

UCH-FC

DOC-BMCN

9643

C.1

**Caracterización Neuroquímica y Sináptica del circuito
istmo-tectal en la vía Tectofugal de 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

CRISTIAN ARIEL GONZALEZ CABRERA

Marzo, 2014

Director de Tesis

Dr. Julio Alcayaga Urbina

Co-Tutor

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Profesor Invitado

Sr. Gonzalo Marín Gamé

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

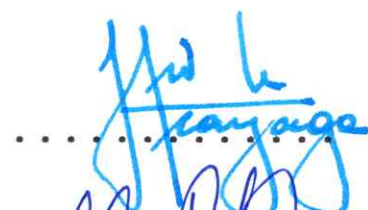
TESIS DE DOCTORADO

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

Cristian Ariel González Cabrera

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 martes 21 de Enero de 2014.

Director de Tesis:
Dr. Julio Alcayaga Urbina



Co-Director de Tesis
Dr. Alejandro Roth Metcalfe



Profesor Invitado
Sr. Gonzalo Marín Gamé



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Magdalena Sanhueza



Dr. Fernando Torrealba

.....

Dr. Jorge Mpodozis

.....

Dr. Pablo Henny



A mis padres, hermanos y esposa

Antes que todo agradezco a mis padres por el total apoyo que me entregaron desde el primer momento en que decidí embarcarme en todo esto. Además, agradezco a Florencia Garrido, mi querida esposa por el apoyo en todos los ámbitos de la vida.

Agradezco a mi tutor Sr. Gonzalo Marín Gamé, por haberme formado como científico. Le agradezco también por su paciencia en estos largos años.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio de Neurobiología y Biología del Conocer por todo el apoyo científico y personal que me entregaron. Quiero en especial agradecer al Sr. Solano Henríquez por su ayuda técnica y apoyo personal.

Agradezco a los laboratorios de:

- Biología Celular del desarrollo, del Dr. Juan Fernández
- Biología del desarrollo, de la Dra. Verónica Palma.
- Neurociencia, del Dr. Christian Gonzalez-Billault.
- Biología del envejecimiento, del Dr. Marco Tulio Nuñez.
- Biología molecular Vegetal, de los académicos Dra. Liliana Cardemil, Dr. Michael Handford, Dra. Claudia Stange y Dra. Lorena Norambuena.
- Fisiología Celular, de los académicos Dra. Cecilia Vergara, Dr. Juan Bacigalupo, Dr. Julio Alcayaga, y Dra. Magdalena Sanhueza.
- Microbiología molecular y Biotecnología, de los académicos Dr. Nicolás Guilliani, Dr. Francisco Chávez y Dr. Carlos Jerez.
- Neuroglia, del Dr. Alejandro Roth

Por haberme apoyado y asistido en innumerables ocasiones en temas técnicos y científicos. Muchos de ellos apoyaron la realización de esta tesis mediante la facilitación de reactivos y equipamiento.

Agradezco a la Vicerrectoría de asuntos académicos y a MECESUP por las becas otorgadas para la realización de mi pasantía en la Universidad de Oxford, UK.

Agradezco al Dr. Paul Bolam por haberme invitado a su laboratorio en la Universidad de Oxford, entrenarme en las técnicas de microscopía electrónica y por su invaluable contribución a esta tesis. Además, agradezco a la Dra. Natalie Doig, Dra. Megan Dowie y Dra. Icnelia Huerta-Ocampo por el entrenamiento entregado en el laboratorio. Finalmente, agradezco al Sr. Gareth Hazell por su ayuda técnica y apoyo personal.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	5
1.2 Identidad neuroquímica de los núcleos del istmo.....	6
1.3 Posibles blancos sinápticos de los axones de lpc.....	12
1.4 Hipótesis.....	16
1.5 Objetivos.....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Diseño de partidores y sondas de RNA.....	18
2.2 Extracción de RNA.....	19
2.3 RT-PCR.....	20
2.4 PCR.....	20
2.5 Clonamiento.....	21
2.6 Síntesis de sondas de RNA.....	21
2.7 Hibridación <i>in situ</i>	22
2.8 Procedimientos quirúrgicos para la inyección de trazadores neuronales.....	24
2.9 Inyecciones de Leucoaglutinina de <i>Phaseolus Vulgaris</i> (PHA-L).....	25
2.10 Inmuno-histoquímica e Inmuno-fluorescencia.....	26
2.11 Estimación de densidad celular.....	27
2.12 <i>Western Blot</i>	29

2.13	Inyecciones dobles de trazadores neuronales para microscopía electrónica.....	29
2.13.1	PHA-L y Biotinilated dextro-amine 3000 DA (BDA 3k).....	29
2.13.2	PHA-L y Cholera Toxin Subunit B (CTB).....	30
2.14	Inmuno-histoquímica e inmuno oro para microscopía electrónica.....	30
2.15	Preparación de tejidos para microscopía electrónica.....	31
2.16	Microscopía electrónica.....	33
2.17	Reconstrucción 3D.....	33
2.18	Análisis glomerular.....	33
3.	RESULTADOS.....	35
3.1	Identificación del fenotipo neuroquímico de las células de lpc.....	35
3.1.1	Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante ensayos de hibridación <i>in situ</i> en el mecenéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	35
3.1.1.1	Amplificación y clonamiento de fragmentos específicos de cDNA de ChAT, CHT1 y VGLUT2.....	33
3.1.1.2	Hibridación <i>in situ</i>	36
3.1.1.3	Complejo del istmo.....	37
3.1.1.4	Otras estructuras cerebrales.....	40
3.1.1.4.1	Romboencéfalo.....	43
3.1.1.4.2	Mesencéfalo.....	45
3.1.1.4.3	Pretéctum.....	45
3.1.1.4.4	Diencéfalo.....	46
3.1.1.4.5	Telencéfalo.....	48
3.1.2	Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante el uso de trazadores neuronales e inmuno-histoquímica.....	50
3.1.3	Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante el uso de trazadores neuronales e inmuno-fluorescencia.....	53

3.2	Identificación y caracterización de las estructuras axónicas de lpc mediante microscopía electrónica.....	55
3.3	Identificación de blancos sinápticos. Posibles blancos sinápticos.....	60
3.3.1	Uso de trazadores y microscopía electrónica.....	60
3.3.1.1	Capa tectal 5 (TGCs I5a-I5b).....	62
3.3.1.2	Capa tectal 2-3 (TGCs I3).....	67
3.3.1.3	Capa tectal 9 (TGCs II).....	72
3.3.2	Análisis sináptico.....	76
3.3.3	Relación lpc/RGCs.....	78
3.3.4	Relación RGCs/TGCs.....	81
3.3.5	Relación lpc/Células <i>Shepherd's crook</i>	83
3.4	Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante microscopía electrónica, utilizando trazadores neuronales e inmuno-oro.....	87
4.	DISCUSIÓN.....	90
4.1	Identidad neuroquímica de lpc y SLu.....	91
4.2	La posible <i>down-regulation</i> del locus colinérgico.....	96
4.3	Co-liberación de glutamato y acetilcolina.....	97
4.4	Los blancos sinápticos de lpc.....	100
4.5	La organización glomerular.....	101
4.6	Cambio de paradigma.....	102
4.7	El efecto dual ejercido por lpc/SLu sobre TeO.....	105
4.8	La proyección homotópica istmo-tectal en los vertebrados.....	108
5.	CONCLUSIONES.....	111
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	112

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Partidores específicos.....	19
TABLA 2	Distribución de RNAs mensajeros para los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el cerebro de <i>Gallus gallus domesticus</i>	41
TABLA 3	Comparación entre los volúmenes de los botones terminales de lpc y los perfiles redondeados marcados observados en microscopía electrónica.....	58
TABLA 4	Combinatoria experimental para determinación de blancos sinápticos.....	60
TABLA 5	Análisis sináptico glomerular.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	La vía retino-tecto-fugal en aves.....	3
Figura 2	Función colinérgica pre-sináptica.....	8
Figura 3	El complejo del istmo y su inmuno-reactividad contra ChAT.....	8
Figura 4	El núcleo <i>isthmi pars parvocellularis</i> (lpc) no expresa el RNA mensajero para el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT).....	11
Figura 5	Las dendritas de las células ganglionares tectales (TGCs) y las terminaciones axónicas de lpc confluyen en TeO.....	13
Figura 6	Amplificación de cDNA.....	36
Figura 7	Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en la región del istmo.....	39
Figura 8	Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el romboencéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	44
Figura 9	Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el pretectum de <i>Gallus gallus domesticus</i>	46
Figura 10	Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el diencéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	47
Figura 11	<i>Western blot</i> anti VGLUT2.....	49
Figura 12	Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el telencéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	51
Figura 13	Inmuno-reactividad anti-VGLUT2 en el tectum óptico.....	52
Figura 14	Immuno-fluorescencia doble anti-VGLUT2/anti-PHA-L en el tectum óptico.....	54
Figura 15	Terminales de lpc marcados anterógradamente con PHA-L.....	57
Figura 16	El glomérulo tectal.....	59

Figura 17	Esquema descriptivo de los experimentos de inyección de trazadores para la microscopía electrónica.....	61
Figura 18	Estructuras marcadas para estudiar relación lpc-TGCs tipo I5a-b.....	63
Figura 19	Aposición entre un terminal de lpc y una dendrita de TGC en una estructura glomerular en la capa 5 del tectum óptico.....	64
Figura 20	Aposición entre un terminal de lpc y dos dendritas de TGC en una estructura glomerular en la capa 5 del tectum óptico.....	65
Figura 21	Reconstrucción 3D de un glomérulo y sus dendritas.....	66
Figura 22	Estructuras marcadas para estudiar la relación lpc-TGCs tipo I3.....	67
Figura 23	Aposición entre un terminal de lpc y una dendrita de TGC en una estructura glomerular en la capa 2-3 del tectum óptico	69
Figura 24	Relación sináptica entre un terminal de lpc y una dendrita de TGC en la capa 2-3 del tectum óptico.....	70
Figura 25	Reconstrucción 3D en distintas orientaciones de glomérulos de lpc en contacto con terminales dendríticos en la capa 2-3.....	71
Figura 26	Estructuras marcadas para estudiar la relación lpc-TGCs tipo II.....	72
Figura 27	Estructura glomerular de terminal axónico de lpc en la capa tectal 9.....	73
Figura 28	Aposición entre un terminal de lpc y una dendrita de TGC en una estructura glomerular en la capa 9 del tectum óptico.....	74
Figura 29	Reconstrucción 3D en distintas orientaciones de glomérulos de lpc en contacto con terminales dendríticos en la capa 9.....	75
Figura 30	Experimentos de doble marcaje PHA-L/CTB.....	79
Figura 31	Criterio morfológico para terminales retinianos.....	80
Figura 32	Relación terminales retinianos/ TGCs.....	83
Figura 33	Estructuras marcadas para relación lpc y células <i>Shepherd's crook</i> (SC).....	84

Figura 34	Ipc en capas profundas.....	85
Figura 35	Fotomicrografías electrónicas donde se muestran dendritas de células <i>Shepherd's crook</i> (SC) en las capas profundas de TeO.....	86
Figura 36	Expresión de VGLUT2 en el glomérulo.....	88
Figura 37	Doble marcaje PHA-L/VGLUT2.....	89
Figura 38	El locus colinérgico.....	93
Figura 39	Esquema Organización istmo-tectal.....	104
Figura 40	Esquema del control istmo-tectal propuesto.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas generales

- DNA : Ácido Desoxirribonucleico
- RNA : Ácido Ribonucleico
- BLAST : Alineamiento de secuencias de tipo local (Basic Local Alignment Search Tool)
- BrEt : Bromuro de Etidio
- cDNA : DNA copiado
- DNasa : Desoxi-ribonucleasa
- DNTP : Deoxi nucleótido trifosfato
- h : Horas
- IDT : Integrated DNA Technologies
- kb : kilobase
- LB : Luria-Bertoni
- mRNA : RNA mensajero
- M : Molar
- mM : Milimolar
- mm : Milímetro
- μm : Micrómetro
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- RNasa : Ribonucleasa
- RPM : Revoluciones por minuto
- RT : Transcripción Reversa
- SD : Desviación estándar
- SDS : Dodecilsulfato sódico
- SSC : Citrato de sodio salino
- s : Segundos

Abreviaturas núcleos cerebrales

AA	Arcopallium Anterius	NBM	Nucleus basalis magnocellularis
AD	Arcopallium Dorsale	nBOR	Nucleus Opticus Basalis
AI	Arcopallium Intermedium	NC	Nidopallium Caudale
AM	Arcopallium Mediale	NF	Nidopallium Frontale
Bas	Nucleus Basorostralis pallii	NFL	Nidopallio Frontal Lateral
Cbl	Nucleus Cerebellaris Internus	NFM	Nidopallio Frontal Medial
CbL	Nucleus Cerebellaris Lateralis	NI	Nidopallium intermedium
CbM	Nucleus Cerebellaris Intermedius	nIII	Nucleus Oculomotorius
Cos	Nucleus Commissuralis Septi	nIV	Nucleus Nervi Trochlearis
DIP	Nucleus Dorsointermedius Posterior Thalami	nVmd	Nucleus motorius nervi trigemini pars dorsalis
DLAmc	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami, pars magnocellularis	nVmv	Nucleus motorius nervi trigemini pars ventralis
DLL	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami, pars lateralis	nVI	Nucleus Nervi Abducentis
DLM	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami, pars medialis	nVII- XII	Nucleos Motores de los Nervios Craneales
DLP	Nucleus Dorsolateralis Posterior Thalami	NL	Núcleo Laminar
DMA	Nucleus Dorsomedialis Anterior Thalami	NM	Núcleo Magnocelular
DMP	Nucleus Dorsomedialis Posterior Thalami	Ov	Nucleus Ovoidalis
E	Entopallium	PGL	Nucleus Paragigantocellularis Lateralis
EW	Nucleus Edinger-Westphal	PL	Nucleus Pontis Lateralis
FRL	Formatio Reticularis Lateralis Mesencephali	PLH	Nucleus Lateralis Hypothalami Posterioris
FRM	Formatio Reticularis Medialis Mesencephali	PM	Nucleus Pontis Medialis
GLdp	Nucleus Geniculatus Lateralis, pars dorsalis principalis	PMH	Nucleus Medialis Hypothalami Posterioris
GLv	Nucleus Geniculatus Lateralis, pars ventralis	PPC	Nucleus Principalis Precommissuralis

GP	Globus Pallidus	PPT	Nucleus Pedunculopontinus Tegmenti
HA	Hyperpallium Apicale	PrV	Nucleus Sensorius Principalis Nervi Trigemini
HD	Hyperpallium Densocellulare	PT	Nucleus Pretectalis
HI	Hyperpallium Intercalatum	R	Nucleus Raphes
HL	Nucleus Habenularis Lateralis	Rgc	Nucleus Reticularis Gigantocellularis
HM	Nucleus Habenularis Medialis	Rpc	Nucleus Reticularis Parvocellularis
Hp	Hippocampus	RPgc	Nucleus Reticularis Pontis Caudalis, pars gigantocellularis
ICo	Nucleus Intercollicularis	Rt	Nucleus Rotundus
IHA	Nucleus Interstitialis Hyperpallii Apicale	Ru	Nucleus Ruber
Imc	Nucleus Isthmi, pars magnocellularis	SC	Shepherd's Crook
IO	Nucleus Isthmo-Opticus	SGPv	Stratum Griseum Periventriculare
Ipc	Nucleus Isthmi, pars parvocellularis	SLu	Nucleus Isthmi pars Semilunaris
LDT	Núcleo Tegmental Laterodorsal	SP	Nucleus Subpretectalis
LHy	Regio Lateralis Hypothalami	SpM	Nucleus Spiriformis Medialis
LLd	Nucleus Lemnisci Lateralis, pars dorsalis	SRT	Nucleus Subrotundus
LLv	Nucleus Lemnisci Lateralis, pars ventralis	STh	Núcleo Subtalámico
LMmc	Nucleus Lentiformis Mesencephali, pars magnocellularis	T	Nucleus Triangularis
LMpc	Nucleus Lentiformis Mesencephali, pars parvocellularis	TeO	Tectum Opticum
LoC	Locus Ceruleus	TGC	Célula Ganglionar Tectal
StL	Striatum Laterale	VeD	Nucleus Vestibularis Descendens
M	Mesopallium	VeL	Nucleus Vestibularis Lateralis
MDT	Núcleo Tegmental Mediodorsal	VeM	Nucleus Vestibularis Medialis
MLd	Nucleus Mesencephalicus Lateralis, pars dorsalis	VLT	Nucleus Ventrolateralis Thalami
StM	Striatum Mediale	VS	Nucleus Vestibularis Superior
NA	Núcleo Angularis	AVT	Area Ventralis Tegmenti

RESUMEN

La vía visual tectofugal de los vertebrados se encuentra particularmente desarrollada en las aves y ha sido asociada a procesos de orientación y atención espacial. El tectum óptico (TeO, colículo superior en mamíferos) es el núcleo central de esta vía y el principal centro visual del cerebro de las aves. La actividad visual que recibe el tectum óptico desde la retina, gatillada por algún estímulo en movimiento, evoca señales sincronizadas de retroalimentación (*feedback*) desde dos núcleos del istmo, el *isthmi pars parvocellularis* (lpc) y el *isthmi pars semilunaris* (SLu), cuyos terminales axónicos columnares ramifican en capas tectales alternadas. Las señales de *feedback* generadas por lpc parecen actuar como un foco atencional que potencia de manera selectiva la propagación de la entrada (*input*) retiniana desde el tectum hacia áreas visuales superiores. Se ha propuesto que dicha modulación del flujo visual ocurriría mediante la liberación de acetilcolina en las capas tectales superiores, actuando a nivel pre-sináptico sobre receptores nicotínicos en los terminales axónicos de las células ganglionares de la retina, afectando la liberación de glutamato por parte de éstos. Aunque lpc y SLu son ampliamente considerados como núcleos colinérgicos, ya que muestran inmuno-reactividad contra la enzima colinacetil transferasa (ChAT), la falta de expresión del RNA mensajero para el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) y el reporte de la expresión del

RNA mensajero del transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) en neuronas de lpc en la paloma, ponen duda acerca del carácter colinérgico de este núcleo. Un fenotipo neuroquímico distinto podría cambiar el mecanismo modulador actual asignado a lpc, abriendo diferentes posibilidades acerca de su participación en el control del flujo visual tectofugal. Como esto conlleva la posibilidad de que lpc establezca sinapsis directas con otros componentes tectales, se hace necesario determinar los posibles blancos sinápticos del núcleo lpc, los cuales hasta ahora son desconocidos. En este trabajo revisamos la identidad neuroquímica de los núcleos del istmo en el pollo mediante ensayos de hibridación in situ para el marcador de neuronas glutamatérgicas VGLUT2, junto con otros dos marcadores colinérgicos: el transportador de alta afinidad de colina (CHT1) y ChAT. También determinamos la expresión a nivel de proteína de VGLUT2 en los terminales axónicos de lpc marcados con un trazador neuronal. Para determinar los blancos sinápticos de lpc realizamos doble marcaje de los terminales axonales de lpc en conjunto con cada posible estructura blanco, utilizando trazadores neuronales, inmuno-histoquímica y técnicas de microscopía electrónica. Encontramos que ambos núcleos, lpc y SLu, presentan expresión de los RNAs mensajeros para CHT1 y ChAT, siendo la expresión de este último notablemente más débil en lpc. Coincidiendo con un fenotipo glutamatérgico, el núcleo lpc mostró una fuerte expresión de RNA mensajero para VGLUT2. Ensayos de inmuno-histoquímica realizados sobre axones de lpc anterogradamente marcados exhibieron inmuno-reactividad para VGLUT2 en las capas superficiales del tectum co-distribuyendo con botones de

los terminales axónicos de lpc, apoyando aun más una función glutamatérgica para lpc. Además, encontramos que los terminales axónicos de lpc establecen contacto sináptico con los subtipos I3 y I5ab de células ganglionares tectales (TGCs) en estructuras de tipo glomerular y en engrosamientos axónicos con las TGCs del tipo II. Aunque los terminales de lpc podrían liberar acetilcolina mediante un mecanismo no-vesicular, nuestros resultados apoyan la existencia de un *feedback* glutamatérgico generado por lpc en conjunto con un *feedback* colinérgico mediado por SLu. Las sinapsis directas entre lpc y los diferentes subtipos de TGCs también sustentan, anatómicamente, el potente efecto de control que ejerce este núcleo sobre el flujo visual tectofugal.

ABSTRACT

The tectofugal visual pathway is particularly developed in birds and it has been associated to orientation and spatial attention processes. The optic tectum (TeO, superior colliculus in mammals) is the main nucleus in this pathway and the largest visual center in the avian brain. Retinal inputs to the optic tectum triggered by moving stimuli elicit synchronized feedback signals from two isthmic nuclei, the *isthmi parvocellularis* (lpc) and *isthmi semilunaris* (SLu), whose columnar axon terminals ramify into alternate tectal layers. The feedback signals from the lpc seem to act as an attentional spotlight by selectively boosting the propagation of retinal inputs from the tectum to higher visual areas. It has been proposed that this selective modulation of the visual stream is mediated by acetylcholine release at the superficial tectal layers, perhaps in a paracrine fashion, which acts upon the nicotinic receptors at the presynaptic retinal terminals, by increasing the glutamate release. Neurons at the lpc and the SLu are widely considered cholinergic because of their immuno-reactivity for choline acetyltransferase (ChAT), still, contradictory findings in pigeons, including the expression of the vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) mRNA in lpc neurons, raise doubts about the cholinergic character of this nucleus. A different neurochemical phenotype might question the modulatory role assigned to lpc, raising different possibilities about the mechanisms by

which this nucleus controls the tectofugal visual transmission. To determine this it is important to address the synaptic targets of the lpc nucleus, which until now are unknown. We here revise in chicks the neurochemical identity of the isthmic nuclei by *in situ* hybridization assays of the glutamatergic marker VGLUT2 along with two cholinergic markers: the choline high affinity transporter (CHT1) and ChAT. We also determined the VGLUT2 protein expression in labeled lpc axon terminals. In order to determine the synaptic targets of the lpc we double-labeled the lpc axon terminals and each possible target structure by using neural tracers, immuno-histochemical, and electron microscopy techniques. We found that both lpc and SLu neurons showed a distinct expression of CHT1 and CHAT mRNAs, albeit the latter shows a weaker labeling in the lpc. In accordance with a glutamatergic phenotype the lpc showed a strong expression of VGLUT2 mRNA. Immunohistochemistry assays in anterogradely-labeled lpc axons showed VGLUT2 immunoreactivity in the superficial layers of the TeO co-distributing with lpc axon-terminal buttons, further supporting a glutamatergic function for the lpc nucleus. We also found that the lpc axon terminals establish synaptic contact, forming a glomerulus-like structure with the type I3 and I5ab tectal ganglion cell (TGC) subtypes and axonal thickenings with the type II TGCs subtype. Therefore, although the lpc terminals may release acetylcholine by a non-vesicular mechanism, our results better support a glutamatergic feedback mediated by the lpc, concomitant with a cholinergic feedback mediated by the SLu. The direct synapse between the lpc and the different subtypes of TGC's,

also supports, anatomically, the strong driving effect that the lpc exerts over the tectofugal visual stream.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema visual de los vertebrados posee dos vías principales, la vía retino-tálamo-fugal y la vía retino-tecto-fugal, las cuales están definidas por el blanco primario de las proyecciones retinianas, que en el primer caso corresponde al núcleo geniculado lateral en el diencéfalo, y en el segundo, al tectum óptico (TeO) en el mesencéfalo.

La vía tectofugal alcanza su máximo desarrollo en las aves, ya que comprende aproximadamente el 90% de los axones que se originan en la retina y se proyectan al encéfalo (Karten & Revzin 1966; Hunt & Webster 1975; Benowitz & Karten 1976; Mpodozis y col., 1995). Su centro visual principal, el tectum óptico, se encuentra altamente diferenciado y posee complejos circuitos neuronales que median comportamientos de discriminación visual, orientación de los ojos y la cabeza, reacciones de escape y atención espacial (Bischof & Watanabe 1997; Nguyen y col., 2004; Wylie y col., 2009, Marín y col., 2005, 2007, 2012). Los axones de las células ganglionares retinianas (RGCs) terminan de manera segregada en cinco de las siete capas más superficiales, conservando finamente la topografía de la retina contralateral (Ramón y Cajal, 1911; Hunt & Webster 1975; Angaut & Repérant 1976), mientras que el flujo visual ascendente hacia el tálamo es mediado por las células ganglionares tectales (TGCs) ubicadas en la capa tectal 13.

Las TGCs poseen extensas arborizaciones dendríticas con terminaciones especializadas que terminan de manera ordenada en una capa tectal única, específica para las diferentes clases de TGCs, las cuales forman canales tecto-talámicos también específicos que terminan en el núcleo rotundus (Rt, pulvinar caudal en mamíferos; Mpodozis y col., 1996) en el tálamo (Benowitz & Karten 1976; Karten y col., 1997; Luksch y col., 1998; Hellmann & Güntürkün 2001; Luksch y col., 2001; Marín y col., 2003).

Estudios recientes, han demostrado que este flujo tectofugal ascendente es controlado por los núcleos del complejo del istmo, constituido por el núcleo *isthmi pars parvocellularis* (Ipc), el núcleo *isthmi pars Semilunaris* (SLu) y el núcleo *isthmi pars magnocellularis* (Imc) (Wang y col., 2006; Marín y col., 2007, 2012). Los núcleos del istmo están conectados de manera recíproca con el tectum óptico formando circuitos paralelos de retroalimentación (*feedback*) visual. Neuronas *Shepherd's crook* (SC) de la capa tectal 10 transmiten la entrada (*input*) retiniana hasta el complejo del istmo de manera topográfica. Las neuronas de Ipc y SLu se conectan de forma homotópica con el tectum, de manera tal que las señales de *feedback* desde ambos núcleos alcanzan la misma región tectal desde donde el *input* visual se origina. Por otra parte, las neuronas de Imc envían axones GABAérgicos sobre Ipc, SLu y las capas tectales profundas, ramificándose profusamente en toda la extensión de estas estructuras (Figura 1) (Güntürkün & Remy 1990; Wang y col., 2004, 2006).

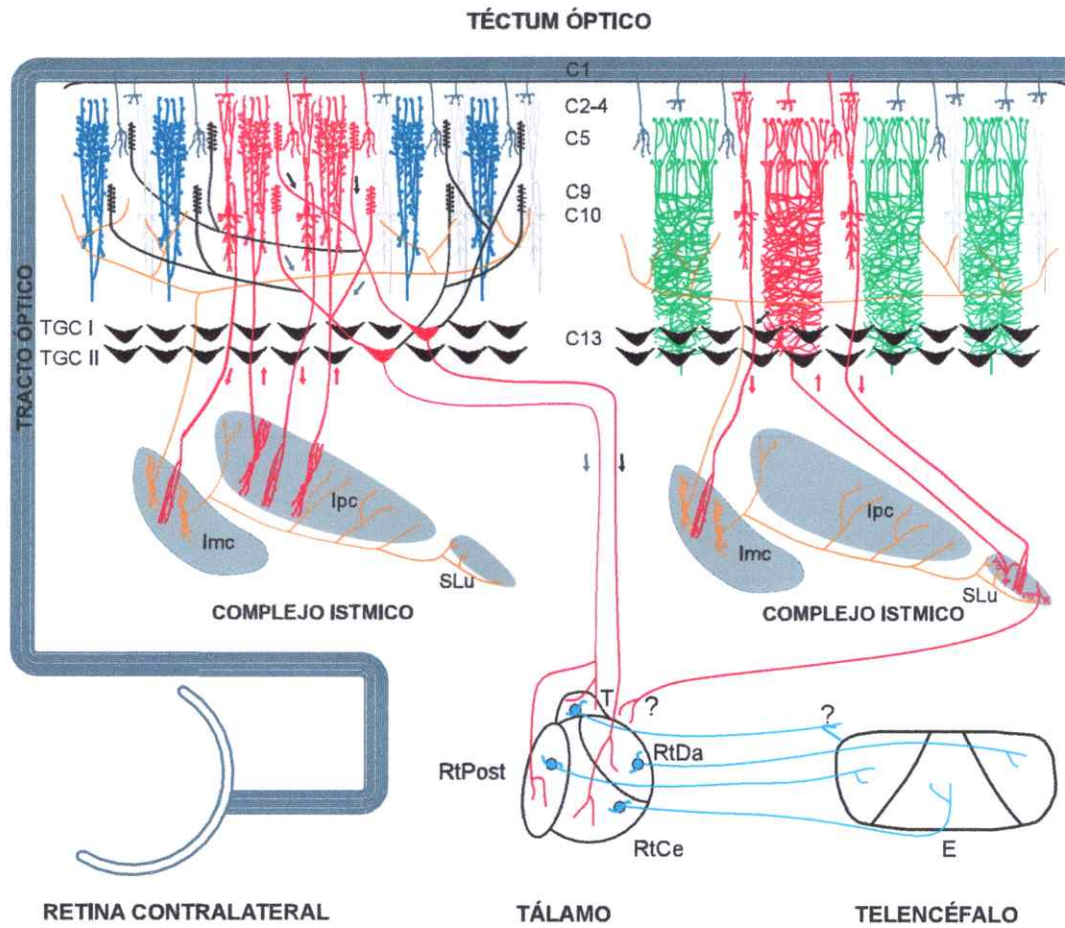


Figura 1. La vía retino-tecto-fugal en aves. El diagrama muestra el flujo visual canalizado por la vía tecto-fugal. Las células ganglionares de la retina terminan sobre las capas superficiales del tectum óptico (TeO) contralateral, donde confluyen con los terminales dendríticos de las células ganglionares tectales (TGCs), las cuales llevan el flujo visual hasta el núcleo rotundus (Rt) en el tálamo, que a su vez se proyecta sobre el núcleo entopallio (E) en el telencéfalo. Ubicados bajo el tectum óptico, los núcleos satélites del istmo (*isthmi pars parvocellularis* (lpc), *isthmi pars Semilunaris* (SLu) e *isthmi pars magnocellularis* (lmc) se conectan de manera recíproca con TeO, de manera homotópica (lpc y SLu) y heterotópica (lmc), teniendo como única entrada la innervación proveniente de las células *Shepherd-crook* (SC) de la capa tectal 10. Cuando un locus tectal es activado, mediante la liberación de glutamato por parte de los terminales de la retina, las células SC activan la representación del mismo locus espacial en los núcleos del istmo, los cuales en conjunto retro-alimentan el tectum óptico a través de toda una columna tectal. Al mismo tiempo las neuronas SC activan neuronas en lmc, las cuales provocan un efecto inhibitorio sobre la periferia de los loci en lpc TeO Y SLu activados, mediante la liberación heterotópica de GABA. La acción del complejo del istmo modula el flujo visual ascendente, estableciendo un potente control sobre este, mediado principalmente por la actividad de lpc.

Este arreglo anatómico permite que un cierto locus tectal visualmente activado gatille señales de *feedback* desde el locus espacialmente correspondiente en lpc y SLu, mientras que al mismo tiempo, vía lmc, se tiende a suprimir las respuestas tectales y el *feedback* ístmico (desde lpc y SLu) en las otras regiones tectales (Wang y col., 2004, 2006; Marín y col., 2007, 2012; Asadollahi y col., 2010; Mysore & Knudsen 2013). Esto generaría interacciones de competencia de amplio rango entre lugares tectales activados simultáneamente por distintos estímulos visuales presentes en la escena visual.

Los núcleos lpc y SLu poseen axones con terminales columnares que se ramifican desde la capa tectal 10 hasta la 2, con botones especialmente concentrados en la capa 5 y desde la capa tectal 13 hasta la 4, con densas ramificaciones bajo la capa tectal 9, respectivamente (Wang y col., 2006). Las respuestas de lpc al *input* visual son rápidas secuencias (*burst*) de potenciales de acción que descargan en forma sincronizada con secuencias de impulsos simples o dobles descargadas por las neuronas de SLu (Marín y col., 2005, 2012).

La supresión de las señales de *feedback* de lpc y SLu producida por la activación de otra zona tectal es también sincronizada (Marín y col., 2012). Esto implica que las señales de *feedback* generadas por ambos núcleos cambia sincronizadamente desde un locus tectal a otro produciendo un efecto paralelo que se extiende a través de todas las capas tectales.

1.1 Planteamiento del problema

Se ha mostrado que el *feedback* mediado por los terminales axónicos de lpc, llamados *paintbrushes*, ejerce un potente efecto de compuerta sobre la transmisión tectofugal ascendente. Por ejemplo, si el *feedback* generado por lpc sobre un cierto locus tectal es suprimido mediante la inactivación del locus de lpc, la respuesta a estímulos en movimiento en la región del campo visual correspondiente es suprimida en todas las subdivisiones del núcleo rotundus. Este fenómeno no ocurre al inhibir el *feedback* generado por SLu.

Además, se ha mostrado que la actividad tipo *burst* generada por lpc, imprime el mismo ritmo de descarga sobre el flujo visual ascendente, de modo tal que la respuesta visual en el núcleo rotundus (y su blanco en el palio, el entopalio) presentan también una actividad tipo *burst* sincronizada con las descargas de lpc (Marín y col., 2012).

Esto ha llevado a proponer que lpc ejerce un efecto atencional focalizado, parecido a un foco atencional, sobre el arreglo bidimensional de las terminaciones dendríticas de las TGCs, potenciando de manera selectiva la transmisión del flujo visual desde el tectum hacia las áreas visuales superiores (Marín y col., 2005, 2007).

Considerando el potente control de este núcleo sobre el flujo visual, cabe preguntarse cómo lpc podría estar ejerciendo este efecto a nivel tectal. Se ha propuesto un modelo de facilitación local pre-sináptica, el cual está sustentado,

por una parte, en el hasta ahora aceptado fenotipo colinérgico de los terminales de lpc y, por otra, en la demostrada presencia de receptores nicotínicos en los terminales retinianos tectales de la mayoría de los vertebrados [en teleósteos (King & Schmidt 1991), en anfibios (Titmus y col., 1999; Dudkin & Gruberg 2003), en mamíferos (Prusky & Cynader 1988; Binns & Salt 2000; Lee y col., 2001) y en aves (Sargent y col., 1989; Britto y col., 1992, 1994)]. De esta manera, los axones de lpc, podrían estar mediando, quizás por un efecto en volumen de acetilcolina (Agnati y col., 2000; Sarter y col., 2009), una facilitación pre-sináptica de la liberación de glutamato por parte de los axones de la retina. Aunque esta idea es ampliamente aceptada, no existen evidencias que confirmen que los núcleos lpc/SLu sean indiscutiblemente colinérgicos y que muestren a los terminales retinianos o a otras estructuras como blancos sinápticos de lpc. Como se plantea a continuación, el fenotipo neuroquímico de lpc está lejos de ser determinado, y los blancos sinápticos de lpc, si es que existe alguno, son hasta ahora desconocidos.

1.2 Identidad neuroquímica de los núcleos del istmo

Si bien ha sido ampliamente aceptado que las neuronas de SLu e lpc son colinérgicas y que el potente control de este último sobre el flujo visual ascendente podría ser producido por una modulación colinérgica pre-sináptica de los terminales retinianos (Marín y col., 2012), la identidad neuroquímica de

lpc no está del todo clara. Estudios basados en absorción y liberación de moléculas radioactivas han asignado un fenotipo glicinérgico y GABAérgico a las neuronas de lpc (Reubi & Cuénod, 1976; Hunt y col., 1977). Conclusión que pareció ser apoyada por experimentos electrofisiológicos realizados en palomas, en los cuales se observó que la estimulación de lpc producía efectos inhibitorios en el tectum (Felix y col., 1994). Sin embargo, otro estudio utilizando anticuerpos contra glutamato, mostró que procesos neuronales en las capas superiores del tectum eran immuno-reactivos y que parte de estos elementos se asemejaban a los terminales axónicos de lpc, sugiriendo que lpc podría ser un núcleo glutamatérgico (Morino y col., 1991).

Este problema pareció alcanzar una solución con el advenimiento de las técnicas de immuno-histoquímica, mediante las cuales varios estudios mostraron de manera consistente, tanto en el pollo como en la paloma, que lpc y SLu exhibían, respectivamente, una moderada y alta reactividad para anticuerpos contra la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), la enzima que sintetiza acetilcolina (Sorenson y col., 1989; Bagnoli y col., 1992; Medina & Reiner 1994; Wang y col., 2006; nuestros resultados, Figura 2; Figura 3). En el caso del lpc de la paloma, la immuno-reactividad para ChAT, la cual incluye los somas y sus conspicuos terminales axónicos, hizo que la idea del fenotipo colinérgico se reforzara y pasara a ser ampliamente aceptada.

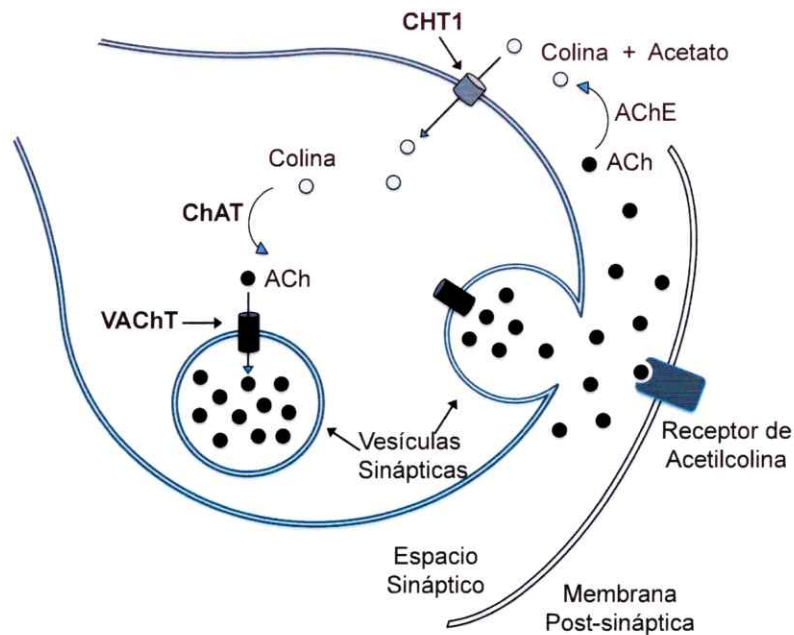


Figura 2. Esquema de las etapas principales en la síntesis y liberación de acetilcolina en una sinapsis colinérgica. En el citoplasma del terminal pre-sináptico, la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) sintetiza acetilcolina (ACh) a partir de colina y acetyl-CoA. Las moléculas de acetilcolina son luego translocadas al interior de vesículas sinápticas por el transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). Tras la liberación del neurotransmisor en el espacio sináptico, la enzima acetilcolina esterasa (AChE) rompe la acetilcolina en acetato y colina, siendo esta última finalmente recuperada por el terminal pre-sináptico mediante el transportador de alta afinidad de colina (CHT1).

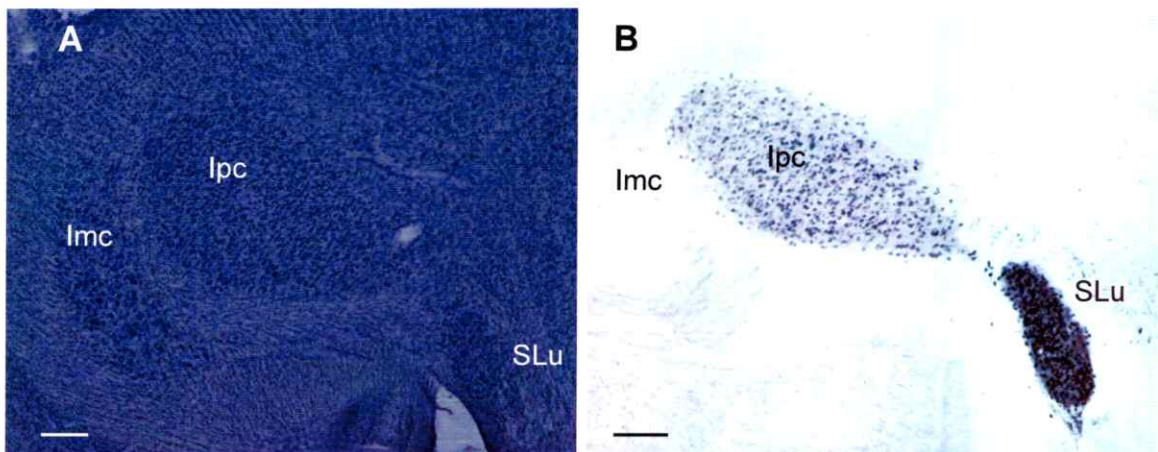


Figura 3. El complejo del istmo y su inmunoreactividad contra ChAT. A, Corte coronal de mesencéfalo de pollo teñido con Nissl donde se aprecian los 3 núcleos del istmo. B, Inmunohistoquímica anti-ChAT en donde se observa la alta y moderada reactividad presente en SLu e lpc, respectivamente. Barra de tamaño= 200μm.

Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* realizados en mi proyecto de tesis de pregrado, mostraron que el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), necesario para el llenado de vesículas sinápticas con acetilcolina (Figura 2), no es expresado por las neuronas de lpc (Figura 4), lo cual implica que estas neuronas si bien tendrían la capacidad de síntesis de acetilcolina, no serían capaces de llenar vesículas sinápticas, y por lo tanto, no podrían liberar acetilcolina por un mecanismo vesicular. Paralelamente, un estudio subsecuente en palomas, mostró la expresión del RNA mensajero para el transportador vesicular de glutamato (VGLUT2) en las neuronas de lpc (Islam & Atoji 2008). Además, un estudio reciente muestra inmunoreactividad anti-VGLUT2 en las capas superiores de TeO en la paloma (Atoji, 2011), lo cual concuerda con lo informado por Morino y col. (1991). Estos estudios renovaron la incertidumbre respecto al verdadero fenotipo de lpc.

Un fenotipo neuroquímico de lpc distinto al colinérgico implicaría cambios sustanciales sobre la manera de concebir la operación del sistema istmo-tectal, debido a que la supuesta acción pre-sináptica de la acetilcolina sobre terminales retinianos quedaría sin sustento. Este nuevo escenario nos obliga a replantear el posible mecanismo de modulación pre-sináptico antes descrito, pudiendo este mecanismo no ser necesariamente por volumen, ni tampoco pre-sináptico, sino que ser sustentado por relaciones sinápticas directas entre los axones de lpc y los somas o dendritas de una o más clases de neuronas tectales.

De igual manera, debido a la estrecha sincronía existente entre las respuestas de lpc y SLu, y el potente efecto de la actividad de lpc sobre la transmisión visual tectofugal, es de especial relevancia definir si estas señales coordinadas son ambas de naturaleza colinérgica o involucran la participación de distintos neurotransmisores.

Todo lo anterior, hace imprescindible la obtención de evidencia experimental que permita dilucidar si existen o no blancos sinápticos para lpc y, si existiesen, lograr identificarlos de manera inequívoca, en función de establecer el mecanismo que media el control de lpc sobre el flujo visual en la vía tectofugal.

VACHT

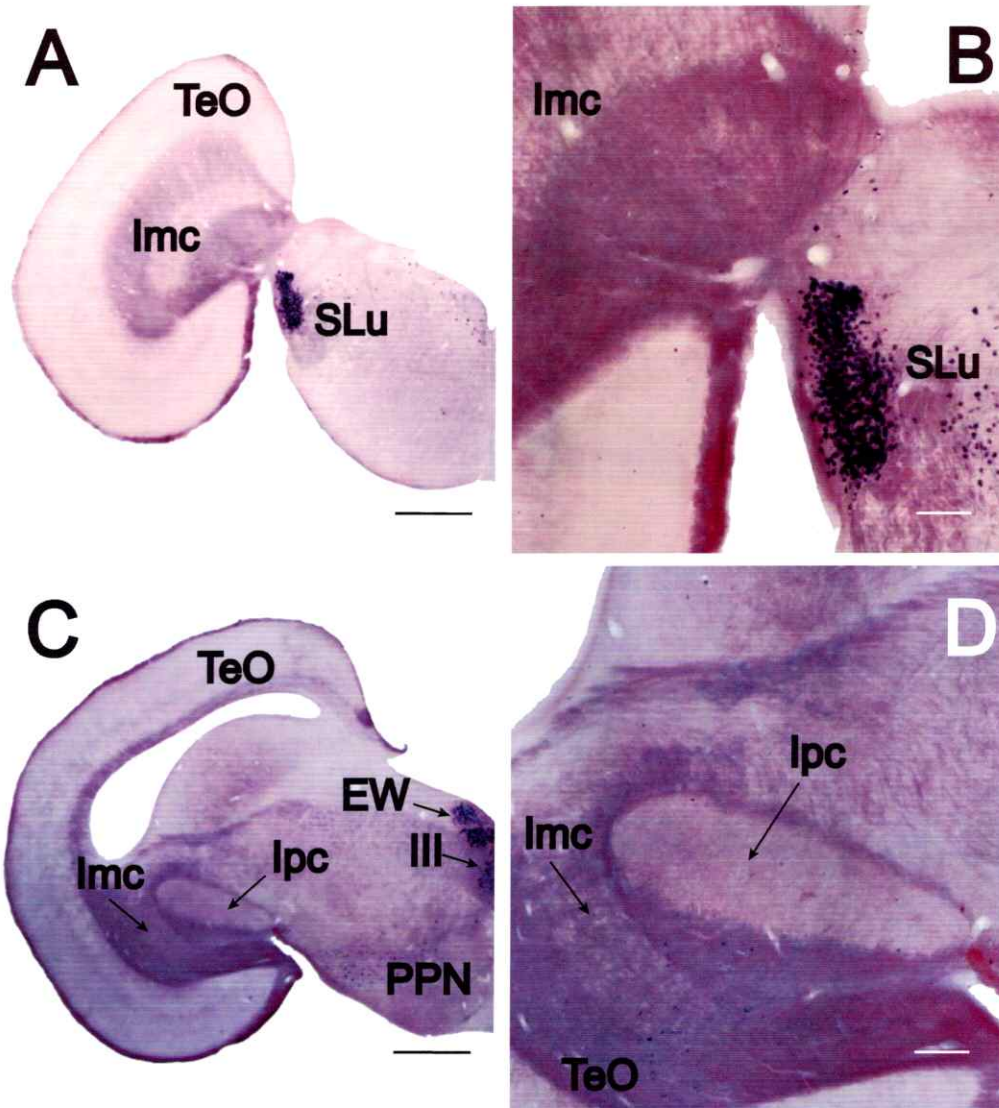


Figura 4. El núcleo isthmi pars parvocellularis (lpc) no expresa el RNA mensajero para el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Cortes coronales de mesencéfalo de pollo reaccionados en ensayos de hibridación *in situ* muestran una (A, B) alta expresión de VACHT en el núcleo isthmi pars Semilunaris (SLu) y (C, D) la total falta de expresión de dicho marcador en los cuerpos neuronales de lpc. Barras de tamaño: A y C=1mm; B y D = 200μm.

1.3 Posibles blancos sinápticos de los axones de lpc

Los terminales axónicos de lpc se ramifican en las capas superficiales del tectum óptico, concentrándose particularmente en la capa 5 y 2-3 (Wang y col., 2006), confluyendo con numerosos procesos y neuronas de diversa índole, en particular con los terminales axónicos de la retina, los terminales dendríticos de las TGCs (Luksch y col., 1998) y las dendritas de las células SC (Wang y col., 2006), todas estructuras relevantes en el contexto de la función istmo-tectal y tecto-fugal. Estudios de microscopía electrónica en palomas, han investigado a nivel de ultra-estructura las capas tectales superficiales (Hayes & Webster 1975; Angaut & Reperant 1976; Reperant & Angaut 1977; Tömböl y col., 2003), describiendo de manera detallada la ultra-estructura de los terminales retinianos y de otros elementos de esas capas, pero sin identificar el origen de esos elementos. Es decir, hasta ahora no se ha descrito la ultra-estructura de perfiles axónicos pertenecientes a lpc y sus posibles interacciones sinápticas. En particular, se desconoce si estos axones establecen relaciones pre o post-sinápticas, con alguna estructura a nivel tectal.

Considerando la organización anatómica del circuito y a la luz de la evidencia electrofisiológica, para esta tesis hemos propuesto tres posibles blancos sinápticos para lpc.

En primer lugar, debido a que los terminales axónicos de lpc se ramifican de manera masiva en la capa tectal 2-3 y en la capa 5, los terminales dendríticos

de las células ganglionares tectales tipo I (TGC I5a, I5b y I3; Figura 5) aparecen como probables blancos sinápticos, ya que terminan en las capas tectales 2-3 (TGC I3; Figura 5) y en la capa 5 (TGC I5a y TGC I5b; Figura 5) (Luksch y col., 1998). Las TGCs de tipo II (TGC II; Figura 5), cuyos terminales dendríticos terminan en la capa tectal 9, son otro probable blanco sináptico, debido a que sus arborizaciones dendríticas también se traslapan (Luksch y col., 1998) con ramificaciones axónicas pertenecientes a las células de lpc.

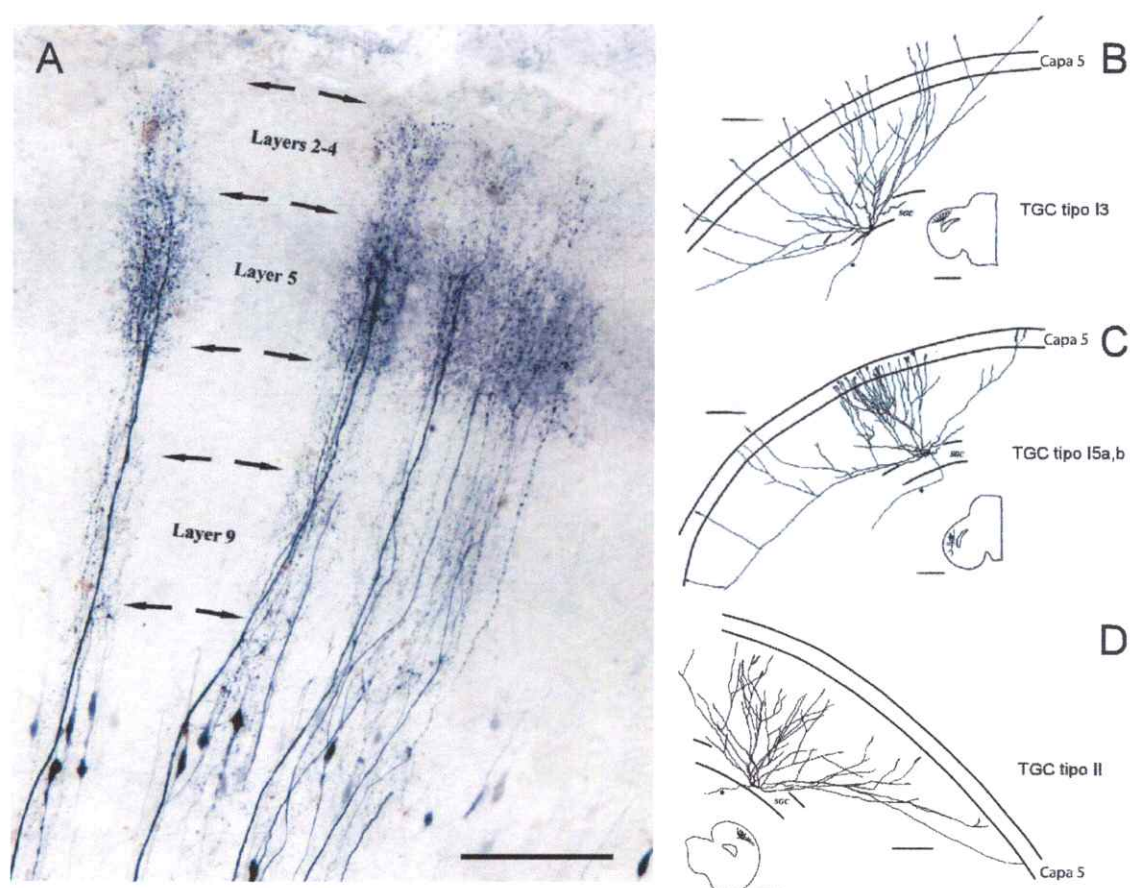


Figura 5. Las dendritas de las células ganglionares tectales (TGCs) y las terminaciones axónicas de lpc confluyen en TeO. A, Terminales de lpc marcados con cristales de biocitina. Los "paintbrushes" se ramifican densamente en las capas 5, 2-3 y moderadamente en la capa 9. Las terminaciones dendríticas de las TGCs, los "bottlebrushes", terminan de manera segregada en la capa 2-3 (**B**; TGC tipo I3), capa 5 (**C**; TGC tipo I5 a,b) y capa 9 (**D**; TGC tipo II). Esquemas B, C, D fueron tomados y modificados de Luksch H, Cox K, Karten HJ. J. Comp. Neurol. 1998 396:399-414, figuras 7,8,10. Barras de tamaño: A = 200mm. B, C y D = 200µm en dibujo principal y 2mm en recuadro.

Los terminales *paintbrush* también coinciden espacialmente con los terminales de la retina en todas las capas retino-recipientes, por lo cual una posible interacción entre estas estructuras también se vuelve interesante de investigar. Y por último, debido a que las células tectales de la capa 10, denominadas neuronas *Shepherd's crook*, poseen terminaciones dendríticas en las capas tectales superiores y proyectan su axón sobre lpc (Wang y col., 2006), llevando el input visual a éste, las convierte en el tercer posible blanco sináptico de este núcleo.

En resumen, considerando que la neuroquímica de lpc ha sido puesta en duda y sus relaciones sinápticas tectales son desconocidas, nos encontramos con que no existe claridad acerca del mecanismo por el cual el núcleo lpc controla el flujo visual tecto-fugal. Así, se hace imperativo conocer el verdadero fenotipo neuroquímico de lpc y su conectividad a nivel tectal para lograr articular un nuevo mecanismo que explique el fenómeno en estudio.

En función de determinar el fenotipo neuroquímico de lpc, en este proyecto de tesis clonamos secuencias específicas de cDNA y a partir de ellas, sintetizamos sondas de RNA marcadas con digoxigenina. Estas sondas fueron utilizadas para determinar la expresión de mRNAs relacionados con las funciones colinérgica y glutamatérgica mediante experimentos de hibridación *in situ*.

Los marcadores ensayados fueron:

- La enzima que sintetiza la acetilcolina, la colina acetiltransferasa (ChAT).
- El transportador de alta afinidad de colina (CHT1), recuperador de la colina desde el espacio sináptico.
- El transportador vesicular de glutamato (VGLUT2), el cual media el transporte del glutamato desde el citoplasma hacia el interior de vesículas sinápticas.

Además, ensayamos la expresión de VGLUT2 a nivel de proteína en los terminales axónicos de lpc, mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y el uso de trazadores neuronales.

Para establecer los posibles blancos sinápticos de lpc, realizamos inyecciones dobles de trazadores neuronales en lpc y en las estructuras pertinentes para lograr marcar de manera específica el terminal axónico de lpc y sus posibles blancos sinápticos, respectivamente. Finalmente, estas muestras, luego de ser reaccionadas mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunoro, se trataron para ser utilizadas en ensayos de microscopía electrónica de transmisión.

1.4 HIPOTESIS

Hipótesis 1: El núcleo *lpc* tiene una identidad neuroquímica glutamatérgica, a pesar de que evidencias previas indican que es colinérgico.

Hipótesis 2: Los blancos sinápticos de *lpc* involucran a los terminales de la retina, las células *Shepherd's crook* de la capa tectal 10 que proyectan a *lpc* y las células ganglionares tectales tipo I que proyectan al núcleo rotundus.

1.5 OBJETIVOS

I- Identificación del fenotipo neuroquímico de las células de lpc

- **Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante ensayos de hibridación *in situ* en el mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus*.**
- **Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante el uso de trazadores neuronales e inmuno-fluorescencia.**
- **Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante microscopía electrónica, utilizando inmuno-histoquímica, trazadores neuronales e inmuno-oro.**

II- Identificación y caracterización de los terminales axónicos de lpc mediante microscopía electrónica

III- Investigación e identificación de los blancos sinápticos de lpc a nivel tectal, mediante el uso de trazadores y microscopía electrónica, específicamente:

- **La relación entre lpc y las células ganglionares tectales**
- **La relación entre lpc y los terminales retinianos.**
- **La relación entre lpc y las células *Shepherd`s crook*.**
- **La relación entre los terminales retinianos y las célula ganglionares tectales.**

2. MATERIALES Y METODOS

Los experimentos fueron realizados en 52 pollos (*Gallus gallus domesticus*) de cualquier sexo (Hibridación *in situ*, n=31; inmuno-histoquímica, n=15; inmunofluorescencia, n=4; extracción de RNA y proteínas, n=2), obtenidos de un proveedor local (Don pollo, Pirque). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y en conformidad con las directivas de la NIH (National Institute of Health) en el uso de animales e investigación experimental.

2.1 Diseño de partidores y sondas de RNA

Las sondas de RNA fueron diseñadas usando las bases de datos de nucleótidos para el pollo y las herramientas bioinformáticas de alineamiento disponibles en el sitio "web" de la National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Con el fin de poder amplificar secuencias de DNA (cDNA) correspondiente a cada sonda diseñada, se diseñaron pares de partidores específicos (Tabla 1) y se sintetizaron comercialmente (IDT DNA, USA). Se seleccionaron las siguientes regiones de cada transcrito para cada sonda:

- ChAT (NM_204610; 755-1168)

-CHT1 (NM_001001763; 1189-1567)

-VGLUT2 (NM_001168383; 14-330)

Todas las secuencias elegidas están ubicadas en la región codificante de su correspondiente RNA mensajero (Figura 37).

Tabla 1. Partidores específicos.

Marcador	Partidor "Forward"	Partidor "Reverse"	Alineamiento (°C)	Fragmento (bp)
ChAT	5'-AGTGGGCAGAGGCCAGGACA-3'	5'-AGGATGCCAAGTGC GCCTGA-3'	62.0	414
CHT1	5'-TGCTGGCATCATCAGTGTACGGC-3'	5'-ACTGTACCTCGCAACCACAGCA-3'	62.0	379
VGLUT2	5'-GGCTCTGCACGCCGTCTCTC-3'	5'-TCGATGGTGTCCCGGGCTT-3'	61.5	317

2.2 Extracción de RNA

Muestras de RNA total fueron extraídas de mesencéfalo de pollo, de 1 a 2 semanas de vida. El tejido fue homogenizado en 1 mL de RNAsolv (Omega Biotek, USA) con un homogenizador mecánico, y mezclado con 0,2 mL de cloroformo en un vortex por 15 segundos. Luego, la mezcla fue incubada durante 10 minutos en hielo y centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente (Centrifuge 5424, Eppendorf). Para precipitar el RNA, la fase acuosa fue recuperada, mezclada con 0,5 mL de alcohol isopropílico en un nuevo tubo, incubado por 10 minutos y centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet fue lavado con 1 mL de etanol 80%, centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a temperatura ambiente, secado al aire y reconstituido con 70 μ L de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC).

2.3 RT-PCR

Para sintetizar cDNA de simple hebra a partir de RNA poli-A, se realizó transcripción reversa usando la transcriptasa Improm-II (Improm-II™ Reverse transcriptase, Promega, Madison, WI USA) y partidores oligo(dT). Un tubo, conteniendo 1 µg de RNA total y 1 µL de partidador oligo(dT), se incubó por 5 minutos a 70°C. Posterior a la incubación, la mezcla de transcripción (1 µL transcriptasa reversa; 2,5µL de MgCl₂ 25 mM; 1µL inhibidor de RNAsa (RNAsin, Promega, Madison, WI USA); 1 µL DNTP's 10 mM; 4 µL de buffer de reacción 5x) fue agregada a la mezcla de RNA/oligo(dT) pre-calentada y fue incubada a 42°C por 60 minutos.

2.4 PCR

El cDNA obtenido se usó como templado en reacciones de PCR, para las cuales se utilizó la polimerasa Taq (Go-Taq, Promega, Madison, WI USA). Las reacciones de PCR fueron hechas en 35 ciclos de amplificación (desnaturalización 30s a 94°C; alineamiento por 60s a la temperatura indicada en la tabla 1; extensión por 50s a 72°C; extensión final por 10 min a 72°C). Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa 1,5% y los fragmentos de DNA doble hebra con el tamaño esperado fueron cortados del gel para ser purificados con un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR clean up system, Promega, Madison, WI USA) de acuerdo al protocolo del fabricante.

2.5 Clonamiento

Las cuatro secuencias de DNA doble hebra obtenidas fueron clonadas en un vector de amplificación (p-GEMT easy vector, PROMEGA, Madison, WI USA) de acuerdo a protocolo del fabricante. Bacterias DH5 α termo-competentes fueron transformadas mediante *shock* térmico (42°C por 90s) y sembradas en placas de Petri con medio LB/Agar-XGAL (LB Broth 2,5%, MO BIO, Carlsbad, CA USA; Agar 2%, Bacto Agar BD, Sparks, MD; XGAL 40 mg/mL, US Biological, Swampscott, MA USA). Los clones positivos (con fragmento de interés insertado) fueron seleccionados por la no expresión del gen LacZ (colonias blancas) y luego amplificados en medio LB-Ampicilina (Ampicilina, US Biological, Swampscott, MA USA) en agitación durante 16 horas a 37°C. El cultivo luego fue "pelleteado" mediante centrifugación (13.000 X RPM) y el DNA plasmidial fue purificado usando un kit de miniprep comercial (QIAprep spin miniprep kit, QIAGEN, Valencia, CA). El DNA purificado fue posteriormente secuenciado (Unidad de secuenciación, Pontificia Universidad Católica de Chile).

2.6 Síntesis de sondas de RNA

El DNA plasmidial purificado fue linealizado mediante digestión enzimática utilizando las enzimas de restricción HincII o ZraI (Fermentas, Vilnius, Lithuania), para cada sonda "sentido" o "anti-sentido", dependiendo de la orientación de inserción en la que cada fragmento se encuentra en el plásmido

para cada clon. Para cada sonda, 5 μg de DNA fueron digeridos con 20 unidades de enzima a 37 °C durante 16-20 h en una reacción final de 100 μL . El DNA linealizado fue luego purificado utilizando un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI USA) y usado como templado para la síntesis de sondas de RNA.

Las sondas de RNA marcadas con digoxigenina fueron sintetizadas *in vitro* utilizando las RNA polimerasas SP6 y T7 (Riboprobe in vitro transcription systems, Promega, Madison, WI USA) y una mezcla de ribonucleótidos marcados con digoxigenina (Dig RNA labelling mix 10X, Roche, Mannheim, Alemania). La mezcla de reacción fue: 1 μg de DNA lineal; 1 μL de Dithiothreitol (DTT) 100 mM; 1 μL de RNasin; 1 μL de mezcla de ribo-nucleótidos marcados 10 mM; 4 μL de buffer de transcripción 5X. Finalmente, las sondas de RNA marcadas con digoxigenina fueron purificadas usando un kit comercial (E.Z.N.A. RNA Probe purification kit, OMEGA biotek) y almacenadas a -80°C.

2.7 Hibridación *in situ*

Treinta y un pollos entre 2 a 4 semanas de edad fueron perfundidos transcardialmente bajo anestesia profunda (ketamina/xylazina 75/5mg/kg), usando 300 mL de solución salina (NaCl 0,75%) seguido de 250 mL de solución de fijación (0,01 M buffer fosfato, pH 7,4; 0,02% NaCl; 4% paraformaldehído (PFA)). Se retiraron los cerebros del cráneo y se incubaron en una solución de post-fijación/crio-protección (30% sacarosa, 4% para-formaldehído en agua

DEPC) durante 24-48h a 4°C hasta que se hundieron. Los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 100 μm usando un micrótomo de congelación (Leitz 1400). Las secciones en flotación se lavaron 3 veces en buffer fosfato/salino (PBS; 0,01 M buffer fosfato, pH 7,4; 0,02% NaCl en agua DEPC) y fueron tratados con una solución de peróxido-PBS-T (6% peróxido de hidrogeno, 0,1% Tween 20, Promega, Madison, WI USA) durante 30 minutos. Luego, las secciones se incubaron en una solución de proteinasa k-PBST (0,01 M buffer fosfato, pH 7,4; Proteinasa K 10 mg/mL, Promega, Madison, WI USA; 0,1% Tween 20) por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez en PBST, se fijaron en una solución de PFA 4% en PBST durante 20 minutos, fueron posteriormente lavadas 3 veces en PBST y pre-hibridadas a 65°C en buffer de hibridación durante 3 horas (formamida 50%, Merck, Darmstadt, Alemania; 1,3X buffer SSC pH 5,3; Winkler, Santiago, Chile; EDTA 5 mM, Winkler, Santiago, Chile; tRNA de esperma de salmón, 200 mg/ml; Tween 0,002%, Promega, Madison, WI USA; CHAPS 0,005%, Calbiochem, La Jolla, CA USA; Heparina 100 mg/ml, Calbiochem). Después de agregar la sonda respectiva y haber sido incubadas por 16-18h a 65-70°C, las secciones fueron lavadas 2 veces en solución A (SSC 5X pH 5,3; formamida 50%; SDS 1%) a 65°C durante 30 minutos y tres veces en solución B (SSC 2,5X pH 5,3; formamida 50%; Tween1%) a 65°C durante 30 minutos. Luego de dos lavados en buffer de ácido málico (MABT; 100 mM ácido málico, Sigma; 0,1% Tween-20, Promega; 150 mM NaCl) las secciones fueron incubadas en solución de

bloqueo (Blocking Reagent 2%, Roche, IN USA; Suero de cabra inactivado 2%, en MABT) durante cuatro horas a temperatura ambiente y luego incubadas durante 16-20 h a 4°C con anti-cuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (anti-digoxigenin-AP Fab fragments from sheep, Roche, Mannheim, Alemania), dilución 1/1000 en MABT. Finalmente, las secciones fueron lavadas seis veces en MABT, incubadas en solución de reacción para fosfatasa alcalina (Tris 100 mM pH 9,5; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tween 1%), y reveladas agregando el reactivo NBT/BCIP (NBT/BCIP Stock Solution, Roche, Mannheim, Alemania) en incubación a temperatura ambiente durante 3-16 horas.

2.8 Procedimientos quirúrgicos para la inyección de trazadores neuronales

Los pollos fueron anestesiados mediante inyección intra-muscular de ketamina (75 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg), para luego ser ubicados en el equipo esterotáxico que no interfirió con el campo visual del animal. La anestesia fue mantenida durante la cirugía a lo largo del experimento mediante la infusión de un 15% de la dosis inicial cada 90 minutos vía una cánula intra-muscular. Durante el experimento la temperatura corporal del animal fue mantenida por medio de una camisa termo-regulada (DC temperature controller; FHC Inc., Bowdoin, ME). Un par de pequeñas ventanas fueron abiertas en el lado derecho del cráneo, exponiendo la parte dorso-lateral del tectum (cuando lpc era el núcleo a explorar) y la parte dorso-medial del telencéfalo (cuando el rotundus

era el núcleo a explorar). Para ambos casos, la dura fue perforada usando una pinza fina.

2.9 Inyecciones de Leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L)

Siete animales (5 no enucleados, 2 enucleados) recibieron una inyección del trazador anterógrado PHA-L en el núcleo lpc. Para inducir la degeneración de los terminales retinianos, en dos animales se removió el ojo contralateral al hemisferio inyectado. Para ubicar el núcleo lpc, se realizaron registros esterotáxicos exploratorios con electrodos de tungsteno (1 MOhm FHC, ME USA) y un amplificador extracelular (model 3600, AM Systems). Las respuestas visuales de lpc fueron provocadas moviendo manualmente un láser sobre una pantalla tangencial. Una vez identificado lpc, una micropipeta cargada con PHA-L (PHA-L 2,5% en buffer fosfato 10mM, pH 8), con un diámetro de punta de entre 10-15 μm , fue bajada hasta el núcleo y se realizó la inyección del trazador por iontoforésis (7 μA por 35 minutos con ciclos de 7s "on" 7s "off"). Los animales fueron perfundidos luego de un tiempo de sobrevivencia de 7-10 días (no enucleados) y treinta días (enucleados). Tres de los animales no enucleados inyectados fueron perfundidos y sus cerebros preparados para microscopia electrónica.

2.10 Inmuno-histoquímica e Inmuno-fluorescencia

Después de la perfusión, los cerebros fueron retirados del cráneo, incubados en solución de post-fijación crio-protectora (30% sacarosa, 4% paraformaldehído en agua DEPC) durante 24-48h y cortados en secciones coronales de 60 μm usando un micrótopo de congelación (Leitz 1400). Previo a la adición de anticuerpos primarios, las secciones fueron lavadas 3 veces en PBS, incubadas en buffer citrato (Citrato de sodio 0,01 M) a 80°C por 30 minutos, lavadas 3 veces en PBS, e incubadas por 60 minutos en solución de bloqueo (suero normal de burro (NDS)-PBST, NDS 3%, Tritón X-100 0,1%). Luego, los anticuerpos primarios fueron agregados y las secciones incubadas por 24 horas a 4°C con agitación. Los anticuerpos primarios anti-PHAL (anti-PHA-L biotinilado hecho en conejo, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) y anti-VGLUT2 (anti-VGLUT2 N29/29 hecho en ratón, UC Davis/NIH NeuroMab Facility, Davis, CA USA) se utilizaron a una dilución de 1:5000 en NDS-PBST 3% y 1:2000 en 3% NDS-PBST, respectivamente.

Para inmuno-histoquímica simple anti-VGLUT2, luego de la incubación en el anticuerpo primario, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron por 2 horas con anticuerpo secundario biotinilado (anti-ratón biotinilado hecho en caballo, Vector Laboratories, Burlingame, CA) a una dilución de 1/200 en 3% NDS-PBST. Luego de tres lavados en PBS, las secciones fueron incubadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Luego de tres

lavados en PBS y uno en buffer Tris (Tris 0,05 M, pH 7,4), las secciones se dejaron 10 minutos en solución diaminobenzidina (DAB; Diaminobenzidine 0,025% en buffer Tris; Sigma) con sulfato de níquel 0,01M (Merck, Darmstadt, Alemania). Luego se agregaron 40 μ L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 0,03% en H_2O) y se dejaron reaccionar durante 3-5 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de buffer Tris. Luego se realizaron dos lavados en PBS y uno en buffer fosfato 0,1M (PB; pH 7,4). Para revelar las inyecciones de PHA-L, realizamos inmuno-histoquímica simple anti-PHA-L. Luego de la incubación en el anticuerpo primario, las secciones se lavaron tres veces en PBS, se incubaron en solución ABC y fueron reveladas como se describió anteriormente.

Para inmuno-fluorescencia doble, los anticuerpos primarios anti-PHA-L hecho en conejo (anti-PHAL no conjugado hecho en conejo, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) y anti-VGLUT2 se agregaron juntos en el primer paso de incubación. Luego, las secciones se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes complementarios (Alexa Fluor 568 anti-ratón hecho en cabra IgG (H+L) y Alexa Fluor 488 anti conejo hecho en cabra IgG (H+L); Invitrogen, Eugene, OR).

2.11 Estimación de densidad celular

Para determinar si el marcaje de VGLUT2 y ChAT obtenido en ensayos de hibridación *in situ* e inmuno-histoquímica, respectivamente, corresponde a una co-expresión de ambos marcadores en todas las células de lpc o corresponde

a poblaciones neuronales distintas, comparamos la densidad celular del núcleo obtenida en dichas preparaciones con la obtenida en material marcado con tinción de Nissl. Dos pollos de ocho semanas de edad fueron perfundidos, los cerebros fueron retirados del cráneo, incubados en solución de post-fijación crio-protectora (30% sacarosa, 4% paraformaldehído en agua DEPC) durante 24-48h y cortado en secciones coronales de 80 μm usando un micrótopo de congelación (Leitz 1400), obteniéndose tres series para cada cerebro. Para ambos cerebros las respectivas series fueron usadas en ensayos de hibridación *in situ* para VGLUT2, inmuno-histoquímica anti-ChAT y tinción de Nissl. Usando el método de fraccionador óptico del programa Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, VT) contamos células en cinco secciones alternadas por cada serie. En cada sección, marcos de conteo de 80 por 80 μm , con 20 μm de profundidad, fueron distribuidos sobre el núcleo lpc usando una grilla de muestreo aleatorio sistemático. En cada sitio fue medido el grosor del corte con el foco del microscopio estableciéndose zonas de exclusión encima y debajo de los límites determinados para el eje z (20 μm) en el marco de conteo. Se contaron las neuronas cuando éstas estaban en foco dentro del marco de conteo o tocando alguna de los tres bordes de inclusión y no tocando ninguno de los otros tres bordes considerados de exclusión (Gundersen et al., 1988). Para estimar la densidad celular, el número total de células contadas fue dividido por el volumen de muestreo total. El encogimiento de volumen debido a cada tratamiento fue considerado y el volumen total de muestreo corregido de

acuerdo a éste. Los datos de densidad celular informados corresponden a los valores promedio entre ambos animales.

2.12 Western Blot

Proteínas de extracto cerebral de pollo y ratón fueron separadas mediante SDS-PAGE en geles de poli-acrilamida 10% y posteriormente electro-transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (TBS Tween 0,1%, leche 5%), luego se incubaron con el anticuerpo primario con una dilución de 1/500 en solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C en agitación. Se realizaron 5 lavados de 10 minutos con TBS Tween 0,1% y se incubó el anticuerpo secundario asociado a peroxidasa en una dilución de 1/10.000 en solución de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente. Luego de 5 lavados con TBS Tween 0,1% se reveló la inmuno-reactividad sobre las membranas mediante la reacción luminol/peroxidasa, la cual fue detectada mediante placas radiográficas ubicadas sobre las membranas en un cassette de revelado.

2.13 Inyecciones dobles de trazadores neuronales para microscopia electrónica

2.13.1 PHA-L y *Biotinilated dextro-amine* 3000 DA (BDA 3k)

Según el método descrito anteriormente, se inyectaron de manera consecutiva ambos trazadores, primero en el núcleo lpc con el trazador neuronal PHA-L

(parámetros electroforesis descritos anteriormente) y luego, en el núcleo rotundus en el tálamo ipsilateral. Esta última, se realizó mediante iontoforesis (7 μ A por 35 minutos con ciclos de 7s "on", 7s "off") con una pipeta cargada con BDA 3k (BDA 3k 10% en buffer fosfato 0,1 M, pH 8,0; Invitrogen, Eugene, OR USA) con diámetro de punta de entre 25-35 μ m. Luego de 7-10 días de sobrevida, los animales fueron perfundidos y el cerebro preparado para microscopía electrónica.

2.13.2 PHA-L y *Cholera Toxin Subunit B* (CTB)

Se inyectaron de manera consecutiva ambos trazadores, primero el núcleo lpc con el trazador PHA-L (parámetros electroforesis descritos previamente) y luego se inyectaron 25 μ L de CTB (2% en buffer fosfato 2% Dimetil sulfóxido (DMSO)) con una jeringa Hamilton en el ojo contralateral. Luego de 7-10 días de sobrevida, los animales fueron perfundidos y el cerebro preparado para microscopía electrónica.

2.14 Inmuno-histoquímica e inmuno-oro para microscopía electrónica

Luego de 7 a 10 días post-cirugía, los animales doble-inyectados fueron perfundidos y sus cerebros preparados para microscopía electrónica. Los tejidos fueron cortados utilizando un vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) en secciones de entre 60-80 μ m, crioprotegidas en solución CP (CP; 10% glicerol, 25% sacarosa en PB 0,1M) y permeabilizados mediante

2-3 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido (método de *freeze/thaw*).

Durante la inmuno-histoquímica, los trazadores se revelaron mediante el depósito de DAB y/o NiDAB. Posteriormente, las secciones fueron fijadas en tetróxido de Osmio, deshidratados y embebidos en resina epóxica según protocolo (ver sección *Preparación de tejidos para microscopía electrónica*).

2.15 Preparación de tejidos para microscopía electrónica

Los animales previamente inyectados con inyecciones dobles o simples de trazadores neuronales, fueron perfundidos con buffer fosfato (PB_{EM}; 0,01 M buffer fosfato, pH 7,4; 0,876% NaCl, 0,02% KCl) seguidos de 160 mL de solución de fijación (Buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4; PFA 3%, glutaraldehído 0,1%). Después de remover el cerebro se post-fijó en la misma solución de perfusión durante 60 minutos. El cerebro se cortó en secciones coronales de 60 µm en vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las secciones previamente reaccionadas y reveladas por inmuno-histoquímica o inmuno-oro, fueron dispuestas en placas de Petri de vidrio cuidando de que quedasen completamente estiradas y se post-fijaron en una solución de tetróxido de osmio (Tetróxido de osmio 1% en PB; Oxkem, Oxford, UK) durante 40 minutos. En el caso de muestras reaccionadas con técnicas de inmuno-oro, la post-fijación con tetróxido de osmio solo se realizó durante 7 minutos. Luego, las secciones fueron lavadas en PB_{EM} (PB_{EM}; 0,01 M buffer fosfato, pH 7,4) y deshidratadas

en series ascendentes de diluciones de etanol (etanol 50% por 15 minutos, etanol 70% con 1% uranil acetato por 40 minutos; TAAB, Reading, UK; etanol 95% por 15 minutos y dos pasos por etanol absoluto). Seguido a la deshidratación, las secciones fueron sometidas a dos pasos por oxido de propileno (Sigma, Saint Louis, MO USA) por 10 minutos para luego ser trasladadas con un mondadientes dentro de la resina (Durcupan ACM, Fluka, Gillingham, UK) y dejados por 16 horas a temperatura ambiente bajo campana. La resina fue calentada para disminuir su viscosidad y facilitar el traspaso de las secciones a porta objetos previamente tratados (frotados sobre la propia piel), cubiertos por un cubre-objetos, para finalmente curar la resina a 65°C por 48 horas.

2.16 Microscopía electrónica

Las secciones se examinaron bajo microscopio de luz para seleccionar las zonas de interés. La zona elegida fue cortada del portaobjeto, pegada en un bloque de resina y el bloque fue esculpido con un cuchillo. Secciones seriales de alrededor de 50 nm de grosor fueron cortadas en un ultramicrotomo (Leica EM UC6, Leica Microsystems) y colectadas en grillas de cobre de ranura simple tratadas con piroloform (Agar Scientific, Stansted, UK). Para la examinación en el microscopio electrónico, el contraste fue mejorado incubando las secciones en una solución de citrato de plomo. Se utilizaron 2 microscopios electrónicos para examinar los tejidos, Philips CM10 y Phillips CM100.

2.17 Reconstrucción 3D

A partir de secciones ultra-finas consecutivas, se realizaron reconstrucciones 3D, utilizando la herramienta "*Reconstruct*", programa de libre acceso de la Universidad de Texas:

<http://synapses.clm.utexas.edu/tools/reconstruct/reconstruct.stm>

2.18 Análisis Glomerular

A partir de series de entre 50-60 secciones ultrafinas (50 nm) consecutivas, obtenidas de regiones tectales de animales (n=3) con axones de lpc marcados con PHA-L, se analizaron engrosamientos axónicos y estructuras glomerulares de lpc en cuanto a cantidad de perfiles dendríticos en aposición por perfiles de

lpc marcados y sinapsis establecidas con éstos. Se eligieron glomérulos y engrosamientos completos (Capa 2-3, n=10; Capa 5, n=15; Capa 9, n=9) y se recorrieron de principio a fin, sección por sección, en series de imágenes alineadas en el programa *Reconstruct*. Para establecer la relación de volumen entre las estructuras glomerulares reconstruidas a nivel ultra-estructural y las estructuras tipo botón observadas en microscopia de luz, se realizaron estimaciones de volumen de éstas. Para estructuras obtenidas por microscopía electrónica, el volumen se calculó mediante la sumatoria de áreas trazadas, correspondientes a perfiles marcados de lpc, en series consecutivas para glomérulos/engrosamientos completos (Capa 2-3, n= 5; Capa 5, n= 4; Capa 9, n=5), multiplicadas por el grosor de las secciones ultrafinas (50 nm) utilizadas ($V_G=(A_1+\dots A_n) \times 50$; Tabla 3). En el caso de las estructuras observadas por microscopía de luz, en animales (n=3) con axones de lpc marcados con PHA-L, éstos se midieron a distintos niveles tectales (Capa 2-3, n= 122; Capa 5, n= 151; Capa 9, n=62), asumiendo las estructuras circulares (botones) como elipses. Luego de medir ambos radios de la elipse, se generaron sólidos de revolución para calcular su volumen (Tabla 3). Las mediciones fueron realizadas sobre micrografías con el programa *ImageJ* (NIH, USA).

3. RESULTADOS

3.1 Identificación del fenotipo neuroquímico de las células de lpc.

3.1.1 Identificación del fenotipo neuroquímico de lpc mediante ensayos de hibridación *in situ* en el mesencéfalo de *Gallus gallus domesticus*.

3.1.1.1 Amplificación y clonamiento de fragmentos específicos de cDNA de ChAT, CHT1 y VGLUT2.

A partir de mesencéfalos de pollos de entre 5 y 15 días de edad, realizamos extracción de RNA mensajero (mRNA) y mediante RT-PCR amplificamos cDNA polyA total. El cDNA fue utilizado como templado para la amplificación específica de los fragmentos previamente seleccionados mediante el diseño de partidores de DNA específicos en ensayos PCR. Luego de ser separados por electroforesis en geles de agarosa detectamos la presencia de bandas de DNA de alrededor de 410, 380 y 320 pares de bases, correspondiente a los fragmentos amplificados para ChAT, CHT1 y VGLUT2, respectivamente (Figura 6; Tabla 1). Estos fragmentos fueron clonados y utilizados como templado en la síntesis de sondas de RNA "en sentido" y "anti-sentido" para ensayos de hibridación *in situ*.

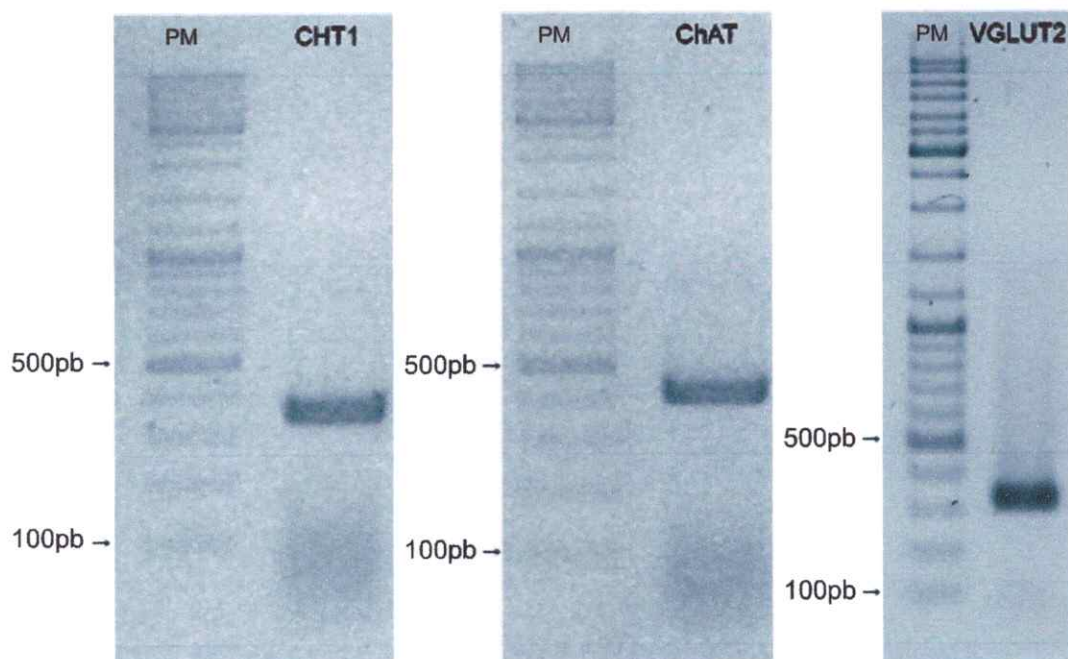


Figura 6. Amplificación de cDNA. Fotografías de separación electroforética en geles de agarosa, de fragmentos específicos de DNA amplificados por RT-PCR de 380, 410 y 320 pares de bases, correspondientes con los fragmentos amplificados para CHT1, ChAT y VGLUT2, respectivamente. PM = escala de referencia de pesos moleculares.

3.1.1.2 Hibridación *in situ*

Realizamos ensayos de hibridación *in situ* para VACHT (n=13), ChAT (n=6), CHT1 (n=6) y VGLUT2 (n=6) en secciones coronales de cerebro de pollo cuyas edades fluctuaban entre uno a cuarenta días post natal (p1- p40). Debido a que no se observaron claras diferencias en este rango de edades, presentamos estos datos como grupo muestral único. Todas las sondas anti-sentido dieron como resultado un marcaje específico, de acuerdo a la región del cerebro que fue ensayada y dichos resultados fueron consistentemente repetibles en diferentes animales. Así mismo, no se detectó marcaje alguno cuando se utilizaron sondas "en sentido" para los mismos ensayos.

3.1.1.3 Complejo del istmo

Como era de esperar, debido a la identidad colinérgica sugerida por reportes de inmuno-histoquímica de ChAT (Sorenson y col., 1989; Medina & Reiner 1994; Wang y col., 2006) y expresión de mRNA de VACHT (Hibridación *in situ* de VACHT, tesis pregrado del autor) los marcadores colinérgicos ChAT y CHT1 resultaron estar fuertemente expresados en las neuronas de SLu (Figura 7). La intensidad del marcaje fue similar a la encontrada en neuronas colinérgicas del complejo oculomotor y los otros núcleos motores del tronco encefálico en el mismo corte. Las neuronas marcadas estaban densamente empaquetadas, tal como ocurre en secciones tratadas con tinción de Nissl, indicando que todas las neuronas de SLu se marcaron de igual manera para los marcadores colinérgicos.

Sorprendentemente, la ausencia de expresión del mRNA para VACHT (tesis de pregrado del autor; Figura 4; 7) en lpc, estuvo acompañada de una débil marca para ChAT y un marcaje moderado para CHT1 (Figura 7). Por otra parte, lpc mostró una intensa expresión del mRNA de VGLUT2 (Figura 7), el cual parece incluir todos los somas neuronales del núcleo. Esto fue confirmado mediante la comparación entre la densidad de neuronas marcadas en ensayos de hibridación *in situ* para VGLUT2 (9.03×10^3 células/mm³, SD= 4.04×10^2 ; n=2) con la densidad total estimada de neuronas de lpc en secciones tratadas con tinción de Nissl (1.08×10^4 células/mm³, SD= 4.27×10^2 ; n=2; Figura 3). Una densidad celular para lpc similar se obtuvo en secciones reaccionadas en

ensayos de inmuno-histoquímica anti-ChAT (9.22×10^3 células/mm³, SD= 2.14×10^3 ; n=2), indicando que todas las neuronas de lpc son VGLUT2 (mRNA) y ChAT positivas.

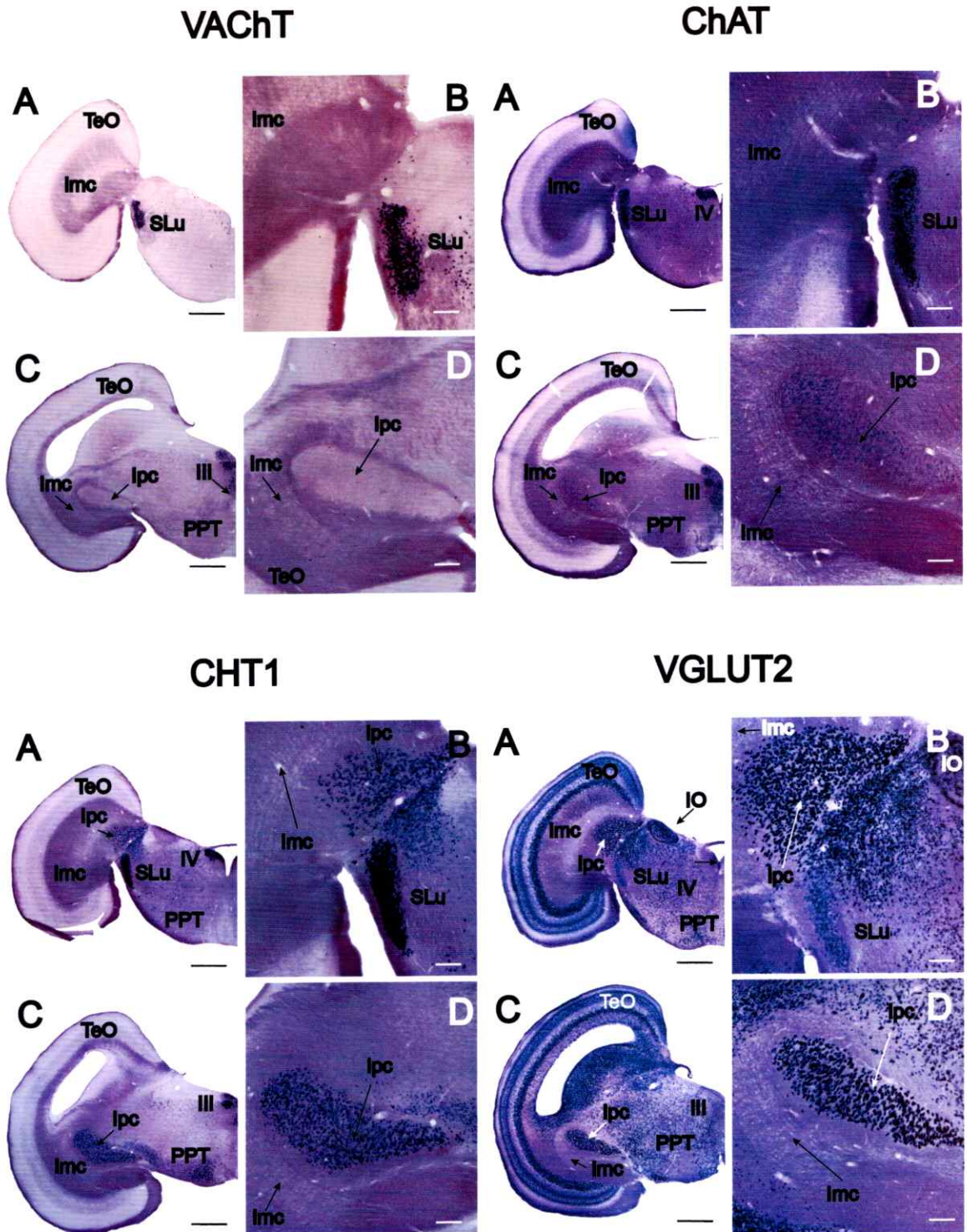


Figura 7. Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatergicos en la región del istmo. Microfotografías de cortes coronales de la región del istmo mostrando ensayos de hibridación *in situ* para sondas de VACHT, ChAT, CHT1 y VGLUT2). Barra de tamaño: A, C = 1mm; B, D = 0,2mm.

Por otra parte, como era de esperar para un núcleo GABAérgico, (Domenici y col., 1988; Wang y col., 2004; Sun y col., 2005), lmc no mostró marcaje alguno en sus neuronas en la totalidad de ensayos para marcadores colinérgicos y glutamatérgicos.

En conjunto, estos resultados muestran una expresión incompleta de los marcadores de fenotipo colinérgico en lpc, sugiriendo fuertemente un fenotipo glutamatérgico para este núcleo. Además, confirman una identidad colinérgica para SLu.

3.1.1.4 Otras estructuras cerebrales

Los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos marcaron de manera consistente todas las estructuras colinérgicas y glutamatérgicas conocidas en el cerebro del pollo. El patrón de marcaje colinérgico de ambos marcadores fue idéntico al reportado previamente para la expresión del mRNA de VAcHT en el cerebro del pollo (tesis de pregrado del autor). Sólo apreciamos una discrepancia a este respecto, en el núcleo spiriformis medialis (SPM), el cual no mostró expresión de CHT1 (Figura 7. Tabla 2). A continuación se detallan brevemente las estructuras marcadas en los distintos niveles anatómicos del cerebro del pollo.

Tabla 2. Distribución de RNAs mensajeros para los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el cerebro de *Gallus gallus domesticus*.

Abrev	Núcleo	VGLUT2	VAcHT	ChAT	CHT1
AA	Arcopallium Anterius	+	-	-	-
AD	Arcopallium Dorsale	+	-	-	-
AI	Arcopallium Intermedum	+	-	-	-
AM	Arcopallium Mediale	+	-	-	-
Bas	Nucleus Basorostralis pallii	+	-	-	-
Cbl	Nucleus Cerebellaris Internus	+	-	-	-
CbL	Nucleus Cerebellaris Lateralis	+	-	-	-
CbM	Nucleus Cerebellaris Intermedius	+	-	-	-
Cos	Nucleus Commissuralis Septi	-	+	+	+
DIP	Nucleus Dorsointermedius Posterior Thalami	+	-	-	-
DLAmc	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami, pars magnocellularis	+	-	-	-
DLL	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami, pars lateralis	+	-	-	-
DLM	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami, pars medialis	+	-	-	-
DLP	Nucleus Dorsolateralis Posterior Thalami	+	-	-	-
DMA	Nucleus Dorsomedialis Anterior Thalami	+	-	-	-
DMP	Nucleus Dorsomedialis Posterior Thalami	+	-	-	-
E	Entopallium	+	-	-	-
EW	Nucleus Edinger-Westphal	-	+	+	+
FRL	Formatio Reticularis Lateralis Mesencephali	+	-	-	-
FRM	Formatio Reticularis Medialis Mesencephali	+	-	-	-
GLdp	Nucleus Geniculatus Lateralis, pars dorsalis principalis	+	-	-	-
GLv	Nucleus Geniculatus Lateralis, pars ventralis	-	-	-	-
GP	Globus Pallidus	-	+	+	+
HA	Hyperpallium Apicale	+	-	-	-
HD	Hyperpallium Densocellulare	+	-	-	-
HI	Hyperpallium Intercalatum	+	-	-	-
HL	Nucleus Habenularis Lateralis	+	-	-	-
HM	Nucleus Habenularis Medialis	+	-	-	-
Hp	Hippocampus	+	-	-	-
ICo	Nucleus Intercollicularis	+	-	-	-
IHA	Nucleus Interstitialis Hyperpallii Apicale	+	-	-	-
Imc	Nucleus Isthmi, pars magnocellularis	-	-	-	-
IO	Nucleus Isthmi-Opticus	+	-	-	-
Ipc	Nucleus Isthmi, pars parvocellularis	+	-	+	+
LDT	Núcleo Tegmental Laterodorsal	-	+	+	+
LHy	Regio Lateralis Hypothalami	+	-	-	-
LLd	Nucleus Lemnisci Lateralis, pars dorsalis	+	-	-	-
LLv	Nucleus Lemnisci Lateralis, pars ventralis	-	-	-	-
LMmc	Nucleus Lentiformis Mesencephali, pars magnocellularis	+	-	-	-
LMpc	Nucleus Lentiformis Mesencephali, pars parvocellularis	+	-	-	-
LoC	Locus Ceruleus	-	+	+	+
LSt	Striatum Laterale	+	-	-	-
M	Mesopallium	+	-	-	-
MDT	Núcleo Tegmental Mediodorsal	-	+	+	+
MLd	Nucleus Mesencephalicus Lateralis, pars dorsalis	+	-	-	-
MSt	Striatum Mediale	+	+	+	+
NA	Núcleo Angularis	+	-	+	+
NBM	Nucleus basalis magnocellularis	-	+	+	+
nBOR	Nucleus Opticus Basalis	+	-	-	-
NC	Nidopallium Caudale	+	-	-	-
NF	Nidopallium Frontale	+	-	-	-
NFL	Nidopallio Frontal Lateral	+	-	-	-
NFM	Nidopallio Frontal Medial	+	-	-	-
NI	Nidopallium Intermedium	+	-	-	-
nIII	Nucleus Oculomotorius	-	+	+	+
nIV	Nucleus Nervi Trochlearis	-	+	+	+
nVmd	Nucleus motorius nervi trigemini pars dorsalis	-	+	+	+
nVmv	Nucleus motorius nervi trigemini pars ventralis	-	+	+	+
nVI	Nucleus Nervi Abducentis	-	+	+	+
nVII-XII	Nucleos Motores de los Nervios Craneales	-	+	+	+
NL	Núcleo Laminar	+	-	-	-
NM	Núcleo Magnocelular	+	-	-	-
Ov	Nucleus Ovoidalis	+	-	-	-
PGL	Nucleus Paragigantocellularis Lateralis	+	-	-	-
PL	Nucleus Pontis Lateralis	+	-	-	-
PLH	Nucleus Lateralis Hypothalami Posterioris	+	-	-	-
PM	Nucleus Pontis Medialis	+	-	-	-
PMH	Nucleus Medialis Hypothalami Posterioris	+	-	-	-
PPC	Nucleus Principalis Precommissuralis	+	-	-	-

PPT	Nucleus Pedunculoponsinus Tegmenti	+	+	+	+
PrV	Nucleus Sensorius Principalis Nervi Trigemini	+	-	-	-
PT	Nucleus Pretectalis	-	-	-	-
R	Nucleus Raphe	+	-	-	-
Rgc	Nucleus Reticularis Gigantocellularis	+	-	-	-
Rpc	Nucleus Reticularis Parvocellularis	+	-	-	-
RPgc	Nucleus Reticularis Pontis Caudalis, pars gigantocellularis	+	-	-	-
Rt	Nucleus Rotundus	+	-	-	-
Ru	Nucleus Ruber	+	-	-	-
SGPv	Stratum Griseum Periventriculare	+	-	-	-
SLu	Nucleus Isthmi pars Semilunaris	-	+	+	+
SP	Nucleus Subpretectalis	-	-	-	-
SpM	Nucleus Spiriformis Medialis	+	+	+	-
SRT	Nucleus Subrotundus	+	-	-	-
STh	Núcleo Subtalámico	+	-	-	-
T	Nucleus Triangularis	+	-	-	-
VeD	Nucleus Vestibularis Descendens	+	-	-	-
VeL	Nucleus Vestibularis Lateralis	+	-	-	-
VeM	Nucleus Vestibularis Medialis	+	-	-	-
VLT	Nucleus Ventrolateralis Thalami	+	-	-	-
VS	Nucleus Vestibularis Superior	+	-	-	-
AVT	Area Ventralis Tegmenti	+	-	-	-

3.1.1.4.1 *Romboencéfalo*

Los mRNAs para ChAT y CHT1 se encontraron fuertemente expresados en todas las neuronas pertenecientes a núcleos motores del puente y la médula, incluyendo el núcleo motor del trigémino, el núcleo abducens, el núcleo facial, el núcleo ambiguo, el núcleo dorsal del nervio vago y el núcleo del hipogloso. Un intenso marcaje fue observado en neuronas del locus coeruleus (LoC), el núcleo tegmental mediodorsal (MDT), el núcleo de la comisura septal y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT). El núcleo vestibularis medialis también mostró la expresión de ambos marcadores colinérgicos (Figura 8).

Un alta expresión de VGLUT2 se observó en los núcleos pontinos pars medialis (PM) y pars lateralis (PL), núcleo reticular gigantocelular (RPg), núcleo sensorial principal del nervio trigémino (PrV) y el núcleo raphe (R). Los núcleos auditivos magnocelular (NM), anterior (NA) y laminar (NL) también mostraron ser VGLUT2 positivos. En el cerebelo, la capa granular, los núcleos cerebelares (Cbl, CbM) y los núcleos vestibulares (VS, VeM, VeL) resultaron ser VGLUT2 positivos (Figura 8).

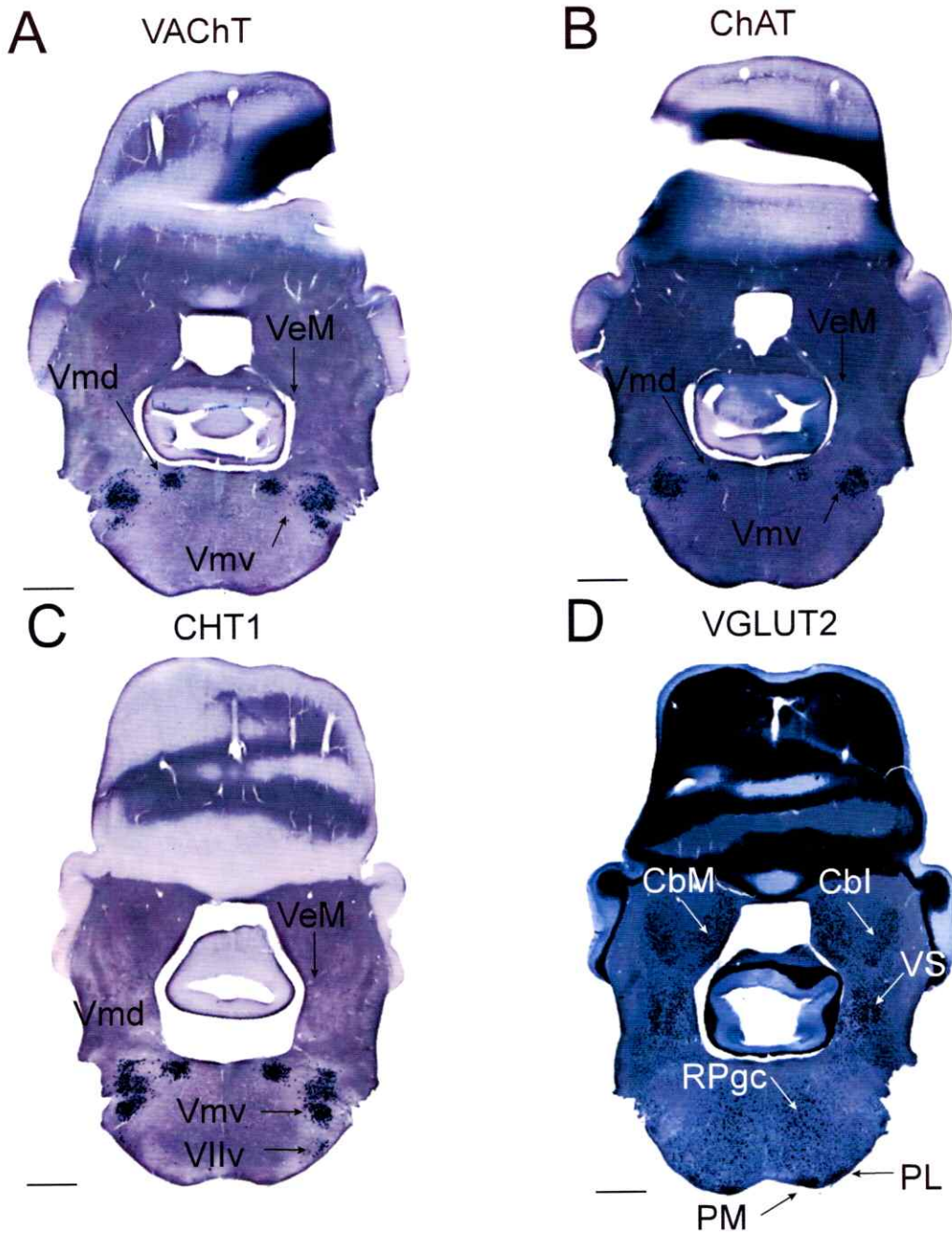


Figura 8. Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el romboencéfalo de *Gallus gallus domesticus*. Cortes coronales a nivel romboencefálico mostrando ensayos de hibridación *in situ* reveladas con precipitación alcalina de NBT/BCIP, en los que las motoneuronas de los núcleos motores V (A, B, C) y VII (C) aparecen fuertemente marcadas para los tres marcadores colinérgicos. Los núcleos pontinos (PL, PM, RPgc), cerebelares (Cbl, CbM) y el núcleo vestibular superior muestran una fuerte expresión de VGLUT2. Barra de tamaño = 1mm.

3.1.1.4.2 *Mesencéfalo*

Todas las subdivisiones de los núcleos oculomotores, Edinger Westphal (EW), troclear (IV) y las células tegmentales colinérgicas de PPT mostraron una fuerte expresión de los tres marcadores colinérgicos (Figura 7).

La expresión de mRNA para VGLUT2 fue muy potente en la parte dorsal del núcleo mesencefálico lateral (MLd), el núcleo intercolicular (ICo), células dispersas en PPT, en la parte dorsal del núcleo lemniscus lateral (LLd) y el núcleo istmo óptico (IO). Células dispersas marcadas también se observaron en el área tegmental ventral (VTA). En el tectum, un intenso marcaje fue encontrado en las capas 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13,14 y el stratum griseum periventricular (SGPv) (Figura 7).

3.1.1.4.3 *Pretéctum*

El núcleo spiriforme medial (SpM) mostró una clara expresión de ChAT pero no de CHT1 (Figura 9). Por otra parte, una clara expresión de VGLUT2 también fue detectada en este núcleo. Ensayos de hibridación *in situ* doble podrían determinar si las neuronas marcadas corresponden a la misma o a distintas poblaciones celulares.

Otros núcleos que mostraron marcaje intenso para VGLUT2 fueron la parte dorsal del núcleo pretectal anterior (APTD) y el núcleo de la raíz óptica basal (nBOR) (Figura 9). El núcleo pretectal (PT) y núcleo subpretectal (SP), ambos considerados GABAérgicos, no mostraron marcaje alguno (Figura 9).

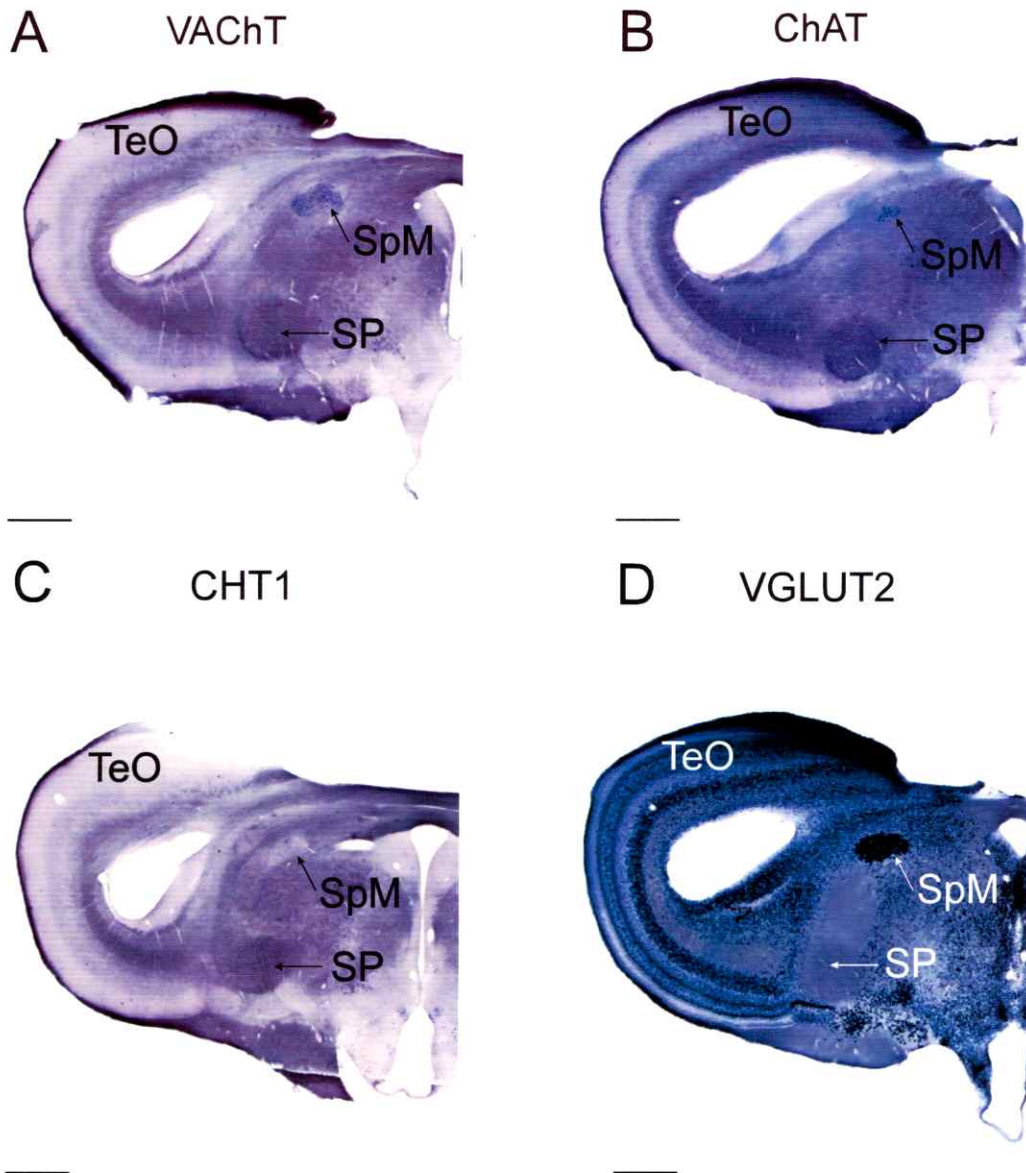


Figura 9. Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatergicos en el pretectum de *Gallus gallus domesticus*. Cortes coronales a nivel del pretectum mostrando ensayos de hibridación *in situ* donde las neuronas del núcleo spiriformis medial (SpM) aparecen fuertemente marcadas para ChAT y moderadamente para VAcHT, pero no se detecta expresión de CHT1 en este núcleo. SpM también expresa, de manera potente, el marcador glutamatergico VGLUT2. Barra de tamaño = 1mm.

3.1.1.4.4 Diencéfalo

Neuronas dispersas en el núcleo hipotalámico lateral (LHy) mostraron una débil marca para ChAT y una moderada expresión del mRNA para CHT1.

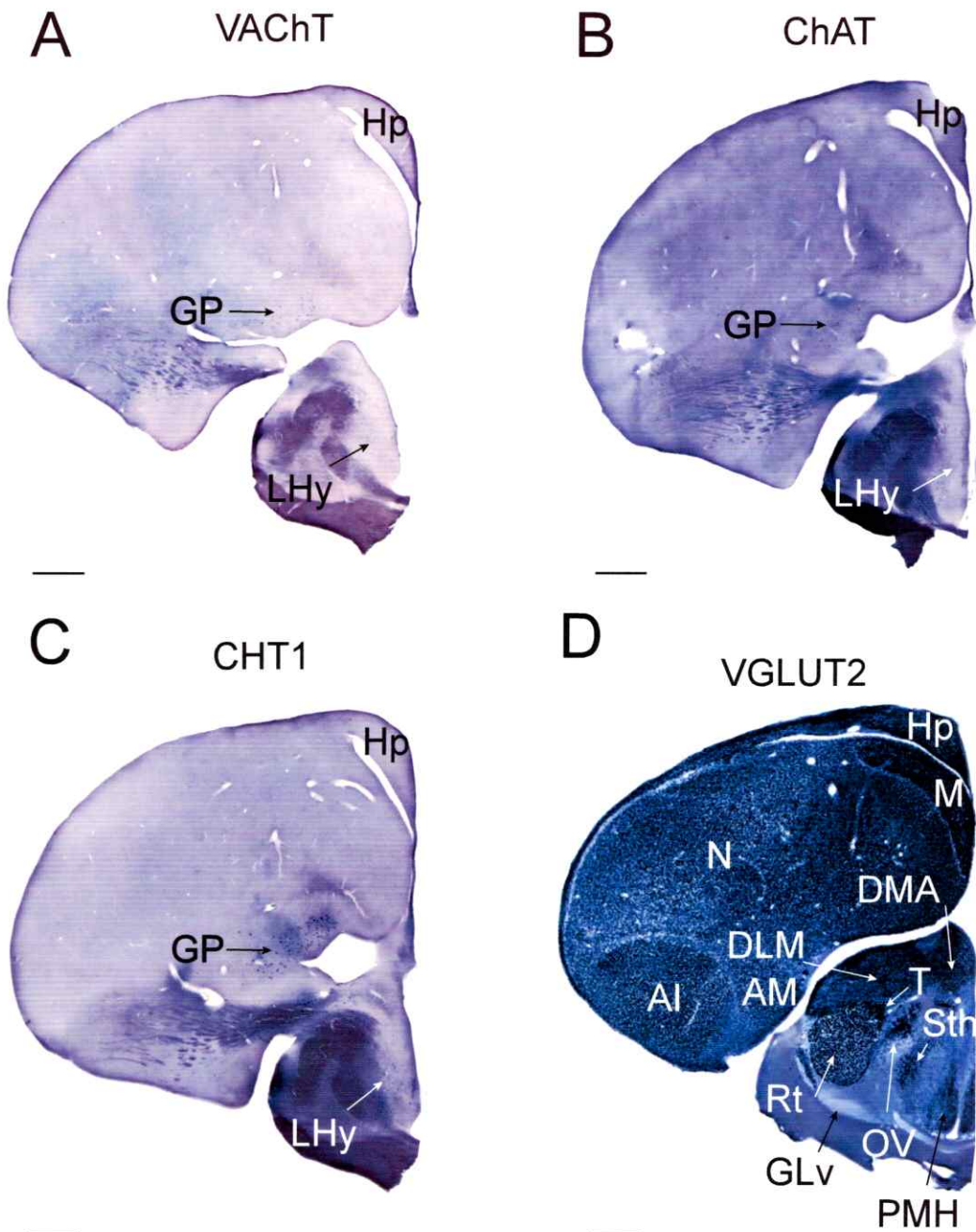


Figura 10. Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatergicos en el diencefalo de *Gallus gallus domesticus*. Cortes coronales mostrando la expresión de los marcadores VACHT, ChAT, CHT1 y VGLUT2 en ensayos de hibridación *in situ*. Una alta expresión de VGLUT2 se aprecia en el núcleo rotundus (Rt), núcleo ovoidalis (OV) núcleos talámicos (DLM DMA), el núcleo hipotalámico posteromedial (PMH) y núcleo subtalámico (Sth). Además, la figura muestra la expresión del marcador glutamatergico en el núcleo telencefálico arcopallio (AI, AM). Barra de tamaño = 1mm.

Una alta expresión del mRNA para VGLUT2 fue encontrada en el núcleo rotundus (Rt), núcleo triangularis (T), núcleo ovoidalis (Ov) (Figura 10) y el núcleo dorsolateral posterior (DLP)

Se observó una expresión moderada en la parte magnocelular del núcleo talámico dorsolateral anterior (DLAmc), la parte medial (DLM) y lateral (DLL) del núcleo talámico dorsolateral anterior, el núcleo talámico dorsomedial anterior (DMA), el núcleo talámico posterior (DMP), el núcleo subtalámico (STh), el complejo lentiforme mesencefálico y el núcleo precomisural (PPC). En el hipotálamo, las partes medial (PMH) y lateral (PLH) del núcleo hipotalámico posterior resultaron ser VGLUT2 positivos.

3.1.1.4.5 *Telencéfalo*

Ambos marcadores colinérgicos se encontraron fuertemente expresados en células dispersas del globus pallidus (GP), el núcleo basal magnocelular (NBM) y el estriado medial (MSt) (Figura 11). La expresión de VGLUT2 fue alta en la mayoría de las estructuras paliales, incluyendo el hipocampo (Hp), el mesopallio (M) y el hiperpallio (H), particularmente las capas dorsal (HD) e intercalada (HI). También se marcaron fuertemente estructuras sensoriales primarias conspicuas como el entopallio (E), el núcleo basal (Bas), el field L y todas las subdivisiones del arcopallio (A). También resultaron ser VGLUT2 positivas algunas células dispersas en el estriado (MSt; LSt) y el globo pálido (GP), (Figura 11). El núcleo NBM no presentó marcaje para VGLUT2.

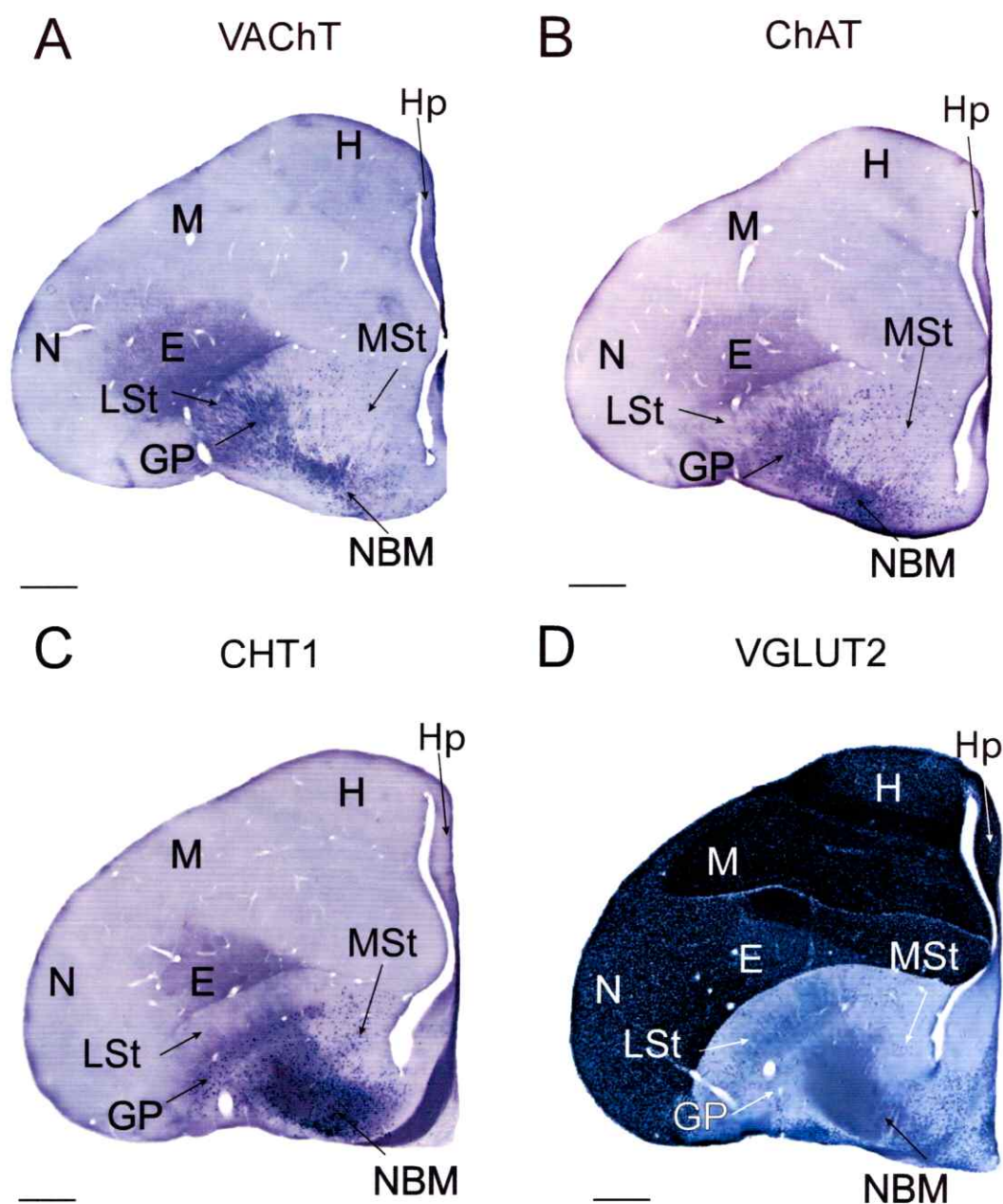


Figura 11. Expresión de RNA mensajero para marcadores colinérgicos y glutamatergicos en el telencéfalo de *Gallus gallus*. Ensayos de hibridación *in situ* en cortes coronales de telencéfalo de pollo muestran la expresión de los 3 marcadores colinérgicos (VACHT, ChAT y CHT1) en algunas neuronas del globo pálido (GP), el estriado medial (StM) y en las neuronas colinérgicas de núcleo basal magnocelular. Una alta expresión del RNA mensajero para VGLUT2 se aprecia en las células del nidopalio (N), mesopalio (M), Hiperpalio y entopalio (E). Se aprecia una escasa marca en el estriado, globo pálido, y neuronas dispersas en el estriado lateral (LSt). Barra de tamaño = 1mm.

3.1.2 Identificación del fenotipo neuroquímico de Ipc mediante el uso de trazadores neuronales e inmuno-histoquímica.

Para establecer la expresión de VGLUT2 en los terminales axónicos de Ipc a nivel de proteína, realizamos ensayos de inmuno-histoquímica anti-VGLUT2 en 4 animales adultos. Debido a que no existen anticuerpos anti-VGLUT2 comerciales diseñados para la proteína VGLUT2 del pollo, optamos por ensayar la inmuno-reactividad del anticuerpo comercial anti-VGLUT2 N29/29, ya que éste fue generado utilizando un péptido de 159 aminoácidos correspondiente a la región C terminal del transportador, el cual posee una identidad de un 84 % con la misma región en la proteína VGLUT2 de pollo. En extractos proteicos de cerebro de pollo separados por SDS-PAGE en geles de acrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa, ensayamos la inmuno-reactividad de dicho anticuerpo en ensayos de *Western Blot*. Como resultado obtuvimos una banda única de alrededor de 65 kDa (Figura 12). El peso molecular estimado para la proteína VGLUT2 del pollo (NP_001161855) es de 64,6 kDa, lo cual claramente coincide con el peso molecular observado en los ensayos. Luego de esta caracterización, consideramos que dicho anticuerpo es adecuado para investigar la distribución de la proteína VGLUT2 en el cerebro del pollo mediante ensayos de inmuno-histoquímica e inmuno-fluorescencia.

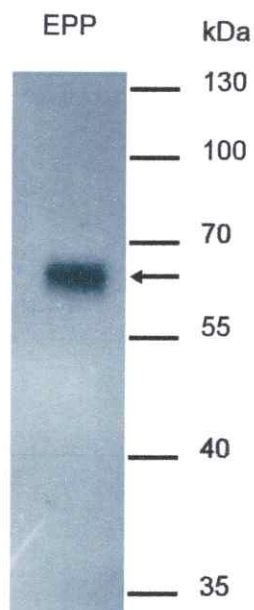


Figura 12. Western blot anti-VGLUT2. Inmuno-reactividad anti-VGLUT2 sobre extractos de proteínas de pollo (EPP) separados por SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Se aprecia una banda única de alrededor de 65 kDa (flecha).

En el TeO se pudo apreciar una conspicua marca para este marcador a nivel de la capa tectal 13, 10 y en las siete capas retino-recipientes, con un énfasis en la capa tectal 5 (Figura 13 B,D). La inmuno-reactividad en la capa 5 para VGLUT2 mostró un patrón punteado, semejante a la morfología de los botones del terminal axónico de lpc en dicha capa (Figura 13 A). Dado que los axones retinianos que terminan en las capas superiores del TeO (Capa 1-7) son glutamatérgicos, la expresión de VGLUT2 en la capa 5 podría deberse a la inmuno-positividad de estos axones. Por lo tanto, en función de obtener una total degeneración de los terminales retinianos en TeO, este mismo ensayo fue realizado utilizando 2 animales enucleados (ver Materiales y Métodos), los cuales fueron sacrificados luego de una sobrevida de 30 días post-operatorio. La inmuno-reactividad para VGLUT2 en estos animales mostró una conspicua marca en la capa tectal 5, consecuente con la ramificación de los terminales axónicos de lpc y sus estructuras tipo botón (Figura 13 C,E).

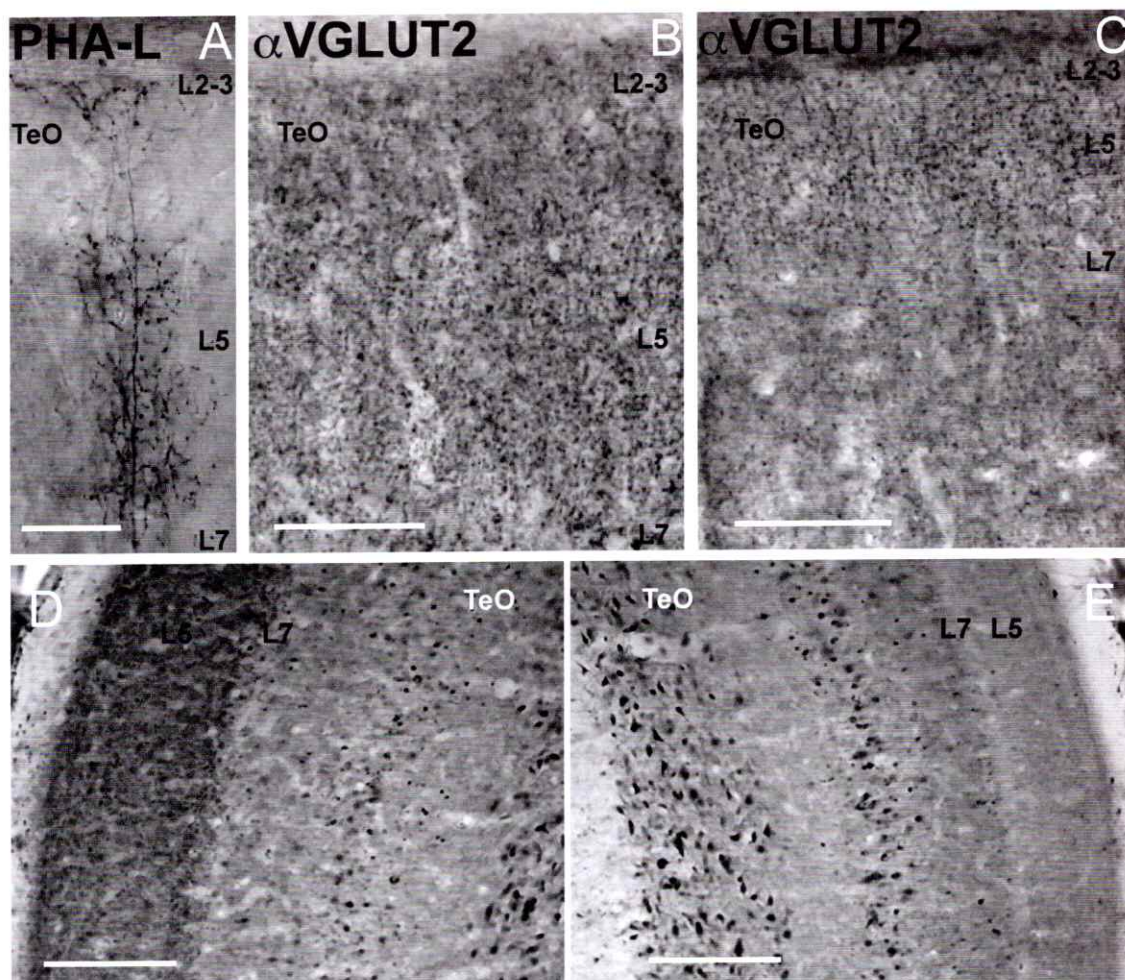


Figura 13. Inmuno-reactividad anti-VGLUT2 en el tectum óptico. Fotomicrografías de cortes coronales de TeO mostrando: **A**, terminal axónico de lpc (*paintbrush*) en las capas superiores de TeO, llenado con el trazador neuronal *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA-L) tras una inyección simple en lpc. **B**, Immuno-histoquímica anti-VGLUT2 en las capas superiores del tectum óptico, correspondiente con la región tectal retino-recipiente. **C**, Immuno-histoquímica anti-VGLUT2 en las capas superiores del tectum óptico realizada en tejidos de un animal enucleado; la total degeneración de los terminales retinianos sobre TeO evidencia una banda VGLUT2 positiva extra-retiniana, correspondiente a la capa tectal 5 que presumiblemente corresponde a las densas ramificaciones de los axones de lpc en dicha capa. Esto se hace más evidente al comparar la inmuno-reactividad anti-VGLUT2 en capas tectales superficiales y profundas de los tectum ipsilateral (**D**) y contralateral (**E**) al ojo enucleado en un mismo animal. Barra de tamaño: A = 50 μm ; B, C, D, E = 200 μm .

3.1.3 Identificación del fenotipo neuroquímico de Ipc mediante el uso de trazadores neuronales e inmuno-fluorescencia.

Para poder identificar de manera clara un terminal axónico de Ipc y poder contrastarlo con la inmuno-reactividad para VGLUT2, realizamos ensayos de inmuno-fluorescencia doble en 2 animales. Para ésto realizamos inyecciones del trazador neuronal Leucoaglutinina *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) en Ipc, con el fin de marcar anterógradamente los terminales axónicos en TeO, y posteriormente revelar el tejido mediante inmuno-fluorescencia doble anti-PHAL/anti-VGLUT2. En la Figura 14 es posible apreciar la co-distribución del trazador PHA-L con la marca para VGLUT2 en las capas tectales 2-3 y 5, en estructuras tipo botón similares a las que caracterizan a los terminales axónicos de Ipc. Nuevamente, a fin de eliminar la marca de VGLUT2 correspondiente a los terminales de la retina, utilizamos 2 animales enucleados, los cuales tuvieron un período de treinta días de recuperación post-operatoria, en función de obtener una total degeneración de los terminales retinianos.

En la figura 14 C,F,I se aprecia la clara superposición de los terminales axónicos de Ipc marcados con PHA-L y la inmuno-reactividad para VGLUT2, esta última confinada a una conspicua banda en la capa tectal 5. La superposición de ambos marcadores es clara en casi todos los botones terminales del axón de Ipc.

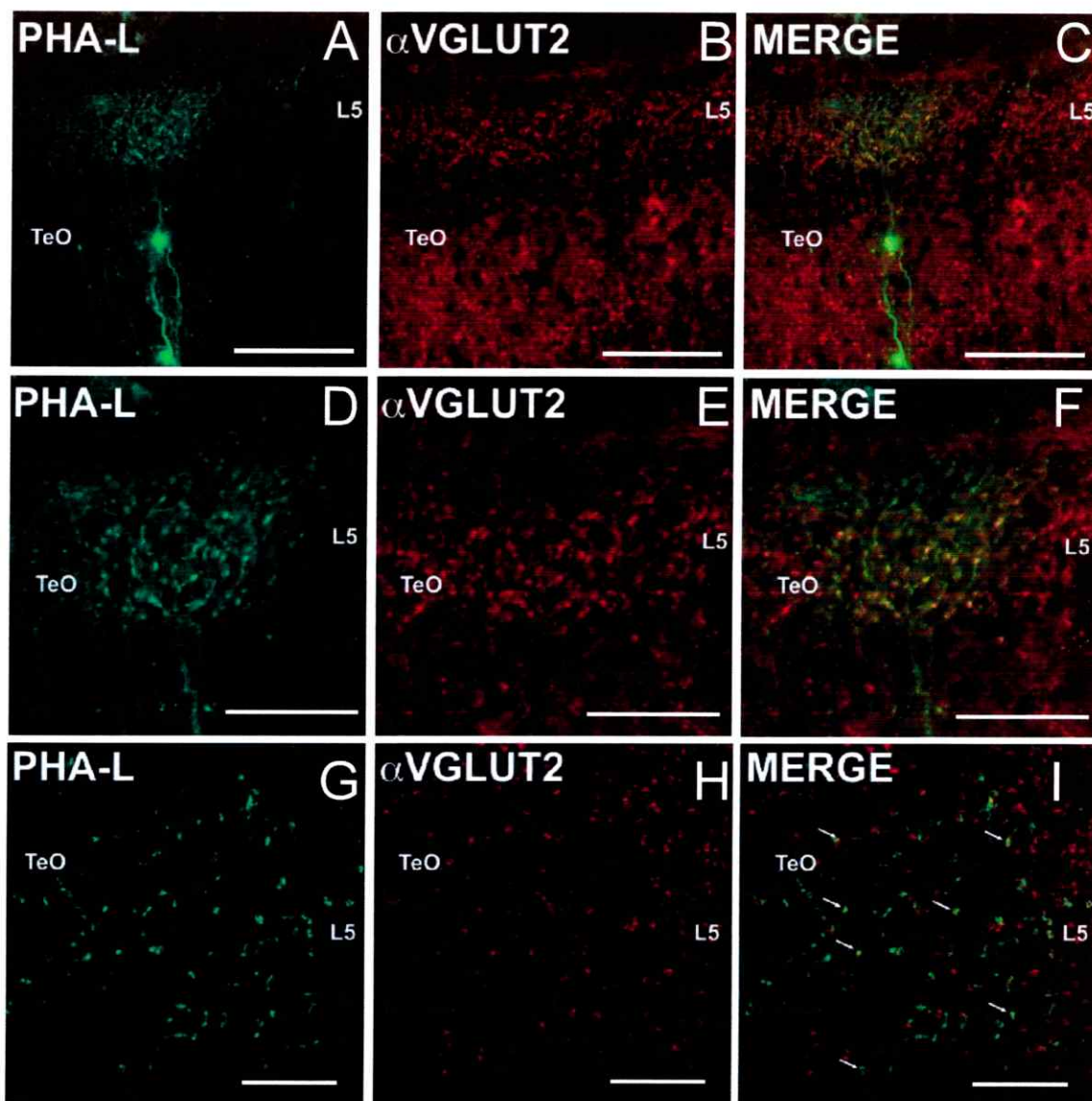


Figura 14. Inmuno-fluorescencia doble anti-VGLUT2/anti-PHA-L en el tectum óptico. Microfotografías de fluorescencia de cortes coronales de tectum óptico mostrando un terminal axónico de lpc lleno con trazador neuronal PHA-L (A, D, G; verde), en conjunto con inmuno-fluorescencia anti VGLUT2 (B, E, H; rojo) en las capas tectales superiores, apreciándose una co-distribución de los marcadores. D, E y F, corresponden a una magnificación de las figuras A, B y C, respectivamente. Imágenes de microscopía confocal (G, H, I) muestran a los botones característicos de lpc, llenos con el trazador (verde), en clara co-distribución (flechas) con las estructuras VGLUT2 positivas (rojo) presentes en la capa tectal 5. Barras de tamaño: A, B, C = 150 μ m; D, E, F = 75 μ m; G, H, I = 20 μ m.

3.2 Identificación y caracterización de las estructuras axónicas de lpc mediante microscopia electrónica.

El axón de lpc se encuentra ramificado en las capas tectales superiores, principalmente en las capas 5 y 2-3. Para poder identificar de manera específica las estructuras pertenecientes a lpc en el tectum, realizamos *in vivo* inyecciones iontoforéticas del trazador neuronal PHA-L en el núcleo lpc, las que resultaron en axones exquisitamente marcados en toda su extensión radial en TeO. Luego de preparar el tejido para microscopia electrónica, se eligieron zonas de interés las cuales se cortaron en ultramicrotomo en secciones de aproximadamente 50 nm. Secciones ultrafinas revelaron una particular estructura tectal correspondiente a los axones de lpc. En la figura 15 se muestra una micrografía a baja magnificación de la capa tectal 5, donde se aprecian múltiples perfiles marcados correspondiente a los terminales de lpc, los cuales fueron llenados con PHA-L y revelados con precipitación de diaminobenzidina (DAB). La cercanía y abundancia de los perfiles marcados, en conjunto con su característica forma redondeada, sugiere que éstos corresponderían a los botones característicos del terminal axónico de lpc (14A).

Al comparar los volúmenes obtenidos de los botones terminales en mediciones de campo claro (n=334 total), y las reconstrucciones seriadas de las estructuras redondeadas de terminales marcados observados con microscopía electrónica (n=14 total) (Tabla 3; ver Métodos) no se observan diferencias significativas entre ellos (ANOVA de dos vías $p=0,57$).

Posteriores reconstrucciones de segmentos completos de terminales confirmaron que estas estructuras glomerulares corresponden a los engrosamientos (botones) observados en los terminales axónicos de lpc. (ver Figuras 21, 25 y 29). Al comparar los volúmenes inter-capas tectales obtenidos en observaciones de campo claro y microscopía electrónica, se obtuvo como resultado que los botones de lpc de las capas 2-3 y 5, no presentan diferencias significativas (ANOVA, $p=0,24$), mientras que los botones de la capa 9 son significativamente más pequeños que los de las capas superiores (ANOVA, prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak $p<0.0001$; Tabla 3).

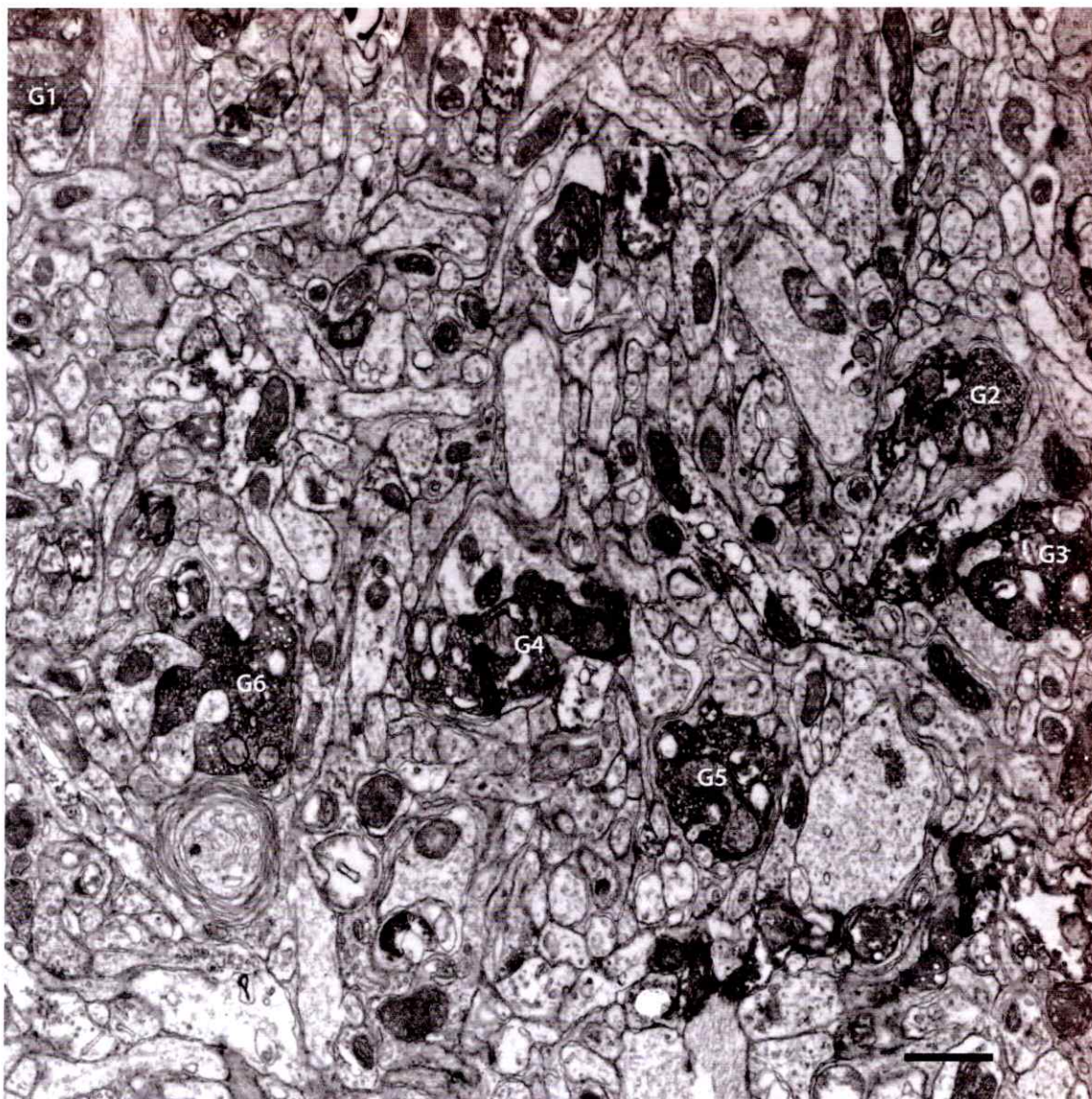


Figura 15. Terminales de lpc marcados anterógradamente con PHA-L. Micrografía electrónica de bajo aumento de la capa tectal 5 en la que se aprecian perfiles axónicos terminales marcados con PHA-L y revelados con inmuno-precipitación de DAB. La morfología y disposición espacial de estos perfiles (G1- G6) se asemeja a la disposición estructural de los botones del *paintbrush* en las capas tectales superiores. Barra de tamaño = 1 μ m.

Tabla 3. Comparación entre los volúmenes de los botones terminales de lpc y los perfiles redondeados marcados observados en microscopía electrónica. A: Volúmenes promedio obtenidos mediante reconstrucciones de microscopía electrónica de estructuras redondeadas de terminales marcados de lpc (Capa 2-3, n= 5; Capa 5, n= 4; Capa 9, n=5). Volumen B: Volúmenes promedio obtenidos de botones terminales de axones de lpc en mediciones de campo claro (Capa 2-3, n= 122; Capa 5, n= 151; Capa 9, n=62).

TeO	Volumen A (μm^3)	Volumen B (μm^3)
Capa 2-3	0,72 \pm 0,16	1,07 \pm 0,16
Capa 5	1,79 \pm 0,65	1,14 \pm 0,12
Capa 9	0,54 \pm 0,28	0,49 \pm 0,08

Como se muestra en la figura 16, estas estructuras redondeadas del terminal de lpc se aprecian llenas de vesículas redondas y varias mitocondrias; además, establecen sinapsis asimétricas con varios perfiles dendríticos, encontrándose estos perfiles rodeados de una envoltura formada por múltiples procesos gliales. Esta estructura, similar a un glomérulo, parece corresponder a los "glomérulos" descritos previamente en las capas retino-recipientes (Hayes & Webster 1975; Angaut & Reperant 1976), pero cuyo origen no pudo ser determinado en ambos trabajos. Esta configuración glomerular para los terminales axónicos de lpc no sólo fue observada en la capa 5, sino que también en las capas tectales más superficiales (2 y 3) y como engrosamientos axónicos en las capas más profundas (7-10), lo que está en registro con la distribución espacial de los botones terminales de las ramificaciones de la estructura axonal de lpc. En capas superiores y profundas, al igual que en la capa 5, también se observó que los perfiles pre-sinápticos, correspondientes a

lpc, establecen sinapsis asimétricas con varios perfiles dendríticos. Estos resultados muestran por primera vez que, en las capas tectales superiores, los axones de lpc establecen relaciones sinápticas asimétricas con varios perfiles dendríticos, rodeados por estructuras gliales, conformando una estructura tipo glomérulo.

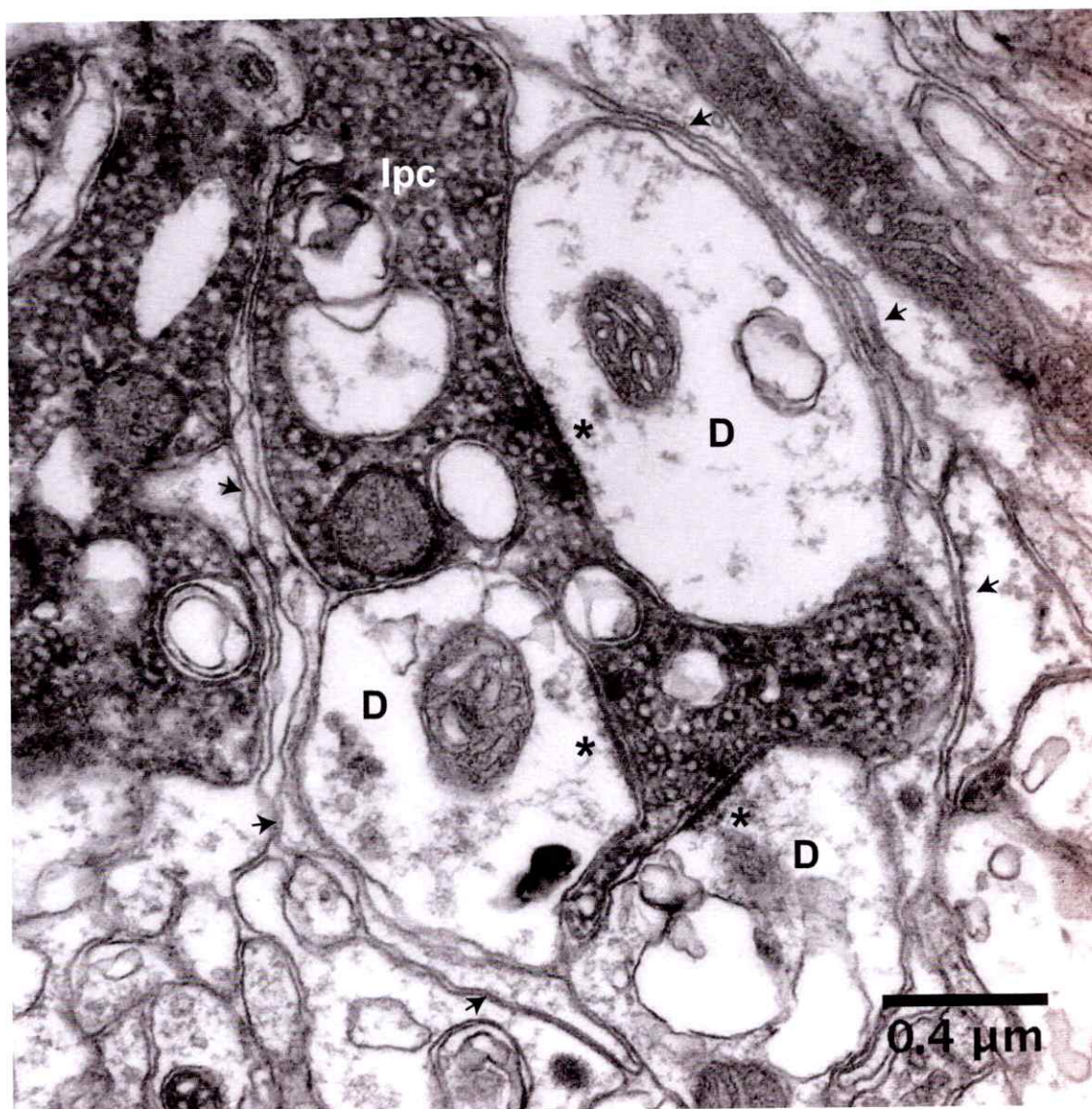


Figura 16. El glomérulo tectal. Fotomicrografía electrónica mostrando un perfil terminal redondeado de lpc marcado con PHA-L formando una estructura tipo glomérulo, dentro de la cual el terminal establece sinapsis asimétricas (asteriscos) con varios perfiles dendríticos (D). Esta estructura glomerular se encuentra envuelta por membrana glial (flechas).

3.3 Identificación de blancos sinápticos. Posibles blancos sinápticos

3.3.1 Uso de trazadores y microscopía electrónica

Como se menciona en la introducción, ante la posibilidad de que Ipc establezca o no relaciones sinápticas a nivel tectal, hemos propuesto tres posibles blancos sinápticos para Ipc: los terminales de la retina, las células ganglionares tectales (TGCs), y las neuronas tectales *Shepherd's crook* (SC) de la capa 10. Para investigar estas relaciones, diseñamos la combinatoria de inyección de trazadores que se muestra y explica en la figura 17. El número de animales en cada caso se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Combinatoria experimental para determinación de blancos sinápticos.

Trazador/núcleo I	Trazador/núcleo II	Relación	n
PHA-L / Ipc	BDA 3K/ Rotundo	Ipc/Celulas ganglionares tectales	3
PHA-L / Ipc	CTB/ Retina	Ipc/Terminales retinianos	3
BDA 3K/Ipc		Ipc/Células Tectales SC	3

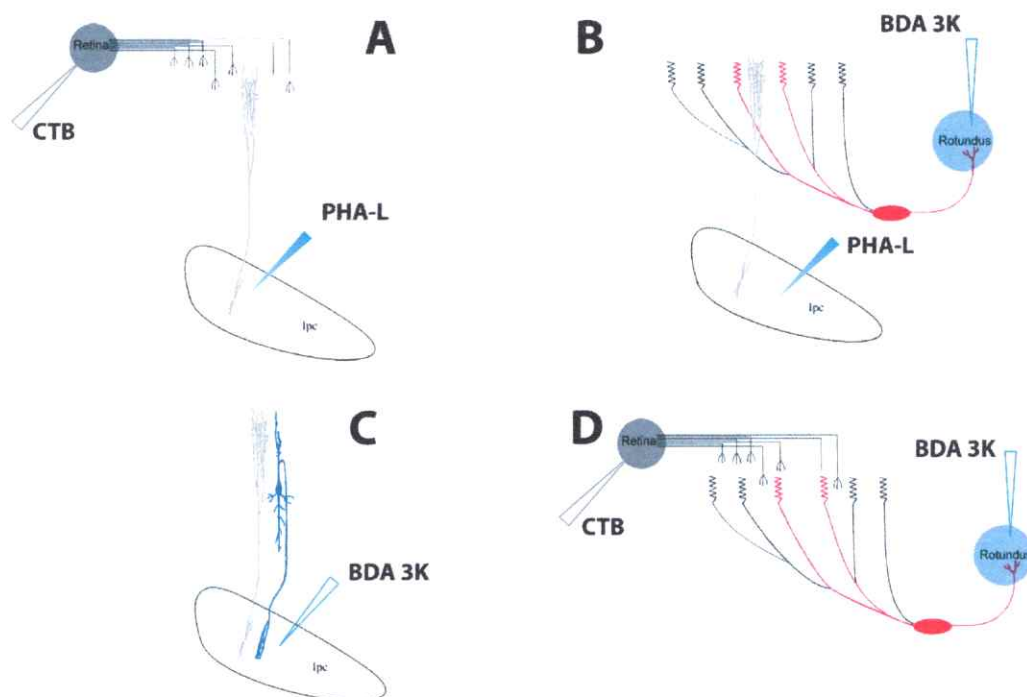


Figura 17. Esquema descriptivo de los experimentos de inyección de trazadores para la microscopía electrónica. Mediante inyecciones localizadas de dos trazadores se marcaron específicamente las estructuras de lpc y sus posibles blancos sinápticos. Los terminales de lpc se marcaron anterógradamente con inyecciones de PHA-L en este núcleo (A, B). Los terminales retinianos se marcaron con inyecciones intraoculares de la subunidad B de la colerotoxina (CTB) (D), mientras que las células ganglionares tectales (TGCs; B) y las células *Shepherd's crook* (SC; C) fueron marcadas retrógradamente con BDA 3k inyectado en los núcleos rotundus (Rt) y lpc respectivamente.

3.3.1.1 Capa tectal 5 (TGCs I5a-I5b)

Inyecciones dobles de los trazadores PHA-L y BDA 3K en los núcleos Ipc y rotundus, respectivamente, resultaron en conspicuos terminales axónicos de Ipc trazados y estructuras dendríticas pertenecientes a las TGCs del tipo I densamente marcadas a nivel de la capa tectal 5a y 5b (Figura 18 A,B). Debido a que en el pollo se han reportado terminaciones dendríticas de las TGC tipo I solo a nivel de la sub-capa tectal 5b (Luksch y col., 1998), nuestros resultados sugieren una nueva sub-clase de células ganglionares tectales del tipo I, por lo cual proponemos los sub-tipos TGC tipo I5a y I5b, de acuerdo a la capa tectal en que sus estructuras dendríticas terminan. La zona seleccionada para el análisis de uno de los casos se muestra en la figura 18 B.

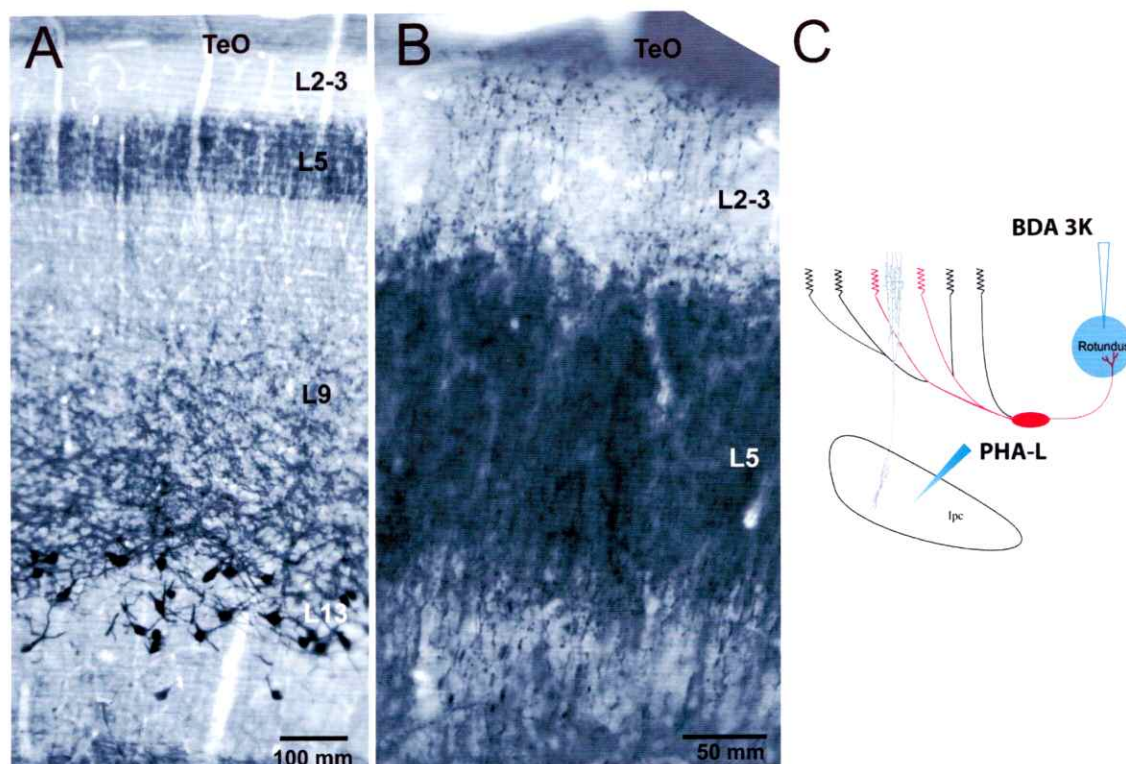


Figura 18. Estructuras marcadas para estudiar la relación Ipc-TGCs tipo I5a-b. **A**, Corte coronal del tectum óptico mostrando células TGCs marcadas retrógradamente desde su blanco en el tálamo con el trazador BDA 3K. Los cuerpos celulares se marcan fuertemente y sus terminales dendríticos forman una conspicua banda a nivel de la capa 5 (5a y 5b). **B**, Terminales axónicos de Ipc marcados entremezclados con las estructuras dendríticas de células TGCs marcadas en las capas superficiales de TeO. **C**, Diagrama de la inyección doble realizada con PHA-L en Ipc y BDA 3K en el núcleo rotundus (Rt) en el tálamo para obtener el resultado mostrado.

En la figura 19 se muestra la terminación de Ipc en forma de glomérulo en la capa 5 del tectum óptico. Los perfiles pre-sinápticos de Ipc, cargados de vesículas sinápticas redondas, se encuentran en estrecha relación con los perfiles intra-glomerulares marcados con BDA 3K pertenecientes a células TGCs marcadas de manera retrógrada. Nuestros resultados muestran glomérulos doble marcados en los cuales el terminal de Ipc se encuentra en estrecha aposición con hasta dos perfiles dendríticos marcados (Figura 20). Aunque la marca doble impide ver con claridad las densidades post-sinápticas

esperadas, en algunos perfiles en que la marca post sináptica es menor, es posible identificar la presencia de estas estructuras. Esto demuestra una relación sináptica entre los terminales axónicos de lpc y los terminales dendríticos presentes en las sub-capas 5a y 5b, pertenecientes a células TGCs del tipo I5a y I5b.



Figura 19. Aposición entre un terminal de lpc y una dendrita de TGC en una estructura glomerular en la capa 5 del tectum óptico. La micrografía muestra un perfil axónico marcado con PHA-L en estrecha aposición con tres perfiles dendríticos, de los cuales, uno de ellos está retrógradamente marcado con depósitos de níquel-DAB (Ni-DAB), correspondiendo a un terminal dendrítico de una TGC tipo I. Además, se muestra el perfil de lpc estableciendo sinapsis (asterisco) con otra dendrita.

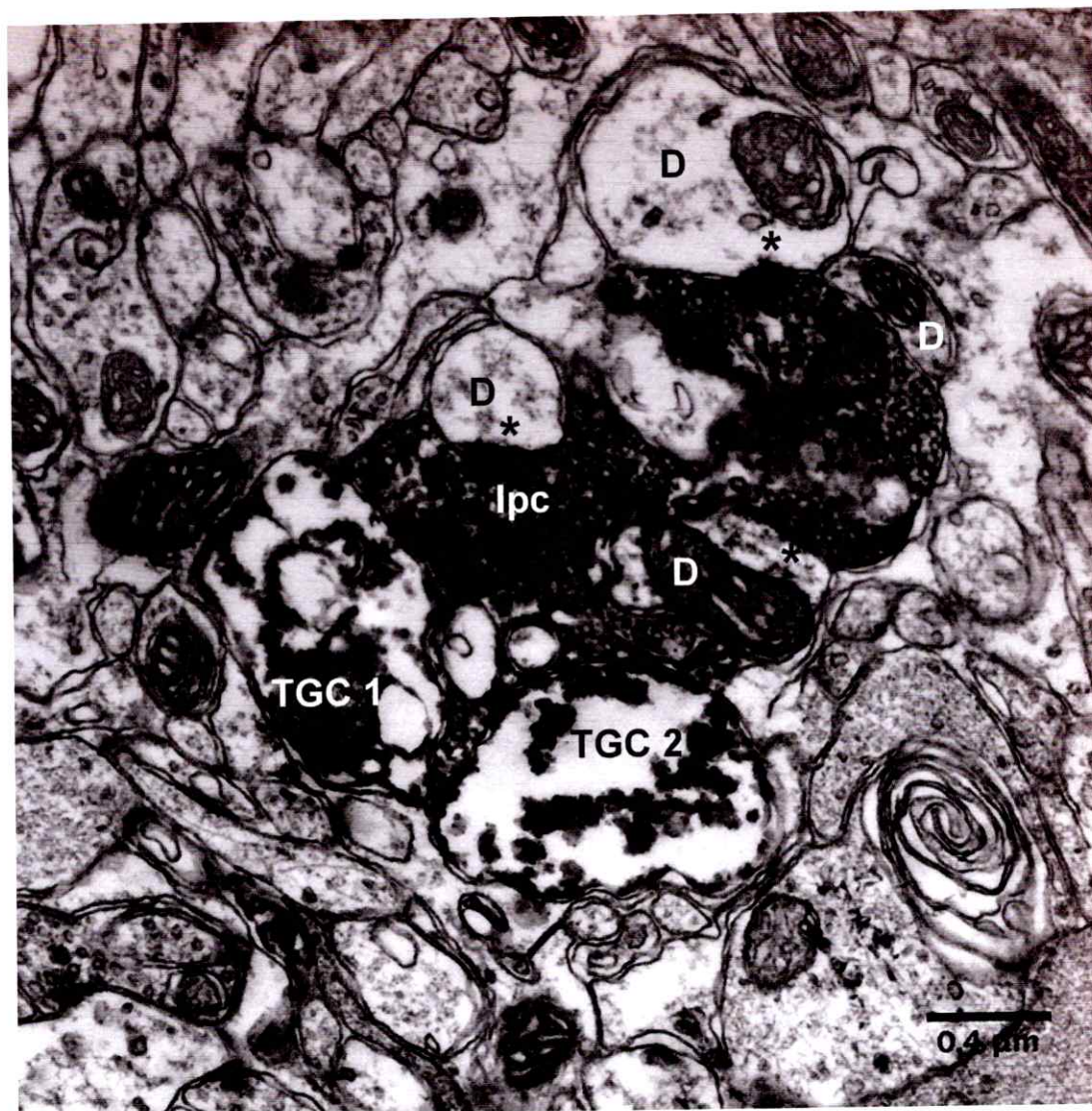


Figura 20. Aposición entre un terminal de lpc y dos dendritas de TGC en una estructura glomerular en la capa 5 del tectum óptico. La microfotografía muestra un perfil axónico de lpc yuxtapuesto a cinco perfiles dendríticos, dos de los cuales corresponden a dendritas de neuronas TGCs retrógradamente marcadas con depósitos de Ni-DAB. Los asteriscos muestran las densidades post-sinápticas en dendritas estableciendo sinapsis con lpc. D = perfil dendrítico.

En la figura 21 se muestra una reconstrucción en 3 dimensiones de glomérulos obtenidos en experimentos de doble inyección. La reconstrucción se realizó a partir de 38 secciones ultrafinas (50 nm) consecutivas. Solo se muestran los perfiles internos y no los perfiles gliales que rodean la estructura.

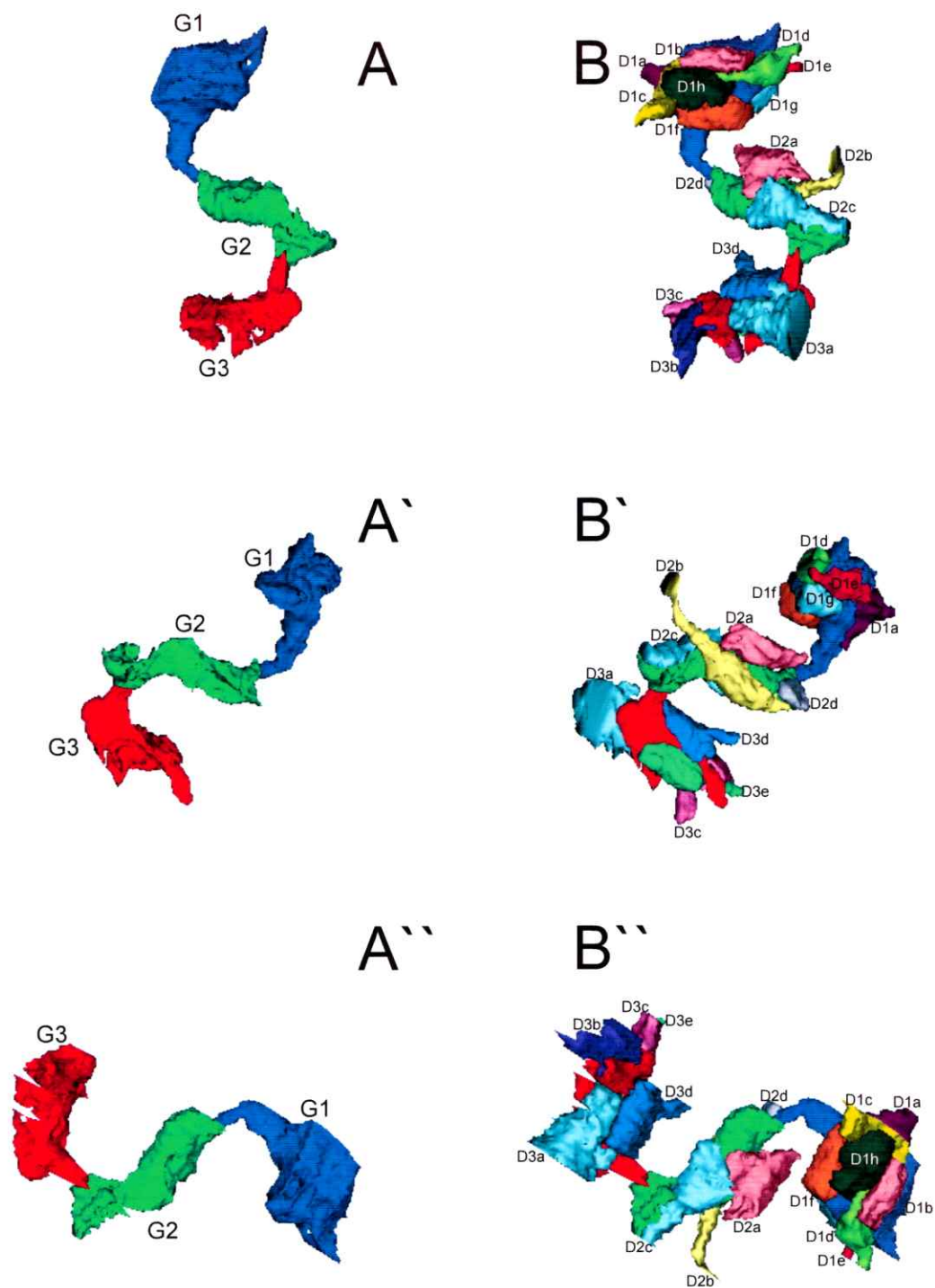


Figura 21. Reconstrucción 3D de un glomérulo de capa 5 y sus dendritas. Reconstrucción realizada a partir de 77 micrografías consecutivas de muestras de axones de lpc marcados con trazador PHA-L. Se observan cuatro glomérulos consecutivos y sus correspondientes dendritas, mostrándose por una parte los perfiles axónicos pertenecientes a lpc en distintas vistas (A, A', A'') y colores (distintos glomérulos; G1-G3), y por otra parte estos mismos junto con sus correspondientes estructuras dendríticas (B, B', B'').

3.3.1.2 Capa tectal 2-3 (TGCs I3)

Inyecciones dobles de los trazadores PHA-L y BDA 3K en Ipc y el núcleo rotundus, respectivamente, resultaron en terminales axónicos de Ipc y estructuras dendríticas pertenecientes a las TGCs del tipo I3 densamente marcadas (Figura 22 A). La zona seleccionada para el análisis de uno de los casos se muestra en la figura 22 B.

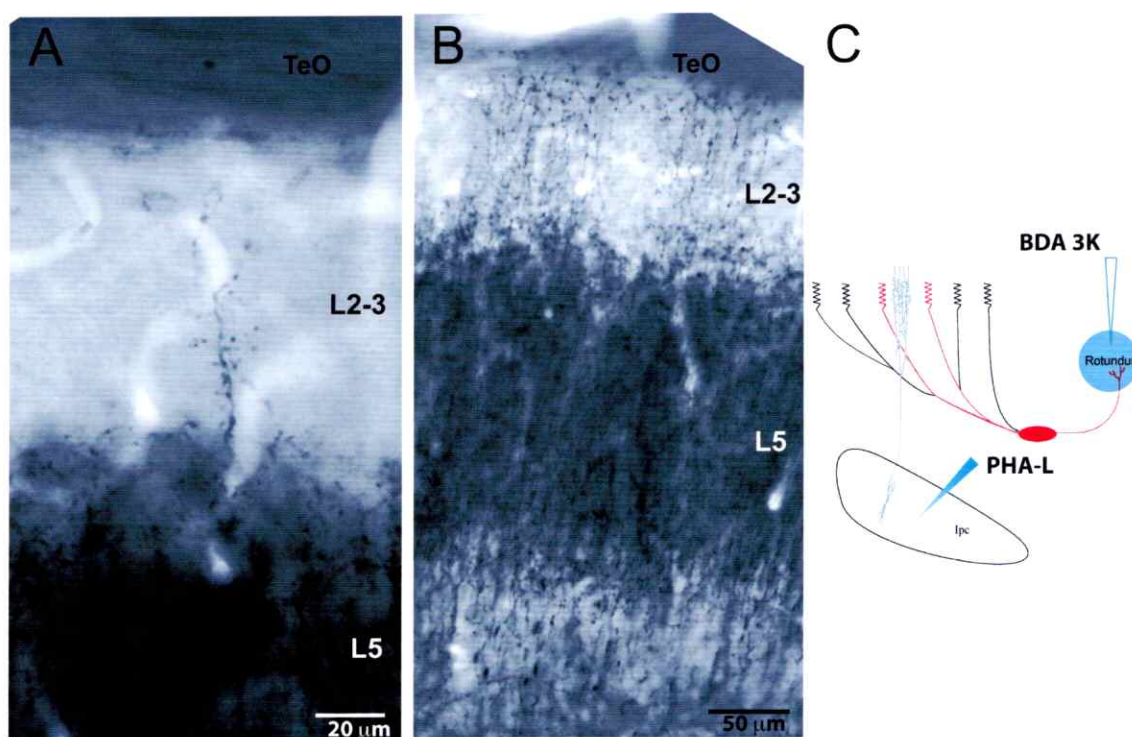


Figura 22. Estructuras marcadas para estudiar la relación Ipc-TGCs tipo I3. **A,** Fotomicrografía óptica de terminales dendríticos de células TGCs marcadas retrógradamente desde su blanco en el tálamo con el trazador BDA 3K. Los cuerpos celulares de las TGCs se marcaron fuertemente y un terminal dendrítico de una TGCs tipo I3 aparece claramente en la capa 2-3 sobre la banda de terminales dendríticos de las TGCs tipo I5. **B,** Terminales axónicos de Ipc marcados entremezclados con los terminales dendríticos de células TGCs marcados en las capas superficiales de TeO. **C,** Diagrama de inyección doble realizada con PHA-L en Ipc y BDA 3K en el núcleo rotundus (Rt) en el tálamo.

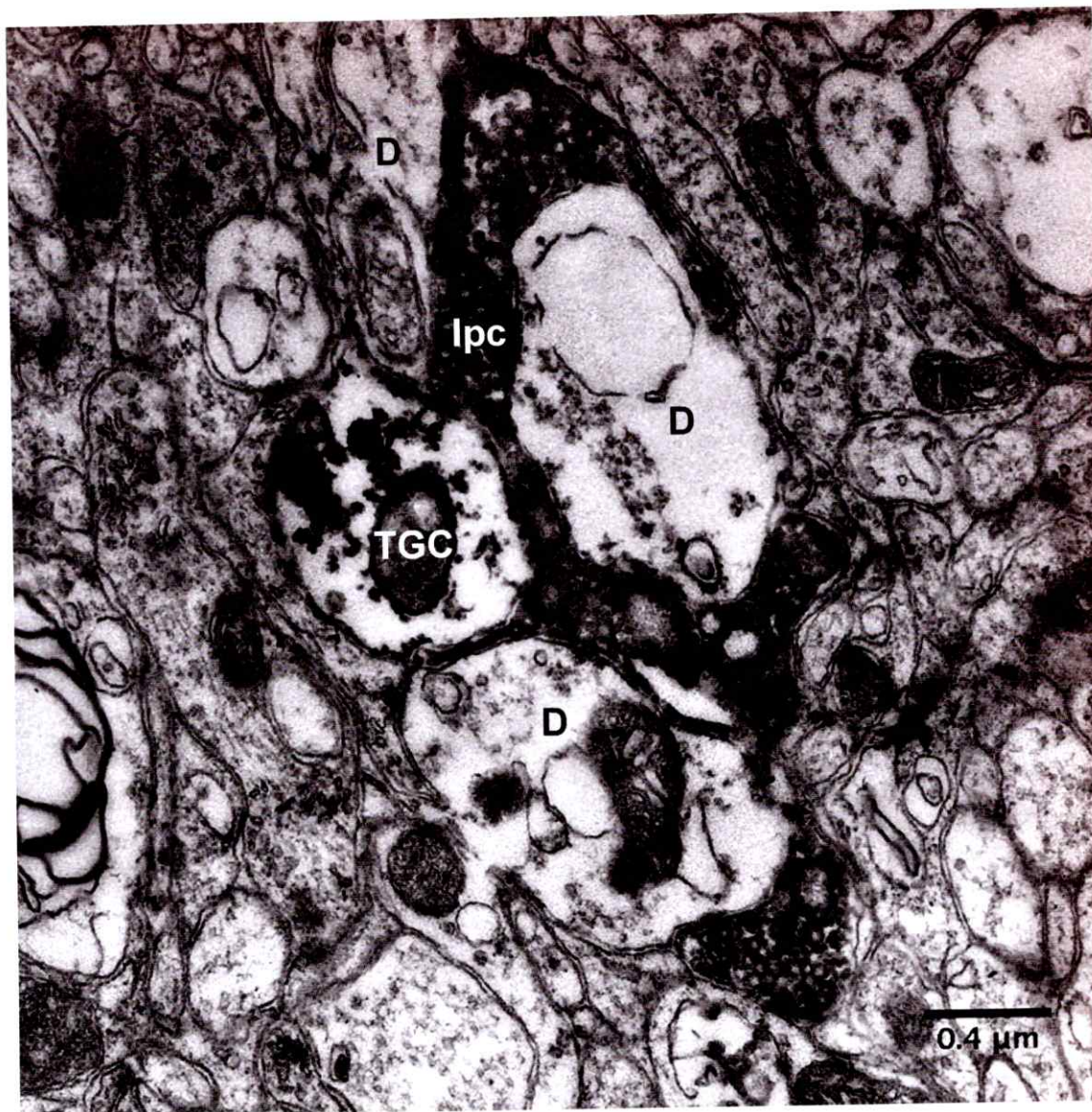


Figura 23. Aposición entre un terminal de lpc y una dendrita de TGC en una estructura glomerular en la capa 2-3 del tectum óptico. La micrografía electrónica muestra un perfil axónico de lpc marcado con PHA-L (DAB) en estrecha aposición con tres perfiles dendríticos (D), de los cuales, uno de ellos está retrógradamente marcado con depósitos de níquel-DAB (Ni-DAB), correspondiendo a un terminal dendrítico de una TGC tipo I.

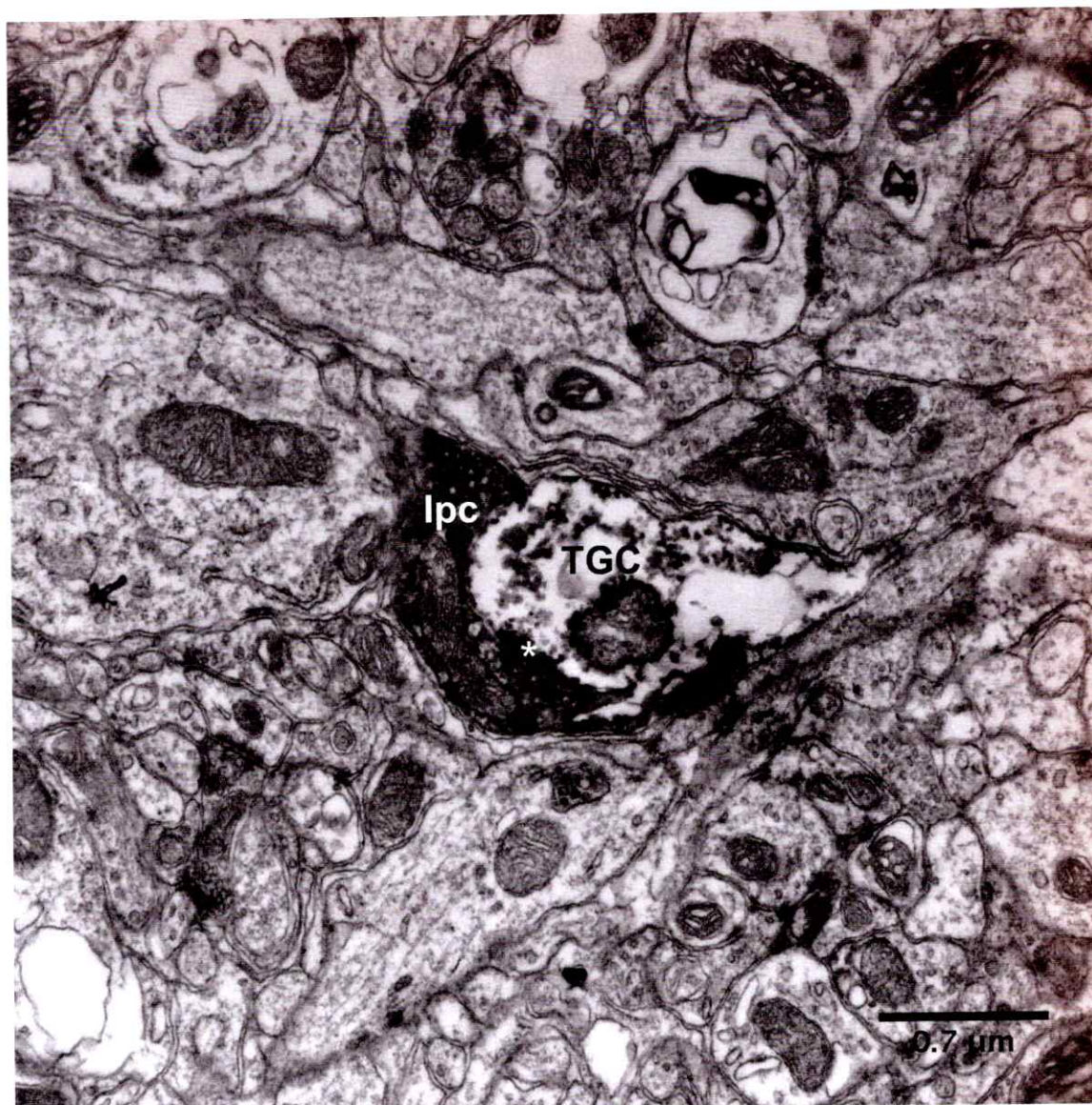


Figura 24. Relación sináptica entre un terminal de lpc y una dendrita de TGC en la capa 2-3 del tectum óptico. La micrografía muestra un perfil axónico marcado con PHA-L en aposición con un terminal dendrítico de una TGC tipo I marcado. Aunque el terminal dendrítico se encuentra marcado con depósitos de DAB, se puede apreciar la posible densidad post-sináptica (asterisco), la cual pudo ser observada en una serie de secciones consecutivas.

Utilizando una muestra de un axón de lpc marcado con PHA-L en la capa tectal 2-3, reconstruimos cuatro glomérulos concatenados en una sola estructura, junto con sus dendritas asociadas (Figura 25). Esto se realizó a partir de 57 secciones ultrafinas consecutivas.

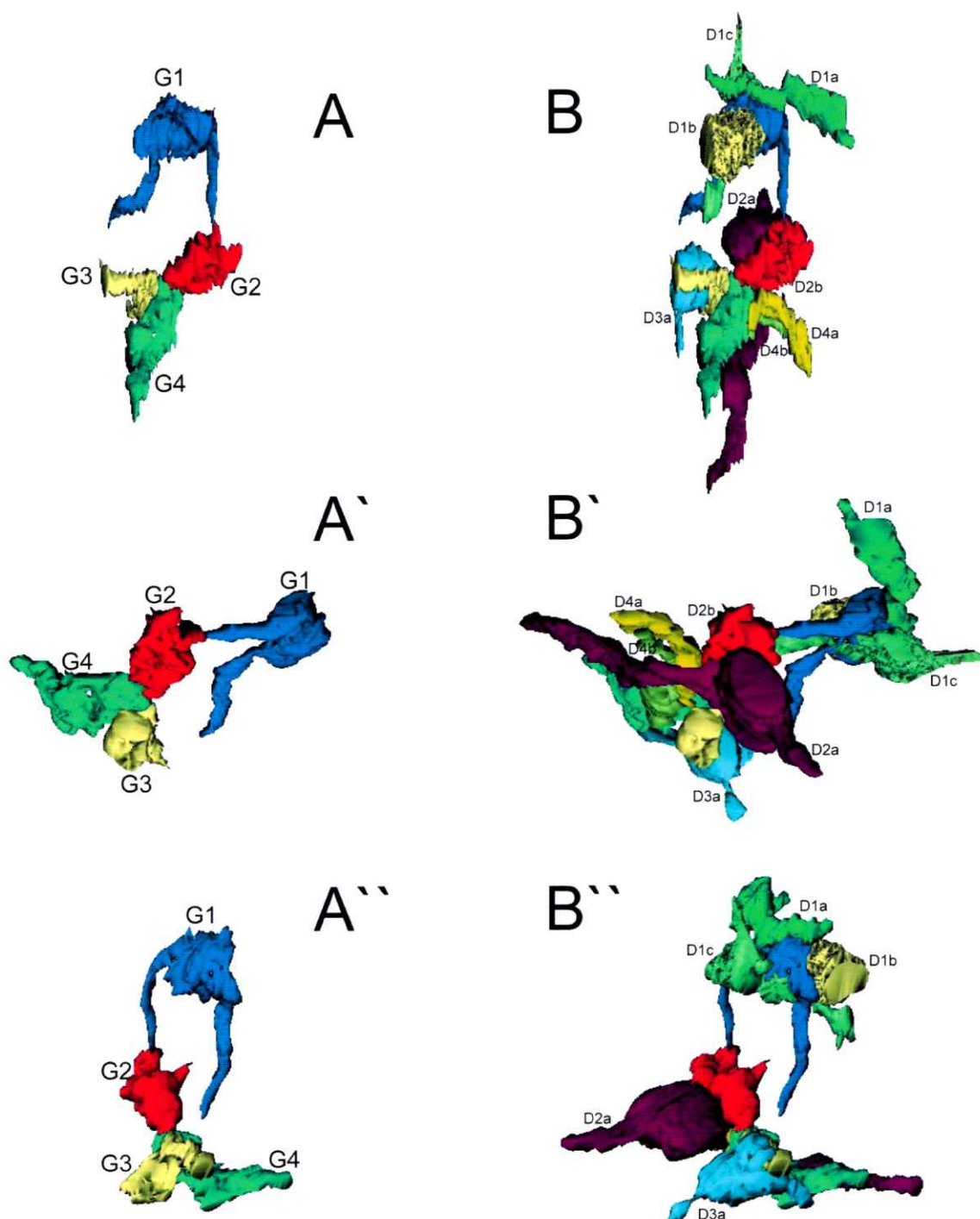


Figura 25. Reconstrucción 3D en distintas orientaciones de glomérulos de lpc en contacto con terminales dendríticas en la capa 2-3. Reconstrucción realizada a partir de 57 micrografías consecutivas de muestras de axones de lpc marcados con trazador PHA-L. Se observan cuatro glomérulos consecutivos y sus correspondientes dendritas, mostrándose por una parte los perfiles axónicos pertenecientes a lpc en distintas vistas (A, A', A'') y colores (distintos glomérulos; G1-G4), y por otra parte estos mismos junto con sus correspondientes estructuras dendríticas (B, B', B'').

3.3.1.3 Capa tectal 9 (TGCs II)

Inyecciones dobles de los trazadores PHA-L y BDA 3K en *Ipc* y el núcleo rotundus, respectivamente, resultaron en terminales axónicos de *Ipc* y estructuras dendríticas pertenecientes a las TGCs del tipo II densamente marcadas (Figura 26 A). La zona seleccionada para el análisis de uno de los casos se muestra en la figura 26 B.

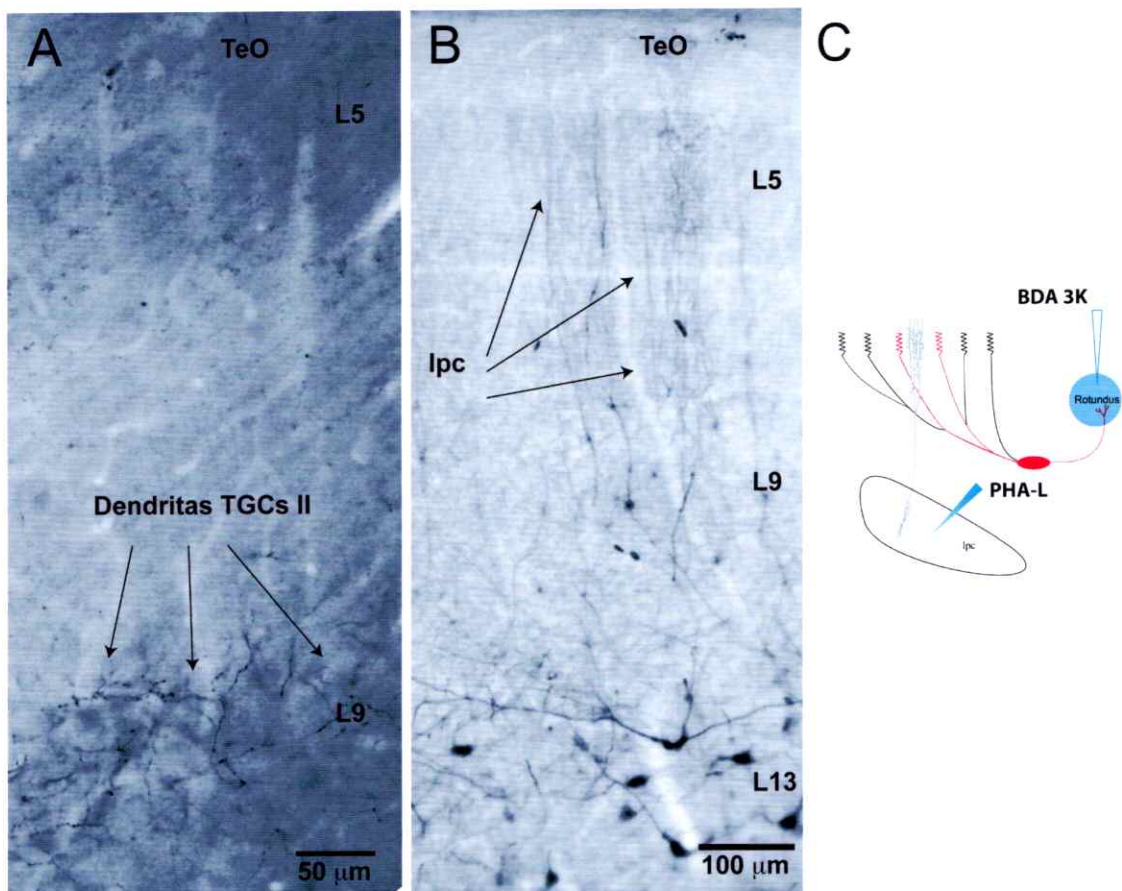


Figura 26. Estructuras marcadas para estudiar la relación Ipc-TGCs tipo II. **A**, Células TGCs marcadas retrógradamente desde su blanco en el tálamo con el trazador BDA 3K. Los cuerpos celulares se marcaron fuertemente y sus terminales dendríticos en la capa 9 se muestran indicados con flechas. **B**, Terminales axónicos de *Ipc* marcados confluyendo con estructuras dendríticas de células TGCs marcadas en las capas profundas de TeO. **C**, Diagrama de inyección doble realizada con PHA-L en *Ipc* y BDA 3K en el núcleo rotundus (Rt) en el tálamo.

Los engrosamientos pre-sinápticos marcados encontrados en esta capa tectal no poseen una clara estructura tipo glomerular como la encontrada en las capas 2-3 y 5. En las figuras 27 y 28 se muestran perfiles pre-sinápticos pertenecientes a lpc estableciendo sinapsis con estructuras dendríticas no marcadas y un perfil dendrítico marcado con Ni-DAB, perteneciente a estructuras dendríticas de células ganglionares tectales del tipo II.



Figura 27. Estructura del terminal axónico de lpc en la capa tectal 9. Se aprecia un perfil de lpc marcado con PHA-L, el cual está rodeado por una estructura glial. Este perfil se muestra en aposición con a una dendrita (D).

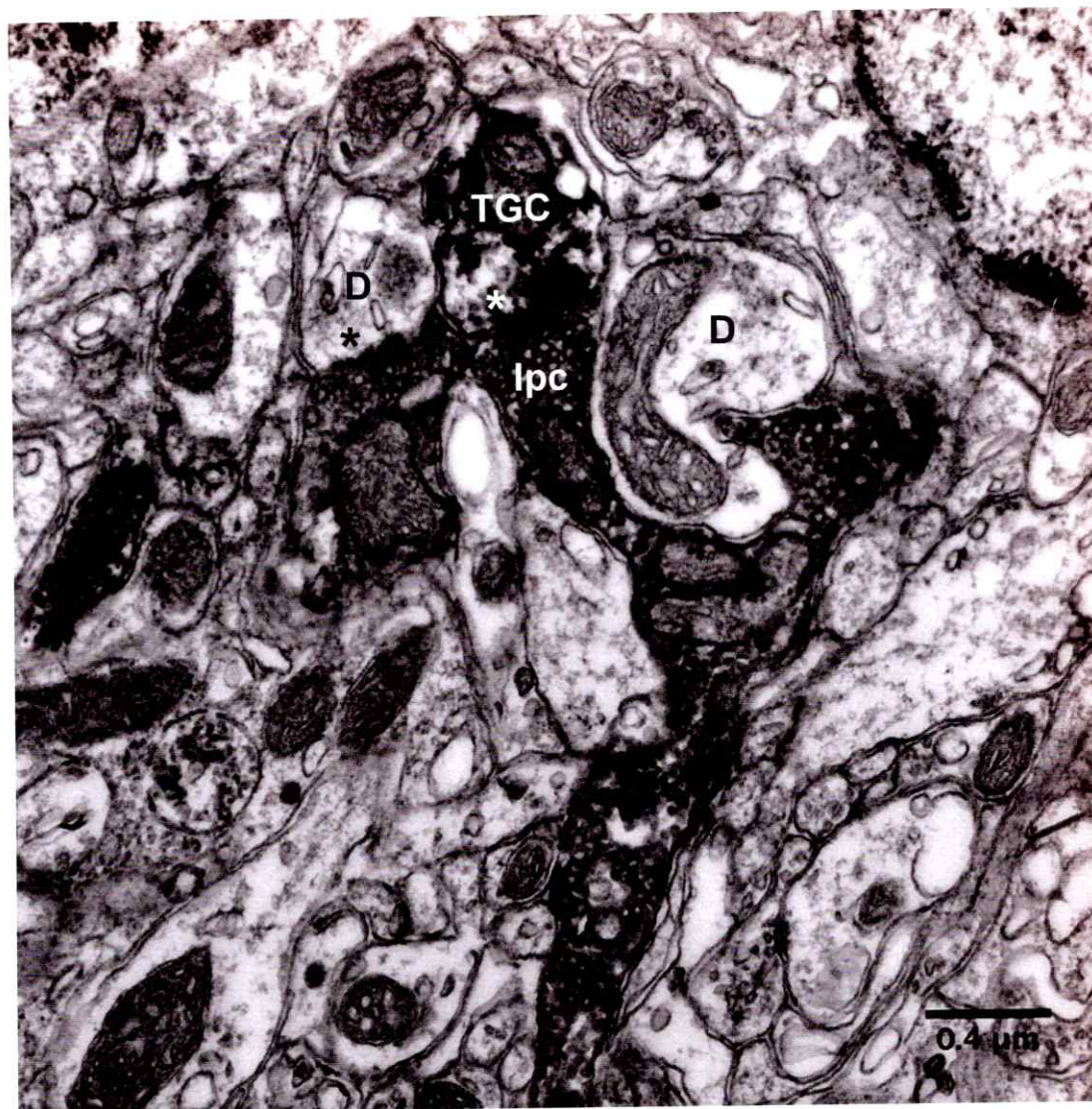


Figura 28. Engrosamiento de un terminal de lpc en aposición con una dendrita de TGC en la capa 9 del tectum óptico. La micrografía muestra un perfil axónico marcado con PHA-L en aposición con tres perfiles dendríticos (D), de los cuales, uno de ellos está retrógradamente marcado con depósitos de níquel-DAB (Ni-DAB), correspondiendo a un terminal dendrítico de una TGC tipo II.

Utilizando una muestra de un axón de lpc marcado con PHA-L en la capa tectal 9, reconstruimos cuatro engrosamientos axónicos de lpc concatenados en una sola estructura, junto con sus dendritas asociadas (Figura 29). Esto se realizó a partir de 31 secciones ultrafinas consecutivas.

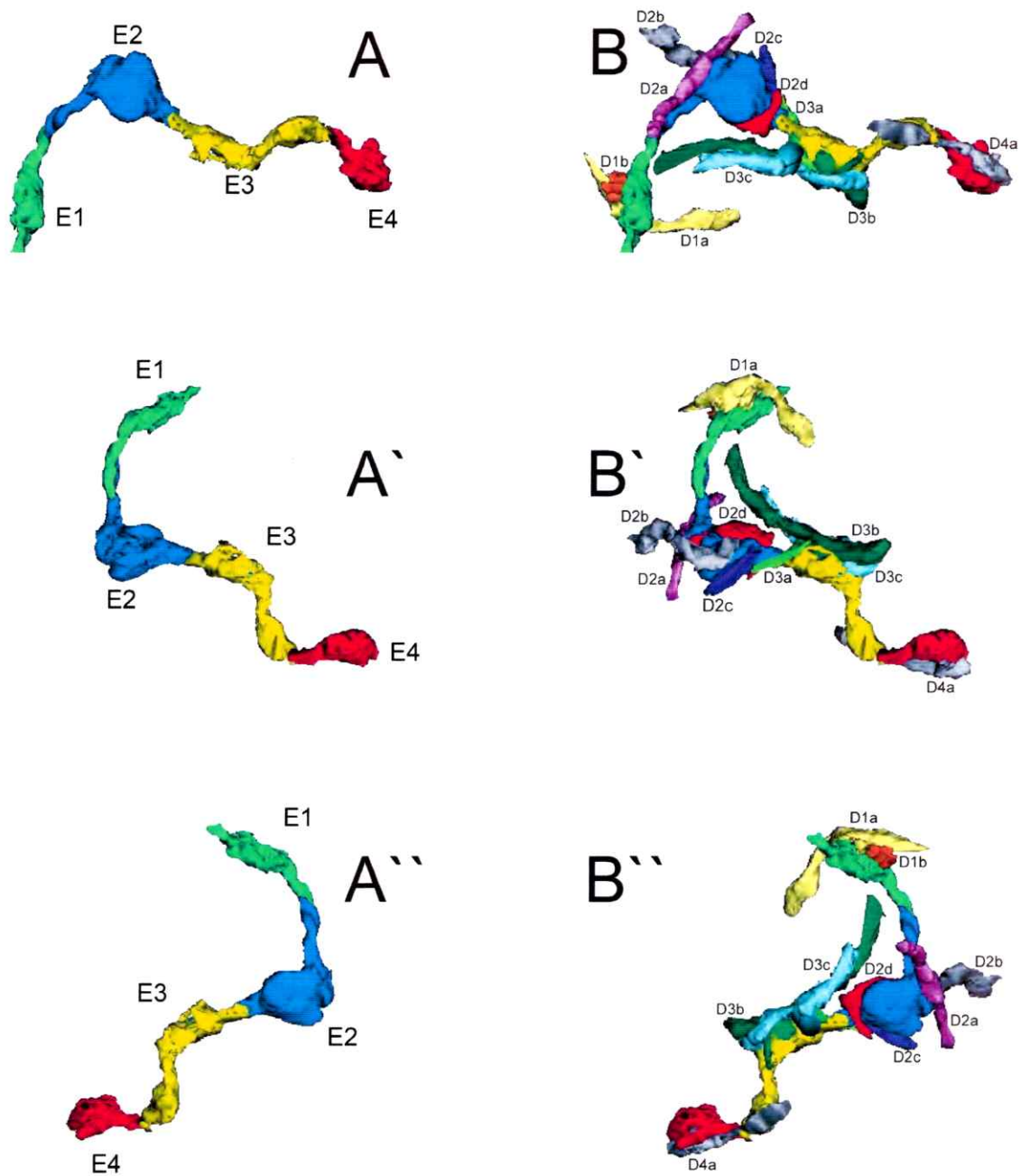


Figura 29. Reconstrucción 3D en distintas orientaciones de engrosamientos de lpc en contacto con terminales dendríticos en la capa 9. Reconstrucción realizada a partir de 31 micrografías consecutivas de muestras de axones de lpc marcados con trazador PHA-L. A la izquierda se observan cuatro engrosamientos consecutivos y sus correspondientes dendritas, mostrándose los perfiles axónicos pertenecientes a lpc en distintas vistas (A, A', A'') y colores (distintos engrosamientos; E1-E4). A la derecha, se muestran éstas mismas estructuras junto con sus correspondientes estructuras dendríticas (B, B', B'').

3.3.2 Análisis sináptico

Debido a que en la gran mayoría de los casos la marca post-sináptica impide visualizar de manera clara las densidades post-sinápticas, identificadoras de una sinapsis establecida entre los perfiles axónicos de lpc y las dendritas de las TGCs, realizamos un análisis que nos permitió determinar de manera indirecta la existencia de sinapsis entre lpc y las células ganglionares tectales. Para ésto, marcamos glomérulos de manera anterógrada con PHA-L, y utilizando secciones consecutivas (alrededor de 50 secciones ultrafinas de 50 nm), contamos el número de sinapsis que establece el perfil pre-sináptico (lpc) con todas las estructuras dendríticas presentes al interior de la estructura glomerular y los engrosamientos en capas profundas. Así, si se determina que el terminal de lpc se conecta sinápticamente con todas ellas, podríamos afirmar entonces que lpc establece sinapsis con los perfiles dendríticos pertenecientes a las TGC, que sabemos de antemano, forman parte de éstas estructuras. Utilizando 3 animales con marca de PHA-L simple en lpc, analizamos 24 glomérulos y 9 engrosamientos axónicos de lpc completos, a partir de 50-60 secciones consecutivas por cada estructura, los cuales correspondieron a 10, 14 y 9 estructuras de capa 2-3, 5 y 9, respectivamente.

El análisis nos indica que del total de perfiles dendríticos en aposición con estructuras pre-sinápticas correspondientes a lpc, el 94% de ellos mostró una densidad post-sináptica evidente (Tabla 5), de los cuales, el 93% resultó establecer una sinapsis única, mientras que el 7% restante muestra dos

relaciones sinápticas con lpc (Tabla 5). Los totales mencionados corresponden a perfiles contenidos en estructuras glomerulares y engrosamientos de las capas tectales superiores y profundas, respectivamente (Tabla 5). Esto demuestra que lpc establece sinapsis sobre las dendritas de las TGCs a nivel de la capa 2-3, capa 5 y capa 9, correspondiente a TGCs de los sub-tipos I3, I5a,b y II, respectivamente.

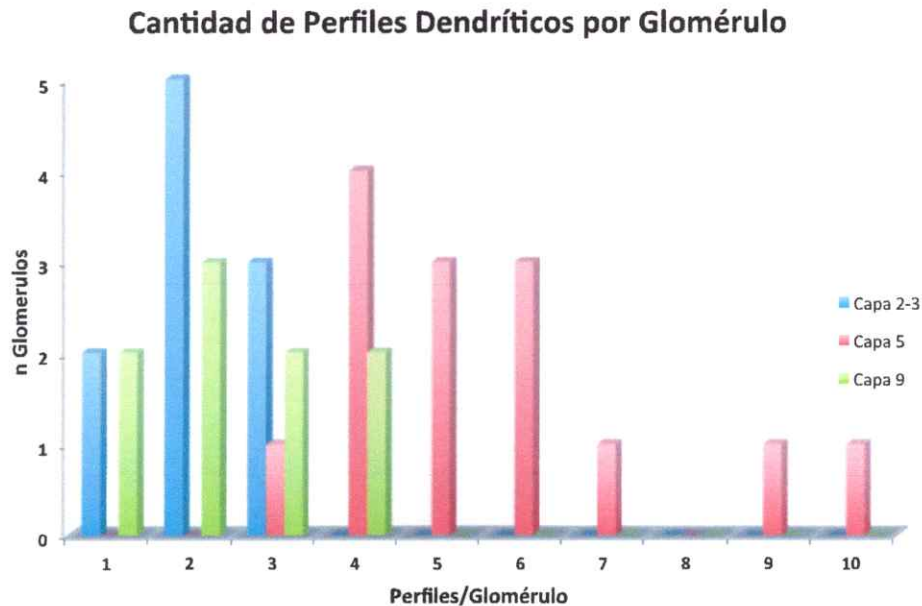
Tabla 5. Análisis sináptico de estructuras axónicas de lpc. Número y porcentaje de perfiles dendríticos en aposición con perfiles de lpc marcados y la cantidad de sinapsis establecidas con éstos en los engrosamientos axónicos de lpc y las estructuras glomerulares.

Perfiles dendríticos	Capa 2-3	Capa 5	Capa 9	Total
	10 Glomérulos	14 Glomérulos	9 Engrosamientos	33 Estructuras
En Aposición	21	79	22	122
Sinaptados	19 (90%)	75 (95%)	21 (95%)	115 (94%)
Una Sinapsis	19 (*100%)	67 (*89%)	21 (*100)	107 (*93%)
Dos Sinapsis		8 (*11%)		8 (*7%)

* Porcentaje respecto del total de perfiles sinaptados

Este análisis también permitió obtener información acerca de la cantidad de perfiles dendríticos relacionados con los terminales axónicos de lpc (glomérulos y engrosamientos), cuya distribución, clasificados por región tectal, se muestra en el Gráfico 1. Este resultado permite definir un rango intercuartílico (RIQ) para la cantidad de perfiles dendríticos por glomérulo, por cada capa tectal: capa 2 = 2-3 perfiles, capa 5 = 4-6 perfiles, capa 9 = 2-3 perfiles (Gráfico 1).

Gráfico 1. Cantidad de perfiles dendríticos por estructura glomerular. Análisis de glomérulos completos (n=34). La distribución se agrupa para la capa 5 (n=14) entre 4 a 6 perfiles dendríticos por glomérulo, mientras que para las capas 2-3 (n=10) y 9 (n=9), la cantidad de perfiles dendríticos está entre 2 y 3 por engrosamiento.



3.3.3 Relación Ipc/RGCs

Para determinar la relación de los terminales retinianos y los axones de Ipc en el tectum óptico, se realizaron experimentos de inyecciones dobles en 3 animales, en los cuales se inyectó PHA-L en el núcleo Ipc y CTB en la retina contralateral al TeO correspondiente.

Como resultado, los axones retinianos se marcaron de manera anterógrada en todas las capas retino-recipientes en toda la extensión del tectum, y a su vez, terminales *paintbrush* se marcaron claramente en TeO. Sin embargo, el doble marcaje de estas estructuras no logró ser realizado de manera óptima, ya que el revelado consecutivo de ambos marcadores favorecía una buena señal sólo

para el primero de los trazadores en ser reaccionado. Ejemplos de esto último se observan en la figura 30 B, donde se aprecian muestras en las que los axones retinianos fueron revelados en primer lugar (CTB) y posteriormente los terminales de lpc (PHA-L), lo que resultó en una potente marca de las capas retino-recipientes y un enmascaramiento total de la marca de lpc. El caso recíproco se observa en la figura 30 A, donde se puede ver el axón de lpc correctamente marcado y los terminales de la retina muy débilmente revelados.

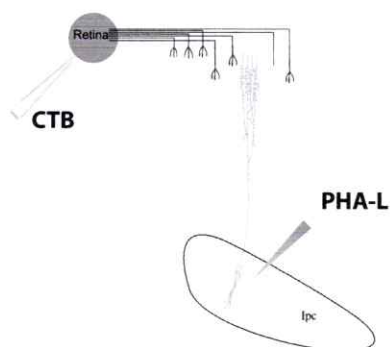
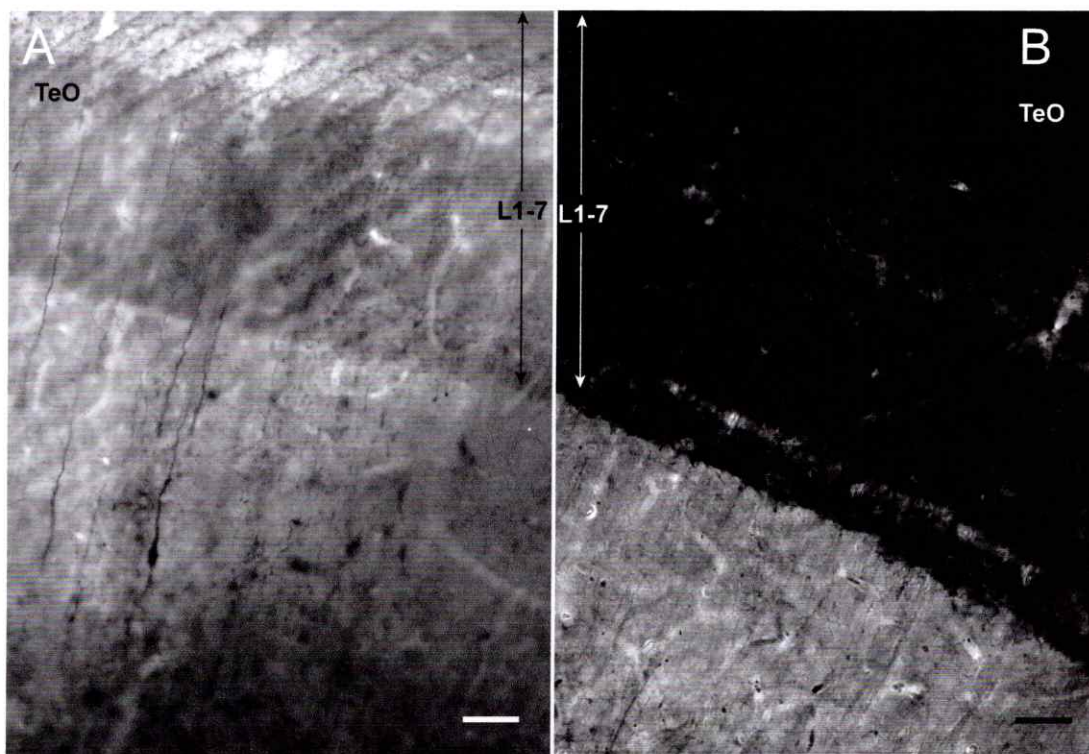


Figura 30. Experimentos de doble marcaje PHA-L/CTB.

Cortes coronales de las capas superficiales de TeO luego de una inyección doble de PHA-L en lpc y CTB en la retina revelada secuencialmente con NiDAB/DAB. En A se reveló primero el PHA-L y luego el CTB. En B, se reveló en el orden inverso. Se muestra que sólo los revelados que se realizaron en primer lugar lograron mostrar una marca evidente, mientras que la segunda marca es casi imperceptible (A y B). C, diagrama inyección doble realizada con PHA-L en lpc y CTB en la retina. Barra de tamaño= 50µm.

Debido a lo anterior, para lograr identificar los perfiles axónicos pertenecientes a las células ganglionares de la retina, utilizamos un criterio morfológico que fue previamente descrito en mamíferos (rata; Lund, 1969) (gato; Sterling, 1971) (primate; Tigges y col., 1973) y establecido por Hayes y Webster (1975) en la paloma, el cual está asociado a características mitocondriales y citoplasmáticas propias de los mismos. El criterio está ilustrado en la figura 31, la cual muestra perfiles terminales con mitocondrias con un espacio inter-membrana notablemente mayor al resto de las estructuras presentes en las capas tectales retino-recipientes (Hayes & Webster 1975).

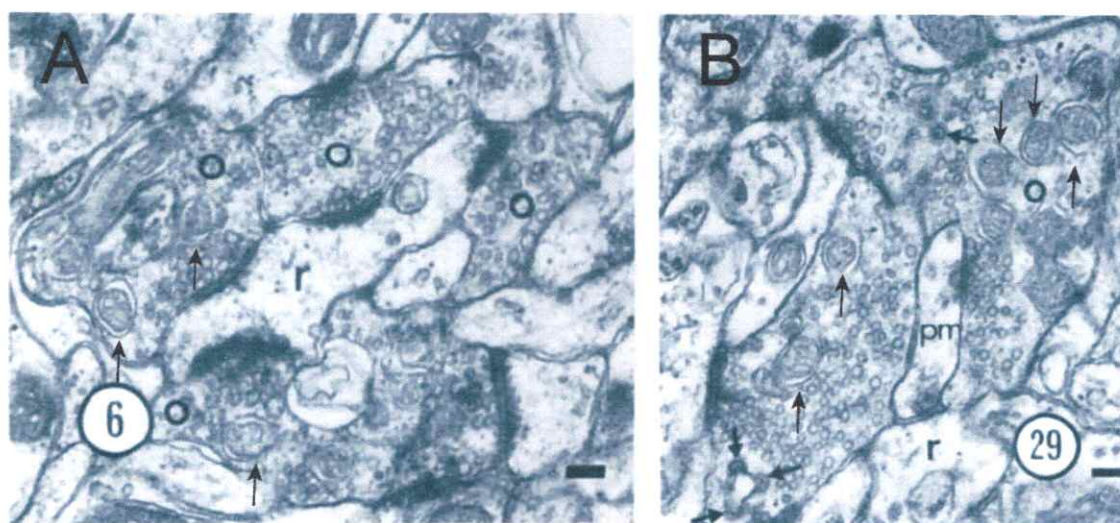


Figura 31. Criterio morfológico para terminales retinianos. Imágenes tomadas de publicación de Hayes & Webster del año 1975, que muestran el criterio morfológico que define a los terminales retinianos en el tectum óptico. Este se define por mitocondrias características, las cuales muestran un prominente espacio entre sus membranas interna y externa (flechas). Barra de tamaño = $0,1\mu\text{m}$.

Entonces, para determinar la interacción de Ipc con los terminales retinianos utilizamos muestras provenientes de tres animales inyectados con PHA-L en Ipc y valiéndonos del criterio morfológico antes mencionado, realizamos un análisis

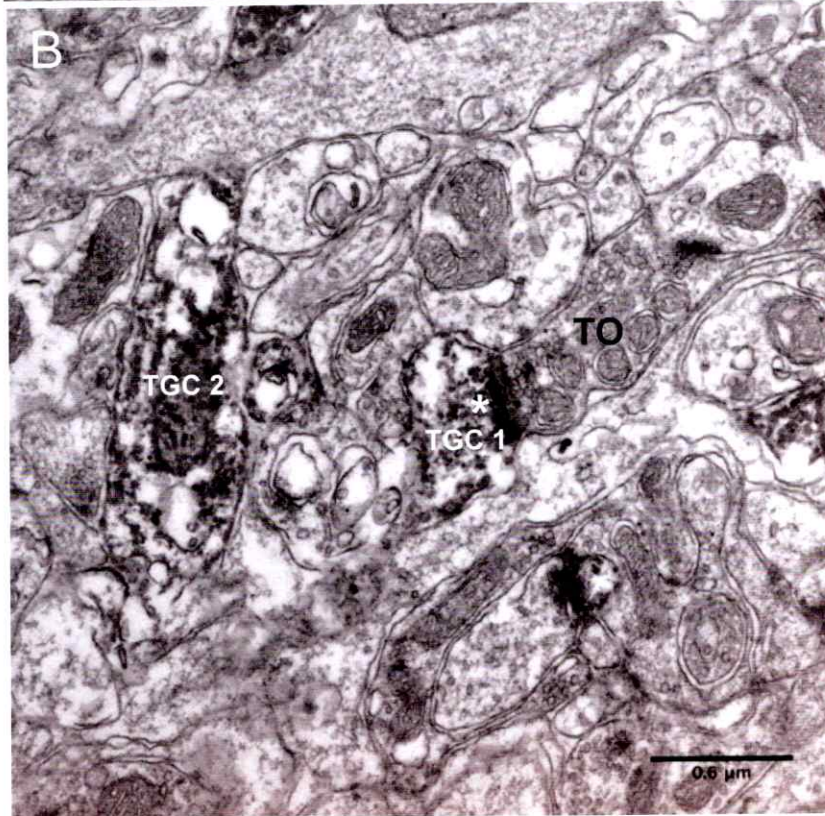
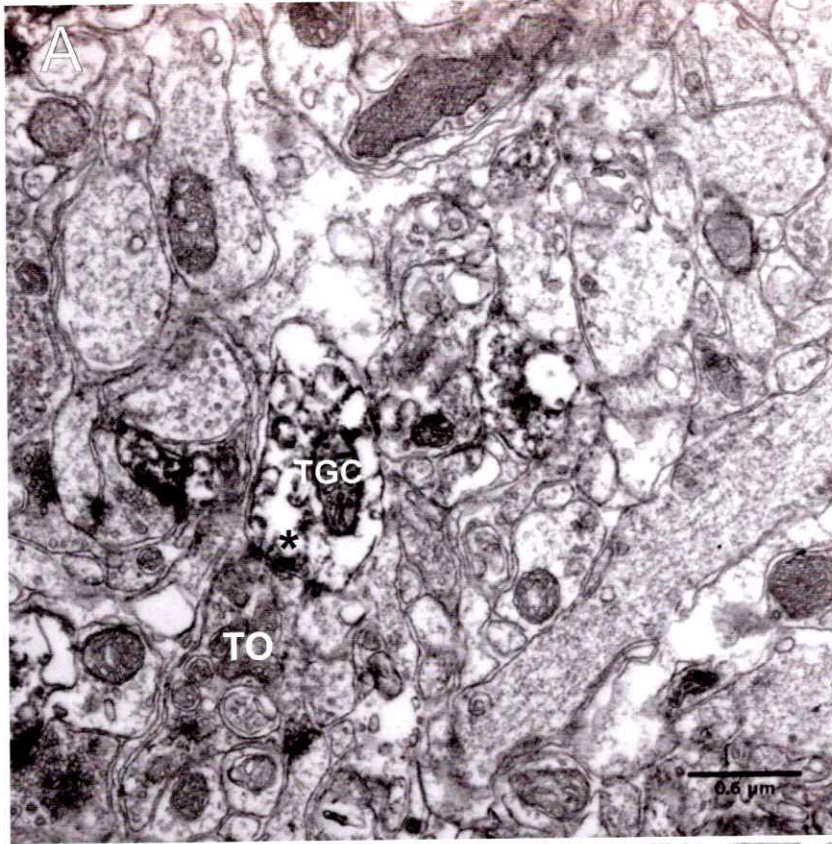
en secciones ultrafinas consecutivas de regiones tectales con glomérulos marcados. Un total de treinta estructuras glomerulares fue analizado (15 en capa 2-3 y 15 en capa 5).

El análisis mostró que la estructura glomerular carece de terminales retinianos en su interior. Aunque se observaron terminales de lpc en aposición con perfiles identificados como terminales retinianos, no fue posible encontrar evidencia de una relación sináptica entre estructuras de lpc y estos últimos.

3.3.4 Relación RGCs/TGCs

Dada la ausencia de terminales retinianos al interior del glomérulo, buscamos la interacción directa entre los terminales retinianos y las dendritas de las TGCs, nuevamente mediante el uso del criterio morfológico para identificar estos terminales. Utilizando muestras de 3 animales inyectados con BDA 3K en el núcleo rotundus, que poseían un denso marcaje de las estructuras dendríticas pertenecientes a las TGCs del tipo I, realizamos un análisis por área tectal (50X50 μm) en búsqueda de perfiles dendríticos marcados que se relacionasen con terminales retinianos.

Como se muestra en la figura 32, es posible apreciar perfiles dendríticos marcados en estrecha relación con estructuras axónicas pre-sinápticas correspondientes a terminales retinianos. La relación de estos perfiles ocurre fuera de la estructura glomerular.



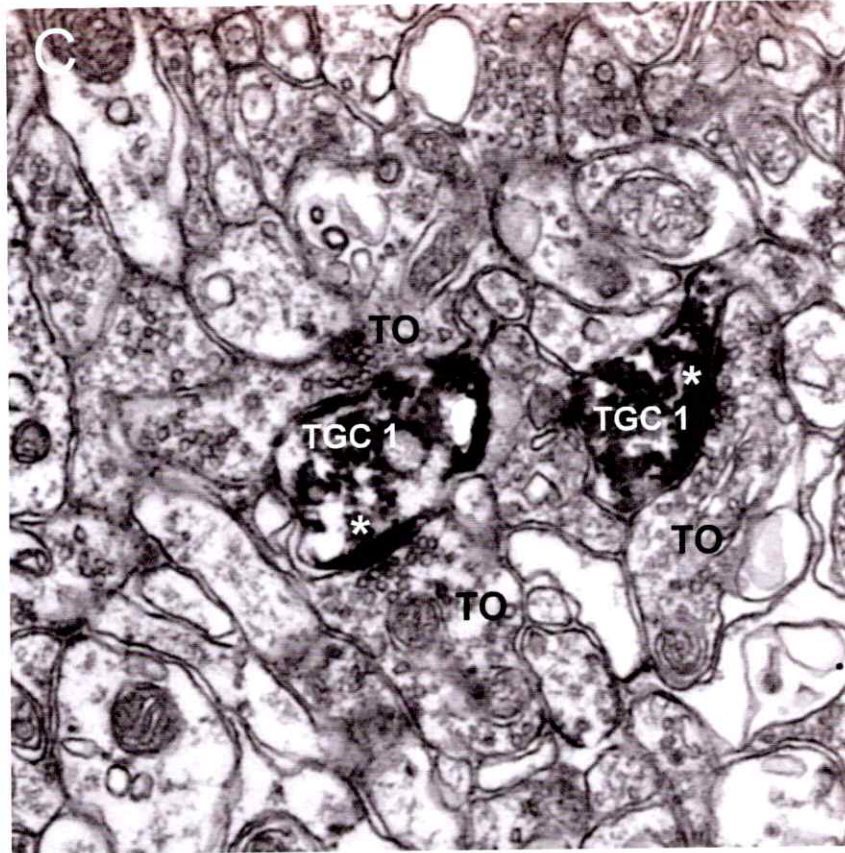


Figura 32. Relación terminales retinianos/ TGCs. Según criterio morfológico se definen los terminales axónicos mostrados en la figura como terminales ópticos (TO), los cuales se muestran en estrecha relación con terminales dendríticos pertenecientes a células TGCs retrógradamente marcadas (A, B, C). Estas estructuras se encuentran estableciendo sinapsis entre sí, lo que se evidencia por las densidades sinápticas marcadas con asteriscos (A, B, C). Mitocondrias con espacio intermembrana prominente (flechas).

3.3.5 Relación Ipc/Células "Shepherd`s crook"

Para el análisis de este posible blanco sináptico, realizamos inyecciones simples de BDA 3K en el núcleo Ipc en 3 animales, obteniendo axones de Ipc y células *Shepherd`s crook* marcadas (Figura 33). La búsqueda en regiones tectales superficiales (capas 2-3 y 5) no arrojó marcajes que evidenciaran relaciones entre perfiles dendríticos pertenecientes a células marcadas retrógradamente desde el núcleo Ipc y perfiles axónicos de neuronas de Ipc.

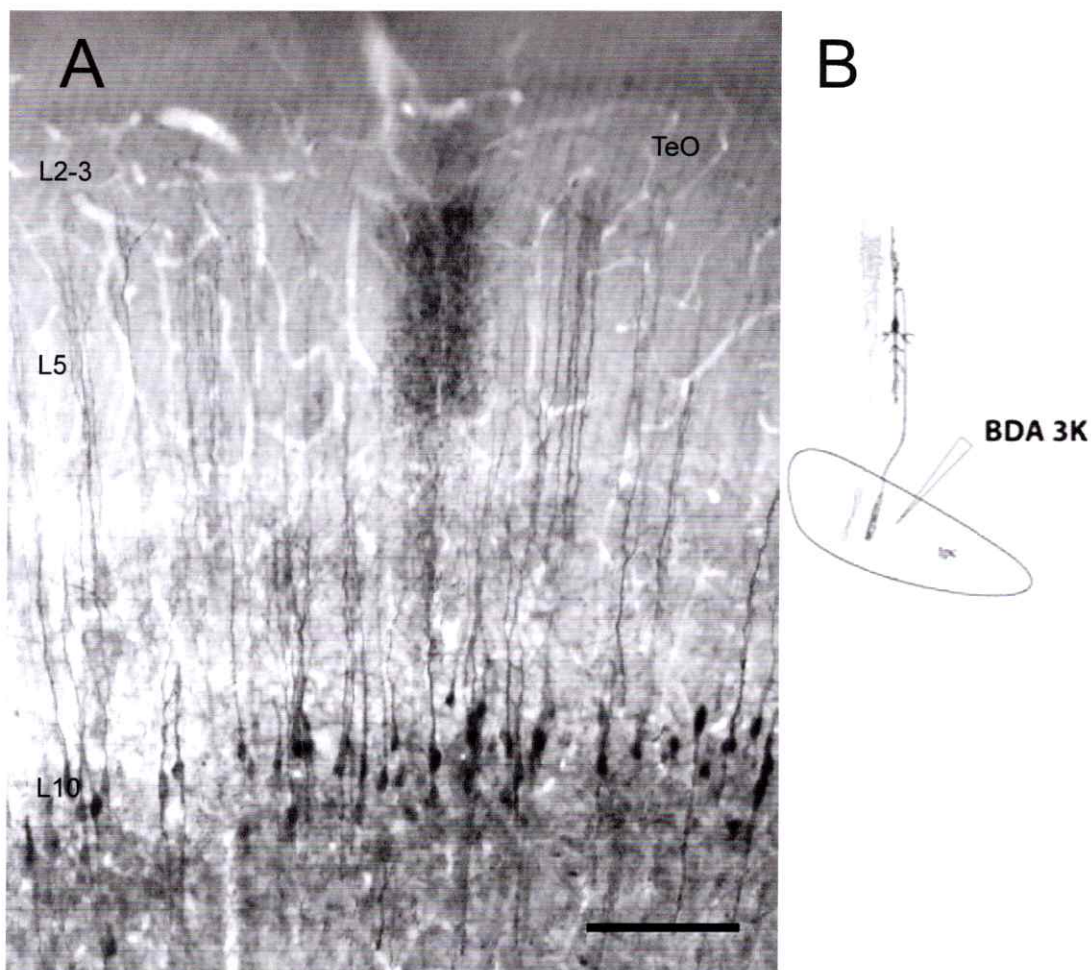


Figura 33. Estructuras marcadas para relación lpc y células *Shepherd's crook* (SC). **A,** Corte coronal de TeO mostrando un terminal axónico de lpc marcado con Ni-DAB sobre un campo de estructuras dendríticas de células SC en las capas superficiales e intermedias de TeO. **B,** Diagrama de inyección simple en lpc con BDA 3K. Barra de tamaño = 200 μ m.

En las capas profundas (capas 9-10) se encontraron perfiles de lpc estableciendo sinapsis con grandes perfiles dendríticos no marcados, al parecer radiales (Figura 34). Al mismo tiempo, a este mismo nivel tectal, encontramos extensos perfiles dendríticos radiales marcados, pertenecientes a células *Shepherd's crook*, siendo sinaptados por estructuras axonales no marcadas (Figura 35 A), las cuales se encuentran llenos de vesículas redondeadas, estableciendo sinapsis asimétricas con la dendrita de la célula SC (Figura 35 A).

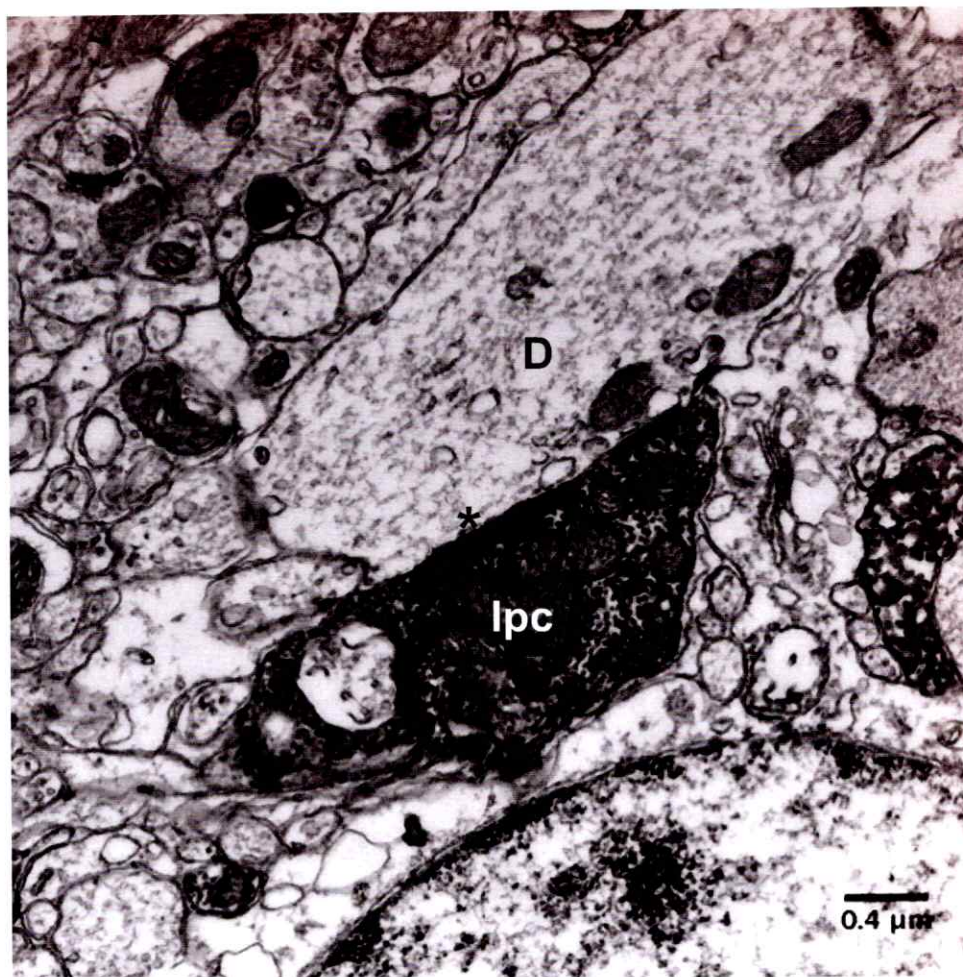


Figura 34. lpc en capas profundas. Fotomicrografía electrónica de un perfil marcado de lpc que se encuentra estableciendo una extensa sinapsis (asterisco) con un perfil dendrítico prominente en la capa 10, sugiriendo la posibilidad que estos últimos podrían pertenecer a las conspicuas dendritas de las células SC a este nivel.

Sorprendentemente, encontramos perfiles dendríticos de células SC estableciendo relaciones con otros perfiles dendríticos mediante estructuras de unión estrecha (Figura 35 B), cuya estructura detallada, y por ende su posible función, es difícil de precisar mediante esta técnica.

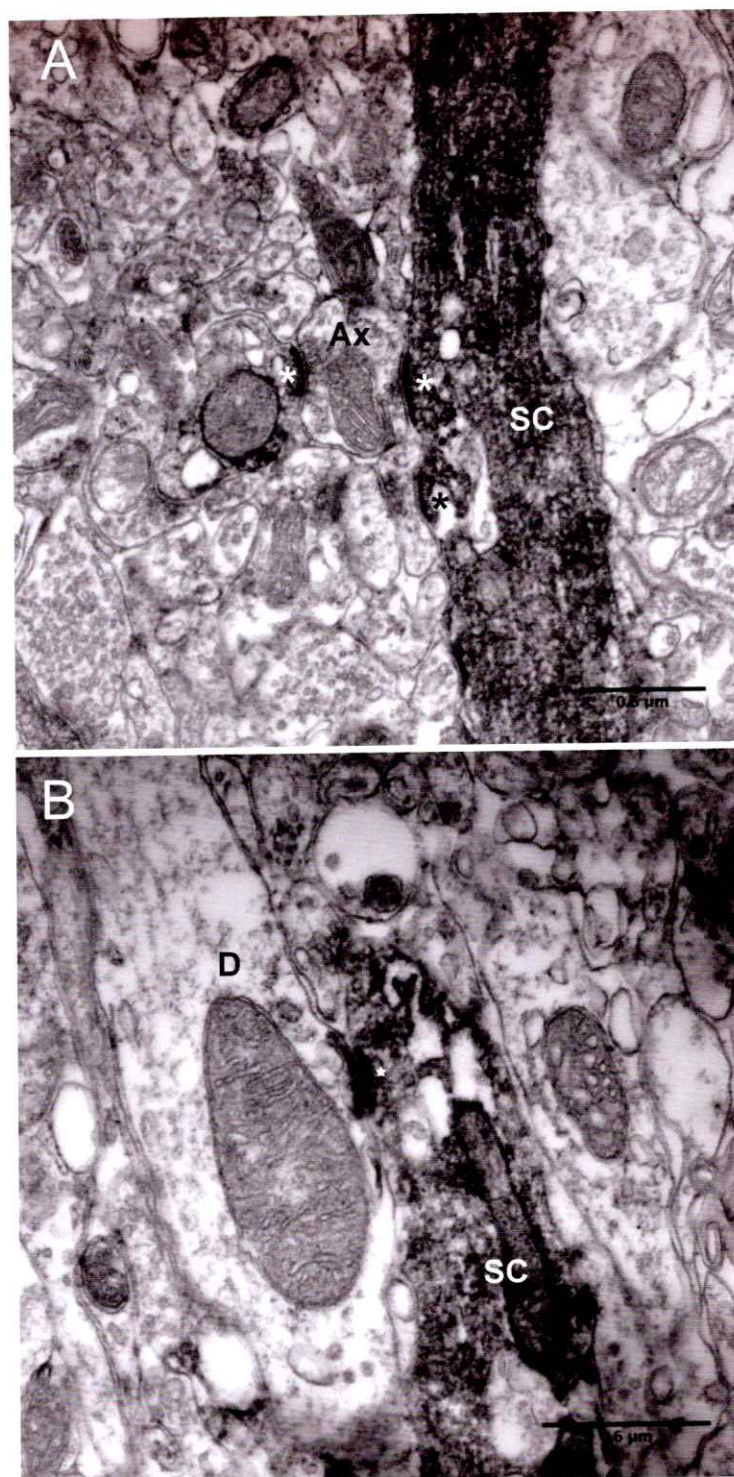


Figura 35. Fotomicrografías electrónicas donde se muestran dendritas de células Shepherd's crook (SC) en las capas profundas de TeO. Los paneles A y B corresponden a un mismo perfil dendrítico marcado. En A establece sinapsis (asterisco) con un perfil axónico no marcado (Ax), mientras que en B establece una estructura tipo "unión estrecha" con otro perfil dendrítico no marcado (estrella).

3.4 Identificación del fenotipo neuroquímico de Ipc mediante microscopía electrónica, utilizando trazadores neuronales e inmunoro

Para confirmar los resultados referentes al carácter neuroquímico de Ipc, realizamos en tres animales ensayos de inmuno-histoquímica simple anti-VGLUT2 además de un caso de doble marca PHA-L / VGLUT2, todos los cuales fueron posteriormente preparados y examinados bajo microscopía electrónica de transmisión. Los ensayos de inmuno-histoquímica simple anti-VGLUT2, revelados mediante el depósito de níquel DAB, mostraron estructuras glomerulares marcadas (Figura 36) en las capas tectales 2-3 y 5, consistente en perfiles pre-sinápticos que contenían vesículas sinápticas redondas densamente empacadas, las cuales corresponden a las estructuras previamente identificadas como terminales axónicos de Ipc.

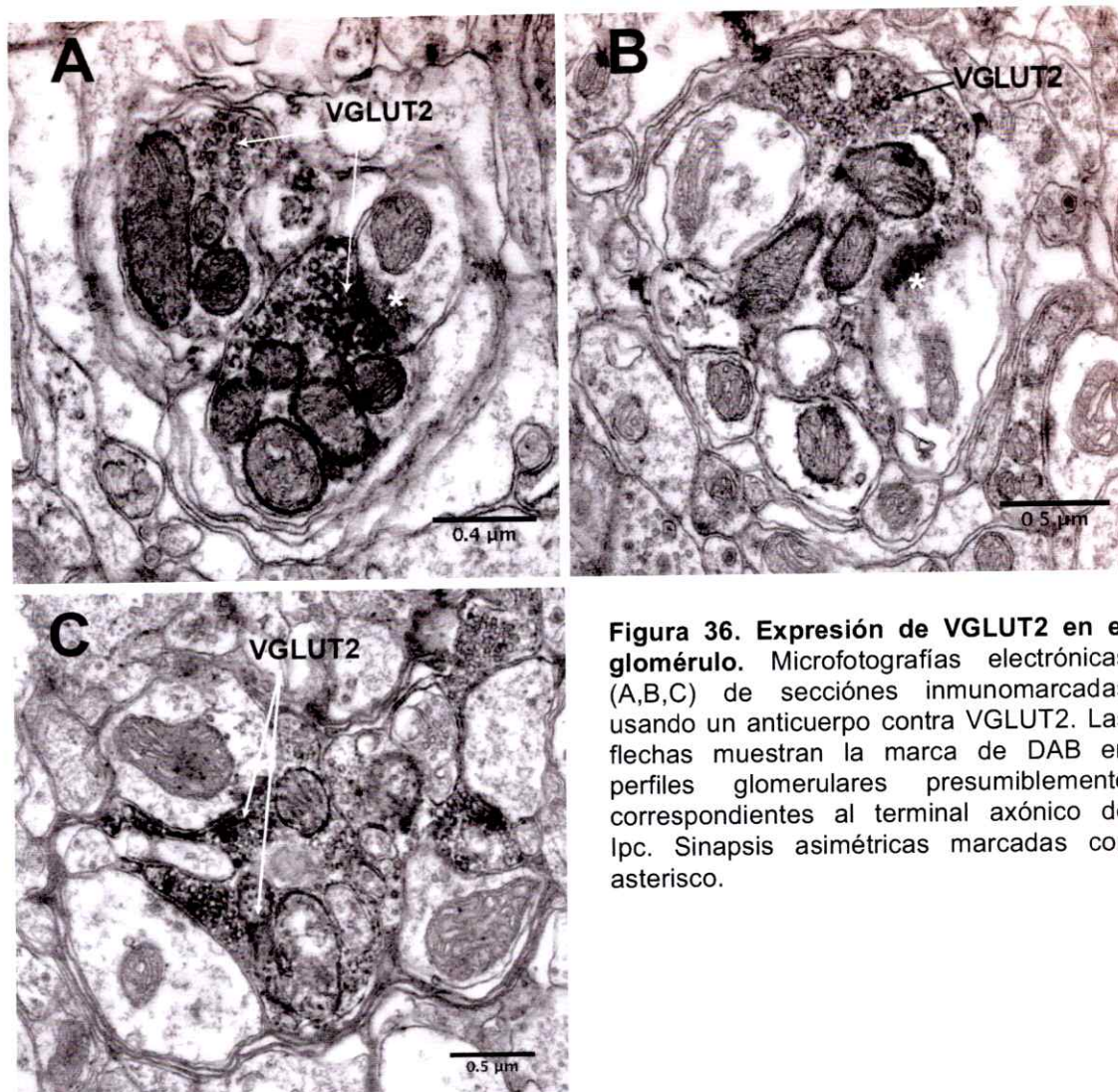


Figura 36. Expresión de VGLUT2 en el glomérulo. Microfotografías electrónicas (A,B,C) de secciones inmunomarcadas usando un anticuerpo contra VGLUT2. Las flechas muestran la marca de DAB en perfiles glomerulares presumiblemente correspondientes al terminal axónico de Ipc. Sinapsis asimétricas marcadas con asterisco.

Además, glomérulos doble-marcados para PHA-L y VGLUT2 en ensayos de inmuno-oro se muestran en la figura 37, donde se aprecian perfiles marcados con níquel-DAB (PHA-L) y sobre ellos, la marca de partículas de oro correspondientes a VGLUT2. Los cortes que se muestran son secciones consecutivas de 50 nm, donde se aprecia que el mismo perfil concentra inmuno-positividad para VGLUT2, en relación a una baja marca de *background*.

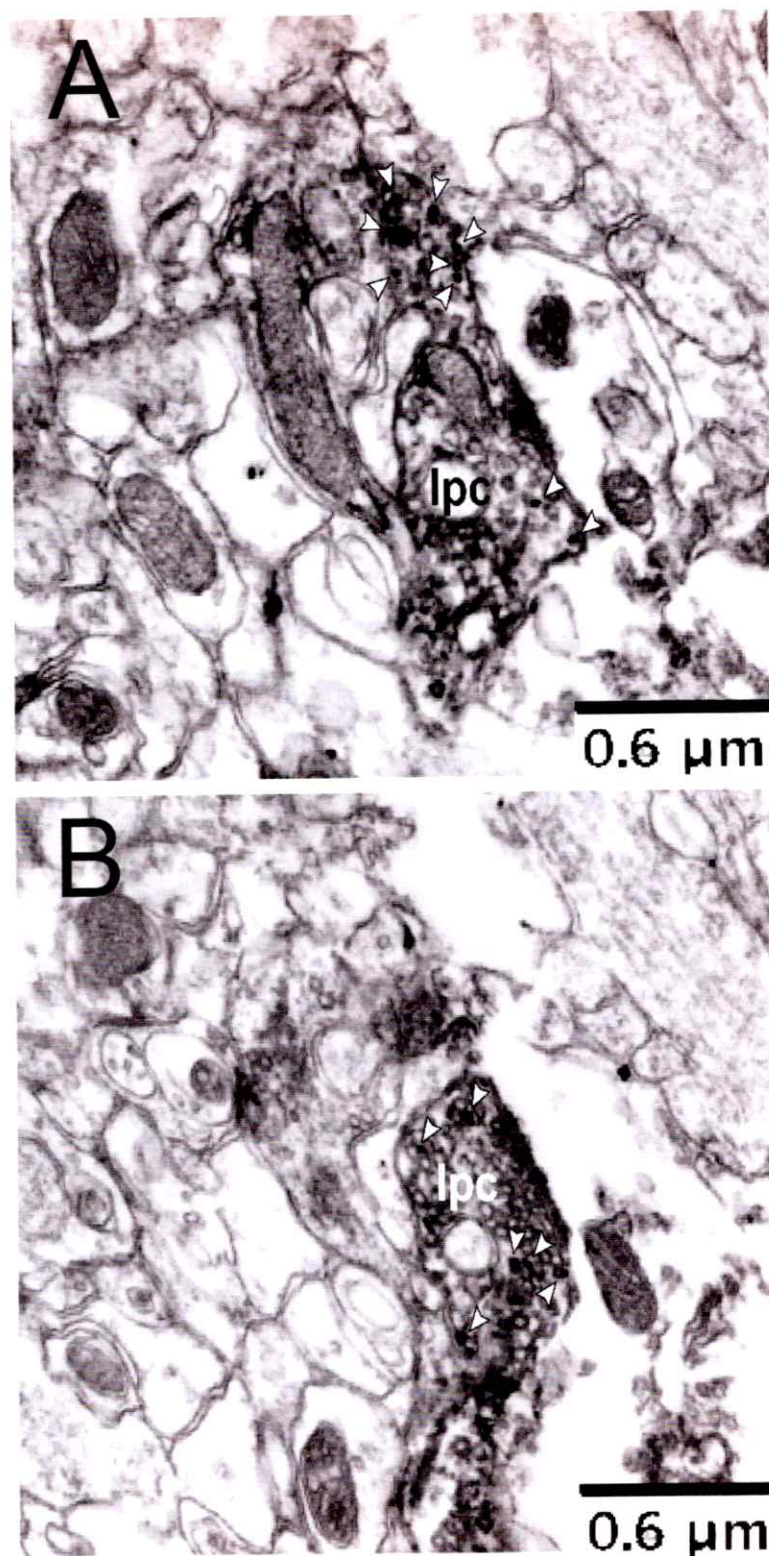


Figura 37. Doble marcaje PHA-L/VGLUT2 . La imagen muestra dos micrografías consecutivas de un perfil axónico de lpc marcado con PHA-L, sobre el cual se muestran partículas de oro (cabezas de flecha) que revelan inmuno-reactividad anti-VGLUT2.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis traen consigo un cambio significativo en cuanto a la descripción funcional del circuito istmo-tectal y al mecanismo mediante el cual este circuito controla el flujo ascendente visual que se origina en el tectum óptico. La posible identidad de lpc como un núcleo glutamatérgico revela, en primer lugar, una notoria heterogeneidad en el complejo ístmico, manifestada en el hecho de que las células colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas se encuentran organizadas en núcleos estrictamente separados, lo que implicaría que las retroalimentaciones (*feedbacks*) mediadas por lpc y SLu son glutamatérgicas y colinérgicas, respectivamente. Esto es particularmente interesante, ya que estos *feedbacks* homotópicos ocurren de manera simultánea y sincronizada, pareciendo afectar capas tectales complementarias. El *feedback* de lpc sobre el tectum potencia la propagación del flujo visual proveniente de la retina hacia áreas visuales superiores (Marín y col., 2007, 2012), proceso que estaría entonces mediado por la liberación de glutamato en lugar de acetilcolina.

Al mismo tiempo, los resultados del estudio de microscopía electrónica permiten precisar el mecanismo mediante el cual los axones de lpc controlan el flujo de la aferencia visual hacia las áreas visuales superiores, al determinar que los botones de los terminales axónicos de lpc representan estructuras sinápticas, y

a su vez, definir que las dendritas de las TGCs son los blancos post-sinápticos principales de estas estructuras.

En lo que sigue discutiremos cada uno de estos puntos con más detalle.

4.1 Identidad neuroquímica de lpc y SLu

Las proyecciones axónicas de lpc y SLu establecen dos *feedback* paralelos y homotópicos sobre el tectum óptico, los cuales hasta ahora habían sido considerados colinérgicos. Este estudio confirma la función colinérgica asignada a las neuronas de SLu, ya que éstas fueron las únicas células del complejo del istmo que expresan, a nivel de mRNA, los tres marcadores colinérgicos pre-sinápticos: VAcHT, ChAT y CHT1. Sorprendentemente, el núcleo lpc, que ha sido ampliamente aceptado como colinérgico, debido a su inmuno-reactividad para la colina acetil transferasa (Sorenson y col., 1989; Bagnoli y col., 1992; Medina & Reiner 1994), no mostró expresión del mRNA codificante para el transportador vesicular de acetilcolina. Las neuronas de lpc mostraron la expresión de los mRNAs para ChAT y CHT1, aunque de manera visiblemente más débil que la observada en SLu para ambos marcadores.

De acuerdo a estos resultados, las neuronas de lpc podrían sintetizar acetilcolina y recuperar la colina desde el espacio extracelular, pero serían incapaces de empacar dicho neurotransmisor en vesículas sinápticas. Debido a que este último paso es crítico para la liberación vesicular del neurotransmisor,

la expresión de ChAT y CHT1 por sí solas se vuelven insuficientes para soportar un fenotipo colinérgico vesicular.

Sin considerar a *lpc*, los tres marcadores colinérgicos se co-expresaron en todos los núcleos colinérgicos, con la sola excepción del núcleo SpM, donde se expresaron VAcHT y ChAT pero no se detectó expresión de CHT1. La alta especificidad de las sondas colinérgicas quedó mostrada al no haberse producido marca en ninguna zona del cerebro en la que no se hayan previamente reportado células colinérgicas. Sin embargo, existe la posibilidad que *lpc* exprese el mRNA para VAcHT en cantidades que estén bajo el umbral de detección de la técnica utilizada, alternativa que siempre va a estar presente en un estudio de esta naturaleza.

Debido a la posibilidad de que existan otras isoformas de VAcHT, podría argumentarse también que estas otras formas del transcrito VAcHT no fueron detectadas por nuestra sonda (tesis de pregrado del autor). En el pollo (Mukherjee & Hausman 2004) como en otros vertebrados (Bejanin y col., 1994; Roghani y col., 1994; Naciff y col., 1997), el locus colinérgico contiene los genes de VAcHT y ChAT, en donde el gen de VAcHT es una región codificante ininterrumpida, sin intrones, anidada en el primer intrón del gen ChAT (Figura 38). Todas las isoformas del gen VAcHT identificadas y estudiadas en mamíferos corresponden a variaciones en regiones 5' no traducidas (5'UTRs) (Roghani y col., 1994; Bejanin y col., 1994; Cervini y col., 1995; Erickson y col., 1994). Por lo tanto, de acuerdo con la conservada estructura del gen VAcHT,

parece poco plausible la existencia de variantes de *splicing* alternativo relacionadas con regiones codificantes en el pollo. Aunque las isoformas del tipo 5'UTR del gen VACHT en el pollo son desconocidas, nuestra sonda fue dirigida a una extensa región codificante de 390pb (la cual codifica para los dominios trans-membrana 3 al 7 de la proteína VACHT) del transcrito, la cual corresponde a la región codificante invariable en todas las isoformas de VACHT de mamíferos. Según esto, el reconocimiento por parte de nuestra sonda debiese cubrir las posibles isoformas equivalentes de VACHT que pudiesen estar presentes en el transcriptoma del pollo.

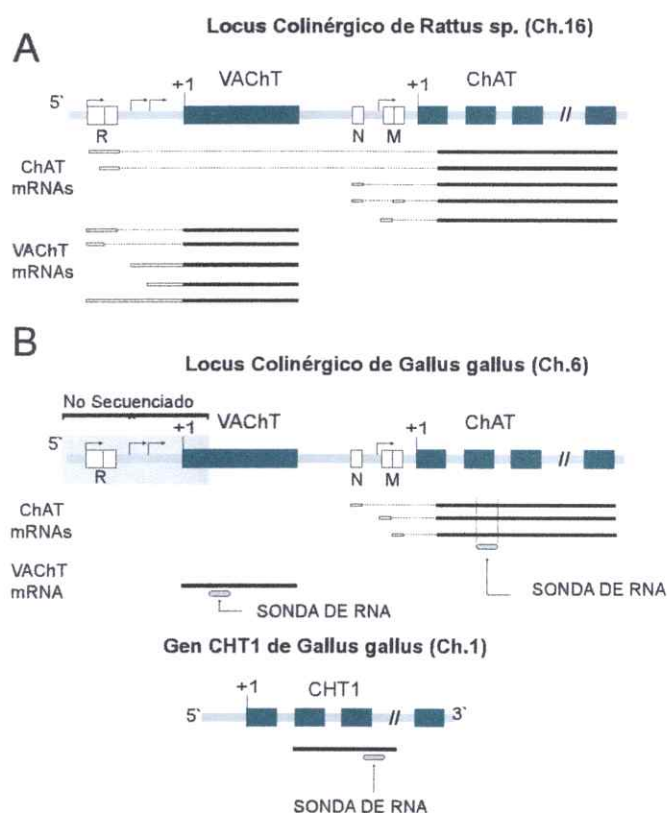


Figura 38. El locus colinérgico. A, Esquema del locus colinérgico en la rata, donde se muestra la organización anidada de los genes VACHT y ChAT, junto con una serie de isoformas 5'UTR de los RNAs mensajero de éstos. B, Esquema del locus colinérgico de *Gallus gallus* parcialmente secuenciado, y las especies de RNA mensajero que hasta ahora han sido identificadas. Se muestran las zonas de hibridación de las sondas de RNA utilizadas, las cuales corresponden a regiones codificantes del RNA mensajero para cada transcrito.

A diferencia de lo que sucede con VAcHT, la expresión del transportador vesicular de glutamato (VGLUT2) en lpc resultó muy alta, lo cual está en concordancia con lo previamente reportado en la paloma, en donde, en ensayos de hibridación *in situ*, utilizando sondas radioactivas de DNA, diferentes a las usadas en este estudio, se mostró marcaje para VGLUT2 en lpc (Islam & Atoji 2008).

Los terminales axónicos de lpc, llamados *paintbrushes*, y los supuestos botones pre-sinápticos de éstos, se mostraron claramente inmuno-positivos frente al anticuerpo anti-VGLUT2, implicando fuertemente un fenotipo glutamatérgico para este núcleo.

Estos resultados están en concordancia con un estudio muy poco citado en la literatura (Morino y col., 1991) que mostró que en palomas enucleadas persistía una inmuno-reactividad para glutamato en perfiles restringidos a la capa tectal 5. En este estudio se sugiere que estos perfiles remanentes poseían una semejanza estructural a la de los terminales axónicos de lpc en las capas superficiales del tectum óptico.

La distribución de VGLUT2 en el cerebro del pollo se corresponde estrechamente con la observada en la paloma (Islam & Atoji 2008), lo cual viene a confirmar la especificidad de la sonda utilizada en este estudio, según fue predicho previamente en el diseño bioinformático de ésta. Nuestros resultados de microscopía electrónica respaldan aún más un fenotipo glutamatérgico, ya que a nivel de ultra estructura fuimos capaces de mostrar la expresión de

VGLUT2 en estructuras glomerulares presumiblemente correspondientes a terminales sinápticos de lpc. El ensayo de marcaje doble con DAB inmuno-oro nos permitió confirmar que un perfil axónico de lpc marcado con DAB estaba marcado con partículas inmuno-oro, indicativas de la inmunoreactividad anti-VGLUT2.

Una demostración experimental de la liberación de glutamato por parte del axón de lpc se hace necesaria para confirmar de manera definitiva la identidad glutamatérgica de lpc. Sin embargo, existen dos circunstancias anatómicas que dificultan este objetivo. Primero, los terminales axónicos de lpc se entremezclan estrechamente con la densa neuropila de los terminales retinianos, los cuales son glutamatérgicos, obscureciendo la interpretación de experimentos de microdiálisis convencionales. Y segundo, la posibilidad de registrar potenciales post-sinápticos como resultado de la estimulación de lpc, y manipular estos potenciales mediante técnicas farmacológicas, es obstaculizada a la luz de la evidencia presentada en este estudio, la cual indica que los terminales axónicos de lpc establecen sinapsis con las especializaciones dendríticas de las células ganglionares tectales. Estas especializaciones dendríticas están característicamente dispuestas muy lejos del soma neuronal y son, además, presumiblemente afectadas por los terminales retinianos glutamatérgicos.

4.2 La posible *down-regulation* del locus colinérgico

La ausencia de expresión del RNA mensajero del gen VACHT en *Ipc* junto con una expresión de RNA mensajero y proteína ChAT comparativamente disminuida (respecto de SLu), sugiere una regulación por decremento (*down-regulation*) parcial del locus colinérgico. Estudios detallados en la rata (Roghani y col., 1994; Bejanin y col., 1994; Cervini y col., 1995; Mallet y col., 1998) (Figura 37) muestran que los genes VACHT y ChAT comparten un sitio de inicio de la transcripción (región R) que da origen a un transcrito primario que abarca el locus completo, el que luego de un proceso de *splicing* alternativo puede originar los mRNAs maduros de ChAT y VACHT (Figura 38, Region R). Por otra parte, también existen secuencias promotoras exclusivas para cada gen (V1, V2 para VACHT; N y M para ChAT), dando como resultado la expresión de varias isoformas 5'UTR, las cuales pueden ser co-expresadas o reguladas de manera individual (Bejanin y col., 1994; Erickson y col., 1994; Berrard y col., 1995; Cervini et al., 1995; Shimojo y col., 1998; Weihe y col., 1998; Schütz y col., 2001; Castell y col., 2002, 2003; Brock y col., 2007). Se ha propuesto que esta clase de control individual de ChAT y VACHT es la más frecuente en la rata y que la expresión acoplada dirigida por la región R es la menos significativa (Schütz y col., 2001). En el pollo, los exones no codificantes N y M del gen ChAT han sido descritos, pero la región río arriba del gen VACHT que contendría la región R no ha sido aún secuenciada (Mukherjee & Hausman 2004). Sólo la isoforma N del transcrito ChAT ha sido reportado (Mukherjee &

Hausman 2004) y no existen reportes de isoformas del transcrito de VACHT. Sin embargo, la estructura altamente conservada del locus colinérgico (Figura 38) hace plausible que la regulación de este locus en el pollo sea similar a la observada en el mamífero, teniendo como resultado una regulación dual, y/o individual, de la expresión de las proteínas VACHT y ChAT. Por lo tanto, es posible que las neuronas de *lpc* estén sufriendo una *down-regulation* del gen colinérgico, dando como resultado el silenciamiento específico del gen VACHT y una disminuida expresión (silenciamiento incompleto) del gen ChAT. Esta podría ser la razón por la cual la expresión de CHT1 está aún presente en *lpc*, ya que el gen CHT1 está ubicado en un cromosoma diferente al del locus colinérgico. Resultados preliminares de ensayos de hibridación *in situ* indican que el mRNA de VACHT se encuentra expresado en *lpc* durante el desarrollo y se vuelve indetectable previo a la eclosión (Reyes, R.; Ferran, JC; Puelles, L.; Gonzalez-Cabrera, C.; Marín, G. Manuscrito en preparación).

4.3 Co-liberación de glutamato y acetilcolina

Evidencia creciente ha demostrado la presencia de transportadores de glutamato en neuronas previamente definidas como catecolaminérgicas, GABAérgicas o colinérgicas (El Mestikawy y col., 2011) reforzando la idea de la co-transmisión neuronal. La expresión del RNA mensajero y la proteína VGLUT2 ha sido reportada en motoneuronas de la médula espinal, las cuales también expresan los transcritos y las proteínas ChAT y VACHT (Ichikawa y

col., 1997; Nishimaru y col., 2005; Herzog y col., 2004). Se ha sugerido que los transportadores vesiculares VGLUT2 y VAcHT podrían estar compartimentalizados en regiones diferentes o actuar de manera sinérgica en la misma vesícula sináptica (Herzog y col., 2004, El Mestikawy y col., 2011). Se ha sugerido también que las propiedades funcionales de la co-liberación de glutamato y acetilcolina estarían asociadas con la transmisión de señales excitatorias rápidas, mediadas por glutamato, y señales excitatorias en una escala de tiempo menor, mediado por acetilcolina (El Mestikawy y col., 2011).

Nuestros resultados sugieren un patrón de expresión similar en el pretectum, donde el núcleo SpM expresa los transcritos VAcHT, ChAT y VGLUT2, además de inmuno-reactividad para ChAT, aunque no es claro si los tres marcadores son co-expresados por las mismas neuronas. Sin embargo, nuestros resultados en lpc son distintos, ya que VGLUT2 y ChAT son co-expresados en ausencia del transcrito VAcHT.

Una atractiva alternativa es que los axones de lpc co-liberen glutamato vía un mecanismo vesicular y acetilcolina mediante un mecanismo no-vesicular. Por ejemplo, en el órgano eléctrico del pez torpedo se ha postulado un mecanismo que permitiría la liberación de acetilcolina de manera cuántica no vesicular (Israel y col., 1986, 1994; Bloc y col., 1999, 2000). Este mecanismo está basado en un homo-oligómero de 220 kDa, denominado mediatóforo, compuesto por subunidades proteo-lipídicas de 15 a 16 kDa. Debido a que la proteína homóloga que forma este mediatóforo, la sub-unidad c del sector de membrana

(V0) de la Vacuolar-H⁺ ATPasa (V-ATPasa), se encuentra altamente conservada entre los vertebrados, como ha sido recientemente predicho en el genoma de *Gallus gallus* (Gene ID: 416753, Marzo 2012), cabe preguntarse si un mecanismo similar estaría operando en los terminales axónicos de lpc en el pollo.

Otra interesante posibilidad es la que presenta un reciente hallazgo relacionado al transportador de alta afinidad de colina (CHT), el cual mostró que la liberación no cuántica de acetilcolina por parte de neuronas parasimpáticas en el epitelio respiratorio de cobayos, es mediada por la acción de dicho transportador (Chávez y col., 2011). Debido a que lpc expresa el RNA mensajero para CHT1, una posible co-liberación de glutamato y acetilcolina podría sustentarse bajo la acción de este transportador.

En vista de todo lo antes expuesto, podemos afirmar que el complejo del istmo en aves posee una neuroquímica heterogénea y segregada para los núcleos del istmo, identificando al núcleo SLu como colinérgico y a lpc como un núcleo glutamatérgico.

4.4 Los blancos sinápticos de lpc.

Aparte de mostrar sustanciales evidencias a favor del perfil glutamatérgico de los terminales de lpc, esta tesis pudo determinar, por una parte, que los botones de los terminales axónicos de lpc representan estructuras sinápticas, y al mismo tiempo, definir los blancos post-sinápticos principales de estas estructuras.

Los terminales axónicos de lpc presentan una gran cantidad de botones terminales en sus ramificaciones tectales, los cuales hemos sido capaces de identificar en este trabajo, en las capas tectales superiores, como estructuras glomerulares que engloban una serie de perfiles post-sinápticos, pertenecientes, al parecer en su mayoría, a estructuras dendríticas de las células ganglionares tectales, y en las capas tectales profundas, como engrosamientos axónicos. Estas estructuras se encuentran en registro con las terminaciones estratificadas de las estructuras dendríticas de las células ganglionares tectales (capas tectales 2-3, 5 y 9). Estos hallazgos apuntan a que lpc ejerce un control directo sobre los canales tecto-talámicos mediados por las TGCs (subtipos I3, I5a,b y tipo II), quizás de manera sinérgica con los terminales retinianos en las capas superiores.

4.5 La organización glomerular

Al examinar la ultra-estructura de los terminales axónicos de lpc, nos encontramos que sus botones sinápticos se organizan de una manera muy particular en las capas tectales superiores, en estructuras tipo glomérulo. Estas estructuras glomerulares habían sido previamente reportadas (Hayes & Webster 1975; Angaut & Reperant 1976) en las capas retino-recipientes 4 - 5 del tectum óptico de palomas y pollos. Sin embargo, aparte de definirse, mediante experimentos con animales enucleados, que estas estructuras no eran de origen retiniano (Hayes & Webster 1975), su verdadera naturaleza era desconocida hasta el presente trabajo.

Al interior del glomérulo, en particular los ubicados en la capa tectal 5a y 5b, el perfil perteneciente a lpc se encuentra cargado de vesículas sinápticas y establece sinapsis asimétricas con varios perfiles dendríticos, de los cuales al menos 2 de ellos corresponden a procesos terminales de las especializaciones dendríticas (*bottlebrush*) de las células ganglionares tectales tipo I5a y I5b. También logramos identificar glomérulos con marca doble en las capas más superficiales, donde terminan las TGCs del tipo I3, los cuales contienen perfiles dendríticos levemente más grandes. A nivel de la capa tectal 9, donde terminan las dendritas de las células ganglionares tectales del tipo II, también fue posible observar doble marcaje y sinapsis entre perfiles correspondientes a engrosamientos axónicos de lpc y perfiles dendríticos de las células ganglionares tectales marcados retrógradamente.

Estos resultados se ajustan casi perfectamente a las observaciones fisiológicas que muestran que el *feedback* de lpc controla la actividad de la totalidad de las subdivisiones del núcleo rotundus, cada una de las cuales recibe la aferencia de una clase específica de TGCs (Karten y col., 1997; Marín y col., 2003, 2012). La estrecha relación sináptica de los terminales de lpc con las dendritas de las TGCs al interior del glomérulo, vienen a ser el sustrato anatómico-estructural del control ejercido por lpc sobre la totalidad del flujo tectofugal (Figura 39).

4.6 Cambio de paradigma

La fisiología del circuito istmo-tectal muestra que la actividad de lpc es indispensable para el flujo visual tecto-talámico (Marín y col., 2007, 2012), ya que al bloquear las respuestas visuales de lpc, no hay flujo visual ascendente hacia el tálamo, suprimiéndose completamente las respuestas visuales en todas las subdivisiones del núcleo rotundo (Marín y col., 2012). En otros vertebrados, se ha mostrado que la estimulación del istmo o la aplicación de agonistas colinérgicos, aumenta la amplitud del potencial evocado visual en las capas superficiales de TeO [Teleostos (Schmidt, 1995), anuros (Titmus y col., 1999; Dudkin & Gruberg, 2003), y mamíferos (Binns & Salt, 2000; Lee y col., 2001)]. Bajo la óptica de una identidad colinérgica de los núcleos colinérgicos istmales que se proyectan a TeO, se había aceptado un mecanismo de facilitación pre-sináptico para este fenómeno [en teleósteos (King & Schmidt 1991), en anfibios (Titmus y col., 1999; Dudkin & Gruberg, 2003), en mamíferos (Binns & Salt,

2000; Lee y col., 2001) y en aves (Marín y col., 2005)], el cual estaría mediado por la liberación de acetilcolina por parte del istmo en las capas tectales superficiales, actuando sobre receptores nicotínicos presentes en el terminal retiniano. Esto que resultaría en una mayor liberación pre-sináptica de glutamato por parte de los axones de la retina.

En el caso de las aves, los resultados de este trabajo, aunque no descartan por completo este modelo, apoyan más bien una acción glutamatérgica directa de lpc sobre las dendritas de las células ganglionares tectales. Estos hallazgos, como dijimos previamente, podrían convertirse en el soporte estructural de la estrecha sincronía que existe entre la actividad de lpc y las respuestas visuales multi-unitarias registradas en todas las subdivisiones del núcleo rotundus, así como de la pérdida de esta respuesta visual cuando la actividad de lpc es bloqueada; evidencia que en conjunto sugiere un control directo del *loop* istmo-tectal dependiente de lpc, sobre la probabilidad de disparo de las TGCs (Marín y col., 2012) (Figura 39).

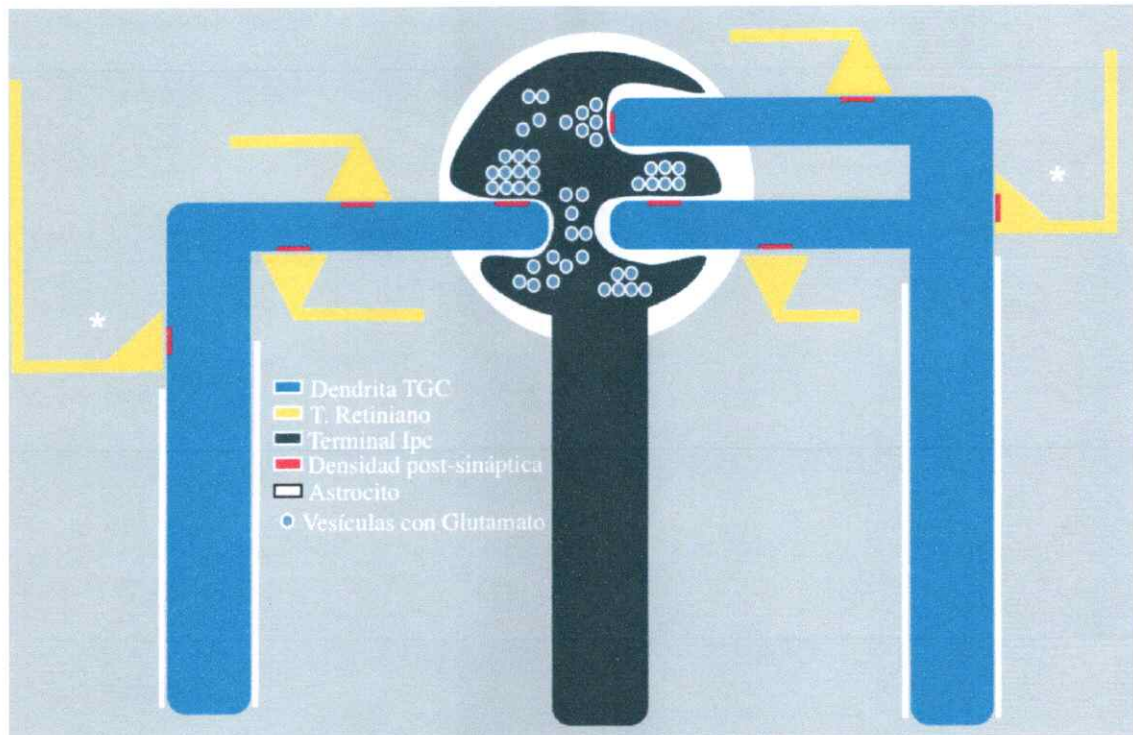


Figura 39. Esquema Organización istmo-tectal. El diagrama muestra la organización del terminal de Ipc con las TGCs y los terminales retinianos. En la estructura tipo glómulo, componentes del terminal axónico de Ipc establecen sinapsis glutamatérgicas sobre elementos dendríticos pertenecientes a células ganglionares tectales. Fuera de esta estructura, los terminales retinianos establecen sinapsis asimétricas con estructuras dendríticas tipo *bottlebrush* de las TGCs. Los asteriscos indican una probable relación sináptica de los terminales retinianos con la estructura principal del *bottlebrush*.

Nuestros datos apoyan además un mecanismo de control dual por parte de los núcleos Ipc y SLu, mediado por glutamato y acetilcolina, respectivamente, que se ejerce en forma simultánea a lo largo de una columna tectal.

4.7 El efecto dual ejercido por lpc/SLu sobre TeO

Si consideramos que los axones de lpc liberan sólo glutamato, podríamos visualizar a la región tectal que recibe el *feedback* simultáneo de lpc y SLu como 2 volúmenes cilíndricos concéntricos de distintos diámetros (Figura 40). Las neuronas de lpc y SLu poseen campos receptivos visuales relativamente grandes (45 ± 15 grados de diámetro vs 20 ± 3 grados, respectivamente), lo que contrasta con sus restringidos terminales axónicos en el tectum ($120\text{--}150$ y $35\text{--}50 \mu\text{m}$ de diámetro, respectivamente). Los campos receptivos relativamente grandes y las respectivas proyecciones de los *feedbacks* ístmicos implican que un estímulo visual pequeño activará cientos de neuronas de lpc y SLu, cuyas proyecciones sobre TeO abarcarán un área tectal de tamaño considerable. Si consideramos para el tectum un factor de magnificación de la entrada retiniana (*input*) de alrededor de $100 \mu\text{m}$ por grado (Clarke & Whitteridge 1976), el área tectal afectada por los *feedbacks* gatillados por un estímulo puntual en la retina sería de aproximadamente unos 4,5 milímetros para SLu y unos 2 milímetros para lpc. Así, esta área, llamada "imagen de punto" por McIlwain (1975) asociada al *feedback* de SLu, contendría de manera concéntrica una "imagen de punto" más pequeño, asociado al *feedback* de lpc. Esta configuración nos permite visualizar una columna de modulación operando en el tectum, consistente de una columna central glutamatérgica (lpc), rodeada por una columna colinérgica más amplia (SLu), con la primera controlando el flujo visual tecto-rotundal dependiente de las TGCs, en todos sus niveles (hacia el tálamo)

y la segunda columna presumiblemente ejerciendo un efecto modulador sobre otros circuitos tectales todavía no determinados, quizá vías premotoras descendentes. Como los axones de lpc establecen sinapsis sobre las dendritas de las TGCs al interior de los glomérulos, es posible suponer que la liberación secuencial de glutamato por parte de los terminales retinianos y los terminales de lpc controlan de manera sinérgica la actividad de las TGCs, explicando el potente control ejercido por el *feedback* de lpc sobre las respuestas visuales en todas las subdivisiones del núcleo rotundus (Marín y col., 2012).

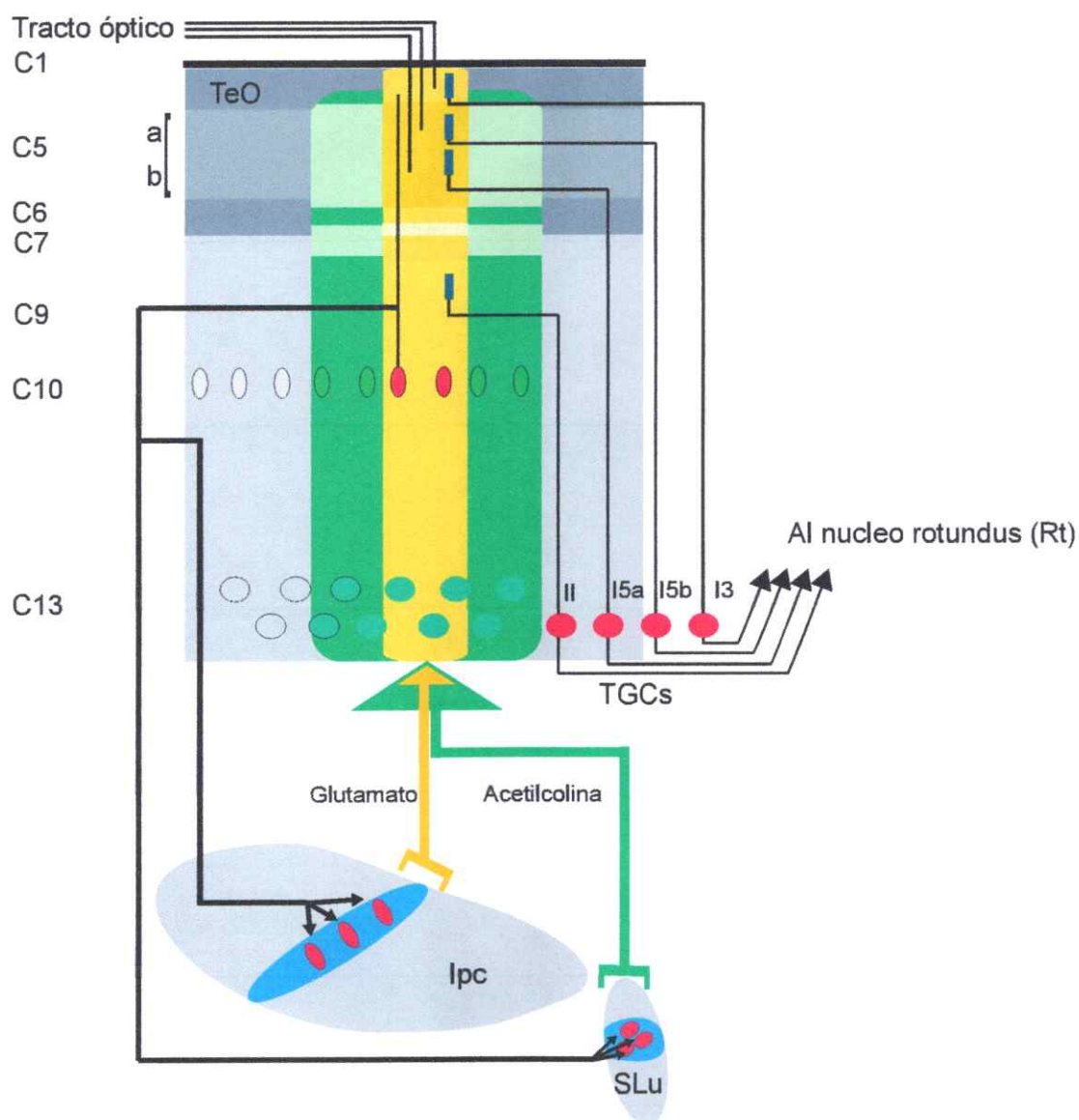


Figura 40. Esquema del control istmo-tectal propuesto. El diagrama representa los volúmenes tectales ocupados por el feedback de lpc (amarillo) y SLu (verde) ante un estímulo puntual presentado en la retina. Este *feedback*, gatillado por un estímulo puntual, abarcaría 2 volúmenes cilíndricos concéntricos de diámetros distintos, estableciendo un "haz" modulador compuesto de una columna central glutamatérgica (lpc; amarillo) controlando el flujo visual tecto-rotundal, sobrepuesto a una columna colinérgica más ancha (SLu; verde) ejerciendo un efecto modulador, presumiblemente sobre otros circuitos tectales.

4.8 La proyección homotópica istmo-tectal en los vertebrados

En todos los vertebrados estudiados, el complejo del istmo contiene células ChAT inmuno-positivas, las cuales por su conectividad recíproca con el tectum óptico y, en algunos casos, por la morfología columnar de sus axones, han sido considerados homólogos a lpc o a lpc/SLu (Mufson et al., 1986; Sorenson et al., 1989; Diamond et al., 1992; Medina y col., 1993; Powers & Reiner 1993; Medina & Reiner 1994; Adrio y col., 2000; Pombal y col., 2001; Gruberg y col., 2006). A la luz de los presentes resultados, la expresión de VGLUT2 y VACHT a nivel de mRNA debiesen ser considerados factores muy significativos a la hora de asignar una homología celular de manera confiable en el contexto del complejo del istmo. Así, neuronas del istmo que ostenten axones columnares enriquecidos con botones terminales, proyectando de manera homotópica sobre TeO y expresen VGLUT2 en lugar de VACHT, podrían ser consideradas homólogas a las neuronas del núcleo lpc de aves, mientras que neuronas que con una conectividad similar, con axones columnares carentes de botones y que expresen VACHT en lugar de VGLUT2, podrían ser consideradas homólogas a las neuronas del núcleo SLu de aves. Por ejemplo, en las tortugas, el circuito istmo-tectal está compuesto de dos núcleos ístmicos que son notablemente similares en morfología y conectividad a los núcleos lmc e lpc/SLu de las aves (Serenó & Ulinski 1987). El equivalente a lpc, llamado núcleo magnocelular caudal, posee axones columnares con miles de botones en las capas tectales centrales y superficiales. Hasta ahora, no se han realizado

trabajos que estudien la expresión de los mRNAs para VAcHt y VGLUT2 en estos u otros reptiles que nos pudiesen permitir relacionar nuestros hallazgos en relación a lpc y ser capaces de identificar poblaciones celulares equivalentes a SLu en reptiles. En el caso de los mamíferos, el núcleo parabigémino (PBG) es una estructura ístmica inmuno-positiva para ChAT que está conectada de manera homotópica y recíproca con el colículo superior, siendo así considerada la estructura homóloga al complejo lpc/SLu de aves (Harting y col., 1973; Graybiel, 1978; Sherk, 1979a, 1979b; Watanabe & Kawana 1979; Harting y col., 1980; Mendez-Otero y col., 1980; Linden & Perry 1983; Jen y col., 1984; Kunzle & Schnyder 1984; Sefton & Martin 1984; Baizer y col., 1991; Jiang y col., 1996; Gruberg y col., 2006). A pesar de que la morfología de los axones istmo-tectales aún no ha sido descrita, se ha mostrado que en roedores el núcleo PBG expresa VGLUT2 (Ito y col., 2011), VAcHt y ChAT a nivel de mRNA (Ichikawa y col., 1997). La potente similitud que esta heterogeneidad tiene con la expresión del complejo lpc/SLu hace necesaria la realización de protocolos de doble marcaje y/o densidad celular para lograr diferenciar poblaciones celulares que expresen el marcador glutamatérgico de aquellas que expresen los marcadores colinérgicos. Estudios equivalentes son necesarios para identificar sub-poblaciones en la región del istmo de los anfibios y peces. En anuros, las fibras istmo-tectales parecen expresar la proteína ChAT (Desan y col., 1987; Wallace y col., 1990), pero la morfología de su terminal axónico no ha sido aún descrita. La situación opuesta ocurre en urodelos, donde los axones istmo-tectales parecen terminar de manera columnar, pero se carece de

una descripción neuroquímica del complejo del istmo (Wiggers & Roth 1991). En peces, el tectum se encuentra conectado de manera recíproca con el complejo istmico, pero la neuroquímica y la morfología axonal asociadas a este último son aún desconocidas (Xue y col., 2001; Dunn-Meynell & Sharma 1984).

En resumen, el presente trabajo de tesis propone una identidad neuroquímica heterogénea y segregada para los núcleos del istmo, los cuales proveen un *feedback* mediante proyecciones homotópicas sobre el tectum óptico ipsilateral, identificando al núcleo SLu como colinérgico y a lpc como un núcleo glutamatérgico.

Estos hallazgos indican que el potente control ejercido por la actividad de lpc sobre el flujo visual ascendente es producido mediante el *feedback* glutamatérgico mediado por los axones de lpc, de forma directa sobre las terminaciones dendríticas de las células ganglionares tectales de todos los subtipos, mediante sinapsis englobadas en estructuras glomerulares en las capas superiores (2-3 y 5) y sinapsis establecidas por sus engrosamientos axónicos en las capas profundas (capa 9).

5. CONCLUSIONES

Los terminales axónicos de lpc forman engrosamientos pre-sinápticos en las capas tectales 2-3, 5 y 9, en las cuales confluyen varias dendritas, entre ellas, perfiles dendríticos de las células ganglionares tectales y además, un perfil pre-sináptico que corresponde de manera exclusiva a terminales axónicos de lpc. En particular, en las capas 2-3 y 5 estas estructuras se encuentran rodeadas por membranas gliales formando en conjunto una estructura glomerular.

Los blancos sinápticos de lpc reconocidos en este trabajo son las células ganglionares tectales en todos sus subtipos (Ia,b, I3 y II) que proyectan al núcleo rotundus en el tálamo.

La identidad neuroquímica de lpc sería de carácter glutamatérgico y no del tipo colinérgico vesicular.

Estos resultados sugieren que la liberación secuencial de glutamato por parte de los terminales retinianos y los terminales de lpc controlan de manera sinérgica la actividad de las TGCs, explicando el potente control ejercido por el *feedback* de lpc sobre las respuestas visuales en todas las subdivisiones del núcleo rotundus.

El *input* colinérgico vesicular sobre el tectum óptico, proveniente del complejo del istmo parece corresponder de manera exclusiva a SLu.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adrio F, Anadón R, Rodríguez-Moldes I. 2000. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the central nervous system of a chondrosteian, the siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *J Comp Neurol* 426:602-621.
- Agnati LF, Fuxe K, Nicholson C, Sykova E. 2000. Volume transmission revisited. *Progress in brain research*, Vol 125. Elsevier, Amsterdam.
- Angaut, P., Repérant, J. 1976. Fine structure of the optic fibre termination in the pigeon optic tectum: a Golgi and electron microscope study. *Neuroscience* 1:93-105.
- Asadollahi A, Mysore SP, Knudsen EI. 2010. Stimulus-driven competition in a cholinergic midbrain nucleus. *Nat Neurosci* 13:889-895.
- Atoji Y. (2011). Immunohistochemical Localization of Vesicular Glutamate Transporter 2 (vGluT2) in the Central Nervous System of the Pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*. 519:2887-2905
- Bagnoli P, Fontanesi G, Alesci R, Erichsen JT. 1992. Distribution of neuropeptide Y, substance P, and choline acetyltransferase in the developing visual system of the pigeon and effects of unilateral retina removal. *J Comp Neurol* 318:392-414.
- Baizer JS, Whitney JF, Bender DB. 1991. Bilateral projections from the parabigeminal nucleus to the superior colliculus in monkeys. *Exp Brain Res* 86:467-470.
- Bejanin S, Cervini R, Mallet J, Berrard S. 1994. A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem* 269:21944-21947.
- Benowitz, LI, Karten HJ. 1976. Organization of the tectofugal visual pathway in the pigeon: a retrograde transport study, *J Comp Neurol* 167, 503-520.
- Berrard S, Varoqui H, Cervini R, Israël M, Mallet J, Diebler MF. 1995. Coregulation of two embedded gene products, choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem* 65:939-42.

Binns KE, Salt TE. 2000. The functional influence of nicotinic cholinergic receptors on the visual responses of neurones in the superficial superior colliculus. *Visual Neurosci* 17:283-289.

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

Bloc A, Bugnard E, Dunant Y, Falk-Vairant J, Israël M, Loctin F, Roulet E. 1999. Acetylcholine synthesis and quantal release reconstituted by transfection of mediatophore and choline acetyltransferase cDNAs. *Eur J Neurosci* 11:1523-1534.

Bloc A, Bancila V, Israël M, Dunant Y. 2000. Reconstitution of mediatophore-supported quantal acetylcholine release. *Metab Brain Dis* 15:1-16.

Britto LRG, Keyser KT, Lindstrom JM, Karten HJ. 1992. Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the mesencephalon and diencephalon of the chick (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol* 317:325-340.

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

Brock, M, Nickel, AC, Madziar, B, Blusztajn, JK, Berse, B. 2007. Differential regulation of the high affinity choline transporter and the cholinergic locus by cAMP signaling pathways. *Brain Res* 1145:1-10.

Castell X, Diebler MF, Tomasi M, Bigari C, De Gois S, Berrard S, Mallet J, Israël M, Dolezal M. 2002. More than one way to toy with ChAT and VACHT. *J Physiol Paris* 96:61-72.

Castell X, Cheviron N, Barnier JV, Diebler MF. 2003. Exploring the regulation of the expression of ChAT and VACHT genes in NG108-15 cells: implication of PKA and PI3K signaling pathways. *Neurochem Res* 28:557-64.

Cervini R, Houhou L, Pradat PF, Bejanin S, Mallet J, Berrard S. 1995. Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene. *J Biol Chem* 270:24654-24657.

Chávez J, Vargas MH, Cruz-Valderrama JE, Montaña LM. 2011. Non-quantal release of acetylcholine in guinea-pig airways: role of choline transporter. *Exp Physiol* 96.4:460-467.

Clarke PG, Whitteridge D. 1976. The projection of the retina, including the 'red area' on to the optic tectum of the pigeon. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 61:351-358.

Desan PH, Gruberg ER, Grewell KM, Eckenstein F. 1987. Cholinergic innervation of the optic tectum in the frog *Rana pipiens*. *Brain Res* 413:344-349.

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

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

Dudkin EA, Gruberg ER. 2003. Nucleus isthmi enhances calcium influx into optic nerve fiber terminals in *Rana pipiens*. *Brain Res* 969:44-52.

Dunn-Meynell AA, Sharma SC. 1984. Changes in the topographically organized connections between the nucleus isthmi and the optic tectum after partial tectal ablation in adult goldfish. *J Comp Neurol* 227:497-510.

El Mestikawy S, Wallén-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE. 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12:204-216.

Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB. 1994. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem* 269:21929-21932.

Felix D, Wu GY, Wang SR. 1994. GABA as an inhibitory transmitter in the pigeon isthmo-tectal pathway. *Neurosci Lett* 169:212-214

Graybiel AM. 1978. A satellite system of the superior colliculus: the parabigeminal nucleus and its projections to the superficial collicular layers. *Brain Res* 145:365-374.

Gruberg E, Dudkin E, Wang Y, Marín G, Salas C, Sentis E, Letelier J, Mpodozis J, Malpeli J, Cui H, Ma R, Northmore D, Udin S. 2006. Influencing and interpreting visual input: the role of a visual feedback system. *J Neurosci* 26:10368-10371.

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

Harting JK, Glendenning KK, Diamond IT, Hall WC. 1973. Evolution of the primate visual system: anterograde degeneration studies of the tecto-pulvinar system. *Am J Phys Anthropol* 38:383-392.

Harting JK, Huerta MF, Frankfurter AJ, Strominger NL, Royce GL. 1980. Ascending pathways from the monkey superior colliculus: An autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 192:852-882.

Hayes BP, Webster KE. 1975. An electron microscope study of the retino-receptive layers of the pigeon optic tectum. *J Comp Neurol* 162:447-466.

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.

Herzog E, Landry M, Buhler E, Bouali-Benazzouz R, Legay C, Henderson CE, Nagy F, Dreyfus P, Giros B, El Mestikawy S. 2004. Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons. *Eur J Neurosci* 20:1752-1760.

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

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

Ichikawa T, Ajiki K, Matsuura J, Misawa H. 1997. Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry. *J Chem Neuroanat* 13:23-39.

Israël M, Morel N, Lesbats B, Birman S, Manaranche R. 1986. Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9226-9230.

Israël M, Lesbats B, Synguelakis M, Joliot A. 1994. Acetylcholine accumulation and release by hybrid NG108-15, glioma and neuroblastoma cells--role of a 16kDa membrane protein in release. *Neurochem Int* 25:103-109.

Islam, MR, Atoji, Y. 2008. Distribution of vesicular glutamate transporter 2 and glutamate receptor 1 mRNA in the central nervous system of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*. 511:658-677.

Ito T, Bishop DC, Oliver DL. 2011. Expression of glutamate and inhibitory amino acid vesicular transporters in the rodent auditory brainstem. *J Comp Neurol* 519:316-340.

Jen LS, Dai ZG, So KF. 1984. The connections between the parahigeminal nucleus and the superior colliculus in the golden hamster. *Neurosci Lett* 51:189-194.

Jiang ZD, King AJ, Moore DR. 1996. Topographic organization of projection from the parabigeminal nucleus to the superior colliculus in the ferret revealed with fluorescent latex microspheres. *Brain Res* 743:217-232.

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

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

King WM, Schmidt JT. 1991. The long latency component of retinotectal transmission: Enhancement by stimulation of nucleus isthmi or tectobulbar tract and block by nicotinic cholinergic antagonists. *Neuroscience* 40:701-712.

Kunzle H, Schnyder H. 1984. The isthmus-tegmentum complex in the turtle and rat: A comparative analysis of its interconnections with the optic tectum. *Exp Brain Res* 56:509-522.

Lee PH, Schmidt M, Hall WC. 2001. Excitatory and Inhibitory Circuitry in the Superficial Gray Layer of the Superior Colliculus. *J Neurosci.* 21:8145-8153.

Linden R, Perry VH. 1983. Retrograde and anterograde-transneuronal degeneration in the parabigeminal nucleus following tectal lesions in developing rats. *J Comp Neurol* 218:270-281.

Luksch H, Cox K, Karten HJ. 1998. Bottlebrush dendritic endings and large dendritic fields: motion-detecting neurons in the tectofugal pathway. *J Comp Neurol* 396:399-414.

Luksch H, Karten HJ, Kleinfeld D, Wessel R. 2001. Chattering and differential signal processing in identified motion-sensitive neurons of parallel visual pathways in the chick tectum. *J Neurosci* 21:6440-6446.

Lund, RD. 1969. Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 135:179-208.

- Mallet J, Houhou L, Pajak F, Oda Y, Cervini R, Bejanin S, Berrard S. 1998. The cholinergic locus: ChAT and VAcHT genes. *J Physiol Paris* 92:145-147.
- Marín G, Letelier JC, Henny P, Sentis E, Farfán G, Fredes F, Pohl N, Karten H, Mpodozis J. 2003. Spatial organization of the pigeon tectorotundal pathway: an interdigitating topographic arrangement. *J Comp Neurol* 458:361-380.
- Marín, G, Mpodozis, J, Sentis, E, Ossandon, T, Letelier, JC. 2005. Oscillatory bursts in the optic tectum of birds represent re-entrant signals from the nucleus *isthmi pars parvocellularis*. *J Neurosci* 25:7081-7089.
- Marín G, Salas, C, Sentis, E, Rojas, X, Letelier, JC, Mpodozis, J. 2007. A cholinergic gating mechanism controlled by competitive interactions in the optic tectum of the pigeon. *J Neurosci* 27:8112-21.
- Marín G, Duran E, Morales C, González-Cabrera C, Sentis E, Mpodozis J, Letelier JC. 2012. Attentional Capture? Synchronized Feedback Signals from the Isthmi Boost Retinal Signals to Higher Visual Areas. *J Neurosci* 32:1110-1122.
- Mcllwain JT. 1975. Visual receptive fields and their images in superior colliculus of the cat. *J Neurophysiol* 38:219-230.
- Medina L, Smeets WJ, Hoogland PV, Puelles L. 1993. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol* 331:261-85.
- Medina, L, Reiner, A. 1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J Comp Neurol* 342:497-537.
- Méndez-Otero R, Rocha-Miranda CE, Perry VH. 1980. The organization of the parabigemino-tectal projections in the opossum. *Brain Res* 198:183-189.
- Morino P, Bahro M, Cuenod M, Streit P. 1991. Glutamate-like Immunoreactivity in the Pigeon Optic Tectum and Effects of Retinal Ablation. *Eur J Neurosci* 3:366-378.
- Mpodozis, J., Letelier J. C., Maturana H. 1995. Nervous system as a closed neuronal network: Behavioral and cognitive consequences. *Lecture Notes in Computer Science*. 930:130-136.
- Mpodozis J, Cox K, Shimizu T, Bischof HJ, Woodson W, Karten HJ. 1996. GABAergic inputs to the nucleus rotundus (pulvinar inferior) of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 374:204-22.

Mufson EJ, Martin TL, Mash DC, Wainer BH, Mesulam MM. 1986. Cholinergic projections from the parabigeminal nucleus (Ch8) to the superior colliculus in the mouse: a combined analysis of horseradish peroxidase transport and choline acetyltransferase immunohistochemistry. *Brain Res* 370:144-148

Mukherjee RS, Hausman RE. 2004. Cloning of chicken choline acetyltransferase and its expression in early embryonic retina. *Mol Brain Res* 129:54-66.

Mysore SP, Knudsen EI. 2013. A shared inhibitory circuit for both exogenous and endogenous control of stimulus selection. *Nat Neurosci* 16:473-478.

Naciff JM, Misawa H, Dedman JR. 1997. Molecular characterization of the mouse vesicular acetylcholine transporter gene. *Neuroreport* 8:3467-3473.

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

Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O. 2005. Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5245-5249

Pombal MA, Marín O, González A. 2001. Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive structures in the lamprey brain. *J Comp Neurol* 431:105-126.

Powers AS, Reiner A. 1993. The distribution of cholinergic neurons in the central nervous system of turtles. *Brain Behav Evol* 41:326-345.

Prusky GT, Cynader MS. 1988. [3H] nicotine binding sites are associated with mammalian optic nerve terminals. *Visual Neurosci* 1:245-248

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

Reubi JC, Cuénod M. 1976. Release of exogenous glycine in the pigeon optic tectum during stimulation of a midbrain nucleus. *Brain Res* 112:347-361.

Reperant J, Angaut P. 1977. The retinotectal projections in the pigeon. An experimental optical and electron microscope study. *Neuroscience* 2:119-140.

Roghani A, Feldman J, Kohan S, Shirzadi A, Gunderson C, Brecha N, Edwards R. 1994. Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10620-10624.

Sargent PB, Pike SH, Nadel DB, Lindstrom JM. 1989. Nicotinic acetylcholine receptor-like molecules in the retina, retinotectal pathway, and optic tectum of the frog. *J Neurosci* 9:565-573.

Sarter M, Parikh V, Howe WM. 2009. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci* 10:383-390.

Schmidt J. 1995. The modulatory cholinergic system in goldfish tectum may be necessary for retinotopic sharpening. *Vis Neurosci* 12:1093-1103.

Schütz B, Weihe E, Eiden LE. 2001. Independent patterns of transcription for the products of the rat cholinergic gene locus. *Neuroscience* 104:633-42.

Sefton, AJ, Martin PR. 1984. Relation of the parabigeminal nucleus to the superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp Brain Res* 56:144-148.

Sereno MI, Ulinski PS. 1987. Caudal topographic nucleus isthmi and the rostral nontopographic nucleus isthmi in the turtle, *Pseudemys scripta*. *J Comp Neurol* 261:319-346.

Sherk H. 1979a. A comparison of visual-response properties in cat's parabigeminal nucleus and superior colliculus. *J Neurophysiol* 42:1640-1655.

Sherk H. 1979b. Connections and visual-field mapping in cat's tectoparabigeminal circuit. *J Neurophysiol* 42:1656-1668.

Shimojo M, Wu D, Hersh LB. 1998. The Cholinergic Gene Locus Is Coordinately Regulated by Protein Kinase A II in PC12 Cells. *J Neurochem* 71:1118-1126.

Sorenson, E, Parkinson, D, Dahl, J, Chiappinelli, V. 1989. Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the chicken mesencephalon. *J Comp Neurol* 281:641-657.

Sterling P. 1971. Receptive fields and synaptic organisation of the superficial grey layer of the cat superior colliculus. *Vision Res. (Suppl.)*, 3:309-329

Sun Z, Wang HB, Laverghetta A, Yamamoto K, Reiner A. 2005. The distribution and cellular localization of glutamic acid decarboxylase-65 (GAD65) mRNA in the forebrain and midbrain of domestic chick. *J Chem Neuroanat* 29:265-281.

Tigges M, Tigges J, Luttrell GL, Frazier CM. 1973. Ultrastructural changes in the superficial layers of the superior colliculus in *Galago crassicaudatus* (primates) after eye enucleation. *Z. Zellforsch.* 140:291-307

Titmus MJ, Tsai H-J, Lima R, Udin SB. 1999. Effects of choline and other nicotinic agonists on the tectum of juvenile and adult *Xenopus* frogs: a patch-clamp study. *Neuroscience* 91:753-769.

Tömböl T, Eyre M, Zayats N, Németh A. 2003. The Ramifications and Terminals of Optic Fibres in Layers 2 and 3 of the Avian Optic Tectum: A Golgi and Light and Electron Microscopic Anterograde Tracer Study. *Cells Tissues Organs* 175:202-222.

Wallace MT, Ricciuti AJ, Gruberg ER. 1990. Nucleus isthmi: its contribution to tectal acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the frog *Rana pipiens*. *Neuroscience* 35:627-636.

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

Wang Y, Luksch H, Brecha NC, Karten HJ. 2006. Columnar projections from the cholinergic nucleus isthmi to the optic tectum in chicks (*Gallus gallus*): a possible substrate for synchronizing tectal channels. *J Comp Neurol* 494:7-35.

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

Weihe E, Schafer M, Schiitza B, Anlaufa M, Depboylua C, Bretta C, Chenb L, Eidenb LE. 1998. From the cholinergic gene locus to the cholinergic neuron. *J Physiol Paris* 92:385-388.

Wiggers W, Roth G. 1991. Anatomy, neurophysiology and functional aspects of the nucleus isthmi in salamanders of the family Plethodontidae. *J Comp Physiol A* 169:165-176.

Wylie DR, Gutiérrez-Ibáñez C, Pakan JMP, Iwaniuk AN. 2009. The optic tectum of birds: Mapping our way to understanding visual processing. *Can J Exp Psychol.* 63:328-338.

Xue HG, Yamamoto N, Yoshimoto M, Yang CY, Ito H. 2001. Fiber connections of the nucleus isthmi in the carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brain Behav Evol* 58:185-204.