

UCH-FC
MAG-B
N822
C.1

Estudio del perfil molecular y
hodológico de las subpoblaciones
neuronales del colopatio visual en
pollos (*Gallus gallus*)

Tesis

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

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Carolina Cecilia Norambuena López

Noviembre, 2017

Director de Tesis: Dr. Jorge Mpodozis

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

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

Carolina Cecilia Norambuena López

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 11 de septiembre 2017.

Director de Tesis:
Dr. Jorge Mpodozis

.....


Co-Director de Tesis
Dr. Gonzalo Marín

.....


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga

.....


Dra. Cecilia Vergara

.....


Dedicado con amor a mi madre Cecilia, a mi padre Gabriel, a
mi hermano Gabriel y a mi hijo peludo Bobi.
Mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer mi madre Cecilia López por sus cuidados, a mi padre Gabriel Norambuena C. por financiar mi tesis y a mi hermano Gabriel Norambuena L. por ser mi fans n°1.

A mis compañeros de carrera, Luciana López, Sofía Leniz, Macarena Ruiz, Katherine Rojas, Nicolás Castro, Pablo Montero y Mahmut Spate por su amistad y apoyo incondicional.

A mi tutor Jorge Mpodozis por confiar en mis habilidades y dejarme realizar una tesis en su laboratorio; y a mi co-tutor Gonzalo Marín por financiar mis experimentos cuando no teníamos proyecto.

A Cristian González C., Florencia Garrido, Máximo Fernández, Pedro Fernández, Sara Fernández, Elisa Sentis y Solano Henríquez por sus valiosos consejos y ayuda en la realización de esta tesis.

ÍNDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Diseño de partidores y sondas de RNA.....	16
Extracción de RNA.....	17
RT-PCR.....	18
Clonación.....	19
Síntesis de la sonda RNA-DIG.....	20
Hibridación in situ control.....	21
Procedimiento quirúrgico para la inyección in vivo de un trazador neuronal.....	23
Inyección de in vivo de CTB-AF 555.....	23
Hibridación in situ para la doble marca de CTB-AF 555 y sonda RNA-DIG.....	25
Tinción con DAPI.....	26
Análisis de co-localización y conteo celular.....	26
Adquisición de imágenes.....	28

RESULTADOS.....	30
Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el cerebro de pollo.....	30
Telencéfalo.....	30
Otras estructuras.....	35
Protocolo para la doble marca de CTB-AF 555 y sonda RNA-DIG en el cerebro de pollo.....	39
Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual.....	43
Neuronas del nidopalio intermedio que proyectan al nidopalio caudo-lateral.....	44
Neuronas del mesopalio ventral externo y nidopalio intermedio que proyectan al núcleo entopalio.....	49
Otras regiones sensoriales: neuronas tálamo-paliales de segundo orden (T-P2°) y núcleo rotundus.....	61

DISCUSIÓN.....	70
Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el cerebro de pollo.....	70
Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual de pollo.....	73
Hipótesis de células equivalentes.....	76
Posibles implicaciones funcionales de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual.....	78
Rol de VGLUT2.....	78
Rol de EAG2.....	80
CONCLUSIÓN.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores, temperatura de "annealing" y longitud del fragmento para la síntesis de cDNA específico de los genes VGLUT2 y EAG2.....	17
Tabla 2. Número y porcentaje de células del Rt retrógradamente etiquetadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-)	43
Tabla 3. Número y porcentaje de células del NI retrógradamente etiquetadas desde el NCL (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT2+/-) y EAG2 (EAG2+/-).....	49
Tabla 4. Número y porcentaje de células del MVex retrógradamente etiquetadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-) y EAG2 (EAG2+/-).....	55
Tabla 5. Número y porcentaje de células del NI retrógradamente etiquetadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-) y EAG2 (EAG2+/-).....	60
Tabla 6. Número y porcentaje de células del tálamo-paliales de 2°orden retrógradamente etiquetadas desde el NCL (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-) y EAG2 (EAG2+/-).....	66
Tabla 7. Número y porcentaje de células del Rt retrógradamente etiquetadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de EAG2 (EAG2+/-).....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Telencéfalo dorsal de vertebrados.....	2
Figura 2. Hipótesis del origen evolutivo común del DVR y la corteza temporal.....	3
Figura 3. Conectividad de la vía tectofugal de mamíferos y aves.....	5
Figura 4. Organización columnar de las proyecciones en la neocorteza de mamíferos y DVR visual de aves.....	7
Figura 5. Representación del microcircuito de la neocorteza de mamíferos y del DVR visual de aves.....	8
Figura 6. Hibridación in situ del mRNA de EAG2 y RORB en el telencéfalo de mamífero y ave.....	10
Figura 7. Hibridación in situ de mRNA de VGLUT2 en el telencéfalo de mamífero y ave.....	11
Figura 8. Perfil de expresión de los marcadores moleculares VGLUT2 y EAG2 en el telencéfalo de cerebro de pollo.....	32-33
Figura 9. Perfil de expresión del marcador molecular EAG2 en el DVR visual.....	34
Figura 10. Perfil de expresión de los marcadores moleculares VGLUT2 y EAG2 en el diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo de cerebro de pollo.....	37-38
Figura 11. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del Rt que proyectan al E.....	41
Figura 12. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del Rt que proyectan al E.....	42
Figura 13. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL.....	45
Figura 14. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL.....	46

Figura 15. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL.....	47
Figura 16. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL.....	48
Figura 17. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del MVex que proyectan al E.....	51
Figura 18. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del MVex que proyectan al E.....	52
Figura 19. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del MVex que proyectan al E.....	53
Figura 20. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del MVex que proyectan al E.....	54
Figura 21. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al E.....	56
Figura 22. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al E.....	57
Figura 23. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al E.....	58
Figura 24. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al E.....	59
Figura 25. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL.....	62
Figura 26. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL.....	63
Figura 27. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL.....	64
Figura 28. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL.....	65
Figura 29. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del Rt que proyectan al E.....	67

Figura 30. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del Rt que proyectan al E.....**68**

Figura 31. Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual.....**75**

LISTA DE ABREVIATURAS

Núcleos cerebrales

APT	núcleo pre-tectal anterior
Arc	arcopallio
Bas	basalis
DL	tálamo dorso-lateral
DVR	dorsal ventricular ridge
E	núcleo entopallio
Ed	entopallio dorsal
Ev	entopallio ventral
L2	field L
GLv	núcleo geniculado lateral ventral
GP	globo pallido
H	hiperpallio
IHA	hiperpallio apical insterticial
Imc	núcleo isthmi pars magnocellularis
Ipc	núcleo isthmi pars parvocellularis
Lat	núcleo cerebelar lateral
LM	lámina mesopallial
LS	lámina subpallial
LSt	estriado lateral
M	mesopallio
MCC	núcleo magnocelular coclear
MD	mesopallio dorsal
MLd	núcleo mesencephalicus lateralis pars dorsalis
MSt	estriado medial
MVex	mesopallio ventral externo
MVin	mesopallio ventral interno
N	nidopallio
NCL	nidopallio caudo-lateral
NCM	nidopallio caudo-medial
NFL	nidopallio fronto-lateral
NI	nidopallio intermedio
NIL	nidopallio intermedio lateral
PrT	núcleo principal del trigémino
Rt	núcleo rotundus
TeO	tectum óptico
TG	núcleo gris tectal
T-P2°	tálamo-pallial de segundo orden
TrO	tracto óptico

Genes

CUX2	Cut Like Homeobox 2
EAG2	voltage-gated potassium channel ether-a-go-go 2
FOXP1	Forkhead Box P1
MEF2C	Myocyte Enhancer Factor 2C
RORB	RAR-Related Orphan Receptor Beta
SATB2	SATB Homeobox 2
VGLUT1	vesicular glutamate transporter 1
VGLUT2	vesicular glutamate transporter 2

Reactivos, técnicas y otros

Amp	ampicilina
cDNA	DNA complementario
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate
CTB-AF 555	colera toxina subunidad B- Alexa fluor conjugada 555
DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreititol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
HINGS	Donor Goat Serum, Heat Inactivated
IDT	Integrated DNA technologies
MABw	buffer ácido maleico/tween-20
mRNA	RNA mensajero
NBT/BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	buffer fosfato salino
PBStw	PBS/tween-20
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehído
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcripción reversa
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sonda RNA-DIG	sonda de RNA marcada con digoxigenina
SSC	citrato de sodio salino

RESUMEN

Con el fin de aportar evidencias de interés a la discusión sobre la posible correspondencia homológica entre el "Dorsal Ventricular Ridge" (DVR) de aves y la corteza sensorial de mamíferos, en el presente estudio se examinó la identidad neuroquímica de las neuronas que forman los circuitos intrapaliales en el DVR visual de pollos, combinando técnicas de trazado neuronal retrógrado e hibridación "in situ" para marcadores moleculares característicos de neuronas corticales (vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2; y voltage-gated potassium channel ether-a-go-go 2, EAG2). Este estudio reveló varias similitudes previamente no advertidas, a nivel laminar, molecular y de conectividad, entre el DVR visual y las regiones sensoriales de la neocorteza, sugiriendo que el DVR podría contener tipos celulares con conectividad y expresión génica característica de la corteza extraestriada visual de mamíferos.

ABSTRACT

In order to provide meaningful evidences to the discussion about the possible homological correspondence between the avian Dorsal Ventricular Ridge (DVR) and the sensory cortex of mammals, in the present study the neurochemical identity of the neurons that form the intrapalial circuits of the visual DVR of chickens was examined, combining retrograde neuronal tracing techniques with in situ hybridization for molecular markers characteristic of cortical neurons (vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2; and voltage-gated potassium channel ether-a-go-go 2, EAG2). This study revealed several previously unnoticed similarities, at laminar, molecular and connectivity levels, between the visual DVR and the sensory neocortex, suggesting that the DVR could contain cell types with connectivity and gene expression characteristic of the visual extrastriate cortex of mammals.

INTRODUCCIÓN

El telencéfalo dorsal o palio, es una de las estructuras más variables y diversas del cerebro de amniotas. En mamíferos, esta área está compuesta principalmente por una gran estructura multilaminada (6 capas) llamada neocorteza. En aves, la región palial se compone de dos divisiones no uniformemente laminares, el hiperpalio (H, también llamado Wulst) y el "Dorsal Ventricular Ridge" (DVR). Este último, está formado por un área más dorsal, conocida como mesopalio (M); una región interna, llamada nidopalio (N); y una región más caudal, nombrada como arcopalio (Arc) (Reiner y col., 2004; Butler y Hodos, 2005; **Figura 1**).

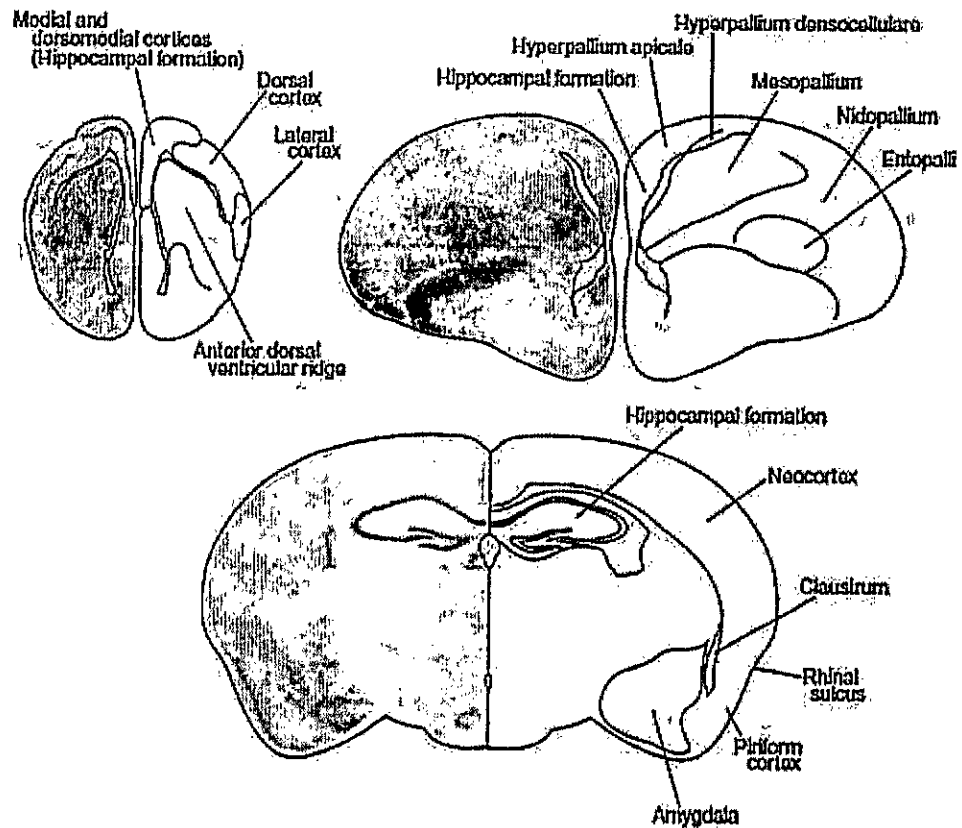


Figura 1. Telencéfalo dorsal de vertebrados. Secciones coronales del telencéfalo de largarto tegu *Tupinambis nigropunctatus* (arriba, izquierda); de paloma *Columba livia* (arriba, derecha); y ratón (centro, inferior), tratadas con tinción de Nissl y con su imagen especular dibujada. Las áreas paliales son etiquetadas. Las imágenes fueron adaptadas de Butler y Hodos, 2005.

Dada las evidentes diferencias morfológicas en la conformación citoarquitectónica del palio entre distintos vertebrados, durante décadas se ha pensado que los tipos neuronales de la neocorteza surgieron únicamente en el linaje de mamíferos. Sin embargo, recientes estudios de anatomía y neuroquímica en el palio aviar, han concluido que podría existir una correspondencia homológica entre la corteza extraestriada (temporal) de mamíferos y el DVR de aves, lo que implica que estas estructuras podrían tener un origen evolutivo común (Karten y Shimizu, 1989; Butler, 1994; Reiner y col., 2005; **Figura 2**).

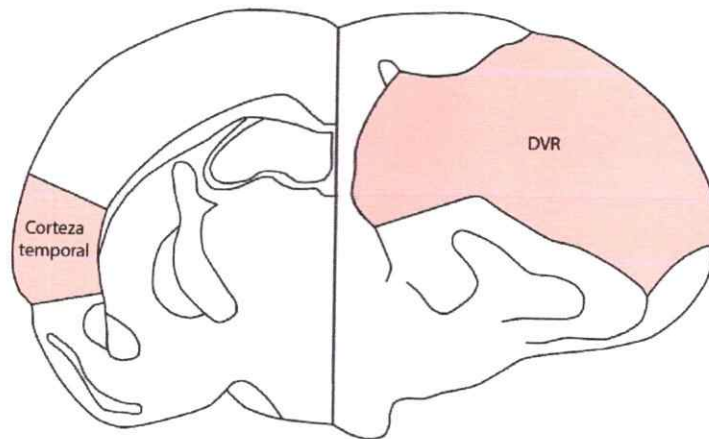


Figura 2. Hipótesis del origen evolutivo común del DVR y la corteza temporal. Representación de la hipótesis de origen en común que propone una correspondencia homológica entre el DVR de aves y la corteza temporal de mamíferos, usando secciones coronales del telencéfalo de ratón y de paloma. Las imágenes fueron adaptadas de Reiner y col., 2005.

Uno de los principales criterios para proponer esta correspondencia homológica es la presencia de poblaciones de células en el DVR que conservan la conectividad (aférente/eferente) y neuroquímica característica de la corteza sensorial de mamíferos (Karten, 1969).

En efecto, se ha descrito que la región interna del DVR, llamada nidopallio, contiene zonas recipientes de aferencias sensoriales ascendentes, las que en virtud de esa característica han sido comparadas a las regiones tálamo-recipientes de la neocorteza sensorial (capa IV). De este modo, las neuronas de la zona audio-recipiente del DVR, llamada Field L, se consideran homologas a aquellas de la capa IV de la corteza auditiva primaria; las neuronas de la región trigémino-recipiente, o núcleo basalis (Bas), a aquellas de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria y las neuronas de la zona colo-visuo-recipiente, el núcleo entopallio (E), a aquellas de la capa IV de la corteza extraestriada visual de mamíferos (Jarvis y col., 2005; **Figura 3**).

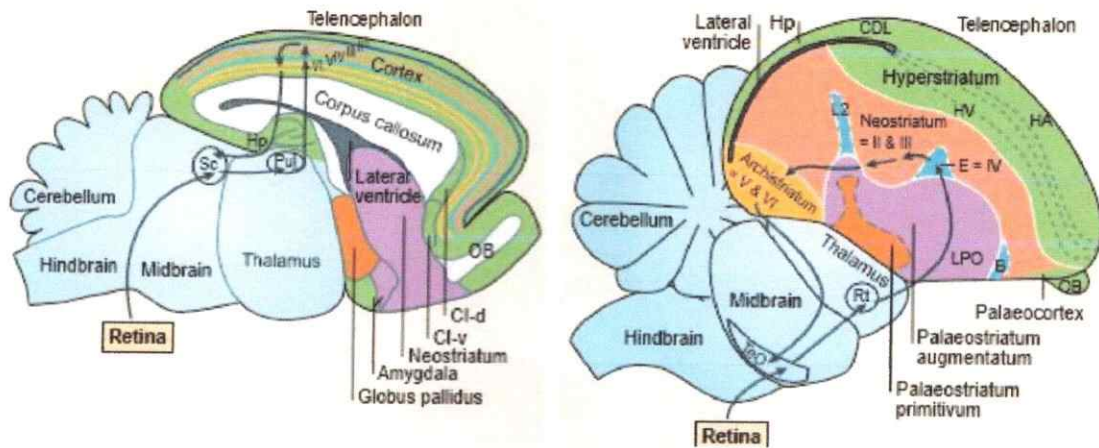


Figura 3. Conectividad de la vía tectofugal de mamíferos y aves. Las áreas celestes indican la supuesta homología de las células tálamo-recipientes del DVR de aves (B, E y L2) con aquellas de la capa IV de neocorteza de mamíferos. B, núcleo basalis; E, entopalio; L2, Field L. Las imágenes fueron adaptadas de Jarvis y col., 2005.

Además, estudios recientes en la organización anatómica de las regiones visuales y auditivas del DVR de las aves muestran que estas regiones presentan una organización interna de tipo columnar y topográfica (Wang y col., 2010; Ahumada-Galleguillos y col., 2015) muy semejante a la encontrada en la neocorteza (Lund y col., 1994; **Figura 4**). Incluso se ha propuesto que estas columnas en el palio de aves, presentan un patrón de conectividad intrínseca comparable al circuito local inter-laminar recurrente (circuito cortical canónico), de la corteza de mamíferos. Así por ejemplo, en el DVR visual, las células del entopalio (lámina interna; tálamo-recipientes), proyectan

recíprocamente, con las células del mesopalio ventral externo (MVex, lámina externa, asociativa; Ahumada-Galleguillos y col., 2015). A su vez, las células del nidopalio intermedio (NI, lámina intermedia, eferente), aferentan a las células del MVEEX y E; al mismo tiempo que generan eferencias a otras regiones asociativas del palio, como el nidopalio frontolateral (NFL), nidopalio caudolateral (NCL) y arcopalio, y al subpalio (estriado lateral, LSt; Fernández, 2016). En la corteza visual extraestriada (temporal), igualmente, las células tálamo-recipientes de la capa IV (capa interna) se conectan con las células de las capas II y III (capas superficiales). En turno, las células superficiales mandan eferencias a otras áreas de la corteza; y a las capas corticales profundas (Callaway, 1998; Douglas y Martin, 2004; Da Costa y Martin, 2010; **Figura 5**).

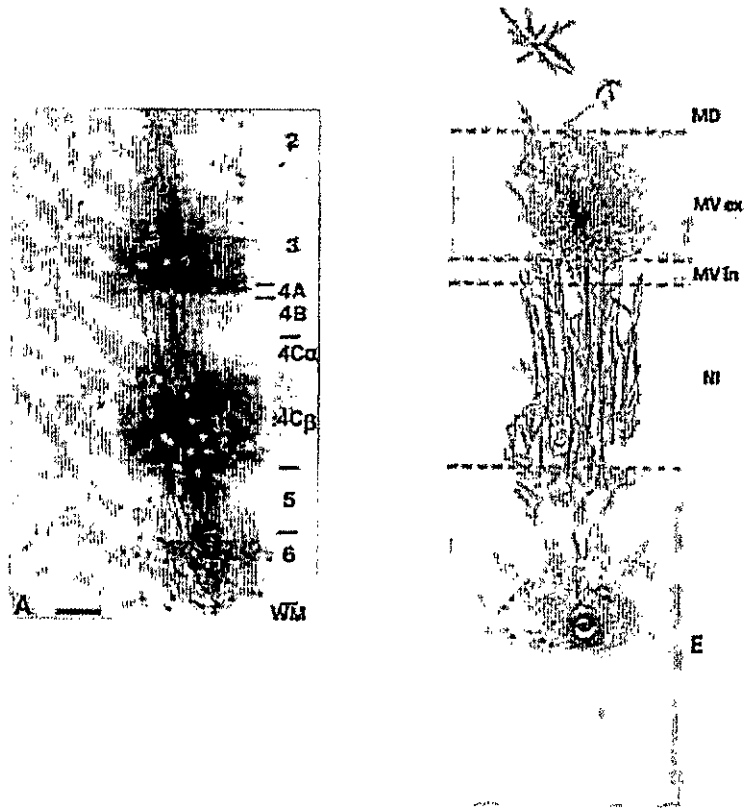


Figura 4. Organización columnar de las proyecciones en la neocorteza de mamíferos y DVR visual de aves. Inyección local de biocitina en la capa 4C β de la área cortical visual V1 de macaco (izquierda) y en el núcleo entopallio del DVR visual de pollo (derecha). Las imágenes de la izquierda y derecha fueron adaptadas de Lund y col., 1994 y Ahumada-Galleguillos y col., 2015, respectivamente.

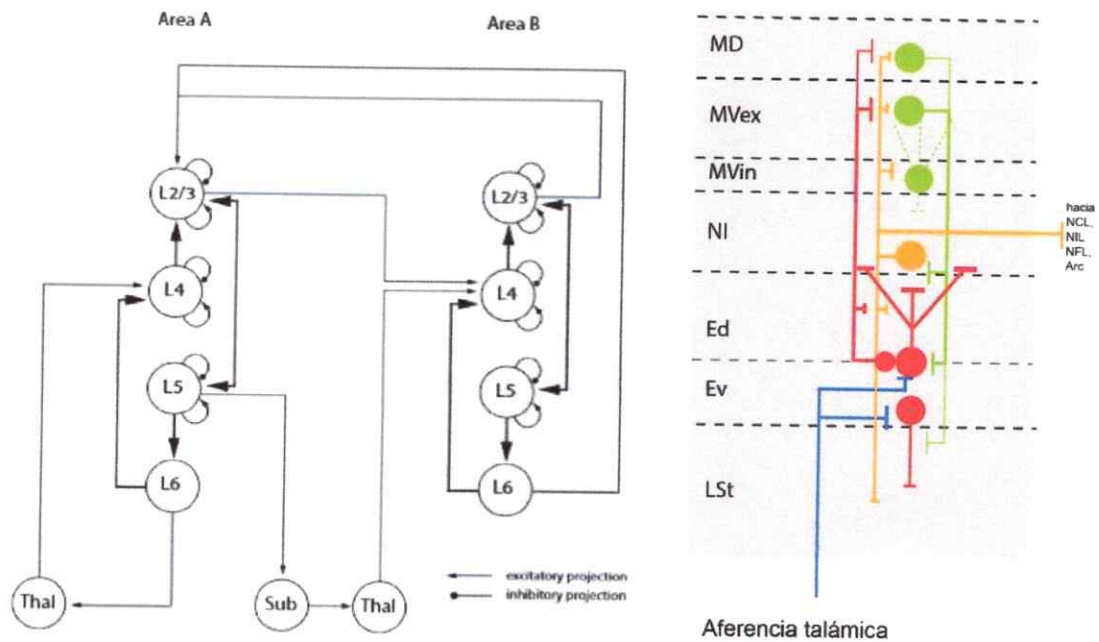


Figura 5. Representación del microcircuito de la neocorteza de mamíferos y del DVR visual de aves. Izquierda: Circuito canónico de la corteza. Las conexiones excitatorias se representan mediante flechas; y las inhibitorias, como líneas con extremos redondos. Las neuronas de diferentes capas corticales se representan como círculos. Lx, capa cortical donde el cuerpo celular se encuentra; Thal, tálamo; Sub, otras estructuras subcorticales. Derecha: Circuito modular interlaminar del DVR visual. La anchura de las líneas representa el tamaño relativo de las proyecciones. Las líneas discontinuas indican proyecciones dudosas, pero posibles. MD, mesopalio dorsal; MVex, mesopalio ventral externo; MVin, mesopalio ventral interno; NI, nidopalio intermedio; Ed, entopalio dorsal; Ev, entopalio ventral; LSt, estriado lateral; NCL, nidopalio caudolateral; NIL, nidopalio intermedio lateral; NFL, nidopalio frontolateral; Arc, arcopalio. Las imágenes de la izquierda y derecha fueron adaptadas de Da Costa y Martin, 2010 y Ahumada-Galleguillos y col., 2015, respectivamente.

Más aún, se ha mostrado que las células de las regiones sensorrecipientes del DVR (Bas, E y Field L), expresan genes (EAG2 y RORB) comúnmente restringidos a las células de la capa tálamo-recipiente (capa IV) de la neocorteza de ratón (Molineaux y col., 2007). El mRNA de EAG2 (voltage-gated potassium channel ether-a-go-go 2), se expresa intensamente en las células nidopaliales localizadas entre el entopallio y Field L, formando una zona de continuidad o "puente citoarquitectónico" entre estos dos núcleos. En la neocorteza, igualmente, este transcripto forma una banda continua de células, uniendo las áreas sensoriales primarias (Dugas-Ford y col., 2012; **Figura 6**).

Por otro lado, gran parte de las células del DVR de aves, expresan solo una isoforma de los transportadores vesiculares de glutamato, el gen VGLUT2 (vesicular glutamate transporter 2; Islam y Atoji, 2008; Gonzalez-Cabrera y col., 2015); preferentemente encontrado en las capas III, IV y V de la neocorteza de mamíferos (Bai y col., 2001; Fremeau y col., 2001 y 2004; Hackett y col., 2011; Balaram y col., 2013; **Figura 7**).

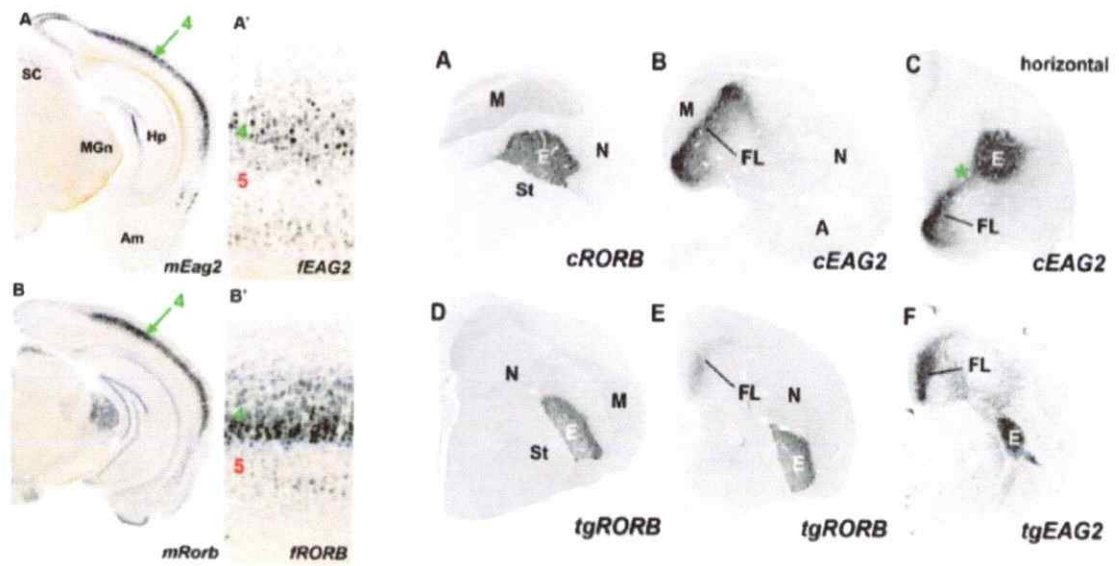


Figura 6. Hibridación in situ del mRNA de EAG2 y RORB en el telencéfalo de mamífero y ave. Izquierda: Distribución del mRNA de EAG2 (A) y RORB (B) en el cerebro de ratón (*Mus musculus*). En el recuadro A' y B', se muestra el detalle de la expresión de EAG2 y RORB en la capa IV de la corteza temporal. Derecha: Distribución del mRNA de EAG2 (B-C-F) y RORB (A-D-E) en el cerebro de pollo (*Gallus gallus*). Las imágenes fueron adaptadas de Dugas-Ford y col., 2012.

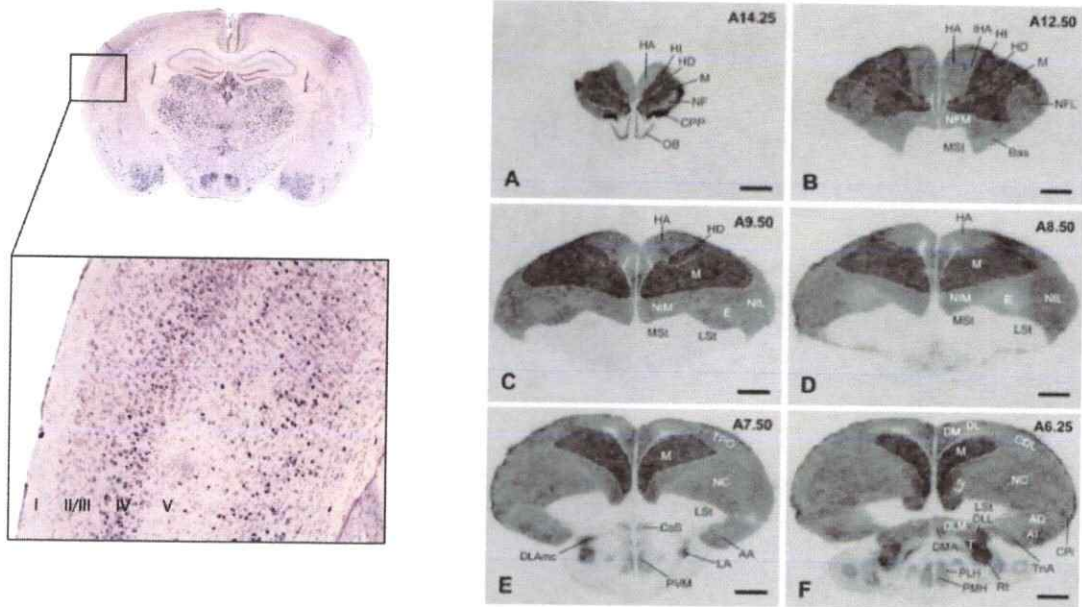


Figura 7. Hibridación in situ de mRNA de VGLUT2 en el telencéfalo de mamífero y ave. Izquierda: Distribución del mRNA de VGLUT2 en el cerebro de ratón (*Mus musculus*). En el recuadro, se muestra el detalle de la expresión de VGLUT2 a través de las capas de la corteza temporal (I-V). Derecha: Distribución del mRNA de VGLUT2 en el cerebro de paloma desde rostral a caudal (A-F) (*Columba livia*). Las imágenes de la izquierda y derecha fueron adaptadas de Allen Brain Atlas (www.brain-map.org) e Islam y Atoji, 2008, respectivamente.

A pesar de todas estas evidencias, aún se desconoce si las células del DVR visual, que expresan marcadores moleculares característicos de las neuronas de la neocorteza de mamíferos, participan en el "loop" de proyecciones entre el entopalio, nidopalio y mesopalio.

Dado la importancia que tiene este circuito para discriminación visual en el cerebro de vertebrados, se hace imprescindible conocer en detalle la identidad molecular y conectividad de las neuronas del DVR visual para aportar evidencias a la discusión sobre la existencia de una correspondencia a nivel laminar, molecular y de circuito intrínseco entre la corteza extraestriada visual de mamíferos y el DVR visual en aves.

HIPÓTESIS

Las neuronas del DVR visual que expresan marcadores moleculares característicos de las neuronas de la neocorteza de mamíferos participan en el "loop" de proyecciones entre el entopalio, nidopalio y mesopalio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer el perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual de pollo (*Gallus gallus*), mediante la doble marca fluorescente de un trazador neuronal retrógrado (colera toxina subunidad B - Alexa fluor conjugada 555, CTB-AF 555) y colorimétrica de una sonda de RNA marcada con digoxigenina (sonda RNA-DIG).

Objetivos específicos

1. Establecer el perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el cerebro de pollo.
2. Generar un protocolo para la doble marca fluorescente de CTB-AF 555 y colorimétrica de una sonda RNA-DIG.
3. Establecer el perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2:
 - 3.1 en las neuronas del nidopallio intermedio que proyectan al nidopallio caudo-lateral.
 - 3.2 en las neuronas del mesopallio ventral externo que proyectan al núcleo entopallio.
 - 3.3 en las neuronas del nidopallio intermedio que proyectan al núcleo entopallio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en pollos (*Gallus gallus*) de ambos sexos (n = 30), obtenidos de un proveedor local (Don Pollo, Pirque). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Diseño de partidores y sondas de RNA

Las sondas de RNA fueron diseñadas por el Dr. Cristian González Cabrera usando las bases de datos de nucleótidos para el pollo y las herramientas bioinformáticas de alineamiento disponibles en la página electrónica de la National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Con el fin de poder amplificar secuencias de RNA (cDNA) correspondiente a cada sonda diseñada, se diseñaron pares de partidores (**Tabla 1**) específicos y se sintetizaron comercialmente (IDT DNA).

Tabla 1. Partidores, temperatura de "annealing" y longitud del fragmento para la síntesis de cDNA específico de los genes VGLUT2 y EAG2.

Genes	VGLUT2	EAG2
N° acceso	NM_001168383	XM_421414.3
Partidor "Forward" [5' → 3']	GGCTCTGCACGCCGTCTCTC	ATCACCCCTGTGCGGAAACTC
Partidor "Reverse" [5' → 3']	TCGATGGTGTCCCCGGGCTT	ACCGGCTTTATCCAAGCGAA
Temperatura de "annealing" [°C]	61,5	57,4
Longitud del fragmento [pb]	317	530

Extracción de RNA

El RNA total fue aislado del telencéfalo de pollos entre 1 a 5 días postnatal. Luego, el tejido fue homogenizado en 1 ml de RNA-Solv[®], OMEGA; usando un homogeneizador dounce. A continuación, se mezcló con 0,2 mL de cloroformo en un vortex por 15 segundos. La mezcla fue incubada en hielo por 10 minutos y centrifugada a 12,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa fue recuperada, mezclada con 0,5 mL de alcohol isopropílico, incubada por 10 minutos y centrifugada a 12,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 80%, centrifugado a 7,500 g por 5 minutos a temperatura ambiente, secado al aire y

reconstituido con 70 μ L de agua libre de nucleasas.

RT-PCR

La hebra simple de cDNA fue sintetizada usando la transcriptasa reversa Improm IITM (RT; Improm-IITM Reverse transcriptase, Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, 1 μ g de RNA total fue incubado con 1 μ L de oligo (dT) primer por 5 minutos a 70°C, luego fue mezclado con la solución de transcripción (1 μ L de transcriptasa reversa; 2,5 μ L de MgCl₂ 25 mM; 1 μ L de inhibidor de RNAasa RNasin®, Promega; 1 μ L de mix dNTPs 10 mM; 4 μ L de buffer de reacción 5X) e incubado por 60 minutos a 42°C. El cDNA obtenido fue ocupado como templado para la "polymerase chain reaction" (PCR) usando una Taq polimerasa (Dream TaqTM, Fermentas). El protocolo de PCR consistió en 35 ciclos de amplificación: denaturación por 30 segundos a 94°C; "annealing" por 60 segundos a la temperatura mostrada en la **Tabla 1**; extensión por 60 segundos a 70°C; y una extensión final por 10 minutos a 70°C. A continuación, los productos del PCR fueron separados en un gel de agarosa 1,5% y GelRedTM 1,2%; y visualizados bajo luz UV. Luego, los fragmentos de DNA correspondientes a la longitud esperada para cada gen

(Tabla 1), fueron extraídos del gel y purificados usando un equipo comercial (E.Z.N.ATM Gel extraction kit, OMEGA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Clonación

Las secuencias específicas de DNA purificadas, fueron clonadas en un vector de amplificación (pGEM[®]-T Easy Vector Systems, Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A continuación, las bacterias *E.coli* cepa DH5 α termo-competentes fueron transformadas a 42°C por 90 segundos, y sembradas en un medio LB-Agar-XGal-Amp (LB Broth 2,5%, MO BIO; agar 2%, BD; 1 μ L/mL XGal 50 mg/mL, Promega; 1 μ L/mL Ampicilina 100 mg/mL). Los clones positivos (colonias blancas) fueron amplificados en un medio LB-Amp (LB Broth 2,5%, MO BIO; 1 μ L/mL Ampicilina 100 mg/mL) a 37°C por 16 horas a 230 rpm. Finalmente, el plásmido de DNA fue purificado usando un equipo comercial (E.N.Z.ATM Plasmid DNA minikit II, OMEGA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y secuenciado de manera comercial (Servicio de secuenciación, Pontificia Universidad Católica de Chile).

Síntesis de la sonda RNA-DIG

Para linealizar el plásmido de DNA purificado, 5 µg de DNA fueron digeridos por 30 U de enzima de restricción ApaI o NdeI a 4°C por 16 horas en un volumen total de reacción de 100 µL. El DNA linealizado fue purificado usando un equipo comercial (Cycle pure kit, OMEGA) y usado como templado para la transcripción in vitro de RNA.

A continuación, 1 µg de DNA linealizado fue agregado a una solución de transcripción (2 µL de Ditioneitol [DTT] 100Mm; 0,5 µL de RNasin; 1 µL de una mezcla de ribonucleótidos marcados con digoxigenina; 4 µL de buffer de transcripción 5X; 1 µL de SP6 o T7) que fue incubada por 1 hora y 30 minutos a 37°C. El producto de la transcripción fue agregado a una solución de LiCl 4M, etanol 100%; y guardado a -80°C. Finalmente, la solución anterior fue centrifugada a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C para precipitar el RNA, el cual fue lavado con etanol 80% y centrifugado a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido fue resuspendido en 80 µL de agua libre de nucleasas y 220 µL de buffer de hibridación, y guardado a -80°C.

Hibridación in situ control

Para testear las sondas RNA-DIG sintetizadas in vitro, pollos de 7 a 21 días de edad (P7-P21) fueron perfundidos transcardialmente con 0,1-0,5 mL de heparina sódica (5000 U.I) inyectada directamente al corazón; 300 mL de NaCl 0,75% y 250 mL de paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,0. El cerebro fue removido del cráneo rápidamente; incubado en PFA 4%, sacarosa 30% en agua libre de nucleasas a 4°C por 12 horas; y en sacarosa 30% en agua libre de nucleasas por 30 minutos a 4°C en agitación. Luego, el hemisferio izquierdo, fue rebanado sagitalmente en dos series (una para cada gen) de secciones de 60 µm de grosor, usando un micrótomo de congelación (Leitz 1400, Alemania). Finalmente, el tejido fue recolectado en PBS 1X libre de nucleasas para ser ocupado inmediatamente en la hibridación in situ control.

Las secciones fueron lavadas dos veces en PBStw (PBS 1X, Tween-20 0,1% en agua libre de nucleasas) por 5 minutos y pre-tratadas en peróxido de hidrógeno [H₂O₂] 6% por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron lavadas tres veces en PBStw, tratadas con proteinasa K (10 mg/mL) 1 µL/mL por 10 minutos a 37°C en agitación; y fijadas en PFA

4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar en PBStw, el tejido fue pre-hibridado en buffer de hibridación (Formamida 50%; SSC [20X] 1,3X, pH 5,3; EDTA [0,5M] 5 mM; Tween-20 0,002%; RNA yeast [20 mg/mL] 50 µg/mL; CHAPS [10%] 0,005%; heparina [50 mg/mL] 100 µg/ml) por 3 horas a 60°C; y en seguida, hibridado con la sonda de RNA marcada con digoxigenina (100 µL de sonda en 2 mL de buffer de hibridación) por 16 horas a 60°C. A continuación, las secciones fueron lavadas dos veces en solución A (Formamida 50%; SSC [20X] 5X, pH 5,3; SDS [10%] 1%) y tres veces en B (Formamida 50%; SSC [20X] 2,5X, pH 5,3; Tween-20 1%) por 30 minutos a 65°C para eliminar restos de sonda hibridada de manera inespecífica. Después de lavar en MABw (ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1%; pH 7,5), el tejido fue bloqueado con HINGS 5% y Blocking Reagent [10%] 2% (Roche, Suiza) en MABw por 4 horas a temperatura ambiente e incubado en anti cuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1/1000 en solución de bloqueo) por 12 h a 4°C en agitación. Luego de 6 lavados en MABw por 40 min, la fosfatasa alcalina fue visualizada con NBT/BCIP en una solución de Tris 100 mM; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; pH 9,5; en 16 horas a temperatura ambiente, dando un precipitado de color azul.

Procedimiento quirúrgico para la inyección in vivo de un trazador neuronal

Para los experimentos de inyección de un trazador neuronal in vivo, pollos de 14 a 17 días de edad (P14-P17) fueron anestesiados con una dosis intramuscular de 0,001 mL/gr de una mezcla de ketamina (100 mg/mL) y xilazina 2% (20 mg/mL), y colocados en un estereotáxico. La anestesia fue mantenida durante la cirugía y experimento inyectando un 33% y 16% de la dosis inicial respectivamente. La temperatura corporal del animal fue mantenida entre 39°C y 42°C por una manta termorreguladora (DC temperature controller). Después de fijar las coordenadas estereotáxicas (antero-posterior y medio-lateral), una pequeña ventana fue abierta en el lado dorsal izquierdo del cráneo. La dura madre fue removida para exponer la superficie del cerebro.

Inyección de in vivo de CTB-AF 555

Para localizar el nidopalio caudo-lateral tanto como el núcleo entopalio, se realizó un registro exploratorio de la actividad visual en las coordenadas fijadas al inicio del experimento, usando un electrodo de tungsteno y un amplificador extracelular. Al identificar la región, se

procedió a llenar una pipeta de vidrio de 30 μ m (diámetro externo) con 2 μ L de CTB-AF 555 (1% en PBS 0,001 M) y se colocó en el lugar del electrodo. En seguida, se inyectó el trazador mediante presión (4 pulsos cada 1 minuto de 0,10 milisegundos y 20 p.s.i) e iontoforesis (corriente positiva, 8 μ A, 6 segundos on, 6 segundos off por 30 minutos). Después de 4-7 días de sobrevida, el animal fue perfundido transcardialmente con 0,5 mL de heparina sódica (5000 U.I) inyectada directamente al corazón; 600 mL de NaCl 0,75% y 300 mL de PFA 4 % en PBS 0,1 M, pH 7,0. El cerebro fue removido del cráneo rápidamente; incubado en PFA 4%, sacarosa 30% en agua libre de nucleasas a 4°C por 12 horas; y en sacarosa 30% en agua libre de nucleasas por 30 minutos a 4°C en agitación. Finalmente, el hemisferio izquierdo en donde se localizó la inyección, fue rebanado sagitalmente en dos series (una para cada gen) de secciones de 60 μ m de grosor, usando un micrótopo de congelación. El tejido fue recolectado en PBS 1X libre de nucleasas para ser ocupado inmediatamente en la hibridación in situ para la doble marca de CTB-AF 555 y sonda RNA-DIG.

Hibridación in situ para la doble marca de CTB-AF 555 y sonda RNA-DIG

Para investigar si las neuronas retrógradamente marcadas con CTB-AF 555 desde NCL y E, expresan el mRNA de VGLUT2 y EAG2, las dos series de secciones flotantes en PBS 1X libre de nucleasas, recopiladas de un hemisferio inyectado con el trazador neuronal fluorescente, fueron tratadas siguiendo el protocolo descrito para la hibridación in situ control, pero con algunas modificaciones que permitieron obtener una señal óptima de CTB-AF 555, post-reacción fosfatasa alcalina-NBT/BCIP:

- 1.- La temperatura de pre-hibridación en buffer de hibridación fue disminuida a 55°C.
- 2.- La temperatura de hibridación y tiempo de incubación de la sonda de RNA fueron disminuidos a 55°C y 12 horas, respectivamente.
- 3.- A las soluciones A y B se les quitó el SDS [10%] y Tween-20 1%, respectivamente. Además, la temperatura y el tiempo de los lavados fueron disminuidos a 53,5°C y 20 minutos.
- 4.- A la solución de bloqueo se le quitó el Blocking reagent [10%]. Por lo tanto, la concentración de HINGS fue aumentada al 20%.

5.- El tiempo de reacción entre la fosfatasa alcalina y NBT/BCIP fue disminuido a 2 horas.

Tinción con DAPI

Después de la hibridación in situ para la doble marca de CTB-AF 555 y sonda RNA-DIG, el tejido fue lavado en PBS 0,001 M e incubadas con DAPI (dilución 1/5000 en PBS 0,001 M) por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron lavadas en PBS, montadas en un portaobjeto, cubiertas con glicerol 70% en PBS 0,001M y guardadas a 4°C en oscuridad.

Análisis de co-localización y conteo celular

Para el análisis de co-localización y conteo celular, se analizó un caso para cada experimento (Inyección en NCL e Inyección en E), en los cuales se identificaron todas las secciones que mostraran células retrógradamente marcadas con CTB-AF 555, ya sea desde el E o el NCL (CTB-AF 555+). Luego, en cada sección se determinaron áreas ($x= 433,4$; $y= 330,2 \mu\text{m}$) que abarcaran la mayor cantidad de células CTB-AF 555+, las cuales fueron fotografiadas en tres canales (RFP-Cam; DAPI-Cam y BF-Cam) y a diferentes distancias de enfoque ($z= 60 \mu\text{m}$).

A continuación, las múltiples imágenes de un área, fueron combinadas en el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA) usando la técnica de "z-stacking" para obtener una imagen con mayor profundidad de campo. Seguidamente, a estas imágenes se les insertó una grilla (Área de los cuadrados = $1600 \mu\text{m}^2$), y sobre esta se fue marcando las células CTB-AF 555+ que co-localizaran o no co-localizaran con la señal colorimétrica de la sonda RNA-DIG, basándose en dos criterios:

- 1.- Ambas señales se sobreponen espacialmente.
- 2.- Los perfiles de intensidad de píxeles de ambas señales se sobreponen espacialmente.

Para llevar a cabo este último, se utilizó el complemento plot.multicolor.4.3 del programa ImageJ, el cual genera gráficos de 3 colores (rojo, verde y azul) de perfil de intensidad de píxeles, a lo largo de una línea posicionada en una imagen RGB.

Finalmente, los datos de todas las secciones, fueron exportados al programa Excel 2010 (Microsoft, USA), en el que se estimó el número total de células CTB-AF 555+, positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT2+/-) o EAG2 (EAG2+/-) para 1 caso, mediante la función SUM:

$$X = \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{ó} \quad Y = \sum_{i=1}^n y_i \quad (1)$$

En donde, x_i ó y_i corresponde al número total de células CTB-AF 555+, positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT2+/-) o EAG2 (EAG2+/-) en una sección sagital de 60 μm ; y, n equivale al número total de secciones sagitales de 60 μm , correspondientes a una serie (VGLUT2 o EAG2), en las cuales se realizó el conteo celular.

Por otra parte, se calculó el porcentaje del número total de células CTB-AF 555+, positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT2+/-) o EAG2 (EAG2+/-) para 1 caso, a través de la siguiente función:

$$X\% = \frac{X}{(X + Y)} \times 100 \quad \text{ó} \quad Y\% = \frac{Y}{(X + Y)} \times 100 \quad (2)$$

Adquisición de imágenes

Las imágenes de las células doble marcadas fueron tomadas con un microscopio confocal (modelo 710, Zeiss, Alemania) y procesadas en ImageJ (National Institutes of Health, USA). Mientras que, las imágenes de la hibridación in situ control de VGLUT2 y EAG2 fueron tomadas con un microscopio convencional (Olympus BX61, Japón). El contraste y brillo

fueron ajustados en Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Japón) y las figuras diseñadas en Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, Japón).

RESULTADOS

Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el cerebro de pollo.

Los ensayos de hibridación in situ para VGLUT2 (n= 5) y EAG2 (n= 10) fueron realizados en secciones sagitales de cerebros de pollos de 7 a 21 días de edad (P7-P21). En este rango no se observaron diferencias significativas en el patrón de expresión génica; por ende los datos se muestran en un solo grupo etario (P21). Todas las imágenes corresponden a series (secciones sagitales de cerebro de 60µm de grosor) tratadas simultáneamente (una para cada marcador) obtenidas de un único cerebro de un pollo.

Telencéfalo

En el telencéfalo de cerebro de pollo se observó una alta expresión de VGLUT2 en la mayoría de las estructuras paliales, tales como hiperpalio, mesopalio, nidopalio y arcopalio. En las regiones sensoriales primarias, como

Field L, núcleo entopallio y núcleo basalis, la expresión de VGLUT2 fue muy conspicua. Por otra parte, en el subpallio, algunas células del estriado y del globo pálido (GP) fueron también VGLUT2 positivas (Figura 8.A, C, E y G).

Para el caso de EAG2, la expresión fue conspicua en las áreas tálamo-recipientes del nidopallio, como E (Figura 8.B, D, F y H; y Figura 9.A y B) y Field L, y del hiperpallio (hiperpallio apical intersticial, IHA). Interesantemente, el núcleo basalis del nidopallio anterior, que recibe proyecciones somatosensoriales ascendentes desde el núcleo principal del trigémino (PrT) en el cerebro posterior, presentó muchas neuronas EAG2 positivas (Figura 8.B, D, F y H). Además, se hizo evidente una banda de células EAG2 positivas uniendo los núcleos Field L y E en sentido rostro-caudal (Figura 8.B, D, F y H. Asterisco). El nidopallio intermedio presentó escasas células EAG2 positivas (Figura 9.A y C). En las estructuras subpaliales, la mayoría de las células del estriado lateral (LSt) y medial (MSt) expresaron el mRNA de EAG2. En contraste, GP no exhibió marca (Figura 8.B, D, F y H).

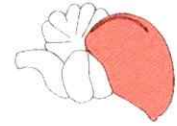
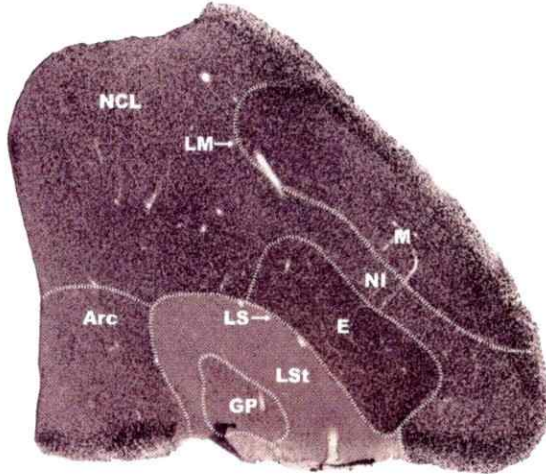
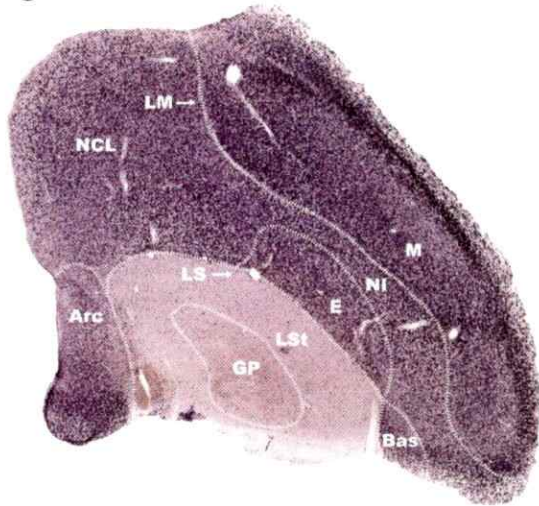
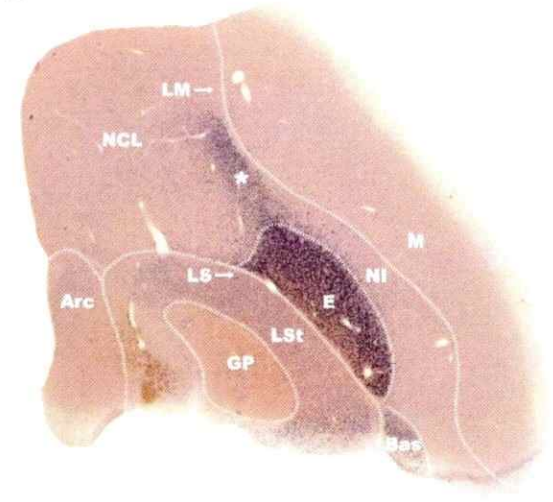
VGLUT2**EAG2****A****B****C****D**

Figura 8. Perfil de expresión de los marcadores moleculares VGLUT2 y EAG2 en el telencéfalo de cerebro de pollo. A y C: Expresión del mRNA de VGLUT2 desde una región lateral a medial del cerebro. **B y D:** Expresión del mRNA de EAG2 desde una región lateral a medial del cerebro. El asterisco (*) indica la banda de células EAG2 positivas uniendo los núcleos Field L y E. El esquema en la esquina superior derecha indica el plano sagital de corte usado en este estudio y la región del cerebro a la cual pertenecen las imágenes (en rosado). Barra de calibración = 1 mm.

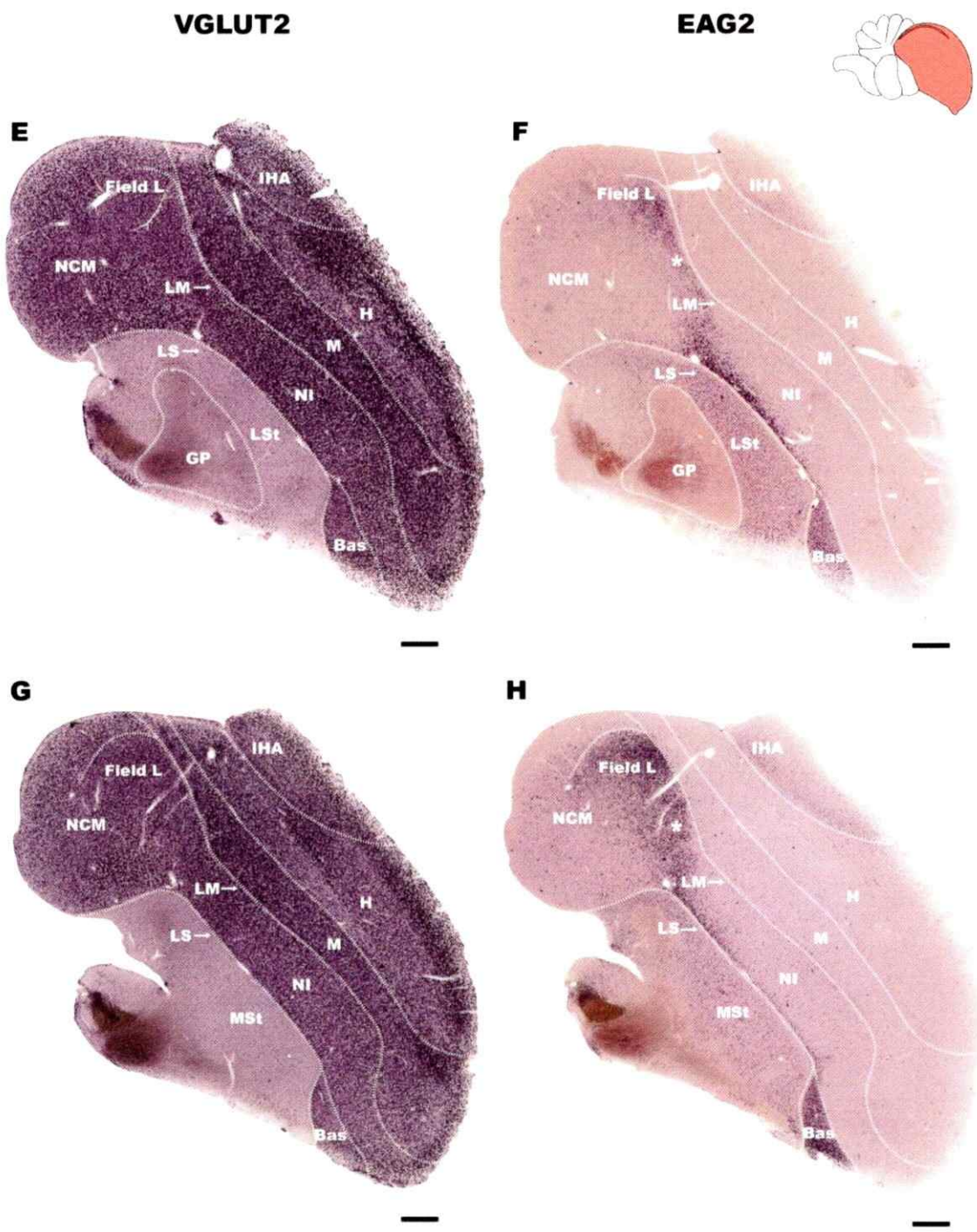


Figura 8. Continuación. E y G: Expresión del mRNA de VGLUT2 desde una región lateral a medial del cerebro. **F y H:** Expresión del mRNA de EAG2 desde una región lateral a medial del cerebro. El asterisco (*) indica la banda de células EAG2 positivas que une los núcleos Field L y E. El esquema en la esquina superior derecha indica el plano sagital de corte usado en este estudio y la región del cerebro a la cual pertenecen las imágenes (en rosado). Barra de calibración = 1 mm.

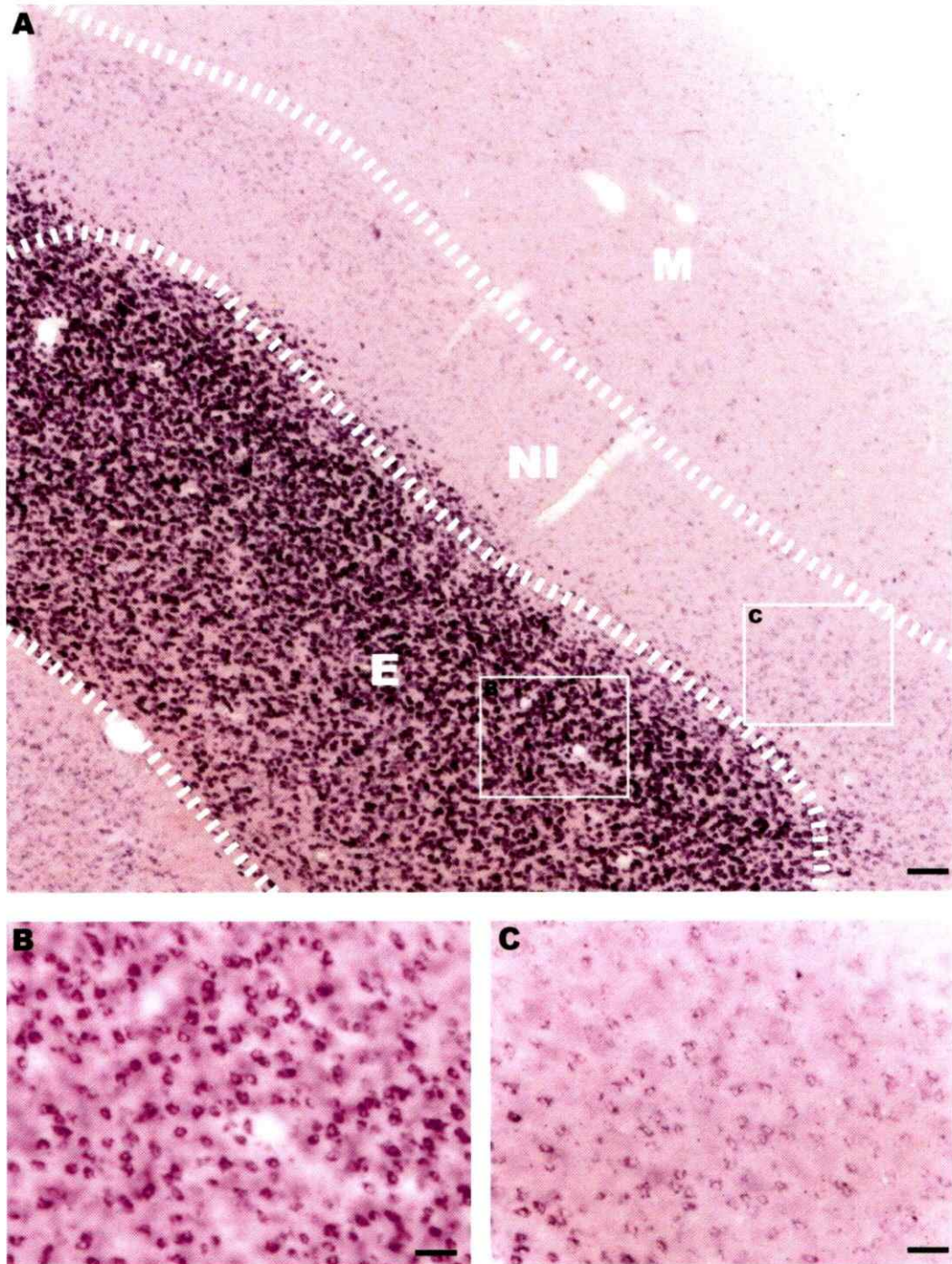


Figura 9. Perfil de expresión del marcador molecular EAG2 en DVR visual. **A:** Detalle de la imagen 8.B, que muestra la expresión del mRNA de EAG2 en el E, NI y M. **C y B:** Imágenes ampliadas de las células EAG2 positivas de los recuadros en A. Barra de calibración en A = 500 μm ; B y C = 60 μm .

Otras estructuras del cerebro

En el diencéfalo de cerebro de pollo se observó una alta expresión de VGLUT2 en la mayoría de los núcleos del tálamo dorso-lateral (DL) y dorsal; por ejemplo, en el núcleo rotundus (Rt; **Figura 10.E y G**). No obstante, en el tálamo ventral, los niveles de expresión VGLUT2 fueron bajos, tal como se muestra en el núcleo geniculado lateral ventral (GLv; **Figura 10.G**). Por otro lado, en el mesencéfalo, la expresión de VGLUT2 fue evidente en la mayoría de las láminas del tectum óptico (TeO) y en el núcleo mesencephalicus lateralis pars dorsalis (MLd); **Figura 10.A, C Y E**). En el complejo ístmico, el núcleo isthmi pars parvocellularis (Ipc) presentó niveles altos de VGLUT2; en contraste, el núcleo isthmi pars magnocellularis (Imc) no mostró marca (**Figura 10.A, C y E**). También, se observaron células VGLUT2 positivas en el núcleo gris tectal (TG) y núcleo pre-tectal anterior (APT; **Figura 10.E y G**). En el cerebelo, VGLUT2 fue expresado intensamente en la capa granular (**Figura 10.E y G**) y en el núcleo cerebelar lateral (Lat; **Figura 10.G**). Finalmente, el mRNA de VGLUT2 fue evidente en varios núcleos del rombencéfalo, como por ejemplo, el núcleo magnocelular coclear (MCC; **Figura 10.E y G**) y núcleo principal del trigémino (**Figura 10.G**).

Con relación a EAG2, se observó una alta expresión del mRNA de EAG2 en el Rt (**Figura 10.F y H**); en algunas células del GLv (**Figura 10.H**); y en menor medida, en el tálamo DL (**Figura 10.F y H**). Por otro lado, en el mesencéfalo, las láminas profundas TeO (13-15) expresaron fuertemente el mRNA de EAG2; al igual que las células del MLd (**Figura 10.B, D y F**). En el complejo ístmico, Ipc e Imc mostraron altos niveles de EAG2 (**Figura 10.B, D y F**). También, TG y APT presentaron células positivas para EAG2 (**Figura 10.F y H**). En el cerebelo, no se observó expresión de EAG2 en la corteza cerebelar (**Figura 10.F y H**); no obstante, en el Lat, la expresión de EAG2 fue muy conspicua (**Figura 10.H**). Por último, en el rombencéfalo, EAG2 se expresó en el MCC (**Figura 10.F y H**) y PrT (**Figura 10.H**), principalmente.



Figura 10. Perfil de expresión de los marcadores moleculares VGLUT2 y EAG2 en el diencefalo, mesencefalo y rombencefalo de cerebro de pollo. A y C: Expresión del mRNA del VGLUT2 desde una región lateral a medial del cerebro. **B y D:** Expresión del mRNA de EAG2 desde una región lateral a medial del cerebro. El esquema en la esquina superior derecha indica el plano sagital de corte usado en este estudio y la región del cerebro a la cual pertenecen las imágenes (en rosado). Barra de calibración = 1 mm.

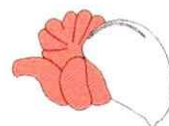
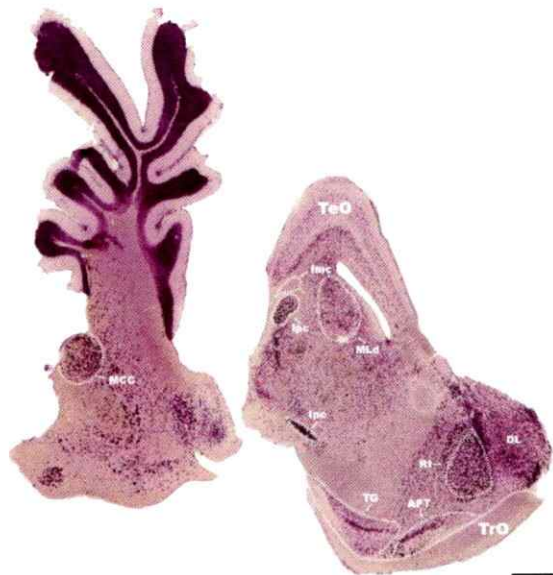
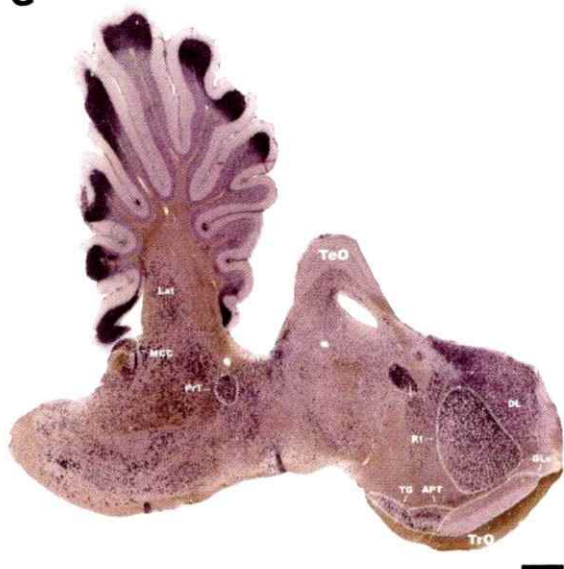
VGLUT2**EAG2****E****F****G****H**

Figura 10. Continuación. E y G: Expresión del mRNA de VGLUT2 desde una región lateral a medial del cerebro. **F y H:** Expresión del mRNA de EAG2 desde una región lateral a medial del cerebro. El esquema en la esquina superior derecha indica el plano sagital de corte usado en este estudio y la región del cerebro a la cual pertenecen las imágenes (en rosado). Barra de calibración = 1 mm.

Protocolo para la doble marca fluorescente de CTB-AF 555 y colorimétrica de una sonda RNA-DIG en el cerebro de pollo

Para validar el protocolo de doble marca de CTB-AF 555 y sonda de RNA-DIG, detallado en la sección de materiales y métodos, se estudió el perfil de expresión de VGLUT2 en las neuronas del Rt que proyectan al E.

Un estudio de doble marca de CTB/RNA-^[35S]dATP en palomas, demostró que las células del Rt son VGLUT2 positivas (Atoji y Karim, 2014). Por lo tanto, si el protocolo de doble marca funciona adecuadamente, este debería permitir reproducir estos resultados.

De este modo, se realizaron inyecciones in vivo en el E (n= 2) de CTB-AF 555 en pollos de 14 a 17 días de edad (P14 a P17). Luego de 4 días de sobrevida, estos animales fueron perfundidos para ocupar su cerebro en los ensayos de hibridación in situ para VGLUT2. En efecto, la marca retrógrada de CTB-AF 555 junto con la señal colorimétrica de una sonda de RNA-DIG, mostró que gran parte de las neuronas del Rt colocalizan con el mRNA de VGLUT2 (**Figura 11 y 12**). Aún más, los datos del conteo celular, revelaron que el 88,9% de las células CTB-AF 555+ expresan el marcador en cuestión (**Tabla 2**).

De esta manera, el experimento control confirmó la identidad glutamatérgica, anteriormente descrita para las neuronas del Rt que proyectan al E y la efectividad de la técnica de doble marca, para estudiar la neuroquímica de las células en el cerebro de ave.

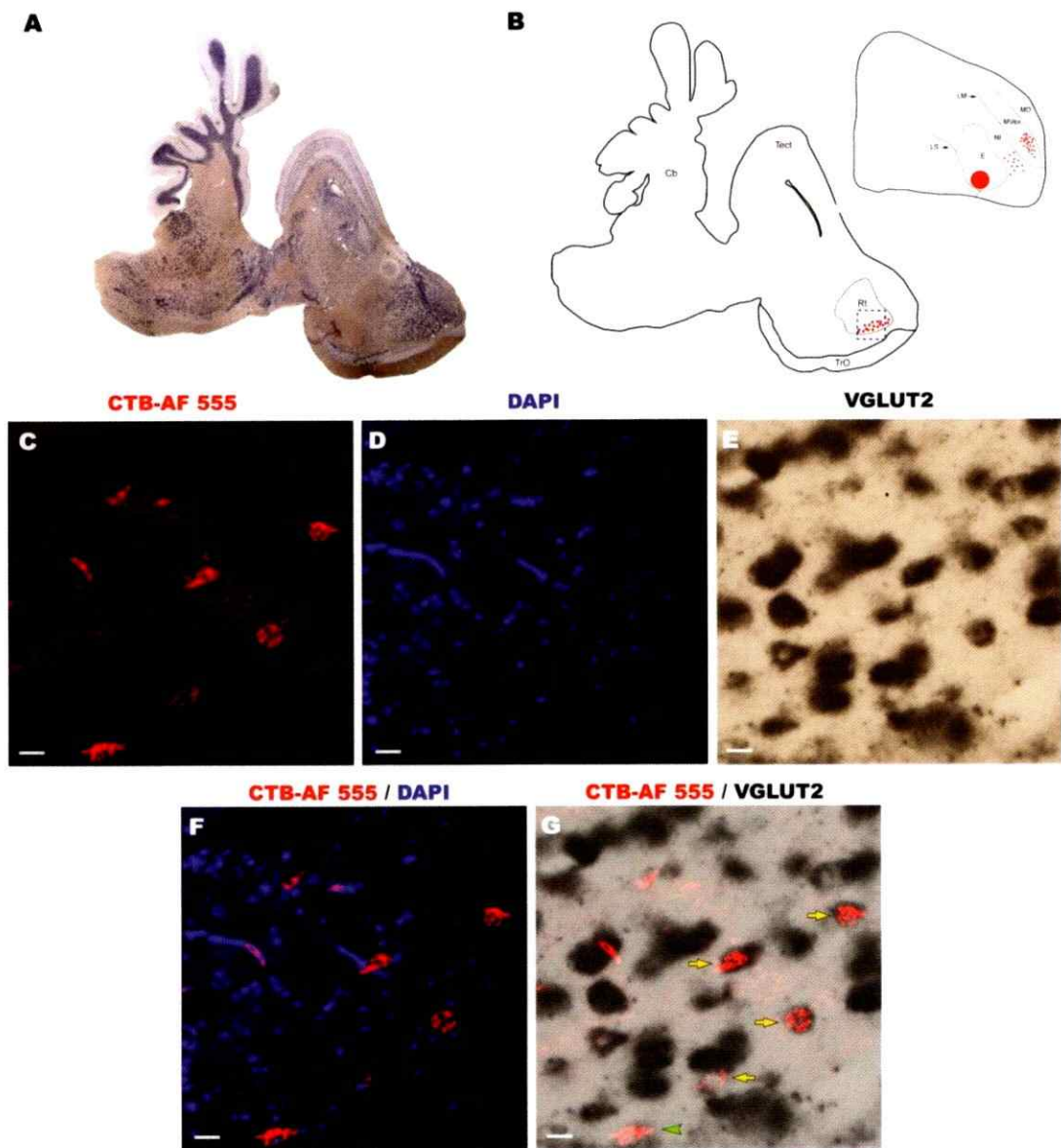


Figura 11. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del Rt que proyectan al E. **A:** Expresión de VGLUT2 en una sección sagital (60 μm) del tálamo retrógradamente marcado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A y de una sección sagital del telencéfalo, representando la inyección de CTB-AF 555 en el E y la distribución de células marcadas retrógradamente en el MVex, NI y Rt. El recuadro azul indica la región en el tálamo a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del Rt marcadas con CTB-AF 555 (flechas blancas). **D:** Núcleo de las células del Rt marcados con DAPI. **E:** Células del Rt marcadas con VGLUT2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas y puntas de flecha verde indican, respectivamente, co-localización y no co-localización. Barra de escala = 20 μm .

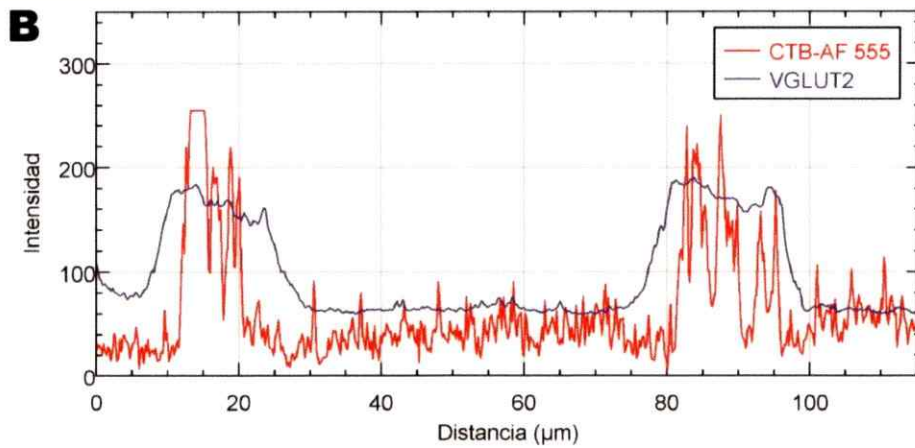
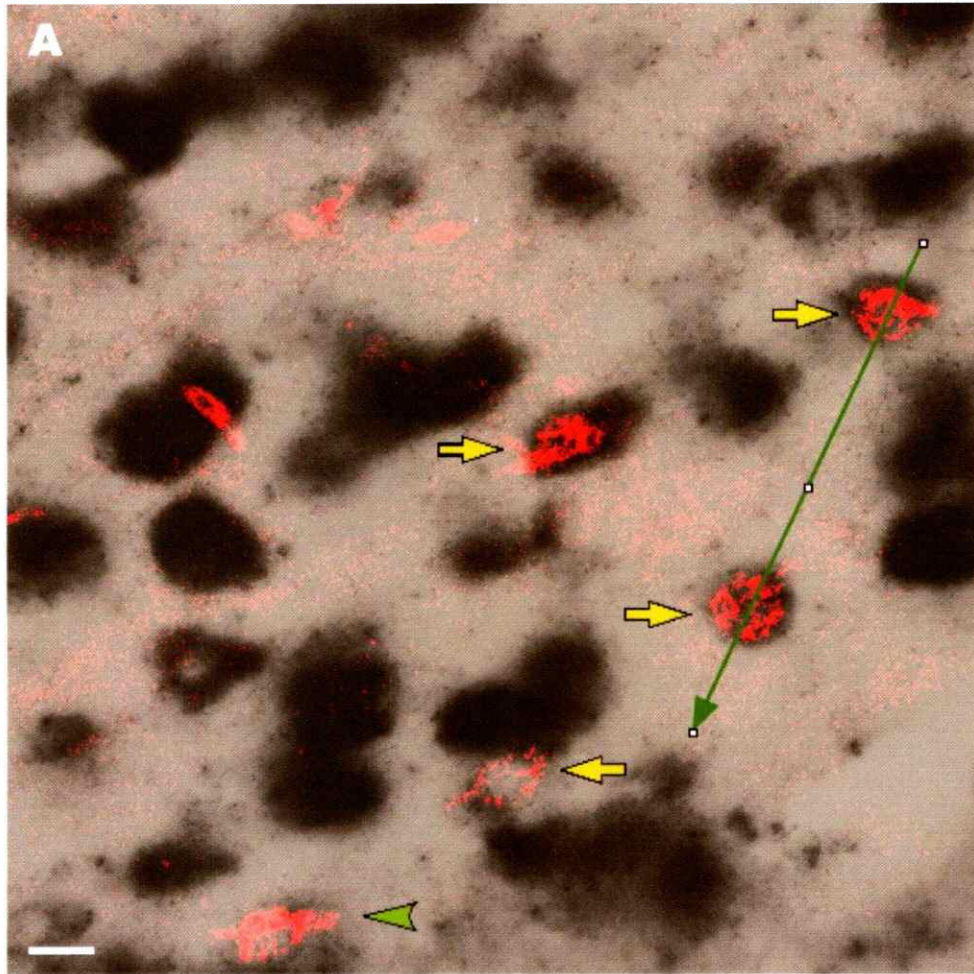


Figura 12. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del Rt que proyectan al E. A: Imagen G de la figura 9, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y VGLUT2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

Tabla 2. Número y porcentaje de células del Rt retrógradamente marcadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-).

Neuronas del Rt que proyectan al E			
Serie VGLUT2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /VGLUT2+	CTB-AF 555+ /VGLUT2-
N° total de células contadas en 5 secciones	63	56	7
Porcentaje del N° total de células contadas en 5 secciones [%]	100	88,9	11,1

Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual

Para los experimentos de doble marcaje, se realizaron inyecciones in vivo de CTB-AF 555 en NCL (n= 2) y E (n= 2) en pollos de 14 a 17 días de edad (P14 a P17). Después de 4 días de sobrevida (P18-P21), los animales fueron perfundidos para ocupar su cerebro en los ensayos de hibridación in situ para VGLUT2 y EAG2. Todas las imágenes corresponden a series (secciones sagitales de cerebro de 60 µm de grosor) tratadas simultáneamente (una para cada marcador) obtenidas de un único cerebro de un pollo inyectado en NCL o E.

**Neuronas del nidopallio intermedio que proyectan al
nidopallio caudo-lateral.**

La marca retrógrada de CTB-AF 555 desde el NCL combinada con hibridación in situ colorimétrica, reveló que la mayoría de las neuronas del NI que proyectan al NCL coexpresan (colocalizan con la señal de) VGLUT2 (**Figura 13 y 14**). El posterior análisis del conteo celular en distintas regiones del NI, mostró que el 96,7% de las células CTB-AF 555+ expresan VGLUT2 (**Tabla 3. Serie VGLUT2**).

Por otra parte, se observó que una subpoblación minoritaria (20,4%) de neuronas retrógradamente marcadas en el NI, expresan EAG2 (**Figura 15 y 16, Tabla 3. Serie EAG2**).

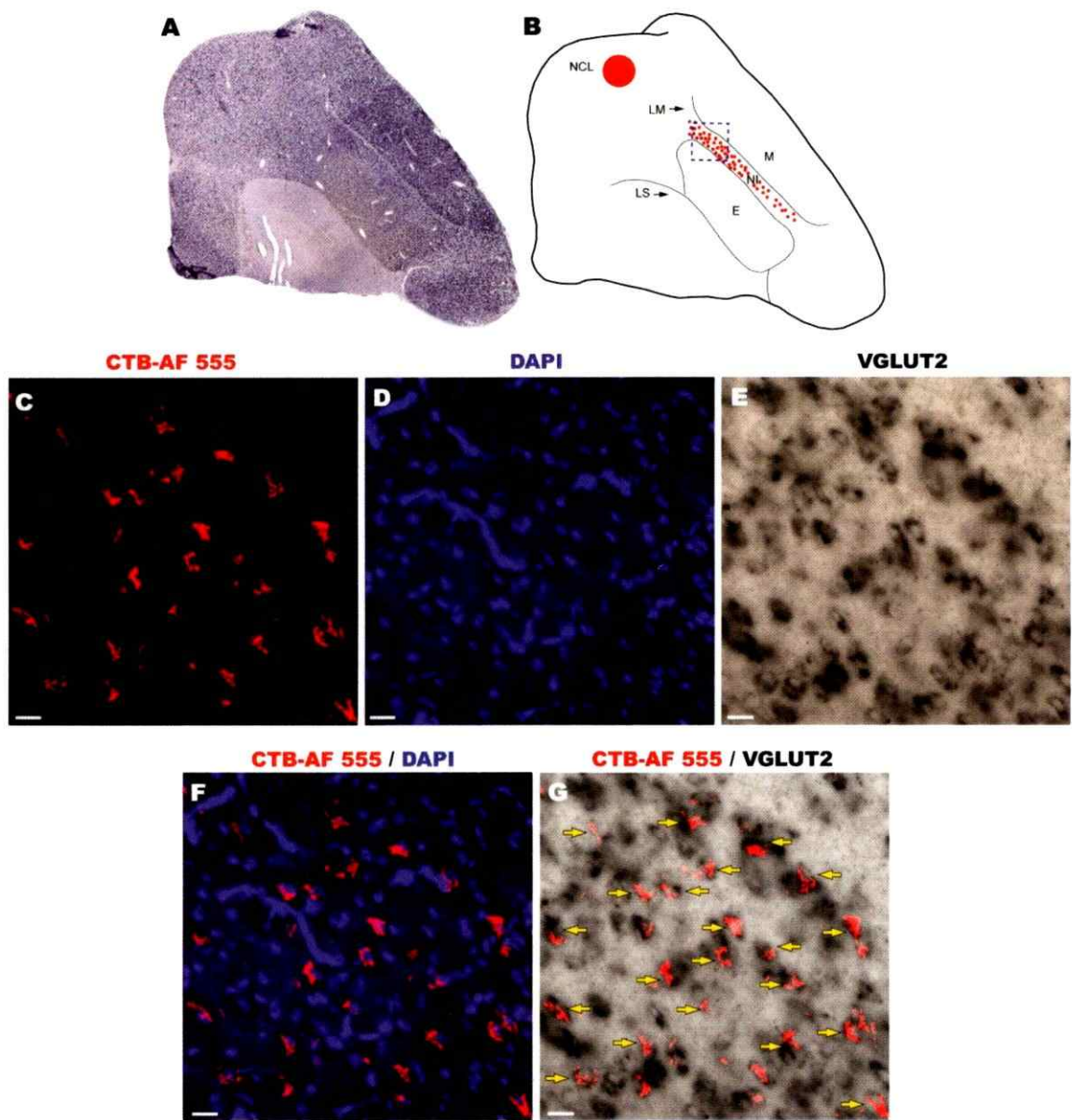


Figura 13. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL. **A:** Expresión de VGLUT2 en una sección sagital (60 μm) del telencéfalo inyectado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A, representando la inyección de CTB-AF 555 en el NCL y la distribución de células marcadas retrógradamente en el NI. El recuadro azul indica la región del NI a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del NI marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células del NI marcados con DAPI. **E:** Células del NI marcadas con VGLUT2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas indican co-localización. Barra de escala = 20 μm .

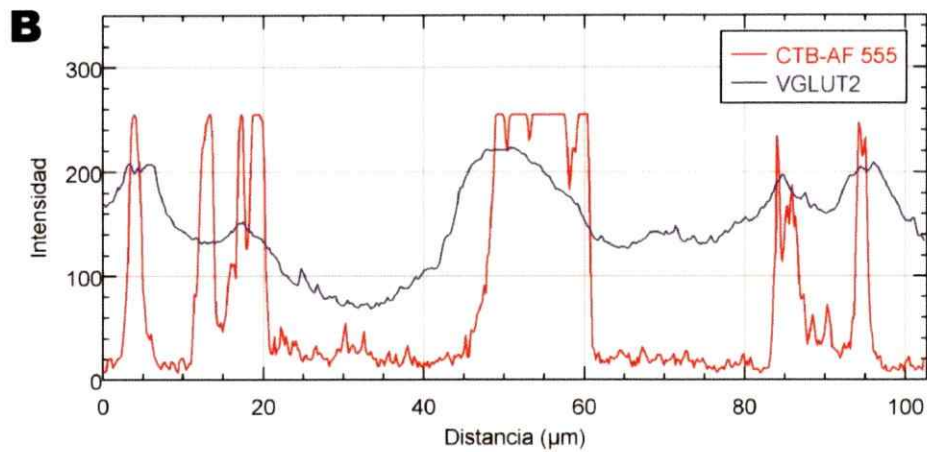
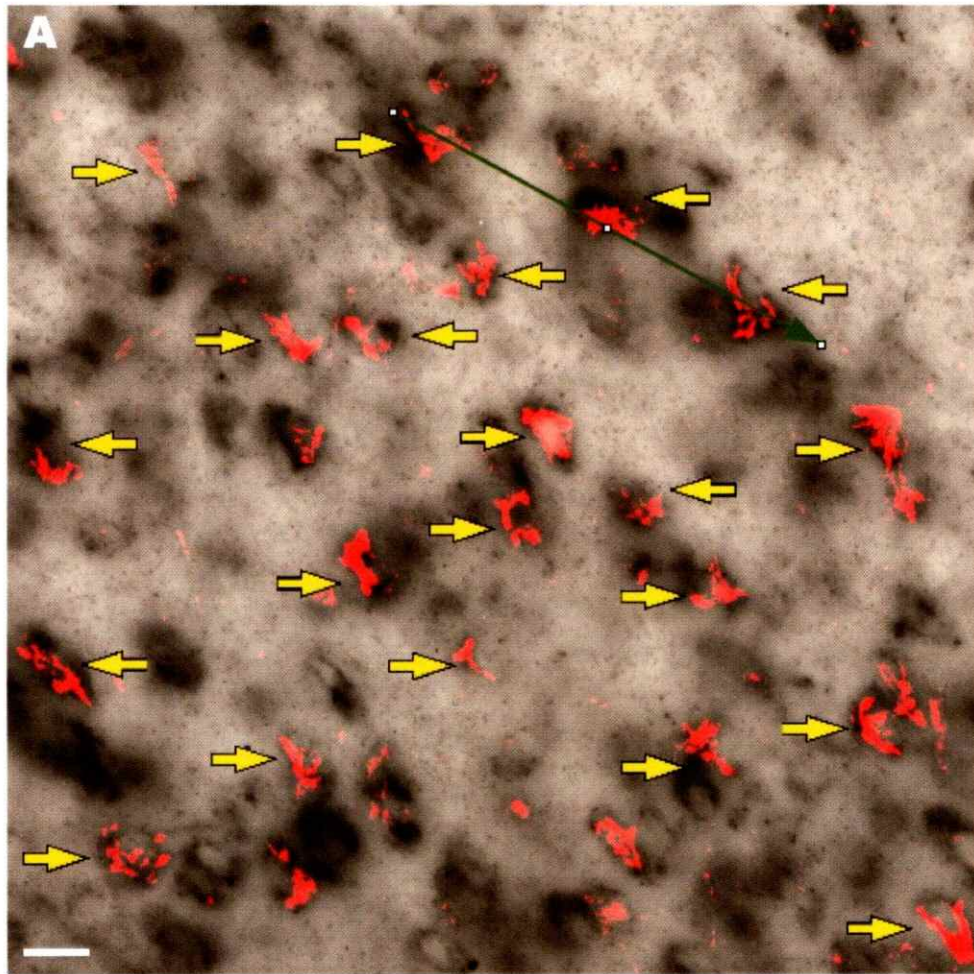


Figura 14. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL. A: Imagen G de la figura 11, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y VGLUT2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

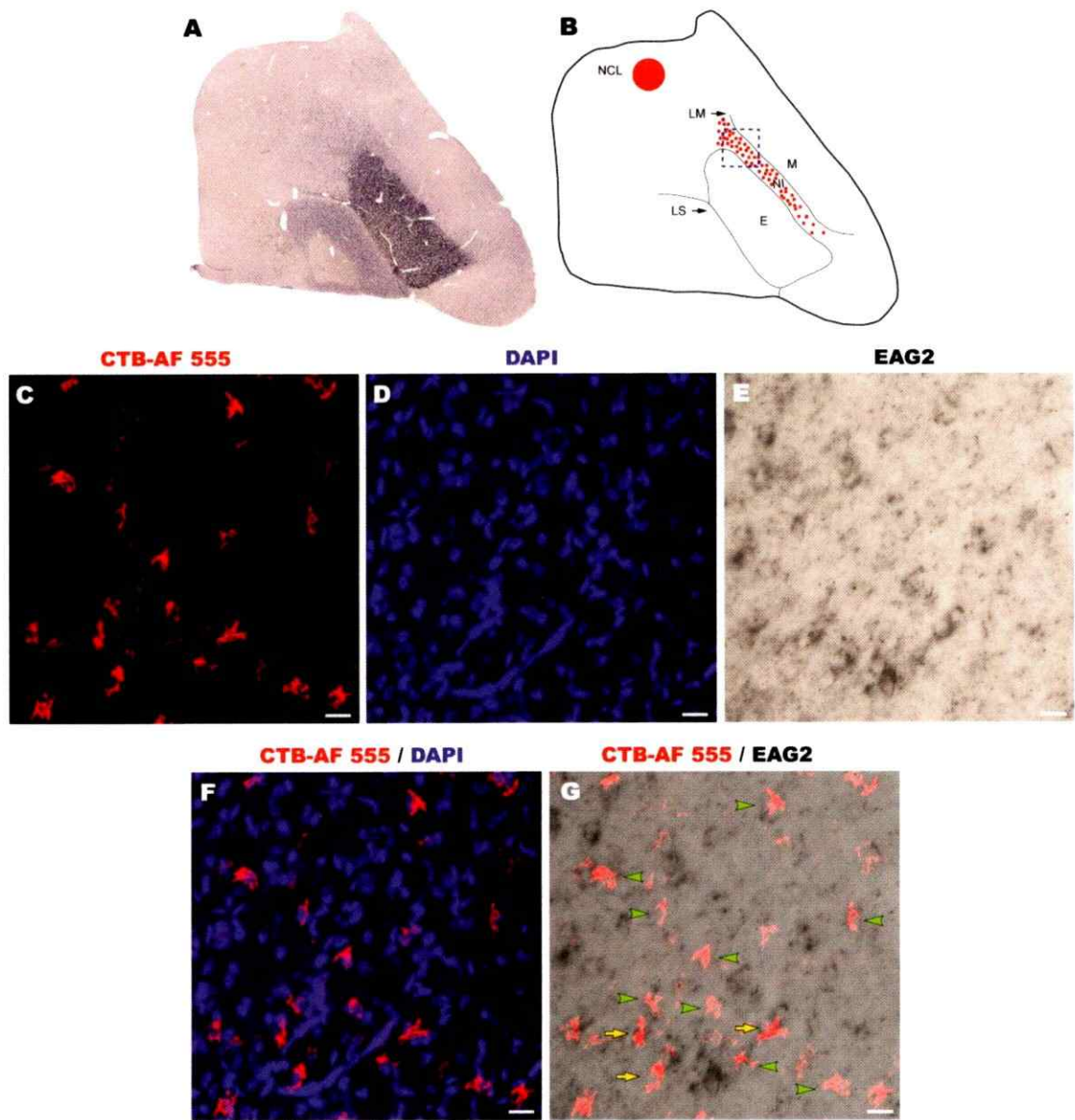


Figura 15. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL. **A:** Expresión de EAG2 en una sección sagital (60 μm) del telencéfalo inyectado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A, representando la inyección de CTB-AF 555 en el NCL y la distribución de células marcadas retrógradamente en el NI. El recuadro azul indica la región del NI a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del NI marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células del NI marcados con DAPI. **E:** Células del NI marcadas con EAG2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas y puntas de flecha verde indican, respectivamente, co-localización y no co-localización. Barra de escala = 20 μm .

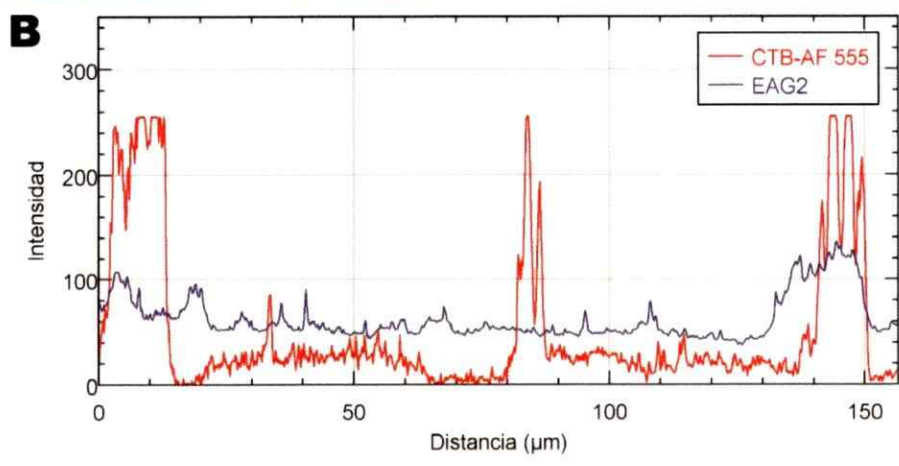
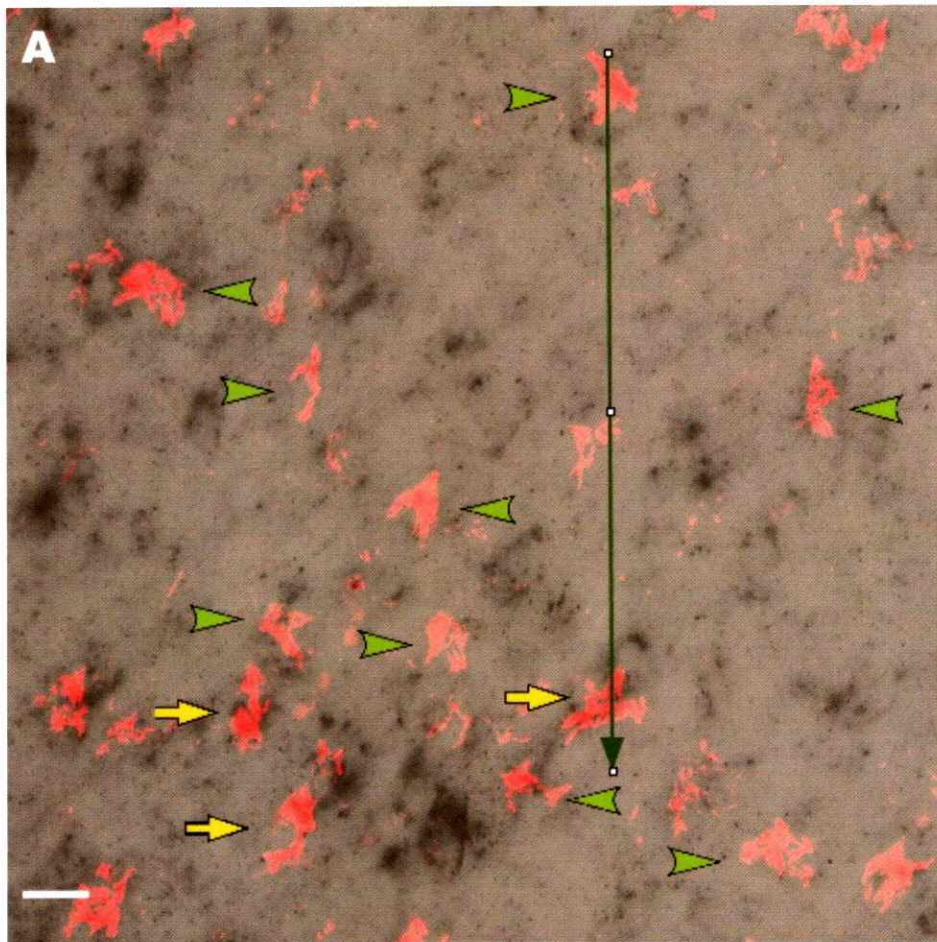


Figura 16. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al NCL. A: Imagen G de la figura 13, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y EAG2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

Tabla 3. Número y porcentaje de células del NI retrógradamente marcadas desde el NCL (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT2+/-) y EAG2 (EAG2+/-).

Neuronas del NI que proyectan al NCL			
Serie VGLUT2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /VGLUT2+	CTB-AF 555+ /VGLUT2-
N° total de células contadas en 12 secciones	302	292	10
Porcentaje del N° total de células contadas en 12 secciones [%]	100	96,7	3,3
Serie EAG2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /EAG2+	CTB-AF 555+ /EAG2-
N° total de células contadas en 9 secciones	142	29	113
Porcentaje del N° total de células contadas en 9 secciones [%]	100	20,4	79,6

Neuronas del mesopallio ventral externo y nidopallio intermedio que proyectan al núcleo entopallio

Por otro lado, la marca retrógrada de CTB-AF 555 desde el E combinada con hibridación in situ colorimétrica, evidenció que gran parte de las neuronas del MVex que proyectan al E colocalizan con la señal de VGLUT2 (Figura 17 y 18). Los datos del conteo celular, recopilados de distintas regiones del MVex, mostraron que el 95,7% de las células CTB-AF 555+ presentan la señal de VGLUT2 (Tabla 4. Serie VGLUT2).

En cambio, se observó que muy pocas neuronas retrógradamente marcadas en el MVex, expresan EAG2 (**Figura 19 y 20**). Es más, el conteo celular reveló que solo el 1% de las células CTB-AF 555+ del MVex expresan el mRNA de EAG2 (**Tabla 4. Serie EAG2**).

Para el caso de las neuronas del NI que proyectan al E, se observó que la mayoría colocaliza con la señal de VGLUT2 (**Figura 21 y 22**). El conteo celular en varias regiones del NI, mostró que el 97% de las células CTB-AF 555+ doble marcan con la señal de VGLUT2 (**Tabla 5. Serie VGLUT2**). En contraste, una subpoblación minoritaria (30,2%) de neuronas retrógradamente marcadas en el NI, expresan EAG2 (**Figura 23 y 24, Tabla 5. Serie EAG2**).

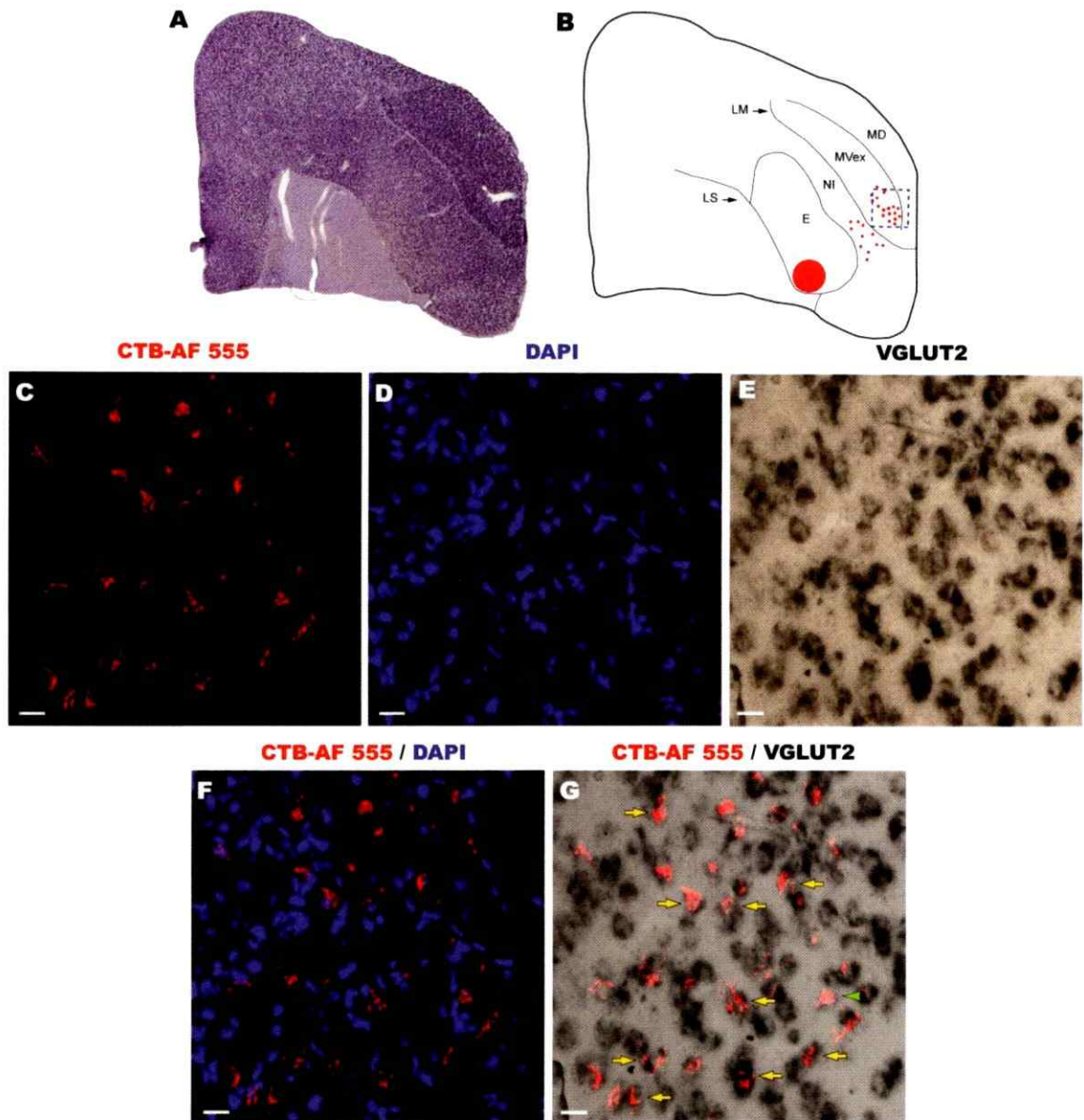


Figura 17. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del MVex que proyectan al E. **A:** Expresión de VGLUT2 en una sección sagital (60 μ m) del telencéfalo inyectado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A, representando la inyección de CTB-AF 555 en el E y la distribución de células marcadas retrógradamente en el MVex. El recuadro azul indica la región del MVex a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del MVex marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células del MVex marcados con DAPI. **E:** Células del MVex marcadas con VGLUT2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas y puntas de flecha verde indican, respectivamente, co-localización y no co-localización. Barra de escala = 20 μ m.

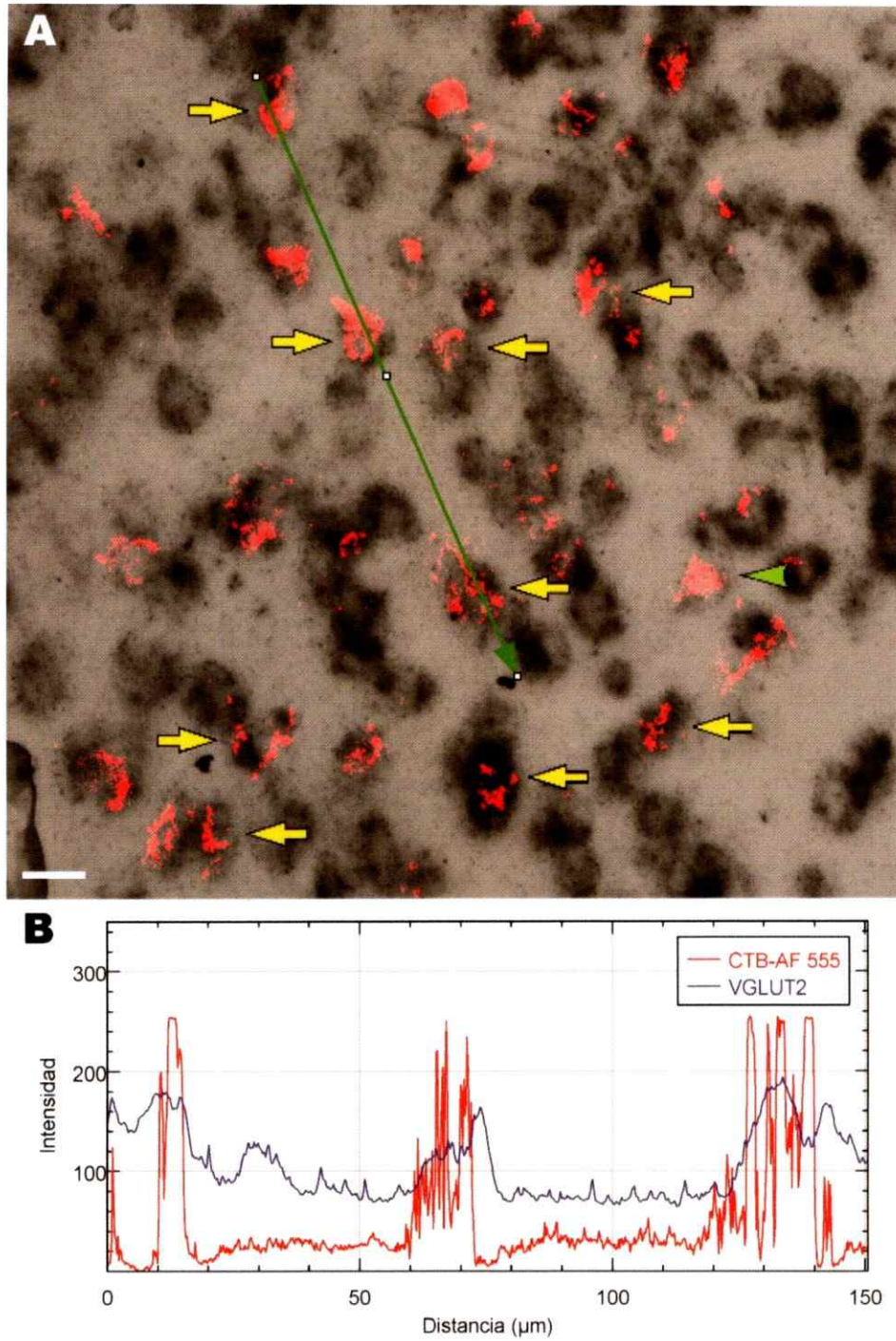


Figura 18. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del MVex que proyectan al E. A: Imagen G de la figura 15, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y VGLUT2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscura posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 μm .

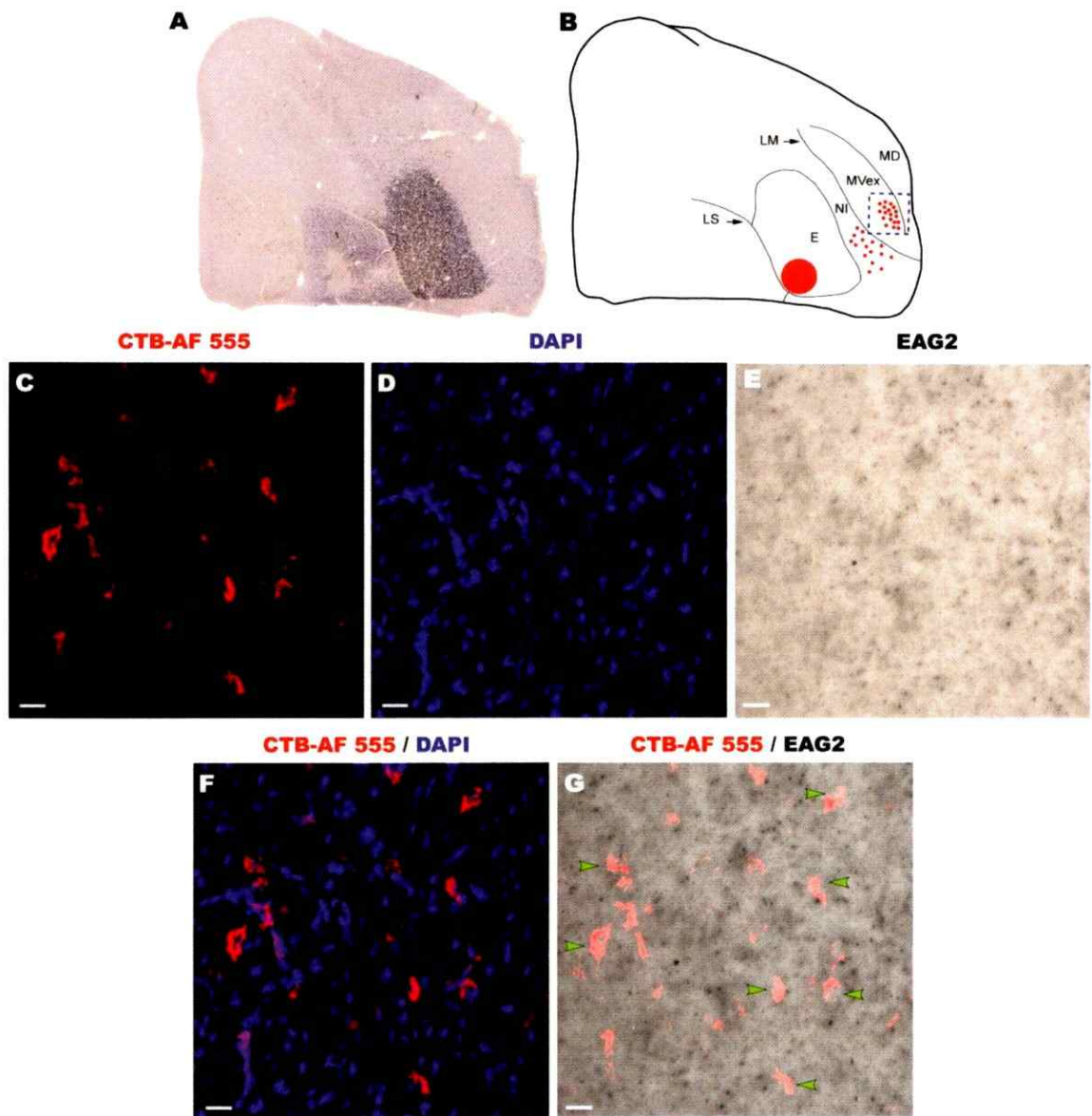


Figura 19. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del MVex que proyectan al E. **A:** Expresión de EAG2 en una sección sagital (60 μm) del telencéfalo inyectado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A, representando la inyección de CTB-AF 555 en el E y la distribución de células marcadas retrógradamente en el MVex. El recuadro azul indica la región del MVex a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del MVex marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células del MVex marcados con DAPI. **E:** Células del MVex marcadas con EAG2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las puntas de flecha verde indican no co-localización. Barra de escala = 20 μm .

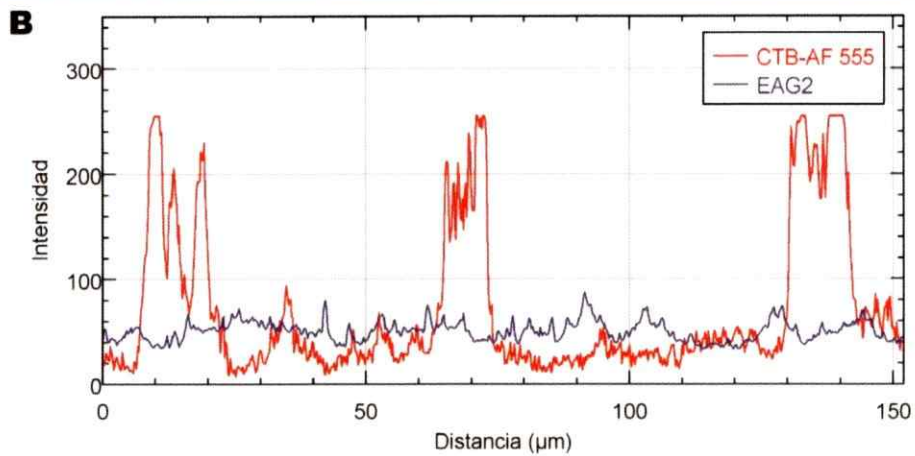
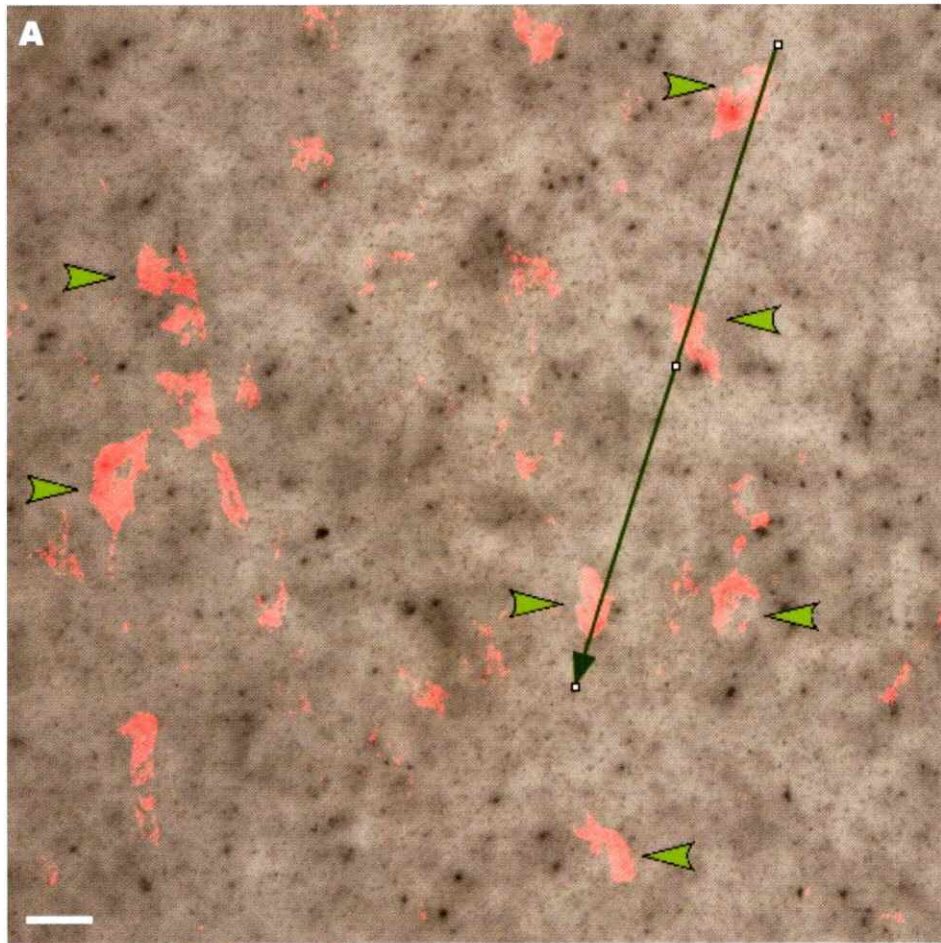


Figura 20. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del MVex que proyectan al E. A: Imagen G de la figura 17, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y EAG2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

Tabla 4. Número y porcentaje de células del MVex retrógradamente marcadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-) y EAG2 (EAG2+/-).

Neuronas del MVex que proyectan al E			
Serie VGLUT2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /VGLUT2+	CTB-AF 555+ /VGLUT2-
N° total de células contadas en 7 secciones	210	201	9
Porcentaje del N° total de células contadas en 7 secciones [%]	100	95,7	4,3
Serie EAG2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /EAG2+	CTB-AF 555+ /EAG2-
N° total de células contadas en 8 secciones	299	3	296
Porcentaje del N° total de células contadas en 8 secciones [%]	100	1	99

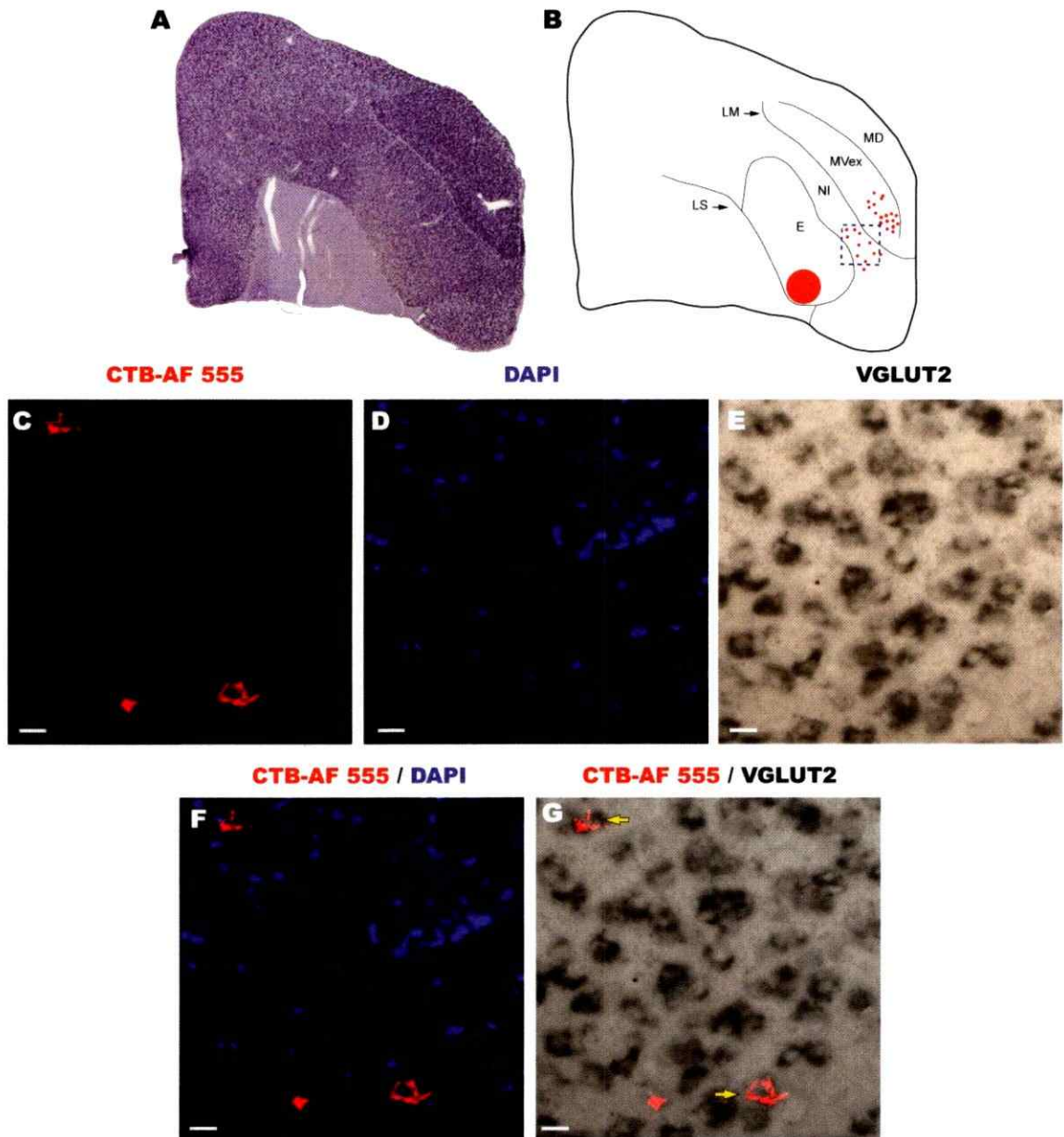


Figura 21. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al E. **A:** Expresión de VGLUT2 en una sección sagital (60 μm) del telencéfalo inyectado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A, representando la inyección de CTB-AF 555 en el E y la distribución de células marcadas retrógradamente en el NI. El recuadro azul indica la región del NI a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del NI marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células del NI marcadas con DAPI. **E:** Células del NI marcadas con VGLUT2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas indican co-localización. Barra de escala = 20 μm .

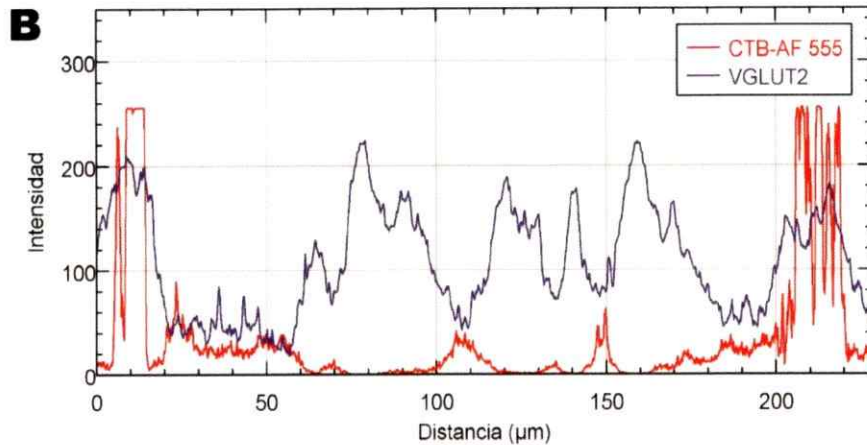
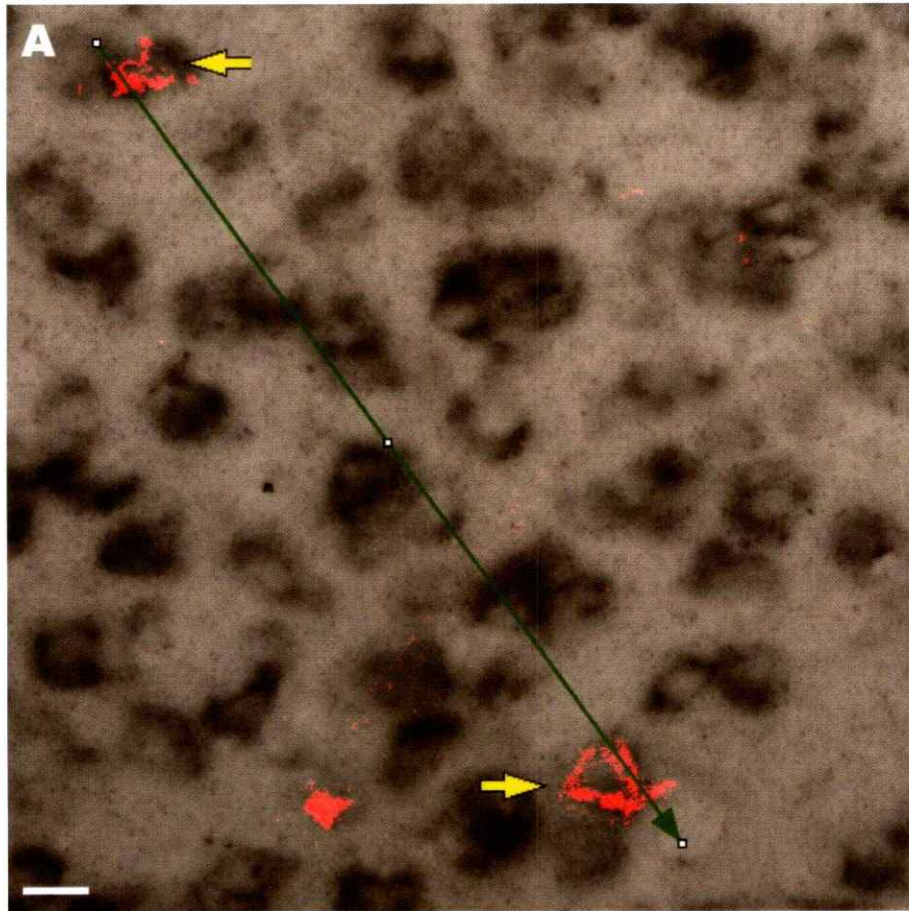


Figura 22. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas del NI que proyectan al E. A: Imagen G de la figura 19, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y VGLUT2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

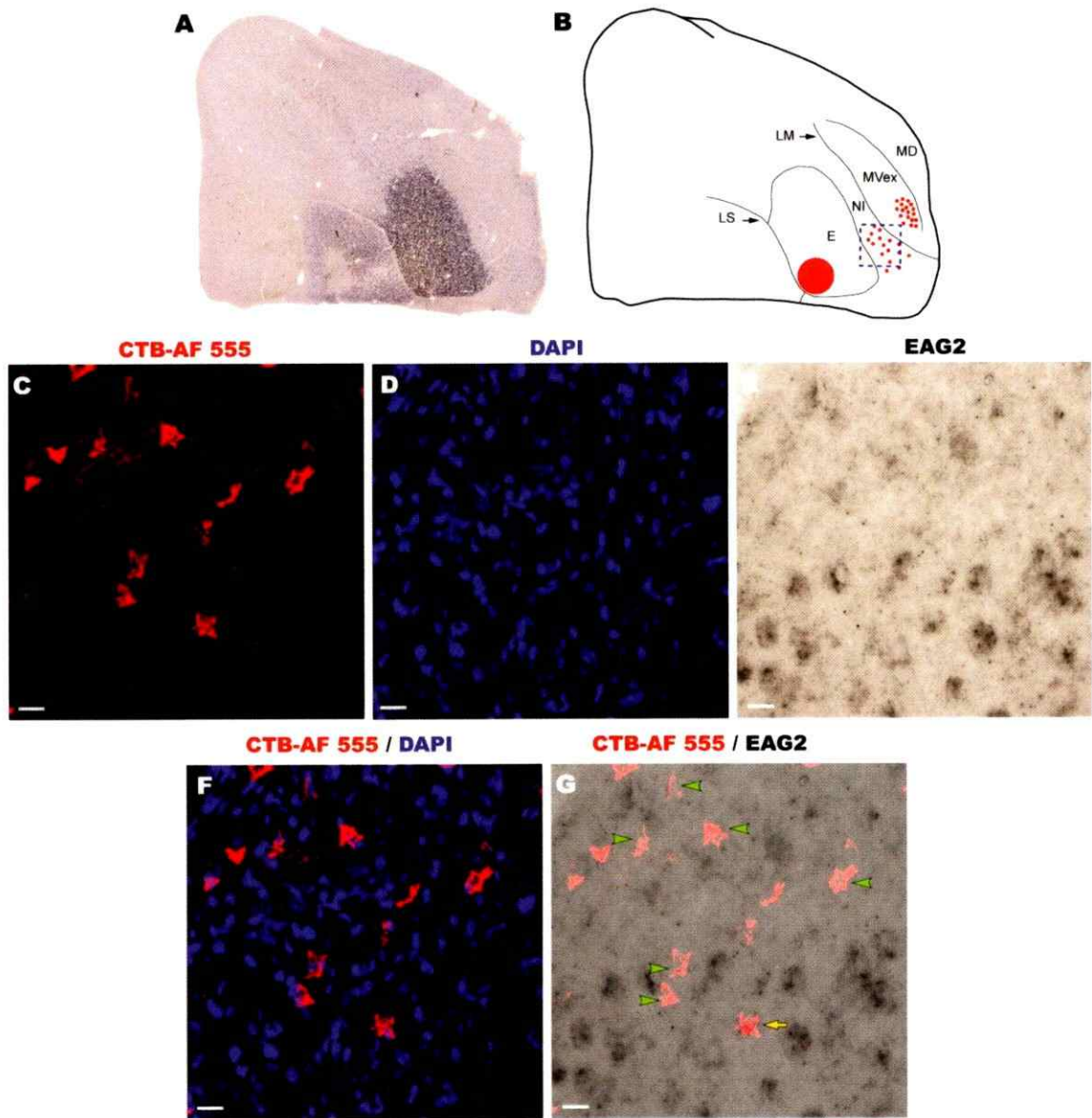


Figura 23. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al E. **A:** Expresión de EAG2 en una sección sagital (60 μm) del telencéfalo inyectado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A, representando la inyección de CTB-AF 555 en el E y la distribución de células marcadas retrógradamente en el NI. El recuadro azul indica la región del NI a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del NI marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células del NI marcadas con DAPI. **E:** Células del NI marcadas con EAG2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas y puntas de flecha verde indican, respectivamente, co-localización y no co-localización. Barra de escala = 20 μm .

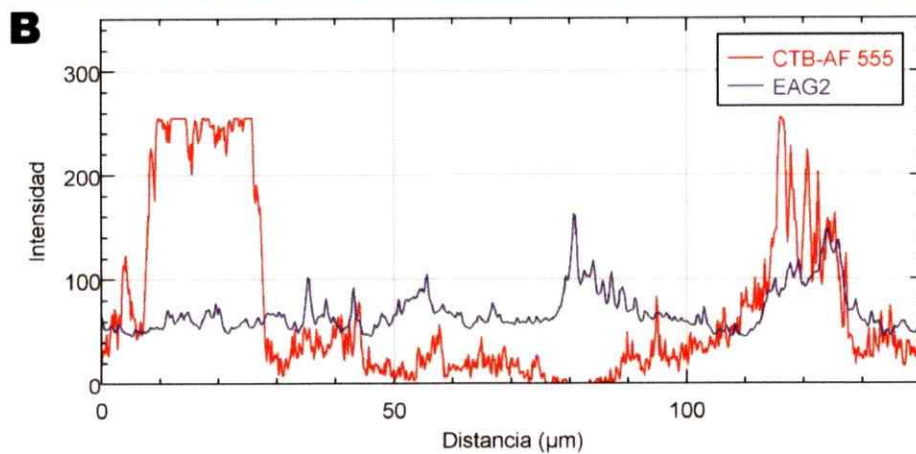
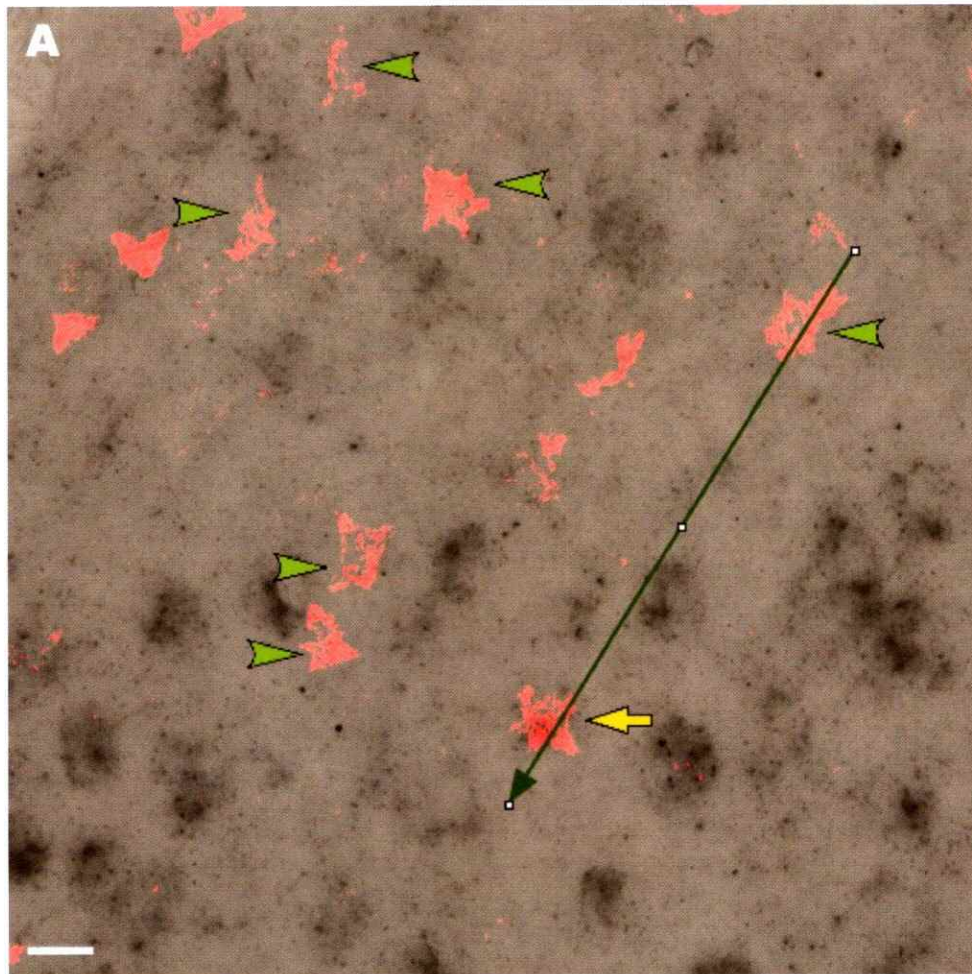


Figura 24. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del NI que proyectan al E. A: Imagen G de la figura 21, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y EAG2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

Tabla 5. Número y porcentaje de células del NI retrógradamente marcadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-) y EAG2 (EAG2+/-).

Neuronas del NI que proyectan al E			
Serie VGLUT2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /VGLUT2+	CTB-AF 555+ /VGLUT2-
N° total de células contadas en 10 secciones	67	65	2
Porcentaje del N° total de células contadas en 10 secciones [%]	100	97	3
Serie EAG2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+/ EAG2+	CTB-AF 555+/ EAG2-
N° total de células contadas en 7 secciones	265	80	185
Porcentaje del N° total de células contadas en 7 secciones [%]	100	30,2	69,8

Otras regiones sensoriales: neuronas tálamo-paliales de segundo orden (T-P2°) y núcleo rotundus

Las inyecciones de CTB-AF 555 en NCL y E además marcaron retrógradamente células del tálamo dorsal. Ello nos permitió caracterizar el perfil de expresión de VGLUT2 y EAG2 de estas neuronas, cuestión que no ha sido estudiada previamente.

Así, en las neuronas tálamo-paliales que proyectan al NCL, que llamaremos de segundo orden sensorial, dado que no reciben aferencias sensoriales directas, se observó que la mayoría colocalizan con la señal de VGLUT2 (**Figura 25 y 26**). El análisis del conteo celular en esta región talámica peri-sensorial, mostró que el 93,3% de las células CTB-AF 555+ doble marcan con la señal de VGLUT2 (**Tabla 6. Serie VGLUT2**). En contraste, no se detectó expresión de EAG2 en estas células (**Figura 27 y 28**). Más aún, se evidenció que ninguna de las células CTB-AF 555+ expresan EAG2 (**Tabla 6. Serie EAG2**).

También observamos que una considerable proporción (73.7%) de las neuronas del Rt que proyectan al E expresan el mRNA de EAG2 (**Figura 29 y 30, Tabla 7**).

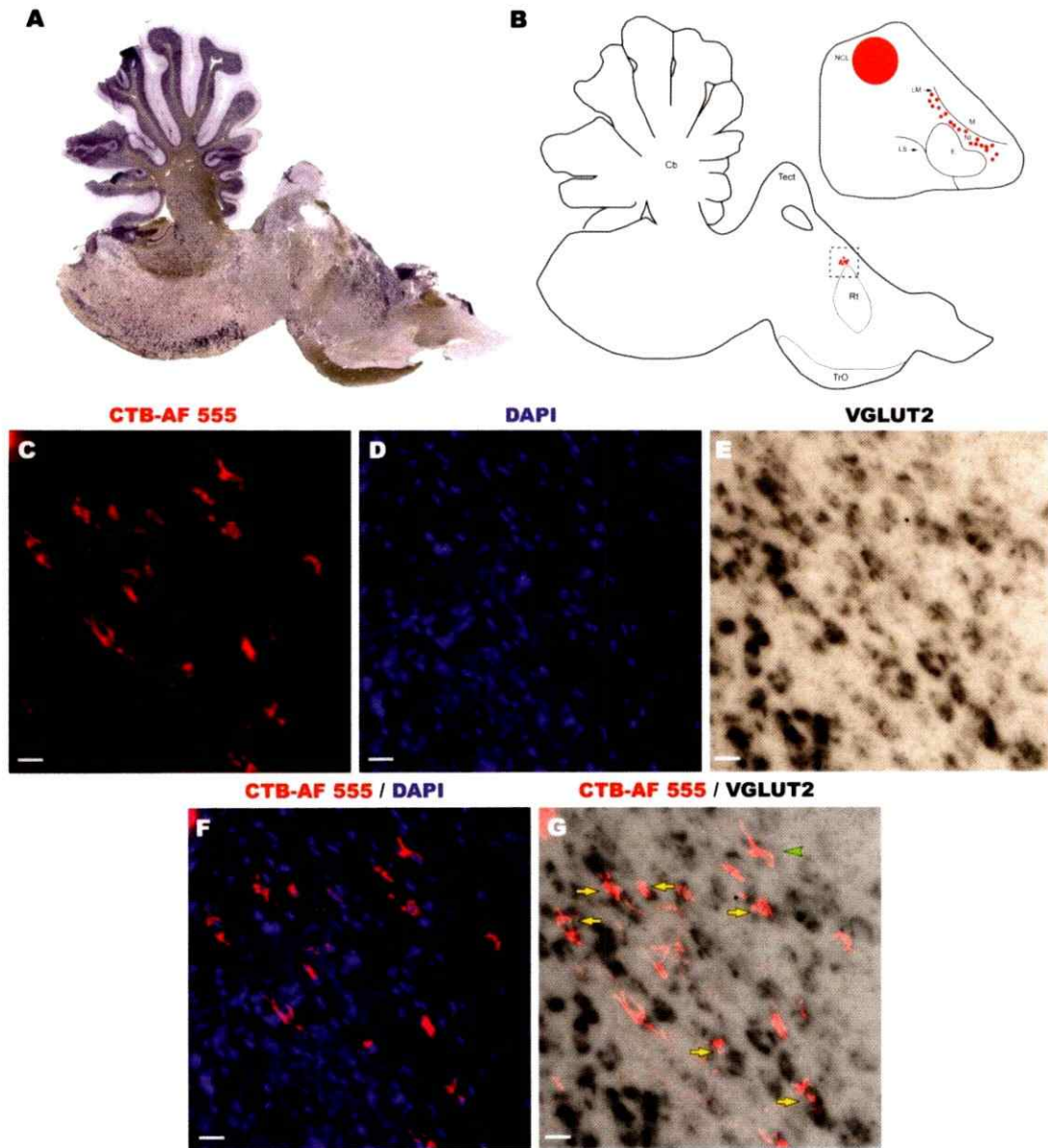


Figura 25. Co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL. **A:** Expresión de VGLUT2 en una sección sagital (60 μm) del tálamo retrógradamente marcado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A y de una sección sagital del telencéfalo, representando la inyección de CTB-AF 555 en el NCL y la distribución de células marcadas retrógradamente en el NI y periferia del Rt. El recuadro azul indica la región en el tálamo a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células T-P2° marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células T-P2° marcadas con DAPI. **E:** Células T-P2° marcadas con VGLUT2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas y puntas de flecha verde indican, respectivamente, co-localización y no co-localización. Barra de escala = 20 μm .

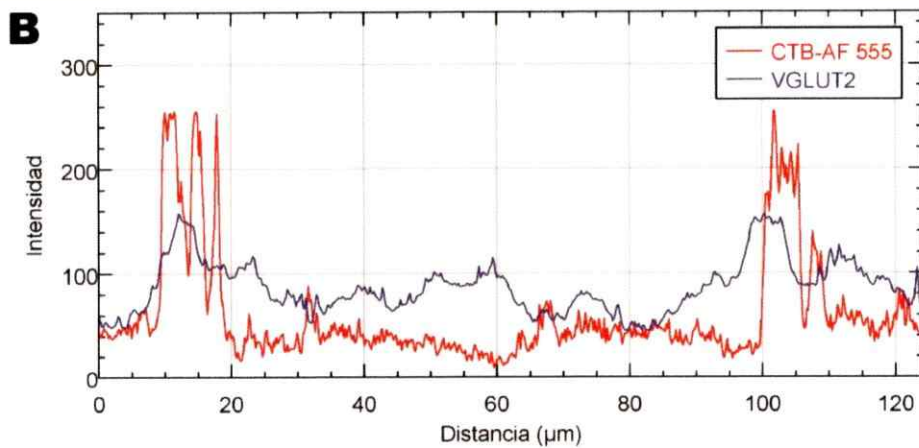
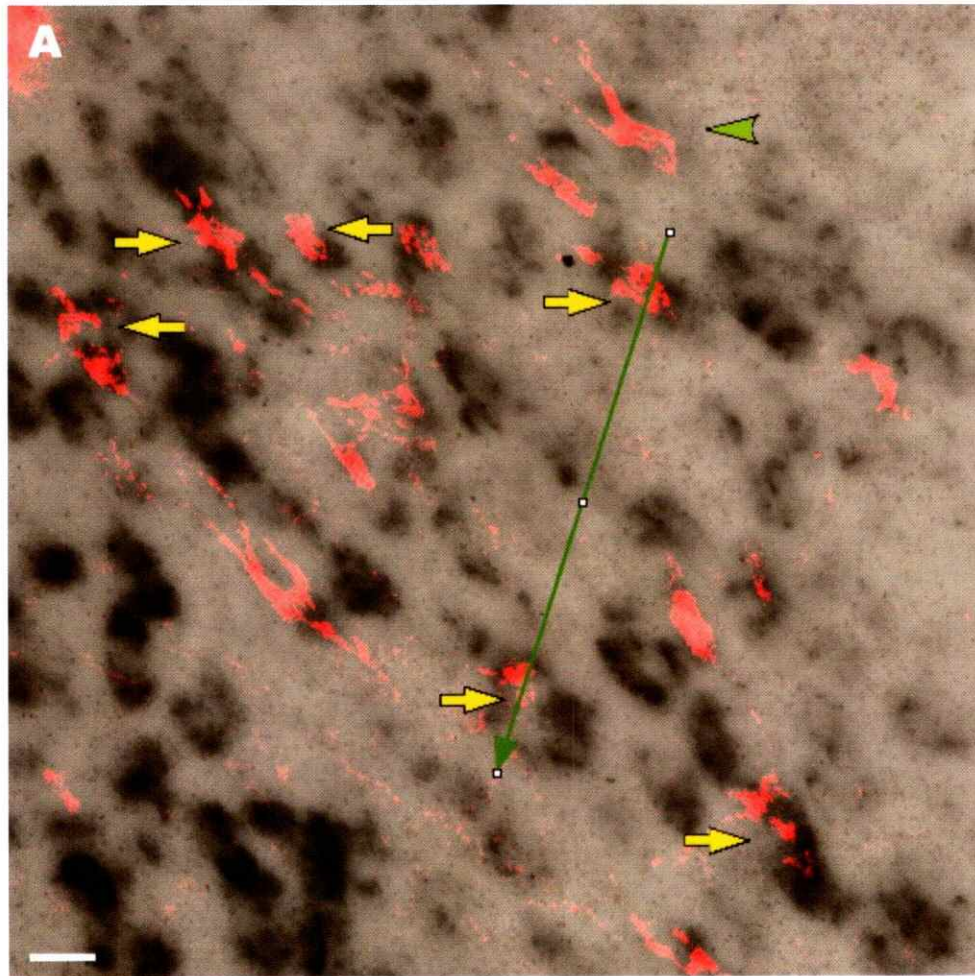


Figura 26. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y VGLUT2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL. A: Imagen G de la figura 23, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y VGLUT2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

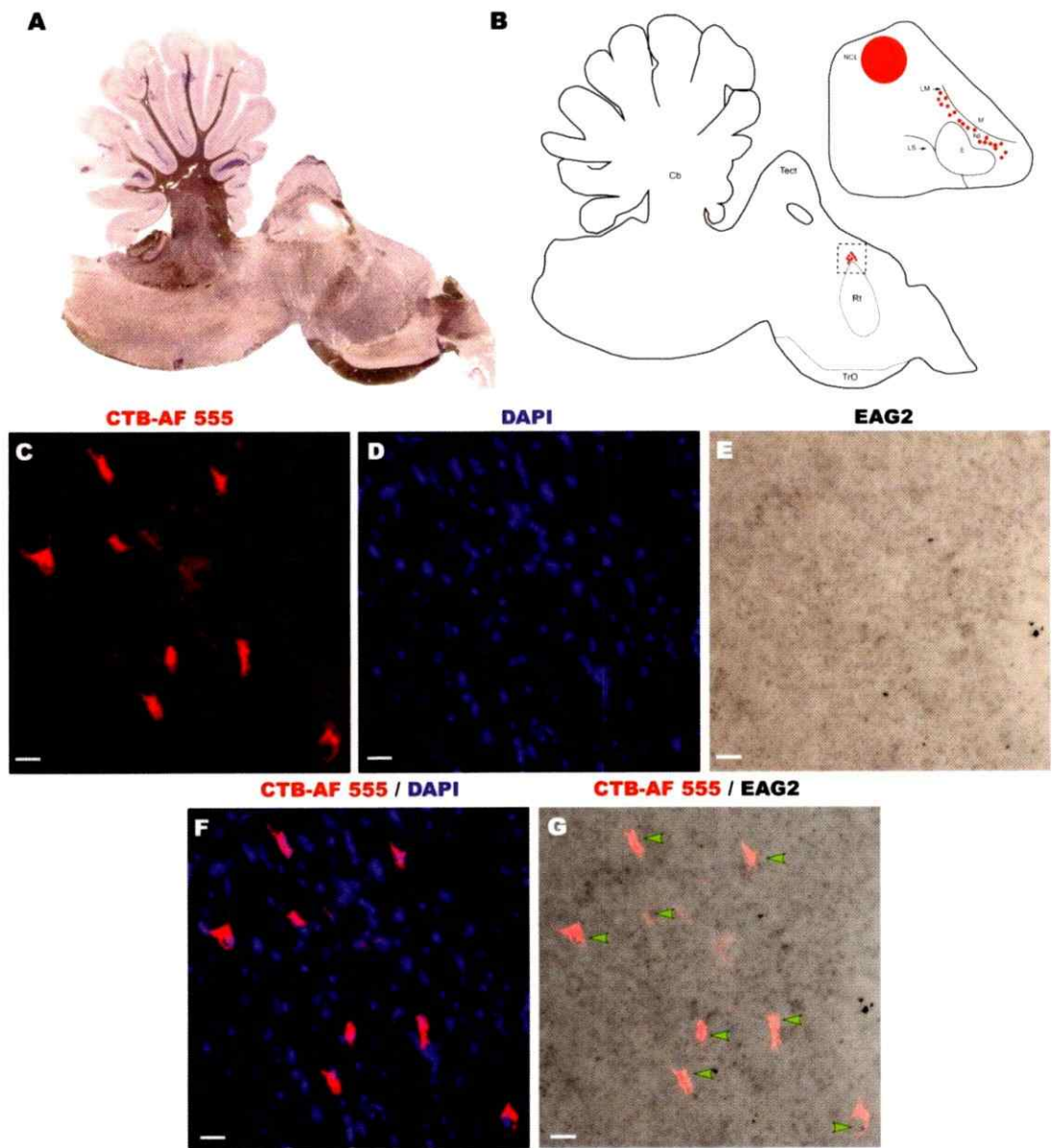


Figura 27. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL. **A:** Expresión de EAG2 en una sección sagital (60 μ m) del tálamo retrógradamente marcado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A y de una sección sagital del telencéfalo, representando la inyección de CTB-AF 555 en el NCL y la distribución de células marcadas retrógradamente en el NI y periferia del Rt. El recuadro azul indica la región en el tálamo a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células T-P2° marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células T-P2° marcadas con DAPI. **E:** Células T-P2° marcadas con EAG2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las puntas de flecha verde indican no co-localización. Barra de escala = 20 μ m.

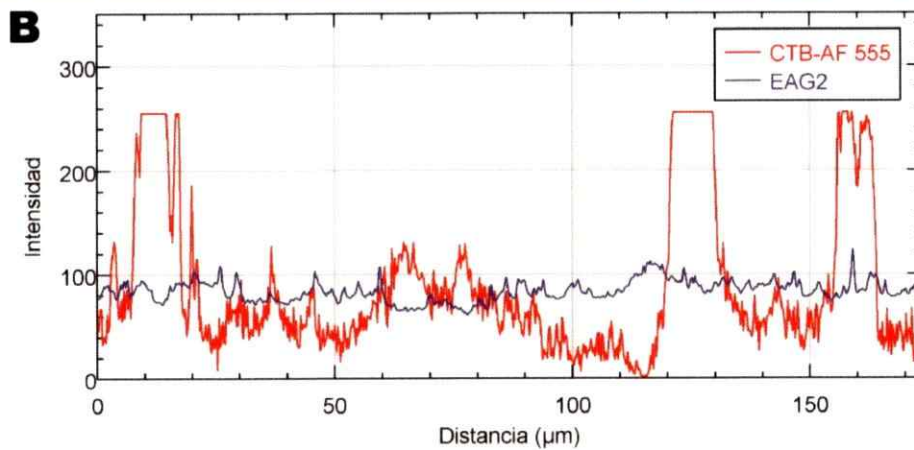
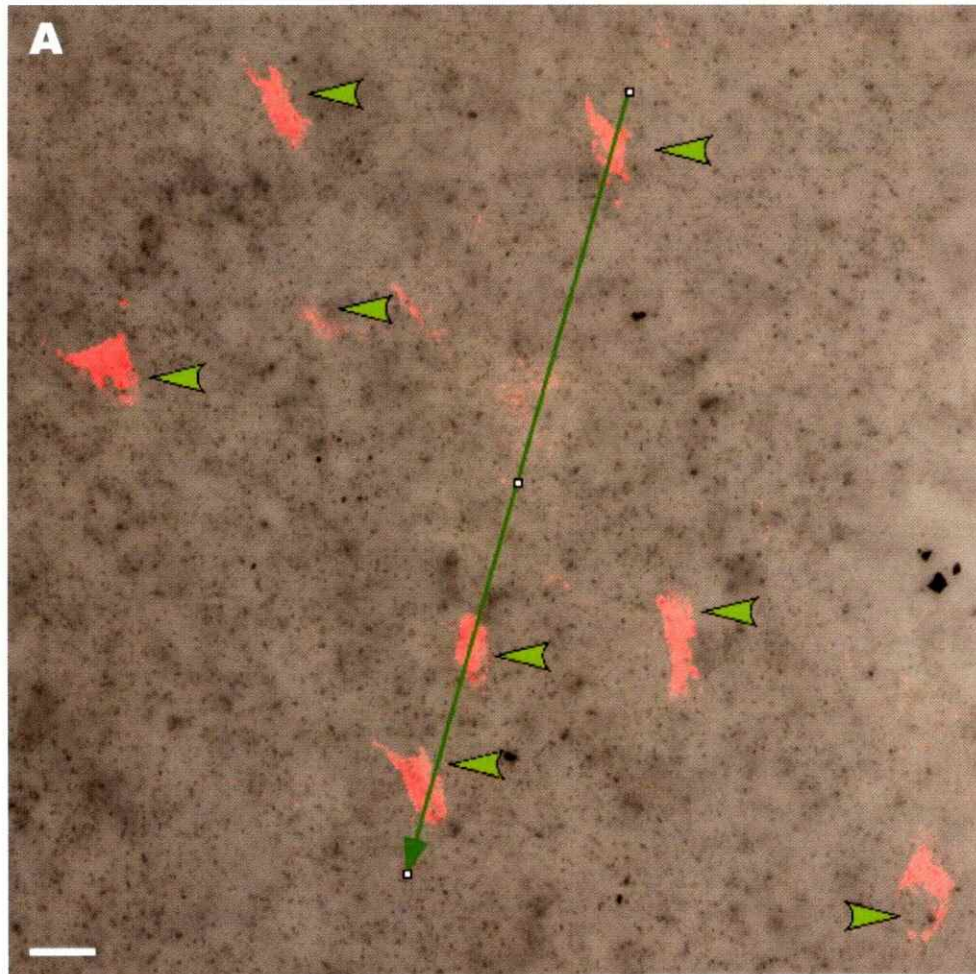


Figura 28. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas T-P2° que proyectan al NCL. A: Imagen G de la figura 25, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y EAG2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

Tabla 6. Número y porcentaje de células del tálamo-paliales de 2°orden retrógradamente marcadas desde el NCL (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de VGLUT2 (VGLUT+/-) y EAG2 (EAG2+/-).

Neuronas tálamo-paliales de 2°orden que proyectan al NCL			
Serie VGLUT2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /VGLUT2+	CTB-AF 555+ /VGLUT2-
N° total de células contadas en 3 secciones	15	14	1
Porcentaje del N° total de células contadas en 3 secciones [%]	100	93,3	6,7
Serie EAG2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /EAG2+	CTB-AF 555+ /EAG2-
N° total de células contadas en 5 secciones	63	0	63
Porcentaje del N° total de células contadas en 5 secciones [%]	100	0	100

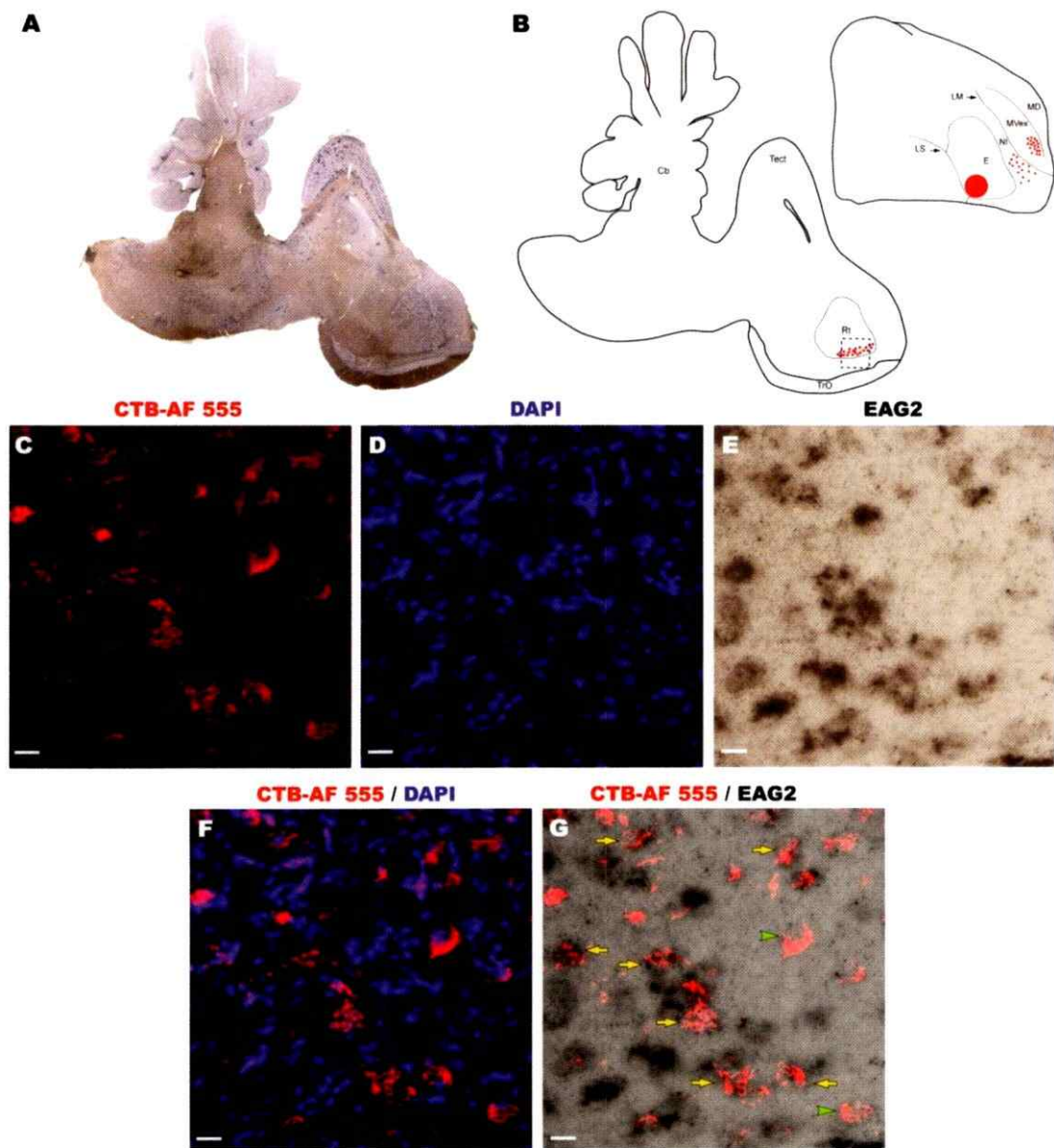


Figura 29. Co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del Rt que proyectan al E. **A:** Expresión de EAG2 en una sección sagital (60 μ m) del tálamo retrógradamente marcado con CTB-AF 555. **B:** Reconstrucción de A y de una sección sagital del telencéfalo, representando la inyección de CTB-AF 555 en el E y la distribución de células marcadas retrógradamente en el MVex, NI y Rt. El recuadro azul indica la región en el tálamo a la cual pertenecen las imágenes C, D, E, F y G. **C:** Células del Rt marcadas con CTB-AF 555. **D:** Núcleo de las células del Rt marcados con DAPI. **E:** Células del Rt marcadas con EAG2. **F:** Superposición de C y D. **G:** Superposición de C y E. Las flechas amarillas y puntas de flecha verde indican, respectivamente, co-localización y no co-localización. Barra de escala = 20 μ m.

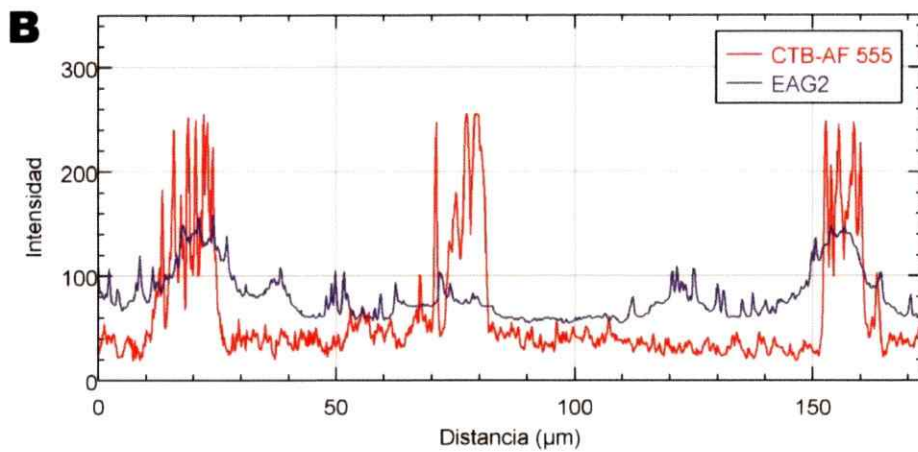
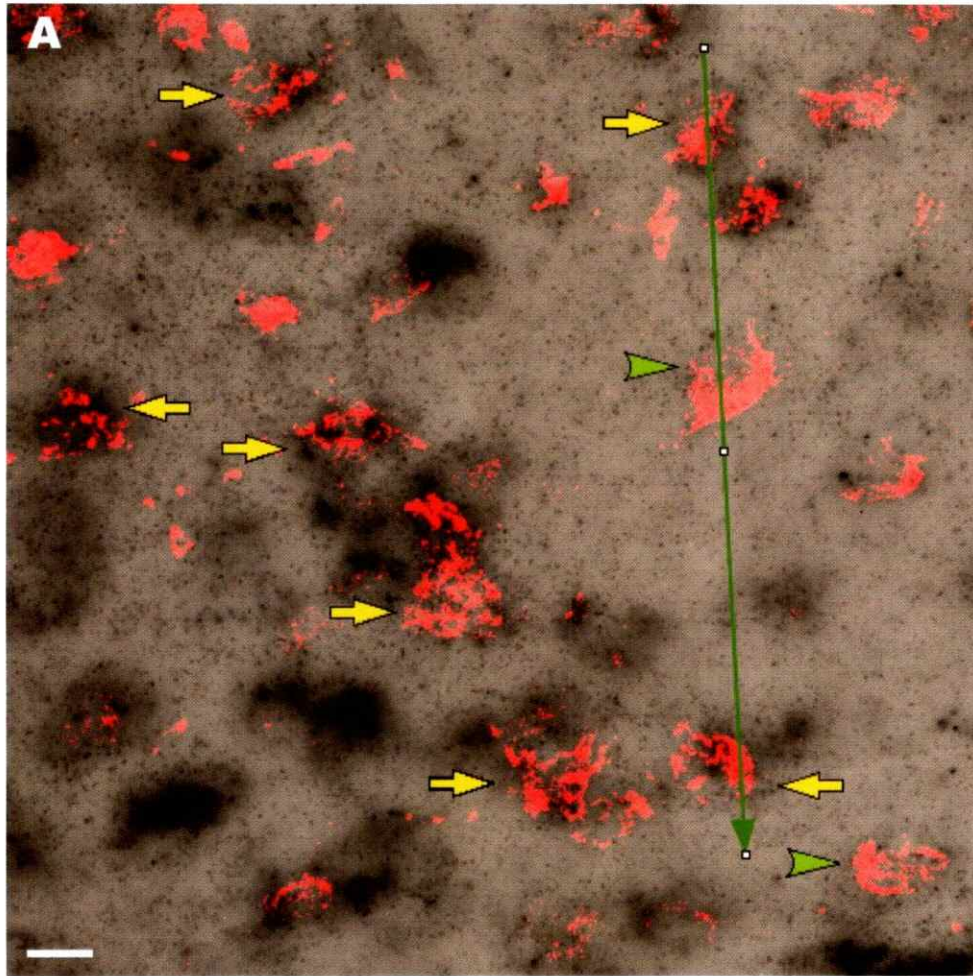


Figura 30. Análisis de co-localización de CTB-AF 555 y EAG2 en las neuronas del Rt que proyectan al E. A: Imagen G de la figura 27, en la cual se realizó el análisis de co-localización. **B:** Gráfico que muestra la intensidad de señal de CTB-AF 555 (línea roja) y EAG2 (línea azul) a lo largo de la flecha verde oscuro posicionada en la imagen A. Barra de escala = 20 µm.

Tabla 7. Número y porcentaje de células del Rt retrógradamente marcadas desde el E (CTB-AF 555+) positivas o negativas para la señal de EAG2 (EAG2+/-).

Neuronas del Rt que proyectan al E			
Serie EAG2			
	CTB-AF 555+	CTB-AF 555+ /EAG2+	CTB-AF 555+ /EAG2-
N° total de células contadas en 3 secciones	95	70	25
Porcentaje del N° total de células contadas en 3 secciones [%]	100	73,7	26,3

En síntesis, demostramos mediante la doble marca fluorescente de CTB-AF 555 y colorimétrica de una sonda de RNA-DIG, que las neuronas del NI que proyectan al NCL y E expresan fuertemente el mRNA de VGLUT2 y que una subpoblación minoritaria de estas células expresa el mRNA de EAG2. Además, mostramos que la mayoría de las neuronas del MVex que proyectan al E son VGLUT2 positivas y que solo el 1% de las células CTB-AF 555+ del MVex doble marcan con el mRNA de EAG2. Finalmente, evidenciamos en el tálamo dorsal, que las neuronas tálamo-paliales de segundo orden que proyectan al NCL doble marcan muy conspicuamente con VGLUT2. Sin embargo, no se encontró expresión de EAG2 en ninguna de estas células peri-sensoriales. Por otra parte, se evidenció que una considerable proporción de células del Rt que proyectan al E, expresan el mRNA de EAG2 (Figura 31).

DISCUSIÓN

Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el cerebro de pollo

Los ensayos de hibridación in situ control para el mRNA de VGLUT2, confirmaron lo descrito por previas investigaciones (González-Cabrera y col., 2015), tanto para el telencéfalo, como para las demás estructuras del cerebro. Esto permite establecer la especificidad de la sonda de RNA ocupada en este estudio y en el de González-Cabrera y col., (2015).

Para el caso del mRNA de EAG2, encontramos que además de lo descrito para el telencéfalo de pollo por Dugas-Ford y col., (2012) este transcripto también se expresó en algunos grupos de células del diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, la mayoría involucrados en vías sensoriales ascendentes visuales, auditivas y somatosensoriales.

En particular, observamos que tanto la lámina 13 del TeO, como el núcleo rotundus, ambos componentes de la vía

tectofugal visual (Karten y Revzin, 1966; Engelage y Bischof, 1993; Karten y col., 1997) expresaron fuertemente el mRNA de EAG2. Igualmente, los núcleos del complejo ístmico, Ipc e Imc, que ejercen un efecto modulador en el "output" del TeO hacia el Rt (Wang y col., 2006; Marín y col., 2007 y 2012), fueron marcados intensamente por EAG2. En congruencia con lo anterior notamos que los núcleos mesencefálicos MCC y MLd, que forman parte la vía auditiva ascendente (Karten, 1968), expresan el mRNA de EAG2. Una excepción notable la constituye el núcleo talámico ovoidalis, que es el origen de las proyecciones al DVR auditivo o Field L (Karten, 1968; Wild y col., 1993), el cual solamente presentó marca en sus células más externas (contorno del ovoidalis). Finalmente, también encontramos en la vía somatosensorial ascendente, que tanto el núcleo principal del nervio trigémino, como su blanco directo en el DVR, el núcleo Basalis (Wild y Farabaugh, 1996), presentan células EAG2 positivas.

Interesantemente en mamíferos, se ha demostrado que el mRNA de EAG2 es expresado en la mayoría de los núcleos del tálamo, excepto el núcleo reticular. En contraste, la expresión en el mesencéfalo, se restringe al colículo superior (TeO en aves) e inferior (MLD en aves), implicados

en la vía tectofugal visual y auditiva, respectivamente (Butler y Hodos, 2005), y al núcleo lemnisco lateral. Similarmente, en el cerebro posterior, EAG2 es expresado en núcleos específicos sensoriales, tales como el trigeminal y coclear (Ludwing y col., 2000; Saganich y col., 2001).

En vista de esta última evidencia, podemos concluir, que el patrón de expresión del mRNA de EAG2 en las estructuras no-telencefálicas del cerebro del pollo, concuerda bastante bien con lo encontrado en mamíferos, validando la especificidad de la sonda de RNA diseñada para este estudio.

El hecho de que el mRNA de EAG2 se exprese particularmente en núcleos y láminas implicadas en las vías sensoriales aferentes, tanto en aves como en mamíferos, nos lleva a preguntarnos cuál podría ser el rol neurofisiológico de este transcripto en la transmisión del "input" sensorial ascendente en el cerebro de vertebrados. En la última sección de esta discusión, haremos un resumen de lo encontrado para EAG2 y platearemos futuros experimentos en nuestro laboratorio, que ayudaran a resolver, en parte, esta pregunta.

Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual de pollo

Los experimentos de doble marcaje de CTB-AF 555/sonda de RNA-DIG en el telencéfalo de pollo, nos permitieron demostrar que las células del DVR visual, que expresan un set de genes característicos de las neuronas corticales de mamíferos, participan en el circuito de proyecciones entre el entopallio, nidopallio y mesopallio. Más aún, al contrastar nuestros resultados con la literatura, encontramos varias similitudes a nivel laminar, molecular y de circuito entre el DVR visual y la neocorteza de mamíferos.

En efecto, observamos que el mRNA de VGLUT2 es expresado en las neuronas del MVex o lámina externa, que proyectan al E; en las neuronas del NI o lámina intermedia, que proyectan al NCL y E; y en las células del E (**Figura 31. mRNA VGLUT2**). Similarmente, en mamíferos, el mRNA de VGLUT2 es expresado preferentemente en la capa III o externa; y, en las capas IV y V (Bai y col., 2001; Fremeau y col., 2001 y 2004; Hackett y col., 2011; Balaram y col., 2013).

Por otro lado, el mRNA de EAG2, solo es expresado por unas pocas neuronas del MVex que proyectan al E; por una subpoblación minoritaria de neuronas del NI que proyectan al NCL (palio 2° orden) y E, e intensa y masivamente por las células del E (**Figura 31. mRNA EAG2**). De igual manera, en la corteza de mamíferos, el mRNA de EAG2 solo es expresado por algunas pocas neuronas de las capas III y V; y por la mayoría de células de la capa IV (Dugas-Ford y col., 2012).

Con respecto a las neuronas del E o lámina interna (tálamo-recipiente), se observó que aquellas del entopalio que proyectan al MVex (lámina externa) se marcan débilmente con CTB-AF 555 en comparación a otras proyecciones del DVR visual de pollo, posiblemente debido a su pequeño tamaño, lo cual significó el principal impedimento para dilucidar la identidad molecular de estas células. No obstante, la evidencia anteriormente expuesta sugiere fuertemente, que estas células podrían expresar VGLUT2 y EAG2 (**Figura 31. mRNA VGLUT2 y EAG2**), tal como las células de la capa IV o interna (tálamo-recipiente) de la neocorteza de mamíferos.

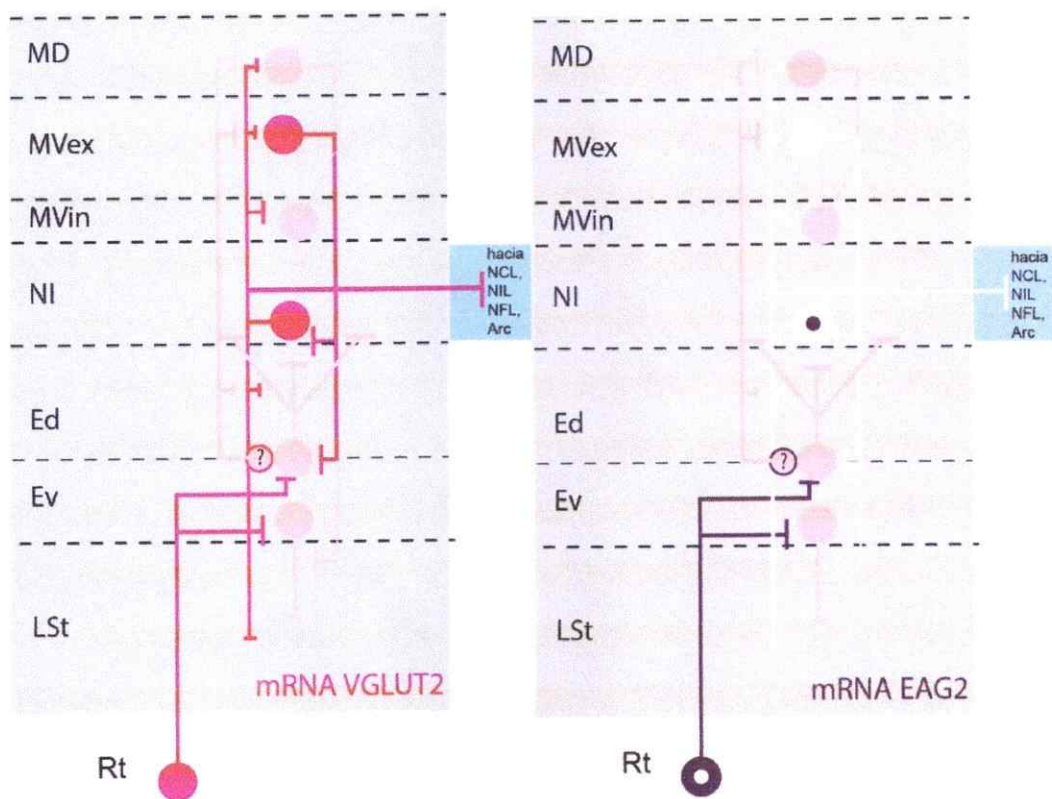


Figura 31. Perfil de expresión del mRNA de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual. Rojo: Expresión del mRNA de VGLUT2; Morado: Expresión del mRNA de EAG2; Blanco: No expresión del mRNA de VGLUT2 o EAG2; Rosado: Perfil de expresión desconocido. Signo de interrogación (?): Supuesta expresión del mRNA de VGLUT2 o EAG2. Ciculo dentro de otro círculo: Subpoblación de células positivas o negativas para el mRNA de VGLUT2 o EAG2. La anchura de las líneas representa el tamaño relativo de las proyecciones. Las líneas discontinuas indican proyecciones dudosas , pero posibles. MD, mesopalio dorsal; MVex, mesopalio ventral externo; MVin, mesopalio ventral interno; NI, nidopalio intermedio; Ed, entopalio dorsal; Ev, entopalio ventral; LSt, estriado lateral; NCL, nidopalio caudolateral ; NIL, nidopalio intermedio lateral ; NFL, nidopalio frontolateral ; Arc, arcopalio; Rt, rotundus.

Hipótesis de células equivalentes

Según la hipótesis de células equivalentes, el DVR de aves contiene poblaciones neuronales correspondientes a grupos celulares en la neocorteza de mamíferos en términos de conectividad, expresión molecular y función (Karten, 1969; Karten y Shimizu, 1989). Por lo tanto, si esta hipótesis es correcta, algunos marcadores moleculares de capa IV y II/III deberían expresarse en aquellas células tálamo-recipientes del E que proyectan al MVex; y en las células del MVex/NI que proyectan al E y NCl, respectivamente.

En relación a lo anterior, se ha observado en el DVR de aves que los genes EAG2 y RORB específicos de capa IV, se expresan en el E, sugiriendo una correspondencia homológica con las capas tálamo-recipientes de la neocorteza (Dugas-Ford y col., 2012). No obstante, en nuestro estudio encontramos, que además del E, existe una subpoblación minoritaria de neuronas del NI que proyectan al E y NCl, que expresan EAG2. Curiosamente, este supuesto marcador de capa IV, también se expresa en algunas células de la capa III y V. De este modo, proponemos que este grupo de neuronas del NI podrían corresponder a aquellas de la capa III que expresan EAG2. Más aún, creemos que estas células

podrían recibir aferencias talámicas, tal como las del E y capa IV. Por lo tanto, si lo anterior fuera cierto, el marcador molecular EAG2, no solo indicaría una identidad capa IV, sino más bien, una identidad senso-recipiente.

Por otro parte, se ha observado en el desarrollo del telencéfalo de pollo (E10), que los factores de expresión CUX2, SATB2, MEF2C y FOXP1 específicos de capas II/III de neocorteza de ratón, se expresan en el dominio lateral del palio, incluyendo el mesopalio (Suzuki y col., 2012). Sin embargo, en el telencéfalo de pollo adulto (P15), el patrón de expresión de estos marcadores cambia, siendo ampliamente expresados en el DVR. Según Dugas-Ford y col., (2012), muchos de estos candidatos no son específicos de capa II/III. Por solo dar un ejemplo, en el cerebro adulto de ratón, los genes SATB2 y MEF2C no solo se expresan en las capas superficiales; siendo notables desde la capa II hasta la VI.

En vista de esta evidencia, creemos que la mejor estrategia para comprobar una homología del MVex con las capas II/III; es demostrar la conectividad en relación con otras láminas, que si expresan genes específicos. Como vimos anteriormente, la gran mayoría de las células del MVex y

NI, que no expresan el mRNA de EAG2, se conectan con el E, que expresa el marcador de capa IV, tal como lo hacen aquellas de las capas II/III. Por esto, creemos que el MVex y NI podrían equivaler, respectivamente, a las capas II y III de corteza de mamíferos.

Posibles implicaciones funcionales de VGLUT2 y EAG2 en el circuito interlaminar del DVR visual

Rol de VGLUT2

Los transportadores vesiculares de glutamato, VGLUT1 y VGLUT2 (Aihara y col., 2000; Bai y col., 2001; Bellocchio y col.; 1998; Fremeau y col., 2001; Herzog y col., 2001; Ni y col., 1994; Varoqui y col., 2002) poseen un rol fundamental en la transmisión excitatoria glutamatérgica de las neuronas corticales de mamíferos.

Con respecto a VGLUT1, además de ser el principal transportador vesicular de glutamato en las neuronas piramidales de la corteza, juega una función esencial en el control de la fuerza sináptica. Experimentos in vitro, han demostrado que la sobreexpresión de este transportador, en las sinapsis excitatorias de neuronas corticales, aumenta la cantidad de glutamato liberado por vesícula en el

espacio sináptico; resultando en un incremento de la respuesta evocada en las neuronas postsinápticas (Wilson y col., 2005).

Para el caso de VGLUT2, se ha demostrado que es co-expresado con VGLUT1 en muchas neuronas piramidales durante periodos críticos del desarrollo. Por lo que se cree que VGLUT2 podría tener un importante rol en la maduración de la transmisión excitatoria vía VGLUT1 (He y col., 2012).

En cuanto al posible rol de VGLUT2 en la transmisión excitatoria de las neuronas del DVR de aves, poco se conoce. No obstante, dada la similitud del circuito intrínseco del DVR visual con el de la neocorteza, suponemos que VGLUT2 podría tener un rol comparable al de VGLUT1 y VGLUT2 en las neuronas corticales. Es decir, podría estar involucrado en la transmisión sináptica glutamatérgica y en procesos de plasticidad neuronal. Dado que se demostró la expresión del mRNA de VGLUT2 en las neuronas de proyección dentro y fuera del DVR visual, la evidencia sugiere fuertemente, que estas células podrían ser glutamatérgicas.

Rol de EAG2

Los canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje, miembros de la familia EAG (ether-a-go-go), juegan un rol clave en la modulación de la excitabilidad celular. Principalmente, la activación de estos canales rectificadores tardíos de corrientes de K^+ , permiten la repolarización del potencial de acción en las células excitables (Bauer y Scharz, 2001).

Inicialmente, fueron detectados mediante el análisis molecular de mutantes en *Drosophila melanogaster* que exhibían rítmicos movimientos de patas durante la anestesia con éter. Registros intracelulares en el músculo de larvas de estos mutantes evidenciaron un incremento en la amplitud y duración de los potenciales de placa terminal (Ganetzky y Wu, 1983). Estos hallazgos fueron los primeros en indicar que el locus *eag* codifica para un canal de K^+ y que una disfunción en un miembro de la familia de los canales de K^+ EAG induce un incremento en la excitabilidad celular.

En vista de lo anterior, se sugiere fuertemente que EAG2 cumple una importante función en modular la excitabilidad de las neuronas que participan en el circuito interlaminar del DVR visual de aves. Más aún, el hecho de que el mRNA de

EAG2 se exprese particularmente en núcleos y láminas implicadas en las vías sensoriales aferentes del cerebro de ave, sugiere que este transcrito podría ser "up-regulated" por la actividad excitatoria generada por las aferencias sensoriales en el desarrollo del cerebro. A favor de esta teoría, en nuestro laboratorio, observaremos la expresión de este transcrito en embriones enucleados. Por lo que hipotetizamos, que la expresión del mRNA de EAG2 podría disminuir notablemente en comparación de un embrión normal.

CONCLUSIÓN

En vista de las similitudes descritas en este estudio, nosotros concluimos que a pesar de las diferencias en la organización celular (núcleos versus láminas); el circuito intrínseco del DVR visual de aves, contendría tipos celulares con conectividad, expresión génica y neuroquímica característica de la corteza extraestriada visual de mamíferos; sugiriendo una correspondencia homológica entre el DVR y la corteza temporal.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada-Galleguillos P., Fernández M., Marín G., Letelier J.C., Mpodozis J. 2015. Anatomical Organization of the Visual Dorsal Ventricular Ridge in the Chick (*Gallus gallus*): Layers and Columns in the Avian Pallium. *J Comp Neurol.* 523:2618-2636
- Aihara Y., Mashima H., Onda H., Hisano S., Kasuya H., Hori T., Yamada S., Tomura H., Yamada Y., Inoue I., Kojima I., Takeda J. 2000. Molecular Cloning of a Novel Brain-Type Na⁺-Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter. *J Neurochem.* 74:2622-2625.
- Atoji Y., Karim MR. 2014. Glutamatergic thalamopallial projections in the pigeon identified by retrograde labeling and expression of vGlut2 mRNA. *Neurosci Res.* 84:43-46.
- Bai L., Xu H., Collins JF., Ghishan FK. 2001. Molecular and Functional Analysis of a Novel Neuronal Vesicular Glutamate Transporter. *J Biol Chem.* 276:36764-36769.
- Balaram P., Hackett TA., Kaas JH. 2013. Differential expression of vesicular glutamate transporters 1 and 2 may identify distinct modes of glutamatergic transmission in the macaque visual system. *J Chem Neuroanat.* 0:21-38.
- Bauer C.K., Schwarz J.R. 2001. Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol.* 182:1-15.
- Bellocchio E.E., Hu H., Pohorille A., Chan J., Pickel V.M., Edwards RH. 1998. The Localization of the Brain-Specific Inorganic Phosphate Transporter Suggests a Specific Presynaptic Role in Glutamatergic Transmission. *J Neurosci.* 18(21):8648-8659.
- Butler A. 1994. The evolution of the dorsal pallium in the telencephalon of amniotes: cladistic analysis and a new hypothesis. *Brain Res Rev.* 19:66-101.
- Butler A., Hodos W. 2005. Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and adaptation. John Wiley and sons, Inc., Publication. New Jersey, USA.
- Callaway E.M. 1998. Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annu Rev Neurosci.* 21:47-74.

Da Costa N.M, Martin K.A. 2010. Whose cortical column would that be? *Front Neuroanat.* 4:1-10.

Douglas R.J, Martin K.A. 2004. Neuronal circuits of the neocortex. *Neocortical circuits.* 27:419-451.

Dugas-Ford J., Rowell J.J., Ragsdale C.W. 2012. Cell-type homologies and the origins of the neocortex. *PNAS.* 109:16974-16979.

Engelage J., Bischof H.J. 1993. The organization of the tectofugal pathway in birds: A comparative review. *Vision Brain and Behavior in Birds.* 137-158.

Fernández M. 2016. Organización intratelencefálica de las proyecciones visuales colotalámicas en aves. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Fremeau R.T Jr., Troyer M.D., Pahner I., Nygaard G.O., Tran C.H., Reimer R.J., Bellocchio E.E., Fortin D., Storm-Mathisen J., Edwards R.H. 2001. The Expression of Vesicular Glutamate Transporters Defines Two Classes of Excitatory Synapse. *Neuron.* 31:247-260.

Fremeau R.T Jr., Voglmaier S., Seal R.P., Edwards R.H. 2004. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 27:98-103.

Ganetzky B., Wu C.F. 1983. Neurogenetic Analysis of Potassium Currents in *Drosophila*: Synergistic Effects on Neuromuscular Transmission in Double Mutants. *J Neurogenet.* 1:17-28

González-Cabrera C., Garrido F., Roth A., 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*). *J Comp Neurol.* 523:1341-1358.

Hackett T.A., Takahata T., Balaram P. 2011. VGLUT1 and VGLUT2 mRNA expression in the primate auditory pathway. *Hear Res.* 274:129-141.

He H., Mahnke A.H., Doyle S., Fan N., Wang C.C., Hall B.J., Tang Y.P., Inglis F.M., Chen C., Erickson J.D. 2012. Neurodevelopmental Role for VGLUT2 in Pyramidal Neuron

Plasticity, Dendritic Refinement, and in Spatial Learning. *J Neurosci.* 32:15886-15901.

Herzog E., Bellenchi G.C., Gras C., Bernard V., Ravassard P., Bedet C., Gasnier B., Giros B., El Mestikawy S. 2001. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* 21:RC181.

Islam M.R., Atoji Y. 2008. Distribution of Vesicular Glutamate Transporter 2 and Glutamate Receptor 1 mRNA in the Central Nervous System of the Pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 511:658-677.

Jarvis E.D., Güntürkün O., Bruce L., Csillag A., Karten H., Künzel W., Medina L., Paxinos G., Perkel D.J., Shimizu T., Striedter G., Wild J.M., Ball G.F., Dugas-Ford J., Durand S.E., Hough G.E., Husband S., Kubikova L., Lee D.W., Mello C.V., Powers A., Siang C., Smulders T.V., Wada K., White S.A., Yamamoto K., Yu J., Reiner A., Butler A.B.; Avian Brain Nomenclature Consortium. 2005. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat Rev Neurosci.* 6(2):151-159.

Karten H.J. 1968. The ascending auditory pathway in the pigeon (*Columba livia*), II: Telencephalic projections of the nucleus ovoidalis thalami. *Brain Res.* 11:134-153.

Karten H.J. 1969. The organization of the avian telencephalon and some speculations on the phylogeny of the amniote telencephalon. *Ann N Y Acad Sci.* 167:164-179.

Karten H.J., Revzin A.M. 1966. The afferent connections of the nucleus rotundus in the pigeon. *Brain Res.* 2(4):368-377.

Karten H.J., Shimizu T. 1989. The Origins of Neocortex: Connections and Lamination as Distinct Events in Evolution. *J Cogn Neurosci.* 1:291-301.

Karten H.J., Cox K., Mpodozis J. 1997. Two distinct populations of tectal neurons have unique connections within the retinotectorotundal pathway of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 387:449-465.

Ludwig J., Weseloh R., Karschin C., Liu Q., Netzer R., Engeland B., Stansfeld C., Pongs O. 2000. Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-a-go-go family

of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol Cell Neurosci.* 16:59-70.

Lund J.S., Yoshioka T., Levitt J.B. 1994. Substrates for Interlaminar Connections in Area V1 of Macaque Monkey Cerebral Cortex. *Cerebral cortex.* 10:37-58.

Marín G.J., Durán E., Morales C., González-Cabrera C., Sentis E., Mpodozis J., Letelier JC. 2012. Attentional capture? Synchronized feedback signals from the isthmi boost retinal signals to higher visual areas. *J Neurosci.* 32:1110- 1122.

Marín G., Salas C., Sentis E., Rojas X., Letelier J.C., Mpodozis J. 2007. A cholinergic gating mechanism controlled by competitive interactions in the optic tectum of the pigeon. *J Neurosci.* 27:8112-8121.

Molyneaux B.J, Arlotta P., Menezes J.R, Macklis J.D. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 8:427-437.

Ni B., Rosteck P.R Jr., Nadi N.S., Paul SM. 1994. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc. Natd Acad Sci.* 91:5607-5611.

Reiner A., Yamamoto K., Karten H.J. 2005. Organization and Evolution of the Avian Forebrain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 287(1):1080-1102.

Reiner A., Perkel D.J., Bruce L.L., Butler A.B., Csillag A., Kuenzel W., Medina L., Paxinos G., Shimizu T., Striedter G., Wild M., Ball G.F., Durand S., Güntürkün O., Lee D.W., Mello C.V., Powers A., White S.A., Hough G., Kubikova L., Smulders T.V., Wada K., Dugas-Ford J., Husband S., Yamamoto K., Yu J., Siang C., Jarvis E.D.; Avian Brain Nomenclature Forum. 2004. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol.* 473:377-414.

Saganich M.J., Machado E., Rudy B. 2001. Differential Expression of Genes Encoding Subthreshold-Operating Voltage-Gated K⁺ Channels in Brain. *The Journal of Neuroscience.* 21(13):4609-4624.

Suzuki I.K., Kawasaki T., Gojobori T., Hirata T. 2012. The temporal sequence of the mammalian neocortical neurogenetic

program drives mediolateral pattern in the chick pallium. *Dev Cell*. 22:863-870.

Varoqui H., Schafer M.K., Zhu H., Weihe E., Erickson J.D. 2002. Identification of the differentiation-associated Na⁺/Pi transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *The Journal of Neuroscience*. 22:142-155.

Wang Y., Luksch H., Brecha N.C., 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. *J Comp Neurol*. 494:7-35.

Wang Y., Brzozowska-Prechtel A., Karten H.J. 2010. Lamina and columnar auditory cortex in avian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:12676-12681.

Wild J.M., Farabaugh S.M. 1996. Organization of afferent and efferent projections of the nucleus basalis prosencephali in a passerine, *Taeniopygia guttata*. *J Comp Neurol*. 365:306-328.

Wild J.M., Karten H.J., Frost B.J. 1993. Connections of the Auditory Forebrain in the Pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*, 337:32-62.

Wilson N.R., Kang J., Hueske E.V., Leung T., Varoqui H., Murnick J.G., Erickson J.D., Liu G. 2005. Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *J Neurosci*. 25(26):6221-6234.