

UCH-FC
Doc-BMCN
F 363
C. 1

**ORGANIZACIÓN INTRATELENCEFÁLICA DE LAS
PROYECCIONES VISUALES COLOTALÁMICAS EN
AVES**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular Y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Máximo Darío Fernández Villafaña

Diciembre, 2016

Director de Tesis: Dr. Jorge Mpodozis Marín



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

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

Máximo Darío Fernández Villafaña

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 21 de Septiembre de 2016.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga (Presidente)

Dr. Osvaldo Álvarez

Dr. Juan Carlos Letelier

Dr. Pablo Henny



.....
.....
.....
.....
.....
.....

A las aves sacrificadas en el desarrollo de este trabajo. Esto no es una dedicatoria, es una declaración de mi responsabilidad.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis padres, Ángela y Juan Emilio por su cariño y amor honesto, a mis hermanos, Nicolás y Felipe por su compañerismo único, a mi hija Rafaela, por ser luz incombustible.

A Jorge Mpodozis por ser un maestro y guía en este camino, por su compromiso intelectual incansable. A Gonzalo Marín por su aporte desinteresado y por imprimir una visión crítica a mi laxitud.

A Elisa, Miccaella, Sara y Alfonso, por ayudar y participar directamente en la realización de este trabajo, ellos son verdaderos coautores. A Solano por su ayuda técnica permanente.

Finalmente quisiera agradecer a todos los integrantes del laboratorio de biología y neurobiología del conocer que propician y propiciaron un ambiente de discusión crítica, de este trabajo y de cualquier idea científica o filosófica, eso es un verdadero crisol, un Rayo mundial.

ÍNDICE DE MATERIAS

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
Plasticidad conductual en mamíferos y aves	1
Anatomía del telencéfalo amniota	5
Breve revisión de la organización del palio de aves y mamíferos	10
Una nueva comprensión de la organización del DVR aviano ...	16
El sistema visual tectofugal de aves	19
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
Objetivos Generales	27
Objetivos específicos	28
CAPÍTULO 2	30
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Animales	30
Procedimientos anatómicos	31
Preparación de rebanadas vitales	31
Inyecciones extracelular <i>in vitro</i> y procedimientos histológicos	32
Inyecciones intracelular <i>in vitro</i> y procedimientos histológicos	34
Inyecciones extracelulares <i>in vivo</i>	36
Procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos	38
Procedimientos fisiológicos	41
Registros <i>in vivo</i>	42

Estimulación eléctrica	45
Estimulación visual	46
Registro y análisis de las imágenes	46
Reconstrucción de neuronas	47
CAPÍTULO 3	48
ORGANIZACIÓN INTERNA DEL COLOPALIO VISUAL.	48
INTRODUCCIÓN.....	48
RESULTADOS.....	51
Caracterización de las proyecciones interlaminares y elementos neuronales de E.	51
Caracterización de las proyecciones interlaminares y elementos neuronales de Ni.	63
Caracterización de las proyecciones interlaminares y elementos neuronales de M.	69
DISCUSIÓN.....	77
Laminación, columnaridad, recurrencia y modularidad del colopalio	82
Comparación con mamíferos	86
CAPÍTULO 4	91
REFERENCIAS DEL COLOPALIO VISUAL.	91
INTRODUCCIÓN.....	91
RESULTADOS.....	94
Revisión de la organización interna del colopalio visual en palomas.	94
Localización de las neuronas eferentes en el colopalio visual.	98
Blancos telencefálicos del colopalio visual.	99

Organización topográfica de la proyección eferente del coloplio visual.	122
Reciprocidad de la proyección entre el coloplio y sus blancos.	130
Distintas poblaciones celulares en Ni.	134
DISCUSIÓN	136
Laminación, columnaridad, recurrencia y modularidad del coloplio.	144
Comparación con mamíferos.	145
CAPÍTULO 5	148
AFERENCIAS TALÁMICAS DEL COLOPALIO VISUAL Y ÁREAS SECUNDARIAS ASOCIADAS.	148
INTRODUCCIÓN	148
RESULTADOS	151
Entoplio y Nidoplio intermedio son aferentados por distintos núcleos del tálamo dorsal.	151
Células Ni proyectantes reciben aferencias sensoriales menores.	160
Células Ni proyectantes y su relación con áreas paliales de segundo orden.	166
Neuronas de primer orden motor en el tálamo aviano.	172
DISCUSIÓN	175
Carácter sensorial o modulador de las neuronas de la matriz perisensorial.	177
Laminación, columnaridad, recurrencia y modularidad del coloplio visual.	180
Comparación con mamíferos.	181
Tálamo motor aviano y su equivalencia con mamíferos.	183

CAPÍTULO 6	185
CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL COLOPALIO VISUAL.	185
INTRODUCCIÓN.....	185
RESULTADOS.....	188
Actividad visualmente evocada en el colopalio visual.	189
Dinámica sináptica del colopalio visual.	199
Columnaridad en el colopalio visual.	209
DISCUSIÓN.....	217
Modularidad, laminación, recurrencia y columnaridad.....	217
Comparación con trabajos previos en aves y mamíferos.....	221
CAPÍTULO 7	227
DISCUSION GENERAL	227
Resumen de los principales resultados y su relación con la hipótesis de trabajo.....	228
Interpretación de la organización general del palio aviano, comparación con la corteza de mamíferos.....	234
El palio de vertebrados, elaboración independiente.....	242
El problema de las equivalencias paliales.....	249
CAPÍTULO 8	258
CONCLUSIONES	258
REFERENCIAS	259
APÉNDICE	276
Figuras complementarias	276

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Principales estructuras del cerebro amniota.....	8
Figura 1-2. Principales estructuras del palio de aves y mamíferos.....	9
Figura 1-3. Citoarquitectura y organización de la corteza de mamíferos	15
Figura 1-4. Organización del DVR auditivo.....	18
Figura 1-5. Organización de la vía tectofugal en aves.....	24
Figura 1-6. Organización del coloplio visual en aves.....	25
Figura 3-1. Eferencias entopaliales intralaminares.....	53
Figura 3-2. Eferencias entopaliales al subpalio.....	54
Figura 3-3. Neuronas entopaliales tipo I.....	57
Figura 3-4. Neuronas entopaliales tipo II.....	60
Figura 3-5. Fotografías de neuronas entopaliales.....	61
Figura 3-6. Conectividad intracircuito de la lámina intermedia Ni....	65
Figura 3-7. Subtipo neuronal de Ni.....	67
Figura 3-8. Neuronas llenadas intracelularmente en Ni.....	68
Figura 3-9. Proyecciones mesopaliales interlaminaeres.....	70
Figura 3-10. Neurona mesopaliaal con axón columnar.....	74
Figura 3-11. Morfología de neuronas mesopaliales.....	75
Figura 3-12. Morfología de neuronas de MVin.....	76
Figura 3-13. Resumen de las proyecciones interlaminares del coloplio visual.....	85
Figura 3-14. Morfologías de células estelares lámina 4 de corteza de mamíferos.....	89
Figura 3-15. Morfologías de células estelares en láminas 2/3 de mamíferos.....	90

Figura 4-1. Organización laminar y columnar del coloplio visual en paloma.....	96
Figura 4-2. Segregación de aferencias talámicas y células eferentes en el coloplio visual.....	103
Figura 4-3. Eferencias del coloplio visual I.....	106
Figura 4-4. Eferencias del coloplio visual II.....	109
Figura 4-5. Reconstrucciones de inyecciones complementarias en NFL y NIL.....	113
Figura 4-6. Reconstrucciones de inyecciones complementarias en NCL y Arc.....	117
Figura 4-7. Inyección complementaria en LSt.....	118
Figura 4-8. Eferencias del coloplio visual III.....	119
Figura 4-9. Eferencias del coloplio visual IV.....	120
Figura 4-10. Topografía rostro caudal de la proyección hacia NCL....	123
Figura 4-11. Topografía medio lateral de la proyección hacia NCL....	126
Figura 4-12. Topografía medio lateral de la proyección hacia NFL....	127
Figura 4-13. Topografía rostro caudal de la proyección desde Ni sobre los blancos caudales.....	128
Figura 4-14. Reciprocidad en la proyección entre el coloplio visual y sus blancos.....	132
Figura 4-15. Proyección desde NFL y NCL hacia el coloplio visual...	133
Figura 4-16. Diferentes tipos celulares en Ni originan la eferencia del coloplio visual.....	135
Figura 4-17. Resumen de la organización de las eferencias coloplio visual.....	143
Figura 5-1. Aferencias talámicas del coloplio visual I.....	154
Figura 5-2. Aferencias talámica del coloplio visual II.....	155

Figura 5-3. Aferencias talámicas del coloplio visual, inyección complementaria en Ni.....	158
Figura 5-4. Aferencias talámicas del coloplio visual, inyección complementaria en E.....	159
Figura 5-5. Células Ni proyectantes reciben aferencias tectales débiles	163
Figura 5-6. Axones tectales aferentan levemente los núcleos Ni proyectante spRt y sRt.....	165
Figura 5-7. Núcleos Ni proyectantes aferentan también el NCL.....	168
Figura 5-8. Núcleos Ni proyectantes aferentan también el NFL.....	169
Figura 5-9. Células Ni proyectantes forman parte de un retículo en torno a los núcleos sensoriales primarios del tálamo.....	170
Figura 5-10. Células NCL y NFL proyectantes se entremezclan en el reticulado.....	171
Figura 5-11. Núcleos Ni proyectantes están conectados con el Arcoplio	173
Figura 5-12. Núcleos Ni proyectantes reciben aferencias del Arcoplio	174
Figura 5-13. Esquema de las proyecciones entre el tálamo dorsal y el coloplio visual y palio de segundo orden.....	179
Figura 6-1. Orientación del electrodo utilizado para los registros en el coloplio visual.....	192
Figura 6-2. Respuesta neuronal visualmente evocada en el coloplio visual.....	195
Figura 6-3. Reconstrucción estereológica de la posición de los sitios de registros en el coloplio visual.....	196

Figura 6-4. Actividad neuronal visualmente evocada a lo largo del coloplio visual.....	197
Figura 6-5. Aumento de actividad neuronal visualmente evocado es estadísticamente significativo.....	198
Figura 6-6. Potenciales de campo a lo largo del coloplio visual, evocados eléctricamente desde E.....	202
Figura 6-7. Mapas de densidad de corriente del coloplio visual.....	203
Figura 6-8. Mapas de densidades de corriente a lo largo del coloplio visual.....	206
Figura 6-9. Mapa de densidad de corriente elaborado usando actividad espontánea característica del coloplio visual.....	207
Figura 6-10. Mapa de densidad de corriente evocado visualmente.....	208
Figura 6-11. Respuesta Mesopalial característica evocada por estimulación eléctrica en E.....	210
Figura 6-12. Gráficos de raster de la respuesta mesopalial evocada eléctricamente y la histología mostrando la posición de los electrodos	211
Figura 6-13. Curvas de activación para cada sitio de registro en M..	212
Figura 6-14. Actividad multiunitaria de coloplio visual.....	215
Figura 6-15. Análisis de correlación de la actividad colopalial en la columna y fuera de esta.....	216
Figura 7-1. Esquema general de la organización del palio aviano.....	241
Figura 7-2. Organización telencefálica de algunas especies de vertebrados.....	248
Figura 7-3. Esquema representativo de las divisiones paliales y sus derivados en el palio de tetrápodos.....	256
Figura 7-4. Esquema propositivo del desarrollo del palio aviano.....	257

Figura 1 anexo. Distribución de axones de neuronas entopaliales en el coloplio visual.....276

Figura 2 anexo. Histograma polar de tres casos de neuronas tipo I y II277

Figura 3 anexo. Inyecciones de trazadores de los casos Rt/NCL/M y Rt/NCL del capítulo 4.....278

Figura 4 anexo. Localización cortical de neuronas estriado proyectante279

Figura 5 anexo. Inyección en arcoplio central.....280

Figura 6 anexo. Inmunoreactividad GABAérgica en la zona dorsal talámica281

LISTA DE TABLAS

Tabla 3-1. Resumen de casos de neuronas entopaliales llenadas intracelularmente en rebanadas.....	56
Tabla 3-2. Resumen de casos de neuronas en Ni llenadas intracelularmente en rebanadas.....	66
Tabla 3-3. Resumen de casos de neuronas mesopaliales llenadas intracelularmente en rebanadas.....	73
Tabla 4-1. Resumen de casos de inyecciones usadas en este capítulo..	101
Tabla 5-1. Resumen de casos de inyecciones usadas en este capítulo..	152
Tabla 6-1. Resumen de casos de los experimentos de registro.....	191

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Núcleo Acumbens
Arc	Arcopallio
Bas	Basorrostralis (pallio somatosensorial)
BDA	Biotinilated Dextran Amina
BNST	Bed núcleo de la estria terminal
CDL	Área Cortico-Dorsolateral
CTB	Cholero Toxina Botulínica
CB	Cerebelo
Cl	Claustro
CSD	Current Source Density
CSP	Prosencéfalo Secundario Caudal
DIP	Núcleo Dorsointermedio Posterior del tálamo
DIVA	Núcleo Dorsointermedio Ventral anterior del tálamo
DLA	Núcleo Dorsolateral Anterior del tálamo
DLL	Núcleo Dorsolateral Anterior pars lateral
DLM	Núcleo Dorsolateral Medial del tálamo
DLP	Núcleo Dorsolateral Posterior del tálamo dorsal
DMA	Núcleo Dorsomedial Anterior del tálamo
DMP	Núcleo Dorsomedial Posterior del tálamo
DVR	<i>Dorsal Ventricular Ridge</i>
E	Entopallio
Ec	Entopallio interno o central
Ed	Entopallio dorsal
Ep	Entopallio periférico o <i>belt</i>
Ev	Entopallio ventral
FPL	Fascículo Proencefálico Lateral
GLd	Núcleo Geniculado latero dorsal

GP Globo Pálido
 H Hiperpalio
 Hb Habénula
 HA Hiperpalio Apical
 HI Hiperpalio Intercalatum
 HD Hiperpalio Densocelular
 HP Hipocampo
 IHA Núcleo intersticial de HA
 L Field L (palio auditivo)
 L2/3 Lámina cortical 2/3
 L4 Lámina cortical 4
 L5 Lámina cortical 5
 L6 Lámina cortical 6
 L1,2a,3 Láminas del DVR auditivo de aves
 LM Núcleo Lentiforme Mesencefálico
 Lst Estriado lateral del subpalio
 M Mesopalio
 MD Mesopalio dorsal
 MV Mesopalio ventral
 Mvl Mesopalio ventrolateral
 MVex Mesopalio visual externo
 Mvin Mesopalio visual interno
 Mst Estriado medial
 NCC Nidopalio Caudo Central
 NCL Nidopalio Caudal Lateral
 NCM Nidopalio Caudal Medial
 NFL Nidopalio Frontal Lateral
 Ni Nidopalio Intermedio
 NiDlp Nidopalio aferentado por DLP

NIL Nidopalio Intermedio Lateral
NIM Nidopalio Intermedio Medial
Ov Núcleo ovoidalis del tálamo
P1-3 Prosómeros 1 al 3
PHA-L Phaseolus vulgaris leucoagglutinin
Pir Corteza piriforme
QF Tracto Quinto Frontalis
R1-11 Rombómeros 1 al 11
RSP Prosencéfalo secundario rostral
Rt Núcleo rotundo del tálamo dorsal
S Septum
SpC Médula espinal
SPC Núcleo Spiriformis Parvocelular del tálamo
SpRt Núcleo Suprarotundo del tálamo
sRt Núcleo Subrotundo del tálamo
SL Septum lateral
Tel Telencéfalo
TeO Tectum óptico
TGC Célula ganglionar tectal
TPO Área Tempo-Parieto-Occipital
TrO Tracto Óptico
TT Tracto Tectotalámico
VP Pálido Ventral
W Wulst

RESUMEN

En aves y mamíferos el telencéfalo se encuentra más desarrollado, en tamaño y elaboración, que en cualquier otra clase de vertebrado. Su porción dorsal, el palio, ha sido clásicamente considerada como la estructura responsable del alto grado de plasticidad conductual de estos vertebrados. En mamíferos se ha estudiado con atención y detalle la estructura y los mecanismos operacionales del palio. En este, la corteza es la estructura que recibe la mayoría de las aferencias talámicas sensoriales. Además, la corteza presenta una organización única entre los vertebrados, caracterizada por tener una laminación en 6 estratos celulares especializados funcionalmente y por establecer elaborados circuitos internos, que resultan en columnas anatómicas y funcionales.

En aves, las regiones paliales que reciben las aferencias sensoriales desde el tálamo no han sido estudiadas con tanto detalle como en mamíferos. Recientemente, algunos estudios han intentado una descripción detallada de una región llamada Dorsal Ventricular Ridge (DVR) la cual recibe aferencias sensoriales talámicas equivalentes a algunas de las encontradas en la corteza de mamíferos (Wang y col., 2010; Ahumada-Galleguillos 2015). Estos estudios han mostrado que en el DVR sensorial de aves existe una organización que podría asemejarse a la corteza de mamíferos, con

tipos celulares estratificados en 3 láminas principales. En el estrato ventral se encuentra el nidopallio tálamo recipiente, sobre éste, el nidopallio intermedio y dorsalmente, el mesopallio. Además, se ha descrito que las neuronas de las tres láminas establecen proyecciones radiales semejantes a las columnas anatómicas de mamíferos. Este hallazgo es relevante para el entendimiento de las operaciones paliales de aves, así como también para el entendimiento de la evolución del telencéfalo de vertebrados y su rol en la realización de conductas plásticas como la sociabilidad y el lenguaje.

En este trabajo realizamos un estudio detallado de la estructura y función del DVR visual de aves, con el foco puesto en establecer en qué medida esta estructura presenta rasgos fundamentales de la organización cortical de mamíferos tales como la modularidad, laminación, columnaridad y recurrencia en sus circuitos locales.

Para hacer esto en primer lugar estudiamos la estructura fina del circuito interno del colopallio visual en rebanadas de telencéfalo de pollos (*Gallus gallus*). Con esto obtuvimos una visión detallada de las principales morfologías de las neuronas que participan en este circuito, encontrando que cada lámina presenta tipos celulares específicos cuyos axones se disponen mayoritariamente de manera radial, estableciendo columnas anatómicas entre las distintas láminas.

En segundo lugar estudiamos en palomas (*Columba livia*) la organización de las proyecciones entre el colopalio visual y otras áreas del telencéfalo encontrando proyecciones hacia cuatro áreas paliales (NFL, NIL, TPO/NCL y Arc) y una subpialial (LSt). Además, demostramos que esta proyección se origina en una población de neuronas especializadas y distribuidas específicamente en una de sus láminas, el nidopalio intermedio. Por último, encontramos que esta proyección se organiza topográficamente y que la lámina eferente recibe proyecciones reciproca al menos desde las áreas NFL y NCL.

En tercer lugar, estudiamos en palomas las aferencias talámicas del colopalio visual. Al hacer esto encontramos una estratificación de la proyección talámica sobre distintas láminas del colopalio visual; una proyección primaria sobre la lámina ventral (Entopalio) y una secundaria aferentando la lámina intermedia (Nidopalio intermedio, especializada en generar las eferencias). También observamos que esta proyección termina sobre áreas paliales de segundo orden y que presenta rasgos evidentes de una proyección tálamo-pialial moduladora.

En cuarto lugar, realizamos un estudio de las operaciones fisiológicas del colopalio visual mediante registros de actividad evocada visualmente a lo largo de las distintas láminas en forma simultánea. También estudiamos mediante mapas de densidades de corriente la dinámica sináptica del colopalio y mediante registros

multiunitarios la columnaridad del circuito. Al hacer esto encontramos evidencia fisiológica que soporta la idea de una organización y operación del DVR visual como un área trilaminar, columnar y recurrente.

Finalmente, al reconocer los rasgos elementales de la organización del palio aviano y compararlos con los descritos para mamíferos y reptiles encontramos seis aspectos centrales de la organización del palio amniota (reptiles, aves y mamíferos) que parecen haber evolucionado en la rama de vertebrados que les dio origen. Esto se propone ya que aquellos rasgos no pueden ser trazados como heredados directamente desde otra rama de vertebrados. Toda esta evidencia en su conjunto apoya fuertemente la hipótesis que propone que el palio de aves y el palio de mamíferos guardan, en sus aspectos operacionales y estructurales, una relación homológica, y no convergente.

ABSTRACT

In mammals and birds the telencephalon is the largest structure of the brain. Its dorsal territory the pallium, has long been regarded as the neural substrate underlying the outstanding behavioral plasticity observed in these amniotes. Notwithstanding this purported functional equivalence, the evolutionary relationship between the avian and mammalian pallia remains controversial and, at present, it is the focus of an active debate.

The neocortex is the largest and most developed division in the mammalian pallium. It is organized in different functional areas, defined mainly by differential thalamic afferents. Most of these areas are composed of six layers, whose neuronal elements embody stereotypical connections that can be summarized as: radial and recurrent between layers from the same area, forming columnar and recurrent local circuits; horizontal between areas; and extracortical to other brain divisions. Thalamic innervation of sensory areas arises from primary or driver nuclei in the dorsal thalamus, and terminate predominantly onto layer 4. However, high order or modulatory thalamic nuclei also innervate the cortex, contacting superficial layers 2/3.

The avian pallium receives ascending thalamic afferents from pathways homologous to those described in mammals. These thalamic

fibers also define singular areas in the pallium, but unlike mammals, the sensory flow through each area has been described as mostly linear. This means that pallial areas lack a layered cytoarchitecture and recurrent circuits within each area. In that way neurons in primary sensory areas send efferents to secondary and tertiary sensory areas, or to motor descending ones.

The sequential nature of the avian pallium has begun to be questioned after the works of Wang et al. (2010) and Ahumada-Galleguillos et al. (2015). These authors described local circuits with a columnar and laminar character within the auditory and tectovisual pallia. According to Ahumada-Galleguillos (2015), the tectovisual pallium is composed of three main stacked layers: the entopallium (E), the ventralmost layer and main recipient of visual thalamic projections from nucleus rotundus; an overlaying nidopallial region called intermediate nidopallium (Ni); and a dorsal mesopallial region (M). In this description was shown that E and M establish columnar projections along the layers possibly involving the Ni as well.

In this thesis I carried out a thorough analysis of the structure and operation of the avian tectovisual pallium, aiming to establish the extent to which avian pallium shares fundamental traits with the mammalian neocortex. Specifically, four dimensions of avian pallial organization were studied: the neuronal elements forming the intrinsic circuitry of the tectovisual pallium; the

organization of efferents from the circuit to other telencephalic areas; the distribution of thalamic afferents into the tectovisual pallium; and the physiology of the intrinsic circuit.

To determine the morphology of the principal neuronal elements of the tectovisual pallium, we reconstructed neurons filled intracellularly in telencephalic slices. We found that each layer (E, Ni and M) possesses particular neuronal morphotypes, whose axons arrange mostly radial or perpendicular to the layers contacting each of them. This arrangement establishes columns of neurons anatomically related. Additionally, these experiments revealed new details of the intrinsic pallial circuitry, stressing the recurrence of the projections as a central feature. Taking this into consideration, we compare the neurons morphologies in the entopallium and Ni/M with those in layer 4 and 2/3 of mammalian cortex, and the organization of both circuits.

In the second part of the study, using classic neurotracing experiments in pigeons, we studied the projections between the tectovisual pallium and other telencephalic areas. In doing that, we found projections to four distinguishable pallial areas (NFL, NIL, NCL, Arc) and to a subpallial one (LSt). We observe that at least some of these projections were originated from different cell populations. Further, it was clear that projecting neurons localize almost exclusively in the Ni, and that these projections are organized topographically. Also, we found that at least of the

areas that receive afferents from the tectovisual pallium (NFL and NCL) send projections back to the Ni. Finally, we conclude that these main traits that we found in the intratelencephalic projection from Ni, resemble those described in the projection from cortical layer 2/3 of mammals.

In third place, we reassessed the distribution of thalamopallial projecting neurons in the thalamus and their terminals in the tectovisual pallium. The main finding was a stratification of the terminals in the pallium, and a corresponding segregation of thalamopallial projecting neurons. In this line, we could distinguish two different pathways: the primary projection from nucleus rotundus thalami to E, and a secondary projection from interstitial thalamic neurons to Ni. We observed that these secondary thalamic neurons receive weak visual sensory afferents, receive descending pallial projections, and in turn project also to associative pallial areas. Those observations led us to propose the secondary projection described here, as an equivalent to the high order thalamopallial pathway of mammals. These results further support our proposition that the Ni could be equivalent to cortical layer 2/3.

Lastly, we explore the physiological operations of the tectovisual pallium in vivo. In first place we recorded the neuronal activity, evoked by moving stimuli, simultaneously through the different layers of the area. This was done in order to identify the visual

nature of the whole area. Additionally, using current source density maps, we identified the spatiotemporal synaptic profile of the local circuit, finding sequences of recurrent events, spatially localized within each layer. Finally, multiunitary recordings evoked by electrical and visual stimuli suggest the existence of a columnar operation of this area.

Given the data summarized here, the tectovisual pallium can be understood as an area that is organized and operates in a laminar, columnar and recurrent way, in the same form as the sensory areas of mammalian cortex do. Moreover, comparing this organization to the pallium of other vertebrates, these traits seem to have evolved independently in the lineage conducting to amniotes, as they are not traceable linearly to other major vertebrate radiation. On the basis of this comparison, we support the hypothesis that avian and mammalian sensory pallia hold a homological relationship, in which the conserved element is an operational form that might underlay the behavioral plasticity present in both taxa.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Plasticidad conductual en mamíferos y aves

Debido a lo difícil que resulta definir qué es una habilidad cognitiva o la inteligencia, es preferible hablar de 'plasticidad conductual'. Esto según algunas descripciones, corresponde a la habilidad de los animales para resolver problemas que ocurren en su ambiente natural y social (Emery & Clayton, 2004; Roth & Dicke, 2005; Roth, 2013). De este modo la plasticidad conductual de tipo humana, puede ser comparada con la plasticidad conductual encontrada en distintas especies animales. El estudio de las conductas que reflejan plasticidad conductual similar a la encontrada en humanos, se ha desarrollado tradicionalmente en especies de mamíferos cercanas -principalmente primates- o en especies de mamíferos que presentan cerebros de gran tamaño.

Al estudiar la neuroanatomía de mamíferos, tempranamente se sugirió a la corteza como el sustrato estructural de la alta plasticidad conductual observada en algunas especies de esta clase. Esta aseveración se basó en observaciones anatómicas que indicaron la ausencia de una estructura palial equivalente a la corteza en el resto de los vertebrados (Smith, 1901).

Aunque antigua, esta asociación entre corteza y plasticidad conductual, continúa teniendo algún asidero y es sustentada por estudios donde se indica que el cerebro de mamíferos excede en tamaño relativo al cerebro del resto de los grandes grupos de vertebrados (Jerison, 1973; van Dongen, 1998; Striedter, 2005). Además, se desprende de estas mediciones que el crecimiento del cerebro mamífero podría ser explicado principalmente por el tamaño fuera de proporción de la corteza y el cerebelo (Stephan y col., 1981; Striedter, 2005; Baron, 2007; Roth, 2013).

La relación entre el tamaño cerebral y la plasticidad conductual se ha debatido en innumerables ocasiones intentando establecer una asociación causal para esta relación (Jerison, 1973; Roth & Dicke, 2005; Chittaka & Niven, 2009). No obstante, ha sido difícil asociar directamente exclusivamente el tamaño del cerebro a la plasticidad conductual. De forma más aceptada se ha indicado que otros aspectos estructurales del cerebro como: la replicación de circuitos neuronales, modularidad, número de neuronas, interconectividad y presencia de regiones integradoras, son rasgos igualmente relevantes y relacionados con el enriquecimiento conductual y su plasticidad (Aboitiz, 1996; Striedter, 2005; Chittka & Niven, 2009; Roth, 2013). Justamente estos rasgos anatómicos se encuentran en la corteza de mamíferos como una firma en su organización.

En relación a la plasticidad conductual aviana, ésta ha sido tradicionalmente desestimada y el uso de aves en estudios conductuales se limitó durante largo tiempo al aprendizaje de tipo asociativo. La supuesta limitación cognitiva de los pájaros se entendía estructuralmente, como la consecuencia de una trayectoria evolutiva que favoreció el desarrollo del telencéfalo con un gran estriado subpalial, visión que predominó hasta los años 70. Sumado esto a la ausencia de una corteza hexalaminada, resultaba un cerebro aviano comprometido en conductas más bien de tipo instintivas (Herrick, 1924; Kappers y col., 1936). Sin embargo, esta visión obviaba el conocimiento vernáculo respecto a las conductas plásticas de algunas aves. Hoy existe una gran cantidad de estudios etológicos que demuestran un alto grado de plasticidad conductual, principalmente en Córvidos y Psitaciformes (Huber y col., 2001; Emery & Clayton, 2004; Gajdon y col., 2004; Auersperg y col., 2012). Estas aves viven en grupos sociales complejos, llevan a cabo largos periodos de crianza de sus polluelos y poseen repertorios vocales muy extensos y plásticos. Los cuervos han sido particularmente estudiados debido su sorprendente habilidad en el uso de herramientas para resolver problemas específicos (Hunt, 1996; Weir y col., 2002; Hunt & Gray, 2004), siendo incluso capaces de usar una herramienta para modificar otra (Taylor y col., 2007), lo cual entre mamíferos se ha observado con mayor claridad sólo en algunos primates no humanos (Hihara y col., 2003; Mulcahy y col., 2005).

La relación entre la plasticidad conductual y estructuras cerebrales en aves, ha sido explorada por estudios que han determinado la razón de encefalización de distintas aves. En estos estudios se ha observado que los tamaños cerebrales y telencefálicos de algunos miembros de la familia *Corvidae*, son mayores a lo esperable de acuerdo a sus tamaños corporales, rivalizando directamente con los valores obtenidos para algunos primates (Jerison, 1973; Rehkamper y col., 1991; Lefebvre y col. 1997, 2002). Además, algunos autores han indicado que las estructuras telencefálicas que dan cuenta de este crecimiento, pertenecen a una región del telencéfalo palial llamada en inglés *dorsal ventricular ridge* (DVR) (Timmermans y col., 2000; Mehlhorn y col., 2010).

Estos antecedentes sugieren que el DVR en aves -como la corteza en mamíferos- podría estar involucrado en el alto grado de plasticidad conductual. Tomando en cuenta la semejanza en este sentido para ambas clases de amniotas y su relación de ancestría, es tentador sugerir que ambas estructuras paliales, pudiesen compartir características estructurales y operacionales. Esto además abre la posibilidad de preguntar si estas estructuras representan un caso de verdadera homología o más bien de convergencia (Striedter & Northcutt, 1991; Faunes & col., 2015).

Aunque ambas regiones -DVR y corteza- se asemejan en su conectividad general con el resto del cerebro, recibiendo

aferencias sensoriales masivas y actuando directamente sobre regiones involucradas en el control motor, la forma de tratar el flujo sensorial descrito clásicamente para el DVR y corteza presentan diferencias fundamentales. No obstante, algunas líneas de evidencia recientes sugieren la presencia de similitudes que no son claramente distinguibles a primera vista (Wang y col., 2010).

Símiles o disímiles en su organización, homólogas o convergentes, ambas estructuras del telencéfalo palial, DVR y corteza, parecen ser centrales en la plasticidad conductual de aves y mamíferos. Esto representa un móvil neurobiológico importante y suficiente, para realizar un estudio detallado y comparado de sus estructuras, principalmente del DVR debido a la escasa información respecto a su organización fina.

Anatomía del telencéfalo amniota

El telencéfalo amniota (reptiles, aves y mamíferos) es una estructura cerebral que se origina como una evaginación de la porción rostral y alar del procencéfalo (la vesícula rostral del tubo neural; **fig. 3-1A y B**) (Buttler & Hodos, 2005; Puelles y col., 2013). En un cerebro amniota adulto, el telencéfalo permanece localizado en el extremo rostral, observándose como la estructura de mayor tamaño y desarrollo (**fig. 3-1C-E**). El telencéfalo se divide funcional y estructuralmente en dos regiones, una dorsal

llamada palio (del latín, manto) y una basal llamada subpalio (Buttler & Hodos, 2005). Estos territorios telencefálicos se desarrollan a partir de primordios dorsales y ventrales del epitelio proliferativo del prosencéfalo. En estadios posteriores del desarrollo ambas porciones son separadas por una empalizada glial llamada límite palio-subpalial o *sulco limitans lateral* (Holmgren, 1925; Striedter y col., 1998; Stenman y col., 2003). El telencéfalo ventral o subpalio se origina principalmente a partir de dos nucleaciones proliferativas llamadas eminencias ganglionares y se compone de varias estructuras entre las que se reconocen principalmente: el complejo estriato-palidal, núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, la amígdala subpalial, algunos grupos de neuronas colinérgicas, el área preóptica y el septum (Puelles y col., 2000, 2013; Buttler & Hodos, 2005; Reiner y col., 1998; Reiner, 2010).

En el epitelio prosencéfalico dorsal se pueden identificar cuatro parcelas progenitoras basándonos en la posición topológica en el tubo neural (medial, dorsal, lateral y ventral) y en la expresión de una combinación de macromoléculas característica. A pesar de que estas cuatro divisiones se encuentran conservadas en amniotas, en cerebros adultos las estructuras que derivan de cada una de ellas, varían tremendamente en su estructura más evidente en las distintas clases (Holmgren, 1925; Striedter, 1997; Puelles y col., 2000). Esta variación va desde un palio en que predominan estructuras hexa- y trilaminadas en mamíferos, hasta un palio

completamente nuclear -a primera vista- en aves, pasando por un palio que contienen ambos tipos de organización en reptiles.

Las principales regiones encontradas en el palio de aves y mamíferos se aprecian en la imagen de la **figura 3-2**. En aves las principales regiones del palio son de medial a lateral: hipocampo, hiperpalio y DVR (formado por dos grandes subregiones llamadas mesopalio y nidopalio) (Buttler & Hodos, 2005). En mamíferos las principales regiones del palio desde medial a lateral son: formación hipocampal (subículo, giro dentado, hipocampo), neocorteza, corteza olfativa y complejo claustró amigdalario (Buttler & Hodos, 2005).

A pesar de las diferencias citoarquitectónicas evidentes entre las estructuras que componen ambos palios, existen bastantes rasgos en la conectividad de estas estructuras con el resto del cerebro que se encuentran conservadas entre aves y mamíferos. A continuación revisamos con mayor detalle algunos aspectos relevantes de la organización del palio de aves y mamíferos.

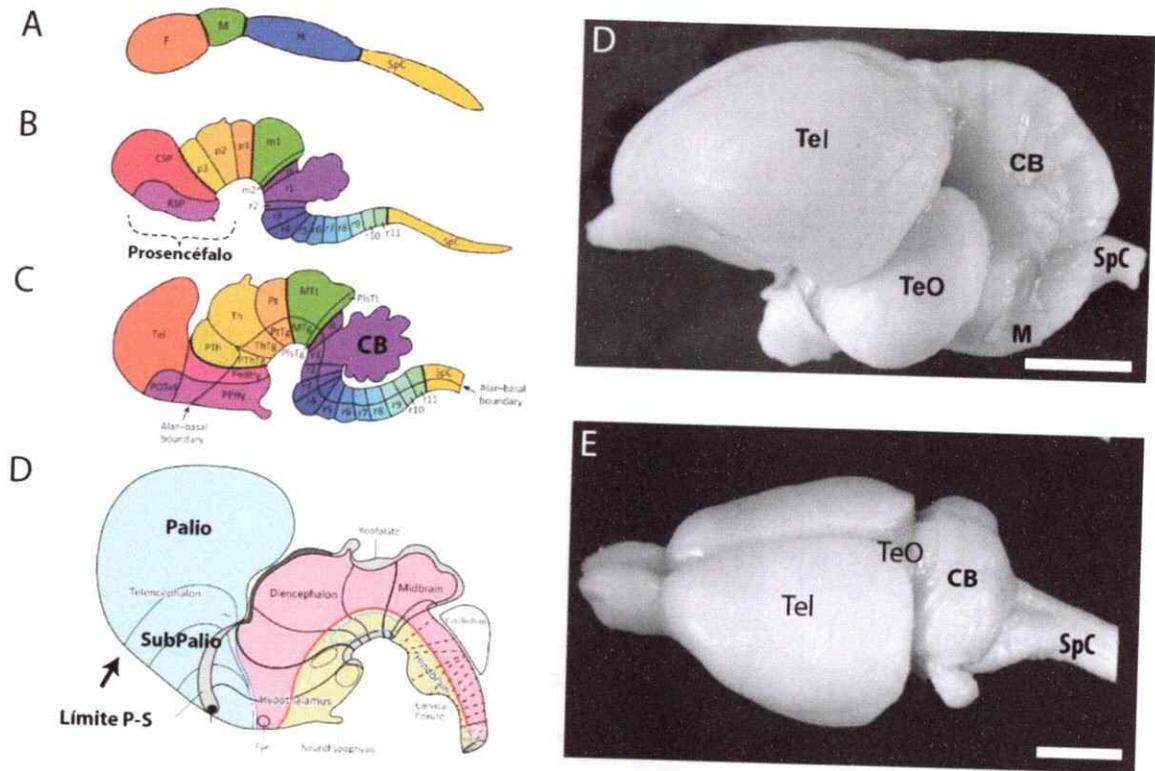


Figura 1-1. Principales estructuras del cerebro amniota. A-D, diagramas de las principales divisiones precursoras del cerebro amniota en estado prenatal. El telencéfalo deriva desde la porción alar de la división más rostral del prosencéfalo, llamada prosencéfalo secundario (CSP más RSP), específicamente desde la división caudal (CSP). D, cerebro de ave (paloma) y (E) rata adulta. Imágenes A-C modificadas de Puelles y col., (2013). D y E desde Wylie y col., (2009). Abreviatura: CB, cerebelo; CSP, prosencéfalo secundario caudal; M, médula; P1-3, prosómeros 1 al 3; R1-11, rombómeros 1 al 11; RSP, prosencéfalo secundario rostral; SpC, médula espinal; Tel, telencéfalo; TeO, tectum óptico. Barras de calibración 500µm.

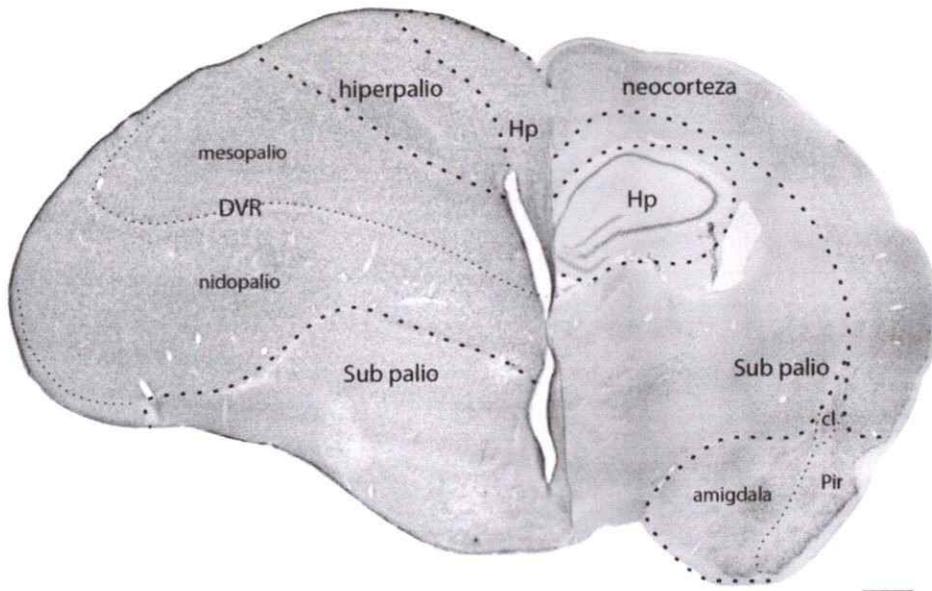


Figura 1-2. Principales estructuras del palio de aves y mamíferos. Imagen compuesta por una fotografía de hemisección transversal del palio de paloma (hemisferio izquierdo) y ratón cola de pincel (hemisferio derecho). En la imagen se destacan las principales estructuras del telencéfalo de aves y mamíferos. Abreviatura: cl: claustrum; DVR: *dorsal ventricular ridge*; HP: hipocampo; Pir: corteza piriforme. Barras de calibración 1mm.

Breve revisión de la organización del palio de aves y mamíferos

Uno de los rasgos más notables del palio amniota es la robusta proyección que recibe desde los núcleos del tálamo dorsal. Estas aferencias se pueden clasificar gruesamente en sensoriales, motoras, límbicas y de segundo orden. En el caso de las proyecciones sensoriales, los núcleos que dan origen a la proyección tálamo-palial, corresponden al relevo talámico de las llamadas "vías ascendentes" de los sistemas sensoriales. Las estructuras del tálamo y del palio que componen las vías sensoriales se encuentran muy diferenciadas y su arreglo representa claramente las modalidades sensoriales relevantes en los modos conductuales de cada especie (Jones, 1985; Buttler 1994, 2008; Buttler & Hodos, 2005).

La proyección tálamo-palial de amniotas se caracteriza por ser topográfica, resultando en una parcelación y diferenciación del palio en áreas especializadas funcionalmente.

Basado en criterios hodológicos (del griego, odos: vía y logos: ciencia, estudio de las vías nerviosas) y ontogenéticos se ha indicado que los núcleos del tálamo dorsal pueden ser agrupados en dos conjuntos, que son: lemnotalámicos y colotalámicos (Buttler, 1994). Hodológicamente el lemnotalámo se distingue por recibir aferencias directas (lemniscas) desde los sistemas sensoriales (retina, núcleos sensoriales cerebro posterior) o desde otras fuentes (estriato-palial, sustancia nigra, núcleos

cerebelares), y por no establecer proyecciones hacia el estriado. Por otra parte, los núcleos colotalámicos se caracterizan por recibir aferencias sensoriales de vías que primero pasan por el tectum del mesencéfalo o colículo, de ahí proviene el "colo" en su nombre (Buttler, 1994, 2008). Ontogenéticamente el rasgo que distingue ambas clases de núcleos, es que todos los núcleos del lemnotalámico se originan a partir desde tres condensaciones celulares o pronúcleos medial, central y lateral, en cambio las estructuras del colotalámico lo hacen a partir de un único pronúcleo dorsal (Rose, 1942; Buttler, 2008). De esta forma, en amniotas las áreas de palio aferentadas por núcleos colotalámicos o lemnotalámicos, sensorial, motor o de otro tipo, corresponden al colopalio y al lemnopalio respectivamente.

En mamíferos la neocorteza, es la estructura de mayor tamaño y la más diferenciada del telencéfalo. Esta región recibe la mayoría de las aferencias talámicas (colofugales como lemnofugales) y posee una citoarquitectura única entre los palios de amniotas y vertebrados. Ésta se caracteriza por estar compuesta por distintos tipos celulares, agrupados en seis láminas organizadas una sobre otra en sentido radial interno-externo (**fig. 1-3A**). Las neuronas de estas láminas se encuentran altamente interconectadas entre sí, formando circuitos mediante procesos axonales y dendríticos, orientados también en sentido radial y por lo tanto topográficos (**fig. 1-3B**). Esta organización resulta en columnas de células altamente interconectadas que comparten propiedades fisiológicas

(Lorente de Nó, 1949; Mountcastle y col., 1955; Mountcastle, 1957; Lubke y col., 2000; Lund y col., 2003). Este patrón estructural se encuentra a lo largo de todas las áreas de la corteza, encontrándose variaciones (como especialización o reducción de alguna lámina) dependiendo del área cortical en cuestión (Shepherd, 2009). A pesar de las diferencias entre áreas, se ha reconocido la existencia de un circuito canónico o elemental presente en la corteza (Douglas y col., 1989; Da costa & Martin, 2010).

En el circuito canónico las células en la lámina 4 (L4) recibe las aferencias provenientes desde el tálamo, éstas a su vez proyectan sobre las neuronas de las láminas superficiales 2 y 3 (L2/3). Las neuronas L2/3 proyectan dentro del circuito sobre las neuronas de la lámina 5 principalmente, y las neuronas L5 recurren sobre L2/3 y L4 de forma directa o a través de la lámina 6. Además las neuronas L2/3 establecen proyecciones córtico-corticales (**fig. 1-3C**) (Douglas & Martin, 2004).

Además del circuito intrínseco y de las proyecciones intracorticales, existen proyecciones desde la corteza hacia otras regiones del cerebro. Una población de neuronas en la lámina 2/3 forma una proyección sobre el estriado de los ganglios basales (Khibnik y col., 2014). Las neuronas de la lámina 5 muestran un evidente rasgo motor proyectando principalmente hacia el estriado lateral, tegmento, colículo superior, núcleos del puente y

dependiendo de la especie, hacia las láminas intermedias de algunos segmentos espinales (Oswald & col., 2013). Por último, las neuronas de la lámina 6 proyectan de vuelta hacia el núcleo talámico desde donde recibe las aferencias cada área cortical (Briggs, 2010).

En el palio de aves se observa también una parcelación modalidad-específica determinada por la proyección tálamo-palial (Dubbledam, 1998; Ahumada-Galleguillos, 2012). Las regiones del palio que reciben la mayor parte de las aferencias talámicas son el DVR y el hiperpalio (Karten, 1969). En el DVR se encuentran proyecciones mayoritariamente de origen colotalámico, aunque también desde regiones lemnotalámicas como los núcleos de la zona dorso medial del tálamo (también llamados límbicos) (Montagnese y col., 2003) y directamente desde el núcleo principal del trigémino (excepcionalmente sin un relevo talámico de ninguna clase) (Dubbeldam y col., 1981). Por otra parte, el hiperpalio recibe aferencias sensoriales exclusivamente lemnotalámicas desde el núcleo geniculado dorsal lateral y desde el tálamo somatosensorial (Karten y col., 1973; Wild, 1987).

Respecto a la organización interna del flujo sensorial observado en el DVR e hiperpalio, se ha indicado clásicamente que las áreas o núcleos sensoriales primarios (*core*) que reciben la proyección talámica, generan proyecciones de corto alcance hacia su periferia (*belt*), donde se ubican las neuronas de proyección hacia áreas más distantes de segundo y tercer orden sensorial o motor, las que



proyectan hacia regiones motoras del cerebro como los ganglios basales, tegmento y médula espinal (Karten & Hodos, 1970; Ritchie, 1979; Wild y col. 1985, 1993).

De acuerdo a lo descrito es posible distinguir semejanzas en la organización del flujo sensorial del palio amniota. Las aferencias talámicas de vías equivalentes, la parcelación modalidad específica, las proyecciones intrapaliales entre áreas primarias, secundarias, motoras y las proyecciones eferentes con carácter motor. Aunque es evidente también según esta descripción que el circuito interno de cada área del palio aviano muestra un carácter lineal, mientras que en mamíferos este presenta un arreglo laminar, columnar y recurrente.

No obstante, en los últimos años evidencia anatómica encontrada en la región sensorial auditiva del DVR, sugiere que su organización interna poseería rasgos estructurales obviados hasta el momento, los cuales se asemejan a la organización de la corteza auditiva de mamíferos (Wang y col., 2010).

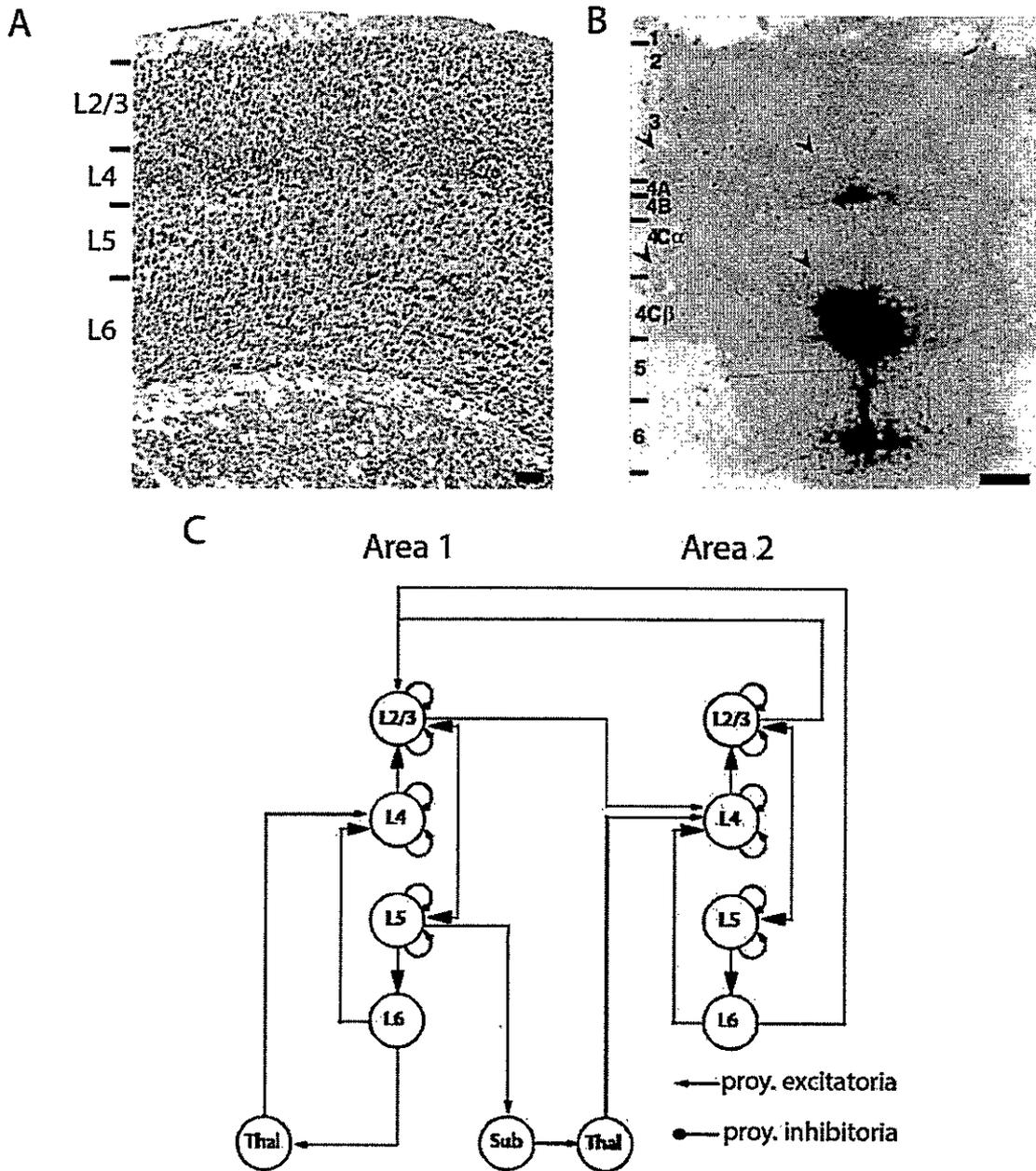


Figura 1-3. Citoarquitectura y organización de la corteza de mamíferos. Imágenes representativas de la laminación, columnaridad y recurrencia del circuito canónico propuesto para la corteza de mamíferos. En **A** se muestra la estructura laminar en una tinción histológica de corteza sensorial de ratón (modificado de brainmaps.org). En **B** se muestra la organización columnar en una corteza visual de macaco (modificado desde Lund y col., 2003). **C**: circuito canónico intrínseco de la corteza propuesto por Douglas & Martin (modificado de Da Costa & Martin, 2010). Barras de calibración 100 μ m.

Una nueva comprensión de la organización del DVR aviano

La mayoría de las descripciones clásicas de la organización del palio sensorial de aves, sugiere que los grandes núcleos primarios del DVR se dividen en dos regiones: una interna (*core*) que recibe las aferencias talámicas y una región externa o periférica (*belt*) desde donde se originan las proyecciones de salida hacia otras zonas paliales. Sin embargo, un reciente estudio anatómico realizado por Wang & col. (2010), reportó en la región auditiva del DVR la presencia de un circuito bastante más elaborado que el flujo lineal clásicamente descrito. En aquella publicación los autores caracterizaron un circuito formado entre el núcleo auditivo primario del nidopalio (*field L*) y el mesopalio ubicado dorsalmente. En la evidencia presentada se detalla que estas regiones del palio se conectan mediante proyecciones de corto alcance, de forma tal que las fibras de proyección se organizan como columnas topográficas dispuestas de manera perpendicular a los núcleos. Basándose en estos resultados y en que el *field L* recibe aferencias colotalámicas desde el núcleo ovoidalis, homólogo al cuerpo geniculado medial de mamíferos, los autores proponen que en el DVR auditivo se encontraría formado por tipos celulares y un circuito intrínseco equivalente al encontrado en el área auditiva de la corteza de mamíferos (**fig. 1-4**).

En la misma línea de lo observado por Wang y col. (2010), los estudios anatómicos realizados recientemente en nuestro laboratorio, indican que el DVR visual presentaría una

conectividad semejante a la revelada en el DVR auditivo, donde el núcleo que recibe la aferencia talámica establece un circuito local con el mesopallio dorsalmente localizado mediante fibras radiales (Ahumada-Galleguillos, 2012).

Estos antecedentes esbozan una organización del DVR sensorial previamente desconocida y sustentan firmemente la idea de que el DVR de aves se organiza siguiendo un patrón más elaborado y similar al cortical, tal como se espera de su asociación con los niveles plásticos de la conducta aviana. Nos parece de este modo, necesario ahondar el estudio de la organización del DVR visual, para llegar a establecer y reconocer su conectividad, identificar las posibles similitudes estructurales con el DVR auditivo y con la corteza visual colorecpiente de mamíferos (corteza extraestriada). A continuación se presenta una descripción del sistema visual colofugal (tectofugal) de aves enfatizando algunos puntos de la vía relevantes para este estudio.

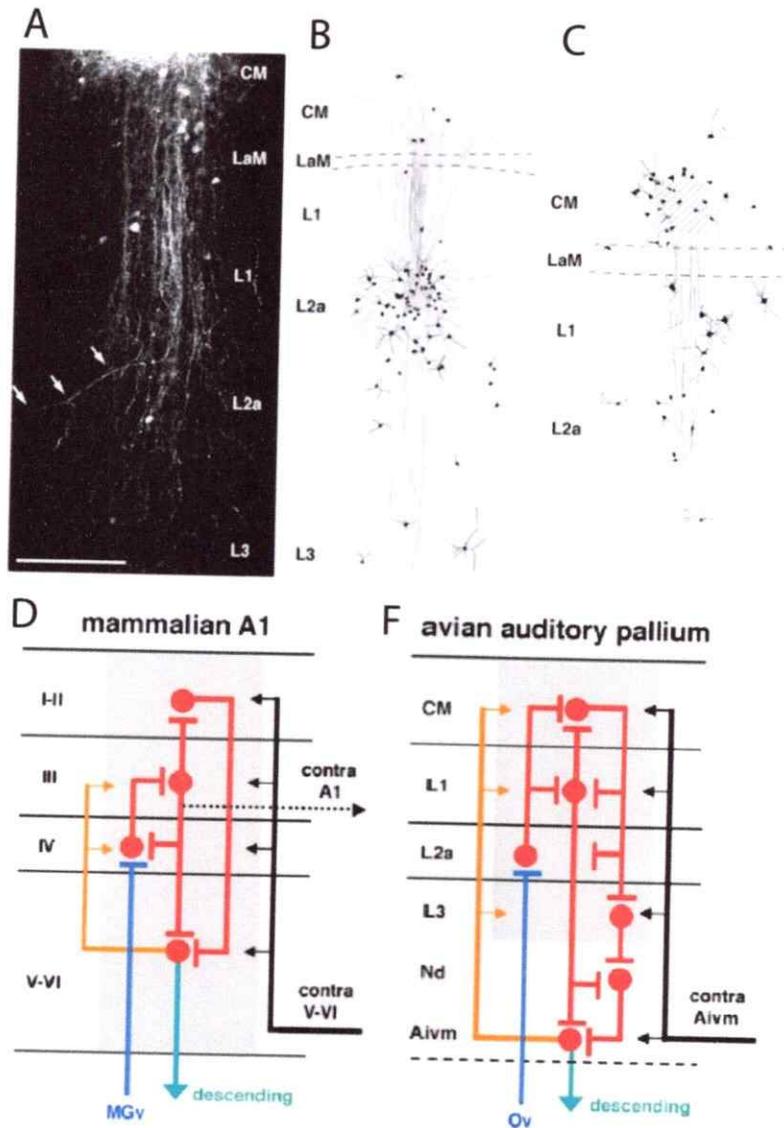


Figura 1-4. Organización del DVR auditivo. Detalle de la organización del DVR auditivo presentado por Wang y col., 2010. **A-C:** Resultados de inyecciones en la lámina mesopialial y tálamo recipiente L2, se puede apreciar los procesos columnares descritos por los autores. **D-F:** Comparación de la organización del circuito intrínseco del área auditiva primaria y del DVR auditivo. Barra de calibración en A 200 μ m. Abreviatura: A1, área cortical auditiva; Aivm, arcopallio ventral intermedio; contra, contralateral; CM, mesopallio caudal; LaM, lámina mesopialial; MGv, cuerpo geniculado medial; Nd, nidopallio dorsal; I-II, III, IV, V-VI, láminas corticales.

El sistema visual tectofugal de aves

En amniotas se puede distinguir dos vías visuales ascendentes hacia el palio: la vía tectofugal o colotalámica y la vía tálamofugal o lemnotalámica (**fig. 1-5A**) (Shimizu & Bowers 1999; Buttler & Hodos, 2005). En aves a diferencia de mamíferos, la vía visual colotalámica se encuentra mucho más desarrollada que la lemnotalámica. El tectum óptico (colículo superior) de aves recibe la mayor parte del flujo visual desde la retina, alcanzando alrededor del 90% de las proyecciones (Mpodosis y col., 1995). La proyección tecto-talámica o tectofugal se origina en las capas profundas del tectum óptico, en la capa 13 y se dirige de forma bilateral hacia el núcleo rotundo (Rt) del tálamo dorsal (pulvinar caudal de mamíferos) (Benowitz & Karten, 1976; Karten y col., 1997; Hellmann & Güntürkün, 2001; Marin y col., 2003; Fredes y col., 2012). Las células que originan esta proyección son las *tectal ganglion cells* (TGC), características por presentar una especialización en forma de cepillo en la parte distal de su arborización dendrítica (Karten y col., 1997; Luksch y col., 1998). Las dendritas de estas células se proyectan desde el soma (capa 13) hasta las láminas retinorecipientes superficiales del tectum, formando un árbol de gran tamaño y una morfología característica, que abarca una gran extensión del tectum óptico y del campo visual representado en éste (**fig. 1-5B**). La proyección tectofugal se caracteriza por ser convergente sobre el núcleo rotundo (Marin y col., 2003). Esto se traduce en que cada locus del núcleo rotundo

se activa con estímulos en casi cualquier parte del campo visual (Revzin, 1967, 1970; De Brito y col., 1975; Wang y col., 1993). En el Rt se encuentran evidentes subdivisiones anatómicas que presentan diferencias en sus propiedades citoarquitectónicas, fisiológicas, histoquímicas y hodológicas (Revzin, 1979; Martínez de la Torre y col., 1990; Mpodozis y col., 1996; Karten y col., 1997; Hellman y Güntürkün, 2001; Marin y col., 2003). Las subdivisiones del Rt son al menos cuatro (*rotundus pars dorsalis anterior, pars centralis, pars posterioris* y *pars triangularis*), y reciben proyecciones desde el tectum a partir de subtipos particulares de TGC. Esto ha sido relacionado con una segregación funcional en el procesamiento de atributos visuales, indicándose que cada subdivisión respondería a distintas dimensiones del mundo visual, tal como color, iluminación, movimiento en dos dimensiones y en profundidad (Wang y col., 1993).

En el entopallio (E), región nidopalial del DVR blanco de las proyecciones rotundas, es menos evidente la existencia de subdivisiones. Sin embargo se sabe que la proyección Rt-E es topográfica en los sentidos rostro-caudal y medio-lateral (Krützfeldt & Wild, 2005; Fredes y col., 2010). De este modo, en E se mantendría el ordenamiento de las subdivisiones rotundas nombradas antes, encontrándose una región anterior, una central y una posterior, que reciben aferencias desde el *rotundus dorsalis anterior, centralis* y *posterioris* respectivamente (fig. 1-6B). En relación con esto, existe evidencia fisiológica que ha asociado a

la región rostral del entopallio con discriminación de patrones espaciales, en tanto a la región caudal con la detección de movimiento y tiempo de colisión de elementos que se acercan en el campo visual (Nguyen & col., 2004; Xiao y col., 2006).

Basado en esta segregación anatómica y funcional de la vía tectofugal, se ha propuesto la existencia de un flujo sensorial ascendente a través de al menos tres canales paralelos, establecidos a nivel de la proyección tecto-rotundo y mantenidos hasta el entopallio, aunque no es del todo claro en qué medida esta segregación se conserva en la proyección desde E hacia otras estructuras telencefálicas. Los antecedentes al respecto indican que las eferencias originadas en E se organizan de manera segregada en un sentido rostro-caudal, donde la región rostral proyecta con mayor énfasis hacia una región rostral del nidopallio llamada nidopallio frontal lateral, la porción central hacia una llamada nidopallio intermedio lateral y área tèmpero parieto occipital y la porción posterior hacia el nidopallio caudo lateral y arcopallio (Husband & Shimizu, 1999; Alpár & Tömböl, 2000). Basado en esto Husband & Shimizu (1999) sugirieron que la segregación de canales de la vía tectofugal se conserva en la proyección desde E hacia sus blancos paliales.

Según esta organización propuesta, el flujo visual desde el Rt, continuaría de forma lineal hasta los blancos paliales de segundo orden sensorial y motores (**fig. 1-6A**). Sin embargo, en un artículo

de Krütfeldt & Wild (2005), se presenta evidencia que obliga a realizar una primera revisión de esta visión clásica. En este artículo los autores muestran que E establece proyecciones de corto alcance con regiones cercanas del palio. Así la zona interna del entopalio (core o Ec) forma un sistema de proyecciones recíprocas con un subnúcleo del mesopalio, llamada mesopalio ventrolateral (Mvl). Además, los autores indican que el Ec proyecta hacia el estriado lateral (LSt) del subpalio. Por último, muestran que la proyección talámica desde el Rt, aferenta al Ec densamente, en cambio la región periférica de E (belt o Ep) de manera dispersa, indicando en conjunto una estratificación de E (fig. 1-6A).

Sumado a esta evidencia investigaciones hechas en nuestro laboratorio (Ahumada y col., 2012; Ahumada-Galleguillos 2012) demostraron que la relación de proyecciones recíprocas entre E y Mvl descrita por Krütfeldt & Wild (2005), se organiza en forma de haces de axones paralelos, extendiéndose a lo largo de todo el eje rostro-caudal y medio-lateral de E. Según esta evidencia, la proyección descendente desde Mvl a E, deja terminales de paso en la zona de nidopalio intermedio (Ni) que queda entre E y Mvl. Además, Ahumada-Galleguillos y col. (2012), describen que el Ni recibiría proyecciones dispersas desde Rt (fig. 1-6C).

Por último, algunos antecedentes preliminares obtenidos por nosotros, indican que el Ni sería en toda su extensión y no solo

el *belt* de E, la región que origina las eferencias del colopatio visual.

Al ordenar los antecedentes respecto a la organización de las proyecciones visuales internas o intrínsecas al colopatio, se tiene que esta región forma un circuito que involucra distintos grupos celulares arreglados dorso-ventralmente en forma de láminas esperablemente especializadas. Éstas son el entopatio más los grupos celulares de DVR directamente dorsales, nidopatio intermedio y mesopatio. Estas láminas se asocian mediante procesos axonales topográficos lo que da origen a columnas estructurales y posiblemente funcionales. Además, la proyección recíproca entre M y E sugiere la presencia de un componente recurrente sobre la aferencia visual entrante.

Esta manera de entender el flujo sensorial en el DVR se asemeja notablemente a cómo se organiza y opera canónicamente la corteza de mamíferos. Debido a esto y a los antecedentes expuestos, nos propusimos realizar un estudio detallado de la organización del colopatio visual. Para esto utilizamos trazado neuronal a nivel unicelular, para detallar las morfologías y detalle del circuito local. También utilizamos trazado neuronal clásico para estudiar la organización de las eferencias y aferencias del colopatio visual. Por último, mediante mediciones de la actividad fisiológica estudiamos las operaciones sostenidas por el circuito local que se comienza a divisar en el DVR de aves.

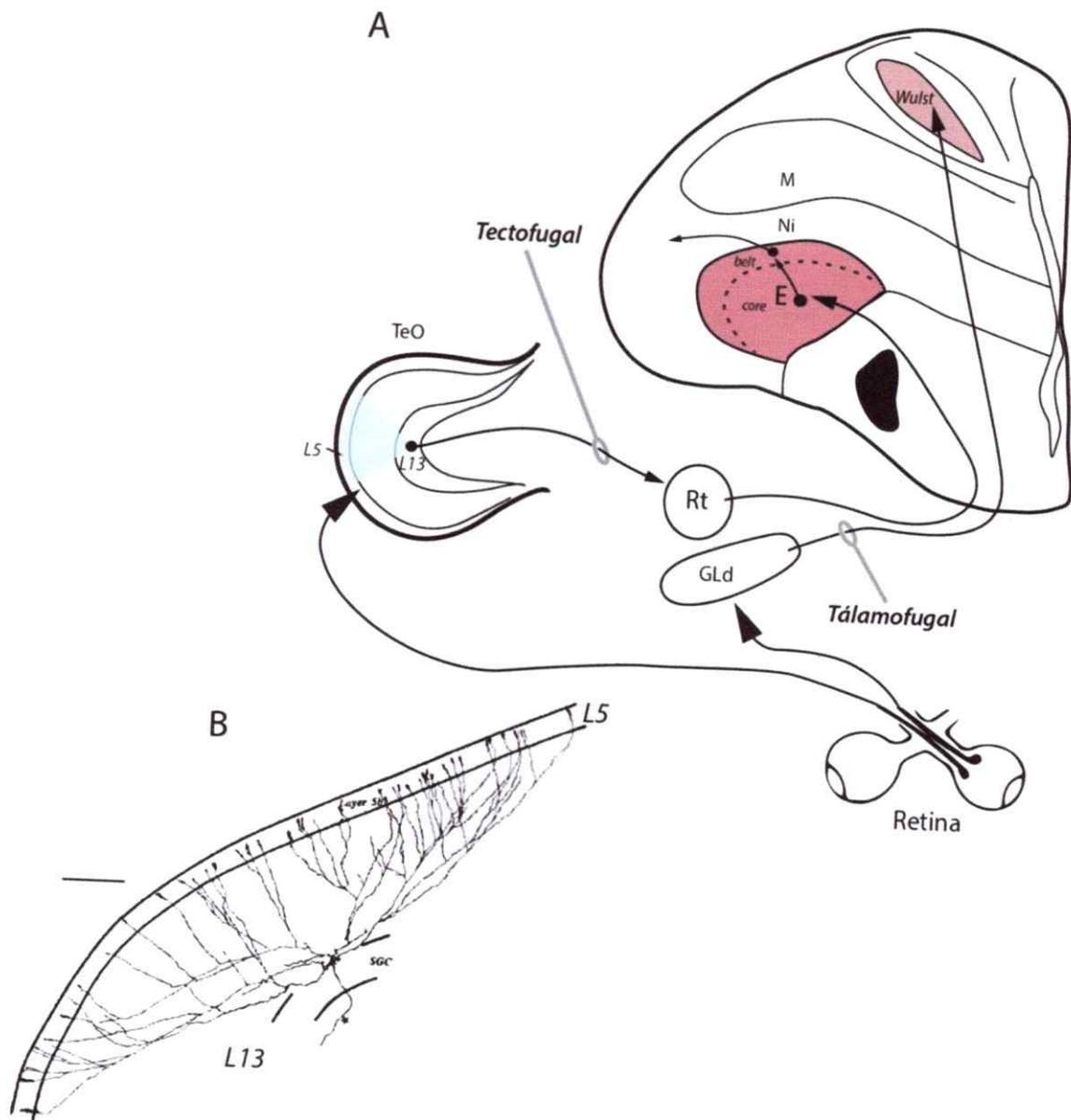


Figura 1-5. Organización de la vía tectofugal en aves. Organización general de la vía visual ascendente tectofugal. En **A** se muestra un diagrama resumen de las principales conexiones encontradas en las vías visuales tectofugal y tálamofugal. En **B** se muestra una reconstrucción de una morfología típica de neuronas que dan origen a la vía tectofugal, las TGC de la lámina 13 del tectum óptico (tomado de Luksch y col., 1998). Barra de calibración en B, 200 μ m para la reconstrucción, 2mm para el dibujo de la rebanada. Abreviatura: L5, lámina 5; L13, lámina 13.

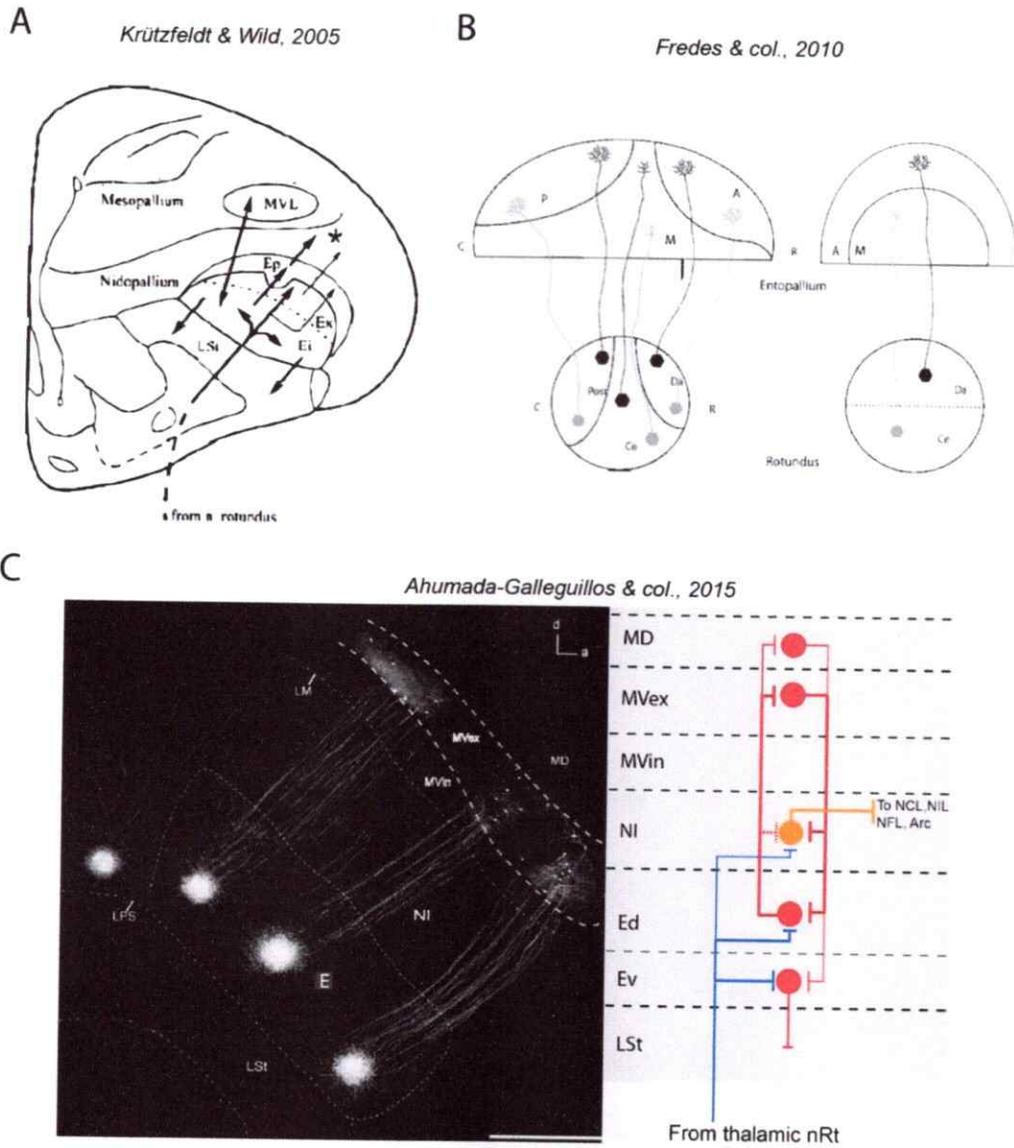


Figura 1-6. Organización del colopalo visual en aves. Distintas proposiciones de la organización del colopalo visual y las aferencias talámicas. Barra de calibración en C, 1mm.

HIPÓTESIS

El colopallio visual de aves se organiza como la corteza de mamíferos, en cuanto a su carácter **laminar**, formado por diferentes estratos celulares especializados, **columnar**, los estratos se encuentran interconectados por procesos axonales topográficos, **recurrentes** y **modulares**, formando módulos anatómicos y fisiológicos repetitivos.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

1.- Realizar estudios anatómicos y fisiológicos que den cuenta en detalle de la conectividad y operaciones internas del circuito entopalio - nidopalio intermedio - mesopalio de aves.

2.- Describir en detalle las proyecciones eferentes del circuito entopalio - nidopalio intermedio - mesopalio de aves y determinar en qué grado éstas mantienen la topografía observada en la proyección tálamo-telencéfalo (rotundo-entopalio).

Objetivos específicos

1.- Caracterizar detalladamente la conectividad del colopalio visual (circuito Entopalio-Nidopalio intermedio-Mesopalio).

Para abordar este objetivo con el detalle requerido, realizamos llenado intracelular de neuronas en preparaciones *in vitro* de rebanadas de cerebro de pollo.

Las conexiones de mayor interés para permitir una interpretación del circuito son:

- a) Proyección desde el entopalio al nidopalio intermedio.
- b) Proyección desde el nidopalio intermedio al entopalio.
- c) Proyección desde el mesopalio al nidopalio intermedio.

2.-Determinar la presencia de aferencias provenientes desde el núcleo Rotundo del tálamo sobre el Nidopalio Intermedio.

Para desarrollar este objetivo se llevaron a cabo inyecciones de trazadores neuronales, en palomas anestesiadas, en el nidopalio intermedio y en el núcleo rotundo del tálamo.

3.-Identificación y caracterización de las eferencias del coloplio visual hacia otras regiones del telencéfalo.

Para llevar a cabo esto se realizaron inyecciones de trazadores neuronales en palomas anestesiadas, en el nidoplio intermedio y en las regiones telencefálicas identificadas como blancos del coloplio visual.

4.-Caracterización fisiológica del coloplio visual.

Para caracterizar fisiológicamente el coloplio visual realizamos registros de la actividad neuronal de esta región en palomas anestesiadas. Los registros se llevaran a cabo utilizando electrodos múltiples. Los aspectos importantes a caracterizar en esta parte del trabajo son:

- a) Actividad visual en el coloplio.
- b) Laminaridad en la actividad del coloplio.
- c) Columnaridad y modularidad de la actividad en el coloplio.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

El desarrollo de esta tesis contempló experimentos realizados en modelos avianos clásicamente usados en neurobiología, la paloma (*Columbus livia*) y el pollo (*Gallus gallus*). Todos los animales usados en los procedimientos que se presentarán a continuación, fueron manejados de acuerdo a los protocolos de manipulación establecidos por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Utilizamos en total 40 pollos de 1 a 7 días. Estos animales fueron donados por la Avícola Chorombo o crecidos en incubadoras de nuestro laboratorio. Las palomas utilizadas fueron ejemplares adultos de 250 a 350 gramos y en total utilizamos 66 individuos obtenidos a través de un proveedor local. Ambas especies de aves fueron mantenidas en las dependencias de la Facultad de Ciencias, con un ciclo de luz de 12 horas luz/oscuridad y con libre acceso a comida y agua.

Los procedimientos experimentales llevados a cabo en este trabajo fueron de carácter anatómico y fisiológico. Para los primeros utilizamos pollos y palomas, para los segundos únicamente palomas.

Procedimientos anatómicos

Para estudiar la organización citoarquitectónica del colopallio visual realizamos experimentos *in vitro* e *in vivo*. En los procedimientos *in vitro* preparamos rebanadas vitales de cerebro de pollo que contenían las regiones paliales de interés, en estas se realizaron inyecciones intra o extracelulares de trazadores neuronales.

En los procedimientos anatómicos *in vivo* realizamos experimentos de trazado neuronal mediante inyecciones extracelulares de trazadores en el cerebro de palomas anestesiadas.

Preparación de rebanadas vitales

Los procedimientos utilizados en la preparación de las rebanadas vitales de cerebro de pollo y en la inyección de trazadores se basaron en el trabajo realizado previamente por Vega y col. (2014). Los animales fueron anestesiados con una mezcla 3:1 de ketamina (112 mg/mL) y xilacina (23 mg/mL) en dosis de 37,5 y 5 mg/kg respectivamente. Luego de que los animales alcanzaron un plano anestésico profundo, estos fueron rápidamente decapitados y sus cerebros removidos desde el cráneo. Inmediatamente el cerebro fue depositado en un recipiente con líquido cerebro espinal artificial, enriquecido en sacarosa (210mM sacarosa, 3mM KCl, 3mM MgCl₂·6H₂O, 23mM NaHCO₃, 1.2mM NaH₂PO₄, 11mM D+-glucosa). Este *buffer* de corte fue previamente enfriado hasta 4°C y burbujeado

con gas carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) durante 20 minutos. El cerebro medio y posterior fue diseccionado y los hemisferios telencefálicos separados a través de la línea media utilizando un bisturí. De cada hemisferio se prepararon rebanadas sagitales y coronales de 600 µm de grosor, utilizando un vibrátomo Leica VT1200. Las rebanadas que contenían las tres regiones de interés del coloplio visual (entoplio, nidoplio intermedio y mesoplio) fueron mantenidas en una cámara con solución de registro (120mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl₂·6H₂O, 23mM NaHCO₃, 1.2mM NaH₂PO₄, 2mM CaCl₂, 11mM D+-glucosa) a temperatura ambiente y continuamente burbujeada con gas carbógeno hasta ser inyectadas.

Inyecciones extracelulares *in vitro* y procedimientos histológicos

Para trazar las proyecciones internas del coloplio visual, realizamos pequeñas inyecciones extracelulares del trazador biocitina-HCL (McDonald, 1992), localizadas en las distintas láminas (E, Ni, M). Para obtener inyecciones restringidas en tamaño (~100 µm de diámetro) y a la vez lograr una alta sensibilidad, usamos una solución concentrada de trazador. Los depósitos fueron realizados utilizando nanoinyectores (WPI, Sarasota, FL USA). Mediante estos dispositivos se hicieron inyecciones de 15 a 20nL de una solución de Biocitina-HCL (Sigma-Aldrich) 10% en buffer fosfato 0.01M pH 7 (PB). El depósito del trazador se realizó mediante guía visual, con la ayuda de una lupa e iluminación

adecuada; para esto se retiró la rebanada desde la cámara de mantención y se puso momentáneamente (menos de 5 minutos) en un recipiente de vidrio con solución de registro. La inyección se hizo mediante una micropipeta de borosilicato acoplada al nanoinyector. Estas pipetas fueron fabricadas en un *puller* (Kopf modelo 720), se utilizaron diámetros de punta de 15 a 30 μm . Una vez inyectadas, las rebanadas fueron devueltas a la cámara de mantención donde permanecieron a temperatura ambiente 3 a 4 horas. Luego de esto las rebanadas fueron retiradas y fijadas durante toda noche en solución de paraformaldehído 4% (PFA 4% en PB). Una vez fijado el tejido, fue transferido a una solución de sacarosa 30% en PB a 4°C, para protegerlo de la rotura por congelamiento durante la resección. Una vez que las rebanadas se hundieron en la solución de sacarosa, fueron reseccionadas en cortes de 70 a 90 μm utilizando un micrótopo de congelación (Leitz 1400).

Luego de lavar las secciones en PB salino 0,75% (PBS), realizamos una saturación de la actividad peroxidasa interna debido a que en la reacción de visualización final, se utiliza la actividad de una peroxidasa exógena. Incubamos las secciones en una solución 2% H_2O_2 en PBS durante 15 minutos. Entonces el tejido fue lavado en PBS durante 10 minutos por 8 veces; luego se incubó durante toda la noche a 4°C y agitación en un volumen de solución de avidina/biotina-peroxidasa (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 0.0025% en PBS mas Tritón X-100 al 0,3%. Para visualizar

el trazador se utilizó una reacción colorimétrica; las secciones se incubaron por 10 minutos en una solución 0,025% diaminobenzidina (DAB, Sigma) y 0,04M sulfato de níquel (Merck, Darmstadt, Alemania) en PBS. La reacción se inició entonces agregando peróxido de hidrógeno en concentración final 0,0003% y se dejó continuar hasta que la marca de la inyección fuese evidente y mientras no se observara señal inespecífica de fondo.

Inyecciones intracelulares *in vitro* y procedimientos histológicos

El trazado o llenado de neuronas individuales fue realizado en rebanadas de telencéfalo. Para esto las rebanadas fueron transferidas desde la cámara de mantención a otra cámara ubicada en una plataforma acoplada a un microscopio invertido con epifluorescencia (Olympus BX51W1). Esta cámara se encontraba continuamente perfundida con solución de registro carbogenada a temperatura ambiente. En estas condiciones las estructuras de interés se pueden identificar debido a la diferencia de opacidad de las distintas estructuras y sus límites. La imagen obtenida con el microscopio se visualizó mediante una cámara de vídeo (WAT 902H2, WATEC, Newburgh, NY USA) y un monitor monocromático (Zenith Data System). Para llenar las neuronas utilizamos electrodos con puntas de tamaños menor a 1 μm y con resistencia de 60 a 90 $\text{M}\Omega$, preparados a partir de capilares de borosilicato (FHC, Bowdoin, ME USA; 1.5mm x 0.75mm) y fabricados en un *puller* de pipetas (P-

97; Sutter Instrument, Novato, CA USA). Los electrodos fueron cargados por la parte trasera con solución 5% de biocitina-HCl más 0,5% biocytin TMR (5-(and-6)-Tetramethylrhodamine Biocytin) en acetato de potasio 0,5M. Los electrodos se acoplaron al cabezal de un amplificador DC intracelular (Cygnus Technologies IR 183A) sostenido por un micromanipulador hidráulico de tres ejes montado sobre la plataforma del microscopio. El electrodo fue posicionado en el tejido usando un manipulador grueso. Una vez que el electrodo fue visualizado y posicionado convenientemente sobre el tejido, se avanzó a través de éste en búsqueda de alguna neurona, lentamente y guiado visualmente usando microscopía IR/DIC o a ciegas, usando como guía el valor de potencial de registro monitoreado en el osciloscopio (VC-6523; HITACHI, Broomfield, CO USA) acoplado al amplificador. La cercanía a una neurona se reconoce por una pequeña y casi imperceptible baja en el potencial, en ese momento se intenta la penetración de la neurona usando un pulso capacitivo más un pequeño avance del electrodo. La penetración provoca la caída sustancial del potencial eléctrico. En los casos en que se logró una penetración estable, el trazador fue inyectado iontoforéticamente usando corrientes de 0,5 a 2nA, durante 2-4 minutos. El llenado de las células fue visualizada en tiempo real usando la epifluorescencia del microscopio y la señal emitida por la biocytin TMR, para corroborar que las neuronas eran llenadas correctamente. A continuación, las rebanadas fueron regresadas a la cámara de mantención e incubadas durante 3 horas

y luego fijadas en PFA 4% durante toda la noche. El procedimiento de revelado utilizado es el mismo descrito para las inyecciones extracelulares, con excepción de la concentración de ABC fue 0,5%.

Inyecciones extracelulares *in vivo*

Para realizar inyecciones de trazadores neuronales en palomas vivas las aves fueron sometidas a una cirugía, para lo cual debieron ser anestesiadas profundamente y mantenidas en un plano anestésico de insensibilidad al dolor durante todo el procedimiento. Para alcanzar este estado las palomas fueron inyectadas intramuscularmente con una mezcla de ketamina (112 mg/mL) y xilaxina (23 mg/mL) en dosis de 96 y 10mg/kg respectivamente. Una vez que se alcanzó un plano anestésico adecuado, las palomas fueron colocadas en posición estereotáxica estándar según se establece en el atlas de Karten y Hodos (1967). Para esto utilizamos un aparato estereotáxico diseñado especialmente para no interferir con el campo visual del animal. El estado de sedación fue monitoreado continuamente y mantenido mediante dosis equivalentes al 15-20% de la dosis inicial. Esta mantención fue aplicada cada 90 minutos después de la primera inyección de anestésico. Con el animal en posición estereotáxica, el cráneo fue expuesto mediante una incisión en la piel. A continuación una pequeña ventana de cráneo fue abierta cuidadosamente utilizando un bisturí en la zona de interés guiados

por las coordenadas del atlas estereotáxico. La actividad neuronal de todos los sitios inyectados fue registrada antes de realizar el depósito de trazador. Normalmente se encontró actividad evocada visualmente en todas las regiones inyectadas (el arreglo experimental utilizado para registrar se describe más adelante). Para el trazado neuronal anterógrado los trazadores usados fueron: *Biotinilated Dextran Amine* 3000 Dalton de peso molecular (BDA 3K; Molecular Probes, Eugene, OR) 10% en PBS y *Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin* (PHA-L; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) 2,5% en PBS. En los experimentos de doble o triple inyecciones desarrollados para explorar la organización topográfica de las proyecciones (capítulo 4), se usó BDA 3K-tetramethylrhodamina (*microruby*; Molecular Probes) 10% en PBS y PHA-L (visualizado mediante inmunofluorescencia).

En los experimentos de trazado neuronal retrógrado realizamos inyecciones locales de solución de subunidad B de la toxina del cólera (CTB, choleraeagenoid, List Biological Laboratories, Campbell, CA) 1% en agua destilada. También llevamos a cabo inyecciones dobles de CTB 1% conjugado con fluoróforos *alexafuor* 488 y 555 (Life Technologies, Eugene, OR) para explorar el arreglo topográfico de las proyecciones (capítulo 4).

En todos los casos los trazadores fueron depositados usando iontoforesis y pequeños pulsos de presión, mediante micropipetas de vidrio con puntas de 10 a 25 μm de diámetro externo, fabricadas

a partir de capilares de borosilicato (FHC; 1.5mm x 0.75mm) preparadas en un *puller* vertical (Kopf modelo 720). Las inyecciones realizadas con iontoforesis consistieron en ciclos de corriente positiva de intensidad 6-9 μ A, 6 segundos ON/OFF de 20 a 40 minutos de duración. Los parámetros del protocolo de iontoforesis y tamaño de la punta de la micropipeta, variaron dependiendo del tamaño deseado para las inyecciones y del trazador usado. El protocolo de corriente fue generado con una fuente de corriente de precisión Midgard (Stoelting Co, Wood Dale, IL). Como se mencionó antes, los depósitos fueron hechos usando corriente y pulsos de presión. Los pulsos fueron realizados con un generador de pulsos, picospritzer III (Parker Instrumentation), acoplado a un tanque de N₂. Esto producía una pequeña gota de trazador de las cuales se daban 1 o 2 por inyección, dependiendo del tamaño deseado, alcanzando un volumen estimado de 50-100nL.

Procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos

Pasados 4-7 días para el CTB o BDA y 7 para el PHA-L, luego de realizada la inyección, los animales fueron eutanasiados usando una sobredosis de la misma mezcla de ketamina/xilacina y perfundidos vía carótidas con 500mL de PBS previamente calentado a 37°C, seguidos de una solución fría (5-10°C) de PFA 4% en PBS. EL cerebro fue postfijado durante 1 o 2 días en la solución de PFA y transferido a una solución de sacarosa 30% en PBS y mantenido

ahí hasta que el cerebro se hundiera completamente, esto como una forma de protección del tejido para el congelamiento durante el seccionamiento. Para seccionar los cerebros, estos fueron montados en la placa congeladora del micrótomó (Leitz 1400) en la posición adecuada para ser cortados en plano coronal o sagital (dependiendo del experimento) según el atlas estereotáxico. En un caso se utilizó un plano semi-horizontal realizado especialmente para observar estructuras y fibras de proyección del colopallio visual hacia estructuras secundarias del pallio (capítulo 6). En aquel caso (fig.4-9) el cerebro fue montado con una inclinación de 20° con respecto al eje vertical. Los cerebros fueron cortados en secciones de 60 o 70 μm y las secciones fueron recogidas de manera seriada formando 3 series de secciones representativas del cerebro. De estas series, una fue reaccionada para visualizar el trazador (usando DAB), la segunda reaccionada para visualizar el trazador y contrateñido con tinción de Giemsa y la tercera solamente con tinción histológica de Giemsa o Nissl. En casos de inyecciones de dos trazadores en que se visualizaron éstos por separados, la primera serie se usó para visualizar un trazador, la segunda serie se usó como tinción histológica y la tercera serie fue reaccionada para visualizar el segundo trazador. Esto se hizo en casos en que se inyectaba en el mismo sitio trazadores anterógrados (PHA-L) tanto como retrógrados (CTB), en los que la reacción de visualización puede realizarse diferencialmente debido

a que los anticuerpos primarios usados son diferentes y no reaccionan de forma cruzada.

Para visualizar las inyecciones con el protocolo de DAB intensificado con metales pesados, las secciones de cerebros inyectados con BDA, PHA-L y CTB, fueron pretratadas con H₂O₂ 2% en PBS durante 20 minutos para bloquear la peroxidasa interna. Luego de lavar con PBS, solo las secciones de cerebros inyectados con CTB y PHA-L fueron incubadas en solución de bloqueo conteniendo suero normal de conejo 4% y Tritón X-100 0,3% en PBS, durante una hora. Luego el material fue incubado a 4°C durante toda la noche en solución de bloqueo más el anticuerpo primario correspondiente; anti-CTB hecho en cabra (List Biological Laboratories, 1:80.000) o anti PHA-L hecho en cabra (Vector Labs, 1:5.000). Posteriormente el material fue lavado en PBS e incubado con un anticuerpo secundario biotinilado, hecho en conejo y reactivo para cabra (Vector Labs, 1:500), durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS, las secciones inyectadas con CTB y PHA-L tanto como las inyectadas con BDA, fueron incubadas a temperatura ambiente por 2 horas en solución de avidina/biotina-peroxidasa 0,0025% y Tritón X-100 0,3% en PBS. A continuación, las secciones se lavaron y reaccionaron para ser visualizadas con el mismo protocolo de DAB descrito en la sección de inyecciones in vitro. Para visualizar mediante inmunofluorescencia el producto de inyecciones de PHA-L o CTB, el material histológico fue incubado

en solución de bloqueo conteniendo suero normal de caballo 4% y tritón X-100 0,3% en PBS. Luego se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo (α Ctb, 1:80.000 o α PHA-L, 1:5.000). A continuación se incubó el material con anticuerpo secundario hecho en burro y reactivo para cabra, conjugado con el fluoróforo Alexa-488 (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., 1:500). Luego de lavar, las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con medio de montaje para fluorescencia (FluorSave Reagent, Merck). De esta forma se pudieron realizar experimentos de inyecciones dobles de PHA-L/BDA-TMR o PHA-L/CTB-Alexa555 y visualizar las señales de los trazadores por separado.

Procedimientos fisiológicos

Para los registros de actividad neuronal *in vivo* utilizamos los mismos procedimientos quirúrgicos que describimos para las inyecciones de trazadores *in vivo*. Una diferencia en los procedimientos fue la mezcla de anestésico usada para la inducción inicial, en este caso se utilizó una mezcla 2:1 de ketamina y xilacina en una dosis de 108 y 7,6mg/kg respectivamente. El anestésico fue usado de esta forma ya que así obtuvimos un plano anestésico profundo, como en los casos de inyecciones, pero con mayor respuesta visual evocada en las regiones del coloplio visual

que no reciben aferencias talámicas desde el núcleo rotundo directamente (nidopalio intermedio y mesopalio).

Inmediatamente después de las sesiones de registro o a la mañana siguiente los animales fueron eutanasiados usando una sobredosis de la mezcla de anestésico, perfundidos con PFA 4%, y sus cerebros procesados de la manera en que se describe en los procedimientos histológicos hasta el momento de ser seccionados. Una vez obtenidas las secciones, éstas fueron fotografiadas en húmedo usando la microscopía de campo oscuro. Este procedimiento permitió visualizar las lesiones dejadas durante el registro, las láminas del colopalio y las fibras columnares de proyección entre láminas. A continuación, el tejido fue montado y teñido usando tinción de Giemsa o Nissl para confirmar las estructuras de interés y los lugares de registro dentro de estas. Los sitios de registro fueron identificados mediante lesiones electrolíticas dejadas en lugares específicos del registro o por las marcas dejadas por la penetración del electrodo en otros casos.

Registros *in vivo*

Los registros hechos con la finalidad de identificar estructuras para ser inyectadas con trazador, se hicieron usando electrodos de tungsteno (FHC, $1M\Omega$ de impedancia). Los registros (multiunitarios y de potenciales lentos) evocados eléctricamente también se hicieron usando la misma clase de electrodos. En estos

casos, las señales eléctricas fueron amplificadas utilizando un amplificador de 16 canales (A-M Systems Inc., 16 channel microelectrode amplifier model 3600), la señal se digitalizó en los casos que así se requiriese, utilizando una tarjeta conversora análogo-digital (National Instruments, BNC 2090) acoplada a un computador. Los datos fueron adquiridos usando un *software* desarrollado por Susana Vargas (Sistema AAPS Neuro) en IGOR PRO (Wavemetrics, IGOR PRO 6.2). El monitoreo permanente de la señal durante el experimento se hizo mediante un osciloscopio y un amplificador de audio y parlante.

Los experimentos de registros múltiples fueron hechos de dos formas, la primera con arreglos de electrodos de tungsteno en forma de peineta fabricados por nosotros en el laboratorio. Estos arreglos consistían en 5 electrodos puestos a una distancia de 200-300 μm el uno del otro. Esta configuración se utilizó para registrar la actividad multiunitaria en el mesopallio luego de estimular en el entopallio. En estos casos (casos **EM1-5**, cap.6) los datos fueron adquiridos y analizados mediante el *software* antes mencionado. En experimentos el mismo arreglo de peineta fue utilizado para registrar secuencialmente (cada 100 μm) la actividad de las distintas láminas del colopallio, evocada por estímulos eléctricos en el entopallio (casos **ENM5-8**, cap.6). En estos casos los registros fueron adquiridos y analizados para

generar mapas de densidades de corriente, para lo cual utilizamos una rutina desarrollada por nosotros en IGOR PRO.

La tercera configuración experimental también requirió múltiples sitios de registro, para esto usamos un arreglo de electrodos Neuronexus (NeuroNexus Technologies, Inc.). Este arreglo consiste en una sola vara compuesta por 32 sitios de registros dispuestos en línea y separados por 100 μm . La amplificación del registro, la digitalización y adquisición de los datos se hizo usando un amplificador de 32 canales, una tarjeta y un programa computacional (Intan Technologies). Una vez adquiridos los datos, estos se analizaron utilizando el software AAPS para la actividad unitaria y multiunitaria, y la rutina elaborada por nosotros para generar los mapas de densidades de corriente.

En los análisis en que se usó la actividad unitaria, las espigas individuales fueron aisladas utilizando como criterio la amplitud de la señal, separando espigas de amplitudes mayores a cuatro veces la desviación estándar del ruido.

En los casos en que se adquirieron potenciales de campo para generar mapas de densidades de corriente, los procedimientos utilizados para generar los mapas fueron basados en el trabajo de Letetier y col. (2000). Brevemente, una vez que se adquirieron los potenciales evocados, utilizando cualquiera de los dos arreglos de electrodos, estos fueron filtrados (10-1000Hz) y las repeticiones (15) en cada profundidad promediadas. Con estos datos

se construyó una matriz en dos dimensiones en términos de tiempo y profundidad. De este modo se obtuvo una curva con los valores de potencial para cada profundidad en cada milisegundo de registro; a continuación, estas curvas fueron suavizadas utilizando un filtro Gausiano y se obtuvo su segunda derivada espacial según Nicholson & Freeman (1975) y Mitzdorf (1985). Los valores obtenidos indican las densidades de corriente donde los sumideros (*sinks*) corresponden a los valores negativos y las fuentes (*sources*) a los valores positivos.

Estimulación eléctrica

En los experimentos que contemplaron estimulación eléctrica en el entopodio, usamos electrodos de estimulación de tungsteno, monopolares, $1M\Omega$ y puntas de $25\ \mu\text{m}$. De este modo obtuvimos estimulaciones locales y efectivas. Los pulsos fueron generados mediante una fuente generadora de pulsos STG4002-1.6mA (Multi Channel Systems MCS GmbH) y gatillados por el programa de registro para coordinar el estímulo eléctrico con el registro. Los valores de tiempo e intensidad de corriente utilizados en cada experimento se detallan en el capítulo 6 (tabla 1-4).

Estimulación visual

Los estímulos visuales fueron presentados frente a los animales en pantallas de alta resolución (tasa de refresco, 60Hz). Los estímulos se generaron utilizando el programa computacional LEONARDO (Lohmann Research Equipment). Se presentaron estímulos con formas circulares o rectangulares, de color negro sobre fondo blanco, rojo sobre fondo negro o blanco sobre fondo negro. El tamaño de los estímulos móviles fue de 1-4° del campo visual siguiendo el reporte de Gu y col. (2002). La velocidad utilizada fue de 30 grados/segundo. La posición del estímulo en el campo visual se cambió de posición luego de una serie de registros debido a la observación de adaptación de la respuesta frente al mismo estímulo.

Registro y análisis de las imágenes

Todas las imágenes derivadas del material histológico tanto de experimentos anatómicos como fisiológicos fueron adquiridas y analizadas utilizando un microscopio óptico convencional (Olympus BX61) equipado con una cámara digital de alta sensibilidad (Spot RT, Digital Instruments) o un microscopio óptico (Olympus BX61) equipado con epifluorescencia y una cámara de alta sensibilidad (Orca-R2, Hamamatsu). El segundo equipo permite adquirir series de imágenes de un mismo campo, con distintas profundidades focales. Estas series de imágenes fueron compuestas usando el programa Cell

Sense Dimension (Olympus). Las imágenes fueron procesadas y en algunos casos compuestas como panoramas usando *software* Photoshop (Adobe, CS6). Las figuras fueron diseñadas y compuestas usando el programa Illustrator (Adobe, CS6)

Reconstrucción de neuronas

Algunos casos representativos de neuronas marcadas individualmente (obtenidos con llenado intracelular en rebanadas) fueron reconstruidos en dibujos hechos usando cámara lúcida acoplada a un microscopio óptico (Olympus BX61). Usando el objetivo de 40X se logró reconstruir los detalles somáticos, árboles dendríticos, espinas dendríticas, axones, terminales y varicosidades. Los dibujos fueron digitalizados mediante un escáner (Canon slide L200) a una resolución de 600 dpi y compuestos luego usando el programa Illustrator. Los casos de neuronas entopaliales dibujados fueron además reconstruidos usando el *software* Neurolucida (MFB Bioscience) para obtener algunos datos estructurales de las neuronas.

CAPÍTULO 3

ORGANIZACIÓN INTERNA DEL COLOPALIO VISUAL.

INTRODUCCIÓN

A pesar del interés que suscita el sistema visual de aves, son escasos los trabajos en que se haya descrito en detalle la organización del telencéfalo visual. Como se describió previamente en la introducción general, en el telencéfalo aviano se pueden reconocer dos zonas visuales primarias: el hiperpalio visual (lemnopalio visual) y el DVR visual (colopalio visual). En relación al DVR recientemente se ha sugerido que las áreas sensoriales primarias de esta región del palio, se organizan como módulos trilaminados (Chen y col., 2013; Jarvis y col., 2013; Ahumada-Galleguillos y col., 2015). Las evidencias más sólidas que apuntan en este sentido son, por una parte, experimentos con marcadores de actividad, donde se muestra activación incluyendo las tres láminas del DVR visual (entopalio, nidopalio intermedio y mesopalio; E-Ni-M) asociada a la presentación de estímulos visuales (Jarvis y col., 2013). Sin embargo, un problema de estos experimentos es la poca especificidad y detalle de la marca resultante.

Por otra parte, en coherencia con los estudios de activación visual en el DVR, Ahumada-Galleguillos y col. (2015), realizaron una

descripción detallada de la conectividad de esta región visual. En este trabajo se demostró mediante pequeñas inyecciones de trazadores, que la parte dorsal de E (Ed), y una subdivisión de M (mesopallio visual externo, MVe) se encuentran recíproca y densamente conectados mediante haces de axones topográficos. Además, según los autores, la lámina intermedia Ni participa del circuito a través de una proyección desde Mve. Otro elemento descrito como eferencia del circuito es la proyección desde la parte ventral de E (Ev) sobre el estriado lateral (LSt) del subpallio (fig. 1-6).

Previo a estos trabajos, son pocos los reportes anatómicos detallando la anatomía interna y organización de los componentes del colopallio visual. Un antecedente relevante descrito es la presencia de al menos cinco tipos neuronales en E, dos de proyección y tres interneuronas (Tömböl, 1988; Csillag y col., 1989; Csillag, 1991). Aunque estas descripciones son valiosas al presentar detalles somatodendríticos y variedad de tipos neuronales, son datos que no permiten entender cómo se organiza en detalle el circuito intrínseco del colopallio visual. Por otra parte, en una investigación realizada por nosotros (Ahumada-Galleguillos y col., 2015), se establecieron algunos rasgos generales de la conectividad interlaminar, aunque dejando pendientes algunos aspectos finos de la organización del circuito.

Debido a esto, en este capítulo del trabajo estudiamos la morfología celular y axonal de los principales elementos neuronales del coloplio visual mediante el uso de llenado intracelular de neuronas. Haciendo esto evitamos un problema clásico de los trabajos de trazado neuronal, que es la toma del trazador por las fibras de paso. En el caso del coloplio visual, la gran cantidad de procesos entre láminas es metodológicamente un problema significativo. Al hacer esto aclaramos algunos aspectos inconclusos de la conectividad, como la morfología de los axones de proyección desde E a M, la posibilidad de que estas u otras neuronas de E terminen en Ni, la morfología de las neuronas de Ni y de M y los sitios de terminación de sus axones. Finalmente, con un panorama más completo del circuito intrínseco del coloplio, pudimos comparar directamente las morfologías celulares de las neuronas del palio de aves con algunas morfologías neuronales descritas en la corteza de mamíferos.

RESULTADOS

Caracterización de las proyecciones interlaminares y elementos neuronales de E.

Con el objetivo de visualizar las proyecciones interlaminares originadas en E, inicialmente llevamos a cabo pequeñas inyecciones extracelulares de solución 10% del trazador biocitina-HCl en rebanadas de telencéfalo (6 casos sagitales, 2 casos transversos). La biocitina es tomada por las neuronas y transportada anterogradamente hacia los terminales axonales de las neuronas en E y retrógradamente hasta el soma de las neuronas que terminan sobre E. Esto puede ser visualizado mediante la reacción histoquímica descrita en el capítulo 2 de materiales y métodos. En la **figura 3-1** se muestra el resultado de un experimento de triple inyección en la parte dorsal de E; en estas imágenes se puede ver la proyección "columnar" desde E a M que describimos previamente (Ahumada-Galleguillos y col., 2015) (**fig.3-1A**). Los haces de axones que forman esta proyección muestran un curso recto que atraviesa el Ni y forma un denso locus de finos terminales en la sublámina MVex del mesopalio. El mismo resultado se obtiene al hacer inyecciones a lo largo de cualquiera de los planos longitudinales del entopalio. En la **figura 3-1**, junto a las "columnas" de axones en curso recto hacia M, se pueden distinguir axones y terminales dispersos localizados en Ni entre las columnas resultantes desde cada inyección (**fig. 3-1B, C**). Las inyecciones hechas en la parte ventral del entopalio (Ev), resultan

mayoritariamente en axones que viajan hacia el estriado lateral directamente ventral a E (fig. 3-2). Aunque en los casos de inyección en Ev también se observó axones viajando hacia las láminas dorsales Ni y M, esto ocurre escasamente.

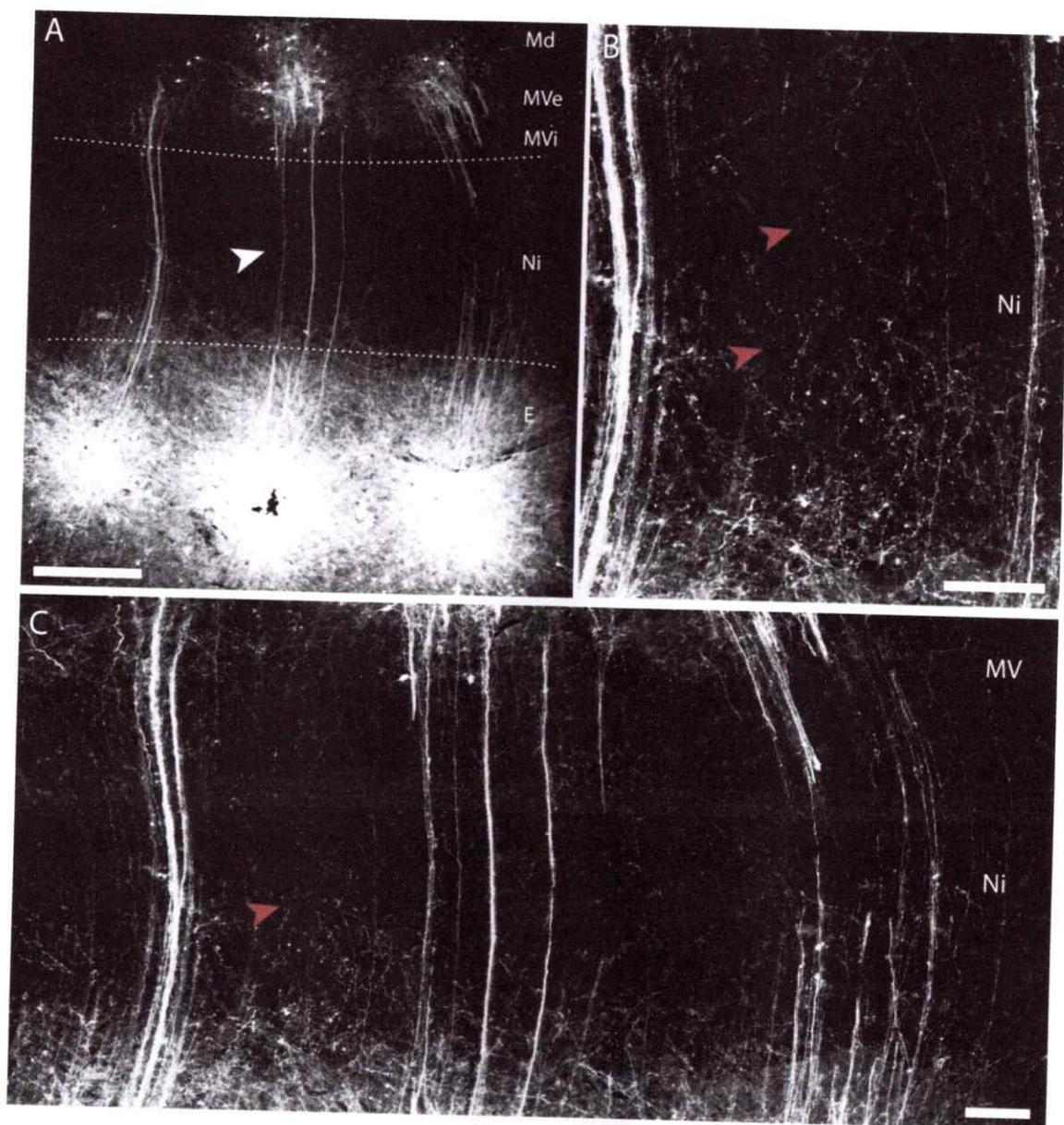


Figura 3-1. Eferencias entopiales intralaminares. Experimento de triple inyección (15nl) de biocitina-HCl 10% en E dorsal, en rebanada vital (600 μ m) sagital telencefálica. **A:** Imagen panorámica con colores invertidos del campo de inyección, tomada desde una sección (70 μ m) de la rebanada revelada histoquímicamente para visualizar la biocitina. La punta de flecha blanca indica los axones columnares entre E y M resultantes de la inyección central. **B y C:** Magnificación de un área del Nidopallio intermedio de **A**. En estas imágenes se distingue con mayor detalle los terminales dispersos en Ni, se destacan algunos con puntas de flecha rojas. Barra de calibración en A, 300 μ m; B y C, 100 μ m.

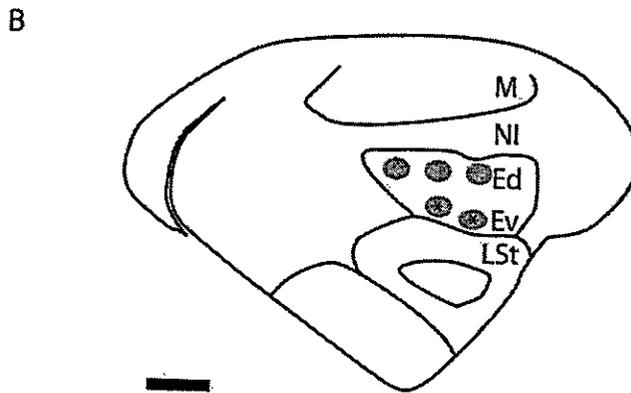
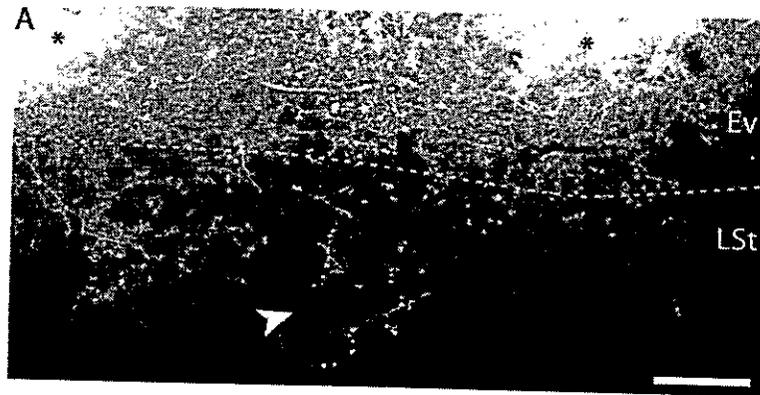


Figura 3-2. Eferencias entopaliales al subpalio. A: Imagen con colores invertidos de una sección (70 μm) de rebanada vital (600 μm) sagital de telencéfalo, doble inyectada con biocitina-HCl 10% en E ventral. Los asteriscos indican los sitios de inyección. La punta de flecha muestra terminales en LSt producto de la inyección en Ev. **B:** Dibujo esquemático de una rebanada sagital de telencéfalo mostrando la ubicación de las inyecciones hechas en Ed presentadas en la **figura 3-1** y las inyecciones en Ev presentadas en esta figura. Barra de calibración en A, 200 μm ; B, 1mm.

En una serie de experimentos de inyección intracelular de biocitina obtuvimos 16 casos de neuronas entopaliales llenadas completamente incluyendo soma y procesos axonales. En el listado de casos presentado en la **tabla 3-1**, se caracterizaron algunos rasgos morfológicos de las neuronas. Usando como criterio la morfología axonal, los distintos casos fueron ordenaron en tres grupos. El primer grupo de neuronas se encuentra formado por los casos E1-E9. Todas estas neuronas se localizan en los dos tercios superiores de E (entopalio central y entopalio dorsal). En los nueve casos, observamos un axón principal que describe un curso recto en dirección a M, muy similar al trayecto de los axones que forman las columnas. Tal como se puede ver en la **tabla 3-1**, la mayor cantidad de los terminales axónicos de estas neuronas se distribuyen en M, aunque en otros casos, si bien se encuentra el axón columnar, los terminales en M son escasos. La morfología de los axones y sus terminales se puede ver más claramente en la **figura 3-3**, donde se presentan los dibujos de las reconstrucciones realizados para 4 neuronas del grupo I (E1, E2, E5, E8) y en la **figura 3-5E** en una fotografía de la morfología completa de los terminales en MVex para el caso E7.

Las neuronas del grupo I presentan morfologías estelares, 5 a 6 dendritas primarias con espinas moderadas, un valor promedio del diámetro somático medido al eje mayor de $13,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$ y un área promedio de $122 \pm 20 \mu\text{m}^2$.

Tabla 3-1. Resumen de casos de neuronas entopaliales llenadas intracelularmente en rebanadas. En la tabla se indica el número de células llenadas por rebanada, presencia de axón recto hacia M, cantidad de procesos axonales observados en cada lámina del coloplio visual, ubicación dorso-ventral en E y cantidad de espinas dendríticas.

caso	N° cels.	Axón recto	Terminales				ubicación	Esp. Dendr.
			Lst	E	NI	M		
E1*	1	1	-	+	-	++	Ed	+
E2*	1	1	-	+	+	+++	Ed	++
E3	1	1	-	++	+	+	Ed	++
E4	2	1	-	+	+++	+	Ed	+
E5*	1	1	-	+	-	+	Ec	+
E6	2	1	-	+++	+	++	Ec	++
E7	2	1	-	++	-	+++	Ec	+
E8*	1	1	+++	+	-	+++	Ec	+
E9	1	1	-	++	++	+	Ec	+
E10*	1	0	-	++	+++	-	Ec	+++
E11*	1	0	+++	++	+++	-	Ec	+++
E12*	1	0	-	+	++	-	Ed	++
E13	1	0	-	+	+++	-	Ed	+++
E14	1	0	-	+	+++	+	Ed	++
E15	1	0	-	+++	-	-	Ev	++
E16	1	0	+++	-	-	-	Ev	+

Simbología, -: no se observa; +: escasos; ++: medio; +++: abundantes; E: entopalio; Ed: entopalio dorsal; Ec: entopalio central; Ev: entopalio ventral; Lst: estriado lateral; Ni: nidopalio intermedio; M: mesopalio; *: células reconstruidas presentadas en figura 3-3 y 3-4.

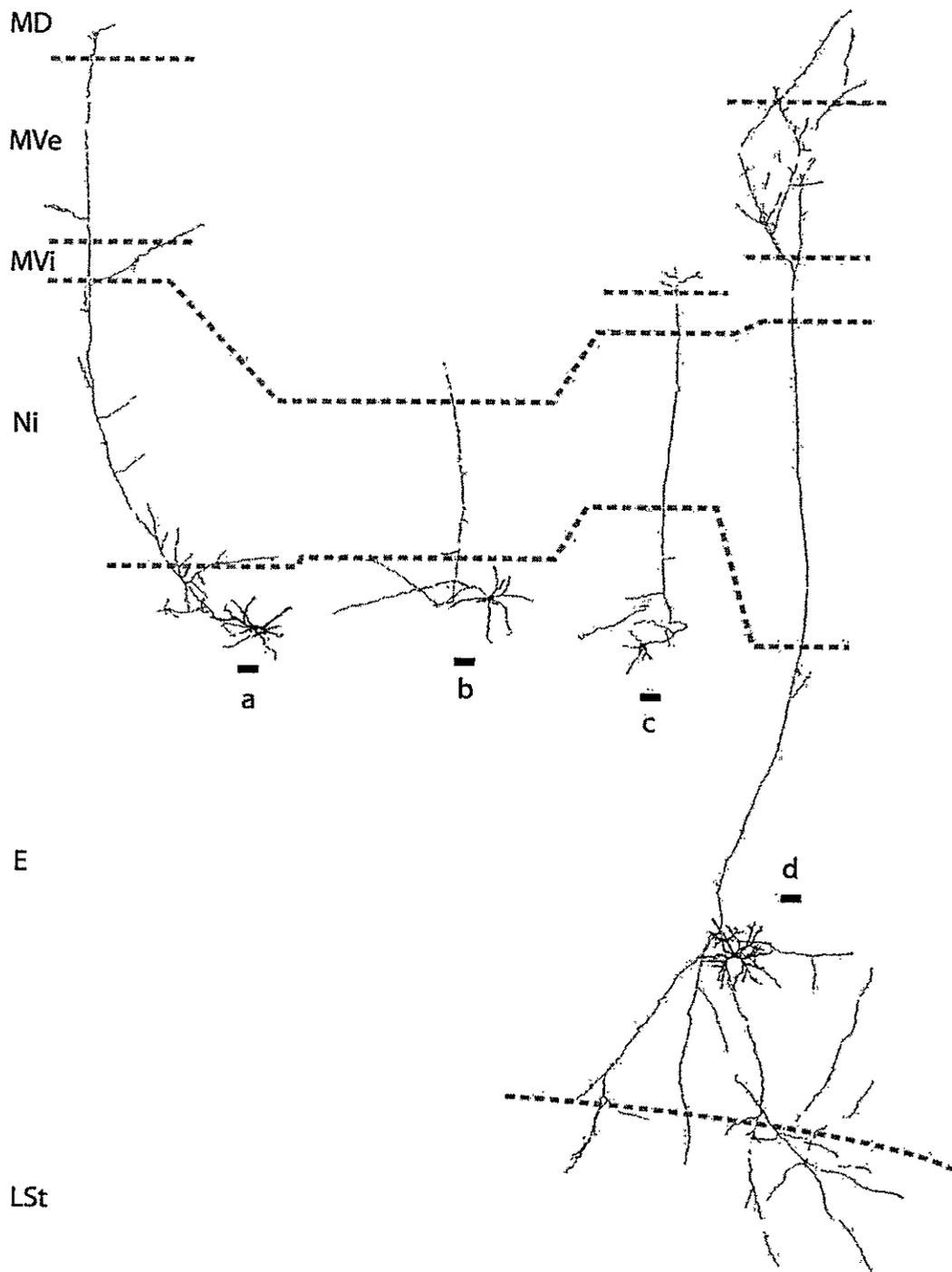


Figura 3-3. Neuronas entopaliales tipo I. Dibujos en cámara lúcida de 4 reconstrucciones de neuronas llenadas en rebanadas vitales de telencéfalo. Las neuronas a-d presentadas corresponden a los casos E1, E2, E5 y E8 respectivamente. Los límites de las láminas se indican con líneas grises discontinuas. Barras de calibración 50 µm.

El segundo grupo de neuronas entopaliales está formado por los casos E10-E14. La característica principal que anida los cuatro casos, es también la morfología axonal. En este grupo, el axón se diferencia del tipo I por presentar arborizaciones axonales dispersas (400~500 μm) que terminan casi exclusivamente en Ni, en menor cantidad en E y en ninguno de los casos en M (fig. 3-4). Estas neuronas presentan morfologías multipolares, con 4 a 5 dendritas primarias. Como se puede ver en la tabla 3-1, en estas neuronas se observó cualitativamente una mayor abundancia de espinas dendríticas que en las del grupo I. El diámetro promedio de las neuronas de grupo II, medido al eje mayor resultó 17 ± 2 μm y el área promedio de 207 ± 18 μm^2 . Al realizar un análisis estadístico no paramétrico sobre los valores de diámetro y área de los dos grupos de neuronas entopaliales, estos resultan significativamente distintos, indicando que éstas corresponderían a poblaciones distintas (test de Wilcoxon-Mann-Whitney, para valores de diámetro: $Z=-1,87$, $p=0,03 < 0,05$, $U=8$, valor crítico 9. Para valores de área, $Z=-2.53$, $p=0,0057 < 0,01$, $U=3$, valor crítico 5). Además, dos análisis basados en la morfología axonal de los dos grupos soportan también esta diferencia (fig. 1 y 2 anexo)

Los dos casos restantes de neuronas ubicadas en E ventral no fueron incluidos en los grupos I ni II. Una de ellas, E15, es el único caso de interneurona obtenido en este trabajo. La arborización del

axón de esta neurona se ubica completamente en la vecindad del soma, es altamente ramificado y denso en varicosidades (fig.3-5G). El otro caso, E16, es la única neurona encontrada que presenta una proyección exclusivamente a LSt (fig.3-5F). Además de E16, dos casos de neuronas de proyección asignadas, a los grupos I (E8) y II (E11), presentaron una bifurcación ventral del axón de proyección, terminando sobre LSt (figs. 3-3 y 3-4). Estas dos neuronas fueron clasificadas como grupo I y II debido a que el criterio de agrupación se basó en la proyección dentro del circuito colopalial. Cabe destacar que ambos casos de neuronas se ubican en el centro de E, lo cual es coherente con los datos previos indicando que la proyección hacia LSt se origina desde la mitad ventral de E.

Dentro de los casos E1 a E14 agrupados como tipo I (mesopalio proyectante o columna formante) y tipo II (Ni proyectante), el único caso que muestra poca congruencia con el criterio de separación es el caso E4 (fig.3-5H). En este, junto con el axón recto subiendo en dirección a M se pudo observar otros axones dispersos distribuidos en Ni.

En la **figura 3-5** se presenta una serie de fotografías de las morfologías de algunos axones, soma y dendritas de los casos no reconstruidos.

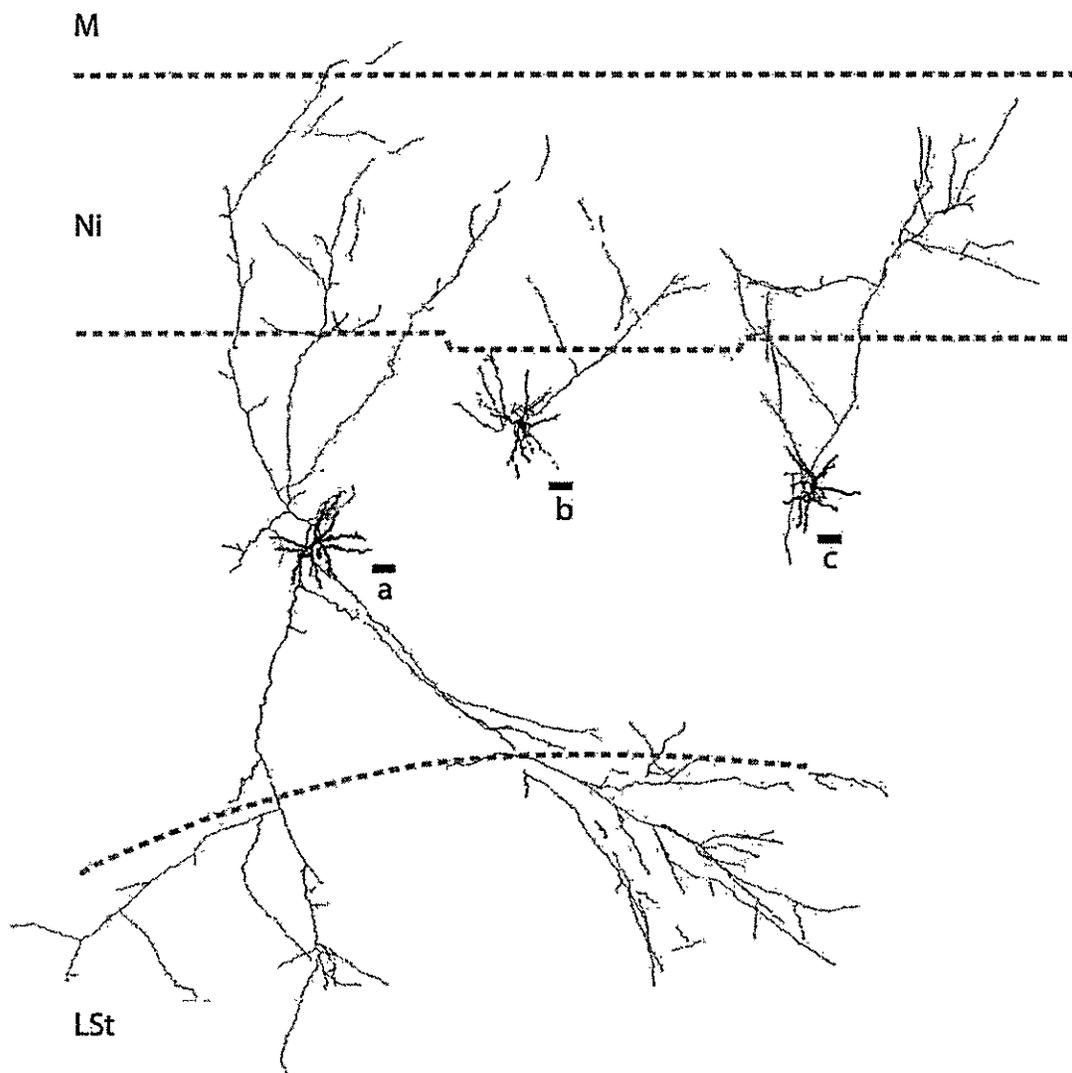


Figura 3-4. Neuronas entopaliales tipo II. Dibujos en cámara lúcida de 3 reconstrucciones de neuronas llenadas en rebanadas vitales de telencéfalo. Las neuronas presentadas a-c corresponden a los casos E10, E11 y E12 respectivamente. Los límites de las láminas se indican con líneas grises discontinuas. Barra de calibración 50 μ m.

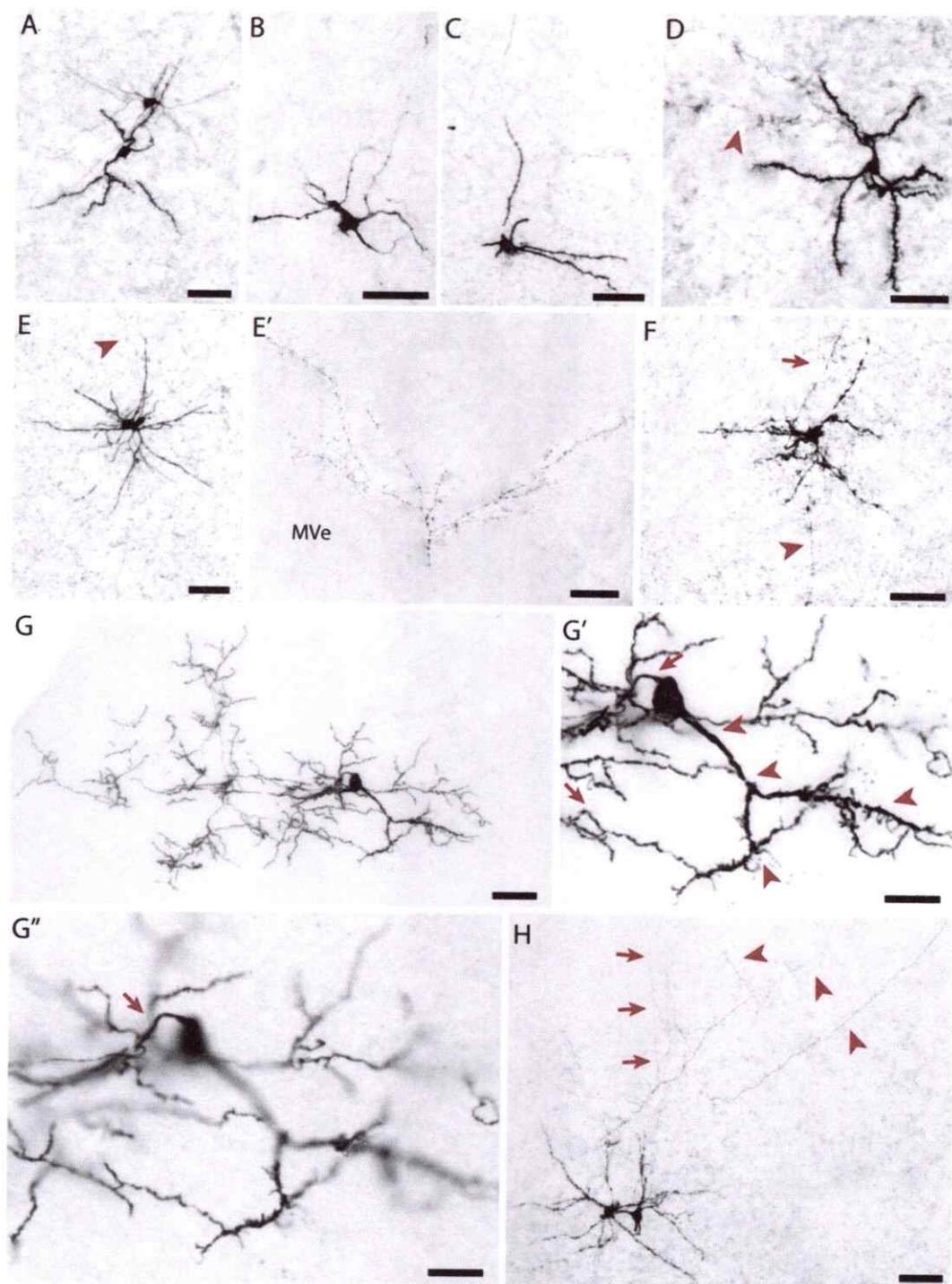


Figura 3-5. Fotografías de neuronas entopiales. Imágenes de neuronas llenadas intracelularmente con biocitina HCl en E, reveladas hisoquímicamente. Los casos presentados corresponden a neuronas no dibujadas en la **figura 3-3** ni **3-4**, pero sí caracterizadas en la **tabla 3-1**. **A:** Neurona E6. **B:** Neurona E9. **C:** Neurona E14. **D:** Neurona E13, la punta

de flecha señala su axón. **E**: Neurona E7, la punta de flecha indica el comienzo del axón recto. **E'**, terminales del axón recto en M; **F**: Neurona E16, la flecha indica una rama dorsal del axón, la punta de flecha muestra el comienzo del axón a lSt. **G**: neurona E15 con axón y terminales solo en E. **G'**: Magnificación de la neurona en **G**, las dendritas se indican con punta de flecha y el axón con flechas. **G''**: Plano focal mostrando el axón saliendo del soma indicado con una flecha, aquí se puede notar la diferencia del axón con las dendritas. **H**: Neuronas E4, se indica con flechas el axón recto en dirección hacia M y con puntas de flecha los axones dispersos terminando en Ni. Barra de calibración 50 μm para todas las imágenes excepto para **G'** y **G''**, donde corresponde a 25 μm .

Caracterización de las proyecciones interlaminares y elementos neuronales de Ni.

Las proyecciones de Ni dentro del coloplio visual son desconocidas. Debido a esto para formarnos una idea inicial de su organización, realizamos inyecciones restringidas de biocitina-HCl 10% en esta lámina. Al hacer esto, obtuvimos consistentemente (4 casos, sagital) marca de células y axones en las láminas dorsal y ventral del coloplio (M y E). Esta marca se distribuye de manera perpendicular a las láminas, en el mismo sentido de las columnas de axones entopaliales, dibujando una columna de células mezcladas con procesos como resultado de cada inyección (fig. 3-6). Junto con la marca columnar, también se observan abundantes procesos axonales laterales terminando en el mismo Ni.

Si bien estos resultados sugieren una proyección desde Ni hacia las otras láminas del coloplio visual y desde las otras láminas hacia Ni, solo a través de los llenados intracelulares obtuvimos datos concluyentes en este sentido. En la **tabla 3-2** se muestra la caracterización de 7 casos de neuronas llenadas en Ni y en las **figuras 3-7 y 3-8** se presenta una reconstrucción y fotografías de los detalles morfológicos de estos casos. En estos resultados se distinguen varios aspectos característicos de la morfología de las neuronas del Ni (**tabla 3-2**). Estas neuronas presentan de 3-5 dendritas primarias que ramifican habitualmente en trifurcaciones (fig. 3-8A). Los radios dendríticos observados en ocasiones

alcanzan extensiones de hasta 200 μm . El diámetro somático promedio de los 7 casos, medido en el eje mayor es $15,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ y el área $161 \pm 6 \mu\text{m}^2$. El axón de estas neuronas se caracteriza por tener una gran cantidad de bifurcaciones, con abundantes terminales horizontales localizados en el mismo Ni (fig. 3-7), tal como fue sugerido por las inyecciones extracelulares. Según las morfologías axonales, M y Ni son las láminas que reciben las proyecciones más abundantes desde estas neuronas (tabla 3-2, fig. 3-7, 3-8D). Además de la proyección sobre M y Ni, en todos los casos se observó un axón de proyección, distinguido como un largo axón que viaja a través del Ni hacia regiones caudales o rostrales del palio (figura 3-8D, punta de flecha; 3-81G, esquema de axones de proyección). En los casos presentados fue menos habitual encontrar terminales sobre E; ésto se observó solo en 4 de ellos, de manera escasa en cantidad y principalmente en el borde dorsal de E. Por último, un único caso muy claro de proyección sobre el estriado lateral, ventral a E, fue obtenido y reconstruido (fig. 3-7).

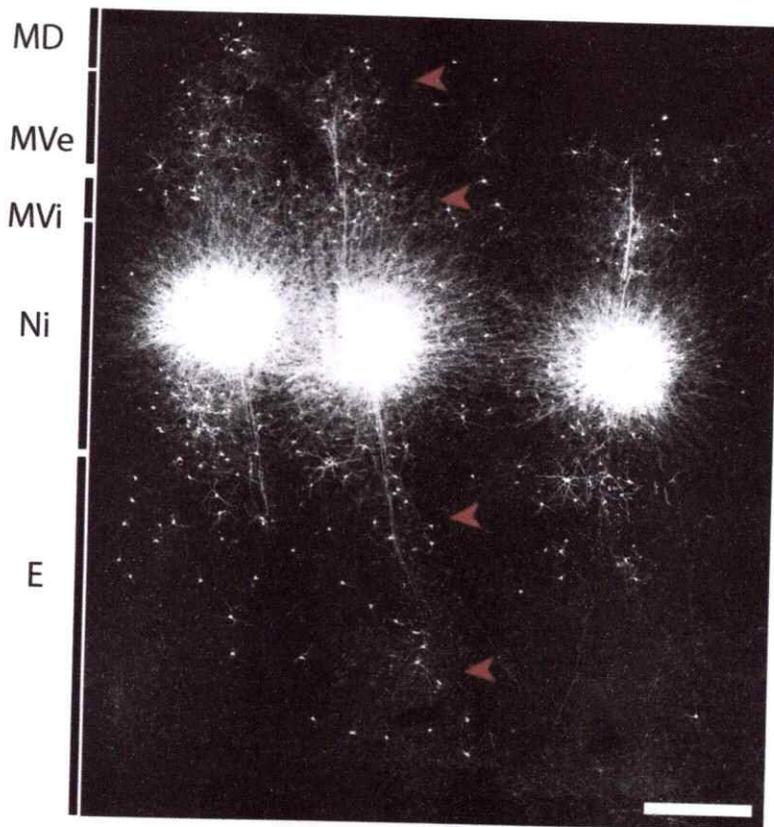


Figura 3-6. Conectividad intracircuito de la lámina intermedia Ni. A: Triple inyección extracelular de biocitina-HCl 10% en Ni. Las puntas de flecha roja indican grupos de células marcados en las distintas láminas como producto de la inyección central. Barra de calibración, 500 μ m.

Tabla 3-2. Resumen de casos de neuronas en Ni llenadas intracelularmente en rebanadas. En la tabla se indica el número de células llenadas por rebanada, cantidad de procesos axonales observados en cada lámina del coloplio visual, presencia de axón de proyección (pry.) y cantidad de espinas dendríticas (Esp. Dend.).

caso	N° cels.	Terminales					Axón pry.	Esp. Dend.
		Md	Mv	Ni	E	LSt		
Ni1	2	+	+++	+++	-	-	+	++
Ni2	1	+	+	+++	+	-	+++	+++
Ni3	1	-	+	+++	-	-	+++	++
Ni4	1	+	+++	+++	+	-	+++	+++
Ni5	1	+	++	++	-	-	+	+++
Ni6	1	+	+	+	++	-	+++	+++
Ni7*	1	++	+++	++	+	+++	+++	+++

Simbología, -: no se observa; +: escasos; ++: medio; +++: abundantes; *: célula reconstruida y presentada en figura 3-7.

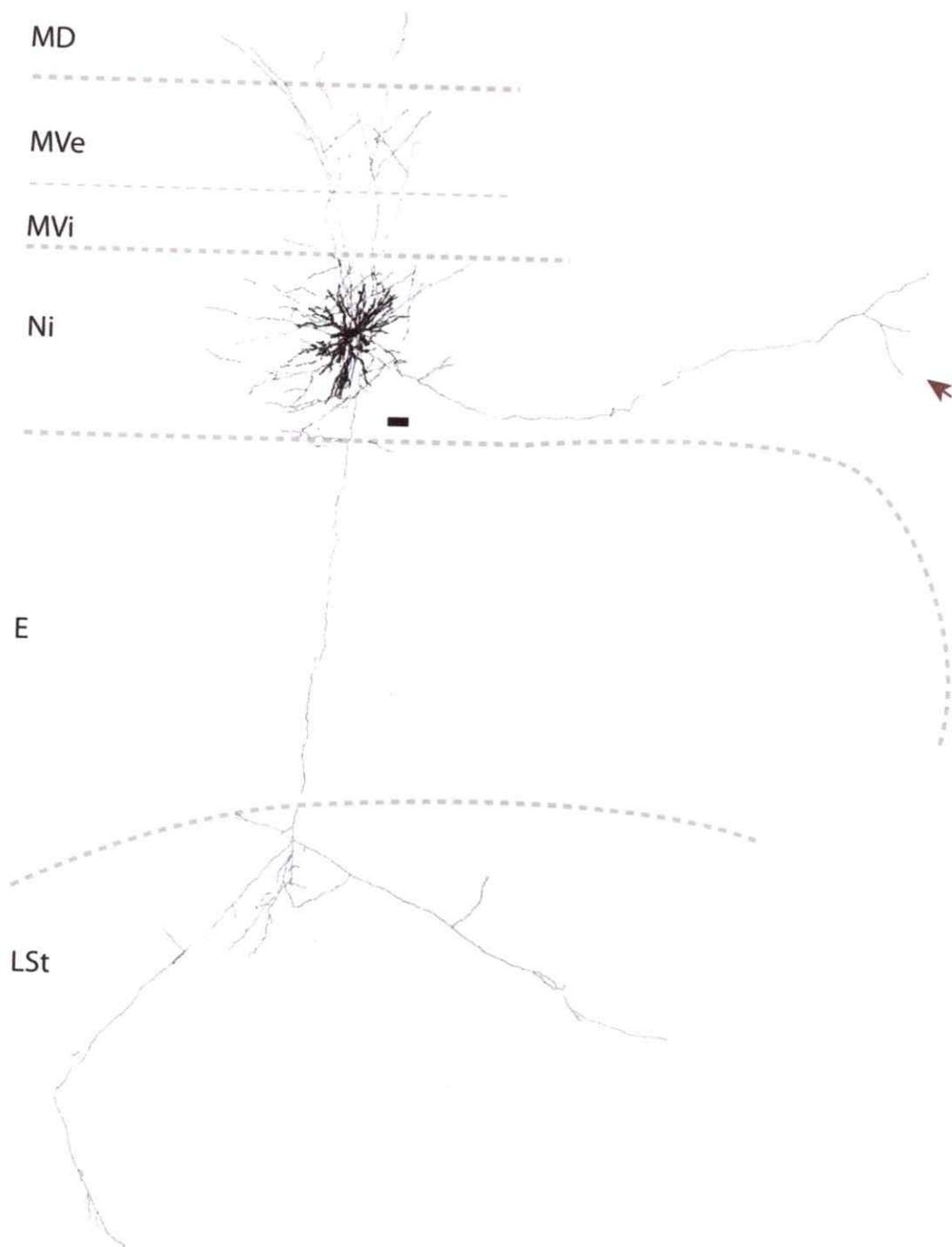


Figura 3-7. Subtipo neuronal de Ni. Dibujo de una reconstrucción en cámara lúcida de la neurona Ni7, llenada intracelularmente en una rebanada telencefálica. Debido a la proyección a LSt, representa un posible subtipo neuronal de Ni. La flecha señala el axón de eferencia observado en la mayoría de las neuronas encontradas en esta lámina. Barra de calibración 50 μm .

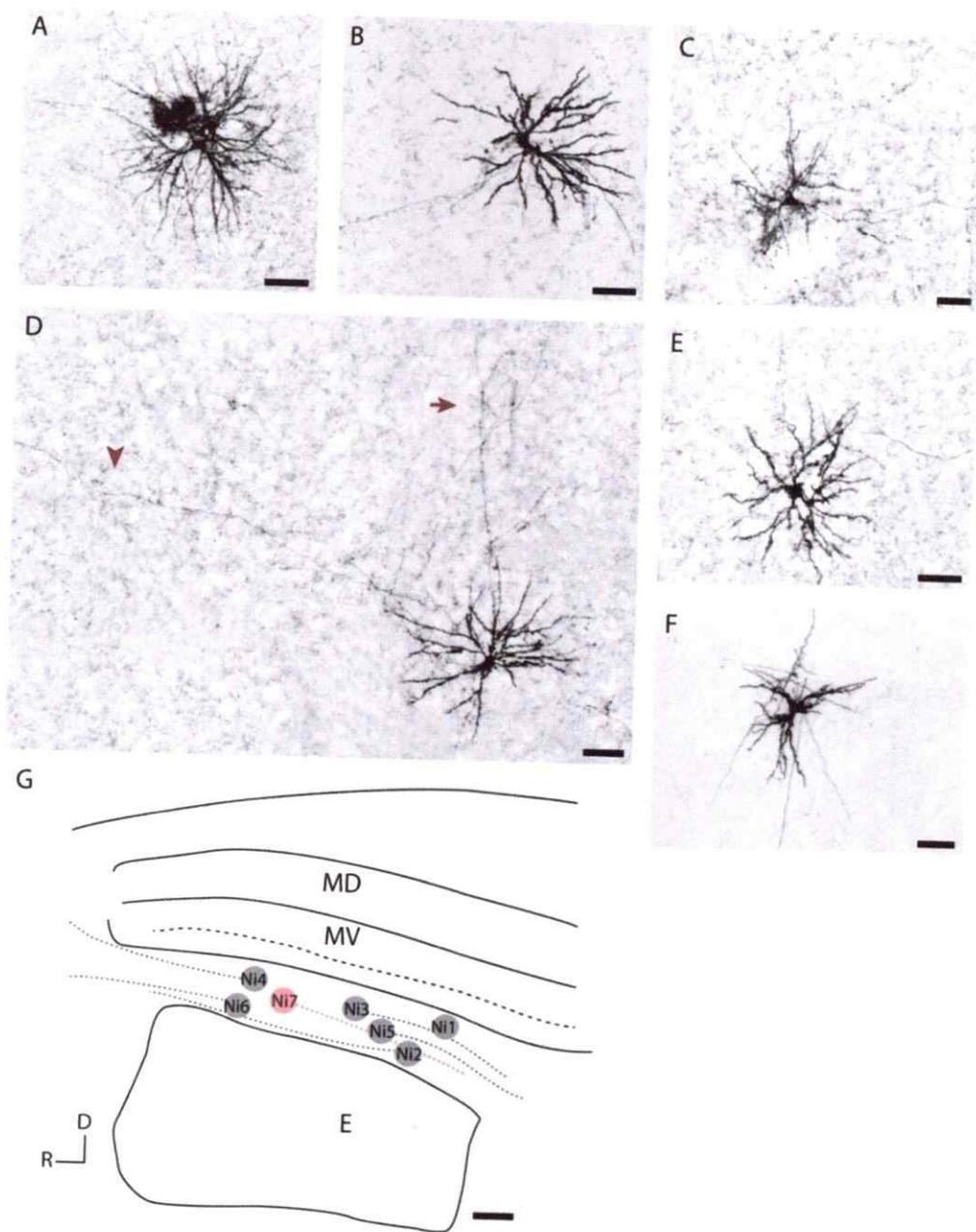


Figura 3-8. Neuronas llenadas intracelularmente en Ni. Los casos presentados en esta figura corresponden a neuronas no dibujadas pero si fotografiadas y caracterizadas en la **tabla 3-2**. **A:** Neurona Ni1. **B:** Neurona Ni2. **C:** Neurona Ni3. **D:** Neurona Ni4, la flecha indica axones dorsales en dirección a M. La punta de flecha señala una rama del axón que da origen a la proyección de referencia. **E:** Neurona Ni5. **F:** neurona Ni6. **G:** Esquema resumen de la posición de cada neurona en Ni y el largo de los axones de referencia observados en cada neurona. En color rojo se resalta el caso Ni7 presentado en la **figura 3-7**. Barra de calibración de A-F, 50 μm ; G, 500 μm .

Caracterización de las proyecciones interlaminares y elementos neuronales de M.

El detalle de las proyecciones mesopaliales dentro del colopallio visual fue estudiado en preparaciones de rebanadas de telencéfalo. Inicialmente mediante inyecciones extracelulares en MV (4 casos, rebanadas sagitales), pudimos apreciar con claridad los axones en arreglo columnar originados en M. Tal como describimos en Ahumada-Galleguillos y col. (2015), encontramos que esta proyección se extiende a lo largo del mesopallio. Esto se puede ver explícitamente en la **figura 3-9A** donde se presenta una triple inyección a lo largo del eje rostro-caudal, resultando axones en dirección a E desde cada sitio inyectado. Además de los axones columnares atravesando el Ni, en esta lámina intermedia se pueden observar terminales que se caracterizan por separarse del curso columnar de los axones descendentes y distribuirse desordenadamente (**fig. 3-9B y C**, puntas de flecha roja). En las imágenes se observa también una gran cantidad de axones laterales originados desde cada sitio de inyección, los cuales parecen terminar principalmente en el mismo mesopallio y en el nidopallio intermedio (**fig. 3-9A**, inyección izquierda). Esta organización de las proyecciones intrínsecas al colopallio, fueron corroboradas mediante siete casos de neuronas llenadas intracelularmente.

Las neuronas mesopaliales obtenidas en los llenados intracelulares muestran morfologías estelares. En todos los casos se contaron 6 dendritas primarias que bifurcan normalmente en dos ocasiones.

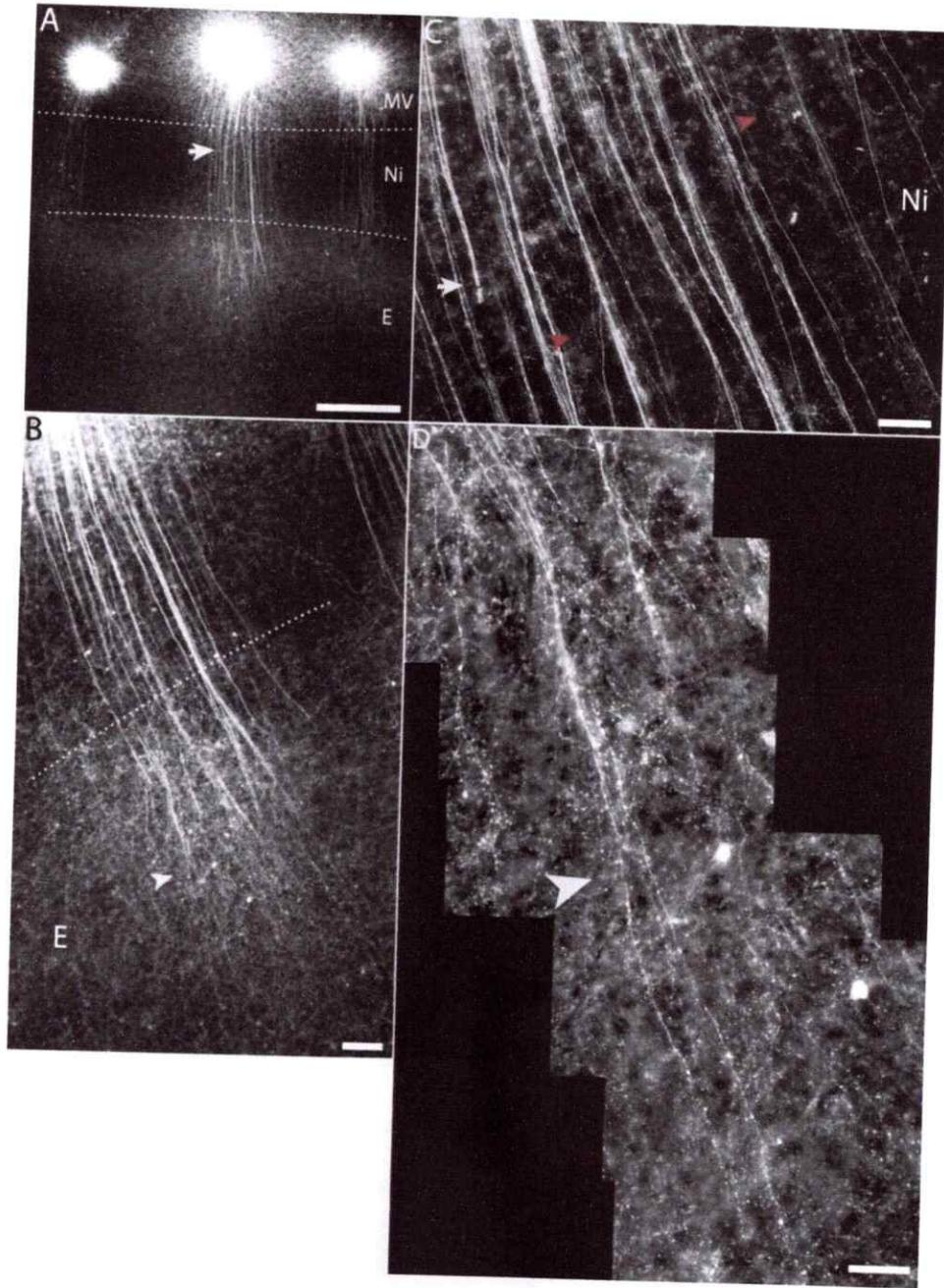


Figura 3-9. Proyecciones mesopiales interlaminaeres. **A:** Experimento de triple inyección extracelular de biocitina-HCl 10% en M en rebanada telencefálica sagital. **B:** Fotografía de los procesos originados como producto de la inyección central presentada en A. **C:** Fotografía en gran aumento de las fibras mesopiales en curso hacia las láminas ventrales. La flecha blanca está alineada con la flecha en el panel A, las puntas de flecha roja indican procesos y terminales en Ni. **D:** Fotografía compuesta de varios planos focales, tomadas con alta magnificación mostrando terminales mesopiales en E. Barras de calibración en A, 500 μm ; B, 50 μm ; C, 100 μm ; D, 40 μm .

Los radios dendríticos son grandes llegando a 200 μm ; el diámetro somático promedio medido en el eje mayor es $14,9 \pm 1,5 \mu\text{m}$ y el área promedio $136 \pm 21 \mu\text{m}^2$. Otros rasgos de la morfología de estas neuronas, principalmente relacionados a las láminas en que termina su axón se presentan en la **tabla 3-3**.

De los siete casos de neuronas mesopaliales, obtuvimos cuatro casos localizados en MVe con axones de proyección completos hasta E (casos M1-M4). En todas estas neuronas desde el axón principal se desprenden sucesivas ramas colaterales, desde el segmento inicial cercano al soma. Estas ramas describen cursos hacia dorsal, rostral y caudal en el mismo mesopalio. Este axón, luego de dar origen a las ramificaciones radiales terminando en M, viaja ventralmente en dirección a E. En este curso final, se observan ramificaciones al nivel de la sublámina MVi y Ni antes de alcanzar el entopalio (**fig. 3-10, 3-11A y B**). La morfología terminal de los axones mesopaliales, parecen en general poco especializadas sin formar estructuras complejas en los distintos blancos (**fig. 3-9D, fig. 3-10, fig. 3-11A y B**, puntas de flecha).

Por último, un presunto subtipo neuronal fue encontrado en la sublámina MVi (división de M inmediatamente dorsal al límite Ni-M). Estas neuronas presentan un árbol dendrítico polarizado hacia dorsal, el que se extiende hasta MVe (casos M7 y M8, **tabla 3-3, fig. 3-12**). Esto fue encontrado en dos instancias y resultó llamativo debido a que las fibras desde E casi no terminan

directamente sobre MVi, siendo MVe la lámina donde terminan mayormente las fibras columnares. De ese modo el árbol dendrítico polarizado de las neuronas de MVi podría recibir aferencias directas desde E.

Tabla 3-3. Resumen de casos de neuronas mesopaliales llenadas intracelularmente en rebanadas. En la tabla se indica el número de células llenadas por rebanada, cantidad de procesos axonales observados en cada lámina del coloplio visual, posición en sublaminas de M y cantidad de espinas dendríticas.

caso	N° cels.	Terminales			ubicación	Esp. Dendr.
		M	NI	E		
M1	2	+++	+++	+	MV ex	+++
M2*	2	++	++	++	MV ex	+++
M3	1	+++	++	++	MV ex	++
M4	1	++	+	++	MV ex	++
M5	1	++	+	-	MV no vis	+++
M6	1	+++	++	-	MV no vis	+++
M7	1	+++	++	-	MV in	+++
M8	1	++	++	-	MV in	+++

Simbología, -: no se observa; +: escasos; ++: medio; +++: abundantes; *: célula reconstruida y presentada en figura 3-10. Los niveles de sombreado indican la sublaminas de M en que se encuentran ubicados los distintos casos.

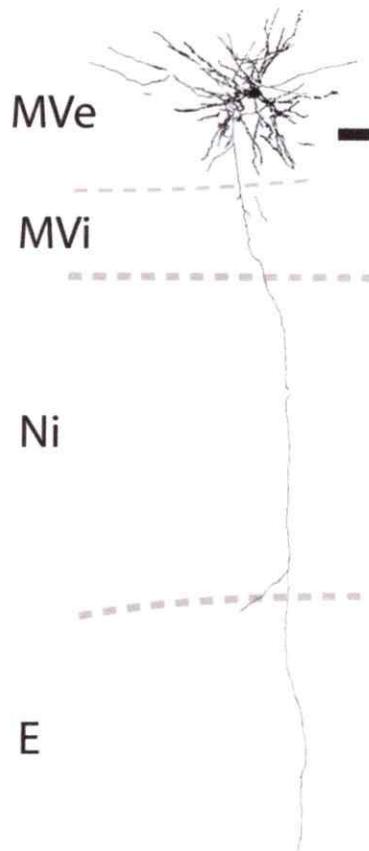


Figura 3-10. Neurona mesopialial con axón columnar. Dibujo de una reconstrucción en cámara lúcida de la neurona M2, llenada intracelularmente en la lámina ventral externa de M en una rebanada telencefálica. Corresponde al subtipo celular característico de proyección "columnar" entre M y E. Barra de calibración 50 μm .

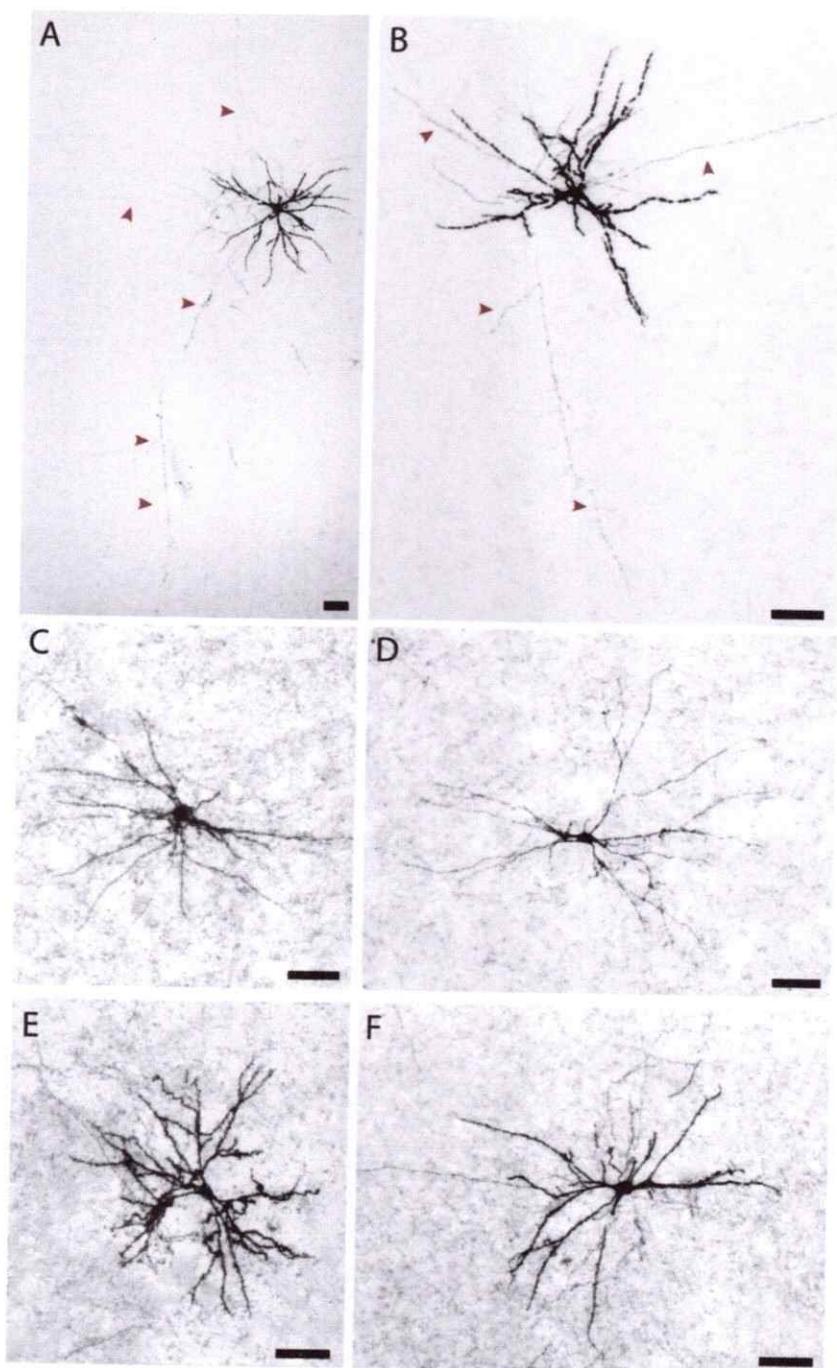


Figura 3-11. Morfología de neuronas mesopiales. Fotografías de neuronas llenadas intracelularmente en rebanadas de telencéfalo. Con excepción de la neurona en B, las neuronas presentadas no fueron dibujadas pero si caracterizadas en la **tabla 3-3**. **A:** Neurona M1. **B:** Neurona M2, en **A** y **B** las puntas de flecha indican ramificaciones del axón columnar. **C:** Neurona M3. **D:** Neurona M4. **E:** Neurona M5. **F:** Neurona M6. Barra de calibración de A-F, 50 μ m.

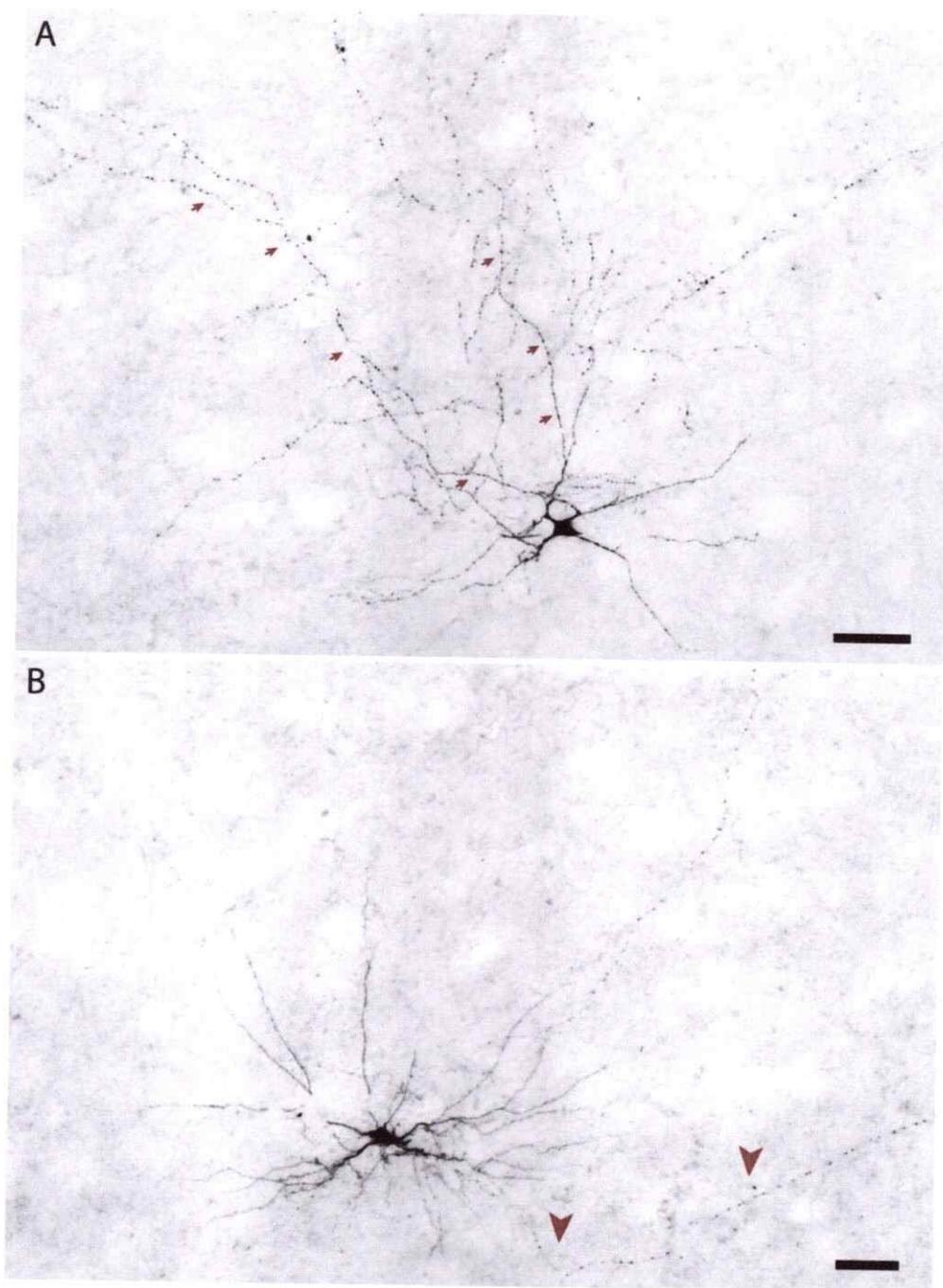


Figura 3-12. Morfología de neuronas de M_{Vin}. Fotografías de neuronas llenadas intracelularmente en rebanadas de telencéfalo. **A, B:** en ambos paneles se muestran llenados intracelulares de neuronas localizadas en la lámina más ventral de M, ambas neuronas presentan un árbol dendrítico polarizado. Las flechas en **A** señalan distintas ramas del árbol dendrítico. En **B** las puntas de flecha señalan el axón. Barra de calibración, 50 μ m.

DISCUSIÓN

El objetivo central de este trabajo fue estudiar en detalle la conectividad intrínseca del colopallio visual. Al estudiar mediante trazadores las relaciones internas de esta estructura, los procesos de axones columnares recíprocos entre E-M son probablemente el rasgo estructural más evidente, por lo masivo de la proyección y por su extensión a lo largo de los ejes longitudinales en que E se enfrenta con M. Krützfeldt & Wild (2005) reconocieron la robustez de esta proyección previamente y aunque pasaron por alto su extensión y homotopía, ellos sugieren por primera vez que M debería ser considerado un componente de la vía tectofugal. Esta proposición se sostuvo en que la proyección E-M había sido observada por ellos en tres distintos órdenes de pájaros (Columbiforme, Paseriforme y Galliforme). A pesar de esto la comprensión del colopallio visual como un módulo trilaminar incluyendo al entopallio, mesopallio y nidopallio intermedio, fue planteada posteriormente por nosotros en Ahumada y col. (2012), debido a la topografía de la proyección E-M, su extensión a todo el entopallio/mesopallio y a que Ni participaría del circuito.

La proyección E-Ni fue sugerida previamente mediante trazado extracelular, indicándose como una proyección desde el core del entopallio hacia su belt, que según algunos autores incluía parte del Ni (Karten & Hodos, 1970; Ritchie, 1979; Husband y Shimizu 1999; Alpár & Tömböl, 2000). Esto se hizo mediante inyecciones de trazador en el core de E; al hacer esto no se tomó en cuenta que

los terminales en el *belt* podrían corresponder a axones talámicos de paso atravesando E (descritos por Egidi & Tömböl, 1994). En nuestro trabajo ambas proyecciones descritas desde E fueron confirmadas y caracterizadas a nivel celular (E-M y E-Ni) mediante llenado intracelular, obteniendo resultados que permiten concluir que estas se originan en tipos neuronales diferentes. La presencia de distintos tipos de neuronas de proyección en E fue descrita anteriormente, utilizando una variación de la tinción de Golgi por Tömböl y col. (1988). En este trabajo fueron reportados dos tipos de neuronas, uno localizado en el core del entopallio (Ec) y el otro en el *belt* (Ep). La morfología de las neuronas Ec reportadas, se asemejan bastante a la morfología somática y dendrítica de nuestras "tipo I". La morfología del axón de las Ec también coincide, el cual según los autores cursa dorsalmente de forma recta casi sin dar colaterales, aunque no se indica dónde terminan. Además algunos casos de neuronas Ec muestran axones ramificando cerca del soma donde la segunda rama viaja ventralmente hacia el LSt, lo que coincide con nuestros casos E8 y E10 (fig. 3-3 y 3-4). A pesar de estas similitudes, los tamaños reportados difieren siendo de 16 a 20 μm de eje mayor somático para las Ec de Tömböl y col. (1988) y de 10 a 18 μm para las nuestras. Una explicación a esto podría ser que las neuronas Ec de Tömböl y col. (1988), estén mezcladas con nuestras "tipo II", ya que estas tienen tamaños mayores, lo que provocaría un aumento del rango de tamaño de las neuronas en Ec.

En relación a las neuronas Ep de Tömböl y col. (1988), nos pareció que morfológicamente podrían corresponder con nuestras neuronas del Ni. Esto es posible ya que en la literatura habitualmente los autores mezclan el Ep con parte del Ni. Otro aspecto favorable con esta idea es que las neuronas Ep de ellos son muy diferentes en morfología a cualquiera de nuestras neuronas entopaliales y semejantes a las Ni. Los autores describen para Ep árboles dendríticos extensos de hasta 300 μm de diámetro y somas redondeados, tal como varios de nuestros casos del Ni. Una discrepancia es que ellos describen una gran cantidad de dendritas primarias para las neuronas Ep (7-10) lo cual dista de nuestros resultados que muestran una moda de 4 para el Ni. Esto podría coincidir en caso que los moños o trifurcaciones cercanas al soma observadas por nosotros, fuesen consideradas dendritas primarias separadas por ellos. Por último, tampoco hay una coincidencia perfecta de los tamaños somáticos ya que nuestras neuronas de Ni presentan rangos de 14 a 16 μm y las Ep de ellos 18 a 21 μm , aunque esto puede ser atribuido (al igual que para Ec vs tipo I) al método de tinción y a los criterios de medición.

En relación a otras caracterizaciones celulares del palio de aves, Wang y col. (2010), describió en el DVR auditivo la presencia de dos morfologías de neuronas de proyección ubicadas en la lámina tálamo recipiente (llamada L2a y forma columnas con el mesopalio auditivo). Coincidentemente con nuestros resultados en E, Wang y

col. (2010) presentan un tipo de neuronas con morfología multipolar y área somática promedio $255 \mu\text{m}^2$, con un axón que origina numerosas colaterales terminando dispersamente en la lámina L1 (equivalente al Ni), similar a nuestras neuronas tipo II, que terminan principalmente en Ni de manera dispersa y con áreas somáticas promedio de $205 \mu\text{m}^2$. El segundo tipo neuronal descrito por Wang y col. (2010), es una neurona columna formante comparable a nuestro tipo I, de tamaños pequeños y diámetros promedio $9,8 \mu\text{m}$ (las nuestras $13,4 \mu\text{m}$). Si bien los tamaños celulares no coinciden exactamente, esto puede deberse a diferencias de criterios de medición o a la técnica utilizada para llenar las neuronas, que en el caso de las "columna formante" de L2a, fue hecho con inyecciones extracelulares de trazador retrógrado en el mesopallio. A pesar de esto las morfologías neuronales encontradas en ambas áreas del DVR son equivalentes y las diferencias en tamaño son congruentes, siendo en ambos casos más pequeñas las neuronas columnares que las de proyección al Ni. Esta similitud podría indicar una organización general del DVR sensorial a nivel de tipos celulares.

En relación a otros tipos de neuronas entopalliales, encontramos solamente tres casos de neuronas de proyección a LSt. Esto probablemente se deba a la poca cantidad de neuronas obtenidas en la parte ventral de E, donde estas se distribuyen principalmente (Krützfeldt & Wild, 2005; Ahumada-Galleguillos y col., 2015). El

hecho de que dos casos de neuronas de proyección al estriado participen de la proyección hacia el colopalio, sugiere que las neuronas LSt proyectantes podrían existir en dos tipos, unas que además de ir al subpalio proyectan al colopalio visual y otras exclusivamente de proyección a Lst, aunque esto requiere mayor cantidad de material para ser concluido. Otro punto que amerita una inspección más exhaustiva es la descripción de las morfologías de interneuronas. En la literatura se han descritos al menos 3 tipos distintos presentes en E y algunos trabajos realizados en nuestro laboratorio y en la literatura se ha reportado la presencia de neuronas GABAérgicas en las tres láminas del colopalio visual (Csillag y col., 1989; Csillag, 1991).

En relación a las neuronas obtenidas en Ni este reporte es el primero en describirlas. Debido a que en el capítulo 4 realizamos una descripción detallada de la relación del colopalio visual con el resto del telencéfalo, sabemos que las neuronas de Ni son las eferentes del circuito. A nivel celular esto se refleja en que todos los casos vistos presentan un axón largo de proyección. Un aspecto morfológico interesante obtenido desde los *fillings* en Ni, es la gran cantidad de terminales dejados por las neuronas en el mismo Ni y en M. Analizando esto desde el circuito intrínseco, se logra apreciar un aspecto importante de su organización que es la recurrencia de las proyecciones. Esto ya que la actividad de Ni, podría afectar el flujo en E y sobre el mismo Ni, a través de la proyección hacia M. Esto ya que las células de M terminan

masivamente en E y Ni, esto se puede apreciar mejor en el resumen de la **figura 3-13**.

De las morfologías encontradas en M, se puede decir que son células estelares muy parecidas a las descritas por Wang y col. (2010), formando la proyección columnar desde el mesopalio auditivo hacia la lámina tálamo recipiente L2a. En ambas regiones sensoriales (visual y auditiva) las neuronas de M dejan gran cantidad de terminales en el mismo mesopalio y en Ni en su curso hacia E y L2a.

Por último en el mesopalio describimos un posible morfotipo en la sublámina MVi. Estas neuronas muestran una morfología dendrítica polarizada dorsalmente hacia MVe. Esto se podría relacionar con que los axones de proyección entre E y M, terminan principalmente en MVe, dejando prácticamente libre de terminales la sublámina MVi.

Laminación, columnaridad, recurrencia y modularidad del colopalio

La organización del colopalio como un módulo formado por al menos tres láminas fue propuesto previamente (Jarvis y col., 2013; Ahumada-Galleguillos y col., 2015). Nuestros resultados apoyan la laminación de colopalio visual, al demostrar que cada una de sus divisiones (E, Ni y M) se compone de tipos celulares específicos tal como una lámina de cualquier estructura laminada del cerebro.

Además, en E y M es evidente la presencia de mas de un tipo neuronales entremezclados.

Las morfologías axonales de las neuronas en las distintas láminas se orientan mayoritariamente de forma perpendicular al eje longitudinal de las láminas, en la mayoría de los casos sin extenderse más allá de 500 μm en el eje horizontal. Esto soporta la columnaridad dentro del área colopallial visual, ya que las neuronas de un punto cualquiera se encuentran conectadas con las neuronas de las láminas dorso-ventrales con mayor énfasis que con las neuronas de su misma lámina. Esto resulta en columnas de neuronas anatómicamente relacionadas. No obstante, la presencia de procesos laterales es significativa tal como se observó en Ni y M.

Las morfologías axonales descritas además permiten imaginar el flujo sensorial entre las distintas láminas de la forma que fue esquematizado en la **figura 3-13**. Al observar el diagrama resumen, se puede apreciar la recurrencia del circuito sobre las neuronas que reciben el flujo sensorial entrante en E. Esto ocurre específicamente mediante los axones de las neuronas de M terminando sobre E, y desde las neuronas del Ni a través de M. Según la proyección de las neuronas en M, éstas tendrían un efecto recurrente sobre las neuronas en M, E y Ni. En este caso la proyección de M, sobre M y Ni, podría representar un proyección

que retroalimente positivamente la recurrencia sobre E (ya que Ni proyecta masivamente sobre M).

Finalmente respecto a la modularidad, ésta puede ser entendida de dos maneras: 1) Como la repetición de un patrón conectivo, es decir dentro del DVR visual se repetiría un módulo conectivo (como indica Ahumada-Galleguillos, 2015). 2) A la forma de organización general del coloplio visual como un área visual (módulo) especializada anatómicamente, con distintas láminas que operan de forma conjunta debido a la conectividad intrínseca. A nuestro parecer los resultados anatómicos presentados aquí soportan ambas interpretaciones de modularidad en el coloplio visual (fig. 3-13).

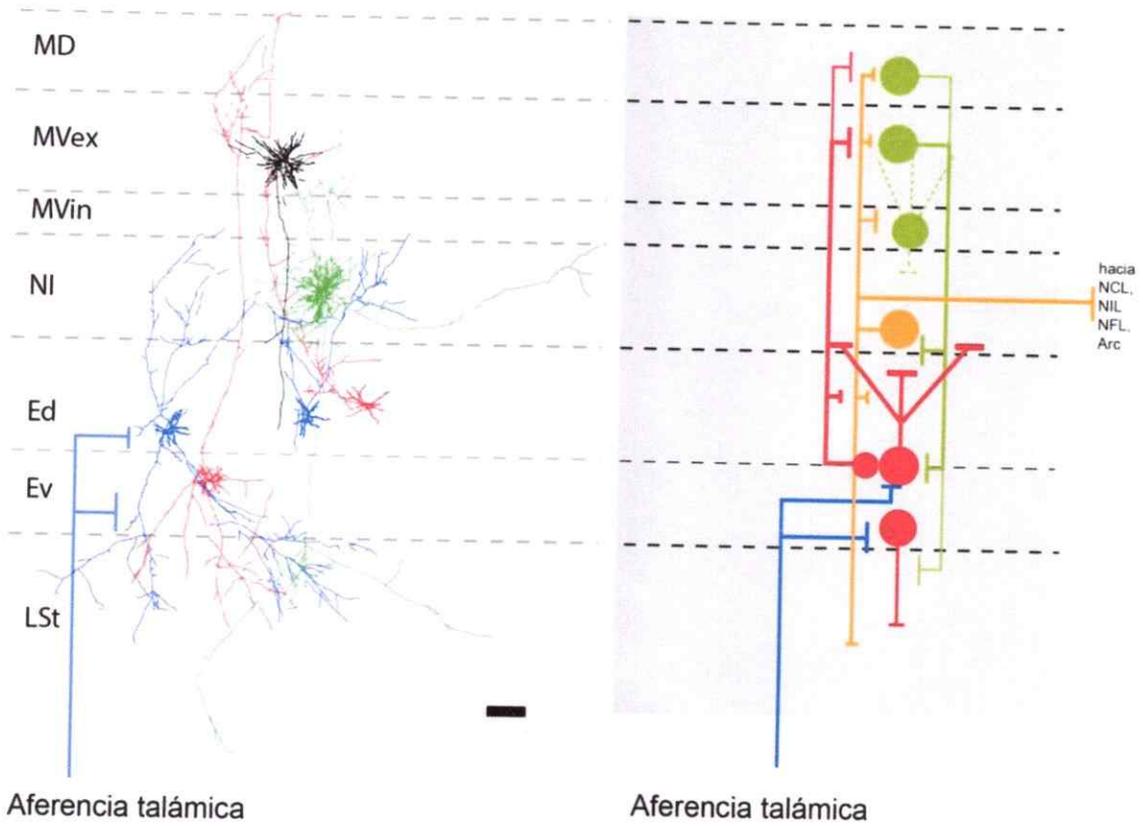


Figura 3-13. Resumen de las proyecciones interlaminares del coloplio visual. En el esquema se muestran los principales subtipos neuronales encontrados en cada lámina y los procesos recurrentes entre láminas que forman el circuito del coloplio visual. Barra de calibración, 200 μ m.

Comparación con mamíferos

La homología del DVR con la corteza de mamíferos ha sido propuesta por distintos autores usando argumentos principalmente hodológicos. Esta equivalencia supone que las neuronas entopaliales corresponden funcionalmente a las neuronas de la lámina 4 (L4), por recibir aferencias sensoriales, y las neuronas del *belt* (para nosotros Ni solamente) con las de la lámina 2 y 3 (L2/3), por participar de la proyección hacia otras regiones paliales. Además de la equivalencia hodológica algunos autores han argumentado una equivalencia a nivel celular, proponiendo que el DVR poseería algunos tipos celulares comparables morfológicamente a los encontrados en la corteza (Wang y col., 2010). Anatómicamente esta propuesta ha sido difícil de probar debido a que el DVR no presenta morfologías piramidales, muy características en la corteza. No obstante algunos antecedentes de expresión de marcadores moleculares en el DVR y corteza, han aportado evidencia a la equivalencia celular, ya que E con L4 tanto como Ni y M con L2/3, muestran similitud en la expresión de marcadores característicos (Dugas-Ford y col., 2012; Atoji & Karim, 2012; Chen y col., 2013).

Debido a que en nuestro trabajo describimos detalles morfológicos novedosos, nos permitimos el ejercicio de comparar las neuronas encontradas en el DVR con neuronas corticales equivalentes según los criterios moleculares y hodológicos.

En relación a las neuronas entopaliales del grupo I, al revisar la literatura encontramos neuronas L4 de la corteza visual primaria que presentan morfologías estelares similares, somas pequeños (10-15 μm) y axones columnares ordenados en haces de fibras que terminan en L2/3 (fig. 3-14A-C). Estos terminales forman arborizaciones muy parecidas a las de nuestro tipo I en MVex (fig. 3-3, 3-5E').

Otra morfología de neuronas L4, descrita en la corteza somatosensorial de ratones, presenta una morfología comparable a las de nuestro grupo II. Estas neuronas son estelares, reciben aferencia talámica directa, su axón es disperso y termina en la lámina 2/3 formando parte del circuito *feedforward* típico de la corteza (fig. 3-14D).

En la figura 3-15A se muestra la morfología de una neurona L2/3 que nos parece comparable morfológicamente a nuestras neuronas encontradas en Ni, en cuanto a la cantidad de dendritas, presentar moños, abundantes espinas dendríticas, tener un axón que ramifica principalmente en la lámina 2/3, 4 y 5 y por presentar un axón eferente.

En la figura 3-15B se muestra una neurona L2/3 de corteza entorrinal similar morfológicamente a las neuronas MVi. En la figura 3-15C se muestran morfologías de neuronas estelares L2/3 que nos parecen comparables a nuestras neuronas MVe, presentando un axón recto o columnar en dirección a las láminas 4 y 5.

Finalmente según los antecedentes anatómicos presentados en este capítulo, nos parece pertinente concluir que los rasgos propuestos como centrales en la organización del colopallio visual de aves - laminación, columnaridad, recurrencia y modularidad- se evidencian como centrales en su arquitectura. En segundo lugar, nos parece que el colopallio visual de aves es una estructura rica y diversa en elementos neuronales como las áreas sensoriales primarias de la corteza de mamíferos, y que los elementos neurales del DVR forman circuitos elaborados y directamente comparables a los encontrados en la corteza.

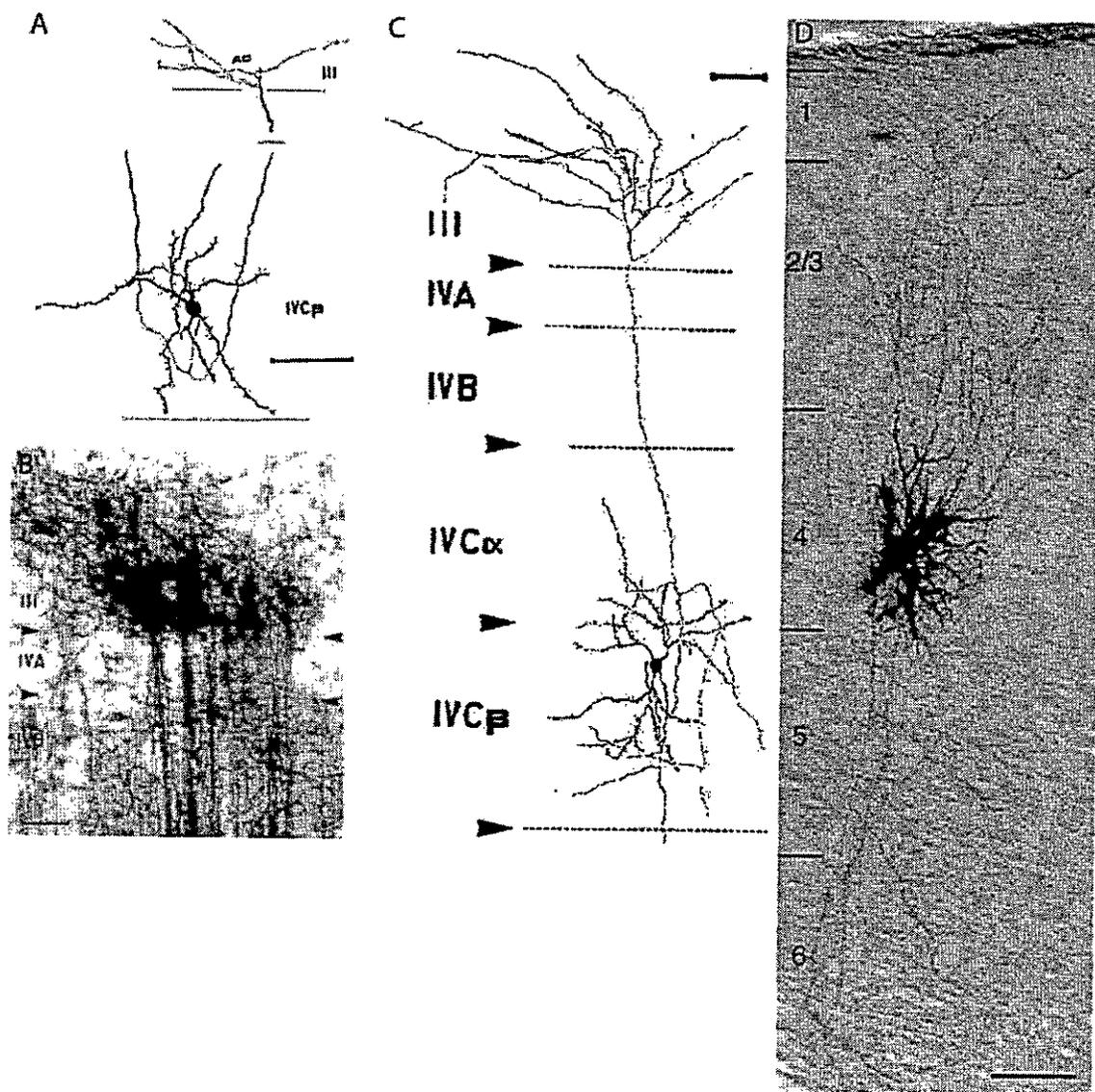


Figura 3-14. Morfologías de células estelares lámina 4 de corteza de mamíferos. A-C: Neuronas estelares L4 reportadas en la corteza visual primaria de macaco por Lund J. (1986). D: Neurona estelar característica de corteza somatosensorial primaria de rata, reportada por Lübke y col. (2000). Barras de calibración en A-C, 50 μ m; D, 100 μ m.

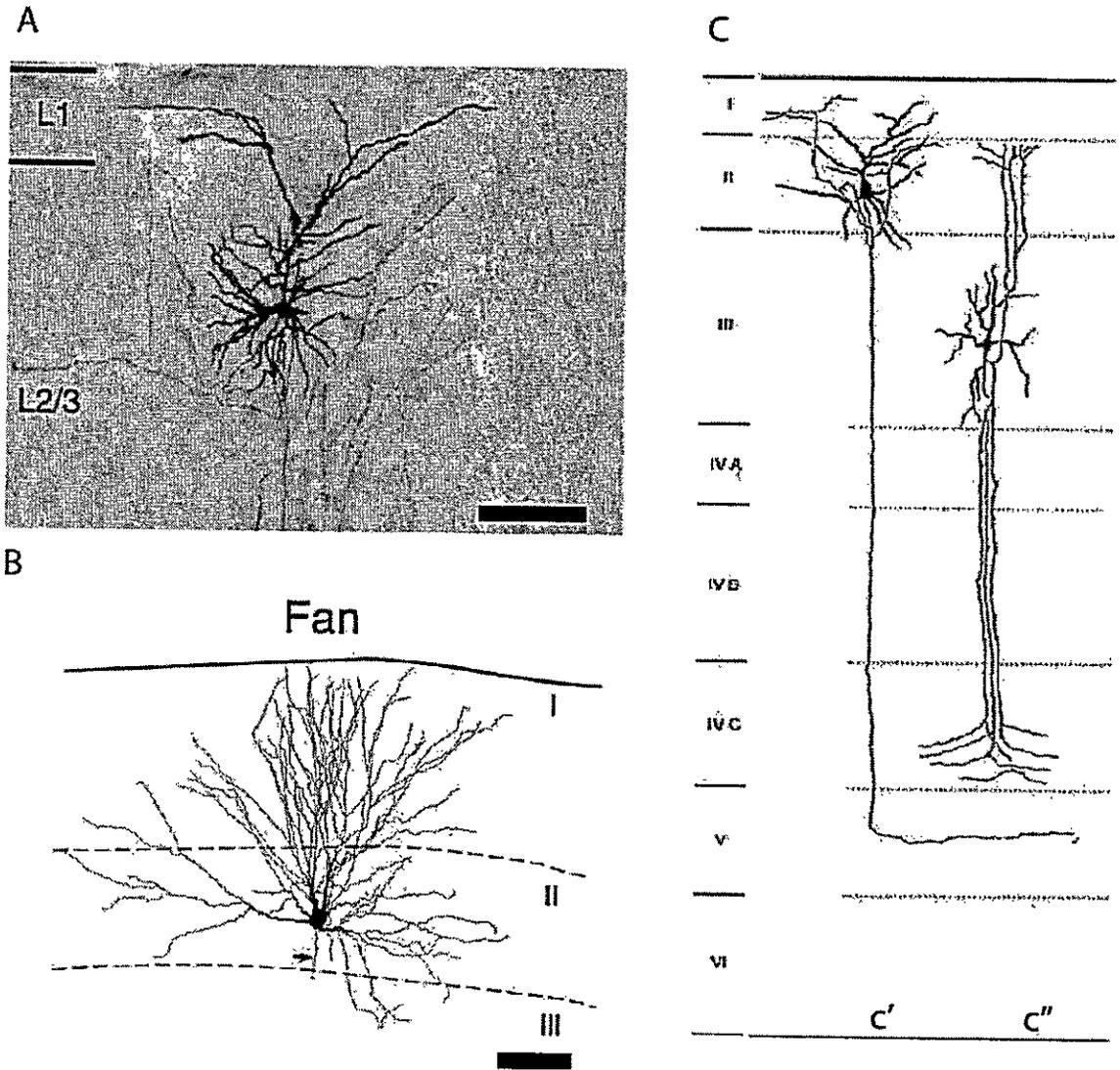


Figura 3-15. Morfologías de células estelares en láminas 2/3 de mamíferos. A: Neurona estelares L2/3 reportadas en la corteza somatosensorial primaria de rata por Lübke y col. (2003). B: Neurona con árbol polarizado característica de corteza entorrinal de rata, reportada por Tahvildari y col. (2005). C: Neuronas estelares de proyección columnar reportadas por Valverde (1985, C') y por Jones (1986, C''), tomadas de Nieuwenhuys y col. (1998). Barras de calibración para A y B, 100 μ m.

CAPÍTULO 4

REFERENCIAS DEL COLOPALIO VISUAL.

INTRODUCCIÓN

Según lo propuesto en este trabajo el colopalio visual se puede entender como una región parcelada en áreas o módulos especializados en el tratamiento específico de una modalidad. La modularidad supone que cada área está compuesta al menos de tres láminas. En las distintas láminas se encuentran tipos celulares especializados cuyos axones establecen conexiones preferentemente dentro del área formando un circuito local (capítulo 1). Además, según esta idea las distintas láminas debiesen presentar una especialización funcional, así la lámina más ventral del módulo, llamada entopalio (E) es tálamo recipiente y su extensión es claramente definida por las fibras y terminales provenientes desde el núcleo Rotundo (Rt). Dorsal a al entopalio, se encuentra la lámina central llamada nidopalio intermedio (Ni) que se extiende desde el límite dorsal de E hasta un límite glial llamado lámina mesopalial. Según hemos propuesto, el Ni se especializaría en generar las eferencias intratelencefálicas del colopalio visual. Dorsal al Ni se encuentra la tercera lámina llamada mesopalio (M), la cual según los resultados en el capítulo 3, se especializaría en establecer una proyección recurrente dentro del circuito.

Estudios previos han indicado que la división dorsal de E (*belt*, Ep) más una porción ventral de Ni estarían involucrados en generar proyecciones hacia otras áreas del telencéfalo, señaladas como áreas de segundo y tercer orden, dependiendo del número de sinapsis que las separan de E. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han interpretado y reconocido de manera diferente el *belt*, confundiéndolo con el Ni (Ritchie, 1979; Husband & Shimizu, 1999; Alpar & Tömböl, 2000). Además, en otros estudios se ha propuesto que no solo el *belt* contendría neuronas eferentes y esto ocurriría también desde la división central de E (*core*, Ec) (Husband & Shimizu, 1999; Alpar & Tömböl, 2000).

En un trabajo de Husband & Shimizu (1999) en que se estudió con detalle las proyecciones intratelencefálicas desde E, se incluye una nueva región además de Ec/Ep llamada por ellos Ep2, la cual equivale según las descripciones de los autores, a parte del Ni de nuestro trabajo. En sus resultados, muestran la presencia de una conexión lineal desde Ec a Ep y de Ep a Ep2, indicando que Ep2 y en menor grado Ec y Ep, son el origen de las eferencias hacia tres áreas paliales llamadas, nidopalio frontal lateral, área tempo-parieto-occipital, nidopalio intermedio lateral y en menor medida al nidopalio caudolateral y arcopalio. Por último, los autores proponen que esta proyección (Ec-Ep-Ep2-palio lateral) sería topográfica, resultando en que Ep2 rostral proyectaría al palio rostral y Ep2 central al central y Ep2 caudal a caudal, de modo que se conservarían los tres canales de procesamiento visual

de la vía tectofugal (ver descripción de la vía tectofugal en capítulo 1).

Antecedentes preliminares nos indicaron que las eferencias hacia otras áreas paliales se originarían exclusivamente en Ni y en ningún caso desde E. Esto sugiere una especialización laminar del Ni y por tanto del coloplio visual. Es por esto que decidimos realizar una revisión detallada de las proyecciones intratelencefálicas del coloplio visual, tratándolo como una región trilaminar. Esto se hizo combinando técnicas de histología normal con experimentos de inyecciones simples, dobles y triples de trazadores anterógrados y retrógrados.

RESULTADOS

Revisión de la organización interna del coloplio visual en palomas.

En aves la organización intrínseca del coloplio visual ha sido descrita previamente solo en trabajos que utilizaron pollos como modelo de estudio (Ahumada-Galleguillos y col. 2015). Debido a que la descripción de las eferencias del coloplio visual se realizará en palomas, el primer resultado presentado en este capítulo está dedicado a revisar de forma general su conectividad intrínseca. Para esto realizamos un experimento de doble inyección en E utilizando el trazador BDA 3K. En casos como éste el trazador usado se transporta muy bien en ambos sentidos (anterógrado y retrógrado). El material obtenido fue procesado para observar los rasgos conectivos más evidentes mostrados por la inyección y para observar la citoarquitectura de la región haciendo histología básica. Los resultados obtenidos se presentan en la **figura 4-1**. En el panel A se muestra una sección húmeda de telencéfalo, donde se distinguen las láminas debido a la fotoluminiscencia diferencial producida por la densidad de fibras heterogénea en E, Ni y M. Los haces de fibras cursando perpendicularmente a las láminas son claramente identificables también. En una tinción de Giemsa presentada en el panel B se puede ver las diferencias citoarquitectónicas entre las láminas y los límites de cada una: la lámina palio-subpalial ventral a E, el límite E-Ni y la lámina mesopalial que separa al nidopalio del mesopalio (**fig. 4-1B**). Se

ve en la imagen que el límite entre E y Ni es indicado por un cambio en la densidad celular entre las láminas (mayor en E que en Ni), también lo indica el aumento del tamaño de las células en Ni y el cambio en la distribución de éstas, dispuestas como una empalizada dorso-ventral a través de la cual, suponemos cursan los haces de fibras que conectan E y M. Las inyecciones de BDA en E muestran la proyección topográfica y recíproca E-M establecida por las fibras columnares que cruzan el Ni (fig. 4-1C, D). Asociado a cada inyección se puede ver unas pocas células llenadas retrógradamente en Ni ubicadas entre las fibras. Como producto de la inyección caudal se puede ver también la proyección de E sobre LSt debido probablemente a su posición más ventral (cabeza de flecha, fig. 4-1C). Por último y tal como ocurre en pollos, se aprecia claramente en el material con la inyección contrateñida, que la mayor parte de los terminales de E sobre M, se circunscriben a la sublámينا MVe (fig. 4-1E, F, G). Las células marcadas retrógradamente en M también se ubican principalmente en MVe y en menor cantidad en la sublámينا dorsal MD (fig. 4-1D, E, F, G).

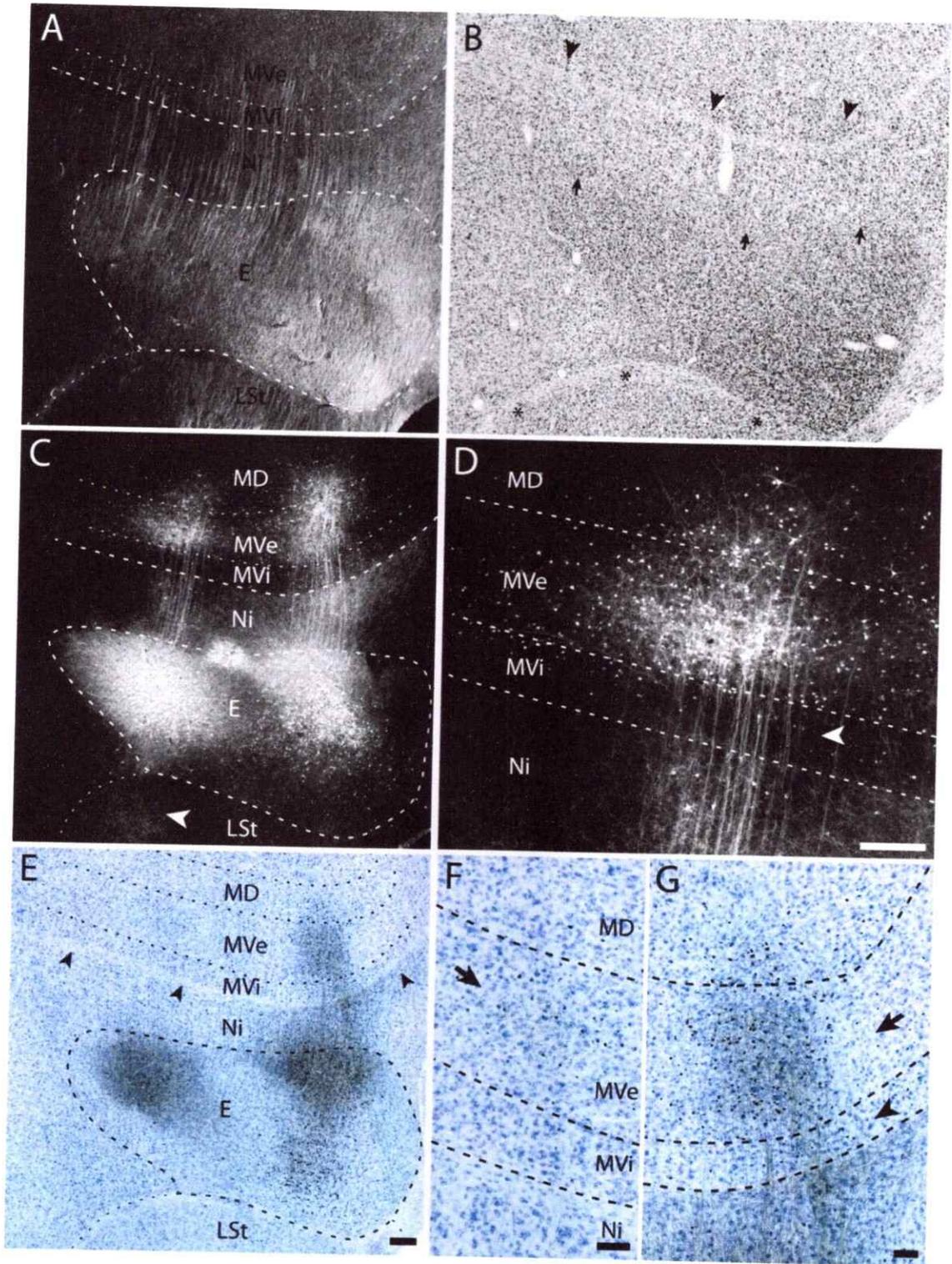


Figura 4-1. Organización laminar y columnar del coloplio visual en paloma. Preparaciones histológicas de secciones telencefálicas sagitales (caso **Ent1**) muestran la citoarquitectura general y la organización interna del coloplio visual. Rostral es hacia la derecha de las imágenes

A: Fotografía en campo oscuro de sección húmeda de telencéfalo. **B:** Nivel siguiente al de A, procesada con tinción Giemsa, mostrando la citoarquitectura del coloplio visual. Las puntas de flecha indican la lámina mesopalial, las flechas el límite entre E y Ni, los asteriscos la lámina palio-subpalial. **C:** Fotografía con colores invertidos de la misma sección en A procesada para visualizar el trazador BDA 3K, inyectado en entoplio rostral y caudal. **D:** Detalle de la distribución de células y terminales en las subláminas de M, la punta de flecha indica la ausencia de terminales y células en la lámina más interna de M. **E:** Sección subsiguiente a la presentada en A, mostrando el producto de la inyección de BDA contrateñido con Giemsa. Las puntas de flecha señalan la lámina mesopalial. **F** y **G:** Magnificación de los campos, caudal y rostral, de terminales y células en M. Las flechas muestran la lámina MVe densa en células y terminales, la cabeza de flecha la lámina más interna MVi, casi libre de células y terminales. Barra de calibración en E válida también para A, B, C: 250 μm ; D, F, G: 100 μm .

Localización de las neuronas eferentes en el colopalio visual.

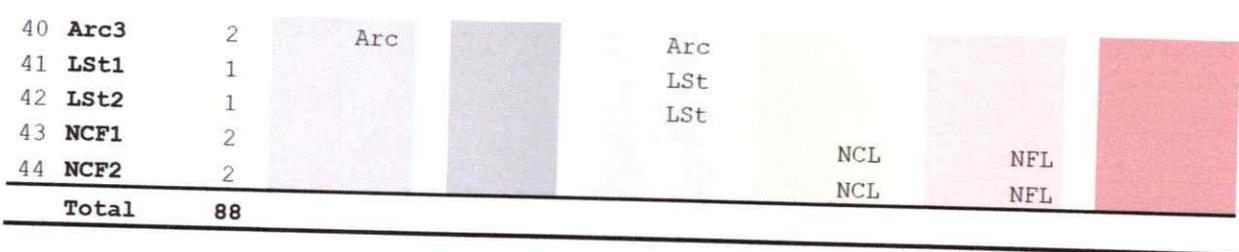
Para determinar la distribución de las neuronas eferentes del circuito E-Ni-M, realizamos experimentos de inyecciones múltiples mezclando trazadores anterógrados y retrógrados (casos Rt/NCL/M y Rt/NCL, **tabla 4-1**). El primer caso presentado en la **figura 4-2**, corresponde a un experimento de inyección cuádruple. En éste se hizo en primer lugar una inyección del trazador anterógrado PHA-L restringido al núcleo Rt. Esto permitió delimitar la extensión de E con más precisión. Una segunda inyección del trazador retrógrado Ctb fue hecha en el nidopalio caudolateral (NCL), una región del palio indicada en la literatura como uno de los blancos del entopalio. Por último, dos inyecciones de BDA-TMR fueron hechas en el mesopalio, lo cual reveló los procesos columnares desde M a E. Los resultados de este experimento hacen evidente distintos aspectos de la organización del colopalio. El primero de ellos es la topografía de la proyección tálamo-telencéfalo, esto se puede ver en la distribución rostral de los terminales talámicos en E (seudocoloreados cian), lo cual coincide con la posición rostral del sitio de inyección en Rt (**fig. 3A anexo**). En segundo lugar, se puede ver que las células que dan origen a la proyección eferente hacia NCL se encuentran segregadas de las fibras talámicas, ocupando específicamente la lámina Ni abarcándola en toda su extensión (**fig. 4-2A y B**). Por último, el tercer aspecto de la organización observado es la topografía del circuito E-Ni-M, evidenciado por las fibras terminando en E, resultantes de las

inyecciones en M. Esto último muestra que la topografía de la proyección tálamo-telencéfalo se conserva dentro del circuito colopallial. En otro caso un experimento de doble inyección (PHA-L en Rt y Ctb en NCL), procesado en un plano de corte coronal, se obtuvo un resultado equivalente (**figura 4-2C y D**). En éste, se demuestra también la segregación de las aferencias talámicas (restringidas a E) y las células eferentes (restringidas a Ni). Además, se puede apreciar la disposición de las neuronas marcadas en toda la extensión del Ni.

Blancos telencefálicos del colopallio visual.

Teniendo en cuenta los resultados que muestran la localización de las células eferentes restringidas al Ni, realizamos ahora una serie de experimentos de trazado para estudiar en orden los blancos telencefálicos secundarios. En estos experimentos inyectamos trazadores anterógrados en distintas posiciones del Ni visual, variando principalmente la posición en el eje rostro-caudal de los depósitos, siguiendo la idea de una proyección diferencial desde rostral a caudal según propuso Husband & Shimizu (1999). Un total de 16 inyecciones localizadas específicamente en Ni fueron analizadas, el listado de los casos y algunos detalles de las inyecciones se presentan en la **tabla 4-1** (casos Ni 1-9). En la mayoría de los casos se hizo inyecciones en ambos hemisferios

debido a que no se observaron proyecciones interhemisfericas desde los sitios inyectados, excepto en el arcopalio.



Abreviatura: C488: CtbAlexa488; C555: CtbAlexa555; D: hemisferio derecho;
 I: hemisferio izquierdo; TeO: tectum óptico.

Tabla 4-1. Resumen de casos de inyecciones usadas en este capítulo. Descripción de las inyecciones hechas en Ni y áreas asociadas al colopatio visual. Se indica el trazador inyectado en cada caso, el hemisferio en que esto se hizo y área inyectada.

Animal	N° Iny.	PHA-L		BDA		Ctb		C488		C555		mRuby	
		I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
1 Ent1	2				E								
2 Ni1	2			Ni		Ni							
3 Ni2	4			Ni	Ni	Ni	Ni						
4 Ni3	4			Ni	Ni	Ni	Ni						
5 Ni4	4	Ni	Ni	Ni	Ni								
6 Ni5	1		Ni										
7 Ni6	2	Ni	Ni										
8 Ni7	2			Ni	Ni								
9 Ni8	2					Ni	Ni						
10 NiTeO	1		TeO				Ni						
11 Ni_RC1	2		Ni		Ni								
12 Ni_RC2	2		Ni		Ni								
13 Ni_RC3	2		Ni		Ni								
14 Ni_RC4	2		Ni										
15 Ni_RC5	2		Ni										Ni
16 Ni_ML	4	Ni	Ni										Ni
17 Rt/NCL	2		Rt										Ni
18 Rt/NCL/M	3		Rt						NCL				Ni
19 NFL1	1								NCL				M
20 NFL2	2	NFL					NFL						
21 NFL3	2		NFL				NFL						
22 NFL_ML1	2								NFL		NFL		
23 NFL_ML2	2								NFL		NFL		
24 NFL/NCL	2	NFL	NCL										
25 NFL/NIL	2	NIL					NIL	NFL					
26 NCL1	1		NCL										
27 NCL2	2			NCL			NCL						
28 NCL_ML1	2								NCL		NCL		
29 NCL_ML2	2								NCL		NCL		
30 NCL_ML3	2								NCL		NCL		
31 NCL_RC1	2								NCL		NCL		
32 NCL_RC2	2								NCL		NCL		
33 NCL_RC3	2								NCL		NCL		
34 NCL_RC4	2								NCL		NCL		
35 NCL_RC5	2								NCL		NCL		
36 NIL1	1						NIL						
37 NIL2	1						NIL						
38 Arc1	1						Arc						
39 Arc2	2		Arc				Arc						

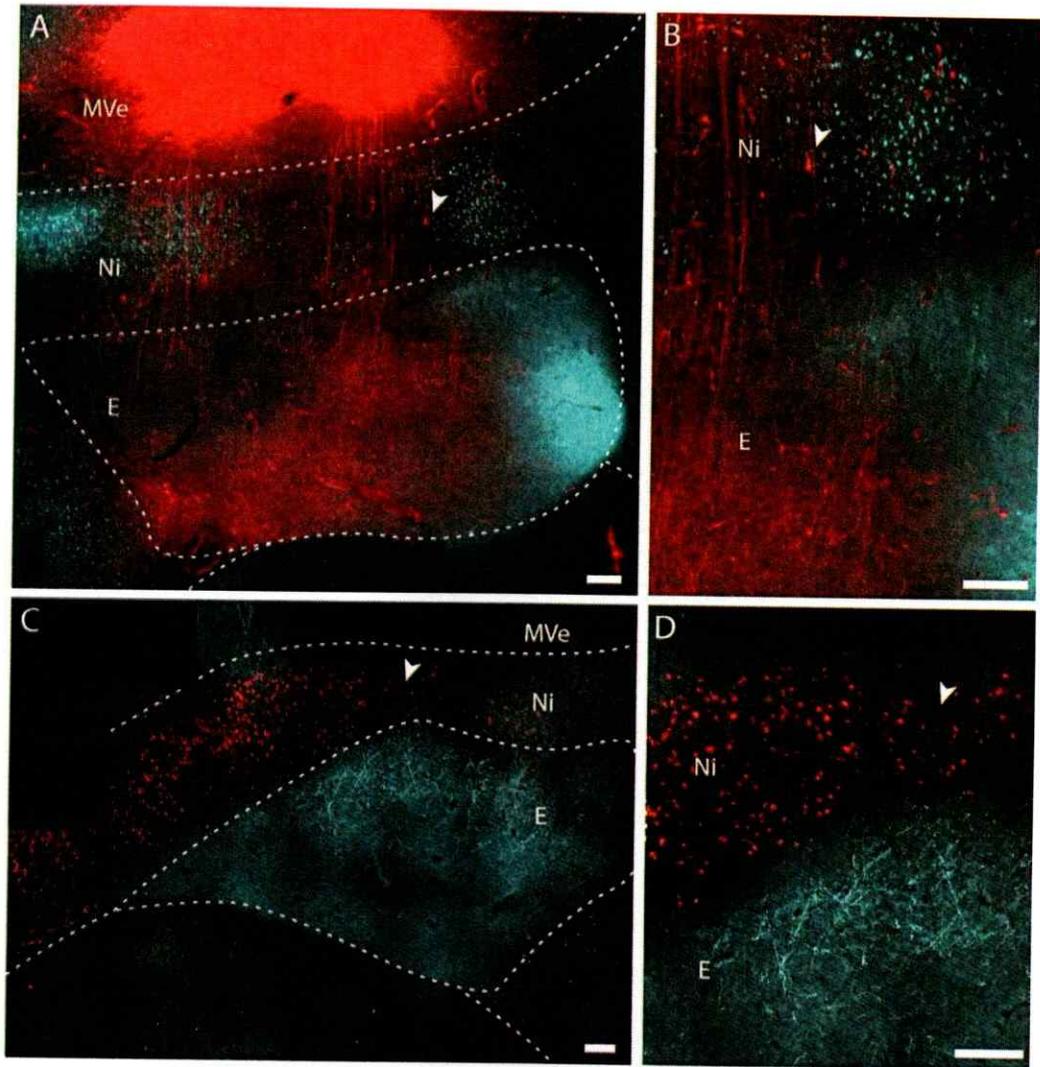
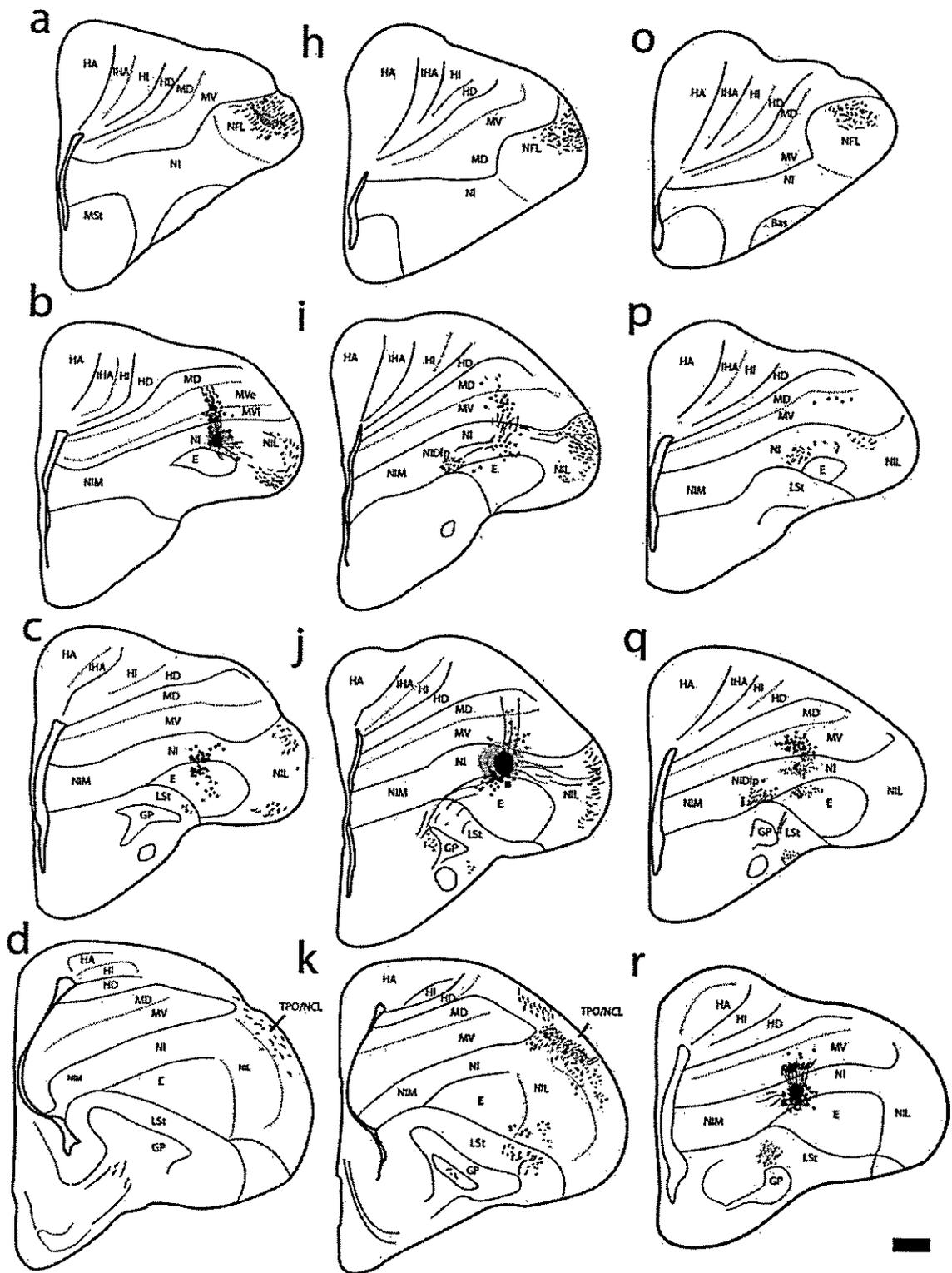


Figura 4-2. Segregación de aferencias talámicas y células eferentes en el coloplio visual. Triple (caso Rt/NCL/M) y doble (caso Rt/NCL) de inyección de trazadores en palomas evidencian la especialización de las láminas en el coloplio visual. **A:** Sección telencefálica sagital (rostral a la derecha) mostrando en color cian las fibras terminando en E, producto de una inyección de PHA-L en el núcleo Rt del tálamo. También en color cian se observan células marcadas retrógradamente desde NCL inyectado con *Ctba*lexa488. En color rojo se ven las fibras columnares terminando en E, como resultado de inyectar BDA3K-TMR en MVe. **B:** Detalle de la distribución de terminales y células en el límite E-Ni, la punta de flecha indica la posición en A. **C:** Sección telencefálica coronal mostrando el resultado de una inyección de PHA-L en Rt (cian) y *Ctb* en NCL (rojo). **D:** detalle del límite E-Ni. Los sitios de inyección se presentan en la **figura 3 del anexo**. Barras de calibración, 200 μm para todos los paneles.

En la **figura 4-3** se presentan tres reconstrucciones de casos representativos de inyecciones en distintas posiciones del Ni (rostral, central y caudal). El primer resultado que se desprende al analizar en conjunto estos casos es que independientemente del sitio inyectado en Ni, siempre se obtienen terminales marcados en cuatro blancos del palio y uno del subpalio. Los blancos paliales encontrados consistentemente fueron: el nidopalio frontal lateral (NFL), nidopalio intermedio lateral (NIL), nidopalio caudolateral/área tempo-parieto-occipital (NCL/TPO) y arcopalio (Arc); el blanco subpalial fue la porción del estriado lateral (LSt) ubicada ventral a E. A continuación se describe el detalle de la proyección sobre los distintos blancos telencefálicos encontrados.

Nidopalio frontal lateral. Esta región corresponde a la porción más rostral y lateral del nidopalio, en niveles anteriores a E. En cortes coronales se observa como una esfera de territorio nidopalial limitando dorso-medial con un segmento de mesopalio y latero-ventral con la pared del cerebro (**fig. 4-3a, h, o, fig. 4-9A, B**). Las fibras colopaliales que aferentan el NFL cursan de manera rostro-lateral desde el sitio de inyección en Ni (**fig. 4-3a, b**). En la **figura 4-3** se pueden ver terminales en NFL en los tres casos reconstruidos, los terminales resultantes de las inyecciones se distribuyen en casi todo el NFL (**fig. 4-3a, h, o**), aunque en algunos casos parecieran presentar un énfasis en su distribución



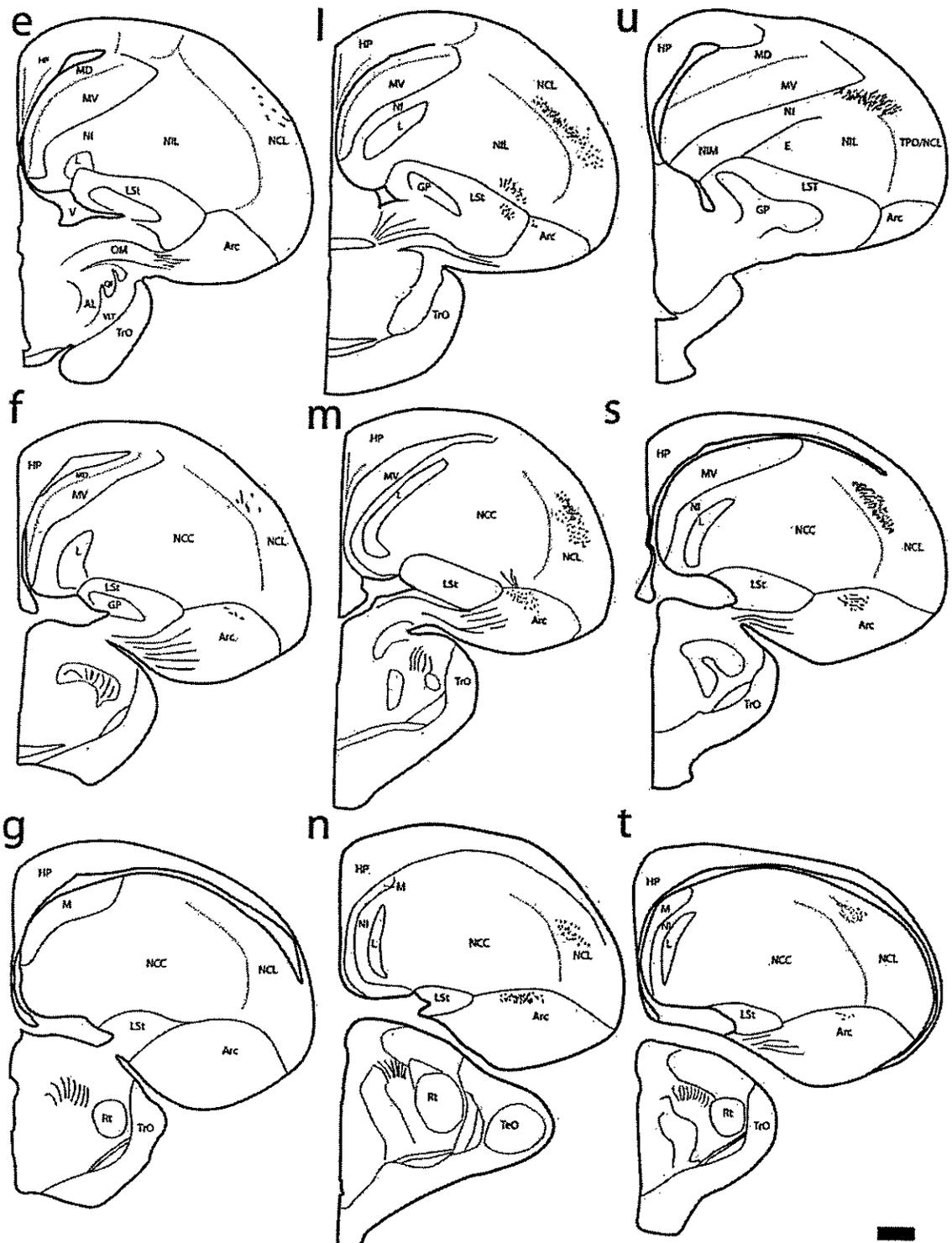
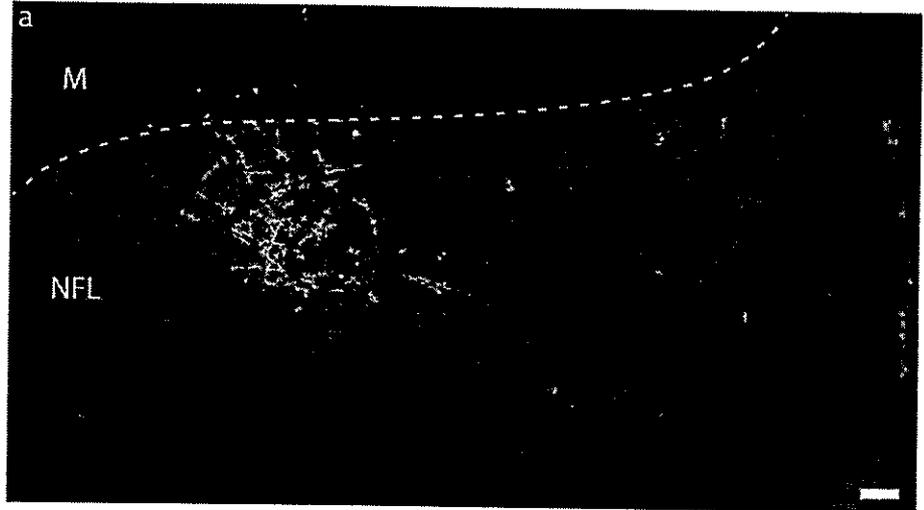
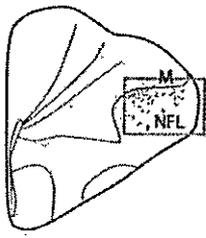


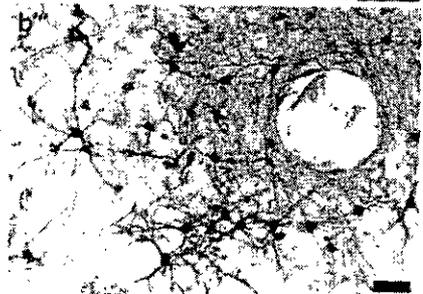
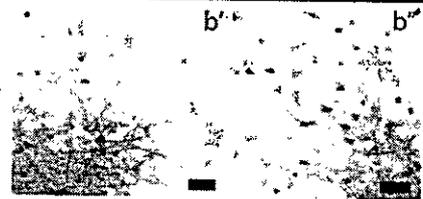
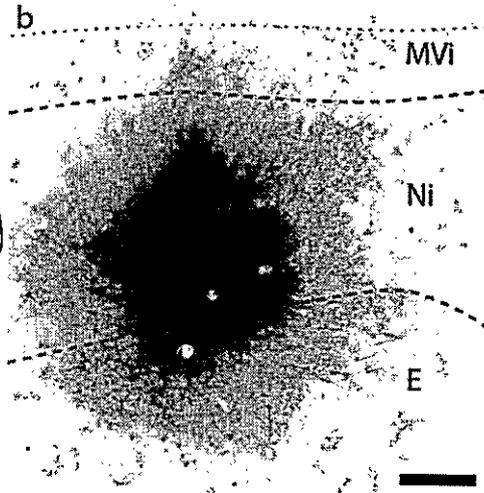
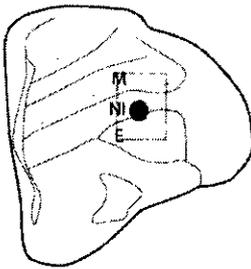
Figura 4-3. Eferencias del colopallio visual I. Reconstrucción de tres casos de inyecciones del trazador anterogrado BDA-3K, en diferentes niveles rostro-caudal de la lámina Ni del colopallio visual. Columna

izquierda (**a-g**, caso Ni2) inyección rostral; columna central (**h-n**, caso Ni3) inyección central; columna derecha (**o-u**, caso Ni4) inyección caudal. Los terminales y fibras se representan como líneas y las células como círculos negros. Se puede apreciar en los casos reconstruidos que independientemente de la posición en que se realiza la inyección, siempre se obtienen terminales en cuatro áreas del palio; Nidopalio Frontal Lateral (**NFL**), Nidopalio Intermedio Lateral / Area Temporo Parieto Occipital (**NIL/TPO**), Nidopalio Caudal Lateral (**NCL**), Arcopalio (**Arc**); y una región del subpalio; Estriado Lateral (**LSt**). Barra de calibración 1mm. Abreviatura: HA, Hiperpalio apical; IHA, núcleo intersticial de HA; HI, Hiperpalio intercalatum; HD, Hiperpalio densocelular; MD, Mesopalio dorsal; MV, Mesopalio ventral; MSt, Estriado medial; Bas, Basorrostralis (palio somatosensorial); NIM, Nidopalio intermedio medial; GP, Globo pálido; NiDlp, Nidopalio aferentado por DLP. HP, Hipocampo; L, Field L (palio auditivo); NCC, Nidopalio caudo central (esta abreviatura es válida para todas las figuras en este capítulo).

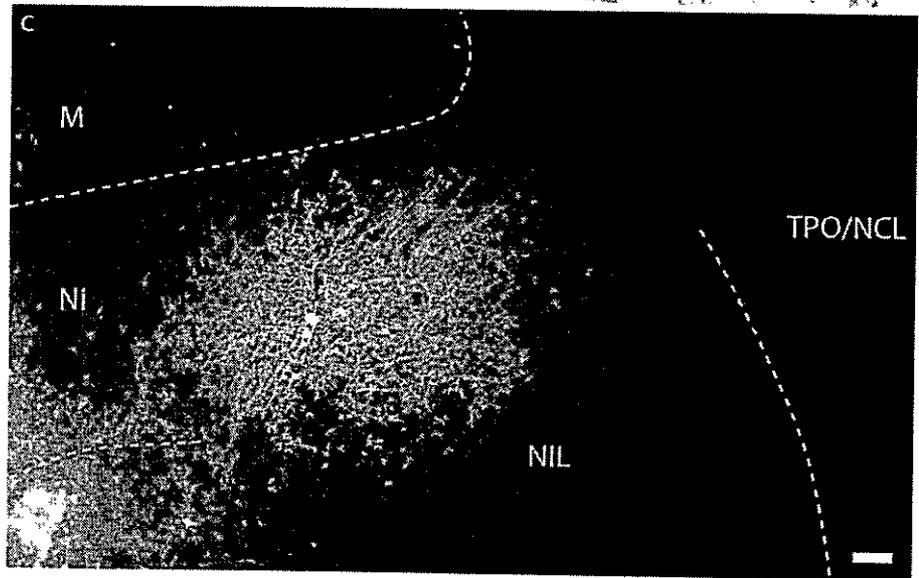
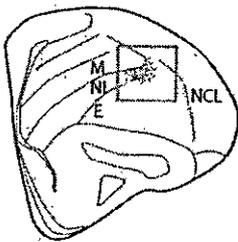
A



B



C



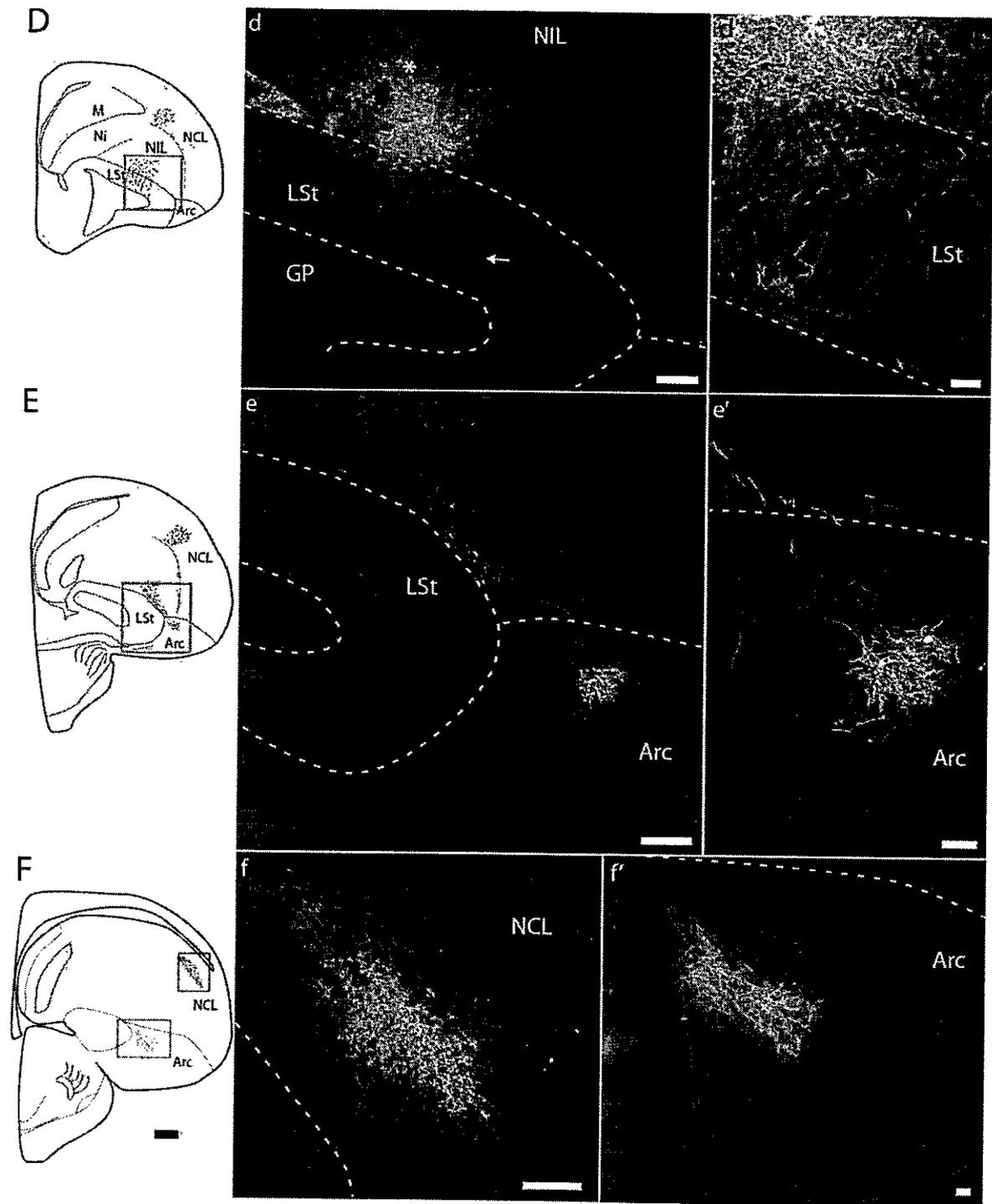


Figura 4-4. Eferencias del coloplio visual II. Fotografías en alta resolución mostrando los terminales obtenidos en los 5 blancos telencefálicos del coloplio visual, marcados como producto de una inyección del trazador BDA-3K en Ni (caso Ni8). Las letras mayúsculas muestran reconstrucciones de las secciones fotografiadas. a: terminales en NFL. b: sitio de inyección. b'-b''': células mesopaliales (b', b'') y

entopaliales (**b'''**) marcadas retrógradamente. **c**: Fibras dejando el Ni con un curso dorso-laterocaudal en dirección hacia NCL, el trayecto de estas fibras se puede apreciar en los dibujos D-F. **d**: fibras cursando trayectoria ventro caudal en dirección a Lst, y Arc. **d'**: terminales en Lst. **e**: fotografía de la sección más caudal mostrando el trayecto de las fibras en dirección a Arc. **e'**: detalle de terminales en Arc. **f** y **f'**: fotografía mostrando el detalle de los terminales en NCL (**f**) y en Arc (**f'**). Barras de calibración: A, B, C, D, E, F: 1 mm; b, d, e, f: 300 μ m; a, c', d', e', f': 100 μ m; b' y b'', 50 μ m.

asociado a la posición medio-lateral del sitio de inyección en Ni (fig. 4-4a'). Además, en algunos casos se pudo observar terminales y fibras pasando levemente el límite dorso medial de NFL, terminando en el mesopallio asociado (fig. 4-4a'). Estos experimentos de trazado anterógrado se complementaron con inyecciones de Ctb en NFL (fig. 4-5a-g; tabla 4-1, casos NFL 1-3). Para las reconstrucciones el límite dorsal de E fue determinado usando microscopía de campo oscuro y tinciones histológicas. Esto se hizo cada vez que fuese necesario determinar si las células eferentes se distribuyen solo Ni o también en E. Los resultados obtenidos muestran en todos los casos que las células se ubican solo en Ni, aunque células más escasas y dispersas se observaron permanentemente en MD. Con respecto a la distribución de las células en Ni, estas se observaron en toda la lámina, desde la lámina mesopallial hasta el borde dorsal de E y desde la región rostral hasta la porción más caudal. Sin embargo, consistentemente se vio una mayor densidad y abundancia de células marcadas en las secciones rostrales, disminuyendo en ambos aspectos hacia caudal (fig. 4-5f, g).

Nidopallio intermedio lateral. Definir los límites de pallio lateral fue difícil debido a la homogeneidad citoarquitectónica de esta área y de sus regiones vecinas. El NIL es la porción de nidopallio lateral, ubicada caudal a NFL. Se dispone desde el límite lateral de E, hasta la pared del cerebro. Tiene aspecto de una franja curva orientada en sentido dorso-ventral, limitando por dorsal con

el mesopallio y por ventral con el piso del hemisferio (fig. 4-3c, j, q). Hacia niveles caudales, bordea como una media luna latero-caudalmente a E. Dado que en niveles caudales el hemisferio crece lateralmente, aparece TPO y NCL como bandas dorso-ventrales pegadas a la pared del telencéfalo lateralmente a NIL (fig. 4-9B, C, D).

Las fibras colopaliales que aferentan al NIL en su porción rostral, se proyectan cursando directamente desde el sitio de inyección hacia lateral pasando a través del Ni (fig.4-3b, i, p). En los niveles caudales ocurre algo similar con las fibras cursando por el Ni y el entopallio hacia caudal. Un detalle de los terminales en NIL provenientes desde la parte caudal del Ni se indica con asterisco en la figura 4-4D. El curso recto de las fibras a través del Ni se puede ver también en la figura 4-8D.

Dos casos de inyecciones complementarias se llevaron a cabo para identificar la ubicación de las neuronas eferentes hacia NIL (tabla 4-1, casos NIL 1-2). La reconstrucción de uno de estos casos, con inyección en la parte central de NIL se muestra en la figura 4-5 h-m. En este se puede ver que las células se localizan en toda la extensión dorso-ventral de Ni, aunque con un énfasis lateral en los niveles caudales. Esto se puede atribuir a que la inyección es restringida y no abarca todo el NIL.

Nidopalio caudo-lateral/ área Temporal Parieto-occipital. Nuestros resultados indican que NCL/TPO comienza en niveles equivalentes a A7.0 del atlas de Karten & Hodós (1967). El NCL se observa en plano coronal como una banda dorso-ventral pegada a la pared lateral del palio caudal, localizada posterior y lateral al NIL (fig.4-3e, l, u; fig.4-9b-d). Este blanco del colopalio visual, junto al NIL, recibe las aferencias más masivas y densas (fig. 4-3d, k, s; fig. 4-4f). Las fibras que aferentan esta región, se observan cursando desde el sitio de inyección hacia caudal, siguiendo un trayecto dorso-latero-caudal característico (figs. 4-3k y 4-4C). Las inyecciones de Ctb complementarias hechas en NCL muestran que todo el Ni proyecta hacia el NCL, encontrándose células localizadas en Ni desde los niveles más rostrales hasta caudal (fig. 4-6a-e).

Arcopalio. Esta área palial muestra una forma ovalada y se localiza ventral al NCL. Recibe aferencias desde el colopalio visual mediante fibras que describen un curso hacia caudal, disponiéndose por ventral y lateral a E, sobre el límite palio-subpalial (fig. 4-3l, m; fig. 4-4e, e'; fig. 4-8 flechas). De esta manera las fibras dirigidas a este blanco realizan un trayecto diferente a las dorso-latero-caudal que aferentan el NCL. Los terminales en Arc se distribuyen de forma restringida a la porción dorsal y central del núcleo (fig. 4-3). Las inyecciones complementarias de Ctb en Arc (tabla 4-1, casos Arc 1-3) muestran células localizadas en Ni desde rostral a caudal (fig. 4-6f-j). La cantidad de células

retrógradas indican que Arc sería el blanco del colopatio visual que recibe la menor cantidad de aferencias. Por último, en las reconstrucciones de la **figura 4-6** se puede ver que NCL y Arc se conectan recíprocamente.

Estriado lateral. Esta región corresponde el único blanco subpalial del Ni. Esta proyección apareció consistentemente en las inyecciones en todos los niveles rostro-caudal (**figura 4-3c, k y r**). Un detalle de los terminales que aferentan esta área y el trayecto que describen se puede ver en las **figuras 4-4d, 4-8 y 4-9D**. Allí se aprecia que algunas de las fibras que aferentan el LSt viajan junto a las que aferentan Arc. Aunque esto se puede ver claramente, es difícil decir si es que estas pudiesen corresponder a colaterales. En los casos de inyecciones complementarias de Ctb en LSt (**tabla 4-1, casos LSt1-2**), se encontraron células distribuidas en todo el Ni (**fig. 4-7**).

Un quinto blanco palial que aparece sistemáticamente no fue incluido en la descripción general de las eferencias. Esta región corresponde al Ni ubicado en el límite medial del entopatio (NiDlp; **fig. 4-3i, q; fig. 4-4D**). Esta área recibe aferencias talámicas desde el núcleo somato/auditivo DLP (Gamlin & Cohen, 1986; Korzeniewska & Güntürkün, 1990), lo cual la convierte en un área sensorial primaria. A pesar de lo repetitivo de esta marca, no es posible aseverar la existencia de proyecciones entre NiDlp y Ni, ya que las inyecciones anterógradas y retrogradas hechas en NCL,

también resultan en células y terminales en NiDlp (**fig. 4-6a, b**). Esto abre la posibilidad de que la marca en NiDlp encontrada al inyectar Ni sea producto de la toma del trazador por fibras de paso desde NiDlp hacia NCL y viceversa.



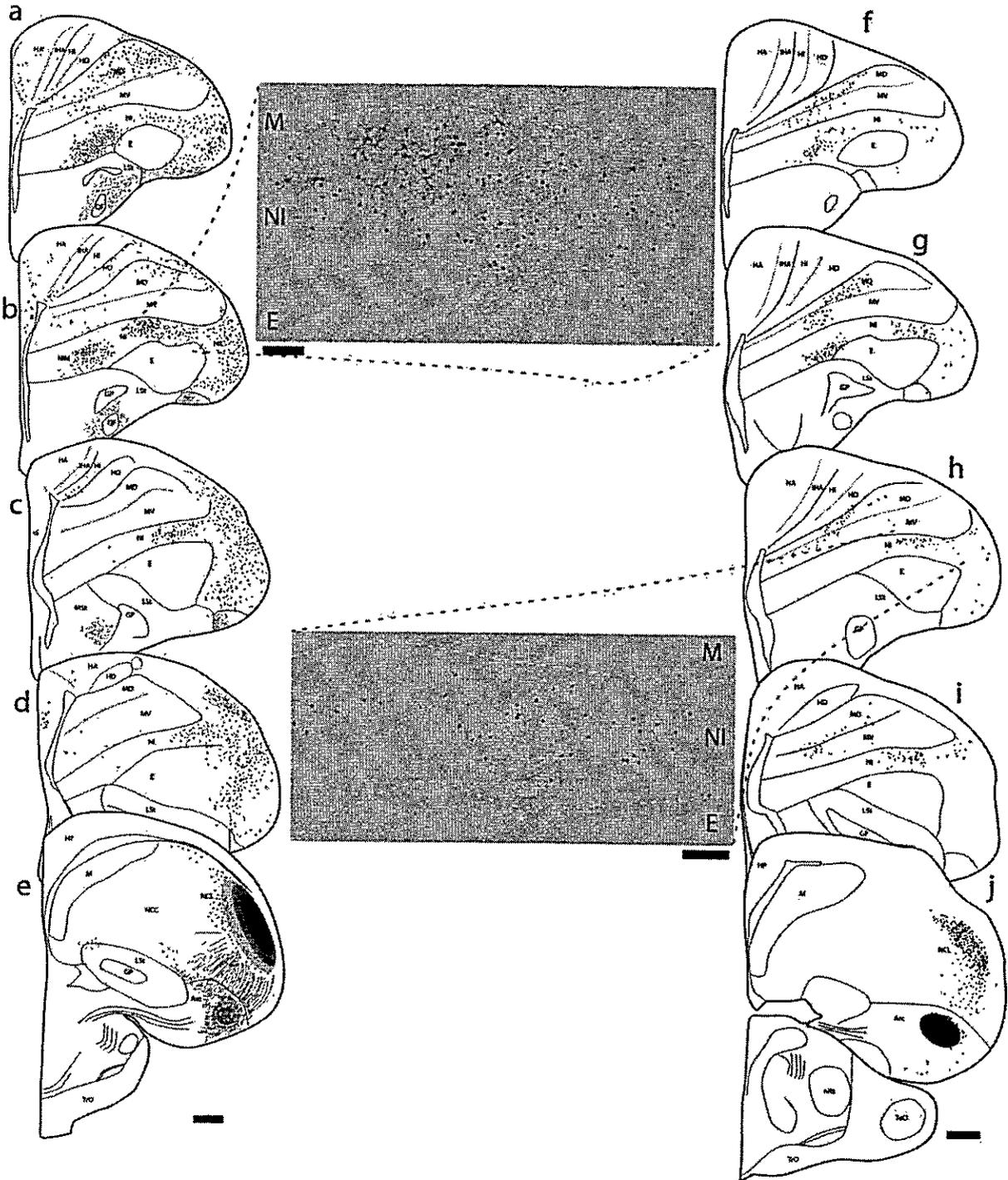


Figura 4-6. Reconstrucciones de inyecciones complementarias en NCL y Arc. Series de dibujos de la marca obtenida en Ni y otras estructuras del telencéfalo, para los casos de inyecciones de CTB en NCL (a-e, caso NCL2) y Arc (f-j, caso Arc3). En la columna central de la imagen se presentan fotografías de las células obtenidas en Ni para cada caso. Barras de calibración: a-j, 1mm; fotografías, 200 μ m.

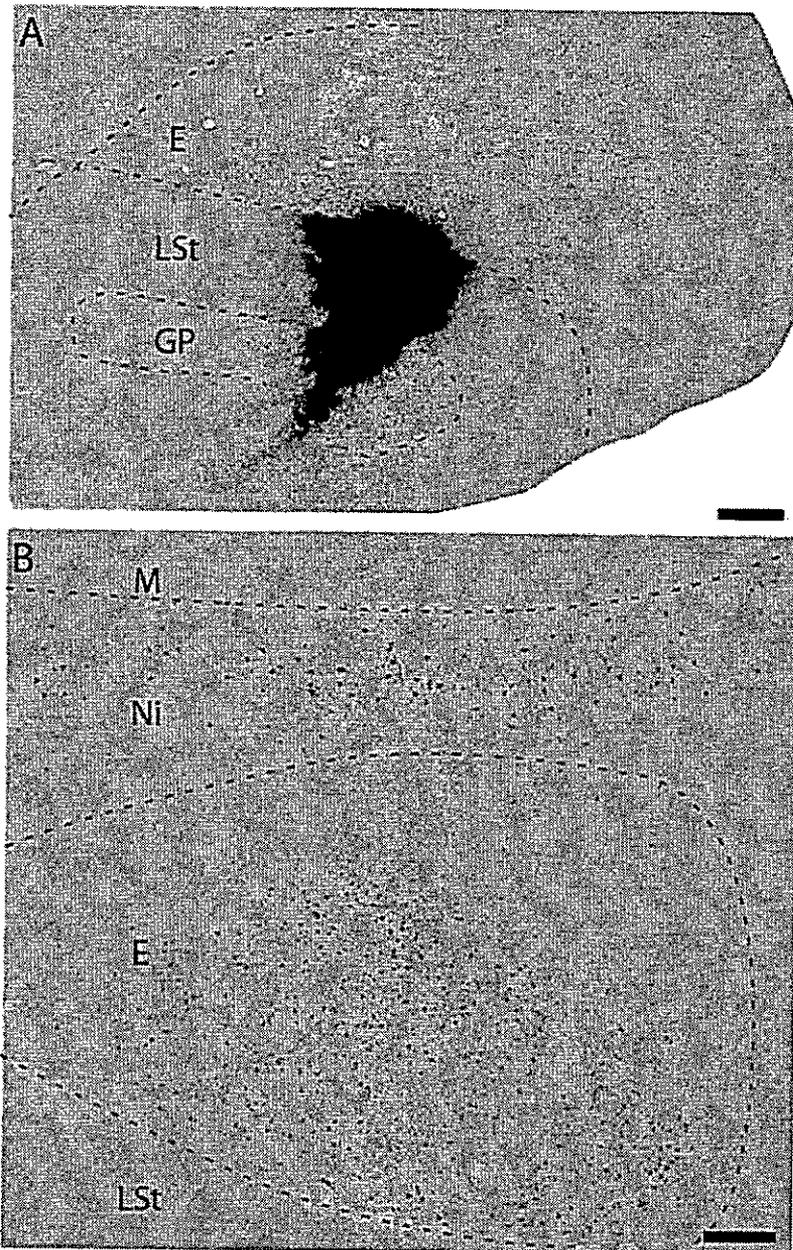


Figura 4-7. Inyección complementaria en LSt. Inyección de CTB en el estriado lateral del subpalio. **A:** sitio de inyección en Lst, se puede ver una gran cantidad de terminales en GP. **B:** células marcadas retrógradamente en la parte ventral de E y en Ni. Barras de calibración: A, 500 μ m; B, 200 μ m.

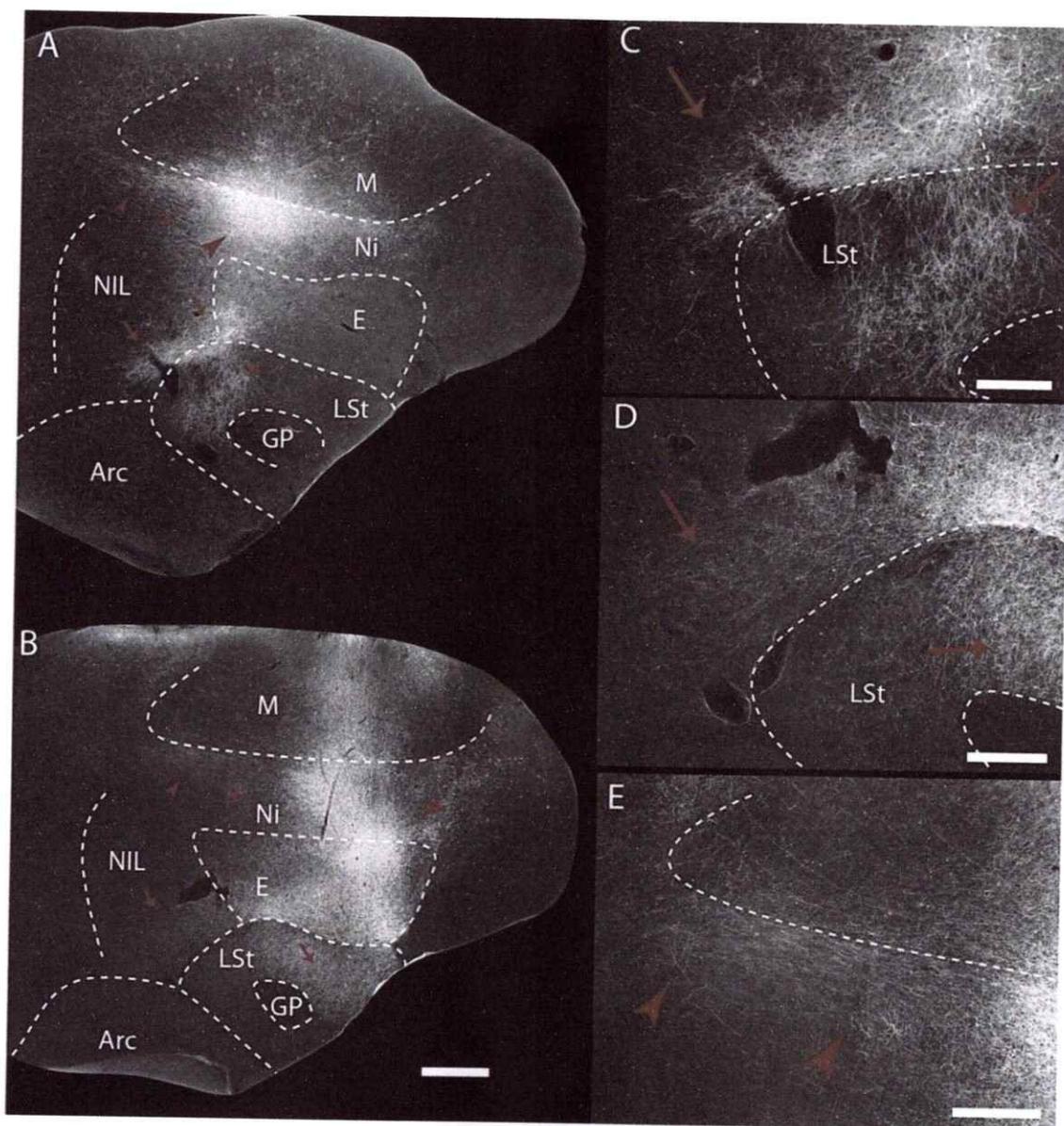


Figura 4-8. Eferencias del colopallio visual III. Fotografías de secciones sagitales de telencefalo de dos casos de inyecciones de BDA 3K en Ni. Se muestran los trayectos de las fibras viajando desde el colopallio visual hacia los blancos caudales NCL, NIL, Arc y LSt. **A:** sitio de inyección en Ni caudal (cabeza de flecha grande). Las cabezas de flecha pequeñas indican las fibras en dirección a NIL y NCL. Las flechas muestran las fibras viajando hacia LSt y Arc (detalle en **C**). **B:** sitio de inyección en Ni rostral (cabeza de flecha grande). Las cabezas de flecha pequeñas indican las fibras en dirección a NIL y NCL (detalle en **E**). Las flechas muestran los terminales en LSt y las fibras viajando hacia Arc (detalle en **D**). Barra de calibración: A y B, 1mm; C, D y E, 500 μ m.

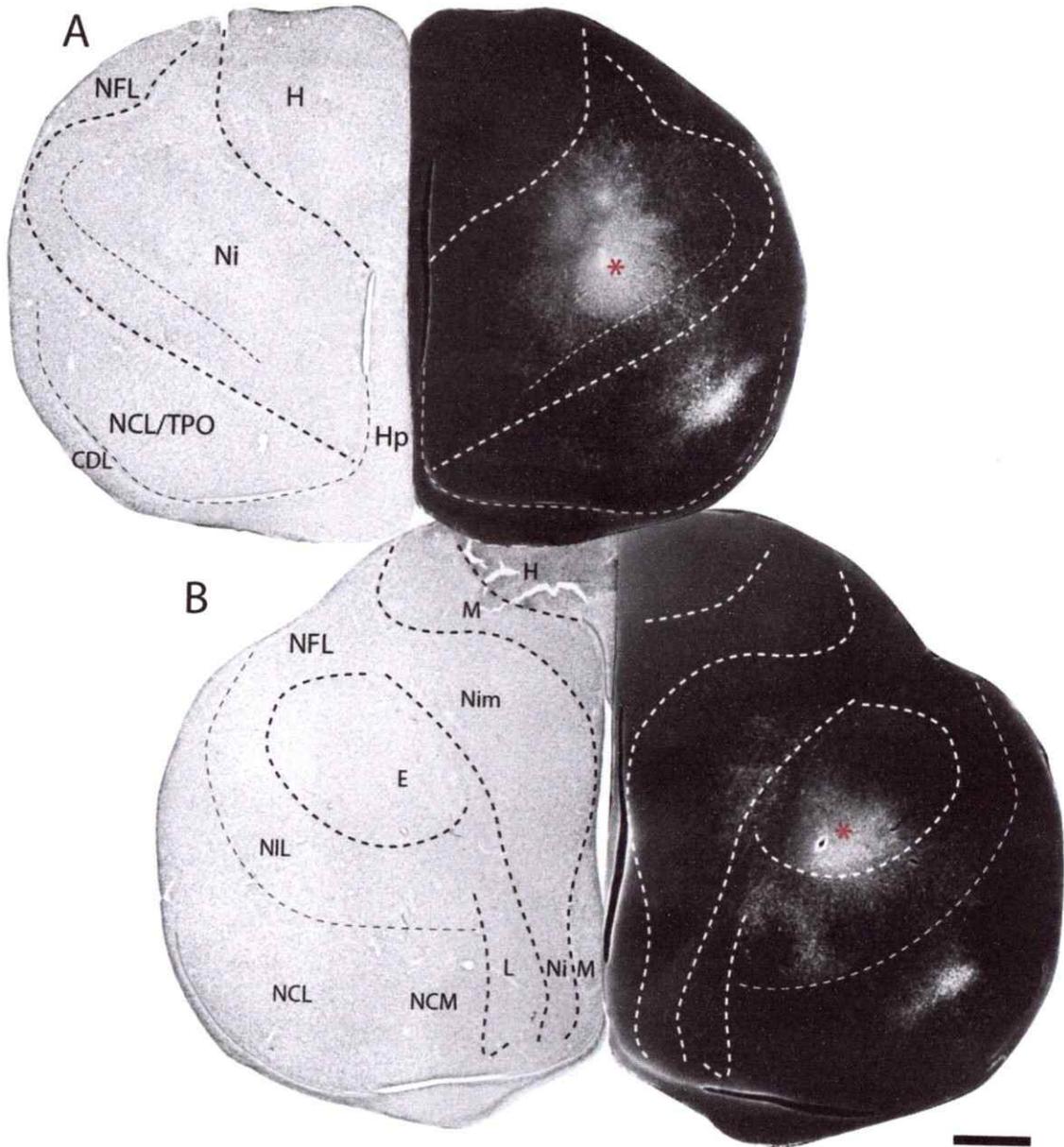


Figura 4-9. Eferencias del colopodio visual IV. Fotografías de secciones horizontales de telencéfalo de un caso de inyección de PHA-L en Ni. **A-D:** distintos niveles dorso ventrales de telencéfalo mostrando imágenes espejadas de secciones contiguas, teñidas con Giemsa (izquierda) y procesadas para visualizar el trazador (derecha). Asteriscos rojos indican el sitio de inyección. Barra de calibración, 1mm.

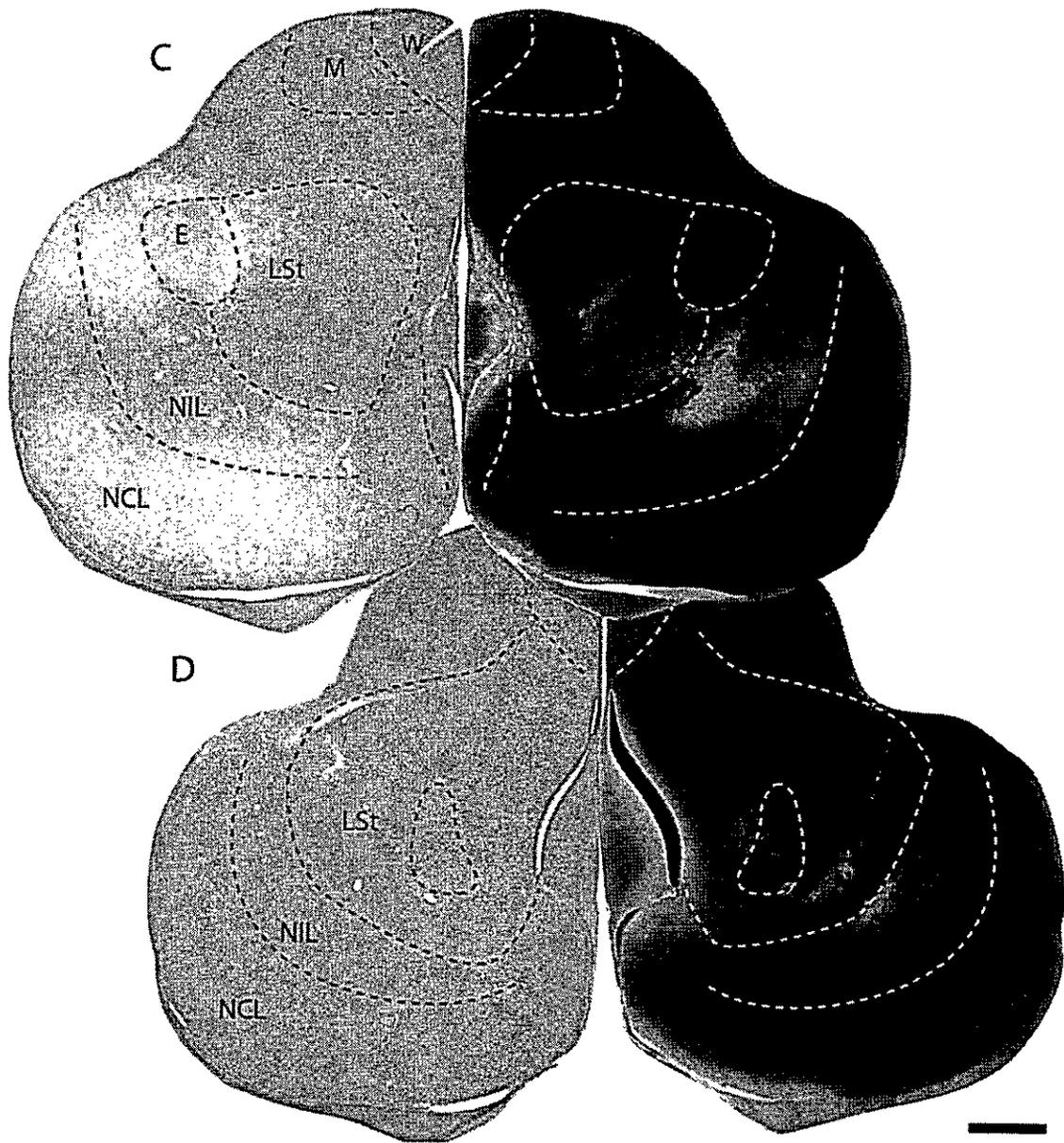


Figura 4-9 (continuación). Eferencias del coloplio visual IV. Fotografías de secciones horizontales de telencéfalo de un caso de inyección de PHA-L en Ni. Barra de calibración, 1mm.

Organización topográfica de la proyección eferente del coloplio visual.

Para estudiar la organización de las proyecciones eferentes realizamos una serie de experimentos de doble inyecciones; anterógradas desde Ni y retrógradas desde NFL o NCL. En total realizamos 34 inyecciones en esta serie de experimentos (tabla 4-1; casos, Ni_RC1-5, Ni_ML, NFL_ML1-2, NCL_ML1-3, NCL_RC1-5). Cuatro casos representativos de estos experimentos que dan cuenta de la topografía en la proyección desde el coloplio visual hacia NCL, NFL y Arc son presentados en las figuras 4-10, 4-11, 4-12 y 4-13.

En la figura 4-10 se muestra la reconstrucción de un caso de doble inyección retrógrada en NCL. En éste los depósitos de Ctb555 (rostral) y Ctb488 (caudal), se hicieron separados en el eje rostro-caudal. Se puede ver en la imagen que las neuronas marcada en el Ni se distribuyen también separadas en el eje rostro-caudal con la misma disposición que los depósitos de trazador.

En la figura 4-11 se muestra otro caso de doble inyección retrógrada en NCL, pero ahora los depósitos fueron separados en el eje medio-lateral. Como resultado de esto se observa que las células marcadas están segregadas en la misma forma que las inyecciones, indicando la topografía de la proyección. También se observa en este caso, marca de células en la región correspondiente a NiDlp (esquina medial de E), donde las células más rostrales de

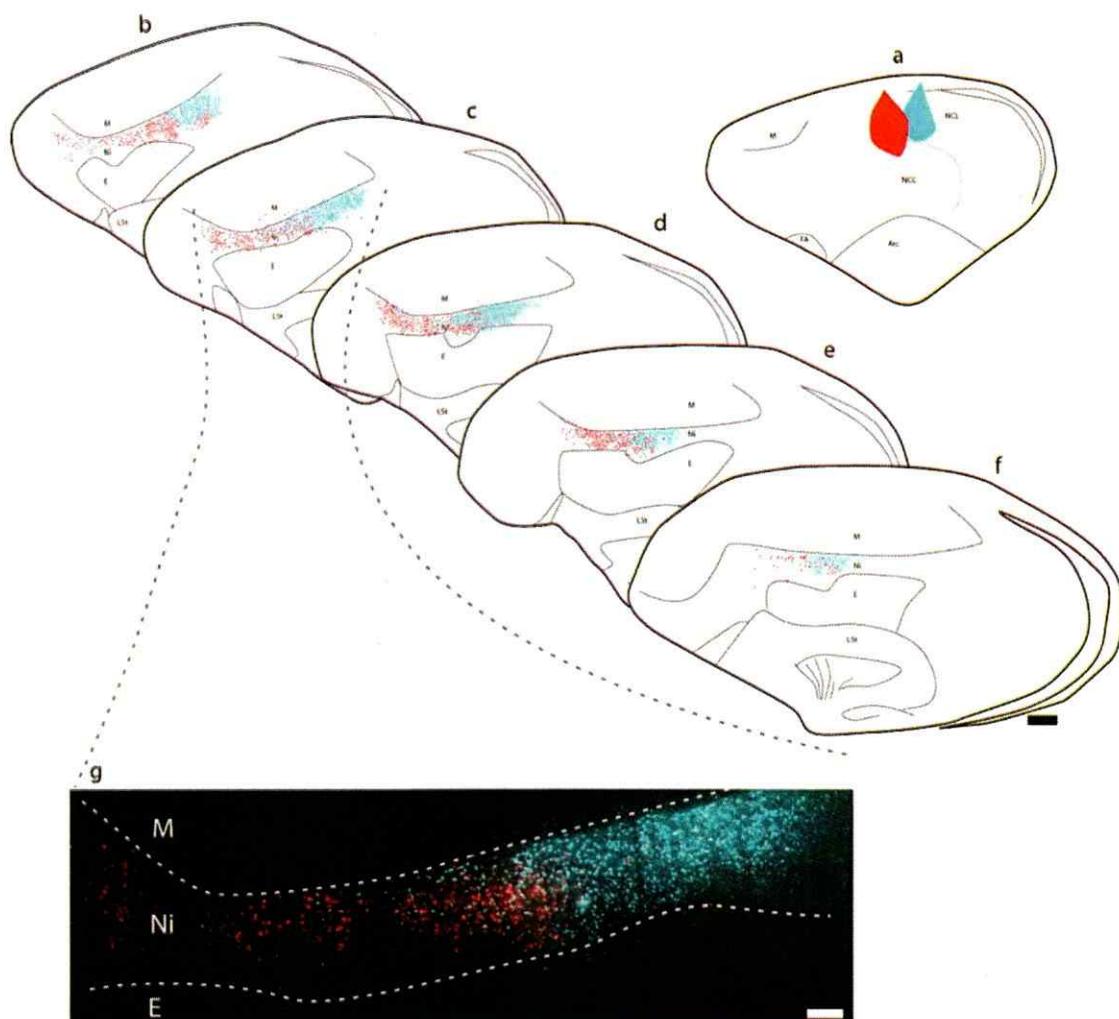


Figura 4-10. Topografía rostro caudal de la proyección hacia NCL. Doble inyección de CTB-Alexa en NCL de paloma (caso NCL_RC3). **a-f**: Serie de dibujos de secciones sagitales de distintos niveles medio-lateral (**a-f**) de telencéfalo. En la serie se muestran las inyecciones en NCL (**a**) y la distribución de las células marcadas retrógradamente en Ni (**b-f**), evidenciándose una segregación de la proyección en el sentido rostro caudal. **g**: Imagen panorámica mostrando las células marcadas en Ni de la sección dibujada en **c**. Barras de calibración: a-f, 1mm; g, 200 μ m.

esta área se marcan con rojo (correspondiendo a la inyección lateral, figura 4-11a) y las células más caudales de color verde (inyección medial, figura 4-11b), sugiriendo una topografía también de la proyección desde NiDlp hacia NCL.

Con respecto a la organización de la proyección hacia NFL, pudimos observar una topografía en el sentido medio-lateral (fig. 4-12). Sin embargo, esta topografía parece menos fina que la observada en la proyección hacia NCL, esto se nota en la mayor superposición de las células marcadas en Ni como resultado de la doble inyección.

En la figura 4-13 se muestra el resultado de un experimento en que se inyectaron dos trazadores anterógrados en Ni localizadas en distintas coordenadas rostro-caudal. En la figura se puede ver claramente la topografía en la proyección hacia NCL y Arc. Un poco menos evidente son los resultados mostrados para la proyección hacia LSt y NIL, aunque queda sugerida su organización topográfica.

En la figura se puede ver como las fibras producidas por la inyección rostral (rojo, BDA-TMR), viajando en sentido dorso-latero-caudal (hacia NIL y NCL), ya van avanzadas en su trayecto en el nivel en que se hizo la inyección caudal (cian, PHA-L; fig. 4-13b). En los niveles c y d de la figura, se aprecia como las fibras de la inyección rostral ya alcanzaron el NCL, y se aproximan a Arc por el trayecto ventro-caudal. En estos mismos niveles se puede ver como las fibras cian, de la inyección caudal terminan en el área caudal al entopallio (NIL caudal) y en LSt, pero solo

unas pocas fibras se aprecian en Arc y NCL. En el nivel **e** se observa en NCL y Arc fibras producidas por ambas inyecciones, segregadas en el eje medio-lateral. En el nivel **f** no se aprecian terminales rojos de la inyección rostral en Arc, mas solo se pueden ver los correspondientes a la inyección caudal (cian). En el nivel **g** se observa lo mismo, pero para NCL.

Con respecto a la topografía de la proyección hacia LSt, llamó la atención que la inyección rostral presentada en la **figura 4-13** no mostrara terminales en esta región. Esto se puede atribuir a un descuido al momento de revisar el material y al pequeño tamaño de la inyección. A pesar de esto, otro material de inyecciones en Ni procesados en plano sagital muestran que la proyección desde Ni a LSt también es topográfica (**fig. 4-8**). Ahí se puede ver que los terminales en LSt producto de la inyección caudal, se encuentran caudales en LSt (**fig. 4-8A**), en cambio la inyección rostral muestra un patrón de distribución claramente más rostral (**fig. 4-8B**). En resumen, con estos experimentos se obtuvo evidencia de que las proyecciones hacia NFL, NCL, Arc Y LSt son topográficas.

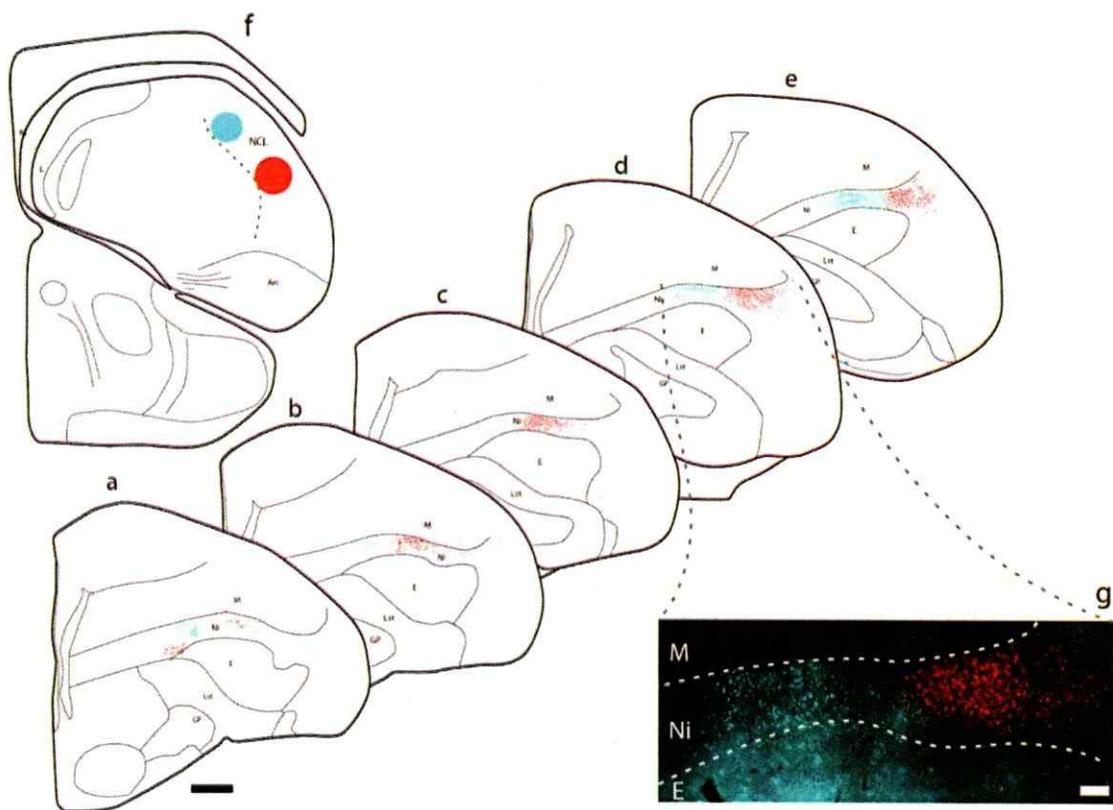


Figura 4-11. Topografía medio lateral de la proyección hacia NCL. Doble inyección de CTB-Alexa en NCL de paloma (caso NCL_ML3). **a-f**: Serie de dibujos de secciones coronales de distintos niveles rostro-caudales (**f-a**) de telencéfalo. En la serie se muestran las inyecciones en NCL (**f**) y la distribución de las células marcadas retrógradamente en Ni (**a-e**), evidenciando una segregación de la proyección en el sentido medio lateral. **g**: Imagen panorámica mostrando las células marcadas en Ni de la sección dibujada en **d**. Barras de calibración: a-f, 1mm; g, 200 μ m.

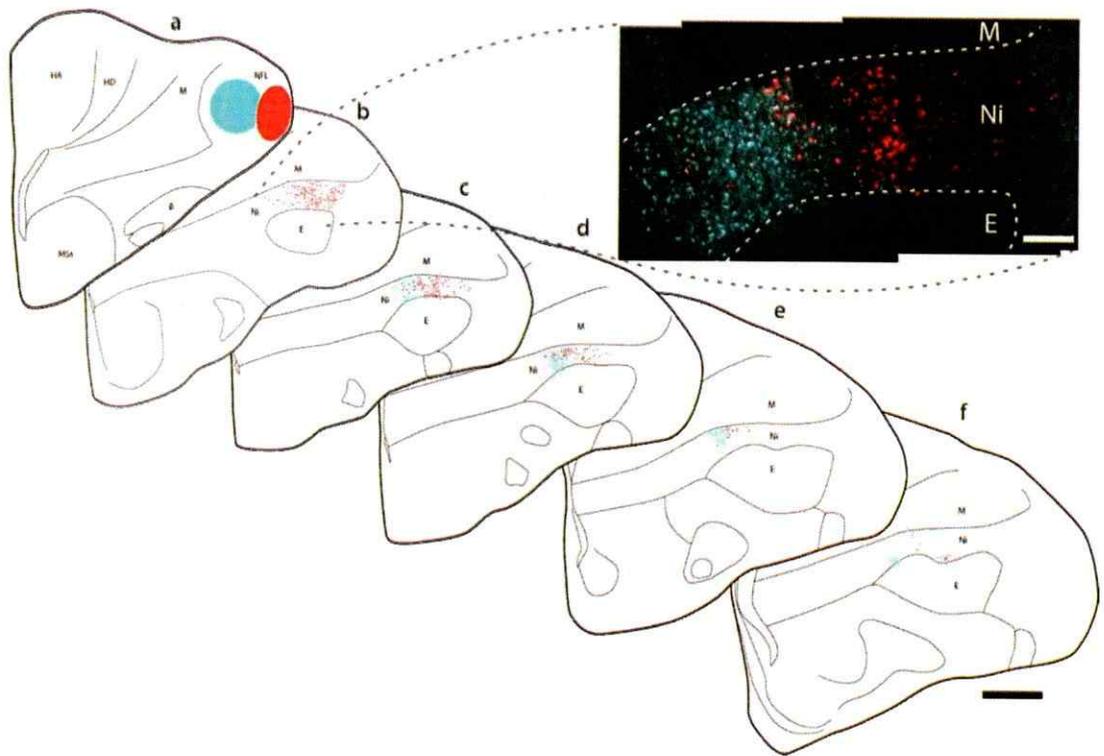


Figura 4-12. Topografía medio lateral de la proyección hacia NFL. Doble inyección de CTB-Alexa en NFL de paloma (caso NFL_ML2). **a-f**: Serie de dibujos de secciones coronales de distintos niveles rostro-caudal (**a-f**) de telencéfalo. En la serie se muestran las inyecciones en NFL (**a**) y la distribución de las células marcadas retrógradamente en Ni (**b-f**), evidenciando una segregación de la proyección en el sentido medio lateral. **g**: Imagen panorámica mostrando las células marcadas en Ni de la sección dibujada en **b**. Barras de calibración: a-f, 1mm; g, 200 μ m.

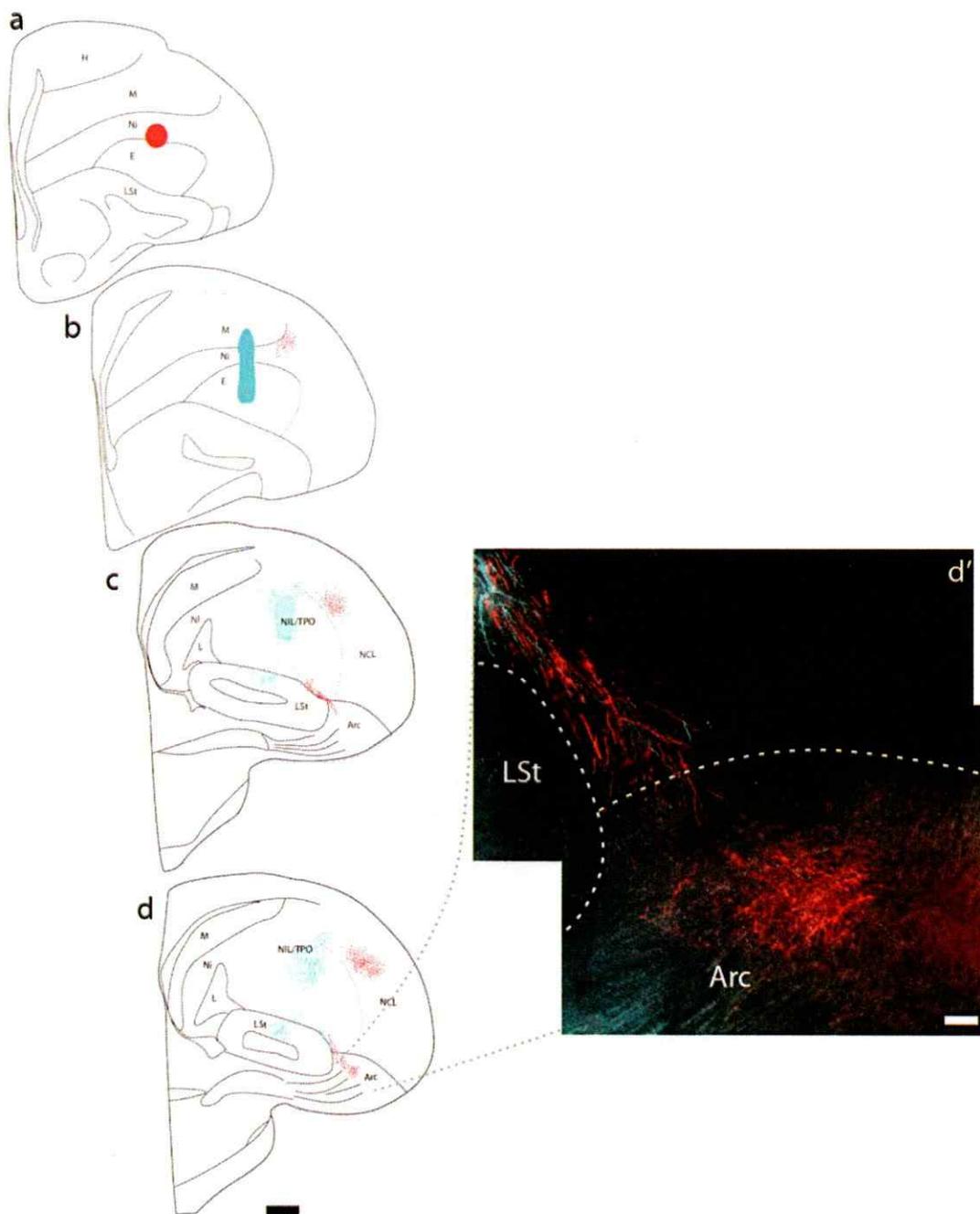


Figura 4-13. Topografía rostro caudal de la proyección desde Ni sobre los blancos caudales. Reconstrucción del caso Ni_{ML}, con una doble inyección de trazadores anterógrados en Ni en dos niveles rostro caudal. En color rojo se muestra la inyección de BDA-TMR (a) y en celeste la inyección caudal de PHA-L (b). Barras de calibración: a-d, 1mm; d', 200 μ m.

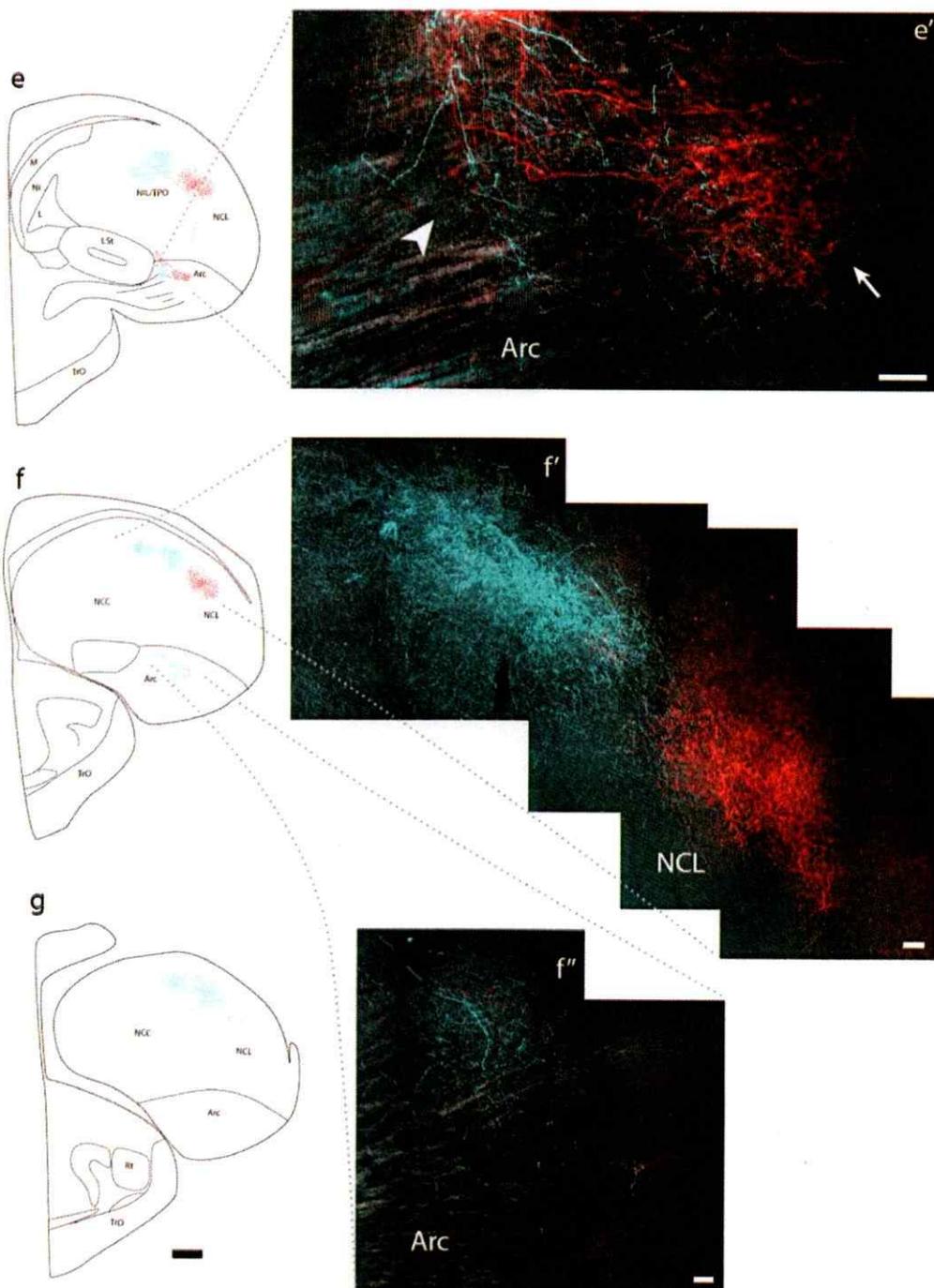


Figura 4-13 (continuación). Topografía rostro caudal de la proyección desde Ni sobre los blancos caudales. Barras de calibración: e-g, 1mm; e', f', f'', 200 μ m.

Reciprocidad de la proyección entre el coloplio y sus blancos.

Debido a que en varios experimentos de inyección en Ni obtuvimos marca de células mezcladas además de los terminales en cada blanco palial del Ni (**fig. 4-14**), la posibilidad de una proyección recíproca entre el coloplio visual y sus blancos fue testada realizando inyecciones de trazadores anterógrados en NFL, NIL, NCL y Arc.

Los resultados de las inyecciones en NFL y NCL resultaron en abundantes terminales en el coloplio visual. Los terminales se localizan principalmente en Ni y algunos terminales escasos en M y E dorsal. En la **figura 4-15**, se muestra el detalle de para dos casos de inyecciones, en NFL y NCL. El único caso en que inyectamos PHA-L en NIL (**tabla 4-1**, caso NFL/NIL) obtuvimos muy pocos terminales en Ni. Esto se atribuyó a tres posibles motivos, el primero es que las proyecciones recíprocas desde NIL son muy pocas (también se marcan pocas células en **fig. 4-14C**). Segundo, que la proyección es topográfica y debido a esto los terminales encontrados en Ni se observaron solo en una sección de telencéfalo que corresponde topográficamente. Tercero, la inyección no fue certera y no dimos con los sitios de NIL que proyectan a Ni.

Con respecto a Arc, en los tres casos de inyecciones anterógradas en esta estructura (Arc1-3, **tabla 4-1**) siempre se obtuvo muy poca marca de terminales en Ni, casi siempre distribuidos en el margen medial del entoplio (NiDlp) o en el mesoplio dorsal. Para estos

casos es posible suponer que no dimos en el blanco correcto, ya que según los resultados de células marcadas retrógradamente en Arc desde Ni, las células Ni proyectantes se distribuyen en subdivisiones de Arc muy restringidas y en cantidades discretas (fig. 4-14D).

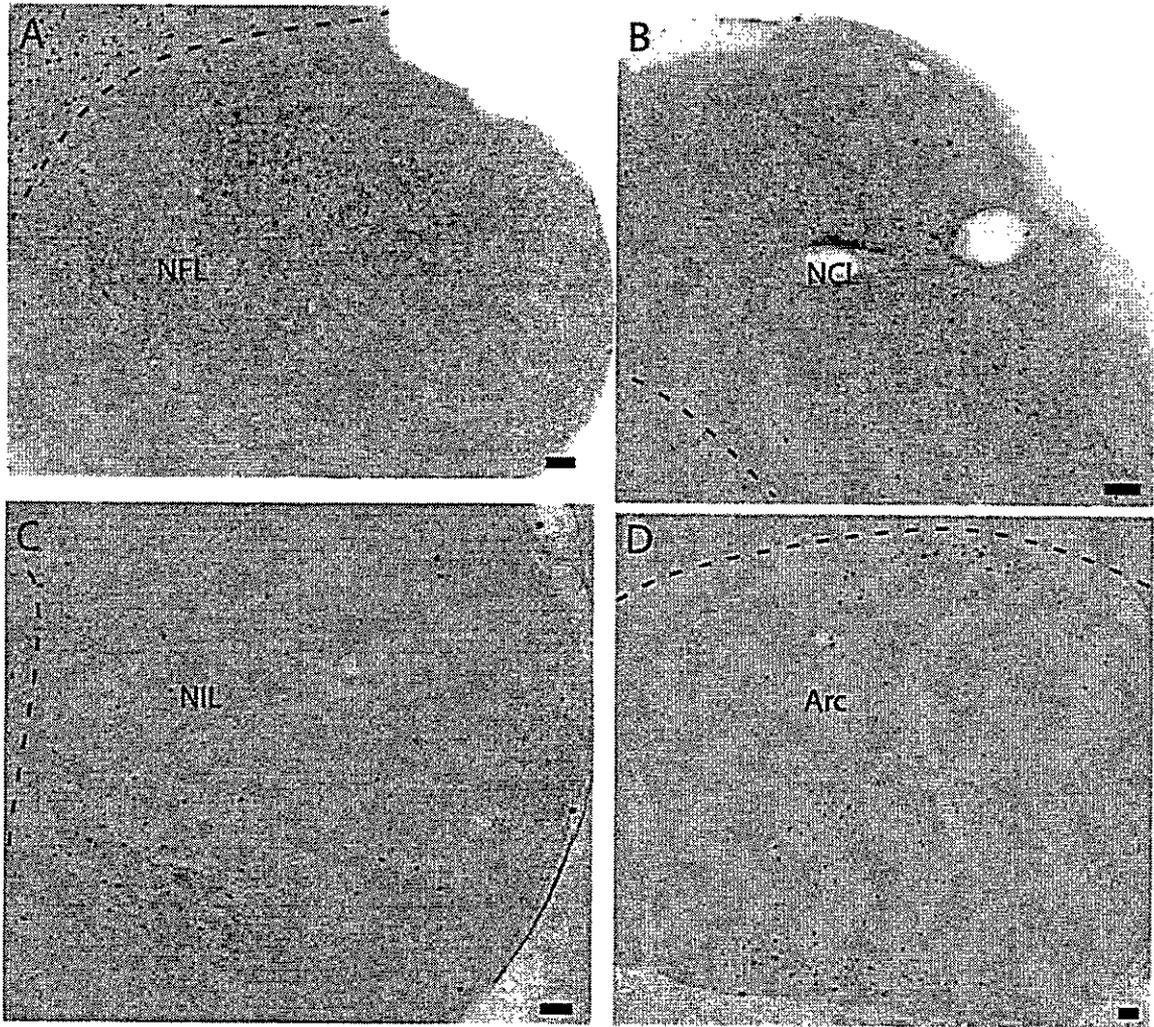


Figura 4-14. Reciprocidad en la proyección entre el colopodio visual y sus blancos. Neuronas marcadas retrogradamente en los distintos blancos paliales del colopodio visual producto de una inyección de Ctb en Ni. A: NFL. B: NIL. C: NCL. D: Arc. Barra de calibración: A-D, 100 μ m.

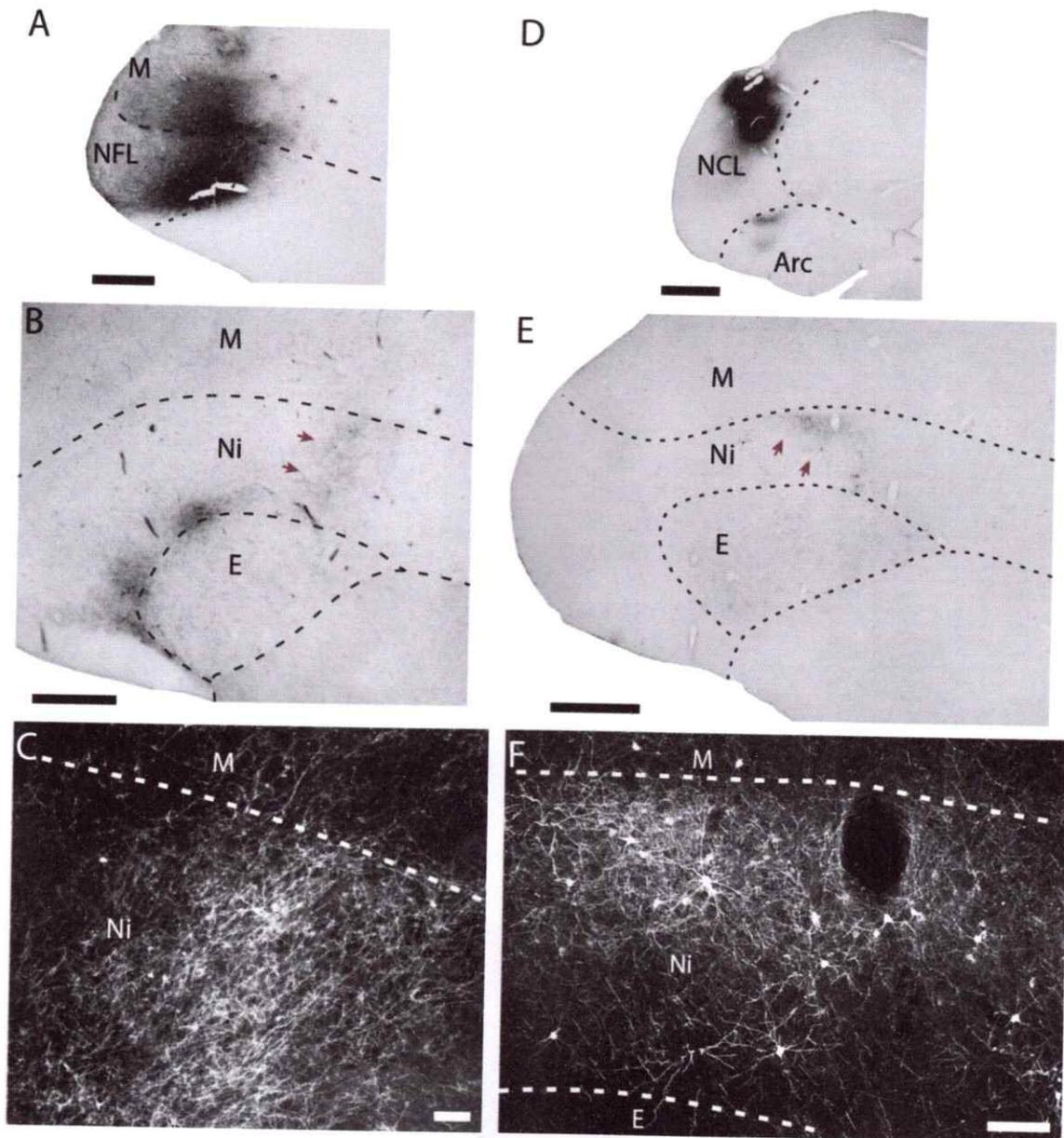


Figura 4-15. Proyección desde NFL y NCL hacia el colopalo visual. Secciones telencefálicas coronales mostrando la marca de terminales obtenidos en Ni como producto de inyecciones en NFL y NCL. **A:** Inyección de BDA 3K en NFL. **B:** Panorama de los terminales obtenidos en Ni como producto de la inyección presentada en A. **C:** Fotografía con colores invertidos mostrando una magnificación de los terminales en la región indicada con flechas en B. **D:** Inyección de PHA-L en NCL. **E:** Panorama de los terminales (y células) obtenidos en Ni como producto de la inyección presentada en D. **F:** Fotografía con colores invertidos mostrando una magnificación de los terminales en la región indicada con flechas en E. Barras decalibración: A y D, 1mm; B y E, 500 μ m; C y F, 100 μ m.

Distintas poblaciones celulares en Ni.

Para caracterizar las neuronas de Ni con respecto a sus eferencias, realizamos una serie de experimentos de doble inyecciones de trazadores retrógrado en los blancos NFL y NCL. En estas inyecciones utilizamos Ctb-Alexa 488 en NFL y Ctb-Alexa 555 en NCL.

El resultado de uno de los experimentos (NCF 2, **tabla 4-1**) de doble inyección se presenta en la **figura 4-15**. Las observaciones hechas sobre estos experimentos son principalmente tres. Primero, las células de proyección hacia NFL y NCL, marcadas retrógradamente por inyecciones en cada sitio, se entremezclan en Ni en caso de que las inyecciones coincidan en marcar células distribuidas en el mismo punto de origen. Segundo, del resultado anterior se desprende que en Ni se encuentran al menos dos poblaciones de neuronas si es que nos basamos en el blanco de proyección como rasgo definitorio de cada población. Tercero, además de las poblaciones proyectando hacia NFL y NCL se puede observar una tercera población minoritaria, que proyecta hacia ambos blancos. Casos de estas neuronas se pueden observar en la **figura 4-16** como células doble marcadas por los trazadores inyectados en ambos blancos. Al contar estas células en las dos repeticiones de este experimento, encontramos que en promedio corresponden a un 3,4% del total de células de proyección marcadas.

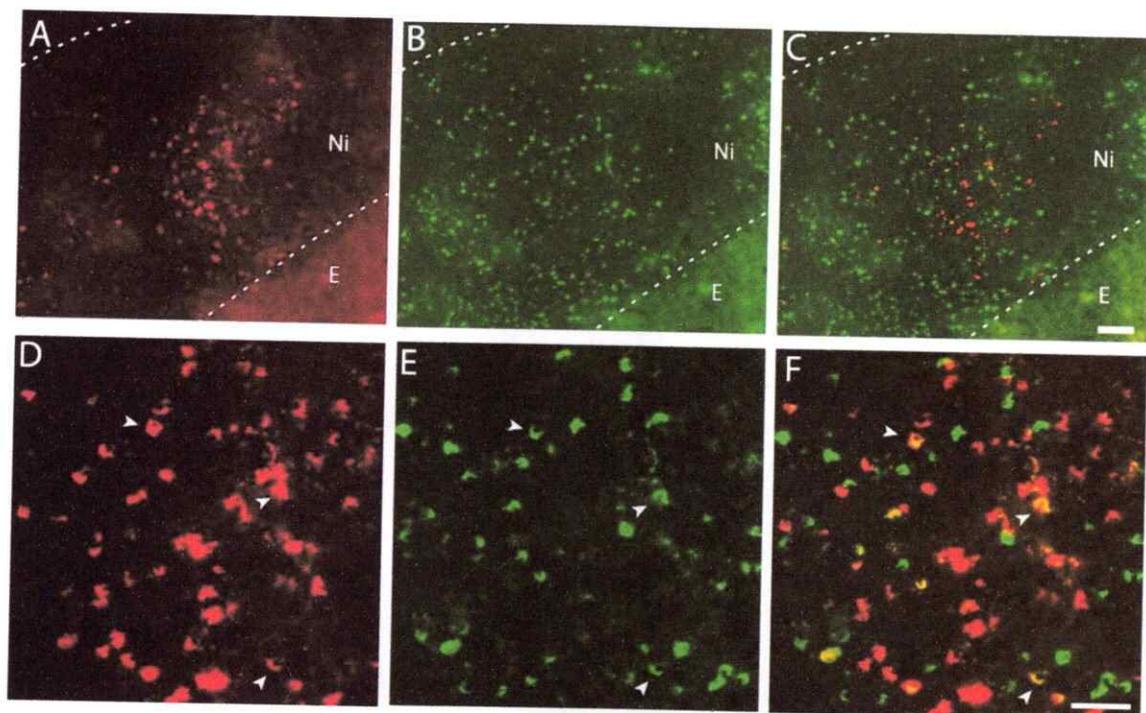


Figura 4-16. Diferentes tipos celulares en Ni originan la eferencia del coloplio visual. Células resultantes de dos inyecciones de CTB-Alexa en NFL (alexa488) y NCL (alexa555) se distribuyen y entremezclan en el Ni. **A-C:** panorama de células marcadas retrógradamente en Ni desde NFL (rojo, **A**) y NCL (verde, **B**). **D-F:** Magnificación de la imagen superior mostrando que parte de la población de células marcadas retrógradamente es doble marcada, indicando la presencia de una tercera población neuronal en Ni. Barras de calibración: C, 100 μ m, válido para A-C; F, 50 μ m, válido para D-F.

DISCUSIÓN

En esta sección del trabajo presentamos resultados de un estudio detallado de las relaciones del DVR visual con el resto del telencéfalo. Las conexiones eferentes de E han sido estudiadas previamente por otros autores (Ritchie, 1979; Husband & Shimizu, 1999; Alpár & Tömböl, 2000; Krützfeldt & Wild, 2005). Tal como se describió en la introducción estos han indicado la existencia de proyecciones que siguen un flujo lineal desde E hacia regiones circundantes (*belt*), desde donde el flujo continúa hacia áreas paliales de tercer orden sensorial.

En la primera parte del capítulo describimos la organización interna del DVR visual en palomas demostrando que, al igual que en pollos, se organiza como un módulo formado por tres láminas principales (E-Ni-M), conectadas masivamente siguiendo los mismos patrones de conectividad intrínseca descritos en pollos (capítulo 3; Ahumada-Galleguillos y col., 2015).

En relación a la localización de las células eferentes los experimentos de doble inyección en Rt y NCL, permitieron delimitar la lámina tálamo recipiente y observar al mismo tiempo las células eferentes. Demostramos que estas neuronas se ubican exclusivamente en Ni, segregadas de los terminales talámicos. En los experimentos en que inyectamos trazadores retrógrados en el resto de los blancos del DVR visual, el resultado no fue diferente. A pesar de no contar

con la marca de los terminales talámicos, usando microscopía de campo oscuro pudimos determinar el límite dorsal de E, encontramos que las neuronas de proyección se localizan siempre en Ni y no dentro de E. En algunos casos, aunque en mucha menor cantidad y densidad, también observamos neuronas en el mesopallio dorsal. De esta forma nuestros resultados indicaron que el Ni es la principal lámina de eferencias del DVR visual. Previamente algunos autores describieron proyecciones intrapaliales originadas en E (*core*), Ep (*belt*) y parte de Ni (Ep2) hacia el resto del palio (Husband & Shimizu 1999; Alpár & Tömböl, 2000; Krützfeldt & Wild 2005). Sin embargo, nuestros resultados indican que esto ocurre solo desde Ni. La diferencia en los resultados obtenidos puede atribuirse en primer lugar a la poca claridad en la definición del *belt* por parte de algunos autores, el cual normalmente es confundido con el Ni, aunque el *belt* fue descrito originalmente como el borde dorsal de E característico por tener neuronas pequeñas (Karten & Hodos, 1970). Además, estudios recientes han confirmado la aferencia rotundal hacia este nivel de E (Fredes y col., 2010). Es por eso que nuestro experimento de inyección Rt/NCL es concluyente respecto a la localización de las células eferentes al Ni. En segundo lugar, en los trabajos previos revisados se puede ver que las inyecciones son de gran tamaño, comprometiendo más de una lámina o área palial, lo cual puede confundir la interpretación de los resultados. Ante esto fuimos cuidadosos en

la posición de las inyecciones, completando además cada resultado obtenido con inyecciones complementarias.

Los blancos del colopallio visual presentados en este capítulo (NFL, NIL, TPO/NCL y Arc) coinciden con los descritos previamente por Husband & Shimizu (1999). Estos autores indican que la proyección se organizaría con una topografía en que la parte rostral proyectaría hacia NFL, la parte central principalmente hacia TPO, la parte caudal sobre NIL y por último indican que la proyección hacia NCL y Arc sería menor y se originaría solo desde el Ni caudal. En nuestros resultados se pueden observar similitudes y diferencias a lo propuesto por estos autores. Una similitud es que NFL recibe con mayor énfasis desde el Ni rostral, aunque también se observó terminales provenientes de los niveles caudales. Con respecto a la proyección del Ni hacia el NIL, Husband & Shimizu (1999) limitan el NIL solo al nidopallio caudal a E y no como todo su contorno latero-caudal. De este modo se puede entender que ellos describan proyecciones solo desde la parte caudal del Ni. Sin embargo, al considerar la banda completa (siguiendo a Karten & Hodos, 1967 y Atoji & Wild, 2005) es evidente que esta también recibe aferencias desde la parte rostral y medial.

Otra diferencia respecto al trabajo de Husband & Shimizu (1999) tiene que ver con el área TPO. Esta región fue designada inicialmente en el atlas de Karten & Hodos (1967), como una franja del pallio lateral pegada a la pared del hemisferio comenzando en

el nivel A7.0 dispuesta lateral al NIL en su porción caudal. Según el atlas TPO sería distinto de NCL, el que se localizaría en niveles más caudales a TPO dispuestos como franja igual que este. Del mismo modo Husband & Shimizu (1999) consideran esta diferencia. Sin embargo nuestro material nos ha hecho considerar a TPO y NCL como la misma región, esto ya que la marca de terminales y células en esta área -obtenida de inyectar Ni- se observa como un continuo comenzando alrededor del nivel A7.0 hasta A5.5 (niveles k y n fig. 4-3). Esto es consistente con los trabajos en que se ha estudiado la organización del NCL y TPO, donde se indica que ambas áreas comienzan en A7.0 y se distingue como una franja positiva para la presencia de la enzima tirosina hidroxilasa en todo su largo (Kröner & Güntürkün, 1999). Además, nuestros resultados muestran que las inyecciones en esta franja, independientemente de la posición rostro-caudal en que se hicieran, resultan en un patrón hodológico indistinguible (conectándose principalmente con Arc y LSt). Por último, Szele & Cepko (1996) demostraron que durante el desarrollo del palio, neuronas ubicadas en toda la franja dorso-ventral del NCL desde A7.0 hasta A5.5 tiene un origen monoclonal (fig. 2 de Szele & Cepko, 1996, clon 43), soportando así nuestra consideración de esta región como una sola área.

La topografía de la proyección intratelencefálica del colopalio visual, fue demostrada para la proyección sobre NFL, NCL, Arc y LSt, y quedó sugerida para el NIL. Esta topografía difiere a lo descrito por Husband & Shimizu (1999) ya que nuestros resultados

indican que el Ni se copia completamente en todos los blancos. Además demostramos que la proyección sobre cada blanco sería topográfica (con mayor o menos énfasis) por separado. Esto es relevante debido a que de esta manera se mantendría en cada blanco la topografía de la proyección tálamo-palial y como consecuencia, la segregación de los diferentes canales propuestos para la vía tectofugal. Sin embargo, no parece copiarse por separado cada canal en distintas áreas del palio.

En relación a la topografía, se pudo ver que la proyección desde Ni hacia el NCL sufre una deformación, donde el Ni rostral proyecta hacia un locus rostro/lateral y el Ni caudal se copia caudo/medial a estos (fig. 4-13f). Kröner & Güntürkün (1999) indican que esta deformación ocurre con el mismo sesgo en la proyección desde distintos blancos sensoriales hacia el NCL, donde áreas sensoriales rostrales (trigeminal) proyectan al NCL lateral y las áreas caudales (field L) lo hacen medial en NCL. Esta deformación se atribuye a la curvatura del palio externo y a la deformación de los hemisferios -debido a su gran desarrollo- respecto a los ejes estereotáxicos.

Una dificultad encontrada en los experimentos de estudio de la topografía, se debió a que las fibras de proyección cursan trayectorias que en muchas ocasiones atraviesan las estructuras en estudio. Por ejemplo, la proyección hacia NCL viaja a través del Ni con un curso latero-caudal (figs. 4-8 y 4-9) y al entrar

al NCL lo atraviesan, provocando que las inyecciones rostrales tomen fibras en paso hacia la región caudal.

El quinto blanco encontrado para el coloplio visual fue el LSt, descrito por primera vez en este trabajo. Encontramos que esta proyección se origina desde todo el Ni y que se organiza topográficamente. Estos resultados permitieron confirmar el antecedente de llenado intracelular del capítulo 3 en que se encontró un caso (Ni7) de neurona LSt proyectante. Previamente en la literatura se habían demostrado solamente proyecciones desde el arcoplio y palio externo (NFL, NIL y NCL), hacia el los ganglios basales (Veenman y col., 1995), pero nunca desde el nidoplio asociado a las regiones sensoriales (Ni). Una descripción más completa de la proyección hacia LSt desde las áreas paliales de segundo orden y como se relacionan éstas con la proyección desde Ni y el entoplio ventral hacia el LSt, sería valiosa para entender la influencia de los circuitos intrapaliales sobre la ejecución motora mediada por los ganglios basales.

Otro aspecto importante en la organización del coloplio visual descrita, fue la presencia de aferencias provenientes desde NCL y NFL, terminando principalmente sobre el Ni. Esto es interesante ya que NFL y NCL reciben aferencias desde distintas áreas sensoriales primarias (Shimizu y col., 1995; Kröner & Güntürkün, 1999), de modo que la proyección recíproca sobre Ni podría

corresponder al sustrato estructural de una modulación del flujo visual tectofugal por la actividad de otras sensoriales.

Los resultados que indican la presencia de distintos tipos celulares en Ni indican que esta lámina no es una estructura homogénea, ya que aquí se entremezclan distintos tipos celulares originando proyecciones segregadas. Conociendo esto, parece interesante ahora saber si es que los distintos tipos celulares se diferencian además en otros aspectos morfológicos, neuroquímicos o fisiológicos. Un resumen de la organización de las eferencias del coloplio visual según los resultados obtenidos en este trabajo se esquematiza en la **figura 4-16**.

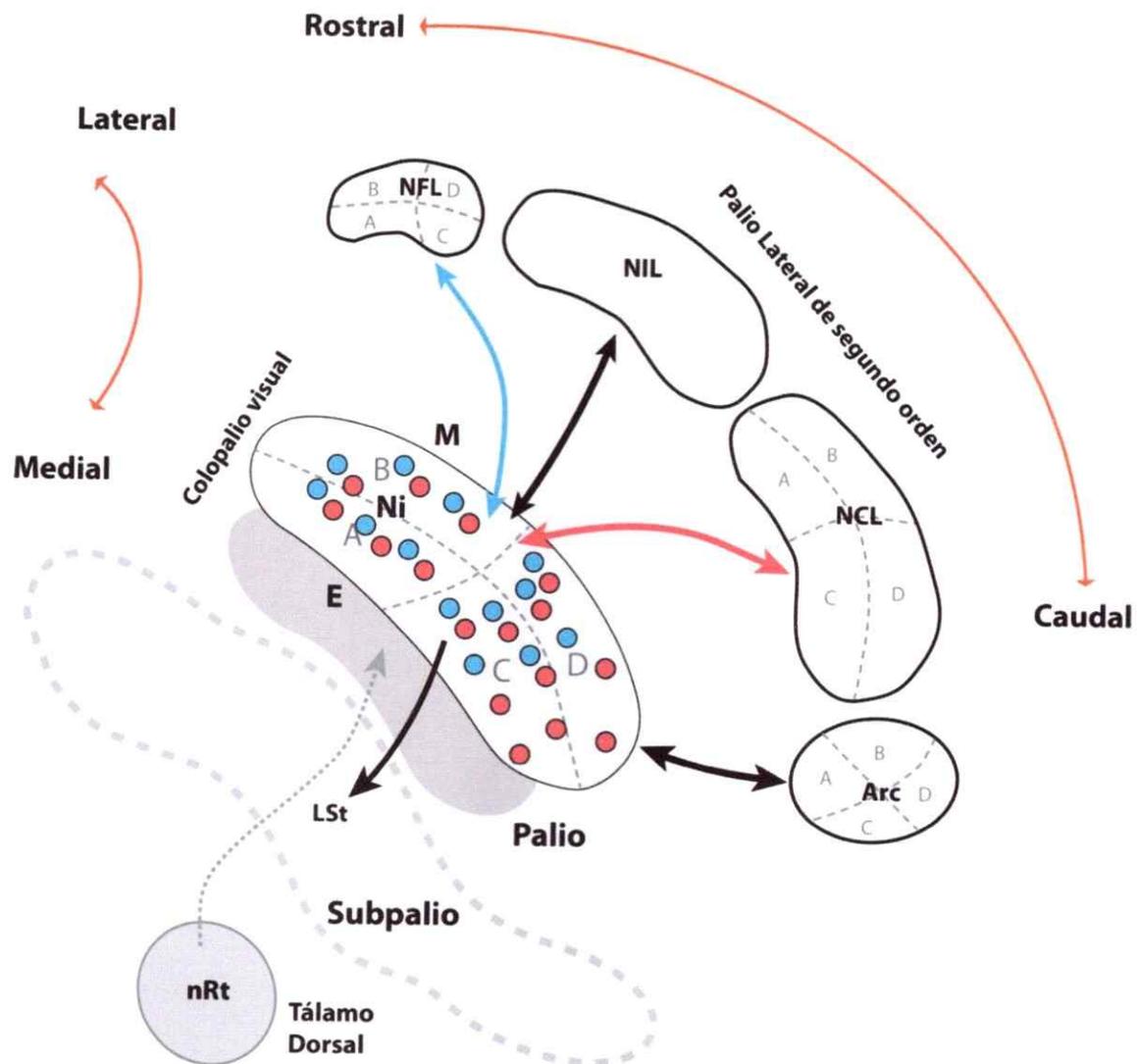


Figura 4-17. Resumen de la organización de las eferencias del colopalo visual. Representación esquemática de la organización de las proyecciones del colopalo desde el Ni hacia el palio de segundo orden y subpalio. Los blancos telencefálicos del Ni son NFL, NIL, NCL, Arc y LSt. Las letras A, B, C y D en gris representan cuadrantes del Ni y la mantención de esta topografía en la proyección hacia los blancos paliales. Los círculos de colores grafican distintas subpoblaciones de neuronas proyectando hacia NFL y NCL.

Laminación, columnaridad, recurrencia y modularidad del colopalio.

Estos cuatro aspectos fueron propuestos en la hipótesis como rasgos fundamentales de la organización del colopalio visual. Los resultados mostrados en este capítulo son concluyentes principalmente respecto a la laminación del colopalio. El carácter laminar se vio reflejado en la especialización hodológica de las neuronas que componen el Ni respecto a E y M. Su organización refleja que funcionalmente operan como una lámina especializada en comunicar al colopalio visual con el resto del telencéfalo, a diferencia de E, que recibe las aferencias talámicas y M al parecer especializado en establecer una proyección recurrente.

En relación a la columnaridad los resultados obtenidos muestran que la topografía de las columnas anatómicas, es conservada en la eferencia debido a la topografía de la proyección. De modo que las neuronas del Ni pertenecientes a una columna, proyectan conservando esta identidad posicional respecto a otras neuronas del Ni. Esto podría ser de importancia en caso de que las columnas fuesen también entidades funcionales significativas.

En relación a la recurrencia, los resultados obtenidos aquí delimitan un modo de operar para el circuito que puede ser relacionado con la recurrencia basándonos en las morfologías de las neuronas de Ni (capítulo 3). Esto ya que las neuronas de Ni se conectan con otras áreas de palio de manera recíproca, de modo que la activación de estas neuronas, sea dirigida por la activación

de la vía tectofugal ascendente o recibiendo actividad desde el resto del palio (vía NFL y NCL), podría activar el circuito intrínseco mediante la proyección de las neuronas del Ni sobre M y sobre el mismo Ni. Esto es relevante desde el punto de vista operacional según se ha propuesto para los circuitos recurrentes, ya que estados sensoriales bajo umbral pueden destacarse cuando se "selecciona" mediante la recurrencia, selección que puede estar determinada por un estado general del telencéfalo indicado por la aferencia hacia el Ni desde NFL y NCL.

Comparación con mamíferos.

La equivalencia de tipos celulares en el palio de aves y mamíferos ha sido propuesta previamente en base a criterios hodológicos y moleculares. La indicación de que el Ni podría corresponder con las neuronas de la lámina 2/3 de mamíferos fue sugerido recientemente por Jarvis y col. (2013). Esta propuesta se basó en la expresión de macromoléculas características de lámina 2/3, en las neuronas del Ni. Sin embargo, la poca caracterización anatómica de estas neuronas no ha permitido una comparación en términos operacional entre ambas láminas. Los resultados presentados en este capítulo indican, que el Ni corresponde operacionalmente al menos a una parte de las neuronas de las láminas 2/3 de mamíferos. La evidencia presentada que soporta esta afirmación es la siguiente: 1) Las neuronas en Ni se especializan en generar la

eferencia del colopatio visual hacia otras áreas paliales de forma similar a como las neuronas L2/3 de proyección intracortical, conectan las áreas visuales primarias con áreas corticales de segundo y tercer orden (DeFelipe y col. 1986; Wang & Burkhalter, 2007). 2) El Ni proyecta desde toda su extensión (dorso-ventral y rostro-caudal) hacia áreas paliales de segundo orden, copiándose manera topográfica, variando el grado en que esto ocurre dependiendo de la región aferentada. En la corteza visual primaria se ha descrito que la proyección hacia áreas visuales de segundo orden representa casi completamente el área primaria, mostrando distinto énfasis en la proyección sobre distintas áreas y organizándose topográficamente (Wang & Burkhalter, 2007). 3) Tanto las neuronas del Ni de aves como las L2/3 de mamíferos, reciben mayoritariamente las aferencias provenientes desde otras áreas paliales (Wang & Burkhalter, 2007). 4) El Ni se compone de distintos tipos celulares que proyectan diferencialmente. En mamíferos se ha descrito una variedad de neuronas en la lámina 2/3 (Tahvildari & Alonso, 2005). 5) Una subpoblación de neuronas en Ni proyecta sobre el estriado lateral de los ganglios basales telencefálicos, la cual parece hodológicamente equivalente a las neuronas de proyección intratelencefálica localizadas en la lámina 2/3 que presentan una proyección al estriado (comparar con **figura 4 de anexo**; Reiner & col., 2003; Khibnik y col., 2014).

Del mismo modo que se pueden encontrar similitudes en la organización del Ni de aves y L2/3 de mamíferos hay algunas

diferencias que notar. Una de ellas es la ausencia de un cuerpo calloso por donde viajan los axones de proyección entre áreas corticales distantes y los axones de proyección interhemisféricos originados en las neuronas de la lámina 2/3. En aves incluso no existe la proyección entre ambos hemisferios originada en áreas sensoriales del palio, esto ocurre solamente desde el DVR caudal (arcopalio y NCL).

Según la evidencia encontrada en este trabajo nos parece correcta la equivalencia que se ha propuesto para el Ni y L2/3 de mamíferos debido a que ambos grupos de neuronas conectan áreas paliales distintas. En relación a la organización de las proyecciones intrínsecas del colopalio, esta consideración parece correcta ya que Ni recibe proyecciones desde E, tal como L2/3 recibe desde L4. Aunque la ausencia de una población equivalente evidente a la lámina 5 en el DVR dificulta establecer la presencia de una proyección equivalente a la desde L2/3 sobre L5, nos parece que esta podría corresponder con la proyección de M sobre E. Esto se dice ya que en E ventral existe una población de neuronas LSt proyectantes comparables en ese sentido a las L5. De esta forma el MVe podría corresponder con una población de neuronas 2/3, especializada en aves en proyectar de manera recurrente sobre las neuronas entopaliales estriado proyectantes. Esto tiene sentido además con lo propuesto por Chen y col., (2013) donde se compara a M con parte de la lámina 2/3 basándose en la expresión del marcador molecular Foxp1, característico de L2/3.

CAPÍTULO 5

AFERENCIAS TALÁMICAS DEL COLOPALIO VISUAL Y ÁREAS SECUNDARIAS ASOCIADAS.

INTRODUCCIÓN

El tálamo dorsal y el telencéfalo palial de amniotas son estructuras cerebrales masivamente conectadas. Esta cercanía se puede observar también durante estadios embrionario ya que ambas regiones se originan a partir de la misma vesícula cerebral, el prosencéfalo (Puelles y col., 2013). Esta relación estructural y embriológica está acompañada de una profunda relación funcional, sostenida por las masivas proyecciones desde todos los núcleos del tálamo dorsal sobre el palio (Jones, 1985). Esta proyección tálamo-palial es un rasgo importante en la organización de las vías sensoriales ascendentes. Esto ya que cada núcleo del tálamo dorsal que forma parte de alguna vía, como relevo talámico, establece una proyección topográfica de primer orden hacia el palio (Jones, 1985; Csillag & Montagnese, 2005; Buttler, 2008). Esta proyección sensorial primaria, determina que la actividad de los núcleos dorsales del tálamo tenga una gran influencia sobre la actividad del área palial específica que aferentan. Debido a esto se le conoce en inglés como proyección "driver" (Sherman & Guillery, 1998). En mamíferos la proyección talámica primaria recae

principalmente sobre las células localizadas en la lámina 4 de la corteza. En aves de manera similar las fibras talámicas primarias aferentan grupos celulares específicos (entopallio, field L, basorrostralis, intersticio hiperpallial).

En mamíferos se ha descrito además una proyección secundaria, desde el tálamo dorsal al pallio, que se origina a partir de células diferentes a las que forman la proyección primaria o *driver*. Estas neuronas se encuentran, en los casos más diferenciados, como subnúcleos dentro o alrededor de las regiones sensoriales primarias, formando una matriz que se caracteriza por la presencia de la proteína calbindina (Rausell & Jones, 1991; Jones, 2001). Los terminales axonales de las fibras talámicas secundarias se distribuyen mayoritariamente en las láminas 1 y 2/3 de la corteza, no presentan una organización topográfica ni parecen ser área específicos (Hashikawa y col., 1991; Jones 2001). Además a esta proyección secundaria se le ha atribuido una función moduladora y sincronizadora de la actividad de distintas áreas corticales (Jones, 2001).

A pesar de lo conservada que se encuentra en amniotas la proyección "*driver*" formada por las neuronas de los núcleos talámicos primarios, algo como la proyección difusa "moduladora" no ha sido descrita más que en mamíferos.

En este capítulo realizamos un estudio detallado de las aferencias talámicas al colopallio visual, teniendo como foco central la

proyección del tálamo sobre el nidopalio intermedio (Ni). Inesperadamente encontramos que las células que proyectan sobre esta lámina del colopalio visual, no se localizan en el núcleo Rt del tálamo dorsal como se ha descrito previamente (Egedi & Tömböl, 1994; Ahumada-Galleguillos, 2012), si no que en la periferia de este. Además, encontramos que estas neuronas parecen formar parte de una red neuronal perisensorial en el tálamo, la que proyecta de manera difusa además sobre distintas áreas del palio. Estas características la prospectan como una posible proyección sincronizadora y moduladora del flujo tálamo-palial.

RESULTADOS

Nueve de los veinte casos de inyecciones utilizados en las descripciones hechas en este capítulo (tabla 5-1), fueron utilizados también para la caracterización de las conexiones intratelencefálicas del colopallio visual en el capítulo 4. Esto fue posible ya que, en los casos de depósitos hechos en el pallio, se utilizaron mezclas de trazadores anterógrados y retrógrados, que pueden ser visualizar de forma separada usando anticuerpos selectivos para cada trazador. De esta manera las inyecciones de trazadores retrógrados en el pallio, sirvieron para estudiar las aferencias talámicas. En la tabla 5-1 se presenta un resumen de los sitios de inyección, trazadores y resultados obtenidos.

Entopallio y Nidopallio intermedio son aferentados por distintos núcleos del tálamo dorsal.

En un conjunto inicial de experimentos, realizamos inyecciones restringidas al núcleo rotundo del tálamo dorsal para caracterizar los terminales en E y Ni descritos en la literatura (casos Rt1-6). Estos casos corresponden a cinco inyecciones de PHA-L y una de Ctb, este último trazador es utilizado principalmente como trazador retrogrado; sin embargo, también funciona de forma anterógrada con bastante sensibilidad en el llenado de procesos secundarios. Todas las inyecciones rotundales realizadas resultaron en terminales distribuidos en toda la extensión dorso

Tabla 5-1. Resumen de casos de inyecciones usadas en este capítulo.
 Caracterización de experimentos de inyecciones de trazadores anterógrados *in vivo* en el tálamo (1-6) y de trazadores retrógrados en el palio (7-17).

caso	Sitio Inyección	trazador	Terminales				células		
			Ent	Ni	M	tálamo	Rt	tálamo	DLP
1	Rt1	Rt	PHA-L	+++	-	-	-	-	-
2	Rt2	Rt	PHA-L	+++	-	-	-	-	-
3	Rt3	Rt	PHA-L	+++	-	-	-	-	-
4	Rt4	Rt d	PHA-L	+++	++	-	-	-	-
5	Rt5	Rt d	PHA-L	+++	++	-	-	-	-
6	Rt6	Rt d	Ctb	+++	++	-	-	-	-
7	Ent1	E	Ctb				+++	-	
8	Ent2	E	Ctb				+++	-	
9	Ni1	Ni	Ctb				+	++	
10	Ni2	Ni	Ctb				-	++	
11	Ni3	Ni /E	Ctb				+	++	
12	Ni4	Ni /M	Ctb				-	++	
13	Ni5	M / NiDLP	Ctb				-	++	++
14	NiTeO	Ni / TeO	Ctb /PHA-L						
15	NCF2	NFL / NCL	Ctb488/Ctb555				-	+++	
16	NFL1	NFL	Ctb				-	++	-
17	NCL2	NCL	Ctb				-	++	-
18	Arc1	Arc	Ctb				+++	-	+++
19	Arc2	Arc	PHA-L				+++		
20	Arc3	Arc	PHA-L				+++	-	+++

Simbología, -: no se observa; +: escasos; ++: medio; +++: abundantes; Rt d: inyección con derrame de trazador fuera de Rt; Arc: arcopalio; TeO: tectum óptico; NiDlp: Nidopalio intermedio aferentado por DLP.

Ventral de E, tal como se ha descrito previamente (Fredes y col., 2010). Además, en todos los casos dependiendo del tamaño de la inyección, fue evidente en mayor o menor grado la topografía de la proyección tálamo-palial (**fig. 5-1**). A pesar de esta consistencia entre los casos de inyecciones talámicas, solo en la mitad de las instancias fueron observados los terminales en el Ni del coloplio visual. Al comparar los seis casos, se observó que la presencia de terminales en Ni dependía directamente de cuán restringido a los límites del núcleo rotundo resultara el depósito del trazador, ya que solo en los casos en que se derramó trazador fuera del núcleo, se encontraron terminales en Ni (**tabla 5-1, fig. 5-2**). En los casos que la inyección de trazador comprometió estructuras talámicas fuera de Rt, se observaron fibras pasando el límite dorsal del entoplio, terminando en Ni y extendiéndose hacia dorsal hasta la lámina mesopalial que separa al Ni del mesoplio (**fig. 5-2**). Una diferencia de los terminales en Ni con los encontrados en E, es que los primeros son evidentemente menos densos, excepto por los terminales que se distribuyen justo en la frontera entre E y Ni, donde se forma un plexo de terminales característico de las inyecciones dorsales en Rt (**fig. 5-2F, G**).

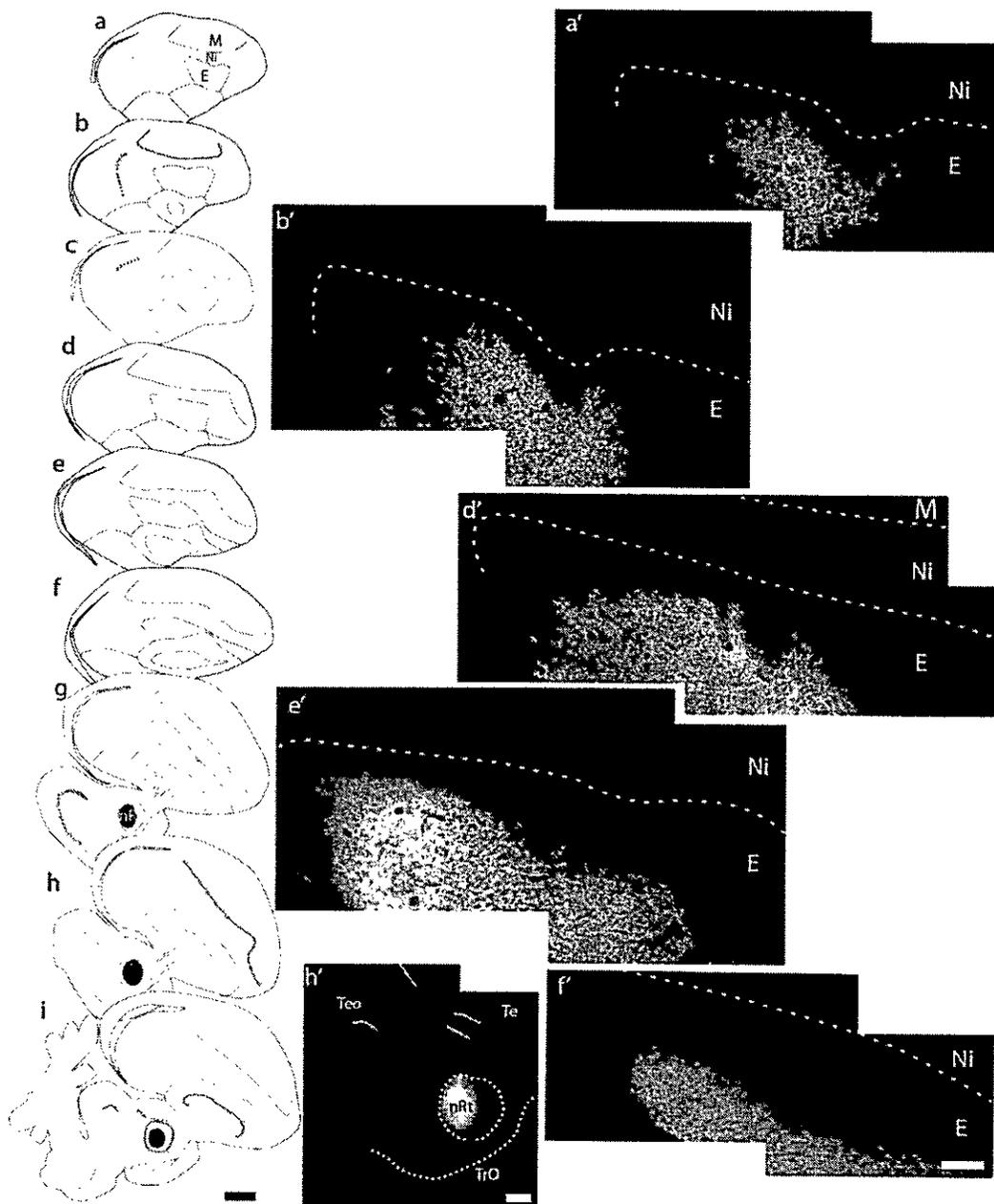


Figura 5-1. Aferencias talámicas del colopalio visual I. Inyección extracelular de trazador anterógrado PHA-L restringida al núcleo rotundo del tálamo dorsal resulta en terminales restringidos a E (caso Rt1). En la columna izquierda se presenta una reconstrucción de una serie de secciones sagitales en orden latero-medial (a-i), representando la inyección en Rt y la distribución de terminales en E. A la derecha se observan fotografías de los niveles a, b, d, e y f, mostrando los terminales en el colopalio y el sitio de inyección en el tálamo (h'). Barra de calibración en i válida para a-i, 1mm; barra en f' válida para a'-f', 250µm; h', 500µm.

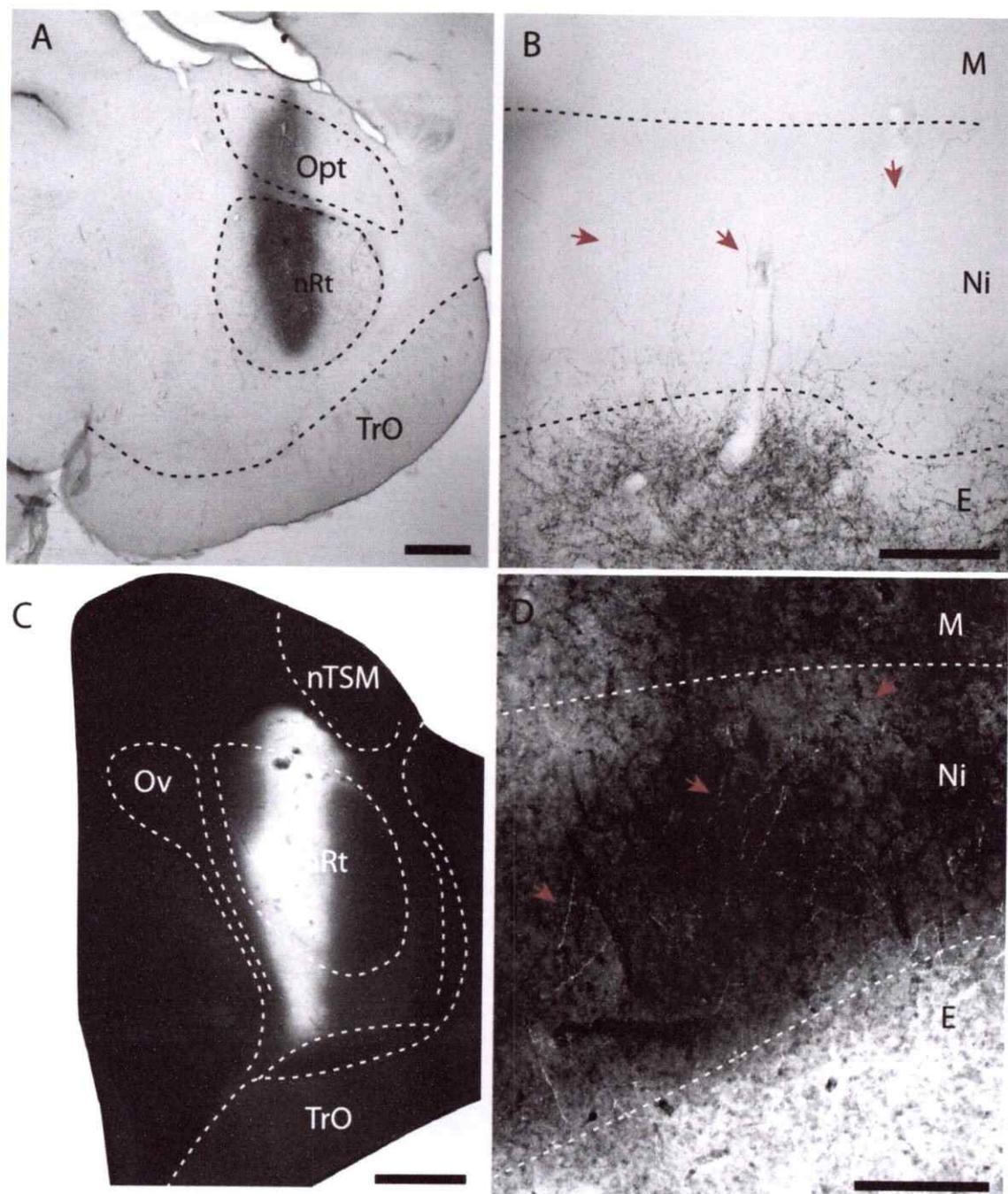


Figura 5-2. Aferencias talámica del coloplio visual II. Inyecciones extracelulares de trazadores en el núcleo rotundo comprometiendo otras estructuras talámicas, resultan en terminales en E y Ni. **A, C y E:** fotografías panorámicas de secciones del hemisferio talámico inyectado con PHA-L en dos casos distintos (A y C) y un tercer caso inyectado con Ctb (E). **B, D, F, G y H:** Fotografías de gran aumento mostrando el detalle de los terminales en Ni para cada una de las inyecciones presentadas (continúa en la siguiente página).

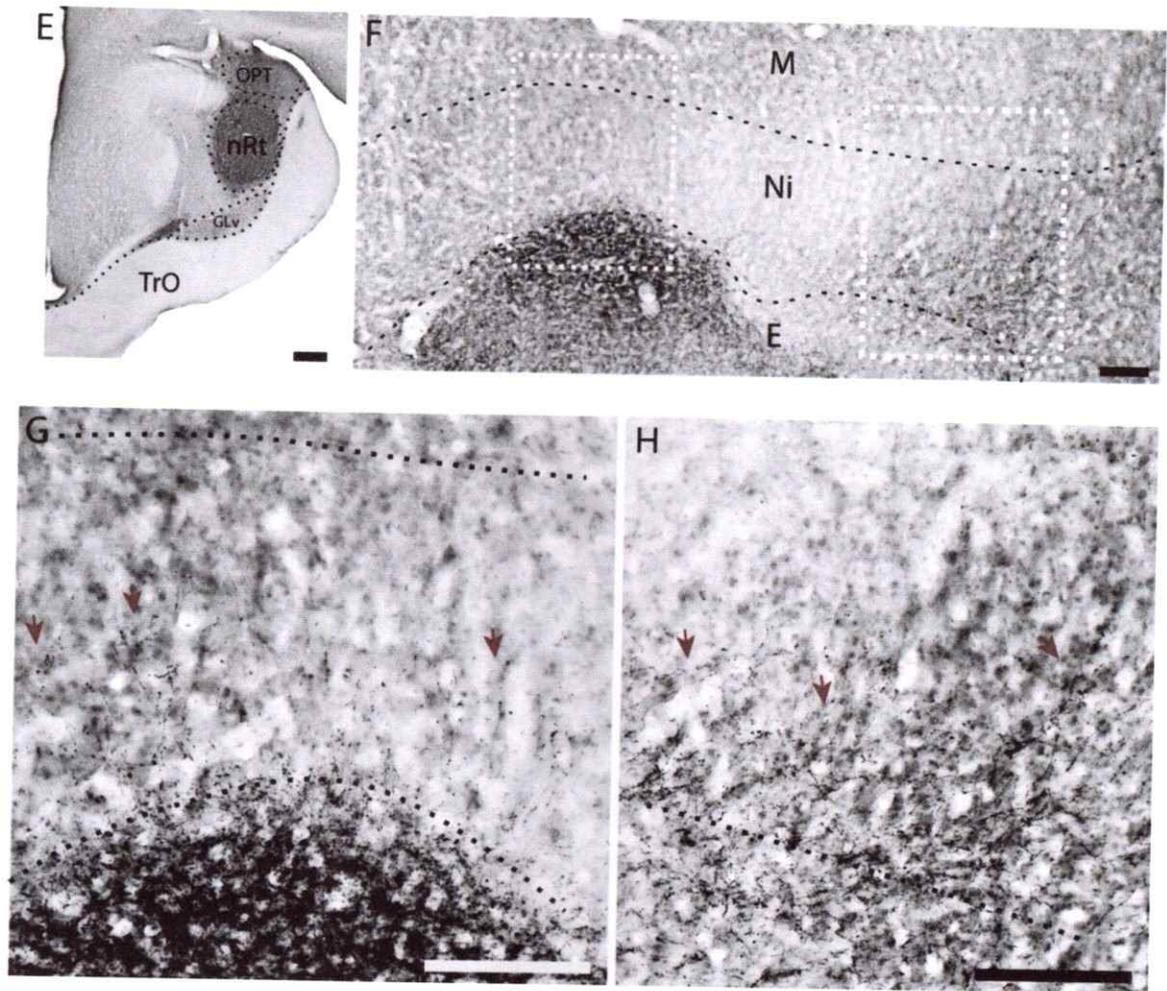


Figura 5-2 (continuación). B corresponde a terminales de la inyección mostrada en A (Rt4); D a la inyección en C (Rt5); F, G y H a la inyección en el panel E (Rt6). Barra de calibración A, C y E, 500 μ m; B, D, F, G y H, 250 μ m.

A continuación de las inyecciones de trazadores anterógrados, complementamos estos experimentos con una serie de inyecciones de trazadores retrógrados, restringidas al entopalio o al nidopalio intermedio (tabla 5-1, casos N° 7-14). En estos casos observamos patrones de distribución de las células talámicas coherentes con lo visto en el trazado anterógrado. De las inyecciones en Ni se obtuvieron células distribuidas por dorsal al núcleo rotundo en una región llamada supra rotundo (SpRt, fig.5-3D') y en menor cantidad en torno a otros núcleos sensoriales de primer orden como DLA, DIVA y DLP (fig. 5-3B', E). Estas regiones marcadas por las inyecciones en Ni, se caracterizan por no tener límites claramente definidos como si ocurre con los núcleos sensoriales primarios. También se observó consistentemente marca de células en otros núcleos del tálamo dorsal llamados sub rotundo (sRt) y spiriformis parvo celular (SPC) (fig. 5-3). Por otra parte, las inyecciones de trazadores retrógrados restringidas a E, resultaron en células contenidas dentro de los límites de Rt y no se observó marca retrógrada de células alrededor de este (fig. 5-4) como sí ocurrió en las inyecciones en Ni.

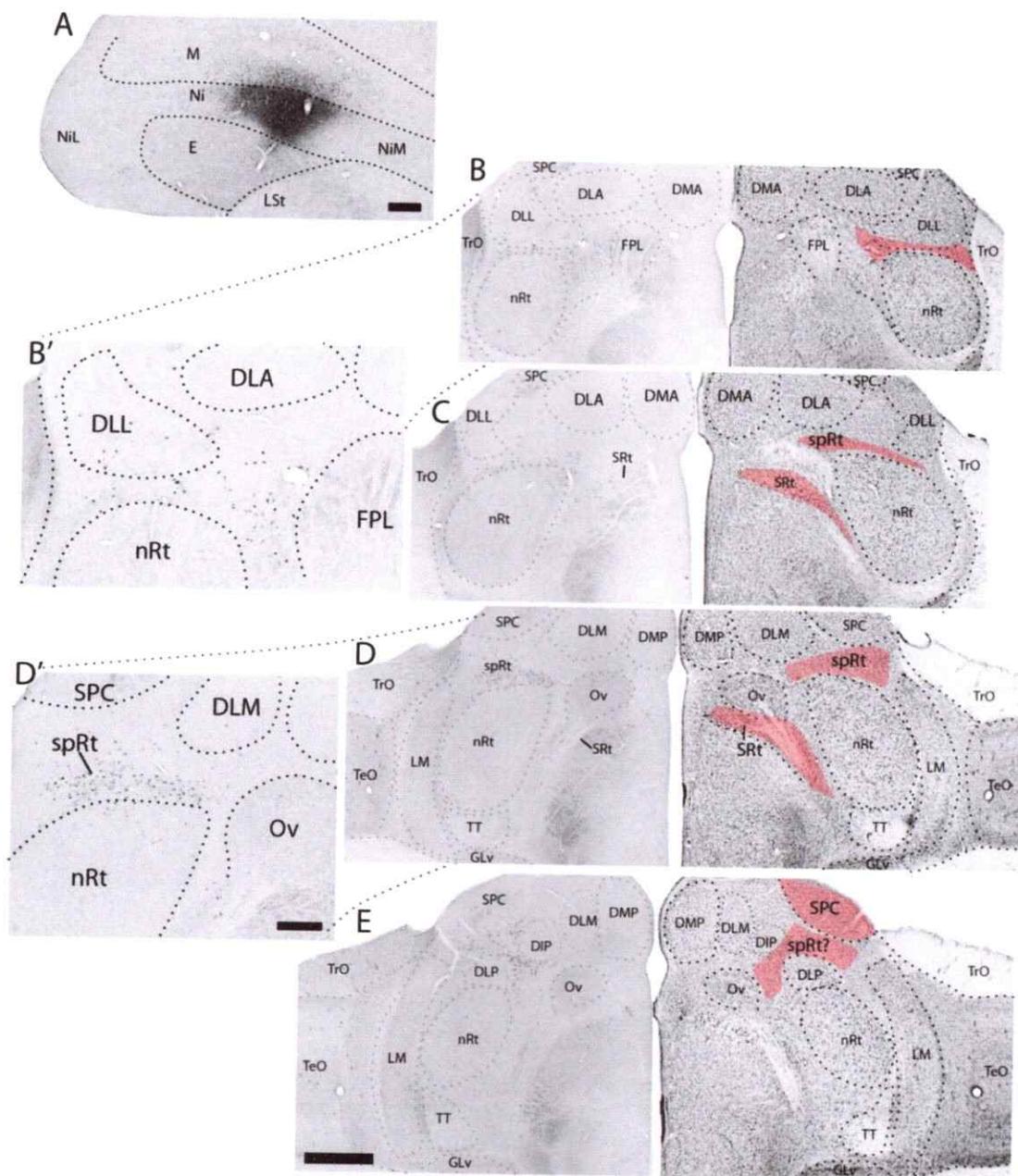


Figura 5-3. Aferencias talámicas del coloplio visual, inyección complementaria en Ni. Inyección extracelular de Ctb en Ni (caso Ni1). **A:** Fotografía de sección telencefálica coronal mostrando el centro del sitio de inyección. **B-E:** fotografías de secciones talámicas, de niveles rostro-caudales (B-E) mostrando células marcadas retrógradamente. Columna izquierda: tejido reaccionado histológicamente para visualizar el Ctb. Columna derecha: tinción de Giemsa de la sección siguiente a las mostradas en la columna izquierda. **B' y D':** Magnificación de la marca observada en B y D. Barra de calibración en A, 500 μ m; la barra en E válida para B-E, 500 μ m; la barra en D' válida para B' y D', 250 μ m.

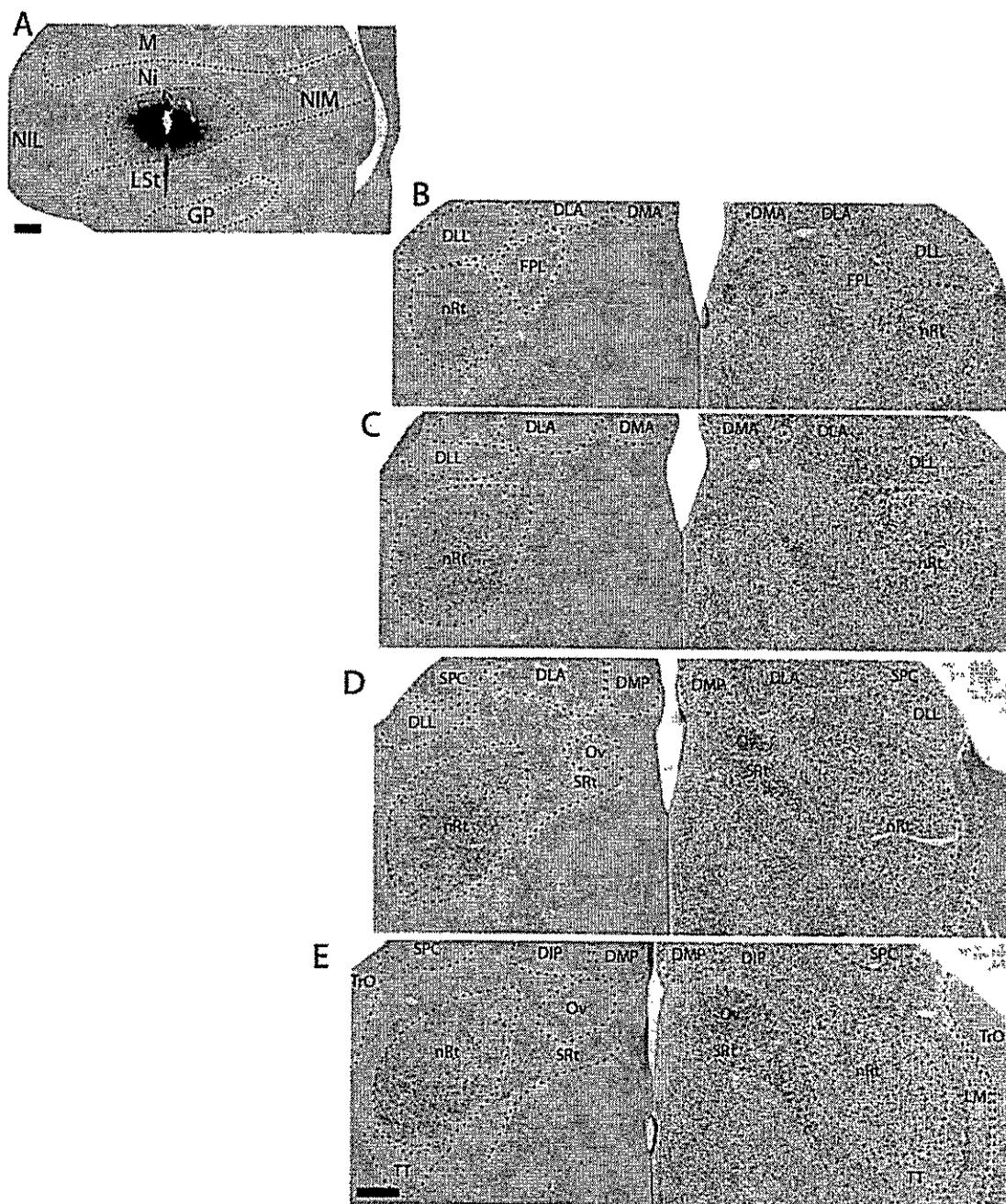


Figura 5-4. Aferencias talámicas del colopodio visual, inyección complementaria en E. Inyección extracelular de Ctb en E (caso Ent1). A: Fotografía de sección telencefálica coronal conteniendo el centro del sitio de inyección. B-E: fotografías de niveles rostro-caudales de tálamo mostrando las células marcadas retrógradamente en Rt. Columna izquierda: tejido reaccionado histológicamente para visualizar Ctb. Columna derecha: tinción de Giemsa de las secciones contiguas a las mostradas en la columna izquierda. Barra de calibración en A, 500 μ m; barra en E válida para B-E, 500 μ m.

Células Ni proyectantes reciben aferencias sensoriales menores.

Para determinar la naturaleza de las células talámicas de proyección al Ni (*driver*, primer orden o *moduladoras*, orden mayor), estudiamos la aferencia visual desde el tectum óptico (TeO) hacia estos grupos de células. Esto fue hecho ya que es una firma de los núcleos de primer orden recibir aferencias sensoriales masivas, lo cual no ocurre para las neuronas moduladoras (Sherman & Guillery, 1998). Para esto realizamos un experimento de doble trazado en el que inyectamos PHA-L en TeO (para marcar la proyección tecto-talámica) y Ctb en Ni (para marcar células Ni proyectantes; caso NiTeO, **tabla 5-1, figura 5-5**). Aunque en este caso, la inyección en Ni comprometió parte de E provocando marca de células en Rt (**fig.5-5A-D**), esto no fue mayor problema ya que el núcleo Rt y sus límites son claramente diferenciables mediante tinciones histológicas, de modo que las células de proyección a E (Rt) y las de proyección al Ni se pueden diferenciar.

Además del objetivo mencionado arriba, este experimento nos permitió identificar al núcleo dorsolateral posterior de tálamo (DLP), el cual también recibe proyecciones desde las láminas profundas del tectum. Esto fue necesario ya que algunas neuronas Ni proyectantes localizadas en el tálamo caudal parecen localizarse dentro de esta estructura (**fig. 5-3E**), lo cual les otorgaría un carácter de neuronas *driver*.

A partir de las observaciones histológicas hechas una vez identificado el núcleo DLP, delimitado por las aferencias tectales, vimos que este se compone de células magnocelulares espaciadas, muy parecidas en tamaño y densidad a las de Rt, disponiéndose como una continuación caudal y dorsal de este (**fig. 5-5F, G y H**). Esta similitud entre Rt y DLP tiene sentido con el hecho de que ambos núcleos reciben aferencias desde las láminas profundas del tectum. Otra característica de DLP es su posición ventro-medial al tracto habénulo-interpeduncular (**fig. 5-5F, HIP**; fascículo retroflexo de mamíferos). En la parte rostral del núcleo (DLPr) las células son más bien parvocelulares, se encuentran pegadas a la parte dorsal de Rt y solo se reconoce una separación entre ambos núcleos por una leve discontinuidad de las fibras tectales (**fig. 5-5E**). Usando estos criterios para reconocer DLP, pudimos comprobar para todos los casos de inyecciones en Ni, que las células que proyecta hacia esta lámina no pertenecen a DLP (**fig. 5-3E y 5-5e', f', h'**). Por el contrario, algunas células que parecen estar asociadas a DLP se encuentran bordeando el núcleo de forma similar a las del spRt con rotundo. Si bien en un caso de inyección en Ni (Ni5, **tabla 5-1**) se marcaron células dentro de DLP, estas son despreciables y se atribuyen a que parte de la inyección comprometió al NiDlp.

La segunda observación hecha en este experimento, es que las células Ni proyectantes ubicadas en SpRt y sRt reciben aferencias

tectales. Sin embargo estas son muy escasas y poco densas, lo cual es muy notorio al compararlo con los terminales que reciben los núcleos sensoriales primarios Rt y DLP (fig. 5-6). Por lo tanto, estos resultados muestran que las neuronas talámicas de proyección a Ni poseen un carácter de proyección tálamo-palial secundaria.

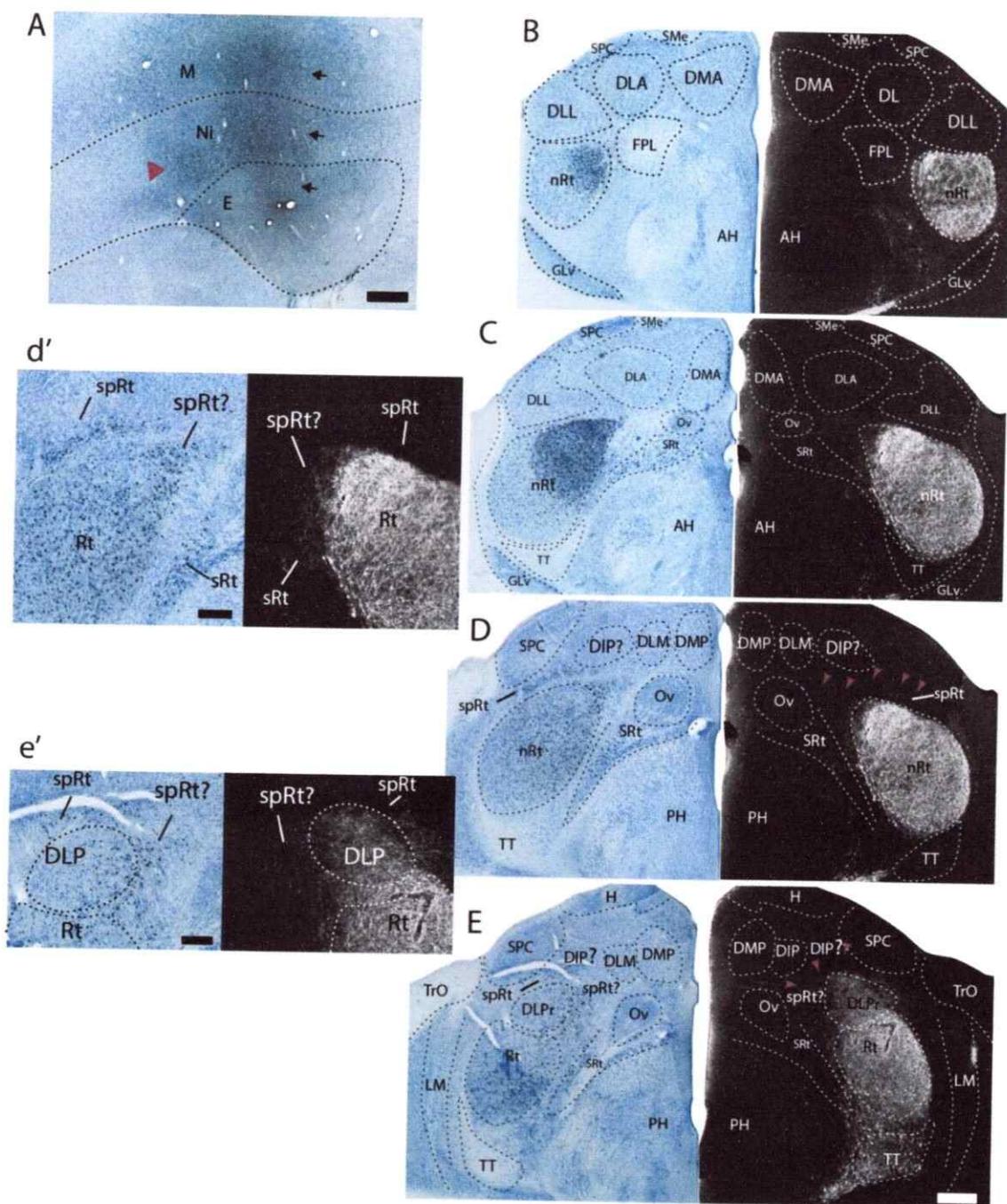


Figura 5-5. Células Ni proyectantes reciben aferencias tectales débiles. Experimento de doble inyección de trazadores, en Ni (Ctb) y TeO (PHA-L; caso NiTeO). **A:** Fotografía de sección coronal telencefálica conteniendo la mayor parte del sitio de inyección en Ni. **B-H:** fotografías panorámicas de secciones de niveles rostro-caudales de tálamo presentando células marcadas retrógradamente desde el sitio de inyección en Ni (columna izquierda) y los terminales producto de la inyección en TeO (columna derecha). (Continuación en la siguiente página)

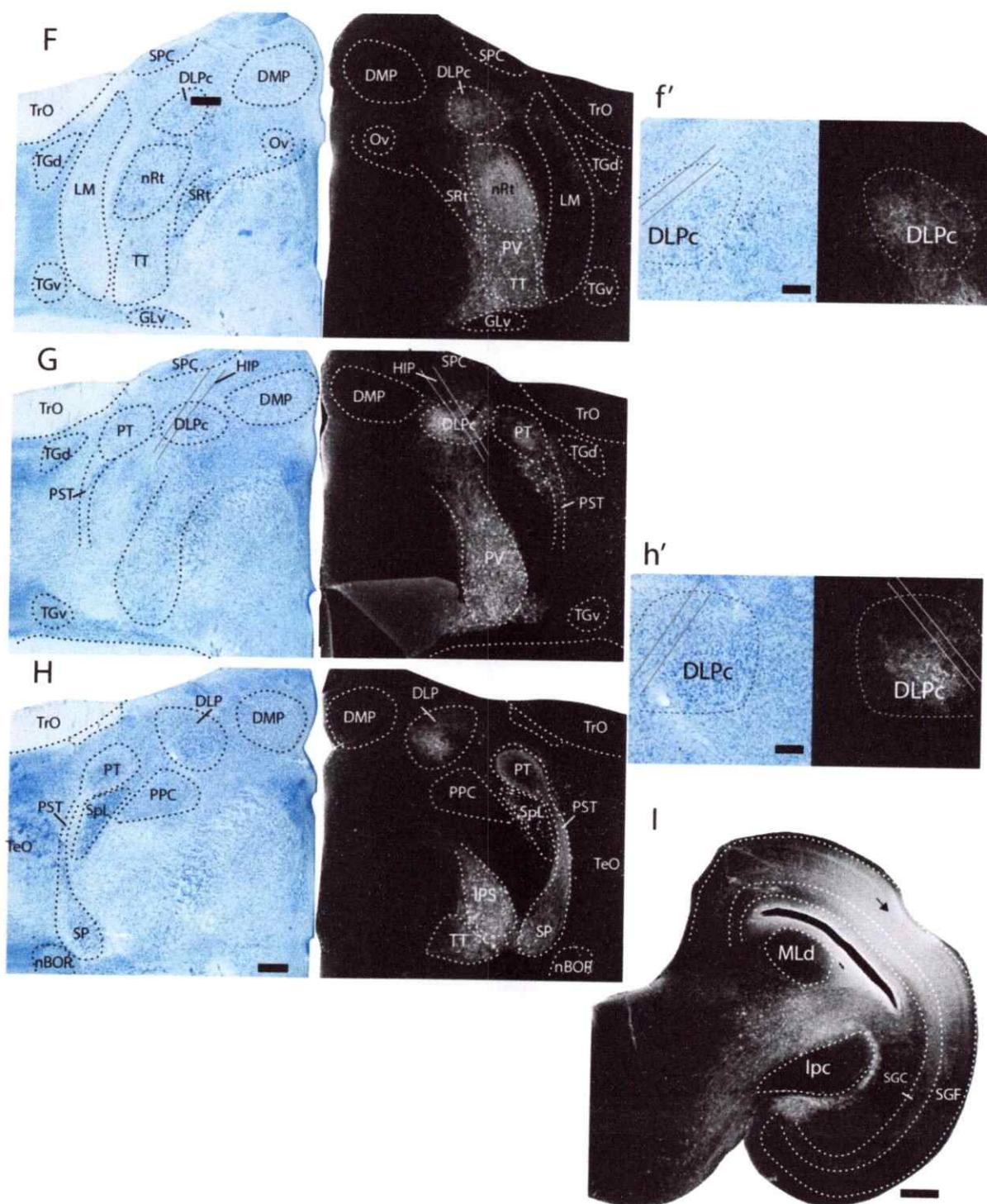


Figura 5-5 (continuación). I: Fotografía panorámica del sitio de inyección en TeO. Barra de calibración para A e I, 500 μ m; barra en E válida para B-E, 500 μ m; barra en H, válida para F-H, 500 μ m; d', e', f' y h', 250 μ m.

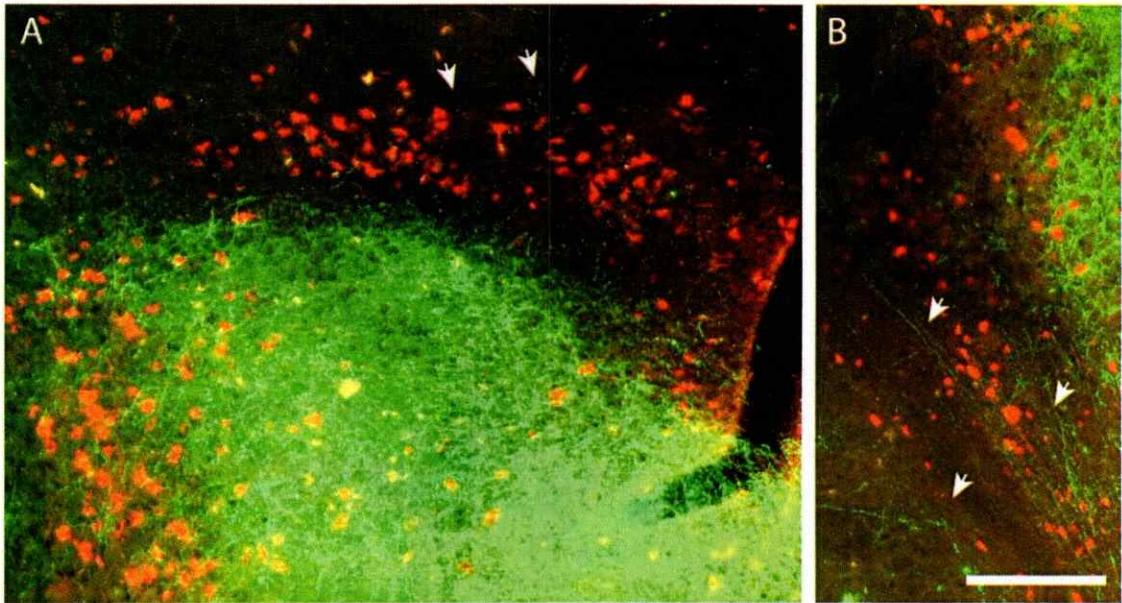


Figura 5-6. Axones tectales aferentan levemente los núcleos Ni proyectante spRt y sRt. Inmunofluorescencia de las fibras tectales (verde) y las células Ni/entopallio proyectantes (rojo). A y B: Fotografías de alta magnificación mostrando la presencia débil de terminales sobre las células en spRt (flechas en A) y en la parte ventral de sRt (flechas en B). La fotografía pertenece a una serie histológica del caso NiTeO mostrado en la **figura 5-5** y corresponde a un nivel equivalente al mostrado en el panel D de ésta. Barra de calibración: 200 μ m.

Células Ni proyectantes y su relación con áreas paliales de segundo orden.

Durante el estudio de las proyecciones intratelencefálicas del colopallio visual (capítulo 4), encontramos que las inyecciones de trazadores en NFL, NCL y Arc, resultaron en células talámicas marcadas retrógradamente (casos NFL1, NCL2, Arc1, **tabla 5-1**). Al revisar la distribución de estas células vimos que se localizaban en torno a los núcleos de primer orden sensorial, formando una franja continua de células (**figs. 5-7, 5-8, 5-9, 5-11**). Al comparar esta marca con la descrita para las células Ni proyectantes, observamos que la franja de neuronas talámicas "peri-sensoriales" de proyección hacia NFL y NCL, contienen a las neuronas Ni proyectantes. En la marca obtenida en estos casos también observamos neuronas en torno a los núcleos de la zona dorso-medial o límbico/motores (DMP y DLM, **figura 5-7**).

Debido a que estas neuronas se disponen en torno a los núcleos talámicos primarios de manera continua, nos pareció que éstas forman un retículo talámico (**fig. 5-9**). Por lo tanto, según muestran los resultados, el retículo talámico proyecta sobre áreas paliales de primer orden sensorial (Ni del colopallio visual), motoras (Arc), y de segundo orden o integradoras (NFL y NCL).

Relacionado con este aspecto de red de la marca obtenida, se puede apreciar en las tinciones histológicas que en torno a los núcleos talámicos de primer orden, sensoriales (Rt, Ov y DLP) y

límbico/motores (DMP, DLM y DIP), las células se organizan como un continuo de células pequeñas y densamente empaquetadas (flechas en tinciones histológicas de la **figura 5-7**).

Como un detalle morfológico interesante se encontró en algunas neuronas del retículo, ubicadas en la parte dorso-medial de Rt (spRt), procesos neuronales (probablemente dendritas) extendiéndose hacia dentro de Rt llegando casi hasta el centro del núcleo (**fig. 5-8B**).

Al comparar la marca de células talámicas obtenidas en los casos de inyección en NFL y NCL, no es evidente que exista una diferencia en la proyección hacia alguna de estas áreas, por parte de alguna región del retículo. Sin embargo, esto debe ser corroborado ya que en un experimento de doble inyección en NFL/NCL (**fig. 5-10**), se observa distinta abundancia de las células proyectando a NFL y NCL, a pesar de que conviven y se entremezclan en casi todo el retículo. En este experimento se puede ver también que no hay células doble marcadas, lo cual indica al menos una diferenciación de las neuronas del retículo en ese sentido, sugiriendo una cohabitación de distintas poblaciones.

Por último, al realizar inyecciones de trazadores anterógrados en Arc (casos Arc 2-3, **tabla 5-1**), observamos una abundante marca de terminales en el tálamo, los que dibujan perfectamente la red peri-nuclear descrita previamente (**fig. 5-12**).

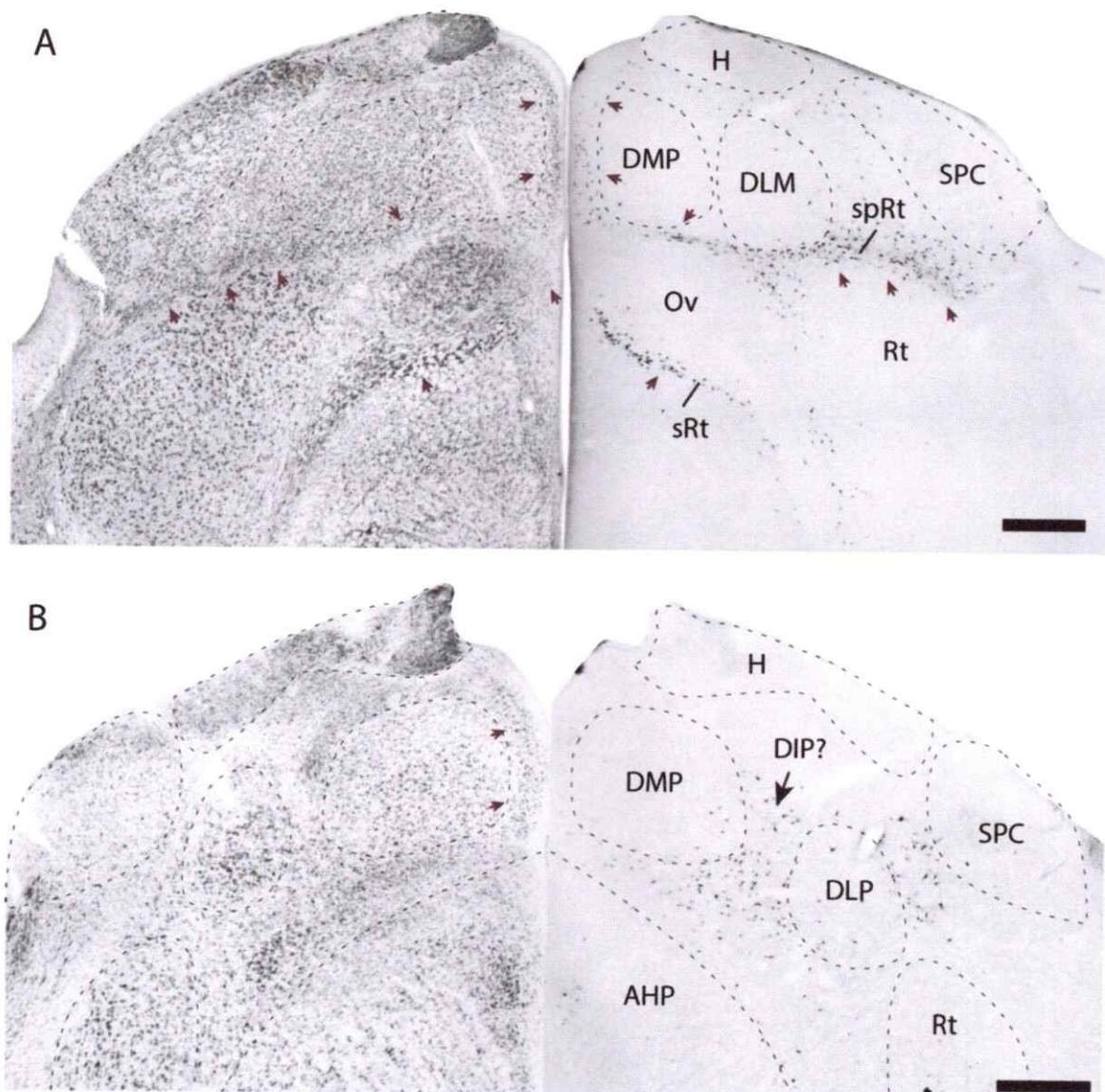


Figura 5-7. Núcleos Ni proyectantes aferentan también el NCL. Secciones coronales de dos niveles (rostro-caudal, A-B) del tálamo dorsal, mostrando la citoarquitectura (izquierda) y las células marcadas retrógradamente (derecha) como producto de una inyección en NCL. Las flechas rojas a la izquierda muestran el aspecto parvo y densocelular de las regiones perinucleares marcadas. Barra de calibración, 500 μ m.

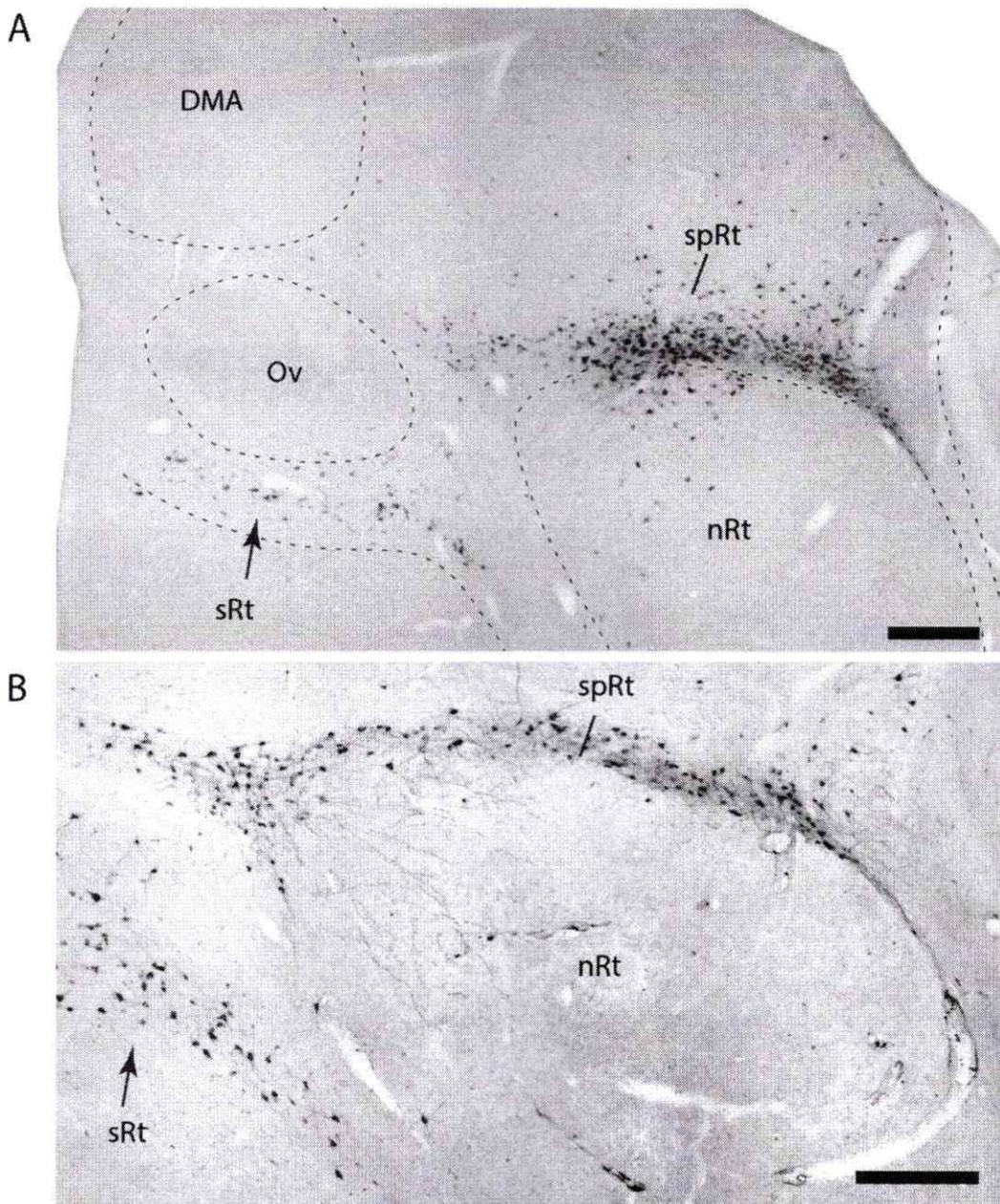


Figura 5-8. Núcleos Ni proyectantes aferentan también el NFL. Secciones coronales de dos niveles (rostro-caudal, A-B) del tálamo dorsal, mostrando las células marcadas retrógradamente como producto de una inyección en NFL. En B se pueden ver los procesos de neuronas en el spRt extendiéndose hacia el centro del Rt. Barra de calibración, 250 μ m.



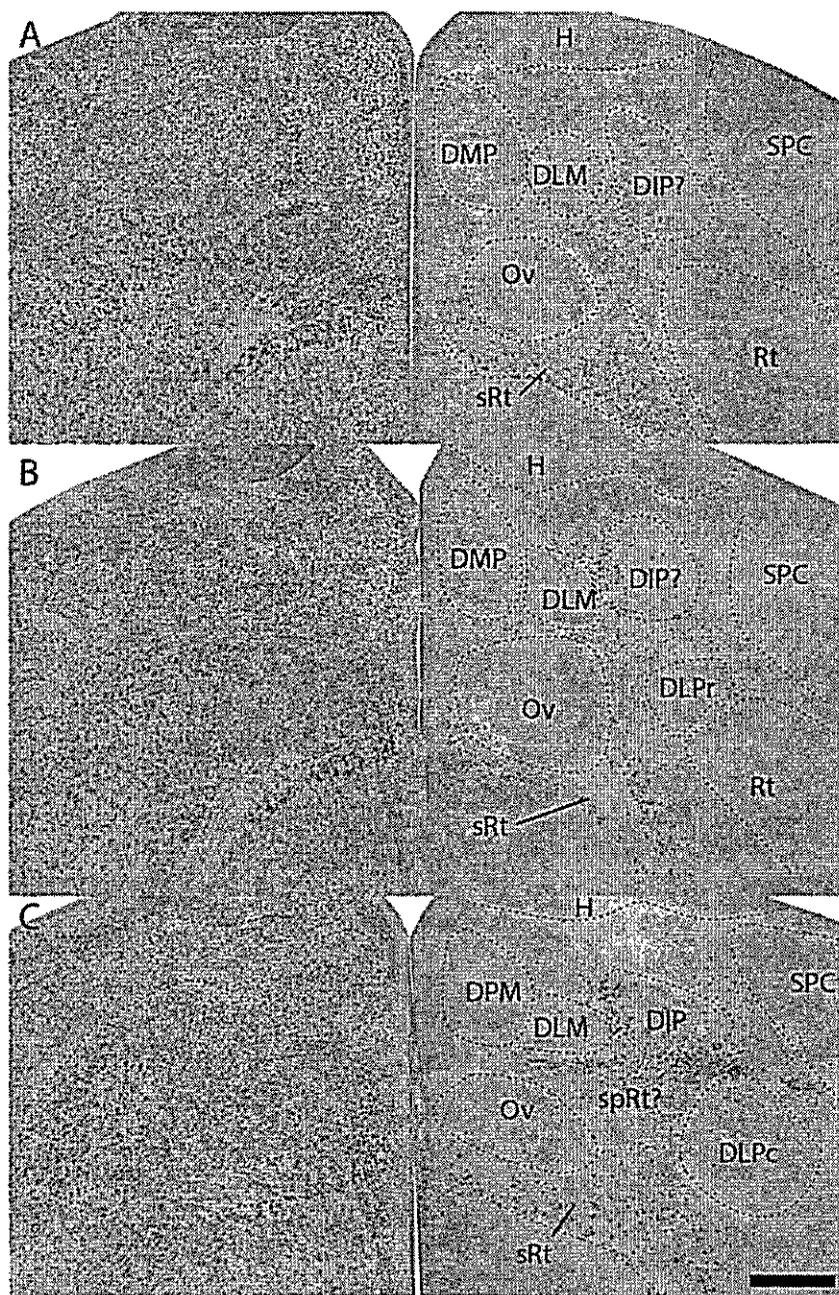


Figura 5-9. Células Ni proyectantes forman parte de un retículo en torno a los núcleos sensoriales primarios del tálamo. Experimento de doble inyección de Ctb en NFL y NCL (caso NCF2), reaccionado histoquímicamente para visualizar las células NFL/NCL proyectantes y el reticulado formado por estas. Cabe hacer notar que no se puede distinguir entre las células de proyección hacia NFL y NCL. En la columna izquierda se presenta la citoarquitectura de tres niveles del tálamo dorsal. En la columna derecha se muestra la distribución de las células NFL/NCL proyectantes. Barra de calibración: 500µm.

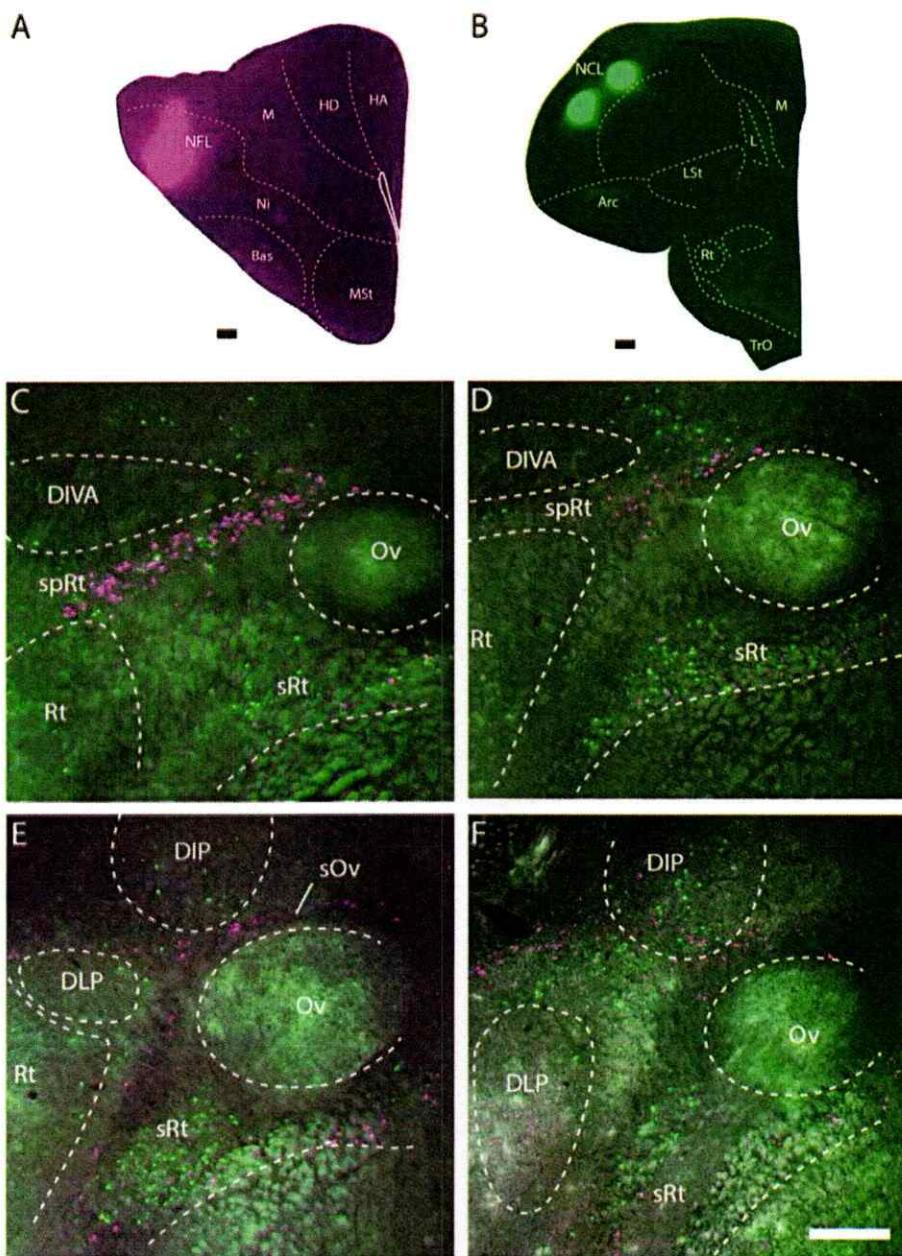


Figura 5-10. Células NCL y NFL proyectantes se entremezclan en el retículo. Doble inyección de trazadores en NFL (Ctb-555) y NCL (Ctb-488), (caso NCF2). **A y B:** Fotografía de los sitios de inyección en NFL (**A**) y NCL (**B**). **C-F:** fotografías de secciones de distintos niveles rostro-caudales de tálamo conteniendo células marcadas retrógradamente desde los sitios de inyección. Barras de calibración: 250μm.

Neuronas de primer orden motor en el tálamo aviano.

Además de las neuronas que forman parte del retículo peri-nuclear, en las inyecciones en NCL encontramos consistentemente células marcadas el núcleo dorso intermedio posterior del tálamo (DIP) y en ningún caso células en el núcleo DLP como se ha reportado previamente (**fig. 5-7B**) (Kröner & Güntürkün, 1999). En las inyecciones en NFL en cambio no se encontraron células en ninguno de los dos.

En los casos en que inyectamos Ctb en el arcopalio también encontramos neuronas retrógradamente marcadas en el tálamo dorsal (casos Arc1, 2 y 3; **tabla 5-1**), principalmente en el núcleo DIP, dorso latero medial (DLM) del tálamo y en el retículo peri-nuclear (**fig. 5-11**). Debido a que el arcopalio corresponde al área motora del DVR y NCL a un área premotora, DIP podría corresponder a un núcleo de primer orden motor del tálamo aviano.

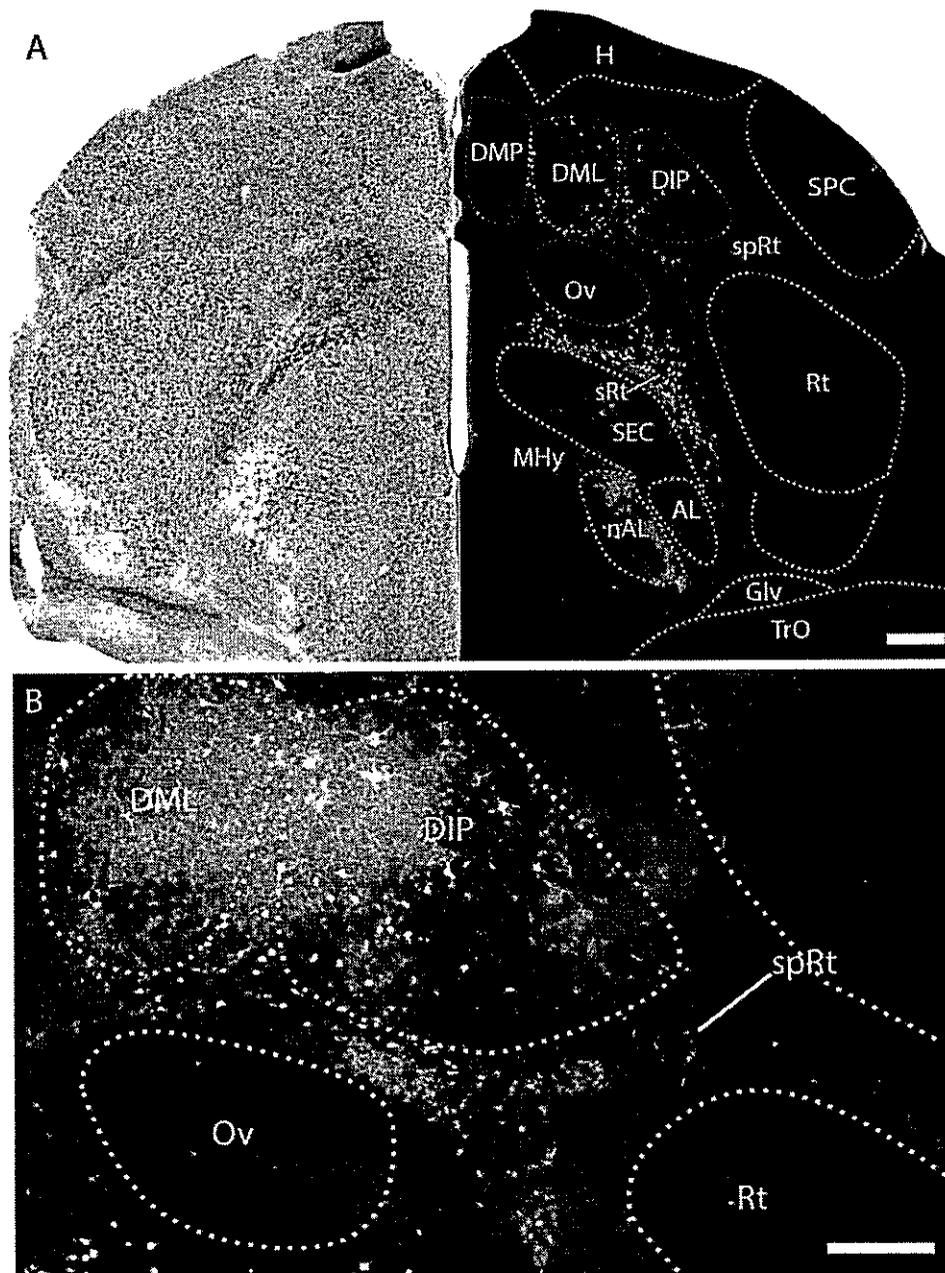


Figura 5-11. Núcleos Ni proyectantes están conectados con el Arcopallio. Secciones transversales de tálamo dorsal, reaccionadas histolquímicamente, mostrando terminales y células como resultado de una inyección de Ctb en el arcopallio (caso Arc1, la inyección se presenta en la figura 5 del anexo). A (izq): Sección talámica teñida con Giemsa, mostrando la citoarquitectura del tálamo. A (der): Sección talámica siguiente a la mostrada en la izquierda, reaccionada inmunohistoquímicamente para visualizar la marca de Ctb. B: Magnificación de la imagen mostrada en A. Barras de calibración: 300µm.

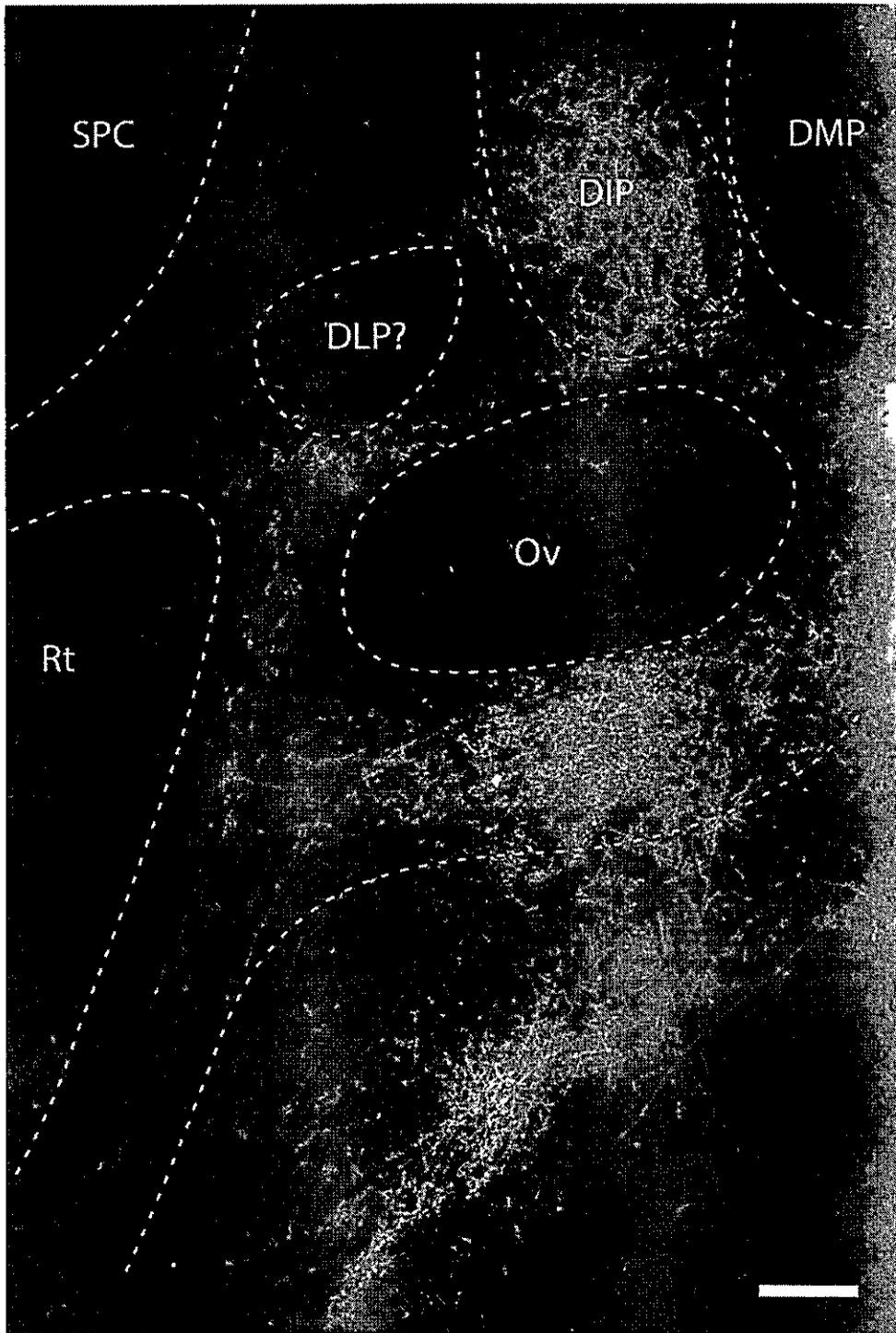


Figura 5-12. Núcleos Ni proyectantes reciben aferencias del Arcopallio. Fotografía con gran magnificación de la región del retículo del tálamo dorsal, mostrando terminales como producto de una inyección de PHA-L en Arc (caso Arc3). Barra de calibración: 200µm.

DISCUSIÓN

La motivación inicial de los experimentos presentados en este capítulo, fue determinar si los terminales observados en el Ni al hacer inyecciones de trazadores en E, correspondían a fibras inespecíficas (en paso) de la proyección desde Rt a E/Ni (descritas por Egedi & Tömböl, 1994 y Ahumada-Galleguillos, 2012) o efectivamente a terminales de las neuronas de E hacia Ni. Aunque proyección E-Ni fue caracterizada en el tercer capítulo, la posibilidad de una proyección Rt-Ni seguía existiendo. Para caracterizar la proyección Rt-Ni, inicialmente realizamos una serie de experimentos de inyecciones de trazadores anterógrados en Rt y de trazadores retrógrados en Ni. Contrariamente a lo esperado encontramos que el Ni del coloplio visual no recibe aferencias desde el Rt, si no que estas se originan en núcleos del tálamo dorsal ubicados en torno al Rt: spRt, sRt y SPC. Es habitual que en las inyecciones en Rt se produzca un derrame de trazador al retirar la pipeta de inyección desde el núcleo. Es por eso que pensamos que un derrame sobre los núcleos peri rotundales de proyección a Ni (sobre todo spRt), explicaría la proyección desde el Rt al Ni reportadas por distintos autores previamente (Egedi & Tömböl, 1994; Krützfeldt & Wild, 2005; Fredes y col., 2010; Ahumada-Galleguillos, 2012).

En la literatura se ha descrito que sRt y SPC proyectan hacia distintas regiones del palio sensorial y asociativo, sin embargo

nunca se ha descrito un patrón de organización de esta proyección y menos se ha atribuido alguna función para ellos. En un trabajo reciente de Atoji & Wild (2012), donde se describen las aferencias y eferencias del mesopallio, los autores indican la presencia de una proyección desde el sRt y spRt hacia el mesopallio visual, trigeminal, auditivo y límbico, esquematizándola finalmente como una proyección paralela a la proyección *driver* desde los núcleos sensoriales primarios. No obstante estos autores no proponen formalmente que esta sería una segunda vía ascendente.

En nuestros resultados de experimentos de doble inyección en áreas paliales asociativas (NFL/NCL), encontramos marca retrógrada de células en el tálamo dorsal formando un continuo en torno a varios núcleos sensoriales y límbicos. Esta marca extensa en torno a distintos núcleos de primer orden del tálamo, contenía las neuronas de proyección hacia el Ni del colopallio visual. Este resultado nos llevó a proponer que las células de proyección al Ni visual forman parte de una matriz perisensorial más extensa, cuyas células proyectan sobre la lámina de eferencias de las áreas sensoriales del pallio y sobre áreas asociativas. En línea con esto al revisar en la literatura los casos de inyecciones en las otras áreas sensoriales del DVR y un caso de inyección realizada por nosotros en la lámina eferente del Wulst (resultado no presentado), encontramos que partes de esta matriz se marcan también con células retrógradas. Estos resultados son coherentes con la proposición

hecha para esta matriz, sugiriendo que ésta establecería una proyección tálamo palial secundaria, de carácter modulador o coordinador de la actividad entre distintas áreas del palio aviano.

Por último la proyección descendente desde el palio motor (arcopalio), dibuja precisamente la localización de la matriz perisensorial con los terminales dejados en el tálamo dorsal. Esta proyección cerraría el circuito, permitiendo una modulación de la actividad talámica según los estados de actividad palial.

Esta visión propuesta coincide además con resultados presentados por Veenman y col. (1997), en que se muestra la presencia de terminales GABAérgicos en el tálamo de paloma, definiendo precisamente el retículo peri-nuclear presentado por nosotros (fig. 6 Anexo). Esto es interesante pensando en una posible relación o circuito talámico entre el retículo peri-nuclear, el núcleo reticular del tálamo (GABAérgico) y los núcleos talámicos de primer orden. Esto se propone ya que en mamíferos se conoce que estas estructuras forman parte de un circuito modulador del flujo tálamo-cortical.

Carácter sensorial o modulador de las neuronas de la matriz perisensorial.

Respecto a las aferencias sensoriales que reciben las neuronas de la matriz, observamos que éstas reciben aferencias tectales menores comparado con los blancos sensoriales primarios del tectum

(núcleo Rt y DLP). Debido a la posición de la inyección, pensamos que la proyección se originaría también en células ubicadas en las láminas profundas del TeO. Interesantemente estos resultados indicaron que las otras regiones de la matriz, que no proyectan al Ni visual, también reciben aferencias menores desde TeO. Esto debe ser explorado con mayor detalle y las aferencias desde otros centros sensoriales de proyección al tálamo deben ser revisadas en orden para entender mejor como se organizan las proyecciones sensoriales sobre la matriz. En relación a esto Wild y col. (1993) demostraron que el contorno del núcleo Ovoidalis del tálamo auditivo recibe aferencias desde un subnúcleo del colículo inferior en palomas. Este patrón de aferencias tálamo-paliales, no específicas y originados en células distintas a las que establecen la aferencia sensorial sobre los núcleos de primer orden o *drivers*, ha sido descrito para las neuronas de proyección talámopalial moduladoras (Sherman & Guillery, 1998) o de orden mayor (*High order*, según Jones, 2001).

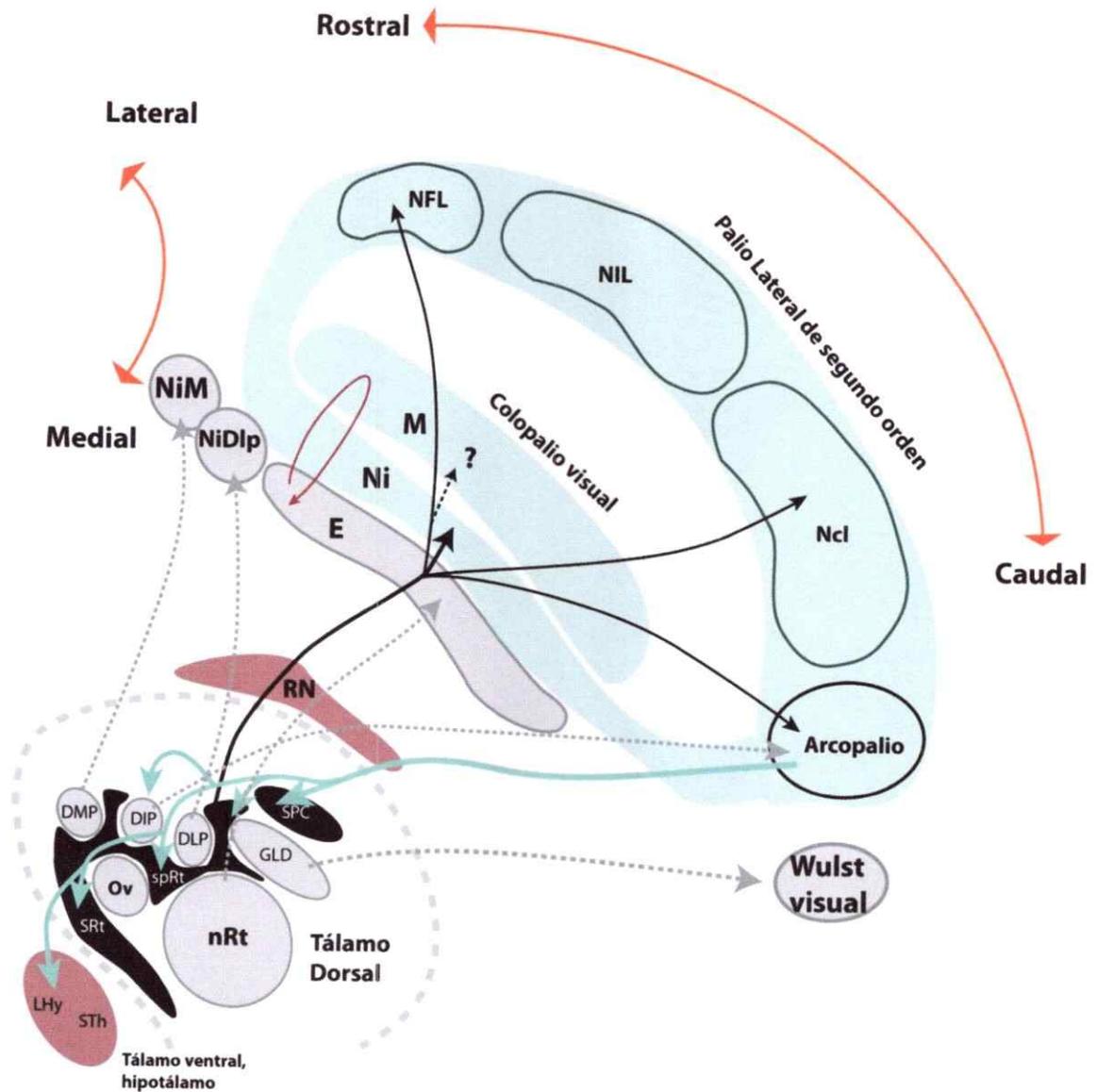


Figura 5-13. Esquema de las proyecciones entre el tálamo dorsal y el colopalio visual y palio de segundo orden. Resumen general de las proyecciones tálamo paliales descritas en este capítulo. Se muestra en negro la matriz talámica de segundo orden y su proyección sobre Ni y sobre las áreas paliales de segundo orden y motoras.

Laminación, columnaridad, recurrencia y modularidad del colopalio visual.

Esta sección del trabajo muestra evidencia relacionada principalmente al primero de estos aspectos propuestos como centrales de la organización del colopalio visual. Concretamente lo que señalamos es una segregación laminar respecto de las aferencias talámicas que recibe el colopalio visual. Estos resultados sugieren fuertemente una diferencia operacional entre E y Ni, ya que el carácter de la proyección sobre el Ni es totalmente distinto a la proyección talámica sobre E en los siguientes aspectos: el carácter de las aferencias sensoriales que reciben las estructuras talámicas que generan la proyección sobre E es masiva y las que proyectan sobre Ni son menores; La proyección sobre E es topográfica, en cambio nuestros resultados sugieren que la proyección sobre Ni sería inespecífica; la proyección hacia E es área/modalidad específica por el contrario las neuronas de proyección sobre el Ni proyectan sobre más de un área palial y no muestra un carácter sensorial único.

Por último el rasgo modulador presentado por la proyección perisensorial sobre el Ni, se puede relacionar directamente con los aspectos de la organización de esta lámina y el patrón de proyección intrínseco al colopalio visual de las neuronas que la componen, que tal como se discutió en los capítulos previos, recurre a través de M sobre el flujo sensorial ascendente. Permitiendo una modulación del flujo entrante directamente.

Comparación con mamíferos.

En mamíferos ha sido descrita una vía ascendente paralela a la proyección tálamo cortical primaria (*driver*). Esta vía es llamada moduladora o de orden mayor y se caracteriza por terminar sobre las neuronas de las láminas superficiales y por ser difusa. Inicialmente se postuló que esta proyección se originaba desde el complejo intralaminar, pero esto se desestimó luego de encontrar que la proyección del núcleo intralaminar termina sobre el estriado lateral y de forma local sobre la corteza, similar a una proyección *driver*. Evidencia posterior ha llevado a proponer que la proyección moduladora se origina en neuronas ubicadas como subnúcleos dentro o entorno a los núcleos primarios de las distintas sensorialidades (Jones, 2001). Además, se ha visto que estas neuronas moduladoras presentan una neuroquímica particular siendo positivas para calbindina en cambio las neuronas *drivers* lo son para parvalbúmina. Además, según algunos autores esta red de neuronas calbindina positiva formaría una matriz continua de células (Rausell & Jones, 1991; Hashikawa y col., 1991; Jones, 2001).

Según la evidencia de la organización en la proyección tálamo palial de mamíferos, nos parece que la proyección descrita para aves en este capítulo, se asemeja notablemente a la proyección moduladora de mamíferos contando con la mayoría de las características centrales de esta. En primer lugar la proyección moduladora de aves se origina en neuronas distintas a las de

proyección primaria y forman una red cuasi continua, asociada a los núcleos primarios. Los axones de estas neuronas terminan principalmente en la lámina Ni de las áreas sensoriales, la cual según presentamos en el capítulo 4, sería equivalente a las láminas 2/3 de la corteza. Además, esta proyección no parece ser topográfica y aferenta también áreas paliales de segundo orden.

Por último el retículo modulador de aves es aferentado por la proyección descendente del arcopalio. Esto es interesante desde el punto de vista de la organización del circuito tálamo palial en aves ya que en este grupo de vertebrados no existe una proyección descendente desde el palio sobre las neuronas sensoriales primarias de tálamo de manera directa. Por otra parte esto sí ocurre en mamíferos desde las neuronas piramidales de la lámina 6. Si bien en aves se ha sugerido una proyección palio-talámica desde el wulst hacia el tálamo, no existen descripciones detalladas del carácter de las neuronas (primer o segundo orden) aferentadas por estas fibras. Respecto a esto, es posible pensar que en aves una proyección palio-talámica directa sobre neuronas de primero ordensensorial no exista y que la manera de modular el flujo tálamo-palial ascendente sea mediante un arreglo diferente. Este involucraría la matriz talámica descrita, probablemente en asociación al núcleo reticular del tálamo. Este aspecto del cerebro aviano sin duda requiere un estudio detallado que permita avanzar en el entendimiento de la evolución del cerebro amniota.

Tálamo motor aviano y su equivalencia con mamíferos.

En el tálamo dorsal de aves se ha propuesto por diferentes autores a dos núcleos como equivalentes al tálamo motor de mamíferos. El primero de estos núcleos ubicado en la zona talámica dorsal (ZTD), llamado DIP y el segundo localizado en el tálamo anterior llamado VIA (ventral intermedio anterior). Esta comparación se sustenta en que ambos núcleos son aferentados por los ganglios basales del telencéfalo, por el cerebelo, palio somatomotor y sustancia nigra reticulata, tal como el complejo Ventral anterior/Ventro lateral de mamíferos. Debido a esta similitud Kitt & Brauth (1982), propusieron inicialmente que DIP sería el equivalente al complejo VA/VL. Por otra parte, Veeman y col. (1997) han indicado que esto no sería correcto, ya que DIP no recibiría proyecciones ni proyectaría sobre el palio motor (en el wulst), indicando que DIP se correspondería mejor con el núcleo parafascicular al tomar en cuenta algunos rasgos neuroquímicos. Además estos autores proponen que el núcleo VIA equivaldría al complejo VA/VL, debido a que VIA si recibe aferencias y proyecta sobre la región somatomotora del wulst, además de presentar los otros rasgos descritos antes para VA/VL.

Los resultados mostrados en este capítulo en relación a la proyección entre el arcopalio y DIP, demuestran que DIP proyecta y recibe aferencias desde un área motora del palio (arcopalio). De este modo este núcleo, al igual que VIA, equivaldría en términos

homólogos al complejo VA/VL. Otro argumento favorable a esto, es la proyección desde DIP hacia el palio límbico (NIM) asociado a la producción de vocalizaciones en aves (Kitt & Brauth 1986; Kröner & Güntürkün 1999; Jarvis, 2004). Nos parece que esta proyección podría equivaler a la proyección de VA/VL sobre la corteza cingulada, la cual también ha sido asociada a la producción de vocalizaciones (von Cramon & Jürgens, 1983; McFarland & Haber, 2000).

Debido a que ambos núcleos, DIP y VIA, se asemejan bastante en su relación con áreas motoras del cerebro, nosotros proponemos que ambas estructuras corresponderían al tálamo motor de aves y que serían equivalentes al complejo VA/VL, correspondiendo a subdivisiones relacionadas al Wulst (VIA) y al DVR (DIP).

CAPÍTULO 6

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL COLOPALIO VISUAL.

INTRODUCCIÓN

En aves las vías sensoriales ascendentes terminando sobre blancos discretos del palio fueron reconocidas durante los años 60 (Revzin & Karten, 1966; Karten, 1968, 1969; Revzin, 1969). La identificación de estos blancos se llevó a cabo en trabajos complementarios en que se combinó técnicas de trazado neuronal y registros electrofisiológicos. Así se estableció que el núcleo entopalio (E), una estructura localizada en la parte externa del estriado y conspicua por la gran cantidad de fibras que recibe, correspondía al blanco palial de la vía visual tectofugal (Revzin & Karten, 1966; Karten & Hodos, 1970). Además, se demostró que flashes de luz y pulsos eléctricos en el tectum óptico o núcleo rotundus (Rt), eran estímulos efectivos en evocar potenciales de campo en E (Revzin & Karten, 1966; Engelage & Bischof, 1989). También mediante mapas de densidad de corriente, Engelage & Bischof (1989) determinaron que la localización de los eventos sinápticos subyacentes a los potenciales visualmente evocados, corresponde a la región central (core) de E. La caracterización de la respuesta neuronal de la vía tectofugal ha demostrado que en el tálamo las neuronas del Rt poseen campos receptivos de gran tamaño ($100^{\circ} \times 85^{\circ}$)

(Reivzin, 1967, 1970; De Brito 1975). En el palio las propiedades fisiológicas de las neuronas de E también presentan grandes campos receptivos tal como Rt (Gu y col., 2002). Estos campos receptivos extensos, característicos de la vía entera, han sido explicados como el resultado de un arreglo anatómico establecido en la proyección convergente desde las neuronas TGC del tectum óptico sobre el Rt (Marín y col., 2003). Del mismo modo las arborizaciones extensas de las TGC determinan la sensibilidad al movimiento de estas neuronas y de las neuronas del resto de la vía hasta E (Luksch y col., 1998, 2001) (fig. 1-5, capítulo 1).

Respecto al flujo sensorial a través de la vía tectofugal, se ha visto que la respuesta evocada por estímulos visuales en movimiento, en Rt y E, presenta descargas neuronales fasciculadas características (Marín y col., 2012). Se sabe también que el flujo a través de la vía y el aspecto fasciculado de su descarga, es modulado y dirigido por las descargas en ráfagas del circuito tecto-itsmal, especialmente desarrollado en aves (Marín y col., 2012).

En el estudio de las vías ascendentes descrito, se evidencia la mezcla de técnicas fisiológicas, que describen propiedades características de las estructuras en estudio, y evidencia anatómica que devela los arreglos estructurales subyacentes. De manera similar en este capítulo nos basamos en la evidencia anatómica presentada en los capítulos previos -que muestran al

colopatio visual como un área trilaminada, que establece circuitos columnares y recurrentes- y realizamos registros de su actividad fisiológica evocada visual y eléctricamente. Al hacer esto incluimos todas las láminas de esta estructura, para entender aspectos básicos de su modo de operar.

Los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos a partir de 14 casos de registros realizados usando dos tipos de arreglos de electrodos (tabla 6-1). Algunas claves anatómicas y fisiológicas fueron usadas para reconocer mediante el registro en que lámina del colopallio visual nos encontrábamos. Brevemente, las estructuras que se encuentran en una penetración en el área de interés - con el electrodos en posición estereotáxica (Karten & Hodos, 1967) - desde dorsal a ventral son: Mesopallio (M), Nidopallio intermedio (Ni), entopallio (E), estriado lateral (Lst) y globo pálido (GP). La actividad entopallial es conspicua y fácilmente reconocible por la gran cantidad de descargas neuronales producidas al pasar un objeto en movimiento en el campo visual del animal. Por lo tanto el entopallio es un excelente indicador de la posición de registros. Debido a la alta actividad visual en E, los límites dorsal y ventral del núcleo son identificables por el aumento y disminución violentos de la actividad visualmente evocada. De esta forma el comienzo de la estructura dorsal (Ni) y ventral (Lst) al entopallio se reconocen también. El límite ventral del Lst se puede reconocer por el aumento en la descarga neuronal sostenida, espontánea y de alta frecuencia encontrada en el globo pálido ubicado abajo del Lst. El Ni se reconoce por algunas características de su respuesta visual (ver más adelante) y por la posición dorsal a E. La posición del mesopallio se puede deducir por su distancia al límite dorsal de E, por su posición respecto

RESULTADOS

a la superficie del cerebro y por algunas características de su actividad neuronal que lo diferencian de la respuesta de Ni.

Actividad visualmente evocada en el coloplio visual.

Para determinar si todas las láminas del coloplio visual son activadas por estímulos en movimiento, realizamos registros en todas las láminas durante la presentación de estímulos en el campo visual de palomas anestesiadas (casos EMN 1-4, **tabla 6-1**). Para registrar desde todas las láminas simultáneamente, utilizamos un multielectrodo con 32 sitios de registros ordenados en línea y separados 100 μ m uno del otro. La orientación en que se dispuso el multielectrodo durante los registros fue la misma que presentan las proyecciones columnares entre E y M, que corresponde a una penetración orientada con $\sim 23^\circ$ sexagesimales respecto al eje de penetración estereotóxica convencional. Al registrar de esta forma las estructuras y el orden en que se encuentran es la misma describió antes. La orientación de una penetración con 23° , la de las fibras columnares y la de una penetración estereotóxica se muestra en la **figura 6-1**. Los estímulos (barra o círculo en movimiento horizontal) usados en los experimentos fueron presentados en una pantalla frente al ojo contralateral del hemisferio registrado. En los planos anestésicos obtenidos con las dosis descritas en los métodos, fue característico encontrar una potente descarga espontánea con aspecto sinusoidal de 50-100Hz a

lo largo de todo el colopatio visual. Interesantemente esta descarga aparecía con una frecuencia algo menor a 1Hz y desaparece mientras el animal está siendo estimulado, es decir mientras el estímulo visual está en movimiento (se volverá a esto más adelante). Como se dijo antes, la actividad visualmente evocada en E es alta, fácilmente reconocible y característica por la presencia de fascículos o ráfagas de espigas que siguen el estímulo visual de forma lineal.

En el Ni la actividad neuronal evocada visualmente se puede reconocer sin problemas en el monitor de audio y video acoplados al registro, siendo característico encontrar en la parte dorsal de Ni y ventral de M (MVi), espigas de gran amplitud comparadas con el resto de las estructuras registradas. M es una región evidentemente menos reactiva a los estímulos visuales que E y Ni cuando el animal se encuentra en planos anestésicos profundos. Debido a esto durante los registros en que se midió la actividad, se usaron planos anestésicos un poco más livianos en que el animal mostraba reflejo pupilar y movimientos oculares esporádicos, aunque permanecía insensible a estímulos aversivos como un apretón de la pata con una pinza gruesa.

Tabla 6-1. Resumen de casos de los experimentos de registro. Detalle de los experimentos de registros a lo largo del colopallio visual, indicando el tipo de electrodo utilizado, la forma de registrar a lo largo de las láminas del colopallio (secuencial o simultáneamente), los estímulos usados para evocar actividad y sus características.

Caso	Registro		Estímulo		
	Electrodo	Tipo	Tipo	Caract.	
1	ENM1	monopolar	secuencial	visual	movimiento
2	ENM2	multielect.	simultaneo	visual	movimiento
3	ENM3	multielect.	simultaneo	visual	movimiento
4	ENM4	multielect.	simultaneo	visual	movimiento
5	EM1	peineta	simultaneo	eléctrico	n=15/A/-200 μ A/200ms/0,5khz
6	EM2	peineta	simultaneo	eléctrico	n=15/A/-200 μ A/200ms/0,5khz
7	EM3	peineta	simultaneo	eléctrico	n=10/A/-200 μ A/100ms/0,5khz
8	EM4	peineta	simultaneo	eléctrico	n=2/A/-100 μ A/100ms/1khz
9	EM5	peineta	simultaneo	eléctrico	n=2/A/-100 μ A/100ms/1khz
10	ENM5	peineta	simultaneo	eléctrico	n=1/A/-100 μ A/100ms
11	ENM6	peineta	simultaneo	eléctrico	n=1/A/-60 μ A/80ms
12	ENM7	peineta	simultaneo	eléctrico	n=1/A/-60 μ A/80ms
13	ENM8	peineta	simultaneo	eléctrico	n=1/A/-60 μ A/80ms
14	ENM9	multielect.	simultaneo	visual	movimiento
15	ENM9	multielect.	simultaneo	visual	movimiento

Abreviatura: A: anódico; multielect.: multielectrodo; sim.: simultáneo.

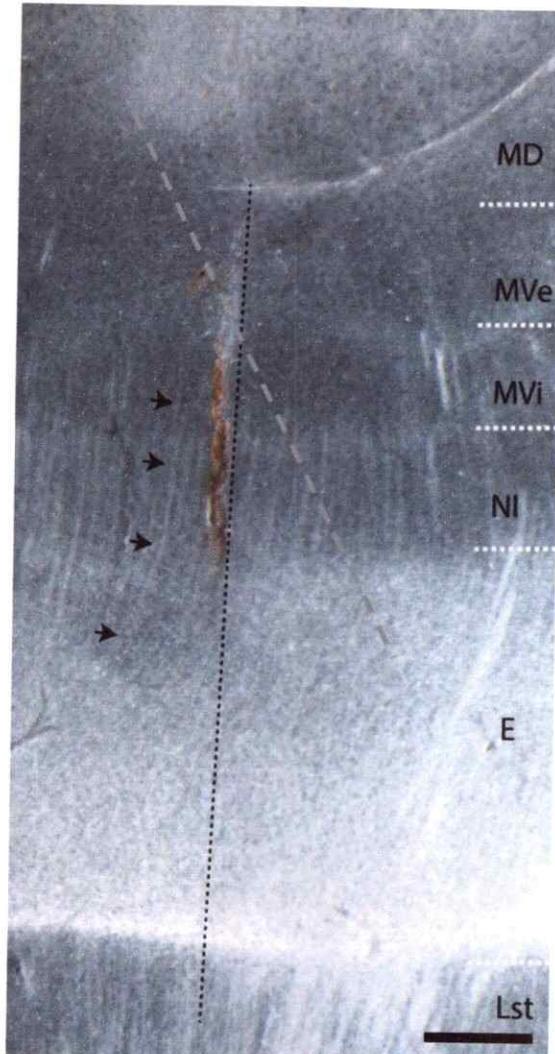


Figura 6-1. Orientación del electrodo utilizado para los registros en el coloplio visual. Sección telencefálica sagital (rostral a la derecha) mostrando el trayecto del electrodo al penetrar con 23° respecto al eje estereotáxico (línea punteada negra), las fibras de proyección columnar (flechas) y la orientación del trayecto de un electrodo en posición estereotáxica (línea gris segmentada). Barra de calibración, 500µm.

Un caso de registro de la actividad evocada visualmente en el colopallio se presenta en la **figura 6-2**. Ahí se muestra un histograma periestímulo de la cantidad de espigas promedio (histograma de espigas promedio, HEP; n=4, casos ENM1-4, **tabla 6-1**). Las ventanas del histograma corresponden a cada barra y representan 50 milisegundos de registro. Cada línea del gráfico corresponde al HEP de los registros hechos con cada sitio del multielectrodo. La posición de los sitios de registro en el colopalliovisual corresponde al mismo nivel en que se presenta cada línea de HEP frente a la sección de telencéfalo al lado izquierdo de la figura (se puede apreciar la lesión dejada por electrodo en la imagen). Para determinar con mayor exactitud la posición de los sitios de registro, se usó el material histológico teñido con Nissl y la profundidad de penetración medida durante el experimento, para hacer una reconstrucción tridimensional con el programa computacional *stereo investigator* (**fig. 6-3**). En el HEP de la **figura 6-2** se puede ver que todas las láminas del DVR visual aumentan su actividad cuando se presenta al animal frente a un estímulo visual en movimiento. También se aprecia que la actividad de E y Ni son las que más aumentan al presentar el estímulo. Las láminas más dorsales (MVex y MD), presentan una notoria acomodación de su actividad, ya que luego de un aumento inicial en la cantidad de descarga éstas disminuyen pasados unos 300ms. Esto no ocurre tan notoriamente en el E ni el Ni, donde el aumento de la descarga sigue la presencia del estímulo sin ser evidente una disminución

mientras la estimulación procede. Por último cabe destacar el aumento de la actividad en el estriado lateral (Lst) del subpalio, debida posiblemente a la proyección desde E ventral y Ni (capítulos 3 y 4). En la **figura 6-4** se presentan ejemplos de trazos de registros correspondientes a las distintas láminas del colopallio visual y su HEP. En la **figura 6-5** se puede ver que el aumento de la actividad promedio, evocada visualmente, es significativo respecto de la actividad basal registrada en cada uno de los sitios.

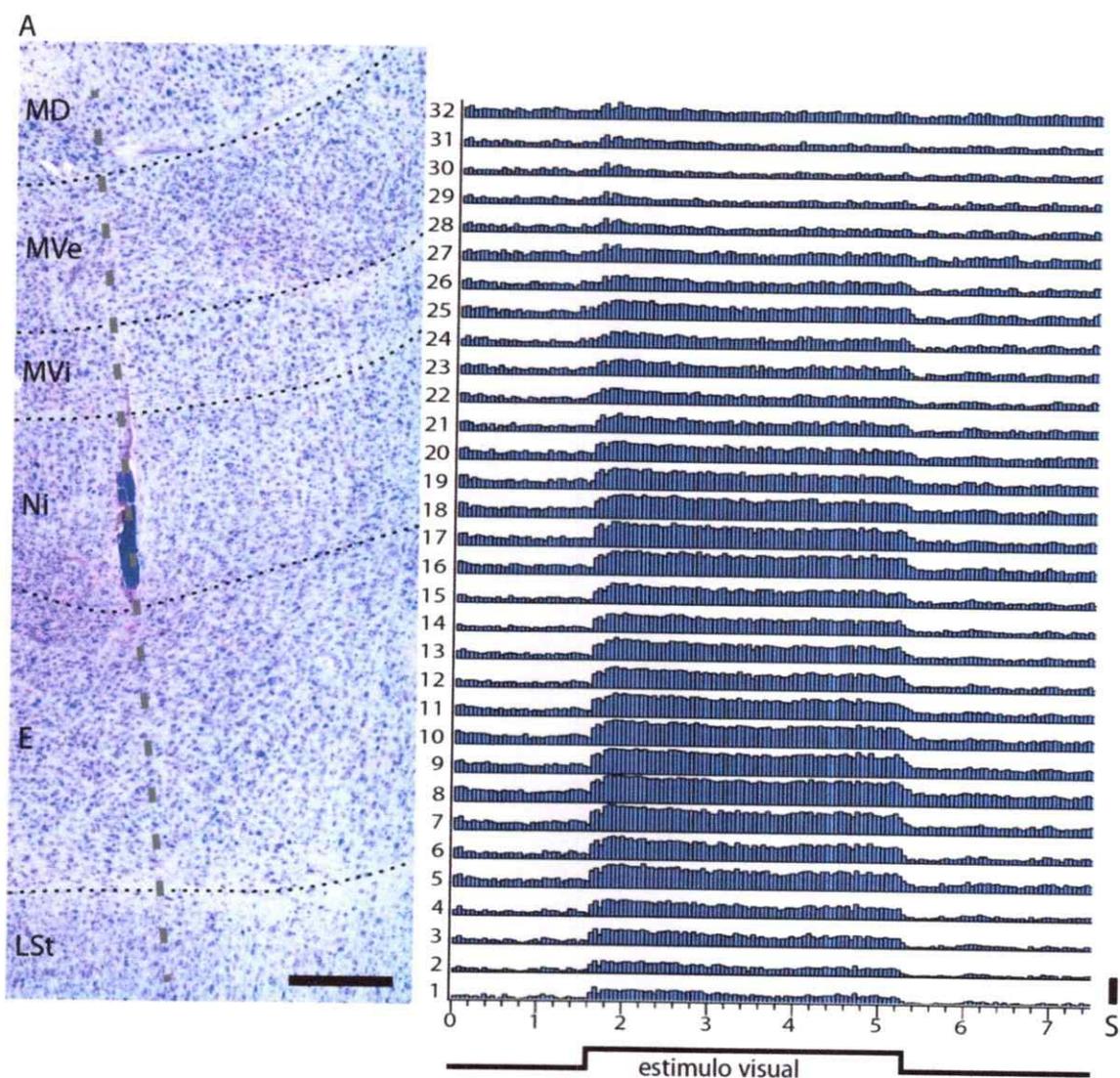


Figura 6-2. Respuesta neuronal visualmente evocada en el colopalo visual. Registro simultaneo a lo largo de todas las láminas del colopalo visual (caso ENM2). **(Izquierda)** Fotografía de una sección sagital de telencéfalo teñida con tinción de Giemsa mostrando el trazo del electrodo a través del colopalo visual, se puede ver parte de la lesión dejada por el electrodo durante el registro. **(Derecha)** Histograma de espigas obtenido del promedio de 15 repeticiones de estimulación visual durante 3,5 segundos. Barras de calibración: barra horizontal, 500µm; barra vertical, 25 espigas.

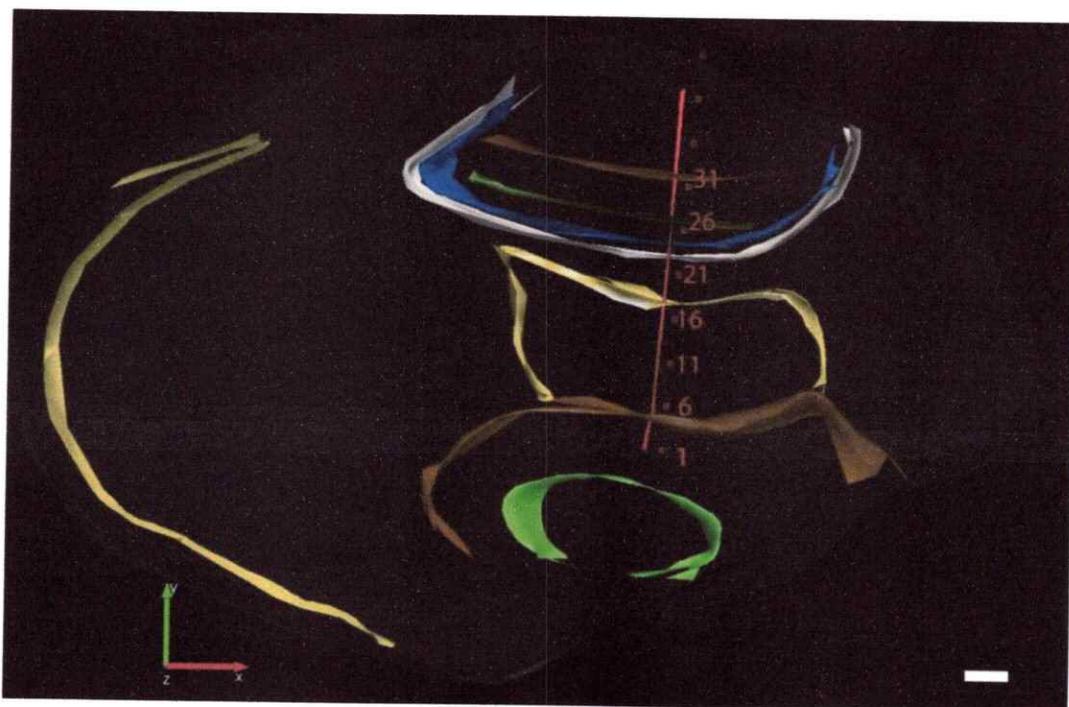


Figura 6-3. Reconstrucción estereológica de la posición de los sitios de registros en el coloplio visual. Reconstrucción realizada usando las secciones telencefálicas conteniendo el sitio de registro del caso ENM2. Se indican las principales divisiones citoarquitectónicas, la lesión dejada por el electrodo se muestra en color rojo. Según esto y lo profundidad de penetración medida durante el registro, se determinó la posición correspondiente a cada sitio de registro. La reconstrucción se realizó utilizando el programa computacional *stereoinvestigator*. Barra de calibración, 500 μ m.

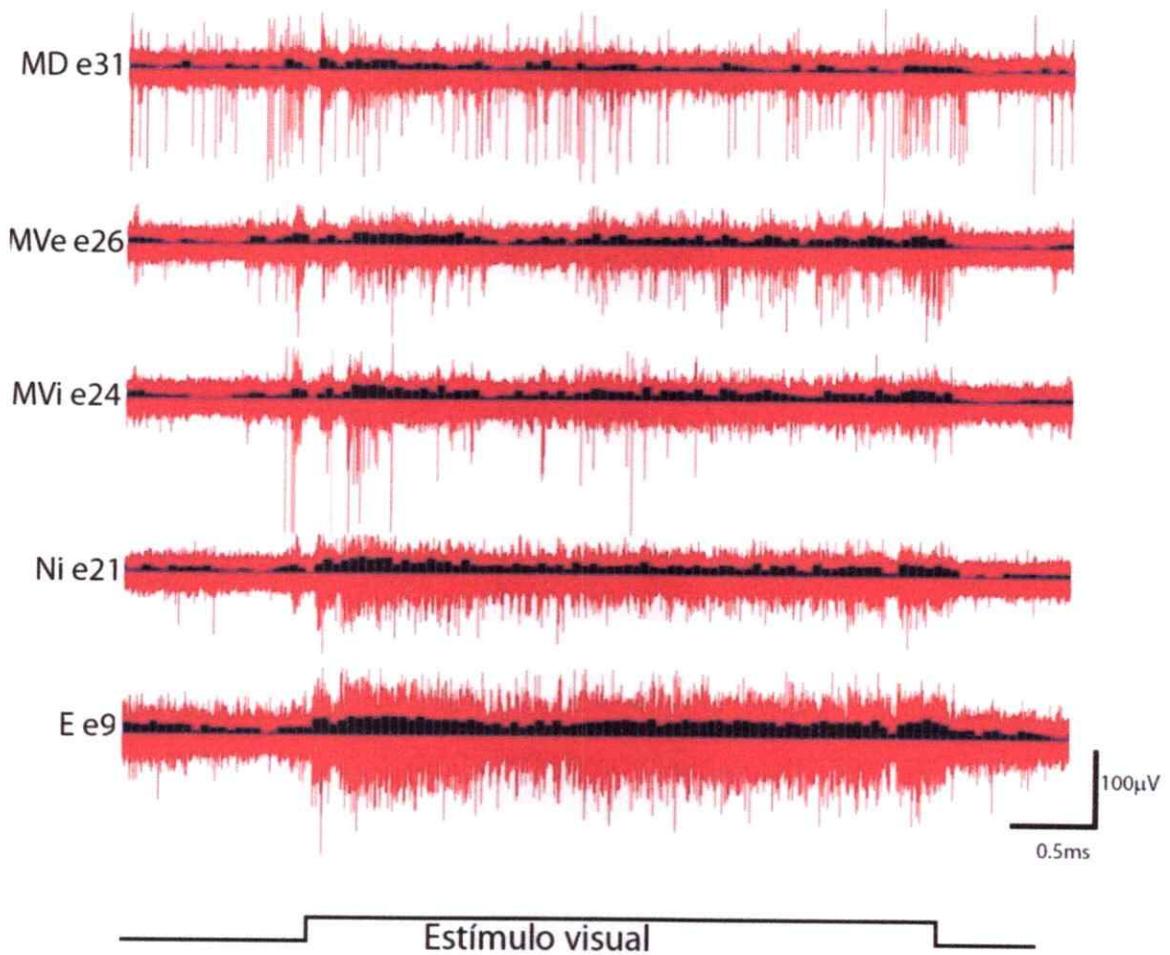


Figura 6-4. Actividad neuronal visualmente evocada a lo largo del coloplio visual. Ejemplos de trazos de registros obtenidos simultáneamente en distintas láminas del coloplio visual. En rojo se presentan trazos de registros en el entoplio (E e9), nidoplio intermedio (Ni e21), mesoplio ventral interno (MVi e24), mesoplio ventral externo (MVe e26) y mesoplio dorsal (MD e31). Por dentro de cada trazo se muestra el histograma de espigas promedio para cada sitio de registro. El estímulo corresponde a un disco equivalente a 4° del campo visual en movimiento.

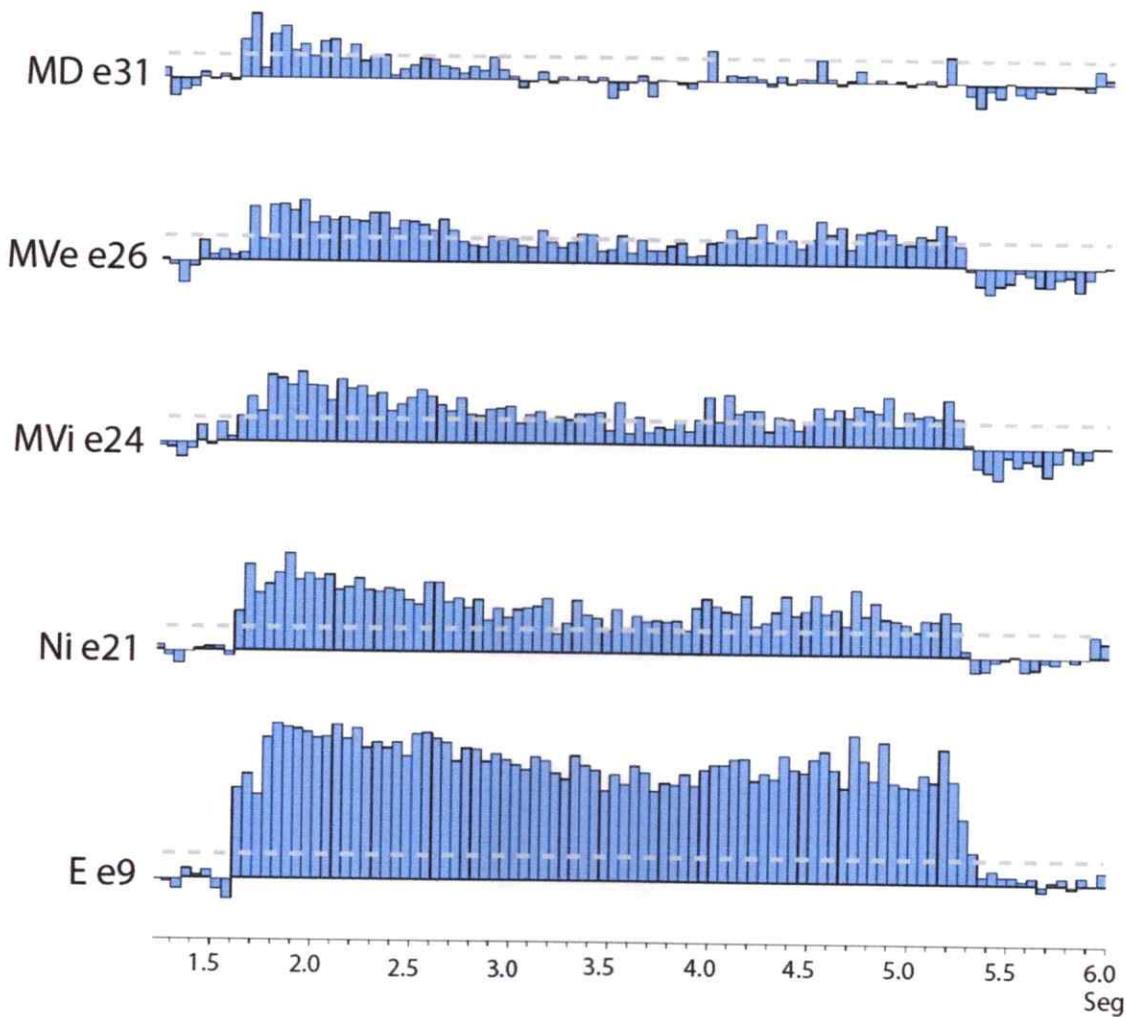


Figura 6-5. Aumento de actividad neuronal visualmente evocado es significativo. Histogramas de espigas promedio de la actividad evocada en las distintas láminas del coloplio visual, normalizados y expresados como valores de desviación estándar con respecto al promedio de actividad del segundo previo a la presentación del estímulo visual. La línea gris indica el nivel correspondiente a dos veces el valor de la desviación estándar.

Dinámica sináptica del coloplio visual.

Para caracterizar la dinámica sináptica del circuito intrínseco del coloplio, realizamos registros de potenciales de campo a lo largo de este y construimos mapas de densidades de corriente ($n=5$, casos EM 1-5, **tabla 6-1**). Para hacer estos registros usamos un arreglo de 4 o 5 electrodos ordenados en forma de peineta, separados por 200-300 μm el uno del otro. El arreglo fue dispuesto en sentido rostro-caudal, con el ángulo de 23° para penetrar en el mismo sentido de las fibras columnares. Los registros se hicieron secuencialmente (cada 100 μm) a lo largo de las láminas del coloplio. De esta forma los cinco sitios de registro puestos en M forman una línea perpendicular a las fibras de proyección entre las láminas. Los potenciales registrados fueron evocados eléctricamente con un electrodo monopolar ubicado en E, en un locus conectivamente relacionado con los sitios de registro. Los estímulos fueron acotados en tiempo e intensidad para intentar generar una activación puntual y efectiva del circuito.

Los potenciales evocados fueron adquiridos sucesivamente desde MD hasta la parte central de E (**fig. 6-6**). Luego de filtrar las señales rápidas y promediar 15 registros de los potenciales en cada sitio, estos se usaron para construir mapas de densidades de corrientes (CSD, sigla del inglés). El material histológico del caso ENM8 y el CSD generado con los registros de cada transecto se presentan en la **figura 6-7**. Al lado izquierdo de la figura se

muestra una fotografía de campo oscuro del área de registro, en ella se pueden distinguir las fibras columnares (flechas rojas) y de modo que se puede saber si el trayecto de los electrodos de registro corresponde con la orientación de las fibras tal como se requiere para realizar el CSD (Nicholson & Freeman, 1975). Para conocer la trayectoria de los electrodos de registros se realizaron lesiones electrolíticas. En la figura se indica con asteriscos las posiciones de inicio del trayecto de registro de los electrodos 1-4 y en la parte ventral se puede ver la lesión de término dejada con el electrodo 3. De esta manera se puede alinear el material histológico con los mapas de CSD en forma precisa. El sitio de estimulación en E también se puede ver en la imagen indicado por una letra 'S', las flechas rojas muestran la trayectoria de los procesos correspondientes al sitio de estimulación. De los datos anatómicos se desprende que la mayor correspondencia anatómica del sitio de estimulación es con los trazos de registros 2 y 3.

Al lado derecho de la figura se presentan los mapas de densidades de corriente obtenidos con los registros de cada transecto. Con respecto a la dinámica sináptica mostrada por los CSD, se puede ver que tras un artefacto provocado por el estímulo -señal breve cerca 20ms- aparece una secuencia de eventos sinápticos, indicados por *sinks* (sumideros de corrientes) y *sources* (fuentes de corrientes) en todo el coloplio visual, localizados exactamente en las distintas láminas. Se puede ver también al comparar los paneles de CSD que el número 2 y 3 son los que presentan la

activación más intensa, esto se ajusta con la correspondencia anatómica entre la trayectoria de los registros de estos electrodos y el sitio de estimulación.

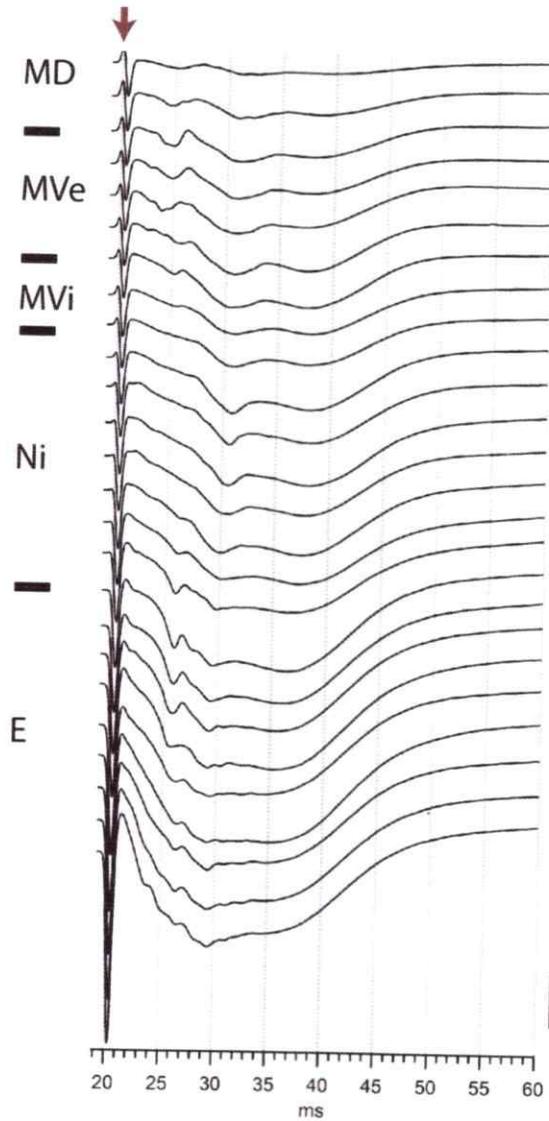


Figura 6-6. Potenciales de campo a lo largo del colopalo visual, evocados eléctricamente desde E. Potenciales evocados eléctricamente desde E, registrados secuencialmente cada $100\mu\text{m}$ a lo largo del colopalo visual en el mismo sentido de los axones columnares. Cada curva corresponde al promedio de 15 registros hechos en cada sitio. El estímulo eléctrico (indicado por la flecha en la parte superior) fue un pulso anódico, monofásico de $60\mu\text{A}$ y $80\mu\text{s}$ de duración. Barra de calibración, 1mV .

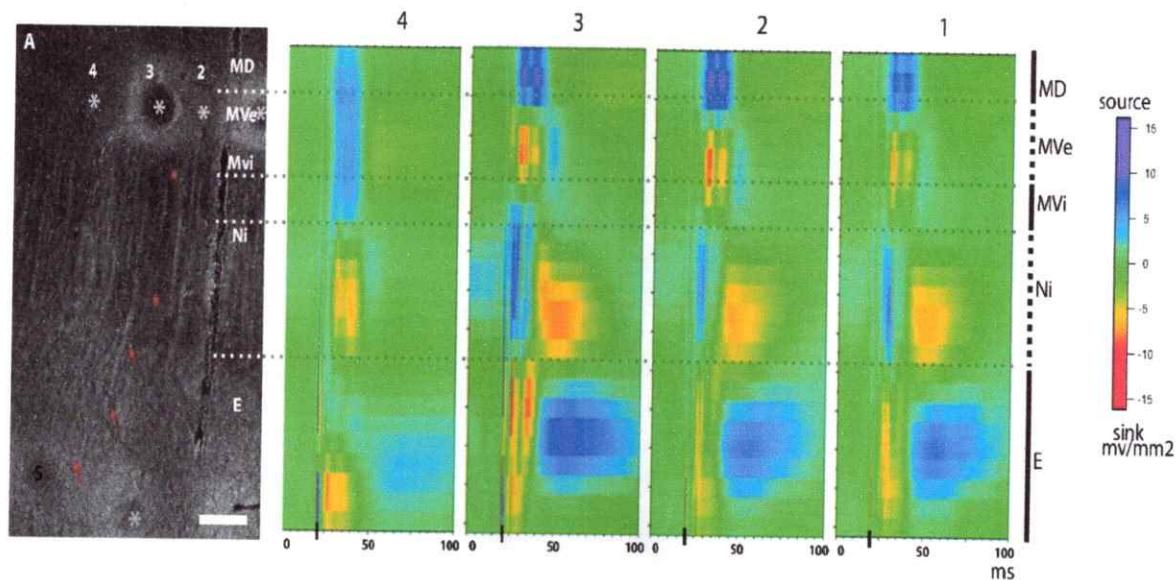


Figura 6-7. Mapas de densidad de corriente del colopaleo visual. CSD construidos utilizando los potenciales registrados a lo largo del colopaleo visual, evocados mediante estímulos eléctricos en E. **A:** Imagen de campo obscuro del colopaleo mostrando la posición los electrodos de registro y estimulación (**S**). Los tractos de registro a lo largo de las láminas pueden inferirse por las lesiones dejadas en dos puntos del registro (indicados con asteriscos grises). En la misma imagen se pueden apreciar las fibras columnares asociadas al sitio de estimulación (flechas rojas). La foto está alineada y en escala con los paneles de los mapas de CSD (**1-4**) obtenidos. Barra de calibración en A, 250 μ m.



Al observar con más detalle la secuencia de eventos en el CSD del electrodo 2 (**fig. 6-8**), se puede ver el artefacto de estimulación seguido por el primer *sink* (**a**) en la parte dorsal de E luego de 1-2 ms, y un segundo *sink* ubicado en el mesopalio distanciado por 2-3 ms del primer *sink* en E (**b**). A continuación de esto se observan 3 *sinks* en E dorsal (**d, f, h**), seguidos cada uno de un *sink* en MVe (**e, g, i**). Luego de esta secuencia de *sinks* en E y M, se aprecia un largo e intenso *sink* en Ni (**j**). Esta secuencia de activación completa dura alrededor de 30ms, y para cada *sink* observado se puede asignar un *source* correspondiente. Para los *sinks* en MVe las *sources* se localizan en MD y para los *sinks* en E se observan *sources* en Ni y viceversa. El patrón sináptico descrito aquí fue obtenido consistentemente en todos los casos en que se realizó este experimento.

Además de los CSDs obtenidos activando eléctricamente el colopalio, construimos otros dos mapas utilizando actividad espontánea y evocada visualmente. En el primer caso usamos la actividad espontánea característica registrada en el colopalio mientras el animal se encuentra anestesiado. La forma de la fase lenta de la onda espontánea característica muestra una forma sinusoidal, con una frecuencia alrededor de 50-100Hz (**fig. 6-9**). Esto produjo como resultado un mapa de CSD mostrando un patrón similar al obtenido al activar eléctricamente el circuito. En este mapa se ve la secuencia recurrente de *sinks* en E y M, aunque ahora los *sinks* en E se localizaron en el centro del núcleo, no en la

parte dorsal y fue menos evidente una activación final en Ni. El último mapa de CSD (**fig. 6-10**) se generó utilizando los 200ms iniciales de un registro de actividad evocada por un estímulo en movimiento. En este caso se observó también la secuencia recurrente E-M, y al igual que en el caso anterior fue menos claro un *sink* final en Ni. No obstante estas diferencias, todos los mapas de CSD obtenidos parecen representar una activación canónica del circuito colopallial.

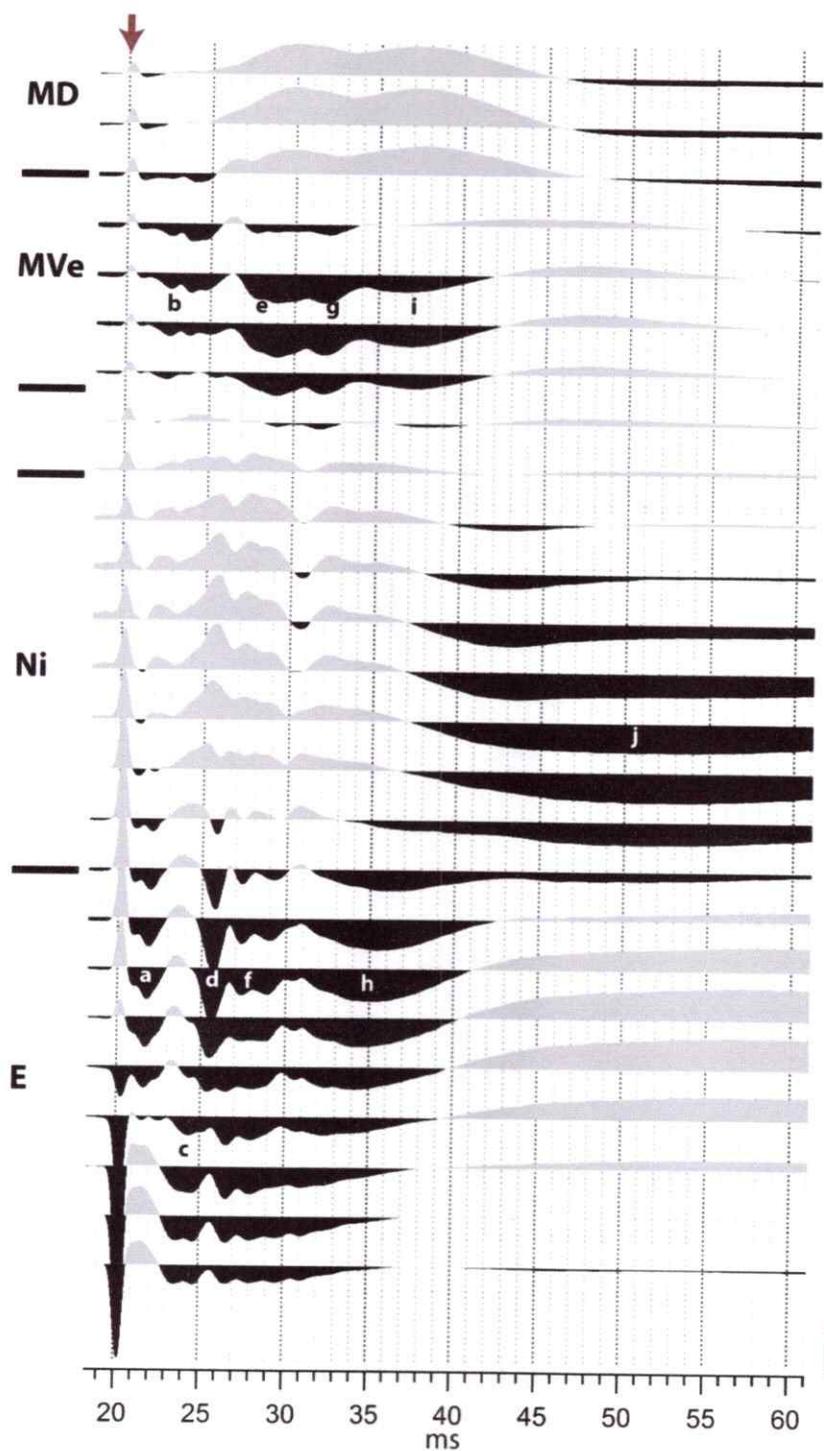


Figura 6-8. Mapas de densidades de corriente a lo largo del coloplio visual. Curvas del CSD correspondiente al panel 2 de la figura 6-6. Los valores máximos de las curvas en color gris representan *sources* y en color negro los *sinks*. El momento del estímulo se indica con una flecha roja en la parte superior del gráfico. Barra de calibración, 20mV/mm².

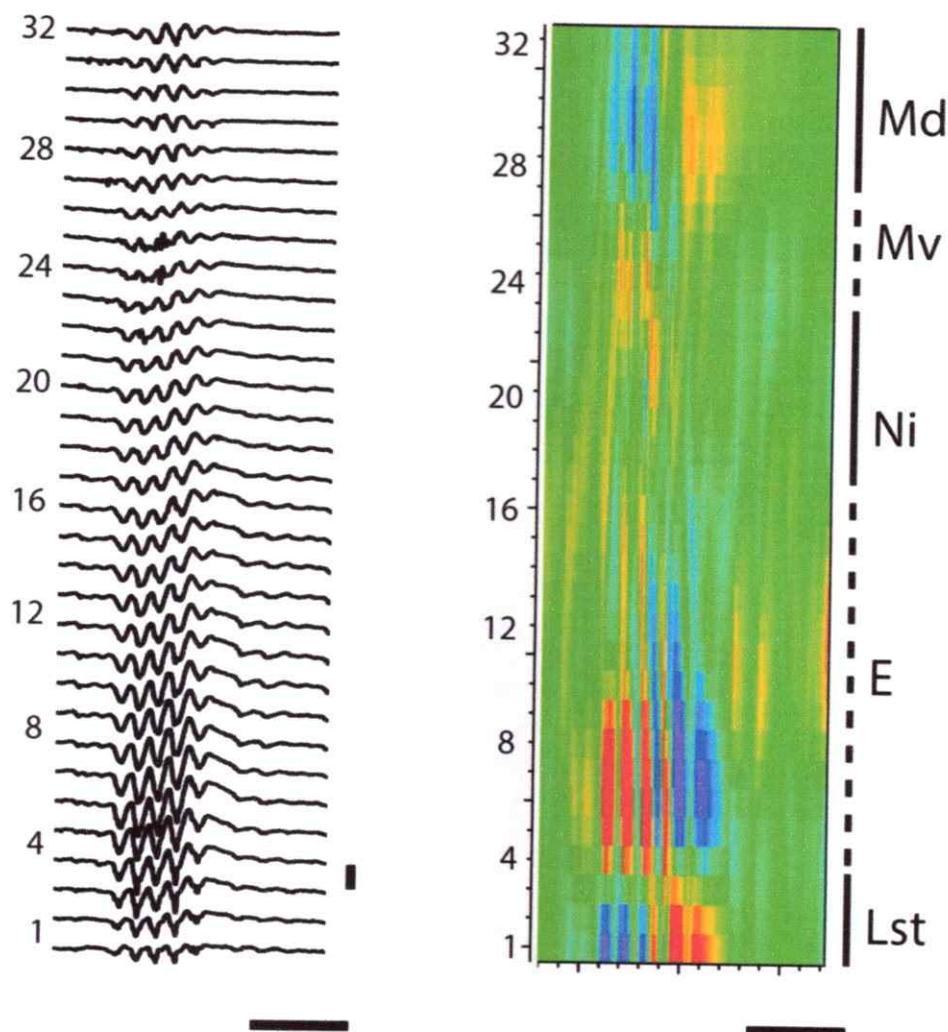


Figura 6-9. Mapa de densidad de corriente elaborado usando actividad espontánea característica del colopodio visual. Al lado izquierdo se presenta una serie de potenciales lentos obtenidos a lo largo del colopodio visual mostrando la forma de la onda característica de esta región. Al lado derecho se presenta el mapa de densidades de corriente obtenido al procesar esta onda. Los *sinks* y *sources* se presentan con el mismo código de colores que en la figura 6-6. Barra de calibración, horizontal: 100ms; vertical 4mV.

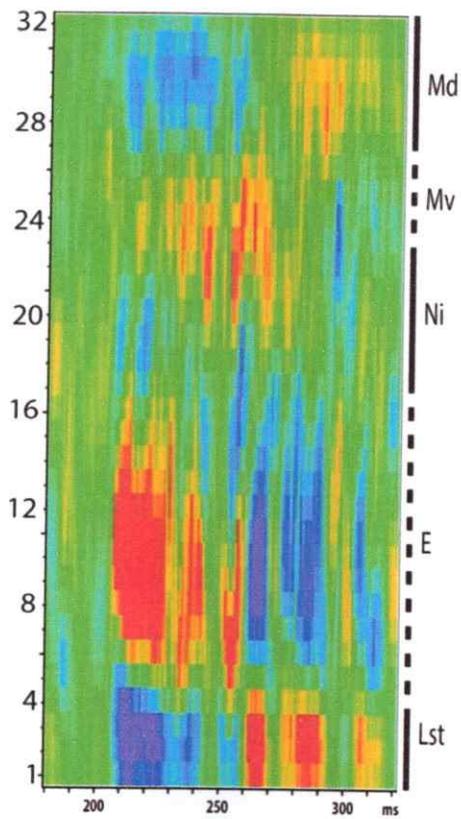


Figura 6-10. Mapa de densidad de corriente evocado visualmente. CSD obtenido a partir de los 300ms iniciales de un registro simultáneo de actividad evocada visualmente a lo largo del coloplio visual.

Columnaridad en el coloplio visual.

Para estudiar la relación entre las columnas anatómicas y la fisiología del coloplio, inicialmente usamos el mismo arreglo de electrodos en forma de peineta dispuesto en el sentido de las columnas para registrar, mientras estimulamos eléctricamente en E (casos EM1-5). A diferencia de los experimentos de CSD, ahora no hicimos transectos y solamente registramos en M con la intención de apreciar la existencia de un decaimiento de la respuesta lateral. Los registros multiunitarios fueron evocados eléctricamente en locus de E que estuviesen anatómicamente relacionados con alguno de los sitios de registro en M, para esto usamos estímulos anódicos de distintas características (tabla 6-1). Durante estos experimentos encontramos en M una descarga neuronal en forma de ráfaga característica, evocada por el estímulo eléctrico, y registrada siempre en uno solo de los cinco electrodos de registro (fig. 6-11). Esta respuesta se encontró consistentemente en los distintos casos en que se hizo el experimento, lo cual se puede ver en los *rasters* construidos para cada caso (fig. 6-12). Además se observó que el electrodo en que se registra esta respuesta en ráfaga es el que mejor se relaciona anatómicamente al sitio de estimulación (fig. 6-12) y el más activo posterior a la estimulación (fig. 6-13). Es de notar que una respuesta parecida a la ráfaga no se aprecia en los electrodos contiguos a pesar de la cercanía (200-300 μ m) y de que en casi todos los electrodos existe un aumento de la actividad registrada.

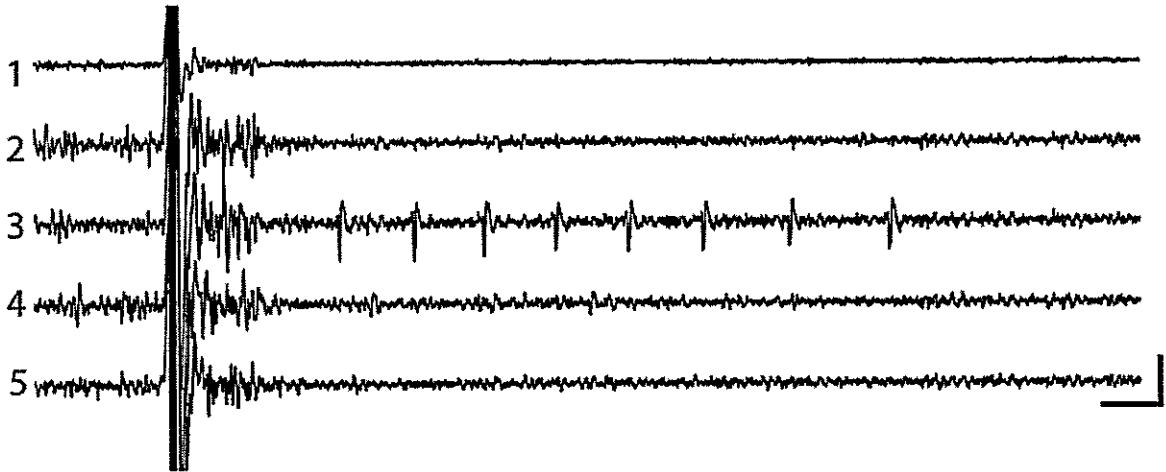


Figura 6-11. Respuesta mesopialial característica evocada por estimulación eléctrica en E. Registro *in vivo* en el mesopalio (caso EM4) utilizando cinco electrodos dispuestos como peineta, separados horizontalmente (rostro-caudal). El registro se hizo durante estimulaciones eléctricas en E, realizadas mediante un sexto electrodo. En el trazo número 3 presentado en la imagen se observa la respuesta en ráfaga característica, este electrodo es además el que se encuentra anatómicamente relacionado al electrodo de estimulación en E. Barra de calibración, 10ms horizontal; 100 μ V vertical.

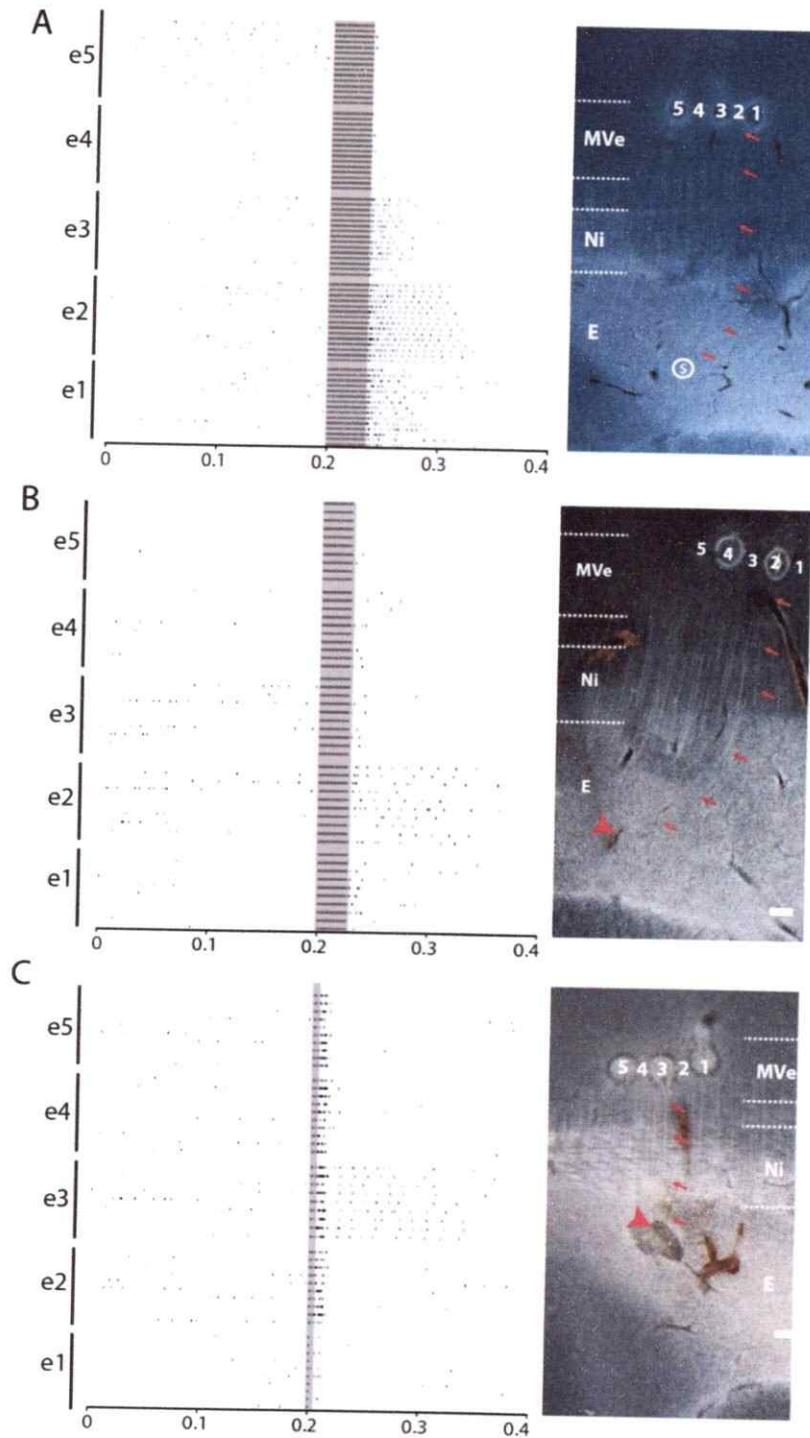


Figura 6-12. Gráficos de raster de la respuesta mesopial evocada eléctricamente y la histología mostrando la posición de los electrodos. Cinco casos distintos de estimulación eléctrica en E y respuesta evocada en M, representada como raster de espigas. **A:** caso EM1. **B:** caso EM3. **C:** caso EM4. Barra de calibración: 300 μ m para todas las imágenes.

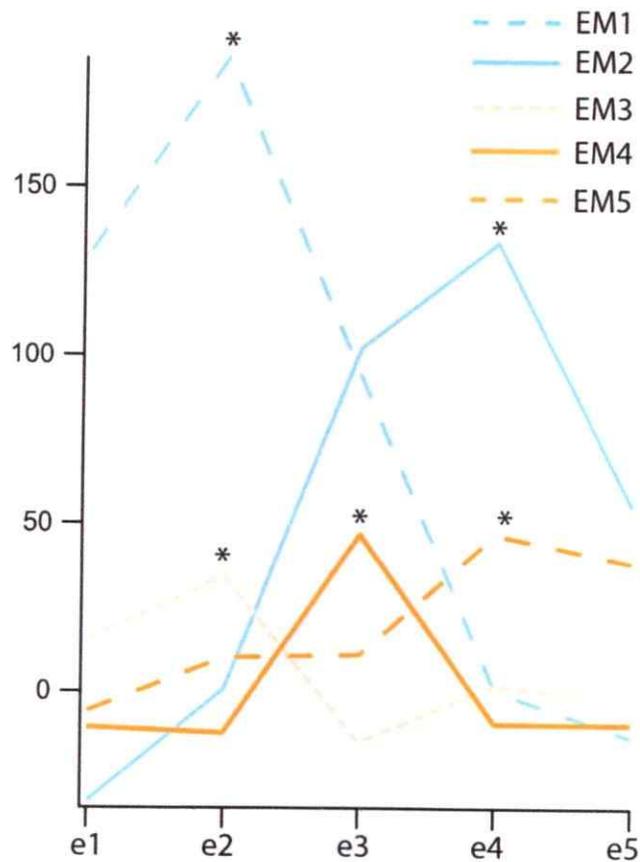


Figura 6-13. Curvas de activación para cada sitio de registro en M. Los distintos puntos de las curvas representan el aumento de actividad en cada sitio de registro en M (e1-5) posterior al estímulo en E. Cada curva representa un experimento distinto (EM1 a EM5). Los valores representan el Z score, del número promedio de espigas, acumulado para 10 ventanas (15ms) post estímulo. En cada curva el electrodo en M relacionado anatómicamente con el sitio de estimulación en E es distinto y se indica con un asterisco.

Como una última aproximación experimental para explorar la relación entre la columnaridad anatómica y la actividad del colopallio visual, hicimos registros de la actividad evocada visualmente usando el multielectrodo de 32 sitios (caso ENM9 y 10, **tabla 6-1**). En esta ocasión registramos inicialmente con el electrodo puesto en la orientación estereotáxica y a continuación registramos con el electrodo en la orientación columnar (23°). De los registros obtenidos en cada caso aislamos espigas evocadas desde de registro de sitios ubicados en E, Ni y M. Debido a que las respuestas encontradas en E es notoria la presencia de ráfagas de descargas y a que estas corresponden a eventos significativos dentro del flujo visual en la vía tectofugal (Marín y col., 2012), construimos ondas envolventes de esta actividad como se muestra en la **figura 6-14**. A continuación las espigas aisladas en cada sitio (E, Ni y M) fueron correlacionadas con la onda envolvente elaborada a partir del registro multiunitario en E, usando un análisis de actividad promedio gatillada por espigas (STA del inglés *spike triggered average*). Los resultados de este análisis indicaron que las espigas registradas en Ni y M se correlacionan perfectamente con la actividad de E representada por la onda envolvente en el caso en que el registro se hizo con el electrodo puesto en el sentido columnar (**fig. 6-15D-E**, trazo negro). Por otra parte observamos que no existe correlación entre las ráfagas registradas en E y las espigas en Ni ni M cuando se registra en un sentido diferente al de las fibras (**fig. 6-15D-E**, trazo gris).

Las correlación entre las espigas de E con los burst de E fue usada como un control (fig. 6-15C).

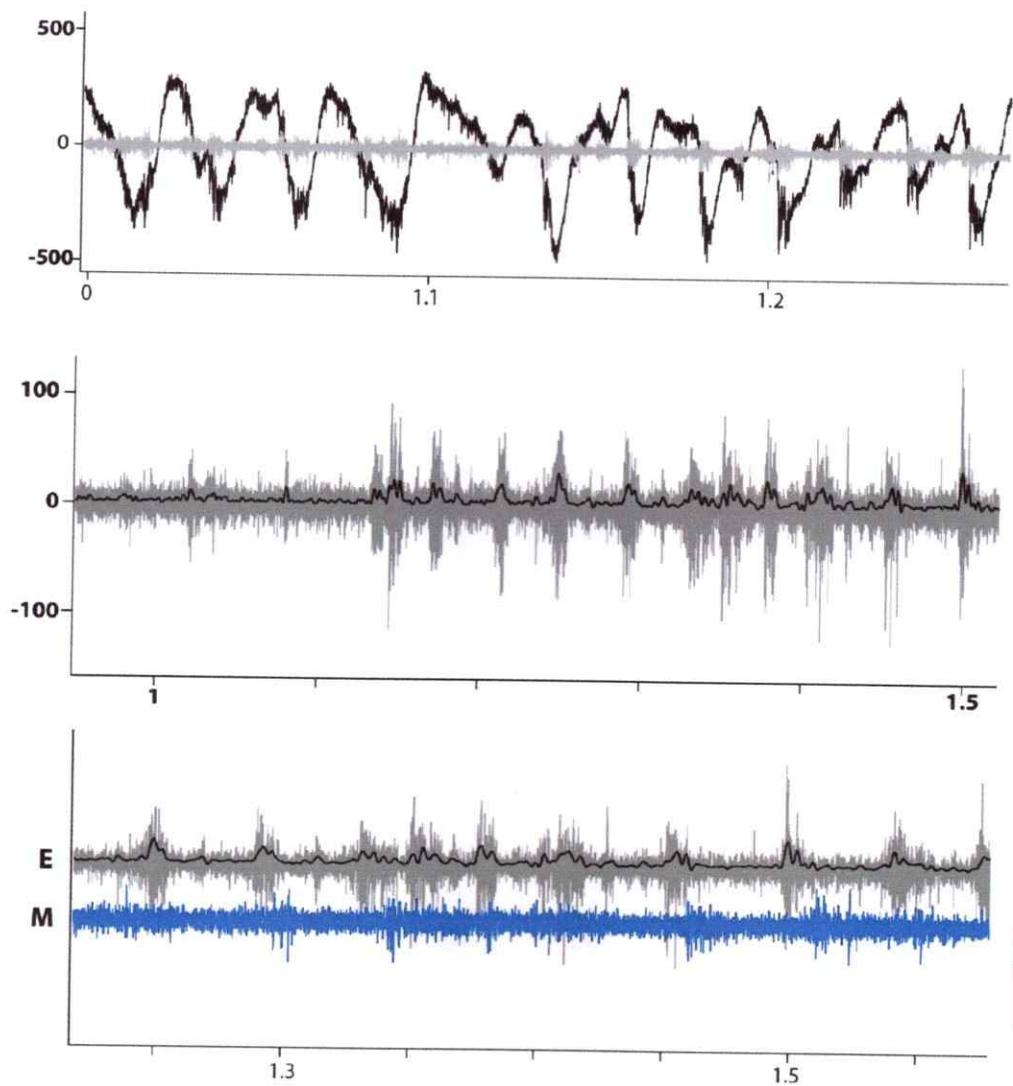


Figura 6-14. Actividad multiunitaria de colopalo visual. Distintos trazos de registros de la actividad multiunitaria evocada visualmente en E y M. **Panel superior:** Trazo de señal cruda (negro) y filtrada (gris) para registros de actividad entopial. **Panel central:** Señal filtrada (gris), se aprecia el aumento de actividad debido al comienzo del estímulo visual (1,15 seg.) y las ráfagas de descarga en la respuesta entopial. En negro se muestra la envolvente utilizada para los STA. **Panel inferior:** Trazo de señal entopial (gris), su envolvente (negro) y la actividad de M (azul).

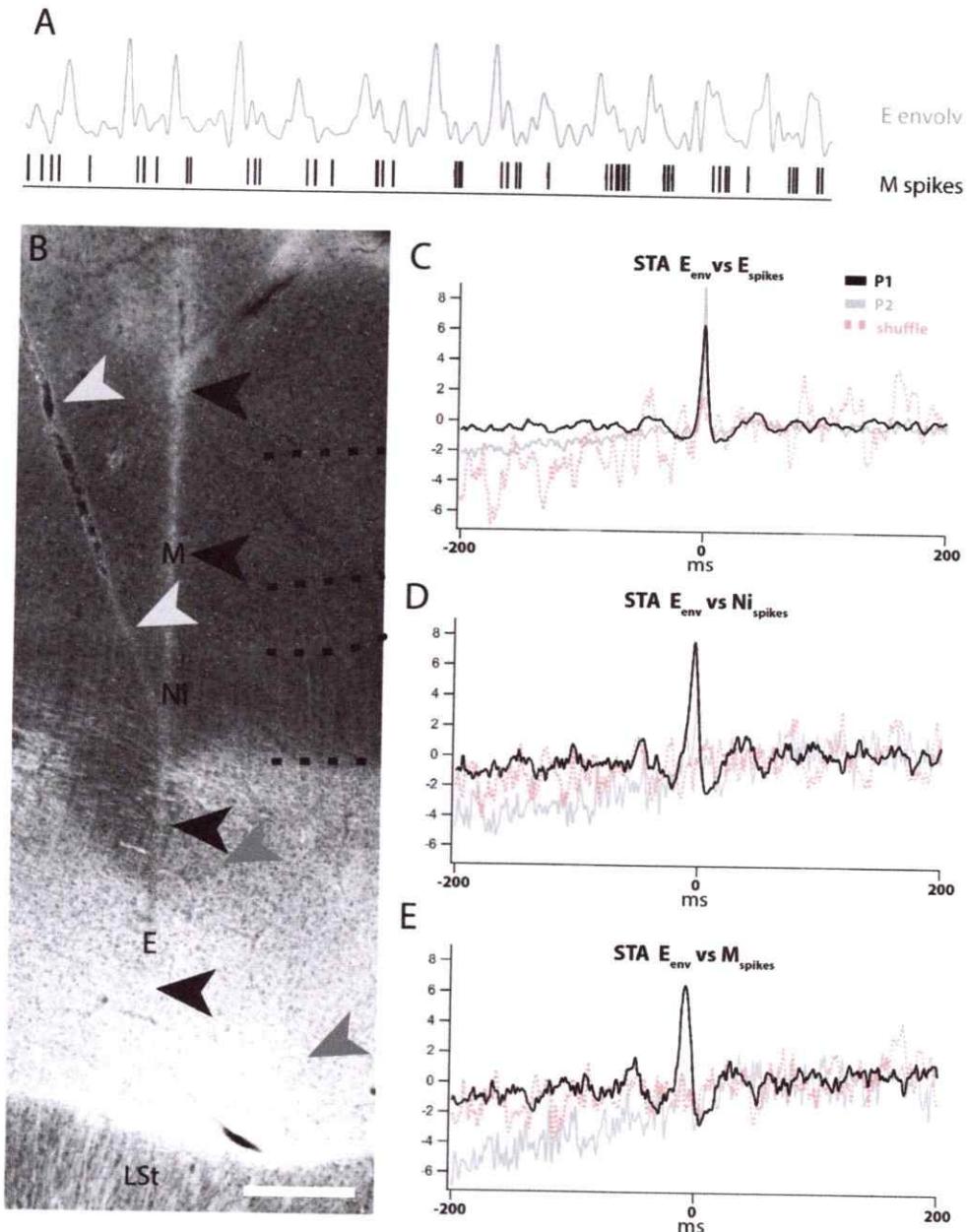


Figura 6-15. Análisis de correlación de la actividad colopial en la columna y fuera de ésta. Correlación de la actividad registrada en E, Ni y M en locus dentro de la columna y fuera de ella. **A:** Trazos de la envolvente entopialial (superior), los picos representan los *bursts* y las espigas aisladas en M representados por líneas verticales. **B:** Material histológico mostrando las fibras columnares, el tracto del electrodo en posición columnar (flechas negras) y estereotáxico (flechas grises). **C:** Correlación de la envolvente en E versus espigas en E (control). **D:** Correlación de la envolvente en E versus espigas en Ni. **E:** Correlación de la envolvente en E versus espigas en M. Barra de calibración en B, 500 μ m.

DISCUSIÓN

El objetivo central de este capítulo fue realizar una caracterización de las operaciones del circuito intrínseco del coloplio visual. Debido a esto el diseño de los experimentos se basó en el conocimiento de la estructura descrita en los capítulos previos. Así mismo los resultados obtenidos evidencian principalmente aspectos operacionales que tienen sentido con la anatomía del DVR más que con propiedades emergentes desprendidas desde la actividad neuronal. Tal como se propone en la hipótesis de esta tesis la evidencia obtenida apoya la idea de que el DVR visual opera bajo propiedades elementales que son la modularidad, laminación, columnaridad y recurrencia.

Modularidad, laminación, recurrencia y columnaridad

Uno de los alcances más significativos de los resultados presentados en este capítulo fue demostrar que el coloplio visual funciona como un área visual. Esto fue evidenciado por dos resultados principales: 1) todas sus láminas (E, Ni y M) se activan al presentar estímulos visuales en movimiento. Si bien no todas las láminas responden con la misma intensidad frente al estímulo utilizado (lo cual es esperable debido a la heterogeneidad hodológica), todas mostraron un aumento significativo de su actividad. El segundo resultado que soporta la idea del área visual trilaminada, son los tres distintos mapas de CSD obtenidos. En

estos se observa que independiente de la forma en que se active el circuito (espontánea, visual o eléctricamente) se obtiene una activación sináptica secuencial en todas las láminas del colopallio visual, esto indica que al activarse alguna de los componentes, lo hace también el resto del locus colopallial, como se esperaría de un área con el circuito descrito previamente.

Respecto a la laminación del colopallio, los CSD obtenidos sostienen fuertemente que este es un aspecto central de su operar, ya que al alinear los CSD con el material histológico correspondiente, se encontró que los distintos eventos sinápticos (representados por *sinks* y *sources*) se localizan precisamente en las láminas del colopallio.

También se observó diferencias en la respuesta de las láminas frente a los estímulos utilizados, si bien no se obtuvo parámetros que permita aún medir estas diferencias, fue evidente que E y Ni presentan mayores niveles de descarga en comparación al M. Además la actividad de E y Ni sigue la presentación del estímulo de manera casi lineal (fig. 6-4). Esto no ocurre con MVe y MD, donde se apreció una acomodación del aumento inicial de la actividad evocada.

Respecto a la recurrencia observada en la anatomía del circuito, en estos experimentos se apreció funcionalmente como uno de los rasgos característicos de los CSD. En el mapa de densidades de corriente obtenido mediante estimulación eléctrica en E, se

observó una secuencia de eventos sinápticos en E seguidos cada uno por otro en MVe, esta secuencia de activación E-M se repite al menos 3 veces en cada activación. Esto puede ser interpretado como resultado de la activación de la proyección recurrente entre E y M. Además luego de esta recurrencia aparece un notorio *sink* en Ni, finalizando la secuencia de eventos. Esto podría sugerir que los eventos recurrentes modulan o evocan finalmente la activación de las neuronas eferentes en el Ni.

Esta recurrencia sináptica fue observada también en el CSD de la onda colopialial espontánea y en el de la actividad visual evocada, siendo menos evidente en el último. Esto probablemente se deba a que la actividad evocada visualmente no se inicia de forma tan coordinada ni balística como la evocada por el pulso eléctrico discreto y en el caso de la onda espontánea.

De cualquier manera nos parece notable que estos resultados muestren patrones sinápticos similares usando distintas condiciones y registrando en distintas posiciones del colopialio visual. Esto parece reflejar un modo de operar canónico y repetitivo del circuito colopialial. Es más, nos parece que la secuencia de activación refleja claramente el circuito propuesto en el capítulo 3 (**fig. 3-16**).

En relación a la columnaridad son tres los resultados que apoyan este patrón operacional. En primer lugar, la obtención de un mapa de CSD es la primera evidencia de que el flujo de corrientes ocurre

en el sentido radial de las columnas. Según la teoría esto no debiese ocurrir si es que la estructura estudiada no se organizara radialmente (Nicholson & Freeman, 1975; Mitzdorf, 1985). Por lo tanto, obtener un CSD claro es un resultado que por sí solo apoya la organización columnar del coloplio visual. No obstante un control en el cual se registre los potenciales evocados realizando un transecto en contra sentido de las columnas fortalecería este punto en caso que el CSD resultara negativo.

El segundo resultado que apoya la columnaridad es la evidencia de la estimulación local en E, obteniendo una ráfaga de espigas característico en un locus de M anatómicamente relacionado con el sitio de estimulación. Aunque un aumento de la actividad pudo observarse en los sitios de registros contiguos, siempre la mayor actividad se encontró en el locus correspondiente. Además si tomamos en cuenta los casos en que la estimulación eléctrica fue menos intensa (casos EM3-5, **fig. 6-7**) el aumento de la respuesta estadísticamente significativo se encuentra abarcando solamente dos locus de registro en M, lo que corresponde a 500 μ m. Según lo descrito en el capítulo 3 esta distancia es coherente con el tamaño de los terminales de las neuronas tipo I de E en MVex, sugiriendo que este podría ser el rango de tamaño funcional de una columna.

Por último el resultado obtenido desde los análisis de STA, si bien preliminares, son prometedores respecto a la existencia de una columna funcional. En estos resultados se indica que dentro

de una columna la actividad neuronal de las distintas láminas se encuentra sincronizada temporalmente, lo cual no ocurre con la actividad neuronal de locus que no se encuentran anatómicamente relacionados. Este resultado es sorprendente debido a que la vía tectofugal no posee campos retinotópicos y al estimular un punto del campo visual, muchos sitios del entopallio se activan. Esto hace imposible estudiar las columnas del colopallio visual como elementos unitarios, relacionados a la posición del estímulo visual como un campo receptivo restringido. Es esto lo que nos parece más valioso de este resultado, ya que a pesar de que columnas adyacentes se activan por el mismo estímulo, la actividad de las distintas láminas de una columna es coherente temporalmente dentro de ella y no con respecto a las vecinas. Nos parece que estos resultados indicarían la existencia de una operación columnar, permitiendo que cuando esta coordinación de actividad ocurra, cada columna funcione como una unidad propia.

Comparación con trabajos previos en aves y mamíferos

Previamente Engelage & Bischof (1989), demostraron que el análisis de densidades de corriente es aplicable al entopallio de aves. En su trabajo los autores observaron un prominente *sink* restringido al centro de E, que correspondido con el máximo nivel de disparo de las neuronas de esta lámina, evocado por un flash de luz. Tal como discuten los autores en E no es evidente una organización

espacial de sus neuronas ni de sus procesos dendríticos, pero aun así es posible observar un claro *sink*. A nosotros también nos sorprendió que los análisis de CSD funcionasen, debido a que teóricamente es necesario un arreglo radial de los procesos dendríticos de los elementos neuronales para que el análisis se ajuste (Nicholson & Freeman, 1975; Mitzdorf, 1985). Esto según vimos en el capítulo 4, no se observa en la morfología dendrítica de las neuronas de ningún componente del colopallio (excepto las neuronas en MVi), encontrándose principalmente neuronas con morfologías estelares.

Respecto a los CSD obtenidos en la corteza de mamíferos, usando potenciales evocados mediante estimulación talámica, se puede apreciar un *sink* de corriente típico debido a la sinapsis de la proyección talamo-cortical sobre las neuronas estelares de la lámina 4, las que presentan morfologías similares a las del colopallio visual (Mitzdorf & Singer, 1978; Swadlow y col., 2002). Nuestra interpretación respecto a esto es que en el palio de aves y en el caso de la lámina 4 de la corteza, el análisis funciona en primer lugar por la coordinación temporal precisa en la activación de los elementos activos (Mitzdorf, 1985). En segundo lugar, creemos que esto se debe a la dirección radial de los procesos axonales que podrían funcionarían como sumideros. También creemos que es importante la orientación preferencialmente radial del flujo sináptico a través de las láminas. Esto último nos parece, determina que el flujo de corrientes ocurra

predominantemente en este sentido que es además en el sentido que se hace el registro. Justamente Engelage & Bischof (1989) no encuentran *sinks* prominentes en el Ni ni en M, a pesar de que registran potenciales evocados visualmente desde estas láminas, pero no lo hacen en el sentido de las fibras columnares. Esta observación soporta el argumento del flujo preferentemente radial del colopallio. No obstante, para confirmar este punto es necesario realizar un control usando nuestro arreglo experimental pero registrando en un sentido distinto al de la columna y ver si de esa forma aparecen o no los *sinks* y *sources* de las láminas superficiales.

En relación a perfiles de CSD obtenidos en la corteza visual de gatos, al compararlos con los obtenidos por nosotros en palomas, se puede apreciar algunas similitudes y diferencias. La primera diferencia es que la recurrencia sináptica sugerida por los pares de *sinks* E-M, no parecen tener un equivalente igualmente notorio en los perfiles corticales, aunque de todas formas el circuito recurrente cortical se puede observar en los perfiles de CSD principalmente en secuencias de *sinks* en las láminas L4-L2/3-L5 (Mitzdorf & Singer, 1978). Esta diferencia podría atribuirse a la intensidad del estímulo utilizado, ya que al ser intrapalial en nuestro caso, podría ser muy potente generando un aumento de los pares de *sinks* recurrentes. Otra explicación a esto es que la proyección recurrente generada por las fibras E-M en aves, estuviese menos desarrollado en la corteza de mamíferos, tal como

sugiere su anatomía. Quizás esta diferencia estructural pueda tener una explicación en la presencia de neuronas piramidales en la corteza, cuyas dendritas apicales podrían tener un efecto de recurrencia o autorecurrencia, reemplazando las masivas fibras axonales.

En la corteza de mamíferos se ha visto que la arquitectura recurrente del circuito intrínseco permite el compromiso de la corteza en estados generales de actividad autogenerados y autosostenidos (Haider y col., 2007; Hasenstaub y col., 2007; Watson y col., 2008). Un estado de activación cortical característico es el llamado '*Up-state*'. Este es un estado despolarizado o de baja en el umbral de disparo de un grupo de neuronas y se ha descrito en animales en planos anestésicos, sueño de ondas lentas y estados de vigilia tranquila (Steriade y col., 1993). Se sabe que este estado despolarizado de la corteza oscila con una frecuencia menor a 1Hz interpuesto con un estado hiperpolarizado (*down state*). Además, se sabe que las neuronas excitatorias que forman el circuito recurrente juegan un rol compartido con neuronas inhibitorias en la modulación de este estado (Sanchez-Vives & McCormick, 2000).

En relación con esto, nos parece que nuestros resultados sugieren que el colopelio presenta algunos rasgos de este tipo de actividad. Por ejemplo la dinámica recurrente de las secuencias sinápticas mostradas por los CSD podría relacionarse con la generación de

estos estados autogenerados. La onda característica del circuito, que aparece principalmente bajo estados de anestesia o de vigilia tranquila, ocurre de forma espontánea y probablemente este sustentada en la proyección recurrente. Durante esta oscilación además se compromete todo el circuito y el semblante recurrente del perfil es clarísimo e incluso más preponderante que en los perfiles evocados (*figs. 6-7, 6-8 y 6-9*). Al observar los registros en que se presenta este fenómeno se aprecia que sobre la onda se montan espigas de neuronas locales, y aparece característicamente con una frecuencia menor a 1Hz (observación no presentada). Por último, en algunos experimentos de registros en rebanadas (no presentados), hemos visto que al agregar un inhibidor de receptores GABAérgicos al medio, una onda similar a la descrita *in vivo*, aparece también *in vitro*, sugiriendo que este estado de actividad del palio aviano es generado por un balance entre las proyecciones recurrentes excitatorias tanto como por proyecciones inhibitorias.

Tomando en cuenta estas evidencias nos parece que estos estados del circuito colopallial se asemejaría bastante a los estados *up* y *down* de la corteza, donde se sabe de la participación de las proyecciones recurrentes de las neuronas estelares de la lámina 4, 2/3 y 5 (Watson y col., 2008; Neske y col., 2015). Lo cual es coherente con la propuesta realizada en el capítulo 3 en que se propone la existencia de neuronas estelares que forman un circuito equivalente al cortical canónico.

Respecto a la columnaridad, aunque inicialmente en la corteza de mamíferos las columnas fueron descritas como entidades anatómicas, actualmente se entiende por columna a un conjunto de neuronas anatómicamente relacionadas con respuestas ajustadas a un aspecto sensorial. Aunque este concepto ha sido debatido debido a que ejemplos de columnas funcionales se han encontrado principalmente en áreas de la corteza que presentan mapas topográficos de la sensorialidad que representan (Horton & Adams, 2005). Debido a que en la vía tectofugal las neuronas presentan campos receptivos grandes, es difícil aplicar el concepto de 'columna funcional' al colopallio visual. Sin embargo, nos parece que los experimentos de correlación temporal de la actividad presentados (fig.6-13, 6-14) se acercan muchísimo a lo que se entiende por columna cortical en mamíferos. Esto se dice ya que nuestros resultados muestran que una estructura columnar se activa temporalmente independiente a la de una columna anatómica vecina.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

El sistema nervioso es una red celular especializada en coordinar la actividad sensorial y motora del organismo. Una característica estructural central en la realización de esta coordinación es la representación de las superficies sensoriales en la arquitectura interna del sistema. Al observar y comparar regiones del cerebro de distintos vertebrados nos parece que la corteza de mamíferos es una región en la que se establece una organización única de las distintas representaciones sensoriales, tanto interoceptivas como exteroceptivas. En efecto en la corteza se observa una representación de las distintas modalidades sensoriales, mapeadas sobre parcelas de esta estructura. Cada una de estas parcelas presenta una repetición de los principales rasgos de su organización interna. Esto permite un tratamiento similar, en términos de operación, sobre aspectos sensoriales de diversa naturaleza. De este modo las distintas representaciones presentes en la corteza pueden ser relacionadas unas con otras de manera coordinada. Este arreglo además permite modular la actividad de representaciones sensoriales y áreas relacionadas con la ejecución motoras en otras partes del cerebro mediante proyecciones descendentes originadas en la corteza (*top down*).

A nuestro entender los rasgos estructurales del palio mamífero, mantiene una relación directa con el alto grado de plasticidad conductual de gran parte de las especies de este grupo.

En este trabajo hemos presentado evidencia novedosa respecto al DVR de las aves, que argumenta a favor de una equivalencia en su organización y operación a la corteza de mamíferos. En lo que resta se presenta un breve resumen de los resultados y una discusión sobre el significado que estos podrían tener respecto a la organización del palio, su función, relación con la conducta y evolución.

Resumen de los principales resultados y su relación con la hipótesis de trabajo

Organización interna del colopallo visual. En el tercer capítulo de este trabajo presentamos una caracterización de las morfologías neuronales de las láminas del DVR visual de pollos. Nuestros resultados mostraron que cada lámina presenta elementos celulares característicos, cuyos axones terminan preferentemente en una de las láminas, por lo tanto, comprometidos mayoritariamente en la formación de un circuito local que involucra todas las láminas del área (E, Ni, M). Fue evidente desde las morfologías neuronales que sus axones se orientan preferencialmente de forma radial. Un esquema resumen y una interpretación del circuito se presentó en la **figura 3-16**. En la interpretación que se hizo, la recurrencia

en la proyección entre láminas aparece como un aspecto central de la organización del circuito. Funcionalmente se interpretó que la recurrencia podría mediar la modulación del flujo visual entrante desde el tálamo hacia E. Esta modulación ocurriría mediante la proyección desde M a E, lo cual suponemos una especialización del palio aviano. Además, la proyección desde el Ni a M descrita por nosotros es masiva y se puede entender como parte de la recurrencia. Esto ya que las neuronas del Ni proyectan hacia otros blancos y reciben desde estos, de modo que, según el estado de actividad general del resto del palio o áreas específicas, se podrían activar o seleccionar diferencialmente algunas de las posibles configuraciones de actividad en E.

Por lo tanto, podemos decir a partir de la evidencia presentada en este capítulo, que el circuito y los elementos que lo componen apoyan la propuesta de que el DVR visual se organiza de forma laminada, radial, modular y que podría representar un sustento anatómico para la presencia de columnas funcionales. Por último al realizar una comparación directa de los principales tipos neuronales del coloplio de aves con elementos neuronales funcionalmente equivalentes del circuito cortical canónico de mamíferos, encontramos similitudes morfológicas directas. Una de las más evidentes es la similitud entre las neuronas estelares de proyección entre la lámina 4 y 2/3 de mamíferos, con las neuronas de proyección entre E y M, ya que ambos casos las neuronas presentan un axón columnar y morfologías terminales semejantes.

Finalmente, la comparación del circuito palial intrínseco y de los elementos celulares presentes en aves y mamíferos nos sugirió una posible conservación de los morfotipos y fundamentalmente de un motivo conectivo del palio amniota.

Eferencias del colopallo visual. En el cuarto capítulo presentamos una reevaluación de las eferencias del colopallo visual de palomas. La evidencia que presentamos demuestra que las eferencias del circuito se generan específicamente en Ni en toda su extensión dorso-ventral y rostro-caudal. Además, se vio que las aferencias talámicas del Rt terminan en E segregadas de las neuronas que generan las eferencias en el Ni. Esto soporta y refleja claramente la organización laminar del DVR. También es importante el hecho de que el Ni completo se proyecte sobre casi todos sus blancos telencefálicos, de modo que toda la actividad talámica entrante se representa en estos blancos. Además observamos que esta proyección se organiza de forma topográfica, indicando que la posición de las neuronas dentro de las láminas del DVR visual es relevante para la operación del sistema.

Los principales blancos paliales encontrados corresponden a áreas de segundo orden sensorial y motor (NFL, NIL, NCL/TPO, Arc). También encontramos que el Ni recibe aferencias desde al menos dos de estas áreas del palio (NCL y NFL), lo cual tal como se discutió previamente puede resultar importante en la modulación y selección de los estados sensoriales entrantes. Además de los blancos

paliales, por primera vez describimos una proyección desde el Ni hacia el estriado lateral, misma región que recibe aferencias desde E ventral (Ahumada-Galleguillos y col., 2015). Entender la relación entre estas proyecciones es importante para entender cómo el circuito del DVR visual influencia la ejecución motora mediada por el circuito de los ganglios basales.

La evidencia discutida en este capítulo muestra que la especialización del Ni dentro del DVR visual, hace evidente su carácter de lámina. Si bien la evidencia mostrada en este capítulo no aporta antecedentes sobre la recurrencia y la columnaridad, sí hay rasgos de la organización del Ni que son coherentes con estas formas de organización. Esto puede verse en la mantención de la topografía de la lámina en la proyección eferente, lo cual sería coherente en caso de que existan columnas funcionales. También puede relacionarse la recurrencia con la proyección recíproca tal como se discutió.

Finalmente según se discutió en el capítulo 4, los antecedentes mostrados permiten comparar directamente el Ni del coloplio visual con parte de la lámina 2/3 del cortex de mamíferos, principalmente en la operación que realizan ambas láminas en conectar un área sensorial con otras áreas.

Aferencias talámicas del coloplio visual y áreas secundarias asociadas. En el quinto capítulo presentamos un estudio mostrando un nuevo aspecto en la organización de la proyección tálamo-palial

de palomas. En este observamos que además de la vía ascendente primaria desde Rt hacia E, existe una proyección secundaria. Esta proyección secundaria se origina en neuronas del tálamo dorsal, dispuestas como una matriz o retículo alrededor de los núcleos talámicos primarios. Los terminales de estas neuronas se distribuyen sobre el Ni del coloplio visual (no sobre E) y además sobre áreas de segundo orden sensorial y motoras (NFL, NIL/TPO, NCL y Arc). Según antecedentes encontrados en otros estudios, pensamos que esta proyección también compromete la lámina de eferencias de las otras áreas sensoriales (Ni auditivo, somatosensorial, etc). Estos antecedentes indican nuevamente que el DVR se organiza de manera laminar, en este punto debido a la aferencia talámica diferencial que reciben E y Ni.

Finalmente debido a las características de la vía ascendente secundaria, ésta se entendió como una posible vía moduladora de la actividad de las distintas áreas paliales. Además, su organización se comparó con un sistema de proyección tálamo-palial modulador del flujo ascendente descrito en mamíferos.

Caracterización fisiológica del coloplio visual. En el capítulo sexto presentamos registros de la actividad neuronal del coloplio visual que nos permitieron apreciar algunos de sus rasgos operacionales. Los datos presentados fueron analizados en relación con los antecedentes anatómicos de los capítulos previos, observando una relación directa entre ambos tipos de evidencia.

Un aspecto importante encontrado en este capítulo fue que todas las láminas del DVR visual se activan al estimular visualmente al animal. Esto nos permitió concluir que el coloplio visual funciona como un área trilaminar. Por otra parte, hicimos un análisis de densidades de corriente (CSD) usando potenciales de campo (espontáneos o evocados eléctrica y visualmente), registrados a lo largo de las láminas del coloplio. Estos análisis mostraron una secuencia estereotipada de eventos sinápticos, los cuales se localizaban precisamente en cada lámina. Por lo tanto, estos resultados nos indicaron ahora que el DVR visual opera como una estructura laminar.

Otro aspecto importante observado desde los CSD, es que la secuencia de eventos sinápticos encontrada posee rasgos evidentes de recurrencia y radialidad del flujo sensorial. Esto se pudo ver en cómo se siguen los eventos sinápticos en E y M, y en el hecho de que el CSD funcionase ya que según la teoría este análisis debe funcionar en estructuras radiales. Así, estos aspectos propuestos como rasgos de la organización del coloplio fueron demostrados también en su modo de operar.

Por último, los análisis de la actividad unitaria en M luego de estimular eléctricamente en E, indican que las neuronas pertenecientes a la columna estimulada en E evocan una respuesta local en las neuronas de la misma columna en M. Finalmente un análisis de correlación temporal de la actividad unitaria dentro

del coloplio visual sugieren la presencia de columnas funcionales. Estos experimentos de correlación indican que el aspecto sensorial que enciende la columna es el movimiento, los campos receptivos de estas columnas son grandes (alrededor de $80^{\circ} \times 80^{\circ}$) y finalmente que lo que diferencia a una columna y otra es la temporalidad con que estas se activan. De modo que estos resultados apoyan la existencia de columnas en el operar del DVR visual.

Al tomar en cuenta todos los antecedentes de la organización del palio aviano, nos parece que todos ellos soportan la idea de una organización del DVR visual en áreas formadas por tres láminas principales, interconectadas mediante circuitos recurrentes y repetitivos, que resultan en columnas estructurales y operacionales.

Interpretación de la organización general del palio aviano, comparación con la corteza de mamíferos

La evidencia descrita en esta tesis respecto a la organización del DVR de aves, se suma a antecedentes hodológicos previos que indican que la porción sensorial de esta región del palio se organiza en áreas con un carácter laminar y columnar. Estas están formadas por mesopalio y nidopalio y ha sido propuesto para el DVR visual y auditivo (field L, FL) (Wang y col., 2010; Jarvis y col., 2013; Ahumada-Galleguillos y col., 2015). Algunas observaciones

preliminares realizadas por nosotros muestran que esto también ocurriría en el área trigeminal del DVR (*Basorostralis*, B). Sin embargo, las otras áreas sensoriales y límbicas del DVR, localizadas en regiones en que se superpone el mesopalio y nidopalio, no han sido estudiadas bajo la idea de áreas laminadas. A pesar de esto al revisar la literatura se puede encontrar evidencia sugerente de que al menos el DVR medial (NIM) y multisensorial (NiDLP) seguirían un patrón similar al DVR visual, auditiva y trigeminal (Kröner & Güntürkün, 1999, figura 10; Wild & Gaede, 2015, figura 8C, E, G).

La idea de un DVR organizado en áreas laminadas ha sido respaldada además por estudios de la composición molecular del DVR, publicados durante el desarrollo de esta tesis (Chen y col., 2013; Jarvis y col., 2013). En estos estudios se demostró la existencia de una continuidad longitudinal del nidopalio y mesopalio, abarcando distintas áreas sensoriales, puntuada por la expresión de genes específicos durante el desarrollo del palio. Los genes usados como marcadores de láminas son *RorB*, el cual se expresa en la porción sensorial del nidopalio (E, FL y B); *CoupTFII* el cual se expresa en el nidopalio intermedio (Ni); y *FoxP1* para el mesopalio. Estos resultados que por una parte indican una continuidad de las láminas de distintas áreas sensoriales, son valiosos también en el contexto de la discusión anatómica comparada. Esto ya que los marcadores utilizados para caracterizar cada lámina son también moléculas

expresadas de manera específica en las láminas 2/3 (couptFII, FoxP1) y lámina 4 (RorB) de la corteza de mamíferos.

Como se puede ver en nuestros resultados y en la evidencia disponible en la literatura, la equivalencia molecular de grupos neuronales del palio de aves y mamíferos, se corresponde estrictamente con aspectos operacionales de estas neuronas. Más específicamente, las neuronas del nidopalio sensorial (E, FL, B) y las L4 de la corteza reciben aferencias sensoriales primarias y expresan moléculas características. Por otra parte, las neuronas del Ni/M y las de L2/3 en la corteza contienen elementos que conectan cada área sensorial con áreas paliales de segundo orden y reciben aferencias desde el tálamo dorsal de segundo orden. Además en mamíferos las neuronas L2/3 poseen elementos de proyección recurrente y radiales sobre las láminas 4 y 5, de manera similar a como las neuronas de M proyectan sobre E. De esta forma la evidencia molecular y hodológica son coherentes, y reflejan una equivalencia entre las láminas del DVR de aves y las de la corteza de mamíferos.

Respecto a las áreas paliales que no reciben aferencias talámicas de primer orden, pero que son igualmente distinguibles como áreas por su hodología y citoarquitectura, se encuentra que en la mayoría de ellas no hay superposición de nidopalio y mesopalio (NFL, NIL, NCL y NCC) como en las áreas de primer orden (E, FL, B). Según la literatura y la evidencia encontrada aquí, proponemos que estas

corresponden a áreas integradoras de distintas modalidades representadas en el palio, y que podrían estar compuestas por neuronas equivalentes a las del Ni (Metzger y col., 1998; Kröner & Güntürkün, 1999; Atoji & Wild, 2005, 2009; Sadananda & Bischof, 2006). Esto se propone en base a la continuidad celular entre estas áreas y el Ni, y a la similitud en su modo de organización, ya que: tanto Ni como las áreas integradoras reciben aferencias desde otras áreas paliales; ambas proyectan hacia otras áreas; proyectan sobre el estriado de los ganglios basales; sus proyecciones son topográficas; reciben aferencias desde la proyección tálamo-palial de segundo orden. Además, pensamos que su estructura se puede comparar a las áreas de segundo orden de mamíferos, ya que varias de estas pierden la lámina 4 sensorrecipiente (áreas agranulares). No obstante estas similitudes, también cabe la posibilidad que parte de la población de neuronas de estas áreas integradoras, sea un equivalente a neuronas de la lámina 5. Esto ya que, estas áreas mantienen una proyección hacia los ganglios basales del telencéfalo de igual modo que las neuronas de la lámina 5. Cualquiera sea la forma, establecer una equivalencia entre estas neuronas de aves y mamíferos requiere un estudio más exhaustivo.

En aves no se ha descrito una proyección descendente desde cada área del DVR sobre los núcleos talámicos de primer orden que la aferentan. Si bien se ha descrito una proyección con estas características desde el hiperpalio (wulst) sobre el tálamo, los

trabajos donde esto se presenta son antiguos y no detallan claramente si la proyección palio-tálamica aferenta directamente los núcleos de primer orden. Por esto pensamos que quizás una proyección palio-talámica sobre los núcleos de primer orden, equivalente a la originada en la lámina 6 de mamíferos, no existe en aves y sea un rasgo únicamente presente en el palio de mamíferos. Si esto fuese así, lo más parecido a una proyección palio-talámica en aves sería la proyección desde el arcopalio (y probablemente hiperpalio) sobre los núcleos de la matriz moduladora descritos por nosotros. Así esta proyección podría modular la actividad talámica y coordinar la actividad entre áreas paliales mediante la proyección difusa sobre las neuronas tipo Ni.

En relación a las regiones motoras del palio, en aves se ha descrito que el arcopalio tanto como hiperpalio generarían proyecciones descendentes moduladoras de la ejecución motora. Esta proyección ha sido comparada a la proyección del tracto piramidal originada en las neuronas de la lámina 5 de las áreas motoras de mamíferos. Al igual que la lámina 6, estas neuronas en aves no forman parte de las regiones trilaminadas. No obstante, en el DVR visual se ha demostrado en varias oportunidades la presencia de neuronas restringidas al entopalio ventral, que proyectan sobre el estriado y que podrían compararse a neuronas de la lámina 5 de la corteza (Krütfeldt & Wild, 2005; Ahumada-Galleguillos y col., 2015). No obstante determinar si esta población de neuronas está presente en otras áreas sensoriales del DVR y si es posible

establecer una homología con alguna subpoblación de neuronas L5 de la corteza, requiere un estudio más acabado.

Una interpretación esquemática de la organización del flujo de actividad en el palio de aves se presenta en la **figura 7-1**. En el esquema se muestran las distintas áreas trilaminadas en que se ha descrito o se sospechan circuitos columnares y recurrentes. Todas estas áreas reciben aferencia talámica de primer y de segundo orden de manera segregada sobre sus láminas. Cada área establece proyecciones intrapaliales con áreas de segundo orden sensorial y en algunos casos áreas motoras. Debido a que las áreas integradoras (solo se muestra NCL, NFL y NCM) reciben proyecciones de distintas modalidades, la proyección recíproca de estas áreas sobre las áreas de primer orden sensorial, podría modificar el flujo talámico entrante o el estado general de cada área primaria a través del circuito recurrente local presente en cada una. Esta modulación podría representar estados generales o integrados de las distintas modalidades sensoriales. En relación con esto se han descrito diversas propiedades emergentes de los circuitos recurrentes que se ajustan a la organización descrita para el palio de aves. Específicamente se han señalado propiedades como: biestabilidad (selección de un estímulo según el estado de la red), *winner take all* y restauración de una señal, entre otras (Douglas & Martin, 2007). Este tipo de propiedades permitidas por esta organización palial podrían ser cruciales en el operar del palio amniota, para permitir estados generalizados de la sensorialidad del organismo.

Además esta organización permitiría una ejecución motora coherente con estos estados generales del sistema a través de las áreas motora del palio y de los ganglios basales. De este modo el palio podría mediar la plasticidad conductual.

La organización general del flujo senso/motor en el palio de aves y mamíferos (áreas modalidad específica, laminación, columnaridad y recurrencia) nos parece equivalente y pensamos que debió aparecer durante la evolución del telencéfalo de vertebrados en el linaje conducente a amniotas independientemente del resto de las radiaciones de vertebrados. Debido a la ancestría amniota común entre aves y mamíferos, y a que las estructuras paliales de ambas clases representan operaciones equivalentes, nos parece posible entender estas estructuras como un caso de verdadera homología. Volveremos sobre esto luego de revisar brevemente la organización del palio de las principales radiaciones de vertebrados.

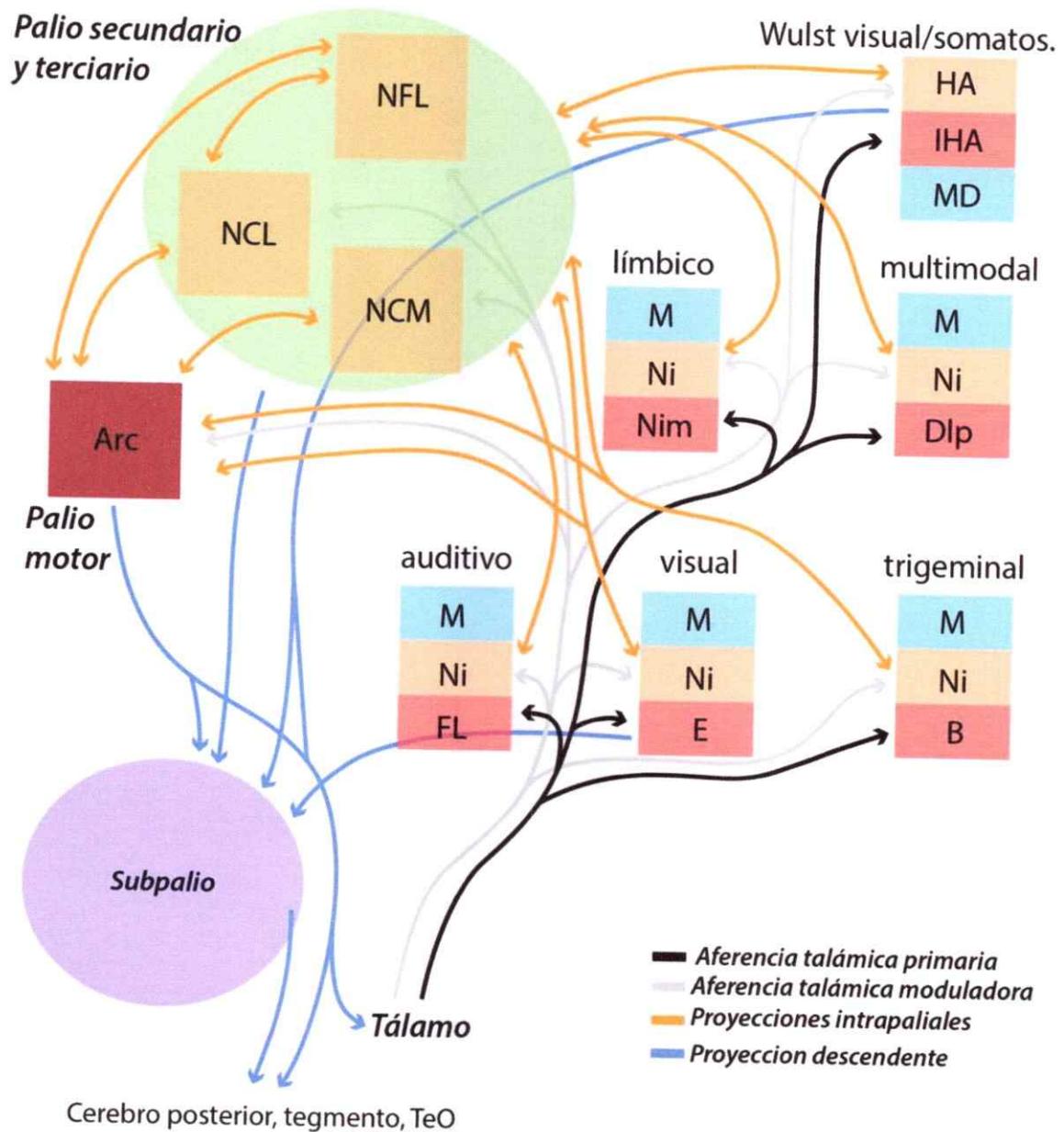


Figura 7-1. Esquema general de la organización del palio aviano. El esquema representa la organización en áreas modalidad específicas, trilaminadas, con circuitos locales, columnares y recurrentes del palio sensorial y su relación con áreas de segundo y tercer orden sensorial (integradoras) y áreas motoras del palio y subpalio.

El palio de vertebrados, elaboración independiente

Durante el curso evolutivo de vertebrados se puede observar un crecimiento y elaboración del cerebro de forma independiente en cada radiación principal de vertebrados (ciclóstomos, peces cartilagosos, peces de aleta radiada y tetrápodos). Debido a esto en cada radiación se encuentran: palios no migrados y poco desarrollados (grupo I), y palios elaborados de gran tamaño, con aumento de número neuronal y migración desde las zonas germinales (grupo II, **fig. 7-2**) (Northcutt, 1981; Butler & Hodos, 2005; Buttler, 2008).

En el telencéfalo de todas las radiaciones de vertebrados se puede distinguir un palio y un subpalio en base a criterios citoarquitectónicos, hodológicos y neuroquímicos (Reiner y col., 1998). En el palio, cada radiación presenta las divisiones paliales características de tetrápodos (medial, dorsal y latero/ventral).

En ciclóstomos se ha descrito en base a criterios hodológicos, un palio medial, dorsal y latero/ventral (Northcutt & Puzdrowski, 1988; Northcutt, 1995; Wicht & Northcutt, 1998; Northcutt & Wicht, 1997; Murakami y col., 2001). El palio ventro/lateral al igual que en todos los vertebrados se encuentra puntuado por la presencia de proyecciones olfativas secundarias. En lampreas tanto como mixinos se han descrito aferencias sensoriales provenientes desde el tálamo dorsal, ventral, pregomerular, y tubérculo posterior (Wicht & Northcutt, 1998), lo que indicaría la presencia de un

territorio equivalente al palio dorsal. Además, en lampreas se ha encontrado expresión en el palio, de un gen homólogo a Emx 1, un marcador característico del palio dorsal y lateral en tetrápodos (Murakami y col, 2001). A pesar de estas evidencias, en ciclóstomos no se distinguen áreas paliales especializadas en recibir aferencias talámicas como ocurre en amniotas (Wicht & Northcutt, 1998). Por último en lampreas se ha descrito una proyección motora, desde el palio hacia el tegmento motor y los ganglios basales. Esto ha llevado a un grupo de autores a proponer que el palio de lampreas representa un arquetipo del palio mamífero (Ocaña y col., 2015).

En elasmobranquios, se ha identificado que la porción lateral del palio recibe aferencias olfativas (Heimer, 1969; Ebbesson & Heimer 1970; Hofmann & Northcutt, 2012). Aferencias sensoriales visuales, somatosensoriales y electrosensoriales, provenientes desde el tálamo, pretectum y mesencéfalo se han descrito terminando sobre una estructura del palio dorsal llamada núcleo central (Hofmann & Northcutt, 2008). Aunque el detalle y ordenamiento de las proyecciones sensoriales es poco claro, se ha podido determinar un esbozo de parcelación en la proyección visual y trigeminal sobre el núcleo central (Ebbesson, 1980). En relación a las proyecciones descendentes hacia áreas motoras, se han encontrado proyecciones desde el palio sobre el núcleo lateral del mesencéfalo y los ganglios basales (área basalis; Hofmann & Northcutt, 2008).

En actinopterigios a pesar de la eversión del telencéfalo se ha propuesto la existencia de las mismas divisiones del palio que en tetrápodos (Nieuwenhuys, 2011). Como en el resto de vertebrados la aferencia olfativa define un palio latero/ventral. También se han reconocido aferencias sensoriales (visuales, octavolaterales, y gustativas) provenientes desde el complejo preglomerular del diencéfalo, terminando sobre la región del palio equivalente al palio dorsal y medial de amniotas (Ebbesson, 1980b; Finger, 1980; Echterler & Saidel, 1981; Ito & Vanegas, 1983; Yamamoto y col, 2007). Además, en algunas especies se ha descrito que las vías sensoriales ascendentes exhiben un grado de parcelación modalidad-específica considerable, además de proyecciones motoras que serían equivalentes a la proyección palio-tegmental de amniotes (Yamamoto y col., 2007; Yamamoto & Ito, 2008; Ito & Yamamoto, 2009).

Por último, en las especies vivientes de peces óseos de aleta lobulada y en anfibios, no se encuentran cerebros elaborados. A pesar de esto, la presencia de las cuatro divisiones paliales (medial, dorsal, latero/ventral) ha sido demostrada en anfibios, mediante el uso de marcadores moleculares (Brox y col. 2002, 2004). En anfibios un estudio reciente de Laberge & Roth (2007) sobre la organización del palio, ha indicado que las aferencias sensoriales que recibe esta región terminan principalmente en la división medial. En este trabajo se estableció también que las aferencias sensoriales al palio son de dos tipos: 1) olfativas sobre el palio latero/ventral; 2) desde el núcleo anterior del tálamo sobre el

pallio medial, donde además se registran respuestas multimodales. Esto se debe a que el pallio de anfibios recibe aferencias sensoriales superpuestas y no parceladas ni restringidas al pallio dorsal ni lateral.

Tomando en cuenta la organización del pallio en las principales radiaciones de vertebrados, una organización arquetípica de éste incluiría las siguientes características: 1) Presencia de al menos tres subdivisiones basándose en la topología, hodología y expresión génica: pallio ventro/lateral, dorsal y medial. 2) Aferencias olfativas secundarias restringidas al pallio ventro/lateral. 3) Aferencias sensoriales originadas en alguna de las divisiones del diencéfalo (tálamo dorsal, ventral, pretectum o complejo preglomerular) aferentando alguna de las divisiones paliales, sin restricción específica a alguna de ellas. 4) Superposición o integración de las modalidades sensoriales. 5) Proyecciones descendentes hacia los ganglios basales, regiones motoras del tegmento, cerebro posterior, presinápticas de centros generadores de patrones y tectum óptico.

Debido a que estas 5 características del pallio vertebrado se encuentran presentes en el pallio amniota, estos rasgos corresponderían a plesiomorfías, representando una organización palial primitiva, común y por lo tanto heredada por todas las radiaciones de vertebrados. A nuestro parecer esta organización refleja la operación central del pallio en el sistema nervioso de

vertebrados, que es integrar la interocepción y exterocepción del organismo, y en concomitancia con esto ejercer un efecto sobre la acción motora.

En amniotas además de los cinco rasgos del palio arquetípico propuestos, existen otros rasgos comunes no trazables directamente a otros linajes de vertebrados, indicando que debieron evolucionar independientemente en el ancestro amniota. Estos rasgos son: 1) Restricción del origen de la proyección tálamo-palial a núcleos del tálamo dorsal. 2) Localización de la aferencia talámica sensorial exclusivamente sobre el palio dorsal, lateral y ventral. 3) Parcelación del palio en áreas especializadas en una modalidad. 4) Organización de las áreas en estructuras laminadas. 5) Presencia de áreas de primer y segundo orden sensorial y áreas motoras. 6) Organización columnar y recurrente de los circuitos internos de las áreas sensoriales.

A nuestro entender y como se expuso previamente estos rasgos de la estructura palial amniota son fundamentales en el tratamiento del flujo ascendente, su integración y efecto sobre la acción motora. Además, según lo propuesto al comienzo de este trabajo nos parece que esta organización es fundamental en el desarrollo de un alto nivel de plasticidad conductual tanto en aves como mamíferos.

De los seis rasgos listados, los primeros cinco han sido descritos en el palio de aves, reptiles y mamíferos. Respecto al sexto es

menos clara la presencia de columnas en reptiles y esto requiere ser revisado a la brevedad.

De este modo la organización del palio aviano descrita y discutida en este trabajo correspondería a una verdadera homología, lo que significa que su organización y operación se encontraba presente en el ancestro común del linaje amniota. No obstante, diversos autores han indicado que una verdadera homología requiere que las estructuras comparadas sean embriológicamente equivalentes y que su desarrollo ocurra mediante mecanismos comparables. De esta forma la homología entre DVR y corteza continúa presentando diferencias que conciliar (Striedter, 1997; Aboitiz, 2010; Aboitiz & Zamorano, 2013). A continuación, revisaremos brevemente el problema embriológico y propondremos un posible mecanismo del desarrollo basado en observaciones preliminares.

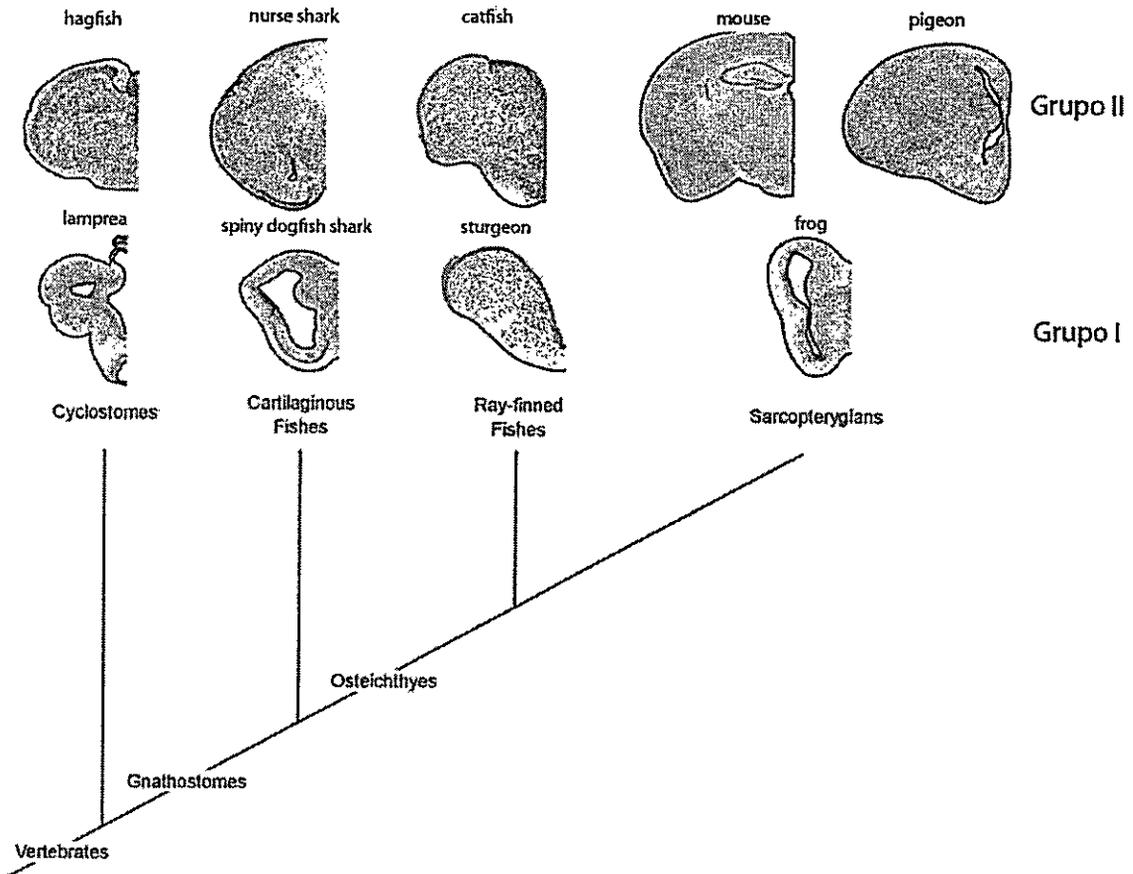


Figura 7-2. Organización telencefálica de algunas especies de vertebrados. La imagen muestra que ambas condiciones de organización telencefálica, no elaboradas (grupo I) y elaboradas (grupo II), se encuentran en miembros vivientes de las mayores radiaciones de vertebrados. Se presentan secciones transversales de telencéfalo. (Arriba/abajo) (1) Cyclostomos: hagfish (*Eptatretus stouti*)/lamprey (*Ichthyomyzon unicuspis*); (2) Elasmobranquios: nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*)/spiny dogfishshark (*Squalus acanthias*); (3) Peces de aleta radiada: catfish (*Ictalurus punctatus*)/sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*); (4) Sarcopterygios: mamífero (left, *Mus musculus*) y ave (*Columba livia*)/anfibio (*Rana catesbeiana*). Las fotos no se encuentran en la misma escala. Imagen tomada de Buttler (2008).

El problema de las equivalencias paliales

Al tomar en cuenta la similitud en organización del palio de aves y mamíferos, se ha sugerido la existencia de una homología entre ambas estructuras. No obstante esta similitud en la organización adulta, existen diferencias embriológicas que han sido usadas como argumento en contra de esta posibilidad.

Como se mencionó previamente el palio embrionario de amniotas puede ser dividido en cuatro segmentos transversales (medial, dorsal, lateral y ventral) que dan origen a estructuras funcional y estructuralmente relacionadas. Los derivados de cada región en las diferentes clases de amniotas se muestran en la **figura 7-3**. Como se indica en esta figura, la división medial da origen en mamíferos, aves y reptiles a estructuras hipocampales ampliamente aceptadas como homólogas (Striedter, 2016). La región dorsal del palio de mamíferos da origen a la neocorteza, en aves a partir de esta división se forma una estructura llamada wulst o hiperpalio y en reptiles corteza dorsal (Smith-Fernández y col., 1998; Puelles y col., 2000; Buttler & Hodos, 2005). Todas estas regiones se encuentran laminadas en algún grado y al igual que para el palio medial, se acepta una homología entre estas regiones por tres motivos: en primer lugar, porque no cabe duda que se originan a partir de precursores neuronales posicionados en lugares topológicamente equivalentes de la zona ventricular (dorsal); segundo, debido a que los precursores de estas regiones expresan una misma combinación de genes homeóticos, que según se ha

propuesto, definen posiciones relativas dentro del cerebro y determinan el potencial morfogénico de las neuronas que los expresan (Rubenstein y col., 1994, Carroll, 1995). En tercer lugar, por una semejanza en la organización interna de estas regiones y en las relaciones que sostienen con áreas sensoriales y motoras del resto del cerebro (Medina & Reiner, 2000).

Las parcelas lateral y ventral en mamíferos dan origen principalmente al claustró, corteza piriforme (palio lateral) y al complejo amigdalario (palio ventral). En aves la parcela latero/ventral da origen al DVR, compuesto por el mesopalio (origen lateral) y nidopalio (origen ventral). En reptiles se observa un DVR igualmente conspicuo que en aves, aunque no siempre se distingue con claridad un mesopalio y un nidopalio.

El problema central de la equivalencia de territorios paliales de amniotas radica en la incongruencia entre la equivalencia funcional y embriológica del DVR y corteza. Como se dijo, el DVR y el complejo claustró-amigdalario se originan a partir desde precursores latero/ventrales (Striedter y col., 1998; Puelles y col., 2000). No obstante esto, las relaciones que establecen ambas regiones con el resto del cerebro son completamente distintas. El DVR por una parte recibe aferencias sensoriales masivas desde el tálamo dorsal, con un patrón muy similar al observado en la corteza (palio dorsal) de mamíferos. Por otra parte, el complejo claustró-amigdalario presenta una hodología completamente distinta, de origen

olfativo e hipocampal. Además, aunque el complejo claustró-amigdalár recibe algunas aferencias talámicas, estas son de una naturaleza diferente a las que recibe el DVR sensorial (Swanson & Petrovich, 1998).

Debido a la homología de las vías sensoriales ascendentes que terminan sobre el DVR y la corteza, Harvey Karten (1969) propuso que el DVR poseía elementos celulares que formarían circuitos equivalentes a los encontrados entre las láminas de la corteza (aunque organizados en núcleos) y por lo tanto DVR y corteza, serían estructuras homólogas.

No obstante, otra escuela de neuroanatomía ha mantenido una visión opuesta a esta hipótesis. Basándose en la diferencia embriológica entre DVR y corteza, estos autores han propuesto que el DVR de saurópsidos correspondería a una expansión del territorio claustró-amigdalár de mamíferos (Striedter 1997; Striedter y col., 1998; Puelles y col., 2000; Puelles 2001).

Tomando en cuenta el trabajo experimental y bibliográfico realizado durante el desarrollo de esta tesis, nos gustaría realizar algunos comentarios, observaciones y propuestas en relación a esta disputa.

Primero, al revisar la literatura del desarrollo de los territorios paliales en amniotes nos encontramos con que no puede realizarse una distinción molecular temprana entre el palio dorsal y lateral. Las diferencias entre los derivados de estas parcelas, pueden

notarse en estadios intermedios y tardíos del desarrollo, basándose en un patrón citoarquitectónico, hodológico y en algunos casos de expresión molecular. Solo de esa forma se puede distinguir en mamíferos el complejo claustró-amigdalar y un equivalente (hodológico y molecular) en el DVR de aves. Al hacer esto, las regiones del DVR equivalente con el complejo claustró-amigdalar corresponden a regiones restringidas y perfectamente identificables del DVR caudal (revisar a Medina y col., 2011, respecto a la genoarquitectura de la amígdala; Reiner & Karten, 1985, en relación a las proyecciones olfativas de aves y reptiles).

Segundo, el DVR anterior o sensorial, que corresponde a las regiones estudiadas en este trabajo y a la mayor parte del DVR, deriva de precursores en el epitelio dorso/lateral (mesopalio) y ventral (nidopalio). El epitelio ventral -a diferencia del límite entre epitelio dorsal y lateral- es reconocible mediante marcadores moleculares tempranos. Sin embargo, los derivados laterales del DVR sensorial no pueden ser designados como palio lateral, ya que (como se dijo en el punto anterior) no pueden distinguirse de los derivados dorsales mediante marcadores moleculares y solo por su hodología adulta característica. Justamente el DVR descrito anatómicamente en este trabajo posee patrones hodológicos equivalentes al palio dorsal de mamíferos (corteza) por lo tanto pensamos que los derivados dorso/laterales del DVR (mesopalio) serían equivalentes embriológicamente a la corteza.

Tercero, en la corteza de mamíferos se ha descrito una población de neuronas glutamatérgicas transitorias, migradas de manera tangencial desde el epitelio ventral. Esta población alcanza su máximo número al momento del nacimiento, representando un 5% del total de las células corticales (neuronas y glías), y disminuye a un quinto en adultos (Teissier y col., 2010). Además, pareciera que esta población modula la proliferación neuronal, llevando a una disminución de 20-40% de neuronas en las láminas superficiales después de una ablación molecular (Teissier y col., 2012). De esta forma la corteza de mamíferos en estadios tempranos del desarrollo se compone de poblaciones originadas principalmente en el epitelio dorso/lateral (indistinguible molecularmente) y de una población originada en el epitelio ventral, del mismo modo que el DVR de aves.

Cuarto, aunque los estudios de migración neuronal en aves son escasos, algunos antecedentes preliminares nos indican que parte de las neuronas del nidopallio sensorial del DVR, se originan en el epitelio dorso/lateral desde donde proliferan las neuronas mesopalliales. Esto sugiere que estas neuronas podrían ser Emx-1 positivas igual que las neuronas hiperpalliales y corticales. Esto es una posible explicación a las descripciones recientes que indican que los núcleos sensoriales del DVR expresan marcadores característicos de lámina 4 y sugiere un origen embrionario equivalente para algunas neuronas del DVR y corteza (fig. 7-4).

Quinto, independientemente de la posible equivalencia de precursores neuronales en el DVR y corteza, es evidente que ambas estructuras poseen rasgos estructurales que las diferencian. Esto indica que ambas estructuras presentan mecanismos del desarrollo que difieren. Ante esto pensamos que estas diferencias se deben a historias evolutivas distintas, que ha llevado que durante el desarrollo del palio dorsal de mamíferos, se utilicen mecanismos asociados al desarrollo de las estructuras laminadas olfativas, sistema que por lo demás se encuentra tremendamente activo en los estadios postnatales en que la corteza aún no termina por diferenciarse. Por otra parte, en aves el desarrollo exacerbado del sistema visual y una pérdida del olfato como sistema sensorial relevante en estadios tempranos, podría ser una explicación del establecimiento de mecanismos distintos en el periodo en que se desarrolla el DVR. Un argumento a favor de esto es que en reptiles se puede encontrar especies con palio laminados completamente desde el palio medial (hipocampo) hasta el ventral (DVR), como el caso del *Sphenodon* (Reiner & Northcutt, 2000) y algunas tortugas, lo cual indica que un DVR laminado existió en algún punto de la evolución amniota.

Otro aspecto importante a considerar es que las aferencias sensoriales en aves invaden el DVR tan tempranamente como estadios E12 (Guirado y col., 2005). Mientras que en mamíferos si bien las aferencias arriban en estadios desde E15 a E18, éstas no aferentan

a sus neuronas blanco definitivas hasta la primera semana posnatal (López-Bendito & Molnar, 2003; Jabaudon y col., 2012).

Sexto, a pesar de la diferencia estructural presentada entre DVR y corteza, nos parece que estas estructuras serían homólogas. Según la evidencia, las diferencias entre ambas estructuras paliales se debe a cambios de mecanismos del desarrollo o momentos de la ontogenia en que los procesos ocurren, lo cual no determina la operación (o función) en que está involucrado el palio amniota (Striedter & Northcutt, 1991; Faunes y col., 2015). Según nuestro entendimiento esta operación corresponde al modo de coordinar la actividad sensorial y motora de organismo, único en amniotas, que se resume en las 6 similitudes estructurales del palio amniota descritas antes. Por último, cabe recalcar la proposición de un patrón estructural que permite la plasticidad conductual en amniotas. Justamente nos parece que esta conducta distinguible, empuja la conservación de esta organización de manera activa en este clado. De este modo la conservación de una organización del palio permitiría un alto grado de plasticidad conductual, independiente de la existencia de cambios en los mecanismos generadores o como se ha dicho en la literatura, cambios en niveles basales de la jerarquía orgánica.

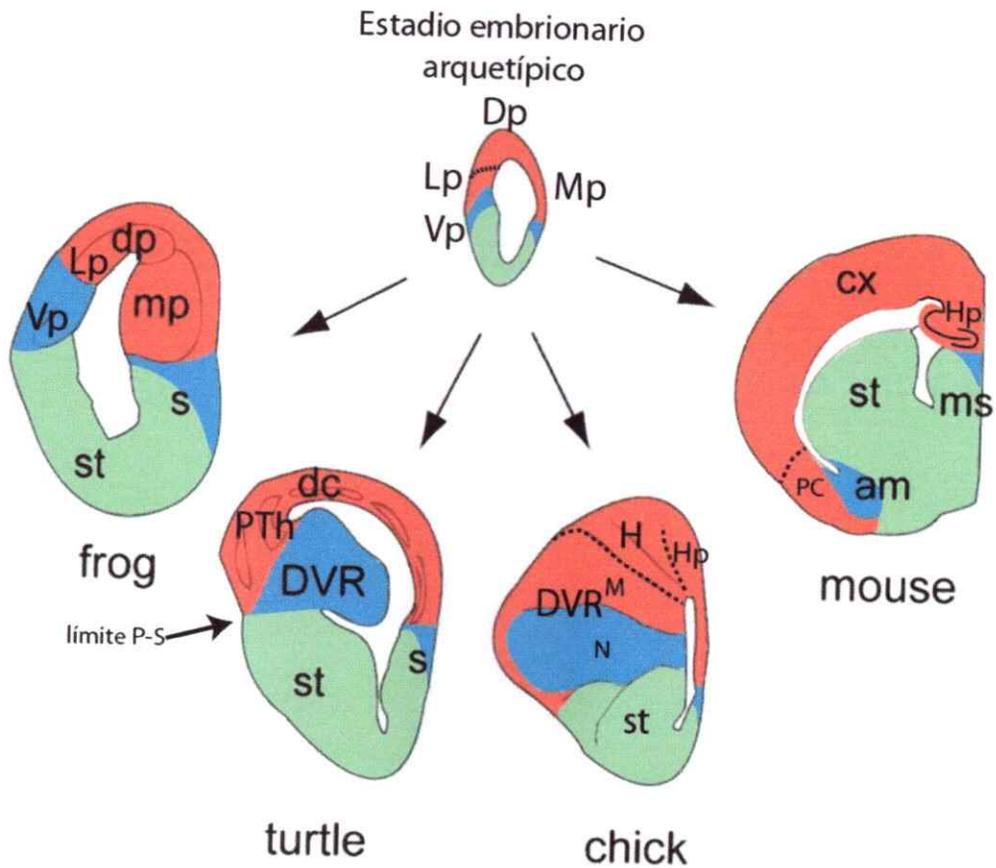


Figura 7-3. Esquema representativo de las divisiones paliales y sus derivados en el palio de tetrápodos. Esquemas de las estructuras derivadas desde los segmentos: medial (Mp), dorsal (Dp), lateral (Lp) y ventral (Vp) del epitelio germinativo palial en amniotas. Abreviatura: am, complejo amigdalár; CX, corteza; dc, dorsal cortex; H, hiperpalio; Hp, hipocampo; M, mesopalio; ms, septum medial; N, nidopalio; P-S, límite palio subpalial; PTh, *Palial thickening*; S, septum; St, estriado. Imagen modificada desde Fernández-Smith y col., (1998).

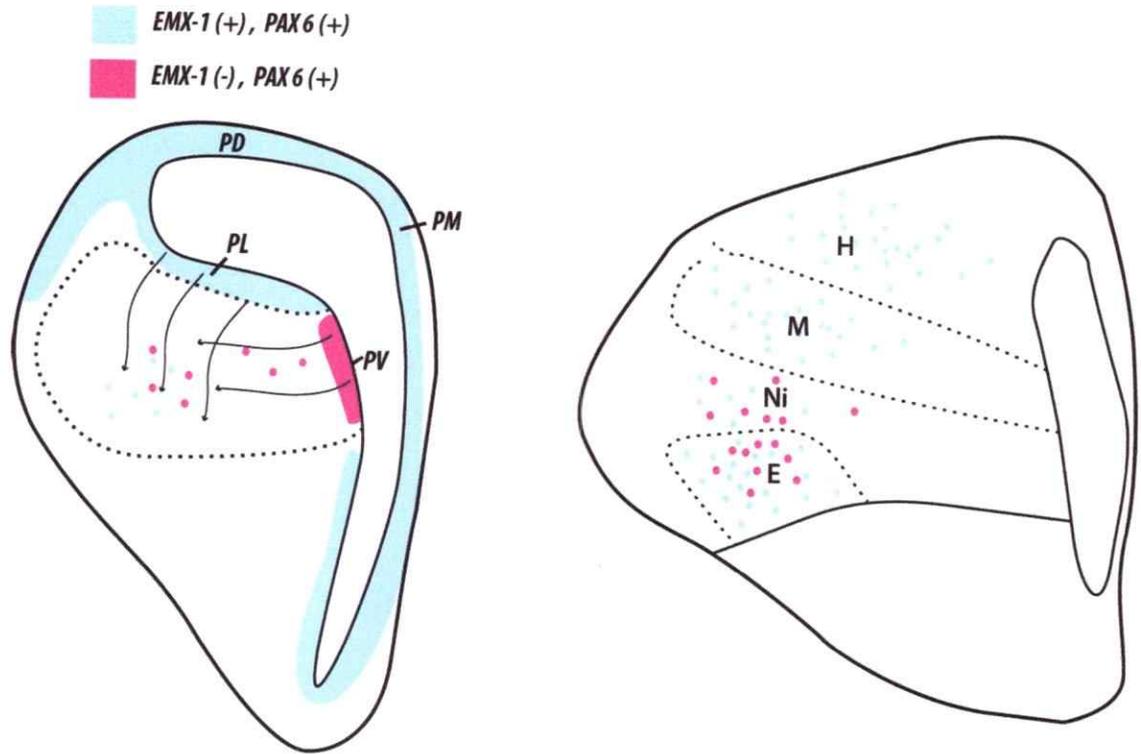


Figura 7-4. Esquema propositivo del desarrollo del palio aviano. A la izquierda se muestra un estadio temprano de desarrollo (E7) y a la derecha uno tardío (E14). En nuestra propuesta se indica que el DVR se compondría por una mezcla de neuronas derivadas de precursores del epitelio dorso/lateral (EMX positivo) que poblarían en estadios tempranos el nidopalio, y por derivados tardíos que poblarían el mesopalio (las neuronas mesopaliales son emx positivas según Smith-Fernández y col. (1998) y Puelles y col., (2000)).

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. La evidencia experimental presentada en este trabajo es un aporte para el entendimiento más completo de la organización del palio de las aves.
2. Los antecedentes presentados sostienen en su conjunto, que el colopalio visual de las aves se organiza de manera modular, laminar, columnar y recurrente.
3. La evidencia presentada y su interpretación en el contexto de la organización del palio aviano, estrecha las similitudes estructurales y operacionales entre el DVR de aves y la corteza de mamíferos.
4. Dada la semejanza en la organización del palio de aves y mamíferos, se sugiere que ambas estructuras serían homólogas.

REFERENCIAS

- Aboitiz F. 1996. Does big means better? Evolutionary determinants of brain size and structure. *Brain Behav Evol.* 47:225-245.
- Aboitiz F., Zamorano F. 2013. Neural progenitors, patterning and ecology in neocortical origin. *Frontiers in Neuroanatomy.* 7:2-15.
- Aboitiz F. 2010. A developmental approach to homology and brain evolution. *Revista Chilena de Historia Natural.* 83:469-477.
- Ahumada-Galleguillos P. 2012. Estudio del sistema colotalámico en aves: organización anatómica del nidopalio y su relación con el mesopalio. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Ahumada P., Tapia S., Fernández M., Letelier J.C., Marín G., Mpodozis J. 2012. Modular recurrent circuits in the avian visual collopallium. Program 895.04, Neuroscience Meeting Planner, New Orleans, LA, Society for Neuroscience Online.
- 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
- Alpár A., Tömböl T. 2000. Efferent connections of the ectostriatal core. An anterograde tracer study. *Annals of Anatomy.* 182:101-110.
- Atoji Y., Wild M. 2005. Afferent and efferent connections of the dorsolateral corticoid area and a comparison with connections of the temporo-parieto-occipital area in the pigeon (*Columba Livia*). *J Comp Neurol.* 485:165-182.
- Atoji Y., Wild M. 2009. Afferent and efferent projections of the centralcaudal nidopallium in the pigeon (*Columba Livia*). *J Comp Neurol.* 517:350-370.
- Atoji Y., Karim M. 2012: Expression of the neocortical marker, *ROR β* , in the entopallium and field L2 of adult chicken. *Neuroscience Letters.* 521:119-124.
- Atoji Y., Wild M. 2012. Afferent and efferent projections of the mesopallium in the pigeon (*Columba Livia*). *J Comp Neurol.* 520:717-741.

- Auersperg A., Szabo B., von Bayern A., Kacelnik A. 2012. Spontaneous innovation in tool manufacture and use in a Goffin's cockatoo. *Curr Biol.* 22:903-904.
- Baron G. 2007. Encephalization: Comparative studies of brain size and structure volume in mammals. En: Kaas J, Krubitzer L (eds). Evolution of nervous system. A comprehensive review, vol 3, Mammals. Academic (Elsevier), Amsterdam, Oxford, pp 125-136.
- Benowitz L., Karten H. 1976. Organization of the tectofugal pathway in the pigeon: a retrograde transport study. *J Comp Neurol.* 167:503-520.
- Briggs F. 2010. Organization principles of cortical layer 6. *Frontiers in neural circuits.* 4:1-8.
- Brox A., Ferreiro B., Puelles L., Medina L. 2002. The telencephalon of the frog *Xenopus* based on calretinin immunostaining and gene expression patterns. *Brain research bulletin,* 57:381-384.
- Brox A., Puelles L., Ferreiro B., Medina L. 2004. Expression of the genes *Emx1*, *Tbr1*, and *Eomes (Tbr2)* in the telencephalon of *Xenopus laevis* confirms the existence of a ventral pallial division in all tetrapods. *J Comp Neurol.* 474:562-577.
- Buttler A. 1994. The evolution of the dorsal thalamus of jawed vertebrates, including mammals: cladistic analysis and a new hypothesis. *Brain research reviews.* 19:29-65.
- Buttler A., Hodos W. 2005. Comparative vertebrate neuroanatomy. John Wiley & Sons, Inc., Publication. New Jersey, USA.
- Buttler A. 2008. Evolution of the thalamus: a morphological and functional review. *Thalamus and related systems.* 4:35-58.
- Carroll S.B. 1995. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature.* 376:479-485.
- Chen Ch., Winkler C., Pfenning A., Jarvis E. 2013. Molecular Profiling of the Developing Avian Telencephalon: Regional Timing and Brain Subdivision Continuities. *J Comp Neurol.* 521:3666-3701.
- Chittaka L., Niven J. 2009. Are bigger brain better? *Curr Biol.* 19:995-1008.
- Csillag A., Bourne R., Patel S., Stewart M., Tömböl T. 1989. Localization of GABA-like immunoreactivity in the ectostriatum of domestic chicks: GABA immunocytochemistry combined with Golgi impregnation. *Journal of Neurocytology.* 18:369-379.

- Csillag A. 1991. Large GABA cells of chick ectostriatum: anatomical evidence suggesting a double GABAergic disinhibitory mechanism. An electron microscopic immunocytochemical study. *Journal of Neurocytology*. 20:518-528.
- Csillag A., Montagnese C. 2005. Thalamotelencephalic organization in birds. *Brain Research Bulletin*. 66:303-310.
- Da Costa N.M. & Martin K.A. 2010. Whose cortical column would that be? *Frontiers in neuroanatomy*. 4:1-10.
- De Brito L., Brunelli M., Francesconi W., Magni F. 1975. Visual response pattern of thalamic neurons in the pigeon. *Brain research*. 97:337-343.
- DeFelipe J., Conley M., Jones E. 1986. Long-range focal collateralization of axons arising from corticocortical cells in monkey sensory-motor cortex. *The journal of neuroscience*. 6:3749-3765.
- Dugas-Ford J., Rowell J., Ragsdale C. 2012. Cell-type homologies and the origins of the neocortex. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 109:16974-16979.
- Douglas R., Martin K., Whitteridge D. 1989. A Canonical microcircuit for neocortex. *Neural computation*. 1:480-488.
- Douglas R., Martin K. 2004. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci*. 27:419-451.
- Douglas R.A. & Martin K.A. 2007. Recurrent neuronal circuits in the neocortex. *Curr Biol*. 13:496-500.
- Dubbeldam J., Brauch Ch., Don A. 1981. Studies on the somatotopy of the trigeminal system in the mallard, *anas platyrhynchos* L. III. Afferents and organization of the nucleus Basalis. *J Comp Neurol*. 196:391-405.
- Dubbledam J.L. 1998. Birds. En: Nieuwenhuys R., Ten Donkelaar H.J., Nicholson C., editores. pp. 1525-1636. Springer, Berlin, Alemania.
- Ebbesson S., Heimer L. 1970. Projections of the olfactory tract fibers in the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). *Brain research*. 17: 47-55.
- Ebbesson S. 1980. On the organization of the telencephalon in elasmobranchs. En: *Comparative Neurology of the Telencephalon* (Ebbesson SOE, ed), pp 1-16. Plenum Press, New York, USA.

Ebbesson S. 1980b. A visual thalamo-telencephalic pathway in a teleost fish (*Holocentrus rufus*). Cell tissue research. 213:505-508.

Echteler S., Saidel W. 1981. Forebrain connections in the goldfish support telencephalic homologies with land vertebrates. Science. 212:683-685.

Egedi Gy., Tömböl T. 1994. EM Study on Terminals Labelled by Phaseolus Vulgaris Lectin in Ectostriatum Periphericum and Neostriatum Intermedium. Journal of brain research. 35:405-414.

Emery N., Clayton N. 2004. The mentality of crows: convergent evolution of intelligence in corvids and apes. Science. 306:1903-1907.

Engelage J., Bischof H. 1989. Flash evoked potentials in the ectostriatum of the zebra finch: a current source-density analysis. Experimental Brain Research. 74:563-542.

Faunes M., Botelho J. Ahumada-Galleguillos P., Mpodozis J. 2015. On the hodological criterion for homology. Frontiers in Neuroscience. 9:233.

Finger T. 1980. Nonolfactory sensory pathway to the telencephalon in a Teleost fish. Science. 210:671-673.

Fredes F., Tapia S., Letelier J.C., Marín G., Mpodozis. 2010. Topographic arrangement of the rotundo-entopallial projection in the pigeon (*Columba livia*). J Comp Neurol. 518:4342-4361.

Fredes F., Vega-Zuniga T., Karten H., Mpodozis J. 2012. Bilateral and ipsilateral ascending tectopulvinar pathways in mammals: A study in the squirrel (*Spermophilus beecheyi*). J Comp Neurol. 520:1800-1818.

Gajdon G., Fijn N., Huber L. 2004. Testing social learning in a wild mountain parrot the kea (*Nestor notabilis*). Learning & Behavior. 32:62-71.

Gamlin P., Cohen D. 1986. A second ascending visual pathway from the optic tectum to the telencephalon in the pigeon (*Columba Livia*). J Comp Neurol. 250:296-310.

Gu Y., Wang Y., Zhang T., Wang Sh. 2002. Stimulus size selectivity and receptive field organization of ectostriatal neurons in the pigeon. Journal of Comparative Physiology A. 188:173-178.



- Guirado S., Real M., Dávila J. 2005. The ascending tectofugal visual system in amniotes: New insights. *Brain research bulletin*. 66:290-296.
- Haider B., Duque A., Hasenstaub A., Yu Y., McCormick D. 2007. Enhancement of visual responsiveness by spontaneous local network activity in vivo. *Journal of Neurophysiology*. 97:4186-4202.
- Hasenstaub A., Sachdev R., McCormick D. 2007. State changes rapidly modulate cortical neuronal responsiveness. *Journal of Neuroscience*. 27:9607-9622.
- Hashikawa T., Rausell E., Molinari M., Jones E. 1991. Parvalbumin- and calbindin-containing neurons in the monkey medial geniculate complex: differential distribution and cortical layer specific projections. *Brain Research*. 544:335-341.
- 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.
- Heimer L. 1969. The secondary olfactory connections in mammals, reptiles and sharks. *Annals New York Academy of Science*. 167: 129-146.
- Herrick C.J. 1924. *Neurological foundations of animal behavior*. Henry Holt & co., New York, USA.
- Hihara S., Obayashi S., Tanaka M., Iriki A. 2003. Rapid learning of sequential tool use by macaque monkeys. *Physiol Behav*. 78:427-434.
- Hofmann M., Northcutt R. 2008. Organization of Major Telencephalic Pathways in an Elasmobranch, the Thornback Ray *Platyrrhinoidis triseriata*. *Brain Behav Evol*. 72:307-325.
- Hofmann M., Northcutt R. 2012. Forebrain Organization in Elasmobranchs. *Brain Behav Evol*. 80:142-151.
- Holmgren, N. 1925. Points of view concerning forebrain morphology in higher vertebrates. *Acta zoologica*. 414-459.
- Horton J., Adams D. 2005. The cortical column: a structure without a function. *Phil Trans R Soc B*. 360:837-862.
- Hunt G. 1996. Manufacture and use of hook-tools by New Caledonian crows. *Nature*. 379:249-251.

- Hunt G., Gray R. 2004. The crafting of hook tools by wild New Caledonian crows. *Proceedings of the Royal Society B*. 271:88-90.
- Huber L., Rechberger S., Taborsky M. 2001. Social learning affects object exploration and manipulation in keas, *Nestor notabilis*. *Animal Behaviour*. 62:945-954.
- Husband S., Shimizu T. 1999. Efferent projections of the ectostriatum in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*. 406:329-345.
- Ito H., Vanegas H. 1983. Cytoarchitecture and ultrastructure of nucleus prethalamicus, with special reference to degenerating afferents from optic tectum and telencephalon, in a teleost (*Holocentrus ascensionis*). *J Comp Neurol*. 221: 401-415.
- Ito H., Yamamoto N. 2009. Non-laminar cerebral cortex in teleost fishes? *Biology Letters*. 5:117-121.
- Jabaudon D., Shnyder S., Tischfield D., Galazo M., Macklis J. 2012. ROR β induces barrel-like neuronal clusters in the developing neocortex. *Cerebral Cortex*. 22:996-1006.
- Jarvis E.D. 2004. Learned birdsong and the neurobiology of human language. *Ann N Y Acad Sci*. 1016:749-777.
- Jarvis E., Yu J., Rivas M., Horita H., Feenders G., Whitney O., Jarvis S., Jarvis E., Kubikova L., Puck A., Siang-Bakshi C., Martin S., McElroy M., Hara E., Howard J., Pfenning A., Mouritsen H., Chen Ch., Wada K. 2013. Global view of the functional molecular organization of the avian cerebrum: mirror images and functional columns. *J Comp Neurol*. 521:3614-3665.
- Jerison H.J. 1973. *Evolution of the brain and intelligence*. Academic Press, New York, USA.
- Jones E.G. 1985. *The Thalamus*. Plenum Press, New York, USA.
- Jones E.G. 1986. Connectivity of the primate sensory-motor cortex. In: Jones EG, Peters A. (eds.) *Sensory-motor areas and aspects of cortical connectivity*. pp 113-184, *Cerebral cortex*, vol 5. Plenum, New York, USA.
- Jones E.G. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends in Neuroscience*. 24:595-601.

- Kappers A., Huber C., Crosby E. 1936. Comparative anatomy of the nervous system of vertebrate, including man. Reprinted 1960, Hafner, New York, USA.
- Karten H.J. 1968. The ascending auditory pathway in the pigeon (*Columba livia*).II. Telencephalic projections of the nucleus ovoidalis thalami. Brain Research. 11:134-153.
- Karten H.J. 1969. The organization of the avian telencephalon and some speculation on the phylogeny of the amniote telencephalon. Annals New York Academy of Science. 167:164-179.
- Karten H., Hodos W. 1967. A stereotaxic atlas of pigeon brain (*Columba livia*). Baltimore: The Johns Hopkins Press.
- Karten H., Hodos W. 1970. Telencephalic projections of the nucleus rotundus in the pigeon (*Columba livia*). J Comp Neurol. 140:35-51.
- Karten H., Hodos W., Nauta W., Revzin A. 1973. Neural connections of the 'visual Wulst' of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon (*Columba livia*) and owl (*Speotyto cunicularia*). J Comp Neurol. 150:253-278.
- Karten H., Cox K., Mpodozis J. 1997. Two distinct populations of tectal neurons have unique connections within the tectorotundal pathway of the pigeon (*Columba livia*). J Comp Neurol. 387:449-465.
- Khibnik L., Tritsch N., Sabatini B. 2014. A Direct Projection from Mouse Primary Visual Cortex to Dorsomedial Striatum. Plos One. 9:1-7.
- Kitt C., Brauth S. 1982. A paleostriatal-thalamic-telencephalic path in pigeons. Neuroscience. 7(11):2735-2751.
- Kitt C., Brauth S. 1986. Telencephalic projections from midbrain and isthmal cell groups in the pigeon. II. The nigral complex. J Comp Neurol. 247:92-110.
- Korzeniewska E., Güntürkün O. 1990. Sensory Properties and afferents of the N. Dorsolateralis posterior thalami of the pigeon. J Comp Neurol. 292:457-479.
- Kröner S., Güntürkün O. 1999. Afferent and efferent connections of the caudolateral neostriatum in the pigeon (*Columba livia*): A Retro- and Anterograde Pathway Tracing Study. J Comp Neurol. 407:228-260.

- Krützfeldt N., Wild M. (2005). Definition and novel connections of the entopallium in the pigeon (*Columba Livia*). *J Comp Neurol.* 490:40-56.
- Laberge F., Roth G. 2007. Organization of the sensory input to the telencephalon in the fire-bellied toad, *Bombina orientalis*. *J Comp Neurol.* 502:55-74.
- Lefebvre L., Whittle P., Lascaris E., Finkelstein A. 1997. Feeding innovations and forebrain size in birds. *Animal Behavior.* 53:549-560.
- Lefebvre L., Nicolakakis, N. & Boire, D. 2002 Tools and brains in birds. *Behavior.* 139, 939-973
- Letelier J.C., Mpodozis J., Marin G., Morales D., Rozas C., Madrid., Velasco M. 2000. Spatiotemporal profile of synaptic activation produced by electrical and visual stimulation of retinal inputs to the optic tectum: a current source density analysis in the pigeon (*Columba livia*). *European journal of neuroscience.* 12:47-57.
- López-Bendito G., Zoltán M. 2003. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nature Reviews.* 4:276-289.
- Lorente de Nó R. 1949. Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. En: *Physiology of the nervous system.* J. Fulton editores. pp. 288-330. Oxford University Press, New York, USA.
- Lübke J., Egger V., Sakmann B., Feldmeyer D. 2000. Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *Journal of Neuroscience.* 20:5300-5311.
- Lübke J., Roth A., Feldmeyer D., Sakmann B. 2003. Morphometric Analysis of the Columnar Innervation Domain of Neurons Connecting Layer 4 and Layer 2/3 of Juvenile Rat Barrel Cortex. *Cerebral Cortex.* 13:1051-1063.
- Luksch H., Cox K., Karten H. 1998. Bottlebrush dendritic endings and large dendritic fields: motion-detecting neurons in the tectofugal pathway. *J Comp Neurol.* 396:399-414.
- Luksch H., Karten H., Kleinfeld D., Wessel R. 2001. Chattering and differential signal processing in identified motion-sensitive

neurons of parallel visual pathways in the chick tectum. *The Journal of Neuroscience*. 21:6440-6446.

Lund J. 1986. Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (*Macaca Mulata*). *J Comp Neurol*. 147:455-495.

Lund J., Angelucci A., Bressloff P. 2003. Anatomical substrates for functional columns in macaque monkey primary visual cortex. *Cerebral Cortex*. 13:15-24.

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

Marín G., Durán E., Morales C., González-Cabrera C., Sentis E., Mpodozis J., Letelier J.C. 2012. Attentional Capture? Synchronized Feedback Signals from the Isthmi Boost Retinal Signals to Higher Visual Areas. *The Journal of Neuroscience*. 32:1110-1122.

Martinez-de-la-Torre M., Martinez S., Puelles L. 1990. Acetylcholinesterase histochemical differential staining of subdivisions within nucleus rotundus in the chick. *Anat Embryol*. 181(2):129-135.

McDonald A. 1992. Neuroanatomical labeling with biocytin: a review. *NeuroReport*. 3:821-827.

McFarland N., Haber S. 2000. Convergent Inputs from Thalamic Motor Nuclei and Frontal Cortical Areas to the Dorsal Striatum in the Primate. *The Journal of Neuroscience*. 20:3798-3813.

Medina L., Reiner A. 2000. Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? *Trends in Neuroscience*. 23:1-12.

Medina L., Bupesh M., Abellán A. 2011. Contribution of geno-architecture to understanding forebrain evolution and development, with particular emphasis on the amygdala. *Brain Behav Evol*. 3:216-236.

Mehlhorn J., Hunt G., Gray R., Rehkämper G., Güntürkün O. 2010. Tool-making New Caledonian crows have large associative brain areas. *Brain Behav Evol*. 75:63-70.

Metzger M., Jiang S., Braun K. 1998. Organization of the dorsocaudal neostriatal complex: a retrograde and anterograde

tracing study in the domestic chick with special emphasis on pathways relevant to imprinting. *J Comp Neurol.* 395:380-404.

Mitzdorf U., Singer W. 1978. Prominent excitatory pathways in the cat visual cortex (A 17 and A 18): A current source density analysis of electrically evoked potentials. *Experimental brain research.* 33:371-394.

Mitzdorf U. 1985. Current source-density method and application in cat cerebral cortex: Investigation of evoked potentials and eeg phenomena. *Physiological reviews.* 65:37-100.

Montagnese C., Mezey S., Csillag A. 2003. Efferent connections of the dorsomedial thalamic nuclei of the domestic chick (*Gallus domesticus*). *J Comp Neurol.* 459:301-326.

Mountcastle V., Berman A., Davies P. 1955. Topographic organization and modality representation in first somatic area of cat's cerebral cortex by method of single unit analysis. *American Journal of Physiology.* 183:646.

Mountcastle V. 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neurophysiology.* 20:408-434.

Mpodozis J., Cox K., Shimizu T., Bischof H.J., Woodson W., Karten HJ. 1996. GABAergic inputs to the nucleus rotundus (pulvinar inferior) of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 374:204-222.

Mpodozis J., Letelier J.C., Concha M., Maturana H. 1995. Conduction velocity groups in the retino-tectal and the retino-thalamic pathways of the pigeon (*Columba livia*). *International Journal of Neuroscience.* 81:123-126.

Mulcahy N., Call J., Dunbar R. (2005). Gorillas (*Gorilla gorilla*) and orangutans (*Pongo pygmaeus*) encode relevant problem features in a tool-using task. *J Comp Psychol.* 119:23-32.

Murakami Y., Ogasawara M., Sugahara F., Hirano Sh., Satoh N., Kuratani Sh. 2001. Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development.* 128:3521-3531.

Neske G., Patrick S., Connors B. 2015. Contributions of diverse excitatory and inhibitory neurons to recurrent network activity in cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience.* 35:1089-1105.

- Nguyen A., Spetch M., Crowder N., Winship I., Hurd P., Wylie D. 2004. A dissociation of motion and spatial-pattern vision in the avian telencephalon: implications for the evolution of "visual streams". *The Journal of Neuroscience*. 24:4962-4970.
- Nicholson C., Freeman J. 1975. Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *Journal of Neurophysiology*. 38:356-368.
- Nieuwenhuys R. 2011. The development and general morphology of the telencephalon of actinopterygian fishes: synopsis, documentation and commentary. *Brain Structure and Function*. 215:141-157.
- Nieuwenhuys R., Donkelaar T., Nicholson C. 1998. *The central nervous system of vertebrates*. Springer, Berlin, Alemania.
- Nixdorf BE, Bishof HJ. 1982. Afferent connection of the ectostriatum and visual wulfs in the zebra finch (*Taenopygia guttata castonotis Gould*): an HRP study. *Brain Research*. 248:9-17.
- Northcutt R. 1981. Evolution of the telencephalon in nonmammals. *Annual Review of Neuroscience*. 4:301-350.
- Northcutt R., Puzdrowski R. 1988. Projections of the olfactory bulb and the nervus terminalis in the Silver lamprey. *Brain Behav Evol*. 32:96-107.
- Northcutt R.G. 1995. The forebrain of gnathostomes: In search of a morphotype. *Brain Behav Evol*. 46:275-318.
- Northcutt R., Wicht H. 1997. Afferent and efferent connections of the lateral and medial pallia of the Silver lamprey. *Brain Behav Evol*. 49:1-19.
- Ocaña F., Suryanarayana Sh., Saitoh K., Kardamakis A., Capantini L., Robertson B., Grillner S. 2015. The Lamprey Pallium Provides a Blueprint of the Mammalian Motor Projections from Cortex. *Curr Biol*. 25:413-423.
- Oswald M., Tantirigama M., Sonntag I., Hughes S., Empson R. 2013. Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 7:1-18.
- Puelles L., Kuwana E., Puelles E., Bulfone A., Shimamura K., Keleher J., Smiga S., Rubenstein J. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol*. 424:409-438.

Puelles L. 2001. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Phil Trans R Soc Lond B*. 356:1583-1598.

Puelles L., Harrison M., Paxinos G., Watson Ch. 2013. A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends in Neuroscience*. 570-578.

Rausell E., Jones E. 1991. Histochemical and immunocytochemical compartments of the thalamic VPM nucleus in monkeys and their relationship to the representational map. *Journal of Neuroscience*. 11:210-225.

Rehkamper G., Frahm H., Zilles Z. 1991. Quantitative development of brain and brain structures in birds (Galliformes and Passeriformes) compared to that in mammals (insectivores and primates). *Brain Behav Evol*. 37:125-143.

Reiner A., Karten H. 1985. Comparison of olfactory bulb projection in pigeon and turtles. *Brain Behav Evol*. 27:11-27.

Reiner A., Medina L., Veenman L. 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Research Reviews*. 28:235-285.

Reiner A., Northcutt R. 2000. Succinic dehydrogenase histochemistry reveals the location of the putative primary visual and auditory areas within the dorsal ventricular ridge of *sphenodon punctatus*. *Brain Behav Evol*. 55:26-36.

Reiner A. 2010. Chapter 2: The conservative evolution of the vertebrate basal ganglia. En: *Handbook of basal ganglia structure and function*, 1ra ed. Steiner & Tseng. Academic press. London, United Kingdom.

Reiner A., Jiao Y., Del Mar N., Laverghetta A., Lei W. 2003. Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. *J Comp Neurol*. 457:420-440.

Revzin A., Karten H. 1966. Rostral projections of the optic tectum and the nucleus Rotundus in the pigeon. *Brain Research*. 3:264-276.

Revzin A.M. 1967. Unit responses to visual stimuli in the nucleus rotundus of the pigeon. Fed Proc. 26:2238.

Revzin A.M. 1969. A specific visual projection area in the hyperstriatum of the pigeon (*Columba livia*). Brain Res. 15:246-249.

Revzin A.M. 1970. Some characteristic of wide-fields unit in the brain of the pigeon. Brain Behav Evol. 3:195-204.

Revzin A.M. 1979. Functional localization in the nucleus rotundus. En: Granda AM, Maxwell JH, editors. Neural mechanisms of behavior in the pigeon. pp 175-200. Plenum Press, New York, USA.

Ritchie T. 1979. Intratelencephalic visual connections and their relationship to the archistriatum in the pigeon (*Columba livia*). PhD thesis, Department of physiology, University of Virginia.

Rose J.E. 1942. The ontogenetic development of the rabbit's diencephalon. J Comp Neurol. 77:61-129.

Roth G., Dicke U. 2005. Evolution of the brain and intelligence. Trends in Cognitive Sciences. 9(5):250-257.

Roth G. 2013. The long evolution of brains and minds. 1ra ed. Springer, New York, USA.

Rubenstein J., Martinez S., Shimamura K., Puelles L. 1994. The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. Science. 266:578-580.

Sadananda M., Bischof H. 2006. Afferentation of the lateral nidopallium: A tracing study of a brain area involved in sexual imprinting in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). Brain Research. 1106:111-122.

Sanchez-Vives M., McCormick D. 2000. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. Nature Neuroscience. 3:1027-1034.

Shepherd G. 2009. Intracortical cartography in an agranular area. Frontiers in Neuroscience. 3:337-343.

Sherman M., Guillery R. 1998. On the actions that one nerve cell can have on another: Distinguishing ''drivers'' from ''modulators''. Proc Natl Acad Sci. 95:7121-7126.

Shimizu T., Cox K., Karten H. 1995. Intratelencephalic projections of the visual wulst in pigeons (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 359:551-572.

Shimizu T., Bowers A. 1999. Visual circuits of the avian telencephalon: evolutionary implications. *Behavioural Brain Research.* 98:183-191.

Smith E. 1901. Notes upon the natural subdivision of the cerebral hemisphere. *Journal of Anatomy and Physiology.* 35(4):431-454.

Smith-Fernandez A., Pieau C., Repérant J., Boncinelli E., Wassef M. 1998. Expression of the *Emx-1* and *Dlx-1* homeobox genes define three molecularly distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos: implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes. *Development.* 2099-2111.

Stenman J., Yu R., Evans R., Campbell K. 2003. *Tlx* and *Pax6* cooperate genetically to establish the pallio-subpallial boundary in the embryonic mouse telencephalon. *Development.* 130:1113-1122.

Stephan H., Frahm H., Baron G. 1981. New and revised data on volumes of brain structures in insectivores and primates. *Folia Primatol.* 35:1-29.

Steriade M., Nuñez A., Amzica F. 1993. A novel (<1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *Journal of Neuroscience.* 13:3252-3265.

Striedter G., Northcutt R. 1991. Biological hierarchies and the concept of homology. *Brain Behav Evol.* 38:171-189.

Striedter, G.F. 1997. The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol.* 49:179-213.

Striedter G.F., Marchant A.T., Beydler S. 1998. The "Neostriatum" Develops as part of the lateral pallium in birds. *The journal of neuroscience.* 18:5839-5849.

Striedter G.F. 2005. Principles of brain evolution. 1ra Ed. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, USA.

Striedter G.F. 2016. Evolution of the Hippocampus in Reptiles and Birds. *J Comp Neurol.* 524:496-517.

Swadlow H., Gusev A., Bezdudnaya T. 2002. Activation of a Cortical Column by a Thalamocortical Impulse. *The journal of Neuroscience.* 22:7766-7773.

Swanson L., Petrovich G. 1998. What is the amygdala? *Trends in Neuroscience.* 21:323-331.

Szele F., Cepko C. 1996. A subset of clones in the chick telencephalon arranged in rostrocaudal arrays. *Curr Biol.* 6:1685-1690.

Tahvildari B., Alonso A. 2005. Morphological and electrophysiological properties of lateral entorhinal cortex layers ii and iii principal neurons. *J Comp Neurol.* 491:123-140.

Taylor A., Hunt G., Holzhaider J., Gray R. 2007. Spontaneous metatool use by new caledonian crows. *Curr Biol.* 17:1504-1507.

Teissier A., Griveau A., Vigier L., Piolot T., Borello U., Pierani A. 2010. A novel transient glutamatergic population migrating from the pallial-subpallial boundary contributes to neocortical development. *The Journal of Neuroscience.* 30:10563-10574.

Teissier A., Waclaw R., Griveau A., Campbell K., Pierani A. 2012. Tangentially migrating transient glutamatergic neurons control neurogenesis and maintenance of cerebral cortical progenitor pools. *Cerebral Cortex.* 22:403-416.

Timmermans S., Lefebvre L., Boire D., Basu P. 2000. Relative size of the hyperstriatum ventrale is the best predictor of feeding innovation rate in birds. *Brain Behav Evol.* 56:196-203.

Tömböl T., Maglóczy Z., Stewart M., Csillag A. 1988. The Structure of Chicken Ectostriatum. I. Golgi Study. *Journal Hirnforsch.* 29:525-546.

Valverde F. 1985. The organizing principles of the primary visual cortex in the monkey. In: Peters A., Jones EG (eds) *Visual cortex.* pp 207-257, *Cerebral Cortex*, vol 3. Plenum, New York, USA.

van Dongen, P.A.M. 1998. Brain size in vertebrates. En: Nieuwenhuys R., Ten Donkelaar H.J., Nicholson C., editores. pp. 2099-2134. Springer, Berlin, Alemania.

Veenman L., Wild M., Reiner A. 1995. Organization of the avian "corticostriatal" projection system: a retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons. *J Comp Neurol.* 354:87-126.

Veenman C., Medina L., Reiner A. 1997. Avian homologues of mammalian intralaminar, mediodorsal and midline thalamic nuclei: immunohistochemical and hodological evidence. *Brain Behav Evol.* 47:78-98.

- Vega-Zuniga T., Mpodozis J., Karten H., Marín G., Hain S., Luksch H. 2014. Morphology, projection pattern and neurochemical identity of Cajal's "centrifugal neurons": The cells of origin of the tectoventrogeniculate pathway in pigeon (*Columba livia*) and chicken (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol.* 522:2377-2396.
- von Cramon D., Jürgens U. 1983. The anterior cingulate cortex and the phonatory control in monkey. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 7:423-425.
- Wang Y., Jiang S., Frost B. 1993. Visual processing in pigeon nucleus rotundus: Luminance, color, motion, and looming subdivisions. *Visual Neuroscience.* 10:21-30.
- Wang Q., Burkhalter A. 2007. Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol.* 502:339-357.
- Wang Y., Brzozowska-Prechtla A., Kartena H. 2010. Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 107:12676-12681.
- Watson B., MacLean J., Yuste R. 2008. Up states protect ongoing cortical activity from thalamic inputs. *PLoS One.* 3:1-16.
- Weir A., Chappell J., Kacelnik A. 2002. Shaping of hooks in New Caledonian crows. *Science.* 297:981.
- Wicht H., Northcutt G. 1998. Telencephalic connections in the pacific hagfish (*Eptatretus stouti*), with special reference to the thalamopallial system. *The journal of comparative neurology* 395:245-260.
- Wild J.M. 1987. The avian somatosensory system: connections of regions of body representation in the forebrain of the pigeon. *Brain Research.* 412:205-223.
- Wild M., Arends J., Zeigler H. 1985. Telencephalic connections of the trigeminal system in the pigeon (*Columba livia*): a trigeminal sensorimotor circuit. *J Comp Neurol.* 234:441-464.
- Wild M., Karten H., Frost B. 1993. Connections of the auditory forebrain in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 337:332-362.
- Wild M., Gaede A. 2015. Second tectofugal pathway in a songbird (*Taeniopygia guttata*) revisited: Tectal and lateral pontine projection to the posterior thalamus, thence to the intermediate nidopallium. *J Comp Neurol.* 524(5):963-985.

Wylie D., Gutierrez-Ibanez C., Pakan J., Iwaniuk A. 2009. The optic tectum of birds: mapping our way to understanding visual processing. *Canadian Journal of Experimental Psychology*. 63:328-338.

Xiao Q., Li D., Wang S. 2006. Looming-sensitive responses and receptive field organization of telencephalic neurons in the pigeon. *Brain Research Bulletin*. 68:322-328

Yamamoto N., Ishikawa Y., Yoshimoto M., Xue H., Bahaxar N., Sawai N., Yang C., Ozawa H., Ito H. 2007. A new interpretation on the homology of the teleostean telencephalon based on hodology and a new eversion model. *Brain Behav Evol*. 69:96-104.

Yamamoto N., Ito H. 2008 Visual, lateral line, and auditory ascending pathways to the dorsal telencephalic area through the rostromedial region of lateral preglomerular nucleus in cyprinids. *J Comp Neurol*. 508:615-647.

APÉNDICE

Figuras complementarias

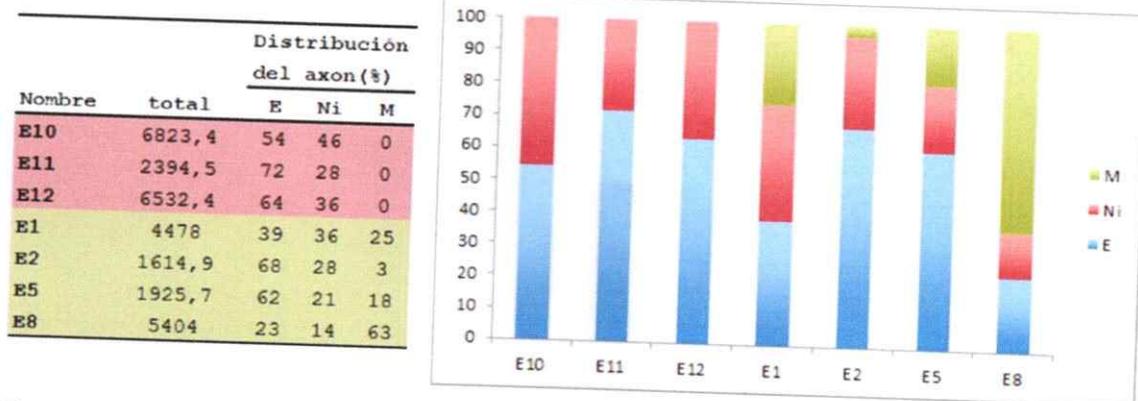


Figura 1 anexo. Distribución de axones de neuronas entopaliales en el colopatio visual. Porcentaje de distribución de los axones para tres casos de neuronas tipo II (E10-12) y cuatro de tipo I (E1, 2, 5 y 8). Estas neuronas fueron reconstruidas usando Neurolucida y el porcentaje de axón localizado en cada lámina cuantificado. Se puede ver que las neuronas de tipo II no presentan axón en M a diferencia de las de tipo I.

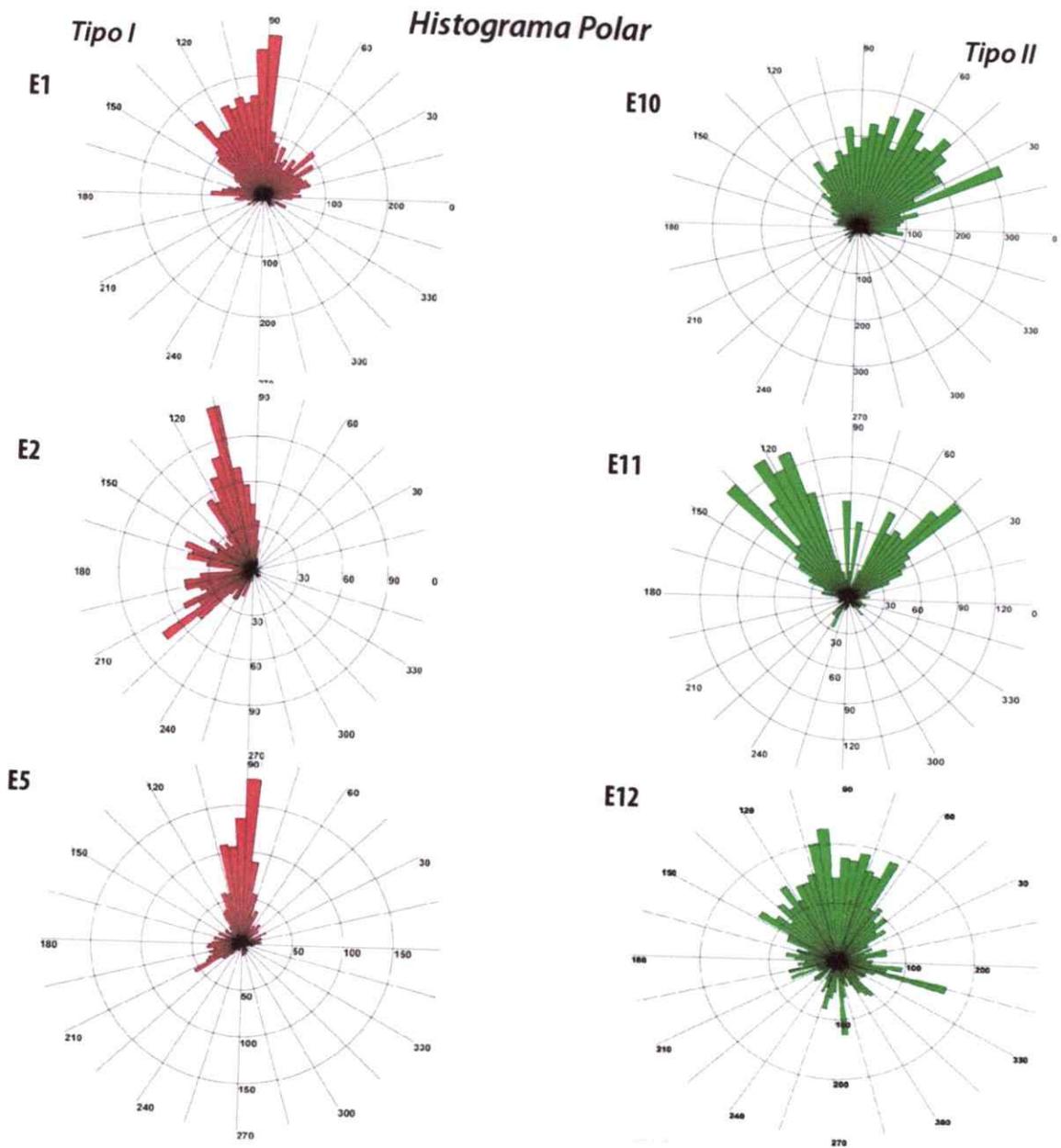


Figura 2 anexo. Histograma polar de tres casos deneuronas tipo I y II. En el histograma polar semuestra la orientación de segmentos de axón de neuronas de tipo I y II. Se aprecia que las neuronas de tipo I muestran una orientación más vertical que las de tipo II. Aunque los datos presentados grafican bien la diferencia morfológica, estos no fueron usados para analizar diferencias estadísticas debido a la poca cantidad de casos.

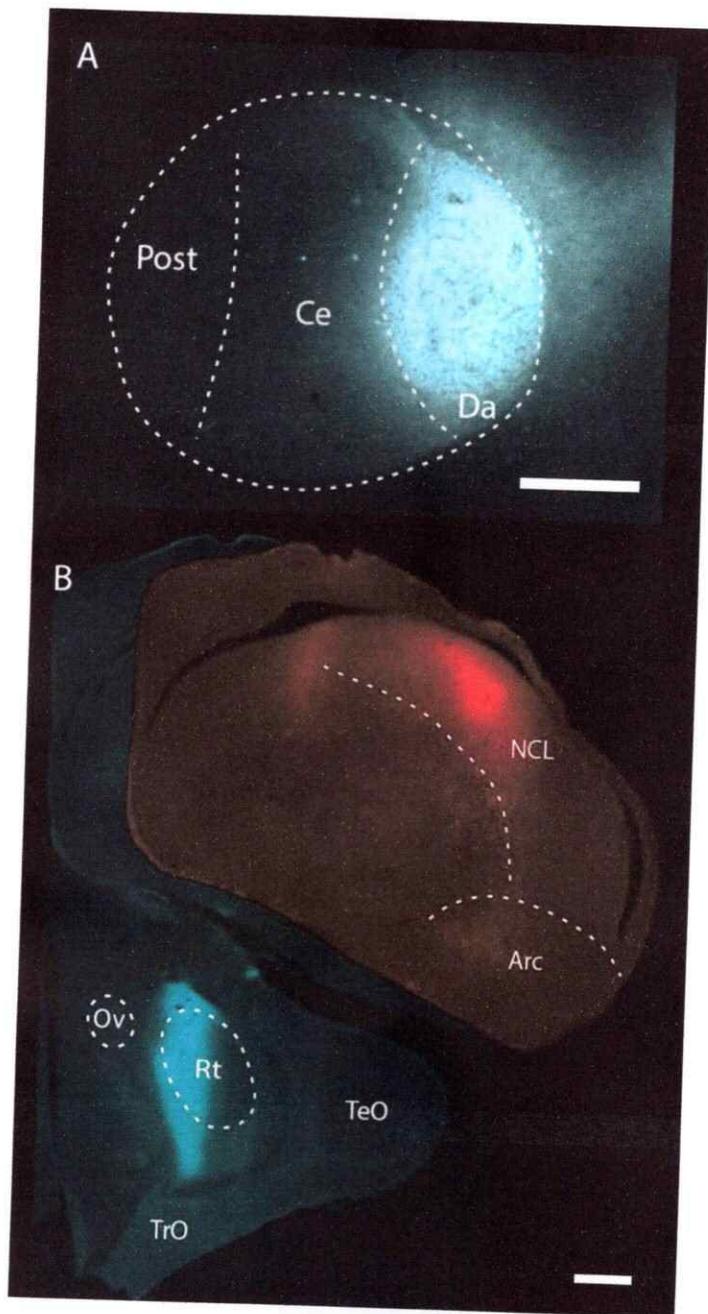


Figura 3 anexo. Inyecciones de trazadores de los casos Rt/NCL/M y Rt/NCL del capítulo 4. En A se muestra una inyección de PHA-L en la división dorsal anterior (Da) del núcleo rotundo del tálamo en el caso Rt/NCL/M. En B se muestran las inyecciones en Rt en color cian y en NCL en rojo, correspondientes al caso Rt/NCL. Barra de calibración, A: 500 μ m; B: 1mm.

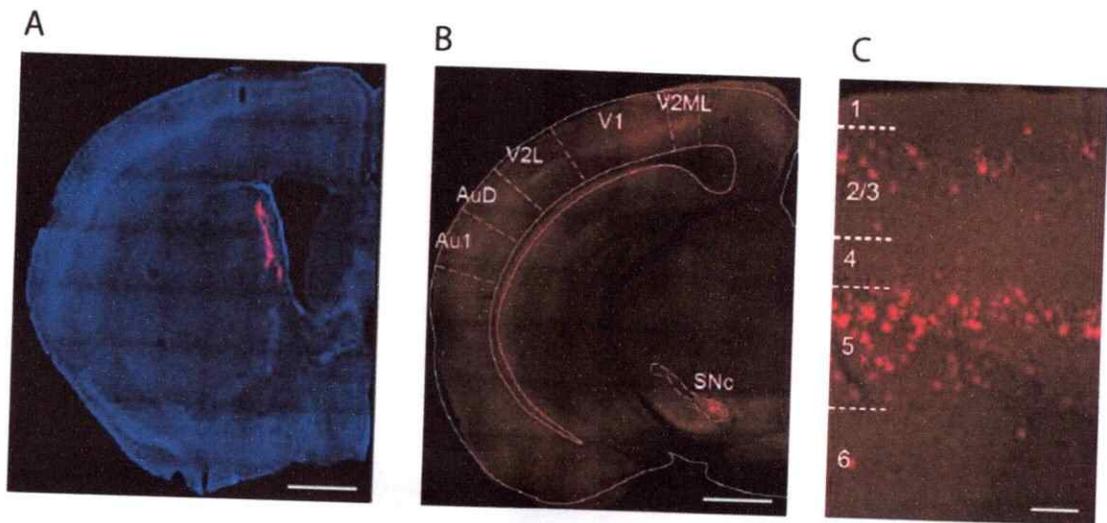


Figura 4 anexo. Localización cortical de neuronas estriado proyectante. Imagen tomada de Khibnik y col., (2014) para demostrar la presencia de neuronas estriado proyectante desde la lámina 2/3 de la corteza visual primaria. Además se puede ver que la localización de estas neuronas es muy similar a como se disponen las neuronas estriado proyectantes en el coloplio visual, en Ni y Ev. Comparar con la figura 4-7. Barras de calibración para A y B, 1mm; C: 100 μ m.

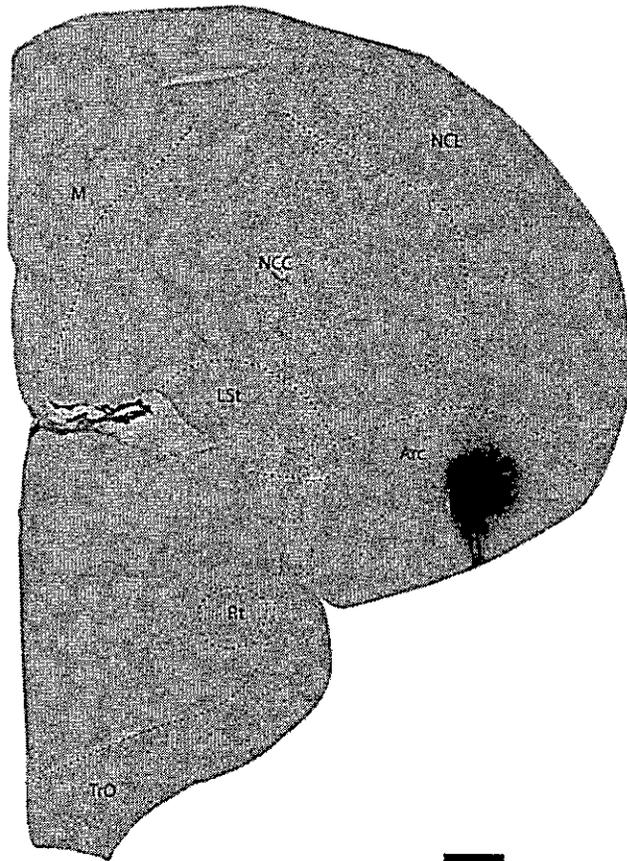


Figura 5 anexo. Inyección en arcopalio central. Inyección de Ctb en el arcopalio central (caso Arc 1, tabla 5-1). Barra de calibración, 1mm.

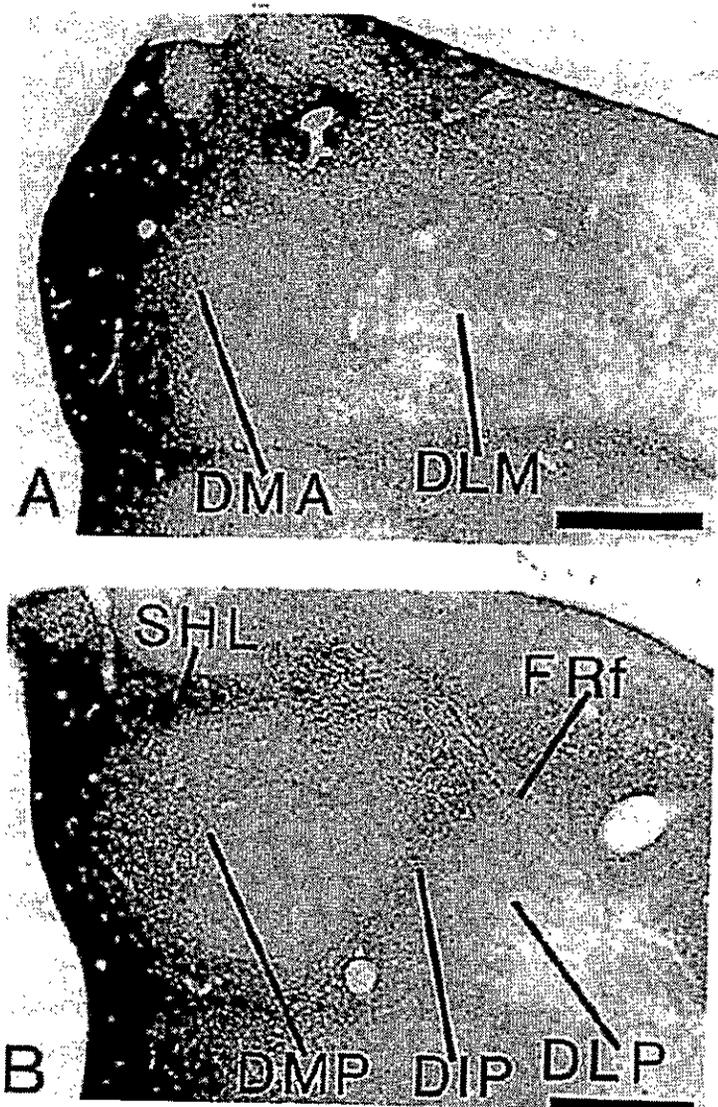


Figura 6 anexo. Inmunoreactividad GABAérgica en la zona talámica dorsal. Fotografía de secciones transversales de tálamo dorsal de paloma mostrando la reactividad contra GABA. Se puede apreciar plexos de terminales en torno a los núcleos sensoriales con un patrón de marca muy parecido a la distribución del retículo ce neuronas descrito en el capítulo 5. Imagen modificada desde la figura 3 de Veenman y col., 1997. Barras de calibración 500μm.