

UCH-FC
MAG-B
W 429
C. 1

**Estudio del Patrón de Expresión de
Marcadores Moleculares Lámina-Específicos en
el Pajío de Aves**

**Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Camila Andrea Weiss Garrido

Agosto, 2016

Director de Tesis Dr: Jorge Mpodozis Marin

Co-Director de Tesis: Alexander Vargas Milne



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

Camila Andrea Weiss Garrido

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de Mayo de 2016.

Director de Tesis:
Dr. Jorge Mpodozis M.

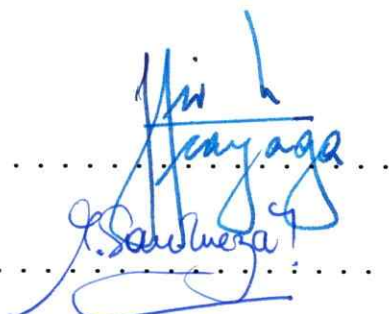
.....


Co-Director de Tesis
Dr. Alexander Vargas M.

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga U.

.....


Dra. Magdalena Sanhueza T.

.....

A Boris, Ignacio y Verónica.



Finalizo mi etapa de Magister en el laboratorio El Rayo, la cual comenzó a tejerse como un acercamiento al EvoDevo de anfibios hace varios ovillos atrás, y esperando continuar mi camino entre peces y moluscos. Cursé la Licenciatura en Ciencias mención Biología (una de las mejores etapas de mi vida) entre las aulas y los pastos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, luego de haber salido de un tradicional colegio católico donde aprendí a escaparme de la misa. En este colegio conocí a Chino Moreno, Ranaval, Martín y Anita, mis maestros y guías al comienzo de este camino tortuoso pero gratificante. Durante la básica cultivé amistades de esas que se mantienen durante toda la vida, de esas que sacan sonrisas y llantos de verdad. Tuve una infancia feliz y extensa, junto al mejor compañero de juegos, risas, experimentos, buenos recuerdos, cacerías de lagartijas y construcción de insectarios que nunca llegaron a buen término. Desde pequeña me atrajo mucho la naturaleza y el trabajo en laboratorio, jugaba a recolectar cosas del jardín y las miraba al microscopio, descubriendo el mundo en miniatura. Fui alentada por mis padres a ser curiosa, a hacerme preguntas, a conocer plantas y animales, a hacer terrarios y a jugar con chanchitos de tierra. Nací un 19 de Agosto en Santiago de Chile, dicen que cerca de las 8 AM, pero jamás lo he comprobado.

Agradecimientos

De adentro hacia afuera, agradezco primero a mi familia por la paciencia, el apoyo y el cariño que me han brindado incondicionalmente durante los distintos procesos de este trabajo. Agradezco en este mismo sentido a Sebastián, mi compañero infalible, y a su amorosa y acogedora familia. A mis tutores, Alex y Jompoma, por darme la oportunidad de realizar mi tesis dentro de sus espacios de trabajo y por enriquecer mi formación científica y humana, al igual que Marín y Lete. A Elisa y Solano, quienes han sido un apoyo muy importante tanto emocional como profesional. A todos los rayeros presentes y ausentes sin excepción, con quienes compartí tiempo, espacio y humores, en especial a mis amigas Flo, Rosana, Sara y Micca. Gracias por arreglar conmigo tantos mundos diferentes. Al Dr. Máximo Rompiato por ayudarme a parar esta tesis y ofrecerme sin querer una salida. A Pedro, al pollo y a Smith, quienes me ayudaron cuando las dificultades parecían imposibles. A Cristian y a Chico, por la disposición y la dedicación que pusieron al enseñarme mis primeros experimentos. A Cristina, por enseñarme y acompañarme con mucho cariño y paciencia en laboratorio ajeno. A mis amigas de la vida por ser soporte emocional incondicional, a los cabros del barrio por ser los más mejores desde tiempos inmemoriales. A todos mis amigos del pregrado. En fin, a todos quienes me tendieron una mano durante este largo proceso de crecimiento y aprendizaje. Gracias totales.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
La neocorteza: particularidades y organización.....	4
DVR de las aves.....	7
Evidencia reciente: organización interna del DVR visual.	9
Marcadores moleculares lámina-específicos	12
1.1 Planteamiento del Problema.....	15
1.2 Hipótesis	17
1.3 Objetivo general	18
Objetivos Específicos:.....	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1 Selección de marcadores de interés	19
2.2 Determinación de secuencias y diseño de partidores.	20
2.3 Obtención de pollos de estadíos E20, P0, P7 y P14-adulto.....	20
2.4 Extracción de RNA.	21
2.5 Transcripción reversa.	21
2.6 PCR.....	22
2.7 Ligación y transformación.	24
2.8 Extracción del DNA plasmidial.....	25
2.9 Linearización del DNA plasmidial.	26
2.10 Síntesis de ribosondas anti sentido marcadas con digoxigenina.	27

2.11 Procedimientos histológicos para los ensayos de ISH.	28
2.12 Hibridación <i>in situ</i> (ISH).	29
2.13 Identificación de núcleos en el palio.	30
2.14 Conteo celular.	31
3. RESULTADOS	34
3.1 Selección de marcadores.....	34
3.2 Amplificación y clonamiento de fragmentos seleccionados.....	34
3.3 Estudio del patrón de expresión de marcadores de identidad de capa en el DVR visual de <i>G. gallus</i>	35
3.4 Estudio del patrón de expresión de CALB1 en el palio visual de <i>G. gallus</i>	37
3.4.1 Expresión de CALB1 en el palio visual de <i>G. gallus</i> : ensayos de hibridación <i>in situ</i>	37
3.4.2 Expresión de CALB1 en el palio visual de <i>G. gallus</i> : conteo celular en P0.	38
3.4.3 Expresión de CALB1 en el palio visual de <i>G. gallus</i> en el desarrollo.	46
3.5 Estudio del patrón de expresión de ROR β en el palio visual de <i>G. gallus</i>	54
3.5.1 Expresión de ROR β en el palio visual de <i>G. gallus</i> : ensayos de hibridación <i>in situ</i>	54
3.5.2 Expresión de ROR β en el palio visual de <i>G. gallus</i> en el desarrollo.....	58
3.6 Expresión de ROR β en otras regiones del palio de <i>G. gallus</i>	61
3.7 Expresión de ROR β en otras regiones del palio de <i>G. gallus</i> en el desarrollo.	63
4. DISCUSIÓN.....	67
4.1 Selección de marcadores.....	70
4.2 Amplificación y clonamiento de fragmentos seleccionados.....	71
4.3 Estudio del patrón de expresión de marcadores de identidad de capa en el DVR visual de <i>G. gallus</i>	72
4.4 Marcadores moleculares en el DVR visual: dinámica espacial.	74
4.5 Marcadores moleculares en el DVR visual: dinámica temporal.....	78
4.6 Marcadores moleculares fuera del DVR visual: dinámica espacial y temporal de Ba.....	80

4.7 Marcadores moleculares fuera del DVR visual: dinámica espacial y temporal de FL.....	82
4.8 Comentario final.....	83
5. CONCLUSIONES	85
6. BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXO	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados y transcritos amplificados.	23
Tabla 2. Programa utilizado para las reacciones de PCR.	24
Tabla 3. Enzimas utilizadas en la linearización y síntesis de sonda	28
Tabla 4. Resumen de resultados para secuenciaciones	36
Tabla 5. Resumen de resultados para el conteo celular	41
Tabla 6. Resumen de resultados para el conteo celular en el desarrollo.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dos hipótesis para posibles homologías entre el palio de aves y el palio de mamíferos.	2
Figura 2. Organización del palio sensorial en mamíferos y aves.....	6
Figura 3. Sectorización hodológica interna del núcleo E.....	12
Figura 4. Esquema del vector pGEM [®] -T Easy.	26
Figura 5. Composición vs campo oscuro para identificación de núcleos	32
Figura 6. Conteo celular.....	33
Figura 7. Amplificación de cDNA.....	37
Figura 8. Ensayos de hibridación in situ: patrón de expresión de CALB1 en el DVR visual de G. gallus: vista coronal estadio P0	39
Figura 9. Ensayos de hibridación in situ: patrón de expresión de CALB1 en el DVR visual de G. gallus, vista sagital estadio P0	40
Figura 10. Detalle de la expresión de CALB1 en las regiones del DVR visual	41
Figura 11. Distribución de las densidades celulares en individuo P0, serie sagital	44
Figura 12. Distribución de las densidades celulares en individuo P0, serie coronal	45
Figura 13. Secuencia temporal de la expresión de CALB1.....	47
Figura 14. Secuencia temporal de la expresión de CALB1: densidades celulares	51
Figura 15. Patrón de expresión de CALB1 en el tiempo	53

Figura 16. Ensayos de hibridación in situ: patrón de expresión de ROR β en el DVR visual de <i>G. gallus</i> en estadio P0.....	55
Figura 17. Ensayos de hibridación in situ para ROR β : vista sagital en estadio P14.....	56
Figura 18. Ensayos de hibridación in situ para ROR β : vista coronal en estadio P14.....	58
Figura 19. Patrón temporal de expresión de ROR β , vista sagital	60
Figura 20. ROR β en otros núcleos del palio sensorial en estadio P14-21, vista sagital ..	62
Figura 21. Patrón temporal de expresión de ROR β fuera del DVR visual: núcleo Ba, vista sagital	63
Figura 22. Patrón temporal de expresión de ROR β fuera del DVR visual: núcleo FL, vista sagital	65
Figura 23. Ensayos de ISH: patrón de expresión de COUPTF2 y BRN2 en la neocorteza de <i>M. musculus</i>	96
Figura 24. Ensayos de ISH: patrón de expresión de ROR β y CALB1 en la neocorteza de <i>M. musculus</i>	97
Figura 25. Ensayos de ISH: patrón de expresión de CUX1 y CUX2 en la neocorteza de <i>M. musculus</i>	98
Figura 26. Ensayos de ISH: patrón de expresión de PLXND1 y PCP4 en la neocorteza de <i>M. musculus</i>	99
Figura 27. Ensayos de ISH: patrón de expresión de ER81 y FOXP2 en la neocorteza de <i>M. musculus</i>	100

Figura 28. Ensayos de ISH: patrón de expresión de EAG2 en la neocorteza de *M. musculus*.....101

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: alineamiento de secuencias de tipo local.

cDNA: DNA copiado

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNTP: deoxi nucleótido trifosfato

DVR: dorsal ventricular ridge

h: horas

IDT: Integrated DNA Technologies

IHQ: inmunohistoquímica

ISH: hibridación in situ

kb: kilobase

LB: Luria-Bertoni

M: molar

mM: milimolar

mm: milímetro

mRNA: RNA mensajero

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RNA: ácido ribonucleico

RNasa: ribonucleasa

RMP: revoluciones por minuto

RT: transcripción reversa

SDS: dodecilsulfato de sodio

SSC: citrato de sodio salino

s: segundos

μm : micrómetro

Abreviaturas núcleos cerebrales

Ba: basalís

E: entopálio

FL: field L

H: hipocampo

HP: hiperpálio

LSt: estriado lateral

M: mesopálio

MC: mesopálio caudal

MVex: mesopálio ventral externo

N: nidopálio

NC: neocorteza

Ni: nidopálio intermedio

OB: bulbo olfatorio

Ov: núcleo Ovoidalis

Rt: núcleo Rotundo

St: estriado

SP: Subpálio

RESUMEN

El palio es la estructura más rostral y dorsal del telencéfalo en vertebrados. En mamíferos, esta estructura se conoce como corteza cerebral, y se organiza en seis capas diferentes, conectadas sinápticamente mediante procesos columnares, orientados radialmente. El palio de las aves presenta importantes diferencias anatómicas y fisiológicas con la corteza sensorial de los mamíferos, pues el palio de las aves tradicionalmente ha sido considerado como un conjunto de núcleos conectados linealmente en lugar de una estructura laminada.

El *dorsal ventricular ridge* o DVR es uno de los componentes principales del palio de las aves, y está formado por una región interna, el nidopalio, y una región externa, el mesopalio. El nidopalio contiene áreas discretas que reciben proyecciones auditivas, multisensoriales y visuales. Avances recientes en la anatomía del DVR visual han mostrado que los núcleos que lo componen se organizan mediante procesos columnares, de manera similar a lo que se observa en la corteza de mamíferos.

El presente trabajo explora el patrón de expresión de marcadores moleculares de identidad celular lámina-específicos, que tradicionalmente se han utilizado en mamíferos, con el fin de evaluar la identidad celular en el DVR de aves. El propósito de este análisis es comprobar si estos marcadores moleculares se expresan en el DVR en concordancia con el patrón hodológico que el DVR exhibe y además constatar las posibles equivalencias que se encuentren entre esta estructura y las distintas capas corticales de mamíferos. Los resultados obtenidos muestran que el patrón de expresión de estos mRNA en el DVR se relaciona estrechamente con el patrón hodológico del DVR, revelando la existencia de un patrón de expresión temporalmente dinámico, en lugar de la existencia de características estables en el tiempo.

Estos resultados sugieren que los marcadores moleculares no estarían indicando características estáticas de las poblaciones celulares que los expresan, sino que más bien se relacionan con contextos operacionales dinámicos que están ocurriendo en estas poblaciones a medida que el cerebro se desarrolla. Así, considerando los resultados mencionados anteriormente y las relaciones operacionales que exhiben las diferentes poblaciones celulares del DVR visual, se sugiere en este trabajo que el concepto de identidad molecular no hace referencia a un conjunto de características invariables en el tiempo, sino que más bien alude a un contexto dinámico presente en una población celular en un momento específico del desarrollo.

ABSTRACT

The pallium is the more rostral and dorsal region of the vertebrate telencephalon. In mammals this structure is organized as a six-layered cortex, in which different layers are synaptically connected by radially oriented processes, called columns. The avian pallial region and the mammalian sensory cortex show strong anatomical and physiological differences, being one of these differences the fact that the avian pallium has been traditionally considered as a set of linearly related nuclei instead of a layered structure.

The dorsal ventricular ridge, or DVR, is one of the main components of the avian pallium, and is formed by an inner region, the nidopallium and a dorsal region called mesopallium. The nidopallium contains discrete areas that receive auditory, multisensory and visual projections. Recent findings on the anatomical organization of the visual DVR have shown that these nuclei embodied a columnar organization that closely resembles that of the mammalian neocortex.

The work presented here explores the expression pattern of molecular markers which have been traditionally used in mammals to test cellular identity in the visual DVR of birds. The purpose of this analysis is to establish whether these molecular markers are expressed according to the hodological pattern that avian DVR exhibits, and to find possible equivalences between the DVR and the different layers of the mammalian cortex. The results show that the mRNA expression of these molecular markers in the DVR and its hodological pattern are tightly related, revealing the existence of a dynamic temporal expression pattern instead of time-stable features.

These results suggest that molecular markers are not indicating static features; rather they are related to dynamic operational contexts occurring during the cerebral development. Thus, considering the above mentioned results and the operational relationships that cellular populations of the visual DVR exhibit, we suggest that the concept of molecular identity does not refer to an invariable set of characteristics of a cell population, but it refers to a dynamic context present in a cell population in a specific developmental stage.

1. INTRODUCCIÓN

El telencéfalo corresponde a la estructura más rostral del cerebro de los vertebrados y se origina desde el segmento más anterior del tubo neural en el desarrollo, el prosencéfalo (Monuki, Porter, & Walsh 2001; Redies & Puelles 2001). De la región dorsal del telencéfalo se origina el palio (manto), mientras que la región ventral da origen al subpalio. El palio consiste en cuatro subdivisiones principales, basadas en las posiciones topológicas desde las que éstas se originan en el tubo neural del embrión temprano: palio medial, palio lateral, palio ventral y palio dorsal (Butler & Hodos 2005, cap. 3). Estos campos se consideran homólogos para todos los vertebrados, dado que originan regiones funcionalmente equivalentes que comparten la expresión de factores de transcripción homeóticos característicos (Fernández et al. 1998; Redies & Puelles 2001).

El subpalio se considera homólogo y equivalente a lo largo de vertebrados en varios aspectos, tales como la conectividad que estas sub-regiones tienen con otros elementos del cerebro, la identidad molecular y celular de sus componentes, el patrón del desarrollo que siguen y las zonas ventriculares desde donde se originan (Butler, Reiner, & Karten 2011; Chen et al. 2013; Nomura et al. 2008).

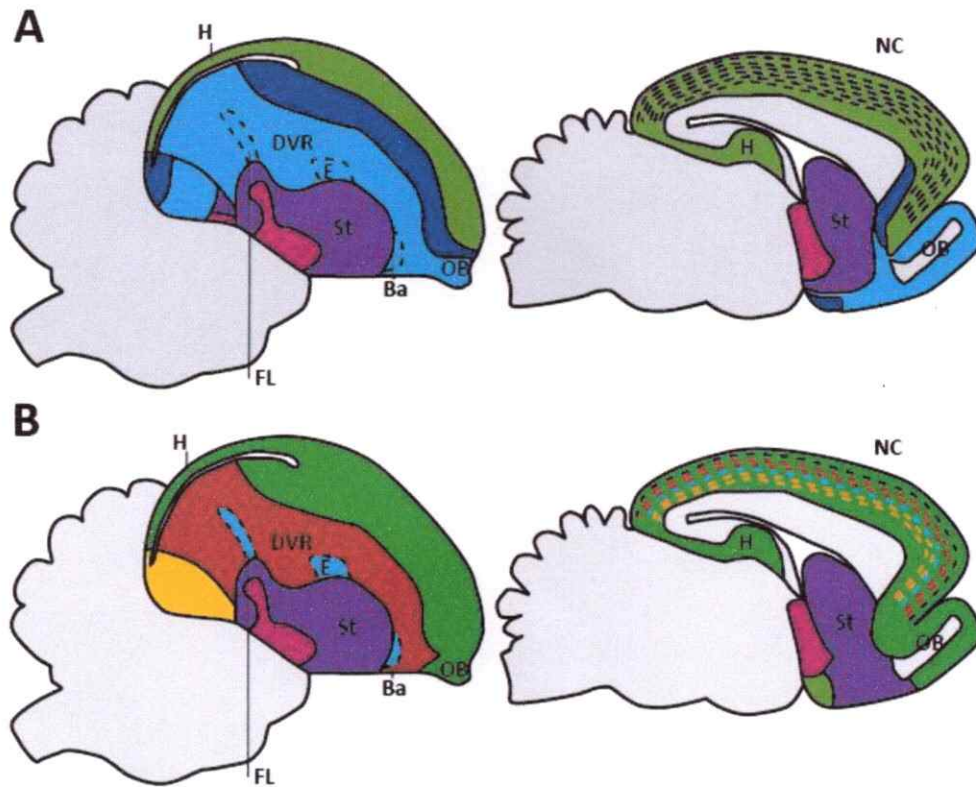


Figura 1. Dos hipótesis para posibles homologías entre el palio de aves y el palio de mamíferos. La discusión que existe en torno a las posibles homologías entre el palio de saurópsidos y el palio de los mamíferos ha sido abordada en torno a varias dimensiones. Existe una visión clásica (A) que propone equivalencias entre el DVR y las regiones amigdalares y el claustrum. Una hipótesis alternativa (B) propone que el DVR y ciertas capas de la corteza comparten identidad, siendo la capa 4 cortical homóloga a las estructuras sensorrecipientes del DVR (celeste). Las capas 2 y 3 se comparan con la población no sensorrecipiente del nidopallio (rojo) y las capas 5 y 6 con el arcopallio, región nidopallial de proyección en el DVR. En colores correspondientes se muestran las estructuras propuestas como equivalentes en ambas hipótesis. H: hipocampo, NC: neocorteza, St: estriado, OB: bulbo olfatorio, FL: field L, E: entpallio, Ba: basalis. Modificado desde Jarvis, 2009.

En amniotas (aves, reptiles y mamíferos) tal como en el resto de vertebrados, la equivalencia de las regiones subpaliales es ampliamente aceptada, sin embargo las equivalencias homológicas de los derivados de las divisiones paliales tempranas son el centro de un intenso debate. En mamíferos y aves, se han propuesto las siguientes equivalencias entre estructuras del cerebro adulto según la región a partir de la cual se originan (Puelles et al. 2000) (**Figura 1 A**) :

Palio medial -> hipocampo en ambos linajes.

Palio dorsal -> neocorteza en mamíferos e hiperpalio en aves.

Palio lateral -> corteza piriforme, claustrum en mamíferos y mesopalio en aves.

Palio ventral -> amígdala en mamíferos y nidopalio en aves.

Mientras que la equivalencia entre las estructuras derivadas del palio medial y dorsal es ampliamente aceptada, este no es el caso del palio lateral y ventral. En aves, tanto el palio lateral como el ventral dan origen al *Dorsal Ventricular Ridge* (DVR), que en términos generales está formado por dos grandes regiones, el mesopalio y el nidopalio. El DVR es la región más desarrollada del palio aviano y recibe proyecciones ascendentes de distintas modalidades sensoriales (auditivas, visuales y multisensoriales), las mismas que en mamíferos aferentan la capa 4 (Butler et al. 2011; Jarvis 2009; Wang, Brzozowska-Prechtl, & Karten 2010; Wild & Krützfeldt 2010). Esta

similitud hodológica que se observa es uno de los principales argumentos utilizados por Karten (1969) para sugerir una equivalencia entre el DVR de las aves y la neocorteza de mamíferos, hipótesis que en términos generales propone equivalencias entre grupos celulares que se suponen conservados para ambos linajes, según las proyecciones que generan y reciben, sin importar el arreglo espacial de las estructuras que las contengan (Figura 2A). Sin embargo esto es debatido debido a que ambas estructuras no derivan de las mismas regiones precursoras en el telencéfalo temprano, y a la gran diferencia citoarquitectónica evidente que existe entre las dos estructuras, pues el DVR está organizado en núcleos y la corteza se organiza en capas.

La neocorteza: particularidades y organización.

La neocorteza es una estructura conservada y exclusiva de los mamíferos, presente desde monotremas y marsupiales más basales y es el elemento de mayor tamaño y diferenciación en el telencéfalo de este grupo animal (Douglas & Martin 2007; Kaas 2013) .

La neocorteza recibe aferencias sensoriales topográficas desde el tálamo dorsal (Douglas & Martin 2010), que la delimitan en regiones especializadas en distintas modalidades. Su rasgo estructural más evidente es su disposición en láminas celulares, formadas por distintos tipos neuronales especializados, formando circuitos

interlaminares, recurrentes y dispuestos topográficamente. Esta característica permite maximizar su potencial conectivo y explicaría el alto grado de adaptabilidad que presenta el cerebro de los mamíferos (Kirkcaldie 2012). Las neuronas que conforman cada lámina o capa de la corteza presentan particularidades, de acuerdo al momento del desarrollo en que se originan, los marcadores que expresan (Molyneaux et al. 2007; Rowell et al. 2010; Watakabe et al. 2007) y la conectividad que presentan, entre las capas y con el resto del cerebro (Douglas & Martin 2004, 2007; Yamamori & Rockland 2006).

A pesar de que las distintas áreas corticales presentan variaciones estructurales, se ha propuesto un circuito canónico para toda la corteza (**Figura 2A**) (Douglas & Martin 2010). En este circuito, las células de la capa 4 (granular) son las que reciben aferencias sensoriales provenientes del tálamo y proyecta sobre la capa 2/3 (Frost & Caviness 1980; Luzzati 2015). Las células de la capa 2/3 (piramidal supragranular) son predominantemente piramidales pequeñas, participan del circuito local proyectando hacia la capa 4 y 5 y formando conexiones cortico-corticales entre distintas áreas de la corteza, tanto ipsilaterales como contralaterales (a través del cuerpo caloso; Ou, Qu, & Wang 2015). Por último, éstas proyectan hacia otros blancos del telencéfalo subpalial (estriado lateral, LSt). La capa 5 (piramidal profunda) está formada por células piramidales de gran tamaño (Ramaswamy & Markram 2015), que sostienen proyecciones principalmente descendentes hacia regiones subcorticales, incluyendo el LSt, regiones premotoras y motoras del mesencéfalo, cerebro posterior y algunos

segmentos de la medula espinal (Molnár & Cheung 2006; Oswald et al. 2013; Ramaswamy & Markram 2015). Finalmente la capa 6 (polimórfica) también proyecta hacia regiones sub-corticales formando principalmente un rebote cortical hacia el tálamo dorsal (Thomson 2010).

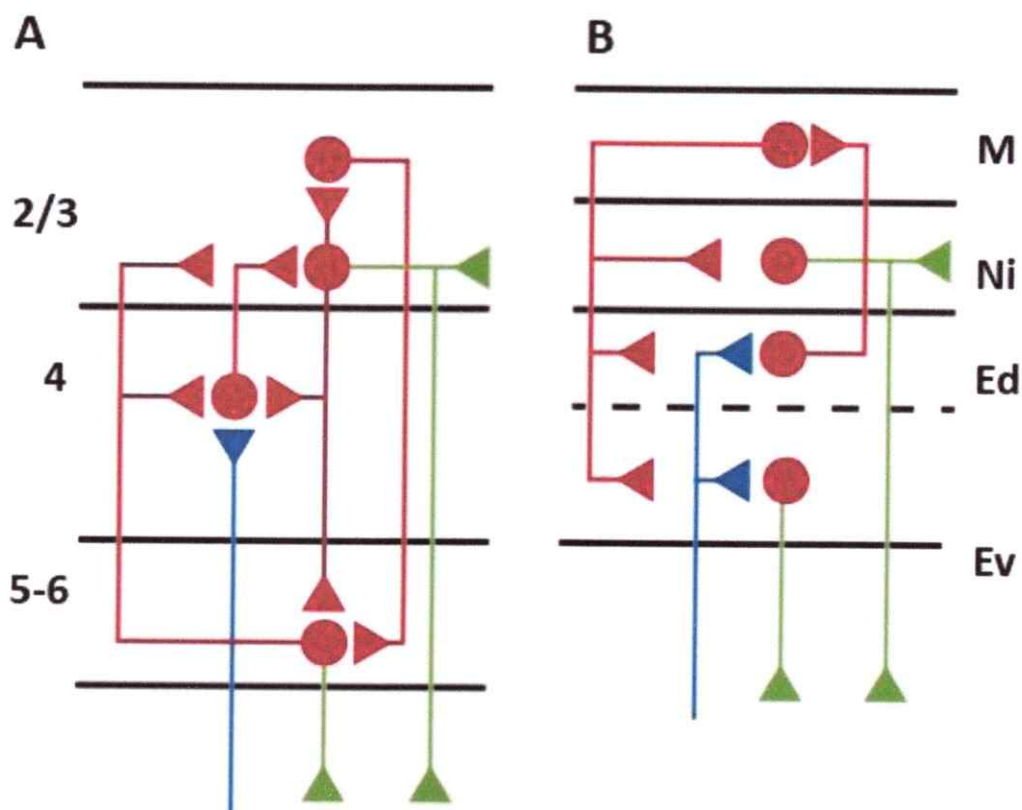


Figura 2. Organización del palio sensorial en mamíferos y aves. Se muestran los dos tipos de organización hodológica a comparar en este trabajo. En color azul las aferencias sensoriales que llegan al palio, en rojo las conexiones locales y en verde las eferencias hacia otras regiones paliales y subpaliales. **A:** esquema del circuito de la neocorteza. **B:** esquema de circuito del DVR.

DVR de las aves.

En saurópsidos las estructuras paliales más desarrolladas, y que reciben aferencias talámicas, son el palio dorsal (hiperpalio) y el *Dorsal Ventricular Ridge* (DVR), el cual corresponde a una protrusión del ventrículo lateral. El DVR está compuesto por varias poblaciones celulares, que incluyen neuronas tálamo-recipientes, interneuronas y neuronas de proyección descendentes, muy similares a las que se encuentran en la corteza de los mamíferos (Ahumada-Galleguillos et al. 2015).

El DVR se encuentra formado por el mesopalio y el nidopalio. El mesopalio corresponde a la región más dorsal del DVR, y el nidopalio se ubica hacia ventral, reconociéndose dentro de este último regiones discretas que reciben proyecciones sensoriales visuales (entopalio, E), auditivas (Field L, FL) y trigeminales (basalis, Ba). Cada una de estas áreas se ubica en el nidopalio ventral, directamente sobre el subpalio; dorsal a éste se encuentra una franja libre de terminales sensoriales llamada nidopalio intermedio (Ni) y dorsal al Ni se ubica el mesopalio (M) (Ahumada-Galleguillos et al. 2015; Benowitz & Karten 1976; Butler et al. 2011; Fredes et al. 2010; Husband & Shimizu 1999; Laverghetta & Shimizu 2003)

Clásicamente, el flujo sensorial dentro del palio de las aves se describió como un flujo lineal, donde los núcleos E, FL y Ba reciben las aferencias sensoriales y subsecuentemente proyectan hacia Ni, núcleo que proyecta finalmente hacia otras

regiones paliales. Finalmente, el arcopalio (de naturaleza nidopalial) da origen a proyecciones descendentes hacia núcleos motores. (Alpár & Tömböl 2000; Güntürkün & Kröner 1999; Husband & Shimizu 1999; Shimizu 2009).

De este modo, el patrón de organización descrita para el DVR sensorial es similar al patrón de las proyecciones sensorial hacia la corteza, donde diferentes regiones modalidad-específica dentro del palio reciben diferentes proyecciones sensoriales específicas desde los núcleos del tálamo dorsal, aunque no parece ser el caso de la organización interna del circuito, que fue descrita clásicamente como un flujo lineal. Sin embargo, no existe evidencia detallada respecto de las conexiones internas del DVR, como sí existe en el caso de los mamíferos.

A pesar de la poca evidencia hodológica que existe en torno a la organización interna del DVR, un estudio reciente en la región auditiva de éste constituye un significativo avance en torno a las equivalencias posibles entre el palio de mamíferos y el palio de aves (Wang et al. 2010). El DVR auditivo de aves es hodológicamente equivalente a la corteza auditiva en mamíferos y está compuesto por dos regiones citoarquitectónicas: el Field L (FL) nidopalial, que recibe aferencias talámicas, y el mesopalio caudal (MC), ubicado hacia dorsal de este núcleo. El estudio de Wang et al (2010) muestra que esta región del DVR se organiza como un complejo de grupos celulares ordenados laminarmente, ampliamente interconectados mediante columnas discretas de axones, orientadas perpendicularmente respecto de estas láminas celulares. Estas proyecciones columnares forman conexiones recíprocas, homotópicas y

topográficamente organizadas entre las células tálamo-recipientes del FL y las células adyacentes del MC. Basados en esta evidencia, los autores comparan esta organización del DVR auditivo con la organización columnar presente en la corteza auditiva de mamíferos, proponiendo la existencia de una equivalencia a nivel laminar, celular e intrínseco del circuito. Considerando esta nueva evidencia, existen estudios posteriores que han examinado con mayor detalle la organización interna de otras regiones del DVR.

Evidencia reciente: organización interna del DVR visual.

Recientemente, la organización interna del DVR visual ha sido descrita en mayor detalle por Ahumada et al (2015), encontrándose que el patrón de organización del DVR visual se asemeja al del DVR auditivo observado por Wang et al (2010), ambos compartiendo aspectos de la citoarquitectura y la hodología del sistema y revelando su complejidad.

El estudio de Ahumada et al (2015) describe la proyección entre E y M organizada como un sistema de conexiones recíprocas entre ambos núcleos, formada por arreglos axonales columnares y discretos, orientados dorsoventralmente, siguiendo un orden topográfico preciso. Además, las proyecciones entopaliales que participan de este arreglo se ubican principalmente en la región dorsal del núcleo (**Figura 3A**) y llegan

a una porción específica del mesopallio (Denominado MVex por los autores). Las neuronas del mesopallio que participan de la formación de columnas proyectan hacia E y sus terminales se distribuyen heterogéneamente dentro de este núcleo, ubicándose principalmente hacia dorsal, misma región donde se ubican las eferencias entopaliales columnares. Esta proyección mesopallial que termina en la región dorsal de E se ramifica y genera proyecciones colaterales terminando de paso en Ni.

Finalmente, la región ventral de E se ha visto que proyecta hacia regiones subpaliales, específicamente hacia el estriado lateral (LSt) (**Figura 3**), misma región hacia donde proyecta la capa 5 en mamíferos, y no participa de la formación de procesos columnares (Ahumada-Galleguillos et al. 2015; Krützfeldt & Wild 2004, 2005).

Si bien a primera vista, en tinciones histológicas de tejido normal, el entopallio no presenta subdivisiones evidentes, estudios más detallados han descrito la heterogeneidad de este núcleo. En términos citoarquitectónicos, hodológicos y neuroquímicos, se han identificado con anterioridad una sub-región dorsal y una ventral (Benowitz & Karten 1976; Karten & Hodos 1970; Krützfeldt & Wild 2004, 2005). Esto es coincidente con los resultados obtenidos por Ahumada et al (2015), donde el entopallio está claramente sectorizado según sus proyecciones intratelencefálicas.

En relación al resto de las divisiones del DVR visual, un estudio de Fernández et al. (2013) indica que las proyecciones del DVR visual se originan exclusivamente en Ni, con prácticamente nula participación de E o M en éstas. Estas proyecciones eferentes

están topográficamente organizadas y se originan aparentemente en distintas subpoblaciones celulares del Ni, indicando que este núcleo podría tener sectorizaciones celulares especializadas en distintos tipos de proyecciones. Finalmente, este núcleo parece estar recibiendo proyecciones talámicas menores (Egedi & Tömböl 1994).

En base a lo anterior, el DVR visual se puede entender como un complejo formado por tres láminas principales: una interna (tálamo-recipiente, E), una intermedia (de proyección, Ni) y una externa (asociativa, M), cada una subdividida en regiones específicas. Las conexiones entre estas láminas parecen formar módulos operacionales discretos, donde células de distintas capas ubicadas en posiciones homotópicas se conectan a través de circuitos locales interlaminares recurrentes. Con esto, los autores proponen la existencia de un circuito canónico común a todo el DVR sensorial aviano, de manera similar a lo que se ha propuesto para la corteza de mamíferos (**Figura 2B**).

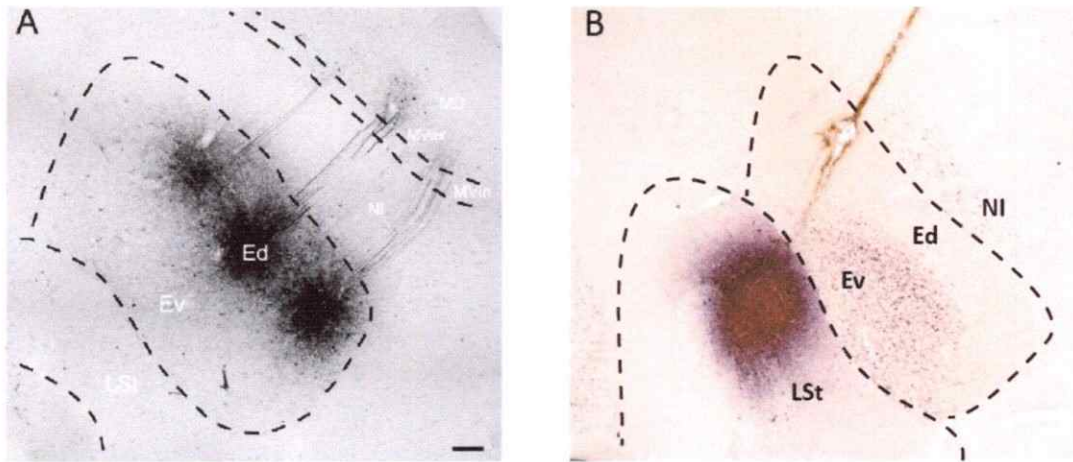


Figura 3. Sectorización hodológica interna del núcleo E. En (A) se observa un corte sagital, donde depósitos de biocitina en la región dorsal de E revelan las proyecciones columnares ascendentes hacia M. En (B) se observa una inyección de trazador retrógrado (CTb) en LSt, donde se observa que sólo la región ventral de E participa de las proyecciones descendentes, sin observarse marca en la región dorsal del núcleo. Barra de calibración: 200 μ m. **A:** imagen modificada desde Ahumada et al (2015). **B:** resultados no publicados del laboratorio de Neurobiología y Biología del Conocer.

Marcadores moleculares lámina-específicos

Durante los últimos años, el problema de las equivalencias entre estructuras paliales de aves y mamíferos ha sido abordado desde el punto de vista de la biología molecular, mediante el uso de marcadores moleculares lámina-específicos cuya expresión está descrita ampliamente para el cerebro de mamíferos, y recientemente utilizados para estudiar el palio de aves. Estos marcadores moleculares corresponden a

genes que, se ha visto, se expresan en regiones acotadas de la corteza, específicamente en una o varias de sus capas, y se han usado como genes indicadores de identidad celular.

Las células sensorrecipientes de la capa 4 de la corteza expresa un conjunto de marcadores moleculares distintivos dentro de los que destaca el gen $ROR\beta$, que codifica un receptor nuclear cuyo ligando no se conoce. Si bien no se ha descrito una función precisa para este gen, se ha visto relacionado con el establecimiento de las aferencias talámicas y el ordenamiento de las células que forman columnas (Jabaudon et al. 2012). Al igual que en mamíferos, se ha visto que $ROR\beta$ se expresa fuertemente en las regiones sensorrecipientes del DVR de aves, evidencia que refuerza la hipótesis de Karten, en la cual se sugieren equivalencias entre los núcleos sensoriales del palio aviano y la capa 4 de mamíferos. Además, este gen se expresa también en la región hiperpalial en aves, que también recibe aferencias sensoriales (Butler et al. 2011; Dugas-Ford, Rowell, & Ragsdale 2012; Jarvis et al. 2005, 2013) .

Por otro lado, se han hecho estudios del mismo tipo con marcadores moleculares de capa 2/3 en el DVR, como $COUPTF2$, $BRN2$ y $CUX2$. La expresión de estos marcadores moleculares se concentra en Ni principalmente y en M en estadíos adultos de aves, respaldando así la idea de que estos núcleos son comparables con la capa 2/3 de la corteza (Aboitiz & Zamorano 2013; Jarvis et al. 2013; Nomura et al. 2008; Suzuki & Hirata 2013). Sin embargo durante el desarrollo de mamíferos estos genes suelen expresarse en más de una capa (generalmente en todas las capas superficiales),

adquiriéndose el patrón lámina-específico durante estadíos posteriores al nacimiento (ver Anexo).

Algunos marcadores moleculares específicos de capas 5 y 6 de corteza han sido probados en telencéfalo de aves, y se ha observado que su expresión se restringe principalmente a la región del arcopallio, descrita como una región motora dentro del pallio de aves (DVR caudal). De manera similar al caso de los marcadores de capa 2/3, los de capa 5 y 6 suelen expresarse en ambas capas durante el desarrollo fetal de mamíferos, adquiriendo su condición lámina-específica durante su desarrollo postnatal (Anexo Figuras 1, 4 y 5). Esta dinámica temporal del patrón de expresión durante el desarrollo sugiere que estos marcadores moleculares no estarían relacionados con una identidad celular invariable en el tiempo, sino que más bien con una identidad temporal dentro de un contexto determinado y variable.

1.1 Planteamiento del Problema

El problema de las equivalencias de los territorios paliales dentro de los amniotas se ha discutido ampliamente durante casi un siglo (Aboitiz & Zamorano 2013; Dugas-Ford et al. 2012; Medina & Reiner 2000). Por una parte encontramos que la corteza de mamíferos se desarrolla a partir del palio dorsal en el tubo neural embrionario, mientras que en aves el DVR se desarrolla a partir de las divisiones lateral y ventral del palio temprano. Citoarquitectónicamente, la corteza se ordena en estratos celulares especializados, en tanto su contraparte en aves presenta una citoarquitectura completamente diferente, pues el DVR se organiza en núcleos celulares.

A pesar de las diferencias nombradas arriba, entre ambos palios (mamíferos y aves) se encuentran similitudes, como parcelación en áreas sensoriales de acuerdo a las aferencias talámicas que reciben. Además según la evidencia reciente ambas estructuras (DVR y corteza) se pueden entender como regiones telencefálicas complejas, formadas por grupos celulares laminarmente ordenados, donde distintas láminas realizan operaciones especializadas dentro de un circuito, formando módulos conectivos discretos y repetitivos a lo largo de ambas estructuras (Ahumada-Galleguillos et al. 2015; Jarvis et al. 2013; Wang et al. 2010). Coherentemente con esto, la evidencia molecular reciente ha mostrado que las láminas especializadas de ambos

linajes comparten la expresión de distintos marcadores moleculares específicos de identidad celular.

A lo largo de los distintos estudios con marcadores moleculares, el concepto de identidad celular se ha entendido como un criterio ontológico de las células, a modo de etiqueta que identifica a los distintos componentes del palio. Sin embargo, según las similitudes que existen en la organización del palio aviano y el de mamíferos, y la dinámica de los marcadores moleculares de identidad durante el desarrollo, la expresión de estos genes podría ser interpretada como indicadora de operaciones o contextos similares, compartidos entre aquellos grupos celulares del DVR y de la corteza que los expresan, y que se mantienen en la medida en que los contextos que enfrentan las poblaciones celulares son equivalentes.

En este trabajo se propone estudiar el patrón de expresión de algunos marcadores moleculares lámina-específicos, teniendo en cuenta la organización interna del DVR visual. Es decir, describir lo que sucede con las células que expresan los marcadores moleculares característicos en las distintas regiones operacionalmente especializadas, y confirmar si existe relación entre el patrón de expresión y la conectividad particular de cada grupo celular (recientemente descrita en el DVR visual).

Dado que el patrón conectivo del cerebro es algo que se establece durante el desarrollo, se propone en este trabajo estudiar también la dinámica del patrón de expresión de estos marcadores moleculares. Dado el carácter dinámico del

establecimiento de las conexiones en el desarrollo, se espera que los marcadores moleculares también adquieran su especificidad durante el desarrollo, a la par que el circuito interno se está estableciendo, o bien que esta especificidad adquirida en un cierto momento del desarrollo se mantenga en el tiempo, a modo de etiqueta molecular que indica la identidad de estas células.

1.2 Hipótesis

En aves y mamíferos los marcadores moleculares lámina-específicos se expresan diferencialmente en grupos celulares paliales laminarmente organizados que presentan patrones conectivos similares.

Específicamente, si suponemos que los marcadores moleculares se relacionan estrechamente con la conectividad, estructura y operación de los grupos celulares que participan del circuito canónico propuesto para el DVR, se espera que:

1. Tanto Ni como M expresen marcadores moleculares de capa 2/3, pero no expresen marcadores moleculares de capa 4 ni capa 5.
2. La región dorsal de E exprese marcadores moleculares de capa 4, pero no exprese marcadores moleculares de capa 2/3 ni capa 5.

3. La región ventral de E exprese marcadores moleculares de capa 5, pero no exprese marcadores moleculares de capa 2/3 ni capa 4.
4. Tanto Ba como FL expresen marcadores de capa 4.

1.3 Objetivo general

Caracterizar/estudiar el patrón de expresión espacial y temporal de marcadores moleculares que se expresan en las distintas capas de la neocorteza de mamíferos en ejemplares juveniles de *Gallus gallus*, con el fin de esclarecer posibles correlaciones con el patrón hodológico observado en el telencéfalo de aves.

Objetivos Específicos:

1. Seleccionar genes para usar como marcadores moleculares de identidad celular.
2. Clonar y generar sondas de RNA para los genes seleccionados.
3. Realizar ensayos de hibridación in situ en cerebros de *G. gallus*, a fin de caracterizar la dinámica espacial de la expresión de estos genes.
4. Comparar estos resultados con los antecedentes hodológicos que se tienen para el DVR de aves.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección de marcadores de interés

Con el fin de encontrar marcadores de identidad de capa, se realizó un análisis de muchos marcadores moleculares, de los cuales 11 fueron seleccionados. El detalle de estos 11 marcadores se encuentra en la **Tabla 1** y se adjuntan imágenes de los patrones de expresión en mamíferos (**Anexo**).

Inicialmente se miró el patrón de expresión de genes que se encuentran en la neocorteza de mamíferos. Para cada gen seleccionado se observó que el patrón fuera coincidente en al menos dos mamíferos de grupos filogenéticamente distantes, es decir, que el gen se expresara en las capas de interés en estos especímenes. Además, el patrón de expresión del mRNA o de su transcrito debiese estar descrito y observado en al menos una especie no mamífera, resultando particularmente útil si está descrito en reptiles. La revisión de los marcadores se hace tanto en la literatura disponible como también en las bases de datos *web* del Allen Institute Brain Atlas y del National Center for Biotechnology Information.

2.2 Determinación de secuencias y diseño de partidores.

Las sondas de RNA utilizadas se diseñaron utilizando las bases de datos de nucleótidos para el pollo, la paloma y la codorniz, y también las herramientas bioinformáticas que se encuentran disponibles en el sitio *web* de National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para cada gen elegido se diseñó un par de partidores específicos, con el fin de amplificar sus secuencias de DNA codificante (cDNA), y se sintetizaron comercialmente (IDT DNA). El detalle de los partidores diseñados y las secuencias utilizadas se encuentra resumido en la **Tabla 1**.

2.3 Obtención de pollos de estadíos E20, P0, P7 y P14-adulto.

Todos los experimentos fueron realizados en pollos (*Gallus gallus*) de ambos sexos, obtenidos de un proveedor local (Don Pollo, Pirque). Los embriones de estadío E20 fueron facilitados por el laboratorio de Ontogenia y Filogenia de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, siendo incubados a 38°C y humedad ambiental entre 60% y 80%.

2.4 Extracción de RNA.

Se extrajo el cerebro completo de un embrión en estadio E16 y de un pollo en estadio P0, con el fin de ampliar la posibilidad de encontrar los transcritos de interés. A partir de cada uno de ellos se realizó una extracción fenólica de RNA, mediante homogenización mecánica del tejido en 1 mL de RNA-*solv*[®]. Luego se agregó cloroformo y se incubó el tejido homogeneizado en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó y se rescató la fase acuosa, se agregó isopropanol 100% y nuevamente se incubó la muestra en hielo. Luego, posterior a una centrifugación, se lavó el pellet obtenido con etanol 80%, se centrifugó nuevamente y fue resuspendido en 40 µL de agua libre de nucleasas. Ambos RNA purificados (E16 y P0) fueron utilizados para la posterior transcripción reversa y amplificación por PCR de todos los genes seleccionados. La integridad del RNA obtenido se comprobó corriendo una electroforesis según el protocolo descrito en Aranda, Lajoie, & Jorcyk, 2012.

2.5 Transcripción reversa.

A partir del RNA obtenido en el paso anterior, se sintetizó DNA para trabajar con éste durante los siguientes pasos. Para esto, se hizo una mezcla de 4 µL de buffer de

reacción Improm-II™ 5x (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 a 25°C), 375 mM KCl, 50 mM DTT), 1 µL de 10 mM DNTP mix, 2.4 µL de 25 mM MgCl₂, 1 µL RNasin®, 1 µL de transcriptasa reversa Improm-II™. Esta fue incubada a 25°C durante 5 minutos. En paralelo, una mezcla de 0.5 µL 10mM de partidador reverso con el RNA purificado fue incubada a 70°C durante 5 minutos y luego en hielo por 1 minuto. Esta última mezcla se añadió a la primera descrita, se incubó a 42°C durante 1 hora, y finalmente a 70°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Este paso fue realizado con los partidores reversos de cada uno de los genes seleccionados.

2.6 PCR.

Para cada gen seleccionado se realizó un ensayo de PCR con el fin de amplificar cada fragmento de cDNA de interés. Para esto, se preparó una mezcla de reacción para cada gen correspondiente, con 5x PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mix, primers correspondientes forward y reverse previamente diseñados (10 pmol/µL), cDNA proveniente de cada transcripción reversa y agua libre de nucleasas. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo según el programa descrito en la **Tabla 2**. Una vez finalizada la reacción, se separaron todos los fragmentos de DNA amplificados de cada reacción de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa 1.5% y GelRed™ 1.2%. Luego de visualizar el gel bajo a luz UV, se cortaron las secciones

correspondientes al tamaño esperado para los fragmentos de DNA de cada marcador.

Para la posterior extracción del DNA desde el gel se utilizó el E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit, según el protocolo adjunto por el fabricante.

Tabla 1. Partidores utilizados y transcritos amplificados.

Marcador	Secuencia de Referencia	Partidores	Fragmento Amplificado
COUP-TF2 [*]	XM_005515561.1	Fw: ATCGAGAACATTTGTGAACTGGC Rv: GAGAGACCACAGGCATCTAGAAGAA	350 pb (nucleótidos 759 a 1050)
BRN2 [*]	XM_005515995.1	Fw: GCACGAATTCATGGCAGCG Rv: GCCGCGATCTTGCTATGCT	396 pb (nucleótidos 33 a 428)
EAG2 ^φ	XM_004936436.1	Fw: GCCCAAAGGACATGAGAGCA Rv: TCCCGAAAGAAATGATGTGCGT	468 pb (nucleótidos 1614 a 2081)
RORβ ^{**}	XM_005499799.1	Fw: GGCTGCAAGGGATTCTTTCG Rv: CCGTTGCTGATGCTGTTGC	302 pb (nucleótidos 91 a 392)
CALB1 [*]	NM_205513.1	Fw: AGGTGCCAGCAGCTAAAGTC Rv: CTCCCTCCATCAGACAAGGC	462 pb (nucleótidos 382 a 843)
CUX1	NM_001290201.1	Fw: TCCAACAAGACTGCTCGCAC Rv: ACTGGGGCTATTGGTTCCA	315 pb (nucleótidos 134 a 448)
CUX2 ^φ	XM_415167.4	Fw: AAGAGGAGCAAGGAGGCTGA Rv: GTGGTGGGTAGAATGCCTCC	946 pb (nucleótidos 85 a 1030)
PLXND1	XM_414455.4	Fw: CGGGGCCATCAGGATAGGAA Rv: CGGCATAGTGCAGGTGATGG	340 pb (nucleótidos 2076 a 2415)
PCP4 ^φ	NM_001278148.1	Fw: GGCGAGATGAGCGAGAGACA Rv: GGGTGTGAAACACCTGGGATG	361 pb (nucleótidos 46 a 406)
ER81 ^φ	NM_204917.1	Fw: ACAGGAGGAAAAGGGTGGGT Rv: CTTTCGGAGGCAAGCTGCAA	322 pb (nucleótidos 266 a 587)
FOXP2 ^φ	JN677532.1	Fw: ATGGGCCTCATATACTGCCA Rv: AGCACACACTGGAAGCCTAA	302 pb (nucleótidos 293 a 594)

* Marcadores con los cuales se realizaron los ensayos de hibridación In situ.

^{*} Marcadores descritos en la literatura para *Coturnix japonica* como marcadores de identidad de capa.

^φ Marcadores descritos en la literatura para *Gallus gallus* como marcadores de identidad de capa.

Tabla 2. Programa utilizado para las reacciones de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Denaturación inicial	95°C	2 minutos	1
Denaturación	95°C	30 segundos	-
Annealing	55-60°C†	30 segundos	25-35*
Extensión	72°C	1 minuto/kb	-
Extensión Final	72°C	10 minutos	1

*El número de ciclos fue ajustado en particular para cada uno de los marcadores utilizados. El rango indicado de 25 a 35 ciclos incluye todos los valores utilizadas para los distintos PCR.

† La temperatura de annealing fue ajustada para cada uno de los marcadores amplificados. El rango indicado de 55-60°C incluye todas las temperaturas utilizadas para los distintos PCR.

2.7 Ligación y transformación.

Los fragmentos de DNA amplificados fueron insertados dentro de un vector para su posterior amplificación. Para esto se utilizó una mezcla de reacción compuesta de 2 μ L 2x Rapid Ligation Buffer T4 ligase (60 mM Tris-HCl pH=7.8, 20 mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilenglicol), 1 μ L T4 DNA ligase, 8 μ L producto PCR y 1 μ L pGEM[®]-T Easy Vector (pGEM[®]-T Easy Vector Systems, Promega). Esta reacción se incubó toda la noche a 4°C.

Posteriormente, a 50 μ L de bacterias *E. coli* cepa DH5 α termocompetentes, se le añadieron los 12 μ L totales de la reacción de ligación y se dejó incubando en hielo por

40 minutos. Luego se dio un choque de calor durante 1.5 minutos a 42°C, y se incubó nuevamente en hielo durante 2 minutos. Luego se incluyeron en 1 mL de LB líquido y se crecieron en agitación horizontal a 37°C durante 1 hora. Finalmente, se sembraron las bacterias en placas de LB agar con ampicilina 0.1 µg/mL y X-GAL 1% (Promega), y fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Este cultivo nocturno permite identificar aquellas bacterias que han incorporado el fragmento de DNA de interés, siendo visualmente identificables gracias al color blanco que presentan las colonias. Aquellas bacterias que no incorporaron el fragmento se observan como colonias de color azul. El detalle del mapa de restricción del vector utilizado se puede observar en la **Figura 4**.

2.8 Extracción del DNA plasmidial.

Se extrajo el DNA plasmidial de las bacterias para su posterior uso. Para esto se seleccionó una colonia blanca para cada gen de interés y se dejó crecer en medio LB/Ampicilina (0.1 µg/mL) durante toda la noche a 37°C en agitación horizontal (250 rpm). Luego se obtuvo el plásmido mediante el uso del QIAprep® Spin Miniprep Kit, según el protocolo del fabricante. Una muestra del DNA plasmidial purificado de cada gen fue secuenciada (Unidad de Secuenciación, Pontificia Universidad Católica de Chile) con el fin de confirmar la identidad de los fragmentos amplificados.

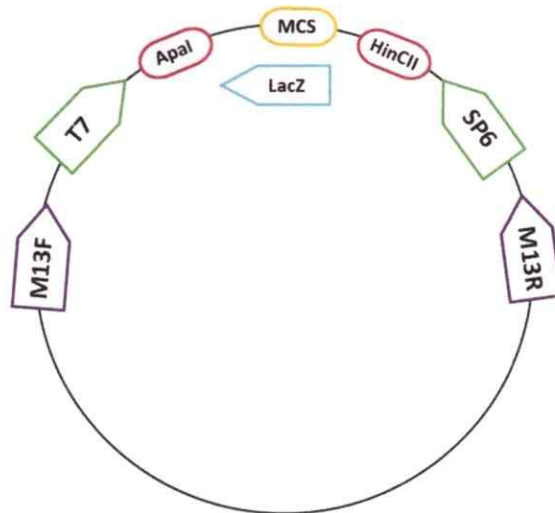


Figura 4. Esquema del vector pGEM®-T Easy. Se muestran en distintos colores los principales sitios del vector: en morado, los primers utilizados para la secuenciación (M13F y M13R); en verde los sitios de unión a las distintas transcriptasas reversas (T7 y SP6); en rojo, los sitios de restricción para las enzimas de corte (Apal y HincII); en celeste, el sitio donde se ubica el gen LacZ; en amarillo, el sitio de múltiple clonamiento (MCS), donde se inserta el fragmento de interés.

2.9 Linearización del DNA plasmidial.

Según el mapa de restricción del vector utilizado (**Figura 4**), se seleccionaron las enzimas de restricción a utilizar para cada gen de interés, según el sentido en que cada fragmento se insertó en el plásmido. El detalle de las enzimas utilizadas se encuentra en la **Tabla 3**. Para cada plásmido se hizo una mezcla de reacción, consistente en 3 μ L de la enzima de restricción correspondiente, 10 μ L de su respectivo buffer, 5 μ g de DNA

plasmidial y agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó a 4°C toda la noche, se purificó el DNA mediante el método fenol-cloroformo y al finalizar se realizó una electroforesis, con el fin de comprobar si los 5 µg de DNA circular estaban completamente linearizados. Para esto se añadieron muestras tanto del DNA circular como de la reacción de linearización, en un gel de agarosa 1.5% y GelRed™ 1.2%.

2.10 Síntesis de ribosondas anti sentido marcadas con digoxigenina.

A partir del DNA linearizado se sintetiza la ribosonda antisentido, que será utilizada para los ensayos de hibridación *in situ*. Se hizo una mezcla de reacción con plásmido lineal puro, buffer de transcripción 5x, RNAsa inhibidora, DTT, ribonucleótidos marcados con digoxigenina, RNA polimerasa (T7 o SP6, Promega) y agua libre de nucleasas. Para el caso de la enzima T7, se incubó la mezcla a 37°C durante 2 horas, mientras que para SP6 se incubó a 39°C durante el mismo tiempo. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1.5%, hipoclorito de sodio 1% y GelRed™ 1.2% (Aranda et al. 2012) para verificar que la sonda fue sintetizada. Finalmente se les agregó 4M LiCl y etanol absoluto, y se dejaron precipitando a -80°C durante toda la noche.

Tabla 3. Enzimas utilizadas en la linearización y síntesis de sonda de los distintos genes.

Gen	COUP-TF2	ROR β	CALB1	CUX1	PCP4	ER81
Enzima de Restricción	Hinc II	Apa I	Apa I	Hinc II	Apa I	Apa I
RNA Polimerasa	T7	Sp6	Sp6	T7	Sp6	Sp6

2.11 Procedimientos histológicos para los ensayos de ISH.

Los animales utilizados fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilazina (75/5 mg/Kg) y luego perfundidos transcárdialmente, usando primero solución salina (0.75% NaCl, Merck) y luego solución de fijación (0.01 M buffer fosfato, pH 7.4; 0.02% NaCl, Merck; 4% paraformaldehído [PFA], Merck). Los cerebros fueron rápidamente extraídos del cráneo e incubados en solución de post-fijación/crioprotección (30% sacarosa, 4% PFA en agua libre de nucleasas) durante toda la noche a temperatura ambiental y agitación constante (50 rpm). Una vez hundidos, los cerebros fueron cortados en secciones sagitales y coronales de 80 μ m en un micrótopo de congelación a -29°C, para ser usados posteriormente en los ensayos de hibridación *in situ*. Los procedimientos aquí descritos han sido aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

2.12 Hibridación *in situ* (ISH).

Los cortes obtenidos se lavaron 3 veces en buffer fosfato/salino (PBS; 0.01 M buffer fosfato, pH 7.4; 0.02% NaCl en agua libre de nucleasas) y se trataron con una solución de peróxido-PBSw (6% H₂O₂, 0.1% Tween-20, Promega) durante 20 minutos. Se lavó el peróxido con PBSw y se incubaron en solución de proteinasa K-PBSw (Proteinase K, 10mg/mL, Promega) durante 10 minutos a 37°C. Los cortes fueron fijados en solución de PFA 4% en PBSw durante 20 minutos, luego lavados 3 veces con PBSw y pre-hibridados durante 3 horas a 60°C en buffer de hibridación (50% Formamida, Merck; 1.3x buffer citrato de sodio [SSC] pH 5.3, Winkler; 5 mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], Winkler; 200 mg/mL tRNA de levadura, Sigma; 0.002% Tween-20, Promega; 0.005% CHAPS, Calbiochem; 100 mg/mL heparina, Calbiochem; en agua libre de nucleasas). Posteriormente se agregó la sonda antisentido correspondiente y se dejó incubando a 60-65°C toda la noche.

Luego de la hibridación, los cortes se lavaron 3 veces con solución A (5x SSC, pH 5.3; 50% formamida; 1% dodecilsulfato sódico [SDS]; en agua nanopura) por 30 minutos, y 3 veces con solución B (2.5X SSC, pH 5.3; 50% formamida; 1% Tween-20; en agua nanopura) durante 30 minutos. Todos estos lavados fueron hechos a 60°C. Luego, los cortes fueron lavados 2 veces a temperatura ambiental en solución buffer de ácido málico (MABw pH 7.5; 100mM ácido málico, Merck; 0.1% Tween-20; 150 mM NaCl,

Merck; en agua nanopura) y posteriormente incubados en solución de bloqueo-MABw (2% Blocking Reagent, Roche; 2% suero de cabra inactivado, Invitrogen) durante 4 horas. Luego, se incubaron durante toda la noche a 4°C y en agitación constante (25 rpm) con anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Anti-digoxigenin-AP Fab fragments from sheep, Roche), 1/2000 en MABw.

Finalmente, los cortes fueron lavados 6 veces en MABw, luego incubados en solución de reacción para fosfatasa alcalina (AP buffer; 100 mM TRIS, pH 9.5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; en agua nanopura) y finalmente incubadas en solución de revelado-AP buffer (4,5 µL/mL NBT, Promega; 3,5 µL/mL BCIP, Promega) a 37°C y en oscuridad hasta obtener la marca deseada. Una vez lograd esto, se detuvo la reacción de revelado con un lavado en PBSw. Los cortes fueron montados y luego deshidratados en una serie de etanol para finalmente ser cubiertos.

2.13 Identificación de núcleos en el palio.

Todos los cortes fueron fotografiados a un aumento de 4x, mediante el uso del programa SPOT Imaging Software (SPOT Imaging Solutions) y su cámara respectiva, adosada a un microscopio Olympus BX51. Las imágenes obtenidas fueron compuestas y editadas usando el software Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated) y preparadas finalmente con Adobe Illustrator (Adobe Systems Incorporated). Las

distintas regiones del palio fueron identificadas mediante la observación de los cortes en campo oscuro, las cuales presentan opacidad diferencial asociada al grado de mielinización que las fibras posean (**Figura 5**).

2.14 Conteo celular.

Los cortes con sus regiones ya delimitadas fueron procesados con el software de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health). Se seleccionaron 4 niveles diferentes para cada estadio analizado. Se dibujó una grilla de recuadros de tamaño 1000x1000 pixeles, y se contó recuadro por medio. Se consideraron sólo aquellas regiones del nidopalio intermedio y del entopalio que se encuentran hacia dorsal del área del entopalio. El entopalio fue contado en su totalidad, siguiendo el patrón de conteo recuadro por medio. Los recuadros considerados fueron aquellos donde más del 75% de su área quedaba dentro de cada región a contar (**Figura 6**). Posteriormente, los gráficos y análisis estadísticos fueron elaborados con el programa de análisis estadístico R (R Foundation for Statistical Computing).

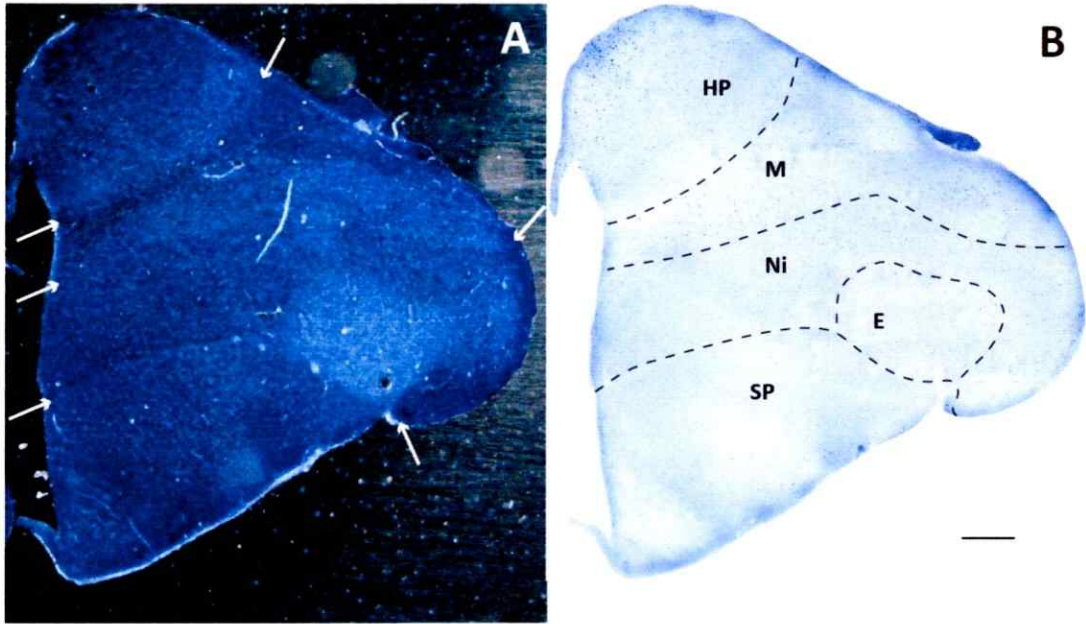


Figura 5. Composición vs campo oscuro para identificación de núcleos. **A:** corte coronal de telencéfalo de *G. gallus* en campo oscuro, se pueden observar las distintas estructuras de interés y los respectivos límites de éstas gracias a la opacidad diferencial que presentan. **B:** mismo corte que en A, con los límites definidos a partir de su imagen en campo oscuro. Barra de calibración 500 μ M.

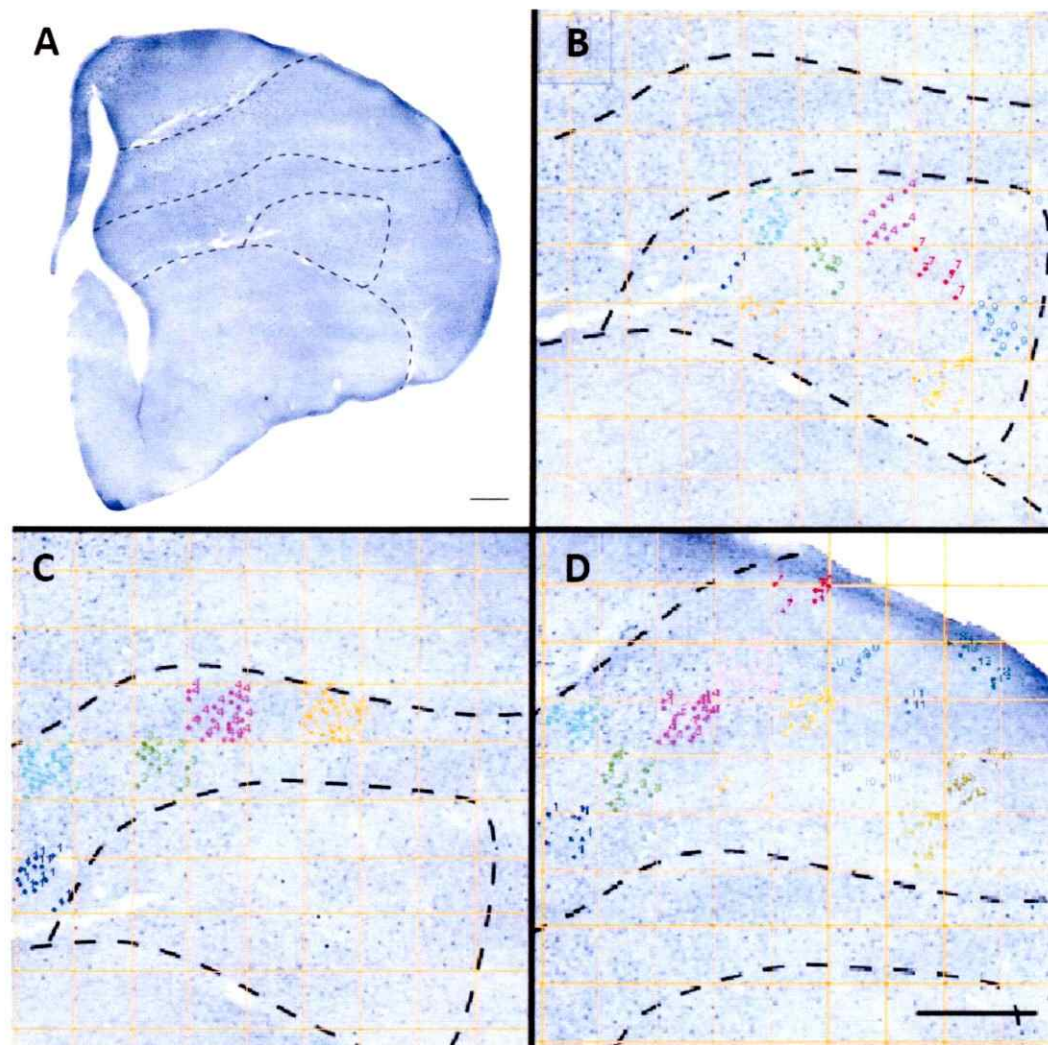


Figura 6. Conteo celular. **A:** Vista completa de un corte coronal. Barra de calibración 500 μM . **B:** grilla y conteo correspondiente al mismo corte en A, para la región del entopalio. **C:** grilla y conteo correspondiente al mismo corte en A, para la región del nidopalio. **D:** grilla y conteo correspondiente al mismo corte en A, para la región del mesopalio. Barra de calibración 500 μM .

3. RESULTADOS

3.1 Selección de marcadores.

La búsqueda de marcadores moleculares específicos para las distintas capas de la neocorteza de mamíferos se hizo acorde a los criterios descritos en la sección de materiales y métodos, y resultó en la selección de 11 genes. El detalle del patrón de expresión de estos genes se observa en el **Anexo** de este trabajo.

3.2 Amplificación y clonamiento de fragmentos seleccionados.

Los resultados para las distintas reacciones de PCR realizadas se pueden observar en la **Figura 7**. Aquellos genes seleccionados que no pudieron ser clonados exitosamente (BRN2, EAG2, CUX2, FOXP2) fueron omitidos para los análisis posteriores.

Las muestras obtenidas de las amplificaciones fueron enviadas a secuenciar para corroborar la identidad de los amplificadas; el resultado de estas secuenciaciones

se encuentra resumido en la **Tabla 4**, que incluye todos los genes exitosamente clonados.

3.3 Estudio del patrón de expresión de marcadores de identidad de capa en el DVR visual de *G. gallus*.

Se probaron los 6 marcadores correctamente secuenciados en ensayos de hibridación *in situ*, en cerebros de *Gallus gallus*. De estos marcadores, sólo 2 dieron resultados positivos para el telencéfalo de *G. gallus*: CALB1 y ROR β . Los marcadores restantes presentaron diversas dificultades:

- COUPTF2: no entrega resultados positivos para *G. gallus*. El uso de este marcador en aves se encuentra reportado en la literatura y se ha utilizado como marcador de capa 2/3.
- CUX1: se expresa en el tálamo de *G. gallus*, pero en el telencéfalo no se encuentran células marcadas. El uso de este marcador en aves no está descrito en la literatura.
- ER81: se han realizado varias pruebas con este marcador, variando en la metodología, pero aún no se consigue obtener marca. El uso de este marcador en aves está reportado en la literatura como marcador de capa 5.

- PCP4: el estado de este marcador es similar al de ER81, habiéndose realizado varias pruebas sin resultados positivos. Además, su uso en la literatura está reportado y es muy escaso en aves, siendo descrito como marcador de identidad de capa 5.

Tabla 4. Resumen de resultados para secuenciaci3nes: en total, seis de siete fragmentos fueron clonados exitosamente. Identidad se refiere a la cantidad de nucle3tidos id3nticos entre el amplificado y la secuencia de referencia; errores se refiere a aquellos nucle3tidos distintos; espacios vacíos son aquellos lugares donde no se incorpor3 ning3n nucle3tido, dejando un espacio vacío en el amplificado.

Gen	Identidad	Errores	Espacios vacíos
COUP-TF2	341/359 pb	8/359 pb	10/359 pb
RORβ	301/301 pb	0/301 pb	0/301 pb
CALB1	462/464 pb	2/464 pb	0/464 pb
CUX1	315/315 pb	0/315 pb	0/315 pb
PCP4	362/362 pb	0/362 pb	0/362 pb
ER81	321/322 pb	1/322 pb	0/322 pb



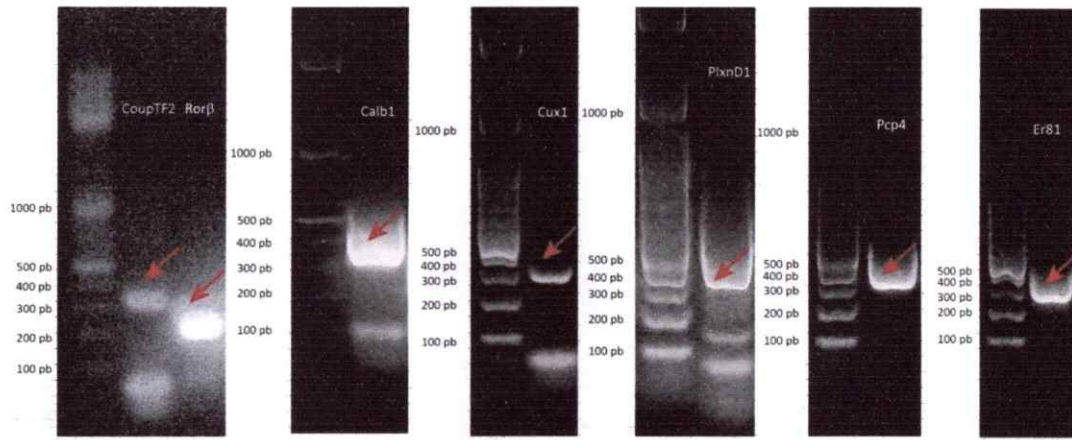


Figura 7. Amplificación de cDNA. Separación de fragmentos específicos de cDNA por electroforesis de COUPTF2 (359 pb), ROR β (301 pb), CALB1 (464 pb), CUX1 (315 pb), PLXND1 (340 pb), PCP4 (362 pb) y ER81 (322 pb).

3.4 Estudio del patrón de expresión de CALB1 en el palio visual de *G. gallus*.

3.4.1 Expresión de CALB1 en el palio visual de *G. gallus*: ensayos de hibridación *in situ*.

De los marcadores seleccionados, CALB1 se eligió como marcador de identidad de capa para probar las posibles equivalencias entre la capa 2/3 de la neocorteza y el DVR visual de las aves. Se realizaron ensayos de hibridación *in situ* cuyos resultados revelan aquellas regiones del telencéfalo donde el RNA mensajero de CALB1 se está expresando. Para esto se realizaron varios ensayos (n=3) contra este marcador en

cerebros de pollo en estadio P0, día de nacimiento, cuyos resultados se muestran en las **Figuras 8 y 9.**

La marca obtenida para CALB1 se encuentra presente a lo largo de todo el palio, es decir, HP, M, Ni y E, mientras que en la región subpalial se presenta en baja abundancia, incluso estando ausente en ciertos niveles. Se puede observar además que esta marca está concentrada principalmente en las regiones de Ni y M, mientras que dentro de E la densidad celular que expresa CALB1 es mucho menor, pero no nula.

3.4.2 Expresión de CALB1 en el palio visual de *G. gallus*: conteo celular en P0.

Como se observa en la **Figura 10** y como se comentó en el punto anterior, la mayor cantidad de células que expresan CALB1 aparentemente se encuentra dentro del Ni, mientras que en E la cantidad es muy baja. Para corroborar esta observación, se contaron las células marcadas en M, Ni y E, con el fin de comprobar si efectivamente hay menos células CALB1 + en E que en Ni y M. Se contó, por una parte, en una serie sagital para un individuo en estadio P0, y en otra serie coronal para un individuo diferente también en estadio P0. El detalle del número total de células contadas y área considerada para cada caso se encuentra en la **Tabla 5.**

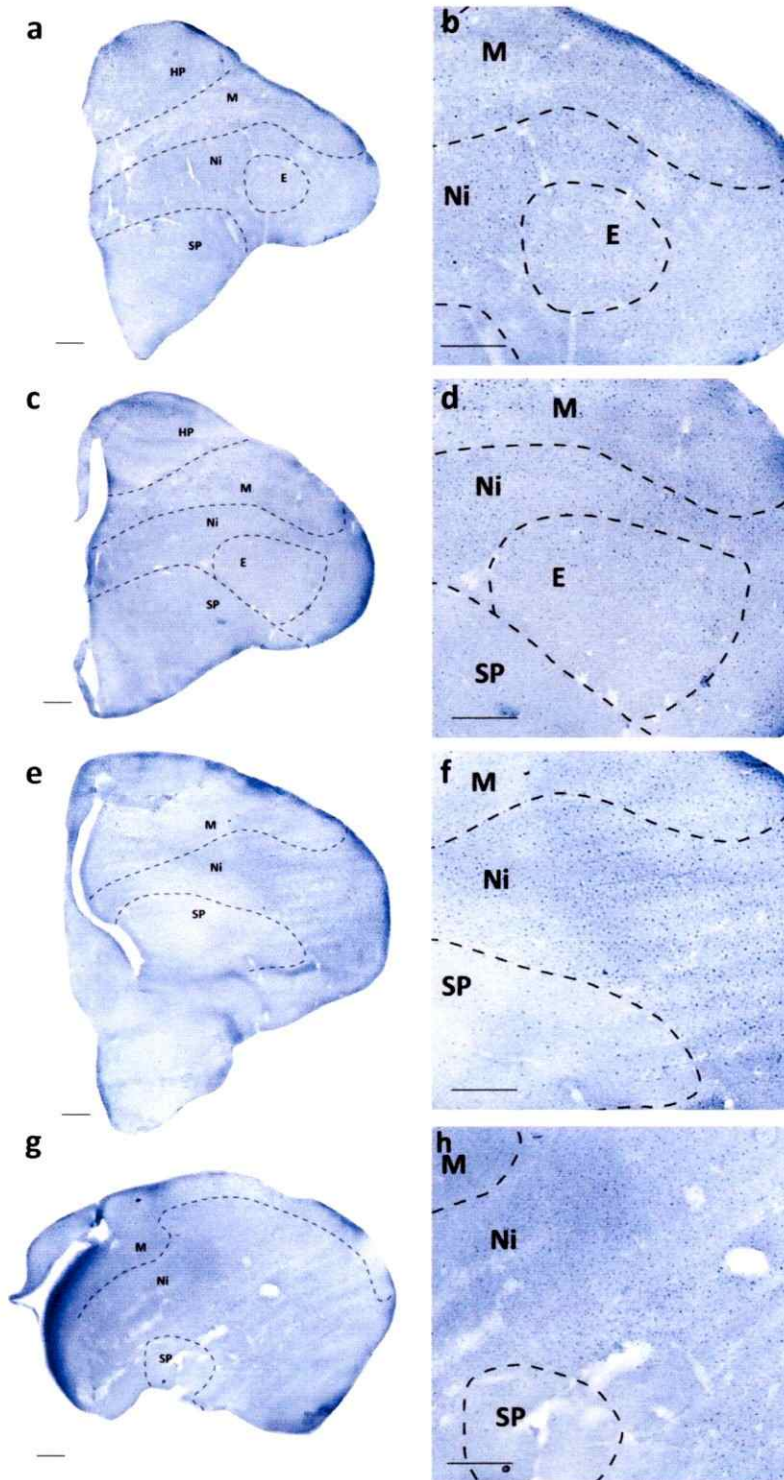


Figura 8. Ensayos de hibridación in situ: patrón de expresión de CALB1 en el DVR visual de *G. gallus*: vista coronal estadio P0. Secuencia de niveles coronales de un mismo individuo, siendo (a) el más rostral y (g) el más caudal. La marca de CALB1 está presente en todo el palio, siendo el nidopalio intermedio (Ni) la región con mayor abundancia, seguida del mesopalio (M), el hiperpalio (HP), el entopalio (E) y finalmente el subpalio (SP). Se puede observar que el entopalio ha desaparecido en los niveles más caudales (e y g) manteniéndose la marca en Ni. Barra de calibración: 500 μ m.

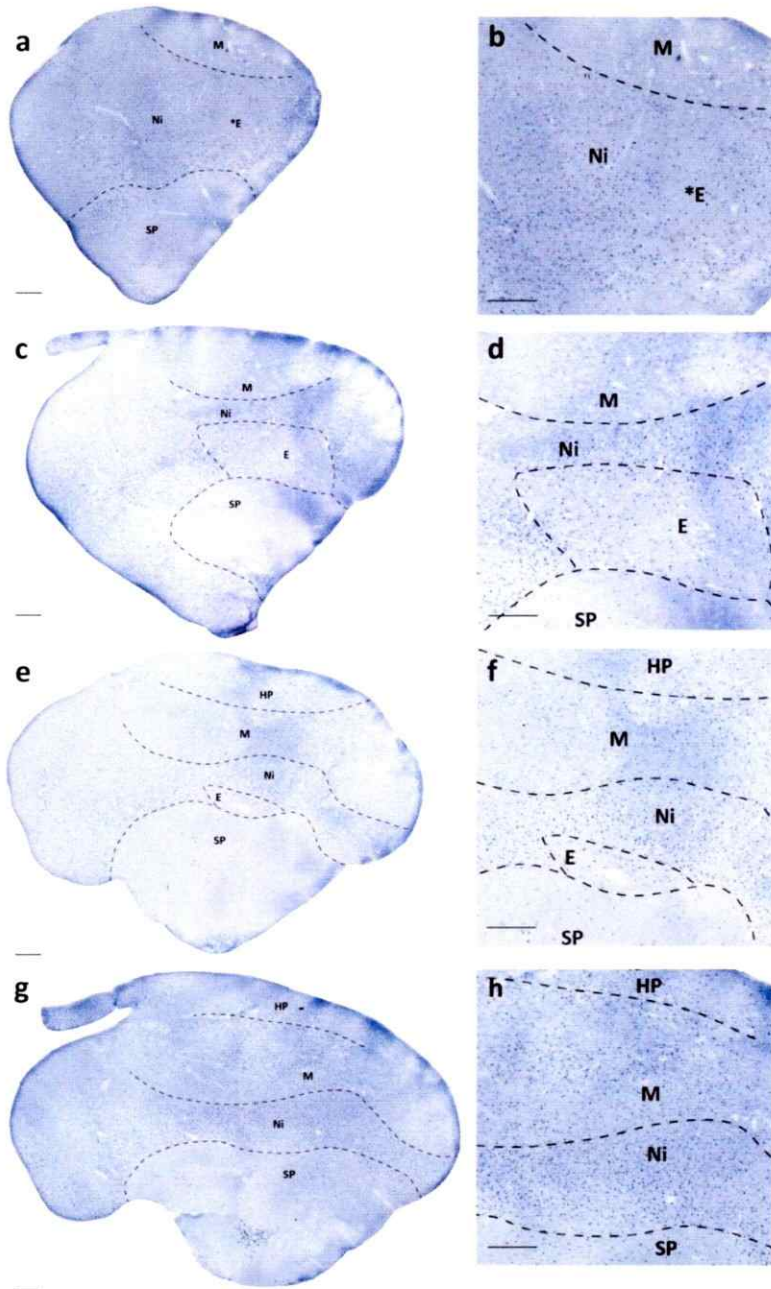
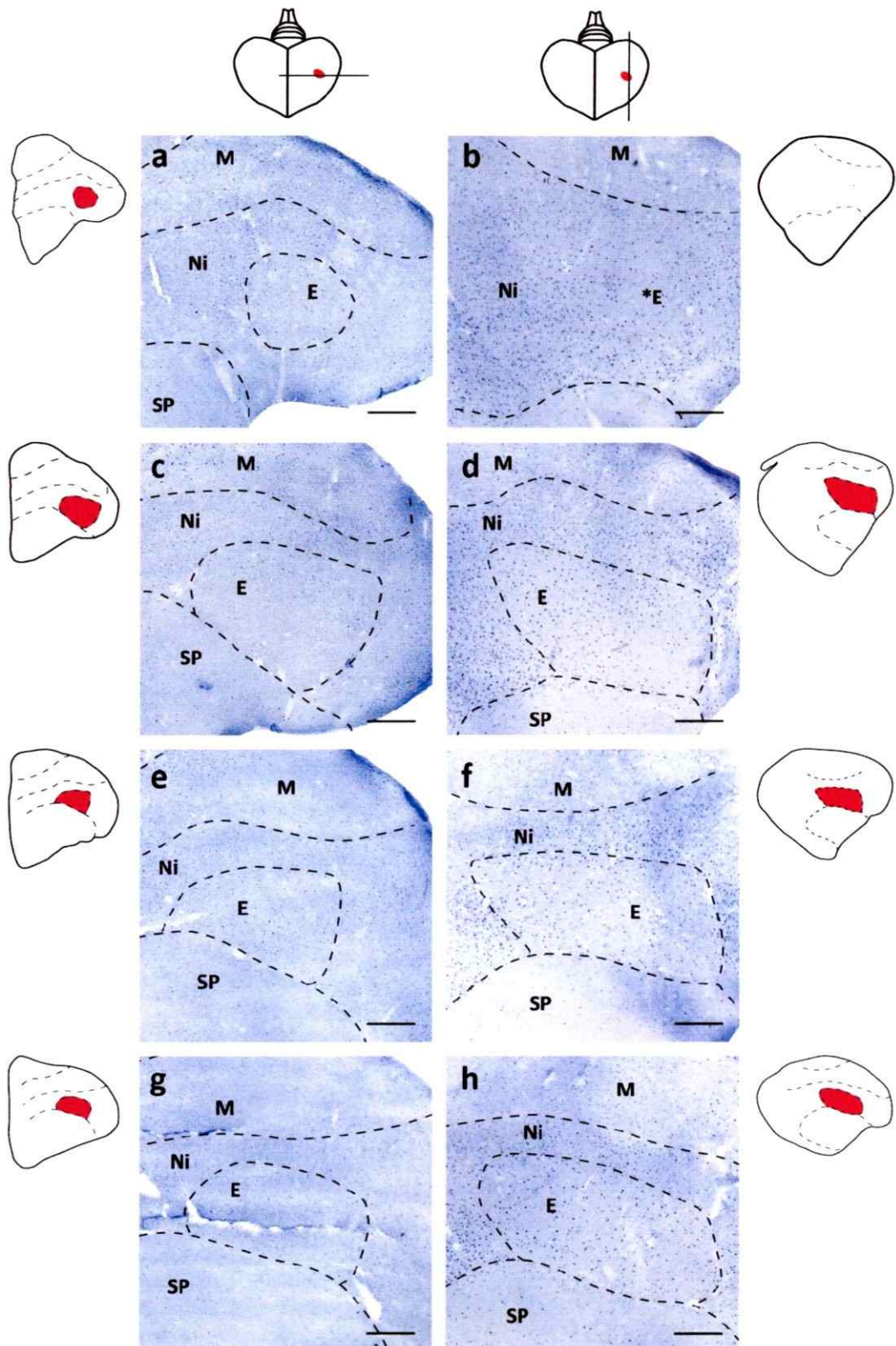


Figura 9. Ensayos de hibridación in situ: patrón de expresión de CALB1 en el DVR visual de *G. gallus*, vista sagital estadio P0. Se muestra una secuencia de niveles parasagitales de un mismo individuo, siendo (a) el más lateral y (g) el más medial. La marca de CALB1 está presente en todas las regiones del palio, siendo más abundante en Ni, M y HP que dentro de E. La región SP presenta menor abundancia de células que expresan CALB1, llegando a ser mínima en (c) y en (e). En (a) se señala con un asterisco la presunta región donde comienza E. Barra de calibración: 500 μ m.

Tabla 5. Resumen de resultados para el conteo celular. Cada casilla contada mide 1000x1000 pixeles, lo que equivale a 3,35 mm². El área total contada corresponde a la suma del área de todas las casillas contadas, mientras que la densidad es el número de células totales contadas en el núcleo dividido por el total de células contadas en el núcleo.

Orientación	Núcleo	N° células totales	Casillas contadas	Área total contada (mm ²)
Sagital	Entopalio	480	55	184,3
	Nidopalio	690	38	127,3
	Mesopalio	722	67	224,5
Coronal	Entopalio	209	41	137,4
	Nidopalio	270	23	77,1
	Mesopalio	393	54	180,9

Figura 10. Detalle de la expresión de CALB1 en las regiones del DVR visual. a, c, e, g: serie coronal individuo P0, de más rostral a más caudal respectivamente. Se observa que la marca de CALB1 está presente en todos los niveles, y en todos ellos encontramos mayor densidad de marca en Ni que en E. b, d, f, h: serie sagital individuo P0, de más lateral a más medial respectivamente. Al igual que en la serie coronal, se observa que Ni es el segmento más rico en marca de CALB1 para todos los niveles mostrados, mientras que E presenta la menor densidad de células marcadas. Barra de calibración: 500 µm.



Según esto, la densidad celular resulta ser mayor en Ni que en los demás núcleos, tanto para la serie coronal como para la sagital. Para comprobar las diferencias observadas, se sometió el conjunto de datos del conteo celular a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para un modelo que se ajusta a una distribución de Poisson. Los resultados de esta prueba indican que todos los núcleos son diferentes en ambos conjuntos de datos, es decir, que E, Ni y M son diferentes entre sí tanto en la serie sagital como en la serie coronal ($p\text{-value} < 0.05$, ANOVA, $n=4$). Además, estos resultados indican que el conjunto de datos para cortes sagitales es diferente del conjunto de datos para cortes coronales ($p\text{-value} < 0.05$, ANOVA, $n=4$). Luego, los datos obtenidos para el conteo celular fueron graficados en un *boxplot*, con el fin de ilustrar su distribución. (Figuras 11 y 12).

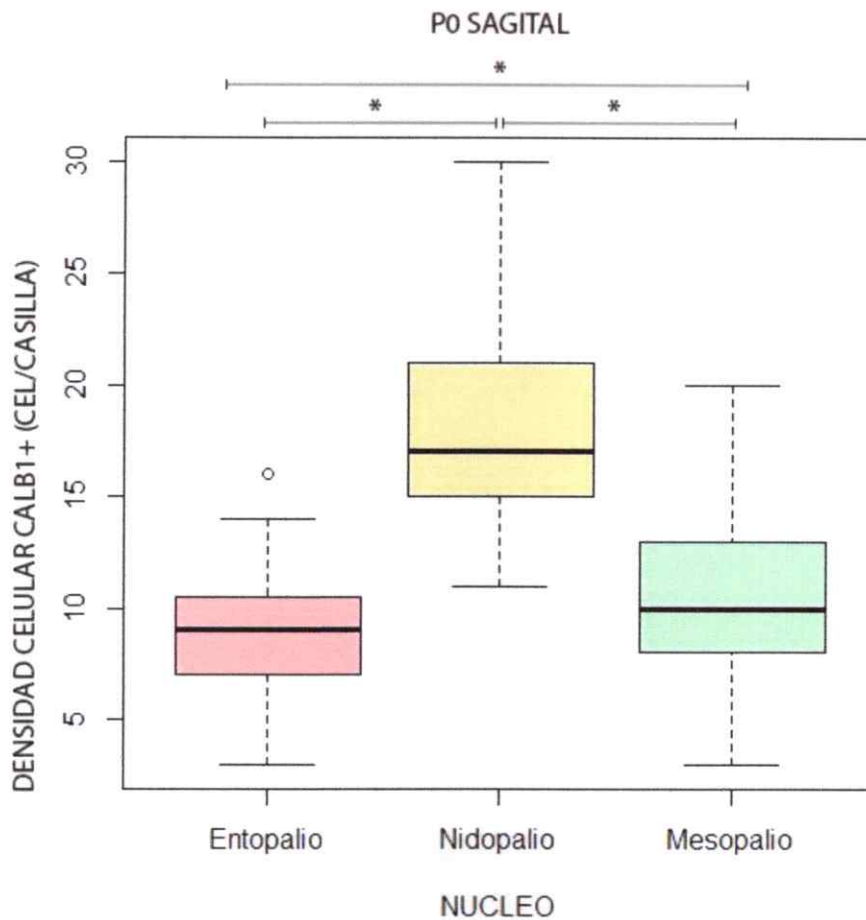


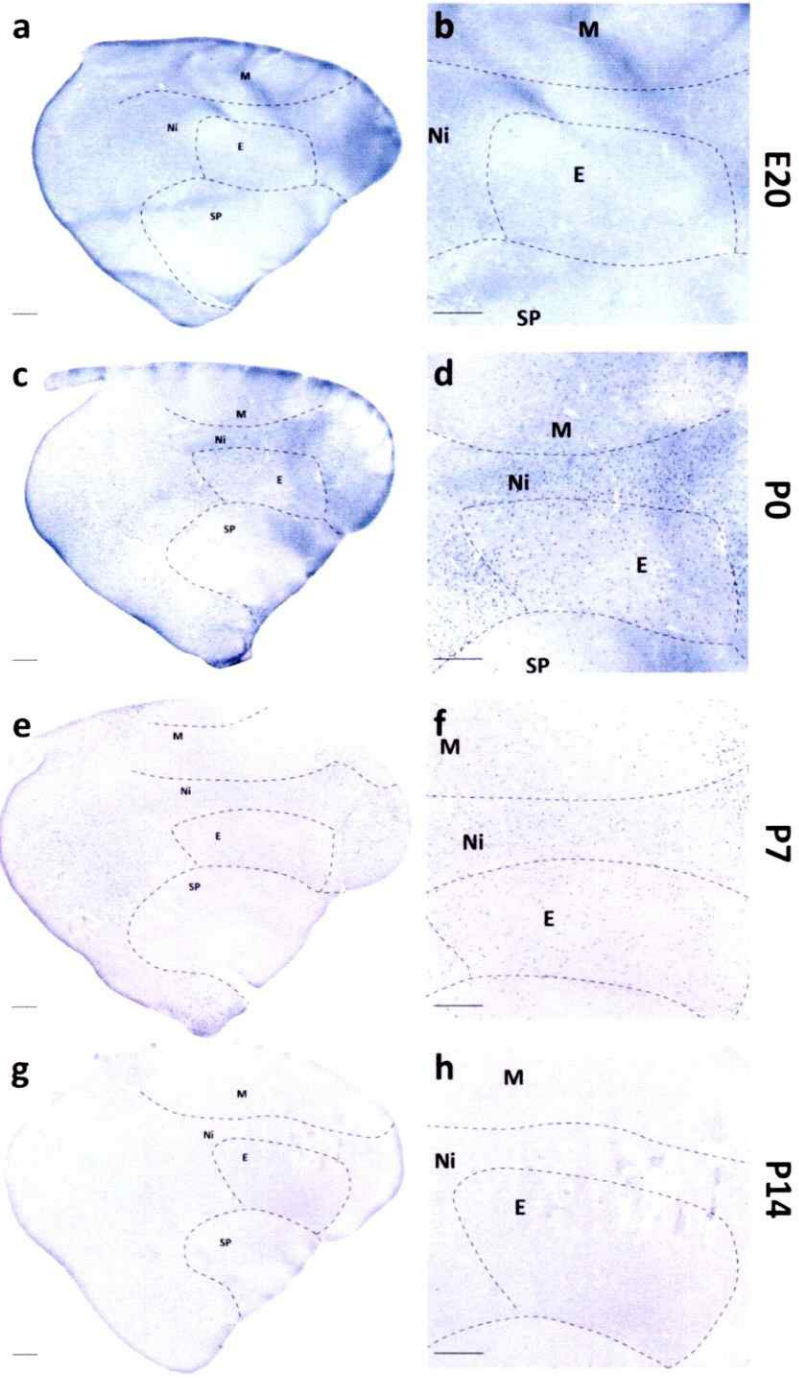
Figura 11. Distribución de las densidades celulares en individuo P0, serie sagital. El gráfico de cajas y bigotes nos muestra la distribución y abundancia de los valores para la densidad celular (número de células por casilla). El límite inferior de la caja (Q_1) representa el 25% de los datos; la línea negra dentro de la caja (Q_2) representa la mediana, o el 50% de los datos; el límite superior de la caja (Q_3) representa el 75% de los datos. Los bigotes, o líneas punteadas, representan aquellos valores extremos de la serie de de datos. Los puntos son aquellos valores atípicos dentro de la serie, que superan en más de 3 veces el valor del intervalo ($Q_3 - Q_1$). El rango dentro del cual se encuentra la mayoría de los valores para densidad celular es mucho más acotado en el caso de E que en los otros dos núcleos, además de presentar valores extremos menores y un valor atípico que se escapa del extremo superior (**p-value* < 0.05, Wilcoxon-Mann-Whitney, n=4).

Los valores de densidad celular CALB1+ encontrados en el núcleo E son significativamente menores que los valores para el núcleo Ni y para el núcleo M (tanto en cortes coronales como sagitales, $p\text{-value} < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney, $n=4$). Así mismo, los valores de densidad celular para el mismo marcador son significativamente mayores en el núcleo Ni que en E y en M (tanto en cortes coronales como sagitales, $p\text{-value} < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney, $n=4$). Una diferencia considerable es que en la serie coronal se encuentran valores de densidad celular en general menores a los encontrados en la serie sagital, pero manteniéndose la diferencia observada entre núcleos.

3.4.3 Expresión de CALB1 en el palio visual de *G. gallus* en el desarrollo.

Con el fin de explorar el patrón de expresión de CALB1, se realizaron hibridaciones in situ en cerebros de pollo en distintos estadios del desarrollo: estadio 20 embrionario (E20), un día antes del nacimiento; día 0 postnatal (P0), mismo día del nacimiento; siete días postnatal (P7) y pollos entre 14 y 21 días postnatal (P14-21). Se realizaron al menos 2 ensayos para CALB1 en cada uno de estos estadios, siendo el mínimo $n = 2$ (E20, P7) y el máximo $n = 3$ (P0, P14-21). En la **Figura 13** se puede apreciar una serie temporal donde se muestran niveles equivalentes en cada estadio.

Figura 13. Secuencia temporal de la expresión de CALB1. A lo largo del desarrollo, (a) se observa que la intensidad y abundancia de la marca son menores en E20 que en P0 (c) y P7 (e), donde se aprecia más cantidad de células marcadas y con una señal más intensa. En P14 (g) la marca es menor que en (a), manteniéndose la diferencia entre núcleos para todos los estadios. Barra de calibración: 500 μm . b: se observan muy pocas células en E que expresan CALB1, mientras que en Ni hay mayor número de éstas. Sin embargo, la expresión en general es baja. d: peak de la expresión de CALB1, con menor cantidad de marca dentro de E que fuera de éste. f: Respecto de (d), la abundancia de la marca es menor, pero se mantiene el mismo patrón entre E y Ni. h: no se observan células marcadas dentro de E, sin embargo, se aprecian algunas células en Ni que expresan CALB1. Barra de calibración: 500 μm .



La expresión de CALB1 aparentemente mantiene durante el desarrollo el patrón anteriormente observado, donde E exhibe una densidad celular CALB1+ menor que Ni, y M, y al mismo tiempo Ni concentra la mayor cantidad de marca respecto de los otros dos núcleos. Esta dinámica se puede observar ejemplificada en la serie del desarrollo de la **Figura 13**. Sin embargo, la intensidad y abundancia con la que este marcador se expresa en el DVR visual parece variar a lo largo del desarrollo, pues se observa que la marca está menos extendida tanto en E20 como en P14, además de mostrar una señal más débil.

Para corroborar estas observaciones, se procedió de la misma manera que para el punto anterior: se contó la cantidad de células expresando CALB1 para cada estadio en los tres núcleos de interés. Los resultados de este conteo celular se encuentran en la **Tabla 6**. Se sometió el conjunto de datos del conteo celular a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para un modelo que se ajusta a una distribución de Poisson. Este análisis reveló que los tres núcleos estudiados son diferentes entre ellos en todos los estadios analizados, y además indica que los estadios son distintos entre sí (*p-value* < 0.05, ANOVA, n=4).

Los valores de densidad celular obtenidos para cada estadio fueron representados en un gráfico de cajas (**Figura 14**) para observar su distribución, la cual aparentemente no varía cualitativamente, pero sí en términos de cantidad de células marcadas. Mientras se mantiene la diferencia que existe entre E y Ni, el número total

de células contadas por casilla disminuye. Una mejor ilustración de esta dinámica temporal se observa en el gráfico de la **Figura 15**.

Tabla 6. Resumen de resultados para el conteo celular en el desarrollo. Cada casilla contada mide 1000x1000 pixeles, lo que equivale a 3,35 mm². El área total contada corresponde a la suma del área de todas las casillas contadas, mientras que la densidad es el número de células totales contadas en el núcleo dividido por el total de células contadas en el núcleo.

Orientación	Núcleo	N° células totales	Casillas contadas	Área total contada (mm²)
E20	Entopalio	91	53	177,6
	Nidopalio	154	30	100,5
	Mesopalio	246	63	211,1
P0	Entopalio	480	55	184,3
	Nidopalio	690	38	127,3
	Mesopalio	722	67	224,5
P7	Entopalio	304	55	184,3
	Nidopalio	341	34	113,9
	Mesopalio	445	86	288,1
P14	Entopalio	26	77	258
	Nidopalio	103	37	124
	Mesopalio	146	84	281,4

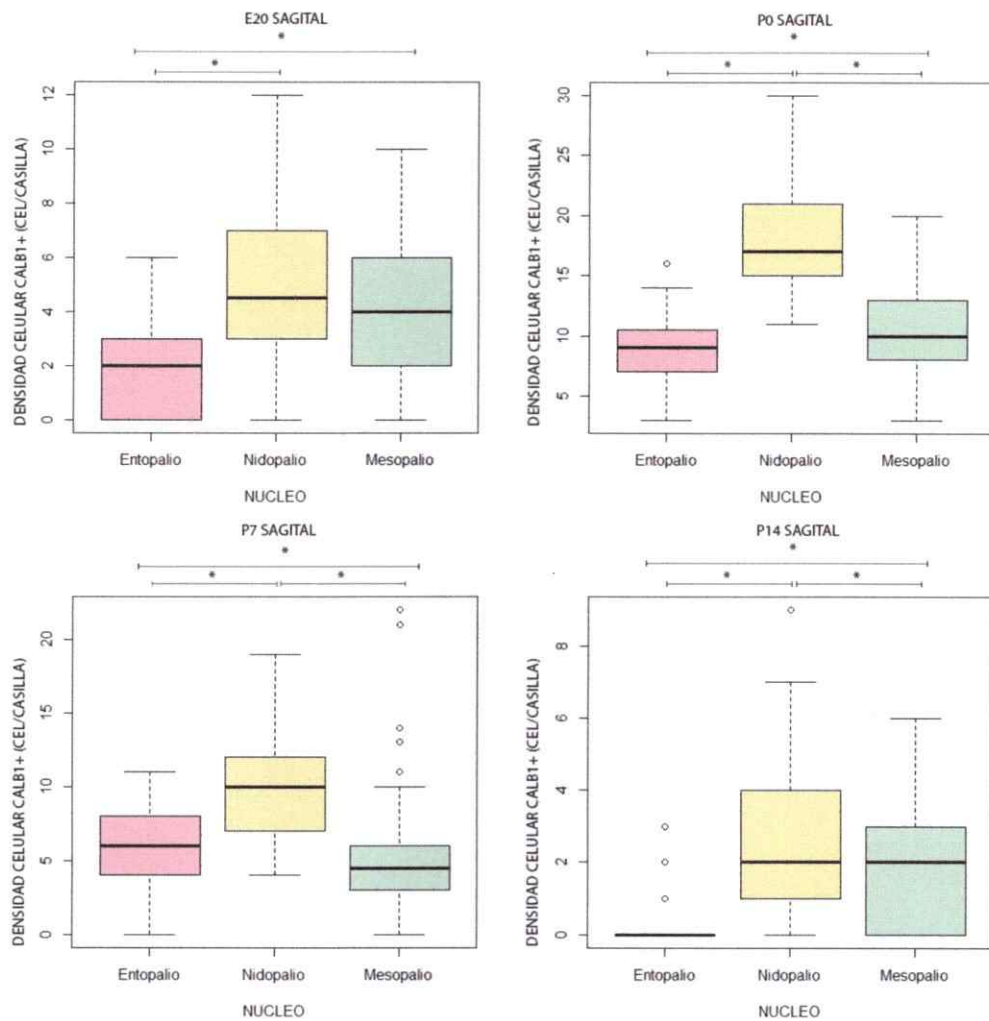


Figura 14. Secuencia temporal de la expresión de CALB1: densidades celulares. Se observa en cada gráfico la distribución de los valores de densidad celular en cada estadio del desarrollo analizado. Se puede ver que la densidad de células expresando CALB1 cambia durante el desarrollo del individuo, sin embargo la relación entre E y Ni se mantiene en el tiempo, siendo E el que menor densidad celular presenta en todos los estadios, mientras que Ni es el que presenta siempre mayor densidad celular CALB1+ (**p-value* < 0.05, Wilcoxon-Mann-Whitney, n=4).

En el gráfico presentado en la **Figura 15** se muestra la dinámica temporal que la expresión de CALB1 presenta a lo largo del período del desarrollo estudiado. Se observa que todos los núcleos cuantificados alcanzan un valor máximo en P0 (*p-value* < 0.05, ANOVA, n=4), y la tendencia entre E20 y P0 es positiva, para todos los núcleos observados (*p-value* < 0.05, ANOVA, n=4). Posterior a P0, se observa que la tendencia se revierte y es negativa, llegando a valores mínimos para densidad celular CALB1+ en los distintos núcleos estudiados (*p-value* < 0.05, ANOVA, n=4). Sin embargo, el núcleo E presenta la menor concentración de células CALB1+ para todos los estadios y núcleos revisados (*p-value* < 0.05, Wilcoxon-Mann-Whitney, n=4), mientras que el núcleo Ni presenta la mayor concentración de células que expresan el marcador molecular (*p-value* < 0.05, Wilcoxon-Mann-Whitney, n=4).

La expresión de CALB1 entonces resulta ser transitoria, y ocurre durante un período muy acotado de tiempo, alrededor del día del nacimiento del animal (P0), para luego decaer y prácticamente desaparecer del DVR visual dos semanas después, sin perderse la relación existente entre Ni y E.

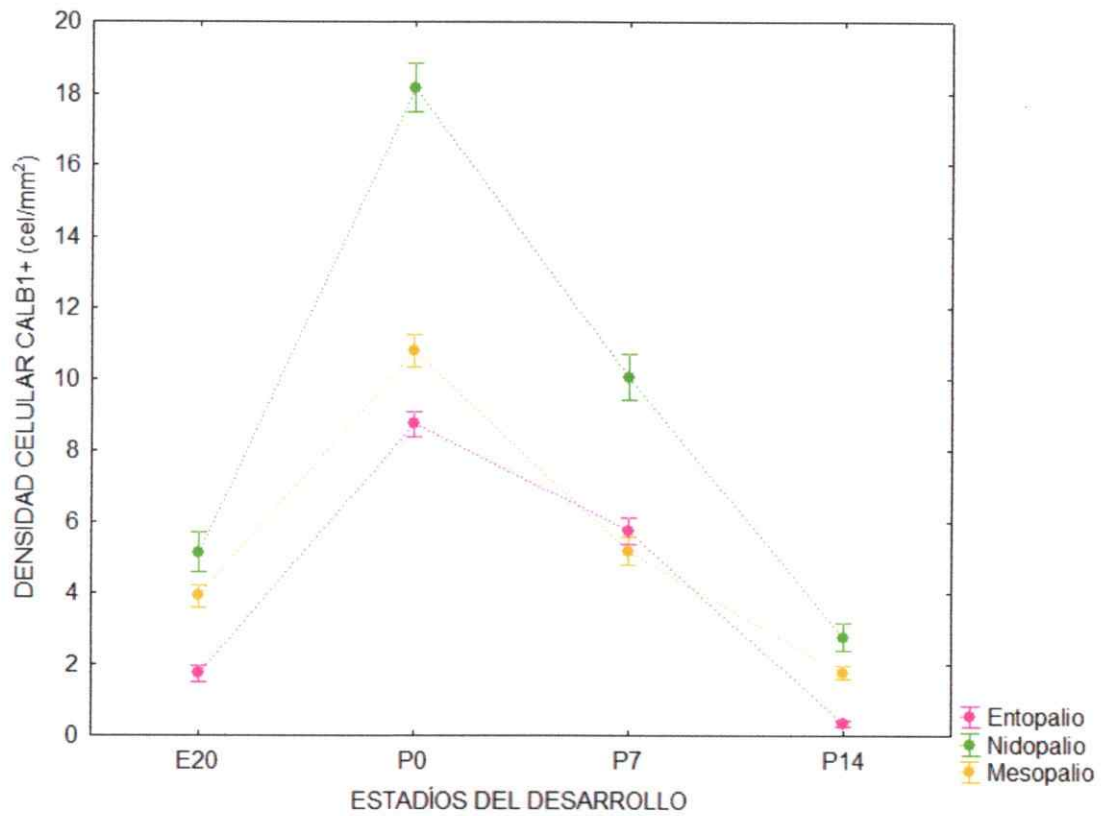


Figura 15. Patrón de expresión de CALB1 en el tiempo. La dinámica del patrón de expresión de CALB1 es similar para las tres regiones estudiadas, aumentando y disminuyendo conjuntamente en los distintos estadios del desarrollo.

3.5 Estudio del patrón de expresión de ROR β en el palio visual de *G. gallus*.

3.5.1 Expresión de ROR β en el palio visual de *G. gallus*: ensayos de hibridación *in situ*.

De los marcadores seleccionados, ROR β se eligió como marcador de identidad de capa 4, pues su uso está bien reportado en la literatura. Para estudiar su patrón de expresión en el palio visual de *G. gallus*, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* cuyos resultados revelan aquellas regiones del telencéfalo donde el RNA mensajero de este gen se está expresando. Para esto se realizaron varios ensayos (n=3) contra este marcador en cerebros de pollo en estadio P0, día de nacimiento, cuyos resultados se muestran en la **Figura 16**.

El patrón espacial de expresión de este gen en individuos en estadio P0 coincidió con lo descrito previamente en la literatura, encontrándose dentro de E y con algunas pocas células individuales fuera de esta región. Además, aparentemente dentro de E existe una subdivisión, donde la parte más ventral presenta menos cantidad de células marcadas que la parte más dorsal y externa, donde la marca es más abundante y densa. Esta característica de la anatomía del núcleo E se observa mucho mejor en un corte sagital (**Figura 16 a y b**) que en un corte coronal, donde la distribución de la marca parece más uniforme.

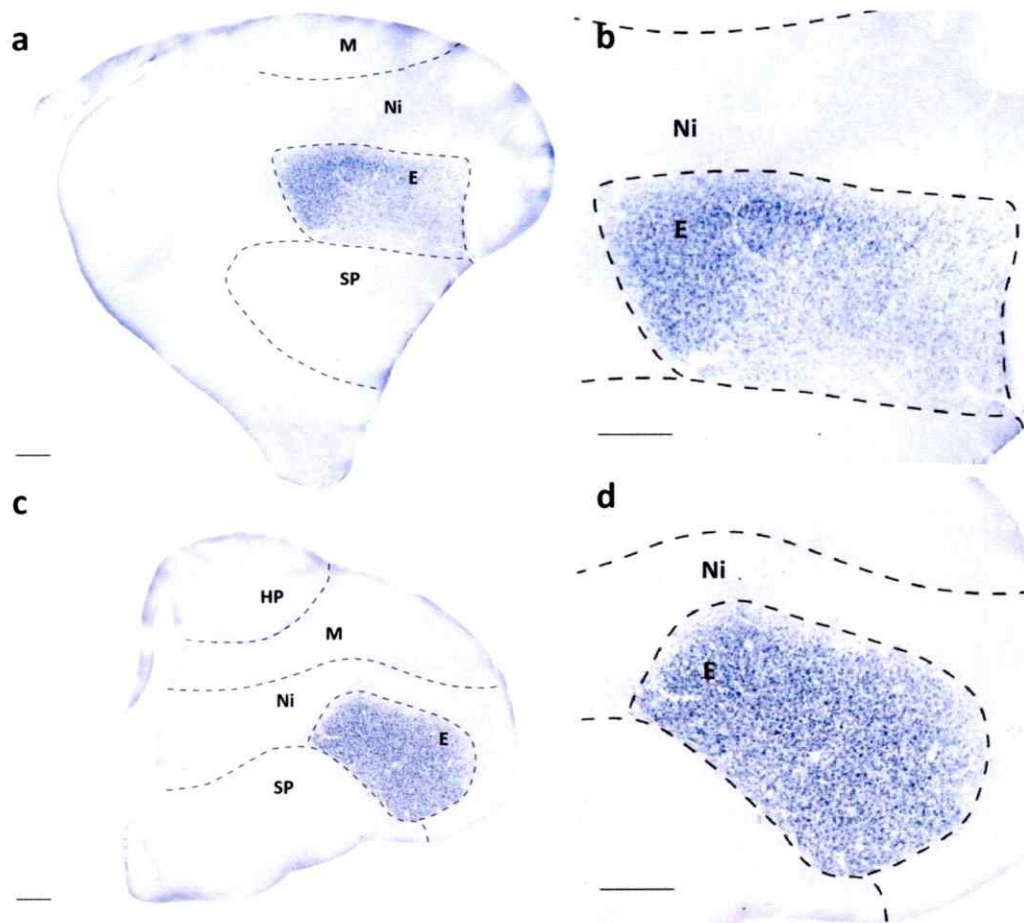
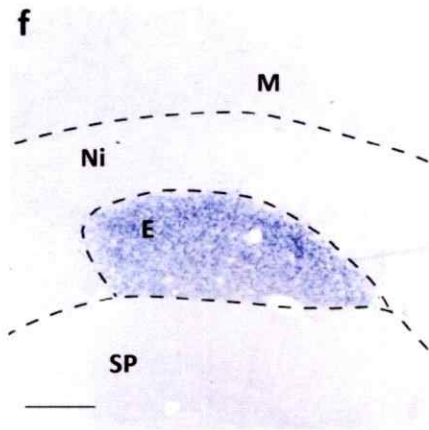
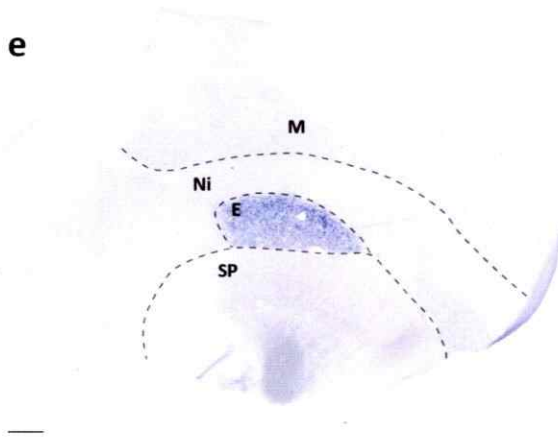
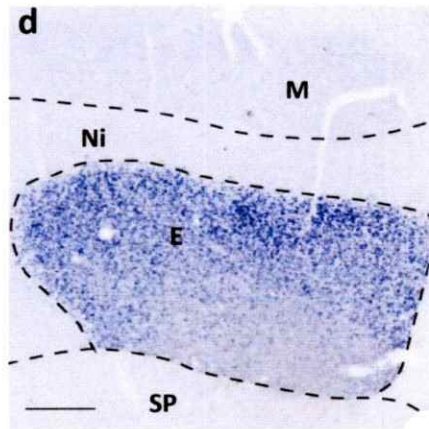
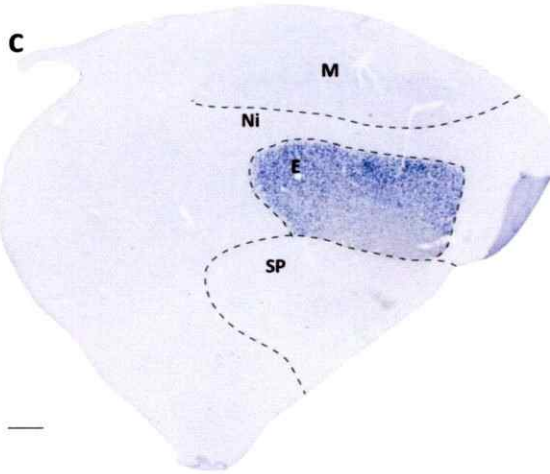
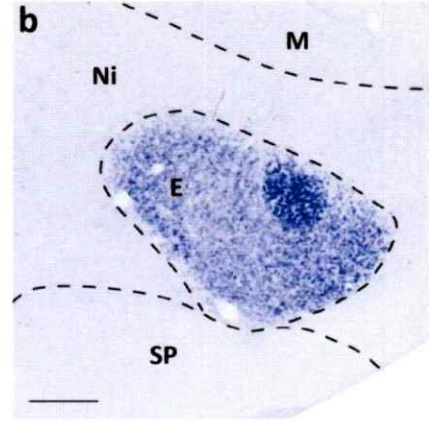
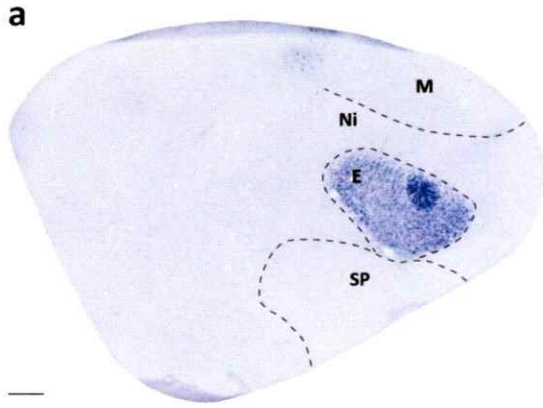


Figura 16. Ensayos de hibridación in situ: patrón de expresión de ROR β en el DVR visual de *G. gallus* en estadio P0. a: vista completa de un corte sagital, la expresión del marcador se encuentra concentrada dentro de E. **b:** detalle de (a) mostrando la región de interés. **c:** vista completa de un corte coronal, el patrón de expresión coincide con lo que se muestra en (a). **d:** detalle de (c) mostrando la marca de ROR β , se observan algunas células individuales por fuera de E. Barra de calibración: 500 μ m.

Esta característica anatómica de compartimentalización que exhibe E es mucho más evidente en estadíos más avanzados, dos a tres semanas post natal, donde encontramos que el patrón descrito anteriormente está presente a lo largo de todo el núcleo. Para evidenciar esto, se muestran los resultados de ensayos de hibridación *in situ* realizados en individuos en estadío P14-21 (**Figura 17**). Se observa además que en niveles más laterales de una serie parasagital, aparece una zona donde la marca de ROR β está aún más concentrada que en el resto de la región dorsal-externa del núcleo (**Figura 17 b**). Esta especie de punto denso se mantiene a lo largo de varios niveles, y desaparece hacia los más mediales. Los resultados de mismo ensayo para cortes coronales en individuos de la misma edad, muestra con menos claridad esta característica, sin embargo es apreciable en algunos niveles (**Figura 18 c y d**)

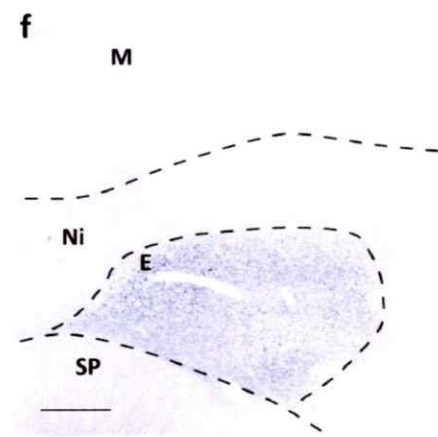
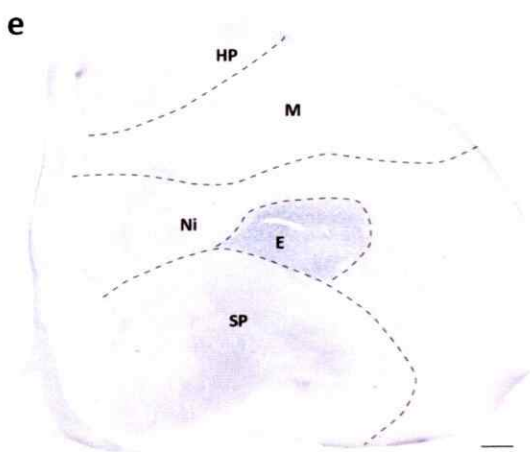
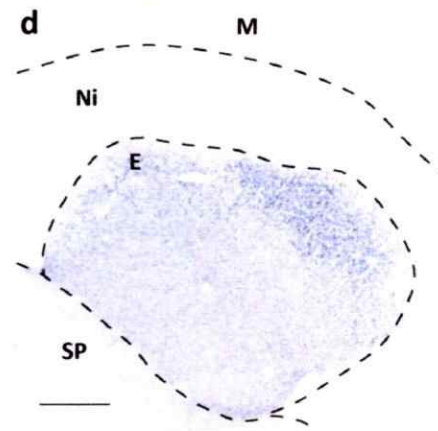
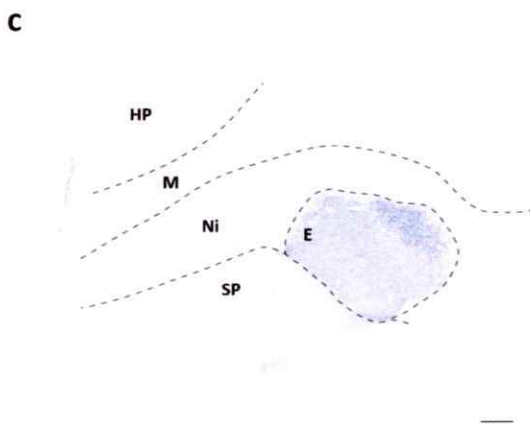
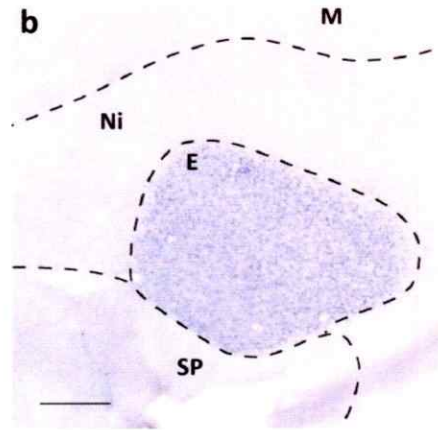
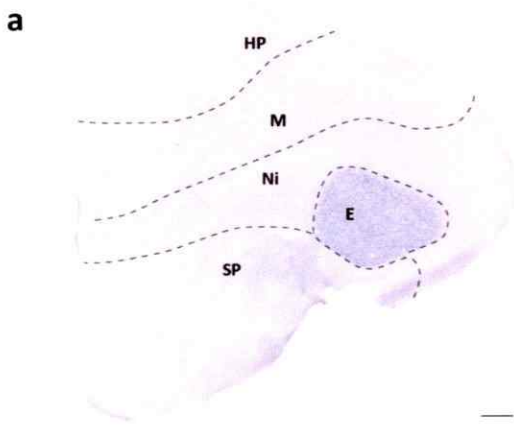
Figura 17. Ensayos de hibridación *in situ* para ROR β : vista sagital en estadío P14. a: nivel más lateral, la expresión del marcador se encuentra concentrada dentro de E, observándose mayor densidad de marca en la capa externa del núcleo. Se observa también una pequeña región aún más densa que la capa externa en la región más dorsal del núcleo. **b:** detalle de (a) mostrando la región de interés. **c:** nivel un poco más medial que (a), el patrón de densidades diferentes entre el centro y la periferia del núcleo se mantiene. **d:** detalle de (c) mostrando la marca de ROR β , se observa apenas la densidad puntual ya descrita en la región más dorsal. **e:** nivel más medial de la serie, aún se puede distinguir una capa externa más marcada que la interna. **f:** detalle de (e), la densidad puntual que encontramos en los niveles anteriores en la región dorsal ya no es identificable. Barra de calibración: 500 μ m.



3.5.2 Expresión de ROR β en el palio visual de *G. gallus* en el desarrollo.

Como se mencionó en el punto anterior, el palio visual presenta un patrón general de expresión de ROR β acorde con lo registrado literatura, pero encontramos esta diferencia entre la región más externa y el centro de E. Se miró lo que ocurría con la expresión de este marcador en el tiempo, en una serie de hibridaciones *in situ* en cerebros de pollo en distintos estadíos del desarrollo: E20, P0, P7 y P14-21, con al menos dos ensayos por estadío. Los resultados obtenidos para el patrón de expresión en el DVR visual se muestran en la **Figura 19**, donde se observa un aumento para cada estadío en niveles equivalentes.

Figura 18. Ensayos de hibridación *in situ* para ROR β : vista coronal en estadío P14. a: nivel más rostral de la serie, la diferencia entre el centro del núcleo E y la capa más externa que observamos en la serie sagital es muy leve. b: detalle de (a) mostrando la región de interés, se pierde el punto dorsal muy concentrado que observamos en la serie sagital. c: nivel un poco más caudal que (a), el patrón de densidades diferentes entre el centro y la periferia del núcleo se aprecia mejor que en el nivel anterior d: detalle de (c) mostrando la marca de ROR β , se observa la capa externa de E más marcada en la región lateral.pero sin evidencia de este punto dorsal muy marcado. e: nivel más caudal de la serie, se puede distinguir la capa externa marcada más intensamente que la interna. f: detalle de (e), la densidad puntual que encontramos en los niveles sagitales sigue sin poderse identificar. Barra de calibración: 500 μ m.



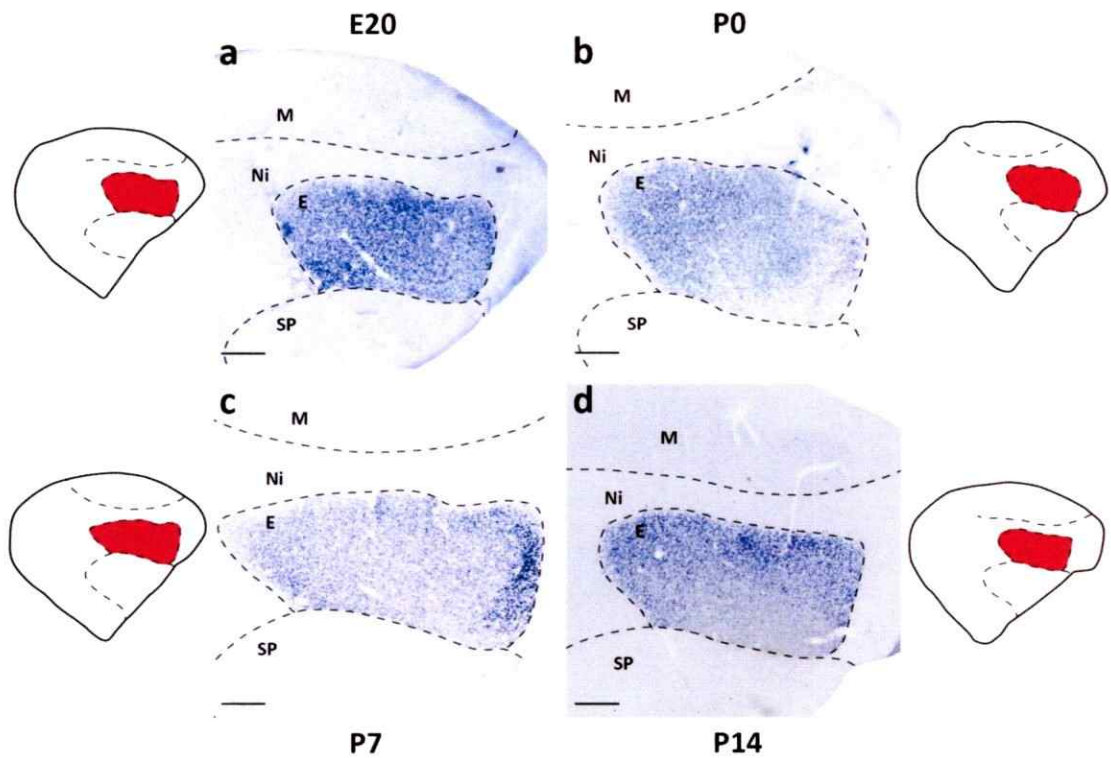


Figura 19. Patrón temporal de expresión de ROR β , vista sagital. a: estadio embrionario 20 prenatal, se observa que la diferencia entre el centro de E y la capa externa es muy leve. **b:** día de nacimiento P0, la diferencia entre el centro de E y la capa externa se hace notoria. **c:** a siete días del nacimiento, P7, se mantiene la diferencia entre el centro y la capa externa de E. **d:** a dos semanas del nacimiento, la diferencia observada en el estadio anterior se mantiene. Barra de calibración: 500 μ m.

3.6 Expresión de ROR β en otras regiones del palio de *G. gallus*.

Parte del patrón de expresión de este marcador molecular de identidad de capa 4 abarca regiones que se encuentran por fuera del DVR visual, en otras estructuras que reciben aferencias sensoriales tanto de la parte somatosensorial (núcleo basalis, Ba) como auditiva (núcleo field L, FL). Estos núcleos se encuentran descritos en la literatura como ROR β positivos en las aves, sin embargo para el caso de Ba los resultados no son concordantes con la evidencia existente. Para el caso del FL en cambio, el patrón obtenido es coherente con lo esperado. Ambos resultados se muestran en la **Figura 20**, donde se pueden ver dos cortes parasagitales más mediales que los revisados en el título anterior. En esta figura, se puede ver también que existen células individuales y aisladas expresando ROR β en otros sitios fuera de éstos núcleos, situación muy similar a la que ocurre con el mismo marcador en el entopalio.

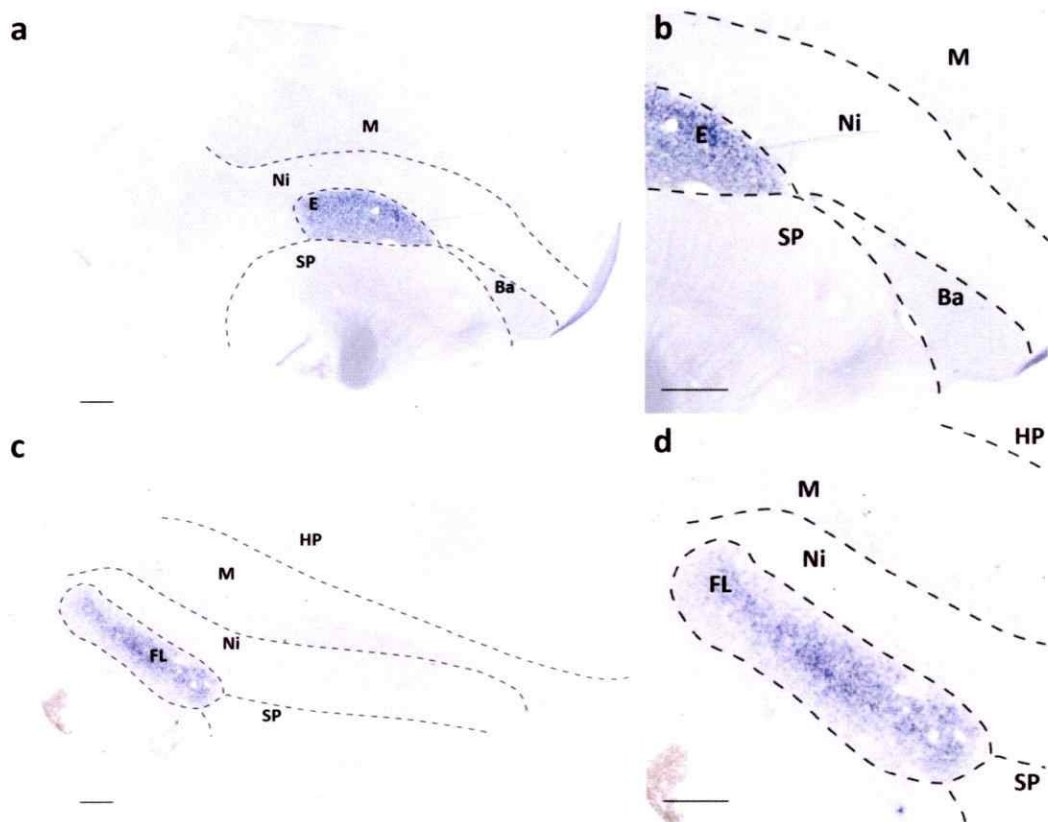


Figura 20. ROR β en otros núcleos del palio sensorial en estadio P14-21, vista sagital. a: expresión del marcador ausente en Ba, se puede ver el contraste de la marca con E. **b:** detalle del núcleo Ba, se observa que no presenta marca. **c:** expresión del marcador en el núcleo FL, marca intensa y abundante. **d:** detalle del núcleo field L, se observan además células aisladas fuera de éste que están expresando el marcador. Barra de calibración: 500 μ m.

3.7 Expresión de ROR β en otras regiones del palio de *G. gallus* en el desarrollo.

Los ensayos de hibridación *in situ* descritos anteriormente para el marcador ROR β en el DVR visual, entregaron resultados respecto del patrón de expresión de este marcador en el desarrollo de los núcleos Ba y FL (Figuras 21 y 22).

Respecto del desarrollo de basalis, se observa que en ninguno de los estadíos estudiados este núcleo presenta marca, hecho que resulta distinto a lo esperado y descrito en la literatura. En cambio, para el núcleo field L, se observa que el patrón de expresión es bien dinámico, estando presente hacia los estadíos más avanzados (P14), mientras que en los estadíos más tempranos, ROR β aún no alcanza su máximo nivel de expresión.

Figura 21. Patrón temporal de expresión de ROR β fuera del DVR visual: núcleo Ba, vista sagital. Se observa en esta serie del desarrollo que Ba no presenta marca en ninguno de los momentos registrados. Esto se contradice con lo registrado en la literatura, donde se describe marca de ROR β en esta región, al menos para estadíos adultos. Barra de calibración: 500 μ m.

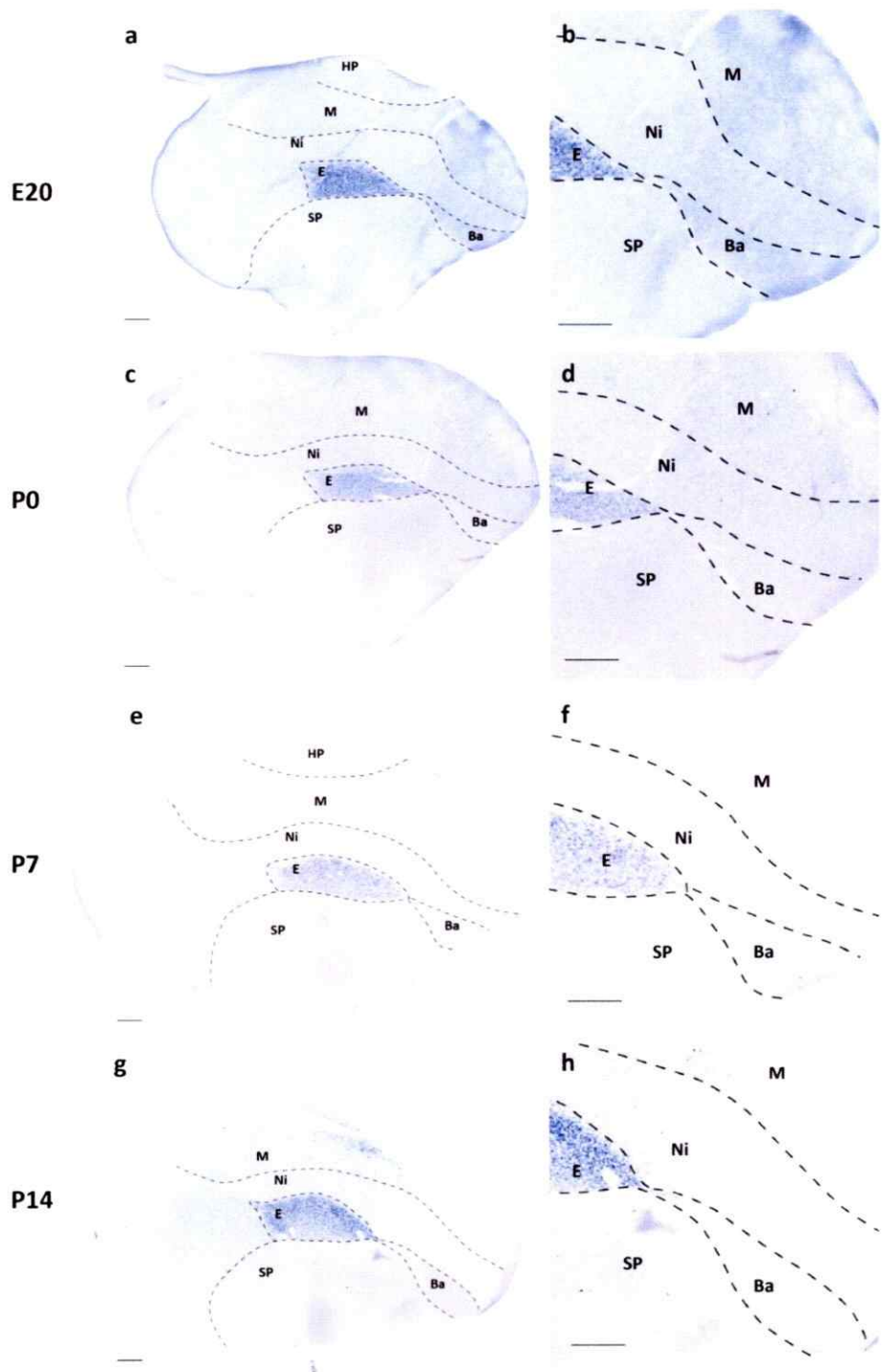
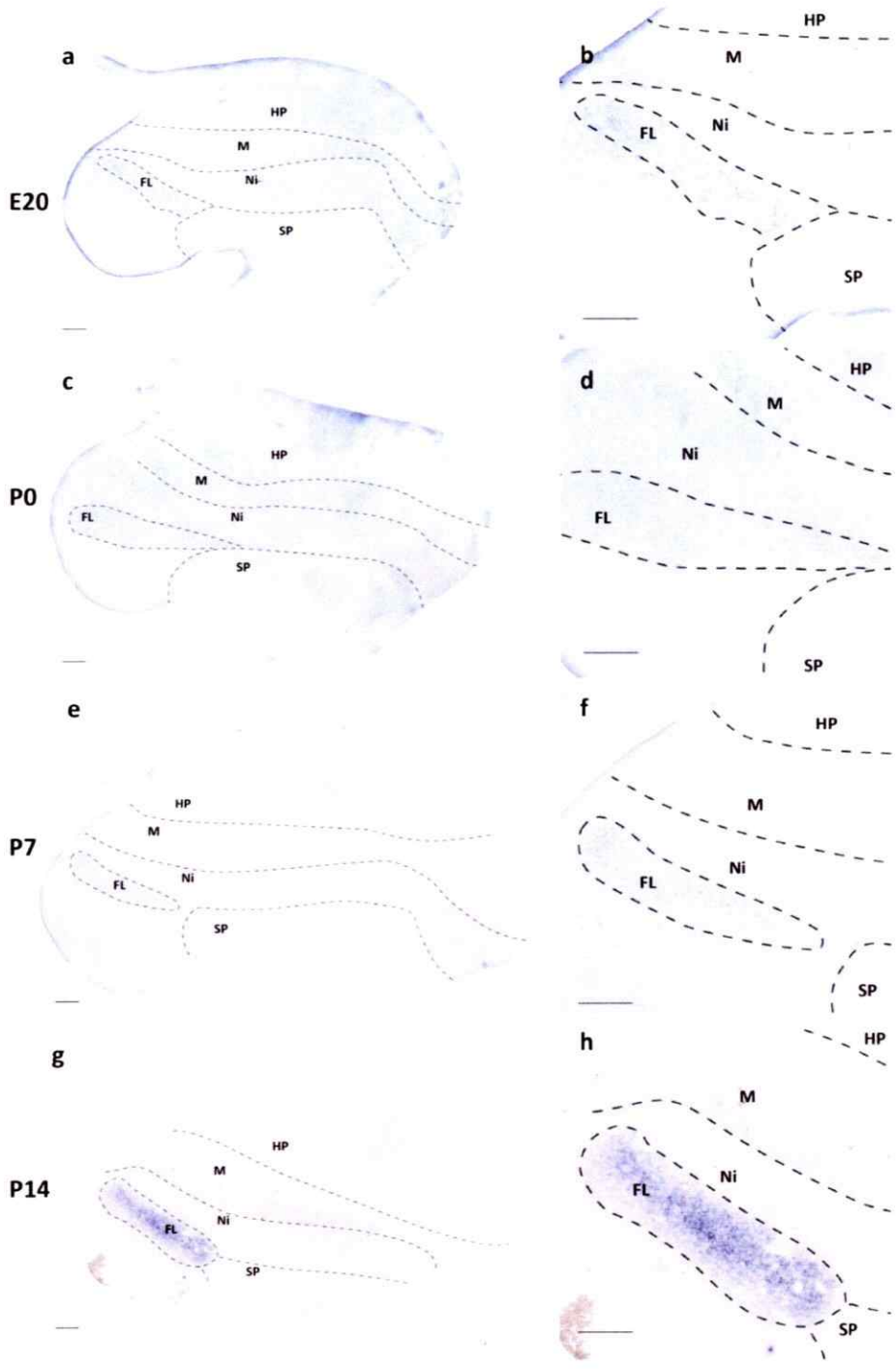


Figura 22. Patrón temporal de expresión de ROR β fuera del DVR visual: núcleo FL, vista sagital. a: estadio prenatal E20, se observa una marca muy leve en FL. **b:** detalle de (a), se aprecia marca dentro del núcleo, que aún es incipiente. **c:** se observa marca aún muy débil. **d:** detalle de (c). **e:** la expresión del marcador aún no es fácilmente observable. **f:** detalle de (e). **g:** marca muy intensa en FL. **h:** detalle de (g), se observan una marca definida e intensa dentro de FL, además de algunas células aisladas en otras regiones. Barra de calibración: 500 μ m.



4. DISCUSIÓN

La técnica de hibridación *in situ* es, esencialmente, un método histoquímico combinado con procedimientos utilizados en biología molecular. Esta técnica se utiliza ampliamente para estudiar expresión genética en tejidos fijados y preparaciones histológicas, mediante la hibridación específica de una sonda (marcada con alguna molécula reportera) con secuencias de nucleótidos de interés, y la posterior visualización del híbrido sonda-transcrito. La hibridación puede realizarse entre hebras de RNA, de DNA o RNA con DNA, y mediante el uso de varios tipos de sonda diferentes, incluyendo las de DNA, RNA o de oligonucleótidos. En el presente trabajo se utilizaron sondas de RNA cuyos nucleótidos están marcados con digoxigenina como molécula reportera (puede variar entre isótopos radioactivos, moléculas fluorescentes, o moléculas reveladas a través de métodos histoquímicos).

El ensayo de hibridación *in situ* (ISH) localiza secuencias de genes *in situ*, como su nombre lo indica, visualizando el producto de la expresión (mRNA) mientras se preserva la integridad celular dentro de los tejidos heterogéneos, permitiendo interpretaciones anatómicamente significativas, lo que otorga una gran ventaja por sobre otras técnicas de detección de expresión genética. Es capaz de detectar

expresión genética de transcritos cuya abundancia mínima oscila entre 10 y 20 copias por célula. Así mismo, esto constituye una desventaja si el gen de interés se expresa con menor abundancia que la mencionada.

El ensayo de ISH permite identificar productos de genes provenientes de síntesis *de novo* en las células donde se observen resultados positivos. Si lo comparamos con otros métodos de detección de productos génicos, como por ejemplo el ensayo de inmunohistoquímica (IHC), este último podría arrojar falsos positivos en caso de que las células del tejido ensayado ingresen proteínas externas de manera inespecífica, dificultad que no presentan los ensayos de ISH.

No obstante, esta técnica presenta un conjunto de dificultades bastante único dada la gran cantidad de variables que involucra. Una de las dificultades que ya fue mencionada, es la incapacidad de detectar concentraciones muy bajas del transcrito de interés (menos de 10 copias por célula), o bien el enmascaramiento del resultado a causa de proteínas asociadas al transcrito de interés, o que éste se encuentre protegido dentro de la célula o estructuras celulares. Para disminuir las dificultades del último punto mencionado, el tejido es tratado con proteinasa K a 37°C, y su concentración es ajustada de acuerdo a lo observado. Este paso es fundamental para el ensayo de ISH, pues permite permeabilizar el tejido y con esto facilitar el paso de la sonda al interior

de las células. Sin embargo, una prolongación excesiva de tiempo de exposición a la proteasa resulta en sobredigestión celular, lo que finalmente deteriora la integridad estructural del tejido y produce pérdida de la señal obtenida.

El diseño de la sonda y el tipo de sonda que se utilice (RNA o DNA, radioactiva o no radioactiva, etc.) también están sujetos a distintas dificultades. Específicamente, en este trabajo se utilizaron sondas específicas de RNA diseñadas a partir de los criterios ya descritos en la sección de métodos, que aseguran la mayor especificidad posible. Las sondas de RNA son mucho menos estables que las de DNA, registrándose deterioro ya a partir de la primera semana de uso.

Respecto de la hibridación misma entre la sonda y el transcrito de interés, la unión y/o separación de dos hebras de nucleótidos hibridadas depende de varios factores, incluyendo las temperaturas a las que se llevan a cabo los diferentes pasos de la técnica, concentraciones salinas, pH, la naturaleza tanto de la sonda como de la secuencia de interés, la composición de las soluciones de lavado, etc. A pesar de la amplia gama de protocolos ya estandarizados, todas estas variables pueden estar afectando el resultado final del ensayo, por lo que es importante revisarlas con detención sabiendo qué rol cumplen dentro del protocolo.

La hibridación *in situ* es un procedimiento dificultoso y extenso, por lo que es importante preguntarse si es el método adecuado a utilizar o si acaso un método distinto y menos extenso permitiría abordar el problema de interés de igual manera.

4.1 Selección de marcadores.

Se seleccionaron 11 marcadores en base al patrón de expresión que éstos tienen en el cerebro de *M. musculus*, tanto para estadios juveniles (P4) como para adultos sexualmente maduros (P56). De los 11 marcadores, sólo dos fueron evaluados en ensayos de hibridación *in situ*. Los resultados de estos ensayos en cerebros de *G. gallus* se interpretaron a partir de la información existente en la literatura y además se compararon acorde a las ventanas temporales donde se expresaban, es decir, si un marcador se expresa en P4 pero no en P56 para el ratón, se consideró esta ventana temporal para la expresión del mismo marcador en pollo, desde estadios tempranos post-natales (P0) hasta el estadio más adulto disponible (P14-21).

4.2 Amplificación y clonamiento de fragmentos seleccionados.

De los 11 genes seleccionados, cuatro de ellos no pudieron ser amplificados por PCR (BRN2, EAG2, CUX2, FOXP2). Como se mencionó en la sección de métodos, las reacciones de PCR se hicieron a partir del cDNA total de cerebro de dos estadíos (embrionario 16, E16, y día de nacimiento, P0). Se probaron 12 temperaturas distintas para cada par de *primers* utilizados, con el fin de identificar la temperatura óptima de la reacción. Una de las razones por las cuales se podría explicar este fallo en la amplificación es que la temperatura real de annealing para BRN2, EAG2, CUX2 y FOXP2 haya estado por fuera del rango utilizado, o bien que el transcrito de estos genes no se esté expresando ni en E16 ni P0, estadíos desde donde se extrajo mRNA total para las posteriores reacciones. Esta última parece ser una explicación viable, dado que como ya se vio en este trabajo, algunos de los marcadores lámina-específicos se expresan dentro de una ventana temporal específica.

Respecto de lo ocurrido con PXND1, se obtuvo una banda del peso esperado pero con una secuencia completamente diferente a la reportada en las bases de datos. Esto podría deberse a una baja especificidad de los *primers* diseñados, es decir, que tengan la capacidad de amplificar otros fragmentos de otros genes incluso después de las medidas tomadas al momento de diseñarlos, o bien que la muestra utilizada en el

PCR haya estado contaminada, amplificando fragmentos de DNA proveniente de otra fuente biológica.

4.3 Estudio del patrón de expresión de marcadores de identidad de capa en el DVR visual de *G. gallus*.

De las seis sondas probadas, cuatro (COUPTF2, ROR β , CALB1, CUX2) dieron resultados positivos para el ensayo de ISH. De estos cuatro, COUPTF2 no dio marca en ninguna región del cerebro de *G. gallus*; sin embargo, en ensayos de ISH en cerebro de paloma adulta, el marcador se observó débilmente en el nidopalio intermedio (resultados no incluidos). La expresión de este marcador de capa 2/3 no resultó conspicua como se esperaba, pero sí fue localizada en las regiones paliales putativamente correspondientes a esta capa. Este resultado se contradice con la evidencia registrada en la literatura, donde COUPTF2 se ha descrito presente en el nidopalio en estadíos bastante tempranos del desarrollo (pre-natal E6; Chen et al. 2013; Jarvis et al. 2013). Esto podría deberse a varias razones, pero dado que los controles positivos y negativos para este marcador resultaron según lo esperado, una posibilidad real es un fallo en la síntesis de sonda. Esto explicaría que en *C. livia* el marcador se haya expresado débilmente, pues si ha habido un error en el proceso de síntesis y la secuencia de mRNA (sonda) obtenida no es idéntica a la original (templado,

DNA), la afinidad que la sonda tenga con el mRNA a detectar va a ser menor que la afinidad de la sonda idéntica al templado. Otra posible razón es que la ventana temporal donde el cerebro de *G. gallus* está expresando COUPTF2 sea distinta a la de aquellas aves donde se ha reportado el patrón de expresión de este gen, reportado sólo en los trabajos de Jarvis et al (2013) y Chen et al (2013). Para comprobar esto último, es necesario ampliar los estadíos revisados en este trabajo a estadíos más adultos y quizás también en el desarrollo de aves. Finalmente, no podemos descartar una pérdida de la expresión de COUPTF2 en el cerebro de *G. gallus*.

Para descartar el fallo en la síntesis de la sonda los ensayos de ISH fueron repetidos con sondas diferentes, sintetizadas en distintos momentos. El resultado siempre fue negativo, por lo que el uso de COUPTF2 se descartó para futuros pasos.

Para el caso de CUX1, los ensayos de ISH dieron resultados positivos dentro del tectum óptico (resultados no incluidos), pero no se obtuvo marca en las regiones de interés (telencéfalo). Dado que la estructura marcada no está dentro del marco de este trabajo, su uso se descartó para futuros pasos; sin embargo, este resultado podría estar reflejando la pérdida de la expresión de CUX1 en las regiones telencefálicas en *G. gallus*, o bien la adquisición de éste como novedad en el linaje de los mamíferos.

Sólo dos sondas (PCP4, ER81) de un total de seis obtenidas no dieron ningún tipo de marca en ninguna región del cerebro de *G. gallus* ni *C. livia*. Aún cuando los controles para estos experimentos dieron el resultado esperado, cada sonda particular tiene características únicas de temperatura de hibridación, pues este parámetro depende directamente del porcentaje de bases C y G que la sonda contenga. Se probaron tres temperaturas diferentes sin resultados positivos, por lo que es deseable repetir los ensayos variando parámetros combinados, por ejemplo temperatura y tiempo de exposición del tejido a la proteinasa K durante las etapas de prehibridación, además de la síntesis *de novo* de cada sonda.

4.4 Marcadores moleculares en el DVR visual: dinámica espacial.

El entopalio es la principal región sensorreciente del DVR visual y como hemos visto, se encuentra anatómicamente dividido en al menos dos regiones, interna o ventral y externa o dorsal, las que exhiben un patrón hodológico diferencial. En relación con la identidad de las células al interior de E, se ensayaron marcadores moleculares de identidad de capa con la intención de observar si sus patrones de expresión se correlacionan de alguna manera con ese patrón hodológico. Se encontró que, de manera coherente con lo propuesto, la expresión de distintos marcadores moleculares dentro de E se encuentra segregada y no es homogénea para todo el

núcleo. El marcador molecular ROR β en individuos de estadio P14-21 presenta un patrón de expresión segregado al interior de E, observándose la mayor densidad de marca en la región dorsal del núcleo. Por el contrario, la región ventral de E se muestra mucho menos abundante e intensamente marcada. Si bien no se conoce cuál es el ligando específico de ROR β ni tampoco cuál es su acción concreta sobre las células, sí se ha observado que al ser sobreexpresado durante el desarrollo en corteza somatosensorial de *M. musculus* la cantidad de *barrels* o barriles aumenta (Jabaudon et al. 2012), por lo que se ha relacionado con el ordenamiento de las células que conforman las columnas corticales. Coherentemente con esta propuesta, los resultados de este trabajo indican que la expresión de este gen se restringe casi exclusivamente al interior de E, y acorde con lo esperado según la anatomía, la región más dorsal de E, que participa masivamente de la formación de procesos columnares ascendentes, se encuentra enriquecida en este factor, de manera similar a cómo se encuentra enriquecida la capa 4 de la corteza.

Al contrario de la región dorsal de E, la región ventral de este núcleo presenta una densidad notoriamente menor de células positivas para ROR β . Las células pertenecientes a esta región entopial se han asociado a proyecciones descendentes hacia el subpalio más que a la formación de columnas, por lo que este patrón de expresión de ROR β no resulta inesperado. Dada la naturaleza estriado-proyectante que E ventral posee, este trabajo sugiere que estas células entopiales tendrían alguna

correspondencia con las células de la capa 5 de mamíferos (Ahumada-Galleguillos et al. 2015) las que podrían ser su equivalente hodológico. Las sondas diseñadas para evaluar poblaciones celulares tipo capa 5 (PCP4 y ER81) no funcionaron de acuerdo a lo esperado, por lo que es importante revisar y repetir los ensayos de ISH bajo distintas condiciones. Aún así, esto no asegura que estos marcadores sean los que efectivamente se expresan en la población celular del entopallio con hodología tipo capa 5, dado que la anatomía más fina de E aún no es del todo clara y existen al menos cinco tipos neuronales hodológicamente diferentes en la capa 5 de la neocorteza (Oswald et al. 2013).

Finalmente, se observó que ROR β se expresaba en células aisladas del Ni dentro del DVR visual (**Figuras 16 y 17**), núcleo que según lo descrito por Egedi y Tömböl (1994) recibiría proyecciones talámicas menores. Dado esto, no debería ser extraño que Ni expresara este marcador molecular en bajas densidades.

Por otro lado, se propuso en esta tesis el uso de CALB1 como candidato a marcador molecular de identidad de capa 2/3. Si bien CALB1 no se utiliza típicamente como marcador molecular de identidad de capa, el patrón de distribución que su transcrito tiene en el telencéfalo de mamíferos está bien estudiado y es conservado en

este linaje, donde se restringe a la capa 2/3 expresándose con gran intensidad y abundancia, mientras en otras capas es comparativamente muy escasa.

En la corteza de mamíferos, la capa 2/3 comunica distintas regiones corticales y además genera las eferencias del sistema columnar, hodología similar a la que exhibe Ni, que comunica distintas zonas paliales y además es donde se originan las proyecciones descendentes. Estas similitudes hodológicas entre ambas regiones son la base para proponer homologías entre ellas. A simple vista (**Figuras 8, 9 y 10**) se puede apreciar que CALB1 se expresa dentro de la región del Ni y que a lo largo de todos los niveles, tanto sagitales como coronales, se mantiene dentro de esta zona, mostrando una señal intensa y significativamente mayor que la señal exhibida por los otros núcleos (M y E) (**Figuras 11 y 12**). Para M se observó que la densidad de células CALB1+ fue significativamente menor que para Ni, pero significativamente mayor que la densidad reportada para E. Esto sugeriría la existencia de una población mesopalial de células que podrían compartir algún rasgo con las células de la capa 2/3 o del Ni, sobre todo porque la distribución de estas células CALB1+ parece no ser azarosa. Sin embargo, esto resulta de una simple observación que debe ser corroborada, además de ser necesarios estudios más profundos acerca de la anatomía y fisiología de M para poder afirmar que efectivamente exista una población celular tipo capa 2/3 dentro de este núcleo.

Finalmente, de acuerdo a lo esperado según la anatomía del DVR visual, E presenta una densidad celular CALB1+ comparativamente despreciable. Sin embargo, es importante mencionar que estas escasas células CALB1+ se ubican principalmente en la región dorsal de E, pues se han descrito poblaciones de interneuronas en esta zona del núcleo (Csillag, Stewart, and Curtis 1987).

4.5 Marcadores moleculares en el DVR visual: dinámica temporal.

Como ya se ha visto, la expresión del marcador molecular ROR β no es homogénea al interior de E. Esta segregación del patrón de expresión sin embargo no es una característica estática de E, sino que aparece con el paso del tiempo y a medida que el cerebro del animal madura y se desarrolla. Para el estadio más temprano revisado en este trabajo (E20) se observó que la distribución de la marca de ROR β era homogénea al interior de E, mientras que hacia estadios más avanzados el marcador molecular progresivamente restringe su mayor nivel de expresión al E dorsal. El hecho de que este patrón se refine con el tiempo sugiere que las estructuras estudiadas no poseen la identidad capa 4/ROR β + de manera intrínseca ni estática, sino que más bien el hecho de que sean ROR β + se relaciona con alguna de las operaciones que la población neuronal de E dorsal sufre dentro de su contexto particular.

En este trabajo se observó que la expresión del marcador molecular CALB1 presenta una expresión variable en el tiempo, donde las relaciones en los niveles de expresión entre Ni y E se mantienen, es decir, Ni concentra la mayor cantidad de células CALB1+ en todos los estadios estudiados, mientras que E siempre presenta la menor cantidad. La intensidad de la marca y la cantidad de células que expresan CALB1 en el DVR es baja en E20, alcanzando una densidad máxima simultáneamente en los tres núcleos (E, Ni y M) durante el día de nacimiento (**Figuras 13, 14 y 15**). Posteriormente, la cantidad de expresión decae y tiende a desaparecer.

Según Suárez et al. (2005), la dinámica temporal de CALB1 en el DVR visual muestra un *peak* de expresión de la proteína al interior del núcleo E alrededor de los estadios E14-E16, sin observarse marca en Ni. Posteriormente este *peak* decae progresivamente hasta P0 sin desaparecer de E por completo. Por otra parte, en este estadio se observa una gran densidad de células que expresan la proteína CALB1 en Ni. Estos resultados coinciden con los bajos niveles de expresión encontrados en E20 durante este trabajo para todos los núcleos. Posteriormente, se observa un aumento global en la expresión del transcrito de CALB1, alcanzando el *peak* ya descrito en P0. Tomando esto en cuenta, se puede decir que tanto E como Ni presentan variaciones en la expresión de CALB1 en diferentes momentos de su desarrollo. En particular el aumento de la expresión de CALB1 en los tres núcleos del DVR visual durante el día de nacimiento resulta de interés, ya que podría tener relación con cambios de actividad

del sistema visual asociados al nacimiento, pudiendo estar relacionado con una maduración general del DVR.

Dado el comportamiento descrito para la expresión del marcador molecular CALB1, resulta de interés ampliar la ventana temporal de estudio de este marcador, pues presenta una dinámica compleja no descrita en su totalidad, con *peaks* y descensos en diferentes núcleos del DVR visual, en distintos momentos del desarrollo.

4.6 Marcadores moleculares fuera del DVR visual: dinámica espacial y temporal de Ba.

De acuerdo a la literatura, los dos núcleos sensorreceptores del DVR no visual (FL y Ba) presentan marca de ROR β al igual que E (Chen et al. 2013; Jarvis et al. 2013). En la ventana temporal estudiada en este trabajo, se encontró que la marca en FL si bien está presente, presenta una dinámica temporal que será discutida más adelante. Inesperadamente, se encontró que el núcleo Ba no presenta marca de ROR β . Resulta interesante la ausencia de ROR β en Ba, pues se observa en todos los estadios estudiados en este trabajo, donde el marcador molecular no se expresa ni antes ni después del nacimiento. Incluso hacia el estadio más avanzado estudiado (P14-21), si

bien se logra diferenciar el núcleo del resto de las láminas paliales, la calidad de la marca obtenida está lejos de ser clara como sí lo es en los otros núcleos.

En aves, el núcleo Ba se asocia a la somatosensorialidad facial, y recibe aferencias sensoriales derivadas directamente del núcleo principal del trigémino, esto es, sin un relevo talámico, a diferencia de E y FL, que reciben aferencias sensoriales derivadas de núcleos del tálamo dorsal (Rotundo (Rt), y Ovoidalis (Ov) respectivamente). Esta característica podría estar asociada a la falta de expresión de ROR β en Ba.

Si ROR β se relacionara efectivamente con el ordenamiento de las células sensorrecipientes en relación a los procesos columnares, entonces esperaríamos de estos resultados que, durante el período de desarrollo explorado en esta tesis, el núcleo Ba aún no se encuentre en el momento de ordenarse en torno a las aferencias sensoriales. Sin embargo, no existe evidencia que indique cuándo es el momento en que los terminales sensoriales aferentan a Ba, a pesar de que en los ensayos de ISH realizados en este trabajo se pueden observar los procesos columnares ascendentes ya formados en la región del DVR donde se ubica este núcleo (observaciones, Figura 21 B), por lo que se puede pensar que ROR β , más que participar del establecimiento de las columnas, tendría que ver con la madurez de las conexiones, o el refinamiento

conectivo de éstas. Sin embargo, para hacer estas afirmaciones hacen falta estudios que describan la dinámica del establecimiento de columnas y la secuencia temporal de eventos conectivos que este establecimiento implica. Además, dados los resultados de este trabajo, es necesario nuevamente ampliar el rango de estadios del desarrollo a estudiar ya que ROR β podría expresarse tardíamente en Ba.

4.7 Marcadores moleculares fuera del DVR visual: dinámica espacial y temporal de FL.

El núcleo FL pertenece a la región auditiva del DVR y presenta una organización columnar equivalente a la observada en el DVR visual y se ha reportado su naturaleza ROR β + con anterioridad. En el trabajo de Chen et al. (2013) se observa que al primer día post-natal (P1), la marca de ROR β es bastante débil, mientras que al siguiente estadio estudiado (adulto, más de 120 días) la marca es intensa y se limita al interior del núcleo. Para el caso de los estadios revisados en este trabajo, observamos que el patrón de expresión de ROR β presenta una dinámica temporal distinta a la expresada en E y en Ba; mientras en los estadios más tempranos (E20) se observa que FL no presenta rastros de ROR β , a medida que el desarrollo avanza la marca se hace más notoria, y aumenta considerablemente entre P0 y P14-21, registrándose en estos últimos estadios el *peak* de expresión.

De manera muy similar a lo que ocurre con Ba, el marcador molecular de identidad de capa 4 no se estaría expresando en estadíos postnatales tempranos. Sin embargo, una semana después del nacimiento el núcleo FL ya está expresando ROR β de manera notoria, sin alcanzar sus niveles máximos de expresión. Nuevamente, nos encontramos con la dificultad de no conocer la dinámica temporal del establecimiento de las columnas en esta región, por lo que es difícil referirse a las posibles relaciones entre el supuesto rol de ROR β y el carácter columnar de estas regiones, mas sí se puede resaltar el hecho de que ROR β presente patrones temporales dinámicos de expresión tanto en E como en FL, sugiriendo una especie de maduración sensorial de los núcleos asociada a la expresión del marcador molecular.

4.8 Comentario final.

Muchos genes se han usado a modo de marcador molecular de identidad celular, con el objeto de identificar poblaciones celulares que de una u otra manera poseen alguna característica que permite etiquetarlas. Estas etiquetas generalmente se entienden como características estáticas y permanentes de aquellas poblaciones celulares que éstas identifican. Sin embargo, como se ha discutido en este trabajo, los resultados obtenidos sugieren que la expresión de estos factores responde más bien a operaciones celulares que están ocurriendo en estas poblaciones en momentos

determinados de sus desarrollos, e implicando contextos particulares. Pareciera entonces que estos marcadores moleculares se relacionaran con una identidad transitoria que estas células adquieren y/o pierden de acuerdo a acontecimientos que ocurren en sus contextos particulares, probablemente siendo ésta la dimensión compartida entre dos poblaciones celulares que presentan la misma etiqueta molecular. Por lo tanto, referirse y considerar estos marcadores moleculares como etiquetas para identificar tipos o identidades celulares invariables en el tiempo resulta contradictorio, pues como hemos visto, el patrón de expresión de estos genes es dinámico y cambia conforme las estructuras cerebrales también lo hacen.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo mostró que el patrón de expresión de los marcadores moleculares de identidad celular se correlaciona con el patrón hodológico que se observa al interior del DVR visual. Así, la sectorización hodológica que existe al interior de E se refleja en el patrón de expresión de ROR β , donde la región dorsal que participa de los procesos columnares resulta densamente marcada, mientras que la región ventral estriado-proyectante exhibe una marca mucho menos intensa. Este marcador además presenta una temporalidad en su patrón de desarrollo, refinándose en la medida en que el telencéfalo madura y establece sus relaciones con otros elementos cerebrales.

Fuera del DVR visual, el núcleo FL presenta una marca de ROR β acorde a lo esperado, mientras que Ba no presenta marca. Además, la dinámica temporal de este marcador sugiere que estos núcleos están cambiando, apareciendo la expresión del marcador en estadios post-natales.

Respecto del marcador molecular CALB1, la mayor densidad celular CALB1+ encontrada en el DVR visual se ubica en Ni, seguido de lejos por M y siendo prácticamente cero en E. Además, al igual que el marcador molecular ROR β , presenta una dinámica temporal clara, con un *peak* de expresión en estadio P0.

La evidencia expuesta en este trabajo sugiere que los marcadores moleculares de identidad celular responden a un criterio temporal, transitorio y variable, que se relaciona con operaciones y contextos que así mismo, varían en el tiempo conforme el desarrollo del animal avanza. Así, aquellas poblaciones celulares que expresan un mismo marcador molecular probablemente comparten sus contextos operacionales en durante la ventana temporal dentro de la cual se manifiestan, más que compartir una identidad fija que las distingue de otras poblaciones. Por lo tanto, es recomendable usarlos en conjunto con otros criterios para establecer relaciones homológicas entre estructuras, dado que por sí solos no indican propiedades estáticas ni definitivas de las células que los expresan.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aboitiz, Francisco & Francisco Zamorano. 2013. "Neural Progenitors, Patterning and Ecology in Neocortical Origins." *Frontiers in neuroanatomy* 7(November):3–15.
- Ahumada-Galleguillos, Patricio, Máximo Fernández, Gonzalo J. Marin, Juan C. Letelier, & Jorge Mpodozis. 2015. "Anatomical Organization of the Visual Dorsal Ventricular Ridge in the Chick (*Gallus gallus*): Layers and Columns in the Avian Pallium." *The Journal of Comparative Neurology* 2636:2618–36.
- Alpár, A. & T. Tömböl. 2000. "Efferent Connections of the Ectostriatal Core. An Anterograde Tracer Study." *Annals of Anatomy* 182:101–10.
- Aranda, Patrick S., Dollie M. Lajoie, & Cheryl L. Jorcyk. 2012. "Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality." *Electrophoresis* 33(2):366–69.
- Benowitz, Larry I. & Harvey J. Karten. 1976. "Organization of the Tectofugal Visual Pathway in the Pigeon : A Retrograde Transport Study." *Journal of Comparative Neurology* 167:503–20.

- Butler, Ann B. & William Hodos. 2005. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy Evolution and Adaptation.pdf*. Second. edited by John Wiley and Sons. New York.
- Butler, Ann B., Anton Reiner, & Harvey J. Karten. 2011. "Evolution of the Amniote Pallium and the Origins of Mammalian Neocortex." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1225(1):14–27.
- Chen, Chun Chun, Candace M. Winkler, Andreas Pfenning, & Erich D. Jarvis. 2013. "Molecular Profiling of the Developing Avian Telencephalon: Regional Timing and Brain Subdivision Continuities." *Journal of Comparative Neurology* 521(16):3666–3701.
- Csillag, András, Michael G. Stewart, & Elizabeth M. Curtis. 1987. "GABAergic Structures in the Chick Telencephalon : GABA Immunocytochemistry Combined with Light and Electron Microscope Autoradiography , and Golgi Impregnation." *Brain Research* 437:283–97.
- Douglas, Rodney J. & Kevan a C. Martin. 2004. "Neuronal Circuits of the Neocortex." *Annual review of neuroscience* 27(13):419–51.
- Douglas, Rodney J. & Kevan AC Martin. 2007. "Mapping the Matrix: The Ways of Neocortex." *Neuron* 56(2):226–38.

- Douglas, Rodney J. & Kevan AC Martin. 2010. "Chapter 2 - Canonical Cortical Circuits." Pp. 15–21 in *Handbook of Brain Microcircuits*, edited by Gordon M. Sheperd and Sten Grillner. Oxford university press.
- Dugas-Ford, J., J. J. Rowell, & C. W. Ragsdale. 2012. "Cell-Type Homologies and the Origins of the Neocortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(42):16974–79.
- Egedi, G. & T. Tömböl. 1994. "Study on Terminals Labelled by Phaseolus Vulgaris Lectin in Ectostriatum Periphericum and Neostriatum Intermedium." *Journal of Brain Research* 35:405–14.
- Fernandez, Anibal Smith, Claude Pieau, Jacques Repérant, Edoardo Boncinelli, & Marion Wassef. 1998. "Expression of the Emx-1 and Dlx-1 Homeobox Genes Define Three Molecularly Distinct Domains in the Telencephalon of Mouse, Chick, Turtle and Frog Embryos: Implications for the Evolution of Telencephalic Subdivisions in Amniotes." *Development* 2111:2099–2111.
- Fredes, Felipe, Sebastian Tapia, Juan Carlos Letelier, Gonzalo J. Marin, & Jorge Mpodozis. 2010. "Topographic Arrangement of the Rotundo-Entopallial Projection in the Pigeon (Columba Livia)." *The Journal of Comparative Neurology* 4361:4342–61.

- Frost, Douglas & Verne S. Caviness. 1980. "Radial Organization of Thalamic Projections to the Neocortex in the Mouse." *The Journal of Comparative Neurology* 194:369–93.
- Güntürkün, O. & S. Kröner. 1999. "A Polysensory Pathway to the Forebrain of the Pigeon: The Ascending Projections of the Nucleus Dorsolateralis Posterior Thalami (DLP)." *European Journal of Morphology* 37:185–89.
- Husband, Scott A. & Toru Shimizu. 1999. "Efferent Projections of the Ectostriatum in the Pigeon (*Columba Livia*)." *The Journal of Comparative Neurology* 345:329–45.
- Jabaudon, Denis, Sara J. Shnider, David J. Tischfield, Maria J. Galazo, & Jeffrey D. Macklis. 2012. "RORB Induces Barrel-like Neuronal Clusters in the Developing Neocortex." *Cerebral cortex* 22(May):996–1006.
- Jarvis, Erich D. et al. 2005. "Avian Brains and a New Understanding of Vertebrate Brain Evolution." *Nature reviews. Neuroscience* 6(2):151–59.
- Jarvis, Erich D. 2009. "Bird Brain : Evolution." *Encyclopedia of Neuroscience* 2:209–15.
- Jarvis, Erich D. et al. 2013. "Global View of the Functional Molecular Organization of the Avian Cerebrum: Mirror Images and Functional Columns." *Journal of Comparative*

Neurology 521(16):3614–65.

Kaas, Jon H. 2013. "The Evolution of Brains from Early Mammals to Humans." *WIREs Cogn Sci* 4(February):33–45.

Karten, Harvey J. 1969. "The Organization of the Avian Telencephalon and Some Speculations on the Phylogeny of the Amniote Telencephalon." *Comparative and Evolutionary Aspects of the Vertebrate Central Nervous System* 167:164–79.

Karten, Harvey J. & William Hodos. 1970. "Telencephalic Projections of the Nucleus Rotundus in the Pigeon (*Columba Livia*)." *Journal of Comparative Neurology* 140:35–52.

Kirkcaldie, Matthew T. K. 2012. "Chapter 4 - Neocortex." Pp. 52–111 en *The Mouse Nervous System*. Elsevier Inc.

Krützfeldt, Nils O. E. & J. Martin Wild. 2004. "Definition and Connections of the Entopallium in the Zebra Finch (*Taeniopygia Guttata*)." *Journal of Comparative Neurology* 468(3):452–65.

Krützfeldt, Nils O. E. & J. Martin Wild. 2005. "Definition and Novel Connections of the Entopallium in the Pigeon (*Columba Livia*)." *Journal of Comparative Neurology*

490(1):40–56.

Laverghetta, Antonio V. & Toru Shimizu. 2003. "Organization of the Ectostriatum Based on Afferent Connections in the Zebra Finch (*Taeniopygia Guttata*)." *Brain Research* 963:101–12.

Luzzati, Federico. 2015. "A Hypothesis for the Evolution of the Upper Layers of the Neocortex through Co-Option of the Olfactory Cortex Developmental Program." *Frontiers in Neuroscience* 9(May):1–12.

Medina, Loreta & Anton Reiner. 2000. "Do Birds Possess Homologues of Mammalian Primary Visual , Somatosensory and Motor Cortices ?" *Trends in Neuroscience* 23:1–12.

Molnár, Zoltán & Amanda F. P. Cheung. 2006. "Towards the Classification of Subpopulations of Layer V Pyramidal Projection Neurons." *Neuroscience Research* 55:105–15.

Molyneaux, Bradley J., Paola Arlotta, Joao R. L. Menezes, & Jeffrey D. Macklis. 2007. "Neuronal Subtype Specification in the Cerebral Cortex." *Nature reviews. Neuroscience* 8(6):427–37.

- Monuki, Edwin S., Forbes D. Porter, & Christopher A. Walsh. 2001. "Patterning of the Dorsal Telencephalon and Cerebral Cortex by a Roof Plate-Lhx2 Pathway." *Neuron* 32:591–604.
- Nomura, Tadashi, Masanori Takahashi, Yoshinobu Hara, & Osumi Noriko. 2008. "Patterns of Neurogenesis and Amplitude of Reelin Expression Are Essential for Making a Mammalian-Type Cortex." *PLoS ONE* 3(1).
- Oswald, Manfred J., Malinda LS Tantirigama, Ivo Sonntag, Stephanie M. Hughes, & Ruth M. Empson. 2013. "Diversity of Layer 5 Projection Neurons in the Mouse Motor Cortex." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7(October):1–18.
- Ou, L., J. Qu, & Y. Wang. 2015. "OTX1 Promotes Basal Dendritic Growth and Regulates Intrinsic Electrophysiological and Synaptic Properties of Layer V Pyramidal Neurons in Mouse Motor Cortex." *Neuroscience* 285:139–54.
- Puelles, Luis 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* 438(March):409–38.
- Ramaswamy, Srikanth & Henry Markram. 2015. "Anatomy and Physiology of the Thick-

- Tufted Layer 5 Pyramidal Neuron." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(June):1–29.
- Redies, Christoph & Luis Puellas. 2001. "Modularity in Vertebrate Brain Development and Evolution." *BioEssays* 1100–1111.
- Rowell, Joanna J., Atul K. Mallik, Jennifer Dugas-Ford, & Clifton W. Ragsdale. 2010. "Molecular Analysis of Neocortical Layer Structure in the Ferret." *Journal of Comparative Neurology* 518(16):3272–89.
- Shimizu, Toru. 2009. "Why Can Birds Be So Smart ? Background , Significance , and Implications of the Revised View of the Avian Brain." *Comparative Cognition and Behavior Reviews* 4:103–15.
- Suárez, Juan, José Carlos Dávila, M. Ángeles Real, & Salvador Guirado. 2005. "Distribution of GABA, Calbindin and Nitric Oxide Synthase in the Developing Chick Entopallium." *Brain Research Bulletin* 66(4-6):441–44.
- Suzuki, Ikuo K. & Tatsumi Hirata. 2013. "Neocortical Neurogenesis Is Not Really 'neo': A New Evolutionary Model Derived from a Comparative Study of Chick Pallial Development." *Development Growth and Differentiation* 55(1):173–87.
- Thomson, Alex M. 2010. "Neocortical Layer 6 , a Review." *Frontiers in neuroanatomy*

4(March):1–14.

Wang, Yuan, Agnieszka Brzozowska-Prechtl, & Harvey J. Karten. 2010. "Laminar and Columnar Auditory Cortex in Avian Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(28):12676–81.

Watakabe, Akiya, Noritaka Ichinohe, Sonoko Ohsawa, & Tetsuo Yamamori. 2007. "Comparative Analysis of Layer-Specific Genes in Mammalian Neocortex." *Cerebral cortex* 17(August):1918–33.

Wild, J. Martin & Nils O. E. Krützfeldt. 2010. "Neocortical-like Organization of Avian Auditory 'Cortex':" *Brain, Behavior and Evolution* 76(2):89–92.

Yamamori, Tetsuo & Kathleen S. Rockland. 2006. "Neocortical Areas , Layers , Connections , and Gene Expression §." *Neuroscience Research* 55:11–27.

ANEXO

Todas las imágenes utilizadas en este anexo fueron tomadas y modificadas desde Allen Brain Atlas (www.brain-map.org).

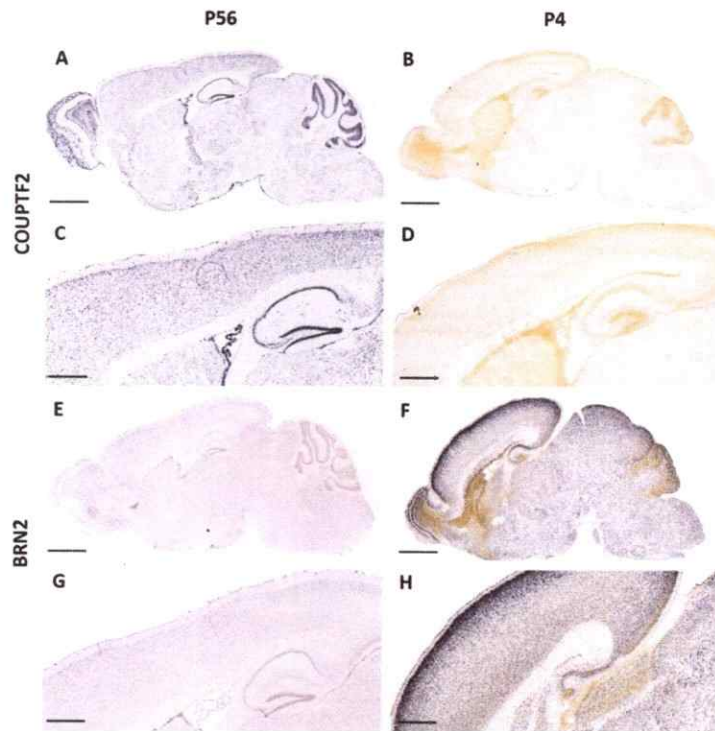


Figura 23. Ensayos de ISH: patrón de expresión de COUPTF2 y BRN2 en la neocorteza de *M. musculus*. A y B: vista completa sagital en distintos estadios del desarrollo. Se muestra la expresión de COUPTF2 en la capa 2/3 para el estadio P56, ausente en P4. C y D: acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de COUPTF2. E y F: vista completa sagital en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de BRN2. Se observa su expresión en la capa 2/3 para el estadio p56, mientras que en P4 ésta se extiende hasta la capa 4 G y H: acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de BRN2. Barra de calibración en A, B, E y F: 1,5 mm. Barra de calibración en C, D, G y H: 660 μ m.

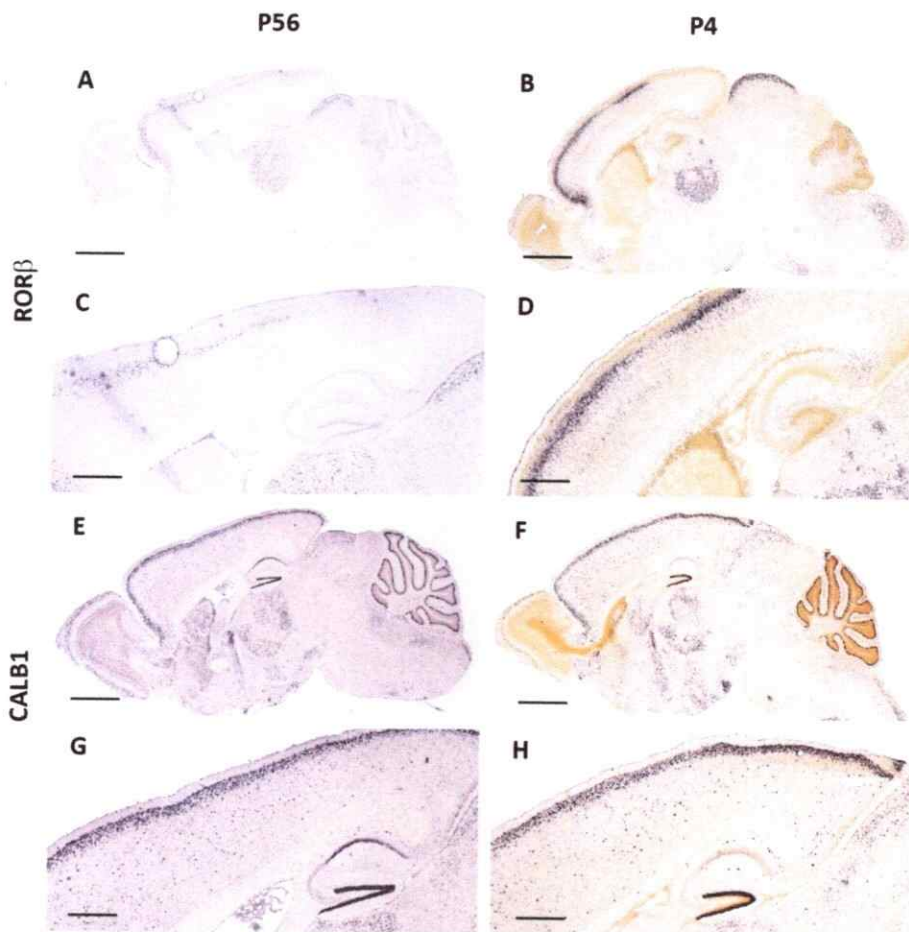


Figura 24. Ensayos de ISH: patrón de expresión de ROR β y CALB1 en la neocorteza de *M. musculus*. A y B: vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo. Se muestra la expresión de ROR β en la capa 4 en ambos estadios, observándose una marca más intensa en P4 que en P56, y además estando presente con menor intensidad y abundancia en la capa 5. **C y D:** acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de ROR β . **E y F:** vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de CALB1. Se observa su expresión en la capa 2/3 tanto en el estadio P56 como en P4. **G y H:** acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de CALB1. Barra de calibración en A, B, E y F: 1,5 mm. Barra de calibración en C, D, G y H: 660 μ m.

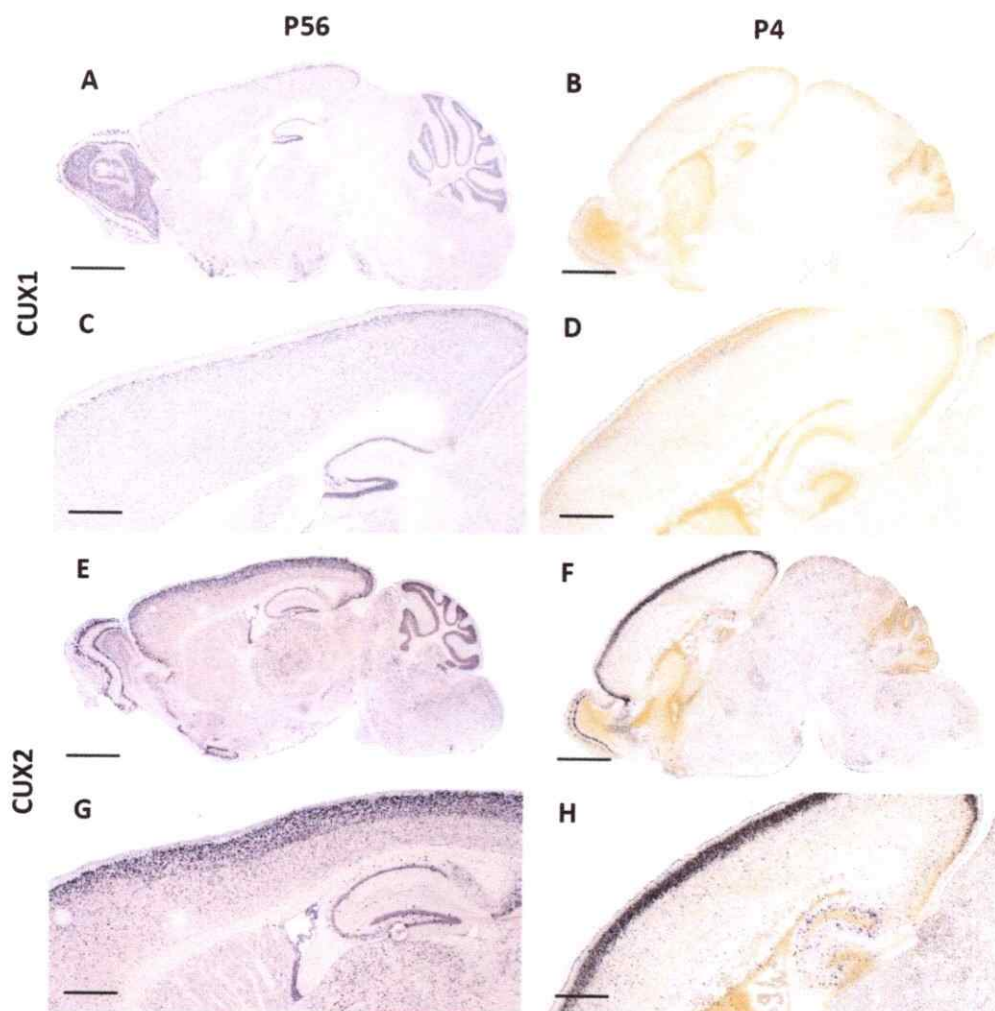


Figura 25. Ensayos de ISH: patrón de expresión de CUX1 y CUX2 en la neocorteza de *M. musculus*. A y B: vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo. Se muestra la expresión de CUX1 en la capa 2/3 en ambos estadios. C y D: acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de CUX1. E y F: vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de CUX2. Se observa su expresión en las capas superficiales (2/3 y 4) en P56, mientras que en P4 se observa la marca más restringida a la capa 2/3. G y H: acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de CUX2. Barra de calibración en A, B, E y F: 1,5 mm. Barra de calibración en C, D, G y H: 660 μ m.

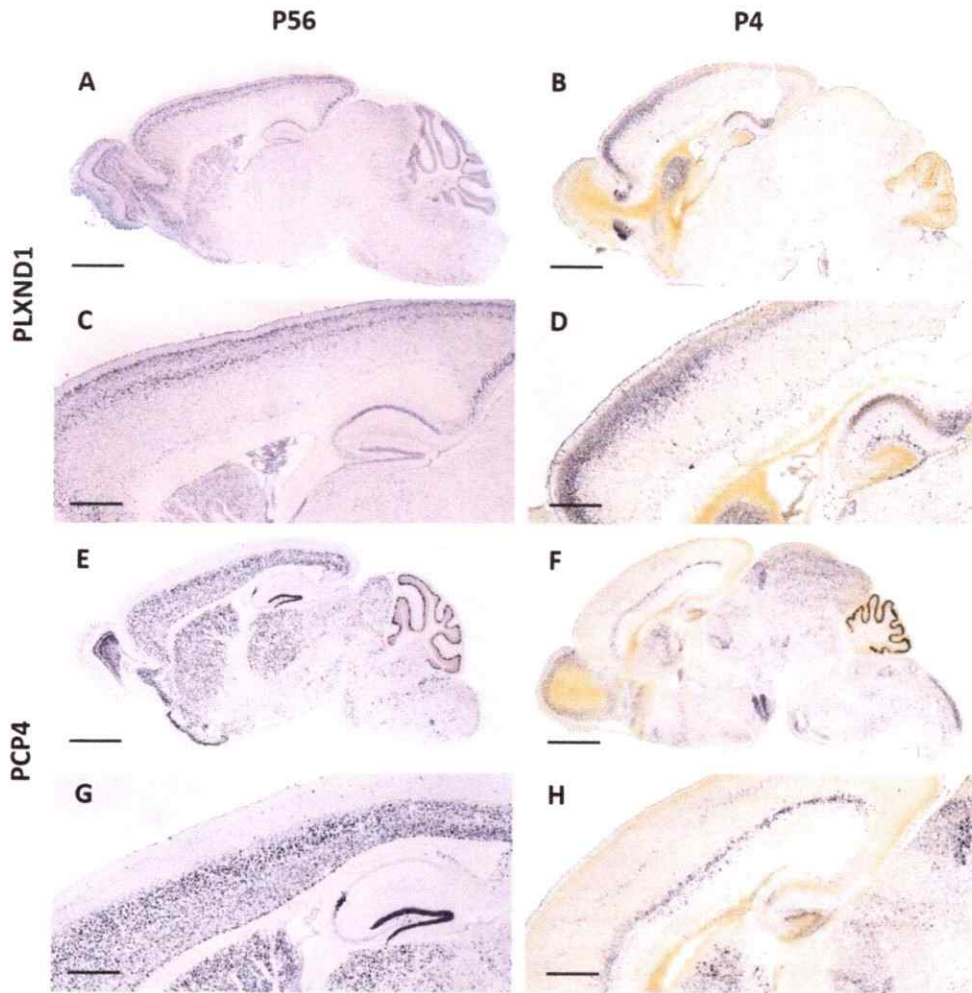


Figura 26. Ensayos de ISH: patrón de expresión de PLXND1 y PCP4 en la neocorteza de *M. musculus*. **A y B:** vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo. Se muestra la expresión de PLXND1 que es más abundante en las capas 2/3 y 5, variando en intensidad entre P56 y P4. **C y D:** acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de PLXND1. **E y F:** vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de PCP4. Se observa su expresión en las capas profundas (5 y 6) en el estadio P56, mientras que en P4 la capa 6 presenta una marca mucho más intensa y abundante que la capa 5. **G y H:** acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de PCP4. Barra de calibración en A, B, E y F: 1,5 mm. Barra de calibración en C, D, G y H: 660 μm .

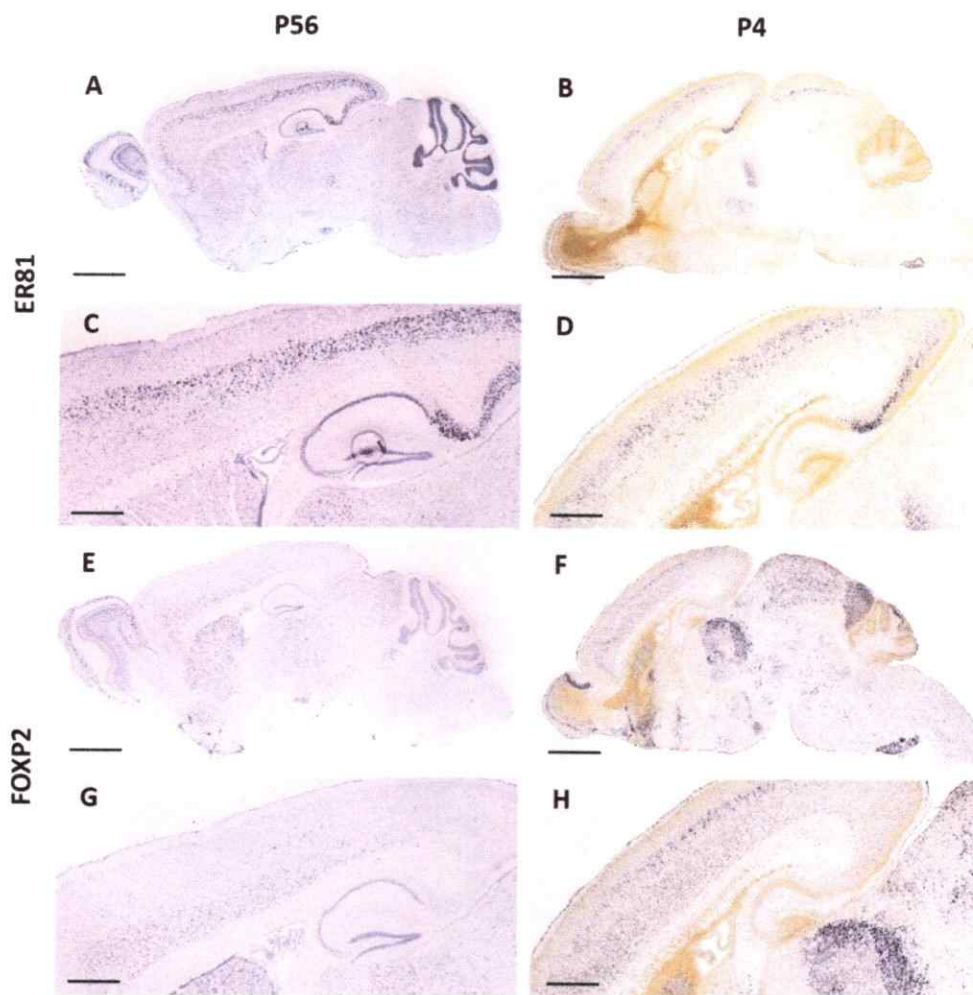


Figura 27. Ensayos de ISH: patrón de expresión de ER81 y FOXP2 en la neocorteza de *M. musculus*. **A y B:** vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo. Se muestra la expresión de ER81 en la capa 5 tanto en P56 como en P4. **C y D:** acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de ER81. **E y F:** vista completa de un corte sagital en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de FOXP2. Se observa su expresión en las capas profundas (5 y 6) en el estadio P4, más abundante en la capa 6, mientras que en P56 la capa 5 no presenta marca **G y H:** acercamiento de la región cortical de interés en distintos estadios del desarrollo, se muestra la expresión de PCP4. Barra de calibración en A, B, E y F: 1,5 mm. Barra de calibración en C, D, G y H: 660 μ m.

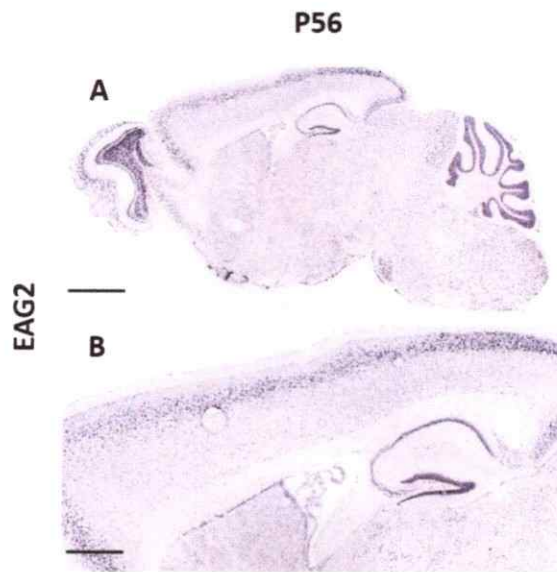


Figura 28. Ensayos de ISH: patrón de expresión de EAG2 en la neocorteza de *M. musculus*. A: vista completa de un corte sagital en estadio P56, se puede observar una marca intensa, abundante y restringida a la capa 4. **B:** acercamiento de la región cortical de interés, se muestra la expresión de EAG2. Barra de calibración en A: 1,5 mm. Barra de calibración en B: 660 μm .