

UCH-Fc  
MAG-B  
R 457  
C 1



**Desarrollo del Fenotipo Neuroquímico y de la  
Morfología de los Terminales Axónicos del Núcleo  
Isthmi pars parvocellularis (Ipc) en *Gallus gallus***

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

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Rosana Patricia Reyes Pinto**

**Octubre, 2014**

**Director de Tesis Dr: Juan Carlos Letelier  
Co-Director de Tesis : Gonzalo Marín Gamé**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGÍSTER**

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

**Rosana Patricia Reyes Pinto**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 29 de Septiembre de 2014.

Director de Tesis:  
Dr. Juan Carlos Letelier

*Letelier*  
.....

Co-Director de Tesis  
Sr. Gonzalo Marín

*Gonzalo Marín*  
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Jorge Mpodozis

.....

Dra. Verónica Palma

.....



*[Signature]*  
.....

A Rossana y Patricio



Rosana Reyes Pinto nació el 26 de abril de 1986 en Santiago de Chile. Su curiosidad por la Biología y la Ciencia la llevó a estudiar Licenciatura Ciencias con mención en Biología en la Universidad de Chile. Posteriormente, su interés por la Neurociencia y Biología del Desarrollo la condujo a desarrollar un trabajo de magíster explorando aquellas áreas. Finalizada esta etapa, pretende continuar y profundizar su formación académica y científica con la intención de dedicarse a la investigación.

## Agradecimientos

Primero que todo, quisiera agradecer a mi mis padres, Rossana y Patricio, hermana y hermanos, cuñados y sobrinos, por la paciencia y apoyo durante todo este tiempo. A Gustavo quién ha sido un apoyo fundamental para poder realizar, continuar y finalizar este trabajo.

Lo segundo es agradecer la valiosa formación académica y científica otorgada por los profesores Gonzalo Marín, Jorge Mpodozis y Juan Carlos Letelier. Es gracias a ellos que he podido llevar a cabo este trabajo de investigación. A mis amigos y compañeros del Rayo, los cuales han sido un gran apoyo en este proceso, y en particular a mi amiga Florencia, quién siempre me ha brindado su ayuda incondicional.

Al profesor Luis Puelles por acogerme durante varios meses en su laboratorio, y muy en especial, agradecer a José Luis Ferrán, tanto por su enseñanza como continua ayuda.

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento de FONDECYT, CONICYT y la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
Neurotransmisores y su influencia en el desarrollo del sistema nervioso .....	3
Anatomía del circuito istmo-tectal .....	6
Ontogenia del circuito istmo-tectal .....	10
Fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo .....	12
Planteamiento del problema .....	15
Hipótesis .....	17
Objetivos .....	17
MATERIALES Y MÉTOD.....	18
Obtención de pollos de estadíos E12, E14, E16, E21 y P2 .....	18
Determinación secuencia y generación partidores .....	18
Extracción RNA .....	19

Transcripción Reversa .....	20
PCR.....	21
Ligación y transformación .....	23
PCR de colonia.....	23
Extracción DNA plasmidial .....	25
Linearización DNA plasmidial .....	25
Síntesis de ribosondas marcadas con dígoxigenina .....	27
Procedimientos histológicos para los ensayos de ISH e IMM.....	27
Hibridación In situ (ISH).....	28
Immunohistoquímica para acetil transferasa de colina (ChAT) y transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT 2) .....	30
Depósito de cristales de biocitina en rebanadas de mesencéfalo.....	31
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
Identificación del fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo en los estadios E12, E14, E16, E18 y P2 mediante ensayos de hibridación <i>insitu</i> .....	33
Expresión control de los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos .....	33
Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en E12 .....	36
Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en E14 .....	36
Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en E16 .....	38
Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en E18 .....	39
Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en P2 .....	41
Identificación del fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo en los estadios E12, E14, E16, E18 y P2 mediante ensayos de inmunohistoquímica .....	42

Immunoreactividad en los núcleos del istmo para VGLUT2 .....	43
Immunoreactividad en el TeO para VGLUT2 .....	43
Immunoreactividad en los núcleos del Istmo para ChAT .....	45
Immunoreactividad en el TeO para ChAT .....	45
Estudio del desarrollo de los terminales axónicos del núcleo Ipc en el tectum óptico mediante el depósito de cristales de biocitina <i>in vitro</i> .....	48
Día embrionario 13 .....	48
Día embrionario 15.....	49
Día embrionario 18.....	49
Día Postnatal 2 .....	50
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
Identidad neuroquímica de los núcleos del complejo del istmo durante el desarrollo.....	53
Down-regulación del locus colinérgico .....	57
Co-liberación .....	60
Morfología de los terminales axónicos de Ipc en diferentes estadios del desarrollo.....	61
Morfología, organización topográfica y actividad neuronal .....	66
Morfología axónica .....	67
Organización topográfica .....	70
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>76</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Partidores utilizados y transcritos amplificados .....	19
TABLA 2	Programa PCR .....	22
TABLA 3	Enzimas utilizadas en el clonamiento de los genes y síntesis de las sondas.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Núcleos del complejo del Istmo.....	3
Figura 2	Esquema del circuito istmo-tectal en aves.....	10
Figura 3	Esquema de una sinapsis colinérgica clásica .....	14
Figura 4	Amplificación de cDNA.....	22
Figura 5	Esquema del plásmido utilizado en el clonamiento.....	24
Figura 6	Expresión control de las sondas utilizadas.....	35
Figura 7	Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante E12.....	37
Figura 8	Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante E14.....	38
Figura 9	Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante E16.....	39
Figura 10	Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante E18.....	40
Figura 11	Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante P2.....	42
Figura 12	Patrón de expresión de las proteínas de VGLUT2 y ChAT en los núcleos del complejo del istmo en cinco estadios del desarrollo.....	44
Figura 13	Patrón de expresión de las proteínas VGLUT2 y ChAT en el TeO en cinco estadios del desarrollo.....	47

Figura 14	Secuencia temporal de la morfología de los terminales en pincel.....	50
Figura 15	Representación esquemática de la organización del locus del gen colinérgico en rata.....	59
Figura 16	Esquema aproximativo del desarrollo de los terminales de Ipc.....	65
Figura 17	Resumen de eventos durante el desarrollo del sistema visual en <i>Gallus gallus</i> .....	72

## ABREVIATURAS NÚCLEOS CEREBRALES

A	Arcopalio
AVT	Área Ventral Tegmental
E	Entopalio
FR	Fibras retinianas
GP	Globus Pallidus
H	Hiperpalio
Imc	Nucleus Isthmi, pars magnocellularis
Ipc	Nucleus Isthmi, pars parvocellularis
LoC	Locus Coeruleus
M	Mesopalio
N	Nidopalio
NL	Nidopalio Lateral
nIX	Núcleo motor glosofaríngeo
nX	Núcleo motor vago
nXI	Núcleo motor accesorio
Ov	Núcleo Ovoidalis
PT	Núcleo Pretectalis
R	Núcleos de Raphe
Rt	Núcleo Rotundo
SGPv	Stratum Griseum Periventriculare
Slu	Nucleus Isthmi pars Semilunaris
SO	Satriatum Opticum
SpM	Núcleo Spiriformis Medialis
TeO	Tectum Opticum
TGC	Célula Ganglionar Tectal
Tii	Tracto infraístmico

## RESUMEN

En vertebrados existen dos vías visuales principales, la vía tálamo-fugal y la vía tecto-fugal. En esta última, la más desarrollada en aves, el tectum óptico (TeO, colículo superior en mamíferos) es el blanco primario de las proyecciones retinianas. El TeO se conecta topográfica y recíprocamente con los núcleos del complejo del istmo conocidos como istmo parvocelular (Ipc), istmo magnocelular (Imc), e istmo semilunaris (SLu). En particular, el núcleo Ipc devuelve una retroalimentación visual sobre el tectum que determina la transmisión de las señales visuales retinianas hacia centros superiores.

En aves y otros vertebrados, Ipc se considera un núcleo colinérgico debido a la expresión de la enzima colin-acetil-transferasa (ChAT) en sus neuronas y terminales axónicos. Sin embargo, resultados recientes muestran en Ipc de individuos adultos la ausencia del RNA mensajero del transportador vesicular de acetilcolina (*VACHT*) y la presencia del RNA mensajero de transportador vesicular de glutamato 2 (*VGLUT2*), lo que sugiere que este núcleo liberaría glutamato en lugar de acetilcolina. En este trabajo, con el fin de determinar si durante el desarrollo existe un cambio en la expresión de estos marcadores en Ipc, y por tanto, una modificación en su fenotipo neuroquímico, se revisó mediante ensayos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* el desarrollo del patrón de expresión de los marcadores colinérgicos *ChAT*, *CHAT* y *VACHT*, y los glutamatérgicos *VGLUT2* y *VGLUT3* (transportador vesicular de glutamato 3). Además, dado que la actividad neuronal y la liberación de neurotransmisores han sido

relacionados con el desarrollo de arborizaciones axonales y proyecciones topográficas, es que en este trabajo se evaluó en diferentes estadios embrionarios el desarrollo de las arborizaciones axónicas de Ipc mediante el uso de un trazador neuronal.

Los resultados mostraron que entre E12 y E16, el núcleo Ipc expresó los RNA mensajeros colinérgicos *ChAT*, *CHT* y *VAcHt* y el glutamatérgico *VGLUT2*, apoyando así, un fenotipo tanto colinérgico como glutamatérgico para Ipc en esta ventana embrionaria. A partir de E18 las células de Ipc continuaron expresando *ChAT*, *CHT* y *VGLUT2*, sin embargo, la expresión de *VAcHt* disminuyó hasta niveles casi indetectables, sugiriendo que desde este estadio y hasta individuos adultos, este núcleo presentaría una neuroquímica principalmente glutamatérgica. Por otro lado, tanto en los estadios embrionarios como postnatales, el núcleo SLu exhibió un patrón de expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos concordante con su reconocido fenotipo colinérgico, mientras que la ausencia de expresión de estos marcadores en el núcleo Imc, concuerda con el fenotipo GABAérgico descrito para éste en adultos. Con respecto a la morfología de los axones de Ipc, en E13 se identificaron axones carentes de ramificaciones, extendiéndose hasta capas intermedias del TeO. En E15 los axones presentaron una clara expansión del campo de ramificaciones terminales. Finalmente, en E18, se observaron terminales en forma de pincel con su característico patrón de arborización observado en individuos postnatales.

Estos resultados apoyan la idea de que en un primer periodo embrionario las células del núcleo Ipc podrían liberar vesicularmente tanto acetilcolina como glutamato. Posteriormente a ese período inicial y hasta la adultez, la liberación se restringiría

principalmente a glutamato. Por otro lado, los terminales axónicos de Ipc presentarían un desarrollo temprano, en donde la maduración de sus terminales estaría completa un par de días previo a la eclosión. Interesantemente, el hecho de que la posible co-liberación de neurotransmisores y la maduración de terminales de Ipc ocurran en el mismo periodo embrionario, sugeriría una correlación funcional entre ambos eventos.

## ABSTRACT

In vertebrates there are two main visual pathways, the thalamo-fugal and tecto-fugal pathways. In the latter, the most developed in birds, the optic tectum (TeO, superior colliculus in mammals) is the primary target of retinal projections. The TeO is connected topographically and reciprocally with the nuclei of the isthmus complex, constituted by the nuclei isthmi pars parvocellularis (Ipc), isthmi pars magnocellularis (Imc), and isthmi pars semilunaris (SLu). In particular, the Ipc nucleus sends a visual feedback to the TeO which controls the transmission of retinal visual signals to higher visual centers.

In birds and other vertebrates, Ipc is considered a cholinergic nucleus because its neurons and axonal endings express the choline acetyl transferase enzyme (ChAT). However, recent results show that Ipc neurons of adult individuals express the messenger RNA of the vesicular glutamate transporter 2 (*VGLUT2*) and not the messenger RNA of the vesicular acetylcholine transporter (*VACHT*), suggesting that the Ipc cells would be able to release glutamate instead of acetylcholine. In this study, in order to explore whether there is a change in the expression pattern of these markers in Ipc during development, and thus a neurochemical phenotype modification, we analyzed by immunohistochemical and *in situ* hybridization assays, the expression of the messenger RNA of the cholinergic markers *Chat*, *VACHT* and *CHT*, and of the glutamatergic markers *VGLUT2* and *VGLUT3* (vesicular glutamate transporter 3) at



different embryonic stages. Furthermore, since in general the neural activity and the release of neurotransmitters have been implicated in the development of both the axonal arborization and the topographic projections of neurons, we also evaluated the development of Ipc axonal arborization using neuronal tracers.

The results showed that between E12 and E16, the Ipc nucleus showed a strong expression of the mRNAs of all cholinergic markers, *ChAT*, *CHT* and *VAcHT*, and also of the *VGLUT2* mRNA, supporting a dual cholinergic and glutamatergic phenotype for Ipc during this embryonic period. From E18 onwards, the Ipc cells continued expressing *ChAT*, *CHT* and *VGLUT2* mRNAs, but *VAcHT* mRNAs expression decreased to almost undetectable levels, suggesting that from this stage this nucleus mainly presents a glutamatergic phenotype. On the other hand, in both embryonic and postnatal stages, the Slu nucleus exhibited a cholinergic and glutamatergic expression pattern consistent with its recognized cholinergic phenotype. At the same time the absence of expression of these markers in the Imc nucleus is consistent with the GABAergic phenotype described for this nucleus in adults. Concerning the morphology of Ipc axons, at E13, we identified axons lacking of terminal branches and extending to intermediate tectal layers. At E15 their axons showed a clear expansion of the field of terminal branches. Finally, At E18 we identified Ipc axon terminals with their typical pattern of arborization observed at adult stages.

These results support the idea that at early embryonic stages, the Ipc cells would be able to release both acetylcholine and glutamate by a vesicular mechanism. Following this initial period and until the adulthood, the neurotransmitter release would be mainly restricted to glutamate. Moreover, the Ipc axonal endings present an early development, such that the maturation of their axonal endings would be completed a few days before hatching. Interestingly, the coincidence of the embryonic stages at which the presumptive co-release of neurotransmitters and the maturation of Ipc axonal endings take place, would suggest a functional relationship between these two events.

## INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo se pensó que el fenotipo neuroquímico de una neurona se limitaba a la liberación de un único neurotransmisor (no-peptidérgico) el cual se mantenía invariable a lo largo de la vida neuronal (Trudeau y Gutierrez, 2007). Sin embargo, actualmente se sabe que ciertas neuronas liberan más de un tipo de neurotransmisor en etapa adulta y que el neurotransmisor liberado puede cambiar durante el desarrollo (Seal y Edwards, 2006; Trudeau y Gutierrez, 2007; Weng, 2009). Dado que los neurotransmisores pueden además participar en el proceso de guía axonal, también se ha sugerido que cambios neuroquímicos durante el desarrollo podrían afectar el establecimiento final de las proyecciones, y por lo tanto la estructura final de los circuitos. Aunque diversas estructuras del sistema nervioso se han usado como modelo en el estudio de algunos aspectos de estos fenómenos, hasta el momento se carece de modelos que permitan estudiarlos de manera conjunta.

En este contexto, el circuito istmotectal de aves podría representar un buen modelo para el estudio integral de esta problemática, dado que en este sistema parecen conjugarse tanto la doble expresión de marcadores neuroquímicos como un cambio en dicha expresión durante el desarrollo, quizá asociado a la maduración de la fina conectividad topográfica que lo caracteriza. El circuito istmotectal consta de una conexión topográfica y recíproca entre el tectum óptico (TeO) y los núcleos del complejo del istmo (NI), conocidos como istmo magnocelular (Imc), istmo parvocelular (Ipc) e istmo semilunaris (SLu) (Figura 1). Hasta ahora existe un consenso generalizado

de que el núcleo Ipc es colinérgico, dado que sus células expresan la enzima responsable de la síntesis de acetilcolina (ChAT) (Asadollahi y col., 2010; Maczko y col., 2006; Wang y col., 2006). Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que las células de Ipc no expresan el RNA mensajero para el transportador encargado de mediar el llenado vesicular con acetilcolina (*VACht*) pero sí el transportador que facilita el almacenamiento de glutamato en vesículas sinápticas (*VGLUT2*), sugiriendo por un lado un fenotipo glutamatérgico para este núcleo y por otro, un desarrollo aparentemente incompleto del fenotipo colinérgico (Gonzalez-Cabrera et al., manuscrito en prep.).

Estos resultados hacen interesante la descripción de la historia neuroquímica embrionaria de Ipc que precede al establecimiento de los marcadores neuroquímicos observados en este núcleo en estadios postnatales, especialmente *ChAT*, *VACht* y *VGLUT2*. Asimismo, considerando la fina organización que el circuito istmo-tectal presenta en estadios postnatales, y dado las implicancias que la maduración de la transmisión sináptica tienen en el establecimiento de mapas topográficos, resulta natural evaluar el desarrollo del patrón neuroquímico de los núcleos del istmo en relación a la maduración morfológica de los axones de Ipc.



**Figura 1. Núcleos del complejo del istmo.** Corte coronal de cerebro de pollo adulto teñido con Nissl, a nivel de mesencéfalo, mostrando los tres núcleos del complejo del istmo. Ipc: Isthmo parvocelular; Imc: Isthmo magnocelular; SLu: Isthmo semilunaris. OM: Óculo-motor. Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ .

### **Neurotransmisores y su influencia en el desarrollo del sistema nervioso**

En la visión clásica el fenotipo neuroquímico neuronal se consideraba una característica inmutable, especificada tempranamente en el desarrollo y determinada por programas transcripcionales específicos (Revisado en Wolfram y Baines, 2013). Esta visión restrictiva concordaba con la concepción de que el fenotipo neuronal estaba

restringido a solo un neurotransmisor (principalmente acetilcolina, glutamato, GABA, serotonina, noradrenalina o dopamina) y con la idea de que neuronas dentro de circuitos maduros debían mantener una transmisión consistente en el tiempo, la que estaría garantizada por una expresión estable del neurotransmisor a lo largo de la vida de la neurona (Revisado en Demarque y Spitzer 2011; Trudeau y Gutierrez, 2007; Wolfram y Baines, 2013).

No obstante, estudios recientes muestran que algunas neuronas tienen la capacidad de liberar mas de un neurotransmisor durante la adultez y que además durante el desarrollo el neurotransmisor liberado puede variar, pudiendo incluso, ser re-especificado (Revisado en Demarque y Spitzer 2011 ; Seal y Edwards, 2006; Spitzer, 2012; Trudeau y Gutierrez, 2007; Weng, 2009 ; Wolfram y Baines, 2013). Ejemplos de lo primero, son las motoneuronas espinales de mamíferos, que co-liberan acetilcolina y glutamato en estadios postnatales (P0-P4) (Nishimaru y col., 2005) y las amacrinas (starburst) de la retina, que co-liberan GABA y acetilcolina (O'Malley y col., 1992). Ejemplo de lo segundo, son las células granulares del giro dentado que contienen y pueden liberar tanto glutamato como GABA en estadios embrionarios para luego, a partir de la tercera semana de periodo postnatal, volverse solo glutamatérgicas (Demarque y Spitzer, 2011; Gutierrez y col., 2003; Safiulina y col., 2006; Safiulina y col., 2010).

Por otro lado, y en relación a la determinación transcripcional del fenotipo neuroquímico, se ha llegado a la comprensión de que el proceso de especificación del neurotransmisor depende también de la actividad eléctrica temprana, en conjunto con la expresión de factores de transcripción y factores tróficos (Spitzer, 2006). Así, en algunos

casos el establecimiento del fenotipo neuroquímico final parece estar asociado al contacto de las neuronas con sus blancos post-sinápticos, tal como ha sido descrito en neuronas colinérgicas post-ganglionares del sistema simpático (Apostolova y Dechant, 2009). En otros, se ha mostrado que la estimulación *in vivo* e *in vitro* de neuronas del ganglio petrosal en ratas induce la expresión de la enzima mediadora de la síntesis de dopamina (Brosenitsch y Katz, 2001; Brosenitsch y Katz, 2002). Además, se ha visto que para una normal expresión del neurotransmisor son necesarios patrones específicos de actividad, de modo que una modificación de esta actividad eléctrica resulta en un cambio en la proporción de neuronas expresando NT excitatorios e inhibitorios (Borodinsky y col., 2004; Root y col., 2008; Spitzer NC y col., 2005; Spitzer, 2012).

Con respecto a la influencia de los neurotransmisores en el desarrollo, se ha mostrado que éstos poseen un rol fundamental en la maduración y establecimiento final de los circuitos neuronales. En mamíferos se ha descrito que la señalización por GABA, acetilcolina y glutamato pueden modular la migración y proliferación de progenitores neurales, así como participar en los procesos de crecimiento y estabilización de arboles dendríticos en neuronas inmaduras (Nguyen y col., 2001; Pathania y col., 2010). También, se ha sugerido un rol crítico de estos tres neurotransmisores en la formación y fortalecimiento de sinapsis neuronales (Mattson M P, 1998; Nguyen y col., 2001; Wang y Kriegstein, 2008). Específicamente, la señalización por acetilcolina y glutamato ha sido involucrada en el refinamiento final del mapa retinotectal, que es un circuito topográficamente organizado. Esto, ya que su precisa organización se ve alterada tanto en mutantes carentes de receptores nicotínicos de acetilcolina, como en individuos sometidos al bloqueo de sus receptores de glutamato durante el desarrollo (Cline y

Constantine-Paton, 1989; Scheetz y Constantine – Paton, 1994; McLaughlin y col., 2003).

Adicionalmente, se ha sugerido que los eventos de co-liberación de neurotransmisores durante el desarrollo también podrían influenciar el desarrollo y establecimiento de los circuitos neurales (Borodinsky y col., 2004; Demarque y Spitzer, 2011; Root y col., 2008). En efecto, se ha visto que la disrupción de la co-transmisión de glutamato en sinapsis GABAérgicas y glicinérgicas en la vía auditiva altera la reorganización y especificación topográfica del circuito tonotópico (Noh y col., 2010).

De esta manera, la posibilidad de estudiar el desarrollo del patrón de expresión de marcadores neuroquímicos en relación a la maduración de una red neuronal resulta de mucho interés. En este contexto el circuito istmo-tectal se convierte en un modelo muy atractivo ya que, como mencionamos más arriba, en uno de los núcleos de esta red, el n. istmo parvocelular (Ipc), podría ocurrir la suma de tres fenómenos relevantes: la co-expresión de marcadores colinérgicos/glutamatérgicos en estadios adultos, la posible variación de estos marcadores durante el desarrollo, y el acoplamiento de este proceso al desarrollo de una proyección axonal finamente topográfica.

### **Anatomía del circuito istmo-tectal**

Dentro del linaje de los vertebrados el circuito istmo-tectal corresponde a un ordenamiento neuronal altamente conservado, que comprende al tectum óptico (TeO, colículo superior en mamíferos) y a un grupo de núcleos istmales, ubicados en el



tegmento mesencefálico posterior. En mamíferos y aves, el tectum óptico es la estructura principal de la vía retino-tecto fugal, que transmite aferencias desde la retina hacia el telencéfalo. Desde el punto de vista funcional, el tectum es una estructura senso-motora que participa en la generación de movimientos de orientación oculares y de cabeza (Cui y Malpelli, 2003; Du Lac y Knudsen, 1990; ; Freedman y col., 1996; Masino y Knudsen 1993; Port y Wurtz, 2009; Stryker y Schiller, 1975; Wurtz y Albano, 1980), en la generación de conductas de escape (Dean y col.,1988; Dean y col., 1989; Keay y col., 1988; Sahibzada y col., 1986), en mecanismos de discriminación de estímulos, y en procesos de atención espacial (Asadollahi y col., 2010; Carello y Krauzlis, 2004; Goldberg & Wurtz, 1972; Knudsen 2007; Knudsen 2011; Lovejoy y Krauzlis, 2010; McPeck y Keller, 2004; Shreesh y col., 2011; Müller y col., 2005). Como veremos, es respecto de esto último que el circuito istmotectal cobra especial relevancia.

En aves, el tectum posee una estructura laminada compuesta de 15 capas celulares y plexiformes bien definidas. Las capas mas superficiales reciben la aferencia finamente topográfica de las fibras de la retina contralateral (**Figura 2**). Desde las capas intermedias y profundas surgen eferencias visuales tanto ascendentes como descendentes (revisado en Wylie et al., 2009). En particular, las células ubicadas en la capa 13 del TeO proyectan de manera no topográfica al núcleo Rotundus thalami (Rt), y se caracterizan por presentar arboles dendríticos amplios y difusos que en su extremo distal poseen terminaciones filamentosas que conforman una especie de cepillo de terminales o espinas dendríticas (bottle brushes) (Karten y col.,1997; Luksch y col., 1998; Luksch y col., 2001).

Los núcleos del istmo están íntimamente conectados al tectum óptico. La proyección de TeO a los núcleos del complejo del istmo conserva la retinotopía, siendo la conexión con los núcleo isthmi pars parvocellularis (Ipc), isthmi pars semilunaris (SLu) e isthmi pars magnocellularis (Imc) ipsilateral y topográfica. Estas eferencias se originan de células bipolares de orientación radial ubicadas en la capa 10 del TeO, que se caracterizan por poseer un axón conocido como bastón de pastor (Shepherd's crook), ya que este emerge de una dendrita apical que realiza un giro en 180° en dirección a las capas mas profundas del TeO. Sus dendritas arborizan en varias capas tectales, incluyendo las retino-recipientes (**Figura 2**) (Wang y col., 2004; Wang y col., 2006).

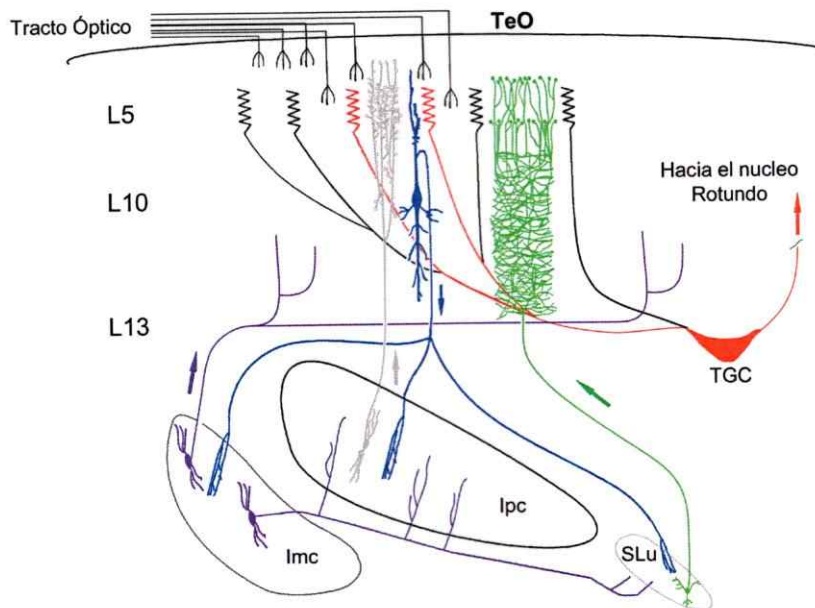
Cada locus de SLu e Ipc extiende sus axones a aquellos locus del TeO de los cuales recibe el input correspondiente (organización topográfica y homotópica) (Brecha, 1978; Güntürkün y Remy, 1990; Hellmann y Güntürkün, 2001; Hunt y Künzle, 1976; Hunt y col., 1977; ). Los terminales axónicos de SLu e Ipc muestran una disposición radial y poseen grados de ramificación diferencial en las capas del TeO (**Figura 2**). Específicamente, los terminales axonales del núcleo Ipc se ramifican extensamente desde la capa 2 a la 10, formando una columna de diámetro de 35 a 50  $\mu\text{m}$ , dando origen a su característica morfología de pincel (Wang y col., 2004; Wang y col., 2006). De esta manera los axones de Ipc ( y de SLu) transmiten una retroalimentación visual hacia la misma columna tectal desde donde se origina la aferencia retiniana (Marín y col., 2005).

Las neuronas de Imc son GABAérgicas, poseen unos terminales amplios y ramificados que proyectan difusamente sobre las capas profundas de TeO, y sobre Ipc, exceptuando el locus ( y la representación de ese locus en Ipc) del cual reciben el input tectal (organización no topográfica y heterotópica) (**Figura 2**) (Wang y col., 2004). Esta

conectividad produce interacciones competitivas entre regiones activas de Ipc que focalizan la retroalimentación de Ipc sobre aquellos locus de TeO que reciben un input visual más intenso, y por lo tanto originados por estímulos más sobresalientes.

Un aspecto interesante del patrón de arborización de Ipc, es que su mayor grado de ramificación axonal ocurre en aquellas láminas (3, 5 y 9) donde también convergen los arboles dendríticos de las células ganglionares tectales, las cuales transmiten la proyección visual hacia el núcleo Rt (**Figura 2**). Y en efecto, se ha mostrado la existencia de sinapsis directas entre Ipc y las dendritas de estas neuronas, sugiriendo que el flujo de la aferencia visual a través de la vía tectofugal podría ser mediado directamente por estas sinapsis (Gonzalez-Cabrera y col., manuscrito en prep.). Esto se correlaciona con el hecho de que el bloqueo neuroquímico de la retroalimentación de Ipc sobre un locus tectal impide la transmisión visual desde ese locus hacia Rt (Marín y col., 2007; Marín y col., 2012). La unión de esta función de Ipc con el efecto focalizador mediado por Imc hacen del circuito istmotectal un mecanismo seleccionador de estímulos similar a un mecanismo atencional.

Esta importante función, que depende tanto de la poco común morfología de los terminales de Ipc, como de su precisa disposición respecto del mapa retinotópico tectal, genera el interés por describir como estos dos niveles de organización anatómica se establecen durante el desarrollo. Como primer paso, esta tesis abordará el primer aspecto de esta problemática.



**Figura 2. Esquema del circuito istmo-tectal en aves.** Se muestran los tres núcleos y la conectividad recíproca homotópica entre Ipc, SLu y la recíproca heterotópica entre Imc y el TeO. Se esquematiza la morfología característica de los terminales de Ipc, así como su patrón de ramificación en las capas del TeO.

### Ontogenia del circuito istmo-tectal

En pollo, el desarrollo del TeO ha sido bien descrito y se sabe que ocurre de acuerdo a un claro gradiente arquitectónico. Hasta el día 18 de incubación (E18) el incremento del espesor y grado de laminación del tectum muestra una orientación desde rostro/ventral hacia caudo/ dorsal (LaVail y Cowan, 1971; Scicolone y col.,1995). Se pueden describir tres grandes fases en el desarrollo del TeO, cuya íntima relación con el desarrollo de su principal aferencia nerviosa, el input retiniano, es difícil de obviar, dado que la eliminación de estas aferencias sobre el TeO ocasiona una importante

modificación de la estructura citoarquitectónica y del patrón de crecimiento del tectum (Kelly y Cowan, 1972). La primera fase, entre los días tres y seis de incubación (E3-E6) corresponde al periodo de máxima proliferación celular tectal, en E5 ya se pueden distinguir dos laminas bien definidas y en E6 las fibras retinianas ya se encuentran en la superficie del polo rostro/ventral del tectum. Durante la segunda fase, entre E6 y E12, se observa un incremento de cuatro veces en el grosor de TeO, pudiendo diferenciarse 12 capas transitorias. Esto se debe principalmente a la migración celular desde epitelio neuronal y al desarrollo y crecimiento de los procesos de neuronas y glías. En particular, alrededor de E9 comienza la invasión de las capas superiores por parte de las fibras del tracto óptico y ya cercano a E11 se inicia una extensa ramificación de estos terminales, incluso en posiciones topográficamente inapropiadas. En E18 el TeO ha adquirido su estructura básica, siendo posible reconocer las 15 capas características en adultos y alcanzando una refinada proyección retinotectal. Finalmente, entre E18 y dos semanas post-eclosión (P14) solo se distingue un aumento en el grosor de las capas superiores debido a un incremento del componente fibroso, lo cual coincide, además, con el periodo de mielinización de los axones de las células ganglionares retinianas que inervan TeO (Heidmann y Luksch, 2001; LaVail y Cowan, 1971; Mey y Thanos, 1999; Nakamura y O'Leary, 1989; Scicolone y col.,1995).

Con respecto a los núcleos del istmo, y en particular a Ipc, excepto por su desarrollo temprano, se carece de información tanto del establecimiento de su patrón de proyecciones sobre el TeO como del desarrollo de la morfología de sus terminales en forma de pincel y menos acerca de una posible correlación entre su desarrollo y el de otras estructuras (Clarke, 1982; Puelles y -de-la-Torre, 1987; Vaage, 1973).

De esta manera, tomando en cuenta la correspondencia existente entre el preciso orden retinotópico de los axones retinianos y la disposición también retinotópica de los axones de Ipc sobre el TeO, y considerando además que el refinamiento del mapa retinotectal requiere de la actividad sináptica y liberación espontánea de neurotransmisores (Cline y Constantine-Paton, 1989; McLaughlin y col., 2003; Scheetz y Constantine – Paton, 1994; Smear y col., 2007), es que resulta interesante la posibilidad de una correlación entre el fenotipo neuroquímico de Ipc y el establecimiento de la topografía de sus propios axones, la morfología de sus terminales y/ o quizás sobre la organización de otras proyecciones.

### **Fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo**

El fenotipo neuroquímico de una neurona es determinado por la transcripción de proteínas involucradas ya sea en la síntesis de la maquinaria enzimática específica para la producción del neurotransmisor (NT), en la síntesis de los transportadores de membrana responsables de la presencia celular de los precursores químicos del NT, y en la síntesis de transportadores vesiculares involucrados en su almacenamiento en vesículas sinápticas (Wolfram y Baines, 2013)

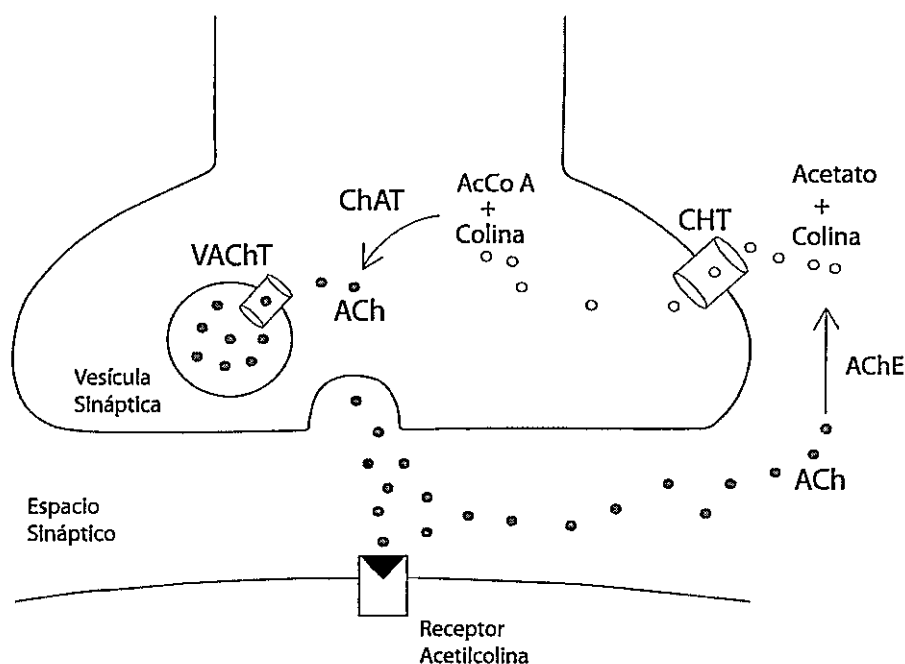
Así, una célula clásicamente colinérgica se define por la presencia de las proteínas responsables de la síntesis y transporte de acetilcolina. En este caso: La colina acetil-transferasa (ChAT) mediadora de la síntesis del NT a partir de los precursores

colina y acetil-Coenzima A, el transportador de colina (CHT) que facilita el ingreso de colina desde el espacio sináptico hacia el citoplasma, y por último, el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) necesario para el almacenamiento de la acetilcolina en las vesículas sinápticas y por ende obligatorio para su posterior liberación (**Figura 3**) (Oda, 1999). El glutamato, en cambio, es un aminoácido presente en todas las células y por tanto su acumulación en vesículas sinápticas a través de un transportador vesicular determina en gran parte la actividad glutamatérgica de una neurona en el proceso sináptico. En mamíferos se han identificado tres isoformas denominadas *VGLUT1*, *VGLUT2* y *VGLUT3* (Aihara y col., 2000; Atoji, 2011; Gras y col., 2002; Ni y col., 1994). El hecho que los mRNA de *VGLUT1* y *VGLUT2* se expresen principalmente en neuronas glutamatérgicas, y que *VGLUT3*, además de expresarse en otro tipo de neuronas, lo haga también en astrocitos, transforma a las isoformas 1 y 2 en los marcadores moleculares de neuronas glutamatérgicas más fidedignos (Atoji 2011; Bai y col., 2001; Gras y col., 2002; Herzog y col., 2004; Kawano y col., 2006; Takamori y col., 2000). En aves se han identificado solo los genes correspondientes a *VGLUT2* y *VGLUT3*, de manera que el único marcador confiable para este fenotipo neuroquímico es el mRNA de *VGLUT2* (Islam y Atoji, 2008).

En aves, Ipc y SLu han sido considerados como núcleos colinérgicos en estadios adultos debido a su inmunoreactividad para ChAT (**Figura 12 B, resultados**) (Sorenson y col., 1989). Sin embargo, ensayos de hibridación *in situ* (ISH) realizados en el pollo han puesto en duda el fenotipo colinérgico de Ipc, ya que han revelado la ausencia del m-RNA de *VACHT* en Ipc y su presencia sólo en SLu. En cambio, estudios similares en palomas han mostrado que en Ipc se observa una fuerte expresión de *VGLUT2* (Islam y



Atoji, 2008). Estos resultados además de confirmados han sido extendidos en nuestro laboratorio, donde, mediante técnicas de inmunohistoquímica (IMH), inmunogold e hibridación *in situ*, se ha mostrado la expresión de *VGLUT2* tanto en las neuronas de Ipc como en sus terminales axónicos. La evidencia indica, entonces, que las células de Ipc en adultos serían capaces de sintetizar acetilcolina mediante la enzima ChAT pero, dado la ausencia de *VAcHT*, no serían capaces de liberar este neurotransmisor por un mecanismo vesicular. En cambio, la presencia de *VGLUT2* en Ipc sugeriría fuertemente un fenotipo glutamatérgico de sus células (Gonzalez-Cabrera et al., manuscrito en prep).



**Figura 3. Esquema de una sinapsis colinérgica clásica.** Se esquematizan los procesos de síntesis, liberación de acetilcolina y recaptación de colina, dependientes de la presencia de las proteínas ChAT, VAcHT y CHT, respectivamente.



## Planteamiento del problema

El hecho de que exista un desacoplamiento entre la capacidad de sintetizar acetilcolina y su habilidad para almacenarla en vesículas sinápticas en adultos podría ser entendido como un remanente de la historia del patrón de marcadores neuroquímicos expresados en Ipc en estadios mas tempranos.

Al considerarse la estructura del locus colinérgico se puede vislumbrar la discrepancia entre la expresión de VAcHT y ChAT en Ipc (**Figura 10**). Este locus comprende la unidad transcripcional que controla tanto la síntesis de acetilcolina como el secuestro de ésta en vesículas sinápticas, mediante la codificación de ChAT y VAcHT, respectivamente. En mamíferos, se ha mostrado que los transcritos *VAcHT* y *ChAT* pueden expresarse de manera conjunta o de modo independiente (Eiden, 1998). Así, esto permitiría hipotetizar dos situaciones con respecto a la expresión de los marcadores colinérgicos en Ipc durante el desarrollo:

- 1) Al igual que en adultos, el transcrito de *ChAT* y *CHT* estaría presente pero el de *VAcHT* no estaría expresándose en estadios tempranos.

- 2) En estadios embrionarios el transcrito de *VAcHT* se expresaría en conjunto con el de *ChAT* y *CHT* para luego en etapas mas tardías disminuir su expresión, manteniendo solo la expresión remanente de *ChAT* y *CHT* en individuos postnatales.

Además, en forma paralela, en algún momento del desarrollo aparecería la expresión de *VGLUT2*. Dado que en otros sistemas existe evidencia de co-liberación de

glutamato y acetilcolina durante el desarrollo (Weng- Chang Li, 2009), es posible que este cambio en la expresión de marcadores neuroquímicos ocurra a través de un estadio intermediario en donde las células de Ipc expresarían tanto *VAcHT* como *VGLUT2*.

Por otro lado, dado que la inmunohistoquímica para ChAT permite la visualización tanto de los somas como de los axones de Ipc, resultados preliminares han sugerido que el desarrollo de estos últimos se extendería hasta estadios embrionarios más avanzados. Sumado a lo anterior, la posibilidad de que los escenarios de co-liberación y de cambio del neurotransmisor liberado estén relacionados con el desarrollo morfológico de neuronas así como en el establecimiento de mapas topográficos, es que resulta interesante estudiar de manera general el desarrollo de los axones de Ipc y evaluar la posibilidad de un cambio en la expresión de marcadores neuroquímicos durante el desarrollo de este núcleo.

## **Hipótesis**

- 1) Existe un cambio en la expresión del transportador vesicular de acetilcolina (*VACHT*) y el transportador vesicular de glutamato 2 (*VGLUT2*) en el núcleo Ipc del complejo del istmo, tal que las neuronas del este núcleo pasan de expresar el marcador vesicular colinérgico en estadios embrionarios a expresar el marcador vesicular glutamatérgico en el período post-eclosión.
- 2) La maduración morfológica de los axones "en pincel" (paintbrushes) del núcleo Ipc se extiende hasta estadios tardíos del desarrollo.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Estudiar el desarrollo del perfil neuroquímico y morfológico en un circuito de retroalimentación durante el desarrollo del mesencéfalo del pollo.

### ***Objetivos específicos***

- 1) Estudiar mediante técnicas de hibridación *in situ* la expresión de mRNAs de *ChAT*, *CHT*, *VACHT*, *VGLUT2* y *VGLUT3* en cinco estadios de desarrollo pre y post-eclosión.
- 2) Estudiar mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de las proteínas ChAT y VGLUT2 en cinco estadios de desarrollo pre y post-eclosión.
- 3) Estudiar el desarrollo de los terminales axónicos del núcleo Ipc en el tectum óptico mediante el depósito de cristales de biocitina en rebanadas de mesencéfalo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Obtención de pollos de estadíos E12, E14, E16, E21 y P2.**

Los embriones se desarrollaron en incubadoras facilitadas por el laboratorio de Ontogenia y Filogenia. La incubación fue a una temperatura de 38°C y una humedad ambiente entre 60% y 80%.

### **Determinación secuencia y generación partidores.**

Las sondas de RNA fueron generadas a partir de secuencias de RNA mensajeros publicadas en Ensemble Genome Browser y National Center for Biotechnology Information (NCBI). Por cada gen, a excepción de VGLUT2 (clon adquirido comercialmente por el laboratorio de Genoarquitectura Funcional, donde se realizaron los procedimientos de hibridación *in situ*, clon ChEST45417) se generaron de dos a tres pares de primers forward y reverse. Estos se usaron en todas las combinaciones con el fin de amplificar fragmentos de diferentes tamaños para cada gen. Se procedió a sintetizar las sondas correspondientes para cada transcrito y estas fueron probadas en ensayos de Hibridación *in situ* para determinar la sonda que ofrecía una mejor marca.

En la **Tabla 1** se muestran los partidores finales que se usaron para sintetizar las sondas usadas en los experimentos de esta tesis.

**Tabla 1. Partidores utilizados y transcritos amplificados.**

Marcador	Transcrito	Partidores	Fragmento Amplificado
ChAT	ENSGALT00000003601	Fwd: 5'-ATGCCTGATCTAGAAAAAGACA-3' Rvse: 5'-GGTAGCCTCCTCCATGTAGC-3'	916 pb (nucleótidos 1 al 916)
CHT	ENSGALT000000027127	Fwd: 5'-ATCGCAGCGAAGCTATTATC-3' Rvse: 5'-TGGCACCATAGGTATTGGTTC-3'	940 pb (nucleótidos 108 al 1197)
VACHT	NM_206982.1	Fwd: 5'-CGCCTCATGATAGACCCCT-3' Rvse: 5'-ATTCTCCTCCGTGCACC-3'	703 pb (nucleótidos 4 al 706)
VGLUT3	XM_425451	Fwd: 5'-AAGGAAGAGGTGAAGAACC-3' Rvse: 5'-CCAGAAAAGAAATAGCCACACC-3'	1210 pb (nucleótidos 51 al 1261)
VGLUT2	NM_001168383.1	_____	618 pb (nucleótidos 1282 al 1900)

### Extracción RNA

A un embrión (HH 37) de pollo decapitado se le extrajo rápidamente su cerebro. A partir de una muestra de tejido de 100 mg se realizó una extracción de RNA mediante el método Fenol- Cloroformo. Luego de agregar a la muestra 0,75 ml de trizol (Trizol LS Reagent, Invitrogen), esta se homogenizó mecánicamente y se dejó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 0,2 ml de cloroformo y se agitó fuertemente para luego incubarlo a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C y se recuperó el volumen superior incoloro. A este último se le añadió 0,5 ml de isopropanol para luego agitar y dejar incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, se obtuvo un pellet al que se le agregó 1 ml de alcohol 75% para nuevamente proceder a centrifugar a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el alcohol, se dejó secar el pellet de RNA por 5

minutos y este fue resuspendido en 100µl de agua libre de RNAsas. Mediante el tratamiento con DNasa I se degradó el DNA residual (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen). Para lo anterior se realizó una mezcla de 10µl total, cuyo contenido fue: 1µl 10x Reaction Buffer [ 200 mM Tris-HCL (ph 8,4), 500 mM KCL, 20 mM MgCL<sub>2</sub>]; 1ul amplification grade DNase I; RNA; Agua SIGMA. Esta mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se le agregó 1µl de EDTA 25 mM. La mezcla Se incubó por 10 minutos a 65°C y finalmente se dejó en hielo por 1 minuto.

### **Transcripción Reversa.**

La mezcla de 1µl de 10mM DNTP Mix, 1µl Oligo (dT) anclado y 10µl RNA tratado con DNasa fue incubada por 5 minutos a 65°C y luego en hielo por 1 minuto. A lo anterior se le agregó 2µl 10x Reverse Transcription buffer [200 mM Tris-HCL pH 8,4, 500mM KCL]; 4µl 25mM MgCl<sub>2</sub>; 2µl 0,1M DTT y 1µl RNAase OUT y luego se incubo a 42°C por 2 minutos. Se añadió 1µl de Superscript II Reverse Transcriptase, se continuó la reacción a 50°C por 60 minutos y se finalizó a 70°C durante 15 minutos. Reactivos pertenecientes a SuperScript First-Strand Síntesis System for RT-PCR, Invitrogen. Como paso final para obtener el cDNA se incorporó 1µl de RNasa H (Ribonuclease H, Invitrogen) y se dejó 20 minutos a 37°C .

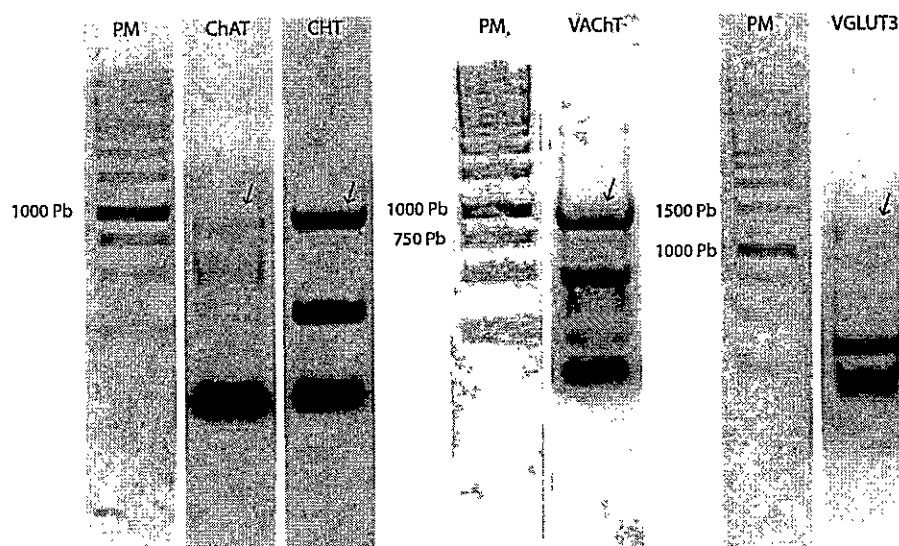
## PCR

Por cada gen se preparó una mezcla de reacción con 5x PCR buffer; 25mM MgCl<sub>2</sub>; dNTP MIX 10mM; polimerasa (Taq Polimerasa Promega); Primer forward y Primer Reverse previamente diseñados (10pmol/μl); cDNA ; agua SIGMA. La reacción fue bajo el programa descrito en la **Tabla 2**. Una vez terminada la reacción se realizó una electroforesis en gel agarosa 1%, Fast Red 0,025% para separar los fragmentos de DNA. Luego de visualizar el gel bajo luz UV se procedió a cortar las secciones correspondientes a los fragmentos del tamaño esperado para cada marcador (**Figura 4**).

Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa (1%, Fast Red 0,025%) y se analizaron bajo la luz UV para reconocer los fragmentos del tamaño esperado para cada marcador. Como se ve en la **Figura 4**, se identificó bandas de cercanas a 1000 pares de bases en el caso de ChAT y CHT, una banda entre 1000 y 1500 pares de bases para VGLUT3 y una banda cercana a 750 pares de bases (pb) correspondientes al fragmento de VACHT. Para extraer los fragmentos de DNA de doble hebra del tamaño esperado desde el gel se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit según el protocolo indicado por el fabricante.

**Tabla 2. Programa PCR.** Detalle del programa utilizado tanto para la amplificación específica de fragmentos de DNA como para el ensayo de PCR de colonia.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturalización inicial	94°C	5´	1
Denaturalización	94°C	30´	
Alineamiento	58°C	30´	38
Extensión	72°C	1´	
Extensión Final	72°C	20´	1



**Figura 4. Amplificación de cDNA.** Separación electroforética de fragmentos específicos de DNA amplificados por RT-PCR de 916Pb para ChAT, 940 Pb para CHT, 703 Pb para VAcHT y 1210 para VGLUT3. PM: pesos moleculares de referencia.



## **Ligación y Transformación**

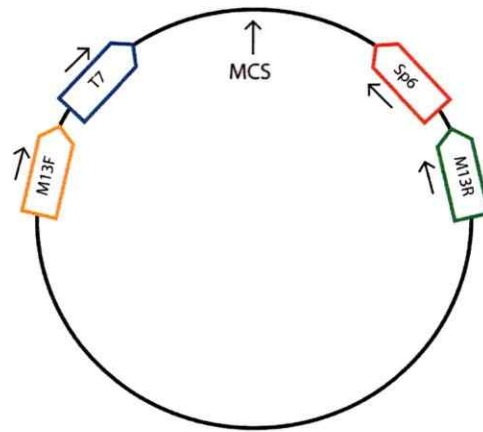
Por cada ligación se realizó una mezcla de reacción compuesta de 2,5µl 2x Rapid Ligation Buffer, T4 ligase [60mM Tris-HCL pH 7.8, 20mM MgCL2, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% Polyethylene glycol]; 0,5µl pGEM-T Easy Vector; 1,5µl Producto de PCR y 0,5µl T4 DNA ligase (pGEM-T Easy Vector Systems, Promega). Esta se dejó incubando a 4°C toda la noche.

A 25µl de bacterias DH5α competentes (Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells, Invitrogen) le fue añadido 5µl de pGEM-T Easy ligado con el fragmento correspondiente e incubadas por 30 minutos en hielo. Luego se les dio un choque térmico por 45 segundo a 42°C y se volvieron al hielo por 5 minutos. Se agregó 200µl de medio de recuperación S.O.C para luego crecerlas en agitación horizontal a 37°C por 2 horas. A continuación, estas fueron sembradas en placas LB/Ampicilina (Bactotripton 1%, Extracto de levadura 0,5%, Agar 1,5%, NaCl 1% y Ampicilina 0,1µg/ ml), previa aplicación de 20µl de X-GAL (US, Biological,Swampscott). Se incubaron a 37°C toda la noche.

## **PCR de colonia**

Mediante este procedimiento se identifican las colonias que incorporaron el fragmento de interés. Se seleccionaron 3 colonias blancas por fragmento amplificado que fueron re-plaqueadas y usadas como molde para un ensayo de PCR. El procedimiento y programa es idéntico al de PCR con la diferencia que los primers

usados fueron M13forward y M13 reverse (Tabla 2, Figura 5). Posteriormente, se corrió un gel de agarosa 1%, Fast Red 0,025%, se observó y seleccionó las colonias que poseían el fragmento de DNA del tamaño esperado para cada marcador. Se tomó una muestra de estas y se crecieron con agitación toda la noche en 7ml de medio LB/ampicilina a 37°C (Bactotriptonal%, Extracto levadura 0,5%, NaCl 1% y Ampicilina 0,1µg/ml).



M13 Forward: 5'GCCAGGGTTTTCCCAGTCAC 3'

M13 Reverse: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'

**Figura 5. Esquema del plásmido utilizado en el clonamiento.** Se muestran tanto los sitios de iniciación de transcripción para las polimerasas Sp6 y T7, como los sitios de unión a los primers de secuenciación M13 Forward y Reverse utilizados para los ensayos de PCR de colonia. Abajo se especifican las secuencias de los primers M13 en cuestión. MCS corresponde al sitio del múltiple clonamiento en donde se inserta el fragmento a clonar.

## **Extracción DNA plasmidial**

Mediante el uso del QIAprep Spin Miniprep Kit y según el protocolo del fabricante se obtuvo el plásmido desde el cultivo de la noche anterior. Una muestra del DNA purificado de cada marcador fue secuenciado.

Luego de determinar las colonias que poseían el fragmento de DNA de nuestro interés, estas se dejaron creciendo por una noche a 37°C en 50ml de medio LB/Ampicilina ((Bactotriptonal%, Extracto levadura 0,5%, NaCl 1% y Ampicilina 0,1µg/ ml). Posteriormente, y según las indicaciones adjuntas, se realizó una Midiprep (QIAfilter Plasmid Midi Kit, Quiagen) a cada cultivo de manera de obtener una alta concentración de DNA plasmidial para utilizar en la síntesis de sondas.

## **Linearización DNA plasmidial**

La mezcla de reacción para cada plásmido consistió en 2µl de enzima, el volumen correspondiente a 5µg de plásmido y un volumen variable de agua sigma y buffer de reacción. Esta mezcla fue incubada por 3-4 hrs a 37°C. La enzima de restricción utilizada para cortar cada plásmido fue seleccionada según el mapa de restricción (**Tabla 3**). Finalizada estas reacciones y con el fin de determinar si los 5µg de plásmido se cortaron completamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%; Fast Red 0,025%, conteniendo como muestras tanto el DNA circular y el DNA lineal.

En el caso de VACHT su DNA lineal se obtuvo mediante una PCR que utilizó como molde el DNA plasmidial con el fragmento de VACHT y los primers M13 forward

y Reverse. El fragmento obtenido a partir de esta PCR tendrá un tamaño aproximado de 900 pb, correspondientes a los 703 pb de VAcHT mas las 180 pb propias a la región M13 y de unión a polimerasas. La reacción de llevó a cabo bajo el mismo programa que se han realizado todos las PCR. Al final del ensayo se realizo una electroforesis en un gel de agarosa 1%; Fast Red 0,025% con todo el producto de PCR para verificar que el tamaño obtenido del fragmento sea de las 900 pb esperadas.

Una vez verificado que los DNA plasmidiales se linearizaron completamente, se procedió a su purificación mediante el uso del QIAprep Spin Miniprep Kit. En el caso de VAcHT se procedió a extraer las bandas correspondientes a 900 pb mediante el QIAquick Gel Extraction Kit (Procedimiento descrito anteriormente).

**Tabla 3. Enzimas utilizadas en el clonamiento de los genes y en la síntesis de las sondas.**

Gen	ChAT	CHT	VAcHT	VGLUT2	VGLUT3
Enzima Restricción	NCO I	SPh I	—	NOT I	SPh I
Rna Polimerasa	SP6	SP6	SP6	T3	SP6

### **Síntesis de Ribosondas antisense marcadas con digoxigenina.**

La mezcla de reacción consistió en plásmido lineal; buffer de transcripción 10x; dNTP MIX marcado con digoxigenina; RNAsa inhibidora; RNA polimerasa y agua sigma. Las reacciones se incubaron a 37°C por 2 horas en el caso de T3 y 3 horas para SP6 (**Tabla 3**). Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1%; Fast Red 0,025% para comprobar que la sonda fue sintetizada. Luego de esta verificación se incubó cada reacción con DNAsa y RNAsa inhibitoria por 20 minutos a 37°C. Las sondas se precipitaron toda la noche a - 20°C previa incorporación de LiCl 8M, etanol 100% y EDTA en la reacción.

Al día siguiente se procedió con la purificación de las sondas, centrifugando cada reacción a una velocidad máxima por 15 minutos a 4°C. Luego de eliminar el sobrenadante se añadió al pellet 300µl de etanol 70% y se procedió a realizar la misma centrifugación. Se descartó el sobrenadante, se agregó 50µl de etanol 100% y se centrifugó a velocidad máxima por 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se seco a 37°C y luego se resuspendió con 20µl de agua sigma. Se incubó por 15 minutos a 37°C para finalmente añadirle 20µl de formamida. A continuación se corrió un gel de agarosa 1%; Fast Red 0,025% para conocer el estado de la sonda post purificación.

### **Procedimientos histológicos para los ensayos de ISH e IMH**

Los embriones fueron adormecidos con una mezcla de Ketamina/Xilacina (0,15/ 0,1 ml) y perfundidos trans-cardialmente con suero salino NaCl 0,75% seguido de una

solución de PFA 4%. Los cerebros fueron extraídos del cráneo y mantenidos entre 22 y 36 horas en solución PFA 4% y luego en sacarosa 30 %. Posteriormente se embebieron en agarosa 4% PBS. Para los ensayos de hibridación *in situ* el tejido fue cortado en vibrátomo en secciones de 120 micrones, mientras que para la inmunohistoquímica, se utilizó un micrótomo de congelación a -28°C para obtener rebanadas entre 50-60 micrones. Los procedimientos mencionados anteriormente fueron aprobados por el comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad de Chile.

### **Hibridación *in situ* (ISH)**

A los cortes obtenidos se les realizó 3 lavados con PBS Tween 0.1% (PBST), luego se incubaron por 5-6 minutos en una solución PBST/proteínasa K (10µg/ml) a temperatura ambiente. Se realizaron lavados rápidos con PBST 0,1%, para luego postfijar el tejido en una solución de glutaraldehído 0,25% / PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se pre-hibridó por 2 horas a 58°C con buffer de hibridación consistente en Formamida 50% ; NaCl 5M 15% ; Buffer PE pH 6.8 10 % ( PIPES 3,025 % ; EDTA 0,5 M 0,2 % y agua filtrada) ; Heparina 0,5 mg/ml ; Tween 0,1% ; ARNt 0,5 mg/ml ; CHAPS 0,5% y agua filtrada. Posteriormente se reemplazó por un nuevo buffer de hibridación precalentado a 58°C con la sonda antisense correspondiente (0,2 – 2µg/ml) y se procedió a hibridar toda la noche a 58°C.

Al día siguiente se realizaron dos lavados de 30 minutos a 58°C con Buffer1 ( NaCl 5M 6% ; Buffer PE 10%; Tween 0,1% y agua filtrada ), dos lavados de 30 minutos a 50°C con Buffer 1.5 (NaCl 5M 1% ; Buffer PE 10% ; Tween 0,1% y agua filtrada). Se

realizó un lavado rápido con Buffer RNasa pH 7,2 (NaCl 5M 10% ; Tween 0,1 % ; PIPES 0,24% y agua filtrada) para luego incubar los cortes por una hora a 37°C con un nuevo Buffer RNasa junto con la RNasa A (100µg/ ml) y luego lavar nuevamente con el buffer RNasa. A continuación se realizó un lavado con buffer 2 (formamida 50%; NaCl 5M 5%; PE 10% ; Tween 0,1% y agua filtrada) y uno con Buffer 3 (formamida 50 % ; NaCl 5M 3% ; Buffer PE 10% ; Tween 0,1% y agua filtrada) ambos por 30 minutos y a 50°C. Se lavaron los cortes dos veces a 65°C por 20 minutos con Buffer 4 ( NaCl 5M 10% ; Buffer PE 10 % ; Tween 0,1% y agua filtrada). Posterior a un lavado con MABT pH 7,5 ( 1,16% ácido maleico ; 0,87% NaCl ; 0,76 % NaOH ; Tween 0,1 % y agua filtrada) se incubó por 2 a 3 horas a temperatura ambiente en Solución de bloqueo (MABT 70% ; Blocking Buffer Reagent 20% y Sheep serum 10 %). Finalmente se reemplazo por una nueva solución de bloqueo mas el anticuerpo anti-Digoxigenin Fab fragments (1/ 3500) y se dejó toda la noche a 4°C.

El último día consistió en 7 lavados de 30 minutos a temperatura ambiente con MABT y un lavado con NTMT por 20 minutos a temperatura ambiente (Tris HCl 1M pH9.5 10% ; NaCl 5M 2% ; MgCl<sub>2</sub> 1M 5% ; Tween 0,1% ; levamisole 0,05% y agua filtrada) Se incubó en la solución de reacción ( 0,45µl NBT / ml NTMT ; 3,5µl BCIP / ml NTMT) en oscuridad hasta obtener la marca deseada. La reacción se detuvo reemplazando la solución de revelado por una de PBST mas EDTA 1mM, para finalmente postfijar con PFA4%. Las secciones fueron montadas y deshidratadas en una secuencia de etanol para finalmente ser cubiertas.

La síntesis y uso de sondas sense para *CHAT*, *CHT* y *VACHT* no se hizo necesaria dado el bajo background obtenido para las reacciones y a la intensidad y consistencia de la

marca tanto en las réplicas como en los diferentes estadios estudiados. Con respecto a *VGLUT2*, ensayos de hibridación *in situ* para este marcador fueron realizados con anterioridad en el laboratorio de Genoarquitectura Funcional (A. Ayad, 2014), describiendo un patrón de expresión embrionario similar al presentado en esta tesis.

### **Immunohistoquímica para acetil transferasa de colina (ChAT) y transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT 2)**

Con el fin de disminuir la marca inespecífica inactivando la peroxidasa endógena, los cortes tanto embrionarios como post-eclosión, fueron incubados por 10 minutos en una solución 3% peróxido de hidrogeno, 10% metanol. Las rebanadas fueron lavadas 3 veces con PBS 1x por 10 minutos. A continuación y a modo de recuperación de epítipo, en el caso de la inmunohistoquímica para ChAT, los cortes se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de borohidrato de sodio 1% en PBS 1X. En el caso de VGLUT2 los cortes se incubaron en una solución de citrato de sodio 10mM PH 6.0 por 30 minutos en un baño termo regulado a 80° C. Luego de realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno se procedió al bloqueo de la reacción a temperatura ambiente por 2 horas. En el caso de ChAT la solución de bloqueo consistió en tritón 0,4% y suero normal de conejo 3 %, mientras que para VGLUT 2 en tritón 0,4% y suero normal de burro 3%. Para la reacción de ChAT los cortes fueron incubados en el anticuerpo primario Anti- ChAT (1:1000) (anti-ChAT hecho en cabra, Millipore, Darmstadt, Germany) en una solución 0,1% tritón y 3 %



suero normal de conejo, mientras que para la reacción de VGLUT2 se incubó en anticuerpo primario anti-VGLUT2 (1:3000) ( anti-VGLUT2 N29/29 hecho en ratón, UC Davis/ NIH Neuromab Facility, Davis, CA USA) en una solución 0,1 % tritón y 3% suero normal de burro, ambas durante toda la noche y a 4°C. Al día siguiente se lavaron los cortes 3 veces por 10 minutos y se procedió a incubar en el anticuerpo secundario a temperatura ambiente por dos horas. Para la reacción de ChAT este correspondió a anti-cabra Ig biotinilado hecho en conejo (1:200) y para VGLUT2 anti-ratón Ig biotinilado hecho en caballo (1:200), ambas en soluciones de incubación con la mismas características que para el anticuerpo primario.

Finalmente, los cortes se incubaron por 1,5 horas a temperatura ambiente en una solución de avidina/biotina 0,25% (VECTASTAIN ABC) y tritón 0,1%. Para el revelado de la reacción de la peroxidasa se usó la mezcla de níquel (Ni) 4% / diamino -benzidina (DAB) 5% y agua oxigenada 1%.

### **Depósito de cristales de biocitina en rebanadas de mesencéfalo**

Los embriones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina / xilacina (70% / 30%). Se extrajo el cerebro en menos de 2 minutos para después ser mantenido por pocos minutos en solución de corte (sacarosa 210 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 3mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 23 mM, y D+-glucosa 11 mM) fría y previamente enriquecida con oxígeno y dióxido de carbono (5% CO<sub>2</sub>; 95 % O<sub>2</sub>). A continuación, se obtuvo un bloque sólido mediante la inclusión del cerebro en una solución de agarosa

2% y buffer HEPES (sacarosa 290 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 3 mM y HEPES 5 mM). Posteriormente, mediante el uso de un vibrátomo y buffer de corte frío, se obtuvieron rebanadas horizontales de entre 500 y 700 micrones que se mantuvieron por unos minutos en solución de trabajo a temperatura ambiente (CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 2 mM, D+-glucosa 11 mM, y solución stock 5X [NaCl 120 mM, KCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 23 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ]). Para llenar los axones de Ipc se depositaron cristales de biocitina en al menos dos regiones desde anterior a posterior en Ipc, esto, mediante una aguja de tungsteno y bajo una lupa de disección. A continuación el tejido se incubó por 6 horas a temperatura ambiente en una cámara con solución de trabajo continuamente burbujeando oxígeno y dióxido de carbono (5% CO<sub>2</sub>; 95 % O<sub>2</sub>), para finalmente ser fijadas toda la noche en una solución PFA 4%. El tejido se mantuvo por algunas horas en una solución de sacarosa 30% y luego se re-seccionó mediante el uso de micrótomo de congelación. El revelado de la biocitina fue según el protocolo de IMH descrito anteriormente.

## RESULTADOS

### **Identificación del fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo en los estadios E12, E14, E16, E18 y P2 mediante ensayos de hibridación *in situ***

Luego de preparar las sondas específicas, como se detalla en la sección de Métodos, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* para *ChAT*, *CHT*, *VAcHt*, *VGLUT2* y *VGLUT3*. Estos fueron realizados en secciones horizontales de cerebro de pollo correspondientes a estadios E12, E14, E16, E18 y P2 con un n=2 para cada marcador y por cada estadio, siendo en total 50 ensayos de hibridación *in situ*. La consistencia de los resultados hizo innecesario realizar réplicas adicionales.

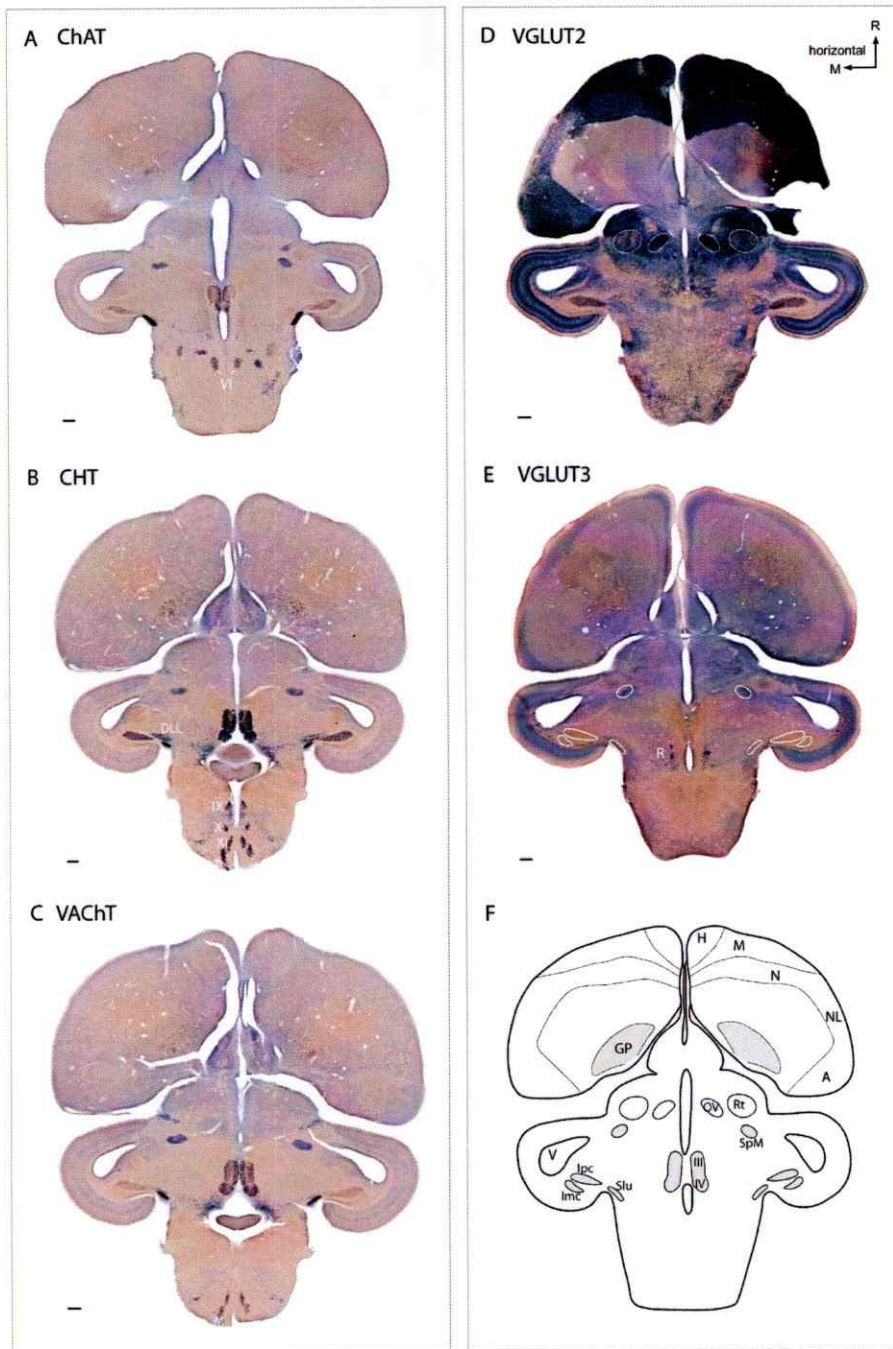
### ***Expresión control de los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos***

A modo de corroborar la especificidad de las sondas generadas, en la **Figura 6** se muestran los ensayos realizados para cada sonda en cortes horizontales de cerebro en estadio postnatal 2 (P2). Se observó que los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos se expresaron únicamente en las estructuras clásicamente descritas en la literatura como colinérgicas y glutamatérgicas. En los cortes presentados se aprecia que los mRNAs para *ChAT*, *CHT* y *VAcHt* se encuentran fuertemente expresados en algunas células del globus pallidus (GP), el núcleo espiriforme medialis (SpM), el núcleo oculomotor (III), el núcleo troclear (IV), el núcleo abducens (VI) y los núcleos motores (IX, X, XI) (**Figura 6 A, B,C**).

Con respecto a *VGLUT2*, se observó una alta expresión en las regiones paliales: hiperpalio (H), mesopalio (M), nidopalio (N) y arcopalio (A). En el tálamo y pretectum, se marcaron consistentemente los núcleos rotundus (Rt), ovoidalis (OV), el complejo talámico óptico principal (OPT), y SpM (no se ve en la figura). En el tectum óptico, las capas 4, 6, 8, 10, 11, 13, 14 y el stratum griseum periventricular (SGPv) mostraron una intensa marca (**Figura 6 D**). *VGLUT3* se observó solo en algunas células del globus pallidus (GP) y en los núcleos del raphe (R) (**Figura 6 E**).

Además, estructuras predominantemente GABAérgicas, como el núcleo subpretectal o catecolaminérgicas, como el área tegmental ventral y el Locus Coeruleus, no presentaron marca significativa con ninguna de las sondas (Revisados en otros cortes).

Con respecto a los núcleos del complejo del istmo, las células del núcleo Imc no presentaron expresión de los marcadores colinérgicos ni glutamatérgicos, lo cual resulta consistente con un carácter GABAérgico de sus neuronas, tal como ha sido descrito en adultos (Wang y col., 2004). Las células de SLu expresan intensamente los mRNA para *ChAT*, *CHT* y *VACHT* y no así los de *VGLUT2* y *VGLUT3*, encontrándose en concordancia con su identidad colinérgica sugerida por la histoquímica de ChAT (**Figura 12**). Tal como ha sido reportado para las células del núcleo Ipc, *ChAT* y *CHT* se expresan con una intensidad moderada, el primero, y más intensa el segundo, mientras que *VACHT* presenta una marca muy débil o nula (**Figura 6 A,B,C**) (Gonzalez-Cabrera y col., manuscrito en prep.). Al mismo tiempo, *VGLUT2* se expresa intensamente en el núcleo Ipc (**Figura 6 D**), mostrando una marca más conspicua que la de *CHT*. No se observó expresión de *VGLUT3* en ninguno de los núcleos del complejo del istmo (**Figura 6 E**).



**Figura 6. Expresión control de las sondas utilizadas.** Cortes horizontales de cerebro de pollo mostrando resultados de las diferentes hibridaciones *in situ* para las diferentes sondas empleadas. Se muestra que todos los núcleos colinérgicos presentes en el corte: óculo-motores (III y IV), los núcleos motores ( IX, X, XI ) y células del GP expresaron fuertemente los marcadores colinérgicos. Los núcleos glutamatérgicos talámicos, como el rotundus (Rt), ovoidalis (OV) y los núcleos telencefálicos hiperpalio, mesopallio y nidopallio exhibieron una alta expresión del marcador glutamatérgico *VGLUT2*. En el caso de *VGLUT3* solo se observa una marca intensa en el núcleo del raphe (R) y algunas células del GP. Notar que el núcleo GABAérgico Imc, no exhibe marca con ninguna de las sondas. Barra escala: 500  $\mu$ m.

### ***Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en E12***

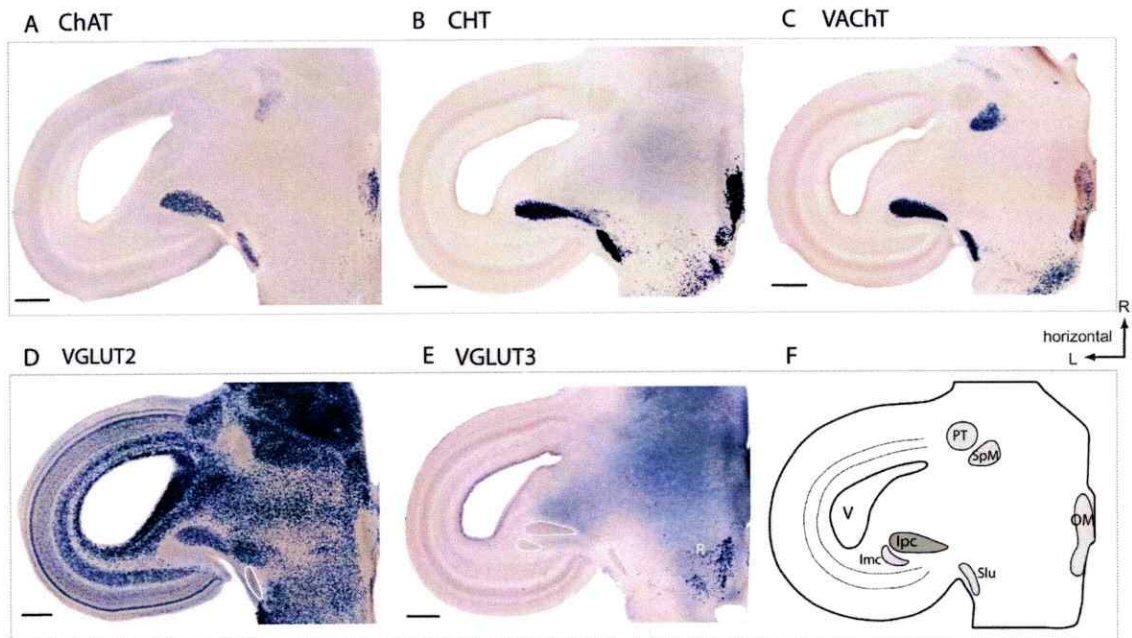
En E12, las neuronas pertenecientes a SLu mostraron una intensa marca para los tres marcadores colinérgicos, confirmando así su fenotipo colinérgico desde este estadio. Con respecto a los mRNAs de *VGLUT2* y *VGLUT3*, sus células no mostraron expresión de ellos. El núcleo Ipc, por su parte, mostró una expresión intensa de *ChAT* y *CHT* en sus células y, a diferencia de lo observado en P2 y en el adulto, una expresión igualmente intensa de *VACHT*. De esta manera, tanto Ipc como SLu presentan intensidades similares de expresión de todos los marcadores colinérgicos. Además, Ipc muestra en paralelo una intensa expresión del mRNA de *VGLUT2* y un nulo marcaje para *VGLUT3* (Figura 7).

Por otro lado, se observó una ausencia de expresión de todos los marcadores tanto colinérgicos como glutamatérgicos en las células de los núcleos Imc y PT, lo cual resulta concordante con el fenotipo GABAérgicos descrito en ambas estructuras en el estado adulto (Gamlin y col., 1996; Wang y col., 2004). Las células del núcleo SpM expresaron los m-RNAs de *ChAT*, *VACHT* y *VGLUT2* (no se observa en el corte). La marca para *CHT* no pudo ser esclarecida, mientras que la de *VGLUT3* fue nula.

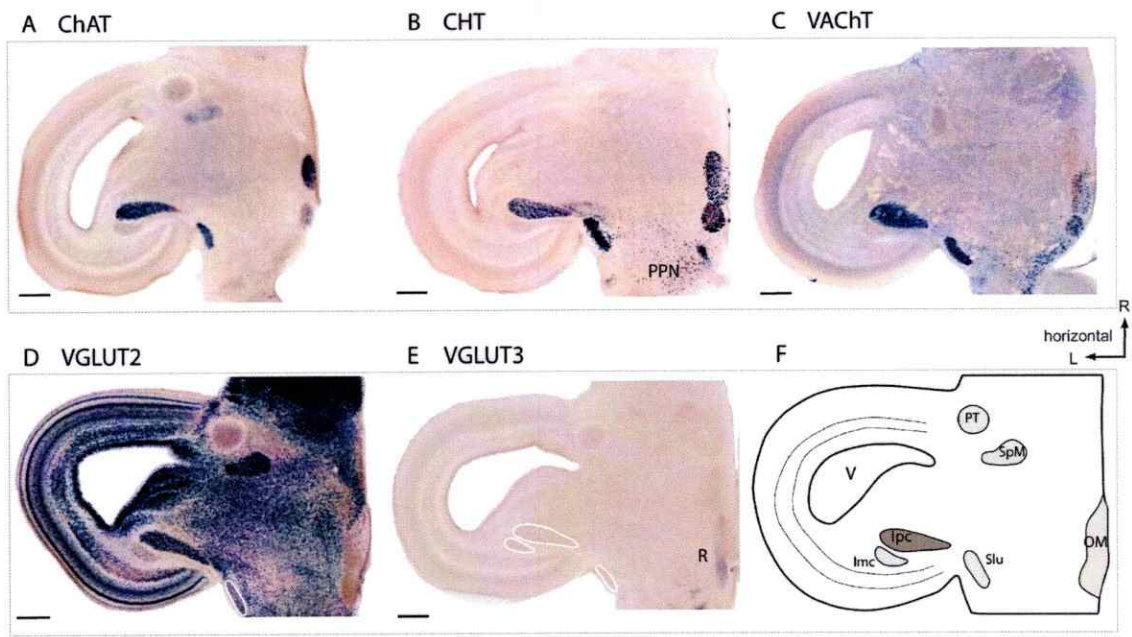
### ***Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en E14***

Al igual que el estadio anterior, SLu presentó una claro fenotipo colinérgico, dado su intensa expresión de los mRNAs de *ChAT*, *CHT* y *VACHT*, así como la nula expresión de *VGLUT2* y *VGLUT3*. Las células de Ipc mantuvieron el singular patrón de

expresión observado en E12, con una fuerte expresión de los marcadores *ChAT*, *CHT* y *VACHT* así como también el de *VGLUT2*. Por otro lado, los núcleos *Imc*, *SpM* y *PT* presentaron el mismo patrón de expresión de m-RNAs observado en E12 (**Figura 8**).



**Figura 7. Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante E12.** Cortes horizontales de mesencéfalo con el resultado de la hibridación *in situ* para las distintas sondas usadas. Las células de *Ipc* expresan intensamente los tres marcadores colinérgicos y además el m-RNA de *VGLUT2*. *SLu* solo expresa los m-RNAs colinérgicos, *ChAT*, *CHT* y *VACHT*. Ninguno de los núcleos exhibió marca para *VGLUT3*. Notar que los núcleos GABAérgicos, *Imc* y *PT* no exhiben marca con ninguna sonda. Barra escala: 500  $\mu$ m.



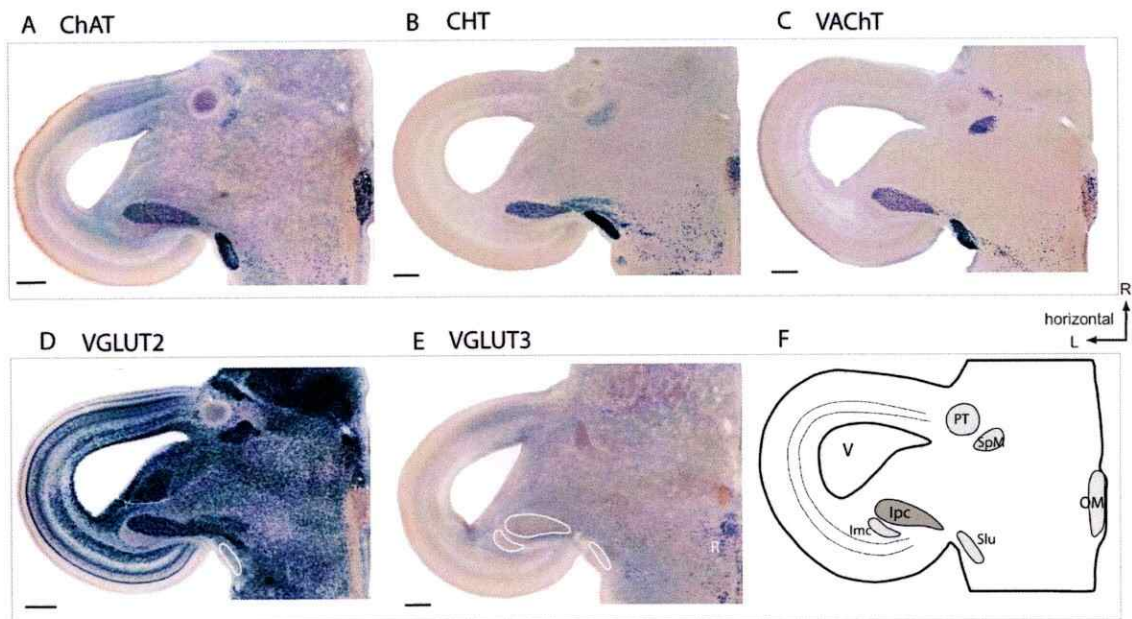
**Figura 8. Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante E14.** Al igual que en el estadio anterior las células de los núcleos Ipc y SLu expresan fuertemente y por igual los m-RNAs de *ChAT*, *CHT* y *VACHT*. En paralelo se sigue observando la expresión de *VGLUT2* en Ipc. *VGLUT3* no se expresó en ningún núcleo. Barra escala: 500  $\mu$ m.

### *Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en E16*

Las células de SLu continuaron exhibiendo una intensa marca para los tres marcadores colinérgicos y una nula marca para los glutamatérgicos. Con respecto a Ipc, aun cuando los mRNAs de *ChAT*, *CHT* y *VACHT* se expresaron con una intensidad moderada en sus neuronas, se debe hacer notar que el grado de expresión de estos mRNAs disminuyó con respecto a los dos estadios anteriores. Esto se ve claramente al percatarse que ahora SLu sobrepasa a Ipc en cuanto a la intensidad de expresión de marcadores colinérgicos. *VGLUT2* continua expresándose fuertemente en este núcleo y



no así *VGLUT3*. SpM mostró un intenso marcaje para los tres marcadores colinérgicos y para *VGLUT2*. Las células de PT y de Imc continuaron con la nula expresión de estos marcadores (**Figura 9**).

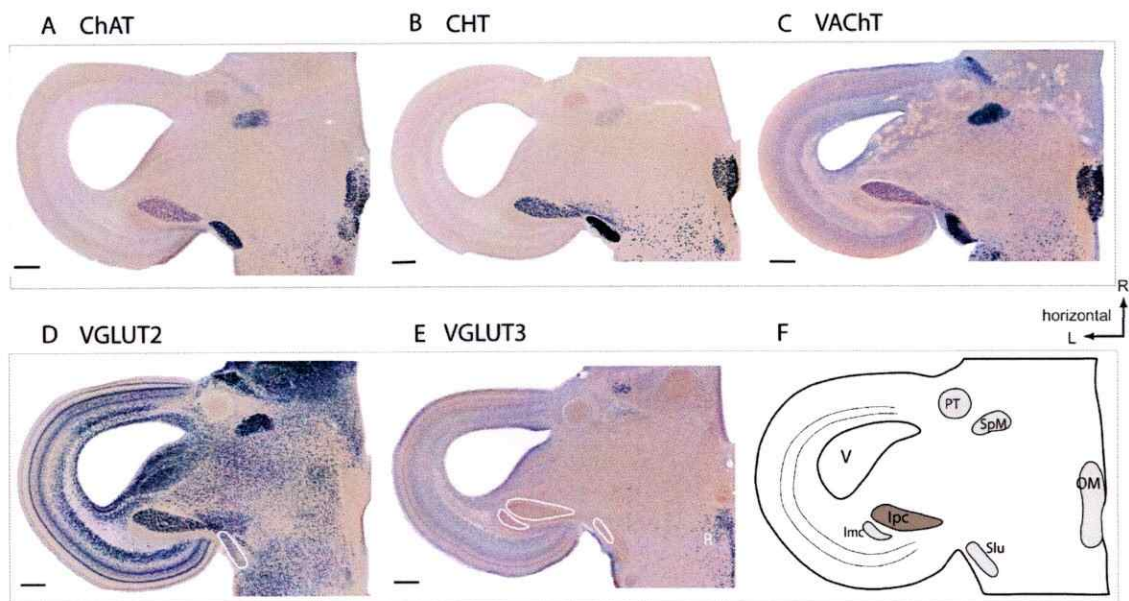


**Figura 9. Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatergicos en los núcleos del complejo del istmo durante E16.** Las células de Ipc muestran un claro marcaje para *ChAT*, *CHT* y *VAcHT*, sin embargo, esta expresión se percibe disminuida con respecto al estadio anterior. Ipc muestra una marca igual de intensa para *VGLUT2*. Las células de SLu, en cambio, persisten con una marca intensa para los tres marcadores colinérgicos. La expresión de *VGLUT3* permanece ausente. Barra escala: 500  $\mu$ m.

### ***Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatergicos en E18***

El núcleo SLu mostró una intensidad de marcaje para los marcadores colinérgicos similar a todos los estadios anteriores y su patrón de expresión para

*VGLUT2* y *VGLUT3* no mostró variaciones. Con respecto a *Ipc* se observó que la expresión de los mRNAs de *ChAT* y *CHT* muestran una intensidad similar a la encontrada en E16, sin embargo, es posible apreciar una significativa disminución en el nivel de expresión de *VACHT* en relación tanto a E16 como a la marca para *SLu* en E18. Tal como ha ocurrido durante todos los estadios analizados, *VGLUT2* mantiene su intensa expresión en este núcleo y la expresión de *VGLUT3* permanece ausente. Por otro lado, los núcleos *PT* e *Imc* no exhibieron expresión de marcador alguno y se continuó reconociendo en el núcleo *SpM* una clara marca tanto para los m-RNAs colinérgicos, *ChAT*, *CHT* y *VACHT*, como para el glutamatérgico *VGLUT2* (**Figura 10**).

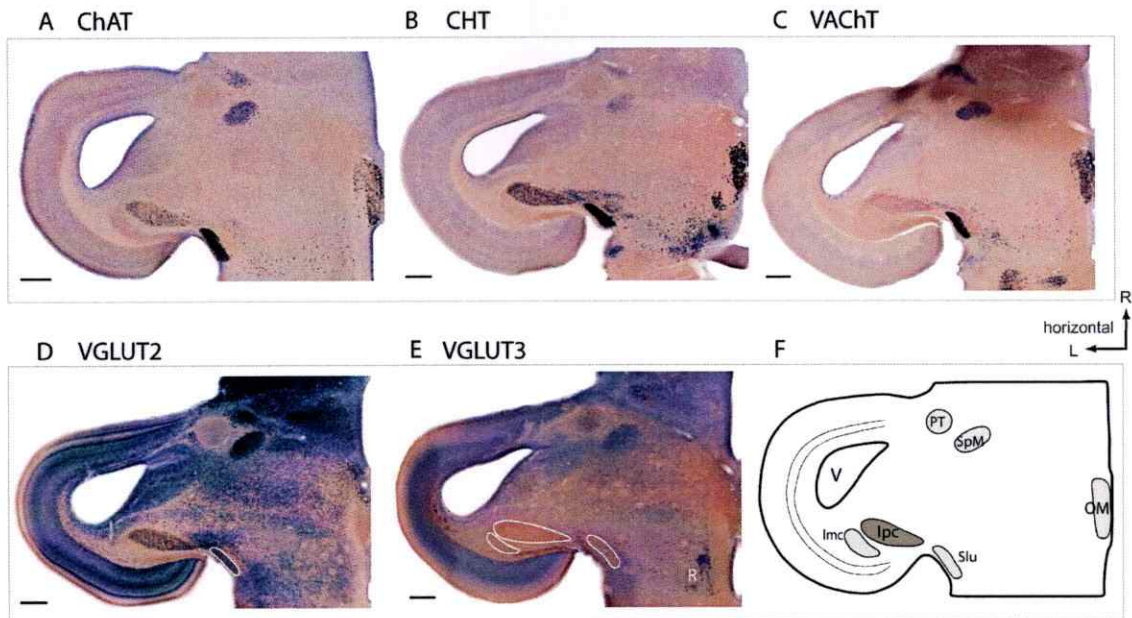


**Figura 10. Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante E18.** En *Ipc* y *SLu* el patrón de expresión de los marcadores *ChAT* y *CHT* es similar que en E16. Sin embargo, se aprecia una reducción de la expresión del m-RNA de *VACHT* en las células de *Ipc*. *VGLUT3* no muestra marcaje alguno en este nivel. Barra escala: 500  $\mu$ m.

### *Expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en P2*

Como se aprecia en la **Figura 11**, SLu mantuvo una potente expresión de los tres marcadores colinérgicos y la ausencia de expresión de ambos marcadores glutamatérgicos, dando cuenta que su fenotipo colinérgico se mantiene constante desde E12 hasta los estadios adultos. Se observó que las células de Ipc mantienen el nivel de expresión de los mRNAs de *ChAT* y *CHT* observados desde E16. Sin embargo, el nivel de expresión de *VAcHT* disminuyó hasta grados de expresión muy bajos o nulos. El marcaje para *VGLUT2* fue tan intenso como para todos los estadios analizados anteriormente. La expresión del mRNA de *VGLUT3* en las células de Ipc se mantuvo nula.

Tal como se indico en la **Figura 1**, las células del núcleo PT e Imc no mostraron marca alguna tanto para los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos, las del núcleo SpM, en cambio, expresaron tanto los m-RNAs de *ChAT*, *CHT* y *VAcHT*, como el marcador glutamatérgico *VGLUT2*.



**Figura 11. Patrón de expresión de los RNA mensajeros colinérgicos y glutamatérgicos en los núcleos del complejo del istmo durante P2.** Los m-RNA de *ChAT* y *CHT* se expresan con menor intensidad en *Ipc* que en *SLu*. Además, *Ipc* muestra un nivel casi nulo de expresión del m-RNA de *VACHT*, pero una intensa marca en las células de *SLu*. Tal como ocurrió durante todos los estadios anteriores *VGLUT2* se expresa en el núcleo *Ipc* y *VGLUT3* en ningún núcleo del complejo del istmo. Barra escala: 500  $\mu$ m.

### **Identificación del fenotipo neuroquímico de los núcleos del complejo del istmo en los estadios E12, E14, E16, E18 y P2 mediante ensayos de inmunohistoquímica.**

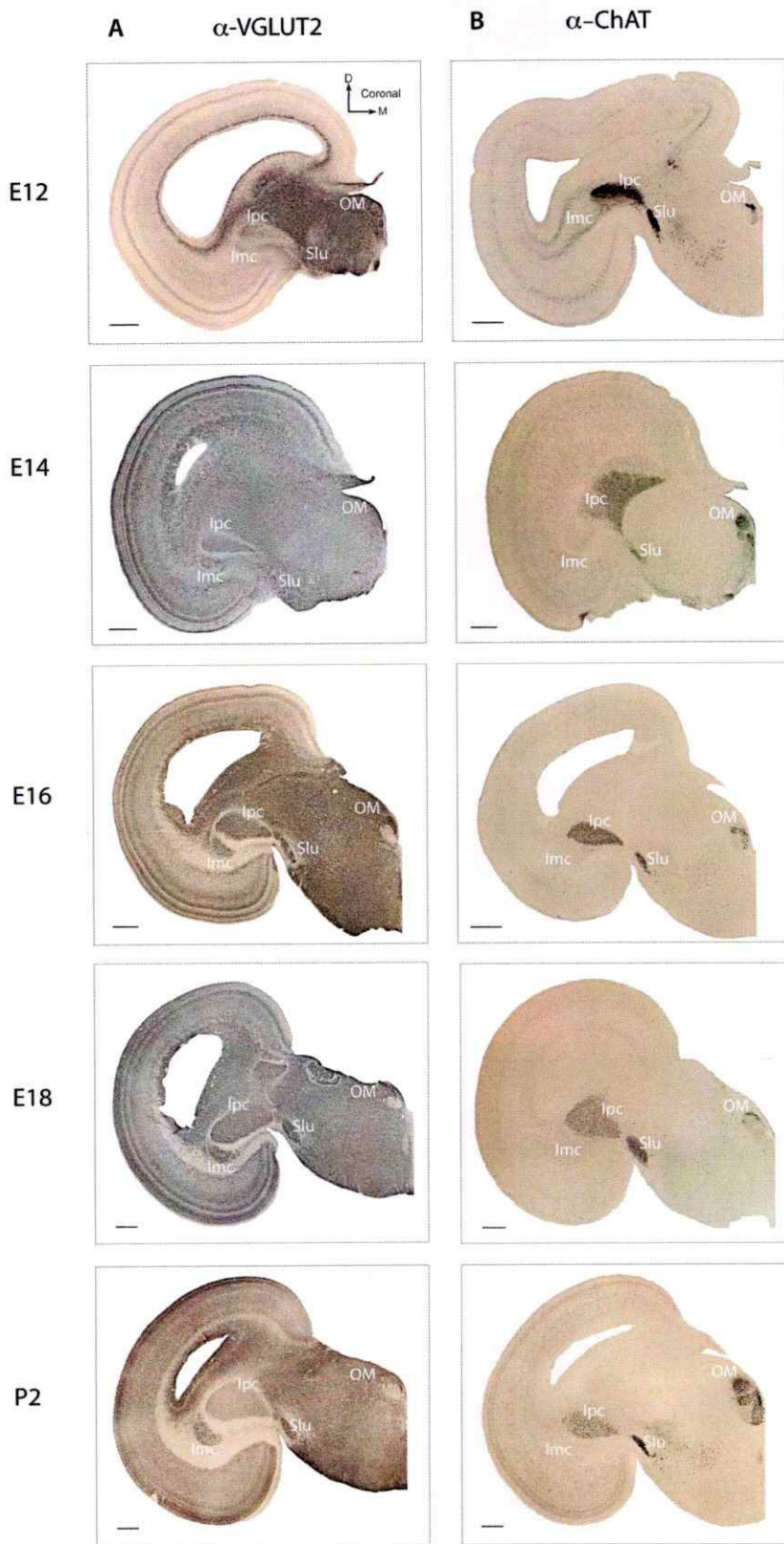
Para llevar a cabo la evaluación del fenotipo neuroquímico a nivel proteico se analizó la inmunoreactividad para VGLUT2 y ChAT, ya que solo estos dos anticuerpos están disponibles comercialmente como marcadores específicos colinérgicos y glutamatérgicos. Los ensayos fueron realizados en secciones coronales de cerebro de pollo correspondientes a estadios E12, E14, E16, E18 y P2 con un n=3 por cada anticuerpo y por cada estadio, siendo en total 30 ensayos de inmunohistoquímica.

### *Immunoreactividad en los núcleos del istmo para VGLUT2*

Dado que la inmunohistoquímica para VGLUT2 solo marca terminales axónicos y no somas neuronales, no fue posible determinar la expresión de esta proteína en los somas de los núcleos del complejo del istmo. Solo se observó que en los cinco estadios analizados, las células de Ipc, Imc y SLu presentaron una intensa marca atribuida a su profusa inervación por terminales glutamatérgicos provenientes probablemente de las células shepherd's crook del tectum (**Figura 12 A**).

### *Immunoreactividad en el TeO para VGLUT2*

En general, se observó que la proteína de VGLUT2 mostró un patrón de expresión "granular" en el TeO, con diferentes intensidades, según el estadio embrionario. En los estadios mas tempranos no fue posible atribuir la marca a capas específicas, dado que éstas aun no se encuentran definidas como en adultos. Así, como se muestra en la **Figura 13 A**, en E12 se puede observar una clara marca en lo que sería una capa intermedia del TeO. En E14 y E16 ya fue posible detectar la expresión de esta proteína en capas aún mas superficiales. En E18 y P2, en donde ya es posible definir las 15 capas tectales reconocidas en adultos, se puede decir con precisión que la marca observada corresponde a las capas 2, 3, 4, 5 y 7. Dado que estas láminas corresponden tanto a las capas retino recipientes como a aquellas donde arborizan los terminales axónicos de Ipc, es que esta marca podría ser atribuida indistintamente a los terminales de Ipc y a los terminales retinianos glutamatérgicos.



**Figura 12. Patrón de expresión de las proteínas VGLUT2 y ChAT en los núcleos del complejo del istmo en cinco estadios del desarrollo.** Cortes coronales a nivel de mesencéfalo mostrando la inmunoreactividad para las proteínas VGLUT2 y ChAT. **A.** En todos los estadios se observa la expresión de la proteína de VGLUT2 en las aferencias de los núcleos Ipc, Imc y Slu. **B.** Se reconoce un claro marcaje para ChAT en las células de los núcleos Ipc y Slu. Los cortes fueron reaccionados con DAB/Níquel. Barra escala: 500  $\mu$ m.



### *Immunoreactividad en los núcleos del Istmo para ChAT*

En las secciones de mesencéfalo de la **Figura 12 B**, se puede apreciar que en los 5 estadios embrionarios analizados hay una intensa reactividad para la proteína ChAT, en lo que pareciera ser la mayoría de los somas celulares del núcleo Ipc y SLu. Sin embargo, mientras la marca desplegada por ambas estructuras es similar en E12 y E14, a partir de E16 se observa una disminución relativa en la marca de Ipc.

Por otro lado, los cuerpos celulares de Imc nunca mostraron immunoreactividad para ChAT. A modo de control, se puede decir que en cada uno de los estadios los somas de los núcleos oculomotores presentaron una intensa expresión de esta proteína, concordante con su ya aceptado fenotipo colinérgico.

### *Immunoreactividad en el TeO para ChAT*

La inmunohistoquímica para ChAT además de marcar somas celulares permite la visualización de axones colinérgicos. Así, al observar con mas detalle el núcleo Ipc, fue posible ver fibras axonales emergiendo desde éste y migrando en dirección a TeO. Como se aprecia en la **Figura 13 B**, en E12 y E14 solo se detectó una débil marca en células que formarán la capa 10, sin embargo, no se observaron fibras marcadas en TeO que pudieran corresponder a axones de Ipc, los que sólo se pueden seguir hasta las capas profundas de TeO.

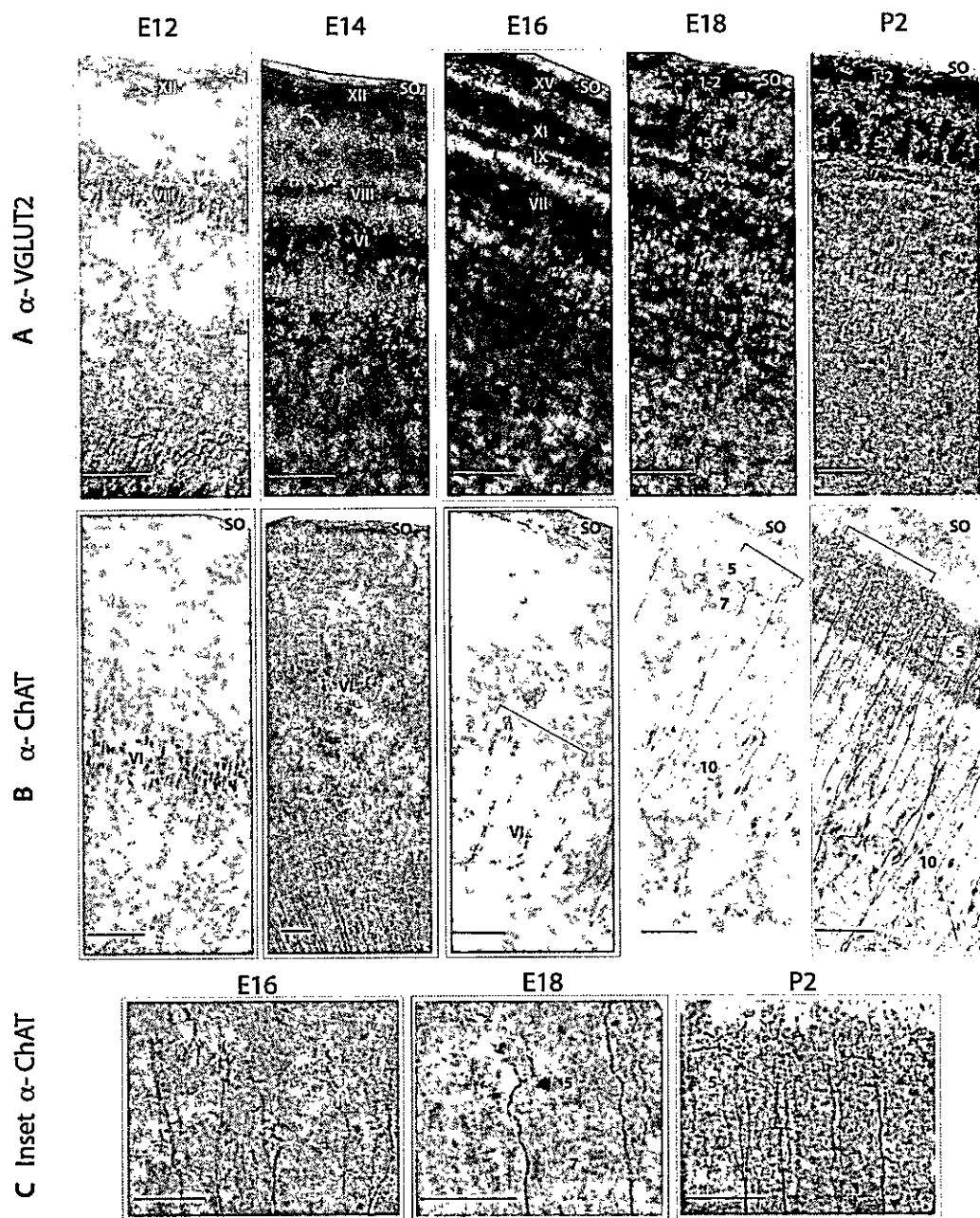
En E16, se observan marcadas tanto las futuras neuronas de la capa 10 (Lámina VI según LaVail y Cowan 1971) como un distinguible plexo fibras gruesas,

correspondientes a axones de Ipc (**Figura 13 B, C**). La extensión observada para estos axones alcanza regiones medias de TeO y un poco por encima de la capa VI.

En E18 se pudo observar que estos axones alcanzan capas más superiores, alrededor de la capa 5, mostrando además ramificaciones secundarias con algunas terminaciones redondeadas, características de los axones de Ipc (**Figura 13 B, C**). Por otro lado, la marca neuronal en lo que se diferencia ya como capa 10 se mantiene presente. Se puede observar un plexo de fibras (o terminales) marcadas débilmente en la capa 7, las que presumiblemente corresponden a ramificaciones dendríticas de estas mismas neuronas.

En P2 hay un notorio aumento de las fibras expresando esta proteína, observándose un denso plexo de terminales y de terminaciones redondeadas en la capa 5 que se extiende con menor densidad hasta la capa 2 de TeO (**Figura 13 B, C**). Aunque no es posible reconocer aisladamente las estructuras con la morfología de cepillos (painbrushes) pertenecientes a los terminales de Ipc, este patrón de marca corresponde predominantemente a estos terminales que se ramifican densamente en la capa 5 y que extienden ramificaciones menos densas en las capas 4 a 2. Además de la marca de los axones y terminales de Ipc, es posible distinguir también una clara marca en la capa 7, probablemente atribuida a terminaciones dendríticas de las células de la capa 10.





**Figura 13. Patrón de expresión de las proteínas de VGLUT2 y ChAT en el TeO en cinco estadios del desarrollo.** Fotomicrografías de las capas superficiales del tectum en cortes coronales de mesencéfalo mostrando la expresión de las proteínas VGLUT2 y ChAT en distintos estadios de desarrollo. **A.** Se muestra la expresión de VGLUT2 en diferentes capas del TeO, sin embargo estas no pueden ser diferenciadas entre terminales de Ipc y otros terminales glutamatérgicos. Barra escala: 100 $\mu$ m. **B.** La inmunotinción para ChAT permite reconocer desde E16 algunos axones marcados y extendiéndose hasta capas intermedias. En E18 estos alcanzan capas más superiores para finalmente ser observados en P2 llegando hasta la capa 5 y sugiriendo leves arborizaciones. Barra escala: 100 $\mu$ m. **C.** Inset a las fibras marcadas en las capas más superiores del TeO. En 16 y E18 se distinguen axones con botones sinápticos y leves ramificaciones. En P2 se observa un marcado aumento de la arborización terminal. Barra escala: 50 $\mu$ m.

## **Estudio del desarrollo de los terminales axónicos del núcleo Ipc en el tectum óptico mediante el depósito de cristales de biocitina *in vitro***

Si la inmunohistoquímica de ChAT revela con fidelidad la morfología de los axones de Ipc, los resultados anteriores indicarían que los axones de Ipc comienzan a ramificarse en estadios posteriores a E16, e incluso en E18, estos axones estarían pobremente ramificados.

Con el fin de revelar más fielmente la morfología de estos axones, se realizaron depósitos de cristales de biocitina en Ipc en diferentes estadios embrionarios. Estos experimentos fueron realizados en rebanadas horizontales de cerebro de pollo para los estadios E13, E15 y P2; y secciones sagitales para E18, con un n=3 para cada experimento. En cada estadio se depositaron dos cristales, obteniéndose en total 12 ensayos exitosos.

### **Día embrionario 13**

En la **Figura 14 A**, E se puede observar un manojito de axones llenados con biocitina saliendo desde el sitio de inyección y extendiéndose profusamente hacia el tectum. Una vez en el TeO los axones realizaron un giro de manera que su orientación se vuelve perpendicular a las laminas tectales. No se reconocieron ramificaciones axonales de estas fibras y su extensión se observó hasta capas medias del TeO. Específicamente, se observaron estas fibras llegando hasta regiones donde se encuentran las presumiblemente células shepherd's crook, de la prospectiva capa 10 (Lámina VI según LaVail y Cowan 1971); células que se marcaron debido al transporte retrogrado de

biocitina desde Ipc. Con respecto a estas células, no fue posible identificar los axones emergiendo desde sus dendritas apicales.

### **Día embrionario 15**

En este estadio se observó un grupo de axones que luego de entrar a TeO giran perpendicularmente en dirección a las capas superiores con una trayectoria axonal bastante irregular (**Figura 14 A**). Se reconocieron lo que parecen ser arborizaciones axonales amplias, desordenadas y con un patrón punteado. Estas arborizaciones se extienden mas allá de las presuntas células de la capa 10 (Lámina VI según LaVail y Cowan 1971), marcadas también retrógradamente, pero sin llegar hasta las capas superiores del TeO. En este caso no fue posible identificar los axones de las células de la capa 10.

### **Día embrionario 18**

En la **Figura 14 A**, ya es posible reconocer en E18 la estructura en forma de pincel (paintbrush) de al menos dos terminales axónicos de Ipc. Esta proyección se extiende hasta las láminas superiores del TeO, mostrando así, una mediana arborización en las capas 2-4 y 9, y una mas profusa en la capa 5. Los axones exhiben una trayectoria perpendicular a las láminas tectales pero claramente más rectilínea que el estadio anterior. También muestran una arborización empaquetada de sus terminales redondeados y un patrón de proyección sobre TeO similar al observado en adultos. Debido al transporte retrogrado del trazador, una gran cantidad de células se marcó en la capa 10, siendo posible distinguir, en la mayoría de ellas, un axón emergiendo desde la dendrita apical y un árbol dendrítico extendiéndose hasta capas medias

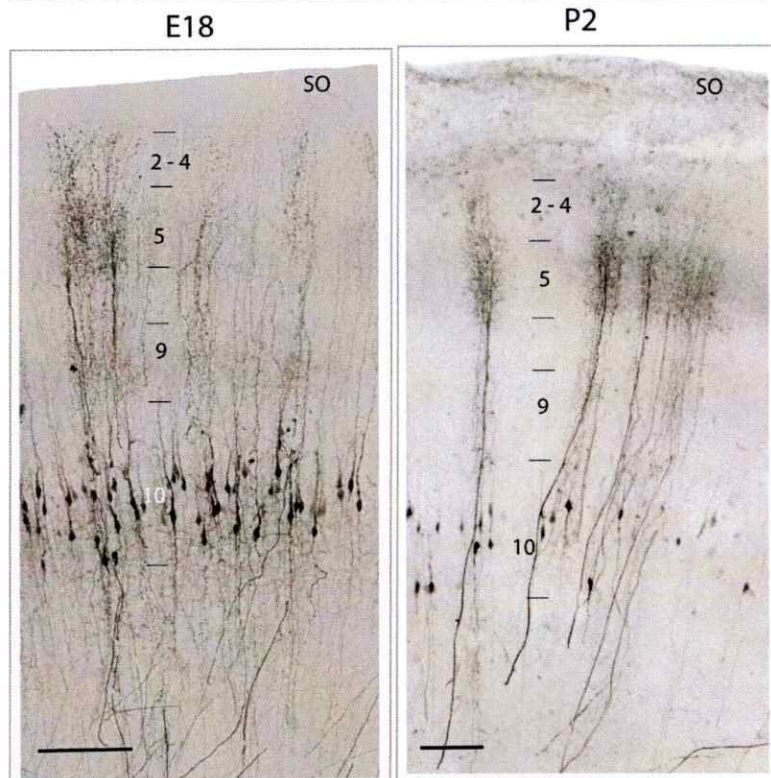
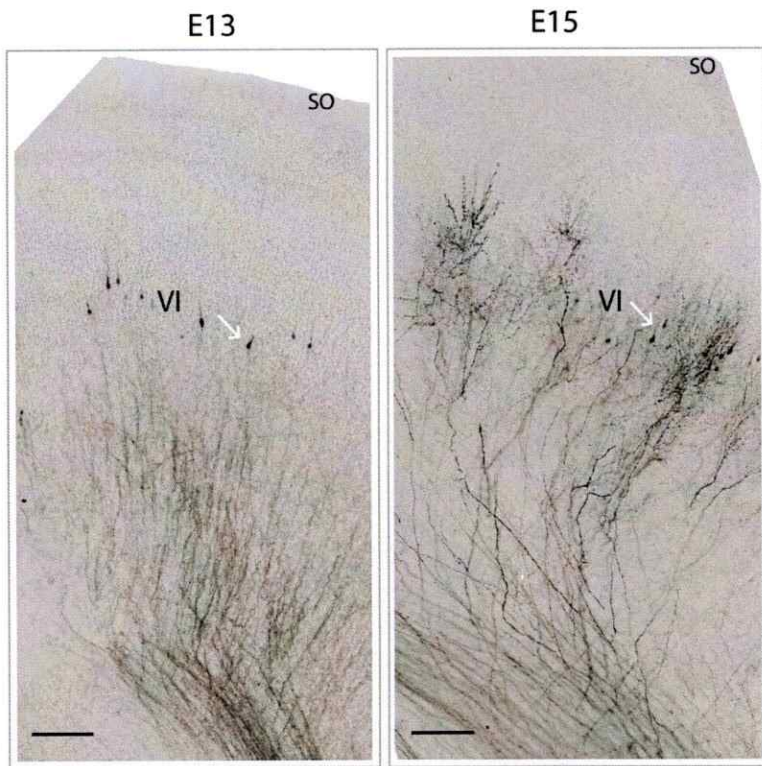
(aproximadamente capa 5). Más allá de estas láminas las dendritas de estas células se confunden con los axones de Ipc.

## **Día Postnatal 2**

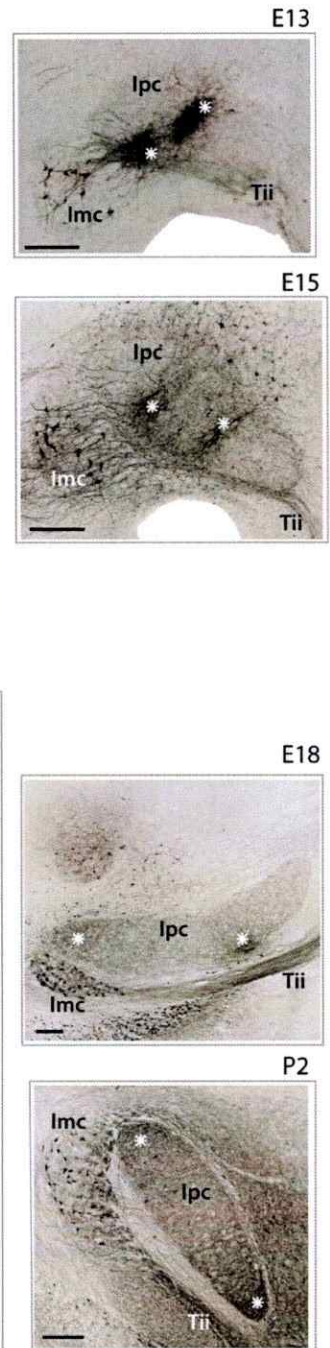
Se reconocieron varios terminales en pincel (paintbrushes) correspondientes a las células de Ipc, los cuales mostraron tanto la típica disposición columnar y laminar de sus terminales, como su ordenada organización en el TeO (**Figura 14 A**). De esta manera y al igual que el estadio anterior, los terminales presentaron una arborización intensa en la lámina 5 y una mas débil en las capas 2-4 y 9. Sus axones se orientaron perpendicularmente a las láminas del TeO pero ahora con una clara disposición rectilínea. Al igual que en todos los estadios estudiados las células de la capa 10 se han llenado retrógradamente con biocitina, sin embargo en esta muestra no fue posible distinguir sus axones con precisión.

**Figura 14. Secuencia temporal de la morfología de los terminales en pincel (paintbrushes).**  
**A.** Axones marcados luego del deposito de cristales de biocitina en rebanadas de mesencéfalo. En E13 solo se puede reconocer un manojo de axones hasta capas medias, en E15 ya se observan fibras con ramificaciones amplias y desordenadas en capas más superiores. En E18 son evidentes algunos terminales axónicos en forma de pincel (Paintbrushes). En P2, se ven terminales en pincel con su típica organización empaquetada y laminar de sus arborizaciones axónicas. Barra escala: 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Se presentan los sitios de inyección en Ipc. En cada estadio se realizaron depósitos de dos cristales (asteriscos) en secciones horizontales para E13, E15 y P2; y en rebanadas sagitales para E18. Se indican somas de células shepherd's crook en E13 y E15 (flechas). **Tii** : Tracto intraístmico. Barra escala: 200  $\mu\text{m}$ .

A



B



## DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis describen, por un lado, el patrón de expresión de marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el circuito istmo-tectal, y por otro, la morfología de los axones de Ipc (paintbrushes), en diferentes estadios del desarrollo. Los resultados muestran que el núcleo istmo parvocelular (Ipc) exhibe un patrón doble de marcadores, sugerente de un fenotipo neuroquímico colinérgico y glutamatérgico, que se mantiene hasta días previos a la eclosión y que se modifica en los estadios posteriores en favor de un fenotipo principalmente glutamatérgico. Lo anterior haría referencia a un fenómeno de restricción del fenotipo neuroquímico en las últimas etapas del desarrollo de este núcleo, en donde la identidad colinérgica se vería restringida en favor de la glutamatérgica. En cambio, el núcleo istmo semilunaris (SLu) conserva durante los estadios embrionarios estudiados, y hasta la adultez, su fenotipo colinérgico. Por su lado, la ausencia de la expresión de los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el núcleo istmo magnocelular (Imc) podría asociarse con un fenotipo GABAérgico en los estadios estudiados.

Este desarrollo del patrón de expresión de los marcadores colinérgicos y glutamatérgicos en el núcleo Ipc permitiría entender que la disminuida expresión del transcrito de *ChAT* y la casi nula expresión del transcrito de *VACHT* en estadios postnatales es el resultado de una desregulación gradual de la transcripción de estos dos mensajeros durante el desarrollo. Esta situación encontraría sustento en mecanismos de regulación y de transcripción independientes.

Dentro de las implicancias que podría tener este fenómeno, se puede mencionar que la gradual disminución de los mRNA de *ChAT* y *VACht* podría ser parte de un mecanismo de modulación de la eficiencia de la transmisión colinérgica. Por otro lado, los neurotransmisores liberados podrían tener relación con el refinamiento y establecimientos de mapas topográficos.

Los experimentos con biocitina indican que alrededor, y posiblemente antes de E18, ya es posible identificar los terminales axónicos de Ipc tal como son reconocidos en individuos postnatales. Antes de esto, las fibras muestran una morfología desordenada y difusa, precedida por axones sin ramificaciones visibles en estadios más tempranos. Interesantemente, se puede mencionar que existe una correlación temporal entre el momento en el que terminales maduros de Ipc ya pueden ser observados (alrededor de E18) y el momento cuando comienza a disminuir la detección de los niveles del mRNA de *VACht* y también *ChAT* (E18). Esto sugiere que la doble capacidad para liberar acetilcolina y glutamato tiene quizás alguna implicancia en el establecimiento del orden topográfico y en el desarrollo de las arborizaciones de los paintbrushes.

### **Identidad neuroquímica de los núcleos del complejo del istmo durante el desarrollo.**

Dada la intensa inmunoreactividad descrita para *GAD* como para *ChAT* es que en el adulto las células de Imc y SLu son reconocidas como GABAérgicas y colinérgicas, respectivamente. Aún cuando el núcleo Ipc presenta una fuerte expresión de la proteína ChAT y por tanto se le ha considerado un núcleo colinérgico, evidencia

reciente (Islam y Atoji, 2008) y estudios en nuestro laboratorio han sustentado mas bien un fenotipo glutamatérgico para sus células. Lo anterior, se basa en ensayos de hibridación *in situ* e inmunogold que han mostrado que las células de Ipc en adultos, si bien expresan los transcritos de *ChAT* y *CHT*, no expresan el transportador vesicular de acetilcolina (*VACHT*) y sí expresan el transportador vesicular de glutamato 2 (*VGLUT2*) (González-cabrera., 2014 en prep.)

Tanto los ensayos de hibridación *in situ* como los de inmunohistoquímica realizados en esta tesis, han mostrado que el núcleo SLu conserva desde E12 y hasta los estadíos postnatales su aceptado fenotipo colinérgico (Wang y col., 2006), mientras que los resultados para el núcleo Imc concordarían con un fenotipo GABAérgico (Braun y col., 1998; Wang y col., 2004). Para el núcleo Ipc, en cambio, el desarrollo es más complejo. Este núcleo exhibe desde E12 hasta E16 los m-RNAs asociados tanto a los marcadores colinérgicos como glutamatérgicos (*VGLUT2*). Luego, desde E18 y hasta P2, se detecta una menor expresión del transcrito de *ChAT* y niveles muy bajos o nulos del m-RNA del transportador vesicular de acetilcolina (*VACHT*), sin embargo, el mRNA de *VGLUT2* junto con el de *CHT* continúan expresándose.

Considerando la metodología utilizada en esta tesis, no se hará referencia a la co-expresión de marcadores en neuronas individuales, ya que para eso es necesario realizar experimentos de hibridación *in situ* dobles, lo cual por ahora está fuera del alcance de este trabajo de investigación. Sin embargo, se puede mencionar que según la tinción Nissl, la densidad de neuronas en Ipc es similar a la densidad de neuronas marcadas en los ensayos de inmunohistoquímica para ChAT e hibridación *in situ* para VGLUT2,



indicando una co-expresión de estos dos marcadores en prácticamente todas las neuronas del núcleo.

Los resultados descritos anteriormente sugerirían que las células de Ipc, desde por lo menos E12, serían capaces tanto de sintetizar y almacenar acetilcolina en vesículas sinápticas, como de ingresar glutamato a estas. Luego de E18 la detección de *VACHT*, al ser muy baja o nula, indicaría que a aunque se pueda seguir sintetizando acetilcolina dada la presencia de *ChAT* y *CHT*, esta no podría ser empaquetada en vesículas sinápticas, sin embargo, la persistencia del transcrito de *VGLUT2* indica que el glutamato seguiría siendo acumulado. Entonces, dado que la acumulación del neurotransmisor en vesículas representa un paso fundamental en el proceso de transmisión sináptica, se puede sugerir que desde E12 a E16 las células de Ipc liberarían tanto glutamato como acetilcolina y que posterior a E16 la liberación vesicular de neurotransmisor se limitaría a glutamato.

Estos resultados podrían objetarse por al menos dos consideraciones. La primera hace mención a cuán específica son las sondas de *VACHT* y *VGLUT2* empleadas en este estudio, y la segunda, a la posibilidad de que la sonda para *VACHT* este reconociendo solo algunas isoformas de este transcrito. Con respecto a la primera observación, se puede decir que tanto en P2 como en los estadios embrionarios el m-RNA de *VACHT* fue detectado congruentemente en todas las estructuras cerebrales descritas como colinérgicas (Oda Y 1999; Sorenson y col., 1989, Medina y Reiner, 1994) y acompañado siempre de los m-RNAS de *ChAT* y *CHT*. Adicionalmente, *VACHT* no fue detectado en estructuras descritas con otra neuroquímica, siendo la única excepción el núcleo SpM,

donde se observó la expresión tanto de *VACHT*, *CHAT*, *VACHT* y *VGLUT2*. Igualmente, la expresión de *VGLUT2* estuvo asociada solo a estructuras glutamatérgicas, patrón de expresión que concuerda con ensayos de hibridación *in situ* descritos anteriormente en paloma (Islam y Atoji, 2008) y que también se complementan con la inmunoreactividad previamente descrita para este marcador (Atoji, 2011) y con la encontrada en este trabajo también.

Con respecto a la segunda observación, es importante destacar que en organismos tan diversos como nematodos, *drosophila*, pollo, rata, ratón y humanos, se ha descrito que los genes de *VACHT* y *CHAT* comparten un mismo locus genético (conocido como locus del gen colinérgico), en donde el exón codificante para *VACHT* corresponde al primer intrón del gen *CHAT* (**Figura 15**) (Alfonso, 1994; Benjanin y col., 1994; Erickson y col., 1994; Kitamoto, 1998; Mukherjee y Hausman 2004; Roghani y col., 1994). En mamíferos se han descrito diversas isoformas para el transcrito de *VACHT*, las cuales poseen invariablemente el exón codificante para *VACHT*, pero sus extremos 5' no codificantes exhiben una cierta diversidad en su composición. Dado lo conservado que ha resultado ser este arreglo genético (Benjanin y col., 1994; Cervini y col., 1995; Eiden LE, 1998; Oda Y 1999; Roghani y col., 1994; Schutz y col., 2001) es probable que ambas características ocurran en el pollo. Tomando en cuenta lo anterior, existiría la posibilidad que la sonda utilizada solo sea capaz de reconocer las supuestas regiones variables del extremo 5' de los transcritos de *VACHT* y no específicamente el exón de *VACHT*. Sin embargo, la sonda fue diseñada para reconocer una región de 703 pb correspondiente al exón codificante del transcrito de *VACHT*. De esta manera, es posible aseverar que la ausencia de marca para *VACHT* se debe a la ausencia del

transcrito y no a la ausencia de hibridación entre la sonda y un tipo de mensajero que en ese momento deje de expresarse.

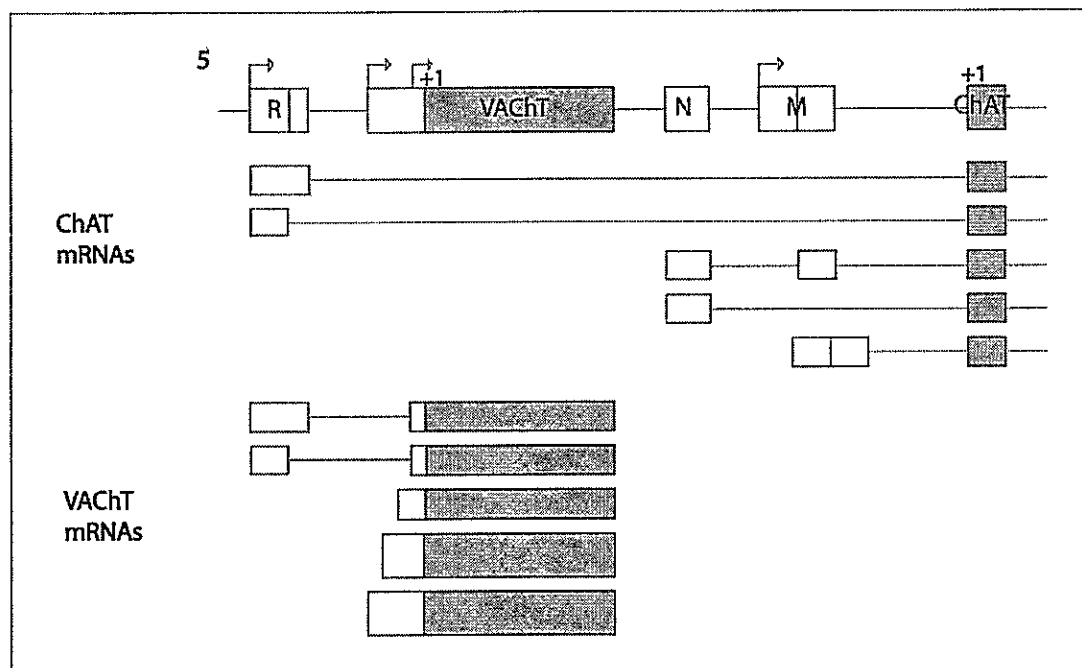
### **Down-regulación del locus colinérgico**

Como se mencionó anteriormente, el locus del gen colinérgico corresponde a un arreglo genético altamente conservado desde nematodos a humanos y que codifica para las proteínas involucradas en la de síntesis y almacenamiento de acetilcolina en vesículas sinápticas, ChAT y VACHT, respectivamente. Este locus posee elementos de regulación común a los dos genes pero también promotores independientes, lo cual permite una transcripción tanto coordinada como desacoplada, **Figura 15**. Así, la región R corresponde a un sitio de inicio de la transcripción común a *ChAT* y *VACHT*, desde el cual se obtiene un transcrito primario que abarca ambos genes, el que luego de un evento de splicing alternativo origina los transcritos maduros tipo R de *ChAT* y *VACHT*. Por otro lado, los sitios de inicio de la transcripción denominados N y M generan los transcritos primarios independientes de *ChAT* tipo N y M. En el caso de *VACHT*, también existe una región V que permite generar transcritos independientes (tipo V). En mamíferos, se ha sugerido que los mensajeros mas abundantes de *VACHT* y *ChAT* corresponden a aquellos generados independientemente desde las regiones N, M y V (Benjanin y col., 1994; Berrard y col., 1995; Brock y col., 2007; Castell y col., 2002; Cervini y col., 1995; Oda Y 1999; Roghani y col., 1994; Schutz y col., 2001). En pollo, por el contrario, no se ha descrito la región R del locus colinérgico, pero si se ha

secuenciado los exones codificantes N y M del gen *Chat*, siendo la isoforma N del transcrito de *Chat* la única reportada hasta el momento, mientras que para *VAcHt* no se ha reportado ninguna isoforma (Mukherjee y Hausman 2004). Sin embargo, dado lo conservado de esta estructura genética, es altamente probable que en pollo los transcritos de *Chat* y *VAcHt* expresados correspondan a aquellos generados bajo sitios de transcripción independientes y que por tanto su expresión pueda también estar regulada independientemente. Es así, como la casi nula expresión del RNA mensajero de *VAcHt* y la disminuida expresión de *Chat* observada desde E18 en las células del núcleo Ipc, podría deberse a un fuerte silenciamiento específico en la transcripción de *VAcHt* y uno más débil en la de *Chat*.

Por otro lado y en concordancia con nuestros resultados, en el desarrollo de la rata se han descrito tres categorías de patrones de expresión de *VAcHt* y *Chat*, los cuales sugerirían una regulación diferencial de estos genes (Schutz y col., 2001). En la primera categoría, en el sistema nervioso periférico, los niveles de expresión del mRNA de *VAcHt* siempre sobrepasan los de *Chat* tanto en los estadios embrionarios como en los postnatales. En la segunda, inicialmente el mRNA de *VAcHt* se expresa en mayor grado con respecto a *Chat* en regiones como la medula espinal, pero luego, en individuos adultos los niveles de ambos transcritos se igualan. La tercera categoría describe niveles similarmente bajos de expresión de los transcritos de *Chat* y *VAcHt* en el núcleo habenular medial, sin embargo, en estadios más tardíos y en la adultez, la expresión del transcrito de *Chat* aumenta con respecto al de *VAcHt* (Schutz y col., 2001). Lo descrito en esta tesis se podría encasillar en una cuarta y nueva categoría, en donde al inicio, se observan en las células de Ipc niveles similarmente altos de expresión

de los mRNAs de *ChAT* y *VACHT*, pero luego se detecta una disminución parcial del transcrito de *ChAT* y una casi completa ausencia del transcrito de *VACHT*.



**Figura 15. Representación esquemática de la organización del locus del gen colinérgico en rata.** Se muestran las diferentes especies de mRNA de *ChAT* y *VACHT* generadas como consecuencia del uso de diferentes promotores y de eventos de splicing alternativo. Bloques blancos corresponden a exones no codificantes del gen *VACHT* y *ChAT*. Bloques grises corresponden a regiones codificantes para el gen *VACHT* y *ChAT*.

Una opción diferente surge desde los análisis realizados en *Drosophila*. La evidencia sugiere que los transcritos primarios para *ChAT* y *VACHT* son generados a partir de un sitio de inicio de la transcripción en común, región R. Sin embargo, se han observado claras diferencias en los niveles del transcrito de *ChAT* con respecto al de *VACHT* (Weihe y col., 1998), lo cual podría ser resultado de algún tipo de regulación post-transcripcional (Eiden LE, 1998). Lo anterior, y dado la factibilidad que la región R

también exista en pollo, abriría la posibilidad que los mRNA de *VAcHt* y *ChAT* se generen desde un transcrito primario común y que luego, alrededor de E16, se gatille algún fenómeno de modificación post-transcripcional que de cuenta de la modificación en los niveles de expresión de los transcritos.

### **Co-liberación**

Se ha vuelto evidente que la mayoría de las neuronas del sistema nervioso utilizan mas de una tipo de neurotransmisor. En particular, se ha demostrado en ratas la expresión de transportadores vesiculares de glutamato en neuronas del CNS con otra neuroquímica ya reconocida (Trudeau, 2007). Específicamente, la presencia de *VGLUT2* ha sido reportada en células catecolaminérgicas de la medula espinal, en células dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT), en células GABAérgicas del córtex cerebral y en motoneuronas espinales colinérgicas, solo por nombrar algunos ejemplos. En algunos de estos casos, la co-liberación de glutamato en conjunto con otro neurotransmisor ha sido comprobada (Mestikawy y col., 2011). La evidencia anterior ofrece un sustento a los hallazgos de esta tesis y a la idea que durante una ventana temporal embrionaria (E12-E16) las células de Ipc serían capaces liberar tanto acetilcolina y glutamato.

Por otro lado, el que luego de esta ventana temporal (E18- adultez) las células de Ipc pierdan en gran medida la expresión del transcrito de *VAcHt* pero mantengan la de *VGLUT2* y que además esto pueda restringir la liberación vesicular de neurotransmisor a solo glutamato, también encuentra sustento en la literatura. Ejemplos de lo anterior son

las células granulares del giro dentado, que pueden liberar tanto glutamato como GABA en un inicio y luego se vuelven solo glutamatérgicas (Gutierrez y col., 2003) o como las neuronas del sistema simpático, las cuales al principio presentan un fenotipo tanto colinérgico como noradrenérgico pero en etapas mas avanzadas solo conservan un carácter colinérgico (Apostolova y Dechant, 2009).

### **Morfología de los terminales axónicos de Ipc en diferentes estadios del desarrollo**

Como se mostró en la sección de resultados, la inmunohistoquímica para ChAT marcó consistentemente los somas del núcleo Ipc. También permitió identificar fibras emergiendo desde este núcleo en dirección al TeO, las cuales en etapas tardías del desarrollo, presentan ramificaciones en las capas intermedias y superficiales. Si la inmunohistoquímica de ChAT fuese un fiel indicador de la morfología de los axones de Ipc, la distribución de esta inmunoreactividad a lo largo del desarrollo sugeriría que en E12 y E14 estos axones no alcanzarían todavía las capas tectales y que en E16 sólo llegarían a las capas intermedias. Luego, en E18, se extenderían a las láminas más superiores, y finalmente, en P2, poseerían ramificaciones similares a las presentes en el estadio adulto.

Sin embargo, en estadios postnatales del pollo, la inmunohistoquímica de ChAT no parece marcar completamente los axones de Ipc, lo que pone en duda su capacidad de hacerlo en estadios más tempranos. Además, las fibras colinérgicas tanto del núcleo SLu como de las células de la capa 10 podrían ser parte de las fibras marcadas mediante esta inmunohistoquímica y confundir estos resultados. De manera que para eliminar estos

factores, y determinar en forma precisa el estado de la morfología de los axones de Ipc, se utilizaron cristales de biocitina a modo de trazador neuronal.

Lo que se encontró fue una secuencia de desarrollo morfológico de los axones de Ipc que distó bastante de lo que habían sugerido los ensayos de inmunohistoquímica (**Figura 13, 14, 16**). En E13 se pudo distinguir un manojo de axones sin ramificaciones extendiéndose hasta capas medias del Te. En E15 se detectó una clara expansión del campo de ramificaciones terminales, los que en algunos casos, se distinguían con forma de canastillo. Y, finalmente en E18, se observaron terminales en forma de pincel con su característico patrón de arborización observado en individuos postnatales.

Estos resultados indicarían un desarrollo de las arborizaciones axónicas de Ipc bastante rápido, en donde en un periodo de 5 días, se pasaría desde un axón sin ramificaciones a un terminal de Ipc maduro. Específicamente, entre E15 y E18, además de un proceso de crecimiento de los axones, podría sugerirse un tipo de re-modelamiento por "poda" o por retracción de terminales que de cuenta del progreso desde unas arborizaciones amplias, difusas, y probablemente con una organización topográfica menos precisa, hacia unas arborizaciones claramente compactas y retinotópicamente organizadas. Este fenómeno ha sido ampliamente descrito en el desarrollo de las proyección retinotectal tanto en ratas como en pollo (Mey y Thanos 2000; Nakamura y O'leary 1989; Simon y O'leary, 1992). En estos casos, los axones de las células ganglionares de la retina establecen sus proyecciones sobre el TeO en zonas topográficamente incorrectas y desarrollan amplias arborizaciones axonales, lo cual es corregido rápidamente en un periodo de dos días, para finalmente dar origen a



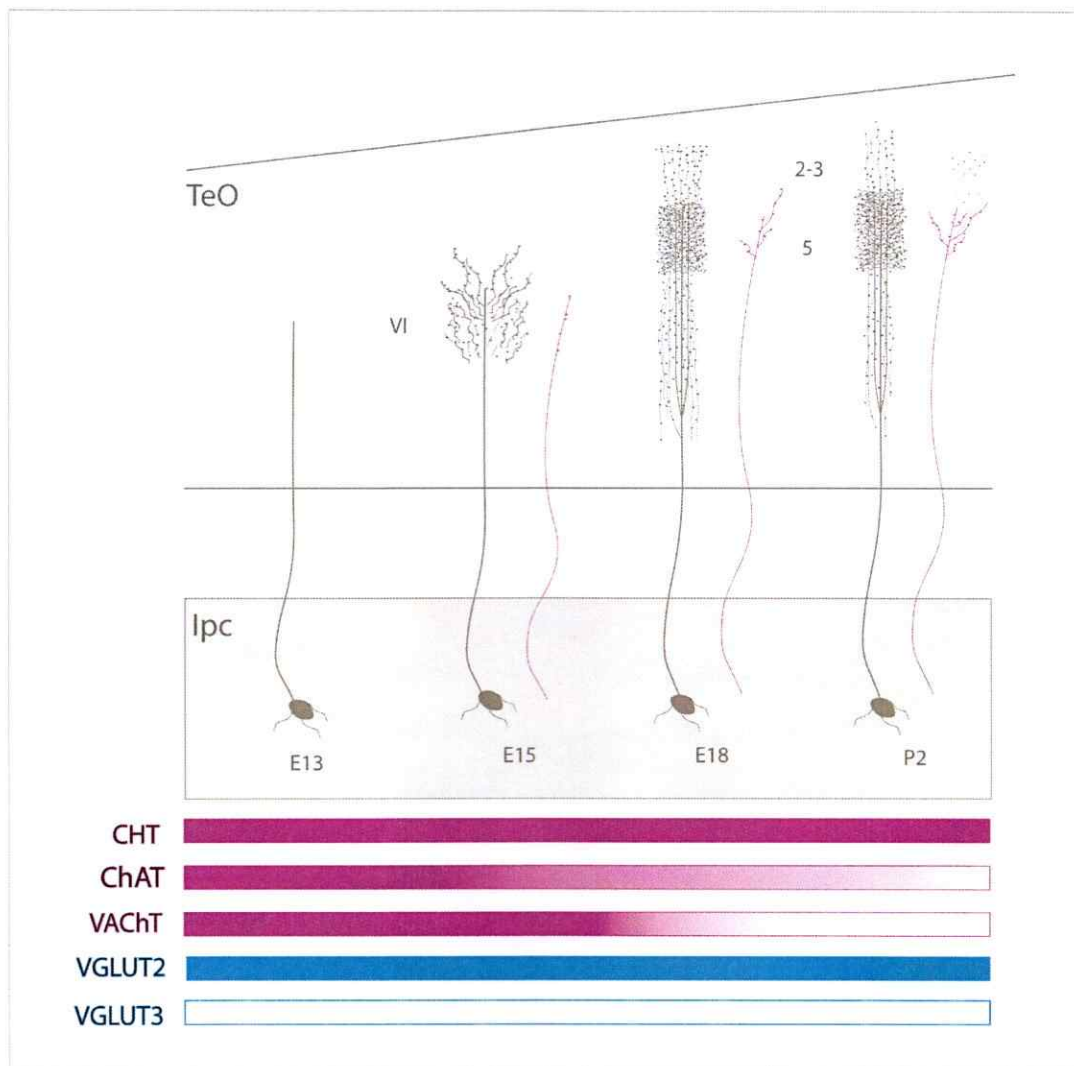
proyecciones topográficas y altamente delimitadas (Simon y O'leary, 1992; Nakamura y O'leary 1989; Mey Y Thanos 2000)

Con respecto a la gran discrepancia entre la morfología revelada por la inmunohistoquímica para ChAT y el llenado con biocitina (**Figura 16**) se podrían considerar varias posibilidades.

Una hace referencia a que alrededor del 80 % de la proteína ChAT se transportaría mediante un flujo axoplásmico lento desde el soma celular hasta los terminales sinápticos, el que parece ser muy variable entre especies (Oda Y, 1999). Si en el pollo este proceso es particularmente lento, se podría retrasar la distribución de la proteína respecto del desarrollo de los terminales. Incluso en el pollo adulto existiría poca disponibilidad de ChAT en los terminales en comparación , por ejemplo, con una paloma, donde se ha observado que la inmuno detección para ChAT es bastante representativa de la morfología de los paintbrushes en individuos adultos y siendo muy similar a la morfología a la obtenida mediante el uso de trazadores neuronales. Por el contrario, en pollo, esta técnica requiere necesariamente de un proceso previo de recuperación de epítipo para poder obtener una clara e intensa marca, que de todos modos no representa fielmente la morfología de los terminales, lo que podría ser indicativo de una disponibilidad reducida del epítipo de ChAT.

Por último, es posible también que exista un mecanismo que facilite una distribución diferencial de las moléculas de ChAT en algunas ramas de los arborizaciones terminales de Ipc, el que podría estar relacionado con los procesos de diferenciación del terminal (ver más abajo).

Los resultados de estos experimentos corresponden a una primera aproximación al estudio del desarrollo de los terminales de Ipc, y por tanto, ofrecen un punto de referencia para posteriores análisis. Sin embargo y debido a la técnica utilizada, se vuelve imposible realizar un análisis más detallado que el expuesto. En particular, por la interferencia que representa el llenado retrógrado de las neuronas shepherd's crook, cuyos procesos se mezclan con los terminales de Ipc, obstaculizando la observación detallada de estos. De manera que para obtener información mas conclusiva acerca de la morfología de estos terminales en diferentes estadios, sería necesario realizar experimentos de llenado celular único que permitan marcar aisladamente los axones y terminales de Ipc.



**Figura 16. Esquema aproximativo del desarrollo de los terminales de Ipc.** Morfología de los terminales de Ipc en diferentes estadios del desarrollo detectada por inmunoreactividad para ChAT (Fibras magenta) y por depósitos de cristales de biocitina (Fibras grises). Se puede apreciar la clara diferencia entre ambos métodos de detección. Se muestra, además, la correlación temporal con el patrón de expresión de los marcadores analizados en esta tesis.



## Morfología, organización topográfica y actividad neuronal

La evidencia presentada en esta tesis sugiere que la transmisión colinérgica podría estar involucrada en el desarrollo de los terminales en forma de pincel del núcleo Ipc, y quizá también en su especificidad topográfica. Esto, dado que la liberación vesicular de acetilcolina, mediada por la expresión de *VACht*, *ChAT* y *CHT*, estaría ocurriendo durante el periodo en que se desarrollan y maduran los terminales de Ipc, y además, porque el cese de esta liberación, determinada por la casi nula expresión de *VACht*, muestra una coincidencia temporal con una primera detección de terminales axónicos maduros (**Figura 16**).

Por otro lado, no se puede descartar totalmente que la liberación de glutamato en esta ventana temporal también tenga algún grado de influencia.

Aún cuando en esta tesis se haya abordado solo el desarrollo morfológico de los terminales axónicos de Ipc y no el del establecimiento de su proyección retinotópica, el hecho de que estos dos procesos tengan una íntima relación durante el desarrollo (Huberman y col., 2008; McLaughlin y col., 2003; McLaughlin y O'Leary, 2005; Nakamura, O'leary 1989) genera la natural curiosidad de analizar los factores que podrían estar influenciando cada uno de los procesos y establecer algún tipo de correlación con el patrón neuroquímico descrito anteriormente.

## *Morfología axónica*

Se sabe que la actividad neuronal puede influenciar la estabilización de contactos sinápticos y modificar el desarrollo de arborizaciones neuronales tanto de la célula eléctricamente activa, como de las neuronas post-sinápticas. Frente a la pregunta de cómo la actividad eléctrica puede influir sobre estos procesos, actualmente se sabe que esto puede ser mediado por neurotransmisores, y específicamente por la acción segundos mensajeros como el calcio (Davis 2001; Mattson, 1998; West y col., 2002; Wong y Ghosh, 2003). Es así como los neurotransmisores ya no son considerados tan solo como moléculas que median la transmisión sináptica, sino también, como modeladores de la morfología neuronal y de los circuitos de los cuales participan. Por ejemplo, la señalización por GABA, serotonina, glutamato y acetilcolina, entre otros, ha sido involucrada en el desarrollo y estabilización de arborizaciones dendríticas, así como en procesos de sinaptogénesis (Mattson, 1988; Nguyen y col., 2001; Pathania y col., 2010; Vitalis y col., 2007).

Lo anterior, por un lado, abriría la posibilidad de que los neurotransmisores liberados por Ipc entre E12 y E16, en particular la acetilcolina, actúe sobre el desarrollo de la morfología de las fibras y dendritas circundantes, y además, sobre la organización de sus propias arborizaciones axónicas.

Con respecto a la modificación de fibras circundantes, la acción podría ocurrir específicamente sobre aquellas involucradas en el circuito, tales como las fibras de SLu e Imc y en particular sobre aquellas cuyo desarrollo se ajusta a aquella ventana temporal (**Figura 17**). Este sería el caso de las células ganglionares de la retina, las células

shepherd's crook, y en particular, las de las células ganglionares tectales (TGCs), cuyo contacto sináptico con terminales de Ipc, además, ha sido recientemente demostrado (Gonzalez-Cabrera en prep).

En relación al desarrollo de sus propias arborizaciones axónicas, esta autorregulación podría llevarse a cabo, al menos, mediante dos mecanismos.

El primero podría involucrar la participación de autoreceptores. Esto, debido a que en diferentes modelos se ha sugerido que la activación de autoreceptores de serotonina en neuronas serotoninérgicas activarían cascadas de señalización que se traducirían en cambios morfológicos de las arborizaciones de las mismas células (Ase y col., 2001; Daubert y Condron, 2010; Koert y col., 2001; Sykes y Condron, 2005; Vitalis y col., 2007;) Siguiendo con esta idea y como se mencionó en la sección anterior, la poca representatividad morfológica de la inmunoreactividad de ChAT podría traducirse en que algunas fibras de las arborizaciones terminales de Ipc reciben moléculas de acetilcolina, mientras que otras simplemente no. Esto podría sugerir que mediante un mecanismo de autoreceptores las fibras que diferencialmente contengan y liberen acetilcolina (determinada por la presencia de *VACHT*) autoregularían específicamente su desarrollo y estabilización. Lo anterior podría asemejarse en cierta manera a lo encontrado en *Drosophila* y en la rana, donde algunas neuronas serotoninérgicas del CNS presentan una distribución irregular de las varicosidades serotoninérgicas, proponiéndose que el desarrollo y mantención de esta compleja distribución de sitios de liberación estaría mediado por un proceso autorregulado por serotonina (Chen y col., 2009; Daubert y Condron, 2010).

El otro mecanismo que podría modificar de manera específica la morfología de

arboles axónicos sería uno de señalización homeostática, mediante el cual, una neurona post-sináptica promovería la modelación del árbol axónico pre-sináptico como compensación frente a una modificación de la actividad sináptica. Se ha sugerido que este mecanismo es esencial para la estabilidad y desarrollo de los circuitos neuronales, de manera que este podría ser un escenario muy probable durante el desarrollo de los terminales de Ipc (Davis y Bezprozvanny, 2001; Smear y col., 2007).

Por otro lado y estrechamente vinculado con la característica de circuito de retroalimentación del circuito istmotectal, se debe mencionar que la liberación de ciertos factores tróficos por parte de neuronas post-sinápticas pueden regular tanto la morfología axónica como el fenotipo neuroquímico de células presinápticas (da Silva y Wang, 2011; Harrington y Ginty, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que el establecimiento del fenotipo neuroquímico final de neuronas del sistema simpático estaría asociado al contacto de las neuronas con sus blancos post-sinápticos (Apostolova y Dechant, 2009). Con respecto a nuestro caso de estudio, contactos sinápticos entre terminales de Ipc y fibras retinianas en TeO no han sido demostrados, pero sí entre los terminales de Ipc y las dendritas de las células ganglionares tectales (TGC). De esta manera, podría proponerse que el establecimiento de contactos sinápticos entre estos dos elementos podría determinar la restricción neuroquímica en Ipc evidenciada en E18 con el cese de expresión de *VACHT*.

## *Organización topográfica*

De lo anterior, se vuelve claro que la actividad neuronal tiene un rol fundamental en el desarrollo y el mantenimiento de los circuitos neuronales. Los cambios morfológicos neuronales resultantes de la actividad eléctrica, y por ende de la liberación de neurotransmisores, se traducen a su vez en la modificación de precisas organizaciones neuronales de mayor escala, como es el caso del mapa retinotópico. Con respecto a este trabajo, para poder sugerir cómo la neuroquímica podría regular el establecimiento del también preciso mapa retinotópico de Ipc sobre el TeO, primero es necesario conocer qué fenómenos median el establecimiento de su proyección. Con respecto a la proyección Ipc-TeO no hay mayor información, pero sí la hay acerca de cómo las fibras de la retina desarrollan su proyección retinotópica sobre TeO, lo cual permitiría sugerir algunos mecanismos análogos para la proyección de Ipc.

Se ha propuesto la participación de dos clases de mecanismos en el desarrollo de la proyección retinotectal, unos independientes de actividad y otros donde la actividad neuronal tiene un rol clave.

La fase dependiente de actividad hace referencia a episodios de actividad espontánea en la retina que coinciden temporalmente con procesos de refinamiento de la proyección retiniana. En mamíferos, se ha comprobado que la inhibición de estas olas de actividad espontánea tempranas además de generar arboles dendríticos grandes y difusos, y por tanto, un campo receptivo más grande de lo normal, provoca una importante desorganización del mapa retinotópico (Huberman y col., 2008; McLaughlin



y O'Leary, 2005; McLaughlin y col., 2003; Wong, 1999; Debski y Cline 2002; Simon y col. 1992; Kobayashi y col., 1990).

En la retina del pollo, olas de actividad espontánea han sido registradas en estadios embrionarios hasta aproximadamente E18 (Catsicas y col., 1998, Wong y col., 1998; Wong, 1999), lo cual coincide con el periodo después del cual es posible distinguir terminales de Ipc maduros (**Figura 17**). Se podría sugerir que una actividad temprana de las células de Ipc en correspondencia con estas olas de actividad, y asociada quizás, con una liberación de acetilcolina en este periodo, podría estar influenciando el refinamiento de sus propios terminales.

Más específicamente y dentro de este mismo contexto dependiente de actividad, es que se ha demostrado un rol clave de la co-transmisión de glutamato en la organización de la proyección tonotópica de ratas. Se ha visto que la inhibición de la liberación de glutamato interfiere con la eliminación de sinapsis y el fortalecimiento de otras, resultando en una notable degradación de la organización topográfica de este mapa (Noh 2010). Lo anterior podría extrapolarse a lo encontrado en esta tesis, donde una posible co-transmisión de acetilcolina y glutamato podría tener un papel determinante en el establecimiento de la proyección topográfica de Ipc sobre el tectum.



**Figura 17. Resumen de eventos durante el desarrollo del sistema visual en *Gallus gallus*.** Esquema del desarrollo temporal de eventos y patrones de expresión descritos para el circuito istmotectal. FR: fibras retinianas.

El análisis anterior se presentó de forma segregada para permitir una mejor exposición de las ideas, sin embargo, es altamente probable que durante el desarrollo exista una influencia múltiple y recíproca entre la actividad de las diversas fibras que conforman el circuito istmo-tectal y que de cuenta de la precisa organización que se alcanza en individuos postnatales.

Aún cuando las ideas discutidas anteriormente forman parte del plano especulativo, estas se basan en algunas observaciones claves que ofrecen cierta factibilidad a lo sugerido, y por lo tanto, un potencial de investigación para estos supuestos. No cabe duda que para comenzar a entender cómo se genera la proyección

topográfica de Ipc sobre el TeO y qué relación tiene con un posible cambio neuroquímico, se vuelven necesarios experimentos del tipo funcional. Dentro de estos, se podría considerar, por un lado, estudiar el desarrollo de los terminales de Ipc *in vivo* mediante el uso de retrovirus que expresen GFP. Por otro lado, se podrían llevar a cabo bloqueos farmacológicos de la actividad eléctrica de las células de Ipc y ensayos inhibitorios de la transmisión colinérgica, mediante el bloqueo de la síntesis y almacenamiento de acetilcolina o el de sus receptores, los cuales permitiría estudiar el efecto de ambos fenómenos sobre el desarrollo axonal y la especificidad topográfica.

En resumen, esta tesis sugiere que durante los estadios embrionarios y hasta la adultez el núcleo SLu conserva su fenotipo colinérgico y que la ausencia de expresión de marcadores resultaría concordante con un fenotipo GABAérgico para Imc. El núcleo Ipc, en cambio, presentaría una identidad tanto colinérgica como glutamatérgica hasta E16, posterior a esto y mediante una restricción del fenotipo neuroquímico, este se limitaría a uno principalmente glutamatérgico.

Además, se propone un desarrollo morfológico temprano para los terminales axónicos de Ipc, coincidente con la ventana temporal donde se liberaría vesicularmente acetilcolina, permitiendo, además, sugerir una acción de este neurotransmisor en el desarrollo de los terminales axónicos y en la maduración del circuito istmotectal. En E13 ya sería posible reconocer arborizaciones terminales y en E18 se observarían terminales con la clásica forma de pincel. Se sugiere también, que algún proceso de remodelamiento, por “poda” o retracción de terminales, podría estar ocurriendo sobre estas arborizaciones.

## CONCLUSIÓN

Hemos definido una ventana temporal, correspondiente a E12 - E16, en donde las células del núcleo Ipc serían capaces de liberar vesicularmente tanto acetilcolina como glutamato. Desde E18 en adelante, esta liberación estaría restringida principalmente a glutamato.

Las células del núcleo SLu mantienen desde los estadios embrionarios analizados hasta la adultez su fenotipo colinérgico y el núcleo Imc presentaría una ausencia de expresión concordante con un fenotipo GABAérgico.

Los terminales axónicos de Ipc muestran un desarrollo mas temprano que el planteado en la hipótesis. En E15 ya se puede reconocer fibras con arboles dendríticos amplios y difusos y en E18 ya se distingue una clara estructura dendrítica en forma de pincel. Se sugiere la posibilidad que un proceso de "poda" y retracción de terminales está mediando el refinamiento de la arborización.

La ventana temporal en que las células de Ipc podrían liberar tanto acetilcolina como glutamato coincide con el periodo en que los terminales de Ipc se desarrollan y maduran, lo cual sugería alguno tipo de correlación funcional entre estos dos procesos.

Por último, los núcleos del complejo de istmo representan un nuevo e interesante modelo para estudiar eventos de modificación del fenotipo neuroquímico en relación al establecimiento de una organizada proyección neuronal.

## BIBLIOGRAFÍA

Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takada J. 2000. Molecular cloning of a novel brain-type Na.-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem.* 74: 2622–2625.

Alfonso A, Grundahl K, McManis JR, Asbury JM, Rand JB. 1994. Alternative splicing leads to two cholinergic proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 241: 627–630.

Apostolova G and Dechant G. 2009. Development of neurotransmitter phenotypes in sympathetic neurons. *Autonomic Neuroscience.* 15: 30–38.

Asadollahi A, Mysore SP, Knudsen EI. 2010. Stimulus-driven competition In a cholinergic midbrain nucleus. *Nat Neurosci.* 13: 889-895.

Ase AR, Reader TA, Hen R, Riad M, Descarries L. 2001. Regional changes in density of serotonin transporter in the brain of 5-HT1A and 5-HT1B knockout mice, and of serotonin innervation in the 5-HT1B knockout. *J. Neurochem.* 78: 619–630.

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.

Ayad Abdelmalik. 2014. Genoarquitectura comparada del mesencéfalo alar en el Ratón y el Pollo. Tesis doctoral.

Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK. 2001. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem.* 276: 36764–36769.

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.

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.

Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X and Spitzer NC. 2004. Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature.* 429: 523-530.

**Braun K., Scheich H, Zuschratter W., Heizmann CW., Matute C., Streit P.** 1988. Postnatal development of parvalbumin-, calbindin- and adult GABA-immunoreactivity in two visual nuclei of zebra finches. *Brain Res.* 475: 205-217.

**Brecha, N.**1978. Some observations on the organization of the avian optic tectum: afferent nuclei and their tectal projections. PhD Thesis, State University of New York: Stony Brook.

**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.

**Brosenitsch, TA y Katz DM.** 2001. Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels. *J. Neurosci.* 21: 2571-2579.

**Brosenitsch, TA y Katz DM.** 2002. Expression of Phox2 transcription factors and induction of the dopaminergic phenotype in primary sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 20: 447-457.

**Carello, CD, Krauzlis RJ.** 2004. Manipulating intent: evidence for acausal role of the superior colliculus in target selection. *Neuron.* 43:575-583.

**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.

**Catsicas M, Bonness V, Becker D, Mobbs P.** 1998. Spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients and their transmission in the developing chick retina. *Curr. Biol.* 8: 283-288.

**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.

**Chen J, Condrón BG.** 2009. *Drosophila* Serotonergic Varicosities Are Not Distributed in a Regular Manner. *J. Comp. Neurol.* 515: 441-453.

**Clarke PGH.** 1982. The generation and migration of the chick's Isthmic complex, *J. Comp. Neurol.* 207: 208- 222.

**Cline HT, Constantine-Paton M.** 1989. NMDA receptor antagonists disrupt the retinotectal topographic map. *Neuron.* 3: 413-426.

**Cui H, Malpelli JG.** 2003. Activity in the parabigeminal nucleus during eye movements directed at moving and stationary targets. *J Neurophysiol.* 89: 3128-3142.

**da Silva S, Wang F.** 2011. Retrograde neural circuit specification by target-derived neurotrophins and growth factors. *Curr Opin Neurobiol.* 21:61-67.

**Daubert EA, Condron BG.** 2010. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci.* 33: 424-434.

**Davis GW, Bezprozvanny, I.** 2001. Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 847-869.

**Dean P, Mitchell IJ, Redgrave P.** 1988. Responses resembling defensive behaviour produced by microinjections of glutamate into superior colliculus of rats. *Neuroscience.* 24: 501-510.

**Dean P, Redgrave P, Westby GWM.** 1989. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci.* 12: 137-147.

**Debski EA, Cline HT.** 2002. Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 93-99.

**Demarque M, Spitzer NC.** 2011. Neurotransmitter phenotype plasticity: An unexpected mechanism in the toolbox of network activity homeostasis. *Devel Neurobio.* 72: 22-32.

**Du Lac S, Knudsen EI.** 1990. Neural maps of head movement vector and speed in the optic tectum of the Barn owl. *J. Neurophysiol.* 63: 131-146.

**Eiden LE.** 1998. The Cholinergic Gene Locus. *J Neurochem.* 70: 2227-22240.

**El Mestikawy S, Wallen-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.

**Freedman EG, Stanford TR, Sparks DL.** 1996. Combined eye-head gaze shifts produced by electrical stimulation of the superior colliculus in rhesus monkeys. *J. Neurophysiol.* 76: 927-952.

**Gamlin P, Reiner A, Keyser KT, Brecha N, Karten HJ.** 1996. Projection of the Nucleus pretectalis to a retinorecipient tectal layer in the pigeon (*Columbia livia*). *J Comp Neurol.* 368 : 424- 438.

**Goldberg ME, Wurtz RH.** 1972. Activity of superior colliculus in behaving monkey. II. Effect of attention on neuronal responses. *J. Neurophysiol.* 35: 560–574.

**Gonzalez- Cabrera y col.,** 2014. En prep. Is the Isthmi pars Parvocellularis Indeed Cholinergic? Expression of Glutamatergic and Cholinergic Markers in the Isthmic Complex of the Chick (*Gallus gallus*).

**Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S.** 2002. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci.* 22: 5442–5451.

**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.

**Gutierrez R, Romo-Parra H, Maqueda J, Vivar C, Ramirez M, Morales MA, Lamas M.** 2003. Plasticity of the GABAergic phenotype of the “glutamatergic” granule cells of the rat dentate gyrus. *J Neurosci.* 23: 5594–5598.

**Harrington AW, Ginty DD.** 2013. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci.* 14: 177-187.

**Heidmann S., Luksch H.** 2001. Development of retino-recipient projection neurons in the optic tectum of the chicken.. *Dev Brain Res.* 128: 149-156.

**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, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S.** 2004. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience.* 123: 983–1002.

**Huberman AD, Feller MB, Chapman B.** 2008. Mechanisms Underlying Development of Visual Maps and Receptive Fields. *Annu Rev Neurosci.* 31: 479–509.

**Hunt, SP., Künzle, H.** 1976. Observations on the projections and intrinsic organization of the pigeon optic tectum: an autoradiographic study based on anterograde and retrograde, axonal and dendritic flow. *J Comp Neurol.* 170: 153–172.

**Hunt, SP., Streit, P., Künzle, H., Cuénod, M.** 1977. Characterization of the pigeon isthmo-tectal pathway by selective uptake and retrograde movement of radioactive



compounds and by Golgi-like horseradish peroxidase labeling. *Brain Res.* 129: 197–212.

**Islam, M. R. and 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, Cox K, Mpodozis J.** 1997. Two distinct populations of tectal neurons have unique connections within the retinotectoretinal pathway of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 387: 449–465.

**Kawano K, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H, Hisona S.** 2006. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 498: 581–592.

**Keay KA, Redgrave P, Dean P.** 1988. Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res Bull.* 20: 13-26.

**Kelly JP, Cowan WM.** 1972. Studies on the development of the chick optic tectum. III. Effects of early eye removal. *Brain Res.* 42: 263-288.

**Kitamoto T, Wang W, Salvaterra PM.** 1998. Structure and organization of the *Drosophila* cholinergic locus. *J. Biol. Chem.* 273: 2706–2713.

**Knudsen, EI.** 2007. Fundamental Components of Attention. *Annual Review of Neuroscience.* 30: 57–78.

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

**Kobayashi T, Nakamura H, Yasuda M.** 1990. Disturbance of refinement of retinotectal projection in chick embryos by TTX and grayanotoxin. *Dev. Brain Res.* 57: 29–35.

**Koert CE, Spencer GE, Minnen JV, Li KW, Geraerts WPM, Syed NI, Smit AB, Van Kesteren E.** 2001. Functional implications of neurotransmitter expression during axonal regeneration: serotonin, but not peptides, auto-regulate axon growth of an identified central neuron. *J. Neurosci.* 21: 5597–5606.

**LaVail JH, Cowan, WM.** 1971. The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development, *Brain Res.* 28: 391–419.

**Lovejoy LP, Krauzlis RJ.** 2010. Inactivation of primate superior colliculus impairs covert selection of signals for perceptual judgments. *Nat. Neurosci.* 13: 261–266.

**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.

**Maczko KA, Knudsen PF, Knudsen EI.** 2006. Auditory and visual space maps in the cholinergic nucleus isthmi pars parvocellularis of the barn owl. *J Neurosci.* 26: 12799-12806.

**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 GJ., Durán E., Morales C., González-Cabrera C., Sentis E., Mpodozis J., Letelier JC.** 2012. Attentional Capture? Synchronized Feedback Signals from the Isthmi Boost Retinal Signals to Higher Visual Areas. *J Neurosci.* 32: 1110-22.

**Masino T, Knudsen EI.** 1993. Orienting head movements resulting from electrical microstimulation of the brain-stem tegmentum in the Barn owl. *J Neurosci.* 13: 351-370.

**Mattson MP.** 1988. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res.* 13: 179-212.

**McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD.** 2003. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron.* 40: 1147-1160.

**McLaughlin T, O'Leary DD.** 2005. Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 327-355.

**McPeck, RM, Keller EL.** 2004. Deficits in saccade target selection after inactivation of superior colliculus. *Nat. Neurosci.* 7 : 757-763.

**Medina L, Reiner A.** 1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J Comp Neurol.* 342: 497-537.

**Mey J, Thanos S.** 2000. Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis, *Brain Res.* 32: 343–379.

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

**Muller JR, Philiastides G, Newsome WT.** 2005. Microstimulation of the superior colliculus focuses attention without moving the eyes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102: 524–529.

**Nakamura H, O'Leary DDM.** 1989. Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axon remodelling to develop topographic order, *J. Neurosci.* 9: 3776–3795.

**Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G.** 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* 305: 187-202.

**Ni B, Rosteck PR Jr, Nadi NS, Paul SM.** 1994. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na- dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 5607–5611.

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

**Noh J, Seal RP, Garver JA, Edwards RH, Kandler K.** 2010. Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat Neurosci.* 13: 232-238.

**O'Malley, D.M., Sandell, J.H., and Masland, R.H.** 1992. Co-release of acetylcholine and GABA by the starburst amacrine cells. *J. Neurosci.* 12: 1394–1408.

**Oda Y.** 1999. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.* 49: 921-937.

**Pathania M, Yan LD, Bordey A.** 2010. A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis. *Neuropharmacology.* 58: 865-876.

**Port NL, Wurtz RH.** 2009. Target selection and saccade generation in monkey superior colliculus. *Exp Brain Res.* 192: 465-477.

**Puelles L, Martínez de la Torre M.** 1987. Autoradiographic and Golgi study on the early development of n. Isthmi principalis and adjacent grisea in the chick embryo: a tridimensional viewpoint, *Anat. Embryol.* 176: 19–34.

- 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.
- Root CM, Velazquez-Ulloa NA, Monsalve GC, Minakova E and Spitzer NC.** 2008. Embrionically expressed GABA and glutamate drive electrical activity regulating neurotransmitter specification. *J Neurosci.* 28: 4777-4784.
- Safiulina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E.** 2006. GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci.* 26: 597-608.
- Safiulina VF, Caiati MD, Sivakumaran S, Bisson G, Migliore M, Cherubini E.** 2010. Control of GABA release at mossy fiber-CA3 connections in the developing hippocampus. *Front Synaptic Neurosci.* 2: 1-11.
- Sahibzada N, Dean P, Redgrave P.** 1986. Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in rats. *J Neurosci.* 6: 723-733.
- Scheetz AJ, Constantine-Paton M.** 1994. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* 8: 745-752.
- Scicolone G, Pereyra-Alfonso S, Brusco A, Pecci Saavedra J, Flores V.** 1995. Development of the laminated pattern of the Chick tectum opticum. *Int J Dev Neurosci.* 13: 845-858.
- Schütz B, Weihe E, Eiden LE.** 2001. Independent patterns of transcription for the products of the rat cholinergic gene locus. *Neuroscience.* 104: 633-42.
- Seal RP, Edwards RH.** 2006. Functional implications of neurotransmitter co-release: Glutamate and GABA share the load. *Curr Opin Pharmacol.* 6: 114-119.
- Shreesh PM, Knudsen EI.** 2011. The role of a midbrain network in competitive stimulus selection. *Curr Opin Neurobiol.* 21: 653-660.
- Simon, DK, and O'Leary DDM.** 1992. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J. Neurosci.* 12: 1212-1232.
- Simon DK, Prusky GT, O'Leary DDM, Constantine-Paton M.** 1992. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 10593-97.

**Smear MC, Tao HW, Staub W, Orger MB, Gosse NJ, Liu Y, Takahashi K, Poo M, Baier H.** 2007. Vesicular Glutamate Transport at a Central Synapse Limits the Acuity of Visual Perception in Zebrafish. *Neuron*. 53: 65–77.

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

**Spitzer NC.** 2006. Electrical activity in early neuronal Development. *Nature*. 444: 707-712.

**Spitzer NC.** 2012. Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nature*. 13: 94-106.

**Spitzer NC, Borodinsky LN, Root CM.** 2005. Homeostatic activity-dependent paradigm for neurotransmitter specification. *Cell Calcium*.37: 417-423.

**Stryker MP, Schiller PH.** 1975 : Eye and head movements evoked by electrical stimulation of monkey superior colliculus. *Exp Brain Res*. 23: 103- 112.

**Sykes PA, Condron BG.** 2005. Development and sensitivity to serotonin of *Drosophila* serotonergic varicosities in the central nervous system. *Dev. Biol*. 286: 207–216.

**Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R.** 2000. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*. 407: 189–194.

**Trudeau LE, Gutierrez R.** 2007. On cotransmission & neurotransmitter phenotype plasticity. *Mol. Interv*. 7:138-146.

**Vaage S.**1973. The histogenesis of the isthmic nuclei in chick embryos (*Gallus domesticus*), *Z. Anat. Entwicklungsgesch*. 142 : 283– 314.

**Vitalis T, Cases O, Passemard S, Callebert J, Parnavelas JG.** 2007. Embryonic depletion of serotonin affects cortical Development. *Eur J Neurosci*. 26: 331–344.

**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.

**Wang DD, Kriegstein AR.** 2008. GABA Regulates Excitatory Synapse Formation in the Neocortex via NMDA Receptor Activation. *J Neurosci.* 28: 5547-5558.

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

**Weng- Chang Li.** 2009. The co-release of glutamate and acetylcholine in the vertebrate nervous system. En R. Gutierrez, Co-Existence and Co- Release of classical neurotransmitter,pp 1-18.

**West AR, Griffith EC, Greenberg ME.** 2002. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci.* 3:921-931.

**Wolfram V, Baines RA.** 2013. Blurring the boundaries: developmental and activity-dependent determinants of neural circuits. *Trends Neurosci.*XX:1-10.

**Wong WT, Sanes JR, Wong ROL.** 1998. Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina. *J. Neurosci.* 18: 8839-52.

**Wong RO.** 1999. Retinal waves and visual system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 29-47.

**Wong ROL, Ghosh A.** 2003. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci.* 3: 803-812.

**Wurtz RH, Albano JE.**1980. Visual-motor function of the primate superior colliculus. *Annu. Rev. Neurosci.* 3: 189-226.

**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.