

UCH-FC
Biotecnología
E 573
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“Expresión de Marcadores Colinérgicos,
GABAérgicos y Glicinérgicos en el Complejo del
Istmo en Pollos (*Gallus-gallus*).”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

CRISTIAN ARIEL GONZÁLEZ CABRERA

Diciembre, 2014

Santiago - Chile

**Directores de Seminario de Título:
Prof. Gonzalo Marín Game
Dr. Alejandro Roth Metcalfe**



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

CRISTIAN ARIEL GONZÁLEZ CABRERA

“Expresión de Marcadores Colinérgicos, GABAérgicos y Glicinérgicos en el Complejo del Istmo en Pollos (*Gallus-gallus*).”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología (Especialización Molecular)

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Alejandro Roth Metcalfe in black ink, written over a horizontal line.

Prof. Gonzalo Marín Game
Co-Director Seminario de título

Handwritten signature of Gonzalo Marín Game in black ink, written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Cecilia Vergara Montecinos'
Presidenta

Handwritten signature of Cecilia Vergara Montecinos in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Christian González-Billaault
Evaluador

Handwritten signature of Christian González-Billaault in green ink, written over a horizontal line.



Nací un día de Enero de 1976 en la comuna de Recoleta, donde crecí junto a mis padres Angel y Luz Marina y mis hermanos Gonzalo, Mauricio y Angela, en una infancia de lujo. Fue el noble Colegio San Benildo quién tuvo la difícil tarea de intentar educarme. Después de terminar la enseñanza media, ingresé a la Escuela de Especialidades de la Fuerza Aérea de Chile, en donde estudié electrónica aeronáutica. A pesar de que me gradué y trabajé ahí un par de años, la Fuerza aérea no logró retenerme por mucho tiempo, la vida militar no era lo mío. Así, a mediados de 1997 LAN Chile (Ladeco en esos años) me abrió sus brazos y volví a vestir de jeans y pelo largo. Casi siete años trabajé allí, empecé como especialista en electrónica, luego jefe de grupo y terminé como supervisor. Hasta ahí todo bien, muchos viajes, el dinero no era escaso, pero faltaba algo. Un buen día, haciendo cerveza casera con un querido amigo, me di cuenta que me interesaban las enzimas, los procesos biológicos, etc. Me maravillé con la biología por primera vez. Entonces, a los 27 años, decidí hacer borrón y cuenta nueva para estudiar Ingeniería en Biotecnología molecular en la Universidad de Chile, lo que implicó dejar de trabajar y volver a depender de mis padres. Hoy, doy término a esta carrera de pregrado presentando el siguiente seminario de título.

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 mis tutores Sr. Gonzalo Marín Gamé y Dr. Alejandro Roth, por haberme formado como científico y también por su paciencia durante estos 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. Por último, deseo agradecer de manera especial al Sr. Pablo Lois por instruirme en las técnicas de hibridación *in situ* en los comienzos de este trabajo.

Agradezco a los laboratorios de:

- 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.
- Microbiología molecular y Biotecnología, de los académicos Dr. Nicolás Guilliani, Dr. Francisco Chávez y Dr. Carlos Jerez.

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.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Identidad neuroquímica de Ipc.....	5
1.2 Hipótesis.....	9
1.3 Objetivos generales.....	10
1.4 Objetivos específicos.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1 Diseño de partidores y sondas de ARN.....	11
2.2 Extracción de ARN.....	12
2.3 RT-PCR.....	12
2.4 Clonamiento.....	13
2.5 Síntesis de sondas de ARN.....	14
2.6 Hibridación <i>in situ</i>	15
2.7 Inmuno-histoquímica.....	16
3. RESULTADOS.....	18
3.1 Amplificación y clonamiento de fragmentos específicos de ADNc de VACHT, GLYT2 y VIAAT.....	18
3.1.1 Amplificación fragmentos específicos.....	18
3.1.2 Clonamiento de fragmentos en el vector pGEM-T easy.....	19

3.1.3	Secuenciación.....	19
3.2	Generación de sondas de ARN marcadas con digoxigenina.....	19
3.3	Ensayos de hibridación <i>in situ</i>	20
3.3.1	Complejo del istmo.....	21
3.3.2	Otras estructuras cerebrales.....	23
3.3.2.1	Romboencéfalo.....	26
3.3.2.2	Mesencéfalo.....	29
3.3.2.3	Pretéctum.....	30
3.3.2.4	Diencéfalo.....	32
3.3.2.5	Telencéfalo.....	34
4.	DISCUSIÓN	36
4.1	Especificidad en la detección de VAcHT.....	37
4.2	La posible " <i>down-regulation</i> " del locus colinérgico.....	38
4.3	Liberación no-vesicular de acetilcolina.....	41
4.4	Fenotipo neuroquímico de lpc.....	42
4.5	Cambio de paradigma.....	42
4.8	Proyecciones.....	44
5.	CONCLUSIONES	45
6.	BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Partidores específicos.....	12
TABLA 2	Secuencia y características de los partidores utilizados.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	La vía retino-tecto-fugal en aves	4
Figura 2	El complejo del istmo y su inmuno-reactividad contra ChAT.....	6
Figura 3	Funciones pre-sinápticas colinérgica, GABAérgica y glicinérgica.....	7
Figura 4	Amplificación de cDNA de VAcHT, GLYT2 y VIAAT del pollo.....	18
Figura 5	Expresión de ARN mensajero para marcadores VAcHT, VIAAT, GLYT2 en la región del istmo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	22
Figura 6	Expresión de ARN mensajero para marcadores VAcHT, VIAAT, GLYT2 en el romboencéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	28
Figura 7	Expresión de ARN mensajero para marcadores VAcHT, VIAAT, GLYT2 en la región pretectal de <i>Gallus gallus domesticus</i>	31
Figura 8	Expresión de ARN mensajero para marcadores VAcHT, VIAAT, GLYT2 en el diencéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	33
Figura 9	Expresión de ARN mensajero para marcadores VAcHT, VIAAT, GLYT2 en el telencéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	35
Figura 10	El locus colinérgico.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas generales

- BLAST : Herramienta de alineamiento de secuencias (Basic Local Alignment Search Tool).
- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- ARN : Ácido ribonucleico
- ARNsa : Ribonucleasa
- dNTP : Deoxi nucleótido trifosfato
- LB : Luria-Bertoni
- pb : Pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- RT : Transcripción Reversa



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* (Ipc) y el *isthmi pars semilunaris* (SLu), cuyos terminales axónicos columnares aunque confluyen en toda la extensión tectal, ramifican densamente en capas tectales alternadas. Las señales de *feedback* generadas por Ipc 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 ocurre por medio de liberación de acetilcolina en las capas tectales superiores, la cual actúa a nivel pre-sináptico sobre receptores nicotínicos en los terminales axónicos de las células ganglionares de la retina, alterando/modulando la liberación de glutamato por parte de estos terminales. Si bien se considera que Ipc y SLu son núcleos colinérgicos, ya que muestran inmunoreactividad contra la enzima colinaacetil transferasa (ChAT), existen informes contradictorios con esta postura, como la posible liberación de glicina o la inmunoreactividad anti-GABA, que levantan dudas acerca de la neuroquímica de este núcleo. Si el núcleo Ipc presenta un fenotipo neuroquímico distinto al actualmente considerado, podría llegar a cambiar la visión de como Ipc estaría ejerciendo el control/modulación tecto-talámico, lo que abriría diferentes posibilidades acerca de su participación en el

control del flujo visual tectofugal. En el presente trabajo revisamos la identidad neuroquímica de los núcleos del istmo en el pollo mediante ensayos de hibridación *in situ* para el marcador de neuronas colinérgicas VAcChT, junto con otros dos marcadores involucrados en la liberación de GABA y glicina: el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT) y el transportador de glicina (GLYT2). Encontramos que el núcleo lpc no expresa los ARN mensajeros para VIAAT y GLYT2, lo que indica que sus neuronas son incapaces de liberar GABA y/o glicina. Sorprendentemente, aunque ambos núcleos, lpc y SLu, mostraron ser inmuno-positivos para ChAT, solo SLU resultó expresar de manera potente los ARN mensajeros para VAcChT, mientras que en lpc la expresión de dicho marcador resultó ser indetectable. Estos resultados descartan que lpc opere mediante funciones neuroquímicas GABAérgicas y glicinérgicas y sugieren la posibilidad de una liberación no-vesicular de acetilcolina por parte de este núcleo.

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 TeO tectum triggered by moving stimuli elicit synchronized feedback signals from two isthmic nuclei: the isthmi parvocellularis (Ipc) and isthmi semilunaris (SLu), whose columnar axon overlap in the tectum but their terminals densely ramify into alternate tectal layers. The feedback signals from the Ipc appear 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 increasing glutamate release. Many authors consider neurons at Ipc and SLu to be cholinergic because of their immuno-reactivity for choline acetyltransferase (ChAT); still, contradictory reports, such GABA immuno-reactivity and the release of glycine from the Ipc terminals have raised doubts about the actual neurotransmitter released by this nucleus. A different neurochemical phenotype could question the modulatory role assigned to Ipc and raise different possibilities about the mechanisms through which this nucleus controls the tectofugal visual transmission. In this seminar we characterized the neurochemical identity of the isthmic nuclei in chicks using *in situ* hybridization assays directed against the expression of the vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and two proteins involved in the release of GABA and glycine: the

vesicular inhibitory amino acids transporter (VIAAT) and the glycine transporter (GLYT2). We found that lpc neurons do not express VIAAT or GLYT2 mARNs, indicating that these neurons are not capable of GABA and/or glycine release. Surprisingly, although the lpc and SLu nuclei showed ChAT immuno-reactivity, the VAcHt mARNs were found strongly expressed only in SLu neurons, whereas in the lpc neurons the expression of this marker was completely absent. These results suggest a different neurochemical identity for lpc and raise the possibility of a non-vesicular acetylcholine release.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema visual de los vertebrados posee dos vías neurales principales: la vía Tálamo-fugal y la vía Tecto-fugal, las cuales son definidas de acuerdo al blanco primario de las proyecciones retinianas; lo que, en el primer caso corresponde al núcleo geniculado lateral en el diencefalo, y en el segundo, al tectum óptico (TeO) en el mesencefalo. La vía tecto-fugal alcanza un enorme desarrollo en las aves, al recibir la aferencia de aproximadamente el 90% del total de axones de la retina (2.4 millones en el caso de las palomas) (Karten y Revzin 1966; Hunt y Webster 1975; Benowitz y Karten 1976; Mpodozis y col., 1995). El núcleo principal de esta vía es el tectum óptico (TeO), formado en las aves por 15 láminas plexiformes y celulares claramente definidas (Ramón y Cajal, 1911). En éste, las aferencias retinianas penetran radialmente y terminan de manera segregada en cinco de las siete capas más superficiales, conservando finamente la topografía retiniana (Ramón y Cajal, 1911; Hunt y Webster, 1975; Angaut y Repérant, 1976). El tectum, a su vez, se conecta de manera reciproca con el istmo, estructura ubicada en el tegmento ventro-lateral, conformando el circuito istmo-tectal. En aves, el complejo del istmo se encuentra particularmente diferenciado, ya que cuenta con tres núcleos celulares conectados con TeO (Figuras 1 y 2A), dos de ellos, *isthmi pars parvocellularis* (Ipc) e *isthmi pars semilunaris* (SLu) de manera homotópica (Hunt y Künzle, 1976; Hunt y col., 1977; Güntürkün y Remy, 1990; Hellmann y Güntürkün, 2001; Figura 1) mientras que el tercero, *isthmi pars Magnocellularis* (Imc), lo hace de manera heterotópica (Wang et al., 2004; Figura 1). Los núcleos Ipc y SLu distribuyen sus terminales axónicos a través de todas las capas tectales, ramificando de manera prominente en las capas más superficiales del TeO, en el caso de Ipc, y en las capas mas profundas, en el caso de

SLu (Hunt y col., 1977; Sereno y Ulinski, 1987; Tömböl y col., 1995; Wang y col., 2004; Wang y col., 2006; Figura 1). La proyección tectal sobre los tres núcleos del istmo está mediada por las células "Shepherd's crook", ubicadas en la capa tectal 10 (Wang y col., 2006). Como se detalla a continuación, este "loop" istmo-tectal ha sido asociado a procesos de orientación y atención espacial (Bischof y Watanabe, 1997; Nguyen y col., 2004; Wylie y col., 2009, Marín y col., 2005, 2007, 2012). La atención espacial es definida operacionalmente como un mecanismo de selección de estímulos que potencia la visión en regiones circunscritas del espacio visual (Desimone y Duncan, 1995; Shipp, 2004). A nivel neuronal, el efecto más conspicuo de la atención espacial es la modulación selectiva de las respuestas que provienen de distintas regiones de un mismo campo receptivo, de manera que la respuesta a un estímulo es potenciada o suprimida, dependiendo de si la zona del campo receptivo en que este estímulo se presenta se superpone o no con el foco de atención (Desimone y Duncan, 1995; Maunsell y Cook, 2002; Treue, 2004). Se ha propuesto que la red neuronal formada por el tectum óptico y los núcleos del istmo, constituiría un sistema "*winner-take-all*" (en la tortuga: Sereno y Ulinski, 1987; en la paloma: Wang y Frost, 1991; Wang, 2003), el cual estaría sustentado en la retroalimentación ejercida por el complejo del istmo sobre el TeO. La retroalimentación homotópica generada desde lpc, sobre un cierto locus tectal, modularía la transmisión sináptica de los axones retinianos, mientras que la difusa proyección heterotópica del núcleo GABAérgico lmc (Domenici y col., 1988; Wang y col., 2004; Sun y col., 2005) estaría inhibiendo las áreas tectales circundantes al locus potenciado por lpc. Si varios estímulos visuales activasen simultáneamente múltiples loci en las capas superficiales del TeO, las interacciones entre ellos, mediadas por esta red, provocarían la convergencia de la actividad de la misma a la potenciación de este "feedback" sobre uno, o unos pocos loci dominantes (Marín y col.,

2005; Marín y col., 2007). El impacto atencional de este mecanismo se debe a que la actividad de lpc ejercería un efecto de compuerta sobre el flujo ascendente de la aferencia visual que va desde el TeO, mediado por las células ganglionares tectales (TGC's) localizadas en la capa 13 (Luksch y col., 1998), hacia el núcleo rotundus (Rt) en el tálamo (Karten y col., 1997; Marín y col., 2007; Marín y col., 2012).

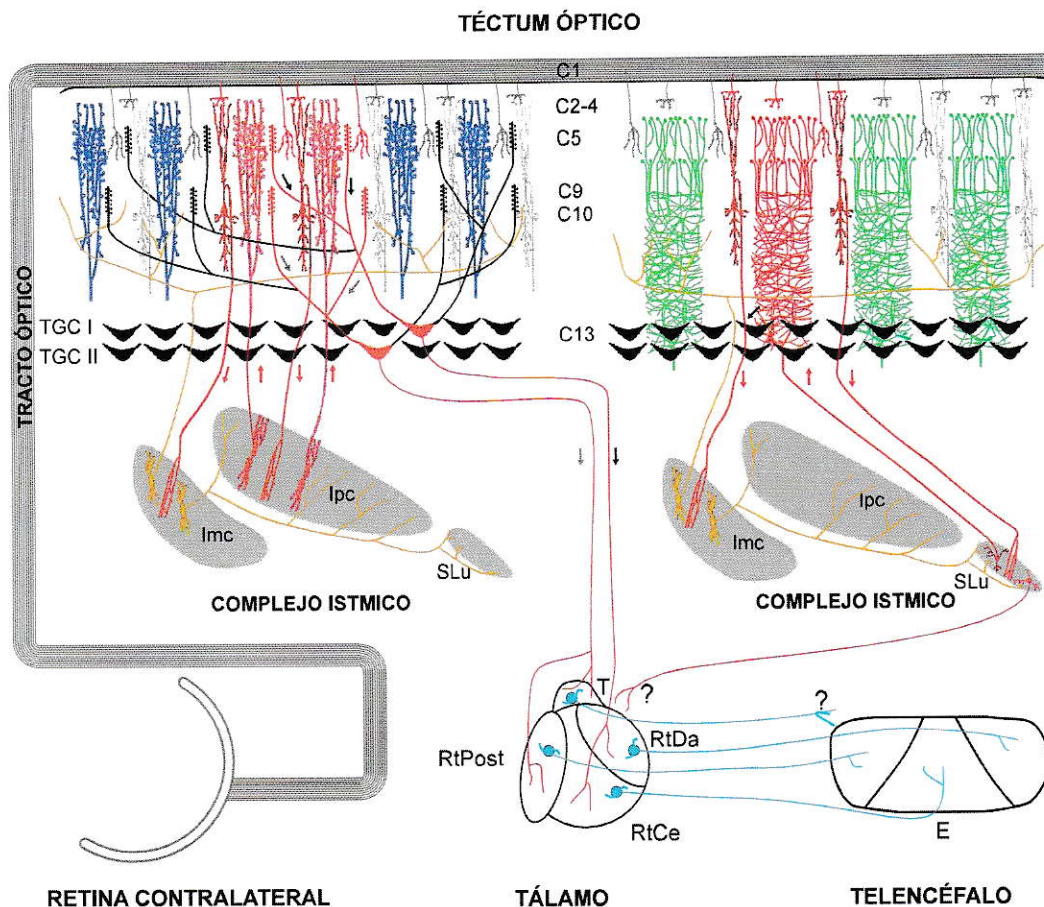


Figura 1. La vía retino-tecto-fugal en aves. El diagrama muestra el flujo visual canalizado por la vía tecto-fugal. Los axones de las células ganglionares de la retina terminan sobre las capas superficiales del tectum óptico (TeO) contralateral, donde confluyen con los terminales dendríticos de las células 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 (Ipc), isthmi pars Semilunaris (SLu) e isthmi pars magnocellularis (Imc)) se conectan de manera recíproca con TeO, de manera homotópica (Ipc y SLu) y heterotópica (Imc), teniendo como única entrada, la inervación 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 Imc, las cuales provocan un efecto inhibitorio sobre la periferia de los loci en Ipc 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 Ipc. Modificado de Marín y col., 2007 y Wang y col., 2006.

1.1. Identidad Neuroquímica de lpc

Si bien se acepta que las neuronas de SLu e lpc son colinérgicas y que el potente control que lpc ejerce sobre el flujo visual ascendente (Marín y col., 2012) podría ser producido por una modulación colinérgica pre-sináptica sobre los terminales retinianos (Marín y col., 2007; Marín y col., 2012), la identidad neuroquímica de lpc no está realmente clara del todo. Así, estudios basados en absorción y liberación de moléculas radioactivas han asignado un fenotipo glicinérgico y GABAérgico a las neuronas de lpc (Reubi y Cuénod, 1976; Hunt y col., 1977), conclusión que pareció ser sustentada por experimentos electrofisiológicos que mostraron un efecto inhibitorio en el tectum producido luego de la estimulación de lpc (Felix y col., 1994; Wang y col., 1995; Wang, 2003), lo cual aunado a experimentos farmacológicos, sugirió una identidad GABAérgica para lpc (Wang y col., 2000). Este problema pareció alcanzar una solución con el uso de técnicas de immuno-histoquímica, mostrándose de manera consistente que lpc y SLu exhibían, respectivamente, una moderada y alta reactividad para la colina acetil transferasa (ChAT; Figura 2B), tanto en el pollo (Sorenson y col., 1989; Wang y col., 2006; nuestros resultados, Figura 2) como en la paloma (Bagnoli y col., 1992; Medina y Reiner, 1994). En el caso de lpc, 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 aceptado.

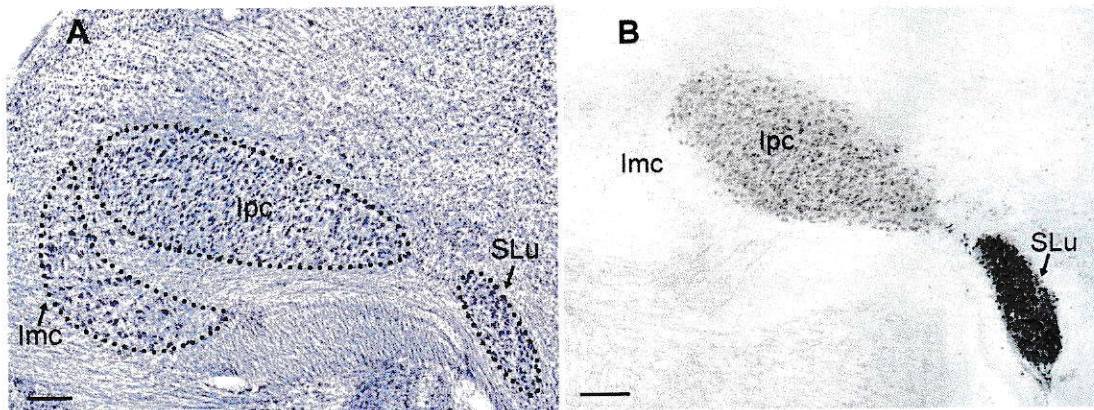


Figura 2. El complejo del istmo y su immuno-reactividad contra ChAT. A, Corte coronal de mesencéfalo de pollo teñido con Nissl donde se aprecian los 3 núcleos del istmo. B, Inmunohistoquímica anti-ChAT en donde se observa la alta y moderada reactividad presente en SLu e lpc, respectivamente. Barra de tamaño= 200 μ m.

Sin embargo, la sola presencia de acetilcolina en el citoplasma no es suficiente para establecer la función colinérgica vesicular, ya que ésta requiere del transportador vesicular de acetilcolina (VAcChT, SLC18A3; Figura 3A), proteína que media el ingreso de la acetilcolina al interior de vesículas sinápticas que posteriormente se fusionaran a la membrana plasmática, permitiendo la liberación del neurotransmisor en la sinapsis.

Por su parte, en la función glicinérgica (Figura 3C) el transportador de glicina (GLYT1/GLYT2) permite el aumento de la concentración de glicina en el citoplasma. Así mismo, la función GABAérgica (Figura 3B) mediante la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) sintetiza el neurotransmisor GABA a partir de glutamato. Ambos neurotransmisores son posteriormente transportados al interior de las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT; Figura 3 B, C).

Considerando lo anterior y en vista de la importancia que tiene el núcleo lpc la vía visual tectofugal, determinar la neuroquímica de lpc es de una gran relevancia al

intentar comprender los mecanismos que subyacen al control del flujo visual tectofugal mediado por este núcleo.

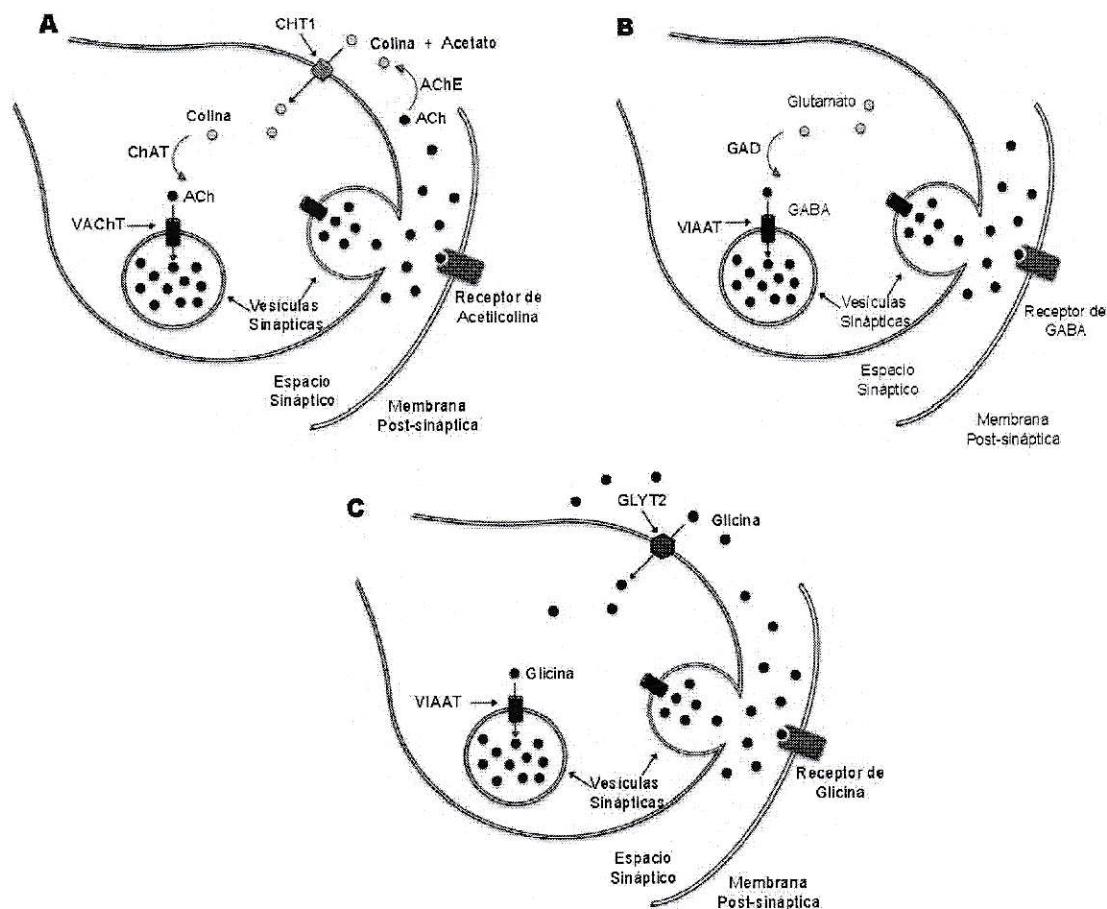


Figura 3. Funciones pre-sinápticas colinérgica, GABAérgica y glicinérgica. A, En el citoplasma del terminal pre-sináptico, la enzima colina acetil transferasa (ChAT) sintetiza acetilcolina (ACh) a partir de colina y acetyl-CoA. Las moléculas de acetilcolina son luego translocadas al interior de vesículas 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). B, la enzima ácido glutámico de-carboxilasa (GAD) sintetiza moléculas de GABA a partir de glutamato, las cuales son luego translocadas al interior de las vesículas sinápticas por la acción del transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT). C, la función glicinérgica debe su especificidad neuroquímica al transportador de membrana plasmática de glicina GLYT2, el cual aumenta la concentración citoplasmática de este aminoácido, que es luego concentrado en vesículas sinápticas por el transportador vesicular VIAAT, transportador que comparte con la función GABAérgica.

El presente seminario de título se enmarca en la caracterización neuroquímica de los núcleos del complejo del istmo en el contexto de los mecanismos atencionales de *Gallus gallus* y se ha centrado en obtener evidencia del carácter neuroquímico del núcleo Ipc, ensayando la expresión de marcadores glicinérgicos, gabaérgicos y colinérgicos en el sistema nervioso central de *Gallus gallus*, mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, hibridación *in situ* e inmuno-histoquímica.

Con el fin de determinar la expresión de los ARN mensajeros que sustentan las funciones glicinérgica, gabaérgica y colinérgica de los núcleos del istmo en *Gallus gallus*, se utilizó RT-PCR para amplificar secuencias específicas (amplicones) de aproximadamente 400 pares de bases (pb) de los ARNm de las proteínas marcadoras de cada una de las vías neuroquímicas de interés, a saber: transportador de glicina 2 (GLYT2), el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT) y el transportador vesicular de acetilcolina. Dichos ampliaciones fueron clonados a plasmidios, secuenciados y utilizados para generar sondas de ARN marcadas con digoxigenina, las cuales utilizamos en ensayos de hibridación *in situ*, logrando la detección específica de estos marcadores en el sistema nervioso central de *Gallus gallus*, en particular, a nivel mesencefálico.

Este trabajo, fue realizado como una colaboración entre los laboratorios de Biología del Conocer y Biología de Neuroglia de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

1.2 HIPÓTESIS

En resumen, considerando la evidencia immuno-histoquímica y fisiológica antes expuesta, planteamos las siguientes hipótesis:

I- Los núcleos istmales, *isthmi pars parvocellularis* e *isthmi pars Semilunaris*, expresan el ARN mensajero del transportador vesicular de acetilcolina.

II- El núcleo *isthmi pars parvocellularis* expresa los ARN mensajeros del transportador de glicina (GLYT2).

III- El núcleo *isthmi pars parvocellularis* expresa los ARN mensajeros del transportador vesicular de GABA/Glicina (VIAAT).



1.3 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el fenotipo neuroquímico de los núcleos *isthmi pars parvocellularis* (Ipc) e *isthmi pars Semilunaris*, caracterizando la expresión de:
 - Transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT).
 - Transportador de glicina (GLYT2).
 - Transportador vesicular de GABA/glicina (VIAAT).

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Clonar fragmentos de secuencias de ARN de *Gallus gallus*. específicos de alrededor de 300-400pb de los marcadores neuroquímicos:
 - Transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT).
 - Transportador de glicina (GLYT2).
 - Transportador vesicular de GABA/glicina (VIAAT).

- 2.- Sintetizar sondas de ARN dirigidas contra los ARN mensajeros para VAcHT, GLYT2 y VIAAT marcadas con digoxigenina, a partir de los fragmentos clonados.

- 3.- Detectar la expresión de los mARNs de VAcHT, GLYT2 y VIAAT mediante ensayos de hibridación *in situ* sobre cortes histológicos de mesencéfalo de pollo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados utilizando 22 pollos (*Gallus gallus*) de ambos sexos (Hibridación *in situ*, n=19; Inmuno-histoquímica n=,1; extracción de ARN, 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 realizados conforme a las directivas de la *National institutes of health* (NIH, Maryland, USA) en el uso de animales en investigación experimental.

2.1 Diseño de partidores y sondas de ARN. Las sondas de ARN fueron diseñadas usando las bases de datos de nucleótidos para el pollo (*Gallus gallus*) y las herramientas bioinformáticas de alineamiento (BLAST) disponibles en el sitio “web” de la *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En función de poder amplificar secuencias de ADN (cADN) correspondiente a cada sonda diseñada, se diseñaron pares de partidores específicos (Tabla 1) y se sintetizaron comercialmente (IDT ADN, USA). Se seleccionaron las siguientes regiones de cada transcrito para cada sonda:

- VACHT (NM_206982.1; 433-822)
- GLYT2 (XM_420906.3; 117-500)
- VIAAT (XM_417347; 515-939)

Todas las secuencias elegidas están ubicadas en la región codificante de su correspondiente ARN mensajero (VACHT, Figura 10).

Tabla 1. Partidores específicos.

Marcador	Partidor "Forward"	Partidor "Reverse"	Alineamiento (°C)	Fragmento (pb)
VChT	5'-AGTGGGCAGAGGCCAGGACA-3'	5'-AGGATGCCAAGTGCCTGA-3'	56	390
GLYT2	5'-TGCTGGCATCATCAGTGACGGC-3'	5'-ACTGTACCTCGCAACCACAGCA-3'	61	384
VIAAT	5'-GGCTCTGCACGCCGTCTCTC-3'	5'-TCGATGGTGTCCCCGGGCTT-3'	61	425

2.2 Extracción de ARN. Muestras de ARN total fueron extraídas de mesencéfalo de pollo, en animales de entre 1 y 2 semanas. 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 ARN, la fase acuosa fue recuperada, mezclada con 0.5mL 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 cADN de simple hebra a partir de ARN poli-A, se realizó transcripción reversa usando la transcriptasa Improm-II (Improm-II TM Reverse transcriptase, Promega, Madison, WI USA) y partidores oligo(dT). Un tubo conteniendo 1 μ g de ARN total y 1 μ L de partidor oligo(dT) se incubaron por 5 minutos a 70°C. Posterior a la incubación, la mezcla de transcripción (1 μ L transcriptasa reversa; 2,5 μ L de MgCl₂ 25mM; 1 μ L inhibidor de ARNsa (RNAsin, Promega, Madison, WI USA); 1 μ L dNTPs 10 mM; 4 μ L de buffer de reacción 5x) fue agregada a la mezcla de ARN/oligo(dT) pre-calentada y fue incubada a 42°C por 60 minutos.

El cADN obtenido se usó como templado en reacciones de PCR, para las cuales se usó 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 ADN 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.

2.4 Clonamiento. Las tres secuencias de ADN 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. Las bacterias fueron precipitadas mediante centrifugación ("pelleteado") (13.000 X RPM) y el ADN plasmidial fue purificado usando un kit de *miniprep* comercial (QIAprep spin miniprep kit, QIAGEN, Valencia, CA). La identidad de los amplificados clonados fue confirmada al secuenciar muestras del ADN plasmidial purificado utilizando partidores internos de los plasmidios (Unidad de secuenciación, Universidad Católica de Chile).



2.5 Síntesis de sondas de ARN. Como preparación para la síntesis de sondas de ARN, el ADN plasmidial purificado fue linealizado mediante digestión enzimática utilizando las enzimas de restricción HincII ó 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 plasmido en cada clón. Para cada sonda, cinco microgramos de ADN fueron digeridos con 20 unidades de enzima a 37°C durante 16-20h en una reacción final de 100 µL. El ADN 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 ARN.

Las sondas de ARNs marcadas con digoxigenina fueron sintetizadas *in vitro* utilizando las ARN 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: 1µg de ADN lineal; 1µL de DTT 100mM; 1µL de RNasin; 1µL de mezcla de ribonucleótidos marcados 10mM; 4µL de buffer de transcripción 5X. Finalmente, las sondas de ARN marcadas con digoxigenina fueron purificadas usando un kit comercial (E.Z.N.A. RNA Probe purification kit, OMEGA biotek,) y almacenadas a -80°C.

2.6 Hibridación *in situ*. Diecinueve pollos de entre 2 a 4 semanas de edad fueron anestesiados profundamente (ketamina/xylazina 75/5 mg/kg) y perfundidos transcardialmente usando 300mL de solución salina (NaCl 0.75%) seguido de 250mL de solución de fijación (0.01 M buffer fosfato, pH 7.4, 0.02% NaCl; 4% paraformaldehído (PFA)). Los cerebros fueron retirados e incubados en una solución de post-fijación/crio-protección (30% sacarosa, 4% PFA en agua DEPC) durante 24-48h a 4°C hasta que se hundieron en ésta. Los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 100 µm usando un micrótopo de congelación (Leitz 1400). Las secciones recuperadas 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 se trataron con una solución de peróxido-PBS-T (6% peróxido de hidrógeno, 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, lavadas una vez en PBST, se fijaron en una solución de PFA 4% en PBST durante 20 minutos seguidas de 3 lavados 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 5mM, 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). Posteriormente, se agregó la sonda respectiva y se incubó por 16-18h a 65-70°C seguido de dos lavados en solución A (SSC 5X pH 5.3, formamida 50%, SDS 1%) a 65°C durante 30 minutos y tres lavados en solución B (SSC 2.5X pH 5.3, formamida 50%, Tween1%) a 65°C durante 30 minutos y dos lavados en buffer de ácido málico (MABT; 100mM ácido málico, Sigma; 0.1% Tween-20, Promega; 150mM 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 16-20h 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 se lavaron seis veces con MABT se incubaron en solución de reacción para fosfatasa alcalina (Tris 100mM pH 9.5; MgCl₂50mM; NaCl 100mM; Tween 1%), y se revelaron agregando el reactivo NBT/BCIP (NBT/BCIP Stock Solution, Roche, Mannheim, Alemania) en incubación a temperatura ambiente durante 3-16 horas.

2.7 Inmuno-histoquímica. Después de la perfusión, el cerebro fue retirado del cráneo, incubado en solución de post-fijación/crio-protectora (30% sacarosa, 4% PFA en agua DEPC) durante 24-48h y cortado en secciones coronales de 60 µm usando un micrótopo de congelación (Leitz 1400). Previo a la adición de anti-cuerpos 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-1000,1%). Luego, los anticuerpos primarios fueron agregados y las secciones incubadas por 24 horas a 4°C con agitación. El anticuerpo primario anti-ChAT (anti-PHA-L biotinilado preparado en conejo, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) se utilizó a una dilución de 1:2000 en NDS-PBST 3%.

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 preparado 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 agregó una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 0,03% en H_2O , concentración final) y se dejaron reaccionar durante 3-5 minutos hasta obtener la marca esperada. 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).

3. RESULTADOS

3.1 Amplificación y clonamiento de fragmentos específicos de ADNc de VACHT, GLYT2 y VIAAT.

3.1.1 Amplificación fragmentos específicos

Utilizando ARN extraído de mesencéfalo de pollo como templado la reacción de transcriptasa reversa se amplificaron fragmentos únicos de ADN copia (ADNc) de aproximadamente 400pb (VACHT), 420pb (GLYT2) y 380pb (VIAAT) (Figura 4).

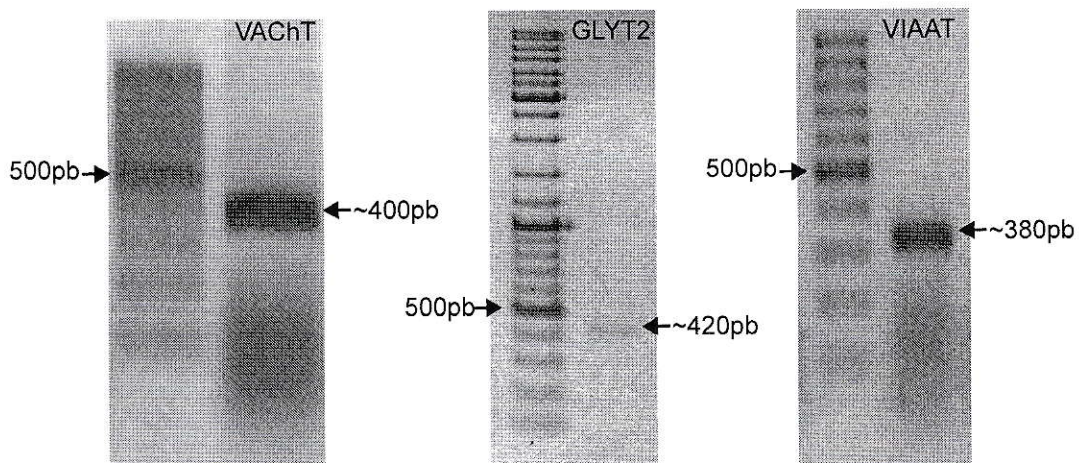


Figura 4. Amplificación de ADNc de VACHT, GLYT2 y VIAAT del pollo. Producto de RT-PCR separado por electroforesis en geles de agarosa 1,5%. Se aprecian bandas únicas de 400pb, 420pb y 380pb para VACHT, GLYT2 y VIAAT, respectivamente.

3.1.2 Clonamiento de fragmentos en el vector pGEM-T easy

Los fragmentos VACHT, VIAAT y GLYT2 purificados fueron ligados con en el vector pGEMT-easy en una reacción de ligación de acuerdo a las instrucciones del fabricante (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems; Promega, Madison, WI). Los productos de ligación se utilizaron para transformar bacterias DH5 α competentes obteniéndose una alta cantidad de clones positivos para la inserción (colonias blancas). De estas colonias se eligieron 3 colonias de cada marcador, las cuales fueron crecidas durante 16 horas en medio LB y purificado su ADN plasmidial.

3.1.3 Secuenciación

El proceso de secuenciación dio como resultado la confirmación del clonamiento de las secuencias específicas esperadas para VACHT (390pb; NM_206982.1; 433-822), GLYT2 (384pb; XM_420906.3; 117-500) y VIAAT (425pb; XM_417347; 515-939).

3.2 Generación de sondas de ARN marcadas con digoxigenina

La técnica de hibridación *in situ* permite la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos mediante el uso de sondas de ADN o ARN en anti-sentido, las cuales hibridan de manera específica con la secuencia blanco que se desea estudiar. Estas sondas deben estar marcadas con alguna molécula que permita su detección posterior al paso de hibridación. En este trabajo utilizamos secuencias de ARN como sondas para la detección de los ARN mensajero (ARNm) de interés sobre cortes histológicos de mesencéfalo de pollos. Dichas sondas fueron marcadas con la molécula digoxigenina, la cual se encuentra asociada a las bases Uracilo (U-dig) de la secuencia sintetizada. La transcripción *in vitro* dió como resultado ARN marcado con

digoxigenina, el cual fue cuantificado por el método de absorbancia, entregando como resultado concentraciones cercanas a los 10 μg totales de ARN para las sondas en sentido (*sense*) y en anti-sentido (*anti-sense*) en todos los casos.

3.3 Ensayos de hibridación *in situ*

Realizamos ensayos de hibridación *in situ* para VACHT (n=13), GLYT2 (n=3), VIAAT (n=3) 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 consistentes en diferentes animales. Así mismo, no se detectó marcaje alguno cuando se utilizaron sondas "en sentido" para los mismos ensayos.

3.3.1 Complejo del istmo

Según lo esperado, el marcador VIAAT se encontró fuertemente expresado en las neuronas GABAérgicas del núcleo lmc (Domenici y col., 1988; Wang y col., 2004; Sun y col., 2005). En lpc, la expresión de VIAAT no fue detectada, descartando un fenotipo GABAérgico para este núcleo. En el caso del marcador GLYT2, no se encontró expresión de éste en ninguno de los núcleos del complejo del istmo, lo que nos llevó a descartar un fenotipo glicinérgico para lpc. Como era de esperar, debido a la identidad colinérgica sugerida por reportes de inmuno-histoquímica de ChAT (Sorenson y col., 1989; Medina y Reiner, 1994; Wang y col., 2006) el marcador colinérgico VAcHT resultó estar fuertemente expresado en las neuronas de SLu (Figura 5). 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. Sorprendentemente, las células pertenecientes al núcleo lpc no mostraron expresión del ARNm para VAcHT (Figura 5). Estos resultados sugieren que lpc posee un fenotipo colinérgico incompleto y a su vez confirman un fenotipo colinérgico para SLu.

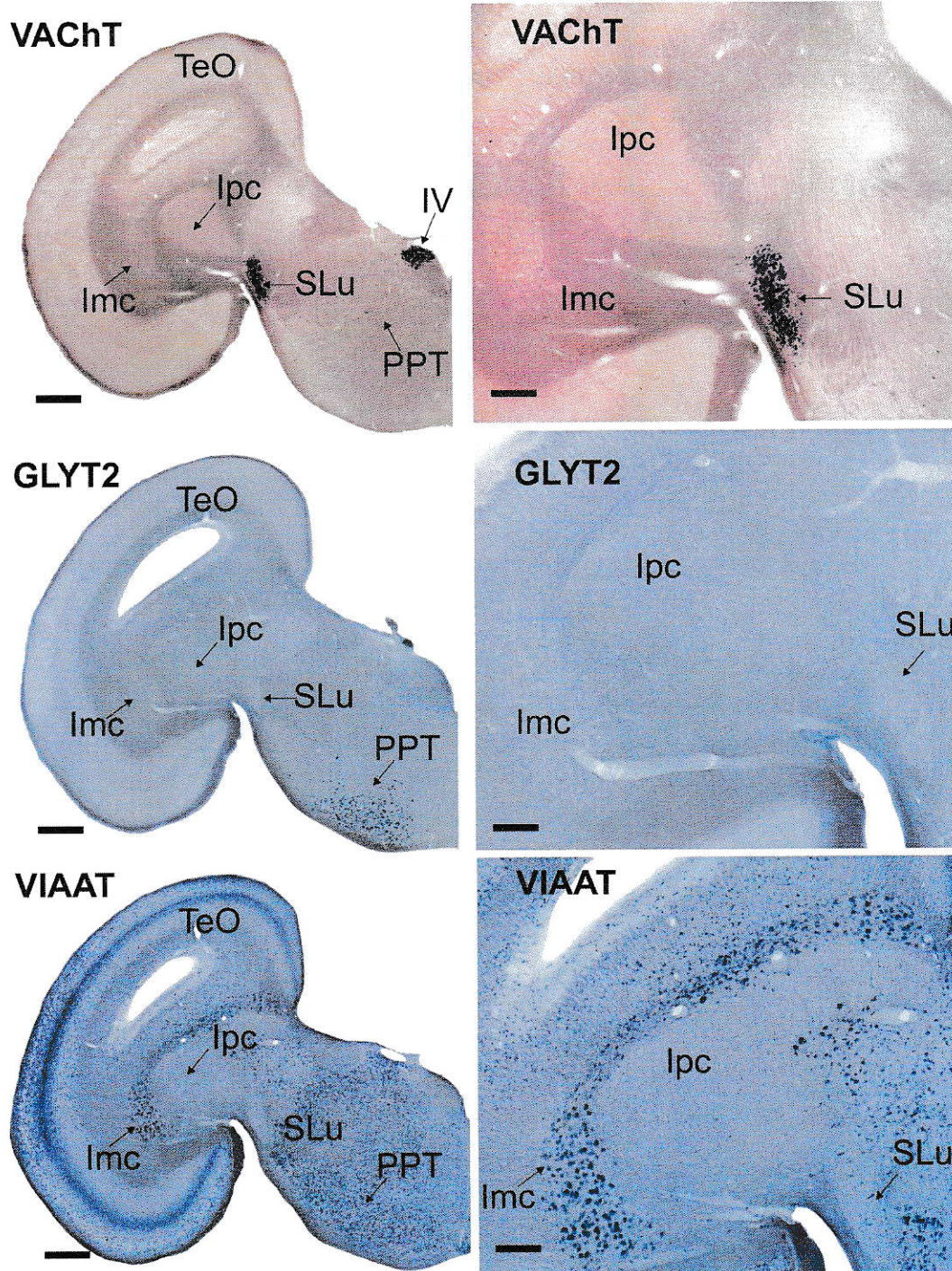


Figura 5. Expresión de ARN mensajero para marcadores VACHT, VIAAT, GLYT2 en la región del istmo. Microfotografías de cortes coronales de la región del istmo mostrando ensayos de hibridación *in situ* para sondas de VACHT, GLYT2 y VIAAT). Barra de tamaño: columna izquierda = 1mm; columna derecha, D = 200 µm.

3.3.2 Otras estructuras cerebrales

Los marcadores VAcHt y VIAAT marcaron de manera consistente todas las estructuras colinérgicas y GABAérgicas conocidas en el cerebro del pollo. Sin embargo, aunque no existe registro del patrón de distribución de neuronas glicinérgicas en *Gallus gallus* previo al presente trabajo, el patrón de expresión de ARNm del marcador glicinérgico GLYT2 coincide de manera consistente con la distribución de neuronas glicinérgicas encontrada en otros vertebrados (Reichenberger y col., 1997; Tanaka y col., 2003; Zeilhofer y col., 2005; Barreiro-Iglesias y col. 2012).

A continuación se detallan las principales estructuras marcadas en cada región del cerebro del pollo.

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

Abrev	Núcleo	VACHT	VIAAT	GLYT2
AA	Arcopallium Anterius	-	S++	-
AD	Arcopallium Dorsale	-	S++	-
AI	Arcopallium Intermedium	-	S++	-
ALp	Nucleus ansae lenticularis posterior	-	++	-
AM	Arcopallium Mediale	-	S++	-
ARC	Nucleus arcuatus hypothalami	-	++	-
APT	Nucleus pretectalis anterior	-	+	-
Bas	Nucleus Basorostralis pallii	-	S++	-
Cbl	Nucleus Cerebellaris Internus	-	++	-
CbM	Nucleus Cerebellaris Intermedius	-	++	-
CBXpu	Corteza cerebelar, capa Purkinje	-	++	-
Cos	Nucleus Commissuralis Septi	++	++	-
DLAmc	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami, pars magnocellularis	-	S++	-
DLA	Nucleus Dorsolateralis Anterior Thalami	-	S++	-
E	Entopallium	-	S++	-
EW	Nucleus Edinger-Westphal	++	-	-
FRL	Formatio Reticularis Lateralis Mesencephali	-	++	-
FRM	Formatio Reticularis Medialis Mesencephali	-	++	-
GLdp	Nucleus Geniculatus Lateralis, pars dorsalis principalis	-	S+	-
GLv	Nucleus Geniculatus Lateralis, pars ventralis	-	++	-
GP	Globus Pallidus	++	S++	-
HA	Hyperpallium Apicale	-	S++	-
HD	Hyperpallium Densocellulare	-	S++	-
HI	Hyperpallium Intercalatum	-	S++	-
HL	Nucleus Habenularis Lateralis	-	-	+
HM	Nucleus Habenularis Medialis	++	-	-
Hp	Hippocampus	-	S++	-
ICT	Nucleus intercalactus thalami	-	++	-
IHA	Nucleus Interstitialis Hyperpallii Apicale	-	S++	-
Imc	Nucleus Isthmi, pars magnocellularis	-	++	-
Ipc	Nucleus Isthmi, pars parvocellularis	-	-	-
LC	Nucleus linearis caudalis raphes	S+	++	++
LDT	Nucleus Tegmentalis latero-dorsalis	++	S++	-
LHy	Regio Lateralis Hypothalami	S+	++	-
LLd	Nucleus Lemnisci Lateralis, pars dorsalis	-	++	-
LLv	Nucleus Lemnisci Lateralis, pars ventralis	-	++	++
LoC	Locus Ceruleus	++	S++	-
LSt	Striatum Laterale	-	++	-
M	Mesopallium	-	S++	-
MDT	Nucleus Tegmentalis medio-dorsalis	++	S++	-
MLd	Nucleus Mesencephalicus Lateralis, pars dorsalis	-	S++	-
MSt	Striatum Mediale	++	++	-

Continuación tabla 2.

Abrev	Núcleo	VAcHt	VIAAT	GLYT2
NA	Núcleo Angularis	-	s++	-
NBM	Nucleus basalis magnocellularis	++	s++	-
nBOR	Nucleus Opticus Basalis	-	++	-
NC	Nidopallium Caudale	-	s++	-
NF	Nidopallium frontalis	-	s++	-
NFL	Nidopallium frontalis, pars lateralis	-	s++	-
NFM	Nidopallium frontalis, pars medialis	-	s++	-
NI	Nidopallium intermedium	-	s++	-
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	++	-	-
PAG	Substantia grisea centralis	-	++	-
PMH	Nucleus Medialis Hypothalami Posterioris	++	s+	-
PPT	Nucleus Pedunculopontinus Tegmenti	++	++	-
PrV	Nucleus Sensorius Principalis Nervi Trigemini	-	++	++
PT	Nucleus Pretectalis	-	++	-
PV	Nucleus posteroventralis thalami	-	++	-
R	Nucleus Raphe	-	++	++
RF	Formatio reticularis	-	++	++
Ru	Nucleus Ruber	-	++	++
SNC	Substantia Nigra, pars compacta	-	++	-
SNr	Substantia Nigra, pars reticulata	-	++	-
SGPv	Stratum Griseum Periventriculare	-	++	-
SLu	Nucleus Isthmi pars Semilunaris	++	-	-
SON	Nucleus superior olivare	-	++	++
SP	Nucleus Subpretectalis	-	++	-
Sp5c	Nucleus spinalis nervi trigemini, pars caudalis	-	++	++
SpM	Nucleus Spiriformis Medialis	++	-	-
SRt	Nucleus Subrotundus	-	++	-
TG	Tectal grey	-	s++	-
TRN	Nucleus reticularis thalami	-	++	-
VeD	Nucleus Vestibularis Descendens	-	++	-
VeL	Nucleus Vestibularis Lateralis	-	++	s++
VeM	Nucleus Vestibularis Medialis	++	++	s++
VLT	Nucleus Ventrolateralis Thalami	-	s++	-
VS	Nucleus Vestibularis Superior	-	++	-
AVT	Area Ventralis Tegmenti	-	++	-
		-	++	-

3.3.2.1 Romboencéfalo

El ARNm para VAcHT se encontró fuertemente expresado en todas las neuronas pertenecientes a núcleos motores del puente y la médula, incluyendo el núcleo motor del trigémino (Vmv, Vmd; Figura 6), el núcleo abducens (VIIm), el núcleo facial (VIIV, VIId), el núcleo ambiguo (Amb), el núcleo dorsal del nervio vago (Xm) y el núcleo del hipogloso (XIIIm). Un intenso marcaje fue observado en neuronas del locus coeruleus (LoC), el núcleo tegmental mediodorsal (MDT), el núcleo de la comisura septal, el núcleo tegmental laterodorsal (LDT y el núcleo vestibularis medialis (Figura 6).

Una alta expresión de VIAAT se observó en las células de Purkinje en el cerebelo, en poblaciones de neuronas de la formación reticular, en los núcleos cerebelares medial (CbM), interpuesto (Cbl) y lateral (CbL), el raphe (R) y el núcleo intermedio del lemnisco lateral (ILL) (Figura 6). Además, se observaron células esparcidas en los núcleos trigeminales espinal caudal (Sp5c) y sensorial principal (Pr5). Los núcleos del complejo olivar superior y los núcleos vestibulares (MVe y SpVe) también muestran una fuerte expresión, con células esparcidas en SpVe. En la parte mas anterior del romboencéfalo, se aprecia una gran cantidad de neuronas VIAAT positivas, en particular, en la región correspondiente al núcleo PPT (Figura 5).

A su vez, esta región del cerebro es la que mostró la mayor expresión de GLYT2. Este marcador se observó fuertemente expresado en poblaciones neuronales de la formación reticular, los núcleos trigeminales espinal caudal (Sp5c) y sensorial principal (Pr5), el raphe (R), los núcleos del complejo olivar superior (SON) y en los núcleos vestibulares (VeM y VeL) (Figura 6). Se encontraron también neuronas marcadas

fuertemente para GLYT2 esparcidas en los núcleos cerebelares medial (CbM) e interpuesto (Cbl). Además, se apreció una fuerte expresión en la región ventro-posterior del área neuronal correspondiente al núcleo pedúnculo pontino (PPT).

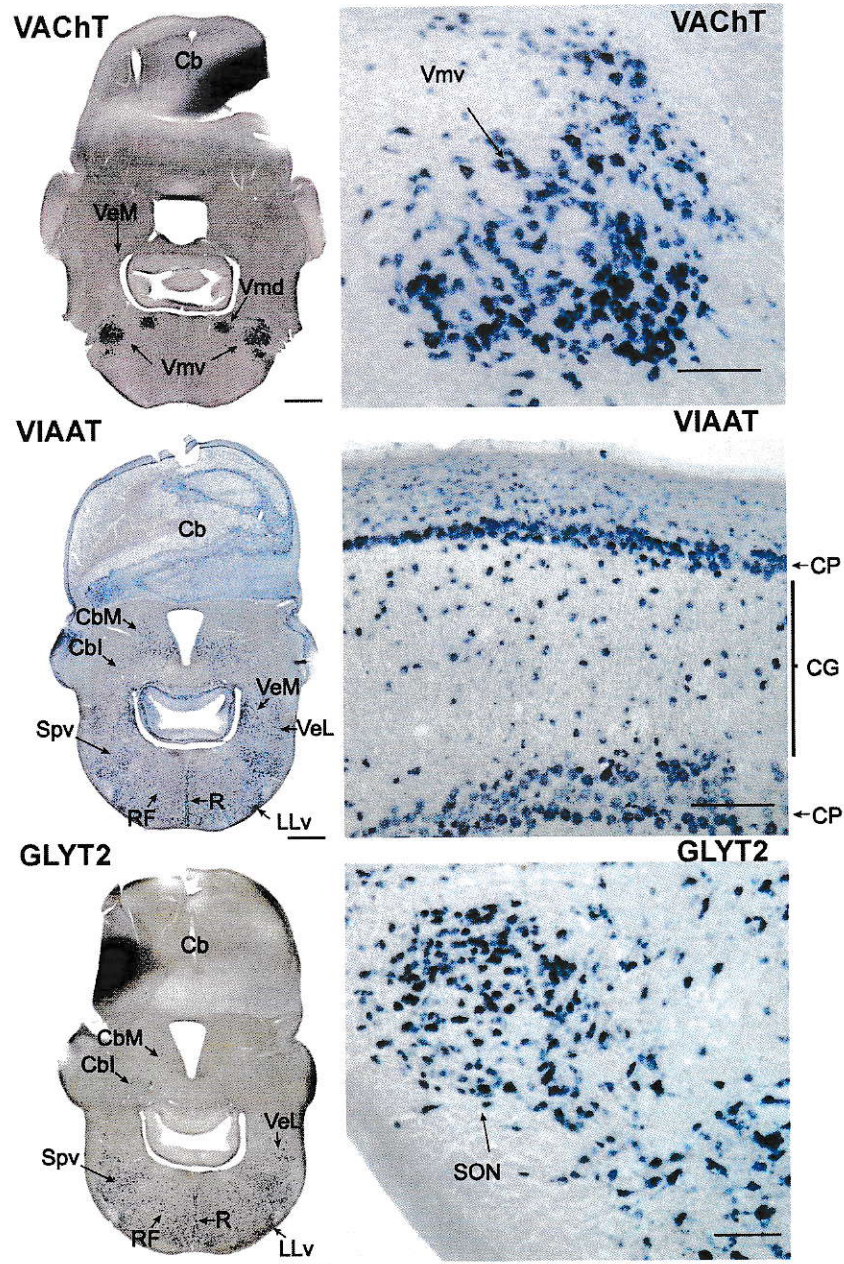


Figura 6. Expresión de ARN mensajero para marcadores VACHT, VIAAT, GLYT2 en el romboencéfalo de *Gallus gallus domesticus*. Cortes coronales a nivel romboencéfalo mostrando ensayos de hibridación *in situ*, en los que las motoneuronas de los núcleos motores trigeminales dorsal y ventral (Vmd y Vmv) y algunas células esparcidas en el núcleo vestibular medial (VeM) aparecen fuertemente marcadas para el marcador colinérgico VACHT. Los núcleos cerebelares (Cbl, CbM), el núcleo del lemnisco lateral ventral (LLv), los núcleos vestibulares (VeM y VeL), el núcleo raphe (R), el núcleo olivar superior (SON) y las neuronas de la formación reticular (RF) muestran una fuerte expresión de los marcadores VIAAT y GLYT2. Células VIAAT marcadas en la capa de Purkinje (CP) y neuronas esparcidas se observan en la capa granular (CG). Barras de tamaño: Columna izquierda = 1mm; Columna derecha = 200 μ m.

3.3.2.2 Mesencéfalo

Todas las subdivisiones de los núcleos oculomotores, Edinger Westphal (EW), troclear (IV; Figura 5) y las células tegmentales colinérgicas de PPT (Figura 5) mostraron una fuerte expresión de VACHT.

Una alta expresión de VIAAT se observó en las neuronas magnocelulares de los núcleos lmc (Figura 5) y MLd. Marcaje específico para este marcador se observó en la sustancia nigra compacta (SNC) y reticulata (SNR), el núcleo interpeduncular (IP) y en todas las capas tectales, concentrándose principalmente en las capas 2-5, 10 y células esparcidas débilmente marcadas en la capa 13. Además, neuronas con intenso marcaje fueron encontradas en el área tegmental periaqueductal grey (PAG), el núcleo parabrual, y el área ventral tegmental (VTA), distribuyéndose estas últimas de manera esparcida. A este nivel cerebral solo se observó marcaje de neuronas GLYT2 en la región mas rostral del tegmento dorsal, en el limite con la región pretectal, en donde se pueden apreciar unas pocas neuronas gigantocelulares fuertemente marcadas (Figura 7).

3.3.2.3 Pretéctum

A nivel pretectal se observa el marcaje moderado de VAcHT en las neuronas del núcleo espiriforme medial (SpM), siendo esta la única estructura marcada a este nivel (Figura 7). Una fuerte expresión del ARN mensajero para VIAAT se observó en el núcleo pretectal (PT), el núcleo espiriforme lateral (SpL), el núcleo posterior del ansa lenticular (ALp) (Figura 7), el núcleo yuxtacomisural medial (MJC), el núcleo terminal medial (MT) y neuronas esparcidas en *tectal grey* (TG). A este nivel cerebral solo se observó marcaje de neuronas GLYT2 en la región pretectal posterior, en el límite con la región más rostral del tegmento dorsal, en donde se pueden apreciar unas pocas neuronas gigantocelulares fuertemente marcadas (Figura 7).

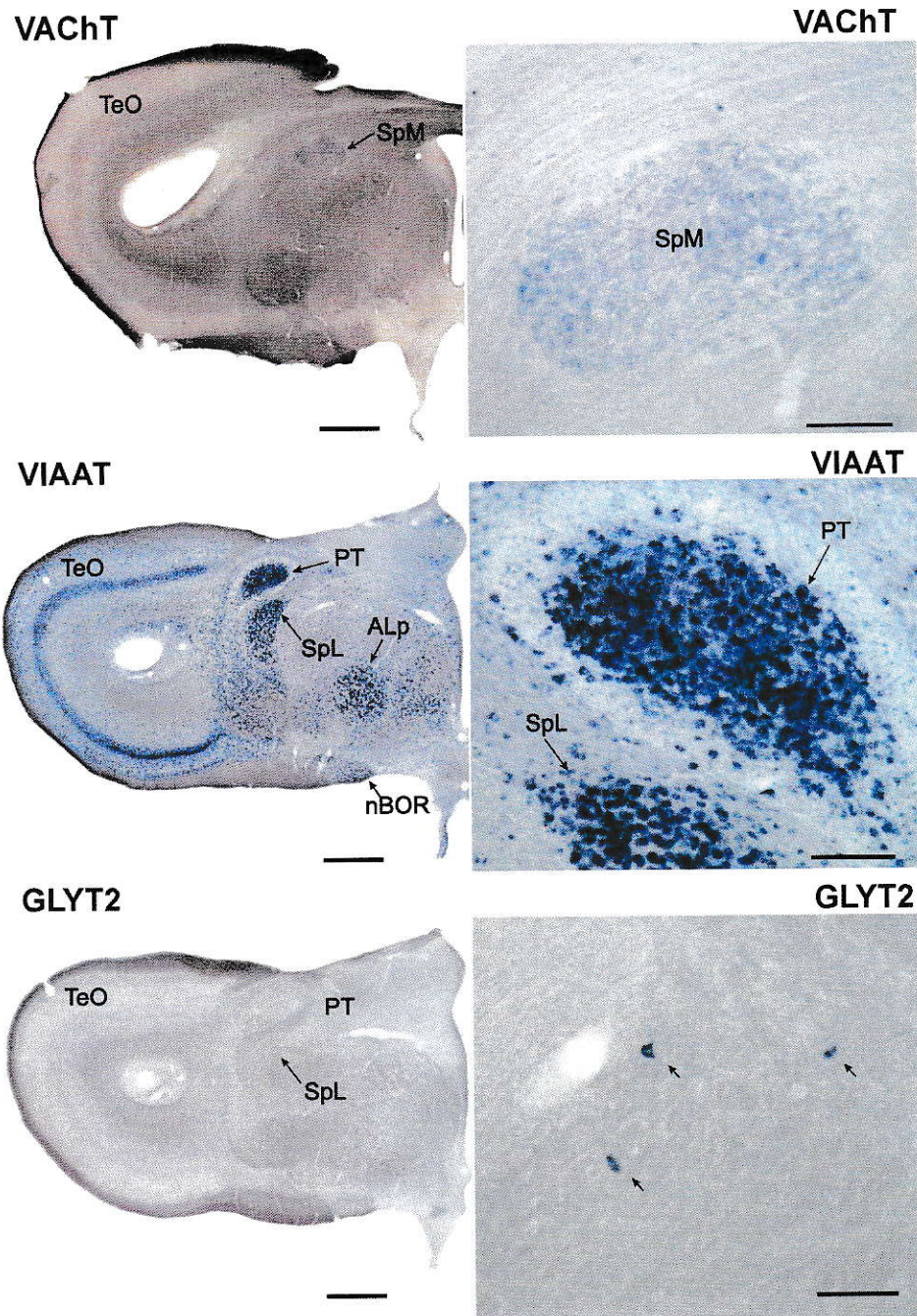


Figura 7. Expresión de ARN mensajero para marcadores VACHT, VIAAT, GLYT2 en la región pretectal de *Gallus gallus domesticus*. Cortes coronales a nivel del pretéctum mostrando ensayos de hibridación *in situ* donde las neuronas del núcleo spiriformis medial (SpM) aparecen moderadamente marcadas para VACHT. Los núcleos pretectales (PT), spiriformis lateralis (SpL), nBOR y el núcleo posterior del ansa lenticular (ALp) se muestran fuertemente marcados para VIAAT. En la región rostral del tectum dorsal, se pueden apreciar unas pocas neuronas gigantocelulares fuertemente marcadas para GLYT2. Barras de tamaño: Columna izquierda = 1mm; Columna derecha = 200 μ m.

3.3.2.4 Diencéfalo

Neuronas dispersas en el núcleo hipotalámico lateral (LHy) y el hipotálamo posteromedial (PMH) mostraron una débil marca para VACHT (Figura 8). Se observó una fuerte expresión de VIAAT en el núcleo posteroventral (PV), el núcleo subrotundus (SRt), el núcleo posterior del ansa lenticular (ALp), las neuronas gigantocelulares del núcleo talámico anterior dorsolateral (DLAmc) y los núcleos talámicos intercalado (ICT) y ventrolateral (VLT). Neuronas fuertemente marcadas se encontraron en el núcleo geniculado ventral (GLv) en su parte dorsal y neuronas esparcidas igualmente marcadas en su parte ventral (Figura 8). Neuronas esparcidas marcadas de manera moderada con VIAAT se apreciaron en el núcleo hipotalámico lateral (LHy) (Figura 8), en la eminencia pre-talámica (PThE) y neuronas esparcidas débilmente marcadas en los núcleos talámicos anteriores dorsolateral (DLA) y dorsomedial (DMA).

Además, neuronas hipotalámicas del estrato periventricular, el núcleo arcuato (Arc), el núcleo lateral anterior (LA), el núcleo reticular talámico (TRN), los núcleos hipotalámicos posteriores medial (PMH) y lateral (PLH) se encontraron marcadas de manera moderada, mientras que el núcleo ventral hipotalámico (VMH) se encontró fuertemente marcado. Se observaron neuronas esparcidas marcadas para VIAAT en el área retromamilar (RM) y premamilar (PM). A este nivel cerebral no se observó marcaje de neuronas GLYT2.

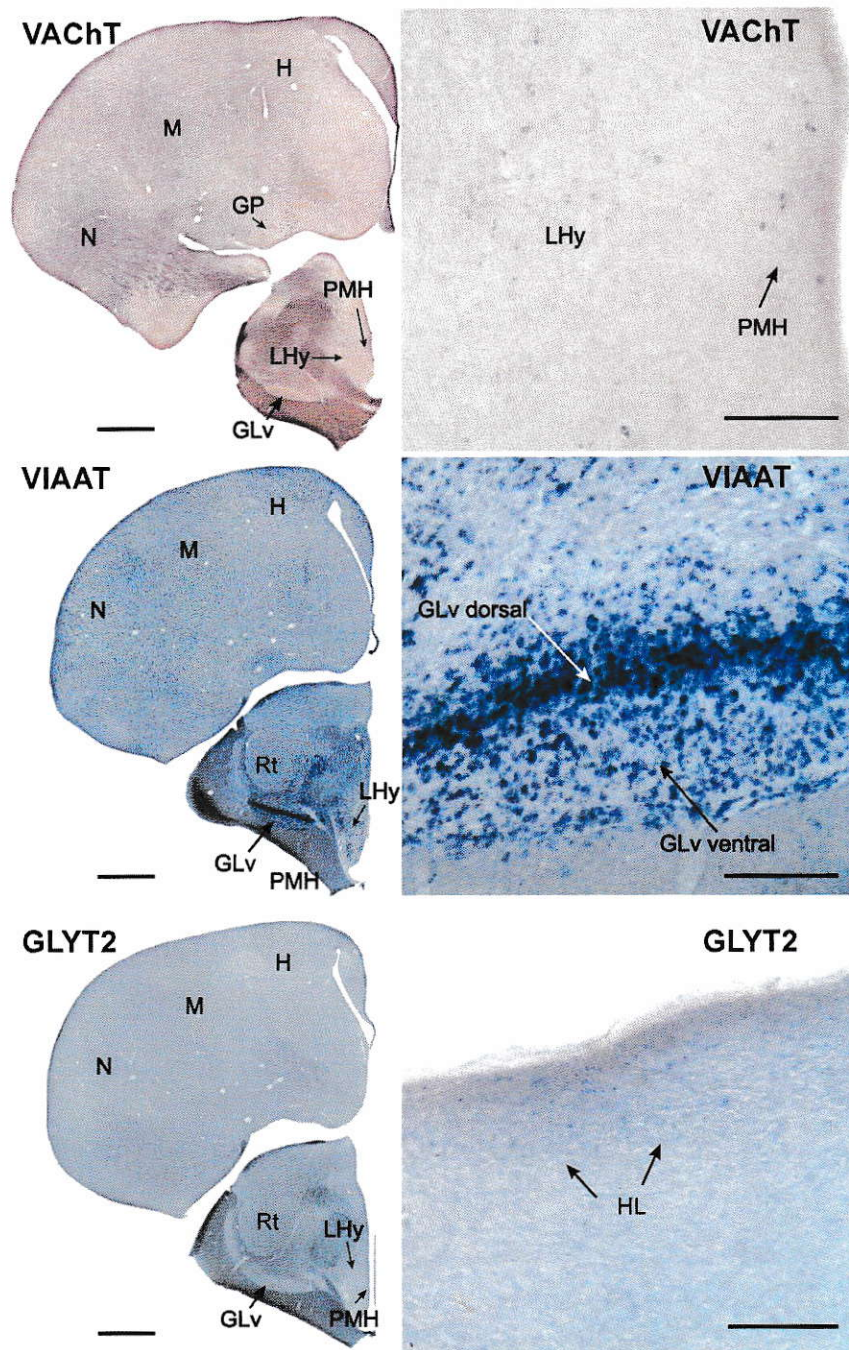


Figura 8. Expresión de ARN mensajero para marcadores VACHt, VIAAT, GLYT2 en el diencefalo de *Gallus gallus domesticus*. Cortes coronales mostrando ensayos de hibridación *in situ*. Una alta expresión de VIAAT se aprecia en el núcleo geniculado ventral (GLv), y de manera moderada en el núcleo hipotalámico posteromedial (PMH) y núcleo subtalámico (Sth). Neuronas levemente marcadas para GLYT2 se aprecian en la habénula lateral (HL). N, nidopallio; M, mesopallio; H, hiperpallio. Barras de tamaño: Columna izquierda = 1mm; Columna derecha = 200 μ m.

3.3.2.5 Telencéfalo

Una fuerte expresión del marcador VAcHT fue observada en células dispersas del globus pallidus (GP), el núcleo basal magnocelular (NBM), el núcleo septal comisural (CoS) y el estriado medial (MSt) (Figura 9).

Se encontró una fuerte expresión del ARN mensajero para VIAAT en el núcleo supra-óptico (SO), el núcleo pre-óptico anterior (POA), en el núcleo acumbens (Ac), el tubérculo olfatorio (TuO) y en neuronas palidales esparcidas en el globo pálido (GP) (Figura 9). La región hipocámpal (Hp) y el palio ventral (VP) muestran neuronas esparcidas fuertemente marcadas para este marcador. Una mezcla de neuronas esparcidas con marcaje débil y fuerte pudo ser apreciado en el estriado medial (MSt) junto con neuronas débilmente marcadas en la porción mas lateral del estriado (LSt) (Figura 9). Neuronas esparcidas con marcaje moderado se observaron en las regiones del hiperpalio (H), nidopallio (N) y entopallio (E) entremezcladas con neuronas débilmente marcadas (Figura 9). Por último, se observaron neuronas esparcidas débilmente marcadas a nivel del mesopallio (M) y neuronas débilmente marcadas en el núcleo basal (Bas). A este nivel cerebral no se observó marcaje de neuronas GLYT2.

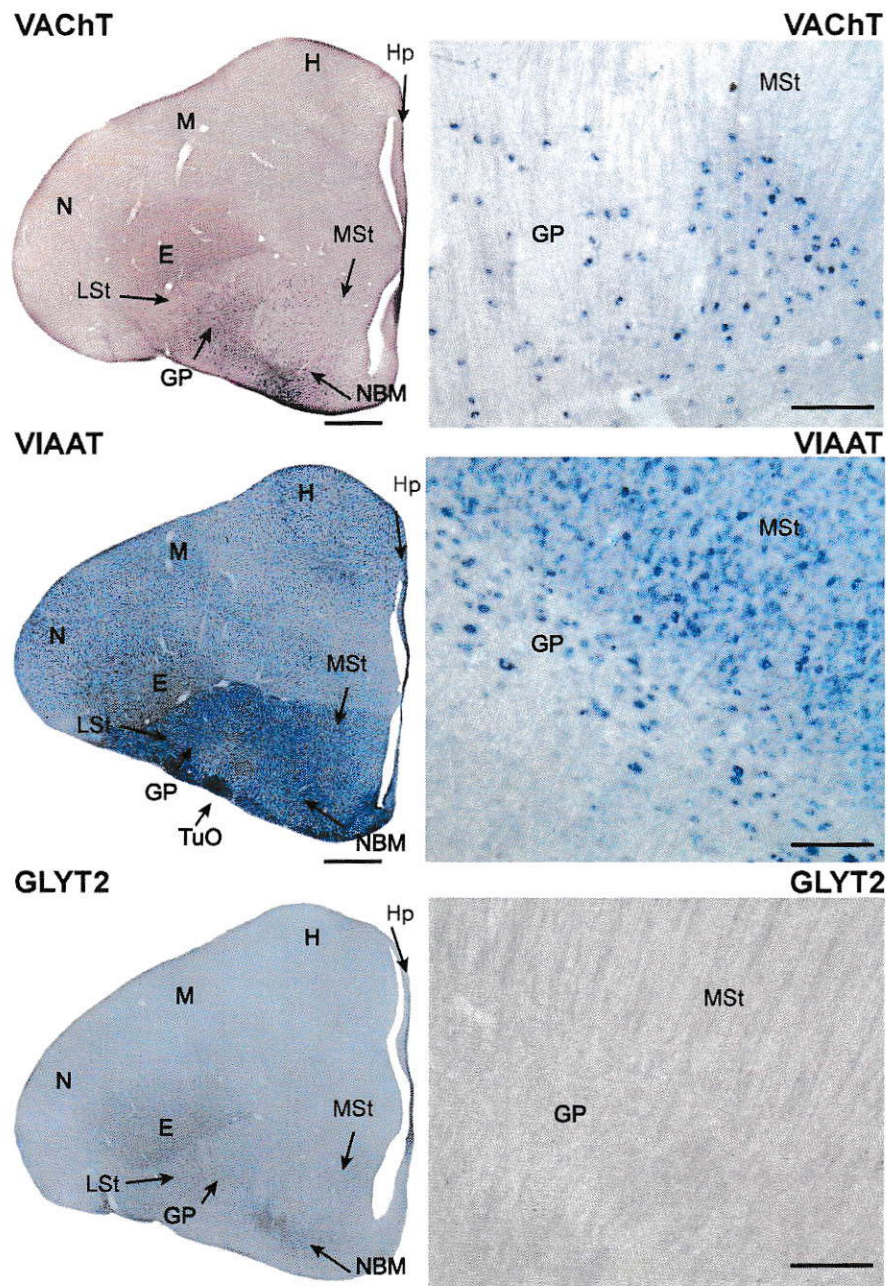


Figura 9. Expresión de ARN mensajero para marcadores VACHT, VIAAT, GLYT2 en el telencéfalo de *Gallus gallus domesticus*. Ensayos de hibridación *in situ* en cortes coronales de telencéfalo de pollo muestran la expresión de VACHT en neuronas del globus palidus (GP), el estriado medial (MSt) y en las neuronas colinérgicas del núcleo basal magnocelular (NBM). Una alta expresión del ARN mensajero para VIAAT se aprecia en el tubérculo olfatorio (TuO) y en células esparcidas del nidopalio (N), mesopalio (M), Hiperpalio y entopalio (E). Además, los núcleos del estriado lateral (LSt) y medial (MSt) muestran neuronas esparcidas suave y fuertemente marcadas para VIAAT. Barras de tamaño: Columna izquierda = 1mm; Columna derecha = 200 μ m.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman el carácter colinérgico del núcleo Isthmi *pars* Semilunaris (SLu), ya que junto con complementar reportes anteriores sobre la inmuno-reactividad de este núcleo para la colina-acetil transferasa (ChAT) (Sorenson y cols., 1989; Medina y Reiner, 1994), muestran la expresión del ARNm que codifica el componente fundamental para la liberación vesicular de acetilcolina, el transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). En contraste, los resultados de este trabajo ponen en duda la identidad neuroquímica del núcleo Isthmi *pars* parvocellularis (Ipc). En primer lugar, la total falta de expresión de los ARN mensajeros que codifican para el transportador de glicina (GLYT2) y para el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT), en todas las células del núcleo Ipc, descarta completamente la posibilidad de que dicho núcleo posea identidades neuroquímicas del tipo GABAérgica y/o glicinérgica, en oposición a propuestas previas (GABAérgica: Hunt y Künzle, 1976; Hunt y cols., 1977; Wang y cols., 1993; Félix y cols., 1994; Glicinérgica: Hunt y cols., 1977; Tömböl y cols., 2003). En primer lugar, la ausencia del ARN mensajero para el transportador VIAAT en las neuronas de Ipc impide, que moléculas de GABA, que hipotéticamente pudiesen estar disponibles en su citoplasma puedan ingresar al interior de vesículas sinápticas. En segundo lugar, la falta de expresión del transportador GLYT2 en las células de Ipc no permitiría la existencia de un "pool" de neurotransmisor disponible en el citoplasma pre-sináptico para ser cargado en vesículas previo a la liberación. Ante la posibilidad de que el transportador de glicina 1 (GLYT1) pudiese estar siendo expresado en este núcleo, un supuesto fenotipo glicinérgico sería aun disfuncional, ya que aunque este transportador es capaz de aumentar la concentración de glicina en el citoplasma pre-



sináptico, la sola ausencia del transportador VIAAT en *lpc* hace que dicha función neuroquímica quede incompleta.

Por otra parte, aunque *lpc* muestra inmuno-reactividad para ChAT, la enzima específica para la síntesis de acetil-colina, la ausencia de expresión del ARN mensajero para VACHT daría cuenta de un fenotipo colinérgico incompleto, ya que la acetilcolina sintetizada por éstas neuronas no sería capaz de ser liberada de manera vesicular. Debido a que los fenotipos glicinérgicos y GABAérgicos quedan completamente descartados para *lpc*, de ahora en más, discutiremos las implicancias biológicas que tiene su particular patrón de expresión colinérgico.

4.1 Especificidad en la detección de VACHT

La alta especificidad de las sondas colinérgicas quedó mostrada al no encontrar marcaje en zonas del cerebro en las cuales no hay células colinérgicas. Sin embargo, existe la posibilidad que *lpc* exprese el ARNm 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. En el pollo (Mukherjee y 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 10). 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 transmembrana 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, de ahí, el reconocimiento por parte de nuestra sonda debiese cubrir las posibles isoformas equivalentes de VACHT que pudiesen estar presentes en el transcriptoma del pollo.

4.2 La posible “*down-regulation*” del locus colinérgico

La ausencia de expresión del ARN mensajero del gen VACHT en *lpc* junto con una expresión de la 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 10A) 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 ARNms maduros de ChAT y VACHT (Figura 10A, Región R). Por otra parte, también existen secuencias promotoras exclusivas para cada gen (V1, V2 para VACHT; N y M para ChAT; Figura 10A), 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 el mas frecuente en la rata y que la expresión acoplada dirigida por la región R es la menos significativa (Schütz y col., 2001).

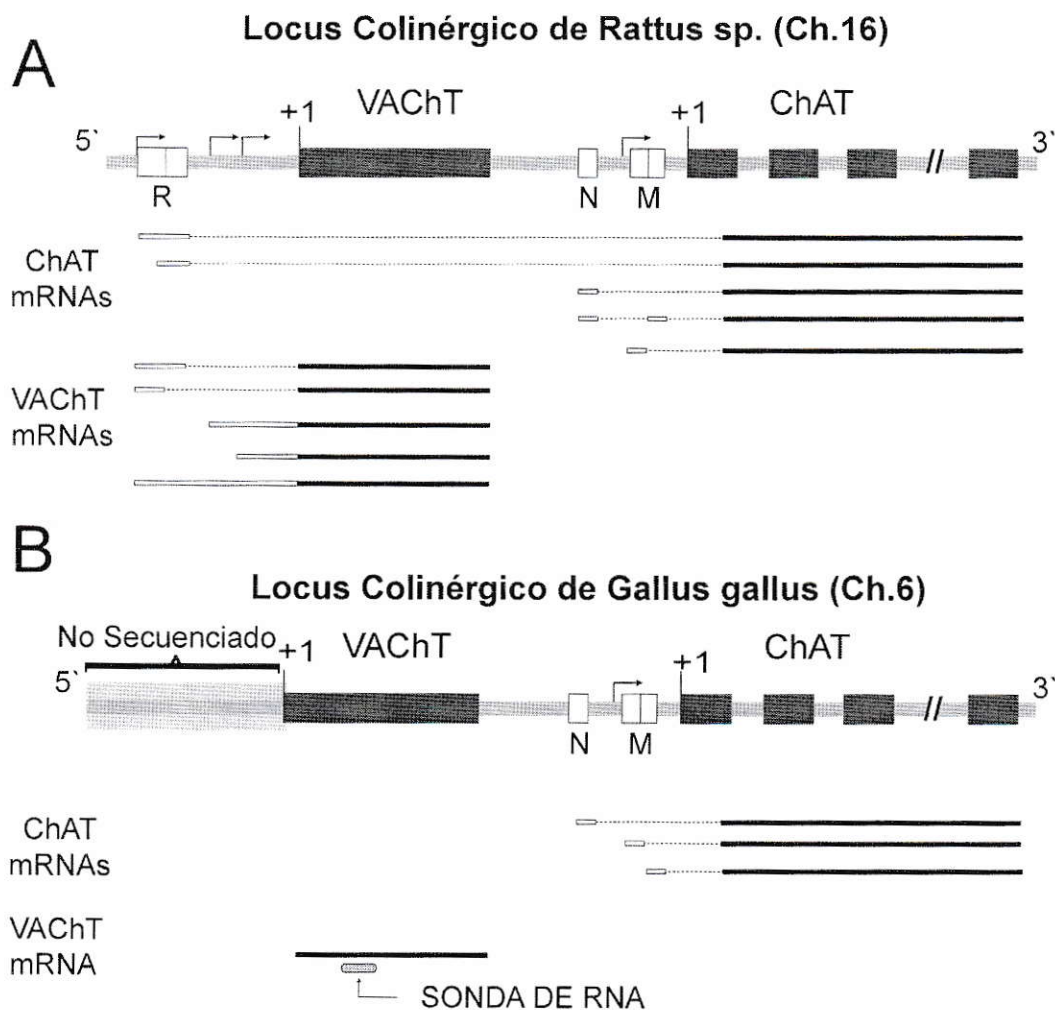


Figura 10. El locus colinérgico. A, Esquema del locus colinérgico en la rata, donde se muestra la organización anidada de los genes VACHT y ChAT, junto con una serie de isoformas 5'UTR de los ARNs mensajero de éstos. B, Esquema del locus colinérgico de *Gallus gallus* parcialmente secuenciado, y las especies de ARN mensajero que hasta ahora han sido identificadas. Se muestran la región de hibridación de la sonda VACHT de ARN utilizada, la cual corresponde a la región codificante del ARN mensajero.

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 secuenciada aún (Mukherjee y Hausman 2004; Figura 10B). Sólo se ha reportado la secuencia de la isoforma N del transcrito ChAT (Mukherjee y Hausman 2004; Figura 10B) y no existen reportes de isoformas del transcrito de VACHT. Sin embargo, la estructura altamente conservada del locus colinérgico (Figura 10) hace plausible que la regulación del locus colinérgico 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. 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.; González-Cabrera, C.; Ferran, JC; Puellas, L.; Garrido-Charad F.; Marín, G. Manuscrito en preparación).

4.3 Liberación no-vesicular de acetilcolina

Una alternativa atractiva es que los axones de lpc liberen acetilcolina mediante un mecanismo no-vesicular. Por ejemplo, en estudios del órgano eléctrico del pez torpeda han llevado a postular un mecanismo que permitiría la liberación de acetilcolina dependiente de calcio de manera cuántica no vesicular (Israel y col., 1986, 1990; 1994; 1998; Bloc y col., 1999, 2000). Mecánicamente, este proceso se basa en un homooligómero de 220 kDa, denominado mediatóforo, compuesto por subunidades proteolipídicas 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 H⁺ ATPasa vacuolar (V-ATPasa), se encuentra altamente conservada entre los vertebrados (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 posibilidad es que las moléculas de acetilcolina, acumuladas en el citoplasma pre-sináptico, sean liberadas de manera no cuántica por el mecanismo de recuperación de colina de alta afinidad. Recientemente, en estudios de las vías aéreas de cobayos, se ha reportado la participación del transportador de alta afinidad de colina (CHT) en la liberación no cuántica de acetilcolina dependiente de calcio por parte de nervios colinérgicos (Chávez y cols., 2011). Por lo tanto, si el transportador CHT estuviese siendo expresado en lpc, podría dar sustento a esta clase de liberación.

4.4 Fenotipo neuroquímico de lpc

La ausencia del marcador VAcHT puede significar que lpc ostenta una identidad neuroquímica distinta a la colinérgica, lo que se abre como una opción plausible al considerar el reporte de que las neuronas de lpc expresarían el transportador vesicular de glutamato VGLUT2 en hibridaciones *in situ* con sondas de ARN radioactivas en palomas (Islam y Atoji, 2008). Este reporte sugiere que lpc podría ser un núcleo glutamatérgico en la paloma, aunque es desconocido si dicha expresión comprende a una sub-población o a todo el núcleo. Esto abre las posibilidades de que lpc co-libere glutamato y acetilcolina de manera vesicular y no-vesicular, respectivamente.

4.5 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; Marín y col., 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 adición de agonistas colinérgicos aumenta la amplitud del potencial evocado visual en las capas superficiales de TeO [teleósteos (King y Schmidt, 1995), anuros (Titmus y col., 1999; Dudkin y Gruberg, 2003), y mamíferos (Binns y Salt, 2000; Lee y col., 2001)]. Bajo la óptica de una identidad colinérgica de los núcleos del complejo del istmo (lpc y SLu), ha sido propuesto un modelo de facilitación presináptica para este fenómeno modulador [en teleósteos (King y Schmidt 1991), en anfibios (Titmus y col., 1999; Dudkin y Gruberg, 2003), en mamíferos (Binns y 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, lo que resultaría en una mayor liberación pre-sináptica de glutamato por parte de los axones de la retina. Los resultados de esta tesis sugieren cambios fundamentales en la comprensión del control que lpc ejerce sobre el flujo visual de la vía tectofugal de las aves. Durante largo tiempo se ha considerado que SLu corresponde simplemente a una extensión de lpc. Si consideramos a lpc como un núcleo no colinérgico, podríamos asignar rápidamente a SLu dicha función moduladora colinérgica, ya que al igual que lpc, posee conectividad recíproca con el tectum óptico y tiene representación de todo el campo visual. A pesar de esto, la modulación que este núcleo podría estar ejerciendo no es obvia y hasta el término de este trabajo permanece sin esclarecer.

4.6 Proyecciones

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 queda sin sustento. Este nuevo escenario sugiere replantearse el posible mecanismo de modulación pre-sináptico antes descrito, pudiendo este mecanismo no ser necesariamente por volumen, ni tampoco pre-sináptico, sino que ser por el contrario 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.

5. CONCLUSIONES

Las neuronas del núcleo SLu expresan el ARN mensajero para el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), mientras que lpc no expresa dicho marcador. El input colinérgico vesicular sobre el tectum óptico, proveniente del complejo del istmo parece corresponder de manera exclusiva a la proyección del núcleo SLu. Por su parte, lpc posee un fenotipo colinérgico incompleto, ya que solo expresa la proteína ChAT y carece del ARN mensajero codificante para la proteína VACHT. Estos resultados nos llevan a refutar la hipótesis I.

Las neuronas de lpc no expresan el ARN mensajero codificante para el transportador de glicina del tipo 2 (GLYT2), lo cual nos lleva a refutar la hipótesis II.

Las neuronas de lpc no expresan el ARN mensajero codificante para el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (VIAAT), lo cual nos lleva a refutar la hipótesis III.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Barreiro-Iglesias A, Mysiak KS, Adrio F, Rodicio MC, Becker CG, Becker T, Anadón R. 2012. Distribution of Glycinergic Neurons in the Brain of Glycine Transporter-2 Transgenic Tg(glyt2:gfp) Adult Zebrafish: Relationship to Brain–Spinal Descending Systems. *J Comp Neurol* 52: 389-425.
- 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.
- 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, Israel 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, and 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 M.H., Cruz-Valderrama J.E., Montaña L.M. 2011. Non-quantal release of acetylcholine in guinea-pig airways: role of choline transporter. *Exp Physiol* 96:460-467.

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

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.

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

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

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

Hunt, SP, 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.

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

Hunt, S.P. and Künzle, H. (1976). Observations on the projections and intrinsic organization of the pigeon optic tectum: an autoradiographic study based on anterograde and retrograde, axonal and dendritic flow, *J. Comp. Neurol.*, 170 173-190.

- 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, Sbia M, Morel N. 1990. Acetylcholine Translocating Protein: Mediatophore at Rat Neuromuscular Synapses. *J Neurochem* 55: 1758-1762.
- 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.
- Israël M. And Dunant Y. (1998). Acetylcholine Release and the Cholinergic Genomic Locus. *Mol Neurobiol* 16:1-20.
- 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.
- Karten, HJ, Revzin AM. 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 retinotectorotundal 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.
- 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.
- 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.
- 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, Mpodozis, J, Sentis, E, Ossandon, T, Letelier, JC. 2005. Oscillatory bursts in the optic tectum of birds represent re-entrant signals from the nucleus isthmi pars parvocellularis. *J Neurosci* 25:7081-7089.
- Marín G, Salas, C, Sentis, E, Rojas, X, Letelier, JC, Mpodozis, J. 2007. A cholinergic gating mechanism controlled by competitive interactions in the optic tectum of the pigeon. *J Neurosci* 27:8112-21.
- Marín G, Duran E, Morales C, González-Cabrera C, Sentis E, Mpodozis J, Letelier JC. 2012. Attentional capture? Synchronized feedback signals from the isthmi boost retinal signals to higher visual areas. *J Neurosci* 32:1110-1122.

- Maunsell JH., Cook, EP. (2002). The role of attention in visual processing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1063–1072.
- Medina, L, Reiner, A. 1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J Comp Neurol* 342:497-537.
- 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.
- Mukherjee RS, Hausman RE. 2004. Cloning of chicken choline acetyltransferase and its expression in early embryonic retina. *Mol Brain Res* 129:54-66.
- 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.
- 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.
- Reichenberger I, Straka H, Ottersen OP, Streit P, Gerrits NM, Dieringer N. 1997. Distribution of GABA, glycine, and glutamate immunoreactivities in the vestibular nuclear complex of the frog. *J Comp Neurol* 377:149–164.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shipp, S. (2004). The brain circuitry of attention. *Trends Cogn Sci*. 8:223-230.
- Schütz B, Weihe E, Eiden LE. 2001. Independent patterns of transcription for the products of the rat cholinergic gene locus. *Neuroscience* 104:633-42.
- 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.
- 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.
- Tanaka I, Ezure K, Kondo M. 2003. Distribution of glycine transporter 2 mRNA-containing neurons in relation to glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla. *Neurosci Res* 47:139-151.
- 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, Egedy Gy, Németh A. 1995. Some data on connections of neurons of nuclei isthmi of the chicken. *J Brain Res* 36:501-508.
- 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.
- Treue, S. 2004. Perceptual enhancement of contrast by attention. *Trends Cogn Sci*. 8:435-437.
- Wang YC, Frost BJ. 1991. Visual response characteristics of neurons in the nucleus isthmi magnocellularis and nucleus isthmi parvocellularis of pigeons. *Exp Brain Res* 87:624-633.
- Wang Y, Xiao J, Wang SR. 2000. Excitatory and inhibitory receptive fields of tectal cells are differentially modified by magnocellular and parvocellular divisions of the pigeon nucleus isthmi. *J Comp Physiol A* 186: 505-511
- Wang YT, Wang SR, Xu HY 1993. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in nucleus isthmi of pigeon. *Act Biophys Sin* 9: 108-112
- Wang SR, Wang YC, Frost BJ. 1995. Magnocellular and parvocellular divisions of pigeon nucleus isthmi differentially modulate visual responses in the tectum. *Exp Brain Res* 104:376-384.
- Wang SR. 2003. The nucleus isthmi and dual modulation of the receptive field of tectal neurons in non-mammals. *Brain Res Rev* 41:13-25.
- 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.

Weihe E, Schafera 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.

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.

Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bosl MR, Fritschy JM. 2005. Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* 482:123–141.