-1177.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.085.

Sutherland, R. J. (1982). The Dorsal Diencephalic Conduction System: A Review of the Anatomy and Functions of the Habenular Complex I.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science*. 1996 Nov 15;274(5290):1123-33. doi: 10.1126/science.274.5290.1123. PMID: 8895455.

Torrìco TJ, Abdijadid S. (2022). Neuroanatomy, Limbic System. 2022 Jul 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 30860726.

Tupling, A. R., Asahi, M., and MacLennan, D. H. (2002). Sarcoplipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44740–44746. doi: 10.1074/jbc.M206171200.

Velasquez, K. M., Molfese, D. L., and Salas, R. (2014). The role of the habenula in drug addiction. *Front Hum Neurosci* 8. doi: 10.3389/fnhum.2014.00174.

- Vied, C., Ray, S., Badger, C. D., Bundy, J. L., Arbeitman, M. N., and Nowakowski, R. S. (2016). Transcriptomic analysis of the hippocampus from six inbred strains of mice suggests a basis for sex-specific susceptibility and severity of neurological disorders. *Journal of Comparative Neurology* 524, 2696–2710. doi: 10.1002/cne.23989.
- Viswanath, H., Carter, A. Q., Baldwin, P. R., Molfese, D. L., and Salas, R. (2014). The medial habenula: Still neglected. *Front Hum Neurosci* 7. doi: 10.3389/fnhum.2013.00931.
- Vogt, B. A. (2019). “Cingulate cortex in the three limbic subsystems,” in *Handbook of Clinical Neurology* (Elsevier B.V.), 39–51. doi: 10.1016/B978-0-444-64196-0.00003-0.
- Wagner, F., French, L., and Veh, R. W. (2016). Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct Funct* 221, 39–58. doi: 10.1007/s00429-014-0891-9.
- Wagner, F., Stroh, T., and Veh, R. W. (2014). Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. *Journal of Comparative Neurology* 522, 2650–2662. doi: 10.1002/cne.23554.
- Wallace, M. L., Huang, K. W., Hochbaum, D., Hyun, M., Radeljic, G., and Sabatini, B. L. (2020). Anatomical and single-cell transcriptional profiling of the murine habenular complex. *Elife* 9. doi: 10.7554/eLife.51271.
- Wallace, M. L., Saunders, A., Huang, K. W., Philson, A. C., Goldman, M., Macosko, E. Z., et al. (2017). Genetically Distinct Parallel Pathways in the Entopeduncular Nucleus for Limbic and Sensorimotor Output of the Basal Ganglia. *Neuron* 94, 138-152.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.017.
- Wang RY, Aghajanian GK. (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science*. 1977 Jul 1;197(4298):89-91. doi: 10.1126/science.194312. PMID: 194312.
- Watanabe, K., Irie, K., Hanashima, C., Takebayashi, H., and Sato, N. (2018). Diencephalic progenitors contribute to the posterior septum through rostral migration along the hippocampal axonal pathway. *Sci Rep* 8. doi: 10.1038/s41598-018-30020-9.

Wawrzynow, A., Theibert, J. L., Murphy, C., Jona, I., Martonosi, A., and Collins, J. H. (1992). Sarcoplipin, the “Proteolipid” of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum, Is a Unique, Amphipathic, 31-Residue Peptide.

Xiang, M., Gan, L., Zhou, L., Kleinl, W. H., and Nathans, J. (1996). Targeted deletion of the mouse POU domain gene Brn-3a causes a selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling.

Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T., and Nakanishi, S. (2013). Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* 78, 537–544. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.035.

Yuan, A., and Nixon, R. A. (2021). Neurofilament Proteins as Biomarkers to Monitor Neurological Diseases and the Efficacy of Therapies. *Front Neurosci* 15. doi: 10.3389/fnins.2021.689938.

Zmira, O., Halpern, A. I., and Drori, T. (2020). Anti-neurofilament antibodies and neurodegeneration: Markers and generators. *J Neuroimmunol* 344. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577248.

Zündorf G, Reiser G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Apr 1;14(7):1275-88. doi: 10.1089/ars.2010.3359. Epub 2010 Oct 6. PMID: 20615073; PMCID: PMC3122891.

Agradecimientos

Estos años han sido toda una aventura. Ha sido un camino largo y lleno de muchos aprendizajes. Gracias a haber tomado la decisión de iniciarlo, y además en el Instituto de Neurociencias, me he encontrado con gente maravillosa, con historias increíbles, con aprendizajes inolvidables y con momentos absolutamente únicos.

Para empezar, caer en el laboratorio 138 fue una gran suerte. Creo que no había laboratorio con más buen ambiente en todo el instituto. Gracias a Eduardo, porque sin tu ayuda esto no hubiera sido posible. Me acuerdo una de las primeras reuniones en las que hablábamos del proyecto de tesis en los que me confesaste que la idea se te había ocurrido en la ducha. Pensé...genial, este es mi sitio. Siempre con una sonrisa, y dispuesto a echar una mano en lo que he necesitado. Gracias por contagiar las ganas y los conocimientos por la neurociencia y neuroanatomía. Además, durante este tiempo he aprendido muchísimo de todo porque eres un pozo de conocimientos: de anatomía, de gestión, de anécdotas e historias curiosas e interesantes para utilizar en clase... Pero también, de radio patio y las historias pasadas, presentes y futuras de todos y todas las que pasaban por el instituto y/o laboratorio, que hacía que desconectaras del estrés y del mal cuerpo si un experimento no salía, o que las comidas de tupper en el comedor, se convirtieran por un momento en ratos en “familia”. Gracias por haberme ayudado a terminar con este gran monstruo. Diego, contigo las risas, los chistes, el “aipa ahí” cuando apareces por el laboratorio han sido un regalo. Voy a echar de menos llorar de la risa en cualquiera de nuestras celebraciones improvisadas, san jueves, san viernes o san lunes, con cualquiera de tus historias o anécdotas. Aún me acuerdo cuando creíamos que era una “sarnosa” (esa larga y divertida historia), y viniste a darme un abrazo que me rompió en mil pedazos, y que hizo de ancla en un momento complicado. Gracias por enseñarme las técnicas “old school” de laboratorio, a querer y disfrutar la neurociencia como lo haces tú y todos tus sabios consejos, de la vida y del laboratorio.

A Paqui, porque sin ti, esto, imposible. Tu paciencia y trabajo es increíble. Mama pato y los patitos, aún no sé cómo puedes aguantarnos a mí y a todos los alumnos, que como yo, íbamos detrás de ti como polluelos preguntándote o pidiendo cosas. Porque aún no he

visto cosa que no sepas cómo funciona, cómo hacerla o cómo solucionarla. Mil millones de gracias por toda la ayuda durante todos estos años...eres la mejor.

Además, cuando llegué, coincidí con el mejor team, el neural tube team. Creo que llevaba pocas semanas cuando me dijeron, ¿Iris, te vienes a tatuarte un tubo neural? Creo que dije que sí mientras bajaba las escaleras, poniéndome la chaqueta. Adri, aún no puedo parar de reírme cada vez que me acuerdo de las historias cuando nos bebíamos alguna cerveza de más y los filtros se desvanecían un poco. La risa de Sara, de esas que se pega y convierte tu día triste en uno bonito, con esas fantásticas preguntas y reflexiones sobre términos en castellano que jamás te hubieras preguntado, algo impensable. Fran, pura dulzura y amor, que no sabes la suerte de haberte quedado relativamente cerca para esos pitis de auxilio y esas fuerzas en el último tramo de la tesis, que junto con Carla, me hicisteis no tirar la toalla. Carla, que sería de tí sin esas largas conversaciones, en la distancia, en persona...has sido un pilar fundamental en este viaje que acaba, y en mi vida en general, gracias y mil gracias, os quiero a los dos muchísimo. Vero, que si ya veníamos de tener aventuras previas, y no pocas, a la era de laboratorio, esto vino a darnos muchas más. Compis de uni, compis de tesis, compis de tanto y espero que nos queden por contar muchísimas historias más...que vienen años bonitos y llenos de cosas increíbles, y si estás cerca, serán mucho mejores. Abra, llegaste tarde para mi gusto, porque me hubiese encantado haberte podido tener antes en mi vida, solucionador de todo, me has salvado de tantas que no sé que hubiese hecho sin ti. Espero que al menos, ahora lo que nos quede sean historias que sumar. Cuánto os quiero, maricarmenes.

Al laboratorio 102, que, sin Alicia, Ana y Raquel, tampoco hubiese sido lo mismo. A Ana y Raquel, que ahora os tengo cerca en departamentos, pero antes, teneros cerca en el laboratorio era una suerte. Mil gracias a Alicia, por tanta ayuda cuando estaba tan y tan perdida. Igual que mis compis de tesis Tono y Claudia, por la compañía, las risas, los san todos y las happy hours. A Rita, que els cafenets i el esmorzarets sense tú no eren igual. La súper triatleta i la súper chispes, ha sigut una sort coincidir amb tú. A Álvaro, que tu paso por el lab trajo aire fresco y compañía de la buena.

A Salva y a Emilio, por dejarme formar parte de este laboratorio y por cada uno de los consejos de las labmeeting, que me han hecho crecer y aprender tantísimo.

A Pili, que da gusto verte siempre con esa sonrisa, gracias por echarme una mano cuando me he atascado con los Imaris y con tantas cosas. Aún me acuerdo del viaje a Berlín, de perdernos en el metro, del paraguas atascado...y me apetece retroceder en el tiempo sólo por volvernos a reír como ese día. A Raquel, por haberme ayudado tantísimo, por ser tan dulce, tan divertida y con ese humor tan ácido. No sé qué hubiese sido todo este tiempo sin ti por el laboratorio, sin esos ratos, risas y crisis cuando algo no salía como esperábamos...que suerte haber coincidido contigo. Ana, por la misma razón, por ser tan tierna y ayudar siempre en lo que he necesitado. Menos mal que os sigo teniendo relativamente cerca a las dos...

A Nica, que llegaste más tarde al lab pero eres la alegría del departamento, y ahora decir cualquier número es peligroso porque siempre tienes una repuesta, la más de acertada para hacerte saltar las lágrimas. A M^o Carmen y M^a Luisa, que compartir congresos y cervezas, además de cosas de lab, siempre da mucha alegría. A Mari Paz, que se te echa de menos, y a Marusa, porque sin ti todo sería un caos y muchísimo más aburrido.

A todos aquellos y aquellas estudiantes que habéis pasado por el laboratorio y habéis dejado tanta huella, y para aquellos que no sólo pasaron, sino que se quedaron de alguna manera en mi vida, como Elena, Víctor y David (gracias por hacerme reír tantísimo, por tus stickers y por las conversaciones tan maravillosas que tenemos. Espero que la próxima visita sea dentro de muy poquito).

A mis vecinos, estudiantes del laboratorio de Ramón Reig y Cristina Márquez, por dedicar vuestro tiempo a enseñarme técnicas y a perfeccionar las cirugías. A Jovana y Verona, por tener paciencia infinita conmigo y ayudarme tantísimo con los time lapse. A Trini, porque es una alegría cruzarse contigo por el pasillo, eres un amor. A Eva y Trini, que han tenido tanta paciencia y me han ayudado tanto con los genotipos.

A todos y todas aquellas que formasteis parte en mi estancia en Magdeburg. To Matthias, for letting me stay in his lab and learning so many things from him (Danke für alles, was Sie mich gelehrt haben). To Damaris, because without you, it wouldn't have been possible, thank you for translating for me, for teaching me how the lab works and for bringing me the best sweets I have ever tasted and for taking such good care of me (Vielen Dank für alles Damaris). A Rodrigo, que me salvó varios experimentos regalándome anticuerpos, y que me salvó por otro lado, haciendo cócteles chilenos para esas tardes-noches de risas y de recuperar energía, de desconectar del trabajo y de olvidarnos lo lejos que estábamos todos de casa. A todos los que coincidimos allí y que fue una suerte encontraros en mi camino (Irene, Katharina, Janosch, Lucía, Duxan, Alejandro), en especial a Sheila, Tati y a Andrés. Andrés, espero verte pronto por aquí para darte un abrazo bien merecido por todas las charlas que nos debemos con un cafetito delante solucionando el mundo. A Ernesto, per acollir-me en la teua casa tots els caps de setmana, ensenyar-me tots els millors raconets de Berlín i per tot el que ha significat tindret propet tot aquest temps, sobre tot a la pandèmia.

A todos y todas las compis del INA que han hecho que mi paso por allí y mi existencia en general, fuera mucho más llevadera por vuestra compañía: Kika y Álvaro, a Belén y Mar, a Juan Antonio y todo su equipo, a Óscar, a Lorenzo y a todos/as los que coincidíamos comiendo cada día en el comedor, que hacían que comer fuera de casa no fuera tan malo, porque se convertía en un rato en familia. A Alex y Raquel, que compartir cafés, pitis y charlas con ellos ha sido un placer. A Quique, por tus preguntas, reflexiones y tu curiosidad infinita, porque de mayor quiero ser como tú.

A mis compañeras de universidad, porque todo esto no hubiese empezado sin ellas, sin su apoyo y sin su empujón para que me aventurara en esta locura. Gracias a Alicia por ser guía todo este tiempo, por dedicar tanto a la terapia ocupacional y por haber peleado para tenerme en el equipo. Gracias Miriam, porque sin ti en mi vida, yo no sé qué haría. Gracias por animarme, ayudarme, hacerme de agenda y recordatorio, por sostener mi caos habitual y darme los mejores consejos, por hacer de faro durante todos estos años. Gracias Paula, por haberme dado fuerzas para seguir cuando casi tiro la toalla, por confiar en mí y por pelear por que siga con vosotras. Eva y Desi, por preocuparos por mí, por creer en

mí, por ayudarme incondicionalmente cada vez que os he necesitado. A Cris, por ser junto a mí, compañera de batalla. Gracias chicas, porque sois las mejores, y junto al resto de compis, Vero, Paula, hacemos el mejor equipo del universo. Además, sin Dani, Rocío, Irene, y demás estudiantes de InTeO, que hacen que sumemos aún más, porque contagian energía y ganas. A todo el resto del equipo de uni, que son una maravilla de profesoras y da gusto compartir la pasión por la terapia ocupacional y las ganas por enseñar con gente tan increíble como vosotros y vosotras. A los y las alumnas de TO, en especial a Noemí, Javi y Elena, porque la cuarentena fue soportable gracias a vosotros/as, vuestra compañía vuestro apoyo y las charlas eternas en el grupo.

Doy las gracias a todos y todas las compis del campus, PAS, conserjería, limpieza... Porque sin cada uno de ellos y ellas, todo sería mucho más complicado. Llegar cada día a trabajar y tener un buenos días, un saludo, una charla de pasillo, un, tienes mala cara Iris, ¿estás bien?...eso no tiene precio, porque forman una parte esencial de mi día a día, y más, cuando pasas mucho tiempo en tu lugar de trabajo, acaba siendo parte de la familia después de tantísimos años.

A la familia elegida, a César y Pau, que son seres de luz que me dan energía, oxígeno y ganas de cualquier cosa, porque sois los mejores y ya está. A Raúl, porque manda huevos que seamos del mismo pueblo e instituto y nos conozcamos de verdad en Berlín...no sabes la alegría que me das cada vez que apareces por la puerta, con unas empanadillas o por usar el aseo, o con unas pizzas en la mano, así, de repente y sin avisar, y llenando nuestra casa de alegría. A mis amigas “de toda la vida”: a Jessy, Noe, Patri, Elena, Esther y Esme. De toda la vida porque llevamos literalmente toda la vida juntas...y porque siempre habéis estado ahí, aunque yo durante mucho tiempo he desaparecido por trabajo o por meterme en fregaos de este tipo, pero siempre acabáis contando conmigo para todo, y eso es tener muchísima suerte.

A Gorka y Gus, porque cada vez que hablamos me preguntáis, nena...¿cómo llevas la tesis?, y tengo muchas ganas de deciros, pues ya está nenico, e ir a Madrid a veros.

A Ana Guardiola y los psicodramáticos, porque cada vez que os veo en persona o por video conferencia, me llenáis las pilas para semanas. Es una suerte compartir tanto y sin filtros con vosotros y vosotras...no hay sitio dónde me pueda sentir más desnuda y libre y a la vez más cuidada que con vosotros. Sois tabla en mitad del océano.

A todos los que en algún momento de mi vida han estado ahí, gracias por aguantar mis “tengo trabajo”, “no podré estar”, “tengo que entregar algo mañana”, “tengo turno”...porque prometo, tener más tiempo para mí y para todos y todas los que forman parte de mi vida.

A Amalia y familia, porque sois y seréis mi familia, siempre.

A Toni, que sé que desde allí arriba, junto con Álvaro, estáis haciendo fuerza para que esto salga, os echo muchísimo de menos.

A mis suegros Reme y Paco, porque no he podido tener más suerte de poder ser parte de vuestra familia. Gracias por vuestra ayuda, por cómo me cuidáis y queréis, porque sois mis segundos padres, los murcianicos. Gracias a todas mis cuñadas y cuñados, porque sois también como los hermanos y hermanas mayores que nunca he tenido. Y a todas las pequeñas, que alegran el alma cada vez que las veo.

A mis tíos Ramón, Marina y Alfonso, y a Marina, Pascual y Atenea, porque sois unos soles, porque me apoyáis y ayudáis con cualquier cosa que aparece en mi vida, en cada proyecto y en cada locura en la que me meto... y os quiero muchísimo.

A el meus tíos i tíes, Luis i Maribel, Jose i Conchi, i a les meues cosines i cosins, Alba, Irene i Roberto, Marta i Luis. Tinc moltíssima sort de tindre-us propet, perque cada vegada que he necessitat alguna cosa, heu estar ahí. Vos vull moltíssim. A la meua iaia, perquè no hi ha ningú com tú, de forta i valenta, de intel·ligent i graciosa, no saps el que t'admire i et vull.

A Bonzo, mi compañero de vida durante los últimos 12 años...creo que nadie se alegra más en el mundo por verme entrar por la puerta (aunque ahora tienes un fuerte

competidor). Creo que me conoces mejor que nadie, y a veces sabes que me encuentro mal antes incluso que yo (de hecho, supiste que estaba embarazada antes que yo). Sólo deseo que podamos contar con infinitas aventuras juntos más, ya que conseguir que tú seas infinito, que es lo que realmente deseo, es imposible.

A la meua germana, perquè es la persona més valenta, intel·ligent, dolça i graciosa que mai he conegut (ademés de moltíssimes coses més). No tinc paraules per a dir-te tot el que es vull i tot el que t'admire. No saps la sort, Dani, de tindre-la i no saps la sort que tinc jo de tindret a tú com a cunyat...eres el més millor del món. Mati, mi pequeño caballo o gran poni, que alegres la existencia con “esos movimientos de cadera” de felicitat pura.

A vosaltres, papà i mamà. Perquè de veritat que tot açò seria imposible sense vosaltres. Perquè creieu en mí el que jo no crec, perquè em voleu el que jo a vegades no em vull, perquè confieu en mí el que jo no confie. Perquè no hi ha moment en la meua vida que no esteu, ajudant, animant, abraçant, espentant, curant, secant les llàgrimes, acompanyant. Crec que no hi han prou paraules, ni fulls, ni agraïments que puguen resumir el que realmente senc i el que realmente feu per mí. No podeu imaginar-vos el que “vos” admire i el que “vos” vull...

Pablo...no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. No se me ocurre un mejor compañero de vida, ni un mejor papá para Marc. Porque te mereces, como mínimo, ser coautor de esta tesis. Porque me has acompañado y apoyado incondicionalmente, porque has trasnochado conmigo para ayudarme a apagar fuegos, porque nos hemos acompañado por media Europa y porque cada mañana nos seguimos eligiendo para compartir todo lo que nos queda por delante...incluida la aventura de ver crecer a nuestro pequeño Marc. Gracias por sumar, gracias por hacerme reír, gracias por tener tanta paciencia, gracias por estar ahí. Te quiero infinito.

Marc, vas arribar de sorpresa a la nostra vida, i cada día ens sorprens encara més. Perquè eres la cosa més bonica del món sencer, perquè mai hagera imaginat que podria ser tant feliç, perquè no hi ha cosa que disfrute més que ser la teua mami i vore cada día com creixes, com descobreixes coses, com mires el món...i no vull perdre ni un segon de aixó.

La maternitat va atropellar el doctorat, i el doctorat va atropellar la maternitat...es hora de tancar esta bonica etapa de la meua vida per poder estar amb la cosa més bonica de la meua vida. Es vull moltíssim Marc.

No podría imaginar uns pares millors, una germana i cunyat millors, un compañero de vida mejor y un fill com tú, Marc. Soy la persona más afortunada del mundo, así que todo lo que venga a partir de ahora, sólo puede hacer sino endulzarme aún más la vida.

A mis iaios, que desde dónde estéis, espero que os sintáis orgullosos de mí. Os echo tantísimo de menos y os quiero tanto...A la tía Soliu, que desde el cel sé que estàs cuidant de mí. Al iaio Luis, que sé que estàs ahí, mirant de prop, perquè segur que estàs ajudant a que tot isca bé, com has fet sempre...et trobe a faltar i es vull moltíssim.

Agradecimientos

Estos años han sido toda una aventura. Ha sido un camino largo y lleno de muchos aprendizajes. Gracias a haber tomado la decisión de iniciarlo, y además en el Instituto de Neurociencias, me he encontrado con gente maravillosa, con historias increíbles, con aprendizajes inolvidables y con momentos absolutamente únicos.

Para empezar, caer en el laboratorio 138 fue una gran suerte. Creo que no había laboratorio con más buen ambiente en todo el instituto. Gracias a Eduardo, porque sin tu ayuda esto no hubiera sido posible. Me acuerdo una de las primeras reuniones en las que hablábamos del proyecto de tesis en los que me confesaste que la idea se te había ocurrido en la ducha. Pensé...genial, este es mi sitio. Siempre con una sonrisa, y dispuesto a echar una mano en lo que he necesitado. Gracias por contagiar las ganas y los conocimientos por la neurociencia y neuroanatomía. Además, durante este tiempo he aprendido muchísimo de todo porque eres un pozo de conocimientos: de anatomía, de gestión, de anécdotas e historias curiosas e interesantes para utilizar en clase... Pero también, de radio patio y las historias pasadas, presentes y futuras de todos y todas las que pasaban por el instituto y/o laboratorio, que hacía que desconectaras del estrés y del mal cuerpo si un experimento no salía, o que las comidas de tupper en el comedor, se convirtieran por un momento en ratos en “familia”. Gracias por haberme ayudado a terminar con este gran monstruo. Diego, contigo las risas, los chistes, el “aipa ahí” cuando apareces por el laboratorio han sido un regalo. Voy a echar de menos llorar de la risa en cualquiera de nuestras celebraciones improvisadas, san jueves, san viernes o san lunes, con cualquiera de tus historias o anécdotas. Aún me acuerdo cuando creíamos que era una “sarnosa” (esa larga y divertida historia), y viniste a darme un abrazo que me rompió en mil pedazos, y que hizo de ancla en un momento complicado. Gracias por enseñarme las técnicas “old school” de laboratorio, a querer y disfrutar la neurociencia como lo haces tú y todos tus sabios consejos, de la vida y del laboratorio.

A Paqui, porque sin ti, esto, imposible. Tu paciencia y trabajo es increíble. Mama pato y los patitos, aún no sé cómo puedes aguantarnos a mí y a todos los alumnos, que como yo, íbamos detrás de ti como polluelos preguntándote o pidiendo cosas. Porque aún no he

visto cosa que no sepas cómo funciona, cómo hacerla o cómo solucionarla. Mil millones de gracias por toda la ayuda durante todos estos años...eres la mejor.

Además, cuando llegué, coincidí con el mejor team, el neural tube team. Creo que llevaba pocas semanas cuando me dijeron, ¿Iris, te vienes a tatuarte un tubo neural? Creo que dije que sí mientras bajaba las escaleras, poniéndome la chaqueta. Adri, aún no puedo parar de reírme cada vez que me acuerdo de las historias cuando nos bebíamos alguna cerveza de más y los filtros se desvanecían un poco. La risa de Sara, de esas que se pega y convierte tu día triste en uno bonito, con esas fantásticas preguntas y reflexiones sobre términos en castellano que jamás te hubieras preguntado, algo impensable. Fran, pura dulzura y amor, que no sabes la suerte de haberte quedado relativamente cerca para esos pitis de auxilio y esas fuerzas en el último tramo de la tesis, que junto con Carla, me hicisteis no tirar la toalla. Carla, que sería de tí sin esas largas conversaciones, en la distancia, en persona...has sido un pilar fundamental en este viaje que acaba, y en mi vida en general, gracias y mil gracias, os quiero a los dos muchísimo. Vero, que si ya veníamos de tener aventuras previas, y no pocas, a la era de laboratorio, esto vino a darnos muchas más. Compis de uni, compis de tesis, compis de tanto y espero que nos queden por contar muchísimas historias más...que vienen años bonitos y llenos de cosas increíbles, y si estás cerca, serán mucho mejores. Abra, llegaste tarde para mi gusto, porque me hubiese encantado haberte podido tener antes en mi vida, solucionador de todo, me has salvado de tantas que no sé que hubiese hecho sin ti. Espero que al menos, ahora lo que nos quede sean historias que sumar. Cuánto os quiero, maricarmenes.

Al laboratorio 102, que, sin Alicia, Ana y Raquel, tampoco hubiese sido lo mismo. A Ana y Raquel, que ahora os tengo cerca en departamentos, pero antes, teneros cerca en el laboratorio era una suerte. Mil gracias a Alicia, por tanta ayuda cuando estaba tan y tan perdida. Igual que mis compis de tesis Tono y Claudia, por la compañía, las risas, los san todos y las happy hours. A Rita, que els cafenets i el esmorzarets sense tú no eren igual. La súper triatleta i la súper chispes, ha sigut una sort coincidir amb tú. A Álvaro, que tu paso por el lab trajo aire fresco y compañía de la buena.

A Salva y a Emilio, por dejarme formar parte de este laboratorio y por cada uno de los consejos de las labmeeting, que me han hecho crecer y aprender tantísimo.

A Pili, que da gusto verte siempre con esa sonrisa, gracias por echarme una mano cuando me he atascado con los Imaris y con tantas cosas. Aún me acuerdo del viaje a Berlín, de perdernos en el metro, del paraguas atascado...y me apetece retroceder en el tiempo sólo por volvernos a reír como ese día. A Raquel, por haberme ayudado tantísimo, por ser tan dulce, tan divertida y con ese humor tan ácido. No sé qué hubiese sido todo este tiempo sin ti por el laboratorio, sin esos ratos, risas y crisis cuando algo no salía como esperábamos...que suerte haber coincidido contigo. Ana, por la misma razón, por ser tan tierna y ayudar siempre en lo que he necesitado. Menos mal que os sigo teniendo relativamente cerca a las dos...

A Nica, que llegaste más tarde al lab pero eres la alegría del departamento, y ahora decir cualquier número es peligroso porque siempre tienes una repuesta, la más de acertada para hacerte saltar las lágrimas. A M^o Carmen y M^a Luisa, que compartir congresos y cervezas, además de cosas de lab, siempre da mucha alegría. A Mari Paz, que se te echa de menos, y a Marusa, porque sin ti todo sería un caos y muchísimo más aburrido.

A todos aquellos y aquellas estudiantes que habéis pasado por el laboratorio y habéis dejado tanta huella, y para aquellos que no sólo pasaron, sino que se quedaron de alguna manera en mi vida, como Elena, Víctor y David (gracias por hacerme reír tantísimo, por tus stickers y por las conversaciones tan maravillosas que tenemos. Espero que la próxima visita sea dentro de muy poquito).

A mis vecinos, estudiantes del laboratorio de Ramón Reig y Cristina Márquez, por dedicar vuestro tiempo a enseñarme técnicas y a perfeccionar las cirugías. A Jovana y Verona, por tener paciencia infinita conmigo y ayudarme tantísimo con los time lapse. A Trini, porque es una alegría cruzarse contigo por el pasillo, eres un amor. A Eva y Trini, que han tenido tanta paciencia y me han ayudado tanto con los genotipos.

A todos y todas aquellas que formasteis parte en mi estancia en Magdeburg. To Matthias, for letting me stay in his lab and learning so many things from him (Danke für alles, was Sie mich gelehrt haben). To Damaris, because without you, it wouldn't have been possible, thank you for translating for me, for teaching me how the lab works and for bringing me the best sweets I have ever tasted and for taking such good care of me (Vielen Dank für alles Damaris). A Rodrigo, que me salvó varios experimentos regalándome anticuerpos, y que me salvó por otro lado, haciendo cócteles chilenos para esas tardes-noches de risas y de recuperar energía, de desconectar del trabajo y de olvidarnos lo lejos que estábamos todos de casa. A todos los que coincidimos allí y que fue una suerte encontraros en mi camino (Irene, Katharina, Janosch, Lucía, Duxan, Alejandro), en especial a Sheila, Tati y a Andrés. Andrés, espero verte pronto por aquí para darte un abrazo bien merecido por todas las charlas que nos debemos con un cafetito delante solucionando el mundo. A Ernesto, per acollir-me en la teua casa tots els caps de setmana, ensenyar-me tots els millors raconets de Berlín i per tot el que ha significat tindret propet tot aquest temps, sobre tot a la pandèmia.

A todos y todas las compis del INA que han hecho que mi paso por allí y mi existencia en general, fuera mucho más llevadera por vuestra compañía: Kika y Álvaro, a Belén y Mar, a Juan Antonio y todo su equipo, a Óscar, a Lorenzo y a todos/as los que coincidíamos comiendo cada día en el comedor, que hacían que comer fuera de casa no fuera tan malo, porque se convertía en un rato en familia. A Alex y Raquel, que compartir cafés, pitis y charlas con ellos ha sido un placer. A Quique, por tus preguntas, reflexiones y tu curiosidad infinita, porque de mayor quiero ser como tú.

A mis compañeras de universidad, porque todo esto no hubiese empezado sin ellas, sin su apoyo y sin su empujón para que me aventurara en esta locura. Gracias a Alicia por ser guía todo este tiempo, por dedicar tanto a la terapia ocupacional y por haber peleado para tenerme en el equipo. Gracias Miriam, porque sin ti en mi vida, yo no sé qué haría. Gracias por animarme, ayudarme, hacerme de agenda y recordatorio, por sostener mi caos habitual y darme los mejores consejos, por hacer de faro durante todos estos años. Gracias Paula, por haberme dado fuerzas para seguir cuando casi tiro la toalla, por confiar en mí y por pelear por que siga con vosotras. Eva y Desi, por preocuparos por mí, por creer en

mí, por ayudarme incondicionalmente cada vez que os he necesitado. A Cris, por ser junto a mí, compañera de batalla. Gracias chicas, porque sois las mejores, y junto al resto de compis, Vero, Paula, hacemos el mejor equipo del universo. Además, sin Dani, Rocío, Irene, y demás estudiantes de InTeO, que hacen que sumemos aún más, porque contagian energía y ganas. A todo el resto del equipo de uni, que son una maravilla de profesoras y da gusto compartir la pasión por la terapia ocupacional y las ganas por enseñar con gente tan increíble como vosotros y vosotras. A los y las alumnas de TO, en especial a Noemí, Javi y Elena, porque la cuarentena fue soportable gracias a vosotros/as, vuestra compañía vuestro apoyo y las charlas eternas en el grupo.

Doy las gracias a todos y todas las compis del campus, PAS, conserjería, limpieza... Porque sin cada uno de ellos y ellas, todo sería mucho más complicado. Llegar cada día a trabajar y tener un buenos días, un saludo, una charla de pasillo, un, tienes mala cara Iris, ¿estás bien?...eso no tiene precio, porque forman una parte esencial de mi día a día, y más, cuando pasas mucho tiempo en tu lugar de trabajo, acaba siendo parte de la familia después de tantísimos años.

A la familia elegida, a César y Pau, que son seres de luz que me dan energía, oxígeno y ganas de cualquier cosa, porque sois los mejores y ya está. A Raúl, porque manda huevos que seamos del mismo pueblo e instituto y nos conozcamos de verdad en Berlín...no sabes la alegría que me das cada vez que apareces por la puerta, con unas empanadillas o por usar el aseo, o con unas pizzas en la mano, así, de repente y sin avisar, y llenando nuestra casa de alegría. A mis amigas “de toda la vida”: a Jessy, Noe, Patri, Elena, Esther y Esme. De toda la vida porque llevamos literalmente toda la vida juntas...y porque siempre habéis estado ahí, aunque yo durante mucho tiempo he desaparecido por trabajo o por meterme en fregaos de este tipo, pero siempre acabáis contando conmigo para todo, y eso es tener muchísima suerte.

A Gorka y Gus, porque cada vez que hablamos me preguntáis, nena...¿cómo llevas la tesis?, y tengo muchas ganas de deciros, pues ya está nenico, e ir a Madrid a veros.

A Ana Guardiola y los psicodramáticos, porque cada vez que os veo en persona o por video conferencia, me llenáis las pilas para semanas. Es una suerte compartir tanto y sin filtros con vosotros y vosotras...no hay sitio dónde me pueda sentir más desnuda y libre y a la vez más cuidada que con vosotros. Sois tabla en mitad del océano.

A todos los que en algún momento de mi vida han estado ahí, gracias por aguantar mis “tengo trabajo”, “no podré estar”, “tengo que entregar algo mañana”, “tengo turno”...porque prometo, tener más tiempo para mí y para todos y todas los que forman parte de mi vida.

A Amalia y familia, porque sois y seréis mi familia, siempre.

A Toni, que sé que desde allí arriba, junto con Álvaro, estáis haciendo fuerza para que esto salga, os echo muchísimo de menos.

A mis suegros Reme y Paco, porque no he podido tener más suerte de poder ser parte de vuestra familia. Gracias por vuestra ayuda, por cómo me cuidáis y queréis, porque sois mis segundos padres, los murcianicos. Gracias a todas mis cuñadas y cuñados, porque sois también como los hermanos y hermanas mayores que nunca he tenido. Y a todas las pequeñas, que alegran el alma cada vez que las veo.

A mis tíos Ramón, Marina y Alfonso, y a Marina, Pascual y Atenea, porque sois unos soles, porque me apoyáis y ayudáis con cualquier cosa que aparece en mi vida, en cada proyecto y en cada locura en la que me meto... y os quiero muchísimo.

A el meus tíos i tíes, Luis i Maribel, Jose i Conchi, i a les meues cosines i cosins, Alba, Irene i Roberto, Marta i Luis. Tinc moltíssima sort de tindre-us propet, perque cada vegada que he necessitat alguna cosa, heu estar ahí. Vos vull moltíssim. A la meua iaia, perquè no hi ha ningú com tú, de forta i valenta, de intel·ligent i graciosa, no saps el que t'admire i et vull.

A Bonzo, mi compañero de vida durante los últimos 12 años...creo que nadie se alegra más en el mundo por verme entrar por la puerta (aunque ahora tienes un fuerte

competidor). Creo que me conoces mejor que nadie, y a veces sabes que me encuentro mal antes incluso que yo (de hecho, supiste que estaba embarazada antes que yo). Sólo deseo que podamos contar con infinitas aventuras juntos más, ya que conseguir que tú seas infinito, que es lo que realmente deseo, es imposible.

A la meua germana, perquè es la persona més valenta, intel·ligent, dolça i graciosa que mai he conegut (ademés de moltíssimes coses més). No tinc paraules per a dir-te tot el que es vull i tot el que t'admire. No saps la sort, Dani, de tindre-la i no saps la sort que tinc jo de tindret a tú com a cunyat...eres el més millor del món. Mati, mi pequeño caballo o gran poni, que alegres la existencia con “esos movimientos de cadera” de felicitat pura.

A vosaltres, papà i mamà. Perquè de veritat que tot açò seria imposible sense vosaltres. Perquè creieu en mí el que jo no crec, perquè em voleu el que jo a vegades no em vull, perquè confieu en mí el que jo no confie. Perquè no hi ha moment en la meua vida que no esteu, ajudant, animant, abraçant, espentant, curant, secant les llàgrimes, acompanyant. Crec que no hi han prou paraules, ni fulls, ni agraïments que puguen resumir el que realmente senc i el que realmente feu per mí. No podeu imaginar-vos el que “vos” admire i el que “vos” vull...

Pablo...no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. No se me ocurre un mejor compañero de vida, ni un mejor papá para Marc. Porque te mereces, como mínimo, ser coautor de esta tesis. Porque me has acompañado y apoyado incondicionalmente, porque has trasnochado conmigo para ayudarme a apagar fuegos, porque nos hemos acompañado por media Europa y porque cada mañana nos seguimos eligiendo para compartir todo lo que nos queda por delante...incluida la aventura de ver crecer a nuestro pequeño Marc. Gracias por sumar, gracias por hacerme reír, gracias por tener tanta paciencia, gracias por estar ahí. Te quiero infinito.

Marc, vas arribar de sorpresa a la nostra vida, i cada día ens sorprens encara més. Perquè eres la cosa més bonica del món sencer, perquè mai hagera imaginat que podria ser tant feliç, perquè no hi ha cosa que disfrute més que ser la teua mami i vore cada día com creixes, com descobreixes coses, com mires el món...i no vull perdre ni un segon de aixó.

La maternitat va atropellar el doctorat, i el doctorat va atropellar la maternitat...es hora de tancar esta bonica etapa de la meua vida per poder estar amb la cosa més bonica de la meua vida. Es vull moltíssim Marc.

No podría imaginar uns pares millors, una germana i cunyat millors, un compañero de vida mejor y un fill com tú, Marc. Soy la persona más afortunada del mundo, así que todo lo que venga a partir de ahora, sólo puede hacer sino endulzarme aún más la vida.

A mis iaios, que desde dónde estéis, espero que os sintáis orgullosos de mí. Os echo tantísimo de menos y os quiero tanto...A la tía Soliu, que desde el cel sé que estàs cuidant de mí. Al iaio Luis, que sé que estàs ahí, mirant de prop, perquè segur que estàs ajudant a que tot isca bé, com has fet sempre...et trobe a faltar i es vull moltíssim.

