

VCH-FC
MAG-B
5241
C.1



**ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES DE LAS
NEURONAS SHEPHERD'S CROOK DEL TECTUM
ÓPTICO SOBRE LOS NÚCLEOS DEL COMPLEJO DEL
ISTMO EN POLLO (*Gallus gallus*).**

Tesis

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

FLORENCIA PAZ GARRIDO CHARAD

Mayo, 2015

Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Letelier

Co-Tutor

Dr. Gonzalo Marín Gamé

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

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

Florencia Paz Garrido Charad

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 29 de Mayo de 2015.

Director de Tesis:
Dr. Juan Carlos Letelier

Letelier
.....

Co-Director de Tesis
Sr. Gonzalo Marín



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga

Julio Alcayaga
.....
Jorge Mpodozis
.....

Dr. Jorge Mpodozis

A Cristian, mi marido,
y a mis padres J & J.

Agradecimientos

Gracias a mis padres, Julio y Jenny, y mis hermanos, Felipe, Josefina, Martín, Rosario y Agustín, por apoyarme, animarme y aguantarme durante todo este proceso. Principalmente quiero agradecer a Cristian, por su apoyo incondicional, paciencia y ayuda en lo científico y emocional, fundamental para desarrollar y finalizar este trabajo.

Gracias al Profesor Gonzalo Marín, por haberme guiado en este proyecto y haberme formado como científica. Especialmente, por su paciencia y su apoyo.

Gracias a los profesores del Laboratorio de Neurobiología y Biología del Conocer, Jorge Mpodozis y Juan Carlos Letelier, por su entrega de conocimiento y formación científica.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio (Rayo), en especial a Rosana y Camila por la paciencia, y ser mis confidentes.

Gracias a Carlos Maureria, por la conversación y ayuda precisa cuando la necesité.

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento de FONDECYT 1110281 y CONICYT.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	7
1.2 Hipótesis.....	11
1.3 Objetivos.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Preparación de rebanadas.....	12
2.2 Depósito de cristales de biocitina <i>in vitro</i>	13
2.3 Inyecciones de trazadores neuronales <i>in vitro</i> utilizando nano-inyectores	14
2.3.1 Inyecciones simples de trazadores neuronales.....	14
2.3.2 Inyecciones dobles de trazadores neuronales fluorescentes.....	15
2.4 Llenado intracelular <i>in vitro</i>	15
2.4.1 Reconstrucción celular.....	16
2.5 Cuantificación de la proyección tecto-istmal.....	17
2.6 Hibridación <i>in situ</i>	18
3. RESULTADOS.....	20
3.1 Estudio de la proyección tecto-istmal mediante el uso de trazadores neuronales <i>in vitro</i>	20
3.1.1 Trazado anterógrado de la proyección tecto-istmal mediante el uso del trazador neuronal biocitina <i>in vitro</i>	21

3.1.2	Trazado retrógrado de la proyección tecto-istmal mediante el uso de trazadores neuronales <i>in vitro</i>	24
	TeO-lpc.....	24
	TeO-lmc.....	26
	TeO-SLu.....	26
3.1.3	Trazado retrógrado de la proyección tecto-istmal mediante el uso de inyecciones dobles en los núcleos del complejo del istmo <i>in vitro</i>	31
	lmc-lpc.....	32
	SLu-lpc/lmc.....	37
3.2	Identificación de la proyección tecto-istmal mediante el trazado <i>in vitro</i> de célula única.....	38
	Ramificaciones dendríticas.....	38
	Proyección axónica.....	40
3.3	Caracterización neuroquímica de la proyección tecto-istmal mediante ensayos de hibridación <i>in situ</i>	42
4.	DISCUSIÓN	44
4.1	Proyección tectal hacia los núcleos del complejo del istmo.....	45
4.2	La fisiología tecto-istmal y su anatomía.....	49
4.3	Identidad neuroquímica de las neuronas ShC.....	51
4.4	Importancia anatómica.....	53
5.	CONCLUSIONES	54
6.	BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Conteo de neuronas ShC.....	36
---------	-----------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Vías visuales principales.....	2
Figura 2	Localización anatómica del complejo del istmo.....	4
Figura 3	Esquema del circuito istmo-tectal.....	6
Figura 4	Proyección tectal sobre el complejo del istmo en rebanada horizontal.....	22
Figura 5	Proyección tectal sobre el complejo del istmo en rebanada coronal.....	23
Figura 6	Neuronas <i>Shepherd's Crook</i> (ShC) trazadas retrógradamente desde el núcleo lpc.....	25
Figura 7	Neuronas <i>Shepherd's Crook</i> (ShC) trazadas retrógradamente desde el núcleo lmc.....	27
Figura 8	Inyección de BDA 3K en SLu no generó marca retrógrada en el tectum.....	28
Figura 9	Clasificación de neuronas tectales ShC.....	30
Figura 10	Combinatoria experimental de inyecciones dobles fluorescentes.....	32
Figura 11	Control de afinidad diferencial o interacción de trazadores fluorescentes.....	33
Figura 12	Neuronas ShC doble marcadas luego de inyectar trazadores fluorescentes en lpc e lmc.....	34
Figura 13	Neuronas ShC vecinas sin doble marca luego de inyectar trazadores fluorescentes en lpc e lmc.....	35
Figura 14	Inyecciones dobles-fluorescentes en SLu-lpc/lmc.....	37
Figura 15	Neuronas <i>Shepherd's Crook</i> llenadas intracelularmente.....	39
Figura 16	Proyección de neurona tectal única sobre los núcleos lpc e lmc.....	41
Figura 17	Expresión de marcadores glutamatérgicos, GABAérgicos y colinérgicos en la capa tectal 10.....	43
Figura 18	Esquema resumen de la conectividad del circuito istmo-tectal.....	46

RESUMEN

En aves, la vía tectofugal, vía visual principal, está asociada a procesos de orientación de la mirada, selección de estímulos y atención espacial. La aferencia retiniana sobre el tectum óptico (TeO) es fuertemente modulada por señales de retroalimentación provenientes del complejo del istmo, el cual comprende los núcleos: *isthmi pars parvocellularis* (Ipc), *isthmi pars semilunaris* (SLu) e *isthmi pars magnocellularis* (Imc). Los núcleos Ipc y SLu, están homotópicamente conectados con el TeO, mientras que Imc proyecta de manera heterotópica sobre éste, formando un circuito que promueve la selección en el tectum de aquellas aferencias visuales provocadas por el estímulo más intenso. Las neuronas tectales *Shepherd's Crook's* (ShC) de la capa 10 llevan la aferencia visual a los núcleos del complejo del istmo, y se desconoce si cada núcleo está asociado con un tipo específico de neuronas tectales o si la misma neurona, mediante colaterales axónicas, se conecta con dos o tres núcleos del complejo del istmo. El presente trabajo investigó en detalle la proyección tecto-istmal sobre los núcleos Ipc, Imc y SLu, mediante inyecciones de trazadores neuronales y técnicas de trazado de células únicas *in vitro*. Los resultados de inyecciones dobles de trazadores fluorescentes en los núcleos Imc e Ipc, indican la existencia de al menos tres poblaciones de

neuronas del tipo ShC, una de las cuales inerva a ambos núcleos, mientras que las otras dos proyectarían de manera segregada sobre lpc e lmc. Además, el trazado de células únicas, reafirmó, que al menos una población de neuronas ShC proyecta, a través de colaterales axónicos sobre los núcleos lpc e lmc. Finalmente, fue posible obtener evidencias del carácter glutamatérgico de las neuronas de la capa tectal 10, mediante ensayos de hibridación *in situ* para el transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2). Estos resultados permitirán refinar los modelos destinados a describir el funcionamiento del circuito tecto-istmal, que ha adquirido una significativa relevancia para explicar procesos de selección de estímulos y atención espacial en diversas especies de vertebrados.

ABSTRACT

In birds, the tectofugal pathway is associated to gaze orientation processes, stimuli selection and spatial attention. The retinal input to the optic tectum (TeO) is strongly modulated by feedback signals from the isthmic complex, which comprise the nuclei: *isthmi pars parvocellularis* (lpc), *isthmi pars semilunaris* (SLu) and *isthmi pars magnocellularis* (lmc). The lpc and the SLu nuclei are homotopically connected to TeO, while the lmc nucleus projection to TeO is heterotopical. The operation of this neural circuit promotes the selection of those visual inputs elicited by the most salient stimuli in the visual scene. The Shepherd's Crook's (ShC) neurons in tectal layer 10 are the visual input to the isthmic complex, but it has not been determined whether there is a single neural population connecting to all nuclei, or whether specific sub-populations connect to each nucleus separately. The present work is a detailed study of the tectal projection onto the lpc, lmc and SLu nuclei, using *in vitro* neural tracer injections and single cell-filling techniques. Single and double injections in the lpc and lmc nuclei demonstrated that at least three subpopulations of ShC from layer 10 innervated these nuclei. One of these sub-populations innervated both the lpc and the lmc, while the other two populations projected in a segregated fashion to the lpc and the lmc. Furthermore, cell-filling experiments supported the

finding of a ShC sub-population projecting to both the lpc and the mc nuclei through axon collaterals. Finally, by using in situ hybridization assays for the vesicular glutamate transporter mRNA (VGluT2), it was possible to obtain evidence about the glutamatergic neurochemical identity of tectal layer 10 neurons. These results will permit to refine the computational models of the isthmo-tectal circuit, which has gained an increasing relevance as a neural mechanism for stimuli selection and spatial attention in diverse vertebrate species.

1. INTRODUCCION

El sistema visual de los vertebrados posee dos vías principales: la vía tálamo-fugal y la vía tectofugal, dos sistemas paralelos que están definidos por el blanco primario de las proyecciones retinianas, el núcleo geniculado lateral dorsal (GLd) y el tectum óptico (TeO), respectivamente (Figura 1).

En aves, el TeO es la estructura retino-recipiente más prominente. Altamente laminada y topográficamente organizada, recibe cerca del 90% de los axones de las células ganglionares (RGCs) de la retina contralateral (Cowan y col., 1961; Hunt & Webster, 1975, Karten y col., 1997). El TeO está organizado en 15 capas plexiformes y celulares claramente definidas (Ramón y Cajal, 1911). Los axones de la retina arborizan en 5 niveles distintos, en las capas tectales 2, 3, 4, 5 y 7, la denominada zona retino-recipiente, lo que se traduce en una representación topográfica completa del mapa visual en esta estructura (Ramón y Cajal, 1911; Cowan y col., 1961; Hunt & Webster, 1975; Repérant & Angaut, 1977). Las eferencias de TeO surgen de neuronas ubicadas desde las capas 6 a la 15. La eferencia tectal principal comprende la proyección no topográfica de las células ganglionares tectales (TGCs), ubicadas en la capa tectal 13, hacia el núcleo rotundo (Rt, pulvinar caudal en mamíferos) en el tálamo (Figura 1,3; Karten & Revzin, 1966; Nauta & Karten, 1970; Benowitz & Karten, 1976; Karten, 1979; Karten & Shimizu, 1989; Karten y col., 1997; Marín y col, 2003).

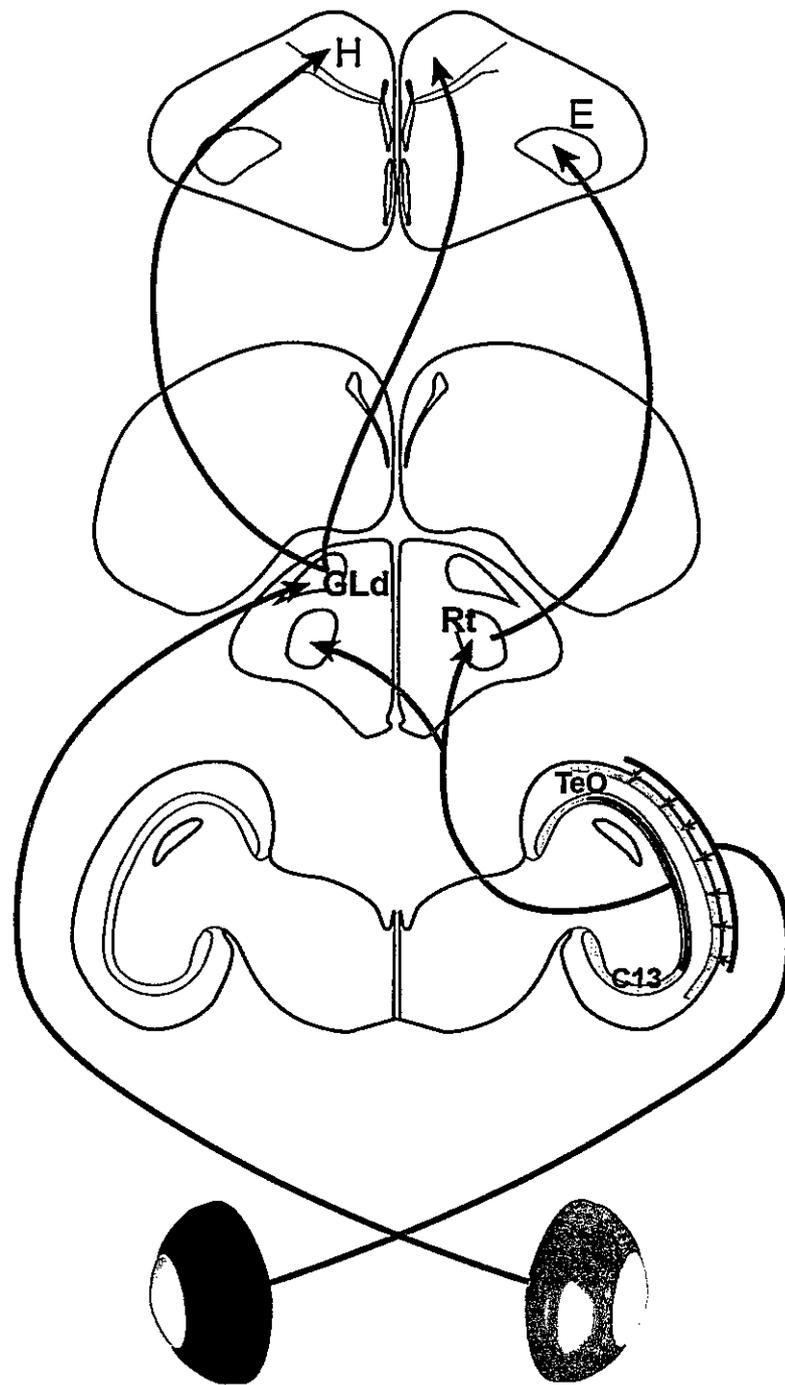


Figura 1. Vías visuales principales. Esquema de las dos vías visuales principales en vertebrados, representadas en secciones coronales de cerebro de pollo. En la vía tálamo-fugal (azul), las proyecciones de la retina llegan hasta el núcleo geniculado lateral dorsal (GLd) ubicado en la región talámica contralateral, del cual surgen dos proyecciones hacia el hiperpalio (H) ipsi y contralateral. Por otra parte, en la vía tecto-fugal (rojo), los terminales de la retina proyectan hacia el tectum óptico (TeO) en el mesencéfalo contralateral, del cual surge desde la capa tectal 13 (C13) una proyección bilateral hacia el núcleo talámico rotundo (Rt), que a su vez proyecta hacia el entopallio (E), en el telencéfalo ipsilateral.

El tectum óptico está recíprocamente conectado, en el mesencéfalo ipsilateral, con los núcleos del complejo del istmo (núcleo parabigémino en mamíferos, Sherk, 1979a, 1979b; Diamond y col., 1992), constituido por el núcleo *isthmi pars magnocellularis* (Imc), el núcleo *isthmi pars parvocellularis* (Ipc) y el núcleo *isthmi pars Semilunaris* (SLu) (Figura 2,3; Hunt & Künzle, 1976; Hunt y col., 1977). Los tres núcleos reciben una proyección retinotópica desde la capa tectal 10 (Hunt y col., 1977; Wang & Frost., 1991; Wang y col., 2004, 2006). El núcleo Imc posee dos poblaciones neuronales que se diferencian por su blanco de proyección. La primera, está formada por neuronas que proyectan de vuelta hacia TeO de manera difusa y heterotópica en las capas 10-12, es decir, una proyección que circunda, pero no inerva, el locus tectal desde el cual está recibiendo la proyección visual. La segunda población celular de Imc se proyecta de manera igualmente difusa y no retinotópica hacia los núcleos Ipc y SLu (Figura 3; Wang y col., 2004). Por otra parte, las neuronas de Ipc y SLu se proyectan a TeO mediante axones columnares que se distribuyen a través de todas las capas tectales (Ipc: 2-10; SLu: 4-13) de forma topográfica y homotópica, es decir, terminan sobre el mismo locus tectal desde el cual están siendo inervados (Figura 3; Hunt y col., 1977; Güntürkün & Remy, 1990; Hellman & Güntürkün, 2001; Wang y col., 2006).

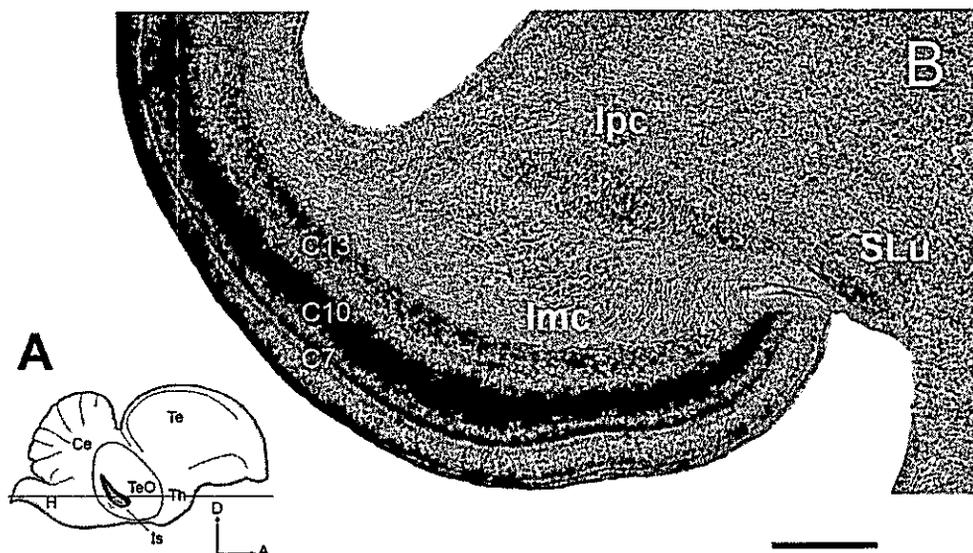


Figura 2. Localización anatómica del complejo del istmo. A, Esquema de la vista lateral de cerebro de pollo, mostrando la ubicación del complejo del istmo (Is). Núcleo *isthmi pars parvocellularis* (Ipc, negro), *isthmi pars Semilunaris* (SLu, gris claro) e *isthmi pars magnocellularis* (Imc, gris). La línea horizontal indica el ángulo de corte de la sección mostrada en B. B, Microfotografía de una sección horizontal de mesencéfalo de pollo teñida con Nissl, donde se observan los tres núcleos del complejo del istmo (Ipc, Imc y SLu) y las capas tectales. Barra de tamaño = 600 μ m.

Estudios electrofisiológicos en aves han demostrado que el complejo del istmo es un centro visual, cuyas neuronas responden consistentemente a estímulos que aparecen o se mueven en los respectivos campos receptivos (Wang & Frost, 1991; Yang y col., 2002; Marín y col., 2005). Por su organización anatómica y propiedades fisiológicas, se ha postulado que este complejo estaría asociado a procesos de orientación y atención espacial (Bischof & Watanabe, 1997; Nguyen y col., 2004; Marín y col., 2005, 2007, 2012; Knudsen, 2011; Sridharan y col., 2014; Sridharan & Knudsen, 2015). Desde el punto de vista operacional, la atención espacial se define como un mecanismo de selección de estímulos que resulta en la potenciación de la visión en regiones circunscritas del espacio visual (Desimone & Duncan, 1995; Shipp, 2004). En el sistema nervioso, la atención espacial se observa como la modulación selectiva de respuestas neuronales provenientes de distintas

regiones de un mismo campo receptivo. Es decir, dependiendo de si la zona del campo receptivo en que un estímulo se presenta se superpone o no con el foco de atención, la respuesta a dicho estímulo es potenciada o suprimida (Desimone & Duncan, 1995; Maunsell & Cook, 2002; Treue, 2004). El circuito istmo-tectal, formado por el tectum óptico y los núcleos del istmo, constituiría un sistema "winner-take-all" (en la tortuga: Sereno & Ulinski, 1987; en la paloma: Marín y col., 2005, 2007; Wang y col., 2006) mediante el cual, señales de retroalimentación visual sobre el TeO, provenientes de Ipc, serían focalizadas sobre la aferencia visual generada por el estímulo más saliente, mientras que la retroalimentación de Ipc sobre las regiones circundantes de TeO sería suprimida por las proyecciones difusas provenientes del núcleo GABAérgico Imc (Figura 3; Domenici y col., 1988; Wang y col., 2004; Sun y col., 2005), generando la potenciación de la aferencia visual en un locus espacial determinado. Estas interacciones permitirían que el animal se oriente hacia uno de los muchos estímulos simultáneos presentes en el campo visual. El impacto atencional de este mecanismo se debe a que las señales de retroalimentación de Ipc ejercería un efecto de compuerta sobre el flujo ascendente de la aferencia visual que va desde TeO hacia el núcleo Rt en el tálamo (Marín y col., 2007, 2012), de manera que sólo las señales más potentes son transmitidas a los centros superiores. Este efecto de compuerta estaría mediado por sinapsis directas de los terminales axónicos de Ipc sobre los terminales dendríticos de las neuronas TGC de la capa 13 que proyectan a Rt (González-Cabrera, 2014).

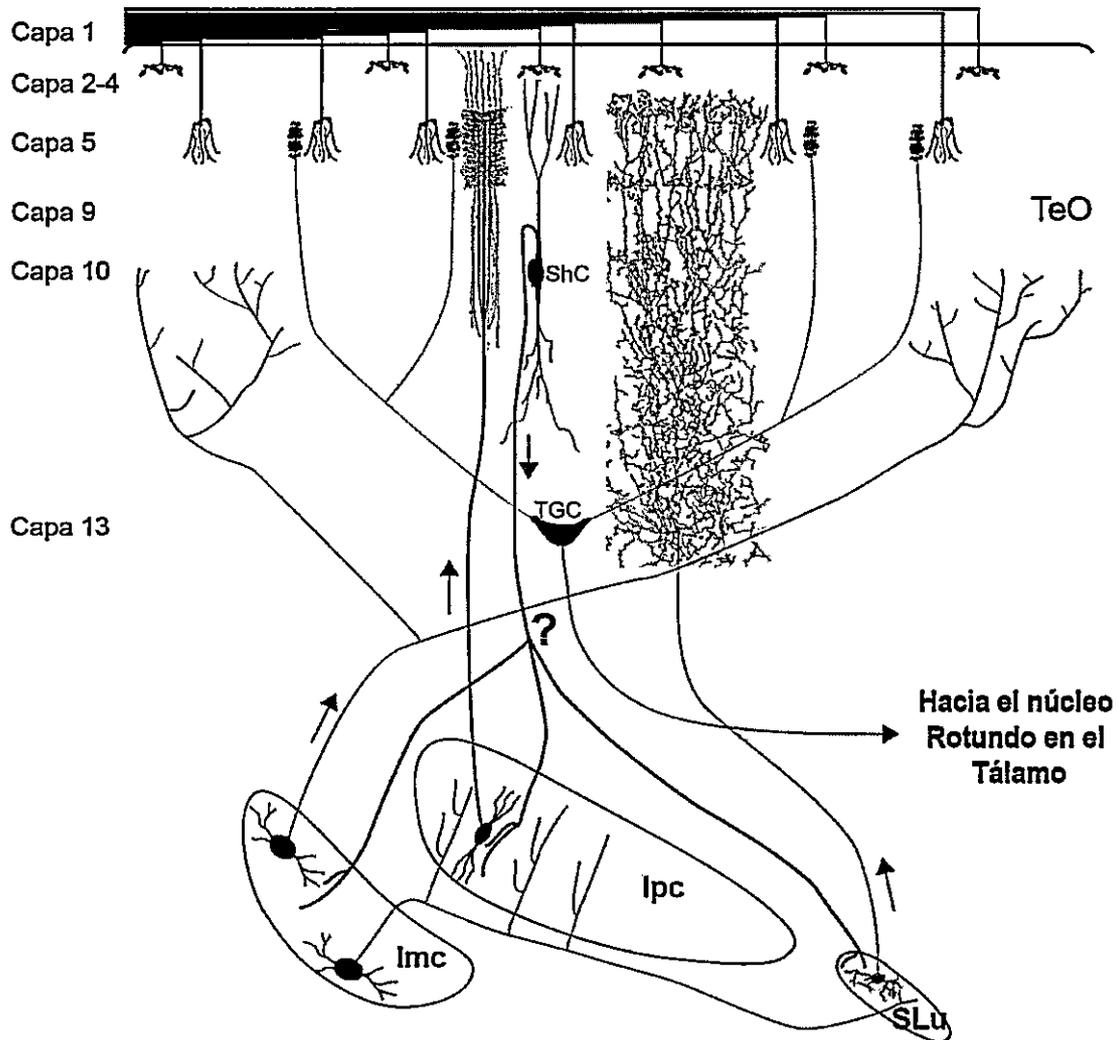


Figura 3. Esquema del circuito istmo-tectal. Las células ganglionares de la retina terminan sobre las capas superficiales del tectum óptico (TeO) contralateral, donde confluyen con los terminales dendríticos de las células ganglionares tectales (TGCs), las cuales llevan el flujo visual hasta el núcleo rotundo en el tálamo. Los núcleos del istmo, lpc, lmc y SLu, se conectan de manera recíproca con TeO, de manera homotópica (lpc y SLu) y heterotópica (lmc), teniendo como única aferencia la inervación proveniente de las células tectales de la capa 10. Cuando un locus tectal es activado, mediante la liberación de glutamato por parte de los terminales de la retina, las células tectales de la capa 10 activan la representación del mismo locus espacial en los núcleos lpc y SLu, los cuales, en conjunto, retro-alimentan el tectum óptico a través de toda una columna tectal. Al mismo tiempo, las neuronas tectales de la capa 10 activan neuronas en lmc, las cuales provocan un efecto inhibitorio sobre la periferia de los loci en lpc, TeO y SLu activados, mediante la liberación heterotópica de GABA. La acción de los axones de lpc modula fuertemente el flujo visual ascendente, estableciendo un efecto de compuerta sobre este flujo visual.

1.1 Planteamiento del problema.

La aferencia visual tectal de los núcleos del istmo proviene exclusivamente de neuronas tectales ubicadas en la capa 10. Se ha asumido que corresponden al tipo *Shepherd's Crook* (ShC); sin embargo, esto sólo se ha determinado fehacientemente para la aferencia del núcleo lpc (Wang y col., 2006), y sugerido para el núcleo lmc (Wang y col., 2004; Figura 3). Estas neuronas presentan una organización radial bipolar, con dos árboles dendríticos, cuyas ramificaciones abarcan desde la capa 2 hasta la 13, lo que hace presumir una función integradora. También poseen un axón característico que surge de la dendrita apical, gira en 180° y deja el tectum en dirección a los núcleos del istmo, atravesando las capas profundas (Figura 3; Ramón y Cajal, 1911; Domesick & Morest, 1977; Wang y col., 2006). Estudios electrofisiológicos indican que las respuestas visuales de los núcleos del istmo se sincronizan estrechamente entre sí. Se ha mostrado, por ejemplo que las neuronas de lmc pueden descargar andanadas de potenciales de acción de forma sincronizada (Marín y col., 2007). También existe una estrecha sincronía entre las respuestas visuales de las neuronas de lpc y SLu (Marín y col., 2012). Ambos fenómenos sugieren que la aferencia visual podría ser común, es decir, que las neuronas ShC sean de un sólo tipo funcional e inervan los tres núcleos (Figura 3).

Por otra parte, estudios *in vitro* sugieren fuertemente la existencia de dos poblaciones separadas de neuronas de la capa 10 involucradas en la proyección tecto-istmal, una de las cuales establecería una proyección hacia lmc mientras la otra población proyectaría al resto del complejo. La primera respondería a estímulos retinianos de manera tónica con una alta frecuencia de descarga de impulsos (100 a 150 Hz en rebanadas), mientras que la segunda respondería con trenes discontinuos de impulsos con una modulación en el rango gamma (20-50 Hz) (Goddard y col., 2012, 2014).

También se ha determinado que la población de neuronas tectales que proyectan a los núcleos lpc y SLu es inmuno-positiva para el anticuerpo contra el factor de transcripción Brn3a, las que se encuentran ubicadas en la misma subcapa tectal 10b (Wang y col., 2006). Aunque esto sugeriría una aferencia poblacional común de neuronas ShC para lpc y SLu, no es suficiente evidencia para determinar si una misma neurona inerva ambos núcleos o dos subpoblaciones inmuno-positivas para dicho marcador proyectan de manera segregada a cada uno.

El fenotipo neuroquímico de las neuronas tectales de la capa 10 es otro factor importante a considerar al momento de intentar discriminar homogeneidad o heterogeneidad en la proyección tecto-istmal. En cuanto a este punto, se ha mostrado que en palomas, los tres núcleos del istmo presentan inmuno-reactividad contra el transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2) (Atoji, 2011) y para distintos receptores de glutamato (Hellmann &

Güntürkün, 2001), sugiriendo que la proyección al complejo istmal sería del tipo glutamatérgico. Por otra parte, se ha mostrado que una población de neuronas de la capa tectal 10 es inmuno-positiva para la enzima que sintetiza acetilcolina, la colinacetil-transferasa (ChAT) (Sorenson y col., 1989). Además, los tres núcleos del istmo presentan inmuno-reactividad para la acetilcolina esterasa (AChE) (Hunt y col., 1977; Wang y col., 2006), enzima involucrada en la degradación de acetilcolina en el espacio sináptico y de receptores nicotínicos colinérgicos (Britto y col., 1994). Aunque estas neuronas ChAT positivas podrían pertenecer a neuronas fugales no relacionadas con el circuito istmo-tectal, la presencia de estos dos marcadores colinérgicos en los núcleos del istmo, ha sugerido una posible acción colinérgica por parte de las neuronas ShC. Por otra parte, hallazgos electrofisiológicos han sugerido la existencia de efectos colinérgicos y/o glutamatérgicos sobre los núcleos del istmo (Wu y col., 1994).

En suma, no existe claridad respecto de la organización de las proyecciones de las neuronas de la capa 10 desde TeO hacia los núcleos istmales. En particular no existe evidencia anatómica si una misma neurona envía colaterales a dos o tres núcleos del istmo, o cada núcleo está asociado a un tipo de neurona de la capa 10 específica (Figura 3).

Dada la importancia que este modelo posee en el entendimiento de los mecanismos que median la atención visual en vertebrados, y tomando en cuenta el número considerable de modelos teóricos que pretenden dar respuesta a la operación de este sistema (Shao y col., 2009; Lai y col., 2011; Mysore & Knudsen, 2012, 2014), se hace imprescindible conocer en detalle la conectividad istmo-tectal, en función de poder identificar y asignar la función particular de cada componente del circuito. Por estas razones, el presente trabajo busca realizar una descripción anatómica de la proyección tecto-istmal, mediante el uso de trazadores neuronales *in vitro* y técnicas de hibridación *in situ*.

1.2 HIPÓTESIS

La innervación istmo-tectal de las neuronas tectales de la capa 10 sobre el complejo del istmo, corresponde a una población única de neuronas *Shepherd's Crook*, la cual envía colaterales axónicas sobre los núcleos lmc, lpc y SLu.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la organización de la proyección tecto-istmal proveniente de las células tectales de la capa 10 y su identidad neuroquímica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la proyección tecto-istmal *in vitro*, mediante el depósito simultáneo de trazadores neuronales fluorescentes en los distintos núcleos del istmo, en preparaciones de rebanadas de mesencéfalo de pollo.
2. Establecer la proyección tecto-istmal *in vitro* mediante el trazado de neuronas únicas, utilizando el método llenado intracelular en rebanadas de mesencéfalo de pollo.
3. Establecer la identidad neuroquímica de la capa tectal 10 mediante ensayos de hibridación *in situ* para marcadores glutamatérgicos (VGluT2), GABAérgicos (VIAAT) y colinérgicos (VACHT).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados en pollos (*Gallus gallus domesticus*) de ambos sexos, 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 y en conformidad con las directivas de la NIH (National Institute of Health) en el uso de animales e investigación experimental.

2.1 Preparación de rebanadas.

Pollos de entre 1 a 5 días (depósito de cristales, $n = 9$; inyecciones simples, $n = 21$; inyecciones dobles, $n = 27$; llenado celular, $n = 9$) de edad, fueron anestesiados profundamente con isoflurano. Luego de decapitarlos, el cerebro fue removido en forma rápida (menos de 2 minutos) y dejado en solución fría de corte enriquecida en sacarosa (210 mM sacarosa, 3 mM KCl, 3 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 23 mM $NaHCO_3$, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 11 mM D+-glucosa) burbujeada con gas carbónico (95% O_2 ; 5% CO_2). Para lograr el ángulo deseado, los cerebros fueron puestos en agarosa 3% (Lafken, Chile) a 40°C y una vez enfriados, los bloques fueron cortados en secciones de 500 μm tanto coronales como horizontales usando un vibrátomo (Leica VT1200). Las rebanadas de mesencéfalo fueron incubadas en una cámara con solución de



registro (120 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 23 mM $NaHCO_3$, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 2 mM $CaCl_2$, 11 mM D+-glucosa) a temperatura ambiente y continuamente burbujeada con gas carbónico.

2.2 Deposito de cristales de biocitina *in vitro*.

Las rebanadas fueron puestas bajo la lupa en solución de registro y, luego de ubicar los núcleos del istmo por sus características anatómicas, se depositaron cristales del trazador neuronal biocitina (Invitrogen, Eugene, OR), utilizando una aguja de tungsteno. Luego, las rebanadas se incubaron por 6 h a temperatura ambiente en solución de registro burbujeada continuamente con carbónico, para luego ser fijadas toda la noche en solución de fijación (4% paraformaldehído; PFA). Posteriormente, las rebanadas fueron transferidas a solución de crioprotección (30% sacarosa en buffer fosfato/salino; PBS: 0.01 M buffer fosfato, pH 7.4; 0.02% NaCl) hasta que se hundieron y fueron re-seccionadas en cortes de 40 a 80 μm usando un micrótopo de congelación (Leitz 1400). Con el fin de eliminar la actividad de peroxidasa endógena, las secciones se incubaron 15 minutos en peróxido 0.6% en metanol 100%. Luego de cuatro lavados en PBS 0.5% tritón, las secciones obtenidas fueron incubadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC en PBS 0.3% tritón; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) en agitación por 2 h a temperatura ambiente. Luego de cuatro lavados en PBS, las secciones se dejaron 10 min en solución diaminobenzidina (DAB; Diaminobenzidine 0.025% en PBS; Sigma) con sulfato de níquel 0.01 M (Merck, Darmstadt, Alemania). Luego se agregaron

4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 0.01% en H_2O) y se dejaron reaccionar durante 10 min. La reacción se detuvo mediante lavados repetidos con PBS.

2.3 Inyecciones de trazadores neuronales *in vitro* utilizando nano-inyectores.

2.3.1 Inyecciones simples de trazadores neuronales.

Con el fin de realizar inyecciones de trazadores provocando el menor daño posible en el tejido, se realizaron inyecciones de trazadores utilizando micropipetas de borosilicato. Estas fueron fabricadas utilizando un estirador de filamentos (P-97; Sutter Instrument, Novato, CA USA) con puntas de entre 20 a 30 μm , e instaladas en un nano-inyector (WPI, Sarasota, FL USA), para posteriormente ser llenadas con dextrano-amina biotinilada 3000 DA (BDA 3k; Invitrogen, Eugene OR) 10% en buffer fosfato. Las rebanadas se observaron bajo la lupa en solución de registro y se realizaron inyecciones de entre 5 a 10 nL del trazador en las distintas regiones. Las rebanadas inyectadas fueron posteriormente incubadas por 4 a 5 h a temperatura ambiente en solución de registro continuamente burbujeada con carbógeno. Tal como para los ensayos de depósito de cristales, las rebanadas luego de ser fijadas, crioprotegidas, re-seccionadas e incubadas en ABC, fueron reveladas mediante la reacción peroxidasa/DAB.

2.3.2 Inyecciones dobles de trazadores fluorescentes.

Para los ensayos de co-localización de marca retrograda en las neuronas tectales de la capa 10, se realizaron inyecciones dobles utilizando los trazadores fluorescentes BDA 3k conjugado con fluoresceína (Invitrogen, Eugene, OR USA) y biocitina conjugada con rodamina (Biocitina TMR; Invitrogen, Eugene, OR USA). Pipetas de borosilicato de entre 20 a 25 μm se llenaron con uno u otro trazador. Las rebanadas fueron puestas bajo la lupa en solución de registro y se realizaron inyecciones locales en cada par de núcleos; *Ipc/lmc*, *Ipc/SLu*, *lmc/SLu* (Figura 9). Las rebanadas se incubaron entre 4 a 6 h a temperatura ambiente en solución de registro continuamente burbujeada con carbógeno. Posteriormente, se fijaron en PFA 4% toda la noche y se dejaron en solución de crioprotección. Se re-seccionaron, montaron en porta-objetos, y cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (FluorSave Reagent; Calbiochem, La Jolla, CA USA), y observadas en un microscopio de epifluorescencia (BX61 WI; Olympus, Center Valley, PA USA).

2.4 Llenado intracelular *in vitro*.

Para poder observar la morfología de las células tectales de la capa 10, realizamos inyecciones intracelulares de neuronas únicas en rebanadas. Las células a llenar fueron observadas mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia (BX51 WI; Olympus, Center Valley, PA USA) equipado con una cámara (WAT 902H2; WATEC, Newburgh, NY USA) y un monitor monocromático (Zenith Data System). Este arreglo experimental permitió la

búsqueda y selección de neuronas de la capa tectal 10 con características fusiformes, así como también, observar en tiempo real el llenado de la célula de interés con el trazador neuronal fluorescente.

Las rebanadas fueron transferidas a una cámara montada en el microscopio, por la cual fluyó continuamente solución de registro oxigenada con carbógeno. Las neuronas fueron inyectadas por medio de una pipeta de borosilicato con una punta de tamaño menor a 1 μm , llenadas con el trazador biocitina HCl (biocitina HCl 5% en acetato de potasio 0.5 M, pH 7.4; Sigma) y con resistencias que fueron desde los 60 a los 80 M Ω . Una vez que las células fueron penetradas con el electrodo, lo cual fue evidenciado por la baja del potencial observado en el osciloscopio (VC-6523; HITACHI, Broomfield, CO USA), se realizó la inyección del trazador mediante pulsos de corriente positiva de 0.5 a 1 nA, utilizando un amplificador (Neuro Data IR183A; Cygnus Technology inc., South Port, NC USA). Posteriormente, las rebanadas fueron incubadas por 2 h en solución de registro burbujeada constantemente con carbógeno. Al igual que en los ensayos de depósito de cristales e inyecciones simples, las rebanadas luego de ser crioprotegidas, re-seccionadas e incubadas en ABC, fueron reveladas mediante la reacción peroxidasa/DAB.

2.5.1 Reconstrucción celular.

Las neuronas marcadas intracelularmente fueron reconstruidas a alta magnificación (40X) con una "cámara lúcida" en un microscopio OLYMPUS BX51.

2.5 Cuantificación de la proyección tecto-istmal.

Para realizar la cuantificación de neuronas marcadas retrógradamente, se utilizaron rebanadas doble inyectadas con trazadores neuronales fluorescentes que exhibieran zona de superposición en el trazado retrógrado de neuronas tectales llenadas desde los núcleos Ipc e Imc. El análisis comprendió rebanadas completas (n = 4), es decir, se utilizaron todas las secciones obtenidas de cada experimento. Las secciones fueron fotografiadas utilizando una cámara (ORCA-R2, Hamamatsu) acoplada a un microscopio de epifluorescencia (BX61, OLYMPUS), y analizadas utilizando el programa cell Sense Dimension (OLYMPUS). Ante un posible cruce de emisión de los canales, las fotografías fueron corregidas mediante la substracción de intensidad en los canales rojo y verde obtenida de muestras control inyectadas con uno u otro trazador, utilizando un procedimiento de corrección del propio programa. En la región de traslape seleccionada, se contaron neuronas marcadas en cada canal, para luego clasificarlas como simples o doble marcadas (Tabla 1).

2.6 Hibridación *in situ*.

Las sondas de RNA utilizadas en el presente trabajo corresponden a las siguientes regiones para cada gen: VGluT2 (NM_001168383; 14-330); VIAAT (XM_417347; 515-939); VACHT (NM_206982; 433-822). Todas las secuencias se encuentran ubicadas en la región codificante de su correspondiente RNA mensajero.

Nueve pollos entre 2 a 4 semanas de edad fueron perfundidos transcardialmente bajo anestesia profunda (ketamina/xylazina 75/5 mg/kg), usando 300 mL de solución salina (NaCl 0.75%) seguido de 250 mL de solución de fijación (0.01 M buffer fosfato, pH 7.4; 0.02% NaCl; 4% PFA). Los cerebros se retiraron del cráneo y se incubaron en solución de post-fijación/crioprotección (30% sacarosa, 4% PFA en agua DEPC) durante 24-48 h a 4°C. Una vez hundidos, fueron cortados en secciones coronales de 100 µm usando un micrótopo de congelación (Leitz 1400). Las secciones en flotación se lavaron 3 veces en buffer fosfato/salino (PBS; 0.01 M buffer fosfato, pH 7.4; 0.02% NaCl en agua DEPC) y fueron tratados con solución de peróxido-PBS-T_w (6% peróxido de hidrógeno, 0.1% Tween 20, Promega, Madison, WI USA) durante 30 min. Luego, se incubaron en solución de proteinasa k-PBST_w (proteinasa K 10 mg/mL, Promega, Madison, WI USA) por 10 min a temperatura ambiente, se lavaron una vez en PBST_w, se fijaron en solución de PFA 4% en PBST_w durante 20 min; fueron posteriormente lavadas 3 veces en PBST_w y pre-hibridadas a 65°C en buffer de hibridación durante 3 h (formamida 50%, Merck, Darmstadt,

Alemania; 1.3X buffer citrato de sodio (SSC) pH 5.3; Winkler, Santiago, Chile; EDTA 5 mM, Winkler, Santiago, Chile; tRNA de esperma de salmón, 200 mg/ml; Tween 0.002%, Promega, Madison, WI USA; CHAPS 0.005%, Calbiochem, La Jolla, CA USA; Heparina 100 mg/ml, Calbiochem). Después de agregar la sonda respectiva y haber sido incubadas por 16-18 h a 65-70°C, las secciones fueron lavadas 2 veces en solución A (SSC 5X pH 5.3; formamida 50%; SDS 1%) a 63.5°C durante 30 min y tres veces en solución B (SSC 2.5X pH 5.3; formamida 50%; Tween1%) a 63.5°C durante 30 min. Luego de dos lavados en buffer de ácido málico (MABT_w; 100 mM ácido málico, Sigma; 0.1% Tween-20, Promega; 150 mM NaCl) las secciones fueron incubadas en solución de bloqueo (Blocking Reagent 2%, Roche, IN USA; suero de cabra inactivado 2%, en MABT_w) durante 4 h a temperatura ambiente y luego incubadas durante 16-20 h a 4°C con anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (anti-digoxigenin-AP Fab fragments from sheep, Roche, Mannheim, Alemania), dilución 1/1000 en MABT_w. Finalmente, las secciones fueron lavadas seis veces en MABT_w, incubadas en solución de reacción para fosfatasa alcalina (Tris 100 mM pH 9.5; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM), y reveladas agregando el reactivo NBT/BCIP (NBT/BCIP Stock Solution, Roche, Mannheim, Alemania) en incubación a temperatura ambiente durante 3-16 h.

3. RESULTADOS

3.1 Estudio de la proyección tecto-istmal mediante el uso de trazadores neuronales *in vitro*.

Para estudiar la conectividad entre las neuronas tectales de la capa 10 y cada uno de los componentes del complejo del istmo, se realizaron inyecciones simples y dobles de trazadores neuronales anterógrados y retrógrados en rebanadas de pollo (n = 57) de entre 1-5 días post-natal (p1-p5).

Inicialmente se buscó establecer planos de sección de rebanadas que incluyeran las proyecciones tectales hacia los tres núcleos, mediante el depósito de cristales e inyecciones de trazadores neuronales, tanto en el tectum óptico como en los núcleos respectivos. Luego de probar diversos planos de sección, se determinó que las rebanadas preparadas en ángulos coronal y horizontal eran las más adecuadas para explorar este circuito (ver más abajo).

A continuación describiremos los resultados obtenidos mediante el trazado anterógrado y retrógrado usando inyecciones simples, seguido de la descripción y análisis del trazado retrógrado mediante inyecciones dobles.

3.1.1 Trazado anterógrado de la proyección tecto-istmal mediante el uso del trazador neuronal biocitina *in vitro*.

Inyecciones locales y depósito de cristales de biocitina en la capa tectal 10 (n = 9), mostraron la proyección de las neuronas tectales sobre los núcleos lmc, lpc y SLu, evidenciada por la prominente presencia de terminales marcados en cada uno de ellos (Figura 4,5). Los núcleos lpc e lmc presentaron terminales tectales en rebanadas tanto coronales como horizontales (Figura 4,5). En particular, en lpc se observa una banda local de terminales en la región central del núcleo (Figura 4C, 5B), mientras que en lmc se aprecia una distribución menos localizada que comprende toda la extensión del núcleo observada en la sección (Figura 4D, 5C). A diferencia de lpc e lmc, el núcleo SLu se encuentra ubicado más alejado del tectum óptico, específicamente en la región lateral del tegmento, lo cual dificultó la obtención de las proyecciones tecto-SLu en rebanadas. Después de probar distintos planos de sección, se encontró que rebanadas en ángulo horizontal (Figura 2) podían contener proyecciones tectales a los tres núcleos del istmo (Figura 4A). La figura 4B muestra un ejemplo en que el depósito de cristales de biocitina en el tectum marcó terminales tectales en la región ventral del núcleo SLu (Figura 4B).

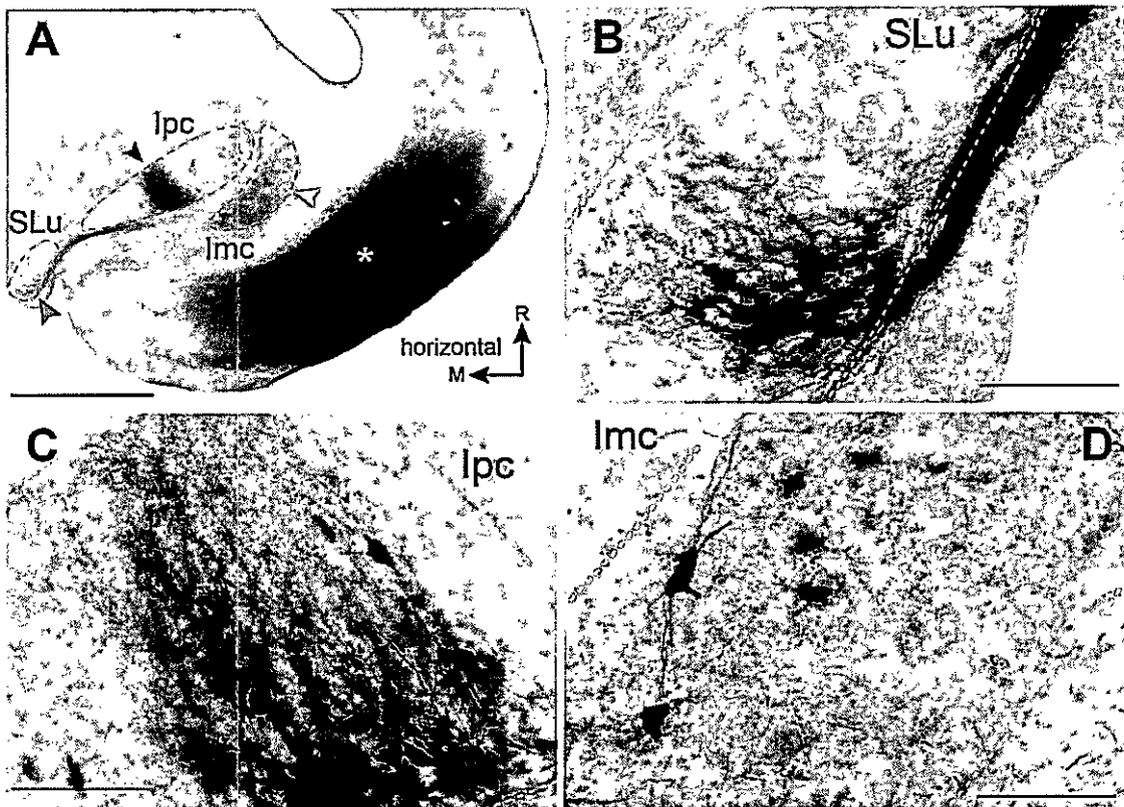


Figura 4. Proyección tectal sobre el complejo del istmo en rebanada horizontal. Marca anterógrada de terminales en los núcleos del complejo del istmo luego de depositar cristales del trazador neuronal biocitina en la capa tectal 10 (asterisco), en rebanadas de mesencéfalo de pollo. A, Rebanada horizontal que incluye los tres núcleos del complejo del istmo. Se observa una banda de terminales sobre la parte ventro-medial de lpc (cabeza de flecha negra) y el borde ventral de SLu (cabeza de flecha gris), y terminales difusos sobre todo lmc (cabeza de flecha blanca). B-D, Detalle de la banda de terminales en SLu (B), lpc (C) e lmc (D). Barra de tamaño A = 500 μ m; B-D = 100 μ m.



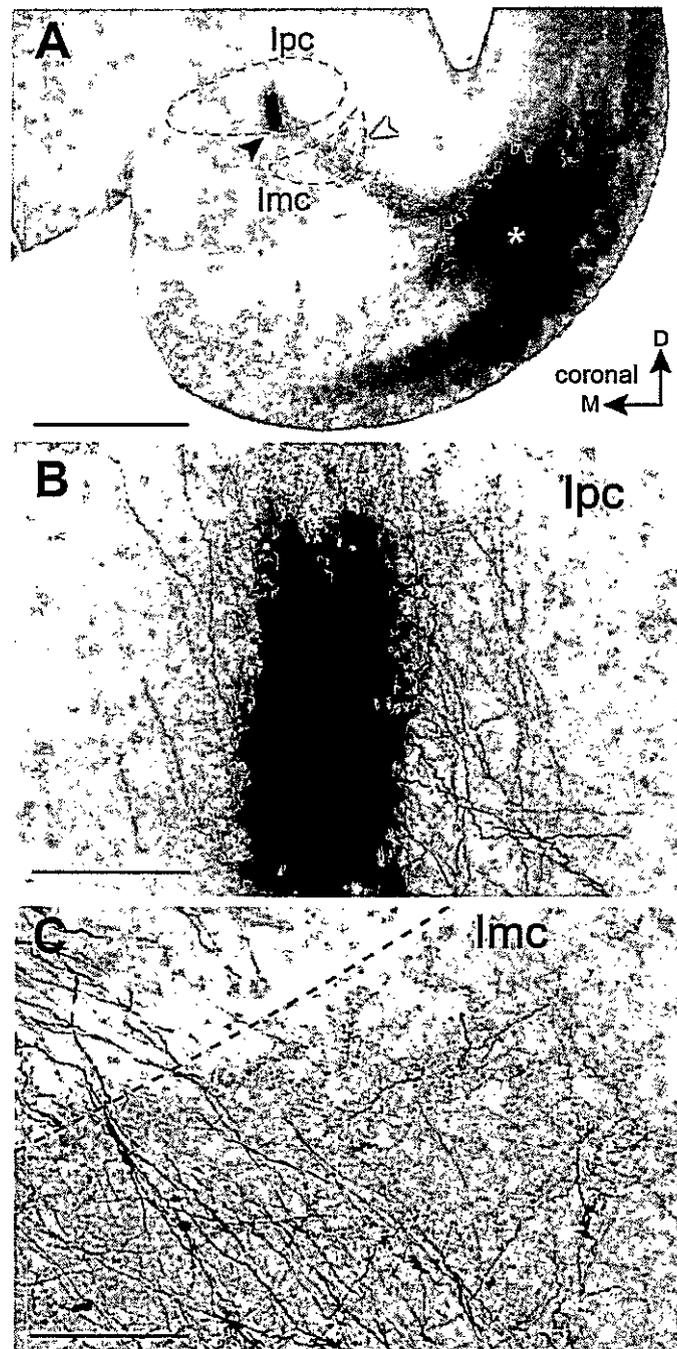


Figura 5. Proyección tectal sobre el complejo del istmo en rebanada coronal. Marca anterógrada de terminales en los núcleos del complejo del istmo luego de depositar cristales del trazador neuronal biocitina en la capa tectal 10 (asterisco), en rebanadas de mesencéfalo de pollo. **A**, Rebanada preparada en un ángulo coronal, que incluye sólo los núcleos lpc e lmc. La inserción de un cristal en la región ventral de TeO (asterisco) marca terminales que se ramifican en lmc (cabeza de flecha blanca) y axones que continúan y forman una banda de terminales en lpc (cabeza de flecha negra). **B**, **C**, Detalle de los terminales en lpc (**B**) e lmc (**C**). Barra de tamaño **A** = 500 μm ; **B-D** = 100 μm .

3.1.2 Trazado retrógrado de la proyección tecto-istmal mediante el uso de trazadores neuronales *in vitro*.

Un aspecto importante de investigar es si las neuronas tectales que proyectan a cada núcleo del complejo istmal poseen o no la misma morfología, ya que esto podría responder de manera directa la pregunta de si los núcleos tienen o no una aferencia específica. A pesar de que se sabe que las neuronas que proyectan a los tres núcleos están en la misma capa tectal 10 y son del tipo bipolar fusiforme, sólo se ha demostrado que las neuronas que proyectan a *Ipc* son del tipo *Shepherd's Crook* (ShC, Ramón y Cajal, 1911; Wang y col., 2006). Por otra parte, se ha sugerido una identidad del tipo ShC para las neuronas que proyectan al núcleo *Imc* (Wang y col., 2004). Para estudiar este problema, se realizó el trazado retrógrado de las células en la capa 10, mediante inyecciones locales del trazador neuronal biocitina y dextrano-amina biotinilada 3000 DA (BDA 3k) en cada uno de los núcleos del istmo por separado.

TeO-Ipc. Inyecciones locales en el núcleo *Ipc*, en rebanadas horizontales y coronales (n = 7), resultaron en el marcaje retrógrado de neuronas en la capa 10 correspondientes exclusivamente al tipo ShC, como se había descrito previamente (Figura 6; Ramón y Cajal, 1911; Wang y col., 2006). Todas las neuronas retrógradamente marcadas exhibían el axón curvo característico que surge de la base de la dendrita apical (Figura 6 A,A') y presentaban árboles dendríticos radiales muy ramificados, especialmente hacia las capas tectales profundas.

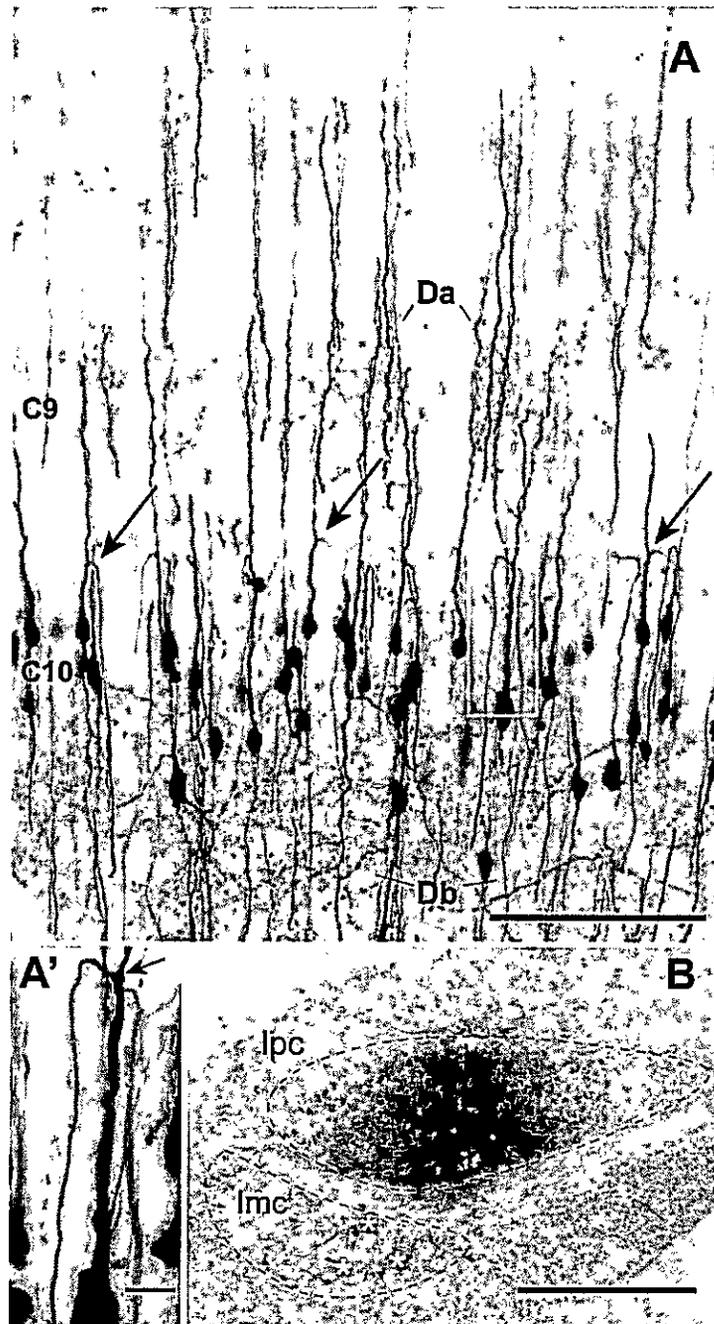


Figura 6. Neuronas *Shepherd's Crook* (ShC) trazadas retrógradamente desde el núcleo lpc. A, Neuronas marcadas en el tectum luego de inyectar lpc con BDA 3K en una rebanada horizontal. Se observa el característico axón surgiendo de la dendrita apical (flechas). Las dendritas apicales (Da) de las ShC marcadas se extienden hasta las capas tectales superiores, dejando ramificaciones principalmente en la capa 8-9. Las dendritas basales (Db) se extienden hacia las capas profundas ramificándose extensamente. A', Detalle del segmento inicial del axón. B, Sitio de inyección en lpc. Se pueden también notar las células llenadas retrógradamente en lmc (asteriscos). Barra de tamaño A = 100 μm ; A' = 25 μm ; B = 500 μm .

Teo-lmc. Inyecciones locales en el núcleo lmc, en rebanadas horizontales y coronales (n = 7), resultaron también en el marcaje retrógrado de neuronas en la capa 10 correspondientes al tipo ShC (Figura 7). En casi todos los casos fue posible observar el axón característico surgiendo de la dendrita apical, las dendritas apicales que se extienden hasta las capas superiores 2-3 y las extensas ramificaciones de la dendrita basal, las cuales se distribuyen en las capas profundas, llegando hasta las capas 13-14 (Figura 7A).

TeO-SLu. La obtención de la proyección tecto-istmal mediante inyecciones en el núcleo SLu se dificultó debido a que éste se encuentra alejado del tectum. Si bien inyecciones en la capa 10 permitieron observar terminales en SLu, el trazado retrógrado mediante inyecciones locales en el núcleo (n = 7), no produjo marca en las neuronas tectales. Se observaron fibras marcadas saliendo de SLu y pasando sobre lpc en dirección al tectum, sin embargo esta proyección se interrumpe debido al corte de la rebanada (Figura 8).

Por otro lado, los axones llenados desde SLu dejaban una amplia región marcada de terminales axónicos y ramificaciones de fibras en lpc (Figura 8B). Se ha visto que las células de SLu no proyectan a lpc (Wang y col., 2006), por lo tanto se podría suponer una aferencia tectal común para lpc y SLu proveniente de las neuronas tectales ShC. Sin embargo, ya que las células de lmc extienden ramificaciones sobre estos dos núcleos, los terminales observados podrían deberse a proyecciones de lmc sobre lpc y SLu. Por lo tanto, por medio de estas inyecciones, no se logró determinar si la anatomía de las neuronas que proyectan al núcleo SLu corresponde a la de neuronas del tipo ShC, y si éstas a su vez dejan colaterales en los núcleos lmc e lpc.

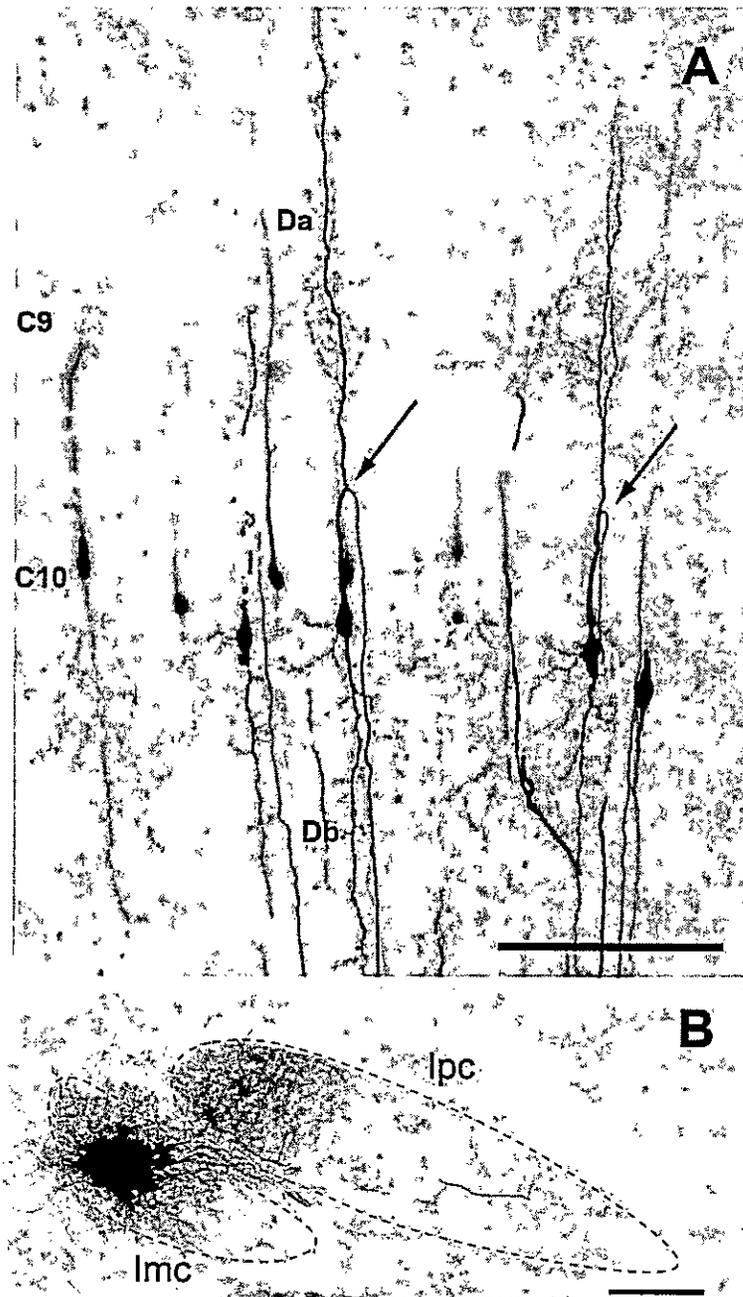


Figura 7. Neuronas *Shepherd's Crook* (ShC) trazadas retrógradamente desde el núcleo Imc. A, Neuronas tectales marcadas luego de inyectar BDA 3k en el núcleo Imc. Se observa el característico axón surgiendo de la dendrita apical (flechas). Se observan las dendritas apicales (Da) que se extienden hasta las capas tectales superiores, dejando ramificaciones principalmente en la capa 9, y las dendritas basales (Db), que dejan extensas ramificaciones en las capas profundas. B, Sitio de inyección de BDA 3k en Imc en rebanada horizontal. Se observan terminales axónicas en Ipc, provenientes de Imc y fibras de paso desde el tectum. Barra de tamaño A = 100 μ m; B = 200 μ m.

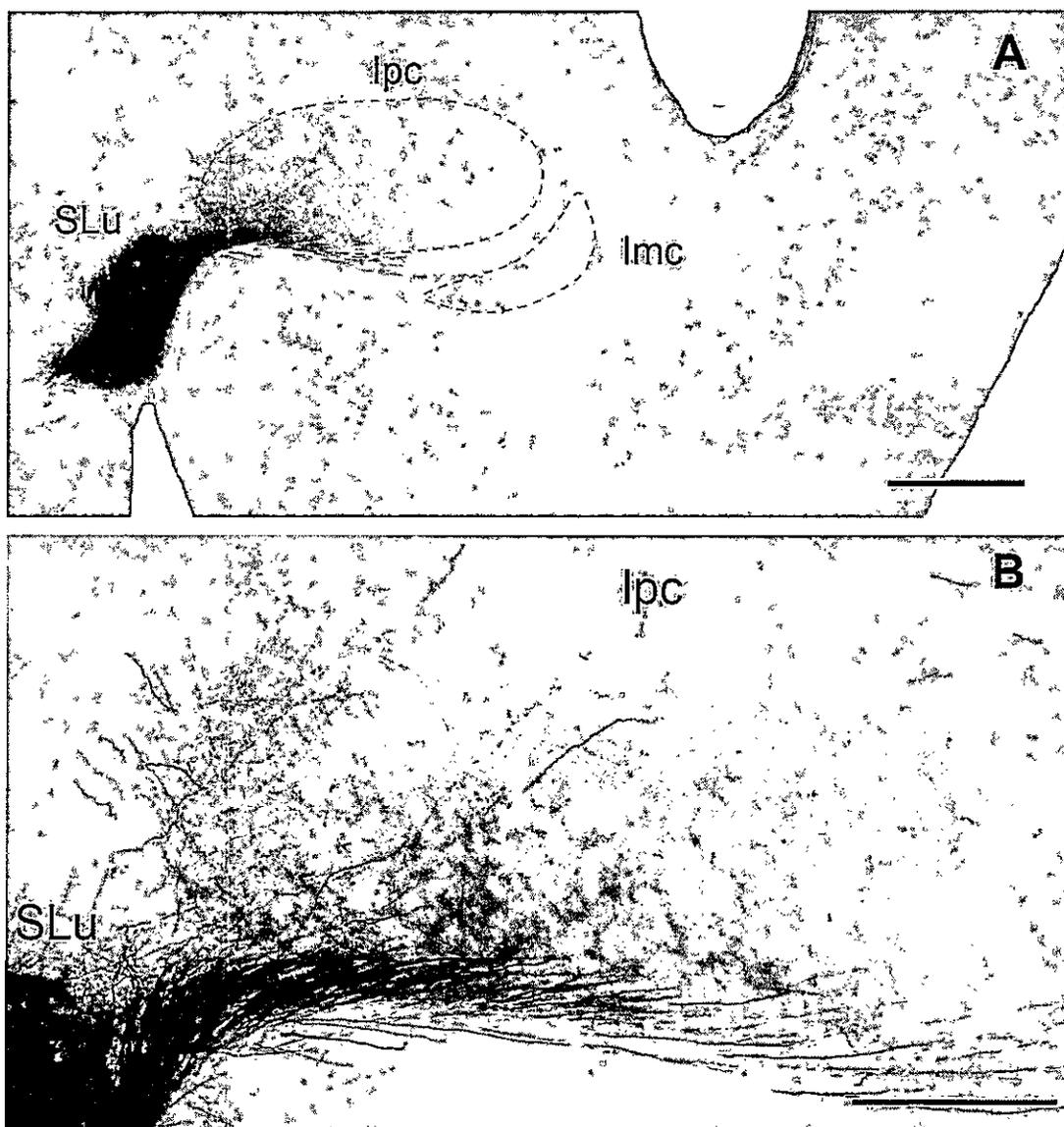


Figura 8. Inyección de BDA 3K en SLu no generó marca retrógrada en el tectum. **A,** Sitio de inyección local en el núcleo SLu en rebanadas preparadas con un ángulo horizontal. No fue posible observar neuronas tectales en la capa 10. **B,** Magnificación de la zona de lpc. Se muestran fibras trazadas desde SLu pasando sobre lpc, dejando ramificaciones, posiblemente provenientes de lmc. Barra de tamaño A= 500 μm ; B= 200 μm .

Con el fin de determinar si las neuronas ShC trazadas desde lpc e lmc son las mismas, realizamos una clasificación anatómica general de ellas utilizando la morfología de sus dendritas apicales como criterio de agrupación (Figura 9). De esta manera pudimos definir cuatro tipos principales: las neuronas del tipo I se caracterizan por ramificar en la capa 9, generando dos a 3 ramas principales, de las cuales se desprenden varias dendritas secundarias, sin extenderse hacia las capas superiores. En cambio, las neuronas de tipo II, III y IV, extienden sus dendritas apicales a través de las capas retinorecipientes hacia las capas superiores, dejando ramificaciones en la capa tectal 9 (Figura 9). La dendrita apical de las ShC del tipo II, presentan una primera bifurcación entre la capa 9-10, para luego bifurcar nuevamente en las capas 2-4. Por otra parte, las del tipo III proyectan su dendrita apical radialmente a través de las capas superiores, bifurcando en la capa 5 en 2 o 3 procesos secundarios que se extienden hasta la capa 1. Por último, la dendrita apical de las neuronas ShC del tipo IV se caracteriza por presentar una primera bifurcación cercana al soma, de la cual se proyectan dos dendritas principales paralelas que dejan ramificaciones en la capa 9, bifurcando nuevamente en las capas 7-8.

Al marcar retrógradamente neuronas ShC, tanto desde lpc como desde lmc, fue posible observar los cuatro tipos neuronales descritos anteriormente, sin mostrar diferencias entre ambos núcleos (lmc-lpc; I = 9-7; II = 13-15; III = 15-13; IV = 13-15) lo que sugiere una aferencia tectal similar para lpc e lmc.

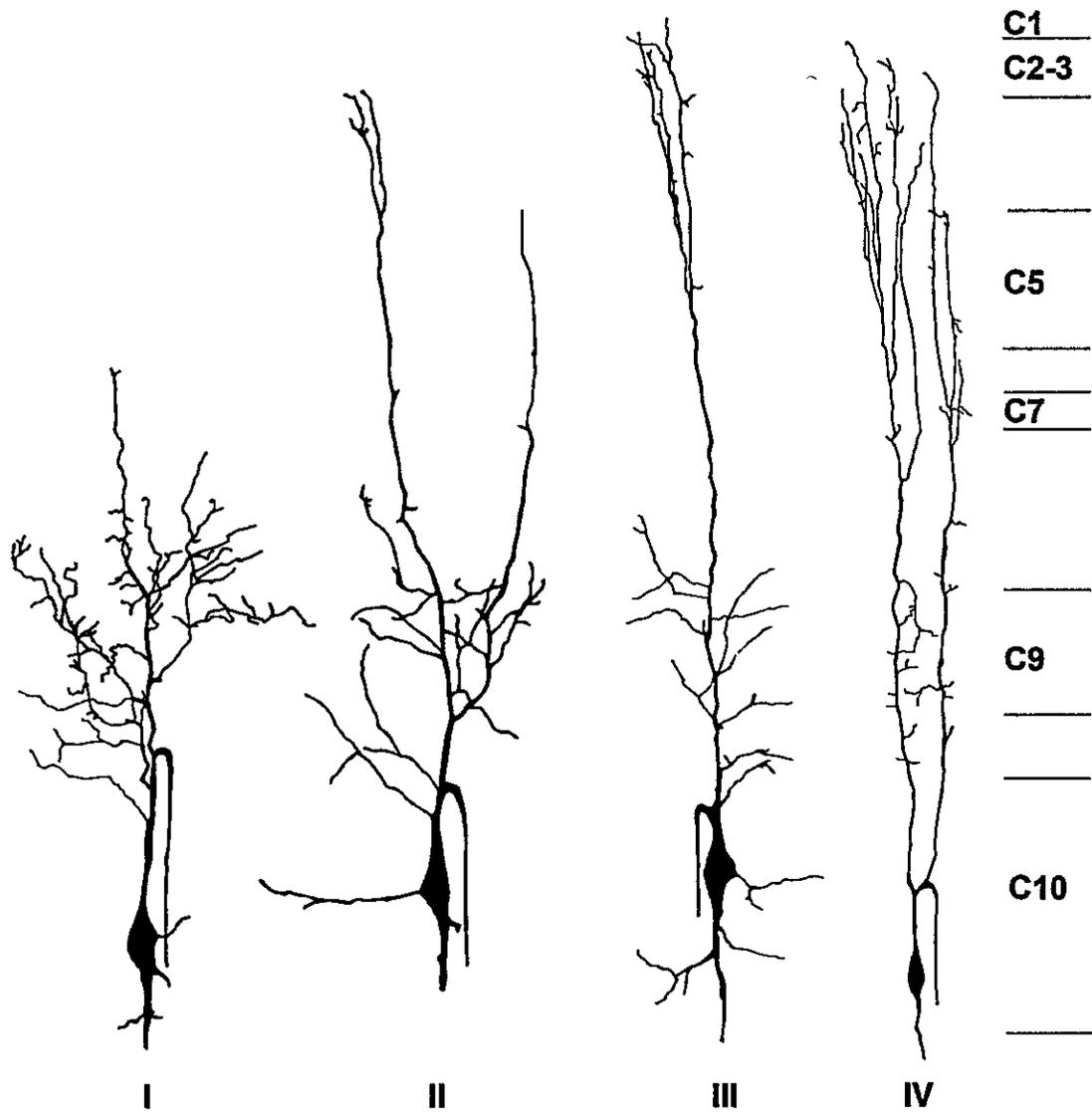


Figura 9. Clasificación de neuronas tectales ShC. Reconstrucción en cámara lúcida de neuronas ShC. Los cuatro tipos dejan ramificaciones secundarias de la dendrita apical en la capa tectal 9. La región en gris delimita la zona retinorecpiente (2-7). Sólo las dendritas apicales fueron reconstruidas.

3.1.3 Trazado retrógrado de la proyección tecto-istmal mediante el uso de inyecciones dobles en los núcleos del complejo del istmo *in vitro*.

Para identificar si la proyección tecto-istmal sobre los núcleos del istmo corresponde a colaterales de una neurona en la capa 10 o a distintas neuronas ShC específicas para cada núcleo, se realizaron inyecciones dobles (n = 27) de los trazadores neuronales fluorescentes biocitina conjugada con tetrametilrodamina (B-TMR) y BDA 3K conjugada con fluoresceína (BDA-F), según la combinatoria experimental presentada en la figura 10. Para estos experimentos el trazador estaba en solución y fue inyectado usando micropipetas, lo que permitió obtener sitios de trazado local con un mínimo de difusión y un menor daño en el tejido.

Si bien no fue posible marcar células retrógradamente desde SLu, se intentó igualmente con los trazadores fluorescentes por la posibilidad de que éstos permitiesen observar marca en la capa tectal 10.

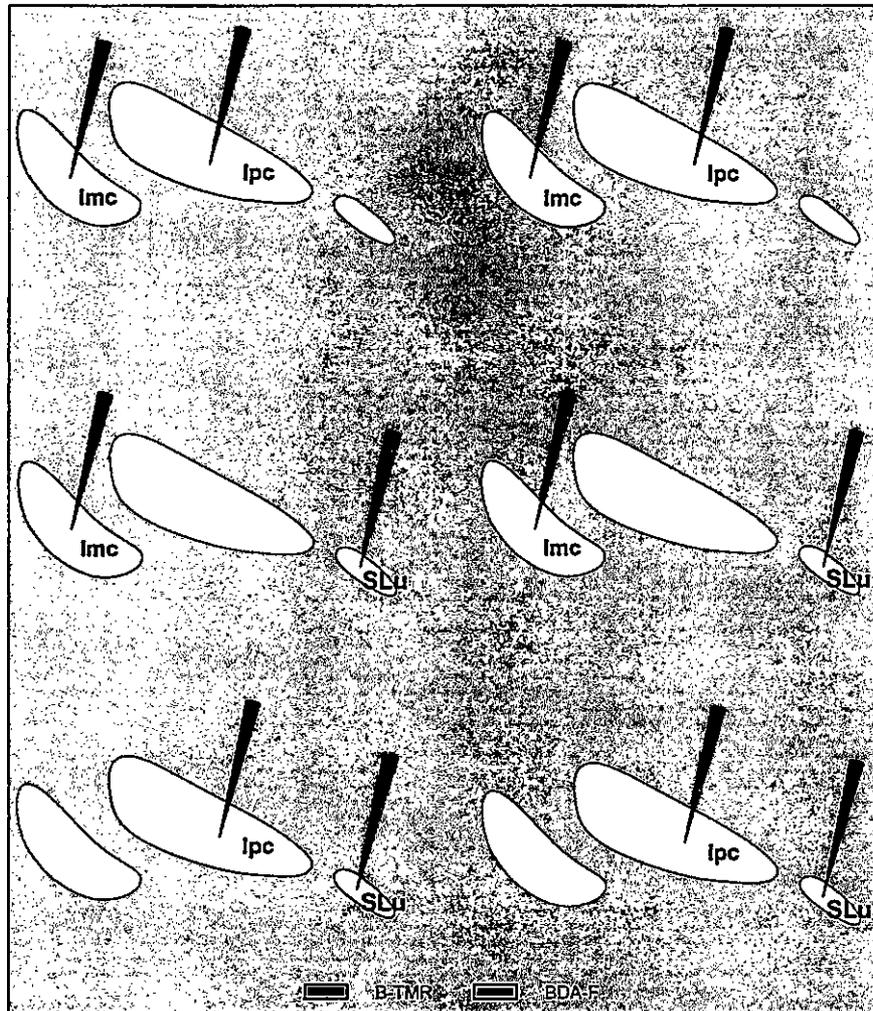


Figura 10. Combinatoria experimental de inyecciones dobles fluorescentes. En rebanadas preparadas con un ángulo tanto coronal como horizontal, se inyectó biocitina conjugada con tetrametil-rodamina (B-TMR) y BDA 3K conjugado con fluoresceína (BDA-F).

lmc-lpc. Para evaluar la validez del método, ante la posibilidad de que el transporte de un trazador predominase o impidiera el transporte del segundo, se inyectaron los núcleos lmc e lpc individualmente con una mezcla de ambos trazadores. En los dos casos, todas las células marcadas presentaron ambos trazadores (Figura 11), evidenciando que no hay interferencia en el transporte entre los dos trazadores utilizados.

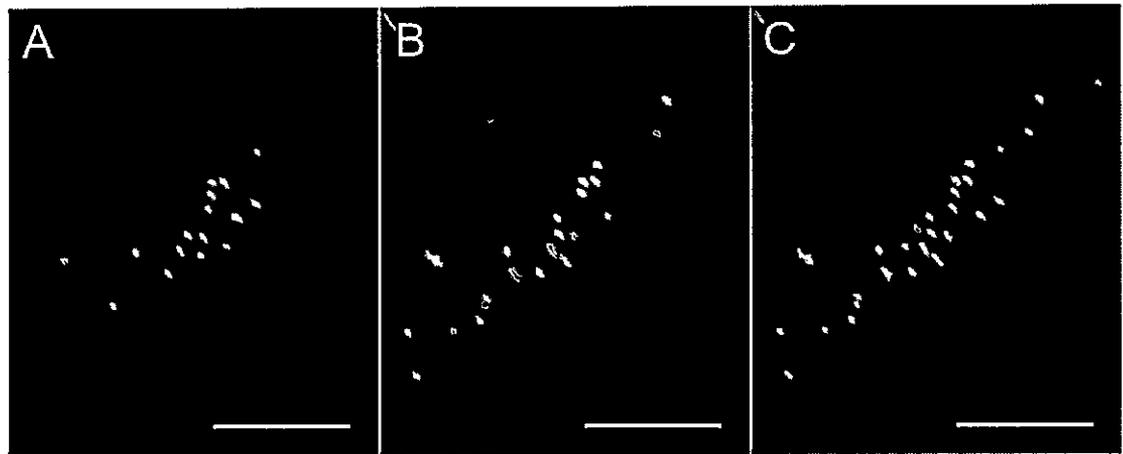


Figura 11. Control de afinidad diferencial o interacción de los trazadores fluorescentes. Inyección local en Ipc con mezcla de los trazadores BDA-F (A) y B-TMR (B). Todas las células presentan marca de ambos trazadores (C). Barra de tamaño = 200 μ m.

Inyecciones locales individuales de cada trazador en los núcleos Ipc e Imc ($n = 15$), llenaron de manera retrógrada neuronas del tipo ShC en la capa tectal 10 (Figura 12). Debido a que los trazadores se inyectaban en lugares aproximadamente homotópicos de cada núcleo, una proporción significativa de las neuronas marcadas con cada trazador se sobreponían espacialmente en el tectum. Al observar esta región de traslape de ambas proyecciones ($n = 4$) fue posible encontrar neuronas doblemente marcadas con ambos trazadores, sugiriendo que estas neuronas proyectan a ambos núcleos (Figura 12D). Por otra parte, también se encontraron, en medio de la zona de traslape de ambos trazadores, neuronas vecinas marcadas diferencialmente con un solo trazador (Figura 13). Debido a la alta homotopía que muestra la proyección tecto-istmal, este hallazgo sugiere también la existencia de poblaciones celulares específicas para ambos núcleos. Inyecciones recíprocas, invirtiendo los trazadores inyectados en cada núcleo (ver Figura 10), no mostraron diferencias en los resultados en uno u otro caso.

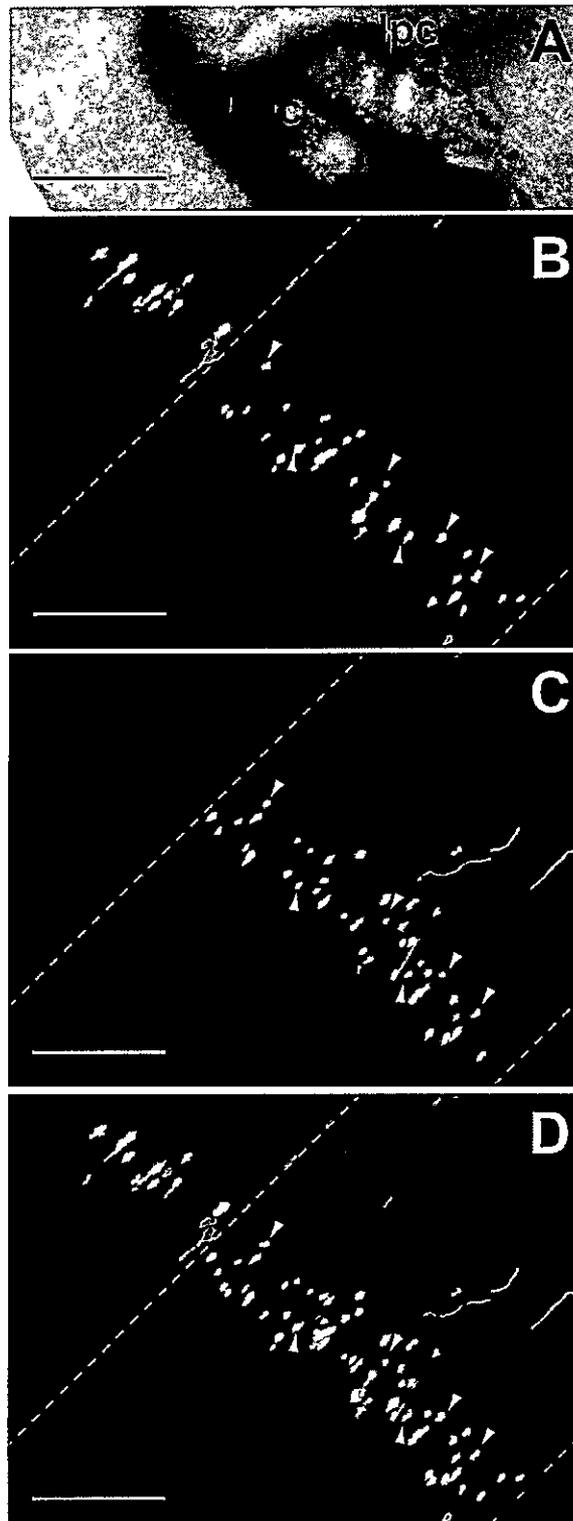


Figura 12. Neuronas ShC doble marcadas luego de inyectar trazadores fluorescentes en Ipc e Imc. A, Sitios de inyección de los trazadores B-TMR y BDA-F en Imc e Ipc, respectivamente, en rebanada coronal. B, Neuronas ShC llenadas retrógradamente desde Imc. C, Neuronas ShC llenadas retrógradamente desde Ipc. D, Sobreposición de B y C, donde se observan neuronas marcadas con ambos trazadores (flechas) en la región de traslape de ambas marcas (líneas punteadas). Barra de tamaño A = 500 μ m; B-D = 200 μ m.

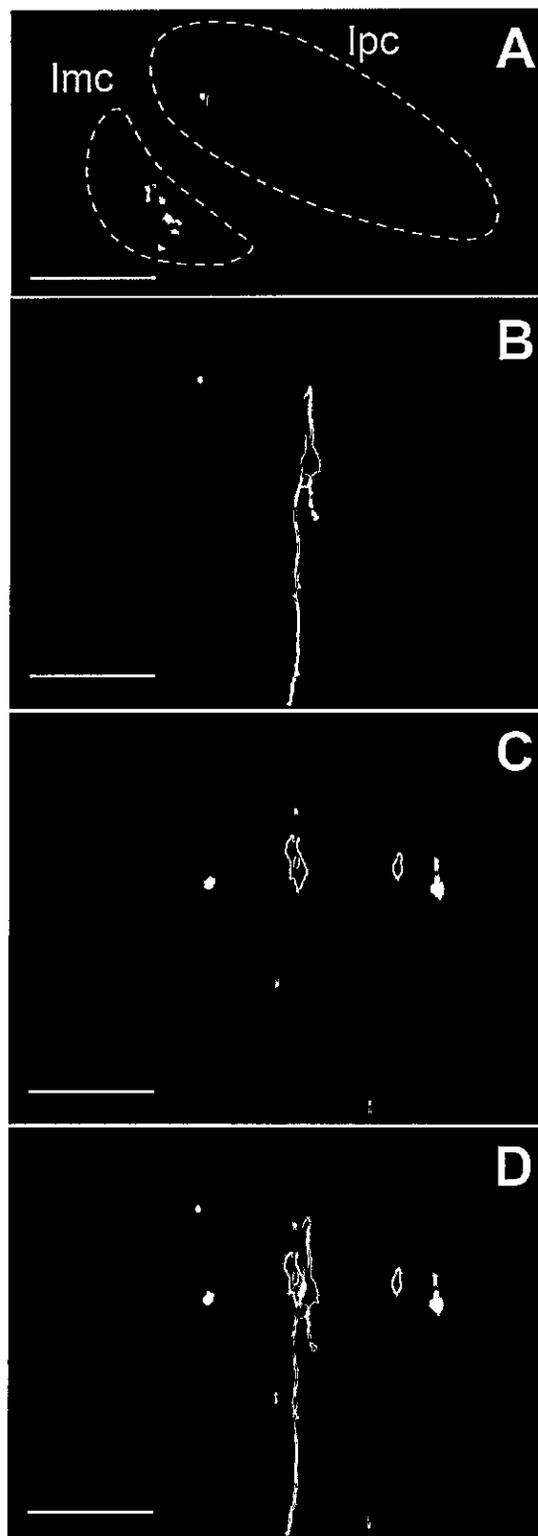


Figura 13. Neuronas ShC vecinas sin doble marca luego de inyectar trazadores fluorescentes en lpc e lmc. A, Sitios de inyección de los trazadores B-TMR y BDA-F en lpc e lmc, respectivamente, en rebanada horizontal. B, Neuronas ShC llenadas retrógradamente desde lpc. C, Neuronas ShC llenadas retrógradamente desde lmc. D, Sobreposición de B y C, donde se observan dos neuronas vecinas en la zona de traslape marcadas cada una con un sólo trazador. Barra de tamaño A = 500 μ m; B-D = 100 μ m.

El conteo celular realizado en rebanadas con doble inyección (n = 4), reveló que, en promedio, el 75% y 67% de las neuronas trazadas desde lpc e lmc, respectivamente, se encontraron marcadas con ambos trazadores (Tabla 1). Esto sugiere la existencia de un número mayoritario de neuronas ShC que proyectaría a ambos núcleos, posiblemente mediante colaterales del axón de una misma célula. Por otra parte, el 25% y 33% de las neuronas retrógradamente marcadas desde lpc e lmc, respectivamente, mostraron marcaje simple, sugiriendo adicionalmente la existencia de otras dos poblaciones significativas de neuronas tectales que proyectarían de manera exclusiva a uno u otro núcleo.

En resumen, estos resultados muestran la existencia de al menos 3 poblaciones tecto-istmales, dos de las cuales proyectarían de manera segregada a cada núcleo y una tercera, aparentemente mayoritaria, capaz de inervar a lpc e lmc a la vez.

Tabla 1. Conteo de neuronas ShC doble-marcadas. Porcentaje de neuronas ShC que presentan doble-marca, llenadas retrógradamente a partir de inyecciones fluorescentes en lpc e lmc en rebanadas de mesencéfalo de pollo, estimado respecto del total de neuronas marcadas desde cada núcleo (%lpc y %lmc) y respecto al total de células contadas (%Total).

n	%lpc	% lmc	% Total
1	58.9	64.8	44.6
2	59.9	37.5	29.9
3	90.8	91.5	83.7
4	90.3	74.7	69.1
	75.0	67.1	56.9

SLu-lpc/lmc. Inyecciones locales de trazadores neuronales fluorescentes en los núcleos SLu-lpc (n = 7) y SLu-lmc (n = 5) (Figura 14), permitieron llenar de manera retrógrada neuronas del tipo ShC en la capa tectal 10 provenientes sólo del núcleo lpc e lmc respectivamente (Figura 14 a,b). Para el caso de SLu, no fue posible observar células retrógradamente marcadas en la capa tectal 10 (Figura 14 a',b').

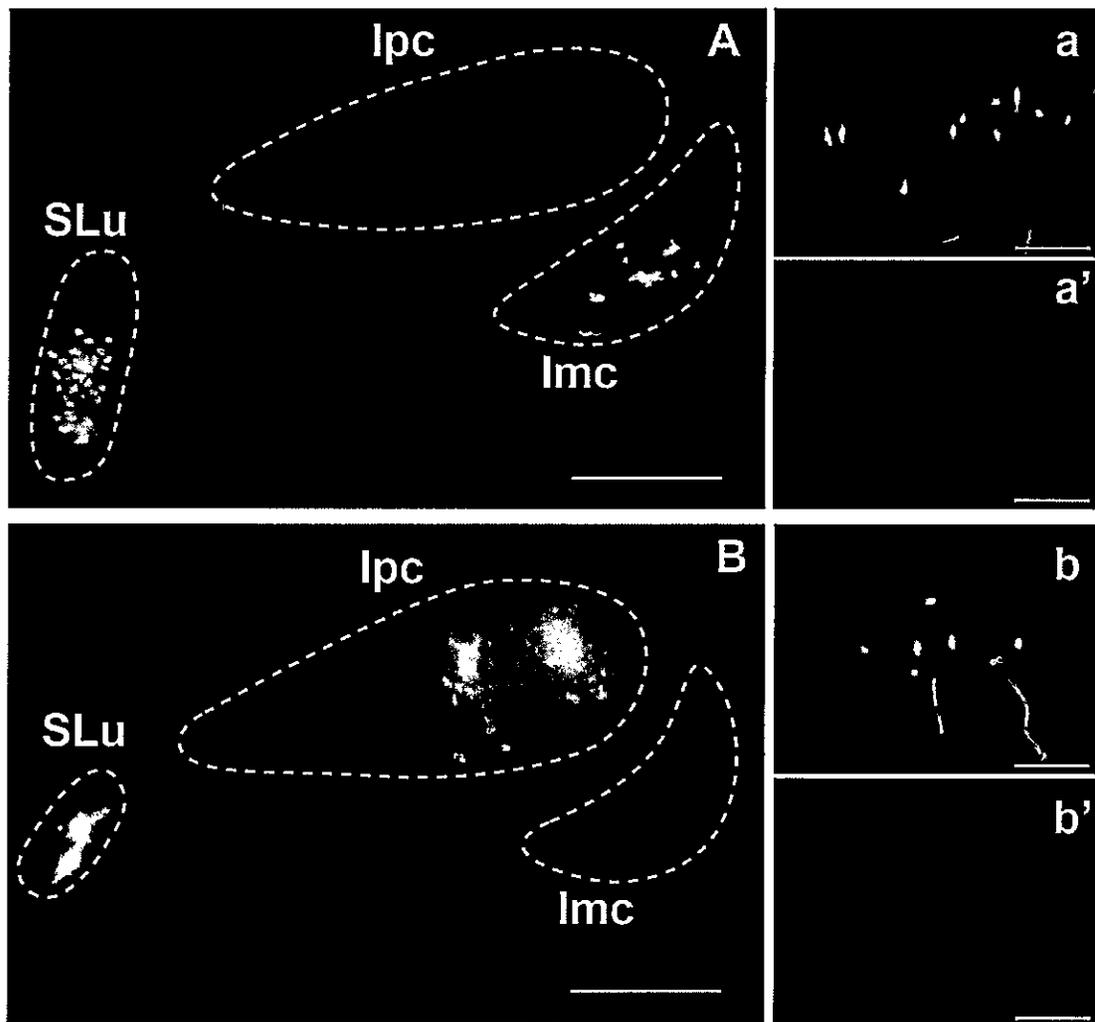


Figura 14. Inyecciones dobles-fluorescentes en SLu-lpc/lmc. Inyecciones locales en SLu-lpc (A) y SLu-lmc (B) permitieron marcar retrógradamente neuronas ShC provenientes sólo de lpc (a) e lmc (b) para cada caso. Al inyectar SLu tanto con los trazadores B-TMR (A) y BDA-F (B) no se observaron neuronas tectales (a',b'). Barra de tamaño A, B = 500 μ m; a-b = 100 μ m.

3.2 Identificación de la proyección tecto-istmal mediante el trazado *in vitro* de célula única.

Con el fin de determinar directamente la proyección de las neuronas ShC sobre los núcleos del istmo y evaluar su morfología, se realizaron llenados intracelulares con el trazador neuronal biocitina-HCl de neuronas tectales de la capa 10 (n = 9). De esta manera se marcó una sola neurona tectal por rebanada, intentando seguir el axón hacia los núcleos del complejo del istmo.

Ramificaciones dendríticas. En la figura 15 se muestran dos neuronas del tipo ShC llenadas intracelularmente, con el característico axón surgiendo de la dendrita apical (Figura 15 A',B,C, flechas). Se observa la dendrita basal que se extiende hasta la capa tectal 13, enviando ramificaciones con varicosidades a lo largo de todas las capas profundas del tectum. Esta técnica permitió identificar estructuras dendríticas prominentes, que surgen de la región superior de la dendrita basal, extendiéndose entre 100 a 200 μm (Figura 15). Notablemente se identificaron extensas ramificaciones dendríticas que surgen desde la dendrita basal a 100 μm del soma, las cuales se proyectan en 45° hasta sumergirse en la capa tectal 13 (Figura 15, asteriscos). Además fue posible observar ramificaciones dendríticas surgiendo desde el soma, extendiéndose por las capas 10-11 (Figura 15 A,B). Por otra parte, las dendritas apicales ramifican en las capas superiores, dejando colaterales entre las capas 8 y 9.

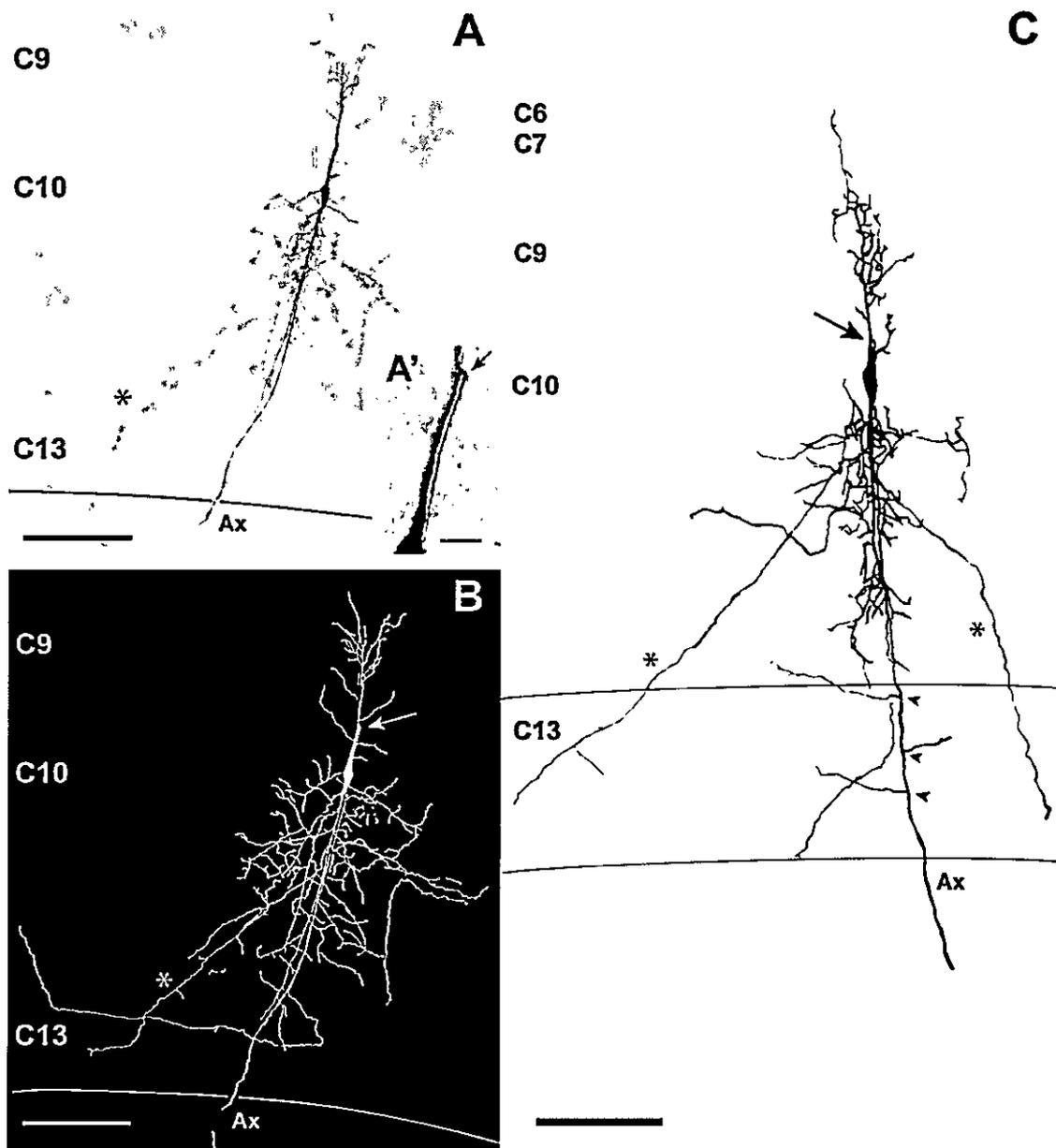


Figura 15. Neuronas *Shepherd's Crook* llenadas intracelularmente. **A,** Fotomicrografía de una neurona ShC llenada intracelularmente con el trazador neuronal biocitina-HCl. **B,** Reconstrucción en cámara lúcida de la neurona mostrada en A. **C,** Reconstrucción de una segunda neurona ShC llenada intracelularmente. En ambos casos se observa el axón característico que surge de la dendrita apical (**A', B, C,** flechas), doblando en 90° en dirección a los núcleos del complejo del istmo, atravesando todas las capas profundas del tectum (**Ax**). La dendrita basal se extiende hasta la capa tectal 13, dejando ramificaciones en todas las capas profundas. Además, se muestran ramificaciones (asteriscos) que surgen de la dendrita basal principal y se extienden en 45° hacia la capa tectal 13. Se observan ramificaciones axónicas horizontales a nivel de la capa 13 (**C,** cabezas de flechas). Barra de tamaño **A, B, C** = 100 μm ; **A'** = 25 μm .

Proyección axónica. En todas las neuronas ShC llenadas ($n = 9$) fue posible seguir el axón en dirección a los núcleos del complejo del istmo. Se encontraron ramificaciones axónicas a nivel de la capa tectal 13 (Figura 15C), y en uno de estos casos se pudo observar la anatomía de los terminales axónicos de las neuronas ShC sobre los núcleos lpc e lmc (Figura 16). Se observó el axón cruzando las capas tectales profundas, llegando primero al núcleo lmc, donde ramifica extensos terminales axónicos (Figura 16a), los cuales se distribuyen por gran parte del núcleo, para luego, mediante la continuación del axón, proyectar terminales sobre el núcleo lpc (Figura 16b). Si bien no fue posible reconstruir el soma de esta neurona (Figura 16, asterisco), se asume que es del tipo ShC, ya que éstas corresponden la única aferencia tectal sobre los núcleos del complejo del istmo (Figura 6,7; Wang y col., 2006). Este hallazgo concuerda con nuestros resultados de doble inyecciones, que sugieren una población numerosa de ShC que proyecta a ambos núcleos.

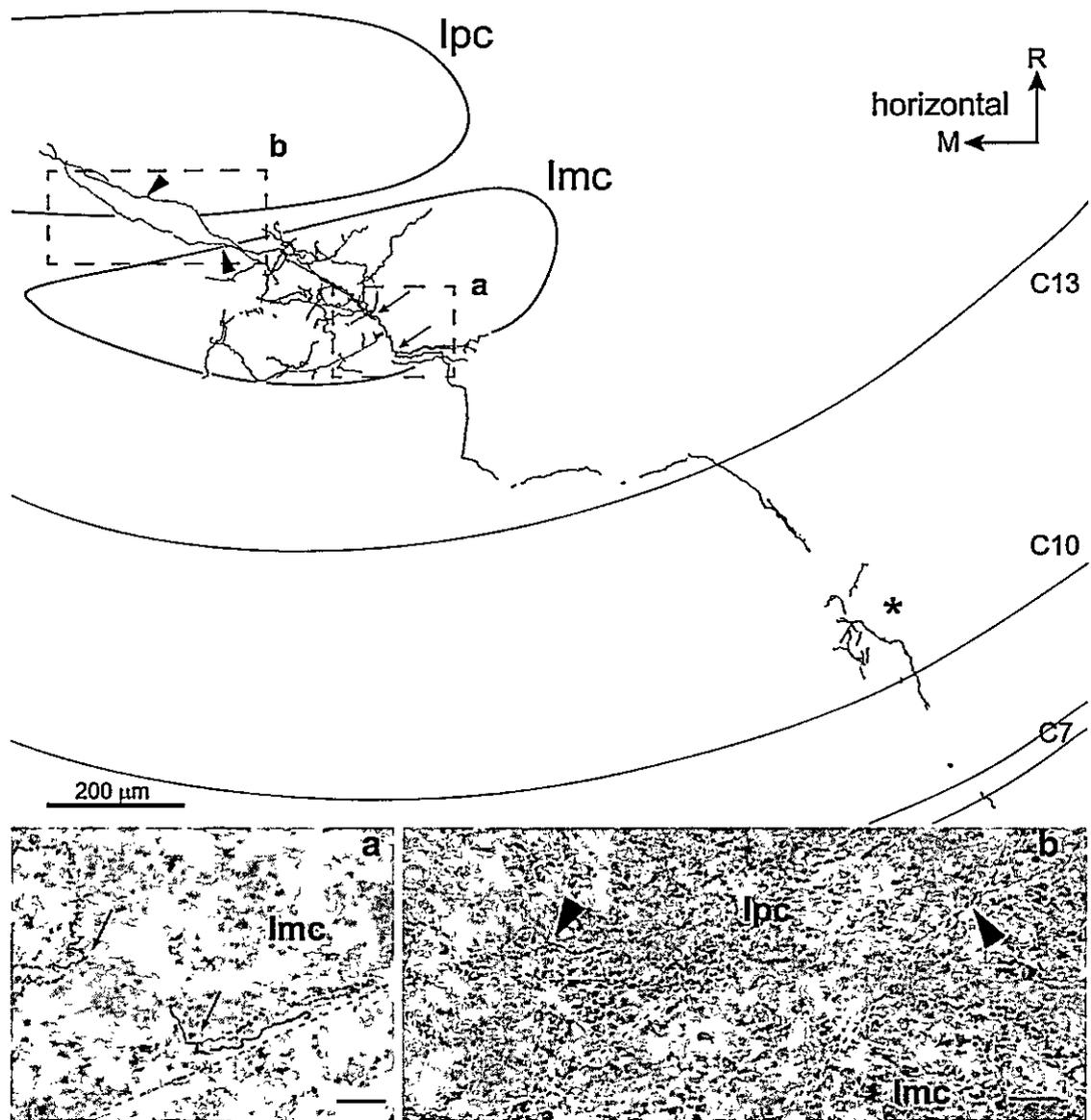


Figura 16. Proyección de neurona tectal única sobre los núcleos lpc e lmc. Reconstrucción en cámara lúcida de los terminales axónicos de una neurona tectal ShC llenada intracelularmente con biocitina-HCl. El axón ramifica dejando colaterales en lmc (recuadro a, flechas), para luego dejar el núcleo en dirección a lpc (recuadro b, cabeza de flechas). El asterisco indica la región de la capa tectal 10 donde se encontraría el soma. Barra de tamaño a,b = 25 μm.

3.3 Caracterización neuroquímica de la proyección tecto-istmal mediante ensayos de hibridación *in situ*.

Para determinar si las neuronas tectales responsables de la aferencia tectal sobre el complejo del istmo presentan un fenotipo neuroquímico glutamatérgico, GABAérgico o colinérgico, realizamos ensayos de hibridación *in situ* para los RNA mensajeros codificantes para el transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2; n = 3), el transportador vesicular de GABA (VIAAT; n = 3) y el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT; n = 3), respectivamente.

Para el caso de los marcadores VGluT2 y VIAAT, fue posible observar una fuerte expresión de ambos RNA mensajeros en células ubicadas en la capa tectal 10 (Figura 17). El resultado de la marca obtenida para VGluT2 se encuentra de acuerdo con lo previamente descrito en experimentos farmacológicos que sugieren una acción glutamatérgica sobre los núcleos del complejo del istmo (Marín y col., 2007, 2012; Goddard y col., 2012). Si bien para ambos marcadores se observaron células en toda la capa 10, se pudo reconocer mayor densidad en la región superior de esta capa para el caso del marcador VIAAT, sugiriendo una mayor expresión de este fenotipo en las neuronas que conforman la capa 10a. Por otra parte, no se encontró expresión del marcador colinérgico VACHT en la capa tectal 10, ni en el resto de las capas tectales (Figura 17), lo cual nos lleva a descartar esta clase de fenotipo para las neuronas ShC.

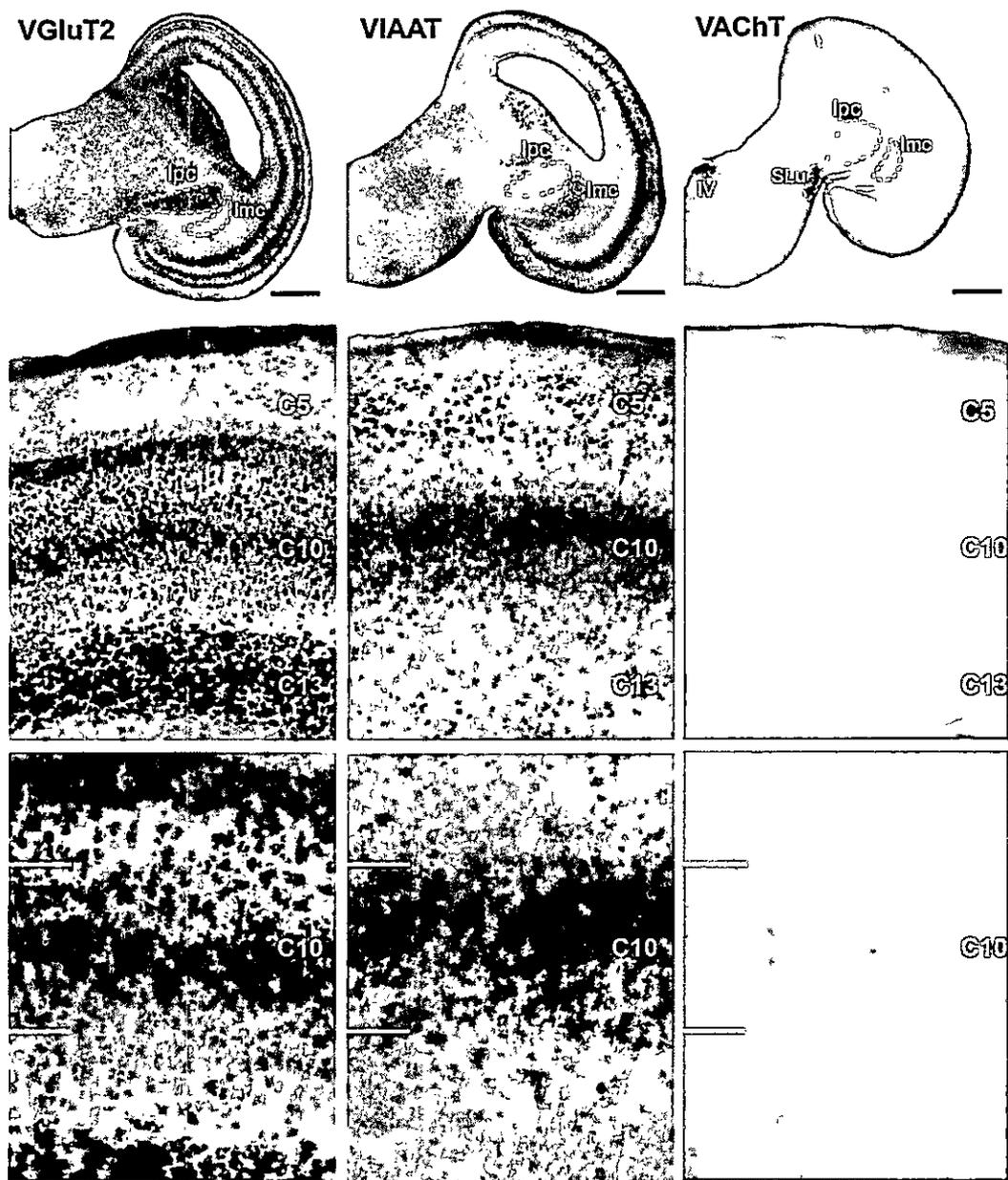


Figura 17. Expresión de marcadores glutamatérgicos, GABAérgicos y colinérgicos en la capa tectal 10. Ensayos de hibridación *in situ* para los marcadores de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLuT2), GABA (VIAAT) y acetilcolina (VACHT). Fila superior, secciones coronales de mesencéfalo de pollo. Se observa la intensa marca de VGLuT2 en el núcleo lpc y varias capas tectales. La expresión de VIAAT se observa en el núcleo lmc y en algunas capas tectales, mientras VACHT se expresa intensamente en el núcleo SLu y troclear (IV). Fila central e inferior, microfotografías a mayor aumento mostrando las capas tectales y la región en torno a la capa 10, respectivamente, donde se observa intensa marca de VGLuT2 y VIAAT en esta capa. Los somas se encuentran fuertemente marcados para ambos marcadores (fila inferior). Notar para el caso de VIAAT, una densificación del marcaje en la región superior de la capa 10. Por otra parte, no se observó marca para VACHT en ninguna de las capas tectales. Barra de tamaño fila superior = 1 mm.

4. DISCUSION

El presente trabajo investigó la posible heterogeneidad neuronal de la proyección de las neuronas de la capa 10 del tectum sobre los núcleos del complejo del istmo. La evidencia previa sugiere que los núcleos de éste complejo conforman un circuito neuronal que participa en la selección de estímulos en la vía visual tectofugal. Las neuronas de la capa 10 forman el brazo aferente de este circuito y no se sabe con certeza si una misma población de neuronas proyecta a todos los núcleos o existe una población específica para cada uno de ellos.

Los resultados de experimentos de inyecciones dobles de trazadores neuronales fluorescentes en los núcleos lmc e lpc determinaron que existe al menos una población neuronal del tipo *Shepherd's Crook* (ShC), aparentemente mayoritaria, que proyecta de manera simultánea a ambos núcleos. Evidencia reforzada por inyecciones intracelulares que mostraron que el axón de una neurona inervaba mediante colaterales axónicas a lmc, y continuaba hacia lpc. Junto con esto, en los experimentos de inyecciones dobles, se encontraron neuronas con marca simple, lo cual sugiere que también existen poblaciones de neuronas ShC que se proyectan de manera exclusiva a lpc e lmc (Figura 18). Las inyecciones en los núcleos del complejo del istmo junto con el llenado de células únicas, permitió ahondar en la anatomía de las neuronas tectales que

proyectan a lpc e lmc, generando una clasificación general morfológica en cuatro tipos de neuronas ShC. Además, este trabajo aporta evidencia que indica un fenotipo glutamatérgico para las neuronas ShC, al encontrar intenso marcaje de las células de la capa tectal 10 mediante los ensayos de hibridación *in situ* para el RNA mensajero del transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2).

4.1 Proyección tectal hacia los núcleos del complejo del istmo.

Se ha determinado en pollos que las neuronas que proyectan al núcleo lpc corresponden a las del tipo ShC (Wang y col, 2006), sin embargo el conocimiento morfológico de las neuronas que proyectan a los restantes núcleos no se había podido determinar con claridad. Gracias a inyecciones realizadas en el núcleo lmc, se observó que su aferencia tectal corresponde únicamente a neuronas ShC, lo cual refuerza la existencia de una población neuronal exclusiva para los núcleos del complejo. Si bien inyecciones en rebanadas permitieron observar de manera efectiva las proyecciones hacia los núcleos lpc e lmc, no fue posible determinar el ángulo de proyección para el núcleo SLu, por lo tanto, utilizando esta técnica no se logró determinar la anatomía de las neuronas tectales que proyectan a este núcleo. Sin embargo, se ha mostrado que la población neuronal que proyecta tanto lpc como SLu es inmuno-reactiva para el factor de transcripción Brn3a (Wang y col, 2006), sugiriendo que es la misma población celular del tipo ShC que proyecta también a este núcleo. Para resolver esta interrogante se haría necesario

realizar inyecciones *in vivo* en SLu y así llenar de manera retrógrada las neuronas tectales que proyectan a éste núcleo y determinar así su anatomía.

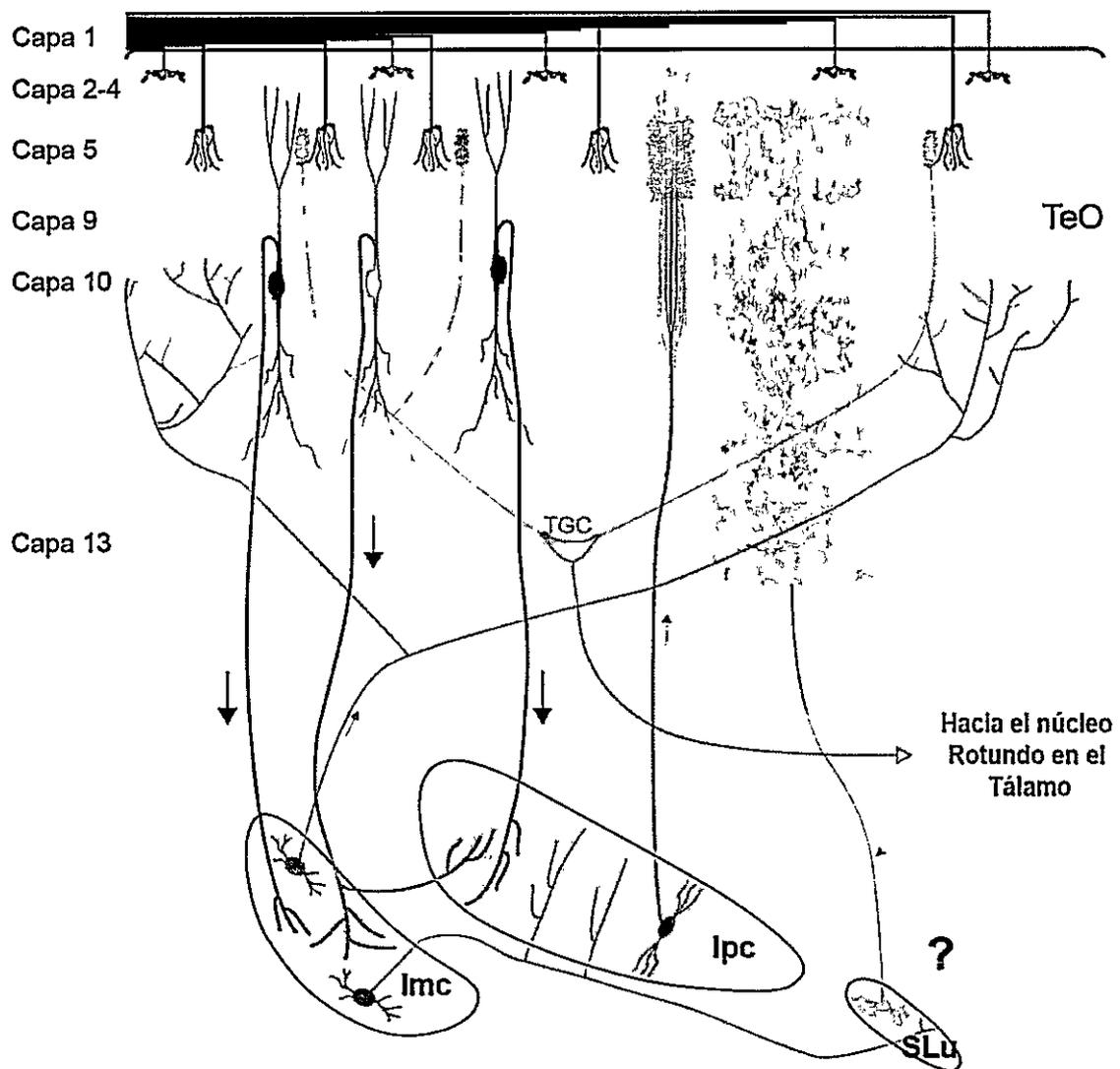


Figura 18. Esquema resumen de la conectividad del circuito istmo-tectal. Los resultados de esta tesis muestran que existen al menos tres poblaciones de neuronas *Shepherd's Crook*, una de las cuales despliega terminales axónicas en lpc e lmc (en amarillo) mientras que otras dos poblaciones inervan estos núcleos en forma exclusiva (en rojo a lmc y verde a lpc).

Por otra parte, el marcaje retrógrado de neuronas ShC que van a los núcleos lpc e lmc, permitió observar que estas neuronas tienen una morfología heterogénea, pudiendo ser clasificadas en cuatro grupos neuronales determinados por la morfología de su dendrita apical. Las neuronas llenadas desde lpc como desde lmc mostraron los cuatro tipos morfológicos descritos, lo que podría sugerir un *input* tectal común para ambos núcleos. Por lo tanto, las diferencias anatómicas observadas en la dendrita apical podrían estar asociadas a la diversidad de terminales retinianos que se encuentran en el tectum óptico (Hunt & Webster, 1975; Repérant & Angaut, 1977; Karten y col., 1997), más que con sus blancos sinápticos.

Las inyecciones dobles de trazadores fluorescentes mostraron que existe una alta proporción de neuronas que presentaron doble marca luego de inyecciones en cada núcleo. Si todas las neuronas ShC proyectaran tanto lpc como lmc, en la zona de traslape se debiese encontrar neuronas doble marcadas en un porcentaje cercano al 100% respecto del total marcado con inyecciones en cada núcleo, y el 100% respecto del total marcado con inyecciones en ambos núcleos. Si fuese el caso contrario, en el cual existiesen sólo neuronas que proyectan a cada núcleo exclusivamente, el porcentaje de neuronas doble marcadas para cada núcleo y respecto del total debiese ser cercano a cero. La alta proporción obtenida de neuronas con doble marca, tanto respecto a los núcleos como del total obtenido, sugieren la existencia mayoritaria de neuronas que proyectan a ambos núcleos. Sin embargo, también

hubo un porcentaje significativo de marca simple, lo que indica que también existen neuronas que proyectan en forma independiente a cada uno de ellos. Los casos encontrados de células marcadas con uno u otro trazador, sin doble marca, muy cercanas entre sí, refuerzan la existencia de estas poblaciones. Esto debido a la alta homotopía que existe entre la proyección del tectum y los núcleos de istmo, tal que si dos neuronas adyacentes inervan a ambos núcleos debiese esperarse que ambas se marcaran con los dos trazadores. Este resultado también indica que no hay una doble marca artefactual debido a la difusión del trazador u a otra causa. Para evitar la rotura de fibras que van hacia lpc al inyectar lmc, se realizaron inyecciones locales en cada núcleo utilizando nano-inyectores, los cuales permiten inyectar pequeños volúmenes de trazador reduciendo el daño en el tejido, disminuyendo la rotura de fibras de paso y la difusión del trazador fuera del sitio de inyección.

Los resultados previamente discutidos establecen de manera indirecta que existe un tipo neuronal ShC que proyecta a lmc e lpc. La técnica de llenado celular permitió resolver inequívocamente esta incertidumbre. Gracias a esto fue posible reconocer estructuras axónicas en los núcleos lpc e lmc provenientes de una misma neurona ShC (Figura 16), evidenciando de manera certera que existe un tipo neuronal que proyecta al menos a estos dos núcleos. Para estudiar la posible proyección de una sola neurona ShC a los tres núcleos del istmo, se hacen necesarios ensayos de marcaje de células únicas *in vivo*, ya que esta técnica elimina la problemática del ángulo y sobrevida de la rebanada.

4.2 La fisiología tecto-istmal y su anatomía.

Estudios electrofisiológicos previos habían supuestamente demostrado que la aferencia tectal a los núcleos lpc e lmc se origina en neuronas exclusivas para cada núcleo (Goddard y col., 2012, 2014). Registros extracelulares en la capa tectal 10 *in vitro* (Goddard y col., 2012) e *in vivo* (Sridharan y col., 2011) mostraron que estas neuronas descargan impulsos en frecuencia gamma (25-75 Hz). Por otra parte, las neuronas de lmc responden a la aferencia tectal descargando a alta frecuencia (150 Hz *in vitro*, Goddard y col., 2014; 600 Hz *in vivo*, Marín y col., 2007), mientras que las neuronas de lpc responden con ráfagas discontinuas de impulsos, con una modulación en el rango gamma (25-70 Hz) (Marín y col., 2005; Goddard y col., 2012). Ensayos de *whole cell-patch clamp* en neuronas tectales de la capa 10 han mostrado la existencia de células que descargan impulsos a alta frecuencia al estimular las fibras retinianas. Dichas neuronas fueron identificadas como aferentes de lmc mediante previa activación antidrómica desde este mismo núcleo (Goddard y col., 2014). Por lo tanto, se ha sugerido la existencia de dos tipos neuronales en la capa tectal 10. Por una parte, neuronas que proyectan exclusivamente al núcleo lmc, que descargan a alta frecuencia, y por otra, neuronas que proyectan a lpc, las que descargarían con impulsos modulados a frecuencia gamma (Goddard y col., 2012, 2014). Estos estudios concluyeron que la aferencia tectal sobre el núcleo lmc es exclusivamente segregada. Sin embargo, la estimulación antidrómica utilizada en dicho ensayo, podría estar activando fibras de paso pertenecientes

a la proyección TeO-lpc, lo cual impide una identificación certera de las neuronas ShC proyectando sobre el núcleo lmc. Por otra parte, al no existir un trazado anatómico de dichas neuronas, no es posible determinar si la célula identificada por este método corresponde a una población de proyección única sobre lmc, o a otra sub-población que pudiese proyectar a los núcleos lmc e lpc, como las neuronas descritas en el presente trabajo.

Por otra parte, registros extracelulares *in vivo*, han mostrado que lmc presenta campos receptivos diagonales y alargados, en los cuales se registra actividad de alta frecuencia en conjunto a respuestas en ráfagas discontinuas, mientras que en lpc se observan campos circulares más pequeños que exhiben exclusivamente respuestas en ráfagas de frecuencia gamma (Marín y col., 2007, 2012). Este perfil de respuestas, podría estar sustentado por la presencia de dos poblaciones tectales: la primera con proyección exclusiva sobre el núcleo lmc, responsable de la actividad de alta frecuencia observada en este núcleo; mientras una segunda población de neuronas que proyectan a ambos núcleos, sería la responsable de la respuestas en ráfagas observadas. Esta hipótesis estaría en concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde fue posible identificar neuronas ShC que proyectan tanto a ambos núcleos, mediante colaterales axónicas, como neuronas que proyectan de manera segregada a lmc, y presumiblemente también a lpc.

A pesar que en el presente trabajo no se pudo determinar si la proyección sobre el núcleo SLu corresponde a neuronas del tipo ShC, que

proyectan de manera exclusiva a este núcleo o en conjunto con otro núcleo del complejo, experimentos electrofisiológicos sí sugieren también la existencia de una aferencia tectal común para el núcleo lpc y SLu. Esto debido a que registros simultáneos *in vivo* en lpc y SLu, muestran una alta sincronía, con un desfase cercano a cero, en las respuestas visuales evocadas en ambos núcleos frente a un estímulo visual (Marín y col., 2012). Sin embargo, es necesario determinar si existe conexión entre las propias neuronas ShC, eléctrica o sináptica, la cual también podría estar dando cuenta de dicha sincronía.

4.3 Identidad neuroquímica de las neuronas ShC.

Las proyecciones tectales sobre el complejo del istmo se han considerado glutamatérgicas debido a la inmuno-reactividad para el transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2) que presentan los terminales axónicos que terminan en los tres núcleos istmales (paloma: Atoji, 2011; pollo: Reyes, 2014). Experimentos *in vivo* en palomas, han mostrado que ante el bloqueo de receptores de glutamato, mediante la aplicación local de CNQX en los núcleos lpc, lmc y SLu (Marín y col, 2007, 2012), las respuestas visuales de estos núcleos se ve suprimida, sugiriendo una aferencia tectal del tipo glutamatérgico. Estos resultados han sido confirmados en ensayos *in vitro*, en rebanadas de mesencéfalo de pollo, donde se muestra que al bloquear receptores del tipo AMPA en lpc (Goddard y col., 2012) ocurre una supresión de la actividad del núcleo al estimular los terminales retinianos. Sin embargo, la expresión de RNAs mensajeros codificantes para marcadores neuroquímicos

en las capas tectales no había sido examinada hasta el presente trabajo. Por lo tanto, elegimos tres marcadores moleculares para abarcar los fenotipos neuroquímicos glutamatérgicos (VGluT2), colinérgicos (VACHT) y GABAérgicos (VIAAT). La prominente marca de VGluT2 encontrada en la capa tectal 10 refuerza la identidad glutamatérgica para las neuronas tectales que proyectan al complejo istmal. Además, se encontró una intensa marca de VIAAT, mostrando la existencia de neuronas GABAérgicas en esta misma capa. Evidencia previa había mostrado immuno-reactividad contra la proteína parvo-albúmina, marcador putativo de neuronas inhibitorias, restringida a la parte superior de la capa 10 (10a) (Goddard y col., 2012). Nuestros resultados sugieren una mayor densidad de marca del RNA mensajero para el transportador de GABA (VIAAT) en la capa tectal 10a parte de las cuales podrían corresponder a estas neuronas parvoalbúmina positivas. Por otra parte, se ha mostrado que las neuronas tectales que proyectan a los núcleos lpc y SLu se encuentran en la capa 10b (Wang y col., 2006), sin embargo la marca encontrada del RNA mensajero para el transportador de glutamato 2 se encuentra en toda la capa tectal 10, sugiriendo que también existen neuronas glutamatérgicas en la capa 10a que proyectan a otros blancos, por ejemplo el tálamo (Vega-Zuniga y col., 2014). Interesantemente, evidencia reciente sugiere que las neuronas parvoalbumino positiva inhiben a las neuronas de la capa 10b aumentando la actividad en el rango gamma en esta capa (Bryant y col., 2015). Una de las maneras de establecer con mayor precisión el carácter neuroquímico de estas neuronas, es realizando ensayos de hibridación *in situ* en conjunto con el trazado retrógrado

de neuronas ShC marcadas mediante inyecciones en los núcleos del istmo. De esta manera, sería posible comprobar si las neuronas que proyectan al complejo son exclusivamente glutamatérgicas, además de determinar si existen poblaciones neuronales con fenotipos neuroquímicos distintos, las cuales pudiesen estar proyectando de manera segregada, o no, a los distintos componentes del complejo del istmo.

4.4 Importancia anatómica

El circuito tecto-istmal, corresponde un importante modelo de entendimiento de procesos de selección de estímulos y atención. Diversos estudios han intentado construir modelos que apuntan a estudiar sus propiedades (Shao y col., 2009; Lai y col., 2011; Mysore & Knudsen, 2012, 2014). En este sentido, es fundamental comprender y determinar, las características morfológicas y funcionales además de la conectividad precisa de los componentes de este circuito. La única aferencia tectal hacia los núcleos del complejo, corresponden a las neuronas de la capa tectal 10, reconocidas como *Shepherd's Crook* para el caso de lpc e lmc (Wang y col., 2006; Figura 7). Este trabajo ha dado importantes antecedentes, mostrando un tipo neuronal que proyecta a ambos núcleos lmc e lpc, a diferencia de lo que se había establecido en los trabajos más recientes (Goddard y col., 2012, 2014).

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo mostró la existencia de distintas poblaciones de neuronas tectales del tipo *Shepherd's Crook* (ShC) que proyectan al complejo del istmo. Por una parte, se mostró la existencia de una población de neuronas ShC que proyectan al núcleo lmc e lpc mediante colaterales axónicas, mientras poblaciones adicionales de neuronas ShC proyectarían de manera segregada a estos núcleos.

Además, se evidenció la expresión de los RNA mensajeros para los marcadores VIAAT y VGluT2, lo cual muestra la existencia de poblaciones neuronales GABAérgicas y glutamatérgicas, la última de las cuales sería responsable de la proyección tecto-istmal.

Estos resultados permitirán refinar los modelos destinados a describir el funcionamiento del circuito tecto-istmal, que ha adquirido una significativa relevancia para explicar procesos de selección de estímulos y atención espacial en diversas especies de vertebrados.

6. BIBLIOGRAFIA

Atoji Y. (2011). Immunohistochemical localization of vesicular glutamate Transporter 2 (vGluT2) in the Central Nervous System of the Pigeon (*Columba livia*). J Comp Neurol. 519:2887-2905

Benowitz, LI, Karten HJ. 1976. Organization of the tectofugal visual pathway in the pigeon: a retrograde transport study, J Comp Neurol 167, 503-520.

Bischof HJ, Watanabe S. 1997. On the structure and function of the tectofugal visual pathway in laterally eyed birds. Eur J Morphol 35:246-254.

Britto LRG, Torrao AS, Hamassaki-Britto DE, Mpodozis J, Keyser KT, Lindstrom JM, Karten HJ. 1994. Effects of Retinal Lesions Upon the Distribution of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Chick Visual System. J Comp Neurol 350:473-484.

Bryant AS, Goddard A, Huguenard JR, Knudsen EI. 2015. Cholinergic Control of Gamma Power in the Midbrain Spatial Attention Network. J Neurosci 35(2):761-775.

Cowan WM, Adamson L, Powell TPS. 1961. An experimental study of the avian visual system. J Anat 95(4):545-563.

Desimone R, Duncan J. 1995. Neural mechanisms of selective visual attention. Annu Rev Neurosci 18:193-222.

Diamond IT, Fitzpatrick D, Conley M. 1992. A projection from the parabigeminal nucleus to the pulvinar nucleus in Galago. J Comp Neurol 316:375-382.

Domenici L, Waldvogel HJ, Matute C, Streit P. 1988. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the pigeon brain. Neuroscience 25:931-950.

Domesick VB, Morest DK. 1977. Migration and differentiation of Shepherd's Crook cells in the optic tectum of the chick embryo. Neurosci 2:477-491.

Goddard A, Sridharan D, Huguenard JR, Knudsen EI. 2012. Gamma Oscillations Are Generated Locally in an Attention-Related Midbrain Network. Neuron 73:567-580.

Goddard A, Huguenard JR, Knudsen EI. 2014. Parallel Midbrain Microcircuits Perform Independent Temporal Transformations. *J Neurosci* 34(24):8130-8138.

Gonzalez-Cabrera C. 2014. Caracterización Neuroquímica y Sináptica del circuito istmo-tectal en la vía Tectofugal de Aves. Tesis doctoral. Universidad de Chile

Güntürkün O, Remy, M. 1990. The topographical projection of the nucleus isthmi pars parvocellularis (Ipc) onto the tectum opticum in the pigeon. *Neurosci Lett* 111:18-22.

Hellmann, B, Güntürkün, O. 2001. Structural organization of parallel information processing within the tectofugal visual system of the pigeon. *J Comp Neurol* 429:94-112.

Hunt, SP, Webster, KE. 1975. The projection of the retina upon the optic tectum of the pigeon. *J Comp Neurol* 162:433-446.

Hunt SP, Künzle H. 1976. Observations on the Projections and Intrinsic Organization of the Pigeon Optic Tectum: An Autoradiographic Study Based on Anterograde and Retrograde, Axonal and Dendritic Flow. *J Comp Neur* 170: 153-172.

Hunt, SP, Streit, P, Künzle, H, Cuénod, M. 1977. Characterization of the pigeon isthmo-tectal pathway by selective uptake and retrograde movement of radioactive compounds and by Golgi-like horseradish peroxidase labeling. *Brain Res* 129:197-212.

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

Karten HJ (1979) Visual lemniscal pathways in birds. In: Neural mechanisms of behavior in the pigeon (Granda AM, Maxwell JH, eds), pp 409– 430. New York: Plenum.

Karten HJ, Shimizu T. 1989. The origins of neocortex: connections and lamination as distinct events in evolution. *J Cognit Neurosci* 1:290–301.

Karten HJ, 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.

Knudsen EI. 2011. Control from below: the role of a midbrain network in spatial attention. *Eur J Neurosci* 33(11): 1961-1972.

Lai D, Brandt S, Luksch H, Wessel R. 2011. Recurrent Antitopographic Inhibition Mediates Competitive Stimulus Selection in an Attention Network. *J Neurophys* 105: 793–805.

Marín G, Letelier JC, Henny P, Sentis E, Farfán G, Fredes F, Pohl N, Karten H, Mpodozis J. 2003. Spatial organization of the pigeon tectorotundal pathway: an interdigitating topographic arrangement. *J Comp Neurol* 458:361-380.

Marín, G, Mpodozis, J, Sentis, E, Ossandon, T, Letelier, JC. 2005. Oscillatory bursts in the optic tectum of birds represent re-entrant signals from the nucleus *isthmi pars parvocellularis*. *J Neurosci* 25:7081-7089.

Marín G, Salas, C, Sentis, E, Rojas, X, Letelier, JC, Mpodozis, J. 2007. A cholinergic gating mechanism controlled by competitive interactions in the optic tectum of the pigeon. *J Neurosci* 27:8112-21.

Marín G, Duran 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.

Maunsell HJR, Cook EP. 2002. The role of attention in visual processing. *Phil Trans R Soc Lond B* 357:1063–1072.

Mysore SP, Knudsen EI. 2012. The role of a midbrain network in competitive stimulus selection. *Curr Op Neu* 21:653–660.

Mysore SP, Knudsen EI. 2014. Descending Control of Neural Bias and Selectivity in a Spatial Attention Network: Rules and Mechanisms. *Neuron* 84: 214–226.

Nauta WJH, Karten HJ (1970) A general profile of the vertebrate brain, with sidelights on the ancestry of cerebral cortex. In: *The neurosciences: second study program* (Schmitt FO, ed). New York: Rockefeller.

Nguyen AP, Spetch ML, Crowder NA, Winship IR, Hurd PL, Wylie DR. 2004. Adissociation of motion and spatial-pattern vision in the avian telencephalon: implications for the evolution of "visual streams". *J Neurosci* 24:4962-4970.

Ramón y Cajal S. 1911. *Histology of the nervous system of man and vertebrates*. Translated from Spanish to French by L. Azoulay, from the French to English by N. Swanson and L.W. Swanson 1995. New York, Oxford University Press.

- Reperant J, Angaut P. 1977. The retinotectal projections in the pigeon. An experimental optical and electron microscope study. *Neuroscience* 2:119-140. 119.
- Reyes R. 2014. Desarrollo del fenotipo neuroquímico y de la morfología de los terminales axónicos del núcleo *Isthmi pars parvocellularis* (Ipc) en *Gallus gallus*. Tesis magíster. Universidad de Chile.
- Sereno MI, Ulinski PS. 1987. Caudal topographic nucleus isthmi and the rostral nontopographic nucleus isthmi in the turtle, *Pseudemys scripta*. *J Comp Neurol* 261:319-346.
- Shao J, Lai D, Meyer U, Luksch H, Wessel Ralf. 2009. Generating oscillatory burst from a network of regular spiking neurons without inhibition. *J Comput Neurosci* 27(3):591-606.
- Sherk H. 1979a. A comparison of visual-response properties in cat's parabigeminal nucleus and superior colliculus. *J Neurophysiol* 42:1640-1655.
- Sherk H. 1979b. Connections and visual-field mapping in cat's tecto parabigeminal circuit. *J Neurophysiol* 42:1656-1668.
- Shipp S. 2004. The brain circuitry of attention. *T Cog Sci* 8(5):223-230.
- Sorenson EM, Parkinson D, Dahl JL, Chiappinelli VA. 1989. Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the chicken mesencephalon. *J Comp Neurol* 281(4):641-47.
- Sridharan D, Boahen K, Knudsen EI. 2011. Space coding by gamma oscillations in the barn owl optic tectum. *J Neurophysiol* 105: 2005–2017.
- Sridharan D, Schwarz JS, Knudsen EI. 2014. Selective attention in birds. 24(11): 510-513.
- Sridharan D, Knudsen EI. 2015. Gamma oscillations in the midbrain spatial attention network: linking circuits to function. *Curr Op Neur* 31:189-198.
- Sun Z, Wang HB, Laverghetta A, Yamamoto K, Reiner A. 2005. The distribution and cellular localization of glutamic acid decarboxylase-65 (GAD65) mRNA in the forebrain and midbrain of domestic chick. *J Chem Neuroanat* 29:265-281.
- Treue, S. 2004. Perceptual enhancement of contrast by attention. *Trends Cogn Sci* 8:435-437
- Vega-Zuniga T, Mpodozis J, Karten HJ, Marín G, Hain S, Luksch H. (2014). Morphology, Projection Pattern, and Neurochemical Identity of Cajal's

"Centrifugal Neurons": The Cells of Origin of the Tectoventretegeniculate Pathway in Pigeon (*Columba livia*) and Chicken (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol* 522:2377-2396.

Wang YC, Frost BJ. 1991. Visual response characteristics of neurons in the nucleus isthmi magnocellularis and nucleus isthmi parvocellularis of pigeons. *Exp Brain Res* 87:624-633.

Wang Y, Major DE, Karten HJ. 2004. Morphology and connections of nucleus isthmi pars magnocellularis in chicks (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol* 469:275-297.

Wang Y, Luksch H, Brecha NC, Karten HJ. 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.

Wu GY, Wang SR, Felix D. 1994. Effect of acetylcholine and NMDA on neurones of avian tectum and nucleus isthmi. *Neuro Rep* 5:850-852.

Yan J, Li X, Wang S-R. 2002. Receptive field organization and response properties of visual neurons in the pigeon nucleus semilunaris. *Neurosci Lett* 331:179-182.