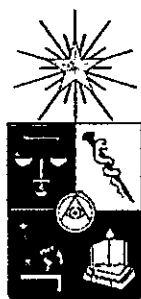


UCH-FC  
MAG-B  
S161  
C-I



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Evidencias de la transición evolutiva desde  
hábitos nocturnos a diurnos en la estructura  
anatómica de las vías visuales en aves. Un  
estudio en el linaje de las Gallinas Ciegas y  
Picaflores (Aves: Strisores).**

**Tesis**

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

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Por**

**Juan Esteban Salazar Salazar**

**Enero de 2015**

**Director de Tesis: Dr. Jorge Mpodozis M.**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

**Juan Esteban Salazar Salazar**

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 14 de Enero de 2015.

**Director de Tesis:**  
**Dr. Jorge Mpodozis M.**

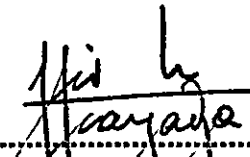
  
.....  


**Co-Director de Tesis:**  
**Dr. Michel Sallaberry A.**


.....

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

**Dr. Julio Alcayaga U.**

  
.....

**Dr. Alexander Vargas M.**

  
.....

A 3 0014

Dedicado a la Memoria de:

Rina Eugenia Salazar Salazar (1950 - 2011).

Luis Miguel González Fariás (1945 - 2012).

Adriana Eudicia Salazar Vega (1926 - 2012).

Miguel Alejandro González Salazar (1969 - 2012).

Teresa Josefina Salazar Salazar (1945 - 2012).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de muchas personas, que colaboraron de diversas maneras. En primer lugar, agradezco el apoyo y el cariño irrestricto de mis padres, Juana y Luis, que siempre alimentaron mi vocación (a pesar de todos los problemas), y fueron un constante abrigo en los momentos difíciles. Agradezco además a mis tutores; Jorge Mpodozis, cuyo sustento permanente y afán de perseguir preguntas difíciles y riesgosas permitió realizar un trabajo que no podría permitirse en otros laboratorios (guiados por la publicación efectiva e inmediata), y Michel Sallaberry, con quién he aprendido las virtudes de todo buen naturalista (incluida la paciencia).

Sin la asistencia de grandes amigos como Pedro Fernández (experto biólogo de laboratorio y buen consejero), Cristian Morales (mago de la estadística y gran confidente) e Isaac Peña (compañero de múltiples batallas en terreno), este trabajo no habría sido posible. Para ellos, mi gratitud. Agradecimientos especiales a Daniel Severín y Tomás Vega por su ayuda con la preparación de material ocular.

Además debo agradecer a todos aquellos que de forma voluntaria, y con la única motivación de aprender y disfrutar, colaboraron como asistentes en nuestras campañas de terreno (generalmente autofinanciadas); Mario Villena, Jean P. Abrileaut, Benjamín Castro, Sergio Soto, Daniel Smith, Daniel Núñez, Stephanie Fischer, Francisco Zamorano, Carlos Pino y Hugo Díaz. Agradecimientos también a Marcelo Orellana y al equipo del Fundo Rinconada de Maipú de la Universidad de Chile, a Pablo Sabat, Claudio Veloso, y a SAG.

Agradezco al gran Solano Henríquez, a doña Elisa Sentis y Andrés Sazo por su asistencia y cooperación para resolver todo tipo de problemas. Además, agradezco a Karina Buldrini, Mónica Núñez, Camila Cavieres, Nuria Torés, Ana Valenzuela, Luis Garrido, Janet Guzmán y al portal Sci-hub.org. Este trabajo fue realizado sin el apoyo de becas Conicyt.

Por último, agradezco a los miembros de los laboratorios Rayo (en especial a Gonzalo Marín, Máximo Fernández, Miguel Salinas, Luis Ossa, Camila Weiss, Daniel Opazo, Quirin Krabichler y Joao Botelho), y Zoología de Vertebrados (en especial a Javier Rodríguez, Jhonatan Alarcón, Pablo Fibla, Juan Hernández, Francisca Briones y J.P. Guevara) por valiosas discusiones y comentarios. Agradezco a los alumnos de los cursos de Zoología y Ornitología, por imponerme permanentemente la necesidad de superación gracias a sus agudas preguntas y ganas de aprender. Agradezco finalmente a Sofía Ortiz, por su apoyo, y por darme una nueva razón para seguir adelante.

## ÍNDICE DE MATERIAS

I.	Resumen.	1
II.	Abstract.	2
III.	Introducción.	3
	a. El sistema visual en aves nocturnas.	3
	b. Historia natural y sistemática de Strisores.	9
	c. Nocturnidad y reversión en Strisores.	13
	d. Explicación del problema.	19
	e. Hipótesis y objetivos.	20
IV.	Materiales y métodos	22
	a. Captura y permisos.	22
	b. Campos visuales.	22
	c. Orientación de las órbitas.	23
	d. Morfometría ocular.	24
	e. Retina ( <i>Wholemounds</i> ).	26
	f. Proyecciones visuales.	28
	g. Estereología y estimación de volúmenes.	31
V.	Resultados.	33
	a. Campos visuales.	33
	b. Orientación de las órbitas.	35
	c. Morfometría ocular.	37
	d. Retina ( <i>Wholemounds</i> ).	43
	e. Proyecciones visuales.	44
	f. Estereología y estimación de volúmenes.	55
VI.	Discusión.	57
VII.	Bibliografía.	73

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1: Parámetros de la orientación de las órbitas oculares en 15 especies de Strisores. ....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 2: Morfometría ocular en dos especies de Strisores. ....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 3: Valores de morfometría ocular para 59 especies de Strisores. ....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 4: Estimaciones volumétricas de los núcleos visuales en dos especies de Strisores. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 5: Estimación del volumen relativo de cada núcleo respecto al Volumen total del cerebro (expresado en porcentaje) para dos especies de Strisores. ....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Relación entre la nocturnidad y la orientación frontal.....	5
<b>Figura 2:</b> Conectividad de las vías visuales en aves.....	7
<b>Figura 3:</b> Árbol filogenético de máxima parsimonia para un análisis combinado (morfológico y molecular) de Strisores.....	11
<b>Figura 4:</b> Hipótesis sobre el origen de la nocturnidad en Strisores.....	14
<b>Figura 5:</b> Hitos utilizados en la determinación del grado de convergencia de las órbitas oculares.....	24
<b>Figura 6:</b> Variables morfométricas estudiadas en el ojo del P. chico y la G. ciega .....	25
<b>Figura 7:</b> Morfología de los campos visuales en la Gallina ciega.....	34
<b>Figura 8:</b> Morfología de los campos visuales en el Picaflor chico .....	35
<b>Figura 9:</b> Comparación de la orientación de la órbita ocular entre distintos grupos de Strisores .....	37
<b>Figura 10:</b> Comparación entre variables de la morfometría ocular entre el Picaflor chico y la Gallina ciega.....	38
<b>Figura 11:</b> Comparaciones anidadas del valor del Índice CD/AL normalizado para distintos grupos de Strisores .....	39
<b>Figura 12:</b> Valores del Índice CD/AL normalizado para las 8 familias de Strisores.....	43
<b>Figura 13:</b> Mapas de distribución de Células Ganglionares Retinianas (RGC) para la retina derecha de un ejemplar representativo de Gallina ciega y Picaflor chico. ....	44
<b>Figura 14:</b> Núcleo del Istmo Óptico (ION).....	46
<b>Figura 15:</b> Núcleo Geniculado Lateral ventral (GLv) .....	47
<b>Figura 16 (Página anterior):</b> Anatomía de los Núcleos laterales del Tálamo de la Gallina ciega .....	49
<b>Figura 17:</b> Anatomía de los Núcleos laterales del Tálamo del Picaflor chico .....	49
<b>Figura 18:</b> Anatomía del Núcleo Lentiforme Mesencefálico (LM) .....	50
<b>Figura 19:</b> Variación inversa en la densidad celular del Núcleo Rotundo (Rt) y la Capa 13 del Tectum Óptico (TeO) en la Gallina ciega y el Picaflor chico.....	51
<b>Figura 20:</b> Anatomía del Tectum Óptico del Picaflor chico.....	52
<b>Figura 21:</b> Anatomía del Tectum Óptico de la Gallina ciega .....	52
<b>Figura 22:</b> Detalle de las proyecciones retinianas profundas (más allá de la Capa 8) del Tectum Óptico en la Gallina ciega.....	53
<b>Figura 23:</b> Engrosamiento dorsal del Tectum Óptico de la Gallina ciega .....	54
<b>Figura 24:</b> Comparación entre la morfología de las proyecciones profundas (más allá de la Capa 9), en tres especies de aves.....	64
<b>Figura 25:</b> Modo de alimentación de la Gallina ciega .....	65
<b>Figura 26:</b> Comparación entre la distribución de RGC en la Gallina ciega y un Murciélago Microquiróptero .....	67
<b>Figura 27:</b> Comparación entre la distribución de RGC en dos especies de murciélagos de la familia Phyllostomidae .....	68

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

<b>AL:</b>	Axial Length (Longitud axial).
<b>CD:</b>	Corneal Diameter (Diámetro Corneal).
<b>CT:</b>	Corneal/Transverse index (Índice Corneal/Transversal).
<b>CTb:</b>	Sub-unidad Beta de la Colerotoxina.
<b>DAB:</b>	Diaminobenzidina.
<b>DLL:</b>	Nucleus dorsolateralis anterior thalami (Núcleo dorsolateral anterior talámico).
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfoxido.
<b>E:</b>	Entopialio.
<b>ECN:</b>	Ectopic Centrifugal Neuron (Neurona Ectópica Centrifuga).
<b>GLv:</b>	Nucleus geniculatus lateralis pars ventralis (Núcleo Genuculado Lateral Ventral).
<b>ION:</b>	Nucleus isthmo opticus (Núcleo del Istmo Óptico).
<b>LA:</b>	Nucleus lateralis anterior thalami (Núcleo lateral anterior talámico).
<b>LdOPT:</b>	Lateralis Dorsalis Nuclei Optici Principalis Thalami (Núcleo Lateral Dorsal Óptico Principal Talámico).
<b>LM:</b>	Nucleus lentiformis mesencephali (Núcleo lentiforme mesencefálico).
<b>nBOR:</b>	Nucleus Radix Optici Basalis (Núcleo de la Raíz Óptica Basal).
<b>NRS:</b>	Normal Rabbit Serum.
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffer Saline (Buffer Salino Fosfato).
<b>PFA:</b>	Paraformaldehído.
<b>RGC:</b>	Retinal Ganglionar Cells (Células Ganglionares Retinianas)
<b>Rt:</b>	Nucleus Rotundus (Núcleo Rotundo).
<b>SCN:</b>	Nucleus suprachiasmaticus (Núcleo Supraquiasmático).
<b>TeO:</b>	Tectum Opticum (Tectum Optico).
<b>TGC:</b>	Tectal Ganglion Cell (Célula Ganglionar Tectal).
<b>VLT:</b>	Nucleus ventrolateralis thalami (Núcleo ventrolateral talámico).



## RESUMEN

Las aves nocturnas poseen múltiples especializaciones sensoriales, tales como la orientación frontal de las órbitas oculares, cambios en la morfología de los elementos mecanosensible, aumento en la sensibilidad auditiva y aumentos diferenciales en la prevalencia de ciertas proyecciones visuales, los que se relacionan a habitar en condiciones escotópicas. Se ha descrito que estos cambios pueden presentarse en linajes que experimentan transiciones entre modos de vida nocturnos y diurnos. En base a los nuevos métodos de reconstrucción filogenética, se ha llegado al consenso de que el linaje de los Picaflor (Aves: Trochilidae), aves exclusivamente diurnas, proviene de un ancestro que dio origen a múltiples grupos de aves nocturnas y crepusculares ("Caprimulgiformes"). En este trabajo se analizó la posible ocurrencia de características propias de aves nocturnas en la morfología visual y la neuroanatomía de una especie de picaflor, el Picaflor chico (*Sephanoides sephanoides*), que se comparó con una especie de Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*), ave de hábitos nocturnos que pertenece a la familia Caprimulgidae. Se encontró que todas las características del Sistema visual del Picaflor chico examinadas son congruentes con un modo de vida diurno. A su vez, en la Gallina ciega existe un amplio campo visual binocular dorsal frontal, correlacionado a la morfología de la retina y el Tectum Óptico. Se concluye que no existe evidencia de conservación de rasgos estructurales asociados a la nocturnidad en Picaflor. Por lo tanto, no es posible, en base a los resultados obtenidos, optar por alguna de las hipótesis sobre el origen del modo de vida nocturno en Strisores.

## ABSTRACT

Nocturnal birds have many sensory specializations, such as frontally oriented ocular orbits, changes in mechanosensitive elements morphology, increased auditory sensitivity and increased prevalence of certain visual projections, which are related to living in scotopic environments. These trait modifications have been described in lineages that have experienced behavioral transitions between nocturnal and diurnal habits. Recent phylogenetic reconstructions agree on the fact that hummingbirds (Aves: Trochilidae), a group of exclusively diurnal birds, originates from an ancestor that also gave origin to many nocturnal and crepuscular bird species ("Caprimulgiformes"). In this study, possible occurrence of nocturnality-related visual and neuroanatomical traits was determined in a hummingbird species, the Green-backed Firecrown (*Sephanoides sephanoides*). Also, this species was compared to a nocturnal Caprimulgid, the Band-winged Nightjar (*Caprimulgus longirostris*). We found that every visual system trait examined in the hummingbird is coherent with a diurnal habit. In the nightjar, we found a broad dorsal frontal binocular field, which is correlated with retinal and tectal morphology. There is no evidence for conservation of nocturnality related traits in hummingbirds. Therefore, it is not possible to refute any hypothesis about nocturnal habits origin in Strisores from our results.

## INTRODUCCIÓN

### 1. El sistema visual en aves nocturnas

Las aves poseen un modo de vida en el que dependen principalmente del sistema visual en el despliegue de sus conductas sociales y de forrajeo (Nieuwenhuys *et al.*, 1998). La gran mayoría de las aves poseen hábitos diurnos (se desenvuelven en condiciones lumínicas de tipo fotópicas). Se ha descrito que únicamente un 3% de las especies de aves existentes posee un modo de vida nocturno o nocturno-crepuscular, es decir, habitan en condiciones escotópicas (Martin, 1990).

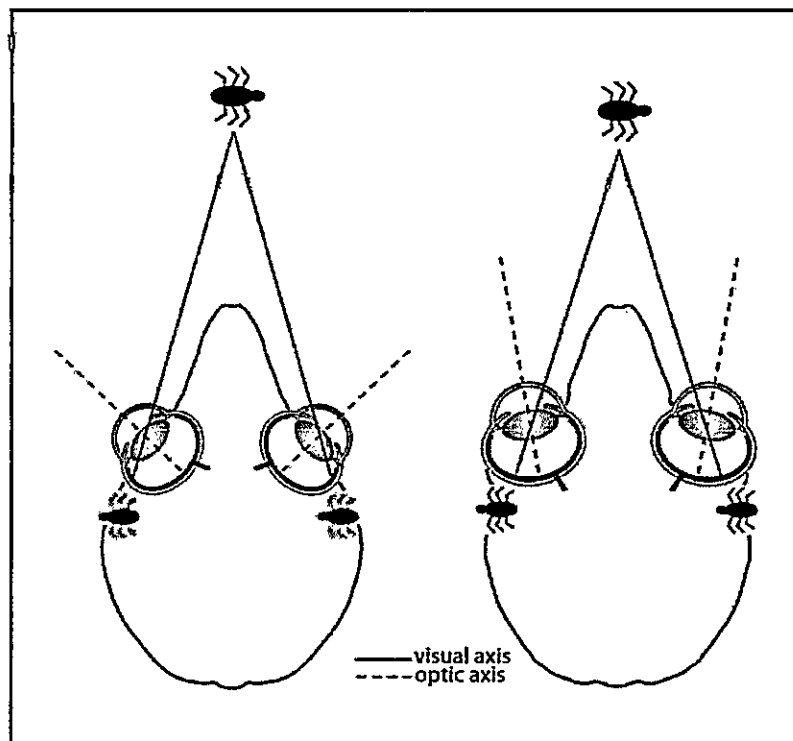
La intensidad luminosa puede variar considerablemente dentro de un ciclo día-noche. La iluminancia (lúmenes por metro cuadrado, medida de la intensidad de luz incidente sobre una superficie) puede variar en un rango de nueve órdenes de magnitud, entre un día despejado y una noche sin iluminación lunar (Martin, 1990). Por lo tanto, el sistema visual de las aves que viven en condiciones escotópicas opera en circunstancias muy diferentes con respecto al sistema visual en especies fotópicas.

En las aves nocturnas se han descrito múltiples características anatómicas relacionadas a la operación del sistema visual en condiciones de baja luminosidad, las que pueden manifestarse incluso entre especies filogenéticamente cercanas, pero con hábitos contrastantes.

La morfología de los elementos ópticos del sistema visual (morfometría del ojo) posee características particulares en aves nocturnas. Se ha mostrado que aves nocturnas poseen una mayor apertura, respecto a la longitud focal, que aves crepusculares y diurnas, lo que permitiría la entrada de una mayor cantidad de luz al ojo, aumentando por ésta vía la sensibilidad en condiciones escotópicas (Hall & Ross, 2007). Además, dentro del grupo de las aves, las especies nocturnas (Strigiformes y "Caprimulgiformes", ver apartado siguiente para una explicación del uso de comillas) son las que presentan la mayor convergencia de las órbitas oculares (frontalidad), alcanzando un valor máximo de convergencia, según el método utilizado, de aproximadamente 40° de convergencia en Strigiformes (Iwaniuk *et al.*, 2008; Menegaz & Kirk, 2009).

Se han propuesto diferentes hipótesis sobre la relación entre el grado de frontalidad y la nocturnidad en aves. Heesy propone que el aumento en la frontalidad encontrado en especies nocturnas sería una posible solución al problema de la aberración esférica (Figura 1) que se produce en los extremos del lente (cristalino) en condiciones de alta apertura (baja luminosidad), al ingresar rayos de luz en forma tangencial a la superficie del lente (Heesy, 2008). Al aumentar la frontalidad, estos rayos pueden ser captados por el lente de manera perpendicular, teniendo como consecuencia una reducción en los fenómenos de aberración. Por otra parte, Martin señala que la mayor convergencia ocular es el resultado del aumento de tamaño de los ojos en aves nocturnas, lo que conlleva a su vez un aumento en el peso total de la cabeza (Martin, 2007). Bajo esta perspectiva, la frontalidad soluciona el problema de acomodar ojos voluminosos y pesados en la cabeza, de tal forma de no repercutir en el vuelo. Además,

Martin señala que en casos como el de la lechuza, el rol que cumple el sistema auditivo en las conductas de captura de presas (Knudsen, 1982), requiere una orientación frontal de las aperturas auditivas, lo que sería otra restricción a la lateralidad en aquella especie (aunque este hecho no explicaría la frontalidad alcanzada en aves caprimulgiformes, en las que no se han descrito mecanismos de orientación auditiva similares a los de la lechuza).



**Figura 1:** Relación entre la nocturnidad y la orientación frontal. En condiciones de apertura amplia de la pupila (condiciones de baja luminosidad), los rayos de luz que entran al ojo provenientes del campo visual anterior inciden sobre el lente (cristalino) de forma tangencial, generando una distorsión de la imagen por aberración esférica. La frontalización de las órbitas permite la reducción del ángulo de incidencia sobre el cristalino, generando una imagen sin distorsiones. Modificado de Heesy, 2008.

Aunque en las aves pueden encontrarse grados crecientes de frontalidad (convergencia binocular), alcanzándose los mayores valores en aves nocturnas, hasta

la fecha, sólo se han descrito neuronas sensibles a la disparidad binocular en una especie de Strigiformes, *Tyto alba*, (Pettigrew & Konishi, 1976), y no se ha encontrado el mismo fenómeno en "Caprimulgiformes" (Pettigrew, 1986; Iwaniuk & Wylie, 2006), por lo que la frontalidad en las aves no estaría directamente relacionada al fenómeno de la estereopsis (entendida como la capacidad de obtener claves espaciales de los objetos en el espacio, a partir de la disparidad en las imágenes del objeto proyectadas en ambas retinas).

Un parámetro relacionado a la orientación de las órbitas oculares es la morfología de los campos visuales, delimitados por el perímetro de la retina en cada ojo (Martin, 2007, 2014). Respecto a la convergencia binocular de los campos visuales, la mayoría de las aves nocturnas posee campos visuales de tipo 1 (área binocular medial de 25°-30°), encontrándose en este grupo aves como algunas Caprimulgiformes (*Steatomis* y *Nyctidromus*), y garzas nocturnas (*Nycticorax*). Las lechuzas (*Tyto*) también poseen la mayor convergencia binocular de los campos visuales, clasificándose dentro de la categoría 3 (área binocular medial cercana a 50°). Otras aves nocturnas, como el Kiwi (*Apteryx*), que poseen ojos pequeños y prevalencia de conductas táctiles en el forrajeo, poseen convergencias binoculares en torno a los 10°, y se clasifican dentro del tipo 2.

La anatomía de la retina también posee diferencias relacionadas a los modos de vida en aves. Se ha relacionado la distribución topográfica de las Células Ganglionares Retinianas (RGC) con las condiciones del entorno; especies que viven en condiciones escotópicas o en hábitats con alta cobertura vegetal poseen una distribución de RGC de tipo radial, mientras que especies diurnas o que viven en ambientes abiertos presentan RGC distribuidas en bandas horizontales (Lisney *et al.*, 2012a). Además, el

número de RGC es menor en especies nocturnas que en diurnas (Iwaniuk *et al.*, 2010a). A su vez, especies nocturnas poseen una mayor proporción de bastones en la capa de fotorreceptores de la retina que sus contrapartes diurnas (Rojas, Tai & McNeil, 1993; Rojas *et al.*, 1999, 2004b; McNeil, McSween & Lachapelle, 2005).

Otra característica relacionada a los hábitos nocturnos es una consecuencia directa de la segregación anatómica y funcional de las vías visuales que conectan la retina con los diferentes núcleos visuales del cerebro medio, tálamo y telencéfalo. En las aves, existen dos vías visuales principales (Wylie *et al.*, 2009) (Figura 2). En la vía Tectofugal o Colotalámica, existen proyecciones que conectan la retina con el cerebro medio (Tectum Óptico), desde donde surgen axones hacia el núcleo Rotundo, el que proyecta al telencéfalo (Entopallio). Por otra parte, la vía Talamofugal o Lemnotalámica comienza con axones retinianos que inervan el tálamo dorsal (complejo de los Núcleos Principales Ópticos Talámicos, OPT), los que proyectan hacia la sección visual del Telencéfalo dorsal (Wulst visual).

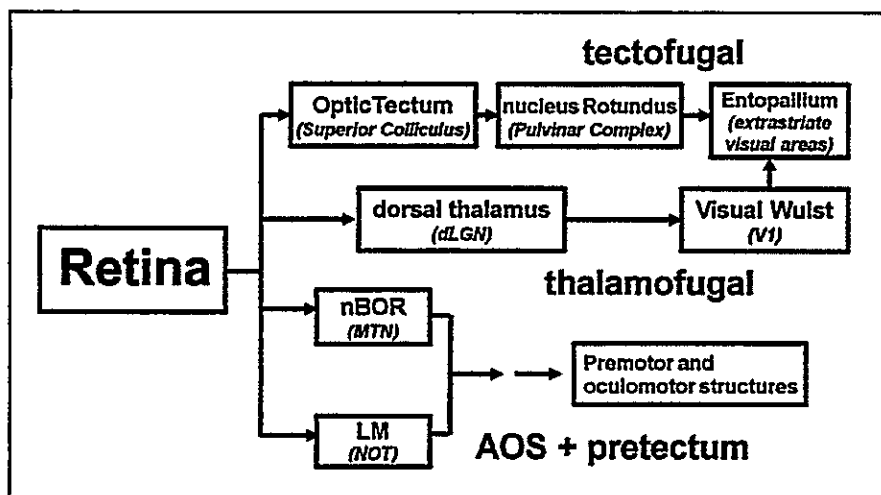


Figura 2: Conectividad de las vías visuales en aves. Entre paréntesis se muestran las homologías propuestas para cada núcleo respecto a la anatomía de las vías visuales en mamíferos. Modificado de Wylie *et al.*, 2009.

Se ha descrito una prevalencia diferencial (cambios en los volúmenes relativos de los núcleos) de la vía Tectofugal respecto a la vía Tálamofugal en numerosos órdenes de aves (Iwaniuk *et al.*, 2010a), la que ha sido interpretada en el contexto de los diferentes modos de vida presentes en dichos órdenes. Es así como aves nocturnas (Strigiformes) tienen una vía Tectofugal muy reducida, al igual que aves que dependen de otros sistemas sensoriales, como el sistema táctil (Anseriformes y algunos Charadriiformes). No obstante, las aves que pertenecen al clado de Strisores, (denotadas por Iwaniuk y colaboradores como Caprimulgiformes y Trochiliformes), poseen una leve reducción (de magnitud similar) en los núcleos pertenecientes a la vía Tectofugal.

Además de comparar el estado de las variables mencionadas entre aves diurnas y nocturnas, es posible analizar la distribución de las mismas en una perspectiva filogenética, es decir, estudiar la presencia de rasgos diurnos y nocturnos en distintos linajes, con el objetivo de determinar la historia de emergencia de tales rasgos, y poder correlacionar aquella historia con variables biogeográficas, ecológicas y conductuales. En particular, existen linajes en los que se produce un evento de transición conductual, entre condiciones lumínicas contrastantes, ya sea con una condición ancestral diurna y una condición nocturna derivada, o viceversa. Estos casos son importantes, ya que permiten entender la plasticidad de los rasgos neuroanatómicos y ópticos involucrados en la percepción visual. Dentro de los múltiples ejemplos de linajes en los que ocurren cambios de modos de vida y condiciones lumínicas, se encuentra el clado Strisores (Mayr, 2011), que incluye representantes diurnos (Picaflones y vencejos), así como múltiples especies nocturnas (Gallinas ciegas y Guácharo, entre otros).



## 2. Historia natural y sistemática de Strisores

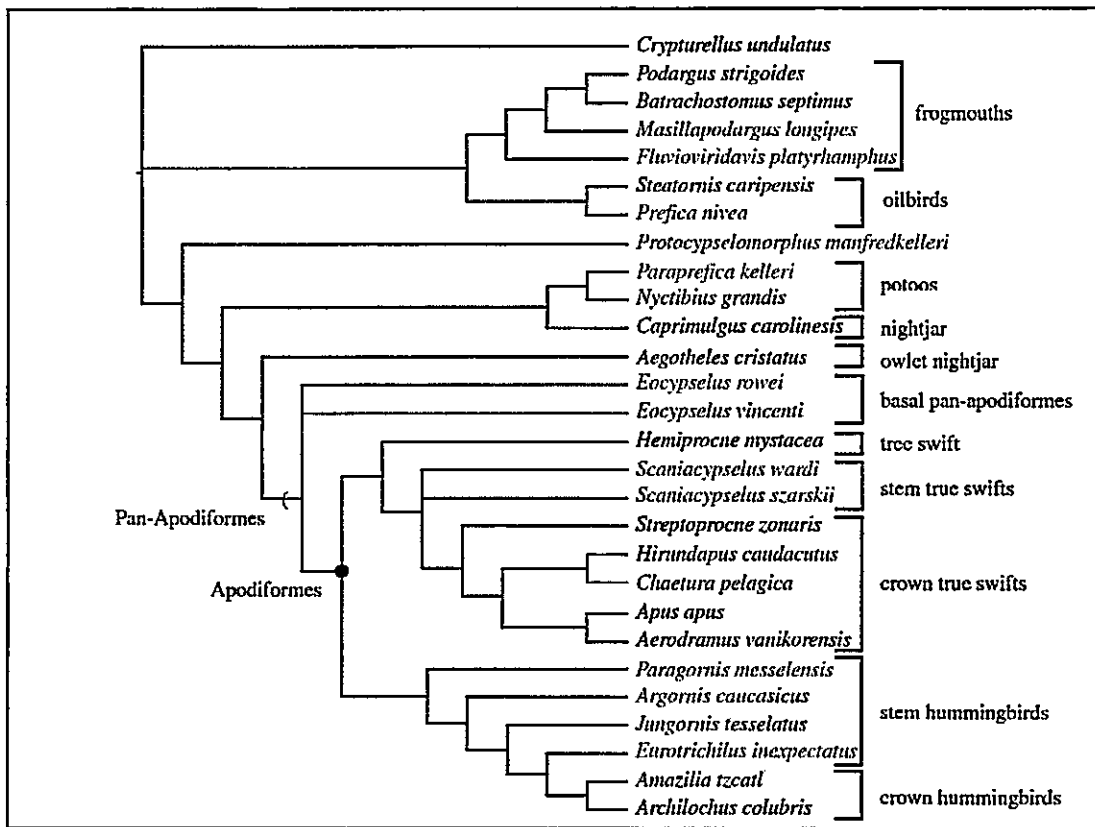
El grupo de los picaflores (Aves: Trochillidae) es uno de los clados más diversificados dentro de las aves (Gould, 1861; McGuire *et al.*, 2007, 2014). A pesar de tal diversificación (338 especies), el plan corporal de los picaflores es relativamente conservado entre especies. Los picaflores presentan una alta tasa metabólica basal y características únicas de vuelo estacionario (Altshuler & Dudley, 2002). Además, los picaflores poseen la menor masa corporal dentro de las aves, característica que se ha interpretado como un efecto de las restricciones fisiológicas impuestas por su tipo de vuelo (Cotton, 1996).

En el orden Apodiformes, existen tres familias; Trochillidae (Picaflores), Hemiprocnidae (Vencejos arborícolas) y Apodidae (Vencejos). Las relaciones de afinidad entre ellas aún se discuten, existiendo dos hipótesis. En base a caracteres morfológicos de especies actuales y material paleontológico, además de métodos moleculares, Nesbitt y colaboradores proponen que el grupo de los picaflores es el más derivado dentro del orden, y que los Vencejos arborícolas son el grupo más basal (Nesbitt, Ksepka & Clarke, 2011; Ksepka *et al.*, 2013). Por otra parte, utilizando caracteres morfológicos, Mayr afirma que el grupo más basal es el de los picaflores (Trochillidae), y que tanto Vencejos como Vencejos arborícolas forman un clado derivado, que se denomina Apodi (Mayr, 2010).

Tradicionalmente, se ha considerado que las familias Steatomithidae (Guácharos), Podargidae (Podargos), Nyctiibidae (Urutaúes), Caprimulgidae (Gallinas

ciegas) y Aegothelidae (Egotelos) forman un grupo natural, denominado Caprimulgiformes (Livezey & Zusi, 2007), en base a caracteres aparentemente compartidos por los miembros del clado, tales como el modo de vida nocturno y la semejanza superficial (ancho mandibular y plumaje críptico). No obstante, estos rasgos son artificiales (la morfología ósea es variable entre familias, por lo que la semejanza es aparente), o bien, se han utilizado rasgos plesiomórficos en el proceso de reconstrucción (anisodactilia, narinas holorrinas o miología de la pelvis), por lo que no existen caracteres sinapomórficos para este clado (Mayr, 2002, 2010). En base a esta situación, Mayr propuso que el orden Caprimulgiformes es un grupo parafilético, lo que se ha visto reforzado por múltiples estudios de reconstrucción filogenética con caracteres moleculares (Ericson *et al.*, 2006; Hackett *et al.*, 2008) y rasgos morfológicos (Mayr, 2010).

Las nuevas reconstrucciones filogenéticas además coinciden en señalar que existe una estrecha relación entre el grupo de los picaflones, vencejos y vencejos arborícolas (Apodiformes) y las familias del clado parafilético "Caprimulgiformes" (en adelante, denotado entre comillas debido a su condición de grupo no natural). Este clado se ha denominado Strisores: Steatomithiformes (Mayr, 2010). En particular, evidencias independientes muestran que Apodiformes se encuentra anidado dentro de Strisores (Figura 3), con las familias de "Caprimulgiformes" como miembros basales, y Apodiformes como derivados (Ksepka *et al.*, 2013; Jarvis *et al.*, 2014).



**Figura 3:** Árbol filogenético de máxima parsimonia para un análisis combinado (morfológico y molecular) de Strisores. En gris se muestran los grupos extintos. Frogmouths: Podargidae, Oilbirds: Steatornithidae, Potoos: Nyctibiidae, Nightjar: Caprimulgidae, Owllet nightjar: Aegothelidae, Tree Swift: Hemiprocnidae, True Swifts: Apodidae, Hummingbirds: Trochilidae. Modificado de Ksepka et al., 2013.

Las afinidades de las familias de “Caprimulgiformes” también son objeto de disputa. Existen dos situaciones en las que se ha logrado consenso y soporte: la existencia de un clado que tiene a Apodiformes y Aegothelidae como grupos hermanos, denominado Daedalornithes por Sangster (Sangster, 2005), y Apodimorphae por Mayr (Mayr, 2010), y la ubicación basal de Steatornithidae dentro de Strisores. Sin embargo, la posición de Podargidae, Nyctibiidae y Caprimulgidae sigue siendo conflictiva. Mayr (Mayr, 2010) y Ksepka (Ksepka et al., 2013) proponen la existencia de un clado que incluye a Nyctibiidae y Caprimulgidae (Caprimulgi), mientras que Hackett (Hackett et al.,

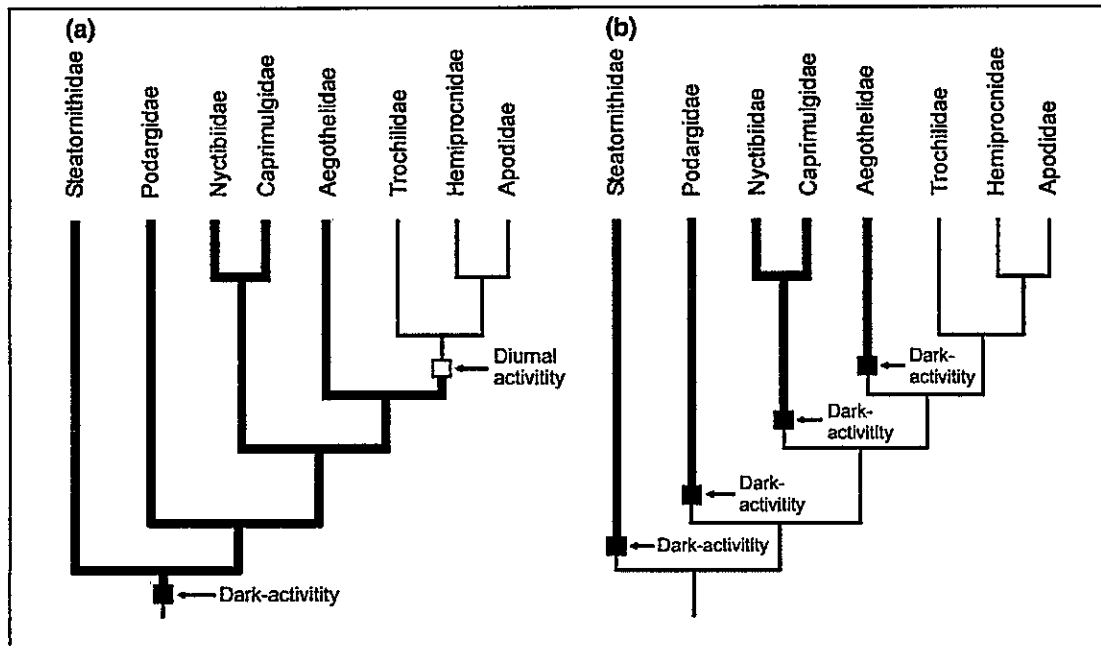
2008) propone a Nyctibiidae como grupo hermano de Steatomithidae, y Ericson muestra una politomía en la base de Strisores, con Steatomithidae, Caprimulgidae, Nyctibiidae y Podargidae (Ericson *et al.*, 2006).

A su vez, también existen múltiples hipótesis sobre la posición de Strisores dentro de Neoaves, y sus afinidades. Sibley propone, en base a un estudio de hibridización de DNA, que el orden Caprimulgiformes tiene como grupo hermano a Strigiformes (Sibley, Ahlquist & Monroe, 1988). Esta interpretación además es coherente con la convergencia de los hábitos nocturnos en ambos grupos. Hackett señala que el clado formado por los Gruiformes Eurypyga y Rhynochetos es el grupo hermano de Strisores (Hackett *et al.*, 2008). En una revisión a gran escala dentro de Aves (Mayr, 2014) se señala la existencia de una extensa politomía, entre Telluraves (el clado de aves terrestres que incluye, entre otros, a Psittaciformes, Passeriformes, Falconiformes y Coraciiformes), Strisores, Aequornithes (clado de aves acuáticas, que incluye grupos como Procellariiformes, Suliformes y Sphenisciformes), y un gran número de clados de afinidades inciertas (como Charadriiformes, Columbiformes y Mirandornithes). Por otra parte, un reciente estudio realizado a escala genómica (Jarvis *et al.*, 2014) propone una resolución a aquella politomía, mostrando que Strisores (denominado Caprimulgimorphae en esta taxonomía) se encontraría en la base de un gran clado de Neoaves denominado Passerea (que incluye a todas las Neoaves menos a Columbea), y su grupo hermano sería el clado Otidimorphae, que incluye a Otidiformes, Musophagiformes y Cuculiformes.

### 3. Nocturnidad y reversión en Strisores

Dentro del clado de Strisores, es posible encontrar especies que presentan modos de vida escotópicos (nocturnos, como en Caprimulgidae, o nocturnos mixtos, que habitan en cuevas, como en Steatornithidae) y fotópicos (Trochilidae, Apodidae y Hemiprocnidae). Aunque las afinidades de Strisores aún no están completamente resueltas, los grupos hermanos de éste clado que han sido propuestos (Hackett *et al.*, 2008; Nesbitt *et al.*, 2011; Jarvis *et al.*, 2014), presentan modos de vida diurnos; Trogon (Trogonidae), Eurypyga (Eurypygidae), Rynochetos (Rynochetidae), Leptosomus (Leptosomidae), además de representantes de Otidiformes, Musophagiformes y Cuculiformes. Por tanto, el escenario más plausible de aparición del modo de vida nocturno en Strisores correspondería a un evento único de transición conductual, en el ancestro común más reciente de Steatornithidae y Trochilidae (Figura 4-A). Sin embargo, se ha propuesto una hipótesis alternativa, que contempla múltiples eventos de emergencia de la nocturnidad (Figura 4-B). Aunque la explicación más parsimoniosa sería la primera hipótesis, existirían razones que podrían sustentar la hipótesis de la aparición múltiple, como la existencia de varios eventos de exclusión competitiva con insectívoros diurnos, o la apertura de nichos por la radiación de insectos nocturnos en el Paleógeno (Mayr, 2010).





**Figura 4:** Hipótesis sobre el origen de la nocturnidad en Strisores. A: Hipótesis del evento único, en el antepasado común más reciente del Guácharo (Steatomithidae) y los Vencejos (Apodidae), con una reversión a la diurnidad en Apodiformes. B: Múltiples eventos de transición hacia la nocturnidad en las familias de "Caprimulgiformes", conservándose un antepasado diurno para Apodiformes. Modificado de Mayr, 2010.

La historia de los eventos de emergencia de la nocturnidad en el linaje de Strisores pudo tener consecuencias importantes sobre la evolución del sistema visual en el grupo de los picaflores, dependiendo de la secuencia de eventos ocurridos (es decir, de la hipótesis favorecida por las evidencias). En otros grupos de vertebrados existen múltiples ejemplos de casos en los que un cambio en el modo de vida (diurno o nocturno) está relacionado a modificación de rasgos neuroanatómicos, incluso entre especies cercanas.

Un caso posible es la transición a un modo de vida nocturno en un linaje diurno. Dentro de este tipo de modificación conductual a escala evolutiva, se encuentran ejemplos en los que la magnitud de los cambios depende de la cercanía filogenética

(tiempo de divergencia) entre las especies diurnas y nocturnas. Tal es el caso de la Gaviota de las Galápagos (*Creagrus furcatus*), la que pertenece a una familia de hábitos diurnos o crepusculares (Charadriiformes: Laridae), pero que posee hábitos nocturnos (Hailman, 1964). Al comparar la morfología ocular, se encontró que el ojo de esta especie presenta un índice de apertura respecto a longitud axial levemente menor que en las gaviotas diurnas, aunque los demás parámetros morfométricos del ojo no presentaron diferencias significativas (Iwaniuk, Heesy & Hall, 2010b). Otro ejemplo relevante es el Kakapo (*Strigops habroptilus*), loro nocturno que también pertenece a un linaje diurno (Psittaciformes: Psittacidae). En el sistema visual del Kakapo se describieron rasgos previamente asociados a la nocturnidad, como un mayor campo visual binocular y una reducción en la prevalencia de la vía Tectofugal, en comparación a los demás loros diurnos (Corfield *et al.*, 2011). Sin embargo, rasgos como la anatomía de la retina no presentaron una morfología como la asociada a la nocturnidad. Ambos casos, en los que se estudió la variación de rasgos en relación a la transición a la nocturnidad, encontraron diferencias de baja magnitud, entre especies cercanamente relacionadas. Al realizar comparaciones a gran escala, aparecen patrones como los descritos en el primer apartado.

Un caso similar, pero en el linaje de los mamíferos, ocurre en el grupo de los roedores Octodóntidos. En este clado, se ha descrito que una especie nocturna, el Degu costino (*Octodon lunatus*), posee un campo binocular de mayor magnitud que una especie diurna muy cercana, el Degu común (*Octodon degus*). Además, el Degu costino posee menos RGC y un mayor volumen de los núcleos dorsales talámicos que el Degu común. En este contexto se demuestra que la nocturnidad por sí misma, en condiciones

ecológicas equivalentes, es capaz de generar un incremento en la binocularidad, lo que se ha denominado como hipótesis de la restricción nocturna (Vega-Zuniga *et al.*, 2013).

Los casos descritos para el fenómeno inverso (transición desde la nocturnidad a un modo de vida diurno) son sustancialmente menos numerosos. No obstante, se ha postulado un origen nocturno para el linaje de los Mamíferos (hipótesis del “cuello de botella” nocturno). Esta hipótesis propone que tanto la morfología ocular (apertura corneal versus longitud axial) como la convergencia binocular (que en el linaje de los mamíferos presentan los valores más extremos entre los amniotas) se explica por el modo de vida escotópico de los grupos de antepasados comunes de aquel clado, reteniéndose algunas de aquellas características en mamíferos secundariamente diurnos (Heesy & Hall, 2010; Hall, Kamilar & Kirk, 2012). Dentro del grupo de los Mamíferos, se encuentra que en el clado de los Primates existen múltiples eventos de transición conductual entre regímenes lumínicos. El caso más estudiado es el origen nocturno de los Primates, y su posterior transición a un modo de vida diurno (primates Antropoides). En este linaje se alcanza la mayor convergencia binocular descrita para los Vertebrados, la que se presenta en linajes nocturnos. En estos linajes, además, se encuentra un gran tamaño de los ojos, lo que tiene como consecuencia, mediante el aumento de la longitud axial, una mayor agudeza visual, lo que se ha correlacionado con la captura activa de presas en condiciones nocturnas. A partir de esta proposición, denominada hipótesis de la depredación visual nocturna (Ankel-Simons & Rasmussen, 2008; Menegaz & Kirk, 2009), es posible explicar el origen nocturno de los primates, además de la conservación de un alto grado de frontalidad en los primates antropoides, de naturaleza diurna. Se ha propuesto que tal conservación es consecuencia del fenómeno de estereopsis, cuya importancia aumentaría (como epifenómeno), al tener



órbitas más convergentes. Esta condición habría restringido la pérdida de convergencia en el paso hacia la condición diurna, teniendo como resultado un linaje de primates diurnos, pero frontales (Heesy, 2009).

En aves, un caso de transición fotópica es el de la morfología del sistema visual en el grupo de los Búhos (Strigiformes), un linaje de especies principalmente nocturnas y crepusculares. Se ha descrito que búhos diurnos y crepusculares tienen una menor apertura corneal respecto a la longitud axial que sus contrapartes nocturnas (Lisney *et al.*, 2012a), pero que no existe una relación entre el modo de vida y la prevalencia diferencial de alguna de las vías visuales (Gutiérrez-Ibáñez *et al.*, 2013).

Dentro del linaje de Strisores, no existen descripciones neuroanatómicas de todos sus miembros en un contexto comparativo. Sin embargo, existen algunas descripciones que pueden aplicarse a un análisis de la transición a la nocturnidad ocurrida en este grupo.

Las especies de "Caprimulgiformes" han sido pobremente estudiadas, principalmente por la dificultad de acceso a muestras de especies con problemas de conservación (Steatomithidae), o especies nocturnas. Los estudios de la neuroanatomía del sistema visual se restringen al examen de las zonas del hiperpalio que putativamente participarían del fenómeno de la estereopsis en dos familias de "Caprimulgiformes"; Podargidae y Aegothelidae (Iwaniuk & Wylie, 2006). Especies de estas dos familias presentan un mayor volumen del Wulst que las demás familias del grupo (Steatomithidae, Nyctiibidae y Caprimulgidae). Este hecho, unido a la mayor

convergencia orbital de aquellas dos familias, podría estar relacionado al fenómeno de la estereopsis.

Por otra parte, existen estudios de la morfología ocular y retiniana en algunas especies de "Caprimulgiformes". Se ha descrito el número y distribución de fotorreceptores en especies de dos familias; Steatomithidae (Guácharo) y Caprimulgidae (Chotacabras pauraque, coliblanco y menor), encontrándose en ambos casos una retina dominada por bastones, pero con una mayor densidad y número de los mismos en el Guácharo (Martin *et al.*, 2004b; Rojas *et al.*, 2004a, 2004b). Respecto a la morfología de los campos visuales, sólo se han descrito dos especies, pertenecientes a las mismas familias señaladas anteriormente, encontrándose que el Guácharo posee un campo frontal binocular de aproximadamente 38° de amplitud máxima, con una mayor extensión que lo descrito para el Pauraque, de 25° de amplitud máxima (Martin *et al.*, 2004a).

En los picaflores, existe un mayor número de trabajos sobre la estructura del cerebro. En primer lugar, se ha descrito detalladamente la neuroanatomía general de varias especies de picaflores; el Tucusito Ruby, *Chrysolampis mosquitus* y el Esmeralda Coliazul, *Chlorostilbon mellisugus caribaeus* (Craigie, 1928), el Mango Jamaicano, *Anthracothorax (Lampornis) mango* (Craigie, 1932), el Colibrí coliancho, *Selasphorus platycercus* (Cobb, 1962) y el Colibrí de Ana, *Calypte anna* (Stegeman, 2013). A pesar de esta situación, la gran mayoría de los trabajos referidos a las características del sistema visual en picaflores se enfocan en el fenómeno de la visión del color, y de los correlatos estructurales del mismo a nivel retiniano (Herrera, Fernández & Pohl, 2004; Herrera *et al.*, 2008; Curé & Palacios, 2009). Respecto a la morfología de los campos

visuales, no se han realizado estudios en ninguna especie de picaflor (Graham R. Martin, comunicación personal).

Para ambos grupos (picaflores y caprimúlgidos) existen datos de orientación de órbita (ángulo beta), siendo más amplio el muestreo en el último grupo, el que cubre todas las familias de "Caprimulgiformes" (Iwaniuk *et al.*, 2008; Menegaz & Kirk, 2009), en contraste con Trochilidae, donde sólo existen datos de una especie de picaflor, el *Amazilia* de cola rufa, *Amazilia tzacatl* (Menegaz & Kirk, 2009). La morfometría ocular ha sido descrita para "Caprimulgiformes", pero no existen datos referentes a Picaflores (Hall & Ross, 2007).

Hasta la fecha se desconoce el detalle de la conectividad de las proyecciones retinianas sobre el Tectum Óptico, el Tálamo dorsal y los núcleos del Sistema Óptico Accesorio en Strisores. No existen estudios de hodología en ninguna especie de este linaje.

#### 4. Explicación del problema

El linaje de Strisores presenta condiciones que lo hacen adecuado para estudiar el problema de la transición conductual entre modos de vida diurnos y nocturnos. En particular, todos los representantes del grupo de los picaflores y vencejos (Apodiformes) presentan hábitos exclusivamente diurnos. Por tanto, si se cumple la hipótesis del único origen nocturno en Strisores (Mayr, 2010), el clado Apodiformes proviene de un ancestro nocturno. Tal como se ha discutido en detalle, es posible esperar que existan

características asociadas al modo de vida nocturno en los representantes diurnos de Apodiformes.

De forma alternativa, en el caso de un origen múltiple de los hábitos nocturnos, a partir de un linaje diurno, al estudiar las características del sistema visual en Apodiformes, no se esperaría encontrar características relacionadas a la nocturnidad. Este análisis, por tanto, permitiría evaluar de forma indirecta ambas hipótesis.

En Chile central existen tres especies de picaflor: el Picaflor chico (*Sephanoides sephanoides*), el Picaflor gigante (*Patagona gigas*) y el Picaflor cordillerano (*Oreotrochilus leucopleurus*). Además, se puede encontrar una especie de Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*). En este trabajo se decidió describir a la especie de Picaflor más abundante, el Picaflor chico, y compararlo con la Gallina ciega.

## 5. Hipótesis y objetivos.

### a. Hipótesis.

El análisis de la morfología de las vías visuales de la especie de picaflor estudiado debiera mostrar rasgos correspondientes con el modo de vida nocturno.

### b. Objetivo general.

Evaluar la presencia de caracteres morfológicos relacionados a un estadio escotópico en las vías visuales de una especie de picaflor, como consecuencia de la historia evolutiva de su linaje.

c. Objetivo específico 1.

Contribuir a la discusión sobre las afinidades filogenéticas entre el clado de los Caprimulgiformes y el clado de Apodiformes.

d. Objetivo específico 2.

Describir en términos generales la neuroanatomía (con énfasis en el sistema visual) de una especie de picaflor y una especie de gallina ciega.

e. Objetivo específico 3.

Interpretar los resultados comparativamente, en el contexto de las hipótesis sistemáticas sobre el origen y pérdida del modo de vida nocturno en este clado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Captura y permisos.

Siete ejemplares de Gallina ciega fueron capturados con redes de niebla en la Estación Experimental Germán Greve Silva de la Universidad de Chile, en Rinconada de Maipú (Región Metropolitana) y diez ejemplares de Picaflor chico fueron capturados utilizando el mismo método en el Campus Juan Gómez Millas de la Universidad de Chile, en Ñuñoa (Región Metropolitana). Los métodos de captura, el número máximo de ejemplares y los sitios de captura fueron aprobados por el Servicio Agrícola y Ganadero, SAG (permisos 8171-2011 y 796-2014). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

### 2. Campos visuales

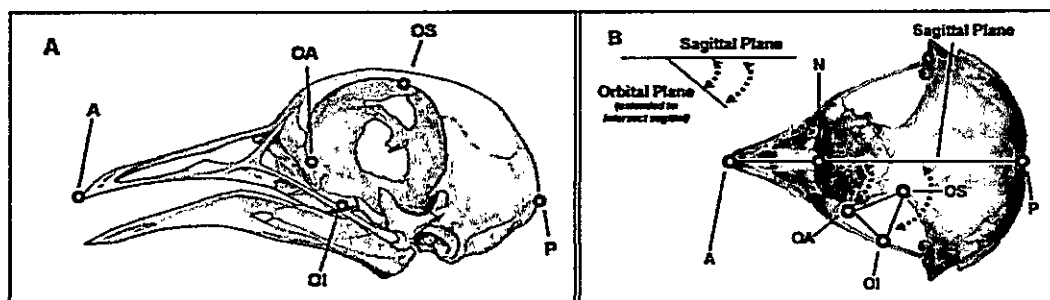
Se examinó la extensión de los campos visuales utilizando un protocolo estándar de reflejo oftalmoscópico (Martin, 2007). Dos ejemplares de Gallina ciega y un ejemplar de Picaflor chico fueron anestesiados utilizando una mezcla gaseosa de Isoflorano en oxígeno (5%). Posteriormente, fueron fijadas a un aparato estereotáxico, y se fijó la punta del pico utilizando como referencia horizontal la línea del párpado. Se indujo midriasis en el ojo derecho, utilizando de una a dos gotas de una solución tópica de Tropicamida 1% (Mydriacyl, ALCON), según el tamaño del ojo. Luego, se determinaron los límites de

la retina para el ojo derecho, mediante el uso de un oftalmoscopio (Welch-Allyn, New York, USA). Se registró el límite de la retina en dos coordenadas, elevación y azimut, en intervalos de 10° y 5°, respectivamente, mediante el uso de un campímetro adosado al aparato estereotáxico. Con los datos de ambas coordenadas para toda la retina, se elaboró una proyección esférica de los campos visuales, así como una proyección en el plano horizontal.

### 3. Orientación de las órbitas.

Se estudió la orientación de las órbitas oculares en un cráneo de Picaflor chico y un cráneo de Gallina ciega, mediante el método de los ángulos diedros (Iwaniuk *et al.*, 2008). Mediante el uso de un brazo digitalizador 3D (Microscribe G2L, Immersion Corporation, California, USA), se capturaron las coordenadas cartesianas de seis hitos (landmarks), los que definen dos planos (Figura 5). El plano sagital está definido por el punto más anterior del pico (A), el punto más posterior del hueso occipital (P), y el punto de unión de la sutura nasal e intermaxilar (N). El plano orbital se define por el punto medio de la barra cuadradoyugal (OI), el punto de la órbita inmediatamente superior al punto anterior (OS) y el punto central del hueso lagrimal (OA). Se calculó la ecuación de cada plano en base a los tripletes de puntos, y se calculó el ángulo diedro según el algoritmo descrito en la literatura. El ángulo resultante ( $\alpha$ , orientación de una única órbita) se multiplicó por 2, para obtener la convergencia total (ángulo  $\beta$ ). En el caso de la Gallina ciega (al igual que en otros caprimúlgidos descritos), existe una curvatura de la barra cuadradoyugal, lo que genera un excesivo ancho de la mandíbula. Esta situación repercute generando un artefacto en la medición de las órbitas, por lo que en tal caso se

realizó una proyección de los dos puntos extremos de la barra cuadradoyugal, cuyo punto medio fue definido como OI, según lo descrito en la literatura (Iwaniuk *et al.*, 2008).



**Figura 5:** Hitos utilizados en la determinación del grado de convergencia de las órbitas oculares. A: Posición de los hitos en el cráneo de una paloma (*Columba livia*). B: Orientación del plano sagital (A, N, P) y el plano orbital (OA, OS, OI), cuyo ángulo diedro es el ángulo de convergencia  $\alpha$ . Modificado de Iwaniuk *et al.*, 2008.

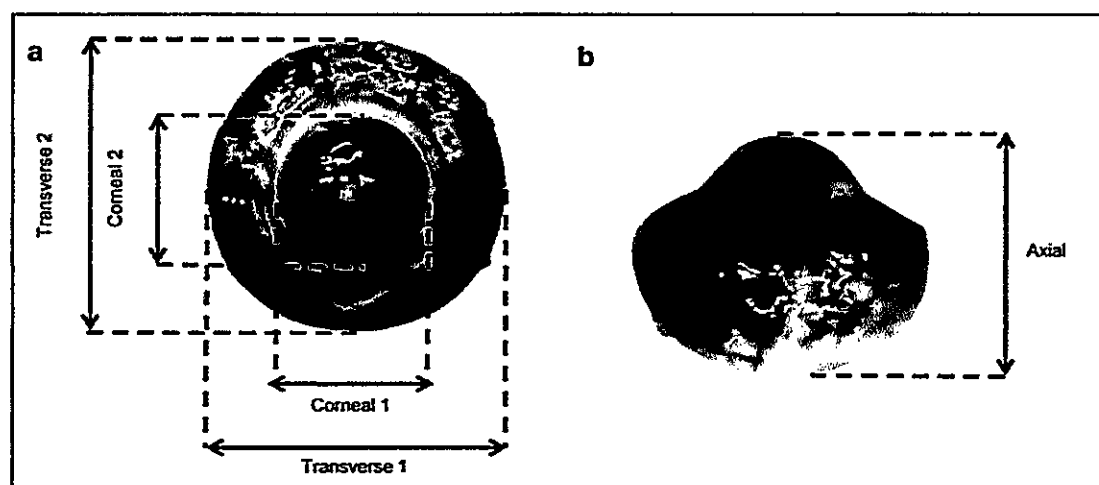
Con el objetivo de realizar comparaciones entre los grupos de Strisores, se extrajeron valores de convergencia de las órbitas oculares descritos hasta la fecha, desde la literatura (Iwaniuk *et al.*, 2008; Menegaz & Kirk, 2009). Los datos (incluyendo los valores obtenidos en este estudio) fueron segregados en dos grupos (Apodiformes,  $n = 3$  y “Caprimulgiformes”,  $n = 13$ ), los que fueron comparados mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

#### 4. Morfometría ocular.

Luego de aplicarse un protocolo de eutanasia y perfusión (descrito en el apartado 6), se extrajeron los ojos de cada individuo, en los que se determinó el estado de 5 variables, de acuerdo al protocolo descrito en trabajos anteriores (Hall & Ross, 2007; Iwaniuk *et al.*, 2010b; Lisney *et al.*, 2012b). En cada ojo se registraron dos valores perpendiculares de diámetro corneal y transversal, además de la longitud axial (Figura



6). Posteriormente se determinaron los índices CT (cociente de los promedios de longitud corneal y transversal) y CD/AL (cociente del promedio de la longitud corneal respecto a la longitud axial). Éste último índice fue normalizado para permitir comparaciones entre especies de distinto tamaño (aplicando logaritmo en base 10), y se determinó el promedio de los índices normalizados y la desviación estándar del índice para cada caso. Se midieron las variables utilizando un pie de metro digital (incerteza = 0.05mm), en 10 ojos de Picaflor chico, y 12 ojos de Gallina ciega, de los cuales, solo se consideraron en los análisis posteriores aquellas mediciones realizadas en ojos que conservaron su estructura intacta (en particular, aquellos que conservaron su longitud axial sin modificaciones evidentes a simple vista): en el P. chico, para la obtención del índice CD/AL se utilizó  $n = 2$  (no fue posible medir la longitud axial en 8 casos), pero para el índice CT se utilizó  $n = 10$  (ya que los valores de longitud corneal y transversal no presentaron problemas). En el caso de la Gallina ciega, se utilizó  $n = 12$  (no fue posible medir la longitud axial en 2 casos), para ambos índices.



**Figura 6:** Variables morfométricas estudiadas en el ojo del P. chico y la G. ciega. Longitud axial (Axial, AL), Diámetro corneal (promedio de Corneal 1 y 2, CD), y Diámetro transversal (promedio

de Transverse 1 y 2, TD). Ojo de un Gallo de Canadá, *Falci pennis canadensis*. Modificado de Lisney et al, 2012.

Se realizó una comparación entre las dos especies mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, considerando el valor de cada índice como un dato independiente. Además, se obtuvo el valor del estado de las variables mencionadas a partir de la literatura (Hall & Ross, 2007) para otras especies de Strisores; 42 especies de "Caprimulgiformes" y 17 de Apodiformes, las que se complementaron con el valor promedio normalizado de las especies estudiadas (G. ciega y P. chico), a modo de realizar comparaciones entre grupos, las que se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

#### 5. Retina (Wholemounds).

A partir de los ojos recientemente extraídos de cada especie (n = 4 para la G. ciega y n = 2 para el P. chico), se realizó un montaje de la retina completa (*wholemound*), según el protocolo de Ullmann (Ullmann *et al.*, 2012). Se realizó un corte transversal del ojo, para remover el cristalino, la musculatura ciliar y columnar, y los humores. Luego, bajo un microscopio de disección, se removió cuidadosamente la retina, apartándola de la esclerótica. Se realizó un corte de referencia, y se sumergió la retina en una solución de *bleaching* (Buffer fosfato 0.1M y peróxido de hidrógeno 30%, ajustado a pH 11.95 con una solución de hidróxido de potasio 1.0M), por un tiempo dependiente de la intensidad del pigmento de cada retina. Luego, se montó la retina en un portaobjetos doblemente gelatinizado, con la capa de fotorreceptores hacia abajo, realizando cortes en la misma para lograr extenderla sobre la superficie del portaobjetos. Una vez montada, se dejó

*overnight* en una cámara sellada, con 5-10 mL de paraformaldehído 4% (sin contacto con la retina), para fijarla suavemente con los vapores de PFA.

Luego, a la retina fijada se le aplicó un protocolo de tinción Nissl (según protocolo descrito en el punto 6). Posteriormente, se realizó un conteo de Células Retinianas Ganglionares (RGC) con un protocolo estereológico estándar (Coimbra *et al.*, 2006, 2009; Lisney *et al.*, 2012a, 2012b). Se realizó el conteo mediante el método del Fraccionador Óptico, con una única sección de conteo. Se utilizó un Área de Conteo (*Counting frame*) de 50 x 50  $\mu\text{m}$  para el Picaflor chico y de 80 x 80  $\mu\text{m}$  para la Gallina ciega. La grilla de muestreo (*Sampling grid*) utilizada fue de 300 x 300  $\mu\text{m}$ , y 800 x 800  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Se incluyó dentro del conteo cada célula encontrada dentro del área de conteo, o en contacto con la zona de inclusión. Se contaron únicamente las células dentro de la capa de las células ganglionares de la retina, utilizando un objetivo de 100X con aceite de inmersión. Aunque se han descrito criterios citológicos para diferenciar las células ganglionares retinianas de otros tipos celulares que pueden presentarse en la capa de células ganglionares (células amacrinas desplazadas), se optó por incluir en el conteo todas las células encontradas en aquella capa, práctica estándar en estudios de distribución de células ganglionares (Coimbra *et al.*, 2006).

Se realizaron conteos en 391 sitios para la Gallina ciega y 509 sitios para el Picaflor chico. Se obtuvo el número total de células multiplicando el conteo total de células por el inverso del Factor de muestreo de área (*Area Sampling Factor*), que corresponde al cociente entre el área de conteo y el área de la grilla de muestreo, en secciones únicas de ancho constante. Luego del conteo, se transformó en cada sitio el mismo a unidades de densidad (células/ $\text{mm}^2$ ), las que se superpusieron en un trazado

del contorno de la retina y el pecten realizado digitalmente a partir de las retinas (Adobe Photoshop CC14), a partir de lo cual se realizaron manualmente los contornos de las zonas de isodensidad.

## 6. Proyecciones visuales.

En tres ejemplares de Picaflor chico y en cuatro ejemplares de Gallina ciega se realizó un protocolo de inyección de un trazador neuronal anterógrado, CTb (List Biological, California, USA), en solución en PBS 0.01M (1%) más 0.2 % Dimetilsulfoxido (DMSO), para favorecer su captación y difusión. En ejemplares anestesiados según el protocolo descrito anteriormente, se inyectaron 10  $\mu$ L de solución en el ojo derecho de las gallinas ciegas (5  $\mu$ L en el hemisferio anterior de la retina, y 5  $\mu$ L en el hemisferio posterior) y 5  $\mu$ L en el ojo derecho de los picaflores (2.5  $\mu$ L en cada hemisferio retiniano), mediante una jeringa Hamilton de 10 $\mu$ L (Hamilton Company, Nevada, USA). Luego de la inyección, se cerró el ojo mediante un parche de cinta y algodón, y se inyectó una solución de anti-inflamatorio (Ketoprofeno 0.1%) y antibiótico (Enrofloxacino 0.1%), en las siguientes dosis: 0.1 mL para cada gallina ciega, y 0.01mL para cada picaflor. Se dejó migrar el trazador por períodos variables, dependientes del estado de cada ejemplar; en el picaflor el rango fue de 5-8 horas, y en la gallina ciega fue de 48-72 horas. En aquel intervalo, se mantuvo a cada animal en condiciones controladas de temperatura, y con alimentación forzada en intervalos de 1.5 horas, con una suspensión en agua de larvas frescas molidas de tenébridos para las gallinas ciegas, y una solución de sacarosa 20% en agua para los picaflores.

Luego del período de difusión del trazador, se realizó un protocolo de eutanasia y perfusión. Se inyectó una dosis de anestesia intramuscular de una mezcla de Ketamina 0.1% y Xilacina 2%, de proporción y concentración dependiente de la especie; en el Picaflor chico, se aplicó una dosis Ketamina/Xilacina 6:4, de 3.6  $\mu$ L/g de peso corporal (aproximadamente 18  $\mu$ L de solución), mientras que en la Gallina ciega se aplicó una dosis Ketamina/Xilacina 7:3 de 0.003 mL/g de peso corporal (aproximadamente 0.15 mL de solución). Luego, se realizó una perfusión transcardiaca de *buffer* fosfato (PBS 0.01M, aproximadamente 200 mL para la Gallina ciega y 50 mL para el picaflor), y luego una solución fijadora (Paraformaldehído 4% en PBS 0.01M, aproximadamente 100 mL para la Gallina ciega y 25 mL para el picaflor). Posteriormente se extrajo la cabeza de cada ejemplar, en la que se expuso el cráneo y se sumergió en solución fijadora (PFA 4%). Al día siguiente, se extrajo el cerebro, el que fue pesado en una balanza analítica (incerteza = 0.00005 g), y sumergido en una solución crioprotectora de Sacarosa 30% en PBS 0.01M. Una vez que el cerebro se hundió, el mismo fue embebido en gelatina 12% (Pig skin, SIGMA), y cortado en el plano coronal, mediante un micrótopo, generando para cada cerebro tres series de 60  $\mu$ m de ancho.

En una las series resultantes se realizó un protocolo de inmunohistoquímica para revelar el trazador. En primer lugar, se realizó un paso de bloqueo de la peroxidasa interna (*bleaching*), con una solución de peróxido de hidrógeno 0.03% y metanol 10% en PBS 0.01M, por 10 minutos. Luego, tres lavados de 10 minutos en PBS 0.01M, y se incubó en anticuerpo primario, Anti-CTb hecho en cabra (Vector Systems, dilución 1:10000, en PBS-Tritón 0.3%, 5% Normal Rabbit Serum), a 4°C *overnight*. Posteriormente se repitieron los lavados en PBS 0.01M, y se incubó en anticuerpo secundario (Anti-Goat IgG biotinilado hecho en conejo, Vector Systems, dilución 1:200,

en PBS-Tritón 0.3%), durante una hora a temperatura ambiente. Aquello fue seguido por tres lavados en PBS 0.01M, y una reacción del sistema AB (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Systems) por una hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados en PBS 0.01M y se realizó la reacción DAB: diaminobenzidina 25 mg/mL, Sulfato de Níquel 3  $\mu$ L/mL (sólo en las gallinas ciegas) y peróxido de hidrógeno 0.003%, incubados hasta obtener reacción (aproximadamente 10-20 minutos). Luego, los cortes fueron lavados al menos 5 veces con PBS 0.01M, montados y cubiertos con Eukitt (Sigma).

A otra serie de cortes se les aplicó el mismo protocolo, para posteriormente realizar una contratinción con Nissl. Una vez montados los cortes, se les aplicó un paso por 45 minutos en cloroformo, para luego aplicarles una batería de hidratación: pasos de 30 segundos por Etanol 100%, 95% (dos veces) y 70%. Luego, los cortes fueron sumergidos en una solución de Cresyl violeta (Merck) por 15-20 minutos (según grado de tinción), para posteriormente terminar la reacción, lavar y aumentar contraste en un paso por agua destilada de un minuto. A continuación se realizó una deshidratación con pasos de 30 segundos por Etanol 70%, 95% (x2) y 100% (x2), para finalmente dejar los cortes en Xilol 100% por al menos 45 minutos. Como último paso, los cortes fueron cubiertos con Eukitt.

Los cortes resultantes fueron fotografiados en un microscopio Olympus (BX51, aumentos de 4X, 10X y 20X) asociado a un software de captura de imágenes (SPOT Imaging, CAM 25.4 2Mp Slider, Diagnostic Instruments, Michigan, USA). Se aplicaron correcciones menores de contraste y exposición *a posteriori* mediante un software de manipulación de imágenes (Adobe Photoshop CC14, Adobe Systems, California, USA).

## 7. Estereología y estimación exploratoria de volúmenes.

Se estimó el volumen de los núcleos de las vías visuales en series de tinción Nissl para ambas especies ( $n = 1$ ), mediante un protocolo estereológico de volumetría, el método de Cavalieri (Gundersen & Jensen, 1987). Se midió el volumen de los siguientes núcleos: Vía Tectofugal: Tectum Óptico (TeO), Núcleo Rotundo (Rt) y Entopallio (E). Vía Tálamofugal: Núcleos Principales Óptico-Talámicos (OPT). Otros núcleos de importancia: Núcleo Genuculado Lateral ventral (GLv). No fue posible estimar directamente el volumen del Hiperpallio Dorsal Visual (Wulst). Además, se estimó el volumen total del telencéfalo. El volumen del cerebro fue obtenido en base al peso total del cerebro (determinado luego de la inmersión en PFA 4%), y la densidad del tejido nervioso descrito en la literatura, de 1.036 g/mL (Ebinger, 1995; Iwaniuk & Nelson, 2002).

Para realizar las mediciones, se utilizó un microscopio Nikon (Eclipse 4000) con platina motorizada (Ludl Electronics, New York, USA) asociado a un software de estereología (Stereo Investigator, MBF Bioscience, Vermont, USA). En una serie (avance del corte = 60  $\mu\text{m}$ , distancia entre cortes = 180  $\mu\text{m}$ ) se demarcó el perímetro de cada núcleo utilizando un objetivo de 4X, para posteriormente utilizar el Estimador de Cavalieri, el que entrega una estimación del volumen de cada núcleo de interés, además del Coeficiente de error de Gundersen (Gundersen & Jensen, 1987). El tamaño de la grilla de medición fue optimizado según el tamaño de la zona a medir y el coeficiente de error. Para el Picaflor chico, se utilizó una grilla de 200  $\mu\text{m}$  para el TeO y el Telencéfalo, y 80  $\mu\text{m}$  en los núcleos restantes. En la Gallina ciega, se utilizó una grilla de 200  $\mu\text{m}$  para todos los núcleos. En ambos casos se utilizó un Factor de Forma igual a cuatro.

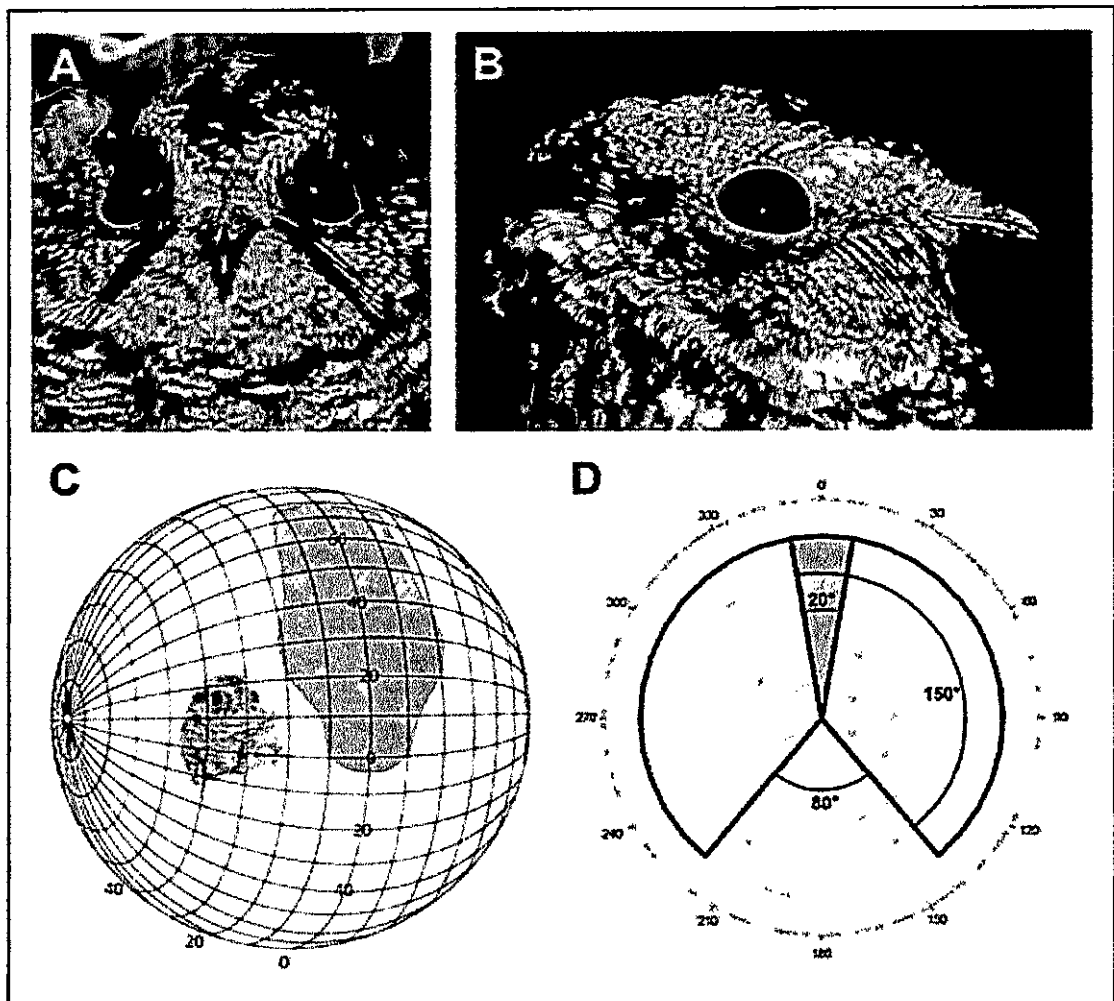
Como referencia de la anatomía de cada zona, se utilizó el Atlas estereotáxico de la Paloma (Karten & Hodos, 1967) y trabajos con descripciones específicas de cada núcleo (Nieuwenhuys *et al.*, 1998; Iwaniuk & Wylie, 2006; Stegeman, 2013).



## RESULTADOS

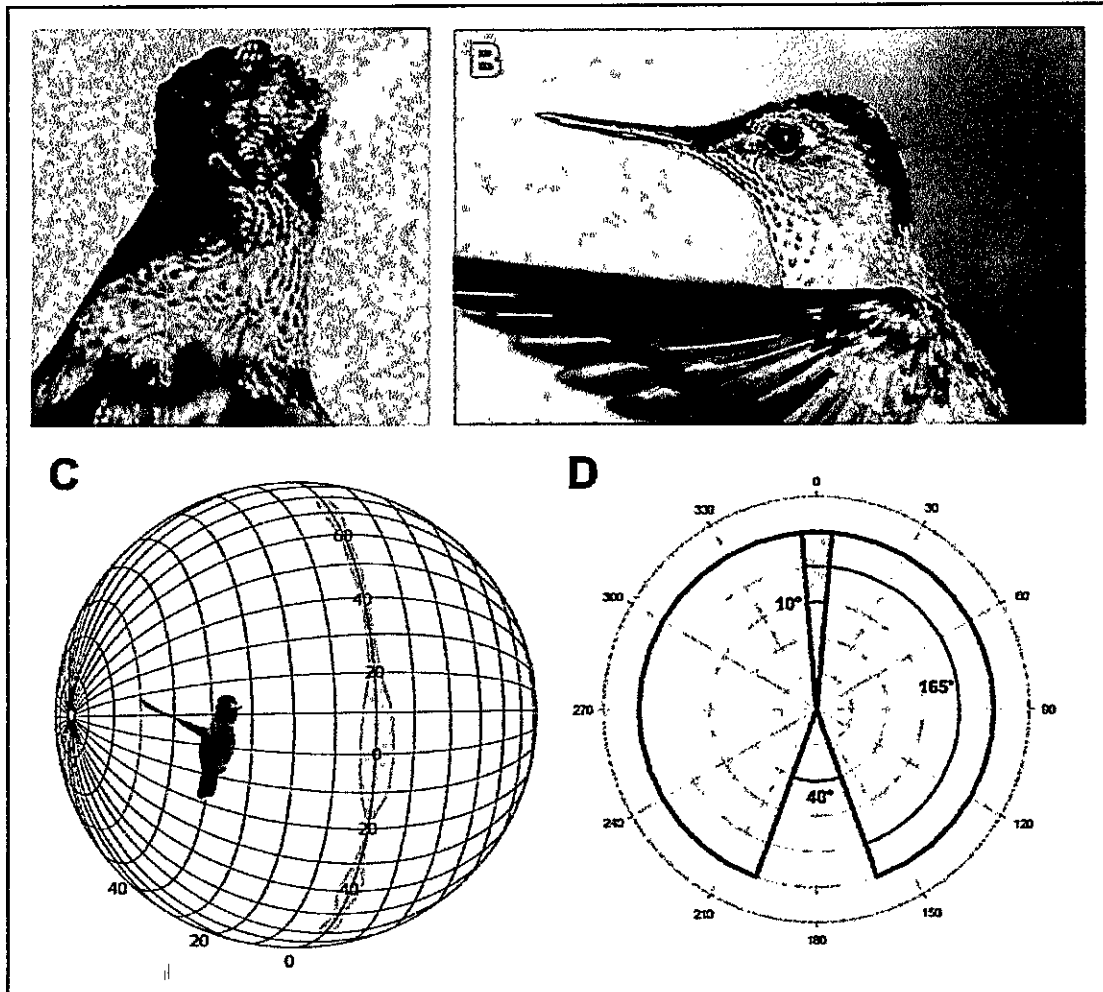
### 1. Campos visuales

Fue posible analizar el tamaño y posición relativa (al animal) de los campos visuales en dos ejemplares de Gallina ciega y un Picaflor chico. No se encontraron mayores diferencias entre los dos ejemplares de Gallina ciega examinados. En un ejemplar de Gallina ciega representativo (Figura 7), se encontró un campo visual binocular con orientación anterior-dorsal (por sobre la línea del pico). Su extensión dorsoventral abarca aproximadamente  $80^\circ$  por la línea media (sagital), y su extensión mediolateral máxima es de aproximadamente  $42^\circ$ , que se presentan a una elevación de aproximadamente  $30^\circ$ . En el plano horizontal (elevación =  $0^\circ$ ), la convergencia binocular es de aproximadamente  $20^\circ$ . Respecto al campo visual de cada ojo, se tiene que en el plano horizontal se extiende por  $150^\circ$ . Además, se encontró que existe una zona ciega posterior de aproximadamente  $80^\circ$  de extensión. Según la clasificación de Martín, los campos visuales de la Gallina ciega corresponden a una morfología de Tipo 3 (Martín, 2007).



**Figura 7:** Morfología de los campos visuales en la Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*). A: Vista frontal. B: Vista lateral. C: Proyección esférica del campo visual binocular (divisiones = 10°). D: Proyección de los campos visuales en el plano horizontal (elevación cero).

En el picaflor chico (Figura 8), el campo visual binocular es de forma alargada, y se extiende por la línea media (sagital) a lo largo de aproximadamente 160°. Su máxima extensión mediolateral se alcanza en el plano horizontal, y es de aproximadamente 10°. El campo visual de cada ojo cubre aproximadamente 165°, y se presenta una zona ciega posterior de aproximadamente 40°. La morfología visual del Picaflor chico corresponde al Tipo 2.



**Figura 8:** Morfología de los campos visuales en el Picaflor chico (*Sephanoides sephanoides*). A: Vista frontal. B: Vista lateral. C: Proyección esférica del campo visual binocular (divisiones = 10°). D: Proyección de los campos visuales en el plano horizontal (elevación cero). Imágenes cortesía de Francisco Natalino (A) y Christopher Momberg (B).

## 2. Orientación de las órbitas

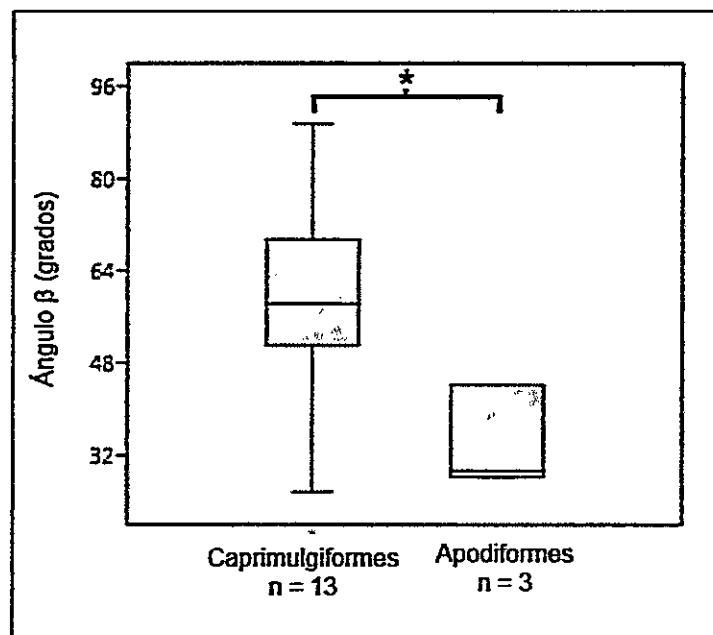
La orientación de las órbitas oculares determinadas en un cráneo de cada especie se muestra en la Tabla 1. Además, se muestran valores de referencia para especies descritas anteriormente. Se encontró que la Gallina ciega posee

aproximadamente el doble de convergencia total de las órbitas oculares, respecto al Picaflor chico.

**Tabla 1:** Parámetros de la orientación de las órbitas oculares en 15 especies de Strisores. Fuentes: 1: Este trabajo. 2: Iwaniuk et al, 2008. 3: Menegaz & Kirk, 2009.

Taxón	Especie	Número	Convergencia de órbita única (ángulo $\alpha$ )	Convergencia total (ángulo $\beta$ )	Fuente
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus longirostris</i>	1	36.64°	73.28°	1
Trochilidae	<i>Sephanoides sephanoides</i>	1	14.14°	28.28°	1
Aegothelidae	<i>Aegotheles insignis</i>	1	25.435°	50.87°	2
Aegothelidae	<i>Aegotheles cristatus</i>	2	33.70°	67.40°	3
Apodidae	<i>Chaetura pelagica</i>	2	22.18°	44.36°	2
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus sp.</i>	2	35.82°	71.64°	2
Caprimulgidae	<i>Nyctidromus albicollis</i>	3	31.35°	62.70°	2
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus carolinensis</i>	2	17.80°	35.60°	3
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus cayennensis</i>	2	26.30°	52.60°	3
Caprimulgidae	<i>Chordeiles minor</i>	2	12.85°	25.70°	3
Nyctibiidae	<i>Nyctibius griseus</i>	1	44.80°	89.60°	2
Nyctibiidae	<i>Nyctibius griseus</i>	1	29.15°	58.30°	3
Podargidae	<i>Podargus strigoides</i>	2	31.32°	62.64°	2
Podargidae	<i>Podargus strigoides</i>	2	25.60°	51.20°	3
Steatomithidae	<i>Steatomis caripensis</i>	2	26.22°	52.43°	2
Trochilidae	<i>Amazilia tzacatl</i>	2	14.70°	29.40°	3

Los valores de convergencia (ángulo beta), obtenidos en este estudio y extraídos de la literatura, resultaron ser estadísticamente diferentes al comparar las especies de Apodiformes (familias Apodidae y Trochilidae, ya que no existen datos sobre las órbitas oculares en Hemiprocnidae) con las familias de "Caprimulgiformes" (Mann-Whitney,  $z = -2.018$ ,  $p = 0.04359$ , Figura 9).



**Figura 9:** Comparación de la orientación de la órbita ocular entre distintos grupos de Strisores: "Caprimulgiformes" versus Apodiformes (Apodidae + Trochilidae, sin datos de Hemiprocnidae). Los valores significativamente diferentes (Mann-Whitney  $p < 0.05$ ) se denotan por un asterisco. Boxplot (se representan los dos percentiles centrales y la mediana). Las barras indican la desviación estándar.

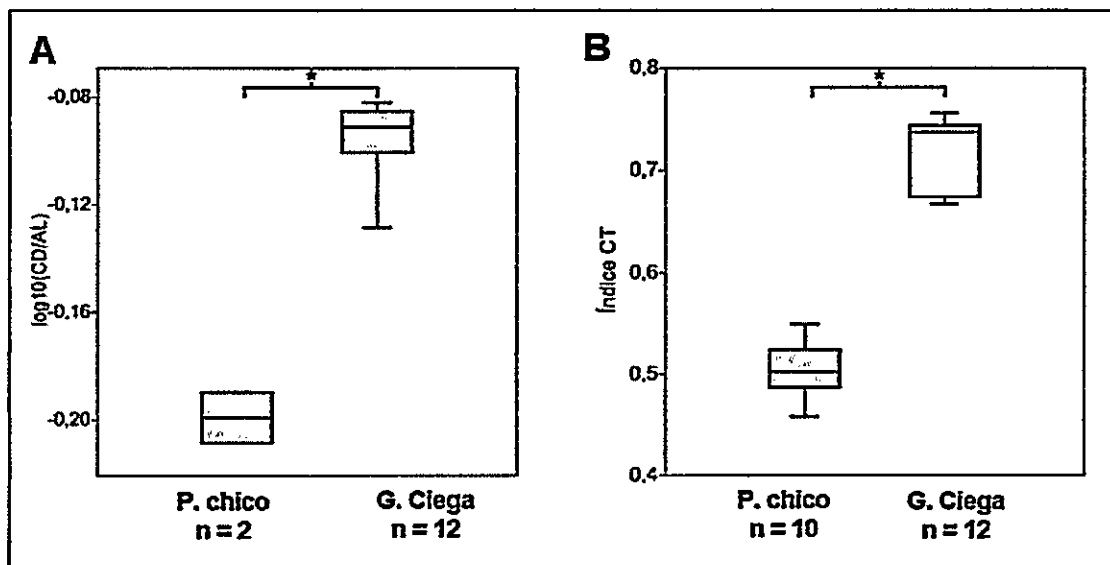
### 3. Morfometría ocular

Los resultados del análisis de la morfometría de los ojos de G. ciega y P. chico se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2: Morfometría ocular en dos especies de Strisores.**

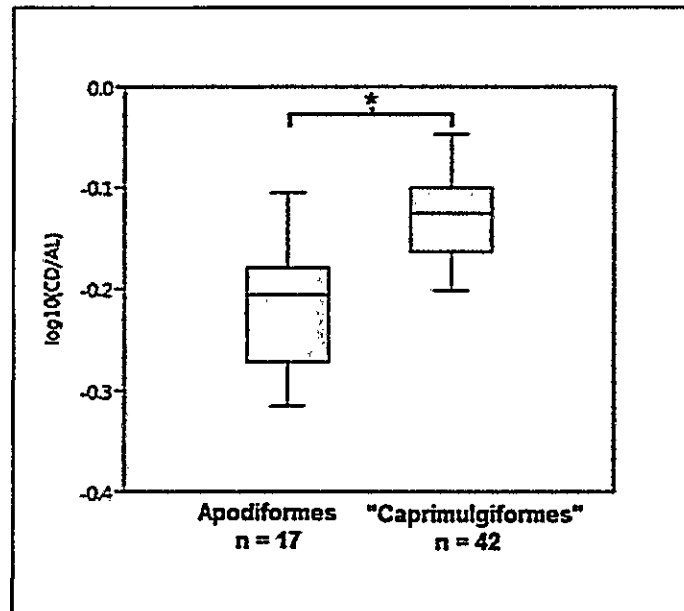
Especie	Longitud Transversal Promedio (Desv. Est.)	Longitud Corneal Promedio (Desv. Est.)	Longitud Axial Promedio (Desv. Est.)	Índice CT (T/CD) Promedio (Desv. Est.)	Índice Corneal/Axial (CD/AL) Promedio (Desv. Est.)	Índice CD/AL Promedio Normalizado (Desv. Est.)
<i>Sephanoides sephanooides</i> (n=2 AL, n=10 T-CD)	5.763 (0.160)	3.050 (0.058)	4.825 (0.035)	0.529 (0.014)	0.632 (0.026)	-0.199 (0.014)
<i>Caprimulgus longirostris</i> (n=12)	14.025 (0.857)	10.057 (0.639)	12.530 (0.745)	0.717 (0.036)	0.803 (0.019)	-0.096 (0.013)

Los valores del índice CD/AL normalizado presentan diferencias significativas entre las dos especies (Mann-Whitney,  $z=-2.045$ ,  $p=0.0409$ , Figura 10A), al igual que el índice CT, en el que se encuentra una diferencia significativa entre ambas especies (Mann-Whitney,  $z=-3.742$ ,  $p=0.00018$ , Figura 10B).



**Figura 10:** Comparación entre variables de la morfometría ocular entre el Picaflor chico (*Sephanoides sephanooides*) y la Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*). A: Índice de diámetro corneal respecto a la longitud axial (normalizado). B: Índice de diámetro corneal respecto al diámetro transversal. Los valores significativamente diferentes (Mann-Whitney,  $p<0.05$ ) se denotan por un asterisco. Boxplot (se representan los dos percentiles centrales y la mediana). Las barras indican la desviación estándar.

Al realizar comparaciones entre grupos, combinando datos obtenidos a partir de la literatura (Tabla 3) con los datos de morfometría ocular obtenidos, se tiene que existe una diferencia estadísticamente significativa de valores del índice CD/AL normalizado entre Apodiformes y "Caprimulgiformes" (Mann-Whitney,  $z=-5.27$ ,  $p=0.000000136$ , Figura 11).



**Figura 11:** Comparaciones anidadas del valor del Índice CD/AL normalizado para distintos grupos de Strisores. El asterisco denota una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). Boxplot (se representan los dos percentiles centrales y la mediana). Las barras indican la desviación estándar.

**Tabla 3:** Valores de morfometría ocular para 59 especies de Strisores, obtenidos de Hall & Ross, 2007.

Taxón	Especie	Longitud axial AL (mm)	Diámetro Comeal CD (mm)	Índice Comeal/Axial (CD/AL)	Índice CD/AL Normalizado
Aegothelidae	<i>Aegotheles insignis</i>	14,05	9,4	0,6690	-0,1745
Aegothelidae	<i>Aegotheles cristatus</i>	13,17	9	0,6834	-0,1653

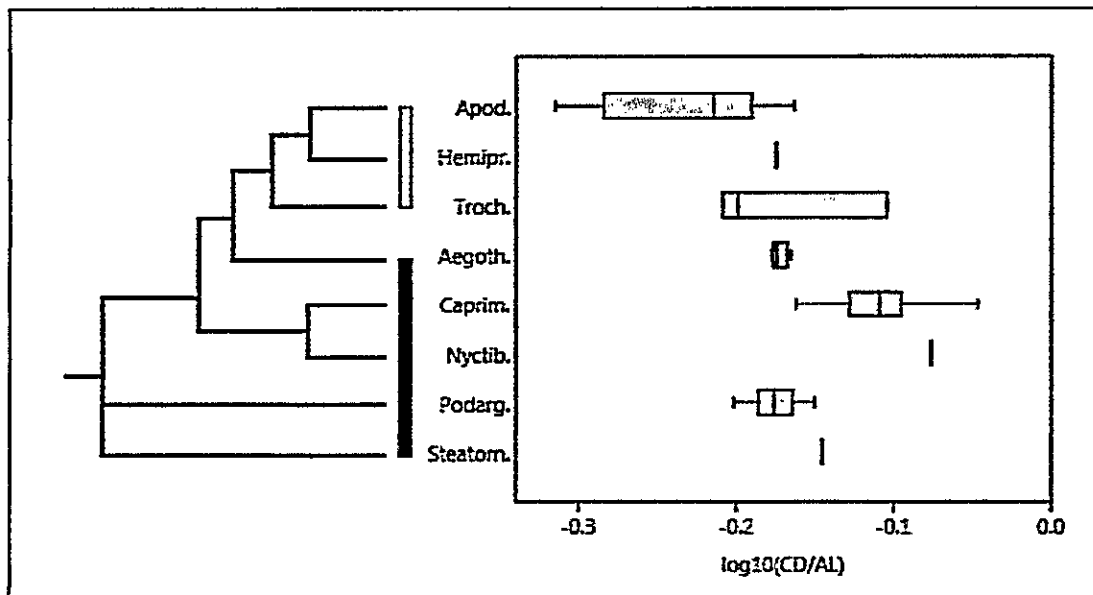
Aegothelidae	<i>Aegotheles albertisi</i>	13,1	8,7	0,6641	-0,1778
Aegothelidae	<i>Aegotheles archboldi</i>	12,4	8,3	0,6694	-0,1743
Apodidae	<i>Collocalia fuciphaga</i>	8,7	4,7	0,5392	-0,2683
Apodidae	<i>Collocalia esculenta</i>	5,9	3,9	0,6605	-0,1801
Apodidae	<i>Collocalia brevirostris</i>	7,2	4,6	0,6346	-0,1975
Apodidae	<i>Apus apus</i>	10,0	5,1	0,5070	-0,2950
Apodidae	<i>Apus barbatus</i>	10,0	6,4	0,6400	-0,1938
Apodidae	<i>Cypsiurus parvus</i>	7,6	4,6	0,6113	-0,2137
Apodidae	<i>Streptoprocne rutilus</i>	8,3	5,1	0,6091	-0,2153
Apodidae	<i>Streptoprocne phelpsi</i>	8,3	5,2	0,6271	-0,2027
Apodidae	<i>Streptoprocne zonaris</i>	13,0	7,1	0,5444	-0,2641
Apodidae	<i>Aeronautes saxatilis</i>	9,2	4,8	0,5217	-0,2825
Apodidae	<i>Hirundapus caudacutus</i>	12,8	6,2	0,4844	-0,3148
Apodidae	<i>Tachomis phoenicoba</i>	7,6	3,9	0,5132	-0,2897
Apodidae	<i>Chaetura b. brachyura</i>	7,0	4,8	0,6809	-0,1669
Apodidae	<i>Telacanthura u. ussheri</i>	8,4	5,8	0,6860	-0,1637
Caprimulgidae	<i>Lurocalis semitorquatus</i>	11,8	9,1	0,7712	-0,1128
Caprimulgidae	<i>Chordeiles pusillus</i>	9	6,7	0,7444	-0,1282
Caprimulgidae	<i>Chordeiles acutipennis</i>	11,6	8,4	0,7241	-0,1402
Caprimulgidae	<i>Chordeiles minor</i>	12,3	8,47	0,6886	-0,1620



Caprimulgidae	<i>Nyctiprogne leucopyga</i>	9,8	8,1	0,8265	-0,0827
Caprimulgidae	<i>Podager nacunda</i>	15,42	12	0,7782	-0,1089
Caprimulgidae	<i>Eurostopodus macrotis</i>	17,45	13,75	0,7880	-0,1035
Caprimulgidae	<i>Nyctidromus albicollis</i>	13,4	10	0,7463	-0,1271
Caprimulgidae	<i>Phalaenoptilus nuttalli</i>	10,8	8,5	0,7870	-0,1040
Caprimulgidae	<i>Nyctiphrynus moleodii</i>	10,3	8,1	0,7864	-0,1044
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus carolinensis</i>	16	12,7	0,7938	-0,1003
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus vociferus</i>	12,8	9,5	0,7422	-0,1295
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus nigrescens</i>	7,8	5,8	0,7436	-0,1287
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus ruficollis</i>	15,1	11,4	0,7550	-0,1221
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus indicus</i>	13,35	10,4	0,7790	-0,1084
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus europaeus</i>	11,6	9,25	0,7974	-0,0983
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus madagascariensis</i>	12	9,2	0,7667	-0,1154
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus macrurus</i>	12,95	9,02	0,6965	-0,1571
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus pectoralis</i>	10,3	8,4	0,8155	-0,0886
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus natalensis</i>	13,3	10,6	0,7970	-0,0985
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus inornatus</i>	12	9,1	0,7583	-0,1201
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus fosii</i>	12,6	8,8	0,6984	-0,1559
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus climacurus</i>	11,8	8,9	0,7542	-0,1225
Caprimulgidae	<i>Macrodipteryx longipennis</i>	11	9,1	0,8273	-0,0824

Caprimulgidae	<i>Macrodipteryx vexillarius</i>	10,8	9,7	0,8981	-0,0467
Caprimulgidae	<i>Hydropsalis climacocerca</i>	10,69	8,84	0,8269	-0,0825
Caprimulgidae	<i>Torquata brasiliana</i>	11,7	8,8	0,7521	-0,1237
Caprimulgidae	<i>Uropsalis segmentata</i>	10,8	9,5	0,8796	-0,0557
Caprimulgidae	<i>Nyctiphrynus ocellatus</i>	10,33	8,54	0,8267	-0,0826
Hemiprocnidae	<i>Hemiproctne mystacea</i>	11,4	7,6	0,6684	-0,1749
Nyctibiidae	<i>Nyctibius griseus</i>	20,4	17,1	0,8382	-0,0766
Podargidae	<i>Podargus strigoides</i>	24,57	15,45	0,6288	-0,2015
Podargidae	<i>Podargus papuensis</i>	26,25	17,9	0,6819	-0,1663
Podargidae	<i>Podargus ocellatus</i>	20,5	13,3	0,6488	-0,1879
Podargidae	<i>Batrachostomus aunitus</i>	22,4	14,9	0,6652	-0,1771
Podargidae	<i>Batrachostomus septimus</i>	16,8	11	0,6548	-0,1839
Podargidae	<i>Batrachostomus stellatus</i>	14	9,9	0,7071	-0,1505
Podargidae	<i>Batrachostomus javensis</i>	12,8	8,6	0,6719	-0,1727
Steatomithidae	<i>Steatomis caripensis</i>	15,47	11,07	0,7156	-0,1453
Trochilidae	<i>Thalurania glaucopis</i>	3,4	2,7	0,7864	-0,1044
Trochilidae	<i>Campylopterus duidae</i>	4,6	2,8	0,6184	-0,2087

Los rangos de morfometría ocular las ocho familias que componen Strisores se muestran en la Figura 12, así como sus relaciones y modos de vida. Estos rasgos sugieren una tendencia hacia la reducción del índice CD/AL normalizado en los grupos más derivados de Strisores, que poseen un modo de vida diurno.



**Figura 12:** Valores del Índice CD/AL normalizado para las 8 familias de Strisores. Las barras expresan el modo de vida (barra negra: hábitos escotópicos, barra blanca: hábitos fotópicos). Cladograma modificado de Mayr, 2010. Datos de Hall & Ross, 2007 y este estudio. Boxplot (se representan los dos percentiles centrales y la mediana). Las barras indican la desviación estándar.

#### 4. Retina (*wholemounds*).

Para ambas especies, se muestran los resultados obtenidos en un caso representativo. En la retina de la Gallina ciega, se encontró una fovea temporal ventral (más de 7500 células/mm<sup>2</sup>). La retina posee una densidad máxima estimada de Células Ganglionares Retinianas (RGC) de 10479 células/mm<sup>2</sup>, y un número total estimado de 860000 células. En el picaflor chico, se encontraron dos zonas de mayor densidad celular, en posición temporal (más de 30000 células/mm<sup>2</sup>) y medial-nasal (entre 20000 y 30000 células/mm<sup>2</sup>). La retina del picaflor chico posee una densidad máxima estimada

de Células Ganglionares Retinianas (RGC) de 48000 células/mm<sup>2</sup>, y un número total estimado de 716544 células.

La distribución de las RGC en la retina (mapas de isodensidad) se muestra en la Figura 13. En ambas especies se encontró un patrón intermedio de distribución de RGC, entre una condición de bandas horizontales y una distribución circular, aunque la Gallina ciega presenta una condición que podría acercarse a un patrón de bandas oblicuas. El largo relativo del pecten es aproximadamente tres veces mayor en el Picaflor chico que en la gallina ciega.

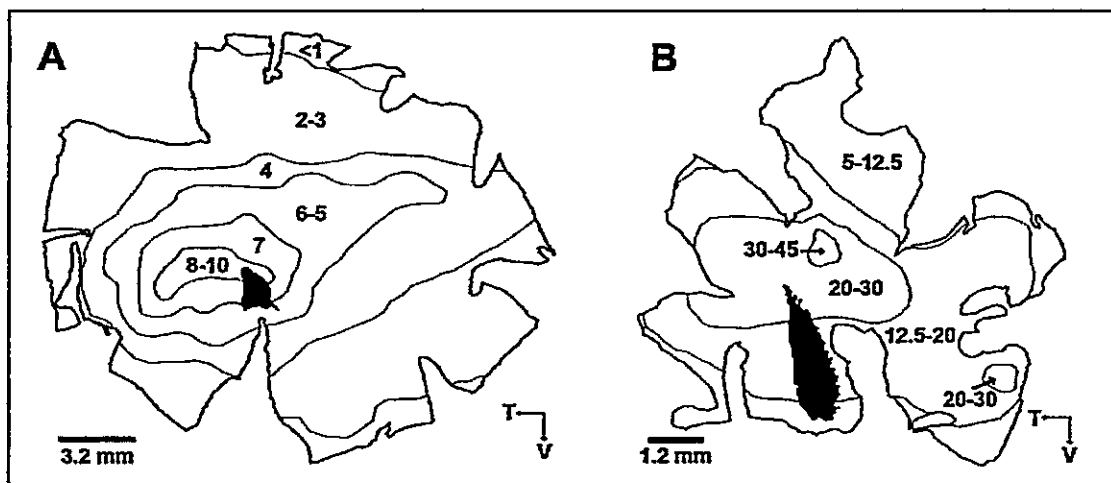


Figura 13: Mapas de distribución de Células Ganglionares Retinianas (RGC) para la retina derecha de un ejemplar representativo de Gallina ciega (A) y Picaflor chico (B). Los valores están expresados en unidades de densidad ( $10^3$  células/mm<sup>2</sup>). El contorno negro corresponde al Pecten. T: Temporal, V: Ventral.

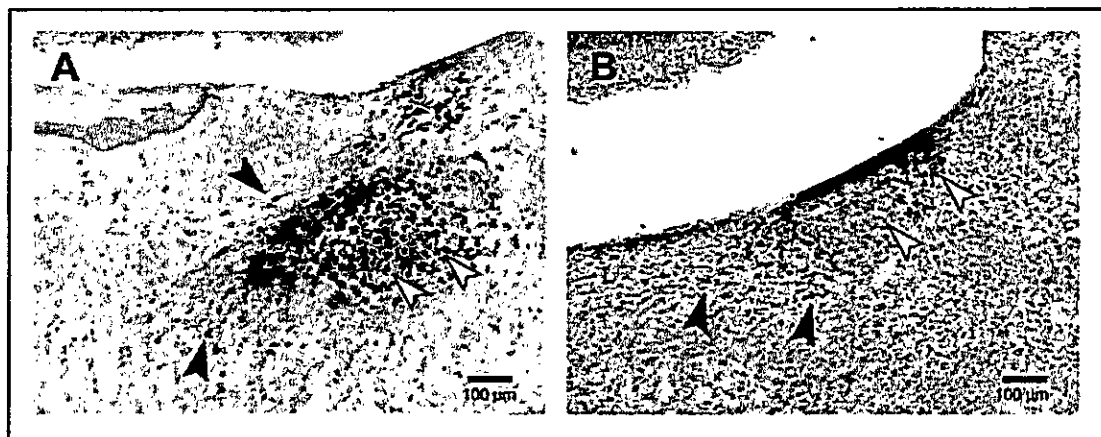
##### 5. Proyecciones visuales.

Se obtuvo migración de trazador y marca en tres ejemplares de Gallina ciega (dos de los cuales resultaron con daños en el tejido, producto de manipulaciones

posteriores) y un ejemplar de Picaflor chico (con reacción positiva, pero baja intensidad de marca). Se describen los resultados obtenidos en un ejemplar representativo de Gallina ciega, y del único caso exitoso de Picaflor chico obtenido. En ambas especies se encontraron terminales marcados con CTb en todos los núcleos previamente descritos como retinorecipientes. Se encontraron proyecciones retinianas, de forma mayoritariamente contralateral, en el Núcleo del Istmo Óptico (ION, Figura 14), Núcleo Geniculado Lateral ventral (GLv, Figura 15), Núcleo Lentiforme Mesencefálico (LM, Figura 16), Núcleos retinorecipientes del Tálamo dorsal (LdOPT y DLL, Figura 16), Núcleo Lateral Anterior Talámico (LA, Figura 16, Figura 17), Núcleo Ventrolateral Talámico (VLT), Tectal Gray (TGr), Núcleo de la Raíz Óptica Basal (nBOR), Núcleo Supraquiasmático (SCN), y en el Tectum Óptico (TeO, Figura 20, Figura 21). En un ejemplar de Gallina ciega (caso mostrado), existió una porción menor de la retina que no captó el trazador, por lo que sus proyecciones no fueron marcadas con el protocolo utilizado. Esta situación se determinó por la ausencia de marca en un creciente dentro del Tectum óptico.

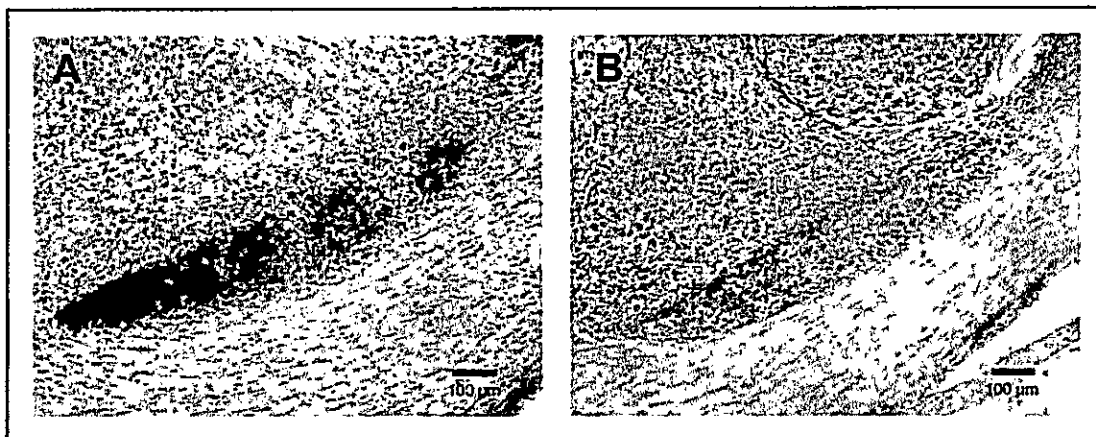
En el núcleo del Istmo Óptico (ION), ubicado en la porción posterior-dorsal del istmo, se encontraron abundantes células marcadas (Figura 14), de los dos tipos descritos para este núcleo (Repérant *et al.*, 2006): las Células Ectópicas (ECN), de somas grandes y múltiples dendritas, y las Células del Istmo Óptico, englobadas por un canastillo que exhibe abundante marca de CTb. Se encontraron Células Ectópicas en varios cortes, extendiéndose por aproximadamente 180  $\mu\text{m}$  en el sentido anterior y 60  $\mu\text{m}$  en el sentido posterior, respecto al núcleo, en la Gallina ciega, y 60  $\mu\text{m}$  en ambos sentidos en el Picaflor chico. En ambos casos se encontraron algunas Células Ectópicas ipsilaterales, siendo ésta la única proyección retiniana no decusada revelada por este

protocolo. Respecto a las categorías aplicadas en la literatura para el ION en aves (Gutiérrez-Ibáñez *et al.*, 2012), puede clasificarse el ION de ambas especies dentro de la Categoría 1 (masa oval con células homogéneamente distribuidas y con límites difusos).



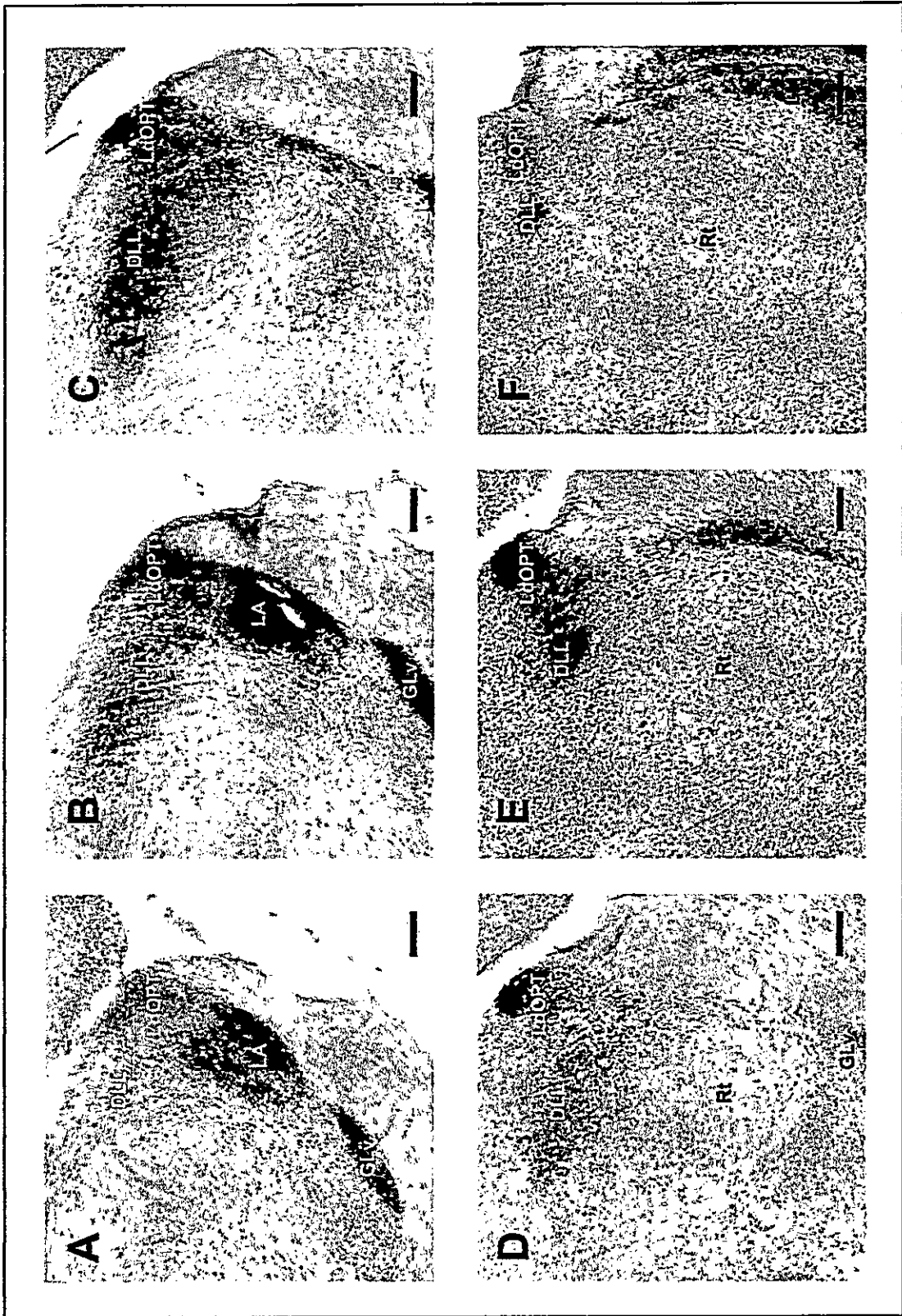
**Figura 14:** Núcleo del Istmo Óptico (ION). Inmunohistoquímica contra CTb inyectado en la retina (contratinción Nissl, A: con Níquel, B: sin Níquel). Flechas negras: Neuronas ectópicas centrifugas (ECN). Flechas blancas: Neuronas del Núcleo del Istmo Óptico (ION). A: Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*). B: Picaflor chico (*Sephanooides sephanooides*). Escala: 100 µm.

El Núcleo Geniculado Lateral (GLv) presentó marca en ambos casos (Figura 15). Sin embargo, en la Gallina ciega se presentaron múltiples franjas sin tinción, lo que sustenta la idea de una absorción incompleta del trazador a nivel retiniano. Se aprecia una lámina interna definida en el Picaflor chico, pero no en la Gallina ciega, en la que se encuentra una banda ancha y difusa de células adyacentes al límite dorsal del núcleo. El tamaño absoluto aparente del GLv es similar en ambas especies.



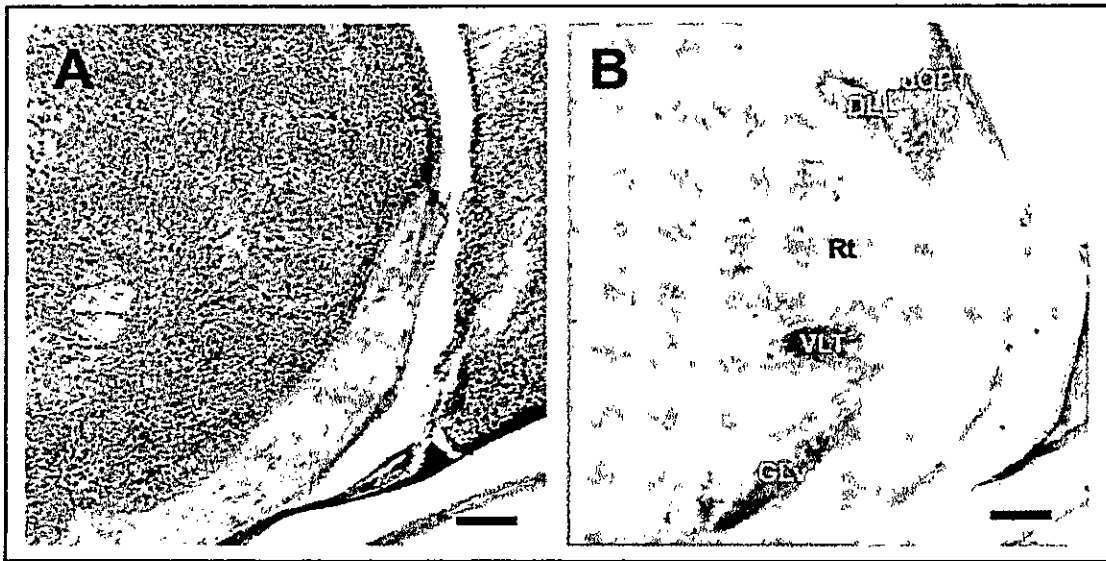
**Figura 15:** Núcleo Geniculado Lateral ventral (GLv). Inmunohistoquímica contra CTb inyectado en la retina (contratinción Nissl, A: con Níquel, B: sin Níquel). A: Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*). B: Picaflor chico (*Sephanooides sephanooides*). Escala: 100 µm.

En el caso de los núcleos del tálamo dorsal se encontraron diferencias morfológicas conspicuas entre las dos especies estudiadas. En la Gallina ciega (Figura 16) se encontraron abundantes fibras proyectando a los Núcleos del OPT (en particular, la proyección hacia el DLL). El LdOPT es denso y presenta marca muy intensa. También existe tinción densa en el núcleo Lateral anterior (LA), y algunas fibras que presumiblemente proyectan al límite lateral del DLAmc. En el Picaflor chico (Figura 17) es posible apreciar un menor tamaño de los núcleos mencionados, así como una menor densidad de marca en el LdOPT y menos proyecciones en el DLL.





**Figura 16 (Página anterior):** Anatomía de los Núcleos laterales del Tálamo de la Gallina ciega, en inmunohistoquímica contra CTb, con Níquel y contratinción Nissl. A-F: Serie de cortes en sentido rostrocaudal, con 60  $\mu$ m de separación. Escala: 200  $\mu$ m.

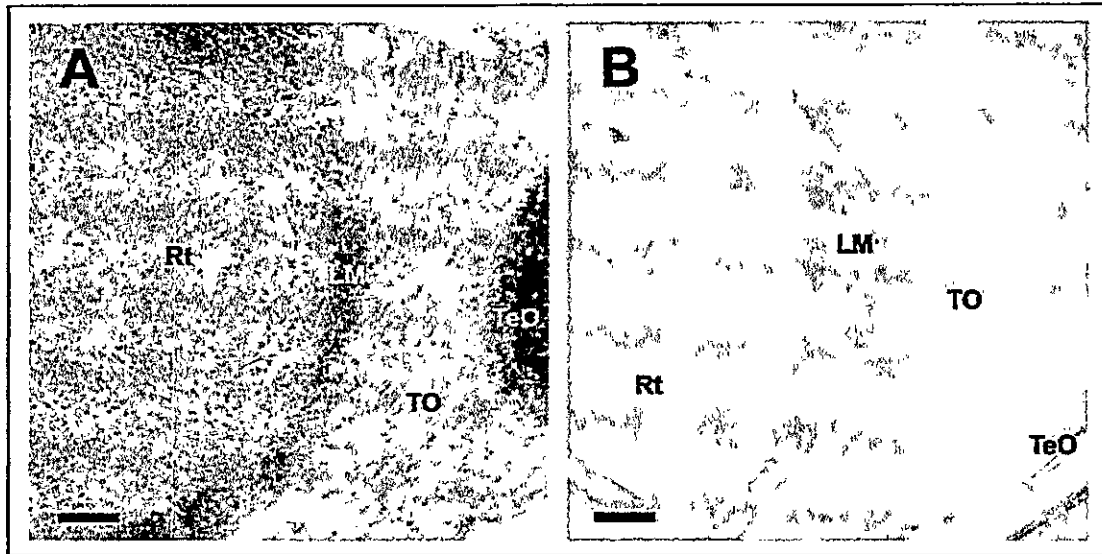


**Figura 17:** Anatomía de los Núcleos laterales del Tálamo del Picaflor chico. A: Inmunohistoquímica para CTb, sin Níquel, contratinción Nissl. B: Sin contratinción, sin Níquel. Serie de cortes en sentido rostrocaudal, con 60  $\mu$ m de separación. Escala: 200  $\mu$ m.

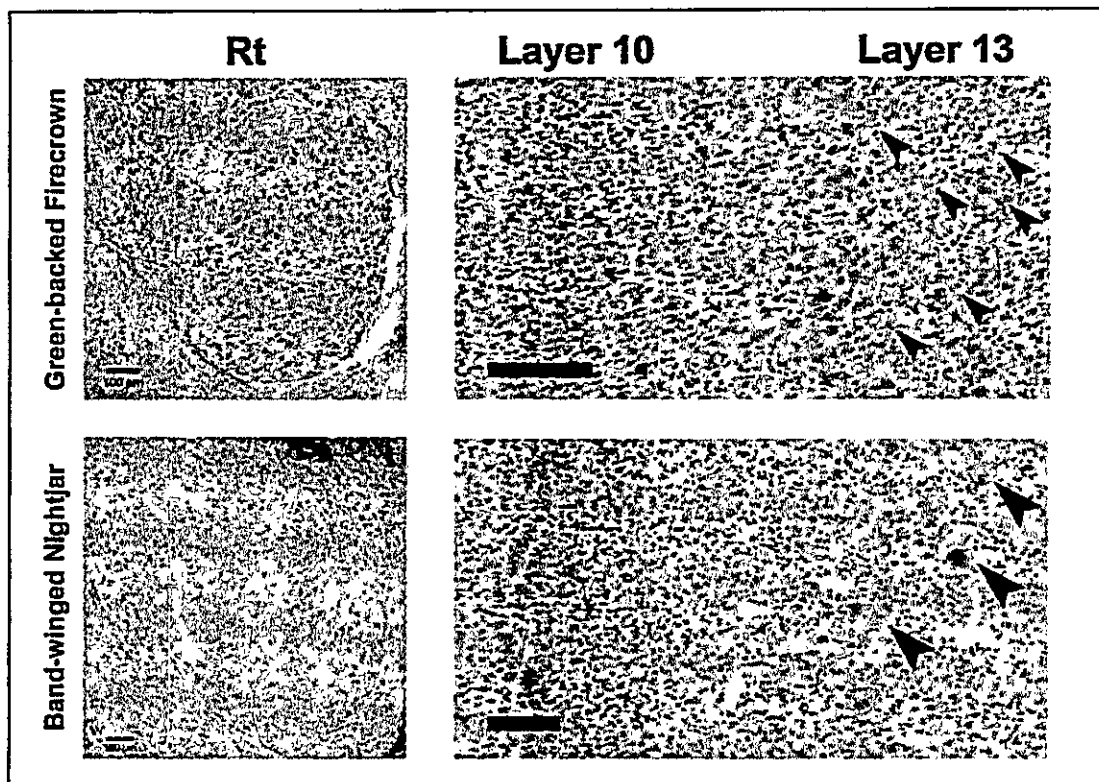
El núcleo lentiforme mesencefálico (LM) también presentaría diferencias de tamaño entre las especies analizadas (Figura 18). En el Picaflor chico, el núcleo aparenta ser más ancho que en la Gallina ciega (en cortes equivalentes).

La morfología de las capas del Tectum Óptico (TeO) no presenta grandes diferencias, salvo algunas capas. En particular, los resultados sugieren diferencias en la estructura de la Capa 13; en la Gallina ciega la Capa 13 tendría menos células TGC que

en el Picaflor chico. Además, la densidad de células en el Núcleo Rotundo aparenta ser mayor en el Picaflor chico (Figura 19).

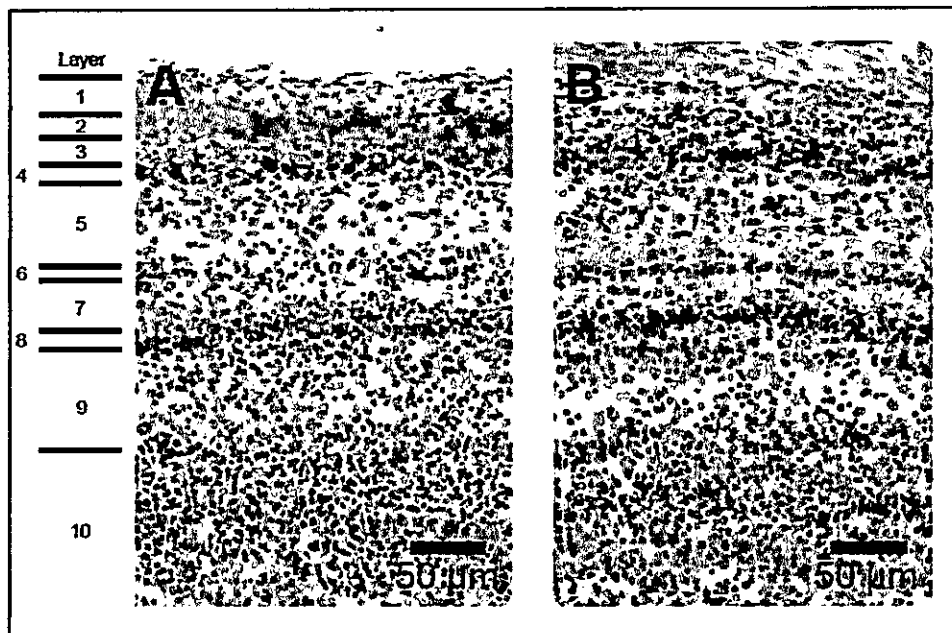


**Figura 18:** Anatomía del Núcleo Lentiforme Mesencefálico (LM), porción rostral, en la Gallina ciega (Inmunohistoquímica contra CTb, con Níquel, contratinción Nissl) y en el Picaflor chico (sin Níquel y sin contratinción). Escala: 200  $\mu$ m.

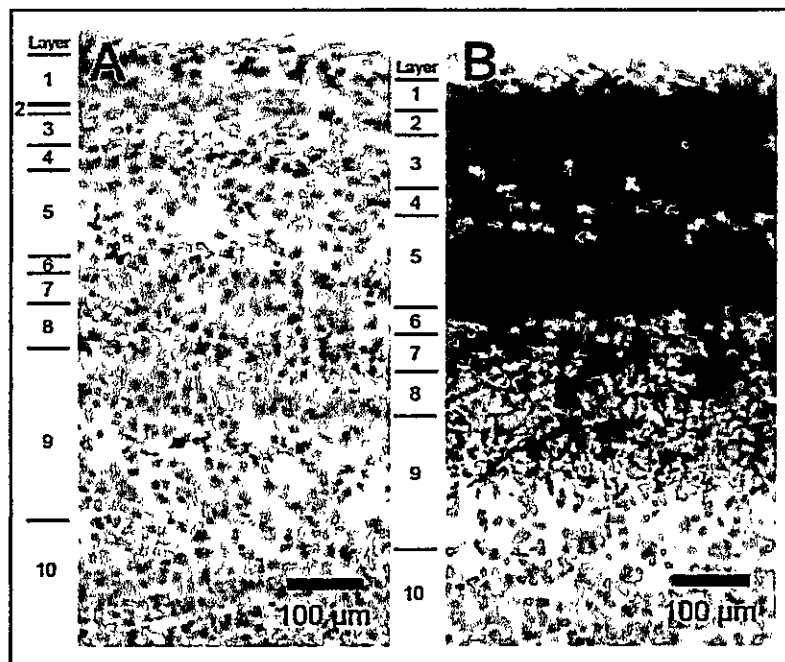


**Figura 19:** Variación inversa en la densidad celular del Núcleo Rotundo (Rt) y la Capa 13 del Tectum Óptico (TeO) en la Gallina ciega (Band-winged Nightjar) y el Picaflor chico (Green-backed Firecrown). Las flechas negras señalan la posición de las TGC. Tinción de Nissl. Escala: 100 $\mu$ m.

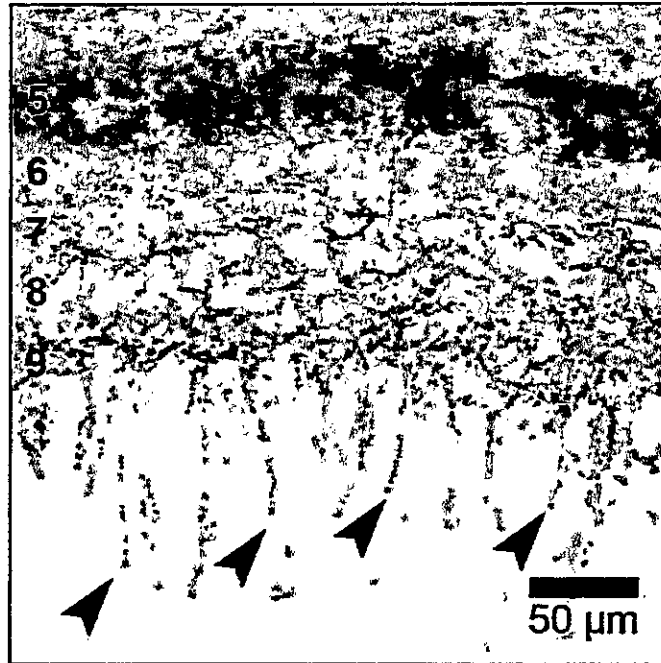
Respecto a las proyecciones retinianas, se encontraron grandes diferencias en su distribución sobre las capas retinorecipientes del TeO. En el Picaflor chico se encontraron proyecciones hacia las Capas 2-3, 4, 5 (abundante marca, salvo en la subcapa 5-a), y 7 (Figura 20). En cambio, la Gallina ciega (Figura 21) presenta, además de las proyecciones señaladas en el Picaflor chico, aferencias retinianas extremadamente inusuales, que trascienden la Capa 7, permeando la Capa 8, y llegando en gran número incluso hasta la Capa 9 (Figura 22).



**Figura 20:** Anatomía del Tectum Óptico del Picaflor chico (*Sephanoidea sephanoidea*). A: Tinción de Nissl. B: Inmunohistoquímica contra CTb inyectado en la retina (contratinción Nissl, sin Níquel). Escala: 50 µm.

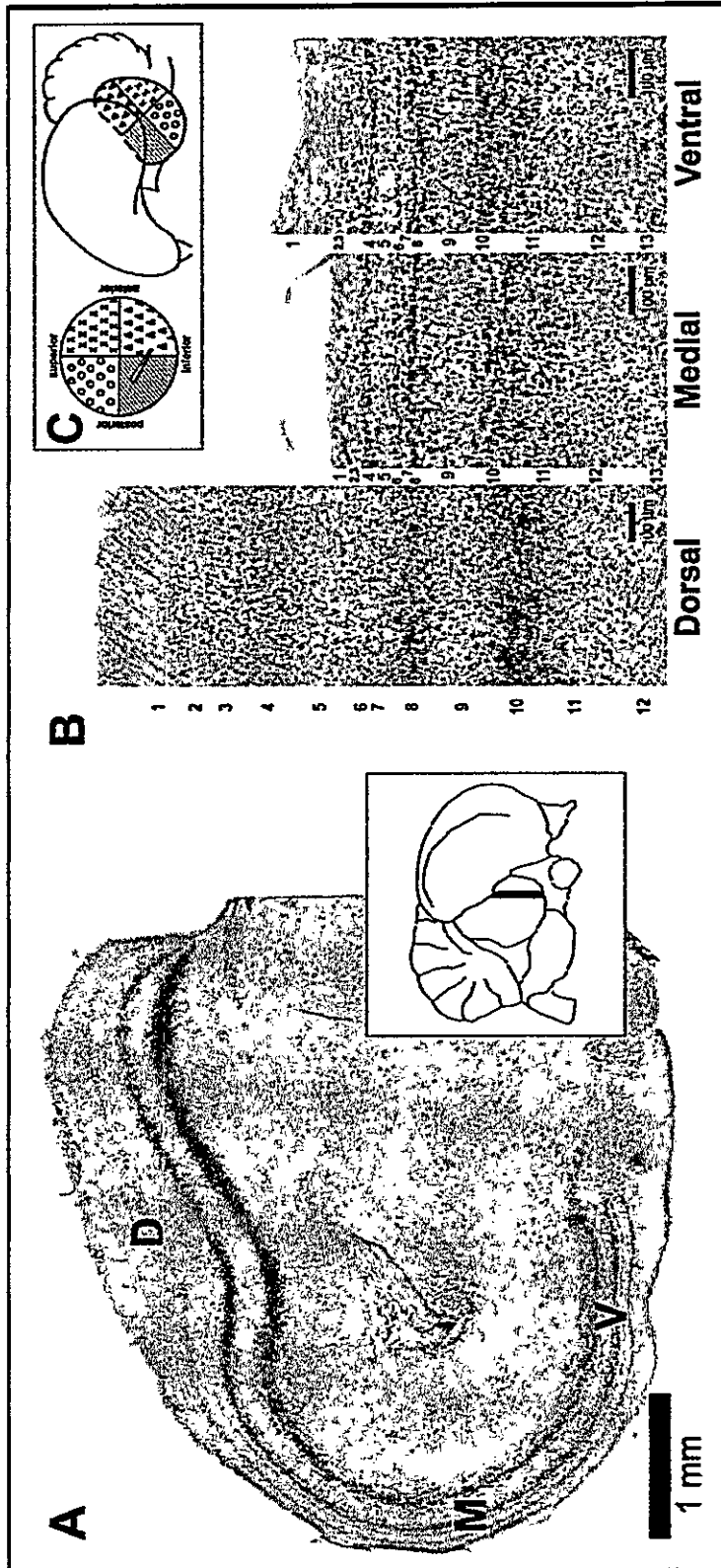


**Figura 21:** Anatomía del Tectum Óptico de la Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*). A: Tinción de Nissl. B: Inmunohistoquímica contra CTb inyectado en la retina (contratinción Nissl, con Níquel). Escala: 100 µm.



**Figura 22:** Detalle de las proyecciones retinianas profundas (más allá de la Capa 8) del Tectum Óptico en la Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*). Las flechas negras muestran algunas de las fibras que alcanzan la Capa 9. Las capas del Tectum Óptico se identifican por la numeración de la izquierda. Inmunohistoquímica contra CTb inyectado en la retina (sin contratinción Nissl, sin Níquel). Escala: 50  $\mu$ m.

Además, en la Gallina ciega, se encontró un engrosamiento dorsal del TeO, en la porción más rostral del mismo (Figura 23). Esta característica se pierde hacia cortes mediales del TeO. Además de un aumento en el ancho del TeO, se observa una pérdida de la estructura específica de cada capa (Figura 23A-B). No existen diferencias cualitativas entre el ancho de las capas en los tercios medial y ventral de la misma posición rostrocaudal (Figura 23B). La zona del TeO que presenta este rasgo correspondería aproximadamente a la zona temporal inferior de la retina (Figura 23C), según lo descrito en la literatura (Wylie *et al.*, 2009). En el Picaflor chico no se aprecia un aumento del ancho dorsal del TeO anterior.



**Figura 23:** Engrosamiento dorsal del Tectum Óptico de la Gallina ciega. A: Tinción Nissl de un corte rostral del TeO (denotado por la línea roja), D: Dorsal, M: Medial y V: Ventral. Escala: 1 mm. B: Detalle de la estructura de las capas del TeO en cada tercio. Escala: 100 µm. C: Proyecciones topográficas de la retina sobre el TeO de una Paloma, *Columba livia*. Modificado de Wyllie et al, 2006.

## 6. Estereología y estimación exploratoria de volúmenes.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos a partir de la estimación exploratoria (n = 1) de volúmenes del cerebro en las especies estudiadas.

**Tabla 4:** Estimaciones volumétricas de los núcleos visuales en dos especies de Strisores, obtenidas mediante el método de Cavalieri. En todas las estimaciones el Coeficiente de error de Gundersen es menor a 0.01.

Especie	Volumen total cerebro (mm <sup>3</sup> )	Volumen telencéfalo (mm <sup>3</sup> )	Vol. Rt (mm <sup>3</sup> )	Vol. OPT (mm <sup>3</sup> )	Vol. GLv (mm <sup>3</sup> )	Vol. E (mm <sup>3</sup> )	Vol. TeO (mm <sup>3</sup> )
<i>Sephanoides sephanooides</i> (n = 1)	190,733	63,187	0,753	0,175	0,299	1,101	13,757
<i>Caprimulgus longirostris</i> (n = 1)	706,801	216,605	1,872	2,045	0,389	8,136	40,594

En la Tabla 5 se muestran las estimaciones de volumen relativo al volumen total del cerebro en ambas especies.

**Tabla 5:** Estimación del volumen relativo de cada núcleo respecto al Volumen total del cerebro (expresado en porcentaje) para dos especies de Strisores.

Especie	Volumen telencéfalo	Rt	OPT	GLv	E	TeO	Volumen Relativo de la vía Tectofugal (Rt+E+TeO)
<i>Sephanoides sephanooides</i> (n = 1)	33,13	0,39	0,09	0,16	0,58	7,21	8,18
<i>Caprimulgus longirostris</i> (n = 1)	30,65	0,26	2,89	0,06	1,15	5,74	7,16

No se apreciarían diferencias en el volumen relativo (porcentual) del Telencéfalo. En los componentes de la vía Tectofugal se apreciaría que un mayor volumen relativo en el Picaflor chico respecto a la Gallina ciega (con la excepción del Entopallio). El caso inverso se encuentra en el OPT de la Gallina ciega, que sería más grande que en el Picaflor chico.

Al sumar los volúmenes de todos los componentes de la vía Tectofugal, se encuentra que tal volumen sería levemente mayor en el Picaflor chico (véase sección Discusión para un comentario sobre la significancia de los volúmenes mostrados).



## DISCUSIÓN

En todos los parámetros del sistema visual que se examinaron en el Picaflor chico, no se encontraron rasgos asociados a la nocturnidad. El Picaflor chico posee un campo visual binocular (frontal) muy reducido, una baja convergencia de órbita en comparación con la Gallina ciega (y los demás "Caprimulgiformes") y un índice CD/AL que cae dentro del rango de valores que pueden corresponder a aves diurnas, catamerales o nocturnas (Hall & Ross, 2007). Además, su neuroanatomía tampoco presenta rasgos nocturnos; los núcleos dorsales talámicos son pequeños y posee un Tectum Óptico y un núcleo Rotundo más grande que en la Gallina ciega, por lo que no se esperaría encontrar un sesgo hacia la vía Tálamofugal.

El único rasgo estudiado que podría sugerir alguna semejanza con un sistema visual nocturno corresponde a la topografía de las Células Ganglionares Retinianas. El Picaflor chico posee una retina con líneas de isodensidad relativamente simétricas, es decir, no posee una banda medial propia de aves que viven en condiciones fotópicas. No obstante aquello, este patrón también puede deberse a un contexto de hábitats cerrados (alta cobertura vegetal), que corresponden precisamente a los tipos de ambientes en los que habita el Picaflor chico, por lo que resulta más plausible ésta explicación a un escenario de conservación evolutiva de una morfología de tipo nocturno. Por lo tanto, ninguna de las evidencias obtenidas permite sustentar la hipótesis de conservación de la morfología nocturna en este contexto.

Los análisis anidados realizados en este estudio pueden ser insuficientes para realizar comparaciones en un contexto filogenético, ya que asumen la independencia de los parámetros estudiados en cada especie. En especies cercanas, la variación de los rasgos puede no ocurrir de forma independiente, debido a la cercanía filogenética. Por lo tanto, es necesario realizar comparaciones tomando en cuenta esta situación, mediante el uso de Métodos Comparativos Filogenéticos, PCM (Pagel, 1999; Pennell & Harmon, 2013). Sin embargo, para utilizar estas herramientas, se requiere de un muestreo más amplio, ya que la robustez de varios algoritmos de PCM es sensible a muestreos de bajo número o incompletos. Además, las relaciones filogenéticas entre varias familias de "Caprimulgiformes" sigue sin resolverse, por lo que tampoco existe un contexto filogenético claro sobre el cual realizar comparaciones. Un paso futuro puede ser ampliar el muestreo a más especies de picaflores, y comparar modelos realizados con distintas hipótesis filogenéticas sobre las afinidades de las familias que componen Strisores. Por último, no se conoce con certeza la identidad del grupo hermano de Strisores, por lo que cualquier interpretación sobre la segregación de rasgos requiere considerar este problema.

El hecho de no encontrar rasgos propios de la nocturnidad en el sistema visual del Picaflor chico, sin embargo, no resulta necesariamente en aceptar la hipótesis del origen diurno de Strisores (y la múltiple emergencia del modo de vida nocturno en las cinco familias de "Caprimulgiformes"). En los últimos años se han descrito varios casos de aves con transiciones conductuales entre regímenes de distinta luminosidad, en contextos filogenéticos de hábitos conservados. En el Kakapo, especie de loro nocturno que pertenece a un linaje de aves diurnas, Eufalconimorphae (Suh *et al.*, 2011), se describió que esta especie sólo presenta algunos de los rasgos habitualmente asociados

a la nocturnidad, por lo que posee un sistema visual intermedio, entre una morfología tipo escotópica y otra fotópica (Corfield *et al.*, 2011). Otro caso similar es el de la Gaviota de las Galápagos, de hábitos nocturnos, perteneciente a un linaje de aves mayoritariamente diurnas (Charadriiformes), pero de morfología ocular levemente distinta a una gaviota diurna (Iwaniuk *et al.*, 2010b).

Los rasgos conductuales, y sus correlatos estructurales (neurales), son extremadamente plásticos a escala filogenética (Blomberg, Garland & Ives, 2003). Es de esperar que, si puede ocurrir una transición estructural a estados intermedios a nivel de especies únicas, de manera asociada a cambios conductuales, a escala de linajes pueda darse una transición completa entre tipos de sistemas visuales. En otros términos, si hay conservación de rasgos nocturnos en una especie diurna, esta conservación puede ayudar a discernir entre hipótesis alternativas respecto a la emergencia de dichos rasgos, pero si no existe conservación, debido a la plasticidad de los rasgos estructurales sensoriales, no es posible utilizar esta situación para discutir acerca de las hipótesis filogenéticas.

Al margen de ser plausible, esta aproximación explicativa requiere dar cuenta de los casos en los que si se han conservado características asociadas a la nocturnidad en especies diurnas. Proponemos frente a esta disyuntiva que en tales casos, los rasgos nocturnos abren un nuevo espacio para la emergencia y co-opción de nuevos rasgos, conservados evolutivamente debido a nuevos modos de vida. Es el caso de la alta frontalización en primates. En este linaje, la nocturnidad propia de las formas basales trajo consigo un reordenamiento de los campos visuales, aumentando la frontalización de las órbitas como consecuencia de los fenómenos de aberración esférica. Este cambio

trajo consigo un aumento del campo visual binocular frontal, lo que combinado a la capacidad de estereopsis presente en mamíferos, y el aumento del diámetro corneal (también como consecuencia de la nocturnidad), tuvo como resultado un sistema visual capaz de percibir claves espaciales de profundidad en el campo visual frontal, y la posibilidad de poseer un incremento en la agudeza visual, resultante de los cambios de la morfología ocular. Este sistema visual, originado y explicable en un contexto nocturno, es además extremadamente útil en condiciones de alta luminosidad, lo que explicaría su conservación en los primates superiores, a pesar de la pérdida del modo de vida nocturno, como propone la hipótesis de la depredación nocturna (Heesy, 2008, 2009; Heesy & Hall, 2010).

En el linaje de Strisores, se han descrito cambios graduales en los rasgos asociados al fenómeno de la estereopsis, como el volumen y la morfología del Wulst (Iwaniuk & Wylie, 2006). Además, se ha discutido la posibilidad de estereopsis en algunas familias de este grupo, Aegothelidae y Podargidae (Pettigrew, 1986), pero no se han encontrado evidencias estructurales o conductuales de la misma, además de constatarse su ausencia en Steatomithidae (Pettigrew & Konishi, 1984). Por lo tanto, si bien en estos grupos existe un aumento en la convergencia binocular, tal como en la Lechuza y en los Primates, la ausencia de la estereopsis dificultaría la emergencia de un sistema visual de depredación nocturna del mismo tipo que el presente en primates, por lo que no existiría el fenómeno de co-opción, y sería factible una reversión rápida hacia un sistema visual de tipo diurno, como el que se encuentra en los grupos derivados en Strisores (picaflores, vencejos arborícolas y vencejos).



No obstante lo descrito hasta ahora, los resultados obtenidos al segregar los valores del índice CD/AL normalizado respecto a la filogenia sugieren una tendencia correspondiente a la reducción del índice en especies más derivadas de Strisores, de hábitos diurnos. Esta idea sería congruente con la historia de transformaciones evolutivas en el linaje estudiado, pero se requiere de una evaluación más cuidadosa, respecto al contrastar el posible origen de la semejanza y variación por efecto de la cercanía filogenética (mediante el uso de PCM), además de las restricciones propias del muestreo limitado, ya que por ejemplo, se cuenta con datos para tres especies de picaflores (con un dato proveniente de este estudio), para un total de 338 especies.

Resulta de especial necesidad la realización de un estudio comparado de la morfología de las vías visuales en todo el linaje de Strisores, que posea un muestreo amplio y sistemático. Si bien existen estudios en las especies que componen el grupo, no se ha abordado la condición de monofilia del mismo, por lo que deben compararse los rasgos neuroanatómicos de Strisores en esa perspectiva. A nuestro conocimiento, este trabajo es el primero que aborda aquella situación, pero la naturaleza restringida del muestreo y el carácter exploratorio del trabajo requieren complementarlo con un análisis de otras especies, para poder afirmar o descartar con mayor certeza las distintas hipótesis sobre la aparición del modo de vida nocturno en Strisores.

Para múltiples comparaciones e inferencias, este trabajo se apoya en resultados obtenidos a partir de un rango muestral restringido o único ( $n = 1$ ). Sin embargo, en el contexto de los estudios en neuroanatomía comparada, esta situación ocurre en estudios que describen animales exóticos o de difícil obtención, como especies amenazadas, o especies logísticamente complejas de capturar y manipular (Corfield *et al.*, 2011). El

valor de tales resultados debe interpretarse cuidadosamente, asumiendo que deben confirmarse con una futura ampliación del muestreo. No obstante, al existir elementos congruentes entre varios experimentos independientes, nuestros resultados aparentemente no se ven socavados por el efecto de la variabilidad individual.

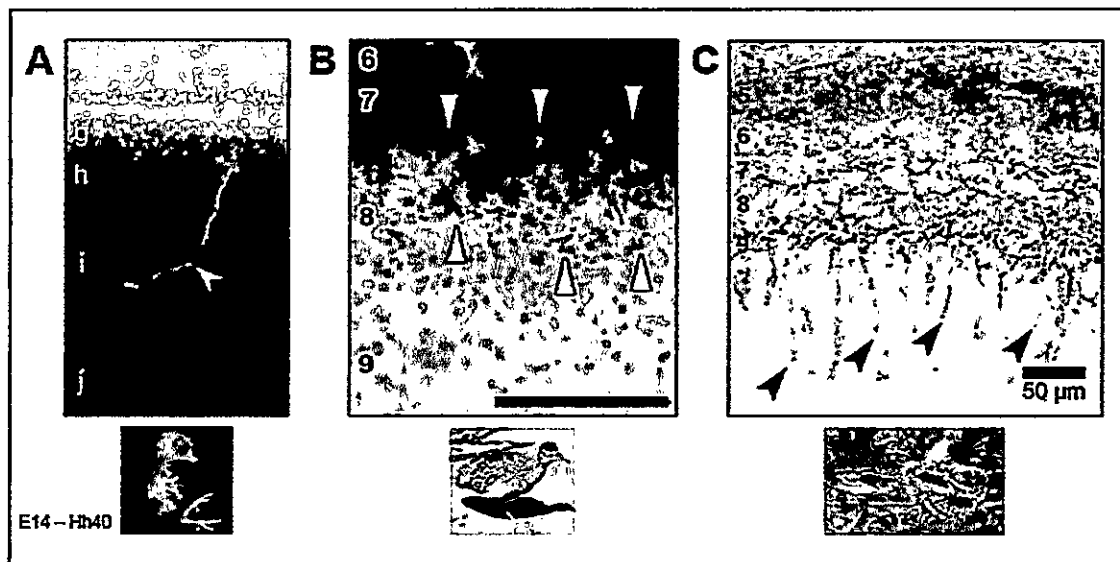
Otro aspecto interesante es interpretar la descripción de cada sistema visual estudiado y los resultados obtenidos, no en un contexto filogenético, sino que en la perspectiva del modo de vida de cada especie.

En el picaflor chico se encontró un grado de binocularidad mucho menor al esperado para una especie que depende fuertemente del sistema visual en su alimentación. Debido a su modo de obtener alimento, orientando la posición del pico con la apertura de las flores de manera frontal, sería razonable esperar un aumento de la zona binocular frontal. Si bien se encontró tal situación, la magnitud de la misma es baja (aproximadamente 2°-4° de convergencia fuera de la zona adyacente al pico, y 10° en la zona cercana al pico). Este resultado puede deberse al bajo tamaño absoluto de los ojos del picaflor, además de la orientación relativamente lateral de sus órbitas. No obstante, no debe descartarse la posibilidad de artefactos en la medición de los campos visuales, derivadas de la enorme dificultad que presenta la campimetría en especies pequeñas, lo que explica en parte la ausencia de descripciones de los campos visuales de picaflores hasta la fecha (Graham R. Martin, comunicación personal). La magnitud de los campos visuales binoculares es comparable a especies que dependen poco del sistema visual para capturar alimento, de campos visuales de tipo 2, como algunos Anseriformes y Apterygiformes (Martin, 2007). Sin embargo, la morfología de los campos visuales del Picaflor chico no se ajusta de manera precisa a la categorización de Martin,

ya que las aves que poseen campos visuales de tipo 2 no poseen el pico en la zona de máxima convergencia binocular, por lo que probablemente sea necesaria una nueva categoría para los campos visuales de los picafloros. Otro aspecto relevante del sistema visual del Picaflor chico es la distribución de las zonas de máxima densidad de RGC en la retina. Además de encontrarse una zona de gran densidad en posición medial (que recibe el flujo visual desde el centro del campo visual, es decir, desde zonas laterales del espacio), la retina presenta una zona de leve aumento de densidad celular en posición nasal, que proyectaría hacia campos visuales posteriores. La interpretación de éste rasgo resulta difícil. En primer lugar, podría darse el caso de que existiera una distribución continua entre aquella zona y la zona de densidad equivalente en posición medial, la que puede haber sido eclipsada por un artefacto en la preparación. Otra situación alternativa pero equivalente es que aquella zona de densidad incrementada sea en sí misma un artefacto en la preparación. La retina del picaflor, al ser de pequeño tamaño, fue muy difícil de preparar, y se presentaron algunas zonas con pliegues, por lo que se requiere una evaluación de nuevas muestras para confirmar la presencia de esta fovea putativa.

Los rasgos más interesantes se encontraron en el sistema visual de la Gallina ciega. En primer lugar, se encontraron proyecciones retinianas nunca antes descritas para aves adultas (proyecciones a la capa 9). Se ha descrito que en todas las aves adultas, las proyecciones retinianas llegan hasta la capa 7 del Tectum Óptico. En embriones de pollo (E14, Hh40), existen proyecciones transitorias hacia la capa 8 (Figura 24A), que rápidamente degeneran, y no se encuentran en el adulto (Omi, Harada & Nakamura, 2011). Sin embargo, en el sistema visual de la Perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*) recientemente se describieron proyecciones que trascienden la Capa 7

(Figura 24B), y llegan hasta la Capa 8 (Krabichler *et al.*, 2015). La magnitud y extensión de las proyecciones retinianas en el TeO de la Gallina ciega trasciende ambos casos (Figura 24C). Las consecuencias funcionales de esta característica son extremadamente difíciles de determinar, ya que se conoce muy poco acerca del rol de la Capa 9 en los fenómenos visuales, por lo que se requiere examinar de forma sistemática la conectividad de aquella capa para poder interpretar el rol de las proyecciones profundas retinianas en el sistema visual de la Gallina ciega.

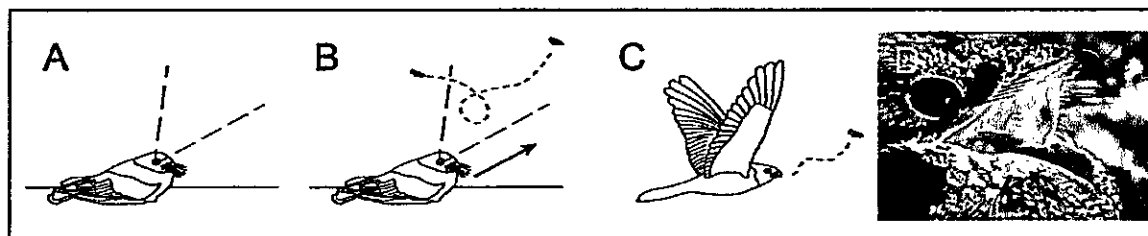


**Figura 24:** Comparación entre la morfología de las proyecciones profundas (más allá de la Capa 9), en tres especies de aves. A: Embrión de pollo (*Gallus gallus*, estadio Hh40), modificado de Omi *et al.*, 2011. . B: Perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*), modificado de Krabichler *et al.*, 2015. C: Gallina ciega (*Caprimulgus longirostris*), este estudio.

Otra característica importante encontrada en la Gallina ciega es la coherencia entre la morfología retiniana, la posible especialización dorsal del TeO y los campos visuales. Por una parte, se determinó la presencia de una fovea temporal-ventral en la retina de la Gallina ciega. Además, se encontró que el campo visual binocular tiene una posición frontal dorsal, por lo que esta zona del campo visual se proyecta sobre la retina temporal ventral. Según la conectividad de las proyecciones retinianas descritas en otras



aves (Wylie *et al.*, 2009), las células ganglionares de la retina temporal ventral proyectan hacia la zona anterior dorsal del TeO, siendo precisamente esta zona la que presenta un conspicuo engrosamiento. Proponemos que la razón de la variación coherente de estas tres características tiene relación con el modo de alimentación de la Gallina ciega (Figura 25). Desde el suelo o una percha de elevación baja, la Gallina ciega espera hasta observar una presa (insectos voladores nocturnos), comenzando así una persecución aérea, que concluye con la captura de la presa con la ancha apertura oral propia de este grupo (Jackson, 2003). Encontramos que los campos visuales binoculares de la Gallina ciega corresponden a la zona del espacio donde ocurre el movimiento de las presas que desencadenan la conducta depredatoria, lo que sería congruente con los rasgos anatómicos descritos. Incluso es posible plantear un posible rol de la especialización tectal en el fenómeno atencional asociado a la detección del movimiento de la presa, para lo que se requiere un estudio acabado de la conectividad del TeO con los núcleos ístmicos en los que se ha propuesto un rol sobre el fenómeno atencional (Marín *et al.*, 2012).



**Figura 25:** Modo de alimentación de la Gallina ciega. A-C: secuencia de eventos en la captura de presas (explicación en el texto). D: Morfología de la apertura mandibular en las Gallinas ciegas.

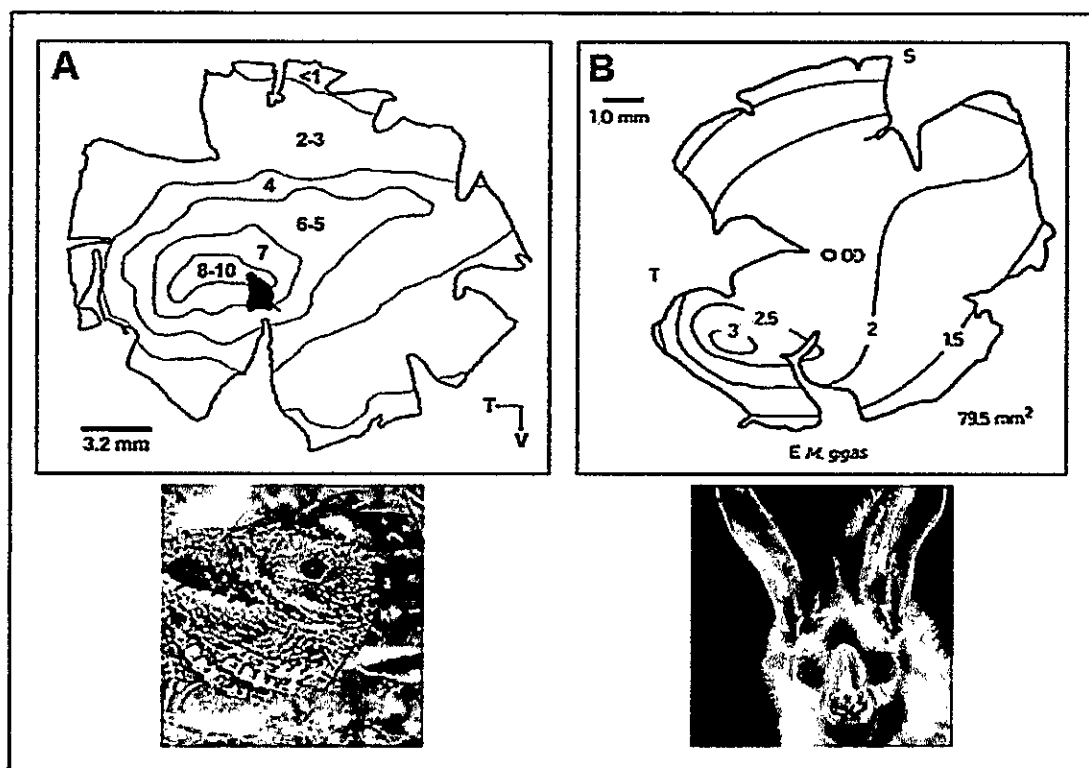
El engrosamiento encontrado en el tercio dorsal del TeO anterior de la Gallina ciega es una característica conspicua, que no ha sido descrita en detalle, pero sí ha sido observada en otras especies de aves, aunque no en la magnitud encontrada en esta

especie (Andrew N. Iwaniuk, comunicación personal). Esta característica podría deberse a un artefacto derivado del plano de corte tangencial sobre una porción esférica. Sin embargo, afirmamos que este no sería el caso, ya que el perímetro del TeO no presenta variaciones a lo largo del eje dorsoventral, como si se observa en otros pliegues del TeO. No obstante, es necesario corroborar esta característica utilizando otros planos de corte (en particular, el plano sagital).

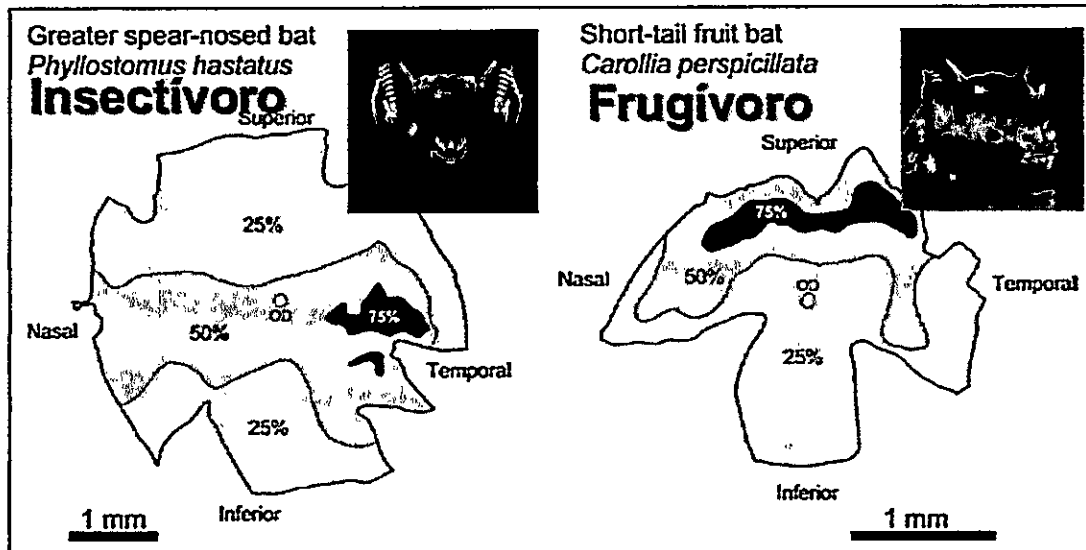
El campo visual binocular máximo de la Gallina ciega es mayor que en el único representante de Caprimulgidae descrito, el Pauraque (Martin *et al.*, 2004a), su orientación orbital también es mayor que varios "Caprimulgiformes" (Iwaniuk *et al.*, 2008; Menegaz & Kirk, 2009). Estos rasgos, sumados a la especialización de los núcleos dorsolaterales talámicos, sugiere la necesidad de reevaluar la presencia de estereopsis en este grupo. Además, es necesario estudiar la morfología del hiperpalio dorsal (Wulst), lo que no fue posible con las técnicas empleadas en este trabajo.

Respecto a la distribución de las Células Ganglionares en la Retina de la Gallina ciega, no existe un patrón como el encontrado en aquella en ninguna otra ave descrita hasta el momento. Sin embargo, en otros grupos se ha descrito una distribución de RGC similar. En particular, se ha mostrado que en cierto tipo de murciélagos microquirópteros (aquellos que son insectívoros y no dependen exclusivamente de la ecolocalización para capturar la presa, sino que utilizan claves visuales), también existe un patrón de bandas anchas oblicuas (Pettigrew *et al.*, 1988), de forma similar a la Gallina ciega (Figura 26). Además, se ha descrito que este patrón podría estar relacionado a la insectivoría, como se muestra en un caso de dos especies de murciélagos de la familia Phyllostomidae (Figura 27), de apariencia semejante, pero con estrategias de forrajeo diferentes

(insectivoría versus frugivoría), apareciendo el patrón de bandas oblicuas solo en la especie insectívora (Heffner, Koay & Heffner, 2007). Por último, se ha mostrado que en el Colículo superior de los murciélagos insectívoros (el homólogo putativo del Tectum Óptico en mamíferos), existe una mayor prevalencia de las capas profundas respecto a las capas superficiales (Eklöf, 2003), siendo las primeras aquellas que reciben proyecciones de múltiples modalidades sensoriales (visuales y auditivas), cuya eventual relación con las proyecciones visuales profundas (Capa 9) de la Gallina ciega sería una interesante ruta de investigación. Todos estos elementos sugieren fuertemente un fenómeno de convergencia estructural y conductual entre ambos grupos, además de la posible existencia de un patrón propio de la insectivoría aérea nocturna entre distintos linajes.



**Figura 26:** Comparación entre la distribución de RGC en la Gallina ciega (A) y un Murciélago Microquiróptero (*Macroderma gigas*, Megadermatidae). A: Este estudio. B: Modificado de Pettigrew et al, 1988.



**Figura 27:** Comparación entre la distribución de RGC en dos especies de murciélagos de la familia Phyllostomidae, que difieren en su modo de alimentación. Modificado de Hefner et al, 2007.

Por otra parte, el campo visual binocular de la Gallina ciega se encuentra en una posición dorsal. En los campos visuales ventrales laterales, no existe representación binocular. Es en esta zona del campo visual donde se encuentra una de las características más conspicuas de la Gallina ciega, la presencia de Cerdas Rostrales (*Rictal Bristles*, Figura 7A-B). Estas largas plumas nacen desde el borde maxilar y se orientan de forma lateral ventral. Se ha propuesto que estas cerdas poseen un rol sensorial, lo que ha sido descrito en otras especies (Lederer, 1972; Cunningham, Alley & Castro, 2011), pero no en Caprimúlgidos. El hecho de que en la Gallina ciega se orienten hacia una zona sin cobertura binocular sugiere un rol sensorial complementario de las Cerdas Rostrales en esta especie, lo que debe ser corroborado con una descripción histológica (presencia de mecanorreceptores, como Corpúsculos de Herbst

y tamaño de núcleos sensoriales faciales, como el Núcleo Principal del Nervio Trigémico, PrV) y fisiológica.

Al comparar ambas especies directamente, los resultados sugieren una relación entre la densidad celular del Núcleo Rotundo (Rt) y la Capa 13 del Tectum Óptico. En el Picaflor chico, existiría una gran densidad de células en el Rt, y múltiples células TGC en la capa 13, encontrándose el caso contrario en la Gallina ciega, que además presentaría células de un diámetro mayor que aquellas del Picaflor chico. Respecto a los volúmenes relativos del Núcleo Rotundo en ambos casos, se aprecia que en el Picaflor chico el mismo sería levemente mayor. Estas relaciones sugieren un fenómeno que debe ser cuantificado estadísticamente, con un muestreo mayor. Funcionalmente, es posible interpretar esta diferencia con respecto a una mayor importancia relativa de la vía Tectofugal, y en particular, de las conexiones entre el Núcleo Rotundo y el Tectum Óptico, en el Picaflor chico. Existe una segregación en las proyecciones desde el TeO hacia el Rt, relacionada a propiedades fisiológicas de distintos tipos de TGCs (Marín *et al.*, 2003; Wylie *et al.*, 2009), de tal forma que un posible paso a seguir es estudiar en detalle la citoarquitectura de éstas células, clasificarlas, y realizar inferencias sobre su fisiología, además de analizar si las diferencias en densidad corresponden a ciertos tipos de TGCs o es homogénea.

Respecto al volumen relativo al tamaño total del cerebro de los núcleos del sistema visual, si bien los resultados son coherentes con las demás características del sistema visual descritas anteriormente (con la notable excepción del menor volumen del Entopallio en el Picaflor chico, aspecto que debe ser corroborado, y el gran volumen relativo del GLv en la misma especie), el insuficiente número de réplicas impide realizar

afirmaciones absolutas, por lo que presentamos estos datos como una primera aproximación a la descripción cuantitativa de los volúmenes en ambas especies. Este trabajo, por su naturaleza exploratoria, debe analizarse desde una perspectiva cualitativa más que cuantitativa.

La morfología del Núcleo del Istmo Óptico (ION) es similar en ambas especies, según las categorías descritas en la literatura (Gutiérrez-Ibáñez *et al.*, 2012). Se han planteado diversas hipótesis acerca del rol funcional del sistema centrifugal (del cuál el ION es parte), el que sigue siendo desconocido. Entre otros, se ha propuesto que el ION está involucrado en el forrajeo visual (picoteo) de aves granívoras (Miceli *et al.*, 1999), en la detección de sombras en el suelo, correspondientes al paso de depredadores aéreos (Wilson & Lindstrom, 2011), y el control atencional selectivo entre el hemisferio dorsal y ventral de la retina (Gutiérrez-Ibáñez *et al.*, 2012). En este último trabajo, se examinan varias especies de picaflors, que presentan una morfología del ION muy similar a la encontrada en el Picaflor chico, pero se muestra que la única especie de Caprimúlgido estudiado, el Chotacabras manchado (*Eurostopodus argus*) no posee ION distinguible (Categoría 0). Los autores señalan que las aves que capturan presas en vuelo presentan una ausencia o reducción del ION, y que la ausencia del mismo en *Eurostopodus* confirma la hipótesis de transición dorsoventral, ya que predadores activos, que se alimentan lejos del sustrato, no necesitan realizar transiciones rápidas entre el hemisferio dorsal de la retina (que cubre el campo visual ventral, donde se encuentra el sustrato) y el hemisferio ventral (campo dorsal, que cubre el cielo). Nuestros resultados muestran que el ION no está ausente en todos los "Caprimulgiformes", por lo que tal confirmación debe reexaminarse, ya que en la Gallina ciega (depredador de insectos en vuelo), existe un ION comparable al de un Búho o una Rapaz. No obstante,

sólo se da un paso de aumento de complejidad en "Caprimulgiformes" (Categoría 0 en Eurostopodus frente a Categoría 1 en nuestro estudio), por lo que no es posible descartar la hipótesis mencionada.

El número de RGC en ambos casos se encuentra dentro de rangos esperables, ya que en el Picaflor chico existe un mayor número máximo de RGC que en la Gallina ciega. Esta situación es congruente con lo descrito en la literatura (Iwaniuk *et al.*, 2010a), en la que se tiene que aves diurnas poseen más RGC que aves nocturnas. La Gallina ciega presenta un número absoluto de RGC mayor que el Picaflor chico debido a su mayor superficie retiniana.

Por último, el estudio de las proyecciones retinianas, que reveló la morfología del Núcleo Lentiforme mesencefálico (LM) en ambas especies, sugiere un mayor volumen del mismo en el Picaflor chico. Esta situación sería congruente con lo descrito en la literatura, ya que se ha señalado que existe una hipertrofia del LM en el grupo de los Picaflores, como consecuencia del control visual en el fenómeno del vuelo estacionario (Iwaniuk & Wylie, 2007).

En conclusión, los resultados obtenidos no permiten sostener la hipótesis de la conservación de rasgos nocturnos en aves diurnas, en el contexto de este linaje. Respecto a las hipótesis sobre el origen de la nocturnidad en Strisores, en base a los resultados obtenidos, no es posible favorecer ninguna de las dos explicaciones alternativas (origen único versus origen múltiple). Se requieren estudios más amplios para responder esta pregunta. Por otra parte, el sistema visual del Picaflor chico presenta rasgos típicos de un ave diurna. En el caso de la Gallina ciega, se encontraron múltiples

rasgos nocturnos, además de otros rasgos novedosos, cuyo rol funcional deberá ser explorado con otras técnicas anatómicas y fisiológicas. Resulta necesario ampliar el muestreo, y emplear Métodos Comparativos Filogenéticos (PCM) para evaluar el efecto de la similitud originada por cercanía filogenética.

En definitiva, es necesario continuar con los estudios del sistema visual en Strisores, y complementario con el estudio de otros rasgos, para lograr comprender la historia de las radicales transformaciones que ocurrieron en este linaje de aves.



## BIBLIOGRAFÍA

- Altshuler, D. & Dudley, R. (2002). The ecological and evolutionary interface of hummingbird flight physiology. *J. Exp. Biol.* **205**, 2325–2336.
- Ankel-Simons, F. & Rasmussen, D.T. (2008). Diurnality, nocturnality, and the evolution of primate visual systems. *Am. J. Phys. Anthropol. Suppl* **47**, 100–117.
- Blomberg, S.P., Garland, T. & Ives, A.R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution (N. Y.)* **57**, 717–745.
- Cobb, S. (1962). Notes on the Brain of the Hummingbird. *Arch. Neurol.* **57–62**.
- Coimbra, J.P., Marceliano, M.L.V., Andrade-da-Costa, B.L.D.S. & Yamada, E.S. (2006). The retina of tyrant flycatchers: topographic organization of neuronal density and size in the ganglion cell layer of the great kiskadee *Pitangus sulphuratus* and the rusty margined flycatcher *Myiozetetes cayanensis* (Aves: Tyrannidae). *Brain. Behav. Evol.* **68**, 15–25.
- Coimbra, J.P., Trévia, N., Marceliano, M.L.V., da Silveira Andrade-Da-Costa, B.L., Picanço-Diniz, C.W. & Yamada, E.S. (2009). Number and distribution of neurons in the retinal ganglion cell layer in relation to foraging behaviors of tyrant flycatchers. *J. Comp. Neurol.* **514**, 66–73.
- Corfield, J.R., Gsell, A.C., Brunton, D., Heesy, C.P., Hall, M.I., Acosta, M.L. & Iwaniuk, A.N. (2011). Anatomical specializations for nocturnality in a critically endangered parrot, the Kakapo (*Strigops habroptilus*). *PLoS One* **6**, e22945.
- Cotton, P.A. (1996). Body size and ecology of hummingbirds. In *Symposia of the Zoological Society of London*: 239–258.
- Craigie, E. (1928). Observations on the brain of the humming bird (*Chrysolampis mosquitos* Linn. and *Chlorostilbon caribaeus* Lawr.). *J. Comp. Neurol.* **45**, 378–440.
- Craigie, E. (1932). The cell structure of the cerebral hemisphere of the humming bird. *J. Comp. Neurol.* **56**, 135–168.
- Cunningham, S.J., Alley, M.R. & Castro, I. (2011). Facial bristle feather histology and morphology in New Zealand birds: implications for function. *J. Morphol.* **272**, 118–28.
- Curé, M. & Palacios, A.G. (2009). Do hummingbirds see in ultraviolet? *Open Med. Inform. J.* **3**, 9–12.

- Ebinger, P. (1995). Domestication and plasticity of brain organization in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Brain. Behav. Evol.* **45**, 286–300.
- Eklöf, J. (2003). *Vision in echolocating bats*. Göteborg University.
- Ericson, P.G.P., Anderson, C.L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U.S., Källersjö, M., Ohlson, J.I., Parsons, T.J., Zuccon, D. & Mayr, G. (2006). Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biol. Lett.* **2**, 543–547.
- Gould, J. (1861). *An introduction to the Trochilidae, or family of humming-birds*. London: Taylor and Francis.
- Gundersen, H. & Jensen, E. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction\*. *J. Microsc.* **147**, 229–263.
- Gutiérrez-Ibáñez, C., Iwaniuk, A.N., Lisney, T.J., Faunes, M., Marín, G.J. & Wylie, D.R. (2012). Functional implications of species differences in the size and morphology of the isthmo optic nucleus (ION) in birds. *PLoS One* **7**, e37816.
- Gutiérrez-Ibáñez, C., Iwaniuk, A.N., Lisney, T.J. & Wylie, D.R. (2013). Comparative study of visual pathways in owls (Aves: Strigiformes). *Brain. Behav. Evol.* **81**, 27–39.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C. & Yuri, T. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* **320**, 1763–1768.
- Hailman, J. (1964). The Galapagos swallow-tailed gull is nocturnal. *Wilson Bull.* **76**, 347–354.
- Hall, M., Kamilar, J. & Kirk, E. (2012). Eye shape and the nocturnal bottleneck of mammals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**, 4962–4968.
- Hall, M. & Ross, C. (2007). Eye shape and activity pattern in birds. *J. Zool.* **271**, 437–444.
- Heesy, C.P. (2008). Ecomorphology of orbit orientation and the adaptive significance of binocular vision in primates and other mammals. *Brain. Behav. Evol.* **71**, 54–67.
- Heesy, C.P. (2009). Seeing in stereo: The ecology and evolution of primate binocular vision and stereopsis. *Evol. Anthropol. Issues, News, Rev.* **18**, 21–35.
- Heesy, C.P. & Hall, M.I. (2010). The nocturnal bottleneck and the evolution of mammalian vision. *Brain. Behav. Evol.* **75**, 195–203.



- Heffner, R.S., Koay, G. & Heffner, H.E. (2007). Sound-localization acuity and its relation to vision in large and small fruit-eating bats: I. Echolocating species, *Phyllostomus hastatus* and *Carollia perspicillata*. *Hear. Res.* **234**, 1–9.
- Herrera, G., Fernández, M. & Pohl, N. (2004). Sistema visual en el colibrí austral (*Sephanoides sephaniodes*) y el picaflor cordillerano (*Oreotrochilus leucopleurus*): Electrorretinografía y coloración. *Omitol. Neotrop.* **15**, 215–222.
- Herrera, G., Zagal, J.C., Diaz, M., Fernández, M.J., Vielma, A., Cure, M., Martínez, J., Bozinovic, F. & Palacios, A.G. (2008). Spectral sensitivities of photoreceptors and their role in colour discrimination in the green-backed firecrown hummingbird (*Sephanoides sephaniodes*). *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* **194**, 785–94.
- Iwaniuk, A. & Wylie, D. (2007). Neural specialization for hovering in hummingbirds: Hypertrophy of the pretectal nucleus lentiformis mesencephali. *J. Comp. Neurol.* **500**, 211–221.
- Iwaniuk, A.N., Gutierrez-Ibanez, C., Pakan, J.M.P. & Wylie, D.R. (2010a). Allometric scaling of the tectofugal pathway in birds. *Brain. Behav. Evol.* **75**, 122–137.
- Iwaniuk, A.N., Heesy, C.P. & Hall, M.I. (2010b). Morphometrics of the eyes and orbits of the nocturnal Swallow-tailed Gull (*Creagrus furcatus*). *Can. J. Zool.* **88**, 855–865.
- Iwaniuk, A.N., Heesy, C.P., Hall, M.I. & Wylie, D.R.W. (2008). Relative Wulst volume is correlated with orbit orientation and binocular visual field in birds. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* **194**, 267–282.
- Iwaniuk, A.N. & Nelson, J.E. (2002). Can endocranial volume be used as an estimate of brain size in birds? *Can. J. Zool.* **80**, 16–23.
- Iwaniuk, A.N. & Wylie, D.R.W. (2006). The evolution of stereopsis and the Wulst in caprimulgiform birds: A comparative analysis. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* **192**, 1313–1326.
- Jackson, H. (2003). A review of foraging and feeding behaviour, and associated anatomical adaptations, in Afrotropical nightjars. *Ostrich* **74**, 187–204.
- Jarvis, E., Mirarab, S., Aberer, A., Li, B. & Houde, P. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science* **346**, 1126–1138.
- Karten, H. & Hodos, W. (1967). *A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon:(Columba Livia)*. Baltimore: Johns Hopkins Press.
- Knudsen, E.I. (1982). Auditory and Visual Maps of Space in the Optic Tectum of the Owl. *J. Neurosci.* **2**, 1177–1194.

- Krabichler, Q., Vega-Zuniga, T., Morales, C., Luksch, H. & Marín, G.J. (2015). The visual system of a Palaeognathous bird: Visual field, retinal topography and retino-central connections in the Chilean Tinamou (*Nothoprocta perdicaria*). *J. Comp. Neurol.* **523**, 226–250.
- Ksepka, D., Clarke, J.A., Nesbitt, S.J., Kulp, F.B. & Grande, L. (2013). Fossil evidence of wing shape in a stem relative of swifts and hummingbirds (Aves, Pan-Apodiformes). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **280**, 20130580.
- Lederer, R. (1972). The Role of Avian Rictal Bristles. *Wilson Bull.* **84**, 193–197.
- Lisney, T.J., Iwaniuk, A.N., Bandet, M. V & Wylie, D.R. (2012a). Eye shape and retinal topography in owls (Aves: Strigiformes). *Brain. Behav. Evol.* **79**, 218–236.
- Lisney, T.J., Iwaniuk, A.N., Kolominsky, J., Bandet, M. V, Corfield, J.R. & Wylie, D.R. (2012b). Interspecific variation in eye shape and retinal topography in seven species of galliform bird (Aves: Galliformes: Phasianidae). *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* **198**, 717–731.
- Livezey, B.C. & Zusi, R.L. (2007). Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zool. J. Linn. Soc.* **149**, 1–95.
- Marín, G.J., Durán, E., Morales, C., González-Cabrera, C., Sentis, E., Mpodozis, J. & Letelier, J.C. (2012). Attentional capture? Synchronized feedback signals from the isthmi boost retinal signals to higher visual areas. *J. Neurosci.* **32**, 1110–22.
- Marín, G.J., Letelier, J.C., Henny, P., Sentis, E., Farfán, G., Fredes, F., Pohl, N., Karten, H. & Mpodozis, J. (2003). Spatial organization of the pigeon tectorotundal pathway: an interdigitating topographic arrangement. *J. Comp. Neurol.* **458**, 361–380.
- Martin, G.R. (1990). *Birds by Night*. London: T & AD Poyser Ltd.
- Martin, G.R. (2007). Visual fields and their functions in birds. *J. Ornithol.* **148**, 547–562.
- Martin, G.R. (2014). The subtlety of simple eyes: the tuning of visual fields to perceptual challenges in birds. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**, 20130040.
- Martin, G.R., Rojas, L.M., Ramirez, Y. & McNeil, R. (2004a). Binocular vision and nocturnal activity in Oilbirds (*Steatornis caripensis*) and Pauraques (*Nyctidromus albicollis*): Caprimulgiformes. *Ornithol. Neotrop.* **15**, 233–242.
- Martin, G.R., Rojas, L.M., Ramírez, Y. & McNeil, R. (2004b). The eyes of oilbirds (*Steatornis caripensis*): pushing at the limits of sensitivity. *Naturwissenschaften* **91**, 26–9.

- Mayr, G. (2002). Osteological evidence for paraphyly of the avian order Caprimulgiformes (nightjars and allies). *J. Ornithol.* **143**, 82–97.
- Mayr, G. (2010). Phylogenetic relationships of the paraphyletic “caprimuliform” birds (nightjars and allies). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **48**, 126–137.
- Mayr, G. (2011). Metaves, Mirandomithes, Strisores and other novelties - a critical review of the higher-level phylogeny of neornithine birds. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **49**, 58–76.
- Mayr, G. (2014). The origins of crown group birds: molecules and fossils. *Palaeontology* **57**, 231–242.
- McGuire, J.A., Witt, C.C., Altshuler, D.L. & Remsen, J. V. (2007). Phylogenetic systematics and biogeography of hummingbirds: Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. *Syst. Biol.* **56**, 837–856.
- McGuire, J.A., Witt, C.C., Remsen, J. V., Corl, A., Rabosky, D.L., Altshuler, D.L. & Dudley, R. (2014). Molecular phylogenetics and the diversification of hummingbirds. *Curr. Biol.* **24**, 910–916.
- McNeil, R., McSween, A. & Lachapelle, P. (2005). Comparison of the retinal structure and function in four bird species as a function of the time they start singing in the morning. *Brain. Behav. Evol.* **65**, 202–14.
- Menegaz, R.A. & Kirk, E.C. (2009). Septa and processes: convergent evolution of the orbit in haplorhine primates and strigiform birds. *J. Hum. Evol.* **57**, 672–687.
- Miceli, D., Repérant, J., Bertrand, C. & Rio, J. (1999). Functional anatomy of the avian centrifugal visual system. *Behav. Brain Res.* **98**, 203–210.
- Nesbitt, S.J., Ksepka, D.T. & Clarke, J.A. (2011). Podargiform affinities of the enigmatic *Fluviovidavis platyrhamphus* and the early diversification of Strisores (“Caprimulgiformes” + Apodiformes). *PLoS One* **6**, e26350.
- Nieuwenhuys, R., Donkelaar, H.J., Nicholson, C., Smeets, W. & Wicht, H. (1998). *The central nervous system of vertebrates*. Berlin: Springer.
- Omi, M., Harada, H. & Nakamura, H. (2011). Identification of retinotectal projection pathway in the deep tectal laminae in the chick. *J. Comp. Neurol.* **519**, 2615–2621.
- Pagel, M. (1999). Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**, 877–884.

- Pennell, M.W. & Harmon, L.J. (2013). An integrative view of phylogenetic comparative methods: connections to population genetics, community ecology, and paleobiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1289**, 90–105.
- Pettigrew, J.D. (1986). The evolution of binocular vision. In *Visual neuroscience*: 208–222. Pettigrew, J.D., Sanderson, K. & Levick, W. (Eds). . Cambridge: Cambridge University Press.
- Pettigrew, J.D., Dreher, B., Hopkins, C., McCall, M. & Brown, M. (1988). Peak Density and Distribution of Ganglion Cells in the Retinae of Microchiropteran Bats: Implications for Visual Acuity. *Brain. Behav. Evol.* **32**, 39–56.
- Pettigrew, J.D. & Konishi, M. (1976). Neurons selective for orientation and binocular disparity in the visual Wulst of the barn owl (*Tyto alba*). *Science* **193**, 675–678.
- Pettigrew, J.D. & Konishi, M. (1984). Some observations on the visual system of the oilbird, *Steatornis caripensis*. *Nat Geo Soc Res Rep* **16**, 439–450.
- Repérant, J., Ward, R., Miceli, D., Rio, J.P., Médina, M., Kenigfest, N.B. & Vesselkin, N.P. (2006). The centrifugal visual system of vertebrates: a comparative analysis of its functional anatomical organization. *Brain Res. Rev.* **52**, 1–57.
- Rojas, L.M., McNeil, R., Cabana, T. & Lachapelle, P. (1999). Diurnal and nocturnal visual capabilities in shorebirds as a function of their feeding strategies. *Brain. Behav. Evol.* **53**, 29–43.
- Rojas, L.M., Ramírez, Y., Marín, G. & McNeil, R. (2004a). Capacidad visual en Caprimulgiformes. *Ornitol. Neotrop.* **15**, 251–260.
- Rojas, L.M., Ramírez, Y., McNeil, R., Mitchell, M. & Marín, G. (2004b). Retinal morphology and electrophysiology of two caprimulgiformes birds: the cave-living and nocturnal oilbird (*Steatornis caripensis*), and the crepuscularly and nocturnally foraging common pauraque (*Nyctidromus albicollis*). *Brain. Behav. Evol.* **64**, 19–33.
- Rojas, L.M., Tai, S. & McNeil, R. (1993). Comparison of rod/cone ratio in three species of shorebirds having different nocturnal foraging strategies. *Auk* **110**, 141–145.
- Sangster, G. (2005). A name for the clade formed by owlet-nightjars, swifts and hummingbirds (Aves). *Zootaxa* **6**, 1–6.
- Sibley, C., Ahlquist, J. & Monroe, B. (1988). A classification of the living birds of the world based on DNA-DNA hybridization studies. *Auk* **105**, 409–423.
- Stegeman, A. (2013). *A three-dimensional digital brain atlas and stereotaxic coordinates for the Anna's Hummingbird, Calypte anna*. The University of British Columbia, Vancouver, Canada.

- Suh, A., Paus, M., Kiefmann, M., Churakov, G., Franke, F.A., Brosius, J., Kriegs, J.O. & Schmitz, J. (2011). Mesozoic retroposons reveal parrots as the closest living relatives of passerine birds. *Nat. Commun.* **2**, 1–7.
- Ullmann, J.F.P., Moore, B.A., Temple, S.E., Fernández-Juricic, E. & Collin, S.P. (2012). The retinal wholemount technique: a window to understanding the brain and behaviour. *Brain. Behav. Evol.* **79**, 26–44.
- Vega-Zuniga, T., Medina, F., Fredes, F., Zuniga, C., Severín, D., Palacios, A.G., Karten, H.J. & Mpodozis, J. (2013). Does Nocturnality Drive Binocular Vision? Octodontine Rodents as a Case Study. *PLoS One* **8**, e84199.
- Wilson, M. & Lindstrom, S. (2011). What the bird's brain tells the bird's eye: the function of descending input to the avian retina. *Vis. Neurosci.* **28**, 337–350.
- Wylie, D.R.W., Gutierrez-Ibanez, C., Pakan, J.M.P. & Iwaniuk, A.N. (2009). The optic tectum of birds: mapping our way to understanding visual processing. *Can. J. Exp. Psychol.* **63**, 328–338.