



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**Expresión de marcadores moleculares de identidad neuroquímica en
neuronas del núcleo parabigémino del *Octodon degus*.**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención Biología Molecular,
Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Denisse del Carmen Carrasco Hinojosa

Abril 2018

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Letelier

Co-Director de Tesis: Prof. Gonzalo Marín

INDICE DE MATERIAS

Página

RESUMEN	xi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Neuroanatomía de los núcleos del istmo de vertebrados	2
1.2 Circuito istmo-tectal y la visión binocular.....	7
1.3 Fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo	10
1.3.1 Identidad neuroquímica colinérgica y glutamatérgica.....	11
1.3.2 Identidad neuroquímica GABAérgica	12
1.4 Planteamiento del problema.....	13
1.5 Hipótesis	15
1.6 Objetivos	15
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1 Obtención de animales	16
2.2 Procedimientos histológicos	16
2.3 Técnicas de Biología molecular.....	17
2.3.1 Diseño de sondas y partidores	17
2.3.2 Extracción de RNA.....	18

2.3.3	Transcripción Reversa (RT)	19
2.3.4	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	19
2.3.5	Clonación.....	21
2.3.6	Purificación DNA plasmidial	22
2.3.7	Linearización del plásmido por endonucleasas	22
2.3.8	Síntesis de sondas de RNA o Transcripción in vitro.	24
2.4	Hibridación in situ.....	26
2.4.1	Hibridación in situ cromogénica (ISH).....	27
2.4.2	Hibridación in situ Fluorescente (FISH)	29
2.4.3	Técnica de inmunofluorescencia (IF) para ChAT	30
2.4.4	Técnicas de FISH combinada con IF.....	30
2.4.5	Visualización y escaneado de las imágenes.....	30
3	RESULTADOS	32
3.1	Diseño de partidores y síntesis de sondas de RNA.....	32
3.2	Ensayos de Hibridación in situ.....	32
3.3	Expresión específica para los ensayos de Hibridación in situ	33
3.3.1	Expresión específica de ChAT y VAcHt mRNA.....	33
3.3.2	Expresión específica de VGluT1, VGluT2 y VIAAT mRNA.....	36

3.4	Caracterización de la identidad neuroquímica de los núcleos del istmo.....	38
3.4.1	Expresión de ChAT, VAcChT y VGluT2 mRNA en el Pbg.....	38
3.4.2	Expresión de VIAAT mRNA en el pLTN.....	40
3.5	Ensayo de doble marca, mediante técnicas de Hibridación in situ e Inmunohistoquímica fluorescente	46
4	DISCUSION.....	49
4.1	Modelo experimental	50
4.2	Especificidad de las sondas de RNA	50
4.3	Identidad neuroquímica colinérgica del Pbg.....	51
4.3.1	Locus de gen colinérgico.....	52
4.4	Expresión de marcadores glutamatérgicos.....	55
4.4.1	Identidad neuroquímica glutamatérgica del Pbg	55
4.5	Identidad neuroquímica GABAérgica del pLTN.....	56
4.6	Co-expresión de glutamato y acetilcolina en el Pbg.....	57
4.6.1	Doble liberación de un neurotransmisor.....	58
4.7	Conectividad y funcionalidad del Pbg	59
5	CONCLUSIONES.....	63
6	BIBLIOGRAFIA.....	64

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Partidores finales utilizados y transcritos amplificados.....	18
Table 2. Amplificación de transcritos de DNA.....	19
Table 3. Detalles para el procedimiento de linearización del plásmido.....	23
Table 4. Componentes del Buffer de Hibridación.	28

LISTA DE FIGURAS

Página

Figure 1. Esquema de las conexiones istmo-tectales en algunas clases de vertebrados. ...	3
Figure 2. Esquema del circuito istmo-tectal en aves.....	4
Figure 3. Citoarquitectura del Pbg del <i>Octodon degus</i>	6
Figure 4. Proyecciones del istmo y binocularidad en la rana.....	8
Figure 5. Inyección de CTb en la región medial del SC del <i>Octodon degus</i>	9
Figure 6. Esquema del circuito istmo-tectal y el campo visual binocular en el <i>Octodon degus</i>	10
Figure 7. Inmunoreactividad positiva para ChAT en el Pbg del <i>Octodon degus</i>	12
Figure 8. Electroforesis para cDNA amplificado.....	20
Figure 9. Mapa del plásmido pGEM-T Easy.	21
Figure 10. Electroforesis control DNA plasmidial circular y DNA plasmidial lineal.	24
Figure 11. Electroforesis de RNA.....	25
Figure 12. Especificidad de las sondas de ChAT y VACHT mRNA.	35
Figure 13. Especificidad de las sondas de VGluT1, VGluT2 y VIAAT mRNA.....	38
Figure 14. Expresión del mRNA del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) en el núcleo parabigémino (Pbg).	41
Figure 15. Expresión del mRNA de la enzima acetil colina transferasa (ChAT) en el núcleo parabigémino (Pbg).....	42
Figure 16. Expresión de mRNA del transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2) en el núcleo parabigémino (Pbg).	43

Figure 17. Expresión del mRNA del transportador vesicular de GABA (VIAAT) en la región del istmo.....	44
Figure 18. Expresión del mRNA para el transportador vesicular de glutamato 1 (VGluT1) en la región del istmo.	45
Figure 19. Ensayos de doble marca de Inmunohistoquímica fluorescente para ChAT (IF) e Hibridación in situ fluorescente (FISH) para VGluT2 mRNA en el núcleo parabigémino.	48
Figure 20. Ensayos de doble marca de Inmunohistoquímica fluorescente para ChAT (IF) e Hibridación in situ fluorescente (FISH) para VGluT2 mRNA.	48
Figure 21. Representación esquemática del locus del gen colinérgico de la rata	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	acetilcolinesterasa
AP	enzima fosfatasa alcalina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
BIC	Brachium del colículo inferior
BO	Bulbo olfatorio
Caud	Subdivisión caudal del Pbg
cDNA	DNA complementario
Ceb	Cerebelo
ChAT	Acetil colina transferasa
Ctx	Corteza cerebral
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasas
dNTPs	Desoxinucléotidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FISH	Hibridación in situ fluorescente
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
Hip	Hipocampo
IC	Colículo inferior
IF	Inmunohistoquímica fluorescente
IH	Inmunohistoquímica
Imc	Núcleo istmi pars magnocellularis
Ipc	Núcleos isthmi pars parvocellularis

ISH	Hibridación in situ
Ladder	Escala con pesos moleculares de referencia
LB Broth	Luria Bertani Broth
mRNA	RNA mensajero
NBT	Nitro-blue tetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NI	Núcleos del istmo
NIH	National Institute of Health
OM	Núcleo oculomotor
OS	Complejo de la oliva superior
OT	Tractus opticus
PAG	Gris periaqueductal
Pbg	Núcleo parabigémino
PBS	Phosphate-buffered saline o Tampón fosfato salino
PBSTw	PBS 1X con Tween 0.1%
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
pLTN	Área periparabigeminal del núcleo lateral tegmental
PN	Núcleo pontino
POD	enzima peroxidasa
PPn	Núcleo pedúnculo pontino
PT	Pretectum
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsas	Ribonucleasas
RNAsin	Inhibidor de ribonucleasas
Rost	Subdivisión rostral del Pbg
RT	Núcleo reticular talámico
SC	Colículo superior

Slu	Núcleo isthmi pars semilunaris
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Buffer saline-sodium citrate
Str	Cuerpo estriado
Tal	Tálamo
TeO	Tectum óptico
TF	Tracto de fibras
TGC	Tectal ganglion cell o Célula ganglionar del tectum
TO	Tubérculo olfatorio
TSA	amplificación de la señal con Tiramida
V	Núcleo motor del nervio trigémino
VAcHT	Transportador vesicular de acetilcolina
VGluT1	Transportador vesicular de glutamato 1
VGluT2	Transportador vesicular de glutamato 2
VIAAT	Transportador vesicular de GABA
VII	Núcleo motor del nervio facial
VN	Núcleos vestibulares
Zi	Zona incerta

RESUMEN

El fenómeno de la atención espacial, prioriza el procesamiento neuronal de las aferencias sensoriales provenientes de lugares específicos en el espacio donde se focaliza la atención. Dentro del sistema visual se ha evidenciado la participación de circuitos mesencefálicos en el control de la selección de estímulos y la atención espacial. En los vertebrados, esta red neural está compuesta por los núcleos del istmo (NI), que se caracterizan por presentar conexiones recíprocas y topográficas con el tectum óptico (TeO), o colículo superior (SC) en mamíferos. Los NI han sido ampliamente estudiados, por proveer de retroalimentación visual al TeO/SC, modulando la transmisión de las señales visuales retinianas hacia centros superiores. Dentro de este circuito, se destacan poblaciones neuronales de naturaleza colinérgica y GABAérgica.

En aves, las neuronas istmales colinérgicas forman los núcleos isthmi pars parvocellularis (Ipc) y núcleo isthmi pars semilunaris (Slu) y la población de neuronas GABAérgicas conforman el núcleo isthmi pars magnocellularis (Imc). Además, se ha demostrado la presencia de VGluT2 en Ipc, sugiriendo que la retroalimentación de los núcleos Ipc y Slu sobre el TeO involucra acetilcolina y glutamato, proponiendo la posibilidad de doble liberación de glutamato y acetilcolina por las neuronas de Ipc. En mamíferos, se ha sugerido al núcleo parabigémino (Pbg) como homólogo al Ipc y Slu, y al área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN) como homólogo al Imc de las aves, los cuales comparten respectivamente un fenotipo colinérgico y GABAérgico.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en un roedor diurno, el *Octodon degus* (Degus), han dilucidado la citoarquitectura del Pbg y la organización de sus

proyecciones recíprocas con el SC, evidenciando dos subdivisiones que proyectan a diferentes regiones del SC, definiendo una de ellas un área de interacción binocular en la parte medial del SC que representa el campo visual aéreo.

En el presente trabajo, con la finalidad de precisar el rol específico de las neuronas de ambas subdivisiones del Pbg y del área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN), hemos decidido investigar por primera vez la identidad neuroquímica de la región del istmo del *Octodon degus*. De esta forma, mediante técnicas de Hibridación in situ (ISH), analizamos en la región del istmo la expresión de mRNA de ChAT y de los transportadores vesiculares VAcChT, VGluT1, VGluT2 y VIAAT en el Pbg y el pLTN. También estudiamos la co-expresión de la proteína de ChAT y de VGluT2 mRNA en las neuronas del Pbg, utilizando doble marca de Inmunohistoquímica fluorescente (IF) e Hibridación in situ fluorescente (FISH).

Los resultados de las ISH mostraron, por un lado, que las neuronas de ambas subdivisiones del Pbg expresan los marcadores colinérgicos ChAT y VAcChT mRNA y el marcador glutamatérgico VGluT2 mRNA, lo cual confirma el fenotipo colinérgico del Pbg y propone un segundo fenotipo glutamatérgico en sus neuronas. Por otro lado, se evidenció que el pLTN expresa el marcador GABAérgico VIAAT mRNA, apoyando el fenotipo GABAérgico de las células del pLTN. Los resultados de doble marca de FISH e IF mostraron además que todas las neuronas del Pbg co-expresan VGluT2 mRNA y la proteína de ChAT, sugiriendo la capacidad de doble liberación en vesículas de acetilcolina y glutamato.

Esta posible identidad neuroquímica del Pbg y el pLTN, vinculada con la hodología de sus proyecciones, sugiere que ambos núcleos a través de interacciones excitatorias e

inhibitorias podrían ejercer efectos de modulación sobre las células del SC, de manera análoga a lo observado en los núcleos Ipc, Slu y Imc en las aves. La posible doble liberación de glutamato y acetilcolina por el Pbg propone un significativo rol modulador sobre los circuitos del SC, presumiblemente asociado al fenómeno de la atención espacial como se ha sugerido para el sistema NI/TeO de otros vertebrados, y quizá también a conductas de escape provocadas por estímulos aéreos.

1 INTRODUCCIÓN

Los seres vivos poseen la capacidad de responder a los diversos cambios que se producen en su medio ambiente. Para ello, deben seleccionar en cada momento la información más relevante para la conducta en curso, a partir de la gran diversidad de estímulos a los que se ven enfrentados. Es de esta capacidad de adaptación a las modificaciones de su entorno, de la cual depende la supervivencia de cada uno de ellos.

El fenómeno de la atención espacial es fundamental en el procesamiento sensorial de los estímulos visuales en el espacio (Posner, 1980). Si un estímulo visual sobresaliente, como el movimiento repentino de un objeto, captura la atención visual, se incrementa la respuesta neuronal de las áreas visuales en el cerebro que representan la localización espacial de aquel estímulo y se reduce la respuesta de las neuronas que representan lugares complementarios. De esta forma, el proceso de la atención selectiva requiere de circuitos neuronales que mantienen representaciones topográficas de las ubicaciones espaciales de los estímulos y de interacciones inhibitorias entre las representaciones competitivas. Esto conlleva a que solo el estímulo visual sobresaliente alcance los centros visuales superiores (Desimone y Duncan, 1995; Maunsell y Cook, 2002; Marín y col., 2007, 2012).

Como un modelo de selección de estímulos, que podría ser parte de mecanismos de atención espacial en variadas especies de vertebrados, ha sido propuesto el circuito istmo-tectal compuesto por el tectum óptico (TeO; colículo superior en mamíferos, SC) y los núcleos del istmo (NI) (Marín y col., 2005, 2007, 2012; Gruberg y col., 2006; Knudsen, 2011; Faunes y col., 2013; Asadollahi y Knudsen, 2016).

1.1 Neuroanatomía de los núcleos del istmo de vertebrados

Los NI que son parte del circuito istmo-tectal, fueron descritos por primera vez en anfibios por Gaupp (1897) y posteriormente en toda clase de vertebrados. En mamíferos, se ha aceptado al núcleo parabigémino (Pbg) como el homólogo a los NI (Wang y col., 2003; Diamond y col., 1992). Durante muchos años se ha estudiado de forma comparada el desarrollo embrionario, la citoarquitectura, la hodología y la neuroquímica de estos núcleos. A pesar de algunas diferencias en la organización de este sistema entre los diversos grupos, existe suficiente evidencia que indica que los componentes fundamentales de este sistema y la lógica de sus conexiones se han conservado a través de la evolución (Belekhova and Kenigfest, 2014; Gruberg y col., 2006).

Los NI proveen una retroalimentación sobre el TeO/SC, y en aves, ejercen un efecto de compuerta sobre la transmisión de las señales visuales retinianas desde TeO/SC hacia centros superiores (Marín y col., 2012). En todas las especies estudiadas, los NI presentan proyecciones topográficas recíprocas con el TeO ipsilateral. El núcleo del istmo de anfibios y el Pbg de mamíferos presentan también proyecciones contralaterales hacia el TeO/SC (Gruberg y col., 2006) (**Figura 1**). Estas proyecciones contralaterales sugieren fuertemente que estos núcleos están implicados en el procesamiento de la visión binocular. Se ha descrito que anfibios y mamíferos son capaces de combinar la información proveniente desde ambos ojos en el TeO/SC a través de un input directo desde la retina contralateral y un input indirecto desde los NI/Pbg, sin que exista una proyección directa al TeO/SC desde la retina ipsilateral (Dudkin y col., 2007).

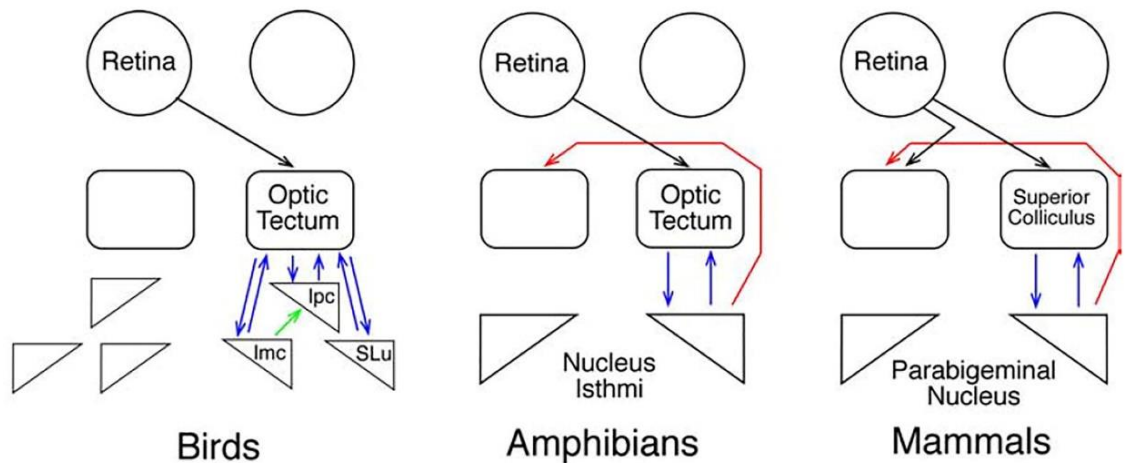


Figure 1. Esquema de las conexiones istmo-tectales en algunas clases de vertebrados. Existen conexiones topográficas recíprocas entre el TeO/SC y el NI/Pbg (Flechas azules). Las Aves (birds) presentan tres núcleos istmales: Ipc, Slu e Imc. Anfibios (amphibians) y mamíferos (mammals), además de las conexiones ipsilaterales, el NI presenta conexiones contralaterales (Flechas rojas) desde el NI/Pbg hacia el TeO/SC. (Esquemas tomados de Gruberg y col., 2006)

En aves, los NI presentan poblaciones neuronales muy conspicuas en cuanto a su morfología e identidad neuroquímica y se encuentran organizadas en 3 núcleos separados, con un patrón propio de conectividad con el TeO. El núcleo isthmi pars parvocellularis (Ipc), el núcleo isthmi pars semilunaris (Slu) y el núcleo isthmi pars magnocellularis (Imc) (Wang y col., 2004, 2006). Ipc y Slu presentan conexiones recíprocas y topográficamente organizadas con el TeO, conectándose de manera homotópica con el TeO ipsilateral. Es decir, un locus determinados de Ipc y Slu se proyectan sobre la misma zona de TeO desde donde reciben sus aferencias visuales (Güntürkün y Remy, 1990; Hellmann y col., 2001; Wang y col., 2004, 2006). Neuronas de Imc, a su vez, se proyectan de vuelta sobre el TeO ipsilateral de manera heterotópica, es decir, los axones se distribuyen sobre toda la

extensión del tectum excepto en la zona desde donde se origina la aferencia tectal. Otras neuronas de Imc se proyectan sobre Ipc y Slu, también de forma heterotópica (Wang y col., 2004, 2006; Faunes y col., 2013) (**Figura 2**).

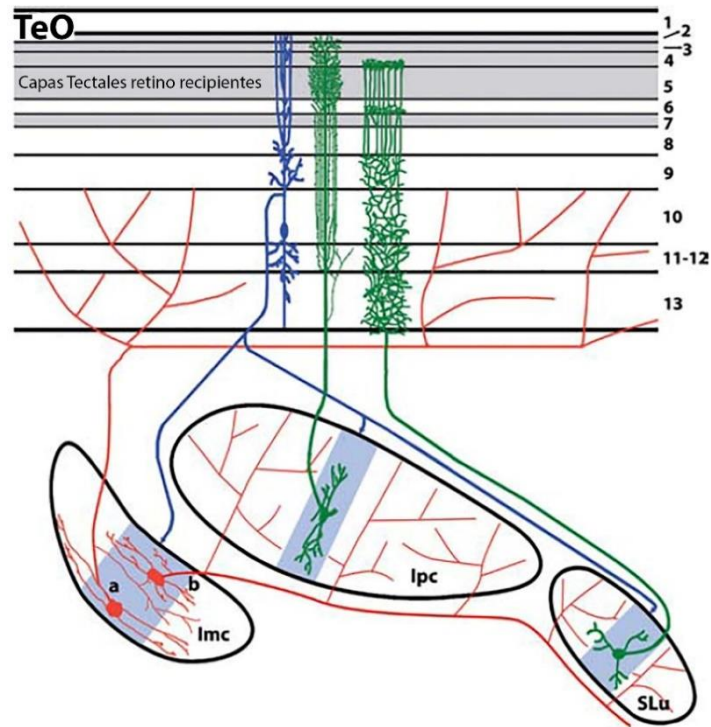


Figure 2. Esquema del circuito istmo-tectal en aves. Se observa un esquema de las conexiones entre el TeO y las 3 divisiones de los NI de las aves, Ipc, Slu y Imc. Neuronas (azul) de la capa 10 del tectum, proyectan topográficamente a Ipc, Slu e Imc. Neuronas de Imc (rojo) proyectan de forma heterotópica sobre el TeO (a) y sobre Ipc/Slu (b). Los terminals axonales de Ipc y Slu (verde) presentan un arreglo columnar en ciertas capas del TeO. El área gris del TeO, indica las capas tectales retino recipientes. El área azul, dentro de Ipc, Slu e Imc indica terminaciones tectales. (Esquema tomado de Wang y col., 2006 y Gruberg y col 2006)

En anfibios, como en la rana, los NI pueden directamente influenciar el input retinotectal y presumiblemente ejercen un efecto de compuerta en la conducta de la selección del estímulo de presa (King y Schmidt, 1991; Dudkin y Gruberg, 2003). Los NI, en ranas, están organizados en dos regiones funcionales contiguas de células que reciben proyecciones desde el TeO ipsilateral. La región dorsal posee células que proyectan al TeO ipsilateral y la región ventral posee células que proyectan al TeO contralateral (Hoshino, 2006; Gruberg y Udin, 1978; Wang, 2003; Dudkin y col., 2007; Gruberg 2006).

Respecto de mamíferos, se ha sugerido al núcleo parabigémino (Pbg) como homólogo a Ipc y Slu colectivamente (Wang y col., 2006) y se ha propuesto al área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN) como homólogo del Imc (Jiang y col., 1996; Goddard y col., 2007; Mysore y Knudsen, 2011). El Pbg se posiciona a lo largo de la pared lateral del mesencéfalo justo ventral al brachium del colículo inferior (BIC) y ha sido descrito como un “núcleo satélite” del SC (Graybiel, 1978), producto de las fuertes conexiones recíprocas y topográficas entre el SC y el Pbg, al igual como se ha descrito en las aves. El Pbg en mamíferos, al igual que el NI de la rana y la salamandra (Dudkin y col., 2007), también presenta proyecciones contralaterales hacia el SC.

En la rata, las neuronas del Pbg son pequeñas y se encuentran densamente organizadas. El Pbg ha sido subdividido en 3 subgrupos: un área dorsal, medial y ventral. Las proyecciones hacia el SC ipsilateral provienen del área dorsal y ventral y las proyecciones contralaterales hacia el SC provienen principalmente del área medial (Watanabe y Kawana, 1979; Usunoff y col., 2007).

En el *Octodon degus* el Pbg es un grupo compacto de células que se posiciona ventral al brachium del colículo inferior (BIC). Por resultados obtenidos en nuestro

laboratorio mediante ensayos de inmunohistoquímica (IH) e inyecciones del trazadores neuronales en el Pbg y en distintas regiones del SC, se han encontrado dos subdivisiones del Pbg: una región caudal (caudo-dorsal) de menor densidad celular, que proyecta principalmente al SC ipsilateral, y otra región rostral (rostro-ventral) de una alta densidad celular, que proyecta al SC contralateral (Deichler y col., manuscrito en preparación; Deichler y col., 2013, 2016; Carrasco y col., 2014) (**Figura 3**).

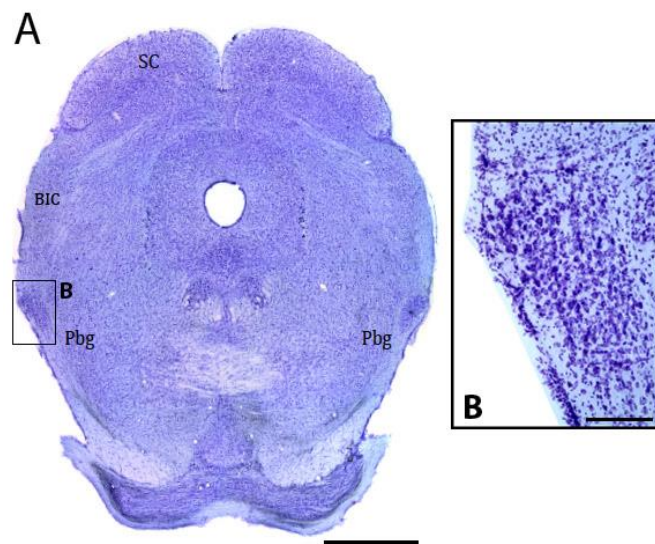


Figure 3. Citoarquitectura del Pbg del *Octodon degus*. **A:** Se observa un corte coronal del cerebro del *Octodon degus* con tinción Nissl, donde se puede apreciar la citoarquitectura del núcleo parabigémino. **B:** Amplificación del Pbg. Siglas: colículo superior (SC), brachium del colículo inferior (BIC), núcleo parabigémino (Pbg). Barra de calibración: 1 mm en A y 100 μ m en B (Imagen adaptada de Carrasco y col., 2014).

Adyacente al Pbg, en mamíferos, encontramos al área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN), descrito y definido por Edwards y col. (1979) en el gato, posicionándose medial al Pbg y contiguo al borde lateral del núcleo pedúnculo pontino (PPT) (Appell y Behan., 1990). De manera similar a lo que se observa con el Pbg, el pLTN

se encuentra recíprocamente conectado con el SC: Se han evidenciado proyecciones bilaterales desde el pLTN hacia el SC en el gato (Graybiel, 1978) y el hurón, donde además se ha observado que las proyecciones ipsilaterales se concentran en la zona dorsal del pLTN, mientras que las contralaterales se ubican más ventrales en el pLTN (Jiang y col., 1996).

1.2 Circuito istmo-tectal y la visión binocular

En todos los animales en que se han descrito proyecciones bilaterales del NI/Pbg al TeO/SC, se ven similitudes en los patrones básicos de organización de las conexiones. De esta forma se ha observado en la rana (Dudkin y col., 2007), en la rata (Watanabe y Kawana, 1979), en el gato (Graybiel, 1978; Edwards y col., 1979) y en el hurón (Jiang y col., 1996), que las proyecciones ipsilaterales del NI/Pbg terminan principalmente en regiones caudales del TeO/SC ipsilateral y que las proyecciones contralaterales del NI/Pbg terminan principalmente en regiones rostrales del TeO/SC contralateral. En la rana, las proyecciones ipsilaterales de la parte dorso-lateral del NI terminan principalmente en áreas del TeO que representan al campo visual monocular, mientras que las proyecciones contralaterales de la parte ventro-medial del NI terminan principalmente en áreas del TeO que representan al campo visual binocular (Dudkin y col., 2007) (**Figura 4**).

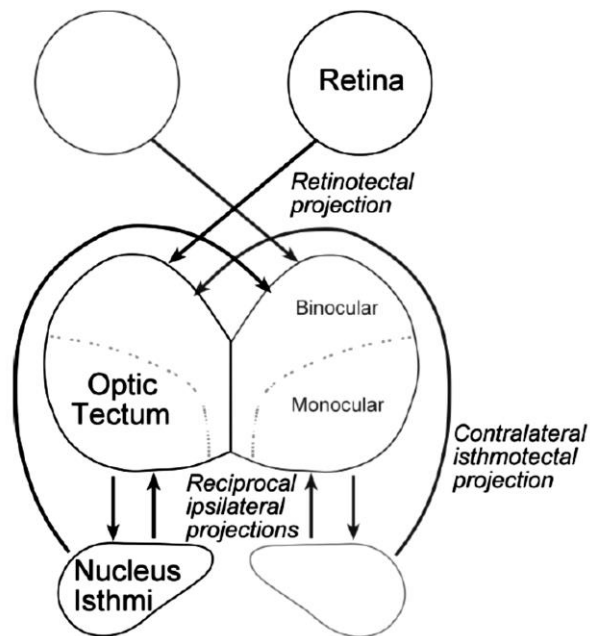


Figure 4. Proyecciones del istmo y binocularidad en la rana. Se observa un esquema de la vista dorsal del TeO. Cada ojo proyecta directamente al TeO contralateral. Se observan las proyecciones recíprocas ipsilaterales entre el NI y el TeO. El NI también presenta proyecciones al TeO contralateral, en la región rostro-medial del TeO que representa el campo visual binocular. La región monocular está localizada en la región caudo-lateral del TeO (Esquema tomado de Dudkin y col., 2007).

Estos resultados son comparables con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en el roedor *Octodon degus*, donde mediante la inyección del trazador neuronal CTb (Cholera Toxin b) en la región medial del SC, se observaron células retrógradamente marcadas solo en el Pbg contralateral y terminales axonales sólo en el Pbg ipsilateral, sugiriendo fuertemente que las proyecciones contralaterales del Pbg terminan principalmente en el área medial del SC (**Figura 5**). El trazado anterógrado con inyecciones en el Pbg ratificó este resultado, al encontrarse terminales restringidos a una

banda medial y anterior del SC (Deichler y col., manuscrito en preparación; Carrasco y col., 2014; Deichler y col., 2016).

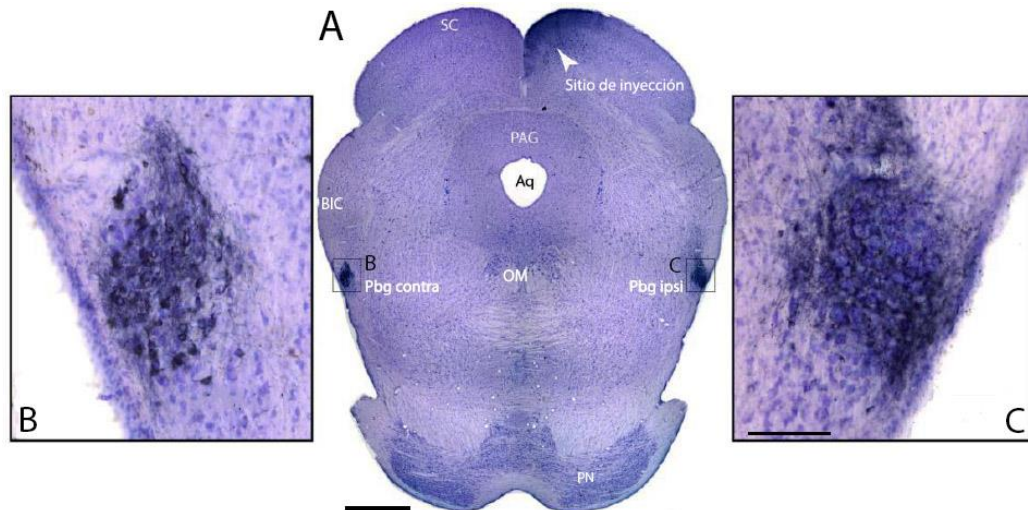


Figure 5. Inyección de CTb en la región medial del SC del *Octodon degus*. **A:** Se observa una sección coronal del cerebro de *Octodon degus*, donde se puede distinguir el sitio de inyección de CTb y la migración bilateral del trazador neuronal. **B:** Marca retrógrada en los somas neuronales del Pbg contralateral. **C:** Marca anterógrada de los terminales axonales del Pbg ipsilateral. Siglas: colículo superior (SC), brachium del colículo inferior (BIC), gris periaqueductal (PAG), núcleo oculomotor (OM), núcleo parabrachial (Pbg) núcleo pontino (PN). Barra de calibración: 1 mm en **A** y 100 μ m en **B, C**. (Imagen adaptada de Carrasco y col., 2014 y Deichler y col., 2016)

Se ha estudiado en ratones que en el área medial del SC está representado el campo visual superior (Dragger y Hubel, 1976; Ito y Feldheim, 2018), y en el *Octodon degus* se ha mostrado que en esta porción del campo visual se encuentra la representación del campo visual binocular (Vega-Zuniga y col., 2013) (**Figura 6**). Estas observaciones reafirman el vínculo de los NI/Pbg en el procesamiento de la visión binocular en el TeO/SC.

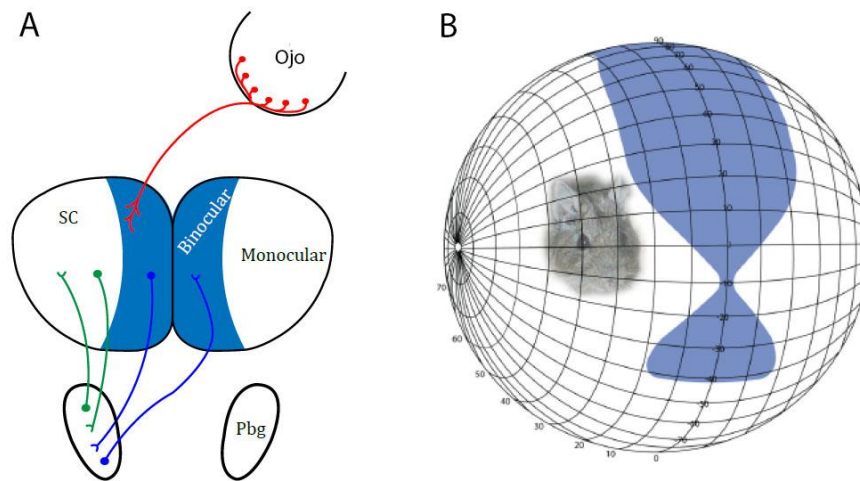


Figure 6. Esquema del circuito istmo-tectal y el campo visual binocular en el *Octodon degus*.
A: Se observa un esquema de las proyecciones entre el Pbg y el SC. El SC envía proyecciones ipsilaterales al Pbg. La región caudal del Pbg, proyecta hacia la región monocular del SC ipsilateral y la región rostral del Pbg, proyecta hacia la región binocular del SC contralateral. Cada ojo proyecta casi directamente al SC contralateral. La región de representación binocular está localizada en la región medial del SC. **B:** Se observa el área binocular del campo visual del *Octodon degus* que en su región dorsal se expande hasta 50° (Esquemas tomados de Vega-Zuniga y col., 2013, Carrasco y col., 2014 y Deichler y col., 2016).

1.3 Fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo

Para comprender a cabalidad la operación del circuito istmo-tectal como sistema involucrado en el proceso de selección de estímulos, se requiere determinar el rol específico de las neuronas que lo componen, en particular los neurotransmisores que ellas utilizan para interactuar unas con otras. Los neurotransmisores más comunes y ampliamente estudiados en el cerebro de los vertebrados son acetilcolina, glutamato y ácido gamma aminobutírico (GABA), cada uno de los cuales ha sido identificado, entre otros métodos, por la detección de proteínas específicas que participan en la síntesis o en el llenado vesicular para cada tipo de transmisor (Prado y col., 2002; Watanabe y col., 2002; Fremeau y col., 2004).

1.3.1 Identidad neuroquímica colinérgica y glutamatérgica

En las aves, Ipc y Slu han sido ampliamente aceptados como núcleos colinérgicos debido a su inmunoreactividad positiva para acetil colina transferasa (ChAT; enzima responsable de la síntesis de acetilcolina a partir de acetil-CoA y colina) en palomas (Medina and Reiner, 1994; Marín y col., 2007), pollos (Wang y col., 2006) y lechuzas (Maczko y col., 2006). Además, estudios recientes de ISH han mostrado en palomas y pollos una fuerte expresión de mRNA del transportador vesicular de glutamato (VGluT2) en Ipc (Islam y Atoji, 2008; González-Cabrera y col., 2015).

En la rana, se ha estudiado que la neurotransmisión del TeO a NI es mediada por acetilcolina. Ensayos de inmunohistoquímica han mostrado la presencia de altos niveles de acetilcolinesterasa (AChE) y ChAT en el NI (Ricciuti y Gruberg, 1985; Wallace y col., 1990).

En mamíferos, el Pbg se considera un núcleo colinérgico, al presentar inmunoreactividad para AChE y ChAT. Al igual que en el Ipc de las aves, un estudio en la ardilla (*Sciurus carolinensis*) ha mostrado datos interesantes de la inmunoreactividad positiva para VGluT2 en el Pbg (Baldwin y col., 2011).

Respecto del Pbg del *Octodon degus*, experimentos de inmunohistoquímica (IH) desarrollados en nuestro laboratorio han mostrado la inmunoreactividad positiva para ChAT en ambas subdivisiones del núcleo, reafirmando su identidad colinérgica (**Figura 7**). Por otro lado, resultados preliminares que mostraron inmunoreactividad positiva para VGluT2 hicieron presumible una naturaleza glutamatérgica (Deichler y col., manuscrito en preparación; Deichler y col., 2013)

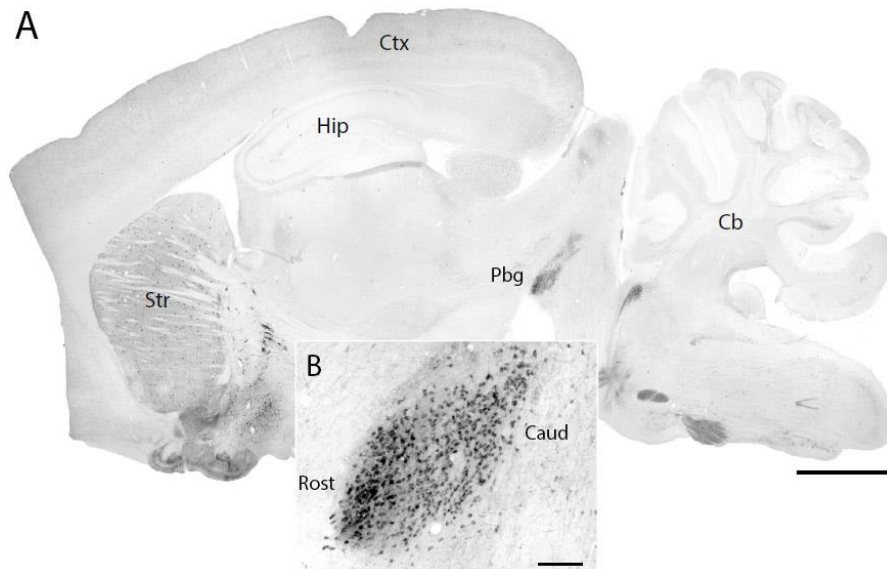


Figure 7. Inmunoreactividad positiva para ChAT en el Pbg del *Octodon degus*. **A:** Sección para-sagital del cerebro de *Octodon degus*, donde se aprecia la inmunoreactividad positiva para ChAT. **B:** Amplificación del Pbg, donde se observa la inmunoreactividad positiva para ChAT, en ambas subdivisiones del núcleo. Siglas: Cuerpo estriado (Str), corteza cerebral (Ctx), hipocampo (Hip), Cerebelo (Cb), núcleo parabigémino (Pbg), subdivisión rostral del Pbg (Rost), subdivisión caudal del Pbg (Caud). Barra de calibración 2 mm en A y 100 μ m en B. (Imagen tomada de Deichler y col., 2016)

1.3.2 Identidad neuroquímica GABAérgica

El ácido gamma aminobutírico (GABA), uno de los principales neurotransmisores inhbidores del SNC, también ha sido identificado en el circuito istmo-tectal. Las neuronas de Imc poseen inmuno positividad para GABA y glutamato descarboxilasa (GAD), la enzima que sintetiza GABA, por lo que se considera que este aminoácido es el principal neurotransmisor de este núcleo (Faunes y col., 2013; Domenici y col., 1988; Veenman, y Reiner, 1994; Tömböl y Németh, 1998; Sun y col., 2005). En la rana, se ha descrito que el NI contiene un gran número de neuronas GABAérgicas (Li y Fite, 2001). El pLTN,

núcleo considerado el homólogo a *Imc* en mamíferos, también se ha caracterizado por presentar inmunoreactividad para ácido gamma aminobutírico (GABA) (Appell y Behan., 1990).

1.4 Planteamiento del problema

Estudios de Hibridación in situ (ISH) de los núcleos del istmo en las aves han aportado interesantes resultados, que han abierto nuevas discusiones en torno a la identidad neuroquímica de estos núcleos en los vertebrados. Por una parte, se ha mostrado una discrepancia entre la expresión para el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) y ChAT mRNA en *Ipc*, ya que el primero evidencia una expresión apenas detectable en pollos (González-Cabrera y col., 2015). Sin embargo, en *Slu* se detectó la expresión de VACHT y ChAT mRNA, confirmando la naturaleza colinérgica de sus neuronas. Por otra parte, se evidenció una alta expresión para VGluT2 mRNA en *Ipc*, sugiriendo la posibilidad de doble liberación de glutamato y acetilcolina por las neuronas de *Ipc*. En este contexto existen numerosos reportes de la capacidad de doble liberación de neurotransmisores en vertebrados (Hnasko y Edwards, 2012). Por ejemplo, estudios previos han evidenciado la capacidad de doble liberación de acetilcolina y glutamato en motoneuronas espinales (Nishimaru y col., 2005).

Frente a todos estos antecedentes, hemos decidido estudiar el patrón de expresión de los marcadores colinérgicos, glutamatérgicos y GABAérgicos en la región del istmo del *Octodon degus*, con la intención de dilucidar la presencia de patrones de identidad

neuroquímica en ambas subdivisiones del Pbg y en el área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN).

De esta manera, el principal objetivo de este estudio fue determinar el patrón de distribución de neuronas que expresan ChAT y los transportadores vesiculares VAcHT, VGluT1, VGluT2 y VIAAT en el Pbg y el pLTN de *Octodon degus*, a través de ISH. En particular, mediante la implementación de técnicas ISH e IMH fluorescente, investigamos la posible expresión simultánea de dos marcadores dentro de una misma neurona, ya que era posible que algunas poblaciones neuronales del Pbg podrían estar co-expresando VAcHT, ChAT y/o VGluT2 mRNA. También esperábamos encontrar marcas de expresión para el transportador vesicular de GABA (VIAAT) en el pLTN, ya que es un marcador del fenotipo GABAérgico (Gasnier, 2004). Y finalmente el marcador VGluT1 no se debería expresar en el Pbg o el pLTN, ya que este marcador, según se ha reportado en ratones, se observa principalmente en corteza, hipocampo y cerebelo (Barroso-Chinea y col., 2007).

El estudio del patrón de distribución de estos marcadores permitirá interpretar mejor la estructura y función del circuito istmal en roedores y en mamíferos en general, ayudando además a establecer comparaciones filogenéticas más detalladas entre los distintos grupos de vertebrados.

1.5 Hipótesis

En la región del istmo del *Octodon degus*: 1) El Pbg presenta la expresión de acetil colina transferasa (ChAT), del transportador vesicular de acetilcolina (VAcChT) y el transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2), de forma segregada en el núcleo, pudiéndose detectar la co-expresión de estos marcadores en una o ambas de las dos subdivisiones (rostral y caudal) del núcleo. 2) El pLTN presenta la expresión del transportador vesicular de GABA (VIAAT). 3) El transportador vesicular de glutamato (VGluT1) no se expresa ni en el Pbg ni en el pLTN.

1.6 Objetivos

Objetivo General

Caracterizar la identidad neuroquímica de la región del istmo en el *Octodon degus* y comparar su patrón de expresión con sus núcleos homólogos en vertebrados.

Objetivos específicos

- 1) Diseño de partidores, clonación a partir de cDNA de mesencéfalo de *Octodon degus* y síntesis de sondas de RNA para ChAT, VAcChT, VGluT1, VGluT2 y VIAAT.
- 2) Estudiar mediante técnicas de Hibridación in situ la expresión de ChAT, VAcChT, VGluT1, VGluT2 y VIAAT mRNA en la región del istmo en estadios adultos.
- 3) Estudiar utilizando doble marca, mediante técnicas de Inmunohistoquímica fluorescente (IF) e Hibridación in situ fluorescente (FISH), la expresión de la proteína de ChAT y de mRNA de VGluT2 en las neuronas de la región del istmo.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de animales

Para los experimentos fueron utilizados 19 ejemplares de Degus (*Octodon Degus*), adultos de ambos sexos, con edades que fluctuaban entre los 8 y los 12 meses, provenientes del biotério de la Facultad de Biología de la P. Universidad Católica de Chile. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y en conformidad con las directivas de la NIH (National Institute of Health) en el uso de animales e investigación experimental.

2.2 Procedimientos histológicos

Los Degus fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina (3/1) y perfundidos trans-cardialmente con suero salino NaCl 0,9% seguido de una solución de PFA 4%. Los cerebros fueron extraídos del cráneo y mantenidos 12 horas en solución PFA 4% y luego en sacarosa 30%. Para los ensayos de Hibridación in situ cromogénica y fluorescente e Inmunohistoquímica fluorescente el tejido fue cortado en micrótomos de congelación a -28°C para obtener rebanadas de 60 micrones. Los cerebros fueron seccionados en series dependiendo de la orientación del corte. Las secciones coronales fueron divididas en 3 series y las secciones sagitales fueron divididas en 4 series (2 series para cada hemisferio). No todas las series fueron destinadas a ensayos de ISH, algunas de ellas se utilizaron en ensayos de IH destinados a otros estudios. Algunas de las secciones para-sagitales no presentan la región dorsal del cerebro, ya que esta región fue cortada en

otro plano para ser utilizada en ensayos de Hibridación in situ incluidos en otro estudio de colaboración.

2.3 Técnicas de Biología molecular

Con la finalidad de obtener ribosondas para ser utilizadas en el procedimiento de Hibridación in situ (ISH) en el *Degus*, se realizaron variados procedimientos que requirieron diversas técnicas de biología molecular, las que se describen a continuación.

2.3.1 Diseño de sondas y partidores

Las sondas de RNA fueron diseñadas a partir de secuencias de RNA mensajeros publicadas para el *Octodon degus*, en Ensemble Genome Browser y National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para cada sonda, fue diseñado un par de partidores (forward y reverse), a excepción de ChAT que fueron diseñados 3 pares de partidores, los cuales fueron sintetizados comercialmente (IDT DNA, Coralville, IA). Las secuencias seleccionadas para el diseño de cada par de partidores, estaban localizadas en la región codificante de cada RNA mensajero correspondiente. A partir de RNA de *Octodon degus* se obtuvo DNA complementario (cDNA), el que fue utilizado como templado para cada uno de los pares de partidores diseñados, sintetizando finalmente las sondas de RNA para cada marcador. Una vez sintetizadas las sondas de RNA, se procedió a realizar diversos ensayos de Hibridación in situ (ISH) para caracterizar y seleccionar el mejor resultado (**Tabla 1**).

Tabla 1. Partidores finales utilizados y transcritos amplificados.

Marcador	Transcrito	Partidores	Fragmento Amplificado
ChAT	XM_004646967.1	Fwd: 5' -CATACCCAGACACGCTGGT- 3'	403 pb
		Rvse: 5' -TGGCACCATTCTGGCTGTAG-3'	(nucleótidos 564 al 966)
VACHT	XM_004646966.1	Fwd: 5' -CCCTTTTCGCATTGCTGAG- 3'	534 pb
		Rvse: 5' -TGAGGTAGACGCCCAAACG-3'	(nucleótidos 494 al 1027)
VGluT1	XM_004646455.1	Fwd: 5' -GGGGTAGTGAAGCCACAGTC- 3'	498 pb
		Rvse: 5' -GAAAGTGCATGGGGTGGAGA -3'	(nucleótidos 1991 al 2488)
VGluT2	XM_004642685.1	Fwd: 5' -CACTAAGTCGTACGGTGCCA- 3'	413 pb
		Rvse: 5' -TGGTGATGCATTCTAGCGCC-3'	(nucleótidos 1777 al 2189)
VIAAT	XM_004630902	Fwd: 5' -TCGTA CTGGGCTACCCTAC- 3'	572 pb
		Rvse: 5' -CAGGAAGATCTGCGACGTGT -3'	(nucleótidos 660 al 1231)

2.3.2 Extracción de RNA

Se procedió a la extracción de RNA mediante el método Fenol- Cloroformo. A un Degus adulto decapitado se le extrajo rápidamente su cerebro, del cual se separó aproximadamente 100 mg de tejido mesencefálico. La muestra fue homogenizada en 1 ml de RNAsolv Reagent (Omega, BioTek) utilizando un homogeneizador de vidrio Dounce. Se agregó 0,2 ml de cloroformo y se agitó en un vórtex por 15 seg, para luego ser incubada por 10 min en hielo. Luego se centrifugó a 12.000 g por 15 min y se recuperó el volumen superior incoloro. A este último se le añadió 0,5 ml de isopropanol, para luego agitar y dejar incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos, el pellet de RNA precipitado fue lavado con 1ml de alcohol 80% para nuevamente proceder a centrifugar a 7500 g durante 5 minutos. Cuidadosamente el alcohol fue eliminado, se dejó secar el pellet de RNA por 5 minutos y este fue re-suspendido en 70ul de agua libre de RNAsas.

2.3.3 Transcripción Reversa (RT)

El cDNA (DNA complementario) de hebra simple fue sintetizado utilizando la transcriptasa reversa Improm-II (RT; Improm-II Reverse transcriptase, Promega), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La mezcla de 1ug de RNA y 1ul de Oligo(dT), fue incubada por 5 minutos a 70°C. Luego fue agregado 1 ul de transcriptasa reversa, 2.5 ul 25mM MgCl₂, 1 ul RNAsin, 1ul de 10mM DNTP Mix y 4 ul 5x Reverse Transcription buffer [200 mM Tris-HCL pH 8,4, 500mM KCL] y fue incubado a 42°C por 60 min. Se finalizó la reacción a 70°C durante 15 minutos.

2.3.4 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

El cDNA obtenido fue utilizado como templado para la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Para cada gen se preparó una mezcla de reacción con DreamTaq Green PCR buffer Mater Mix (2X) (incluye DreamTaq DNA Polimerasa, 2X DreamTaq Green buffer, dNTPs, and 4 mM MgCl₂), partidior forward y partidior reverse (10 pmol/ul), cDNA y agua libre de RNAsas (**Tabla 2**).

Table 2. Amplificación de transcritos de DNA. Detalle del programa utilizado en el termociclador para la amplificación específica de fragmentos de DNA y de las temperaturas de alineamiento (T_m) utilizadas para cada gen.

Fase del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Gen	T _m
Desnaturalización Inicial	94°C	1 ' "	1	ChAT	57.4°C
Desnaturalización	94°C	30 " "		VChT	57°C
Alineamiento	T _m	60 " "	35	VGluT1	57.4°C
Extensión	72°C	50 " "		VGluT2	58°C
Extensión Final	72°C	10 ' "	1	VIAAT	58°C

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,5% (Fast Red 0,025%) y luego bajo la luz UV se reconoció el tamaño del fragmento esperado para cada marcador. Se identificaron bandas cercanas a los 500 pares de bases (pb) en el caso de VACHT, VGluT1 y VIAAT, una banda cercana a las 400 pb en el caso de ChAT y una banda cercana a los 250 pb en el caso de VGluT2 (**Figura 8**). Para la extracción desde el gel de los fragmentos de DNA de doble hebra se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit siguiendo las recomendaciones indicadas por el fabricante.

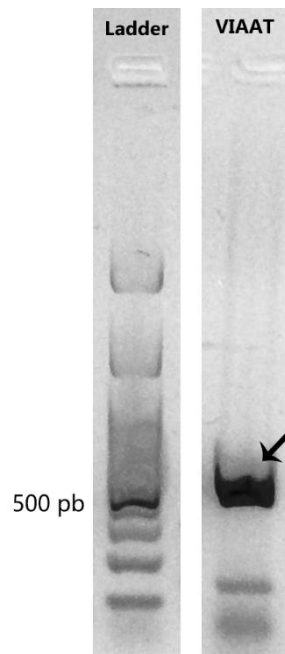


Figure 8. Electroforesis para cDNA amplificado. Se observa la separación electroforética de fragmentos específicos de DNA amplificados por RT-PCR, a la izquierda la escala de referencia (Ladder) nos indica que la banda amplificada tiene un tamaño aproximado de 570 pb. La banda indicada corresponde a la amplificación por PCR de un fragmento del gen VIAAT.

2.3.5 Clonación

Las 5 secuencias específicas de DNA doble hebra obtenidas, fueron clonadas dentro de un vector plasmidial (pGEM-T Easy Vector Systems, Promega) (**Figura 9**). Para cada ligación se realizó una mezcla de reacción compuesta de 5 ul 2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA ligase, 0,5 ul pGEM-T Easy Vector, 5 ul Producto de PCR y 1 ul T4 DNA ligase. Esta se dejó incubando a 4°C durante la noche.

Fueron transformadas 50 ul de bacterias DH5 α competentes (Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ Competent Cells, Invitrogen) añadiendo 10 ul de pGEM-T Easy ligado con el fragmento correspondiente e incubadas por 40 minutos en hielo. Luego se les dio un choque térmico por 45 segundo a 42°C y se volvieron al hielo por 2 minutos. En una solución de 1 ml de LB Broth (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0,5%, Agar 1,5%, NaCl 1%), se agregaron las bacterias transformadas y se incubaron a 37°C y 270 rpm por 1 hora.

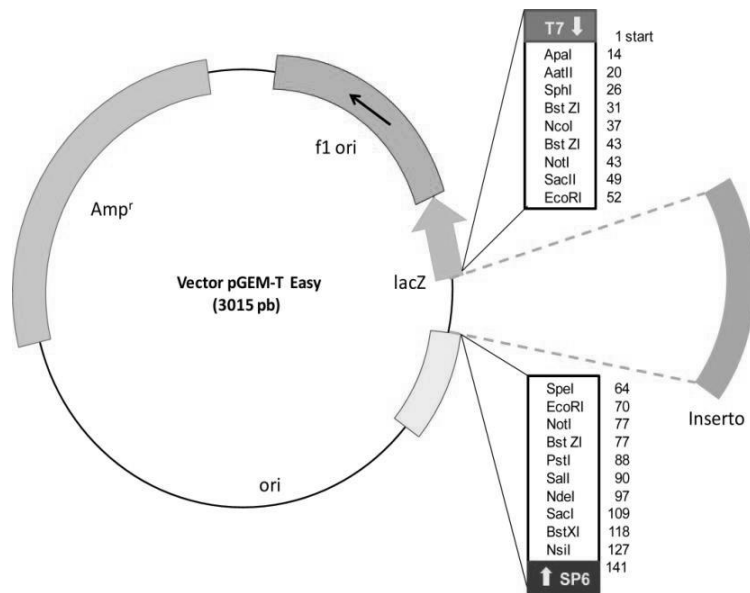


Figure 9. Mapa del plásmido pGEM-T Easy. Se muestran principales componentes del vector y el sitio de inserción del fragmento de ADN exógeno.

A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 2 min, una vez descartado el sobrenadante, se procedió a sembrar las bacterias transformadas en placas Petri con medio LB-Agar-XGAL (2.5% LB Broth, MO BIO, Carlsbad, CA; 2% Agar, Bacto Agar BD, Sparks, MD; 40 ug/ml XGAL, US Biological, Swampscott, MA). Se incubaron a 37°C ON. Para la detección de los clones positivos, fue utilizado el método de selección de azul y blanco. Los clones positivos fueron amplificados en un medio de 50 ml LB-Ampicilina (Ampicilina 0,1ug/ ml, US Biological) a 37°C y 270 rpm durante la noche.

2.3.6 Purificación DNA plasmidial

El DNA plasmidial fue purificado utilizando kits comerciales de Miniprep (QIAprep Spin Miniprep Kit Qiagen, Valencia, CA o E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I, Q-spin, Omega, BioTek) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA purificado fue comercialmente secuenciado por el servicio de secuenciación de la P. Universidad Católica de Chile, para ser comparado con las secuencias publicadas y conocer la orientación del inserto (forward o reverse) en el plásmido.

2.3.7 Linearización del plásmido por endonucleasas

Para la obtención del DNA templado para la síntesis de la sonda de RNA, el DNA plasmidial purificado fue linearizado. La mezcla de reacción estuvo compuesta por el DNA plasmidial, en el volumen adecuado para obtener una concentración final de entre 5 – 10 ug, 1.5 ul de la correspondiente enzima de restricción, 5ul de buffer de restricción 10X, para finalmente ajustar el volumen a 50 ul con agua libre de nucleasas. La mezcla

fue incubada por 2 horas a 37°C. La reacción fue detenida mediante un golpe de calor, con la temperatura indicada por el fabricante durante 20 min. Las enzimas de restricción utilizadas fueron ApaI, NcoI o HincII, seleccionadas según la orientación del inserto en el plásmido, con el fin de obtener una secuencia anti-sentido para la síntesis de la sonda de RNA para cada secuencia. También se verificó la ausencia de sitios de cortes dentro del inserto, a través del sitio web NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) (**Tabla 3**).

Table 3. Detalles para el procedimiento de linearización del plásmido. Partidor de secuenciación, orientación del inserto y enzimas usadas en el proceso de linearización plasmidial para proceder a la síntesis de una sonda de RNA anti-sentido.

Gen	Partidor de Secuenciación	Orientación del Inserto	Enzima de restricción	Inactivación de Enzima de restricción	Enzima RNA Polimerasa
ChAT	M13pUC Fwd	Reverse	HincII	65°C por 20'	T7
VChT	M13pUC Fwd	Forward	ApaI	65°C por 20'	SP6
VGluT1	M13pUC Fwd	Forward	ApaI	65°C por 20'	SP6
VGluT2	M13pUC Fwd	Forward	NcoI	80°C por 20'	SP6
VIAAT	M13pUC Fwd	Forward	NcoI	80°C por 20'	SP6

Para corroborar que el plásmido efectivamente fue cortado en un solo sitio de corte, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5%; Fast Red 0,025%, conteniendo como muestras el DNA circular y el DNA lineal (**Figura 10**). Una vez verificada la obtención de DNA plasmidial lineal, se procedió a su purificación mediante el uso de E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega, BioTek).

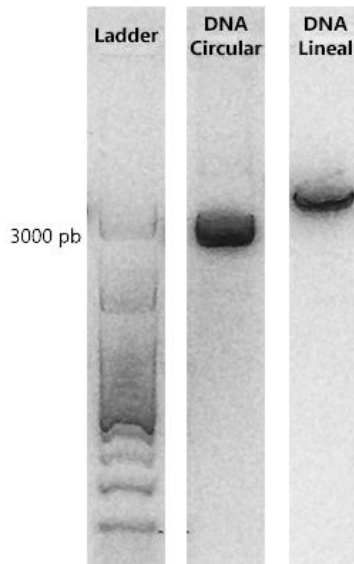


Figure 10. Electroforesis control DNA plasmidial circular y DNA plasmidial lineal. Se observa una diferencia en la tasa de migración de ambas bandas, el DNA plasmidial lineal presenta una menor velocidad de migración en comparación al DNA plasmidial circular debido a su enrollamiento. Se observa solo una banda en el DNA lineal, lo que corrobora que la enzima de restricción solo cortó en un sitio de en el plásmido. Ladder: Escala con los pesos moleculares de referencia.

2.3.8 Síntesis de sondas de RNA o Transcripción in vitro.

El DNA lineal obtenido fue utilizado como templado para la síntesis de la sonda de RNA. Las sondas fueron sintetizadas utilizando desoxinucleótidos (dNTPs) marcados con Digoxigenina. La mezcla de reacción consistió en 1ug de DNA plasmidial lineal, 2ul buffer de transcripción 10X, 2ul dNTP marcados con Digoxigenina (DIG RNA Labeling Mix, Roche), 1ul RNAsin, 1 ul RNA polimerasa y agua libre de RNAsas. Las reacciones se incubaron a 37°C por 2 horas para ambas enzimas T7/SP6. (Tabla 3). Se puso a incubar 2 horas y media a 37°C. Luego se le añadieron 2μL de DNAsaI y se incubó 15 minutos a 37°C, para eliminar el DNA. Se paró la reacción añadiendo 1μL del quelante EDTA 0.5M

pH 8. Luego se añadió a las sondas una solución previamente enfriada de 2,5 ul LiCl 4M y 75 ul etanol 100% la que se dejó precipitar durante al menos 2 horas o durante la noche a -80°C .

A continuación, se procedió con la purificación de las sondas, centrifugando cada reacción a una velocidad máxima (13.000 rpm) por 30 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 300ul de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones previas durante 5 min. Se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min y luego se resuspendió con 40ul de agua libre de nucleasas. Para finalmente añadirle 40ul de formamida y 2 ul de RNAlater. A continuación, se corrió un gel de agarosa 1,5% (Fast Red 0,025%) para comprobar que la sonda había sido sintetizada (**Figura 11**).

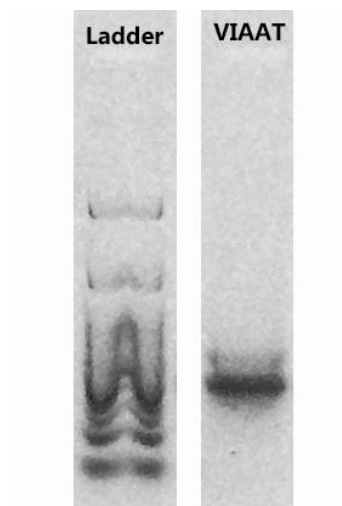


Figure 11. Electroforesis de RNA. Gel de agarosa al 1,5% para visualizar la ribsonda obtenida. Se observa la sonda de RNA para VIAAT.

2.4 Hibridación in situ

Para la implementación de ensayos de Hibridación in situ en las secciones de cerebro del *Octodon degus*, se utilizó un protocolo de base descrito por (González-Cabrera y col., 2015), el cual durante el proceso experimental fue ajustado con la finalidad de obtener mejores resultados en los ensayos de ISH.

La primera etapa del ensayo consiste en hibridar la ribosonda anti-sentido marcada con Digoxigenina con los mRNA del tejido, formándose así doble híbridos RNA-RNA. La segunda etapa permite que los fragmentos Fab de los anticuerpos acoplados a la enzima fosfatasa alcalina (AP) o a la enzima peroxidasa (POD), que están dirigidos contra la digoxigenina, se unan a nuestra ribosonda. Numerosos fragmentos Fab de anticuerpos se pegan a una sola ribosonda, potenciando el resultado de la reacción. En la última etapa, (1) Para la ISH cromogénica, posterior a la aplicación del anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP), se añaden los sustratos NBT/BCIP que reaccionan con la fosfatasa alcalina, los cuales producen una reacción cromógena azul oscura en el citoplasma de las células que contienen el mRNA hibridado con la ribosonda de interés. (2) Para la Hibridación in situ fluorescente (FISH) se utilizó el método de amplificación de la señal con Tiramida (TSA). El método de TSA-FISH, se emplea posterior a la aplicación del anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a la enzima peroxidasa (anti-DIG-POD) y se procede a agregar las moléculas de Tiramida conjugadas con Biotina. En presencia de H₂O₂, la peroxidasa cataliza la formación de radicales libres y de moléculas activadas de Tiramida-biotinilada, las cuales se depositan en sitios cercanos donde se ha localizado la actividad de la peroxidasa (Bobrow y col., 1989). Las numerosas moléculas de Tiramida-biotinilada que se posicionan alrededor del anticuerpo anti-

digoxigenina-POD, son detectadas aplicando streptavidina marcada con un fluorocromo, que se une a los depósitos de biotina y permite la visualización de la marca con fluorescencia. Para el método de TSA se siguió el protocolo descrito por Krabichler y col., 2017.

2.4.1 Hibridación in situ cromogénica (ISH)

El primer día (Día 1) a los cortes obtenidos se les realizó 2 lavados con PBS 1X con Tween 0.1% (PBSTw), luego se incubaron los cortes durante 10 min en solución de acetilación (625 ul Trietanol-amina, 88 ul Ácido clorhídrico y 125 ul de anhídrido acético diluidos en 50 ml de agua pura). Se lavaron 3 veces con PBSTw. Luego se incubaron por 10 minutos en una solución PBSTw/Proteinasas K (10ug/ ml) a 37°C. Se realizó un lavado rápido con PBSTw para luego post-fijar el tejido en una solución de PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBSTw y se pre-hibridó por 3 horas a 65°C con buffer de hibridación (**Tabla 4**). Posteriormente se reemplazó por un nuevo buffer de hibridación precalentado a 57°C con la sonda correspondiente (30 – 60 ng/ml) y se procedió a hibridar durante la noche a 57°C.

Al día siguiente (Día 2), realizaron dos lavados de 30 minutos a 57°C con Solución A (5X SSC pH 5.3, 50% Formamida, 1% SDS y agua filtrada), tres lavados de 30 minutos a 57°C con Solución B (2.5X SSC pH 5.3, 50% Formamida, 1% Tween y agua filtrada). Se realizaron dos lavados rápidos de 5 min con MABw (100mM Acido Maleico, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20 y agua filtrada, ajustado a pH 7.5). Se incubó por 2 a 3 horas a temperatura ambiente en Solución de bloqueo (Blocking Buffer Reagent 2%, Heat

Inactivated Goat Serum (HINGGS) 5% en MABw). Finalmente se reemplazó por una nueva Solución de bloqueo más el anticuerpo anti-Digoxigenina-AP, Fab fragment (Roche) (1/2000) y se dejó incubando durante la noche a 4°C.

Table 4. Componentes del Buffer de Hibridación. Protocolo utilizado para preparar la solución del Buffer de Hibridación.

Buffer de Hibridación	
Reactivo	Concentración
Formamida	50 %
SSC 20X	1.3X pH 5.3
EDTA 0.5M pH 8	5mM
RNA yeast	200 ug/ml
Tween 20	0.5 %
CHAPS	0.5 %
Heparina	100 ug/ml
Agua bidestilada estéril	Razar a 50 ml

Al día siguiente (Día 3) las secciones se lavaron 6 veces (durante 30 minutos a temperatura ambiente con MABw. Posteriormente se lavaron con NTMT por 10 minutos a temperatura ambiente (100Mm Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ y agua filtrada). Y se incubaron en NTMT con NBT/BCIP y se dejó a revelar en oscuridad a 37°C. La reacción, dio un producto coloreado azulado donde se expresaba el mRNA en estudio y se detuvo con varios lavados en PBS con 1mM de EDTA.

2.4.2 Hibridación in situ Fluorescente (FISH)

El protocolo a seguir es casi exactamente igual que para la hibridación in situ cromogénica, salvo que en el Día 1 con el fin de disminuir la marca inespecífica, antes de comenzar con la reacción, los cortes fueron incubados por 10 minutos en una solución 3% peróxido de hidrogeno, 10% metanol, con el fin de inactivar las peroxidasas endógenas. Además, en el Día 2 luego de lavar los cortes con Solución A y Solución B. Se realizaron dos lavados rápidos de 5min con TNT (100mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20 y agua filtrada). Luego se incubó por 2 a 3 horas a temperatura ambiente en Solución de bloqueo (Blocking Buffer Reagent 1%, Heat Inactivated Horse Serum (HINHS) 1% en TNT). Finalmente se reemplazó por una nueva Solución de bloqueo más el anticuerpo anti-Digoxigenin-POD, Fab fragment (Roche) (1/300) y se dejó incubando durante la noche a 4°C.

En el Día 3 las secciones se lavaron 6 veces, durante 30 minutos a temperatura ambiente con TNT. Posteriormente se lavaron con 0.05M Buffer Borato, pH 8.5 por 10 min. Se incubaron en una solución de trabajo de Biotin-tyramide (IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany) (0.001% Biotin-tyramide y 0.0015% H₂O₂ en 0.05M Buffer Borato, pH 8.5), por 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se lavaron 3 veces en solución de PBS 1X. La detección final fue llevada a cabo con Streptavidin-Alexa-546 (1/500), en una solución de PBS 1X, 0,25% Tween 20) incubada por 2 horas a temperatura ambiente.

2.4.3 Técnica de inmunofluorescencia (IF) para ChAT

Las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS 1X. A modo de recuperación de epítotope, los cortes se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de Borohidrato de sodio 1% en PBS 1X. Luego fueron lavados 3 veces en PBS 1X. Luego se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo (4% HINHS, 0,1% Tween 20 en PBS). Los cortes fueron incubados en el anticuerpo primario Anti-ChAT (1/500), 0,1% Tween 20 y 3% HINHS en PBS 1X, a 4°C durante la noche. Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces con PBS 1X y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario por 2 horas, en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. La solución de reacción consistió en el anticuerpo secundario Anti-Goat IgG (Alexa Fluor® 488) hecho en burro (1/500), 0,1% Tween 20 y 3% HINHS en PBS 1X. Finalmente, los cortes se lavaron 3 veces en PBS, para luego observar las muestras bajo un microscopio de fluorescencia.

2.4.4 Técnicas de FISH combinada con IF

Esta técnica permite obtener doble marcaje sobre los mismos cortes. Los cortes deben procesarse primeramente mediante la FISH. Tras detener la reacción de FISH, bajo condiciones de oscuridad, las secciones se lavaron varias veces con PBS y se continuó con la IF, como fue descrito previamente (parágrafo 2.4.3).

2.4.5 Visualización y escaneado de las imágenes.

Los microscopios utilizados para la visualización de las imágenes fueron,

Olympus BX63 microscopio con una cámara digital anexada (DP26 color for brightfield) y Olympus Fluoview FV1000/BX61 microscopio confocal de barrido (Olympus, Tokyo, Japan). Por último, la elaboración de las figuras fue llevada a cabo mediante el uso de los programas informáticos Adobe PhotoShop CS6 y Adobe Illustrator CS6.

3 RESULTADOS

3.1 Diseño de partidores y síntesis de sondas de RNA.

Como se describió detalladamente en el capítulo de Materiales y Métodos, para la síntesis de las sondas de mRNA de ChAT, VACHT, VGluT1, VGluT2 y VIAAT fueron diseñados sus respectivos partidores a partir del genoma del *Octodon degus*. Todos los partidores diseñados amplifican secuencias localizadas en las regiones codificantes de sus correspondientes mRNA. Para cada una de las sondas se diseñó un par de partidores forward y reverse, a excepción de la sonda de ChAT, donde fueron diseñados 3 pares de partidores diferentes, ya que la secuencia amplificada con el primer par de partidores no amplificó la secuencia de ChAT esperada. Cada una de las sondas de mRNA del estudio fueron sintetizadas en promedio 3 veces durante el periodo experimental y cada nueva sonda fue utilizada en promedio en 5 ensayos de Hibridación in situ (ISH).

3.2 Ensayos de Hibridación in situ

Debido a que los ensayos de Hibridación in situ no fueron realizadas en un modelo animal experimental, se debió proceder al ajuste del protocolo inicial de ISH para mamíferos proporcionado por el Dr. Cristian González-Cabrera (ver sección de Materiales y Métodos). De un total de 50 ensayos de Hibridación in situ, se obtuvieron resultados concluyentes para ChAT, n = 5; VACHT, n = 5, VGluT1, n = 4, VGluT2, n = 9 y VIAAT, n = 5 y para ensayos de doble marca de Hibridación in situ e inmunohistoquímica fluorescente n=3.

3.3 Expresión específica para los ensayos de Hibridación in situ

Con el propósito de corroborar la especificidad de las sondas utilizadas, los ensayos de ISH se realizaron en todo el cerebro del *Octodon Degus*. Al analizar los cortes de cerebro, se evidenció que las marcas de expresión para cada una de las sondas sintetizadas fueron coherentes con la distribución anatómica colinérgica, glutamatérgica y GABAérgica del sistema nervioso central de mamíferos.

3.3.1 Expresión específica de ChAT y VACHT mRNA

En los cortes que se muestran a continuación, se pueden observar marcas de expresión específicas para los mRNA de ChAT y VACHT.

Se identificaron marcas de expresión para ChAT y VACHT mRNA en todas las estructuras comúnmente aceptadas como colinérgicas en el cerebro de mamíferos. Se observaron intensas marcas de expresión, con una distribución celular irregular y dispersa en las estructuras del cuerpo estriado (Str), en su región dorsal y ventral, como también en el tubérculo olfatorio (TO). Así también en el núcleo pedúnculo pontino (PPn) y en los núcleos de los nervios craneales, como el núcleo motor del nervio trigémino (V) y el núcleo motor del nervio facial (VII), se detectaron intensas marcas de expresión (**Figura 12**).

Por otro lado, no fueron detectado marcas de expresión para ChAT y VACHT mRNA en estructuras no colinérgicas, como el tálamo (Tal), colículo superior (SC) e hipocampo (Hip) (las últimas estructuras fueron analizadas en otros cortes no presentados).

Y finalmente se observaron débiles marcas de expresión para VAcHt mRNA en la corteza, no siendo detectado ChAT mRNA (**Figura 12**). Estas marcas de expresión han sido descritas como controversiales, al igual que en nuestros resultados, estudios previos han reportado pequeñas cantidades de células VAcHt inmunopositivas en la corteza, pero con débiles marcas de expresión (Schäfer y col., 1998). Así también otros estudios han detectado la presencia de células colinérgicas en la corteza en roedores, pero no en primates (Levey y col., 1984; Roghani y col., 1997).

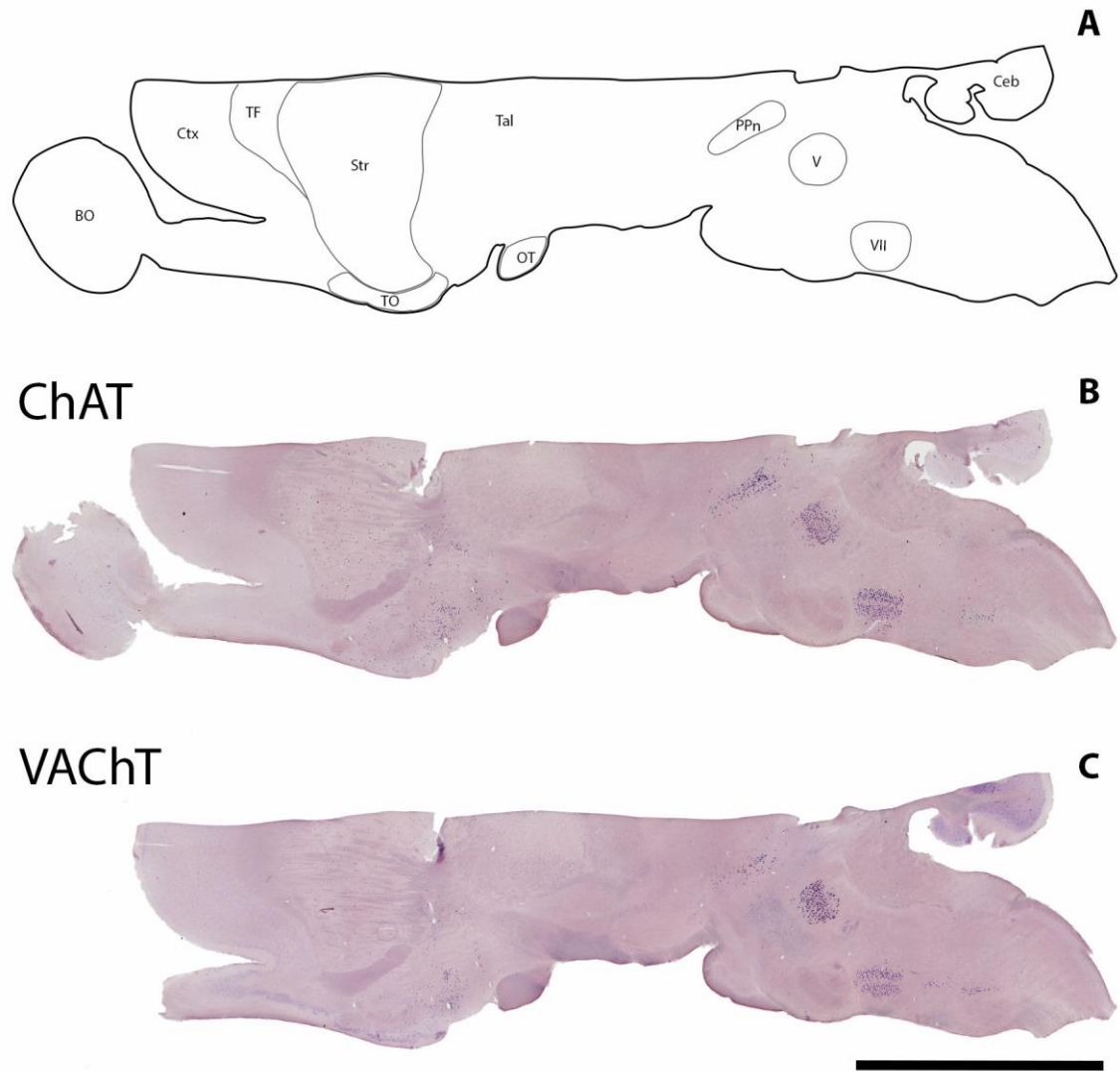


Figure 12. Especificidad de las sondas de ChAT y VACHT mRNA. Secciones para-sagitales del cerebro de *Octodon degus* mostrando las marcas de expresión positiva de ISH cromogénica para ChAT y VACHT. La región superior del cerebro, fue utilizada en un estudio de colaboración. A: Diagrama donde se señalan algunas de las principales estructuras cerebrales. B: Corte sagital con las marcas de expresión para ChAT mRNA. C: Corte sagital con las marcas de expresión para VACHT mRNA. Siglas: Corteza cerebral (Ctx), Bulbo olfatorio (BO), Tracto de fibras (TF), Cuerpo estriado (Str), Tubérculo Olfatorio (TO), Tálamo (Tal), Tractus opticus (OT), Núcleo pedúnculo pontino (PPn), Núcleo motor del nervio trigémino (V), Núcleo motor del nervio facial (VII), Cerebelo (Ceb). Barra de calibración = 5 mm.

3.3.2 Expresión específica de VGluT1, VGluT2 y VIAAT mRNA

En los cortes que se presentan a continuación se pueden apreciar señales específicas de expresión para los diferentes marcadores VGluT1, VGluT2 y VIAAT mRNA.

Los resultados para las marcas de expresión glutamatérgicas y GABAérgicas son coincidentes con lo reportado en estudios previos en mamíferos. De esta forma para los marcadores vesiculares de glutamato (VGluT1 y VGluT2 mRNA) observamos un patrón complementario de marcas de expresión en el SNC (Kaneko y Fujiyama, 2002). Fueron identificadas intensas marcas de expresión para VGluT1 mRNA en la corteza cerebral (Ctx), abarcando desde la lámina II a la VI. También se observaron intensas marcas de expresión en el hipocampo (Hip), tanto en las células piramidales del giro parahipocampal, como en las neuronas granulares del giro dentado y en las neuronas de la capa granular del cerebelo (Ceb), como ha sido descrito previamente en mamíferos (Kaneko y Fujiyama, 2002) (**Figura 13**). En contraste, para VGluT2 mRNA se evidenciaron intensas marcas de expresión en casi todas las células de los núcleos talámicos (Tal), en núcleos subtalámicos, en el pretectum (PT), en el colículo superior (SC), en el colículo inferior (IC), en núcleos vestibulares (VN), en el núcleo Pontino (PN) y en el complejo de la oliva superior (OS) (**Figura 13**). Por último, se identificó expresión de VIAAT mRNA en células reconocidas como GABAérgicas en mamíferos, en corteza cerebral (Ctx), en hipocampo (Hip), cuerpo estriado (Str), tubérculo Olfatorio (TO), zona incerta (Zi), colículo superior (SC), colículo Inferior (IC), y en estructuras predominantemente GABAérgicas como el pretectum (PT), núcleo reticular talámico (RT), y células de purkinje del Cerebelo (Ceb) (Wang y col., 2009; Rodrigo-Angulo y col., 2008) (**Figura 13**).

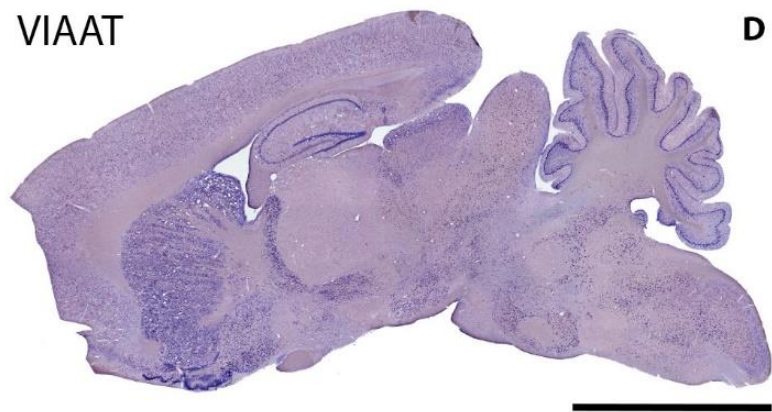
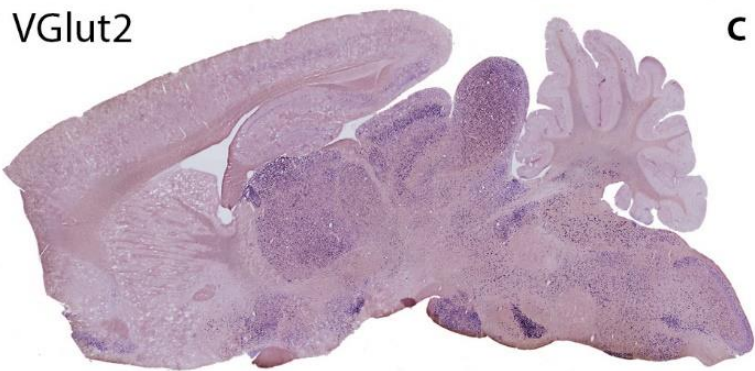
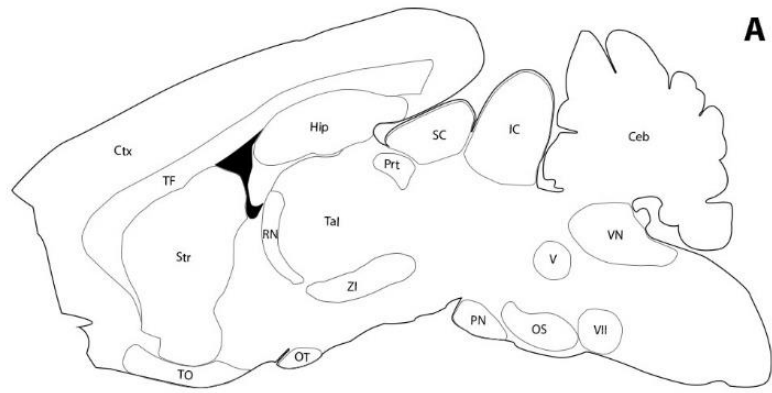


Figure 13. Especificidad de las sondas de VGluT1, VGluT2 y VIAAT mRNA. Se observan secciones para-sagitales del cerebro de *Octodon degus* mostrando las marcas de expresión positivas de ISH cromogénica para VGluT1, VGluT2 y VIAAT. **A:** Diagrama donde se señalan algunas de las principales estructuras cerebrales. **B:** Corte para-sagital con las marcas de expresión para VGluT1 mRNA. **C:** Corte para-sagital con las marcas de expresión para VGluT2 mRNA. **D:** Corte para-sagital con las marcas de expresión para VIAAT mRNA. Siglas: Corteza cerebral (Ctx), Tracto de fibras (TF), Cuerpo estriado (Str), Tubérculo Olfatorio (TO), Tálamo (Tal), Tractus opticus (OT), núcleo Reticular Talámico (RN), Zona incerta (ZI), Pretectum (Prt), hipocampo (Hip), Colículo superior (SC), Colículo inferior (IC), Cerebelo (Ceb), Núcleos vestibulares (VN), Núcleo motor del nervio trigémino (V), Núcleo motor del nervio facial (VII), Núcleo Pontino (PN) y Complejo de la oliva superior (OS). Barra de calibración = 5 mm.

3.4 Caracterización de la identidad neuroquímica de los núcleos del istmo

A través de ensayos de ISH y de doble marca de ISH e IH, se investigó la identidad neuroquímica de los núcleos de la región del istmo del Degus: el núcleo parabigémino (Pbg) y el área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN). Estos núcleos han sido considerados homólogos a los núcleos del istmo (NI) de otras especies (Wang y col., 2006; Mysore y Knudsen, 2011). Con este fin, se procedió al estudio detallado de la expresión de los marcadores ChAT, VACHT, VGluT1, VGluT2 y VIAAT mRNA en esta región.

3.4.1 Expresión de ChAT, VACHT y VGluT2 mRNA en el Pbg

En el Pbg del Degus se pueden distinguir dos subdivisiones, una región rostral (rostro-ventral) de una alta densidad celular, y una región caudal (caudo-dorsal) de menor densidad celular (ver Introducción y Discusión). En ambas subdivisiones del núcleo Pbg, se obtuvieron marcas de expresión para ChAT, VACHT y VGluT2 mRNA.

Para los marcadores colinérgicos, se observó en el Pbg una débil marca de expresión para VAcHt mRNA (**Figura 14**) y una mediana marca de expresión para ChAT mRNA (**Figura 15**). Sin embargo, los núcleos motores pertenecientes a las mismas secciones de cerebro presentaron intensas marcas de expresión para VAcHt y ChAT mRNA. Estos resultados en donde se evidencia una débil marca de expresión en el Pbg y una intensa expresión en núcleos motores, son coincidentes con estudios previos de ISH para ChAT en ratas (Oh y col., 1992).

Estos resultados fueron consistentes en varias muestras de cerebro (n = 10). Cabe también señalar que las secciones de tejido utilizados en los ensayos de ISH para ChAT y VAcHt fueron obtenidas a partir del mismo cerebro. Es más, los ensayos de ISH para ChAT y VAcHt fueron realizados en paralelo, es decir las secciones de cerebro fueron divididas en 2 series y sometidas de forma simultánea a las mismas condiciones experimentales. Por lo tanto, esta menor intensidad de la marca de expresión celular en Pbg no podría estar relacionada con la técnica de ISH, sino con una expresión diferencial del mRNA de VAcHt y ChAT en las células del Pbg (ver Discusión).

Para VGluT2 se observó una intensa marca de expresión en las células del núcleo Pbg (**Figura 16**), que parece estar presente en la mayoría o en todas las neuronas de ambas subdivisiones del núcleo. La intensa marca de expresión para VGluT2 fue semejante en todas las estructuras marcadas.

Por otro lado, no se observaron marcas de expresión para VIAAT y VGluT1 en las neuronas de ambas subdivisiones del núcleo parabigémino (**Figura 17 y 18**).

3.4.2 Expresión de VIAAT mRNA en el pLTN

En el área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN), adyacente al Pbg, encontramos marcas de expresión para VIAAT mRNA (**Figura 17**). Este dato resulta consistente con el carácter GABAérgico de las neuronas del núcleo Imc de aves (Veenman, y Reiner, 1994; Sun y col.,2005), considerado el núcleo homólogo al pLTN de mamíferos. Por otro lado, en pLTN no se obtuvieron marcas de expresión para VACHT, ChAT, VGluT2 y VGluT1 mRNA (**Figura 14, 15, 16 y 18**).

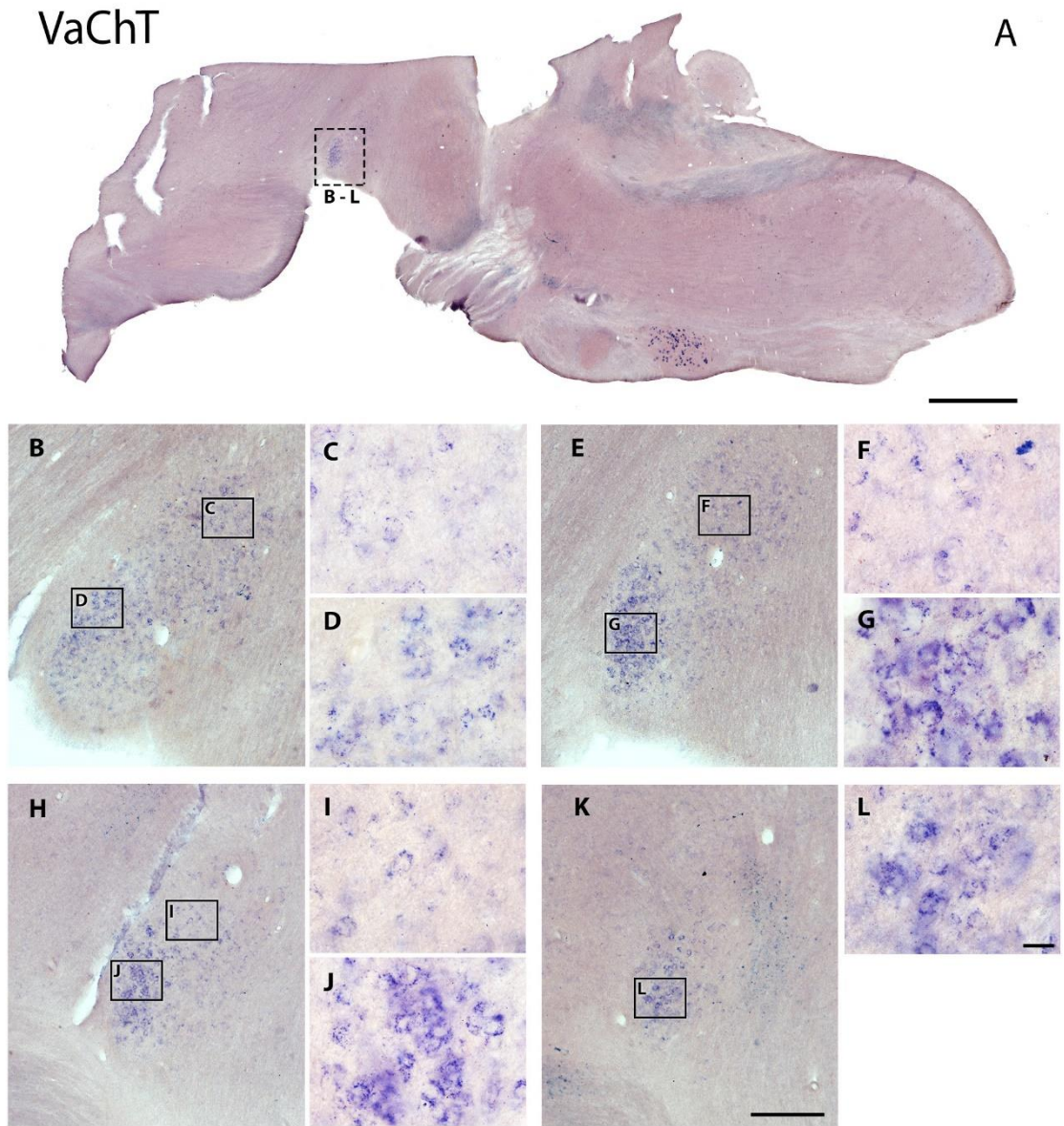


Figure 14. Expresión del mRNA del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) en el núcleo parabigémino (Pbg). A: Sección para-sagital del mesencéfalo de *Octodon degus* mostrando la reacción de ISH positiva para VACHT. B, E, H, K: Amplificación de la región del istmo en distintos planos para-sagitales desde lateral a medial, pudiéndose distinguir las dos subdivisiones del núcleo parabigémino. C, F, I: Amplificación del área caudo-dorsal del núcleo, donde se aprecia una menor densidad de somas neuronales. D, G, J, L: Amplificación del área rostro-ventral del núcleo, donde se aprecia una mayor densidad de somas neuronales, y una expresión de VACHT aparentemente más intensa. Barra de calibración=1 mm en A; 200um en B, E, H, K; 20um en C, D, I, J, F, G, L.

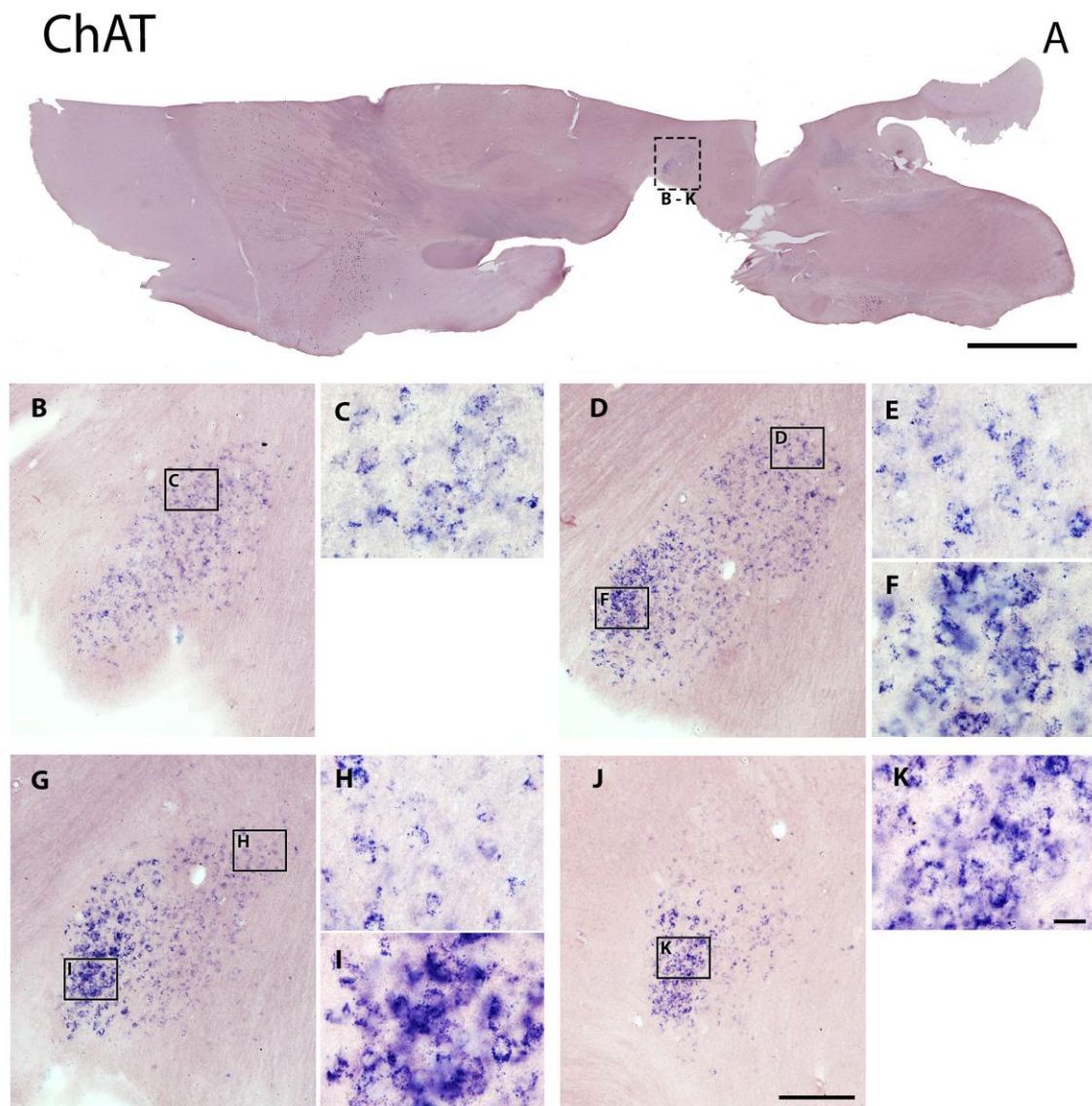


Figure 15. Expresión del mRNA de la enzima acetil colina transferasa (ChAT) en el núcleo parabriginio (Pbg). **A:** Sección para-sagital del telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo del *Octodon degus* mostrando la reacción de ISH positiva para VACHT. **B, D, G, J:** Amplificación de la región del istmo en distintos planos para-sagitales desde lateral a medial, donde se pueden apreciar la expresión de ChAT, principalmente en los cuerpos celulares del área rostro-ventral del núcleo. **C, E, H:** Amplificación del área caudo-dorsal del núcleo parabriginio, donde se aprecia una menor densidad de somas neuronales marcados. **F, I, K:** Amplificación del área rostro-ventral del núcleo parabriginio, donde se aprecia una mayor densidad de somas neuronales marcados. Barra de calibración=2 mm en **A**; 200um en **B, D, G, J**; 20um en **C, E, F, H, I, K**.

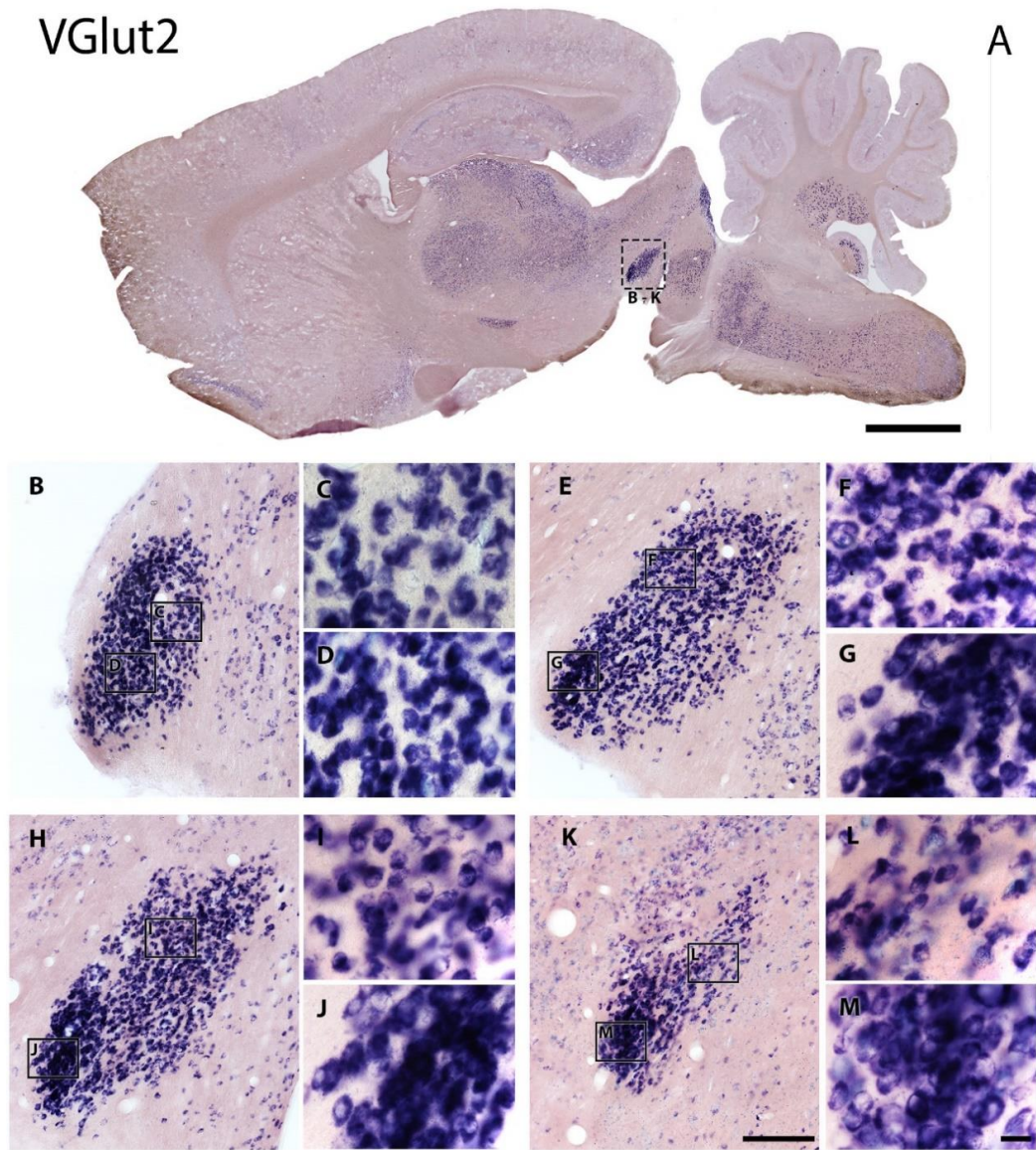


Figure 16. Expresión de mRNA del transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) en el núcleo parabigémino (Pbg). **A:** Sección para-sagital del telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo del *Octodon degus* mostrando la reacción de ISH positiva para VGLUT2. **B, E, H, K:** Amplificación de la región del istmo en distintos planos para-sagitales desde lateral a medial, donde se pueden apreciar la expresión de VGLUT2, principalmente en los cuerpos celulares del área rostral-ventral del núcleo. **C, F, I, L:** Amplificación del área caudo-dorsal del núcleo parabigémino, donde se aprecia una menor densidad de somas neuronales. **D, G, J, M:** Amplificación del área rostral-ventral del núcleo parabigémino, donde se aprecia una mayor densidad de somas neuronales. Barra de calibración=2 mm en A; 200um en B, E, H, K; 20um en C, D, F, G, I, J, L, M.

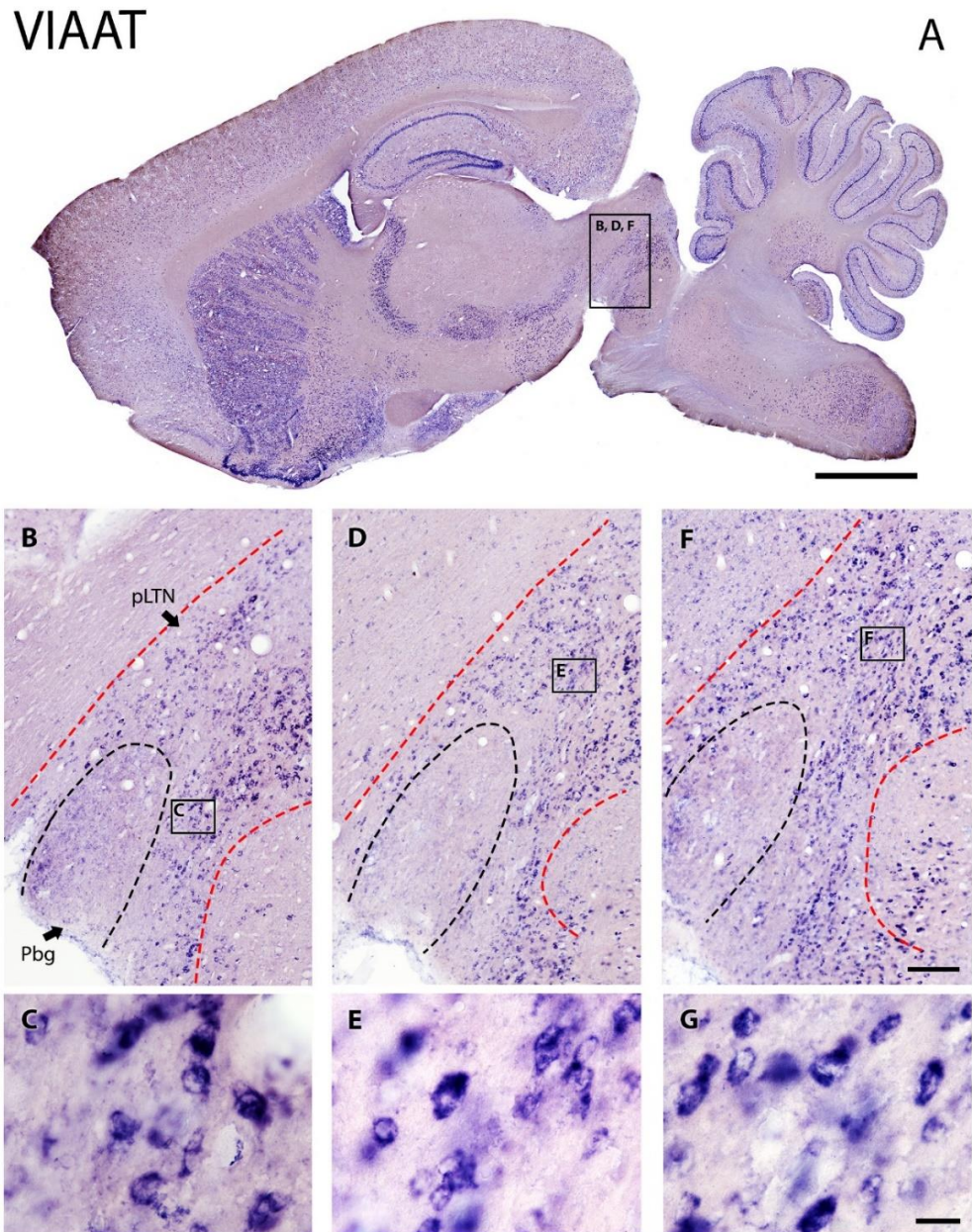


Figure 17. Expresión del mRNA del transportador vesicular de GABA (VIAAT) en la región del istmo. **A:** Sección para-sagital del telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo del *Octodon degus* mostrado la reacción de ISH positiva VIAAT. **B, D, F:** Amplificación de la región del istmo en distintos planos para sagitales desde lateral a medial, donde se pueden apreciar la expresión de VIAAT. evidenciándose una fuerte expresión en el área periparabrachial del núcleo tegmental lateral (pLTN), sin observar marca de expresión en el núcleo parabrachial (Pbg). Los límites del Pbg y del pLTN, están indicados con líneas punteadas negras y rojas respectivamente. **C, E, G:** Amplificación donde se aprecian los somas neuronales del pLTN. Barra de calibración=2 mm en A; 200um en B, D, F; 20um en C, E, G.

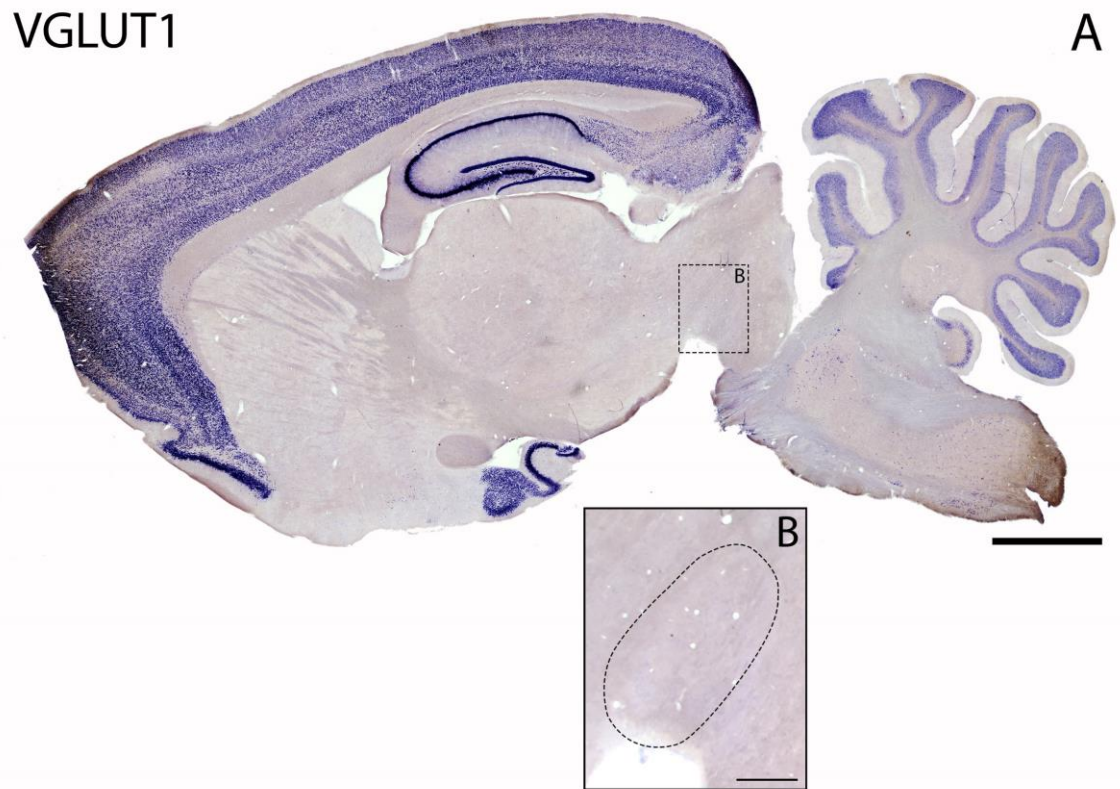


Figure 18. Expresión del mRNA para el transportador vesicular de glutamato 1 (VGluT1) en la región del istmo. A: Sección para-sagital del telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo mostrando la reacción de ISH positiva para el VGluT1 en el *Octodon degus*. Se observa una intensa marca en la corteza cerebral, hipocampo y capa granular del cerebelo. **B:** Amplificación de la región del istmo, se puede observar la ausencia de marcas de expresión para VGluT1. Barra de calibración=2 mm en A; 200um en B.

3.5 Ensayo de doble marca, mediante técnicas de Hibridación in situ e Inmunohistoquímica fluorescente

Los resultados obtenidos en los ensayos de ISH cromogénica sugieren fuertemente que la mayoría o quizá todas las neuronas del Pbg del Degus, al igual que las neuronas del núcleo Ipc de las aves (Islam y Atoji, 2008; González y col., 2015), expresan mRNA de marcadores glutamatérgicos y colinérgicos. Esto es interesante porque sugiere la posibilidad de una doble liberación de acetilcolina y glutamato por parte de las neuronas del Pbg.

Con el objetivo de dilucidar la expresión simultánea de VGluT2 y ChAT dentro de una misma neurona del núcleo parabigémino, se procedió a realizar ensayos de doble marca, combinando ISH e inmunohistoquímica. En secciones para-sagitales de cerebro, se realizaron ensayos de Hibridación in situ fluorescente (FISH) para VGluT2 mRNA y luego ensayos de Inmunohistoquímica fluorescente para ChAT (IF). Los resultados obtenidos muestran que todas las neuronas del núcleo parabigémino co-expresan VGluT2 mRNA y la proteína de ChAT (**Figura 19**). En las mismas secciones de cerebro, se identificaron estructuras control que no presentaron doble marca, con el fin de corroborar la especificidad del experimento. De esta forma, se pudieron observar regiones en donde un marcador estaba expresado intensamente sin que hubiese expresión del otro. Así, por ejemplo, encontramos que la región del cuerpo estriado (Str) de identidad colinérgica conocida, presenta inmunoreactividad positiva para ChAT y no presenta marcas de expresión para VGluT2 mRNA (**Figura 20**). Y que la región del colículo Inferior (Ic), presenta una intensa expresión para VGluT2 mRNA, con inmunoreactividad negativa para ChAT (**Figura 20**).

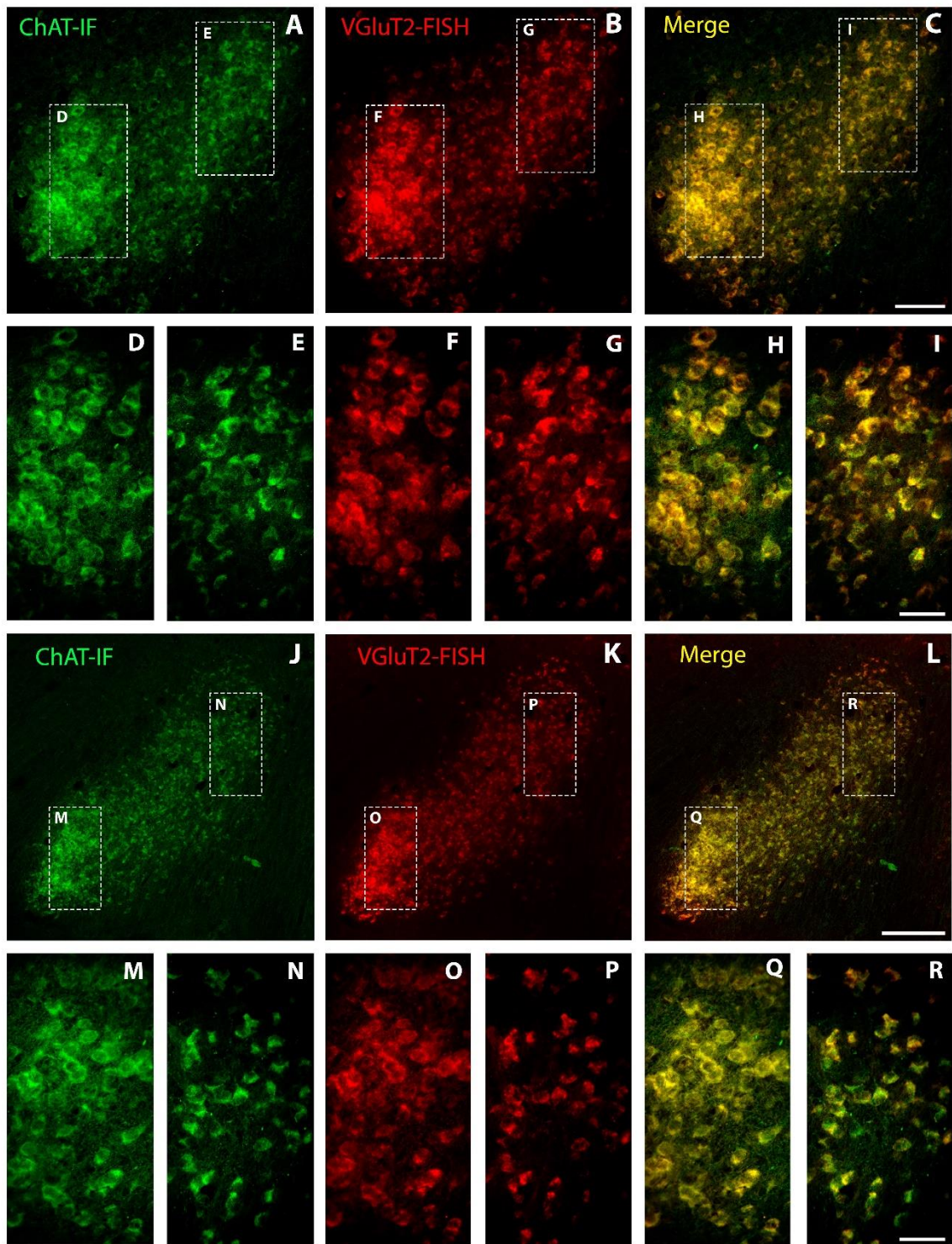


Figure 19. Ensayos de doble marca de Inmunohistoquímica fluorescente para ChAT (IF) e Hibridación in situ fluorescente (FISH) para VGluT2 mRNA en el núcleo parabigémino. A, J: Se observa la inmunoreactividad positiva para ChAT en el Pbg. **B, K:** Se observa la reacción de FISH positiva para VGluT2 mRNA en el Pbg. **C, L:** Se observa que todas las neuronas del núcleo presentan marcas de expresión positiva para ambos marcadores. **D, F, H, M, O, Q:** Amplificación del área rostro-ventral del núcleo parabigémino, donde se aprecia una mayor densidad de somas neuronales. **E, G, I, N, P, R:** Amplificación del área caudo-dorsal del núcleo parabigémino, donde se aprecia una menor densidad de somas neuronales. Secciones parasagitales del Pbg en dos planos, las imágenes de **A-I**, corresponden a secciones parasagitales más laterales del Pbg en relación a las imágenes de **J-R**. Barra de calibración = 100um en **A, B, C**; 200um en **J, K, L**; 50um en **D – I, M – R**.

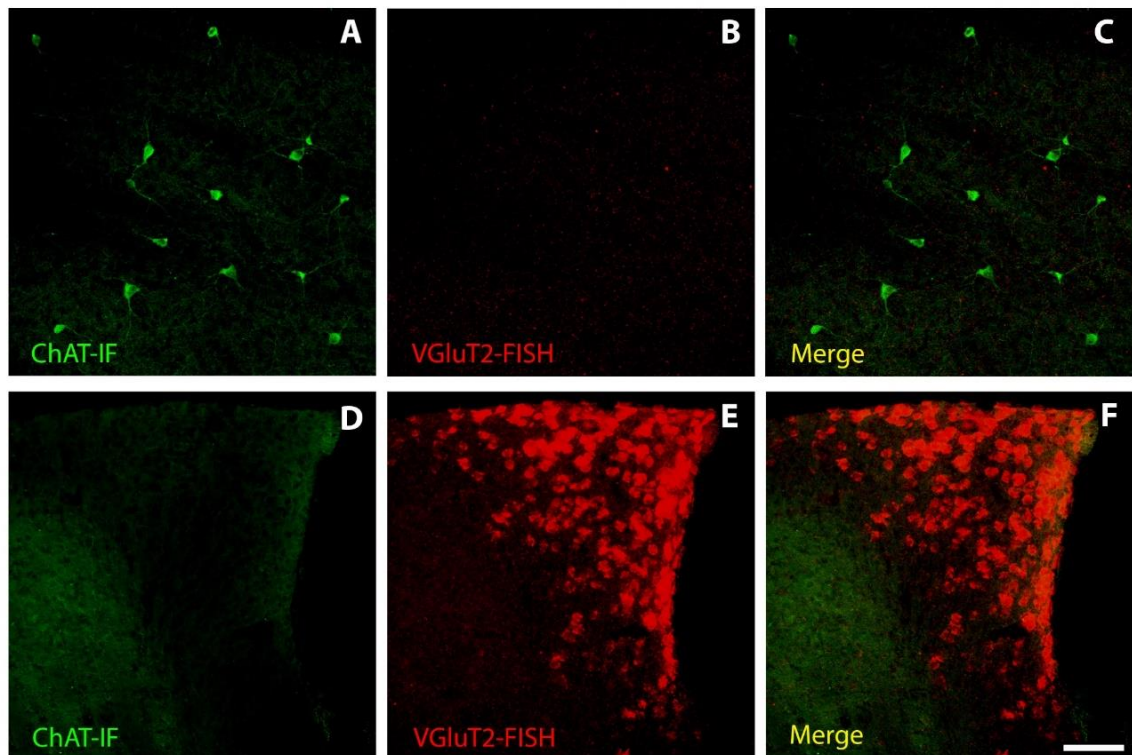


Figure 20. Ensayos de doble marca de Inmunohistoquímica fluorescente para ChAT (IF) e Hibridación in situ fluorescente (FISH) para VGluT2 mRNA. A, B, C: Se puede observar la inmunoreactividad positiva para ChAT y la ausencia de marcas de expresión positiva para VGluT2 mRNA en células neuronales del cuerpo estriado. **D, E, F:** Se puede observar la ausencia de inmunoreactividad para ChAT y las marcas de expresión positiva para VGluT2 mRNA en células neuronales del colículo inferior. Barra de calibración = 100um.

4 DISCUSION

En el presente estudio se describe por primera vez, mediante ensayos de ISH, el patrón de expresión de marcadores colinérgicos, glutamatérgicos y GABAérgicos en la región del istmo del *Octodon degus*. Además, mediante ensayos de doble marca de Hibridación in situ fluorescente (FISH) e Inmunohistoquímica fluorescente (IF), se estudió la co-expresión de VGluT2 mRNA y de la proteína de ChAT en el Pbg del *Octodon degus*.

Los resultados de los ensayos de ISH sugieren fuertemente un fenotipo colinérgico y glutamatérgico para el Pbg y un fenotipo GABAérgico para el pLTN. Los resultados de doble marca de FISH e IF muestran la co-expresión de acetilcolina y glutamato en todas las neuronas marcadas del Pbg, proponiendo la posibilidad de doble liberación de ambos neurotransmisores por parte de las neuronas del Pbg del *Octodon degus*.

Estos resultados aportan al entendimiento de las conexiones del Pbg y el pLTN sobre el SC, al proponer características excitatorias a las neuronas del Pbg e inhibitorias a las neuronas del pLTN. Nuestro estudio sugiere que estos núcleos podrían estar ejerciendo efectos de modulación sobre células del SC, similar a lo observado por parte de los NI sobre el TeO de las aves, que ejercen un efecto selectivo sobre la transmisión de señales retinianas hacia centros superiores.

4.1 Modelo experimental

Fue utilizado como modelo animal experimental, el *Octodon degus* (Degus), roedor histricomorfo de la familia Octodontidae, endémico de la zona central de Chile. Las características del sistema visual de este roedor diurno, lo hacen un organismo idóneo para ser utilizado en el estudio comparado del sistema visual de vertebrados. Estudios han mostrado que presenta claras adaptaciones visuales para la vida diurna y que la organización de sus proyecciones visuales centrales mantiene un patrón común a otros mamíferos roedores con sistemas visuales bien desarrollados (Jacobs y col., 2003; Vega-Zuniga y col., 2013).

4.2 Especificidad de las sondas de RNA

Los partidores forward y reverse, para la síntesis de las sondas, fueron diseñados basándonos en el genoma del *Octodon degus* (Degus) publicado en la base de datos online del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El proceso de la síntesis de las ribosondas fue iniciado con la extracción de RNA del mesencéfalo de *Octodon degus*, por lo tanto, nuestras sondas de RNA fueron específicas para esta especie.

Todas las sondas de RNA diseñadas entregaron marcas de expresión específicas en los ensayos de ISH. Las marcas de expresión fueron comparadas con estudios previos de ISH realizados en otros mamíferos y con el atlas del cerebro del ratón suministrado online por el Allen Institute (<http://mouse.brain-map.org/>). Se dedicó trabajo a que las marcas de expresión fueran intensas en las estructuras comúnmente aceptadas como colinérgicas,

glutamatérgicas y GABAérgicas, para poder interpretar con seguridad los resultados de las marcas en el Pbg y el pLTN (**Figura 12 y 13**).

4.3 Identidad neuroquímica colinérgica del Pbg

Los ensayos de ISH realizados en esta tesis le otorgan al Pbg un fenotipo colinérgico, ya que fueron detectadas en las neuronas del núcleo marcas de expresión para ChAT y VAcHt mRNA. Las marcas de expresión para ambos marcadores exhibieron diferencias de intensidad en el Pbg. Se observó para ChAT mRNA una marca de expresión de mediana intensidad y para VAcHt mRNA una débil marca de expresión en el Pbg (**Figura 14 y 15**). Esto se hizo más evidente al comparar la intensidad de las marcas entre el Pbg y otras estructuras colinérgicas intensamente marcadas, que no presentaban esta diferencia.

Con estos resultados, uno se podría cuestionar la efectividad del protocolo de ISH en cuanto a la permeabilización de las sondas de ChAT y VAcHt en el tejido. Si las sondas no estuviesen permeabilizando bien el tejido, uno esperaría encontrar una disminución de la intensidad de las marcas de expresión en todas las estructuras cerebrales, lo cual no fue el caso, ya que se evidenciaron intensas marcas de expresión en neuronas de otros núcleos, como el núcleo motor del nervio facial (VII) y el núcleo motor del nervio trigémino (V). Esto fue observado en las mismas secciones de cerebro que contenían al Pbg y también en otras secciones del ensayo de ISH para ChAT y VAcHt.

Con estos resultados, también uno podría presumir que ChAT y VAcHt mRNA están siendo expresados de forma diferencial en el Pbg, posiblemente como resultado del

control de la transcripción dentro del gen codificante de ChAT y VACHT, lo que podría estar generando niveles desiguales de expresión entre estos marcadores en el núcleo Pbg.

4.3.1 Locus de gen colinérgico

Diversos estudios han demostrado que ChAT y VACHT comparten un mismo locus genético, denominado locus del gen colinérgico (Mallet y col., 1998; Eiden, 1998). La estructura del locus del gen colinérgico es altamente conservada entre diversas especies (Mallet y col., 1998). En el primer intron del gen de ChAT encontramos la región codificante de VACHT, ambos con la misma orientación transcripcional (Erickson y col., 1994; Cervini y col., 1995). Análisis de la región 5' no codificante del locus del gen colinérgico en roedores ha identificado tres exones no-codificantes (R, N y M) y variados promotores en distintas posiciones dentro del locus. De esta forma, los diversos transcritos de mRNA para ChAT y VACHT son generados por el uso de diferentes promotores y eventos de splicing alternativo del mRNA dentro de la región 5' no codificante. Es así como se ha observado en ratas 5 mRNA distintos para ChAT y 5 mRNA distintos para VACHT (Misawa y col., 1992; Kengaku y col., 1993; Bejanin y col., 1994; Cervini y col., 1995;) (**Figura 21**). En roedores, se ha mostrado que todos los transcritos de mRNA codifican finalmente la misma proteína de ChAT (Mallet y col., 1998; Weihe y col., 1998; Oda, 1999).

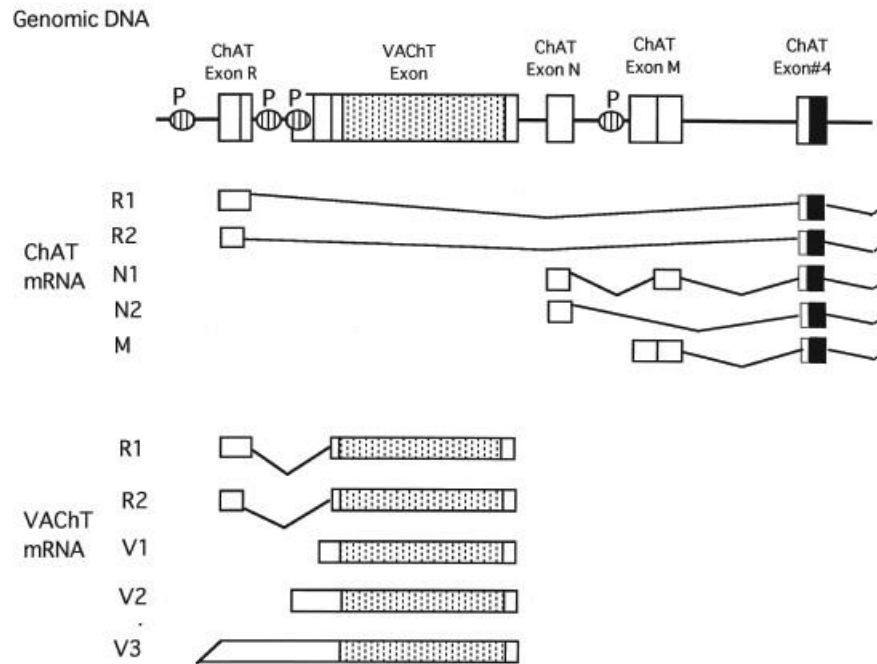


Figure 21. Representación esquemática del locus del gen colinérgico de la rata. Se observan las diferentes especies de mRNA de ChAT y VAcHT generados de diferentes promotores y de eventos de splicing alternativo. Bloques blancos, corresponden a exones no codificantes del gen ChAT y VAcHT. Bloques punteados corresponden a regiones codificantes para el gen VAcHT. Bloques negros corresponden a regiones codificantes para el gen ChAT. **P**, corresponde a los diferentes promotores.

Esta estrecha relación entre los genes de ChAT y VAcHT, junto a la presencia de más de un sitio de iniciación de transcripción, hacen sugerir la existencia de elementos regulatorios que pueden coordinar la expresión simultánea o independiente de ChAT y VAcHT (Berrard y col., 1995; Misawa y col., 1995; Schütz y col., 2001). De esta forma, se han observado expresiones desiguales de transcritos de ChAT y VAcHT en algunas estructuras colinérgicas en ratas durante el desarrollo y en estadios adultos (Hollera y col., 1996; Weihe y col., 1998). En neuronas colinérgicas de ratas adultas se han descrito tres categorías del patrón de expresión de ChAT y VAcHT mRNA. La primera categoría fue

observada en el sistema nervioso periférico, donde la expresión de VAcHt mRNA resultó ser relativamente mayor a ChAT mRNA. La segunda categoría se observa en los núcleos colinérgicos de la medula espinal, del tronco encefálico y del área basal del prosencéfalo, donde la expresión de VAcHt mRNA fue relativamente similar a ChAT mRNA. Y la tercera categoría corresponde al núcleo habenular medial, donde la expresión de ChAT mRNA resultó ser relativamente mayor a VAcHt mRNA (Schütz y col., 2001). Análisis de la región 5' no codificante del locus del gen colinérgico sugieren la presencia de elementos reguladores *cis*, pero los mecanismos exactos de cómo estos elementos estarían afectando la expresión de los transcritos aún no han sido elucidados (Lönnerberg y col., 1995, 1996).

En pollos, similar a lo observado en nuestros resultados, se ha evidenciado en los Ipc niveles diferenciales de expresión de VAcHt y ChAT mRNA, observando que ChAT mRNA se expresa con una intensidad moderada, mientras que el mRNA de VAcHt presenta una marca muy débil o nula (González-Cabrera y col., 2015). Así también, estudios de ISH para ChAT mRNA en ratas muestran de marcas expresión muy débiles en el núcleo Pbg e intensas marcas de expresión en núcleos motores, al igual que lo observado en este trabajo (Oh y col., 1992).

Considerando todos estos antecedentes, se puede sugerir que el patrón de débil expresión de VAcHt mRNA y de mediana expresión de ChAT mRNA en el Pbg del *Octodon degus* está relacionado con niveles de expresión diferenciales del locus del gen colinérgico para ambos transcritos, como consecuencia de mecanismos de regulación de la transcripción.

4.4 Expresión de marcadores glutamatérgicos

Glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios en el SNC de vertebrados. Las proteínas del transportador vesicular de glutamato (VGluT) regulan la liberación y el almacenamiento de glutamato dentro de las neuronas excitatorias. VGluT1 y VGluT2 son dos isoformas ampliamente encontradas en proyecciones glutamatérgicas dentro del sistema visual de mamíferos. Se ha descrito que ambas isoformas presentan una distribución complementaria dentro del SNC (Kaneko y Fujiyama, 2002). VGluT1 se expresa preferentemente en células de la corteza cerebral e hipocampo, mientras que VGluT2 se expresa principalmente en estructuras subcorticales, como el tálamo, el colículo superior y el pulvinar (Balarama y col., 2011, 2015; Baldwin y col., 2011, 2013; Barroso-Chinea y col., 2007, 2008). Estos antecedentes respaldan los resultados de esta tesis, donde se observó claramente un patrón complementario de expresión entre VGluT1 y VGluT2 mRNA en el cerebro del *Octodon degus*: Se obtuvieron intensas marcas de expresión de VGluT1 en células de la corteza cerebral, en el hipocampo y en las neuronas de la capa granular del cerebelo, mientras que se evidenció una intensa expresión de VGluT2 en células del tálamo, pretectum, colículo superior, colículo Inferior, núcleos vestibulares, núcleo Pontino y complejo de la oliva superior, entre otros. (**Figura 13**).

4.4.1 Identidad neuroquímica glutamatérgica del Pbg

Los ensayos de ISH realizados en esta tesis le otorgan al Pbg un fenotipo glutamatérgico, ya que en la mayoría o quizás en todas las neuronas de ambas subdivisiones del núcleo se detectaron intensas marcas de expresión para VGluT2 mRNA,

pero a su vez no se observaron marcas de expresión para VGluT1 mRNA en las neuronas del Pbg (**Figura 16 y 18**).

Estudios previos respaldan nuestros resultados, los cuales han evidenciado inmunoreactividad y marcas de expresión de ISH positivas para VGluT2 en palomas (Islam y Atoji, 2008; Atoji, 2011), y pollos (González-Cabrera y col., 2015). En mamíferos, a través de ensayos de inmunohistoquímica, también han evidenciado la naturaleza glutamatérgica del Pbg en ardillas (Baldwin y col., 2011) y en ratones (Shang y col., 2018).

Las intensas marcas de expresión de VGluT2 en el Pbg podrían en cierto modo estar compensando la menor expresión de los marcadores colinérgicos en el Pbg, similar a lo que se ha observado en estudios de ISH en los NI en el pollo, evidenciándose en el núcleo Ipc una débil expresión para ChAT y VACHT mRNA y una fuerte expresión para VGluT2 mRNA (González-Cabrera y col., 2015).

4.5 Identidad neuroquímica GABAérgica del pLTN

Los ensayos de ISH realizados en esta tesis sugieren para las neuronas del pLTN un fenotipo GABAérgico, producto de la evidencia de marcas de expresión para VIAAT mRNA. En el Pbg no se detectaron marcas de expresión para VIAAT mRNA (**Figura 17**).

Resultados similares a los expuestos en esta tesis se han obtenido en estudios previos de ensayos de inmunohistoquímica para GABA en la región del istmo del gato, en los cuales se evidenció una reactividad positiva para GABA en las células del pLTN y una reactividad negativa en las células del Pbg (Appell y Behan, 1990). En aves, a través de

ensayos de inmunohistoquímica, se ha mostrado la naturaleza GABAérgica del núcleo Imc en pollos (Tömböl y Németh, 1998; Sun y col., 2005) y palomas (Veenman, y Reiner, 1994).

Los resultados de este trabajo y los antecedentes presentados sustentan la posibilidad de homología del pLTN de mamíferos al Imc de las aves (Wang y col., 2004). Ambos núcleos establecen conexiones recíprocas con el SC/TeO y presumiblemente comparten la identidad neuroquímica GABAérgica.

4.6 Co-expresión de glutamato y acetilcolina en el Pbg

Los resultados de los ensayos de ISH implementados en el *Octodon degus* nos llevaron a evaluar la posibilidad de co-expresión de los marcadores de acetilcolina y glutamato por parte de las mismas neuronas en el Pbg. Para aproximarnos en la respuesta, decidimos realizar ensayos de doble marca de señales en las neuronas del Pbg. De esta forma se realizaron ensayos de Hibridación in situ fluorescente (FISH) para VGluT2 mRNA y ensayos Inmunohistoquímica fluorescente (IF) para ChAT, en las mismas secciones de cerebro en el *Octodon degus*.

La decisión de implementar la técnica de IF para ChAT junto a la FISH para VGluT2 y no la técnica de doble FISH, se fundamentó en dos razones, primero, porque en ratones y ratas se ha descrito que todos los transcritos de mRNA para ChAT, indiferente de sus regiones 5' no codificantes, codifican finalmente la misma proteína de ChAT (Oda, 1999), y segundo, porque nuestro laboratorio ya contaba con un protocolo establecido de inmunohistoquímica para ChAT en el *Octodon degus* (Deichler y col., 2013).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que todas las neuronas del Pbg que expresan VGluT2 mRNA coexpresan la proteína de ChAT (**Figura 19**). Esto sugiere la posibilidad de una doble liberación de acetilcolina y glutamato por parte de las neuronas del Pbg.

4.6.1 Doble liberación de un neurotransmisor

Actualmente, cada vez son más las evidencias que demuestran la capacidad de una neurona de liberar dos o más neurotransmisores. Por ejemplo, se ha encontrado doble liberación de GABA y acetilcolina en células amacrinas de la retina (O'Malley y col., 1992; Lee y col., 2010), doble liberación de GABA y glutamato en neuronas del sistema auditivo (Noh y col., 2010; Ito y col., 2011) y en las fibras musgosas en el hipocampo (Gutiérrez y col., 2003), doble liberación de monoaminas y glutamato en neuronas del mesencéfalo (Sulzer y col 1998; Bérubé-Carrière y col., 2009), y co-expresión de VGluT2 y GAD en subpoblaciones neuronales en mesencéfalo de ratas (Morales y Root., 2014).

En cuanto a los resultados de esta tesis, estudios previos han evidenciado la capacidad de doble liberación de acetilcolina y glutamato en mamíferos en neuronas de la habénula medial (Ren y col., 2011), en motoneuronas espinales (Nishimaru y col., 2005) y en interneuronas del cuerpo estriado (Guzman y col., 2011).

Es fundamental destacar que la capacidad de una neurona de liberar más de un neurotransmisor no necesariamente implica la capacidad de co-liberación. Se entiende por co-liberación, cuando ambos neurotransmisores están incluidos dentro de un mismo pool de vesículas sinápticas y son liberados de forma simultánea por parte de la vesícula

sináptica (El Mestikawy y col., 2011; Tritsch y col., 2012; Münster y col., 2016). Por otro lado, se habla de co-transmisión, cuando una neurona es capaz de liberar múltiples neurotransmisores sin que estos se encuentren en el mismo pool de vesículas sinápticas, pudiendo liberarse de forma independiente el uno del otro (O'Malley y col., 1992; Lee y col., 2010). Esta distinción es importante, ya que el modo de liberación de más de un neurotransmisor puede tener distintos impactos en la funcionalidad de los circuitos. (Hnasko y Edwards, 2012; Vaaga y col., 2014).

Ante estos antecedentes, nuestros resultados de co-expresión de los mRNA del transportador vesicular de glutamato y de ChAT, pero una débil expresión de VAChT, por parte de las neuronas del Pbg, nos permiten sugerir la posibilidad de una doble liberación de acetilcolina y glutamato, sin conocer aún el posible modo de liberación de estos neurotransmisores, ya que los transportadores respectivos podrían localizarse en diferentes vesículas. Las diferencias de expresión de estos marcadores hacen presumir que ambos neurotransmisores se estarían co-transmitiendo, liberándose con más frecuencia glutamato que acetilcolina.

4.7 Conectividad y funcionalidad del Pbg

El núcleo NI/Pbg en vertebrados presentan conexiones organizadas de forma recíproca y topográficas con el TeO/SC. En aves, los NI poseen proyecciones ipsilaterales recíprocas con el TeO y han sido intensamente estudiadas, mostrándose que los NI mediante señales de retroalimentación excitatorias e inhibitorias sobre las neuronas del TeO son capaces de modular selectivamente la propagación de las señales visuales

predominantes hacia los centros visuales superiores (Marin y col., 2007, 2012). De esta forma, en el proceso de la selección de un estímulo competitivo se ha descrito que tanto el Slu como el Ipc, los núcleos colinérgicos (Medina and Reiner, 1994; Wang y col., 2006; Marín y col., 2007) y glutamatérgicos de este circuito (Islam y Atoji, 2008; González-Cabrera y col., 2015), participan activamente en la transmisión de señales visuales retinianas al TeO, pero es principalmente el Ipc quien se encarga de seleccionar la actividad visual predominante que se propaga hacia centros superiores, ignorándose la función de Slu. El Imc, el núcleo GABAérgico del circuito, es quien a través de sus interacciones inhibitorias con Ipc, Slu y TeO provoca la selección de un estímulo sobre el otro, al inhibir la actividad en los lugares complementarios (Marin y col., 2007, 2012).

En el *Octodon degus*, el Pbg además de presentar proyecciones recíprocas ipsilaterales con el SC también envía proyecciones al SC contralateral, al igual que lo observado en anfibios (Dudkin y col., 2007) y otros mamíferos (Jiang y col., 1996; Usunoff y col., 2007). El arreglo de las proyecciones hacia el SC se encuentra organizado en relación a las dos subdivisiones del núcleo, siendo el área caudal del núcleo que proyecta al SC ipsilateral y el área rostral del núcleo que proyecta al SC contralateral. Una conectividad muy similar se ha descrito en otros mamíferos. En el gato, se distingue una división caudal que proyecta al SC ipsilateral y otra rostral que proyecta principalmente al SC contralateral (Graybiel, 1978; Edwards y col., 1979). En el hurón, también se identificaron principalmente dos áreas en el Pbg, un área caudo-ventral que proyecta principalmente al SC ipsilateral y un área rostro-dorsal que proyecta predominantemente al SC contralateral (Jiang y col., 1996).

El arreglo de las proyecciones del Pbg al SC en el *Octodon degus* son interesantes, ya que se ha observado que la proyección contralateral termina en el área medial del SC, donde se ve representada el área del campo visual binocular del Degus (Deichler 2016; Vega-Zuñiga y col., 2013). En ratones también se ha observado que esta región superior del campo visual es binocular (Wallace y col., 2012). Estas observaciones sugieren en primera instancia que el Pbg participaría en el procesamiento de la visión binocular, con ciertas similitudes a lo observado en anfibios (Dudkin y col., 2007). A su vez, se ha observado que al mostrar un estímulo de amenaza o un objeto en movimiento en esta región del campo visual superior, los animales realizan conductas innatas de escape (Yilmaz and Meister, 2013; De Franceschi y col., 2016), e incluso la estimulación con luz intermitente en esta área puede provocar paralización del animal (Liang y col., 2015). Interesantemente, estudios recientes han evidenciado al Pbg como un integrante activo de los circuitos neuronales involucrados en la generación de estas respuestas de defensa (Shang y col., 2015, 2018).

Estos antecedentes junto a los resultados de nuestra tesis nos permiten sugerir que el núcleo Pbg y pLTN del *Octodon degus* podrían estar ejerciendo un fuerte efecto de modulación sobre las células del SC, en el contexto de la selección de estímulos y la generación de respuestas de escape. Haciendo un paralelo a lo que se ha observado en aves, el Pbg podría ejercer, mediante la liberación de glutamato y acetilcolina, efectos excitatorios sobre circuitos del SC que median conductas de escape. Al mismo tiempo, el pLTN podría estar ejerciendo efectos inhibitorios sobre el Pbg y/o el SC que representan otras regiones del campo visual. Es posible además que ambos núcleos estarían modulando la transmisión de señales visuales, mediadas por las células TGCs del SC hacia

centros superiores (Deichler, 2016), similar a lo observado en aves y en el gato, donde se ha visto que los terminales del Pbg en el SC terminan en capas retino recipientes. Un estudio reciente en el ratón mostró que la estimulación de las TGCs del SC, y del núcleo talámico donde estas células se proyectan, produce conductas defensivas en el animal (Zingg y col., 2017). Un estudio acabado de los blancos sinápticos del Pbg en el SC sería de gran ayuda para clarificar estos temas.

5 CONCLUSIONES

El presente estudio ha contribuido significativamente a definir la identidad neuroquímica de los núcleos de la región del istmo del *Octodon degus*, señalándose un fenotipo glutamatérgico y colinérgico para las neuronas del núcleo parabigémino (Pbg) y un fenotipo presumiblemente inhibitorio, GABAérgico, para las neuronas del área periparabigeminal del núcleo tegmental lateral (pLTN).

Hemos definido también la co-expresión de marcadores de glutamato y acetilcolina en las neuronas del Pbg, sugiriendo fuertemente la capacidad de doble liberación de estos neurotransmisores por parte de las células del núcleo.

Estos resultados sustentan las propuestas de homología entre los núcleos de las regiones del istmo de mamíferos y aves: el Pbg sería homólogo a Ipc/ Slu y el pLTN sería homólogo al Imc. Además, nuestro estudio allana el camino para estudios futuros del circuito istmo-tectal en mamíferos y otros vertebrados.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Fondecyt 1151432 del Prof. Gonzalo Marin.

6 BIBLIOGRAFIA

Appell, P.P. and Behan, M., 1990. Sources of subcortical GABAergic projections to the superior colliculus in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 302(1), pp.143-158.

Asadollahi, A. and Knudsen, E.I., 2016. Spatially precise visual gain control mediated by a cholinergic circuit in the midbrain attention network. *Nature communications*, 7, p.13472.

Atoji, Y., 2011. Immunohistochemical localization of vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) in the central nervous system of the pigeon (*Columba livia*). *Journal of Comparative Neurology*, 519(14), pp.2887-2905.

Balaram, P., Takahata, T. and Kaas, J.H., 2011. VGLUT2 mRNA and protein expression in the visual thalamus and midbrain of prosimian galagos (*Otolemur garnetti*). *Eye and brain*, 3, p.5.

Balaram, P., Isaamullah, M., Petry, H.M., Bickford, M.E. and Kaas, J.H., 2015. Distributions of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the visual system of tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Journal of Comparative Neurology*, 523(12), pp.1792-1808.

Baldwin, M.K., Wong, P., Reed, J.L. and Kaas, J.H., 2011. Superior colliculus connections with visual thalamus in gray squirrels (*Sciurus carolinensis*): evidence for four subdivisions within the pulvinar complex. *Journal of Comparative Neurology*, 519(6), pp.1071-1094.

Baldwin, M.K., Balaram, P. and Kaas, J.H., 2013. Projections of the superior colliculus to the pulvinar in prosimian galagos (*Otolemur garnettii*) and VGLUT2 staining of the visual pulvinar. *Journal of Comparative Neurology*, 521(7), pp.1664-1682.

Barroso-Chinea, P., Castle, M., Aymerich, M.S., Pérez-Manso, M., Erro, E., Tuñón, T. and Lanciego, J.L., 2007. Expression of the mRNAs encoding for the vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the rat thalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 501(5), pp.703-715.

Barroso-Chinea, P., Castle, M., Aymerich, M.S. and Lanciego, J.L., 2008. Expression of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the cells of origin of the rat thalamostriatal pathway. *Journal of chemical neuroanatomy*, 35(1), pp.101-107.

Bejanin, S., Cervini, R., Mallet, J. and Berrard, S., 1994. A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35), pp.21944-21947.

Belekhova, M.G. and Kenigfest, N.B., 2014. Turtle isthmic complex of visual nuclei: Immunohistochemistry of gamma-aminobutyric acid, choline acetyltransferase, calcium-binding proteins and histochemistry of cytochrome oxidase activity. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 50(5), pp.435-447.

Berrard, S., Varoqui, H., Cervini, R., Israël, M., Mallet, J. and Diebler, M.F., 1995. Coregulation of two embedded gene products, choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter. *Journal of neurochemistry*, 65(2), pp.939-942.

Bérubé-Carrière, N., Riad, M., Dal Bo, G., Lévesque, D., Trudeau, L.É. and Descarries, L., 2009. The dual dopamine-glutamate phenotype of growing mesencephalic neurons regresses in mature rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 517(6), pp.873-891.

Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J. and Litt, G.J., 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification application to immunoassays. *Journal of immunological methods*, 125(1-2), pp.279-285.

Carrasco, D., Deichler, A., Mpodozis, J.,y Marín, G. 2014. Bilateral connections of a satellite nucleus in the midbrain tegmentum may mediate binocular interactions in the rodent superior colliculus. Poster presented at *Annual Meeting of the Chilean Society of Neuroscience*.

Cervini, R., Houhou, L., Béjanin, S., Mallet, J. and Berrard, S., 1995. Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), pp.24654-24657.

De Franceschi, G., Vivattanasarn, T., Saleem, A.B. and Solomon, S.G., 2016. Vision guides selection of freeze or flight defense strategies in mice. *Current Biology*, 26(16), pp.2150-2154.

Deichler, A., Carrasco, D., Mpodozis, J.,y Marín, G. 2013. Identification of the parabigeminal nucleus in the diurnal octodontid rodent *Octodon degus*. Poster presented at *28th Annual Congress of the Argentine Society of Reserch in Neuroscience*.

Deichler, A., Carrasco, D., Vega-Zuniga, T., Mpodozis, J.,y Marín, G. 2016. Bilateral projections of the parabigeminal nucleus to the superior colliculus in *Octodon degus*. Poster presented at *Neuroscience Meeting, Society of neuroscience, Sfn. San Diego, USA*.

Desimone, R. and Duncan, J., 1995. Neural mechanisms of selective visual attention. *Annual review of neuroscience*, 18(1), pp.193-222.

Domenici, L., Waldvogel, H.J., Matute, C. and Streit, P., 1988. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the pigeon brain. *Neuroscience*, 25(3), pp.931-950.

Drager, U.C. and Hubel, D.H., 1976. Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, 39(1), pp.91-101.

Dudkin, E.A. and Gruberg, E.R., 2003. Nucleus isthmi enhances calcium influx into optic nerve fiber terminals in *Rana pipiens*. *Brain research*, 969(1-2), pp.44-52.

Dudkin, E.A., Sheffield, J.B. and Gruberg, E.R., 2007. Combining visual information from the two eyes: the relationship between isthmotectal cells that project to ipsilateral and to contralateral optic tectum using fluorescent retrograde labels in the frog, *Rana pipiens*. *Journal of Comparative Neurology*, 502(1), pp.38-54.

Edwards, S.B., Ginsburgh, C.L., Henkel, C.K. and Stein, B.E., 1979. Sources of subcortical projections to the superior colliculus in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 184(2), pp.309-329.

Eiden, L.E., 1998. The cholinergic gene locus. *Journal of neurochemistry*, 70(6), pp.2227-2240.

El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, Å., Fortin, G.M., Descarries, L. and Trudeau, L.E., 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), p.204.

Erickson, J.D., Varoqui, H., Schäfer, M.K., Modi, W., Diebler, M.F., Weihe, E., Rand, J., Eiden, L.E., Bonner, T.I. and Usdin, T.B., 1994. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35), pp.21929-21932.

Faunes, M., Fernández, S., Gutiérrez-Ibáñez, C., Iwaniuk, A.N., Wylie, D.R., Mpodozis, J., Karten, H.J. and Marín, G., 2013. Laminar segregation of GABAergic neurons in the avian nucleus isthmi pars magnocellularis: a retrograde tracer and comparative study. *Journal of Comparative Neurology*, 521(8), pp.1727-1742.

Freneau Jr, R.T., Voglmaier, S., Seal, R.P. and Edwards, R.H., 2004. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends in neurosciences*, 27(2), pp.98-103.

Gasnier, B., 2004. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflügers Archiv*, 447(5), pp.756-759.

Gaupp, E. 1897. Die Metamerie des Schädels. *Ergebnisse Anat. Entwicklungsgesch.*, 7:793±885.

Goddard, C.A., Knudsen, E.I. and Huguenard, J.R., 2007. Intrinsic excitability of cholinergic neurons in the rat parabrachial nucleus. *Journal of neurophysiology*, 98(6), pp.3486-3493.

- González-Cabrera, C., Garrido-Charad, F., Roth, A. and Marín, G.J., 2015.** The isthmic nuclei providing parallel feedback connections to the avian tectum have different neurochemical identities: expression of glutamatergic and cholinergic markers in the chick (*Gallus gallus*). *Journal of Comparative Neurology*, 523(9), pp.1341-1358.
- Graybiel, A.M., 1978.** Organization of the nigrotectal connection: an experimental tracer study in the cat. *Brain research*, 143(2), pp.339-348.
- Gruberg, E.R. and Udin, S.B., 1978.** Topographic projections between the nucleus isthmi and the tectum of the frog *Rana pipiens*. *Journal of Comparative Neurology*, 179(3), pp.487-500.
- Gruberg, E., Dudkin, E., Wang, Y., Marín, G., Salas, C., Sentis, E., Letelier, J., Mpodozis, J., Malpeli, J., Cui, H. and Ma, R., 2006.** Influencing and interpreting visual input: the role of a visual feedback system. *The Journal of neuroscience*, 26(41), pp.10368-10371.
- Gutiérrez, R., Romo-Parra, H., Maqueda, J., Vivar, C., Ramírez, M., Morales, M.A. and Lamas, M., 2003.** Plasticity of the GABAergic phenotype of the “glutamatergic” granule cells of the rat dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 23(13), pp.5594-5598.
- Guzman, M.S., De Jaeger, X., Raulic, S., Souza, I.A., Li, A.X., Schmid, S., Menon, R.S., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Bartha, R. and Prado, V.F., 2011.** Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the striatum reveals regulation of behaviour by cholinergic-glutamatergic co-transmission. *PLoS biology*, 9(11), p.e1001194.
- Güntürkün, O. and Remy, M., 1990.** The topographical projection of the nucleus isthmi pars parvocellularis (Ipc) onto the tectum opticum in the pigeon. *Neuroscience letters*, 111(1), pp.18-22.
- Hellmann, B., Manns, M. and Güntürkün, O., 2001.** Nucleus isthmi, pars semilunaris as a key component of the tectofugal visual system in pigeons. *Journal of Comparative Neurology*, 436(2), pp.153-166.
- Hnasko, T.S. and Edwards, R.H., 2012.** Neurotransmitter corelease: mechanism and physiological role. *Annual review of physiology*, 74, pp.225-243.
- Hollera, T., Berse, B., Cermak, J.M., Diebler, M.F. and Blusztajn, J.K., 1996.** Differences in the developmental expression of the vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in the rat brain. *Neuroscience letters*, 212(2), pp.107-110.
- Hoshino, N., Tsurudome, K., Nakagawa, H. and Matsumoto, N., 2006.** Current source density analysis of contra- and ipsilateral isthmotectal connections of the frog. *Visual neuroscience*, 23(5), pp.713-719.

- Islam, M.R. and Atoji, Y., 2008.** Distribution of vesicular glutamate transporter 2 and glutamate receptor 1 mRNA in the central nervous system of the pigeon (*Columba livia*). *Journal of Comparative Neurology*, 511(5), pp.658-677.
- Ito, S. and Feldheim, D.A., 2018.** The Mouse Superior Colliculus: An Emerging Model for Studying Circuit Formation and Function. *Frontiers in neural circuits*, 12, p.10.
- Ito, T., Bishop, D.C. and Oliver, D.L., 2011.** Expression of glutamate and inhibitory amino acid vesicular transporters in the rodent auditory brainstem. *Journal of Comparative Neurology*, 519(2), pp.316-340.
- Jacobs, G.H., Calderone, J.B., Fenwick, J.A., Krogh, K. and Williams, G.A., 2003.** Visual adaptations in a diurnal rodent, *Octodon degus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 189(5), pp.347-361.
- Jiang, Z.D., King, A.J. and Moore, D.R., 1996.** Topographic organization of projection from the parabigeminal nucleus to the superior colliculus in the ferret revealed with fluorescent latex microspheres. *Brain research*, 743(1-2), pp.217-232.
- Kaneko, T. and Fujiyama, F., 2002.** Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neuroscience research*, 42(4), pp.243-250.
- Karten, H.J., Cox, K. and Mpodozis, J., 1997.** Two distinct populations of tectal neurons have unique connections within the retinotectoretinal pathway of the pigeon (*Columba livia*). *The Journal of comparative neurology*, 387(3), pp.449-465.
- Kengaku, M., Misawa, H. and Deguchi, T., 1993.** Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord. *Molecular brain research*, 18(1-2), pp.71-76.
- King, W.M. and Schmidt, J.T., 1991.** The long latency component of retinotectal transmission: enhancement by stimulation of nucleus isthmi or tectobulbar tract and block by nicotinic cholinergic antagonists. *Neuroscience*, 40(3), pp.701-712.
- Knudsen, E.I., 2011.** Control from below: the role of a midbrain network in spatial attention. *European Journal of Neuroscience*, 33(11), pp.1961-1972.
- Krabichler, Q., Vega-Zuniga, T., Carrasco, D., Fernandez, M., Gutiérrez-Ibáñez, C., Marín, G. and Luksch, H., 2017.** The centrifugal visual system of a palaeognathous bird, the Chilean Tinamou (*Nothoprocta perdicaria*). *Journal of Comparative Neurology*, 525(11), pp.2514-2534.
- Lee, S., Kim, K. and Zhou, Z.J., 2010.** Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron*, 68(6), pp.1159-1172.

- Levey, A.I., Wainer, B.H., Rye, D.B., Mufson, E.J. and Mesulam, M.M., 1984.** Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience*, 13(2), pp.341-353.
- Liang, F., Xiong, X.R., Zingg, B., Ji, X.Y., Zhang, L.I. and Tao, H.W., 2015.** Sensory cortical control of a visually induced arrest behavior via corticotectal projections. *Neuron*, 86(3), pp.755-767.
- Li, Z. and Fite, K.V., 2001.** GABAergic visual pathways in the frog *Rana pipiens*. *Visual neuroscience*, 18(3), pp.457-464.
- Lönnerberg, P., Lendahl, U., Funakoshi, H., Arhlund-Richter, L., Persson, H. and Ibáñez, C.F., 1995.** Regulatory region in choline acetyltransferase gene directs developmental and tissue-specific expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(9), pp.4046-4050.
- Lönnerberg, P., Schoenherr, C.J., Anderson, D.J. and Ibáñez, C.F., 1996.** Cell type-specific regulation of choline acetyltransferase gene expression role of the neuron-restrictive silencer element and cholinergic-specific enhancer sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), pp.33358-33365.
- Maczko, K.A., Knudsen, P.F. and Knudsen, E.I., 2006.** Auditory and visual space maps in the cholinergic nucleus isthmi pars parvocellularis of the barn owl. *Journal of Neuroscience*, 26(49), pp.12799-12806.
- Mallet, J., Houhou, L., Pajak, F., Oda, Y., Cervini, R., Bejanin, S. and Berrard, S., 1998.** The cholinergic locus: ChAT and VAcHT genes. *Journal of Physiology-paris*, 92(2), pp.145-147.
- Maunsell, J.H. and Cook, E.P., 2002.** The role of attention in visual processing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 357(1424), pp.1063-1072.
- Marín, G., Mpodozis, J., Sentis, E., Ossandón, T. and Letelier, J.C., 2005.** Oscillatory bursts in the optic tectum of birds represent re-entrant signals from the nucleus isthmi pars parvocellularis. *Journal of Neuroscience*, 25(30), pp.7081-7089.
- Marín, G., Salas, C., Sentis, E., Rojas, X., Letelier, J.C. and Mpodozis, J., 2007.** A cholinergic gating mechanism controlled by competitive interactions in the optic tectum of the pigeon. *Journal of Neuroscience*, 27(30), pp.8112-8121.
- Marín, G.J., Durán, E., Morales, C., González-Cabrera, C., Sentis, E., Mpodozis, J. and Letelier, J.C., 2012.** Attentional capture? Synchronized feedback signals from the isthmi boost retinal signals to higher visual areas. *Journal of Neuroscience*, 32(3), pp.1110-1122.

- Marín, O., Smeets, W.J. and González, A., 1997.** Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltl*) amphibians. *Journal of Comparative Neurology*, 382(4), pp.499-534.
- Medina, L. and Reiner, A., 1994.** Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *Journal of Comparative Neurology*, 342(4), pp.497-537.
- Misawa, H., Ishii, K. and Deguchi, T., 1992.** Gene expression of mouse choline acetyltransferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. *Journal of Biological Chemistry*, 267(28), pp.20392-20399.
- Morales, M. and Root, D.H., 2014.** Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*, 282, pp.60-68.
- Münster-Wandowski, A., Zander, J.F., Richter, K. and Ahnert-Hilger, G., 2016.** Co-existence of functionally different vesicular neurotransmitter transporters. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 8, p.4.
- Mysore, S.P. and Knudsen, E.I., 2011.** The role of a midbrain network in competitive stimulus selection. *Current opinion in neurobiology*, 21(4), pp.653-660.
- Nishimaru, H., Restrepo, C.E., Ryge, J., Yanagawa, Y. and Kiehn, O., 2005.** Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), pp.5245-5249.
- Noh, J., Seal, R.P., Garver, J.A., Edwards, R.H. and Kandler, K., 2010.** Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nature neuroscience*, 13(2), p.232.
- Oda, Y., 1999.** Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology international*, 49(11), pp.921-937.
- Oh, J.D., Woolf, N.J., Roghani, A., Edwards, R.H. and Butcher, L.L., 1992.** Cholinergic neurons in the rat central nervous system demonstrated by in situ hybridization of choline acetyltransferase mRNA. *Neuroscience*, 47(4), pp.807-822.
- O'Malley, D.M., Sandell, J.H. and Masland, R.H., 1992.** Co-release of acetylcholine and GABA by the starburst amacrine cells. *Journal of Neuroscience*, 12(4), pp.1394-1408.
- Posner, M.I., 1980.** Orienting of attention. *Quarterly journal of experimental psychology*, 32(1), pp.3-25.

- Prado, M.A., Reis, R.A., Prado, V.F., de Mello, M.C., Gomez, M.V. and de Mello, F.G., 2002.** Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry international*, 41(5), pp.291-299.
- Ren, J., Qin, C., Hu, F., Tan, J., Qiu, L., Zhao, S., Feng, G. and Luo, M., 2011.** Habenula “cholinergic” neurons corelease glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron*, 69(3), pp.445-452.
- Ricciuti, A.J. and Gruberg, E.R., 1985.** Nucleus isthmi provides most tectal choline acetyltransferase in the frog *Rana pipiens*. *Brain research*, 341(2), pp.399-402.
- Rodrigo-Angulo, M.L., Heredero, S., Rodríguez-Veiga, E. and Reinoso-Suárez, F., 2008.** GABAergic and non-GABAergic thalamic, hypothalamic and basal forebrain projections to the ventral oral pontine reticular nucleus: their implication in REM sleep modulation. *Brain research*, 1210, pp.116-125.
- Roghani, A., Shirzadi, A., Butcher, L.L. and Edwards, R.H., 1997.** Distribution of the putative vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 82(4), pp.1195-1212.
- Schmidt, A. and Bischof, H.J., 2001.** Integration of information from both eyes by single neurons of nucleus rotundus, ectostriatum and lateral neostriatum in the zebra finch (*Taeniopygia guttata castanotis* Gould). *Brain research*, 923(1-2), pp.20-31.
- Schütz, B., Weihe, E. and Eiden, L.E., 2001. Independent patterns of transcription for the products of the rat cholinergic gene locus. *Neuroscience*, 104(3), pp.633-642.
- Shang, C., Chen, Z., Liu, A., Li, Y., Zhang, J., Qu, B., Yan, F., Zhang, Y., Liu, W., Liu, Z. and Guo, X., 2018.** Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. *Nature communications*, 9(1), p.1232.
- Schäfer, M.H., Eiden, L.E. and Weihe, E., 1998.** Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience*, 84(2), pp.361-376.
- Sulzer, D., Joyce, M.P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S.N., Hattori, T. and Rayport, S., 1998.** Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *Journal of Neuroscience*, 18(12), pp.4588-4602.
- Sun, Z., Wang, H.B., Laverghetta, A., Yamamoto, K. and Reiner, A., 2005.** The distribution and cellular localization of glutamic acid decarboxylase-65 (GAD65) mRNA in the forebrain and midbrain of domestic chick. *Journal of chemical neuroanatomy*, 29(4), pp.265-281.

Tömböl, T. and Németh, A., 1998. GABA-immunohistological observations, at the electron-microscopical level, of the neurons of isthmic nuclei in chicken, *Gallus domesticus*. *Cell and tissue research*, 291(2), pp.255-266.

Tritsch, N.X., Ding, J.B. and Sabatini, B.L., 2012. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature*, 490(7419), p.262.

Usunoff, K.G., Schmitt, O., Itzev, D.E., Rolfs, A. and Wree, A., 2007. Efferent connections of the parabigeminal nucleus to the amygdala and the superior colliculus in the rat: a double-labeling fluorescent retrograde tracing study. *Brain research*, 1133, pp.87-91.

Vaaga, C.E., Borisovska, M. and Westbrook, G.L., 2014. Dual-transmitter neurons: functional implications of co-release and co-transmission. *Current opinion in neurobiology*, 29, pp.25-32.

Vega-Zuniga, T., Medina, F.S., Fredes, F., Zuniga, C., Severín, D., Palacios, A.G., Karten, H.J. and Mpodozis, J., 2013. Does nocturnality drive binocular vision? Octodontine rodents as a case study. *PloS one*, 8(12), p.e84199.

Veenman, C.L. and Reiner, A., 1994. The distribution of GABA-containing perikarya, fibers, and terminals in the forebrain and midbrain of pigeons, with particular reference to the basal ganglia and its projection targets. *Journal of Comparative Neurology*, 339(2), pp.209-250.

Wallace, D.J., Greenberg, D.S., Sawinski, J., Rulla, S., Notaro, G. and Kerr, J.N., 2013. Rats maintain an overhead binocular field at the expense of constant fusion. *Nature*, 498(7452), p.65.

Wallace, M.T., Ricciuti, A.J. and Gruberg, E.R., 1990. Nucleus isthmi: its contribution to tectal acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the frog *Rana pipiens*. *Neuroscience*, 35(3), pp.627-636.

Wang, S.R., 2003. The nucleus isthmi and dual modulation of the receptive field of tectal neurons in non-mammals. *Brain Research Reviews*, 41(1), pp.13-25.

Wang, Y., Major, D.E. and Karten, H.J., 2004. Morphology and connections of nucleus isthmi pars magnocellularis in chicks (*Gallus gallus*). *Journal of Comparative Neurology*, 469(2), pp.275-297.

Wang, Y., Luksch, H., Brecha, N.C. and Karten, H.J., 2006. Columnar projections from the cholinergic nucleus isthmi to the optic tectum in chicks (*Gallus gallus*): a possible substrate for synchronizing tectal channels. *Journal of Comparative Neurology*, 494(1), pp.7-35.

Wang, Y., Kakizaki, T., Sakagami, H., Saito, K., Ebihara, S., Kato, M., Hirabayashi, M., Saito, Y., Furuya, N. and Yanagawa, Y., 2009. Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)–Venus transgenic mouse. *Neuroscience*, 164(3), pp.1031-1043.

Watanabe, K. and Kawana, E., 1979. Efferent projections of the parabrachial nucleus in rats: a horseradish peroxidase (HRP) study. *Brain research*, 168(1), pp.1-11.

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. and Hayasaki, H., 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. In *International review of cytology* (Vol. 213, pp. 1-47). Academic Press.

Weihe, E., Schäfer, M.K.H., Schütz, B., Anlauf, M., Depboylu, C., Brett, C., Chen, L. and Eiden, L.E., 1998. From the cholinergic gene locus to the cholinergic neuron. *Journal of Physiology-Paris*, 92(5-6), pp.385-388.

Yilmaz, M. and Meister, M., 2013. Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli. *Current Biology*, 23(20), pp.2011-2015.

Zingg, B., Chou, X.L., Zhang, Z.G., Mesik, L., Liang, F., Tao, H.W. and Zhang, L.I., 2017. AAV-mediated anterograde transsynaptic tagging: mapping corticocollicular input-defined neural pathways for defense behaviors. *Neuron*, 93(1), pp.33-47.