

**LA RED ISTMO-TECTAL: MODULACIÓN DE LA
ACTIVIDAD VISUAL EN EL TECTUM ÓPTICO DE
LAS AVES**



Tesis

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

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

Facultad De Ciencias

Por

Macarena Faunes Carvallo

Diciembre, 2011

Director de Tesis Dr: Jorge Mpodozis

UCH-FC
DOC-BMCN
F.264
C.1

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

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

Macarena Faunes Carvallo

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 31 de agosto de 2011.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis

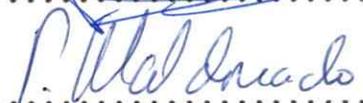
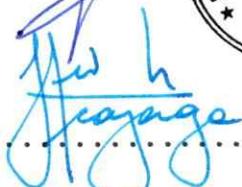
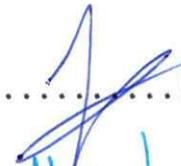
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga

Dr. Francisco Aboitiz

Dr. Pedro Maldonado

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



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

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

MACARENA FAUNES CARVALLO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 31 de agosto de 2011.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Julio Alcayaga

Dr. Francisco Aboitz

Dr. Pedro Maldonado

A los impulsores del movimiento por la educación pública

Estoy muy agradecida por todo el cariño y el apoyo que he recibido de la gente que ha estado cerca mío durante este largo período. Gracias a mis padres, Victoria y Martín, mis hermanos, Martín y Nicolás, y a Chico y su familia.

Toda la gente del Rayo me ha ayudado de alguna manera. Gracias a ellos por eso y por su amistad. Sara Fernández, Carlos Salas y Patricio Ahumada han trabajado conmigo en muchas de las cosas que presento en esta tesis. Cristian Morales, Ernesto Durán, Maricel Quispe, Cristian González, Solano Henríquez y Elisa Sentis también me ayudaron miles de veces. Cristián Gutiérrez y Natalia Márquez me han acompañado desde lejos.

El profesor Óscar Muñoz y el equipo de natación de la Facultad me acogieron durante los últimos años del doctorado, a pesar de ser una nadadora poco competitiva.

Agradezco también a los miembros de mi comisión evaluadora, Julio Alcayaga, Pedro Maldonado y Francisco Aboitiz por su tiempo y sus valiosos consejos y críticas.

Por último, gracias a mis admirados profesores y queridos amigos Gonzalo Marín y Jorge Mpodozis, que me han tenido casi tanta paciencia como yo a ellos. Gonzalo, quien lleva algunos años estudiando el istmo de las aves, ha sido mi principal guía en este trabajo. El que no figure como mi tutor de tesis es debido sólo a motivos formales.



INDICE DE MATERIAS

...

1.	INTRODUCCION	1
1.1	Circuitos de retroalimentación en sistemas sensoriales	1
1.2	Atención visual espacial	4
1.3	El colículo superior y la red istmotectal como modelos de atención visual espacial	6
1.4	Organización de la vía tectofugal de las aves	8
1.5	Organización de la red istmotectal	11
1.6	La red istmotectal: Modulación del flujo visual tectal y atención espacial	16
1.7	Hipótesis	20
1.8	Objetivos	21
2.	MATERIALES Y METODOS	23

2.1.	Obtención de animales	23
2.2.	Procedimientos quirúrgicos	24
2.3.	Registros <i>in vivo</i>	26
2.4	Estimulación visual	27
2.5	Adquisición y análisis de datos	28
2.6	Inyección de trazadores	28
2.7	Procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos	30
2.8	Medidas de diámetros y densidades celulares	32
2.9	Estimaciones de volúmenes y número de células en el núcleo Imc del diamante y el zorzal	32
3.	RESULTADOS	34
3.1	Efecto de la activación e inhibición del núcleo Ipc y de la aplicación de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre las respuestas visuales registradas en el TeO	34
3.1.1	Registros extracelulares <i>in vivo</i> en el TeO y el núcleo Ipc	34
3.1.2	La sobre-activación del núcleo Ipc produce un aumento en la transmisión sináptica retino-tectal	38
3.1.3	La inactivación del núcleo Ipc produce una reducción en la transmisión sináptica retino-tectal	40

3.1.4	La aplicación de agonistas muscarínicos en las capas superficiales del TeO produce un aumento en las respuestas visuales en el TeO y el núcleo Ipc	42
3.1.5	La adaptación de las respuestas tectales a estímulos visuales repetitivos no es afectada por la actividad del núcleo Ipc ni por la aplicación de agonistas o antagonistas colinérgicos en el TeO	51
3.1.6	Distribución de receptores muscarínicos en el TeO	54
3.1.7	La aplicación de acetilcolina o nicotina en las capas superficiales del TeO produce un aumento en la actividad espontánea en el núcleo Ipc	57
3.2	Conexiones del núcleo Imc en Passeriformes	61
3.2.1	Las células que proyectan al núcleo Ipc y al TeO están entremezcladas en el núcleo Imc del pollo	61
3.2.2	El núcleo Imc está organizado en dos divisiones en Passeriformes	64
3.2.3	La division interna del núcleo Imc de Passeriformes contiene células más grandes y presenta menor densidad celular que la division externa	66
3.2.4	La division externa del núcleo Imc del diamante mandarín	67

proyecta al núcleo Ipc, mientras que la division interna proyecta al TeO	
3.2.5 Estimación del volumen y número de células en el núcleo Imc interno y externo en el diamante mandarín y en el zorzal	70
4. DISCUSION	73
4.1 Efecto de la activación del núcleo Ipc y aplicación de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre las respuestas visuales registradas en el TeO	76
4.1.1 Inhibición y sobreactivación del núcleo Ipc	76
4.1.2 Efecto de la aplicación de agonistas y antagonista colinérgicos en el TeO sobre las respuestas visuales registradas en el TeO	79
4.1.3 Distribución de receptores muscarínicos en el TeO de la paloma	82
4.1.4 Efecto de la aplicación de agonistas y antagonista colinérgicos sobre la actividad espontánea del núcleo Ipc	83
4.1.5 Adaptación de las respuestas visuales en el TeO y el núcleo Ipc	85

4.1.6	Comparación con otros vertebrados	86
4.2	Conexiones del núcleo Imc en Passeriformes	89
4.2.1	Significado funcional de la segregación espacial del núcleo Imc en Passeriformes	89
4.2.2	El núcleo Imc en Passeriformes	90
4.2.3	Comparación con otros diápsidos	91
4.2.4	El diamante mandarín como modelo animal para el estudio del circuito istmo-tectal	92
4.3	Conclusiones finales	93
5.	BIBLIOGRAFIA	95

LISTA DE FIGURAS

1.	Trayectoria de la mirada en la observación de un rostro	6
2.	Los núcleos del istmo y el tectum óptico de las aves	13
3.	Esquema de la red istmotectal	18
4.	Registro <i>in vivo</i> de respuestas visuales en el tectum óptico (TeO) y en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) de la paloma	36
5.	Adaptación de las respuestas visuales registradas en el tectum óptico (TeO) a la presentación repetitiva de destellos de luz	39
6.	La sobre-activación del núcleo istmo parvocelular (Ipc) provoca un aumento en los potenciales evocados retino-tectales	41
7.	La inactivación del núcleo istmo parvocelular (Ipc) produce una reducción en los potenciales evocados retino-tectales	43

8.	Efecto de agonistas y antagonista colinérgicos sobre los potenciales evocados retino-tectales	46
9.	Efecto de agonistas y antagonista colinérgicos sobre la descarga de ráfagas tectales visuales	47
10.	La aplicación de agonistas colinérgicos muscarínicos en el tectum óptico (TeO) produce un aumento en los potenciales evocados retino-tectales aun si el núcleo istmo parvocelular (Ipc) se mantiene inactivado	50
11.	La adaptación de las respuestas visuales de TeO e Ipc a estímulos repetitivos	53
12.	Inmunoreactividad para receptores muscarínicos en el tectum óptico (TeO) y los núcleos del istmo en la paloma	56
13.	La microinyección de acetilcolina o nicotina en las capas superficiales del tectum óptico (TeO) produce un aumento en la actividad espontánea en el núcleo istmo parvocelular (Ipc)	59
14.	La microinyección de acetilcolina o nicotina en las capas superficiales del tectum óptico (TeO) produce un aumento en la actividad espontánea en el núcleo istmo parvocelular (Ipc),	

- independientemente de la actividad de la retina 60
15. Ejemplos de células marcadas retrogradamente en el núcleo istmo magnocelular (Imc) después del depósito de cristales de biocitina conjugada con rodamina en el tectum óptico (TeO) y de BDA conjugado con fluoresceína en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) en rebanadas de mesencéfalo de pollo (*Gallus gallus*) 63
16. Secciones coronales teñidas con Nissl que muestran el núcleo istmo magnocelular (Imc) en distintas especies de Passeriformes y no Passeriformes 65
17. Tamaños celulares y densidad celular en las divisiones interna y externa del núcleo istmo magnocelular (Imc-in e Imc-ex) en varias especies de Passeriformes 67
18. Ejemplos de células retrógradamente marcadas en el núcleo istmo magnocelular del diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*) luego del depósito de cristales de biocitina en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) y en el tectum óptico (TeO) en rebanadas de mesencéfalo 69
19. Ejemplos de células marcadas retrógradamente en el núcleo istmo magnocelular (Imc) después del depósito de un cristal de biocitina conjugada con rodamina en el tectum óptico (TeO) y otro de BDA

conjugado con fluoresceína en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) en rebanadas de mesencéfalo de diamante mandarín (<i>Taeniopygia guttata</i>)	71
20. Ejemplos de células retrógradamente marcadas en el núcleo istmo magnocelular del diamante mandarín (<i>Taeniopygia guttata</i>) luego de una microinyección in vivo de CTB en el tectum óptico.	72
21. Conclusiones	88
22. Al menos tres tipos de núcleo istmo magnocelular en diápsidos	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ChAT+	Immunopositivo para colina acetil transferasa
CTGs	Células tectales ganglionares
Imc	Núcleo istmo magnocelular
Imc-ex	Subdivisión externa del núcleo istmo magnocelular
Imc-in	Subdivisión interna del núcleo istmo magnocelular
Ipc	Núcleo istmo parvocelular
Rt	Núcleo rotundus
SLu	Núcleo semilunaris
TeO	Tectum óptico

RESUMEN

El tectum óptico (TeO) recibe una proyección de la retina contralateral. Los núcleos del complejo del istmo se conectan recíprocamente con el TeO, de manera que proveen una señal de retroalimentación visual a la neuropila retino-tectal. El complejo del istmo se compone de los núcleos inmunopositivos para colina acetil-transferasa (ChAT+) istmo parvocelular (Ipc) y semilunaris (SLu) y del núcleo GABAérgico istmo magnocelular (Imc). Las proyecciones del núcleo Ipc sobre el TeO son topográficas y homotópicas, mientras que los axones de las células del núcleo Imc se ramifican sobre grandes áreas en el TeO. El núcleo Imc proyecta también a los núcleos Ipc y SLu.

Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que el núcleo Ipc ejerce un efecto de compuerta en el flujo visual ascendente tecto-talámico. Sin embargo, el efecto de este núcleo sobre las respuestas visuales tectales ha sido previamente reportado como inhibitorio.

En nuestro laboratorio también se ha mostrado que en la retroalimentación que el TeO recibe del núcleo Ipc ocurre una selección

competitiva de estímulos visuales, mediada por una inhibición de largo alcance producida por el núcleo Imc. Esta selección de estímulos sería relevante en la atención visual espacial del animal. En el pollo, se ha propuesto que las células de Imc que proyectan al TeO y las que proyectan a los núcleos Ipc y SLu son dos poblaciones diferentes, pero que están entremezcladas espacialmente. Se desconoce si es que las aferencias tectales que reciben estas dos poblaciones son diferentes.

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar la manera en que el núcleo Ipc modula las respuestas visuales en el TeO. Específicamente, estudiamos *in vivo* el efecto de la hiperactivación e inhibición del núcleo Ipc, así como de la aplicación de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre las respuestas visuales en TeO. Mostramos que el núcleo Ipc produce un aumento en los potenciales visuales retino-tectales. Nuestros resultados sugieren que este efecto ocurriría a través de receptores colinérgicos muscarínicos, posiblemente postsinápticos. Además hemos mostrado que la activación de receptores colinérgicos nicotínicos en el TeO produce un aumento en la actividad espontánea en el núcleo Ipc, con independencia de la actividad retiniana. Así, la activación del núcleo Ipc produciría un aumento en las respuestas visuales tectales a través de receptores muscarínicos, prolongando así su propia actividad visual y concomitantemente su propia actividad espontánea a través de receptores

nicotínicos.

Además, estudiamos las proyecciones del núcleo Imc en el diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*), ya que se ha reportado que en esta especie dicho núcleo está compuesto por dos subdivisiones. Haciendo inyecciones de trazadores neuronales tanto en rebanadas como *in vivo*, mostramos que las dos poblaciones celulares separadas en el núcleo Imc del diamante mandarín corresponden a los dos tipos celulares hodológicamente definidos en el núcleo Imc del pollo. Además hemos observado la misma segregación del núcleo Imc en otras cuatro especies de Passeriformes, y constatado su ausencia en otros grupos de aves, sugiriendo que la segregación de este núcleo en dos subpoblaciones separadas podría ser un rasgo propio de Passeriformes. El diamante mandarín ofrece una herramienta excepcional para el estudio del circuito istmo-tectal, ya que permite estudiar la fisiología y anatomía de las dos subpoblaciones celulares del núcleo Imc por separado.

ABSTRACT

The optic tectum (TeO) receives a projection from the contralateral retina. The nuclei of the isthmic complex are reciprocally connected with the TeO, thus providing a visual feedback signal upon the retino-tectal neuropile. The isthmic complex is composed of the choline acetyl-transferase immunopositive (ChAT+) nuclei isthmi parvocellularis (Ipc) and semilunaris (SLu), and the GABAergic nucleus isthmi magnocellularis (Imc). The projection of Ipc to TeO is topographic and homotopically organized, while Imc axons branch in wide areas in TeO. Imc also sends diffuse projections to Ipc and SLu.

Studies carried in our laboratory show that Ipc exerts a gating of the ascending visual activity in the tecto-talamic pathway. Nevertheless, the effect of Ipc on the tectal visual responses has been previously reported to be inhibitory.

Also in our laboratory, it has been shown that a competitive selection of visual stimuli takes place in the feedback signal from Ipc to TeO. This competition is mediated by long-range inhibition produced by Imc. This

stimuli selection would be relevant for the visual spatial attention of the animal. In the chick, it has been proposed that Imc cells projecting to TeO and Ipc/SLu are different subpopulations, which would be found intermingled in the nucleus. It is unknown whether the tectal afferences received by these two cell types are the same.

The main objective of this thesis was to study the way in which Ipc modulates the visual responses of TeO. Specifically, we studied *in vivo* the effect of over-activating and inhibiting Ipc, as well as the effect of cholinergic agonists and antagonists upon the tectal visual responses. We show that Ipc activation increases the retino-tectal potentials. Our results suggest that this effect would be mediated by muscarinic acetylcholine receptors, presumably postsynaptic. We also show that nicotinic receptor activation in TeO raises the spontaneous activity in Ipc, independently of retinal activity. Thus, Ipc activation would increase the tectal visual responses via muscarinic receptors, concomitantly prolonging its own visual responses, and its own spontaneous activity by means of nicotinic receptors in TeO.

We also studied the projections of Imc in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*), since this nucleus has been previously reported to be composed of two anatomical subdivisions in this species. By injecting retrograde neural tracers both *in vitro* and *in vivo*, we show that the two subpopulations of cells hodologically defined in the chick Imc are anatomically segregated in the

zebra finch Imc. Moreover, we have found the same Imc segregation in four other passerine species, and the homogeneous Imc pattern of the chick in other non-passerines species. These results suggest that the Imc anatomical segregation could be exclusive of passerines. Therefore, the zebra finch offers a great opportunity to further explore the isthmotectal network, since it allows the study of the physiology and anatomy of the two Imc cell types separately.

1. INTRODUCCION

1.1 Circuitos de retroalimentación en sistemas sensoriales

El funcionamiento de los sistemas sensoriales suele ser descrito como un flujo unidireccional de actividad desde los órganos transductores periféricos hacia núcleos centrales conectados serialmente, en los que las propiedades de los campos receptivos en cada uno se construyen a partir del anterior. Sin embargo, este esquema no puede sino ser insuficiente (König y Luksch, 1998), ya que ignora la presencia de proyecciones centrífugas de retroalimentación. Ya Ramón y Cajal (1899, 1904) describió fibras centrífugas en la retina y en el bulbo olfatorio de vertebrados. También en el sistema auditivo de vertebrados las propias células receptoras reciben proyecciones centrales, y muchas de las conexiones entre núcleos del bulbo raquídeo y mesencefálicos, y entre estos

últimos y el tálamo son recíprocas (revisado por Spangler y Warr, 1991). En mamíferos, las cortezas sensoriales devuelven proyecciones a las regiones del tálamo de las cuales recibe aferencias (Diamond y col., 1969). Estas proyecciones llegan a ser tan profusas, que en el tálamo visual el núcleo geniculado lateral recibe más sinapsis de la corteza que de la retina (Montero, 1991). Las cortezas sensoriales también proyectan a los centros sensoriales mesencefálicos (Yan y Suga, 1998; Hashemi-Nezhad y col., 2003).

Aun así, las funciones cumplidas por las proyecciones de retroalimentación en los sistemas sensoriales permanecen relativamente desconocidas. Uno de los aspectos explorados ha sido la modulación de los campos receptivos de células en niveles más periféricos por parte de proyecciones centrífugas, como por ejemplo, cambios en la frecuencia preferida en células auditivas, o cambios en orientación preferida en células visuales sensibles a movimiento (Yan y Suga, 1998; Hashemi-Nezhad y col., 2003). Esta plasticidad permitiría que el sistema responda de distintas maneras de acuerdo al contexto sensorial (Suga y Schlegel, 1972; Lee y col., 2002; Chacron y col., 2003). Otro de los papeles propuestos para los circuitos de retroalimentación es la selección de estímulos en la atención (King, 1997; Knudsen, 2007; Saalman y col., 2007). Se ha mostrado que señales de retroalimentación originadas en niveles superiores de una vía sensorial

modulan las respuestas de las neuronas en los niveles precedentes. Por ejemplo, estudios realizados en primates sugieren que la corteza prefrontal produce una modulación de las respuestas en la corteza visual cuando el animal realiza una tarea de atención visual (Moore y Armstrong, 2003; revisado por Bisley, 2011).

En esta tesis se abordarán algunas preguntas básicas sobre la fisiología y anatomía de un circuito de retroalimentación de la actividad visual presente en el mesencéfalo de aves, que está involucrado en la atención visual espacial. Mediante registros *in vivo* y microinyección de agonistas y antagonistas colinérgicos en palomas anestesiadas mostraremos cómo un circuito de retroalimentación colinérgica incrementa las respuestas visuales en el principal centro retino-recipiente del cerebro de las aves. Además exploraremos la organización anatómica de un circuito GABAérgico funcionalmente complementario al primero y propondremos un nuevo modelo aviario para su estudio.

1.2 Atención visual espacial

La atención espacial es la percepción selectiva de estímulos provenientes de una cierta región del espacio. La atención espacial auditiva, por ejemplo, se pone de manifiesto a través de nuestra capacidad de escuchar lo que dice una sola persona en medio de un grupo de gente conversando al mismo tiempo, como suele ocurrir en una reunión social, fenómeno conocido como *cocktail party effect* (revisado por Bronkhorst, 2000). Un factor importante que permite que esto ocurra es nuestra capacidad de atender a los sonidos provenientes del lugar donde está nuestro interlocutor, ignorando los sonidos que vienen de otras posiciones en el espacio (Cherry, 1953; Saupe y col., 2010). Este ejemplo ilustra el hecho de que la percepción es selectiva. Por otra parte, si alguien en la reunión sorpresivamente comienza a hablar muy alto, capturarán nuestra atención. De modo que los estímulos suficientemente fuertes pueden “competir” por la atención del observador.

Así como la audición, la visión también es un proceso selectivo. La retina de los primates sólo tiene alta resolución espacial en la fovea. Nosotros no atendemos simultáneamente a todo nuestro campo visual, sino que lo exploramos moviendo constantemente la mirada. En la figura 1 se muestra la trayectoria seguida por la mirada de un observador que examina un retrato. La

mirada recorre la imagen experimentando movimientos bruscos. En humanos estos movimientos, denominados "movimientos sacádicos" o "sacadas", ocurren alrededor de tres veces por segundo (Yarbus, 1967). Como se puede apreciar en la figura, la mirada se detiene en puntos de interés particular y no en un punto cualquiera. Esto significa que antes de que ocurra una sacada ha ocurrido una selección del lugar donde se posará la mirada, es decir, la atención se ha movido antes de que se muevan los ojos (Posner, 1980; Thompson y col., 2005), lo que ha sido directamente demostrado en experimentos realizados en humanos (por ejemplo ver Fan y col., 2002). Por lo tanto, a pesar de que la atención visual suele ir hacia el lugar del espacio donde está la fovea, ésta puede estar en un lugar diferente del que se está mirando. En el primer caso se habla de *atención manifiesta* y en el segundo de *atención encubierta* (Posner, 1980). Esto también queda en evidencia cada vez que no queremos que otros se den cuenta de que estamos atendiendo a un estímulo, por lo que atendemos a él sin mirarlo directamente. En el proceso de dirigir la atención a un lugar del espacio, la competencia de estímulos en la visión resulta tan evidente como en la audición. En efecto, estímulos visuales como colores muy contrastantes, o estímulos en movimiento capturan fácilmente nuestra atención y son seleccionados sobre otros estímulos presentes en la escena visual.

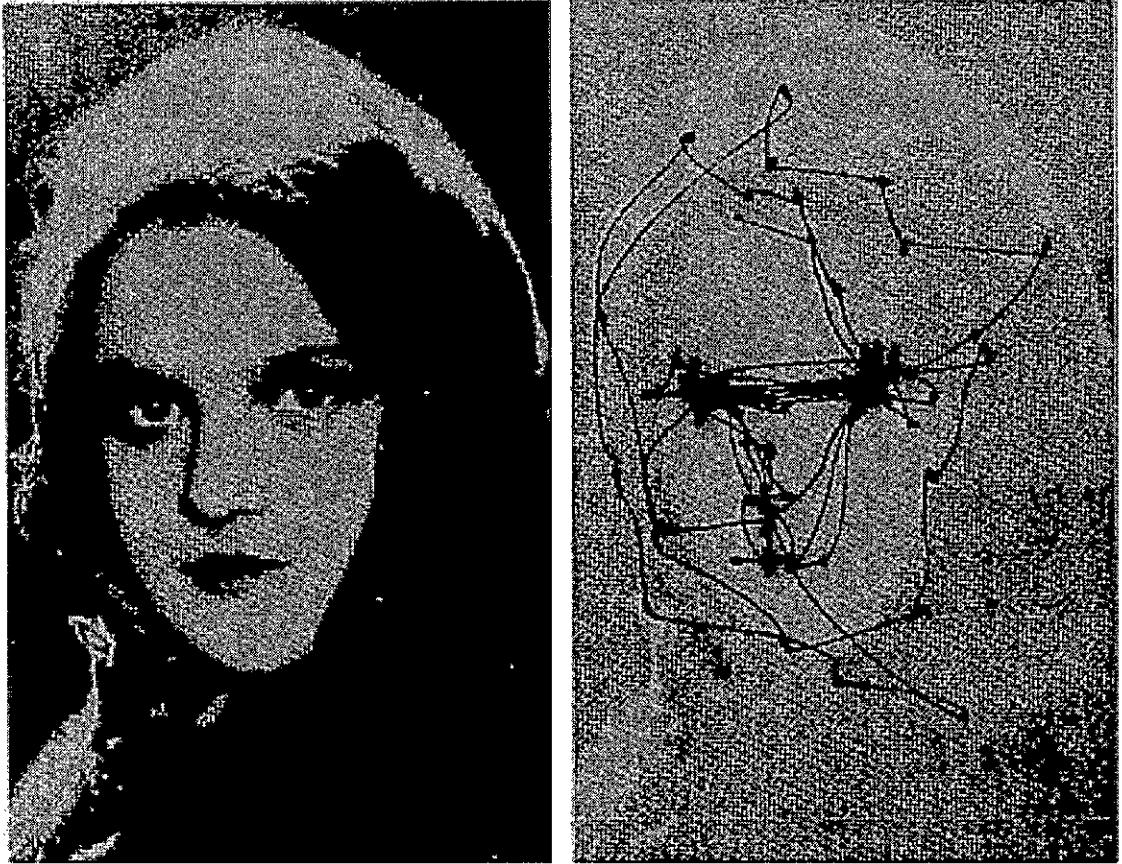


Figura 1. Trayectoria de la mirada en la observación de un rostro.

Registro de los movimientos oculares durante la examinación libre de la fotografía con ambos ojos durante un minuto (representados por el trazo negro de la derecha). Tomado de Yarbus (1967).

1.3 El colículo superior y la red istmo-tectal como modelos de atención visual espacial

Numerosos estudios en mamíferos muestran que el colículo superior, estructura laminada retino-recipiente ubicada en el techo del mesencéfalo, está involucrado

en la generación de movimientos oculares sacádicos (Stryker y Schiller, 1975; Wurtz y Albano, 1980). Más aun, esta estructura está involucrada también en la selección del blanco visual hacia donde se realizará la sacada, es decir, en movimientos encubiertos de la atención visual (Müller y col., 2005; Port y Wurtz, 2009). El núcleo mesencefálico parabigeminal, considerado como un núcleo satélite del colículo superior debido a la conectividad recíproca que sostiene con sus capas superficiales, también estaría involucrado en la selección del blanco de la sacada (Cui y Malpeli, 2003).

El tectum óptico (TeO) es el homólogo de las capas superficiales del colículo superior de mamíferos en el resto de los vertebrados. En aves y reptiles, animales más visuales que los mamíferos, el TeO es prominente y altamente diferenciado. También lo son los núcleos del complejo del istmo, homólogos al núcleo parabigeminal de mamíferos y conectados recíprocamente con el TeO. Desde que la anatomía fina del circuito istmo-tectal comenzó a ser desentrañada, se ha sugerido que éste podría tener un posible papel en la selección de estímulos visuales (Serenó y Ulinski, 1987). Estudios más recientes realizados en aves han mostrado que los núcleos del istmo forman un circuito que permite la competencia en el TeO entre aferencias visuales (y también auditivas) provenientes de estímulos presentados simultáneamente en distintos

lugares del espacio (revisado en Gruberg y col., 2006; Marín y col., 2007, Asadollahi y col., 2010).

1.4 Organización de la vía tectofugal de las aves

En vertebrados, las células ganglionares de la retina proyectan en su mayoría a dos blancos centrales principales: el TeO y el tálamo dorsal, dando origen a las dos vías visuales principales, la vía tectofugal y la vía tálamofugal. En aves, la mayor parte de las fibras contribuyen a la vía tectofugal, es decir, la vía que va de la retina al TeO, del TeO al núcleo talámico rotundus (Rt), y del núcleo Rt al núcleo telencefálico entopalio (Mpodosis y col., 1996; Karten y col., 1997). Lesiones en los núcleos de esta vía afectan severamente la realización de diversas conductas visuales, tales como la discriminación de intensidad, formas, color y movimiento (Hodos y Karten, 1970; Weiss y Hodos, 1986; Hodos y col., 1988; Chaves y Hodos, 1998; Nguyen y col., 2004), poniendo de manifiesto su relevancia para el comportamiento visual de estos animales.

Además de las aferencias retinianas, el TeO recibe aferencias de varias estructuras talámicas, pretectales y telencefálicas. Las principales eferencias del TeO son hacia el núcleo Rt y a los núcleos del istmo, además de otras

proyecciones a núcleos visuales del tálamo, a la formación reticular mesencefálica y al núcleo lateral del puente, entre otros (revisado por Luksch, 2003; Wylie y col., 2009).

En aves, el TeO es una estructura laminada formada por 15 capas celulares y plexiformes claramente definidas, denominándose como "capa 1" la más superficial y "capa 15" la más profunda. En las capas celulares del TeO encontramos células horizontales y radiales, muchas de las cuales son interneuronas intratectales. Las fibras provenientes de la retina contralateral invaden la superficie del TeO y lo penetran radialmente para terminar en alguna de las siete capas más externas, siendo la capa 5 la más prominente de éstas. Esta proyección es estrictamente topográfica (Hunt y Webster, 1975), de manera que en el TeO se forma un mapa completo del campo visual de la retina contralateral.

En la capa 13 del TeO se ubican los somas de las células tectales ganglionares (CTGs), que originan la masiva proyección al núcleo Rt (Benowitz y Karten, 1976; Mpodozis y col., 1996; Karten y col., 1997). Estas células poseen árboles dendríticos amplios y ramificados, de hasta 4 mm de diámetro, que se extienden radialmente hacia las capas tectales superficiales, donde presentan especializaciones sinápticas denominadas "en cepillo" ("bottle-brushes", Luksch

y col., 1998; Luksch y col., 2001). Las CTGs tienen campos receptivos grandes, discontinuos e irregulares, sensibles a estímulos en movimiento, que en ocasiones presentan una región central sensible también a estímulos estáticos (Schmidt y Bischof, 2001). Se han distinguido varios tipos de CTGs en el pollo y la paloma, según las capas tectales a las que llegan sus terminales dendríticos en cepillo, la ubicación de sus somas dentro de la capa 13 y la subdivisión del núcleo rotundus a la que llegan sus axones (Mpodozis y col., 1996; Karten y col., 1997; Luksch y col., 1998; Hellman y Güntürkün, 2001, Marín y col., 2003). Las principales son las CTGs tipo I y las CTGs tipo II. Los terminales dendríticos en cepillo de las CTGs tipo I se ubican en la capa retino-recipiente 5, donde establecerían contactos sinápticos con las fibras retinianas (Tömböl y Nemeth, 1999), y sus somas se localizan en la sublámina externa de la capa 13. En cambio, los terminales dendríticos de las CTGs tipo II se ubican en capas tectales más profundas (capa 9), no reciben aferencias retinianas directas (Mpodozis y col., 1996; Karten y col., 1997; Hellman y Güntürkün, 2001) y sus somas se encuentran en la sublámina interna de la capa 13.

En la proyección tecto-rotunda, cada subdivisión del núcleo Rt recibe aferencias de uno o más tipos de CTGs, distribuidas por toda la superficie de la respectiva sublámina de la capa 13. Las CTGs tipo I proyectan a las regiones

central y dorsal anterior del núcleo rotundus mientras que las CTG tipo II proyectan a la subdivisión posterior y a la dorsomedial, llamada triangularis (Karten y col., 1997; Marín y col. 2003). Consecuentemente, los campos receptivos en el núcleo Rt son grandes (del orden de los 100°) y responden principalmente a estímulos visuales en movimiento. Experimentos conductuales y fisiológicos sugieren que estas subdivisiones del núcleo Rt constituyen vías paralelas involucradas en distintas modalidades visuales, como discriminación de movimiento, frecuencias espaciales y color (Hodos y col., 1988; Wang y Frost, 1993; Nguyen y col., 2004).

A diferencia del núcleo Rt, en el entopallio no se distinguen subdivisiones citoarquitectónicas claras. Sin embargo, como la proyección de Rt al entopallio es topográfica, en el entopallio se pueden definir distintas zonas, que reciben cada una de ellas proyecciones de una subdivisión diferente de Rt (Laverghetta y Shimizu, 2003; Fredes y col., 2010).

1.5 Organización de la red istmo-tectal

Además de originar una proyección ascendente hacia el núcleo Rt, el TeO genera una proyección hacia los núcleos del istmo (núcleo parabigeminal en

mamíferos, núcleo istmo en peces y anfibios, núcleos del complejo del istmo en aves; Gruberg y col., 2006), ubicados en el tegmento dorsolateral. Las conexiones entre el TeO y los núcleos del istmo son recíprocas, de manera que éstos proveen una retroalimentación a la actividad visual en la neuropila retino-tectal.

En aves, las proyecciones del TeO a cada uno de los núcleos del complejo del istmo son ipsilaterales y topográficas. Se originan en células posiblemente glutamatérgicas bipolares de orientación radial, cuyos somas se ubican en la capa tectal 10, y cuyas dendritas arborizan en varias capas tectales, incluyendo capas retino-recipientes (Güntürkün y Remy, 1990; Woodson y col., 1991; Wang y col., 2004, 2006). Los axones de estas células se originan a partir de una dendrita apical y giran 180° para dirigirse hacia los núcleos del istmo. Debido a esta "vuelta en U", las células tectales que proyectan a los núcleos del istmo reciben el nombre de "bastón de pastor" (Ramón y Cajal, 1904).

El complejo del istmo se compone de los núcleos istmo parvocelular (Ipc), istmo semilunaris (SLu) e istmo magnocelular (Imc; figura 2). Tanto el núcleo Ipc como el núcleo SLu derivan de células del istmo dorsal que migran hacia rostral durante el desarrollo (Clarke, 1982), y son inmuno-positivos para colina acetiltransferasa (ChAT+, Wang y col., 2006). En cambio, el núcleo Imc deriva del mesencéfalo dorsolateral (Clarke, 1982) y es inmunopositivo para ácido gama

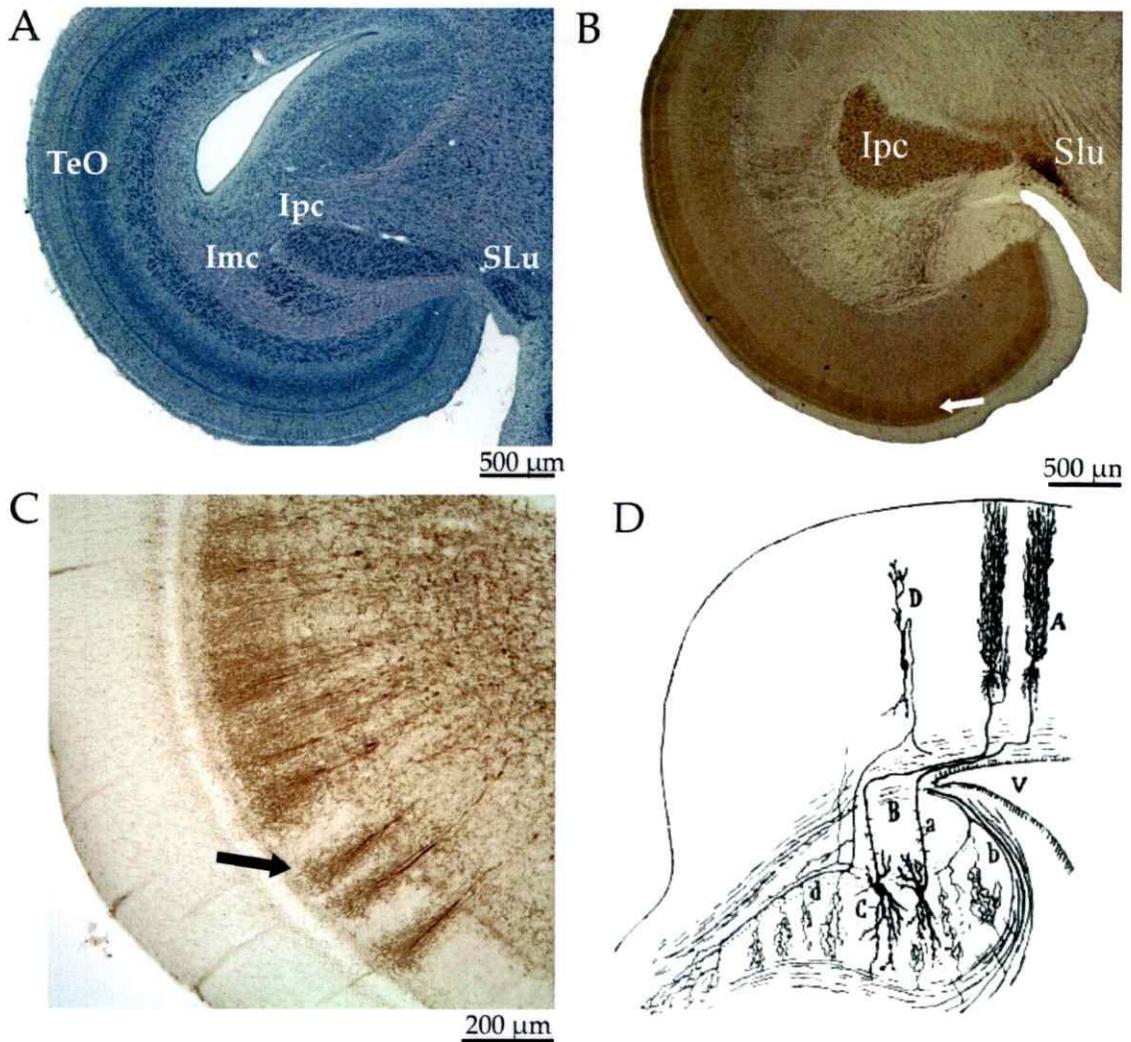


Figura 2. Los núcleos del istmo y el tectum óptico de las aves.

A. Corte coronal de mesencéfalo de paloma con tinción de Nissl, donde se señalan el tectum óptico (TeO) y los núcleos del istmo, parvocelular (Ipc), magnocelular (Imc), y semilunaris (SLu). **B.** Inmuno-reactividad anti colina acetil transferasa (ChAT+) en el mesencéfalo de la paloma. Los somas de los núcleos Ipc y SLu, y sus axones ramificándose en el TeO (flecha blanca) exhiben una fuerte marca. **C.** Detalle de los axones ChAT+ en pincel de las células del núcleo Ipc (flecha negra). **D.** Dibujo de Pedro Ramón y Cajal mostrando las proyecciones recíprocas entre el istmo y el TeO en aves (Ramón y Cajal, 1904). A, axón en pincel, B, axones en el tracto istmotectal, C, somas de las células del istmo (Pedro Ramón y Cajal pensó que los axones en pincel provenían del Imc y no de Ipc), D, célula bipolar bastón de pastor.

amino butírico y para glutamato descarboxilasa (GABA+ y GAD+; Braun y col., 1988; Wang y col., 2004). Debido a su origen embrionario, recientemente se ha propuesto cambiar el nombre del núcleo Imc por el de núcleo preístmico magnocelular (Puelles, y col., 2007). Sin embargo, en esta tesis nos referiremos a él por su nombre original. Este núcleo también se diferencia de los otros dos núcleos del istmo en su conectividad ya que además de proyectar al TeO, proyecta a los núcleos Ipc y SLu.

Las proyecciones que recibe el TeO de los núcleos ChAT+ del istmo son topográficas y homotópicas. Los axones aferentes de las células de estos núcleos se extienden radialmente en el TeO, definiendo una columna tectal, y ramificándose en varias capas. Los terminales axónicos de las neuronas del núcleo SLu se ramifican en una columna de un diámetro aproximado de 120-180 μm y terminan en las capas 4c, 6 y 9-13 (Wang y col., 2004, 2006). Los terminales axónicos del núcleo Ipc se ramifican en una columna de un diámetro aproximado de 35 a 50 μm y terminan más densamente en las capas 3, 5, y 9 (Wang y col., 2004, 2006). Estos terminales se denominan "en pincel" debido a su morfología característica (figura 2). Cabe notar que los axones en pincel se ramifican en la capa retino-recipiente 5, donde se ubican los árboles dendríticos

de las células tectales ganglionares tipo I₅ (CTGs I₅), las que originan una masiva proyección hacia las divisiones central y dorsal anterior del núcleo Rt.

En contraste, la proyección del núcleo Imc al TeO no es topográfica, ya que los axones de las células del núcleo Imc se ramifican a través de grandes áreas en las capas profundas (capas 10 a 13) de TeO. Este núcleo también proyecta a Ipc y SLu de manera no topográfica. En la figura 3 se puede apreciar un esquema de la red istmo-tectal. Las proyecciones del núcleo Imc han sido más profundamente estudiadas en el pollo (*Gallus gallus*), donde, basándose en experimentos de llenado intracelular de sus neuronas, el grupo de H. J. Karten ha propuesto que este núcleo presentaría dos subpoblaciones celulares, entremezcladas espacialmente e indistinguibles por la morfología de sus somas: una que proyectaría al TeO y otra que proyectaría a los núcleos Ipc y SLu (Wang y col., 2004). Las células que proyectan al TeO presentarían una anti-topografía con éste, es decir, proyectarían a una gran región en el TeO pero no a la zona desde la cual reciben proyección (Wang y col., 2004). Aunque la proyección del núcleo Imc a los núcleos Ipc y SLu es difusa, donde cada terminal axónico de Imc se ramifica profusamente y cubre gran parte de estos núcleos, resta aun por saber si ésta es antitopográfica. Tampoco se sabe si las aferencias tectales que reciben las células que proyectan al TeO y a los núcleos Ipc y SLu son distintas.

El hecho de que los dos tipos celulares se encuentren entremezclados dificulta el abordaje de estos problemas.

A diferencia del pollo y la paloma, donde Imc es un núcleo de apariencia homogénea, se ha reportado que éste está compuesto por dos subdivisiones en el diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*, Braun y col., 1988). Si estas dos subdivisiones correspondieran a los dos tipos celulares presentes en el núcleo Imc en el pollo, el diamante mandarín ofrecería un muy buen modelo para comprender la organización de Imc. Sin embargo, las proyecciones de Imc en el diamante mandarín u otro passeriforme no han sido previamente estudiadas.

1.6 La red istmo-tectal: Modulación del flujo visual tectal y atención espacial

En palomas, estudios *in vivo* realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la respuesta visual más conspicua que se registra en el TeO, las ráfagas tectales, corresponden a las descargas de los axones aferentes que provienen del núcleo Ipc (Marín y col., 2005). Estas ráfagas constituyen una señal de retroalimentación visual, ya que las respuestas visuales generadas en el istmo provienen a su vez del TeO. También se ha mostrado que la inactivación experimental del núcleo Ipc produce una cancelación de las respuestas visuales

en el núcleo Rt, en la región del campo visual correspondiente al campo receptivo inactivado en el núcleo Ipc (Marín y col., 2007). Más aun, las respuestas visuales registradas en el núcleo Rt y entopallio están sincronizadas con las respuestas visuales del núcleo Ipc (Marín y col., en imprenta), de manera que éste ejercería un efecto de compuerta para el flujo visual ascendente desde el TeO.

Del esquema anterior se desprende que el núcleo Ipc (putativamente colinérgico) tendría un efecto activador y el núcleo Imc un efecto inhibitor sobre las respuestas tectales en el TeO. Sin embargo, otros estudios anteriores, previos a la caracterización neuroquímica del núcleo Ipc, sugieren que, a pesar de que la acetilcolina sería un neurotransmisor excitatorio en el TeO, el núcleo Ipc tendría un efecto inhibitorio sobre las respuestas visuales tectales (Wang y col., 1995a; Felix y col., 1994; Wang, 2003).

Por otra parte, también en nuestro laboratorio se ha mostrado que al presentarse dos estímulos visuales simultáneos se produce en el núcleo Ipc una selección competitiva entre éstos. La respuesta a un primer estímulo se reduce al presentarse simultáneamente un segundo estímulo, aunque sea en una posición distante (hasta 100°) al primero. Esta inhibición de largo alcance es mediada por

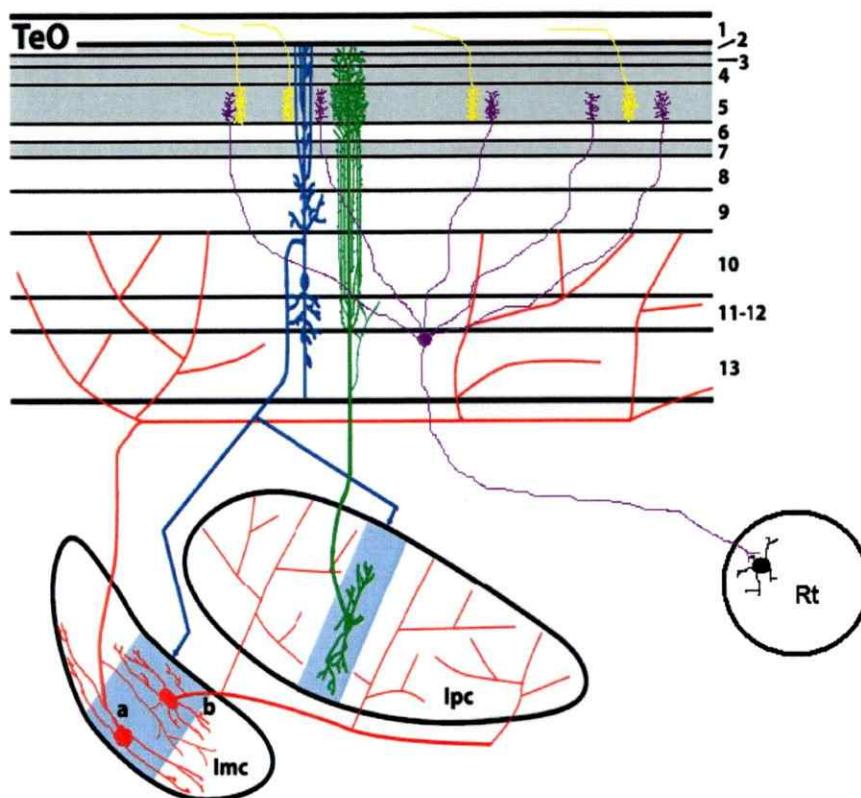


Figura 3. Esquema de la red istmotectal.

En amarillo se representa la subpoblación de fibras retinianas que terminan en la capa 5 del tectum óptico (TeO), donde presumiblemente tienen contactos sinápticos glutamatérgicos con los terminales dendríticos en cepillo de las células de la capa 13 (morado). Éstas últimas generan la proyección del TeO al núcleo talámico Rotundus (Rt). Las células “bastón de pastor” de la capa 10 (azul) proyectan a los núcleos del complejo del istmo, istmo parvocelular (Ipc) e istmo magnocelular (Imc) (semilunaris no mostrado para simplificar el esquema). El núcleo GABAérgico Imc proyecta de manera difusa al núcleo Ipc y al TeO (rojo), mientras que el núcleo colinérgico Ipc proyecta de manera topográfica al TeO (verde). Los axones en pincel de las células del núcleo Ipc (verde) se ramifican particularmente en la capa 5. Modificado de Wang y col., 2006.

el núcleo Imc (Marín y col., 2007). Otros autores han replicado estos experimentos y han comprobado que el mismo fenómeno ocurre en el TeO de lechuzas, donde también ocurre competencia entre estímulos auditivos y entre estímulos auditivos y visuales (Asadollahi, y col., 2010; Mysore y col., 2010).

Estos trabajos apuntan a un modelo según el cual la activación de un *locus* tectal se retroalimentaría positivamente a través del núcleo Ipc, al mismo tiempo que produciría una inhibición horizontal global en el resto del TeO mediada por el núcleo Imc. Cuando un segundo estímulo es presentado en otro lugar del campo visual, de manera que la activación del segundo *locus* tectal es capaz de sobrepasar un cierto umbral (dado por la inhibición producida por el primer estímulo), éste ejercerá ahora una inhibición sobre el primero, teniendo como resultado la abolición de su propia inhibición. De esta manera, al haber dos estímulos presentes, las respuestas visuales tectales tenderán a ser mayores para uno de los dos (Marín y col., 2007). Este modelo de competencia de estímulos constituiría un mecanismo subyacente a la selección de estímulos en la atención visual espacial.

Modelos computacionales de este sistema de competencia de estímulos sugieren que la antitopografía de la proyección del núcleo Imc sobre el TeO es clave para que se dé el fenómeno de competencia (Lai y col., 2011). Para

comprender a cabalidad el funcionamiento de este circuito será necesario dilucidar las conexiones de los dos tipos celulares presentes en el núcleo Imc.

Así, a pesar de que la red istmo-tectal de las aves se ha convertido en un buen modelo para estudiar el papel de los circuitos de retroalimentación en sistemas sensoriales, aspectos básicos de su anatomía y fisiología permanecen desconocidos. El principal problema abordado en esta tesis es el efecto que tiene la actividad del núcleo Ipc y la activación de receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos sobre las respuestas visuales en el TeO. Adicionalmente, para poder avanzar en el entendimiento cabal del circuito istmotectal, resolveremos si es que el diamante mandarín ofrece un buen modelo para estudiar la fisiología y anatomía del núcleo Imc, responsable por la competencia de estímulos que se observa en el núcleo Ipc. Por último, exploraremos si es que la segregación del núcleo Imc en dos subdivisiones se extiende a otras especies de Passeriformes.

1.7. Hipótesis

1. Considerando que el núcleo Ipc es ChAT+, que su inactivación reduce las respuestas visuales en el núcleo Rt y que la actividad en estos dos núcleos está sincronizada, proponemos que el núcleo Ipc produce un aumento en las respuestas visuales tectales mediada por receptores colinérgicos.

2. Proponemos además que la subdivisión del núcleo Imc observada en Passeriformes corresponde a la segregación espacial de los dos tipos celulares presentes en el núcleo Imc del pollo.

1.8. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es resolver ciertos aspectos básicos de la fisiología y anatomía del circuito istmotectal de aves.

I. El objetivo principal es estudiar la manera en que el núcleo Ipc modula las respuestas visuales en el TeO. Los objetivos específicos a este respecto son:

I. i Evaluar el efecto de la inactivación y sobreactivación del núcleo Ipc sobre los potenciales evocados retino-tectales.

I. ii. Evaluar el efecto de la microinyección en el TeO de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre los potenciales evocados retino-tectales, así como sobre la actividad del núcleo Ipc.

II. Además, nos hemos propuesto estudiar las proyecciones de las dos capas del núcleo Imc en Passeriformes, para determinar si es que éstas corresponden a la segregación espacial de los dos tipos celulares que se encuentran entremezclados en el núcleo Imc del pollo. Los objetivos específicos a este respecto son:

- II. i. Corroborar, a través del uso de trazadores neuronales retrógrados, la presencia en el núcleo Imc del pollo de dos tipos de células; células que proyectan a los núcleos Ipc y SLu y células que proyectan al TeO.
- II. ii. Caracterizar la organización citoarquitectónica del núcleo Imc en varias especies de aves Passeriformes y no Passeriformes.
- II. iii. Hacer inyecciones de trazadores retrógrados en el núcleo Ipc y en el TeO en el diamante mandarín tanto *in vivo* como *in vitro* para determinar qué células de Imc proyectan a cada uno de estos blancos.
- II. iv. Estimar el número total de células en el núcleo Imc del diamante mandarín y el zorzal.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Obtención de animales

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo al protocolo de manejo de especies vivas para experimentación y bioseguridad exigido por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Para los experimentos de registros *in vivo* e inmunohistoquímica se usaron un total de 53 palomas adultas de ambos sexos (300-350 g), y para experimentos de neuroanatomía se usaron 12 diamantes mandarines adultos machos (15-30 g) y 5 pollos de ambos sexos de 1 a 6 días de edad (40-50 g). Estos animales fueron obtenidos en el comercio y mantenidos en un bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Para el estudio de la organización citoarquitectónica del núcleo Imc en varias especies de aves

también se usaron un cerebro de cotorra argentina y un cerebro de colibrí tomados de la colección de cerebros del Laboratorio de Neurobiología y Biología del Conocer, además de un espécimen de chincol (*Zonotrichia capensis*), fiofío (*Elaenia albiceps*), zorzal (*Turdus falcklandii*) y queltehue (*Vanellus chilensis*) que fueron colectados muertos en el campus Juan Gómez Millas de la Universidad de Chile. Por la manera en que obtuvimos estos animales no sabemos exactamente cuánto tiempo transcurrió entre la muerte del animal y la inmersión del cerebro en fijador, pero a juzgar por las condiciones de los cadáveres (temperatura y rigidez del cuerpo) estimamos que en ningún caso transcurrieron más allá de 2 horas. El núcleo Imc del estornino (*Sturnus vulgaris*) fue examinado usando fotos de alta resolución que fueron amablemente entregadas a nosotros por el Dr. Harvey J. Karten, del Departamento de Neurociencias de la Escuela de Medicina de la Universidad California, en San Diego.

2.2 Procedimientos quirúrgicos

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia general (ketamina 75 mg/Kg y xilazina 5 mg/Kg para palomas, y ketamina 50 mg/Kg y xilazina 20

mg/Kg para diamante mandarín) inyectada intramuscularmente, con dosis de mantenimiento del 15% de la inicial, aplicada cada dos horas. Durante todo el experimento la temperatura corporal fue mantenida entre 39 y 41 °C con una almohada calefactora con termostato. Las palomas fueron posicionadas en un aparato para fijar la cabeza en la posición estereotáctica estándar (Karten y Hodos, 1967).

Para los registros y microinyecciones en el TeO y el núcleo Ipc en palomas, en el lado derecho del cráneo se abrió una pequeña ventana para exponer la zona dorsolateral del TeO, la que sirve para acceder tanto a las capas superficiales de éste como al núcleo Ipc. La duramadre fue removida con cuidado para permitir la penetración del electrodo o pipeta. Al final del experimento se realizó la eutanasia con una dosis letal de anestesia y el cerebro fue conservado en paraformaldehído 4% (PFA 4%) en solución tampón fosfato salino (PBS) en los casos en que el sitio de inyección en el núcleo Ipc debía ser corroborado.

Para las enucleaciones de palomas, el nervio óptico derecho fue cortado con tijeras y el ojo fue extraído con pinzas. En estos experimentos, y en los de microinyección *in vivo* de trazadores en el diamante mandarín, los animales se recuperaban de la anestesia en una jaula calefaccionada y eran monitoreados

cada dos horas. Durante los cinco días siguientes a la cirugía los animales recibieron inyecciones intramusculares de antibiótico y analgésico (ketoprofeno 2 mg/Kg por día y enrofloxacin 5 mg/Kg por día).

2.3 Registros *in vivo*

Se realizaron registros *in vivo* en el TeO y el núcleo Ipc en palomas. Los registros en el TeO se hicieron con electrodos de tungsteno (FHC, 1-2 M Ω de impedancia) penetrando unos 300-500 μ m desde la superficie tectal, hasta maximizar el registro de las ráfagas tectales, lo que correspondería a la capa 5. Los registros en el núcleo Ipc se hicieron penetrando por la superficie dorsal del TeO, lateral al cerebelo (coordenadas estereotáxicas 2,75 anterior y 5,5 lateral, Karten y Hodos, 1967). Al introducir el electrodo con 5° de inclinación hacia adelante, el núcleo Ipc se encuentra al bajar aproximadamente unos 3,5 mm. Éste era identificado por la descarga característica en ráfagas con campos receptivos circulares de unos 15-25°, y el registro de espigas de alta frecuencia al estimular fuera de dichos campos. Para la aplicación de agonistas o antagonistas colinérgicos, GABAérgicos o glutamatérgicos en el núcleo Ipc, el electrodo de tungsteno fue reemplazado por una micropipeta triple de vidrio, con uno de los

carriles usado como electrodo, y los otros dos conectados a un microinyector a presión (Picospritzer de dos canales, artesanalmente convertidos en cuatro canales cuando fue necesario a través de un sistema de mangueras y llaves de tres pasos). La pipeta era previamente marcada por fuera con el trazador fluorescente DiI para la posterior identificación del sitio de registro.

Para el registro simultáneo en *loci* homotópicos en el núcleo Ipc y el TeO, se buscaban dos sitios de registro en los cuales los campos receptivos estuvieran sobrepuestos. Para la microinyección de agonistas o antagonistas colinérgicos o glutamatérgicos en el TeO, se usó un micromalipulador que permite mover dos sujetadores y regular la distancia y el ángulo entre éstos (Narishige, MMD-4). Así se posicionaba la punta de una pipeta triple de vidrio a unos 100-150 μm de distancia de la punta del electrodo de registro.

2.4 Estimulación visual

Los estímulos visuales se presentaron en un monitor CRT y fueron sintetizados por un sistema generador de estímulos controlado por un computador (Leonardo, Lohmann Res. Equip.). Los estímulos consistían principalmente en círculos de luz blanca sobre un fondo negro, y se disponía de un completo

control de las variables espaciales y temporales de los mismos. El sistema de adquisición de datos controlaba también el sistema de presentación de los estímulos.

2.5 Adquisición y análisis de datos

El sistema experimental para registro extracelular y estimulación visual consistía en un amplificador extracelular y un sistema de adquisición de datos basado en un computador PC equipado con una tarjeta convertora de 32 canales (National Instruments). El análisis de los datos se hacía *off-line* mediante un completo programa de despliegue y análisis implementado en Igor Pro (Wavemetrics).

2.6 Inyección de trazadores

Para el depósito de cristales de trazadores *in vitro*, se prepararon rebanadas de mesencéfalo de diamante mandarín y pollo siguiendo el protocolo descrito por Wang y col. (2004) para pollo. Los animales fueron anestesiados con éter etílico y decapitados. Rápidamente se extraía el cerebro y se colectaba en solución de

disección oxigenada y fría (240 mM sacarosa, 3 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 23 mM NaHCO₃, 1,2 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glucosa). El mesencéfalo se cortaba en rebanadas coronales de 500 µm de espesor en un vibrátomo. Cristales de biocitina no conjugada, biocitina conjugada con rodamina, o dextranoamina biotinilada (BDA) conjugada con fluoresceína o rodamina fueron depositados en el núcleo Ipc y/o el TeO con una aguja de tungsteno en rebanadas mantenidas en solución de disección a 6-10 °C. Las rebanadas fueron entonces incubadas a temperatura ambiente en fluido cerebroespinal artificial (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.3 mM Mg₂SO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 26.2 mM NaHCO₃, 11 mM D-glucosa, 2.5 mM CaCl₂) por 4-6 h, luego fijadas en PFA 4% por una noche, sumergidas por unas 5 horas en sacarosa 30%, y reseccionadas en un micrótopo de congelación. Las rebanadas con marcas fluorescentes fueron contrateñidas con diamidino fenilindol (DAPI) y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia. Las rebanadas marcadas con biocitina no conjugada fueron procesadas para amplificar la marca con avidina-biotina y revelarla con diaminobencidina (DAB), contrateñidas con tinción de Nissl y fotografiadas en un microscopio de luz transmitida.

Las inyecciones *in vivo* de subunidad B de colerotoxina (CTB) en el TeO de diamantes mandarines fueron realizadas con una jeringa Hamilton

manipulada con un micromanipulador (Narishigue) bajo lupa. Cinco días después de la inyección, los animales fueron perfundidos intracardiamente con suero salino tibio (40 °C, 20 mL) y PFA 4% frío (5 °C, 50 mL), y sus cerebros cortados y procesados para revelar la marca (ver sección siguiente).

2.7 Procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos

Los cerebros de palomas de los experimentos de registros y de las aves colectadas muertas fueron fijados por varios días (5 a 30 días) en PFA 4%, sumergidos en sacarosa 30%, y cortados en el plano coronal en un micrótopo de congelación, en secciones de 60 µm de espesor. Los cortes fueron colectados en PBS, montados en portaobjetos cubiertos de gelatina y teñidos con tinción de Nissl.

Los diamantes y las palomas usados para inmunohistoquímica fueron perfundidos con suero salino tibio (50 mL y 200 mL respectivamente), seguido por PFA 4% frío (100 mL y 300 mL respectivamente), y sus cerebros postfijados en PFA 4% a 4°C por 8 horas antes de ser cortados y procesados.

Para estudiar la distribución de receptores muscarínicos en el TeO de palomas normales o previamente enucleadas, usamos el anticuerpo monoclonal

IgM M-35 (Argene), que marca los cinco tipos de receptores muscarínicos en mamíferos y receptores muscarínicos en otros grupos de animales incluyendo aves (André y col., 1985; Bernardini y col., 1998; Calaza y Gardino, 2000). Para revelar la marca de las inyecciones de CTB *in vivo* en el TeO del diamante usamos un anticuerpo primario anti-CTB hecho en cabra (List). En ambos casos, los cortes fueron lavados 3 veces por 10 min en PBS, la actividad peroxidasa interna fue bloqueada incubando los cortes en una solución de metanol 50% y H₂O₂ 0,3% en PBS por 15 min a temperatura ambiente; los cortes fueron nuevamente lavados 3 veces por 10 min e incubados por 2 horas en solución de bloqueo a temperatura ambiente. Para la marca de receptores muscarínicos la solución de bloqueo contenía suero normal de cabra 5% y tritón 0,05% en PBS, mientras para la marca de CTB contenía suero normal de conejo 5% y tritón 0,1% en PBS. A continuación los cortes fueron incubados en anticuerpo primario (M-35 1:250, anti-CTB 1:125) en sus respectivas soluciones de bloqueo a 4°C por toda la noche. Al día siguiente, después de lavar 6 veces por 10 min los cortes se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en anticuerpo secundario, que en el caso de M-35 fue un anti-ratón IgM biotinilado hecho en cabra (1:100), y en el caso del anti-CTB fue un anti-cabra biotinilado hecho en conejo (1:200), ambos diluídos en sus respectivas soluciones de bloqueo. A continuación se lavaron los

cortes 6 veces por 10 min y la marca fue revelada con avidina-biotina y DAB. En el caso de la inmunohistoquímica para receptores muscarínicos se realizaron también controles negativos sin anticuerpo primario y sin anticuerpo secundario.

2.8 Medidas de diámetros y densidades celulares

En cortes de mesencéfalo teñidos con Nissl, se estimó el tamaño de las células de Imc midiendo el diámetro mayor y menor de los somas en el plano focal que exhibiera el nucléolo.

Las estimaciones de densidades celulares se realizaron usando el método del disector óptico (Oorschot, 1996). Se usó una ventana de muestreo de $100 \mu\text{m}^2$ y $20 \mu\text{m}$ de espesor, distribuido homogéneamente en las dos subdivisiones de Imc. Las densidades celulares se estimaron como el promedio de células por unidad de volumen.

2.9 Estimaciones de volúmenes y número de células en el núcleo Imc del diamante y el zorzal

Usando un microscopio de luz transmitida con una platina controlada por un PC con el software Neurolucida estimamos el volumen de las subdivisiones interna y externa de Imc en un diamante mandarín y un zorzal. El volumen se estimó a partir de mediciones del área transversal del núcleo en diferentes niveles rostrocaudales, en cortes coronales de 60 μm de espesor teñidos con tinción de Nissl. En estos mismos cortes, usando el método del fraccionador óptico (West y col., 1991) con ayuda del software Stereoinvestigator, se contaron células, usando un lente objetivo de 100x, en un marco de conteo de 180 μm de lado y 12 μm de espesor, el cual fue repartido en grillas de 300x300 μm aleatoria y sistemáticamente por el núcleo. El método del fraccionador óptico consiste en hacer conteos en un volumen de muestreo que representa una fracción conocida del total (West y col., 1991). Por lo tanto, es necesario tener una serie de secciones que contenga la totalidad del núcleo de interés representado, para lo cual es preferible usar tejido en óptimas condiciones. Por eso nos hemos inclinado por hacer este tipo de análisis en el diamante (ya que pudimos perfundir estos animales) y en un particularmente bien conservado ejemplar de zorzal.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto de la activación e inhibición del núcleo Ipc y de la aplicación de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre las respuestas visuales registradas en el TeO

3.1.1. Registros extracelulares *in vivo* en el TeO y el núcleo Ipc

En las capas superficiales del TeO (capas 4-7) se registran potenciales retino-tectales evocados visualmente que poseen varios componentes (Holden, 1968; Dye y Karten, 1996; Letelier y col., 2000) y que son producidos predominantemente por sinapsis entre los axones de la retina y dendritas radiales de las células tectales. Entre ellas están las CTGs tipo I y posiblemente las células de la capa 10. También se registran oscilaciones fasciculadas rápidas que van montadas en dichos potenciales (figura 4). Estas oscilaciones, denominadas *bursts* o ráfagas tectales, corresponden a la descarga de los axones

en pincel provenientes del núcleo Ipc (Marín y col., 2005). De manera que tan sólo registrando en las capas superficiales del TeO es posible monitorear simultáneamente los potenciales retino-tectales y la actividad en el *locus* homotópico de Ipc. Ambas respuestas visuales son bloqueadas por la aplicación de CNQX, antagonista de receptores ionotrópicos de glutamato, en las capas superficiales del TeO (Dye y Karten, 1996). Las ráfagas también se registran espontáneamente en ausencia de estimulación visual (manteniendo al animal en oscuridad).

En este trabajo hemos usado estímulos visuales estáticos y en movimiento. El estímulo estático consiste en un destello de luz blanca de 20 ms en un círculo presentado sobre un fondo negro en el centro del campo receptivo del *locus* tectal registrado. El estímulo en movimiento corresponde al barrido horizontal de un círculo de luz blanca sobre un fondo negro en dirección caudo-rostral, pasando por el centro del campo receptivo.

Para medir los potenciales de campo, hemos considerado el área bajo la curva del valor absoluto de éstos. Con este parámetro podemos detectar simultáneamente cambios en la amplitud y en la duración de los potenciales. Para medir las respuestas visuales en el núcleo Ipc hemos contado las ráfagas

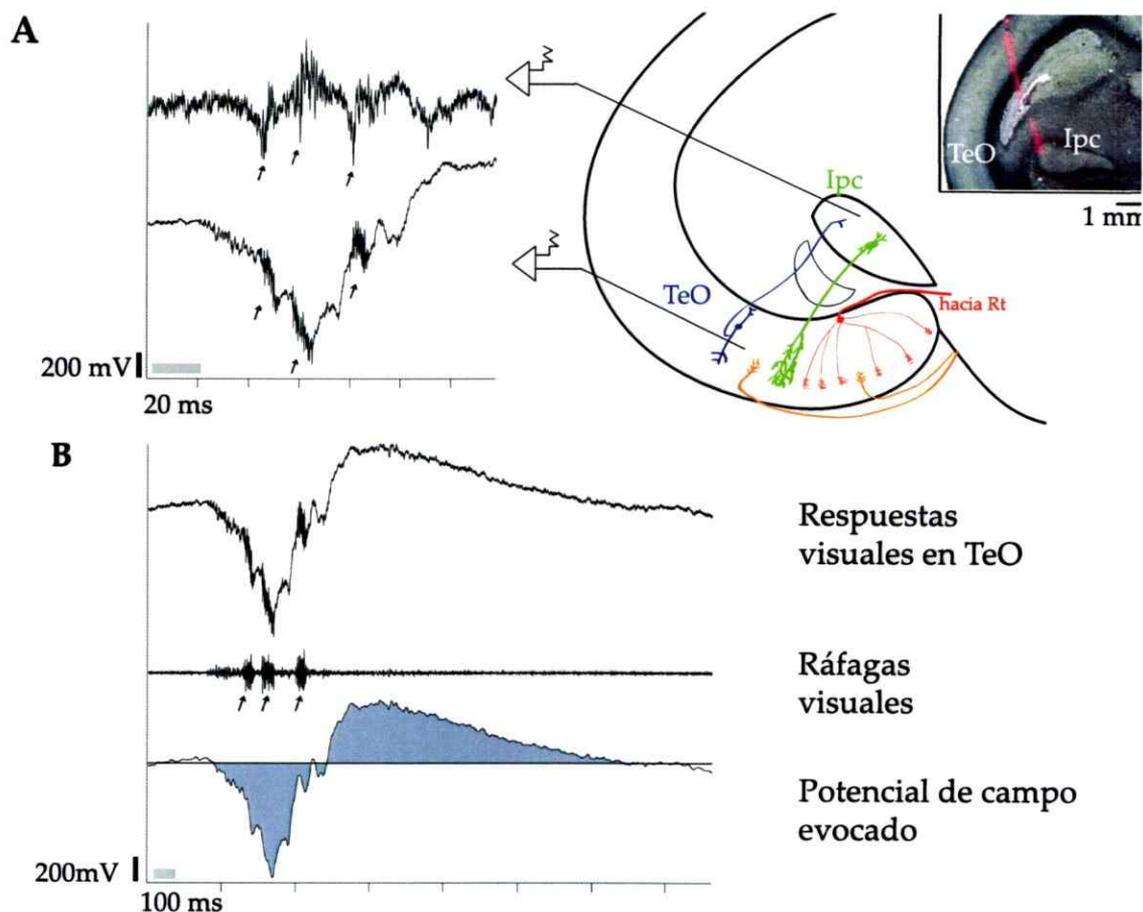


Figura 4. Registro *in vivo* de respuestas visuales en el tectum óptico (TeO) y en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) de la paloma.

A. Ejemplo de registros simultáneos de las respuestas a un destello de luz (barra gris) en dos *loci* homotópicos del núcleo Ipc y el TeO. El trazo de arriba representa el registro en el núcleo Ipc y el de abajo el registro en el TeO. Notar que las ráfagas del núcleo Ipc se registran también en el TeO (flechas). El esquema de la derecha representa una vista coronal del mesencéfalo de la paloma. En naranja, fibras retinianas que llegan al TeO; azul, células bastón de pastor de la capa 10 del TeO; verde, células del núcleo Ipc; y rojo, células tectales ganglionares de la capa 13. En el recuadro de arriba, en una sección coronal del mesencéfalo de paloma se muestra un ejemplo de penetración en el núcleo Ipc (rojo) con una pipeta previamente sumergida en DiI, para marcar el sitio de registro. **B.** En el TeO se registran potenciales de campo y ráfagas (trazo de arriba). Estas dos señales se pueden separar con filtro pasa alta de 400 Hz (trazo del medio) y pasa baja de 400 Hz (trazo de abajo). En este estudio evaluamos las respuestas visuales de Ipc contando las ráfagas y los potenciales retino-tectales midiendo el área bajo la curva del potencial (sombreado).

que se registran en el TeO en ventanas temporales equivalentes a las recién descritas (figura 4).

Tanto los potenciales evocados en el TeO como las respuestas visuales del núcleo Ipc presentan adaptación a la presentación consecutiva de destellos separados por 500 ms. Como se aprecia en la figura 5, en una secuencia de 12 destellos separados por 500 ms, a partir del segundo destello los potenciales evocados caen aproximadamente a un 50% de la respuesta inicial y se mantienen entre el 40 y 50% en los destellos siguientes. Las ráfagas se reducen a aproximadamente a un 45% a partir del segundo destello y continúan disminuyendo hasta alcanzar alrededor de un 20% a partir del destello N°6 (n=12). Nosotros usamos la presentación de destellos consecutivos para evaluar si la activación/inactivación del núcleo Ipc o la aplicación de agonistas/antagonistas colinérgicos en el TeO produce algún cambio en el grado de adaptación.

En todos los experimentos de microinyección de agonistas o antagonistas colinérgicos, hemos usado como control la microinyección del vehículo, que en todos los casos fue suero salino (NaCl 0,75%). Este procedimiento reduce levemente las respuestas tanto en el TeO como en el núcleo Ipc, presumiblemente por daño mecánico producido por la inyección en el tejido.

Por eso los registros previos a la inyección control no son comparables a los registros tratamiento, así que en todos los resultados son presentados como comparaciones entre post-inyección tratamiento y post-inyección control.

3.1.2. La sobre-activación del núcleo Ipc produce un aumento en la transmisión sináptica retino-tectal

Una manera de evaluar el efecto de la actividad del núcleo Ipc sobre las respuestas visuales en el TeO es forzar su sobre-activación y evaluar el efecto de ésta sobre los potenciales evocados retino-tectales. La microinyección en el núcleo Ipc del bloqueador GABAérgico picrotoxina (PTX, 200 μ M, 4 gotas de aproximadamente 0,2 nL) produce un aumento en la cantidad de ráfagas visuales registradas en el TeO, como respuesta a estímulos visuales en movimiento (N=6, rangos de Wilcoxon $p < 0,05$), presumiblemente porque provoca la abolición de la inhibición GABAérgica en el núcleo Ipc proveniente del núcleo Imc. Este aumento en la cantidad de ráfagas alcanzó un 16% en promedio en las respuestas a estímulos en movimiento. En las respuestas a destellos de luz se observa una tendencia al aumento en las ráfagas, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas (n=5, rangos de Wilcoxon, $p < 0,07$).

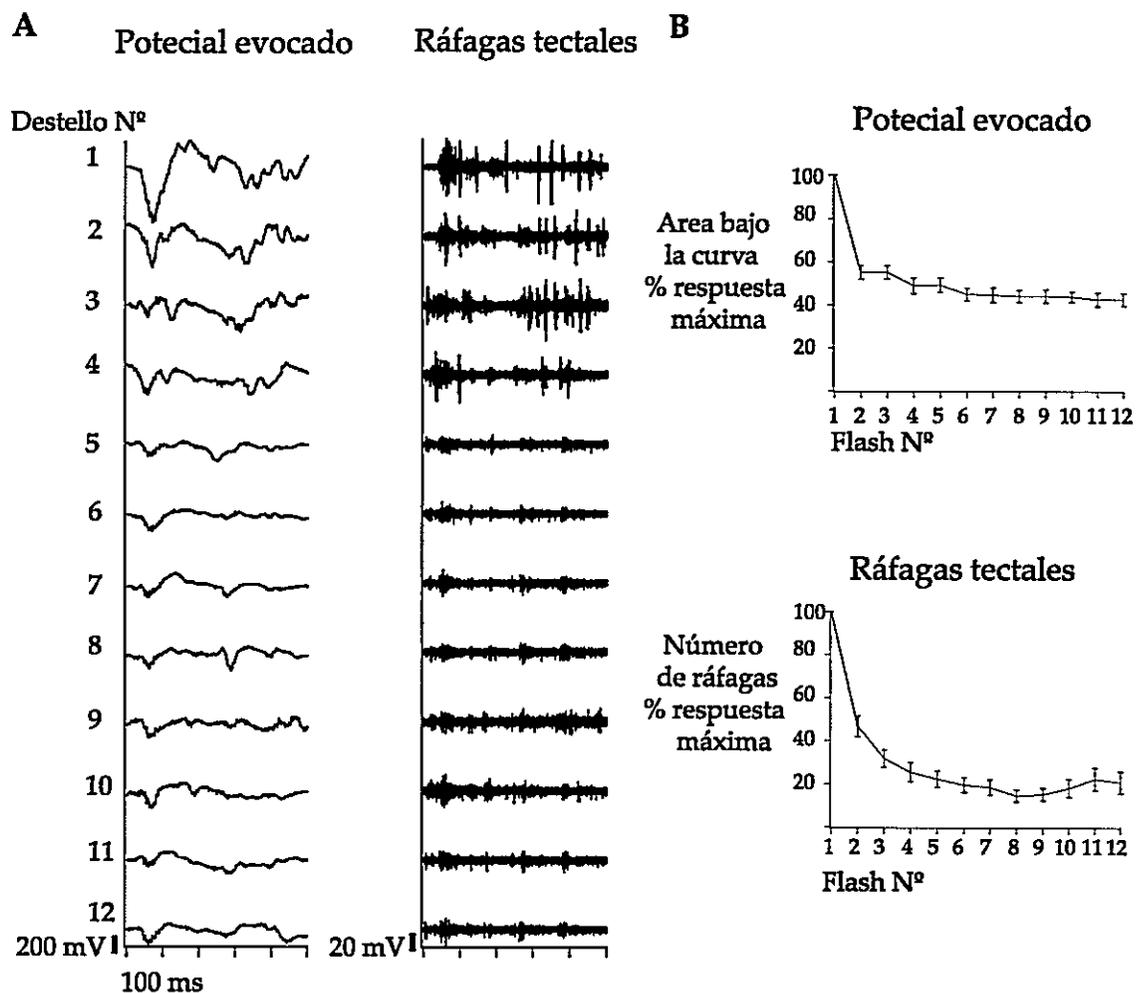


Figura 5. Adaptación de las respuestas visuales registradas en el tectum óptico (TeO) a la presentación repetitiva de destellos de luz.

A. Ejemplo de registros de potenciales evocados (retino-tectales) y ráfagas visuales (descargas de los axones de las células del núcleo istmo parvocelular, Ipc) como respuesta a 12 destellos consecutivos separados por 500 ms. **B.** Adaptación promedio de los potenciales evocados y de las ráfagas como respuesta a la presentación de 12 destellos consecutivos separados por 500 ms. Las barras de error corresponden al error estándar (N=12).

Este aumento en la actividad del núcleo Ipc produce un aumento promedio de 7,7% en los potenciales evocados por estímulos en movimiento en el TeO (figura 6, n=6, rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$). Las respuestas a estímulos estáticos también exhiben una tendencia a aumentar, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (n=5, rangos de Wilcoxon, $p < 0,07$).

En la medida en que el aumento en los potenciales evocados en el TeO se relaciona con el grado de aumento de las ráfagas visuales, estos resultados sugieren que la descarga de Ipc potencia la transmisión sináptica entre la retina y el TeO.

3.1.3. La inactivación del núcleo Ipc produce una reducción en la transmisión sináptica retino-tectal

Si la activación del núcleo Ipc produce un aumento en los potenciales evocados retino-tectales, es de esperar que su inhibición produzca una reducción en dichas respuestas, efecto que podría resultar más notorio que el de la sobre-activación.

La microinyección en el núcleo Ipc de CNQX (200 μM , 3 gotas de aproximadamente 0,2 nL) prácticamente elimina, de manera reversible, las respuestas visuales en ese núcleo. Esto produce una reducción en los potenciales

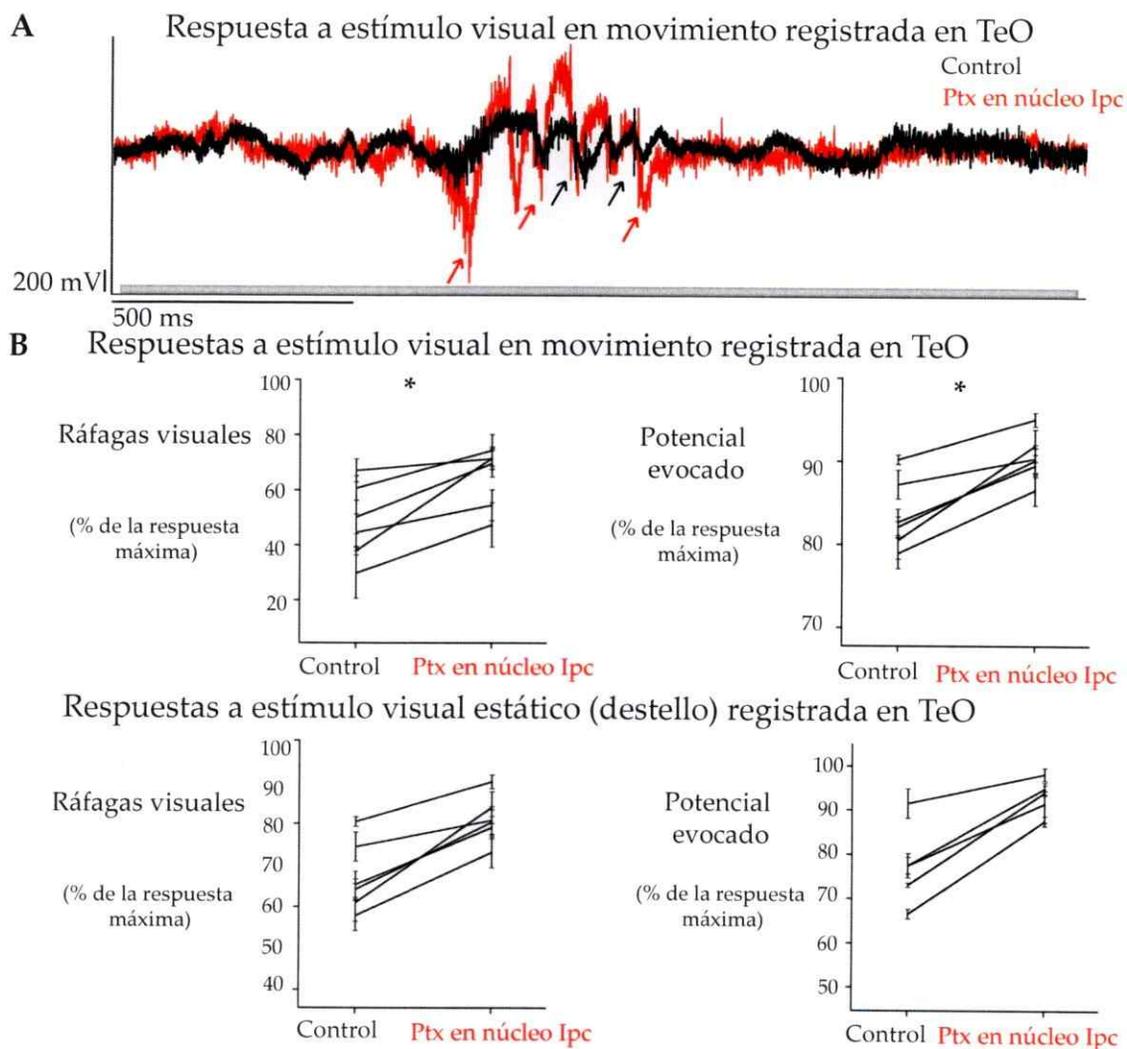


Figura 6. La sobre-activación del núcleo istmo parvocelular (Ipc) provoca un aumento en los potenciales evocados retino-tectales.

A. Ejemplo del efecto de la microinyección de picrotoxina (Ptx) en el núcleo Ipc sobre la respuesta a un estímulo visual en movimiento (barra gris) registrada en el *locus* homotópico en el tectum óptico (TeO). El trazo negro corresponde a la respuesta control (microinyección de suero salino) y el rojo a la respuesta después de la microinyección en el núcleo Ipc de Ptx 200 μ M (4 gotas de aprox. 0,2 nL, 40 s antes de la presentación del estímulo). Notar el aumento en la cantidad de ráfagas (flechas). **B.** Efectos de la microinyección de Ptx en el núcleo Ipc sobre las respuestas visuales registradas en el TeO. Las ráfagas y los potenciales retino-tectales evocados por la presentación de estímulos en movimiento (arriba, N=6) aumentan. Cada trazo corresponde a un experimento independiente. Las barras de error representan el error estándar en cada experimento (para 10 repeticiones). * Rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$.

evocados en el TeO, tanto por estímulos en movimientos como por destellos. La reducción promedio para las respuestas a estímulos en movimiento es de 23%, y para las respuestas a estímulos estáticos es de un 28,8% (figura 7, $n=10$ para estímulos en movimiento y $n=9$ para destellos, rangos de Wilcoxon, $p<0,05$). Estos resultados también apoyan la noción de que el núcleo Ipc produce un aumento en la transmisión sináptica entre la retina y el TeO.

3.1.4. La aplicación de agonistas muscarínicos en las capas superficiales del TeO produce un aumento en las respuestas visuales en el TeO y el núcleo Ipc

Bajo el supuesto de que el núcleo Ipc es colinérgico (Medina y Reiner, 1994; Wang y col., 2006; Marín y col., 2007; Asadollahi y col., 2010), se esperaría que la aplicación de agonistas colinérgicos en las capas superficiales del TeO tuviera efectos comparables a la sobre-activación de éste (como se dijo en la introducción, los axones en pincel se ramifican más extensamente en las capas tectales superficiales 2, 3 y 5), mientras que la aplicación de antagonistas colinérgicos debiera tener el efecto contrario. La inyección de una microgota de acetilcolina (0,2 nL; 5mM) 30 s antes de la presentación del estímulo visual en movimiento, produce un aumento promedio del 16% en los potenciales evocados en TeO (figura 8.A, $n=6$, rangos de Wilcoxon $p<0,05$). Además de tener

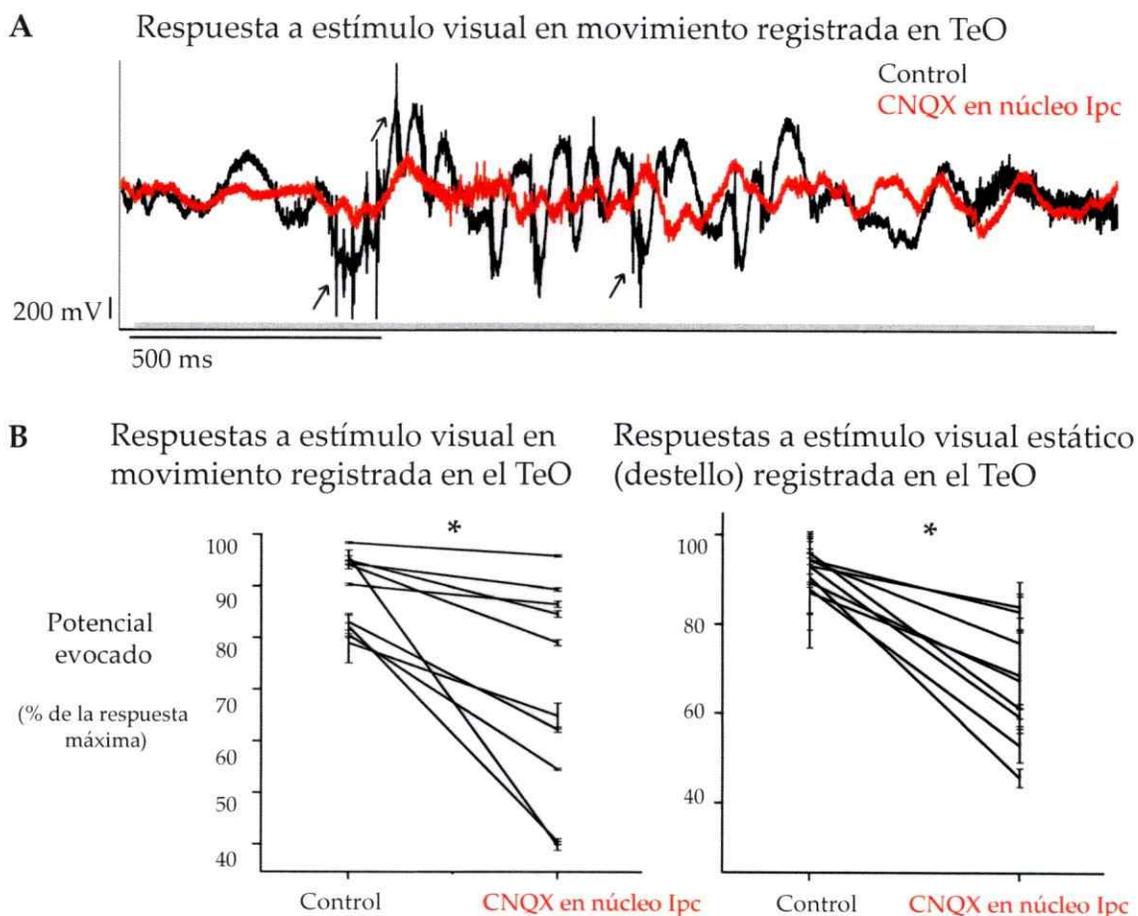


Figura 7. La inactivación del núcleo istmo parvocelular (Ipc) produce una reducción en los potenciales evocados retino-tectales.

A. Ejemplo del efecto de la microinyección de CNQX en el núcleo Ipc sobre las respuestas a un estímulo visual en movimiento registradas en el locus homotópico en el tectum óptico (TeO). El trazo negro corresponde a la respuesta control (microinyección de suero salino en el núcleo Ipc) y el rojo a la respuesta después de la microinyección en el núcleo Ipc de CNQX $200\mu\text{M}$ (3 gotas de aproximadamente $0,2\text{ nL}$, 30s antes de la presentación del estímulo). Notar que las ráfagas (algunas de ellas señaladas con flechas) desaparecen totalmente con el tratamiento.

B. Reducción en los potenciales retino-tectales evocados por la presentación de estímulos en movimiento (izquierda, $n=10$) y flashes (derecha, $n=9$). Las barras de error representan el error estándar en cada experimento (para 10 repeticiones). * Rangos de Wilcoxon, $p<0,05$.

un efecto sobre los potenciales evocados, la microinyección de acetilcolina produjo un notorio aumento en las respuestas visuales del núcleo Ipc (ráfagas visuales registradas en el TeO), las que aumentaron a casi el triple (figura 9.A, aumento promedio del 62%, $n=6$, rangos de Wilcoxon, $p<0,05$). A diferencia de las respuestas a estímulos en movimiento, las respuestas a destellos no cambiaron significativamente con la aplicación de acetilcolina (figuras 8.B y 9.B), aunque se puede apreciar una leve tendencia a aumentar, sobre todo en la cantidad de ráfagas ($n=6$, rangos de Wilcoxon, $p<0,07$).

La microinyección de los agonistas muscarínicos muscarina (500 μ M) o betanecol (20 mM) produce un efecto equivalente al de la aplicación de acetilcolina: los potenciales retino-tectales en las respuestas a estímulos visuales en movimiento aumentaron en un 20% con la aplicación de muscarina y un 18% con la aplicación de betanecol, y en las respuestas a destellos luminosos aumentaron en promedio en un 16% y un 19% respectivamente (figura 8.C-D, $n=4$ para muscarina y $n=4$ para betanecol, rangos de Wilcoxon para los datos agrupados $n=8$, $p<0,05$). Por otra parte, las descargas de ráfagas visuales en las respuestas a estímulos en movimiento aumentaron en promedio en un 69% con la aplicación muscarina y un 167% con la aplicación de betanecol, y en las respuestas a destellos aumentaron en un 72% y un 35% respectivamente (figura

9.C-D, $n=4$ para muscarina y $n=4$ para betanecol, rangos de Wilcoxon para los datos agrupados $n=8$, $p<0,05$).

La aplicación en el TeO de nicotina 500 μM , en cambio, no produce cambios significativos en los potenciales evocados retino-tectales ni en la cantidad de ráfagas visuales (figuras 8.E-F y 9.E-F, $n=4$). Esto sugiere que el aumento en los potenciales retino-tectales y las ráfagas visuales provocado por la aplicación de acetilcolina ocurre a través de receptores colinérgicos sólo muscarínicos. Congruentemente, la microinyección en el TeO del antagonista muscarínico atropina (100 μM) produce el efecto opuesto al de la aplicación de agonistas muscarínicos: una reducción promedio en los potenciales evocados tectales del 8% para estímulos en movimiento y del 17% para destellos (figura 8.G-H, $n=6$, rangos de Wilcoxon, $p<0,05$), y en las ráfagas tectales visuales de un 44% para estímulos en movimiento, pero sin diferencias significativas en las respuestas a destellos (figura 9.G-H, $n=6$, rangos de Wilcoxon, $p<0,05$).

Debido a que la sola sobre-activación del núcleo Ipc produce un aumento en las respuestas visuales del TeO (ver sección 3.1.2), es posible que el aumento en los potenciales retino-tectales provocado por la microinyección de agonistas muscarínicos en el TeO se deba exclusivamente al aumento en las respuestas visuales del núcleo Ipc y no refleje un efecto directo de la activación de

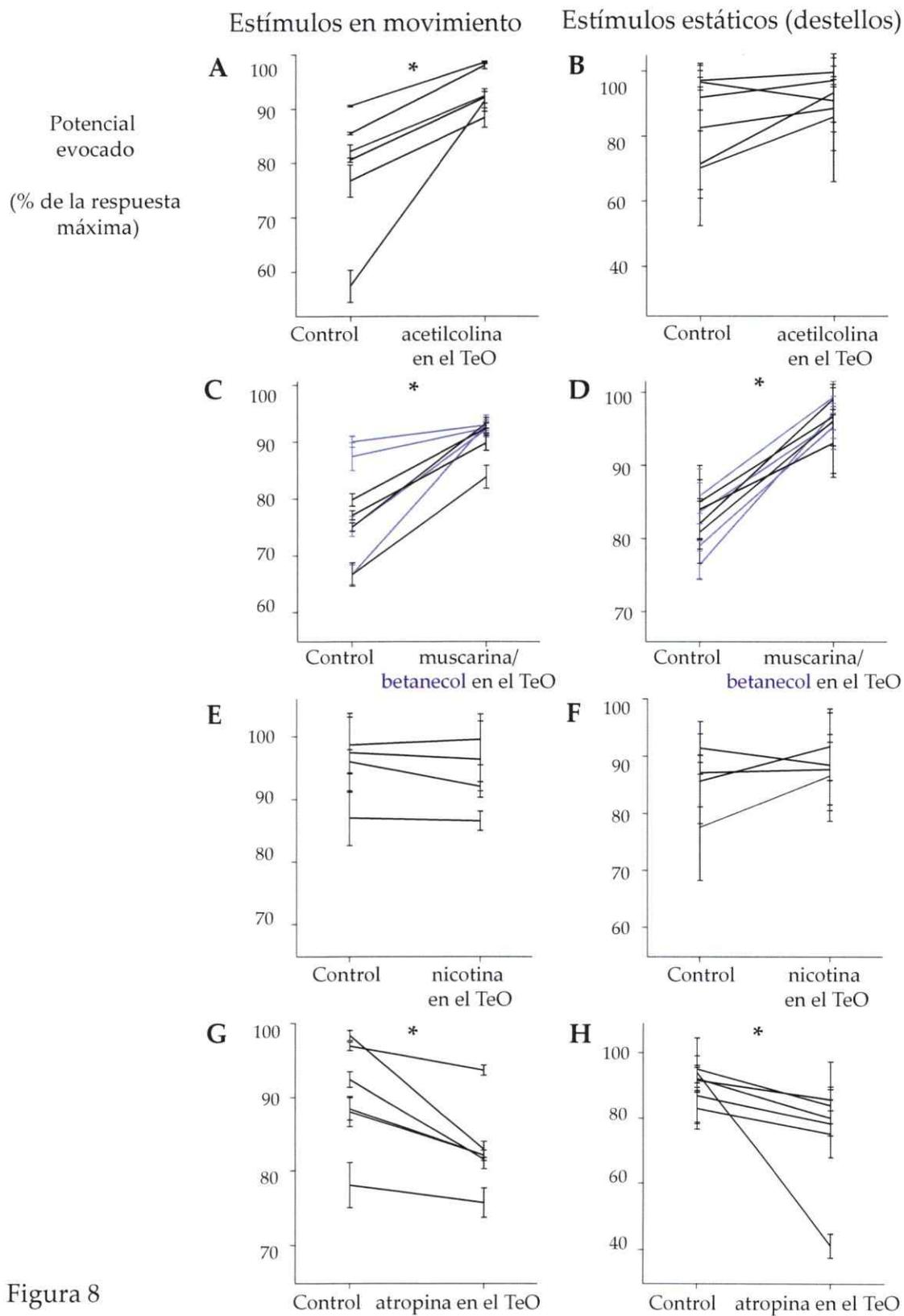


Figura 8

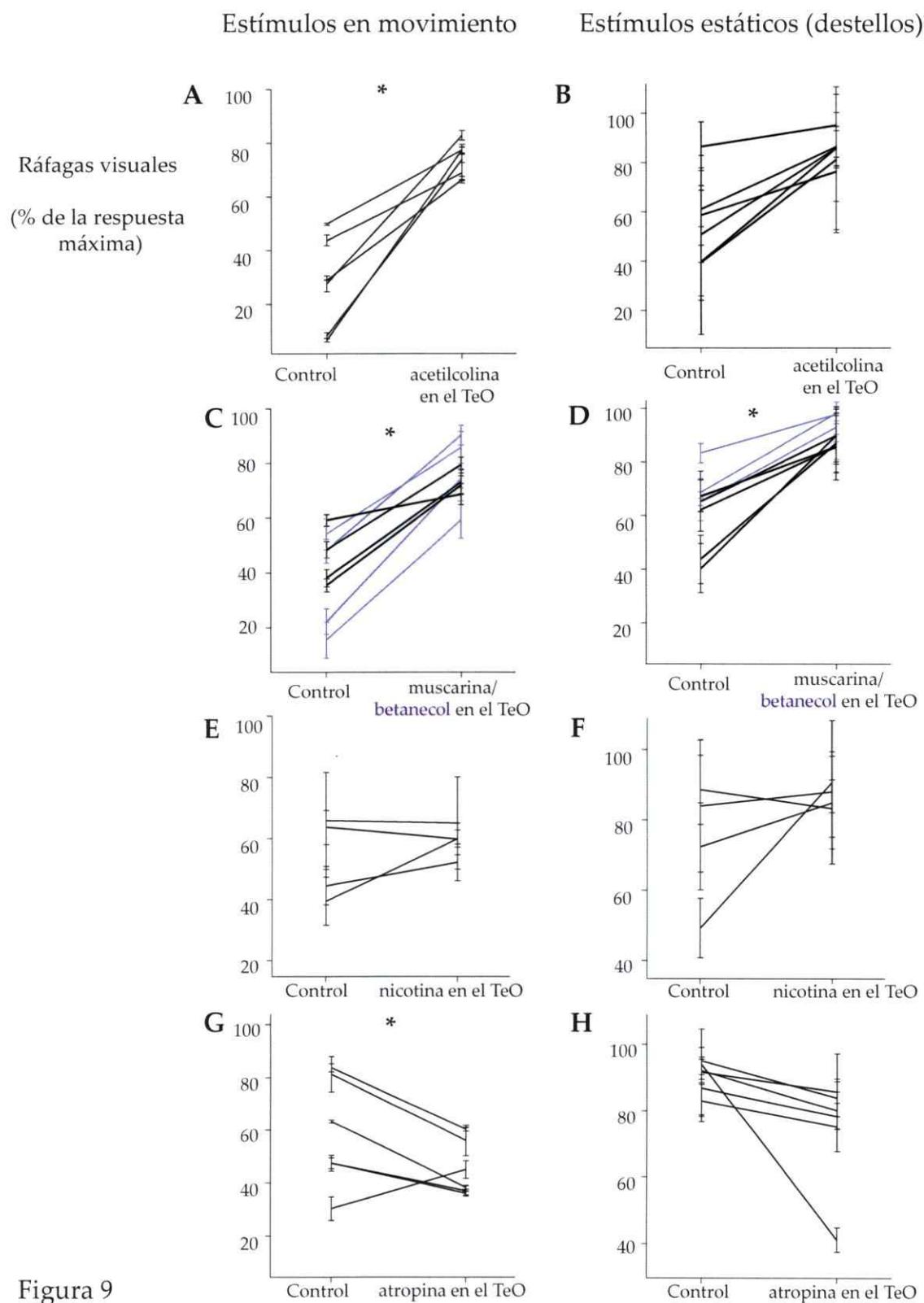


Figura 9

Figura 8 (Página 46). Efecto de agonistas y antagonista colinérgicos sobre los potenciales evocados retino-tectales.

Se grafican los cambios en los potenciales evocados por estímulos en movimiento y estáticos después de la microinyección en TeO de **A-B.** acetilcolina (n=6), **C-D.** muscarina (n=4, negro) y betanecol (n=4, violeta), **E-F.** nicotina (n=4), y **G-H.** atropina (n=6). Cada trazo corresponde a un experimento independiente. Las barras de error corresponden al error estándar dentro del experimento. * Rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$.

Figura 9 (Página 47). Efecto de agonistas y antagonista colinérgicos sobre la descarga de ráfagas visuales registrada en el tectum óptico (TeO).

Se grafican los cambios en los potenciales evocados después de la microinyección en TeO de **A-B.** acetilcolina (N=6), **C-D.** muscarina (N=4, negro) y betanecol (N=4, violeta), **E-F.** nicotina (N=4), y **G-H.** atropina (N=6). Cada trazo corresponde a un experimento independiente. Las barras de error corresponden al error estándar dentro del experimento. * Rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$.

receptores muscarínicos sobre las respuestas visuales tectales. En tal caso, la aplicación de agonistas colinérgicos muscarínicos probablemente tendría un efecto específico en las respuestas visuales de las células de la capa 10 del TeO, y no sobre otras células tectales. Por esta razón, microinyectamos acetilcolina o muscarina en el TeO, ahora manteniendo el *locus* homotópico en el núcleo Ipc inactivado mediante la microinyección de CNQX (200 μ M). Aun en tales condiciones, la microinyección de acetilcolina (5 mM), muscarina (500 μ M) o betanecol (20 mM) produjo un aumento promedio en los potenciales evocados

retino-tectales del 12% para estímulos visuales en movimiento (figura 10, n=3 para aplicación de acetilcolina, n=2 para aplicación de muscarina, n=1 para aplicación de betanecol, para los datos agrupados n=6, rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$) y una tendencia a aumentar en el caso de estímulos estáticos (n=2 para aplicación de acetilcolina, n=2 para aplicación de muscarina, n=1 para aplicación de betanecol, para los datos agrupados n=5, rangos de Wilcoxon, $p < 0,07$), mientras que la descarga de ráfagas tectales en dicho *locus* se mantuvo suprimida. Así, observamos un efecto directo de los agonistas muscarínicos sobre el potencial evocado retino-tectal.

Estos resultados indican que la activación de receptores muscarínicos en el TeO produce un aumento en la transmisión del flujo visual retino-tectal. El aumento en la descarga de ráfagas visuales producido por la activación de receptores muscarínicos en el TeO indica que las respuestas de las células tectales "bastón de pastor" de la capa 10 son moduladas a través de este mecanismo, ya que las ráfagas corresponden a las descargas de su blanco sináptico, las células del núcleo Ipc. Así, entre las poblaciones celulares tectales cuyas respuestas visuales aumentan por activación de receptores muscarínicos se encuentran las células de la capa 10.

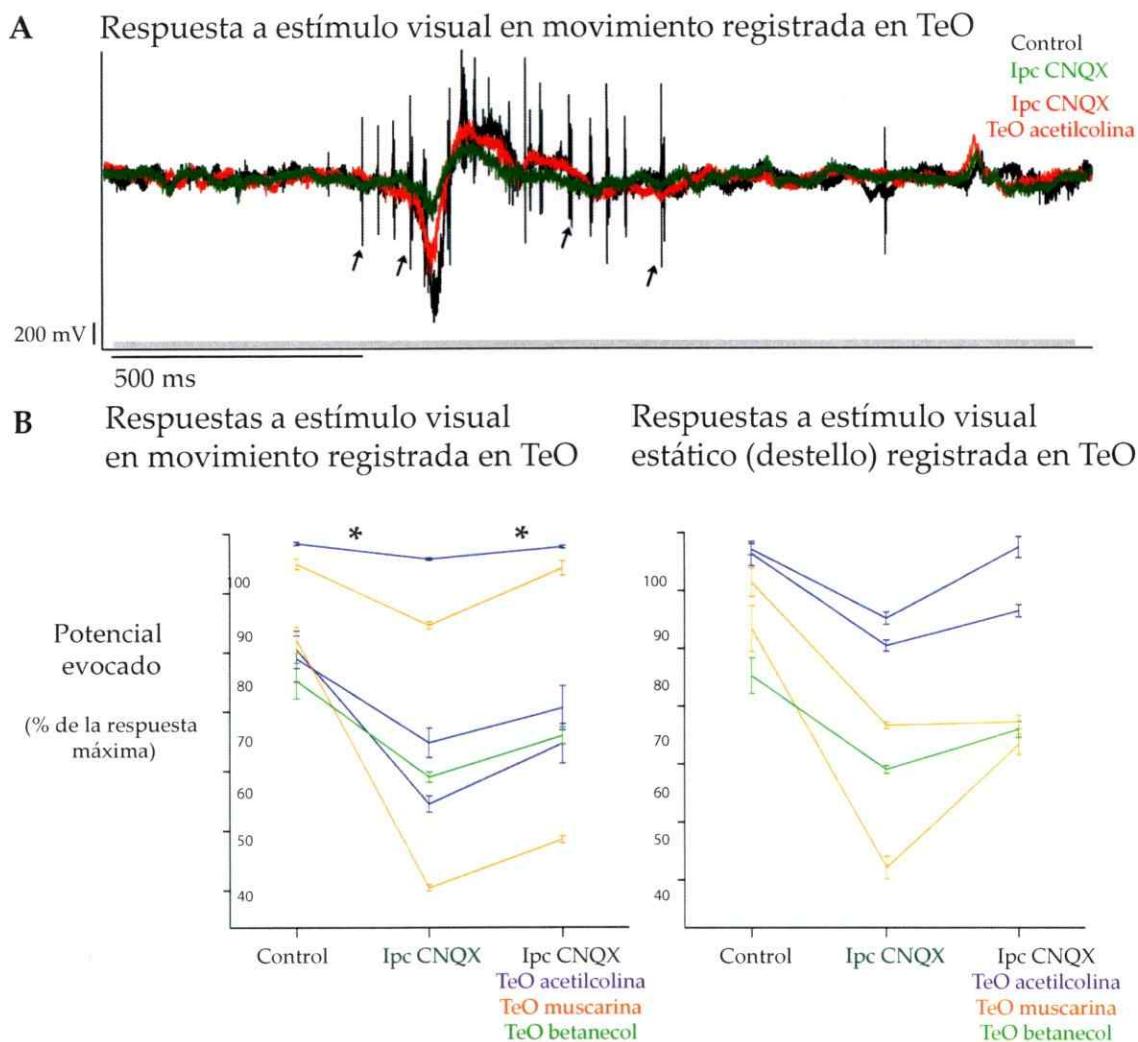


Figura 10. La aplicación de agonistas colinérgicos muscarínicos en el tectum óptico (TeO) produce un aumento en los potenciales evocados retino-tectales aun si el núcleo istmo parvocelular (Ipc) se mantiene inactivado.

A. Ejemplos de registros en el TeO de las respuestas a la presentación de un estímulo en movimiento. El trazo negro corresponde a la respuesta control en el locus homotópico en el núcleo Ipc, el trazo verde a las respuestas después de la microinyección de CNQX en el mismo locus y de suero salino en el TeO, y el trazo rojo a la microinyección de CNQX en Ipc y acetilcolina en el TeO. **B.** Potenciales retino-tectales evocados visualmente después de inactivar el locus homotópico en el núcleo Ipc, y después de aplicar acetilcolina (N=3, trazos violeta), muscarina (N=2, trazos naranja), o betanecol (trazos verdes) en el TeO. Cada trazo corresponde a un experimento independiente. Las barras de error corresponden al error estándar dentro del experimento. * Rangos de Wilcoxon para los datos agrupados, $p < 0,05$.

Esto último indica que la relación entre el TeO y el núcleo Ipc es recíproca, ya que la activación del núcleo Ipc provoca un aumento en la transmisión sináptica retina-cap 10, y por lo tanto aumentan sus propias respuestas visuales a través del circuito retina-cap 10-Ipc.

3.1.5. La adaptación de las respuestas tectales a estímulos visuales repetitivos no es afectada por la actividad del núcleo Ipc ni por la aplicación de agonistas o antagonistas colinérgicos en el TeO

Dada la naturaleza recursiva de las interacciones entre el núcleo Ipc y el TeO, se podría esperar que la actividad del primero tuviera un efecto de largo plazo (algunos segundos o más) sobre las respuestas visuales del segundo. Para explorar esta posibilidad hemos analizado la acomodación de las respuestas visuales tectales a estímulos repetitivos (ver sección 3.1.1, figura 5). Durante todos los experimentos hasta ahora descritos hemos registrado también las respuestas visuales a destellos repetitivos para saber si alguno de los tratamientos tiene algún efecto sobre la acomodación. Como se puede apreciar en la figura 11, luego de estandarizar las respuestas respecto a la respuesta inicial, ni la sobre-activación del núcleo Ipc (n=5) ni su inactivación (n=9) tienen efectos sobre el curso de la acomodación de los potenciales evocados retino-

tectales (ANDEVA de dos vías). Tampoco lo tienen la microinyección en el TeO de los agonistas y el antagonista colinérgicos que hemos usado (acetilcolina n=6, muscarina n=4, betanecol n=4, nicotina n=4, atropina n=6, ANDEVA de dos vías). Del mismo modo, la acomodación de las respuestas del núcleo Ipc registradas en el TeO a destellos luminosos repetitivos no cambia con estos tratamientos (microinyección de picrotoxina en el núcleo Ipc n=5, microinyección en el TeO de acetilcolina n=6, muscarina n=4, betanecol n=4, nicotina n=4, atropina n=6, ANDEVA de dos vías). Este resultado sugiere que la adaptación de las respuestas visuales del TeO y del núcleo Ipc observadas en el rango de los 12 segundos no depende de la actividad del núcleo Ipc, pero no nos permiten descartar que Ipc tenga otros efectos de largo plazo sobre las respuestas tectales.

Figura 11 (página 53). La adaptación de las respuestas visuales del TeO y el núcleo Ipc a estímulos repetitivos no dependen de la activación de receptores colinérgicos ni de la actividad del núcleo Ipc.

Se grafican los potenciales retino-tectales (izquierda) y las ráfagas (derecha) en las respuestas a 12 destellos consecutivos separados por 500 ms en distintos tratamientos. Todas las respuestas están expresadas como porcentaje de la inicial. Para microinyección en el TeO de acetilcolina, N=6, de muscarina, N=4, de betanecol, N=4, de nicotina, N=4, y de atropina, N=6. Para la microinyección de picrotoxina en el núcleo Ipc, N=5, y de CNQX, N=9. Las barras de error corresponden al error estándar.

Potencial evocado (% de la respuesta máxima) Ráfagas tectales (% de la respuesta máxima)

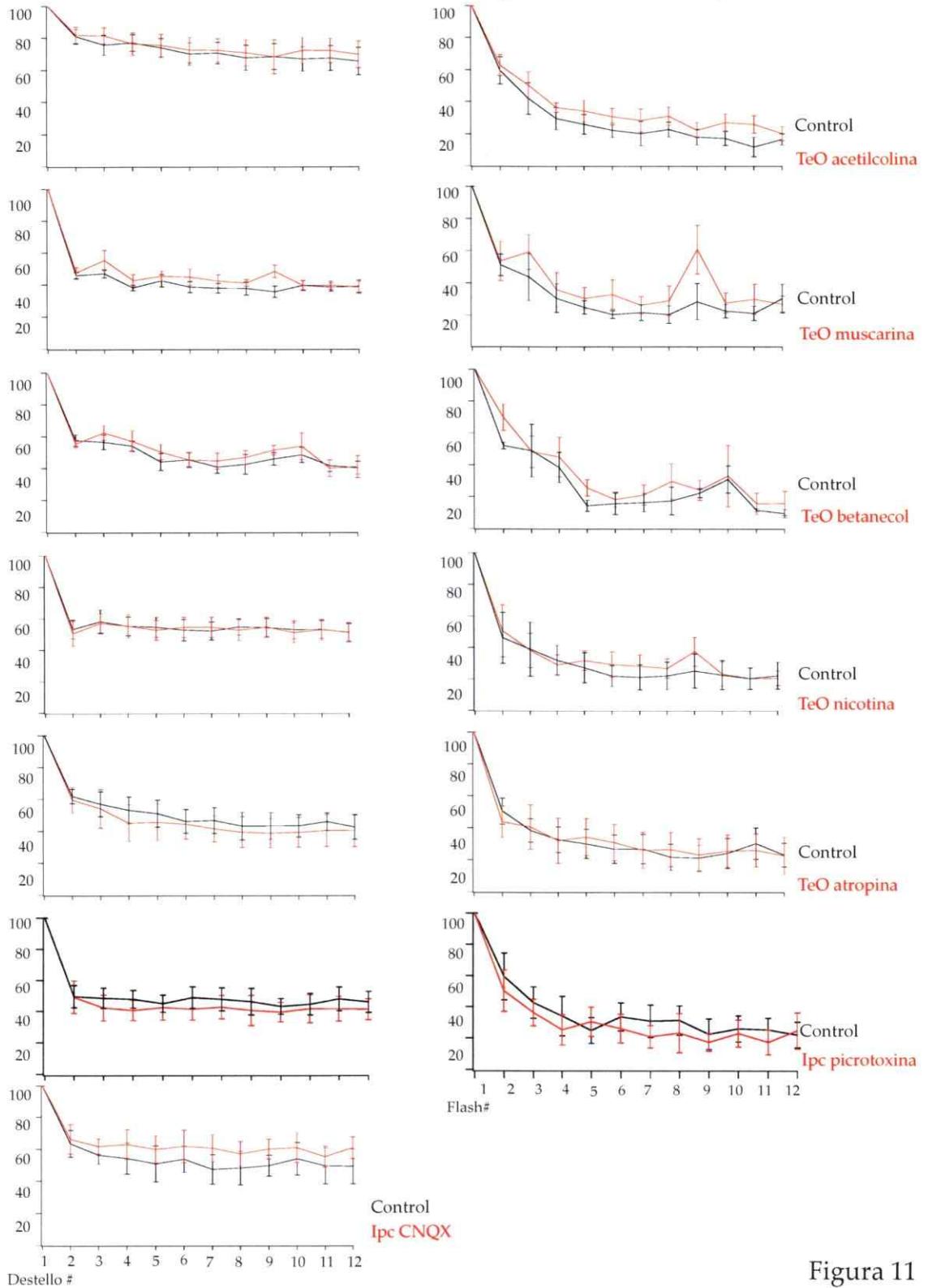


Figura 11

3.1.6. Distribución de receptores muscarínicos en el TeO

Como nuestros resultados de microinyección de agonistas y antagonistas colinérgicos sugieren la participación de receptores muscarínicos en el potencial evocado retino-tectal, hemos decidido estudiar la distribución de dichos receptores en el TeO. Estudios hechos en los años 80s y 90s de marcaje de receptores muscarínicos con ligandos radiactivos en el cerebro de aves muestran que en el TeO hay receptores muscarínicos (Dietl y col., 1988; Ball y col. 1990). Sin embargo, esta técnica no permite resolver espacialmente entre las distintas capas del TeO. Usando un anticuerpo que se une a los diferentes tipos de receptores muscarínicos en mamíferos y en otros grupos de animales, incluyendo aves (André y col., 1984; Bernardini y col., 1998; Calaza y Gardino, 2000), el anticuerpo M-35, hemos estudiado la distribución de receptores muscarínicos en el TeO de la paloma.

En el TeO la marca para M-35 se extiende por todas sus capas, pero sólo se observan somas inmunopositivos en la capa 13 y en menor medida en la capa 10 (figura 12.A, n=3). Los núcleos del istmo también presentan marca. En el núcleo Imc se marcan fuertemente los somas celulares, mientras que en los núcleos Ipc y SLu se marcan relativamente pocos somas y hay mucha marca de

neuropila (figura 12.B, n=3). Los controles negativos sin anticuerpo primario o secundario no presentan marca (figura 12.D, n=3).

Para determinar si parte de la marca observada en TeO corresponde a fibras de la retina, marcamos el mesencéfalo de una paloma enucleada seis semanas antes, para permitir la completa degeneración de las fibras retinianas (Britto y col., 1994). Como se observa en la figura 12.C, no se observan diferencias cualitativas en el patrón de marcaje de TeO desaferentado *versus* el TeO normal, salvo por la marca de células ubicadas en la capa 1 del TeO normal, las que en el TeO desaferentado se observan en mayor número y llegan a invadir capas retino-recipientes más profundas. En un individuo normal, éstas células inmunopositivas para M35 se observan en la superficie pial de todo el cerebro. En el animal enucleado se observa un aumento en la cantidad de éstas en todo el tracto óptico, indicando que éstas corresponderían a células gliales que han proliferado o aumentado la expresión de receptores muscarínicos como producto de la degeneración axonal, y no a neuronas ni neuropila tectales. Nuestros resultados no proveen ninguna evidencia de que las fibras retinianas en el TeO expresen receptores muscarínicos.

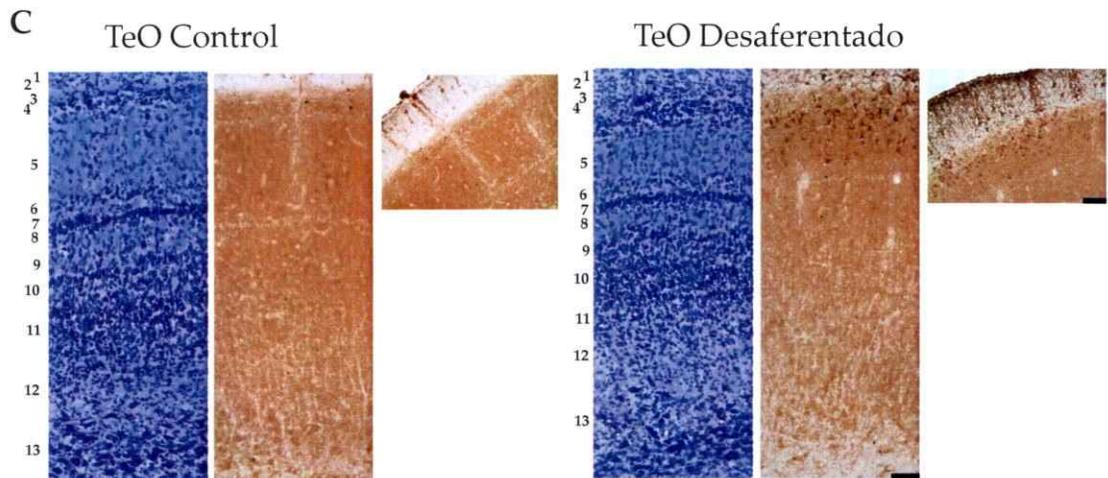
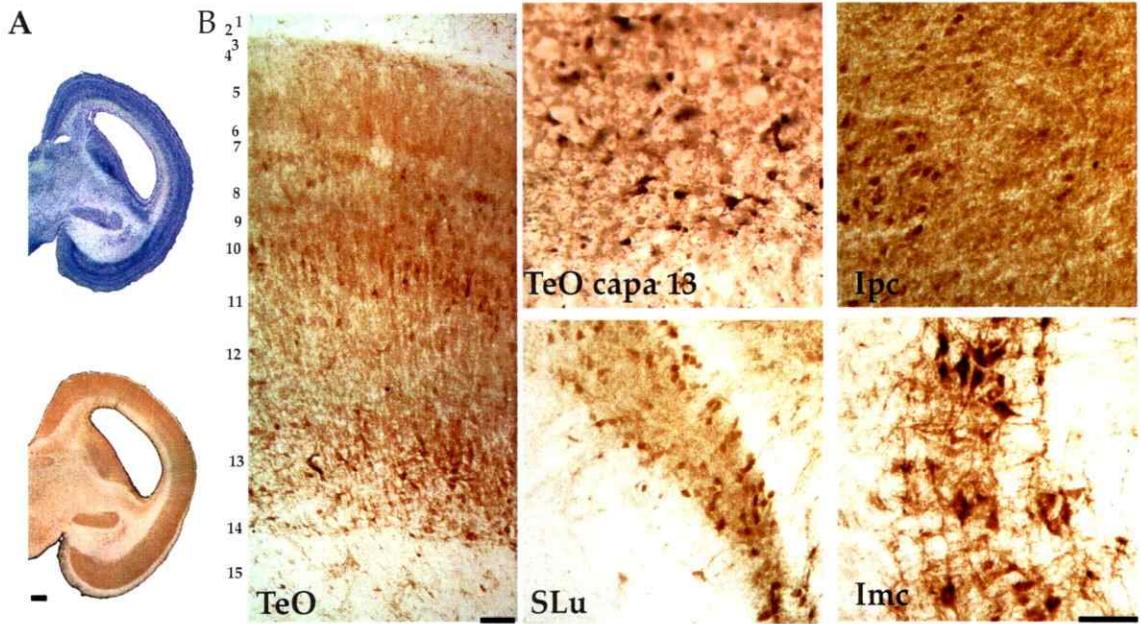


Figura 12

Figura 12 (página 56). Inmunoreactividad para receptores muscarínicos en el tectum óptico (TeO) y los núcleos del istmo en la paloma.

A. Microfotografías de bajo aumento del mesencéfalo de la paloma con tinción de Nissl (arriba) e inmunohistoquímica para receptores colinérgicos muscarínicos (abajo, anticuerpo M-35). **B.** Microfotografías de mayor aumento mostrando la inmunoreactividad para receptores muscarínicos en el TeO, en la capa 13 del TeO, y en los núcleos istmo parvocelular (Ipc), semilunaris (SLu), y magnocelular (Imc). **C.** Inmunoreactividad en el TeO en una paloma previamente enucleada. El control corresponde al tectum ipsilateral al ojo removido y el desaferentado corresponde al tectum contralateral. **D.** Controles de la marca del anticuerpo M-35 en el TeO, sin anticuerpo primario y sin anticuerpo secundario. Barras de calibración, 500 μm en A y 100 μm en B-D.

3.1.7. La aplicación de acetilcolina o nicotina en las capas superficiales del TeO produce un aumento en la actividad espontánea en el núcleo Ipc

Además de los efectos producidos sobre las respuestas visuales registradas en el TeO y el núcleo Ipc, la aplicación de agonistas colinérgicos en las capas superficiales del TeO modifica la tasa de descargas espontáneas de las células del núcleo Ipc. La inyección en el TeO de una microgota de acetilcolina (5mM) o nicotina (500 μM) pero no de muscarina (500 μM), provoca un notorio aumento en la actividad espontánea del núcleo Ipc (figura 13, n=5 para acetilcolina, n=5 para nicotina, rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$ y n=4 para muscarina,), sugiriendo que la activación de receptores nicotínicos en el TeO produce un aumento en las descargas espontáneas del núcleo Ipc, probablemente a través de las células

tectales bastón de pastor de la capa 10. Más aun, la microinyección de nicotina produce este efecto aun cuando aplicada junto con atropina, excluyendo la posible participación de receptores muscarínicos (figura 13, $n=6$, rangos de Wilcoxon, $p<0,05$).

Para saber si la actividad espontánea del núcleo Ipc es dependiente de la actividad espontánea de la retina, repetimos el experimento anterior, pero en presencia de CNQX 200 μM en el TeO. La microinyección de CNQX provoca una reducción en la actividad espontánea en el núcleo Ipc, indicando que al menos parte de la actividad espontánea del núcleo Ipc depende de la retina. Aun así, en estas condiciones la adición de acetilcolina o nicotina en el TeO produce un aumento en la actividad espontánea del núcleo Ipc, mientras las respuestas visuales permanecen suprimidas (figura 14, $n=4$ para acetilcolina y nicotina, rangos de Wilcoxon, $p<0,05$). También hemos realizado registros en palomas previamente enucleadas (6 semanas antes del registro). Aun en ausencia de aferencias retinianas, en el TeO se registran ráfagas indicativas de actividad espontánea del núcleo Ipc. En estas condiciones, la microinyección de nicotina produce en la descarga espontánea de ráfagas una tendencia a aumentar (figura 14, $n=4$, rangos de Wilcoxon, $p<0,07$).

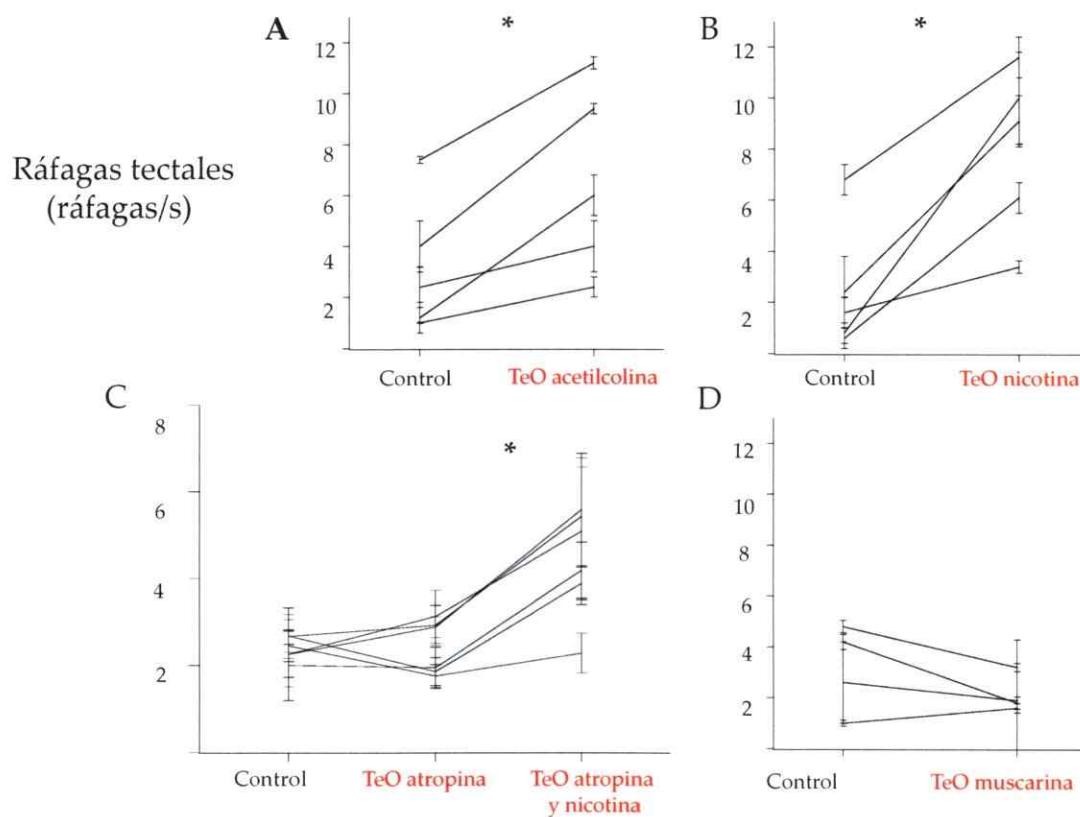


Figura 13. La microinyección de acetilcolina o nicotina en las capas superficiales del tectum óptico (TeO) produce un aumento en la actividad espontánea en el núcleo istmo parvocelular (Ipc).

Se grafica la actividad espontánea del núcleo Ipc después de la microinyección en el TeO de suero salino o **A**, acetilcolina (n=5), **B**, nicotina (n=5), **C**, atropina y atropina con nicotina (n=6), **D**, muscarina (n=4). Cada trazo corresponde a un experimento independiente. Las barras de error corresponden al error estándar dentro del experimento. * Rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$.

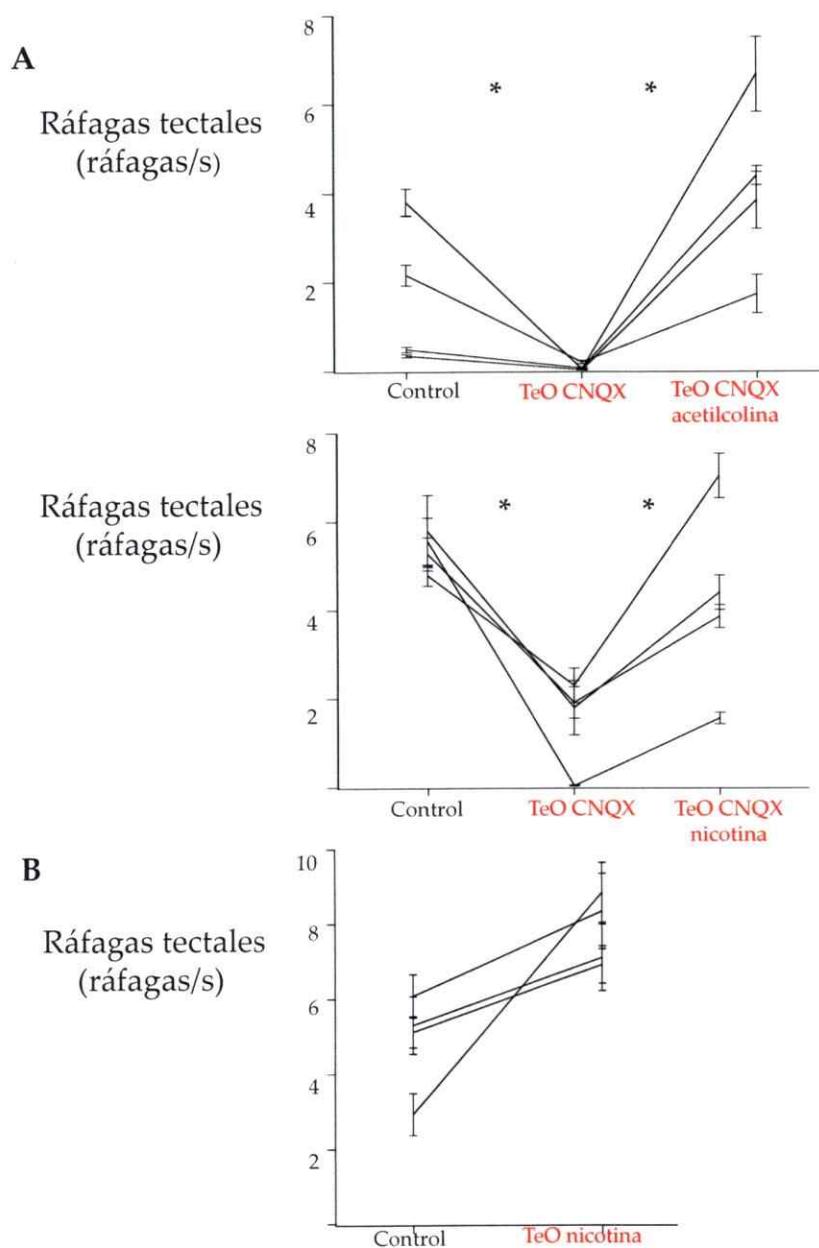


Figura 14. La microinyección de acetilcolina o nicotina en las capas superficiales del tectum óptico (TeO) produce un aumento en la actividad espontánea en el núcleo istmo parvocelular (Ipc), independientemente de la actividad de la retina. **A.** Actividad espontánea del núcleo Ipc después de la microinyección de suero salino o CNQX, y CNQX junto con acetilcolina (n=4) o nicotina (n=4). **B.** Actividad espontánea del núcleo Ipc registrada en el TeO previamente deaferentado después de la microinyección de salino o nicotina (n=4). * Rangos de Wilcoxon, $p < 0,05$.

Estos resultados sugieren que, a pesar de que parte de la actividad espontánea de Ipc depende de la actividad de la retina, el aumento producido en esta actividad por la activación de receptores nicotínicos en el TeO es independiente de ésta. Los receptores nicotínicos podrían estar presentes en las células bastón de pastor o en alguna interneurona tectal que proyecte sobre éstas.

3.2. Conexiones del núcleo Imc en Passeriformes

3.2.1. Las células que proyectan al núcleo Ipc y al TeO están entremezcladas en el núcleo Imc del pollo

Como se dijo en la introducción, basándose en experimentos de llenado intracelular, el grupo de H. J. Karten ha sugerido que el núcleo Imc estaría compuesto de dos subpoblaciones de células que se encuentran entremezcladas; una que proyecta a los núcleos Ipc y SLu y otra que proyecta al TeO (Wang y col., 2004). Por otro lado, un estudio sobre el desarrollo del mesencéfalo del diamante mandarín muestra que el núcleo Imc en estos animales posee dos claras subdivisiones anatómicas (Braun y col., 1988). Antes de investigar la anatomía del núcleo Imc en Passeriformes, decidimos corroborar los resultados

de Wang y col. (2004) sobre la organización del núcleo Imc del pollo haciendo depósitos de cristales de trazadores retrógrados en el TeO y el núcleo Ipc en rebanadas de mesencéfalo de pollo.

Al aplicar trazadores neuronales fluorescentes de dos colores diferentes en el TeO y el núcleo Ipc (n=8), encontramos que las células del núcleo Imc que proyectan al TeO y al núcleo Ipc pertenecen a poblaciones diferentes, pero no están segregadas espacialmente (figura 15). Como también había sido observado por Wang y col. (2004), las células marcadas retrógradamente por inyecciones en el TeO son mucho menos numerosas que las marcadas por inyecciones en Ipc. A pesar de que en cada rebanada depositamos cuatro o cinco cristales grandes distribuidos por el TeO medial y lateral (unos 200-300 μm de diámetro aproximadamente), tan sólo se marcaron 17 células en un total de 8 rebanadas, mientras que habiendo depositado apenas un cristal pequeño en el núcleo Ipc por rebanada (50-100 μm de diámetro aproximadamente), se marcaron 1345 en un total de 8 rebanadas.

De las 17 células marcadas que proyectan al TeO, apenas 3 presentaron doble marca, y dado que las tres ocurrieron en la misma rebanada, no es descartable que la doble marca se deba a errores metodológicos tales como difusión de trazador a través del medio de incubación desde un sitio de

inyección al otro en la rebanada. Así, aunque la escasez de marca originada en el TeO dificulta el análisis, se puede decir que prácticamente no hay doble marca, corroborándose así los resultados de Wang y col. (2004).

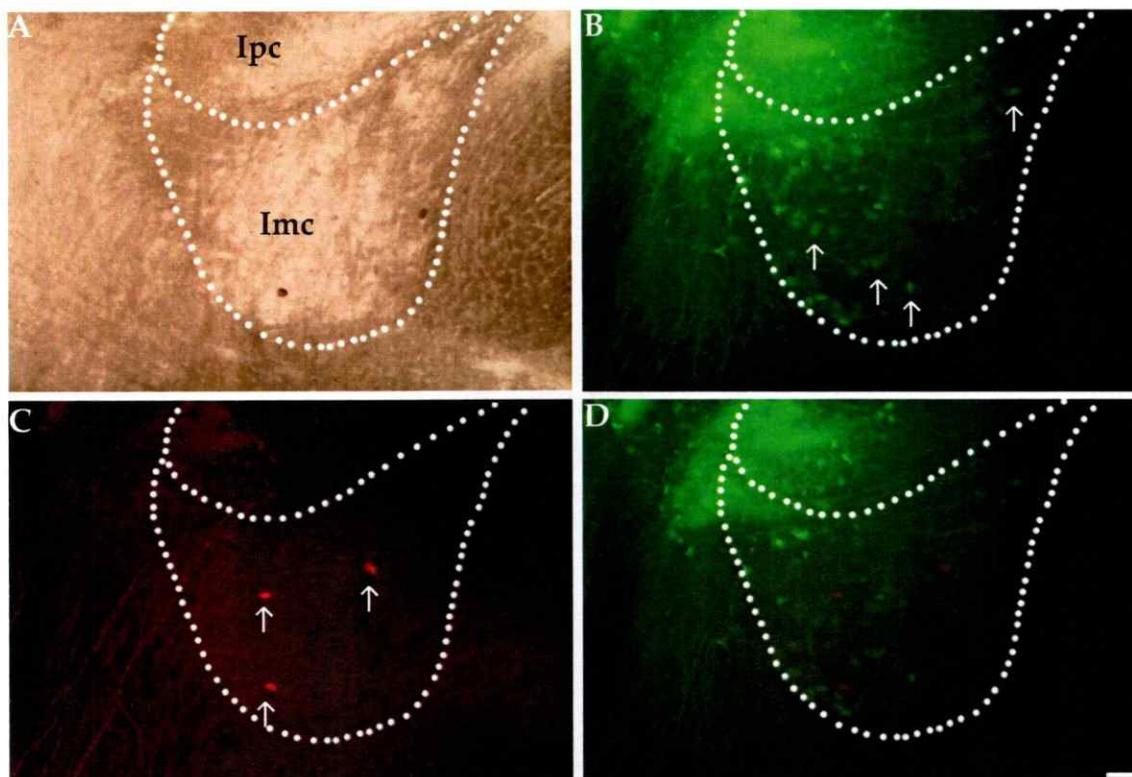


Figura 15. Ejemplos de células marcadas retrógradamente en el núcleo istmo magnocelular (Imc) después del depósito de cristales de biocitina conjugada con rodamina en el tectum óptico (TeO) y de BDA conjugado con fluoresceína en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) en rebanadas de mesencéfalo de pollo (*Gallus gallus*). **A.** Microfotografía de luz transmitida, para mostrar la ubicación de los núcleos Ipc e Imc. **B.** Células de Imc que proyectan a Ipc (algunas de ellas señaladas con flechas blancas). **C.** Células de Imc que proyectan a TeO (señaladas con flechas blancas). **D.** Superposición de B y C. Notar que no hay células doblemente marcadas. Barra de calibración =100 μ m

3.2.2. El núcleo Imc está organizado en dos divisiones en Passeriformes

Además del diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*, familia Passeridae), donde se ha mostrado que el núcleo Imc está subdividido en dos capas (Braun y col., 1988), tuvimos oportunidad de examinar el núcleo Imc en otras cuatro especies del orden Passeriformes. Éstas fueron: el zorzal, (*Turdus falcklandii*, familia Turdidae), el estornino (*Sturnus vulgaris*, familia Sturnidae), el chincol (*Zonotrichia capensis*, familia Emberizidae) y el fiofío (*Elaenia albiceps*, familia Tyrannidae). En todas estas especies el núcleo Imc está organizado en dos claras divisiones citoarquitectónicas: Una interna, más próxima al núcleo Ipc (Imc-in), y otra externa, más próxima al TeO (Imc-ex). En la figura 16 se muestran cortes coronales de mesencéfalo teñidos con Nissl, donde se aprecia el núcleo Imc en los Passeriformes estudiados, junto con cortes del núcleo Imc de una paloma (*Columba livia*, orden Columbiformes), un pollo (*Gallus gallus*, orden Galliformes), una cotorra argentina (*Myiopsitta monachus*, orden Psittaciformes), un queltehue (*Vanellus chilensis*, orden Charadriiformes) y un picaflor (*Sephanoides sephanoides*, orden Apodiformes). En ninguno de estos no-Passeriformes el núcleo Imc presenta subdivisiones reconocibles. Psittaciformes, el orden al que pertenece la cotorra, es grupo hermano de Passeriformes según la última filogenia molecular de aves (Hackett y col., 2008), lo que sugiere que la

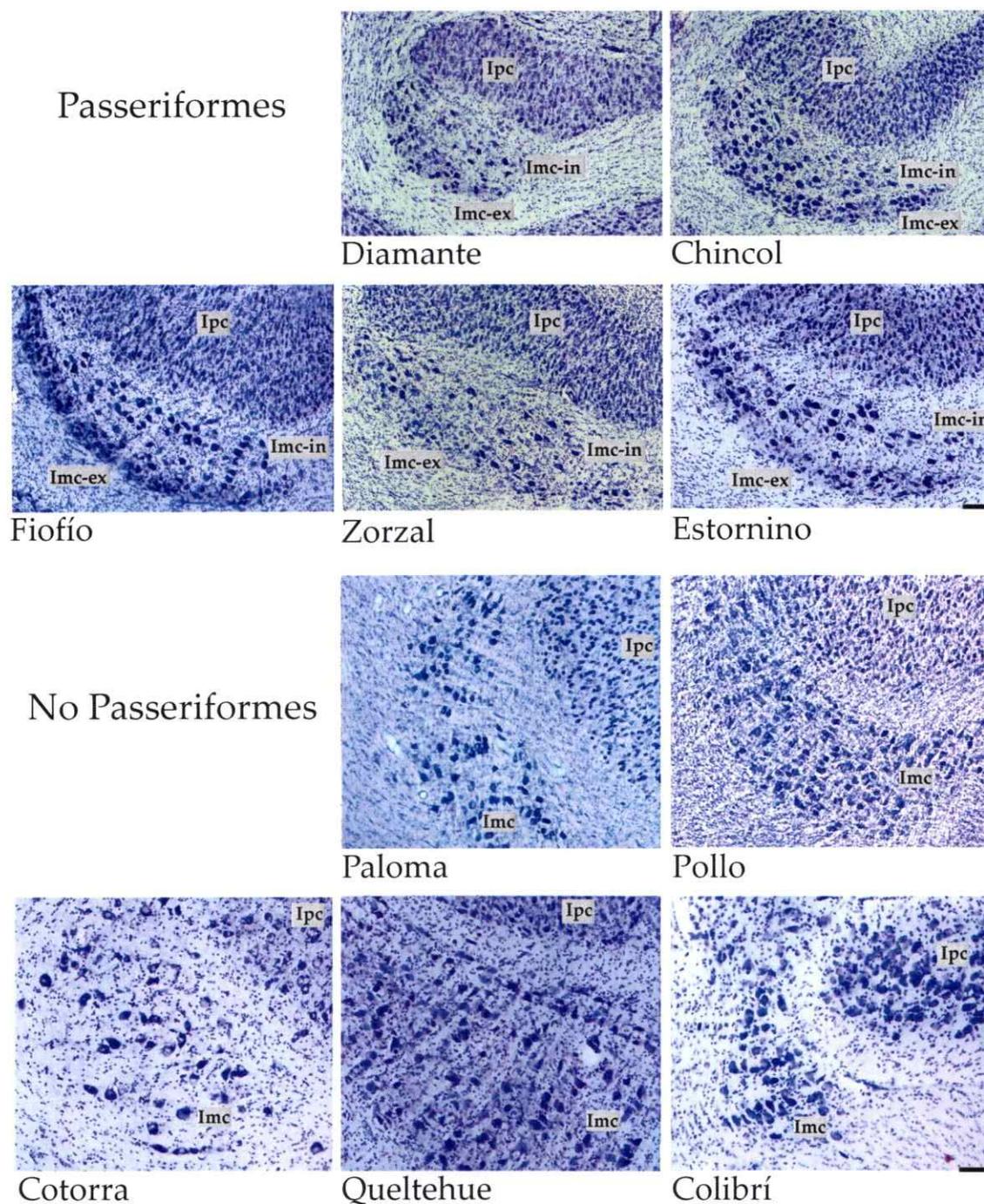


Figura 16. Secciones coronales teñidas con Nissl que muestran el núcleo Istmo magnocelular (Imc) en distintas especies de Passeriformes y no Passeriformes. Imc-in e Imc-ex, divisiones interna y externa del núcleo Imc respectivamente. Ipc, núcleo istmo parvocelular. Barras de calibración = 50µm.

subdivisión del núcleo Imc en dos capas podría ser una característica exclusiva de los Passeriformes.

3.2.3. La división interna del núcleo Imc de Passeriformes contiene células más grandes y presenta menor densidad celular que la división externa

Además de la presencia de dos subdivisiones en el núcleo Imc de Passeriformes, al observar secciones teñidas con Nissl se hace evidente la diferencia en tamaños celulares y densidad celular entre éstas. En todos los especímenes que examinamos se puede apreciar que las células del núcleo Imc-in son más grandes y están más separadas unas de otras que las del núcleo Imc-ex. Medidas del tamaño celular y densidades celulares realizadas en un espécimen de cada especie corroboran esta observación. El diámetro máximo promedio de los somas del núcleo Imc-in supera al del núcleo Imc-ex en un 27% en el zorzal, 23,4% en el chincol, 42,2% en el estornino, 29% en el diamante, y 18% en el fiofío. Por otra parte, la densidad celular en Imc-in es menor que la de Imc-ex en un 73% en el zorzal, 67% en el chincol, 75% en el diamante y 35% en el fiofío (figura 17). En el estornino no fue posible estimar la densidad celular, ya que no disponíamos del tejido (ver materiales y métodos).

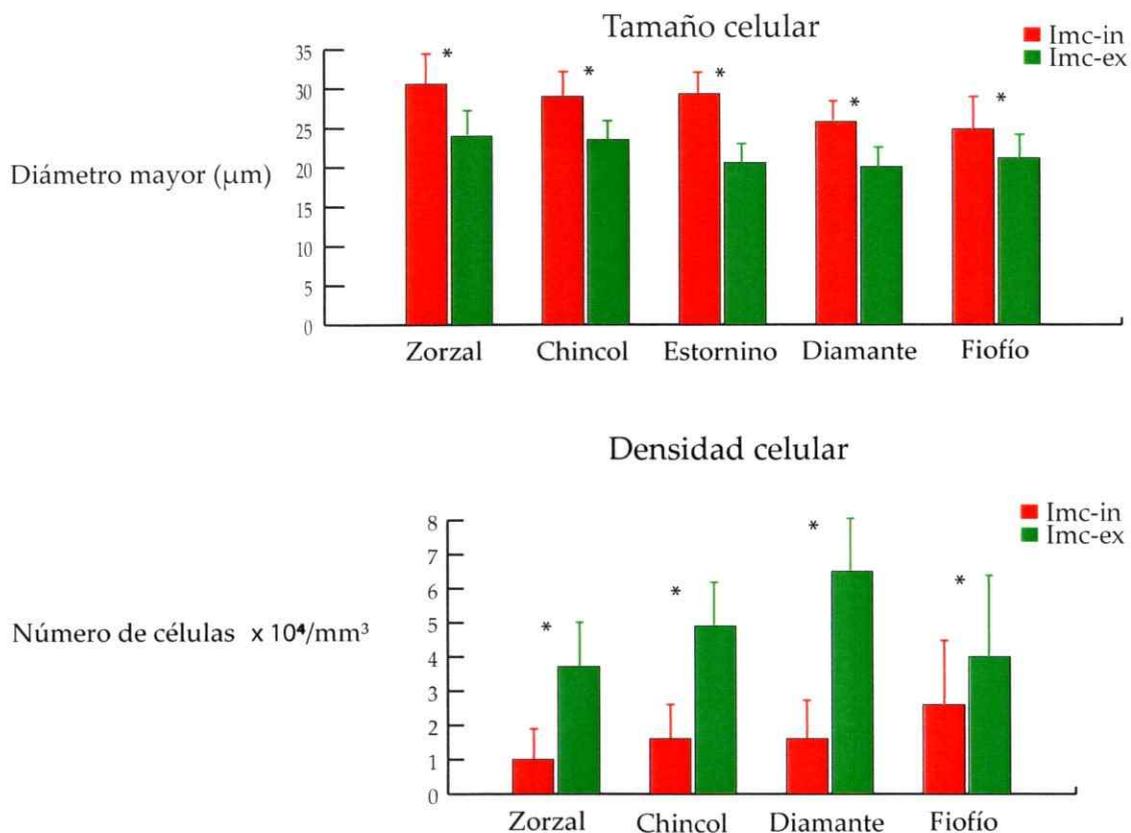


Figura 17. Tamaños celulares y densidad celular en las divisiones interna y externa del núcleo istmo magnocelular (Imc-in e Imc-ex) en varias especies de Passeriformes. Las medidas se realizaron en un espécimen de cada especie. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las medidas en 100 células (arriba) y 100 disectores ópticos (abajo). * test de t, $p < 0,05$.

3.2.4. La división externa del núcleo Imc del diamante mandarín proyecta al núcleo Ipc, mientras que la división interna proyecta al TeO

Para determinar si es que las células de las dos divisiones del núcleo Imc en Passeriformes corresponden a los dos tipos celulares observados en el pollo,

hemos depositado cristales de trazadores neuronales retrógrados en el TeO y el núcleo Ipc en el diamante, usando preparaciones *in vitro* de rebanadas de mesencéfalo.

Al depositar cristales de biocitina en el núcleo Ipc del diamante (N=8), las células marcadas retrógradamente se ubican principalmente en el núcleo Imc-ex (95.4% de un total de 283 células marcadas, figura 18), mientras que las células marcadas luego de depositar cristales de biocitina en el TeO (N=8) se ubican casi exclusivamente en el Imc-in (98.9% de un total de 93 células marcadas, figura 18).

También realizamos inyecciones dobles con trazadores fluorescentes de dos colores diferentes en el TeO y el núcleo Ipc (biocitina conjugada con rodamina y BDA conjugada con fluoresceína, respectivamente, N=5). El patrón de marcaje retrógrado en el núcleo Imc corrobora los resultados previos, ya que las células marcadas desde el núcleo Ipc se localizan sólo en el núcleo Imc-ex y las células marcadas desde el TeO se localizan sólo en el núcleo Imc-in, y no se observaron células con doble marca (figura 19).

Para descartar la posibilidad de que la integridad de la proyección desde el núcleo Imc-ex al TeO fuera afectada durante la preparación de las rebanadas, hicimos dos inyecciones *in vivo* de CTB en el TeO. En ambos casos, todas las

células retrógradamente marcadas se ubican en la división medial del núcleo Imc (un total de 62 y 25 células, figura 20).

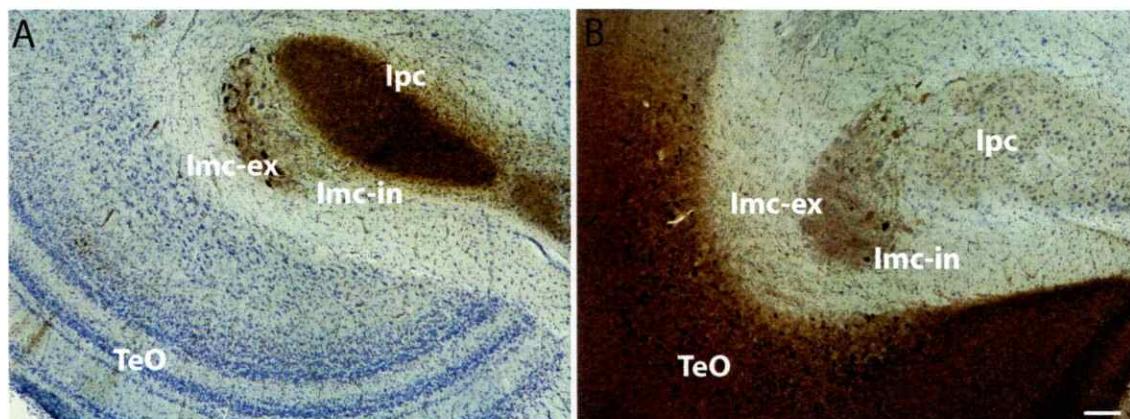


Figura 18. Ejemplos de células retrógradamente marcadas en el núcleo istmo magnocelular del diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*) luego del depósito de cristales de biocitina en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) y en el tectum óptico (TeO) en rebanadas de mesencéfalo.

A. Células marcadas en Imc luego del depósito de un cristal de biocitina en Ipc.

B. Células marcadas en Imc luego del depósito de varios cristales de biocitina en TeO. Imc-in, división interna de Imc, Imc-ex, división externa de Imc. Barra de calibración= 100 μ m.

3.2.5. Estimación del volumen y número de células en el núcleo Imc interno y externo en el diamante mandarín y el zorzal

De acuerdo con Wang y col. (2004), en el núcleo Imc del pollo las células que proyectan al TeO son menos numerosas que las que proyectan a los núcleos Ipc y SLu. Nuestros resultados de aplicación de trazadores neuronales apoyan esa noción (sección 3.2.1) y sugieren que en Passeriformes podría ser también el caso. Aprovechando la segregación de los dos tipos celulares en el diamante mandarín, hemos realizado estimaciones del número de células en los núcleos Imc-in e Imc-ex para comprobar si efectivamente hay más células que proyectan al TeO (en Imc-in) que células que proyectan al núcleo Ipc (en Imc-ex). En un diamante y un zorzal, nuestra estimación de la cantidad de células en el núcleo Imc-in es de $1576 \pm 0,08$ y $2119 \pm 0,07$, y en el núcleo Imc-ex de $3247 \pm 0,06$ y $5047 \pm 0,05$, respectivamente. Es decir, en el núcleo Imc-ex habría algo más del doble de células que en el núcleo Imc-in. Nuestras estimaciones de volúmenes en el diamante mandarín son de $0,19 \text{ mm}^3$ para el núcleo Imc-in y de $0,22 \text{ mm}^3$ para el núcleo Imc-ex, y en el zorzal de $0,25 \text{ mm}^3$ para el núcleo Imc-in y de $0,37 \text{ mm}^3$ para el núcleo Imc-ex. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las células de Imc que proyectan al TeO son menos numerosas que las que proyectan a los núcleos Ipc y SLu.

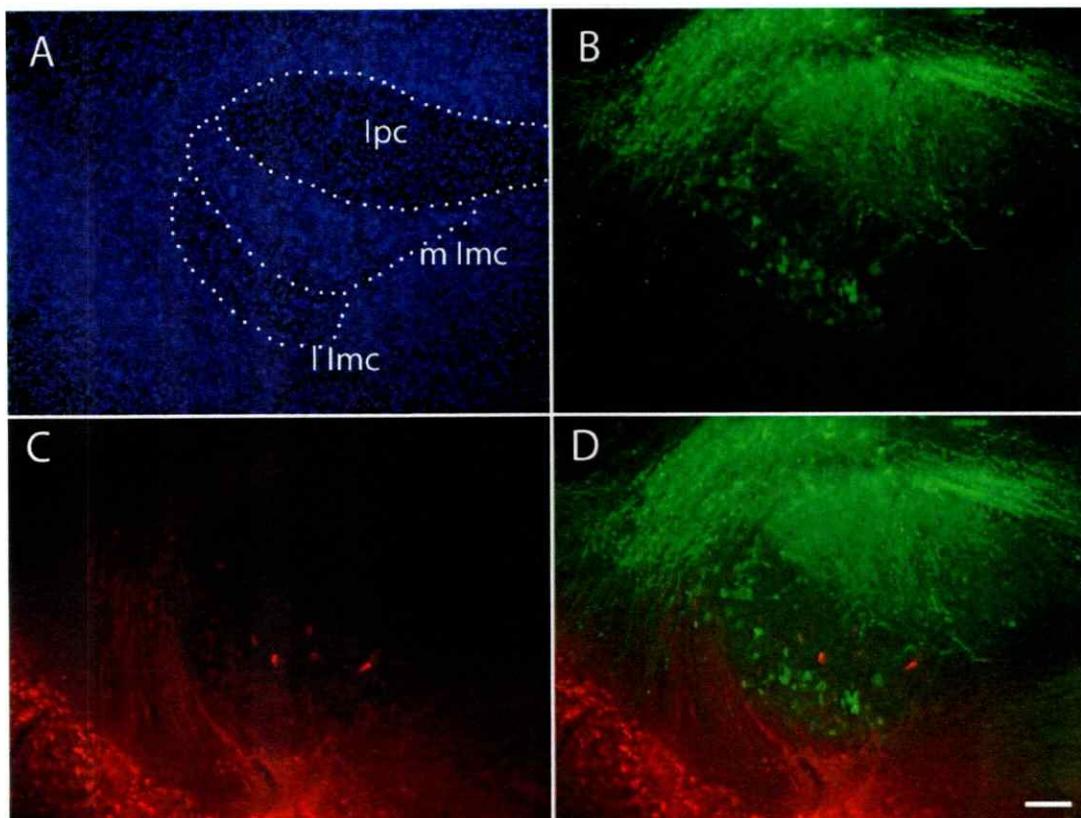


Figura 19. Ejemplos de células marcadas retrógradamente en el núcleo istmo magnocelular (Imc) después del depósito de un cristal de biocitina conjugada con rodamina en el tectum óptico (TeO) y otro de BDA conjugado con fluoresceína en el núcleo istmo parvocelular (Ipc) en rebanadas de mesencéfalo de diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*). **A.** Tinción de Dapi, para mostrar la ubicación de los núcleos Ipc, Imc interno (Imc-in) e Imc externo (Imc-ex). **B.** Células de Imc que proyectan a Ipc. **C.** Células de Imc que proyectan al TeO. **D.** Superposición de B y C. Barra de calibración = 100 μ m

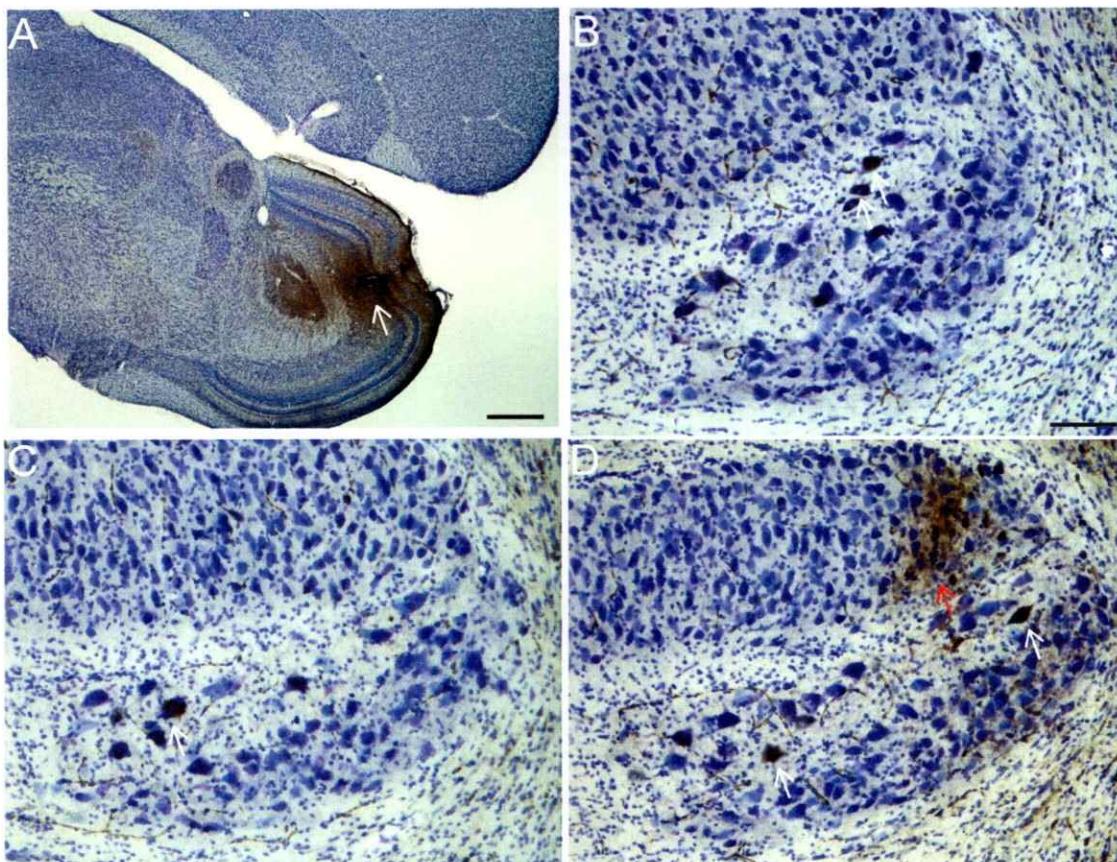


Figura 20. Ejemplos de células retrógradamente marcadas en el núcleo istmo magnocelular del diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*) luego de una microinyección *in vivo* de CTB en el tectum óptico.

A. Sitio de inyección (flecha blanca). **B-D.** Secciones de tres niveles rostrocaudales diferentes mostrando células marcadas en la subdivisión interna del núcleo istmo magnocelular (flechas blancas), así como fibras marcadas anterogradamente en el núcleo istmo parvocelular (flecha naranja en D). Barras de calibración = 500 μm (A) y 100 μm (B-D).

4. DISCUSION

Nuestros resultados sugieren que la activación del núcleo Ipc provoca un aumento en los potenciales evocados retino-tectales a través de receptores muscarínicos. De acuerdo a nuestros resultados de inmunohistoquímica en el TeO desaferentado, estos receptores se localizarían en células tectales y no en los terminales axónicos de la retina. Entre las células tectales cuyas respuestas visuales se ven moduladas de esta manera, se encuentran las células de la capa 10, ya que la aplicación de agonistas muscarínicos en el TeO produce un aumento en las respuestas visuales en el núcleo Ipc. Por otra parte, la actividad espontánea del núcleo Ipc se ve aumentada por la activación de receptores nicotínicos en el TeO, los cuales podrían localizarse en las células de la capa 10 o en alguna interneurona intra-tectal. Así, en esta tesis hemos mostrado que la

activación del núcleo Ipc aumenta la transmisión sináptica retino-tectal a través de receptores muscarínicos, prolongando así su propia activación, y también su propia actividad espontánea a través de receptores nicotínicos (figura 21).

En esta tesis también hemos corroborado la observación previa del grupo de H. J. Karten (Wang y col., 2004) de que el núcleo Imc del pollo se compone de dos subpoblaciones celulares que tienen proyecciones diferentes, pero que son indistinguibles por la forma o tamaño de sus somas, los que se encuentran entremezclados en el núcleo. Hasta ahora, los modelos animales para el estudio del circuito istmotectal en aves han sido el pollo (Wang y col., 2004; Wang y col., 2006), la paloma (Marín y col., 2005., Marín y col., 2007) y la lechuza (Asadollahi y col., 2010). En todos estos animales el núcleo Imc exhibe un aspecto homogéneo. Nosotros mostramos que las dos subdivisiones que componen el núcleo Imc del diamante mandarín corresponden a los dos tipos morfológicos presentes en el núcleo Imc del pollo. Proponemos al diamante mandarín como un modelo ideal para el estudio de la organización y fisiología del núcleo Imc, ya que al tener las dos subpoblaciones neuronales de este núcleo segregadas espacialmente, permite el estudio de éstas por separado.

La retroalimentación positiva que el núcleo Ipc ejerce sobre las respuestas visuales en el TeO formaría parte de un mecanismo de selección competitiva de

estímulos, en el cual la competencia entre aferencias retinianas en el TeO es efectuada por una inhibición GABAérgica de largo alcance mediada por el núcleo Imc (Serenio y Ulinski, 1987; Marín y col., 2007). Las actividad de los núcleos Rt en el tálamo y entopallio en el telencéfalo se sincroniza con la actividad visual registrada en el núcleo Ipc (Marín y col., en imprenta). Este mecanismo de selección de estímulos estaría involucrado en la atención visual espacial del animal, al permitir que la actividad visual gatillada desde las regiones del campo visual donde se encuentran estímulos novedosos o salientes (que tienen mayor probabilidad de "ganar" la competencia) ascienda hacia el tálamo y el telencéfalo en mayor medida que la gatillada por estímulos no-novedosos o poco salientes (Marín y col., en imprenta). Así, de la totalidad de estímulos visuales que podrían estar presentes simultáneamente en una escena visual, se restringiría la cantidad de estímulos hacia los cuales el animal orientaría su conducta.

4.1. Efecto de la activación del núcleo Ipc y aplicación de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre las respuestas visuales registradas en el TeO

4.1.1. Inhibición y sobreactivación del núcleo Ipc

Hemos mostrado que los potenciales de campo tectales evocados visualmente son aumentados por la sobreactivación del núcleo Ipc y se ven reducidos por la inactivación de este núcleo. Estos resultados son consecuentes con el actual modelo de selección de estímulos efectuada por el circuito istmo-tectal (Marín y col., 2007; Lai y col., 2011) y difieren de resultados previos obtenidos por otros grupos. Reportes anteriores del grupo de S. R. Wang sobre la modulación que la actividad del núcleo Ipc produce sobre las respuestas visuales tectales habían mostrado que la sobre-activación de este núcleo con NMDA provoca una reducción en las respuestas visuales y los tamaños de los campos receptivos de las células tectales, mientras que la inactivación del núcleo Ipc con lidocaína tiene el efecto contrario (Wang y col., 1995a; Wang y col., 2000). Por otra parte, de acuerdo a los trabajos de estos autores, la sobre-activación del núcleo Imc con acetilcolina provocaría un aumento en las respuestas visuales tectales y en el tamaño de sus campos receptivos, mientras que su inactivación con lidocaína tendría el efecto opuesto (Wang y col., 1995a; Wang y col., 2000). Los autores concluyen que el núcleo Ipc tiene un efecto inhibitorio y el núcleo Imc un efecto

excitatorio sobre las respuestas visuales de las células tectales. Dado que los mismos autores habían generado evidencias de que la acetilcolina actúa como un neurotransmisor excitatorio y GABA como uno inhibitorio sobre el TeO (Wang y col, 1986), ellos proponen que las células del núcleo Ipc serían GABAérgicas, mientras que las del núcleo Imc serían glutamatérgicas y colinérgicas (Wang y col., 1995b). Sin embargo, esta explicación no es apoyada por las evidencias inmunohistoquímicas más recientes, que sugieren que Imc es GABAérgico e Ipc colinérgico (Wang y col., 2004, 2006). Wang y col. (1986, 1995a, 1995b, 2003, 2000) tampoco disponían de la detallada descripción de Marín y col. (2005, 2007) de las respuestas distintivas que se registran en los núcleos Ipc e Imc. En el núcleo Ipc se registran ráfagas de unos 600 Hz (sincronizadas con las ráfagas tectales) que van montadas sobre una onda positiva de unos 20 a 100 Hz, con campos receptivos circulares de unos 15-25°. Al presentar estímulos fuera de estos campos receptivos se registran espigas regulares de alta frecuencia (500-700 Hz), que corresponden a las descargas de los axones provenientes del núcleo Imc (Marín y col., 2005). Las neuronas del núcleo Imc responden a estímulos visuales con trenes de espigas de alta frecuencia (500-700 Hz, como la señales registradas en el núcleo Ipc), con campos receptivos ovalados y verticales, que alcanzan hasta unos 100-120° de

largo (Marín y col., 2007). Por último, Wang y col. (1986, 1995a, 1995b, 2003, 2000) no sabían que las ráfagas tectales correspondían a descargas de los axones de las células de Ipc (Marín y col., 2005). En conjunto todas estas diferencias entre el modelo de trabajo del grupo de S. R. Wang y nosotros podría dar cuenta de estas discrepancias.

Marín y col. (2007) mostraron que el núcleo Ipc ejerce un efecto de compuerta en la transmisión del flujo visual tectal hacia el núcleo Rt. La inactivación del núcleo Ipc produce un escotoma en el núcleo Rt en la región del campo visual correspondiente al campo receptivo inactivado. De acuerdo a este resultado, se esperaría que la modulación de las respuestas visuales tectales en el TeO por parte del núcleo Ipc fuera de carácter excitatorio, y que sus efectos fueran dramáticos. Lo primero se ve reforzado por nuestros resultados, ya que encontramos que los potenciales evocados retino-tectales aumentan con la activación del núcleo Ipc y disminuyen con su inactivación. Sin embargo, la reducción en los potenciales evocados por inhibición del núcleo Ipc es apenas del orden del 20 al 30% en promedio. Esto podría sugerir que el registro de potenciales evocados en las capas superficiales del TeO no refleja fielmente la actividad de las CTGs I, ya sea por involucrar muchas otras sinapsis retino-tectales además de las sinapsis retina-CTGs I (estas otras sinapsis entonces no

estarían siendo moduladas por el núcleo Ipc), o por estar muy lejos del soma, el cual podría recibir sinapsis directamente desde el núcleo Ipc.

Por otra parte, una disminución sólo parcial de la magnitud del potencial postsináptico a nivel de las dendritas de las CTGs podría eventualmente ser suficiente para disminuir la frecuencia de descargas de potenciales de acción en estas neuronas, a un nivel que elimine las respuestas visuales registradas en el núcleo Rt.

4.1.2 Efecto de la aplicación de agonistas y antagonista colinérgicos en el TeO sobre las respuestas visuales registradas en el TeO.

Los resultados anteriores sumados al hecho de que el núcleo Ipc es presumiblemente colinérgico (Medina y Reiner, 1994; Wang y col., 2006) sugieren que la aplicación de agonistas colinérgicos debería aumentar la amplitud de los potenciales evocados retino-tectales. Nuestros resultados muestran que los potenciales de campo tectales evocados visualmente son aumentados por la aplicación de agonistas muscarínicos en el TeO pero no de nicotina, y se ven reducidos por la aplicación de un antagonista muscarínico. Estos datos concuerdan con los de Wang y col. (1986), quienes mostraron que las

respuestas visuales de células registradas extracelularmente en distintas capas del TeO de la paloma aumentan con la aplicación por iontoforesis de acetilcolina, se reducen con la aplicación de atropina y no cambian con la aplicación de curare.

La aplicación de acetilcolina, muscarina o betanecol en el TeO además produce un aumento en las respuestas visuales en el núcleo Ipc. Este resultado indica que la transmisión de la actividad visual entre la retina y las células de la capa 10 se ve potenciada por la activación de receptores muscarínicos. Esta activación del núcleo Ipc no es necesaria para que los potenciales evocados retino-tectales aumenten en presencia de agonistas muscarínicos, ya que eso ocurre al microinyectar acetilcolina o muscarina en el TeO aun manteniendo el núcleo Ipc inactivado.

En algunos de los casos de aplicación de agonistas colinérgicos en el TeO, así como en el experimento de aplicación de picrotoxina en el núcleo Ipc, sólo hubo efectos estadísticamente significativos sobre las respuestas visuales a estímulos en movimiento y no sobre las respuestas a destellos de luz. En casi todos los tratamientos, sin embargo, en las respuestas a destellos se observa una tendencia similar a los efectos que ocurren con las respuestas a estímulos en movimiento. Para establecer las diferencias entre las respuestas tectales a

estímulos estáticos y a estímulos en movimiento en su relación con actividad del núcleo Ipc, hará falta otros experimentos diseñados con este fin.

Así, el núcleo Ipc aumentaría los potenciales evocados retino-tetales a través de la activación de receptores muscarínicos en el TeO. Entre las sinapsis retino-tectales moduladas de esta manera se encuentra la sinapsis retina-capula 10, de manera que la actividad del núcleo Ipc se retroalimentaría positivamente.

La modulación colinérgica muscarínica de sinapsis glutamatérgicas ha sido extensamente estudiada, particularmente en el hipocampo y en el estriado de mamíferos (Marino y col., 1998; Vogt y Regehr, 2001; Oldenburg y Ding, 2011). Los receptores muscarínicos pueden actuar presinápticamente, donde se ha mostrado que reducen la liberación de glutamato a través de la inhibición de corrientes de Ca^{2+} (Vogt y Regehr, 2001), o postsinápticamente, donde pueden aumentar la excitabilidad de las espinas dendríticas a través de la inhibición de corrientes de K^{+} (Shen y col., 2007), o potenciar las corrientes dependientes de receptores de kainato (Benveniste, y col., 2010). En aves se han identificado homólogos de los cinco tipos de receptores muscarínicos presentes en mamíferos (Li y col., 2007), de manera que es esperable que la misma variedad en mecanismos de modulación sináptica muscarínica que hay en el cerebro de mamíferos ocurra también en el cerebro de aves.

4.1.3. Distribución de receptores muscarínicos en el TeO de la paloma

Los receptores muscarínicos responsables por los efectos observados en nuestros experimentos de aplicación de agonistas colinérgicos en el TeO podrían estar en las fibras retinianas, en las células tectales de proyección (en particular en las de la capa 10 y las CTGs I) o en interneuronas intratectales. Para investigar este problema examinamos la inmunoreactividad al anticuerpo M-35 en el TeO de la paloma. En concordancia con estudios anteriores (Dietl y col., 1988; Ball y col., 1990), encontramos abundante inmunoreactividad para receptores muscarínicos en el TeO. La marca se presenta en su mayoría en la neuropila, salvo por algunos somas marcados en las capas 13 y 10. Esto sugiere que el efecto de la aplicación de agonistas colinérgicos sobre los potenciales evocados retinotectales observado por nosotros podría ser postsináptico. Para saber si además había receptores muscarínicos presinpresinápticos, hicimos inmunohistoquímica en el TeO deaferentado, sin encontrar diferencias entre el patrón de marcaje de TeO deaferentado y el control. Esto sugiere que las fibras retinianas no aportan a la inmunoreactividad para receptores muscarínicos en TeO y que posiblemente no presentan receptores muscarínicos. Así, es poco probable que el efecto observado por nosotros de aplicación de agonistas

muscarínicos sobre las respuestas visuales se deba a receptores presinápticos de las fibras retinianas. Estos resultados concuerdan con dos estudios anteriores hechos con ligandos radiactivos (Francis y col., 1980; Por y Bondy, 1982) en el TeO de pollos y palomas previamente desaferentados.

Los núcleos del istmo también presentan receptores muscarínicos, especialmente los somas del núcleo Imc. Aunque en el caso de los núcleos Ipc y SLu estos receptores podrían ser autorreceptores, la presencia de receptores muscarínicos en el núcleo Imc podría sugerir que este núcleo recibe aferencias colinérgicas. La única aferencia conocida del núcleo Imc es la capa 10 de TeO, y su naturaleza neuroquímica es hasta ahora desconocida. Más aun, se ha mostrado que los somas de los núcleos Imc e Ipc son inmunopositivos para las subunidades α -7 y β -2 de receptores colinérgicos nicotínicos (Wang y col., 2006).

4.1.4 Efecto de la aplicación de agonistas y antagonista colinérgicos en el TeO sobre la actividad espontánea del núcleo Ipc

Otro efecto de la microinyección de acetilcolina en el TeO es el aumento en la actividad espontánea en el núcleo Ipc. La microinyección de muscarina no tiene el mismo efecto, mientras que sí lo tiene la microinyección de nicotina. Esto

sugiere que las células tectales de la capa 10 son también activadas a través de receptores nicotínicos. A pesar de que parte de la actividad espontánea del núcleo Ipc depende en parte de las descargas espontáneas de las células de la retina (ya que disminuye por la microinyección de CNQX en el TeO), el efecto de agonistas nicotínicos sobre ésta ocurre con independencia de la actividad retiniana, ya que se observa aun manteniendo las sinapsis retino-tectales bloqueadas o en palomas cuyo TeO ha sido previamente desaferentado.

Esta independencia de la actividad de la retina exhibida por el efecto de la activación de receptores nicotínicos sobre la actividad espontánea del núcleo Ipc sugiere que los receptores involucrados en este fenómeno no se localizarían en sinapsis retino-tectales. Estos receptores podrían localizarse en sinapsis intratectales o istmo-tectales. Estudios *in vitro* muestran que la estimulación eléctrica en el núcleo Ipc produce potenciales postsinápticos excitatorios en las células tectales de la capa 10 que proyectan al núcleo Ipc (Shao y col., 2009). Existen evidencias inmunohistoquímicas de que en la capa 10 del TeO hay células que presentan subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 8$ de receptores nicotínicos (Britto y col., 1992; Lohmann y col., 2000). Sin embargo, no se sabe si éstas son las células que proyectan al núcleo Ipc o corresponden a otra subpoblación celular.

4.1.5. Adaptación de las respuestas visuales en el TeO y el núcleo Ipc

La adaptación de las respuestas de las células tectales a la presentación repetitiva de estímulos visuales estáticos o en movimiento ha sido reportada previamente por otros (Frost y DiFranco, 1976; Woods y Frost, 1977). Nosotros observamos adaptación tanto en los potenciales evocados como en las respuestas de las células del núcleo Ipc, lo que sugiere que las respuestas de las células tectales de la capa 10 también presentarían esta adaptación. Debido a que el núcleo Ipc ejerce un efecto excitatorio sobre el potencial retino-tectal era presumible que la adaptación de este último fuera un reflejo de la adaptación del primero. Sin embargo, ni la sobre-activación o inactivación de Ipc, ni la aplicación de agonistas y antagonista colinérgicos en TeO produjo cambios en el nivel de acomodación, sugiriendo que este fenómeno no dependería de la actividad del núcleo Ipc. La adaptación de las respuestas visuales tectales podría resultar de propiedades de las sinapsis retino-tectales, de circuitos intra-tectales o de propiedades intrínsecas de las células tectales.

4.1.6. Comparación con otros vertebrados

En conjunto, estos resultados sugieren que en la paloma el núcleo Ipc aumenta las respuestas visuales en el TeO y el propio flujo visual del TeO al núcleo Ipc a través de receptores muscarínicos. En peces y anfibios, donde en lugar de un complejo de núcleos del istmo se observa un solo núcleo del istmo, el cual es colinérgico (ver Gruberg y col., 2006), numerosos trabajos muestran que el núcleo del istmo produce un aumento en la transmisión del flujo visual retina-TeO a través de receptores nicotínicos. Tanto en peces como en anfibios el núcleo del istmo produce un aumento en la liberación de glutamato desde los terminales de la retina, a través de la activación de receptores colinérgicos nicotínicos presinápticos (King y Schmidt, 1991; Henley y col., 1986; Kuras y Gutmaniene, 2001; Dudkin y Gruberg, 2003; revisado en Gruberg y col., 2006). Se ha mostrado que en aves las fibras retinianas que terminan en las capas 2, 4 y 7 de TeO presentan subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\beta 2$ de receptores nicotínicos. Estos receptores presinápticos podrían jugar un papel similar al que tienen en el TeO de peces y anfibios. Movidos por nuestro interés en la modulación de las respuestas visuales de las CTG I₅, en este trabajo hemos registrado principalmente en la capa 5 del TeO, donde hasta ahora no se ha mostrado la presencia de receptores nicotínicos, lo que podría explicar el hecho de que no

hayamos evidenciado ningún efecto de la activación de receptores nicotínicos sobre los potenciales evocados retino-tectales. La modulación muscarínica de las sinapsis retino-tectales, sin embargo, no sería exclusiva de las aves, de acuerdo al trabajo de Kahl y Wiggers en el TeO de urodelos (2000), que muestra que además de la modulación nicotínica, los potenciales evocados tienen un componente que es aumentado por aplicación de agonistas muscarínicos y bloqueado por la aplicación de atropina.

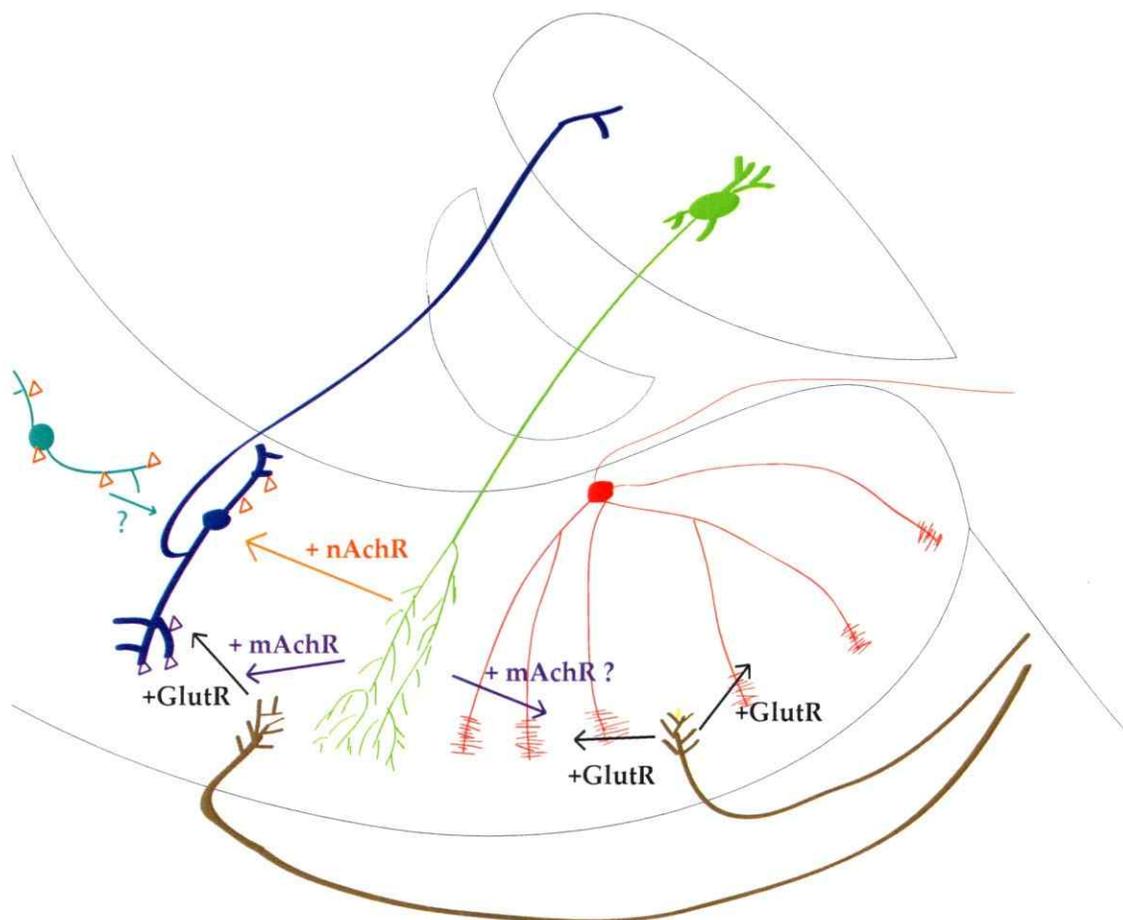


Figura 21. Nuestros resultados sugieren que las células tectales de la capa 10 que proyectan al núcleo istmo parvocelular (Ipc) son activadas a través de receptores nicotínicos (nAChR, representados por triángulos naranja) presentes en estas células o en interneuronas tectales, mientras que los receptores muscarínicos (mAChR, representados por triángulos morados) participan en una potenciación presumiblemente postsináptica de sinapsis retino-ectales (esquematizadas en negro, GlutR, receptores glutamatérgicos), incluyendo las sinapsis retina-Capa tectal 10 y posiblemente las sinapsis retina-células tectales ganglionares (CTG I). En el esquema, los axones de la retina se representan en café, las células tectales de la capa 10 que proyectan al tectum óptico (TeO) en azul, las células del núcleo Ipc en verde, las CTG I en rojo y una célula tectal cualquiera en calipso.

4.2. Conexiones del núcleo Imc en Passeriformes

4.2.1. Significado funcional de la segregación espacial del núcleo Imc en Passeriformes

En esta tesis mostramos que en el diamante mandarín las neuronas de la división lateral del núcleo Imc proyectan casi exclusivamente al núcleo Ipc, mientras que el principal blanco de la división medial es el TeO. Estos resultados sugieren que los dos tipos celulares definidos hodológicamente en el núcleo Imc de pollo (Wang y col., 2004) corresponden a los dos tipos neuronales anatómicamente segregados en el núcleo Imc de Passeriformes. La segregación en dos divisiones que se encuentra en Passeriformes sugiere que el papel que juega la actividad del núcleo Imc sobre el TeO y sobre los núcleos Ipc y SLu podría ser diferente. Dado que el núcleo Imc proyecta sólo a las capas profundas del TeO, mientras que los núcleos Ipc y SLu proyectan a capas profundas y superficiales, sólo las células del núcleo Imc que proyectan a los núcleos Ipc y SLu tendrán algún efecto sobre la actividad de las capas retino-recipientes (superficiales) del TeO. En palomas, se ha mostrado que las células del núcleo Imc que proyectan a los núcleos Ipc y SLu se sincronizan a altas frecuencias de disparo, tal vez por una aferencia común o por acoplamiento eléctrico (Marín y

col., 2007). La separación de las dos poblaciones observada en Passeriformes sugiere que cada una de ellas podría actuar como un conjunto distinto.

Por otra parte, esta segregación podría permitir que cada una de las subdivisiones reciba aferencias distintas. Esto podría constituir una diferencia en la organización de la red entre Passeriformes y otras aves, o bien simplemente reflejar un grado diferente de diferenciación del circuito, sin que esto tenga consecuencias funcionales.

4.2.2. El Núcleo Imc en Passeriformes

En todos los Passeriformes que examinamos, que incluyen cuatro oscinos (el estornino, el chincol, el zorzal y el diamante) y un suboscino (el fioffo) se puede apreciar la clara segregación del núcleo Imc en dos subdivisiones, una subdivisión interna con células más grandes y espaciadas, y una externa con células más pequeñas y más densamente distribuidas. En cambio, en ninguno de los no Passeriformes esta segregación es evidente. Entre los no Passeriformes examinados está la cotorra argentina, del orden Psittaciformes, grupo hermano de Passeriformes según la última filogenia molecular de aves (Hackett y col.,

2008), lo que sugiere que la segregación de Imc podría ser un rasgo exclusivo de los Passeriformes.

4.2.3. Comparación con otros diápsidos

En tortugas, donde primero se estudió la anatomía fina del circuito istmo-tectal, se distingue un núcleo inicialmente llamado istmo magnocelular rostral (Ir) y otro llamado inicialmente istmo magnocelular caudal (Ic), y ambos tienen conexiones recíprocas con el TeO. Las células del núcleo Ir proyectan axones difusos que se extienden por grandes regiones en las capas profundas del TeO y emiten una colateral que termina en el núcleo Ic, mientras que las del núcleo Ic proyectan axones que se ramifican en una columna tectal (Serenó y Ulinski, 1987). Considerando la conectividad y también las semejanzas inmunohistoquímicas para ChAT y GABA, se ha establecido que el núcleo Ir sería el homólogo al núcleo Imc, y que el núcleo Ic sería el homólogo a los núcleos Ipc y SLu de las aves (Powers y Reiner, 1993). Para resaltar estas homologías Powers y Reiner (1993) cambiaron los nombres originales de los núcleos Ir e Ic de la tortuga por istmo magnocelular (Imc) e istmo parvocelular (Ipc, a pesar de que sus células no son particularmente pequeñas).

De manera que podemos distinguir entre los diápsidos al menos tres tipos de circuitos istmotectales: Uno en que la misma célula del núcleo Imc proyecta a "Ipc/SLu" y al TeO (como en la tortuga), otro en que estas dos proyecciones se originan desde dos tipos celulares diferentes que se encuentran entremezclados (como en aves no-Passeriformes) y finalmente, otro en que estos dos tipos están separados (como en Passeriformes, figura 22).

4.2.4. El diamante mandarín como modelo animal para el estudio del circuito istmo-tectal

El diamante mandarín ha sido extensamente usado como animal modelo para el estudio del aprendizaje del canto (revisado en Brainard y Doupe, 2002). Es un animal fácil de mantener y reproducir en cautiverio. Los resultados presentados en esta tesis permiten considerar al diamante mandarín como un excelente modelo para el estudio del circuito istmotectal, al permitir el estudio anatómico y fisiológico de las dos poblaciones celulares del núcleo Imc por separado, para poder comprender así los papeles que éstas cumplen en el control ejercido por los núcleos del istmo sobre la actividad visual del TeO.

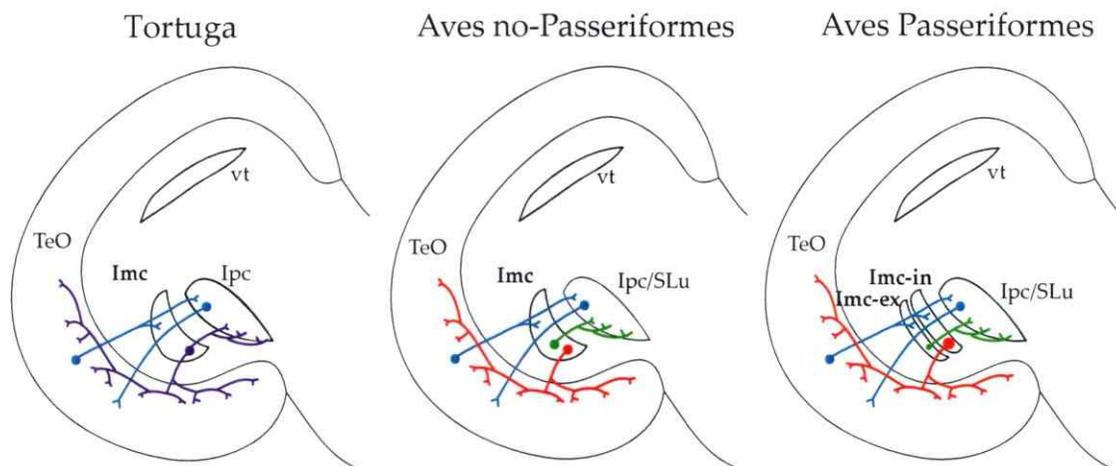


Figura 22. Al menos tres tipos de núcleo istmo magnocelular (Imc) en diápsidos. En tortugas el homólogo al núcleo Imc de aves presenta un sólo tipo celular que proyecta tanto al homólogo de los núcleos istmo parvocelular y semilunar (llamado Ipc) como al tectum óptico (TeO; Sereno y Ulinski, 1987; Powers y Reiner, 1993). En aves el núcleo Imc presenta dos tipos celulares, uno que proyecta a los núcleos Ipc y SLu y otro que proyecta al TeO (Wang y col., 2004, y corroborado en esta tesis). Nuestros resultados muestran que estos dos tipos celulares, que en el núcleo Imc del pollo se encuentran entremezclados, están segregados en dos claras subdivisiones en el núcleo Imc de Passeriformes, Imc interno (Imc-in) e Imc externo (Imc-ex).

4.3. Conclusiones finales

En resumen, nuestros resultados sugieren que el núcleo Ipc provoca un aumento en las respuestas visuales tectales a través de receptores muscarínicos, presumiblemente postsinápticos. Esto provoca un aumento en la transmisión del flujo visual retina-TeO-núcleo Ipc. Concomitantemente, el núcleo Ipc prolonga su propia activación a través de receptores nicotínicos en el TeO

ubicados en sinapsis intratectales o istmo-tectales. Resta por comprobar si entre las sinapsis retino-tectales que se ven moduladas por receptores muscarínicos se encuentran las sinapsis retina-CTGs I. Esto se podrá explorar realizando registros simultáneamente en el TeO y el núcleo Rt, para evaluar el efecto de la aplicación de agonistas y antagonistas muscarínicos en el TeO sobre las respuestas en este núcleo.

Por otra parte, hemos mostrado que el diamante mandarín es un excelente modelo para el estudio del circuito istmo-tectal. En esta tesis hemos apenas comenzado la caracterización de las dos subpoblaciones del núcleo Imc y su papel en el circuito istmotectal. Hemos mostrado que las células que proyectan a los núcleos Ipc y SLu son más pequeñas que las que proyectan al TeO y que son aproximadamente el doble en número. El uso del diamante mandarín permitirá estudiar las aferencias que reciben estos dos tipos celulares, también permitirá el registro de la actividad de estas poblaciones por separado, así como los efectos que éstas tienen en el funcionamiento del circuito istmotectal.

5. BIBLIOGRAFIA

André, C., Guillet, J. G., De Backer, J. P., Vanderheyden, P., Hoebeke J., Strosberg, A. D. 1984. Monoclonal antibodies against the native or denatured forms of muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO*, 3, 17-21.

Asadollahi, A., Mysore P., Knudsen, E. (2010). Stimulus-driven competition in a cholinergic midbrain nucleus. *Nature Neuroscience*, 13, 889–895.

Ball, G., Nock, B., Wingfield, J., McEwen, B., Balthazart, J. (1990). Muscarinic cholinergic receptors in the songbird and quail brain: A quantitative autoradiographic study. *The Journal of Comparative Neurology*, 298, 431-442.

Benowitz, L. I., Karten, H. J. (1976). Organization of the tectofugal visual pathway in the pigeon: A retrograde transport study. *The Journal of Comparative Neurology*, 167, 503-520.

Benveniste, M., Wilhelm, J., Dingledine, R. J., Mott, D. D. (2010). Subunit-dependent modulation of kainate receptors by muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Research*, 1352, 61-69.

Bernardini, N., De Stefano, M. E., Tata, A. M., Biagioni, S., Augusti-Tocco, G. (1998). Neuronal and non-neuronal cell populations of the avian dorsal root

ganglia express muscarinic acetylcholine receptors. *International Journal of Neuroscience*, 16, 365-377.

Bisley, J. W. (2011). The neural basis of visual attention. *Journal of Physiology*, 589, 49-57.

Brainard, M. S., Doupe, A. J. (2002). What songbirds teach us about learning. *Nature*, 417, 351-358.

Braun K., Scheich H., Zuschratter W., Heizmann C.W., Matute C., Streit P. (1988). Postnatal development of parvalbumin-, calbindin- and adult GABA-immunoreactivity in two visual nuclei of zebra finches. *Brain Research*, 475, 205-17.

Britto, L., Keyser, K., Lindstrom, J., Karten H. J. (1992). Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the mesencephalon and diencephalon of the chick (*Gallus gallus*). (1992) *The Journal of Comparative Neurology* 317, 325 – 340.

Britto, L., Torrão, A. S., Hamassaki-Britto, D. E., Mpodozis, J., Keyser, K. T., Lindstrom, J. M., Karten, H. J. (1994). Effects of retinal lesions upon the distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the chick visual system. *The Journal of Comparative Neurology*, 350-473-484.

Bronkhorst, A. W. (2000). The cocktail party phenomenon: A review of research on speech intelligibility in multiple-talker conditions. *Acta Acustica united with Acustica*, 86, 117-128.

Calaza, K. C., Gardino, P. F. (2000). Evidence of muscarinic acetylcholine

receptors in the retinal centrifugal system of the chick. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 1075-1082.

Chacron, M. J., Doiron, B., Maler, L., Longtin, A., Bastian, J. (2003). Non-classical receptive field mediates switch in a sensory neuron's frequency tuning. *Nature*, 423, 77-81.

Chaves, L., Hodos, W. (1998). Color reversal-learning deficits after tectofugal pathway lesions in the pigeon telencephalon. *Behavioural Brain Research*, 90, 1-12.

Cherry, C. (1953). Some experiments on the recognition of speech, with one and two ears. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 25, 975-979.

Clarke, P. H. G. (1982). The generation and migration of the chick's isthmic complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 207, 208-222.

Cui, H., Malpeli, J. G. (2003). Activity in the Parabigeminal Nucleus During Eye Movements Directed at Moving and Stationary Targets. *Journal of Neurophysiology*, 89, 3128-3142.

Diamond, I. T., Jones, E. G., Powell, T. P. S. (1969). The projection of the auditory cortex upon the diencephalon and brain stem in the cat. *Brain Research*, 15, 305-340.

Dietl M. M., Cortés R., Palacios J. M. (1988). Neurotransmitter receptors in the avian brain. II. Muscarinic cholinergic receptors. *Brain Research*, 439, 361-365.

Dudkin, E., Gruberg, E. R. (2003). Nucleus isthmi enhances calcium influx into optic nerve fiber terminals in *Rana pipiens*. *Brain Research*, 969, 44–52.

Dye, J. C., Karten, H. J. (1996). An in vitro study of retinotectal transmission in the chick: Role of glutamate and GABA in evoked field potentials. *Visual Neuroscience*, 13, 747-758.

Fan, J., McCandliss, B. D., Sommer, T., Raz, A., Posner, M. I. (2002). Testing the efficiency and independence of attentional networks. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 14, 340-347.

Felix, D., Wu, G. Y., Wang S. H. R. (1994) GABA as an inhibitory transmitter in the pigeon isthmo-tectal pathway. *Neuroscience Letters*, 129, 212–214.

Francis A., Jaganna, A., Schecheter, N. (1980). Stability of muscarinic-cholinergic receptor activity in the deafferented retinotectal pathway. *Brain Research*, 185, 161-168.

Fredes, F., Tapia, S., Letelier, J. C., Marín, G., Mpodozis, J. (2010). Topographic arrangement of the rotundo-entopallial projection in the pigeon (*Columba livia*). *The Journal of Comparative Neurology*, 518, 4342–4361.

Frost, B. J., DiFranco, D. E. (1976). Motion characteristics of single units in the pigeon optic tectum. *Vision Research*, 16, 1229-1234.

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

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

Hackett, S., Kimball, R., Reddy, S., Bowie, R., Braun, E., Braun, M., Chojnowski, J., Cox, W., Han, K., Harshman, J., Huddleston, C., Marks, B., Miglia, K., Moore, W., Sheldon, F., Steadman, D., Witt, C., Yuri, T. (2008). Phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763-1768.

Hashemi-Nezhad, M., Wang, C., Burke, W., Dreher, B. (2003). Area 21a of cat visual cortex strongly modulates neuronal activities in the superior colliculus. *Journal of Physiology*, 550.2, 535-552.

Hellmann, B., Güntürkün, O. (2001). Structural organization of parallel information processing within the tectofugal visual system of the pigeon. *The Journal of Comparative Neurology*, 429, 94-112.

Henley, J. M., Lindstrom, J. M., Oswald, R. E. (1986). Acetylcholine receptor synthesis in retina and transport to optic tectum in goldfish. *Science*, 232, 1627-1629.

Hodos, W., Karten, H. J. (1970). Visual intensity and pattern discrimination deficits after lesions of ectostriatum in pigeons *The Journal of Comparative Neurology*, 140, 53-68.

Hodos, W., Weiss, S. R., Bessette, B. B. (1988). Intensity difference thresholds after lesions of ectostriatum in pigeons. *Behavioural Brain Research* 30, 43-53.

Holden A. (1968). The field potential profile during activation of the avian optic tectum. *Journal of Physiology*, 194, 75-90.

Hunt, S. P., Webster, K. E. (1975). The projection of the retina upon the optic tectum of the pigeon. *The Journal of Comparative Neurology*, 162, 433-453.

Kahl, H., Wiggers, W. (2000). Influence of muscarinic ligands on the amplitudes of the evoked surface potential's late components in the optic tectum of the urodele *Plethodon jordani*. *Neuroscience Letters*, 285, 17-20.

Karten, H.J., Hodos, W. (1967). A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). John Hopkins Press, Baltimore.

Karten H.J, Cox K., Mpodozis J. (1997). Two distinct populations of tectal neurons have unique connections within the retinotectorotundal pathway of the pigeon (*Columba livia*). *The Journal of Comparative Neurology*, 387, 449-465.

King, A. (1997). Sensory processing: Signal selection by cortical feedback. *Current Biology*, 7, R85-R88.

King W.M., Schmidt J. T. (1991). The long latency component of retinotectal transmission: Enhancement by stimulation of nucleus isthmi or tectobulbar tract and block by nicotinic cholinergic antagonists. *Neuroscience*, 40, 701-12.

Knudsen, E. (2007). Fundamental Components of Attention. *Annual Review of Neuroscience* 30, 57-78.

König, P., Luksch, H. (1998). Active sensing—closing multiple loops. *Zeitschrift für Naturforschung*, 7-8, 542-9.

Kuras, A., Gutmaniene, N. (2001). N-cholinergic facilitation of glutamate release from an individual retinotectal fiber in frog. *Visual Neuroscience* 18, 549-558.

Lai, D., Brandt, S., Luksch, H., Wessel, R (2011). Recurrent antitopographic inhibition mediates competitive stimulus selection in an attention network. *Journal of Neurophysiology*, 105, 793-805.

Laverghetta A.V., Shimizu T. (2003) Organization of the ectostriatum based on afferent connections in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Brain Research*, 963, 101-112.

Lee, T. S., Yang, C. F., Romero, R. D., Mumford, D. (2002). Neural activity in early visual cortex reflects behavioral experience and higher-order perceptual saliency. *Nature Neuroscience*, 5, 589 – 597.

Letelier, J. C., Mpodozis, J., Marin, G., Morales, D., Rozas, C., Madrid, C., Velasco, M. (2000). Spatiotemporal profile of synaptic activation produced by the electrical and visual stimulation of retinal inputs to the optic tectum: A current source density analysis in the pigeon (*Columba livia*). *European Journal of Neuroscience* 12, 47-57.

Li, G. Q., Kevetter, G. A., Leonard, R. B., Prusak, D. J., Wood, T. G., Correia, M. J. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor subtype expression in avian vestibular hair cells, nerve terminals and ganglion cells. *Neuroscience*, 146, 384-402.

Lohmann, T. H, Torrao, A. S., Britto, L. R., Lindstrom, J., Hamassaki-Britto, D. E. (2000). A comparative non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemical study of the distribution of alpha7 and alpha8 subunits of

the nicotinic acetylcholine receptors in visual areas of the chick brain. *Brain Research*, 852, 463-9.

Luksch, H., Cox, K., Karten, H. J. (1998). Bottlebrush dendritic endings and large dendritic fields: Motion-detecting neurons in the tectofugal pathway. *The Journal of Comparative Neurology*, 396, 399-414.

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

Luksch, H. (2003). Cytoarchitecture of the avian optic tectum: Neuronal substrate for cellular computation. *Reviews in the Neurosciences* 14, 85-106.

Marín, G., Letelier, J. C., Henny, P., Sentis, E., Farfán, G., Fredes, F., Pohl, N., Karten, H. J., Mpodozis, J. (2003) Spatial organization of the pigeon tectorotundal pathway: An interdigitating topographic arrangement. *The Journal of Comparative Neurology*, 458, 361-380.

Marín, G., Mpodozis, J., Sentis, E., Ossandón, T., Letelier, J. C. (2005). Oscillatory bursts in the optic tectum of birds represents re-entrant signals from the nucleus isthmi pars parvocellularis. *The Journal of Neuroscience*, 25, 7081-7089.

Marín, G., Salas, C., Sentis, E., Rojas, X., Letelier, J. C., Mpodozis, J. (2007). A cholinergic gating mechanism controlled by competitive interactions in the optic tectum of the pigeon. *The Journal of Neuroscience*, 25, 8112-8121.

Marín, G., Durán, E., Morales, C., González-Cabrera, C., Sentis, E., Mpodozis, J., Letelier, J. C. Attentional capture? Synchronized feedback signals from the isthmi boost retinal signals to higher visual areas. *The Journal of Neuroscience*, En imprenta.

- Marino, M. J., Rouse, S. T., Levey, A. I., Potter, L. T., Conn, P. J. (1998). Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 11465-11470.
- Medina, L., Reiner, A. (1994). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 342, 497-537.
- Montero, V. M. (1991). A quantitative study of synaptic contacts on interneurons and relay cells of the cat lateral geniculate nucleus. *Experimental Brain Research*, 86, 257-270.
- Moore, T., Amstrong, K. M. (2003). Selective gating of visual signals by microstimulation of frontal cortex. *Nature*, 421, 370-373.
- Mpodozis J., Cox K., Shimizu T., Bischof H. J., Woodson W., Karten H. J. (1996). GABAergic inputs to the nucleus rotundus (pulvinar inferior) of the pigeon (*Columba livia*). *The Journal of Comparative Neurology*, 374, 204-222.
- Müller, J. R., Philiastides, M. G., Newsome, W. T. (2005). Microstimulation of the superior colliculus focuses attention without moving the eyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 524-529.
- Mysore, S., Asadollahi, A., Knudsen, E. (2010). Global Inhibition and Stimulus Competition in the Owl Optic Tectum. *The Journal of Neuroscience*. 30, 1727-1738.
- Nguyen, A. P, Spetch, M. L., Crowder, N. A., Winship, I. R., Hurd, P. L. Wylie, D. R. (2004). A dissociation of motion and spatial-pattern vision in the avian

Weiss, S., Hodos, W. (1986) Discrimination of mirror images stimuli after lesions of the visual system in pigeons. *Brain Behavior and Evolution*, 3, 195-204.

West, M. J, Slomianka, L., Gundersen, H. J. G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anatomical Record*, 231, 482-497.

Woods, E. J., Frost, B. J. (1977). Adaptation and habituation characteristics of tectal neurons in the pigeon. *Experimental Brain Research*, 27, 347-354.

Woodson, W., Reiner, A., Anderson, K., Karten, H. J. (1991). Distribution, laminar location, and morphology of tectal neurons projecting to the isthmo-optic nucleus and the nucleus isthmi, pars parvocellularis in the pigeon (*Columba livia*) and chick (*Gallus domesticus*): A retrograde labelling study. *The Journal of Comparative Neurology*, 305, 470-88.

Wurtz, R. H., Albano, J. E. (1980). Visual-motor function of the primate superior colliculus. *Annual Review of Neuroscience*, 3, 189-226.

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

Yan, W., Suga, N. (1998). Corticofugal modulation of the midbrain frequency map in the bat auditory system. *Nature Neuroscience*, 1, 54-58.

Yarbus, A. L. (1967). *Eye movements and vision*. Plenum press, 129-146, 171-211.