

UCH-PC
Doc=BMCN
L 433
C-1



El núcleo geniculado ventrolateral y su rol visuomotor en las conductas de orientación de la mirada

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

Daniel Severin Lea-Plaza

Diciembre, 2015

Director de Tesis Dr: Jorge Mpodozis

Co-Director de Tesis Sr: Gonzalo Marín

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

Daniel Severin Lea-Plaza

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 15 de enero del 2016.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis

.....


Co-Director de Tesis:

Sr. Gonzalo Marín

.....
Gonzalo Marín

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga (Presidente)

.....
Julio Alcayaga

Dr. Juan Carlos Letelier

.....
Juan Carlos Letelier

Dr. Pedro Maldonado

.....
Pedro Maldonado

Dr. Magdalena Sanhueza

.....
Magdalena Sanhueza

Dedicado a los que hacen posible que la ciencia moderna y costosa exista.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Nací el 7 de Abril de 1984 en Viña del Mar, Chile. Mis padres eran muy trabajadores y siempre quisieron lo mejor para sus hijos. Soy el menor de cinco hermanos. Crecí en medio de la sociedad viñamarina acomodada de los 90'. Padecí de un buen colegio católico y disfruté del deporte, del mar y de los bosques de eucaliptus de la quinta región. Busco la reflexión por necesidad y bailo por pasión. La ciencia es prescindible, pero me encanta y aquí me quedo.

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a mi mamá y a mi papá la vida y mi formación como persona. Le agradezco a Jorge por todo el tiempo, los recursos, las discusiones y la entrega emocional puesta en este trabajo. Recuerdo esos largos y extenuantes días de trabajo, cuando estaba recién aprendiendo a hacer neurobiología con las manos, y Jorge se quedaba hasta tarde para el apoyo moral... sirvió. A Gonzalo Marín, por compartir toda su experiencia conmigo y por contar hasta 10 y escuchar atentamente mis preguntas "cortas". Al Lete por animarme y orientarme en la implementación de todo el cablerío que fue el sustrato metodológico de mi tesis. Al Solano por formarme como un experimentador creativo. A Tomás y al Pino por iniciarme en la experimentación con animales. A Bryan por aportar y compartir todo su saber analítico y computín. Al Negro por compartir sus programas y ser un compañero de viaje en este proceso. A la Elisa por entregarme su experiencia en la histología. En general, le agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Neurobiología y Biología del Conocer por todo lo entregado en la convivencia.

LISTA DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	9
Objetivos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Sujetos	10
Cirugías	10
Microestimulación eléctrica	11
Caracterización de los campos receptivos	11
Análisis de la densidad de corriente	13
Estimación de la ubicación del electrodo	14
Histología	15
Trazador neuronal	16
Medición de la respuesta conductual	17
Análisis de datos	22
Análisis estadísticos	25
Ablación del tectum óptico	26
Detección de los movimientos espontáneos de la cabeza	28

Aplicación del agonista	29
RESULTADOS	30
Análisis de la densidad de las corrientes evocadas visualmente	30
Caracterización de los campos receptivos	32
Movimientos oculares en animales con la cabeza restringida de movimiento	33
Activación de la musculatura del cuello en animales anestesiados	37
Cambios de orientación de la mirada evocados eléctricamente en animales despiertos	39
Efecto de la ablación del TeO	52
Movimientos espontáneos de la cabeza en animales despiertos	56
DISCUSIÓN	58
Caracterización fisiológica del GLv	59
Experimentos de microestimulación eléctrica en el cerebro: limitaciones y usos	60
Experimentos de microestimulación eléctrica en el cerebro de la paloma	64
Efecto de la ablación tectal	69
Actividad multiunitaria asociada a movimientos espontáneos de la cabeza	69
Comparación con movimientos del repertorio conductual de la paloma	70
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	74
APÉNDICE	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1

43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	2
Figura 2	4
Figura 3	5
Figura 4	12
Figura 5	13
Figura 6	19
Figura 7	21
Figura 8	25
Figura 9	27
Figura 10	29
Figura 11	31
Figura 12	31
Figura 13	33
Figura 14	35

Figura 15	37
Figura 16	38
Figura 17	39
Figura 18	42
Figura 19	44
Figura 20	45
Figura 21	49
Figura 22	50
Figura 23	51
Figura 24	55
Figura 25	57

RESUMEN

La retina de los amniotas proyecta a seis regiones encefálicas distintas. Una de estas regiones se encuentra en el tálamo ventral y aloja al núcleo geniculado ventrolateral (GLv). Se han sugerido diversos roles para este núcleo. Sin embargo aún no se ha establecido cuál es su papel en el contexto de las operaciones visuales. En aves, además de las proyecciones retinianas topográficas, el GLv recibe proyecciones de las vías visuales principales, de la vía talamo-fugal por medio de las proyecciones desde el hiperpalio dorsal (wulst) y de la vía tecto-fugal a través de las proyecciones tecto-GLv. El GLv proyecta masivamente al tegmento medial y al núcleo del puente medial (PM). La primera es una región mesencefálica implicada en la generación de los patrones de los movimientos de orientación visual. El PM proyecta recíprocamente a las folias VI y VII del "cerebelo visuomotor". La conectividad del GLv sugiere un rol visuomotor directo para esta estructura. El objetivo de esta tesis fue establecer y describir el papel que cumple el núcleo GLv en las conductas de orientación de la mirada (movimientos oculares y de la cabeza). Todos los experimentos de esta tesis se realizaron con palomas adultas. Se caracterizaron algunas propiedades fisiológicas sensoriales de distintos loci en el GLv. Los movimientos oculares se midieron con una videocámara infrarroja. Los movimientos de la cabeza se midieron con acelerómetros, giróscopos y con el seguimiento imageneológico de un láser adosado a la cabeza del animal. El GLv es un núcleo visual

que posee campos receptivos (CRs) acotados, siendo los CRs frontales más pequeños que los CRs más excéntricos. Microestimulamos eléctricamente distintos núcleos visuales. Hallamos que al estimular en el GLv se generan movimientos oculares y no así en las otras regiones sensoriales del cerebro de la paloma. A lo largo de un transecto dorso-ventral del GLv, el punto en el cual se generó la mayor respuesta en la musculatura del cuello se situó en las fibras de proyección del GLv, 100 μm sobre los somas de la lámina interna. Al estimular en la lámina interna en animales con la cabeza libre, estos movieron ambos ojos y la cabeza. La velocidad máxima, y la amplitud de los movimientos de la cabeza dependen de los parámetros del estímulo hasta un valor de saturación. Los parámetros cinemáticos del movimiento de la cabeza como la dirección, la duración, la latencia, la velocidad máxima de saturación y amplitud de saturación no dependen de los parámetros del estímulo eléctrico y son característicos del sitio de estimulación. La dirección del movimiento es hacia el CRs del sitio estimulado y no depende de la posición inicial de la cabeza. La relación entre los movimientos de la cabeza y la ubicación del CRs del sitio estimulado varía entre los sitios frontales y los sitios con CRs excéntricos. Finalmente, encontramos que la actividad multiunitaria en la lámina interna del GLv cambia con los movimientos de la cabeza en presencia y en ausencia de luz. Estos resultados muestran que la activación del GLv genera conductas de orientación y aproximación visualmente referenciadas similares a las que realiza el animal en los momentos previos al picar los granos de comida. Además, se establece directamente un rol para el GLv y estas son las primeras evidencias de un mapa neuronal de los movimientos de la cabeza visualmente referenciado en el tálamo de un vertebrado.

ABSTRACT

The lateral geniculate nucleus, par ventralis (LGNv) is a prominent retino recipient structure highly conserved in vertebrates. In birds, it is composed of two main layers: an internal one (LGNv -int), that contains tightly packed somas of the projections cells, and an external one (LGNv -ext), that contains the main dendrites of the projecting cells and receives the different synaptic afferences. The optic tectum and the visual hiperpallium (wulst in birds and primary visual cortex in mammals) are the main non-retinal source of the LGNv afferences. Other significant afferences originate from several tegmental areas. Retinal, tectal and hiperpallial inputs are highly topographic and end homotopically forming concurrent restricted synaptic loci inside the neuropile of the LGNv -ext. Projections from the LGNv -int follow a descending course through the pretectum, prerubral field and motor tegmentum (MT), to finally target the medial pontine nucleus (PM). PM projects reciprocally to the cerebellar folia VI and VII, the "visuomotor cerebellum". Due to their role in generation of gaze movements, MT and "visuomotor cerebellum" have been extensively studied. In spite of the prominent and conservative character of LGNv, its role in visual operations remains at present unknown. Considering its close link with visual and motor centers, we hypothesized that the LGNv may have a role in the generation of visually driven orientation gaze. The aim of this thesis was to establish and describe the role of the LGNv in orienting gaze behaviors (eye and head movements). Specific locus within the pigeon LGNv were microstimulated with

electrodes chronically implanted. Eyes movements were measured in head restrained and unrestrained animals with a video based eye tracker system. Head movements, in the 3 spatial axis, were measured in unrestrained birds by means of a set of accelerometers and gyroscopes attached to the head. We found that electric microstimulations of a specific LGNv locus triggered the bird to lead its beak to a specific spacial point in a locus-dependent manner. Elicited movements had kinematics parameter that were independent of intensity, frequency and duration of the stimulus. The end position of the beak tip was correlated with the spatial location of the visual field of the stimulated locus. These movements had very similar kinematic properties to the ones obtained in the same animals prior to the tectal ablation. In summary, these results show that activation of LGNv trigger visually guided head movements that resemble a rapid saccade-like movements of the head performed by pigeons before peaking food grains. The present work established for the first time in vertebrates that GLv is key actor in the generation of visually orienting gaze shifts.

INTRODUCCIÓN

En los amniotas la retina origina proyecciones a seis regiones encefálicas: hipotálamo (núcleo supraquiasmático), sistema óptico accesorio, complejo pretectal, tectum óptico (colículo superior de mamíferos), complejo talámico ventral (en aves, núcleo geniculado ventrolateral [GLv], núcleo intergeniculado [IGL], núcleo ventrolateral del tálamo [VLT] y núcleo lateral anterior [LA]) y el complejo talámico dorsal (núcleo geniculado dorsal [GLd]; Rodieck, 1979; Güntürkün y Karten, 1991). Este último es el principal blanco de la retina en los mamíferos más visuales, y la mayoría de los trabajos sobre la visión han estudiado esta ruta. En los vertebrados no mamíferos el tectum óptico (TeO) constituye el principal centro visual, del cual surge una proyección fugal masiva hacia el telencéfalo, la vía tecto-fugal. El TeO en mamíferos (colículo superior), constituye el mayor centro de integración (Wallace et al., 1996) y de selección de estímulos (Horowitz y Newsome, 1999) asociados al control de la mirada. El núcleo supraquiasmático tiene un rol de pivote en el control neural de los ritmos circadianos (Moore, 1978). Los núcleos del sistema óptico accesorio están involucrados fundamentalmente en los procesos de estabilización de la imagen en la retina (Simpson, 1984). Al pretectum se le ha atribuido un rol en el nistagmus optocinético, en el reflejo pupilar, parpadeo evocado por luz, entre otros (Gamlin, 2006). Se ha sugerido que el GLv estaría involucrado en las conductas de discriminación cromática (Maturana et al., 1982; Hughes y Chi, 1983), en el reflejo

pupilar (Jones, 1985), en el reflejo optocinético (Büttner y Fuchs, 1973; Gioanni et al., 1991) y en la regulación de los ritmos circadianos (Pickard y Turek, 1983). Sin embargo, aún no se ha establecido con claridad cuál es el papel que juega este núcleo en las operaciones visuales de los vertebrados.

El GLv es una estructura altamente conservada en el sistema visual de los amniotas (Niirni et al., 1963; Butler y Northcutt, 1973; Crossland y Uchwat, 1979; Vega-Zuniga et al., 2015). Se ubica en el diencéfalo ventrolateral, recibe aferencias retinianas (Figura 1 B), del tectum óptico y del hiperpalio dorsal (corteza visual primaria de mamíferos) de ambos hemisferios (Karten et al., 1973; Miceli et al., 1987). En aves, el GLv es una estructura alargada en el eje anteroposterior, con forma de lenteja que yace sobre el tracto óptico. Se pueden distinguir dos capas, una externa y otra interna (Figura 1 A). La primera es la que está en contacto con el tracto óptico y posee una densa neuropila, la segunda se ubica hacia dorsomedial y presenta células de mayor tamaño (Guiloff et al., 1987).

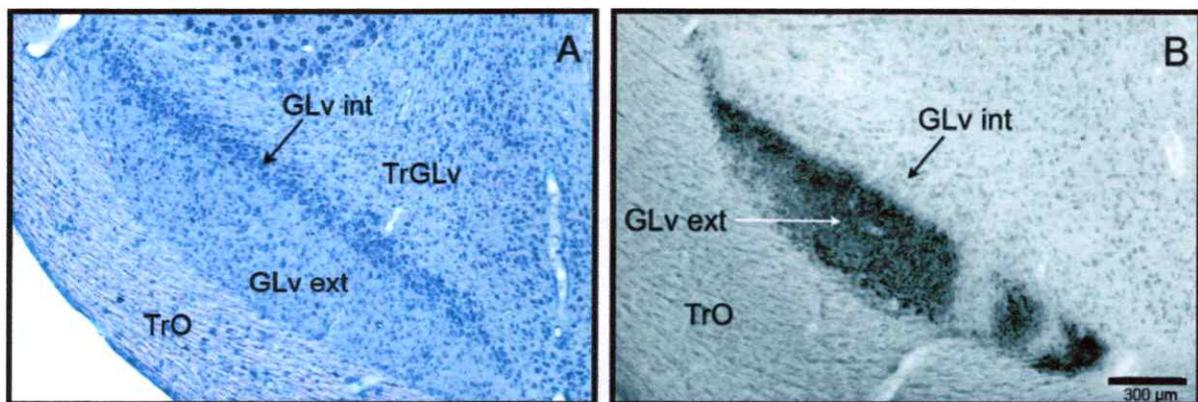


Figura 1. Histología y Aferencias Retinianas al GLv. A: Microfotografía de un corte histológico del tálamo ventral de una paloma teñido con violeta de cresilo. Se muestra la lámina interna del GLv (GLv int), la lámina externa (GLv ext), el tracto óptico (TrO), y el tracto de las eferencias del GLv (TrGLv). B: Microfotografía tomada de un animal que recibió una inyección de CTb en el globo ocular. La inmunoreactividad revela un plexo denso de axones que se distribuye por toda la extensión dorsoventral de la capa externa. Las áreas libres de terminales marcados podrían deberse a una distribución irregular del CTb en la cámara vitreal del ojo. A y B: Las microfotografías fueron tomadas a un aumento de 10X y se muestra a la misma escala.

Estudios en pollo han mostrado que al GLv proyectan topográficamente todas las regiones de la retina (Crossland y Uchwat, 1979). Estudios en paloma muestran que los terminales retinianos se ramifican en la capa externa del GLv sin entrar a la capa interna (Shimizu et al., 1994; Vega-Zuniga et al., 2014). Asimismo, observaciones hechas en nuestro laboratorio al inyectar la subunidad β de la toxina del cólera (CTb) en el GLv confirman que las ganglionares de la retina se conectan topográficamente con el sitio de inyección.

La conectividad entre el tectum óptico y el GLv ha sido estudiada en detalle por Crossland y Uchwat (1979). Ellos mostraron en pollo que el tectum óptico proyecta topográficamente sobre el GLv y que además, este mapa retinotópico de segundo orden originado a partir de las proyecciones tectogeniculado está en registro con las proyecciones retinogeniculado. Es decir, las ganglionares que proyectan al GLv desde un locus específico de la retina responden a la misma región del campo visual que las células tectales (homotópicas) que proyectan a ese mismo locus del GLv. También se mostró que las proyecciones del tectum ascienden desde el tracto óptico ramificándose solo hasta la neuropila del geniculado, de manera muy similar a como lo hacen las proyecciones retinianas (Vega-Zuniga et al., 2014).

Estudios anatómicos (Mpodozis et al., 2000; Marín et al., 2001; Mpodozis y Karten, 2004; Vega-Zuniga et al., 2015; Mpodozis et al., manuscrito en preparación) muestran que las eferencias del GLv surgen desde somas ubicados casi exclusivamente en la capa interna. Estas células se extienden a lo ancho de la capa externa, y sus axones pasan dorso-medialmente por el pretectum y luego avanzan hacia ventral en la zona medial del tegmento hasta llegar al núcleo del puente medial (PM). A lo largo de este trayecto inervan el núcleo ventrolateral del tálamo (VLT), el núcleo principal precomisural (PPC), la zona

incerta (ZI), pasan por el núcleo ruber (Ru), el núcleo intersticial de Cajal y dejan terminales en la región tegmental pre y perirubral, incluyendo el núcleo mesencefálico profundo, *pars ventralis* (MPv). Los resultados anatómicos muestran que las proyecciones del GLv hacia PPC, VLT y MPv son recíprocas y, en el caso de MPv, bilaterales (Figura 2). Todas estas estructuras, a excepción de PPC, han sido implicadas en conductas visuomotoras.

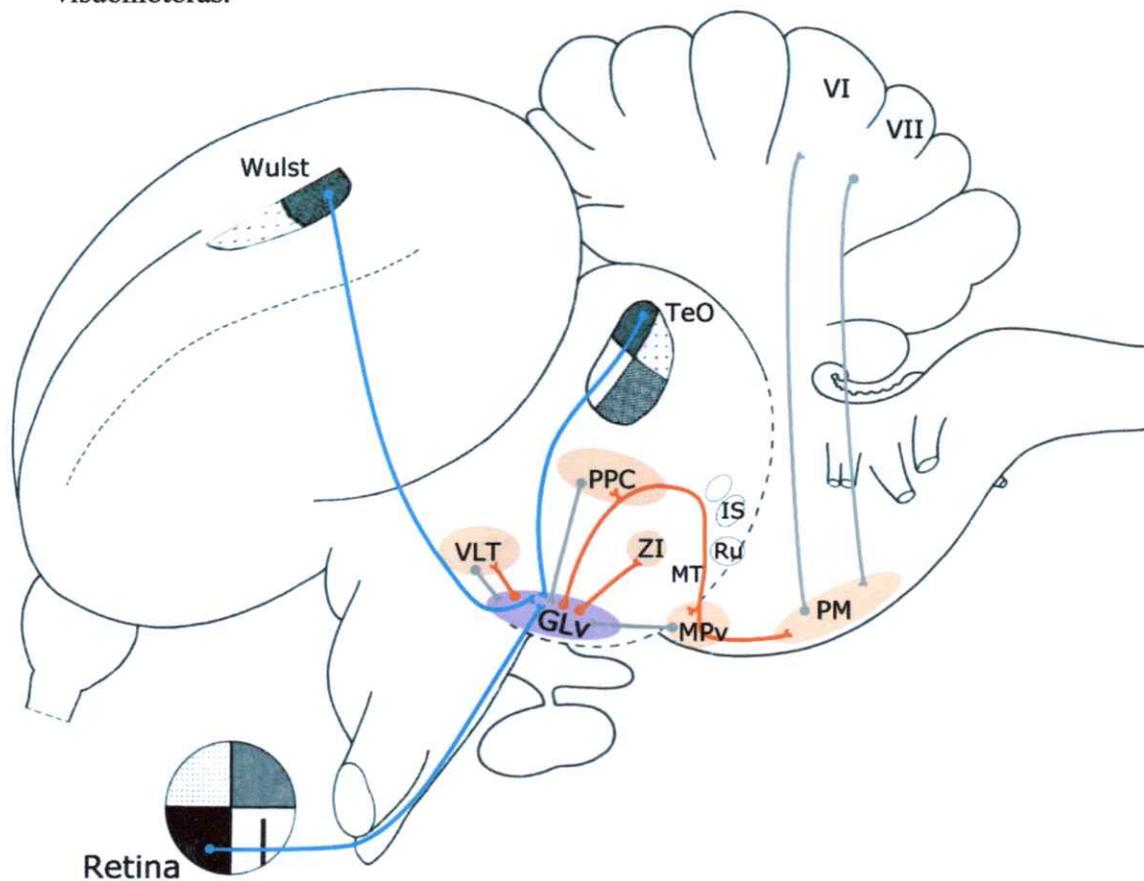


Figura 2. Esquema de las aferencias y eferencias del GLv. En azul se muestran las aferencias visuales principales del GLv, en naranja las eferencias y en gris el resto de las aferencias y las conexiones recíprocas entre el núcleo del puente medial (PM) y el cerebelo. *Hyper pallium apicale* (Wulst), *nucleus ventrolateralis thalami* (VLT), *nucleus geniculatis laterales pars ventralis* (GLv), núcleo principal precomisural (PPC), *zona incerta* (ZI), núcleo de Ruber (Ru), núcleo intersticial de Cajal (IS), núcleo de Darkshewitsch (D), núcleo mesencefálico profundo, *pars ventralis* (MPv), tectum óptico (TeO), tegmento motor (TM), folias del "cerebelo visuomotor" (VI y VII). Esquema adaptado de Nieuwenhuys et al. (1998).

Con el fin de verificar uno de los blancos de los axones de proyección del GLv, se realizaron inyecciones de la subunidad β de la toxina del cólera (CTb), un trazador neuronal, en el núcleo del puente medial (PM) (Figura 3A). Al reaccionar la inmunohistoquímica, observamos una clara marca en somas ubicados en la capa interna del GLv y en otros pocos somas ubicados en la lámina externa (Figura 3B). También observamos en la lámina externa del GLv una densa marca de procesos neuronales, muchos de los cuales emergen de células marcadas en la lámina interna. Estas observaciones concuerdan con la idea de que las aferencias del PM que provienen del GLv corresponden a los axones de las células de la capa interna.

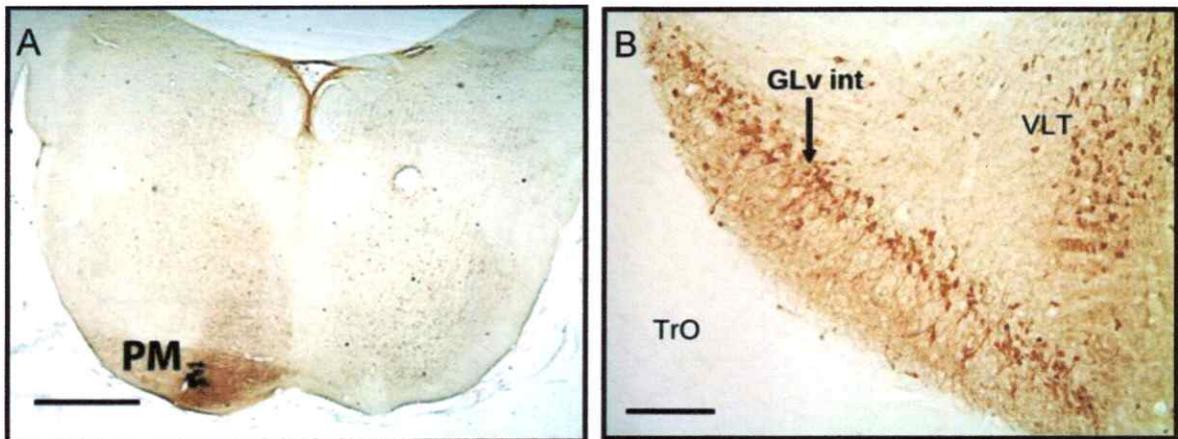


Figura 3. A: Inyección de CTb en el PM. B: Células retrógradamente marcadas en el GLv. Los somas de estas neuronas se sitúan en la lámina interna. Solo algunos somas se observan en la capa externa. La capa externa se encuentra llena de procesos neuronales marcados. El aumento es de 4X (A) y de 10X (B). Las barras de calibración corresponden a 1 cm (A) y a 200 μ m (B).

Los axones de las células de la lámina interna del GLv se encuentran ocupando principalmente la región del tegmento motor medial del tronco encefálico. Esta región cumple un rol premotor en los movimientos de orientación y se considera el centro

generador de patrones de los movimientos de orientación visual. Existe una extensa literatura en amniotas que da cuenta de las estructuras premotoras y músculo-esqueléticas implicadas en estos movimientos, las que varían dependiendo de la especie. En la rana, la porción medial del tegmento mesencefálico está implicada en el control del movimiento de la mirada (cuerpo completo) hacia estímulos visuales (Masino y Grobstein, 1989). En mamíferos se ha mostrado que la microestimulación eléctrica en el tegmento medial, más específicamente en el núcleo ruber, el núcleo intersticial de Cajal, el área prerubral y la formación reticular tegmental y pontina, evoca movimientos de la mirada en direcciones ortogonales entre sí, conformando un mecanismo "cartesiano" de control premotor de la dirección de la mirada (Wurtz y Goldberg, 1972; Büttner et al. 1977; Raphan y Cohen, 1978; Sparks, 1986; Waitzman et al., 2000; Sparks, 2002; Scudder et al., 2002; Quessy y Freedman, 2004; Walton y Freedman, 2014). En las aves, las neuronas premotoras del cuello se encuentran en la formación reticular parvocelular y gigantocelular ubicadas en la región del tegmento medial de la médula oblonga y en el puente (Dubbeldan, 1998). En la formación reticular medial pontina de la paloma se originan movimientos oculares (Yang et al., 2008). En la lechuza, las neuronas tegmentales ubicadas en torno a la línea media del tronco encefálico proyectan a la porción cervical de la médula espinal (Masino y Knudsen, 1992). En esta región tegmental se ha mostrado la existencia de un mecanismo "cartesiano" generador de movimientos que se asemeja a lo que se ha propuesto al respecto en el tegmento medial de mamíferos (Masino y Knudsen, 1993).

El blanco principal de los terminales axonales de las neuronas de la lámina interna del GLv parece ser el núcleo puente medial (Marín et al., 2001). En aves y mamíferos el

núcleo PM, proyecta recíprocamente al vermis de las folias VI y VII del “cerebelo visuomotor” (Butler y Hodos, 1996). En monos, las células de Purkinje de estas regiones cerebelares responden antes de los movimientos oculares y microestimulaciones en estas áreas son suficientes para producir sacadas (Fujikado y Noda, 1987; Noda y Fujikado, 1987), incluso una vez iniciada la ejecución de movimientos (Krauzlis y Miles, 1998). En humanos, se ha confirmado la participación del cerebelo visuomotor en la generación de sacadas mediante estimulación artificial usando TMS, imageneología con resonancia magnética funcional (fMRI) y mapeando lesiones con MRI en pacientes con infartos (Hashimoto y Ohtsuka, 1995; Hayakawa et al., 2002; Ye et al., 2010). Utilizando un paradigma conductual que permite aislar las respuestas asociadas a los movimientos de la cabeza, Suzuki y Keller (1988) mostraron que las células de Purkinje de esta región aumentan la descarga con la velocidad horizontal de la cabeza. Todas estas evidencias indican que las folias VI y VII del cerebelo cumplen un rol activo en las conductas de orientación de la mirada.

En la literatura el rol visuomotor del GLv se ha sugerido a partir del trabajo de Graybiel (1974), que mostró en el gato la existencia de una proyección del complejo GLv hacia el núcleo medial del puente. Algunos trabajos más recientes también sugieren el rol oculomotor del GLv, con argumentos anatómicos y fisiológicos (Harrington, 1997; Livingston y Mustari, 2000; Livingston y Fedder, 2003; Gamlin, 2006). Livingston y Fedder (2003) muestran que en el macaco alerta una proporción significativa (60%) de las unidades con respuesta visual del núcleo pregeniculado (nombre que recibe en primates el complejo GLv), descargan andanadas de espigas antes y durante la ejecución de sacadas oculares y movimientos oculares voluntarios de seguimiento lento de un estímulo visual.

En aves no existen estudios que indiquen o descarten un rol visuomotor para el GLv. Cabe destacar el trabajo de Gioanni et al. (1991), donde muestran que en palomas las lesiones neurotóxicas de este núcleo provocan cambios en la ganancia del componente horizontal del reflejo optocinético. Dicho reflejo es una conducta oculomotora refleja que depende, en su sensorialidad visual, del sistema óptico accesorio. Este resultado es interesante, dado que sugiere que el GLv tiene al menos un rol modulador sobre conductas visuomotoras reflejas.

Recientemente en nuestro laboratorio hemos encontrado, por primera vez en vertebrados, una evidencia directa que indica que el núcleo GLv tiene un rol en la generación de movimientos de orientación de la mirada. Al respecto, nuestras observaciones preliminares muestran que al microestimular en un locus específico del GLv en palomas crónicamente implantadas con un electrodo, la paloma realiza un movimiento de cabeza, aparentemente orientando el pico hacia el campo visual del locus correspondiente. Además, encontramos que el movimiento de cabeza va acompañado de movimientos oculares. Esto último es interesante por cuanto la microestimulación hemilateral en el GLv gatilla una conducta compleja y concertada entre músculos del cuello y de ambos ojos. Sin embargo desconocemos el efecto específico de la activación de un locus del geniculado sobre los centros generadores de los patrones de movimiento. No sabemos de qué manera se orquestan los movimientos de cabeza y ojos, si obedecen a una conducta tipo evasiva, si es que el animal intenta fovealizar un objeto, si lo intenta picotear o una combinación de las anteriores. Por lo tanto se requiere de más evidencias para abordar estas interrogantes.

Hipótesis

La activación neuronal en el núcleo geniculado ventrolateral gatilla conductas de orientación de la mirada visualmente guiadas.

Objetivos

Objetivo general:

Establecer y describir el papel que cumple el núcleo GLv en las conductas de orientación de la mirada guiadas por estímulos visuales.

Objetivos específicos:

- 1- Medir el tamaño y ubicación de los campos receptivos del GLv. Estudiar la distribución espacial en el GLv de las corrientes sinápticas evocadas por luz.
- 2- Determinar qué subregión del GLv produce una mayor respuesta de orientación visual frente a los estímulos eléctricos.
- 3- Determinar el efecto de la microestimulación eléctrica de la lámina interna del GLv sobre los movimientos de orientación visual, ojos y cabeza. Estudiar la dependencia de la cinemática del movimiento de la cabeza con el sitio de la estimulación, con los parámetros del estímulo y con la posición inicial de la cabeza.
- 4- Estudiar la relación entre la actividad neuronal de la lámina interna del GLv y los movimientos espontáneos de la cabeza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos: En esta tesis, se emplearon 44 palomas (*Columba livia*) adultas de entre 300 y 420 gramos. Se les administró comida y agua libremente. Los animales fueron adquiridos de un proveedor local autorizado y mantenidos en el vivero del laboratorio. Todos los métodos usados fueron aprobados de acuerdo al protocolo de manejo de especies vivas para experimentación y bioseguridad del comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Cirugías: Todos los experimentos requirieron de una sesión quirúrgica previa, en la cual los animales fueron anestesiados con ketamina (220 mg por Kg de animal) y xilacina (26 mg por Kg de animal) y luego montados en un aparato estereotáxico en la orientación estándar (Karten y Hodos, 1967). Todas las heridas y zonas de presión fueron tratadas con anestesia tópica (lidocaína clorhidrato 4%). El electrocardiograma y la temperatura de los animales se registraron continuamente durante el procedimiento. Se efectuaron craneotomías que permitieron el acceso al GLv. Se insertó en el cráneo una placa de acrílico que se usó de soporte para los electrodos que fueron implantados crónicamente y los dispositivos de medición. Para los experimentos con animales despiertos con la cabeza restringida de movimiento, se implantaron pernos de sujeción en la placa de acrílico. Esto permitió inmovilizar la cabeza del animal sin generarle puntos de presión que pudieran generarle algún dolor. Después de la cirugía, se les inyectó antibiótico (enrofloxacino 33

mg/Kg de animal) y un analgésico antiinflamatorio (ketoprofeno 33 mg/Kg de animal). Las sesiones experimentales con animales con implantes crónico se iniciaron dos días después de la cirugía, y se prolongaron por no más de dos horas, a una frecuencia de dos sesiones diarias durante una semana.

Microestimulación eléctrica: Se utilizó una unidad de aislamiento de estímulos de corriente continua STG4002-1.6mA (Multi Channel Systems MCS GmbH). Se emplearon electrodos de tungsteno (FHC Inc. Neural microTargeting worldwide) de 1 M Ω (probados a 1 kHz), con un vástago de 125 μ m de diámetro y aislados con una resina epoxi excepto en la punta (20 μ m). En los sitios de estimulación se entregaron trenes de pulsos de corriente constante monofásica y, en la mayoría de los casos, bifásica balanceada a modo de minimizar el daño tisular. Cada estímulo bifásico constaba de un pulso catódico de 300 μ s seguido de uno anódico de igual magnitud y duración. De este modo se construyeron pulsos bifásicos “cátodo-primero” (Figura 4). La amplitud de la corriente, la frecuencia y la duración del tren de pulsos se especifican en cada experimento. La corriente fue medida como la caída de voltaje a través de una resistencia conectada en serie con el circuito de estimulación. Constantemente se monitoreó la corriente inyectada en el sitio de estimulación con un osciloscopio (Tektronix TDS 2014B).

Caracterización de los campos receptivos: Se construyó un iluminador controlable por un generador de pulsos. El aparato consta de un arreglo de LEDs que iluminan un extremo de una fibra óptica. A su vez, el otro extremo de la fibra ilumina el lumen de un cilindro

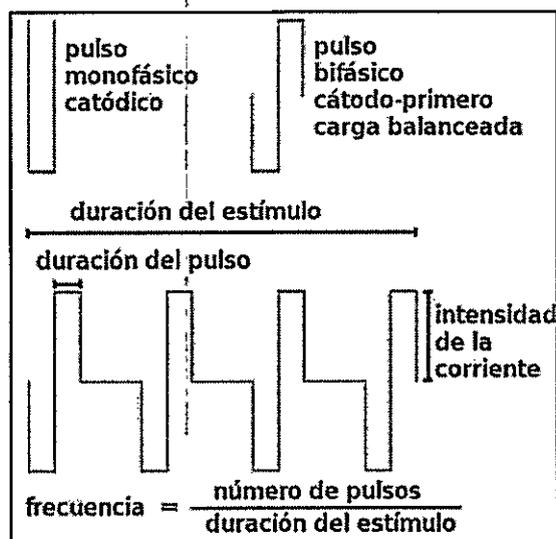


Figura 4. Parámetros de los microestímulos eléctricos utilizados. Arriba: se muestran las dos formas de pulsos utilizados. Abajo: parámetros de un tren de pulsos bifásicos balanceados cátodo primero.

de aluminio. Este cilindro es de 10 cm de largo y el interior tiene un diámetro creciente que va de los 6 mm, por donde entra la luz, a los 22 mm, por donde sale. Este dispositivo nos permitió iluminar una superficie de acrílico opaco de una manera localizada y homogénea. De esta manera se estimuló una región acotada del campo visual. Se situó el centro del ojo de tal manera que el eje óptico apunte al centro del campímetro (Nalbach et al., 1990). Bajo los efectos de la anestesia (ketamina/xilacina), la variación de la orientación del ojo dentro de la órbita ocular es menor a los 2° (Nalbach et al., 1990). Para ubicar el campo receptivo de la lámina externa del GLV, en distintas regiones del campo visual se aplicaron pulsos de luz de 50 ms de duración ($n = 12$) y se registró el cambio en la frecuencia de descarga multiunitaria centrado y reducido respecto de la situación previa al estímulo visual (Figura 5). La respuesta se normalizó respecto del valor de la región del espacio en la cual se obtuvo la máxima respuesta. El tamaño de los campos receptivos se expresa en términos del radio de la curva de isonivel del 80% de la respuesta de la función

gaussiana 2D que mejor se ajusta a los datos (Figura 13, *resultados*). Para realizar el ajuste y comparar el tamaño de los campos receptivos ubicados en distintas partes del campo visual, todos los datos fueron transformados a un sistema de coordenadas de doble polaridad o sistema de coordenadas de Hess, en el cual azimut y elevación están definidos por ejes independientes. De esta manera 1° en una esfera unitaria corresponde a una distancia estándar en cualquier parte de la superficie de la esfera.

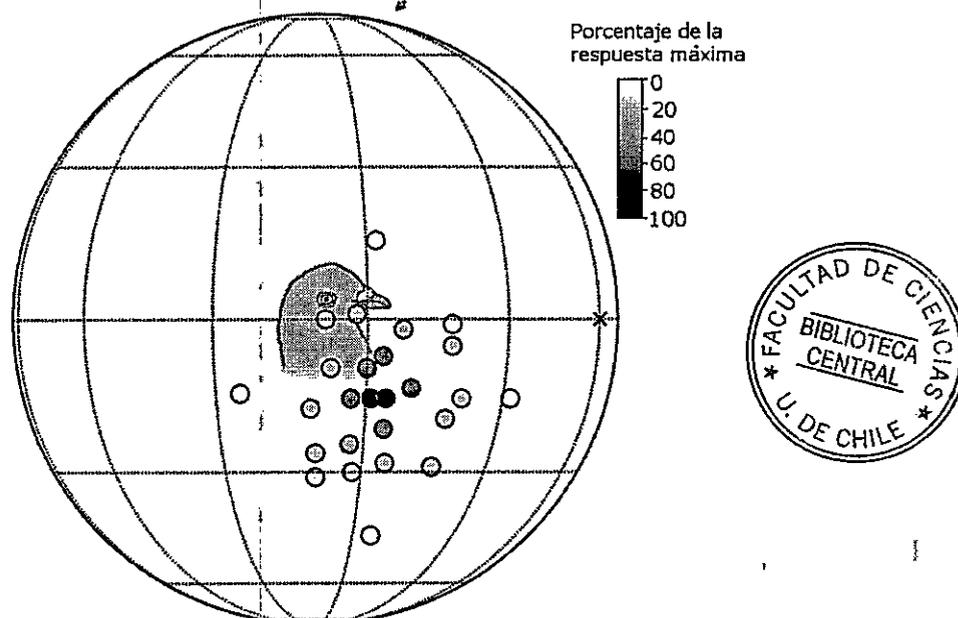


Figura 5. Determinación del centro y tamaño del campo receptivo visual de los loci del GLv int. Aquí se muestran las respuestas asociadas a un sitio del GLv. Los valores en escala de grises representan las respuestas evocada desde esa región del campo visual expresada en porcentaje respecto de la respuesta máxima. Estos valores se ajustaron posteriormente a una función gaussiana 2D y se determinó el tamaño del campo receptivo (ver texto). En esta tesis se determinó la ubicación y se midió el tamaño del CR de 17 sitios en el GLv.

Análisis de la densidad de la corriente (current source density, CSD): Se realizó un transecto en el sentido dorso-ventral abarcando las regiones circundantes del GLv. En cada sitio, se registró el potencial de campo extracelular (LFP, 3-200 Hz) evocado por luz. Los estímulos fueron pulsos de luz de 50 ms y se presentaron en una región amplia del campo visual. Los promedios de las señales de voltaje (12 repeticiones) adquiridas en

cada profundidad fueron alineados con el inicio del estímulo visual (ver *resultados*, Figura 11, *LFP gráfico de líneas*). Luego se construyeron vectores para cada uno de los puntos de muestreo (1 kHz) y a cada vector se les asignó los valores de voltaje de cada profundidad en ese instante. Los valores de voltaje de los nuevos vectores fueron derivados dos veces con respecto al espacio (en este caso la profundidad). Los nuevos valores obtenidos corresponden a la densidad de la corriente (ver *resultados*, Figura 11, *CSD gráfico de líneas*). Finalmente se alinearon todos los vectores en una matriz que representa el tiempo en el eje horizontal y la profundidad en el vertical. El valor de cada punto se expresó con una escala de código de colores (ver *resultados*, Figura 11, *CSD gráfico de colores*). El programa para realizar este análisis de manera automática fue desarrollado y provisto gentilmente por Máximo Fernández en base a lo descrito para esta técnica (Nicholson, 1973; Nicholson y Freeman, 1975) y posteriormente ajustado. Para poder realizar esta técnica, se requiere que la región estudiada tenga una organización anatómica tal que permita alinear el eje de las profundidades con el eje principal del flujo de la corriente (Johnston y Wu, 1995). El GLv es un núcleo organizado retinotópicamente en un plano que se extiende rostro-caudal y medio-lateralmente, las aferencias llegan por ventral, las células eferentes de la lámina interna están dispuestas a lo largo del eje dorso-ventral y las eferencias salen por dorsal.

Estimación de la ubicación del electrodo: Para situar el electrodo en el cerebro, se utilizó como primera referencia las coordenadas estereotáxicas del atlas de Karten y Hodós (1967). Durante la penetración, se monitorearon las propiedades fisiológicas con un amplificador diferencial de voltaje (A-M Systems, Inc. Modelo 3600) conectado a un

amplificador de audio y a un osciloscopio. Al llegar al tracto óptico se realizó un CSD (ver *métodos CSD y resultados*; Figuras 11 y 12). Esta técnica se utilizó de manera rutinaria para ubicar las subregiones del GLv al momento de realizar los experimentos con los animales anestesiados. Luego se localizó el campo receptivo registrando potenciales evocados en la lámina externa (ver *métodos mapeo*). Una vez terminadas las mediciones en preparaciones agudas o crónicas, se realizaron lesiones electrolíticas inyectando 5 μ A de corriente continua positiva durante 4s. Los animales se sacrificaron al día siguiente para que se generara una cicatriz glial en torno a la lesión.

Histología: Los animales se anestesiaron y se perfundieron con suero salino seguido de paraformaldehído 4% en amortiguador fosfato. Se extrajo el cerebro del cráneo y se dejó superfundiendo en PFA 4% más sacarosa 30% en amortiguador fosfato (PB) a pH 6,8 por 2 días. Se removió la duramadre del tejido nervioso y el cerebro se congeló a -30°C para ser cortado (60 μm para verificar lesiones y 30 μm para anatomía) con un micrótopo LEITZ. Las rebanadas se montaron en porta objetos cubiertos con gelatina y luego fueron teñidas con Nissl. Las lesiones electrolíticas fueron detectadas mediante reconstrucciones histológicas con tinción Nissl colorimétrico (violeta de cresilo (acetato), MERCK) o fluorescente (NeuroTrace® 500/525 Green Fluorescent Nissl Stain, Molecular Probes®). En ocasiones se verificó la ubicación del electrodo sumergiéndolo previamente en *1,1'-Diocadecyl 3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate* (DiI), un colorante fluorescente. Posteriormente se reconstruyó el trayecto del electrodo observando la fluorescencia emitida por el DiI depositado a lo largo de la penetración (DiCarlo et al., 1996).

Trazador neuronal: La inyección en el núcleo del puente medial fue hecha a 12,5 mm de profundidad en 1,00 anterior y 1,00 lateral, de acuerdo a las coordenadas del atlas de Karten y Hodos (1967). En el sitio de inyección se ubicó una micropipeta de vidrio con una punta de entre 20 y 30 μm . Se inyectó una solución de CTb 1% (List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA) en amortiguador fosfato. Se inyectó 1 μl de la solución con un sistema de presión (PICOSPRITXER® III, Parker Instruments). Se dejó que la paloma se recuperara de la anestesia y después de una sobrevida de 6 días se perfundió (ver histología). Las secciones se lavaron 3 veces por 5 min en amortiguador fosfato con 0,75% de cloruro de sodio (PBS) y se incubaron en una solución de anticuerpo primario hecho en cabra anti-CTb diluido 1:10.000 en PBS con 0,3% de triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) y 5% de suero normal de conejo durante toda la noche a 4°C. Luego las secciones se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron en una solución de anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con biotina (Vector Labs, Burlingame, CA) diluido 1:200 en PBS con 0,3% triton X-100 durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de tres lavados en PBS, los cortes fueron incubados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC *Elite* Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) diluido 1:100 con triton X-100 al 0,3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, las secciones fueron incubadas por 6 min con 0,05% 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en PB. Se agregaron 0,01% de peróxido de hidrógeno a la solución de DAB hasta que se alcanzó una relación señal/ruido apropiada. Se lavó con PBS por 30min y los cortes fueron montados en portaobjetos, deshidratados, clareados y cubiertos con medio de montaje (Entellan® nuevo, MERCK). Las secciones fueron examinadas con un microscopio de

luz y las estructuras fueron identificadas en base al atlas estereotáxico de Karten y Hodos (1967).

Medición de la respuesta conductual: El estado conductual de los animales puede afectar la métrica de las respuestas gatilladas por la microestimulación eléctrica (Tehovnik et al., 2003). Las sesiones se realizaron en una pieza aislada parcialmente de los sonidos, y con una baja intensidad de luz para minimizar la presencia de cualquier estímulo que pudiese alterar el estado conductual de los animales. Al inicio de cada sesión se controló el estado de las palomas y cuando los animales presentaron algún indicio de estrés o alertividad debido a la presencia humana, se interrumpieron las sesiones y se retomaron cuando los animales volvieron a un estado de tranquilidad. Se utilizaron dispositivos adosados a la cabeza de los animales para medir los movimientos de la cabeza y de los ojos. Estos sensores pesaron entre 0,6 g el más liviano y 5 g cuando se utilizaron todos juntos y constituyeron entre el 3% y el 15 % del peso de la cabeza y el cuello de las palomas. Todos los animales toleraron rápidamente los instrumentos situados en sus cabezas sin ninguna molestia evidente, aun después de largas sesiones en esa condición.

Cámara de video infrarrojo: Se empleó un sistema de seguimiento ocular no invasivo basado en una videocámara infrarroja (resolución de pixeles 320 x 240). En la condición de cabeza libre, la cámara (2 g) se adhirió a la cabeza del animal para que cámara y cabeza se muevan de manera solidaria. Las señales de video se grabaron a 60 Hz a través de un programa (ViewPoint EyeTracker®, Arrington Research) de análisis de imagen que identifica el pixel de la imagen correspondiente al centro de la pupila (método de detección de pupila oscura). Se determinó la relación entre el tamaño del plano enfocado y la

distancia de enfoque (Figura 6 A.). En cada experimento, se midió la distancia entre el sensor de la cámara y la córnea de la paloma. Luego se interpoló el tamaño del plano enfocado correspondiente. El desplazamiento del centro de la pupila se estimó multiplicando el tamaño del plano enfocado por la posición relativa del centro de la pupila en cada uno de los dos ejes del plano enfocado (distancia estimada, DE; Figura 6 B). La resolución angular informada por el manual del programa de análisis es de $0,5^\circ$ medido en humanos. Las dimensiones de los ojos de una paloma son distintas a las de los ojos humanos, por lo tanto se calculó la resolución angular del sistema de medición adaptado para una paloma y fue de 1° . A continuación se detalla el cálculo (la abreviaciones se definen en la leyenda de la Figura 6).

relación $TPE \propto DCPE$ para el eje menor de la cámara:

$$TPE = 0,36 \times DCPE + 0,09$$

La máxima $DCPE$ empleada fue de 1,9cm

$$\Rightarrow TPE_{m\acute{a}x} = 0,36 \times 1,9 + 0,09$$

$$\Rightarrow TPE_{m\acute{a}x} = 0,774cm$$

unidad mínima informada por el programa de análisis = 0,01

$$DE_{min} = 0,01 \times TPE_{m\acute{a}x} = 7,74 \times 10^{-3}cm$$

diámetro axial del ojo de palomas adultas (DA)

$$\overline{DA} = 1,17cm; desviación estándar = 0,03; n = 13$$

factor de corrección (FC) que considera la inserción de los músculos que mueven los ojos

$$CER = DA \times FC = 1,17 \times \frac{1}{2} = 0,59$$

$$\alpha = \sin^{-1} \left(\frac{DE_{min}}{CER} \right) = \sin^{-1} \left(\frac{7,74 \times 10^{-3}}{0,59} \right)$$

$$\alpha \approx 1^\circ$$

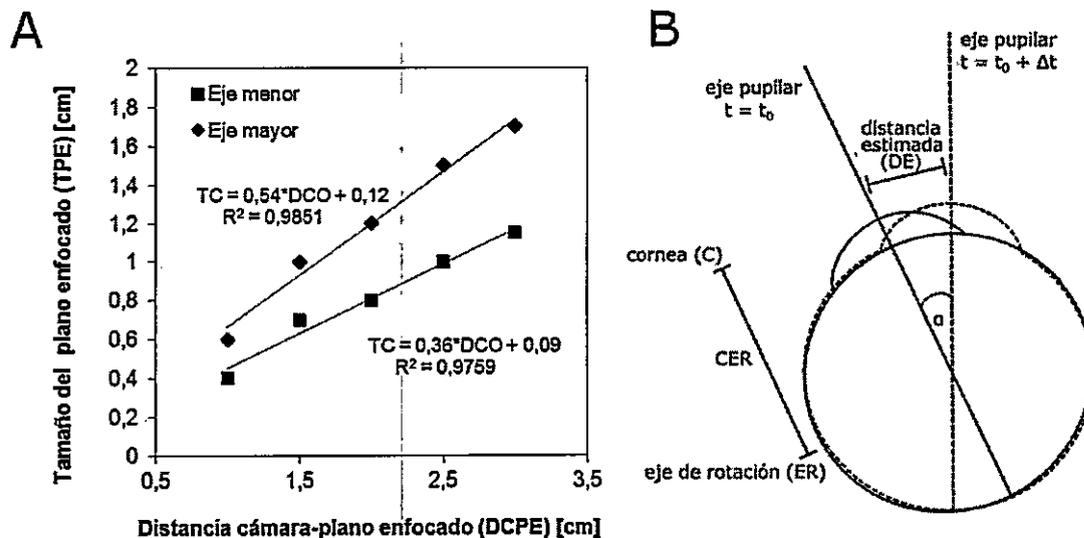


Figura 6. Determinación de la rotación ocular medida con una videocámara IR. A: Determinación de la relación entre el tamaño del campo enfocado (TPE) y la distancia entre la cámara y el plano enfocado (DCPE). B: Rotación ocular (α) calculada en base al desplazamiento estimado (DE) del centro de la pupila.

Sensor de campo magnético: Para medir las contracciones y relajaciones de la musculatura del cuello (Figura 15 y 16) y la latencia de los movimientos oculares se utilizó un sensor de campo magnético (ZX-MAGNETIC, magnetic field sensor borrad, innovative experiment). Esta tarjeta posee un sensor de efecto de hall (UGN3503) que detecta cambios en la densidad del flujo magnético. La salida de la tarjeta es un voltaje DC relativo a la densidad del campo magnético. Todas las mediciones realizadas con este dispositivo fueron hechas con una frecuencia de muestreo de 10 kHz y posteriormente filtrada de acuerdo al fenómeno estudiado. Se adosó un disco de imán de 5 mm de diámetro en la superficie de la musculatura del cuello y sobre la piel que recubre la porción dorsal del ojo. Se ubicó el sensor (0,5 g) a pocos milímetros del imán y se conectó a la tarjeta de adquisición.

Cámara de video de alta velocidad: Se ancló una luz láser (sacado de un puntero láser) a la cabeza del animal alineando el haz de luz con el pico. Se ubicó al animal en la posición estereotáxica (Figura 7). Se apagó la luz y se filmó la posición del láser en la semiesfera antes, durante y después de la estimulación. Se grabó a 250 cuadros por segundo (cps) y a 500 cps. El inicio de la filmación se sincronizó con el sistema de estimulación, dejando un *buffer* para el tiempo previo. Este sistema se utilizó para medir los movimientos inducidos por microestimulación eléctrica con distintas posiciones iniciales de la cabeza y algunos movimientos con la posición inicial fija. Adicionalmente, sirvió para calibrar los dispositivos inerciales y permitió monitorear en tiempo real la posición de la cabeza (Figura 7).

Mediciones inerciales: A fin de establecer la métrica de los movimientos inducidos por la microestimulación, utilizamos sensores de mediciones inerciales, acelerómetros lineales y giróscopos. En los experimentos con microestimulaciones eléctricas, se utilizó una unidad de medición inercial (IMU) consistente en un acelerómetro lineal 3D análogo (ADXL335, ANALOG DEVICES) y un giróscopo 3D digital (ITG-3200, InvenSense) montados en una placa de 2 x 2 cm (3 gramos). Este dispositivo se ancló firmemente a la cabeza del animal, de modo que el IMU y la cabeza se movieron solidariamente (ver Figura 7). Estas placas se conectaron a un microprocesador (arduino uno, <http://www.arduino.cc/>), el cual envió los datos a un computador a una tasa de 1 kHz, donde fueron almacenados y analizados *post hoc*. Los parámetros del algoritmo de análisis fueron calibrados empíricamente en base a la posición del rayo láser proyectado desde la cabeza del animal. Los cálculos de la orientación final de la cabeza calculados con el IMU y con el láser mostraron una diferencia menor a 2°.

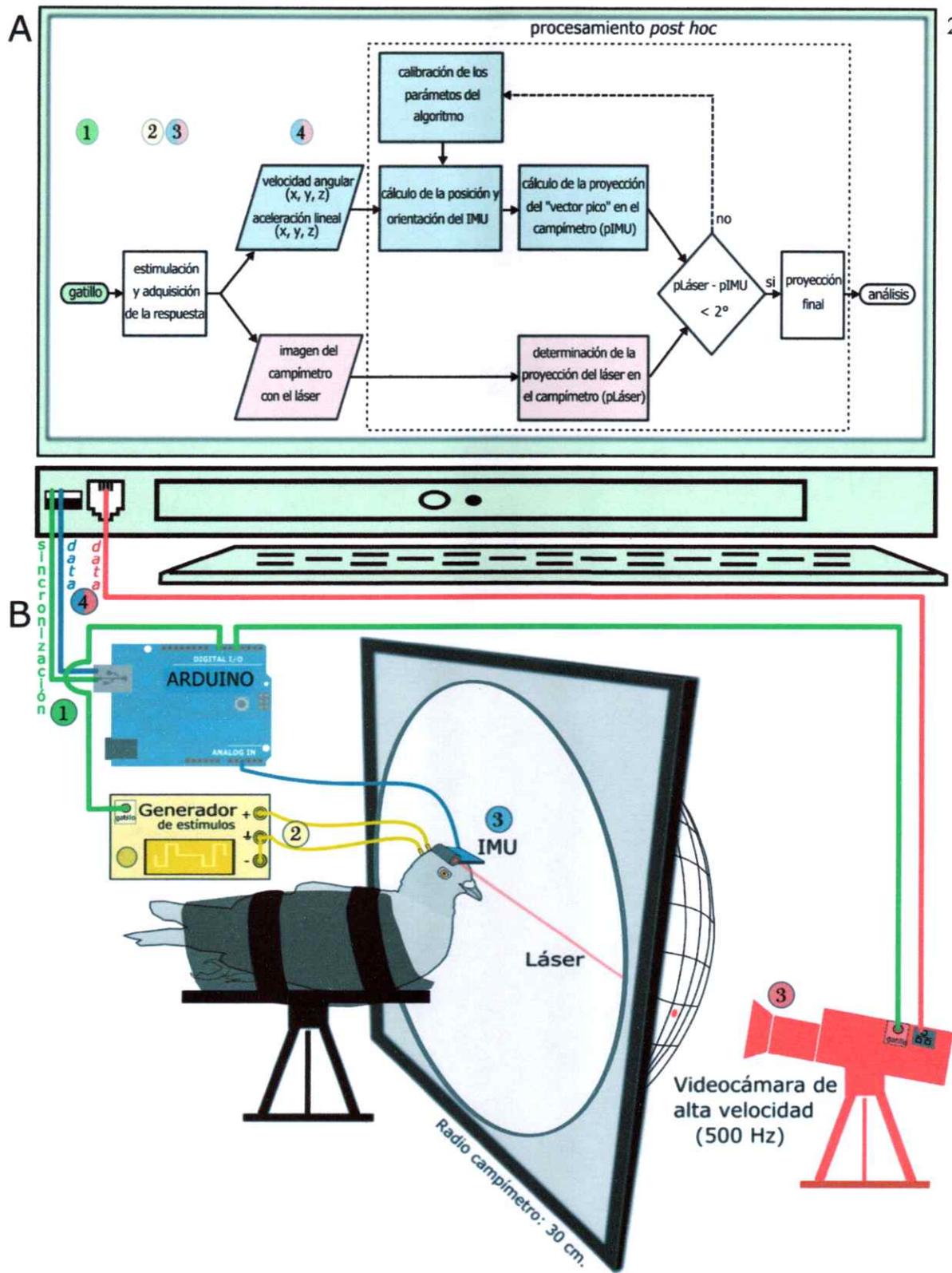


Figura 7. Experimento de microestimulación del GLv con la cabeza libre. A: diagrama de flujo del proceso de adquisición y procesamiento de los datos. B: esquema que muestra la configuración experimental de la instrumentación y de las conexiones empleadas para la adquisición de los datos. Las etapas de la adquisición se enumeran de acuerdo a la sucesión de los eventos.

Análisis de datos: Los movimientos de la cabeza observados en las palomas se pueden descomponer en rotaciones y traslaciones. Al girar y trasladarse la cabeza, la orientación de la mirada cambia. Como una aproximación de la dirección de la mirada de la paloma utilizamos el eje X del acelerómetro, el cual fue alineado con la dirección del pico del animal (Figura 7). La posición y la orientación instantánea se calcularon integrando los datos inerciales del instante previo. La aceleración lineal (a) fue medida con un acelerómetro de tres ejes (XYZ) y la velocidad angular (ω) con un giróscopo de tres ejes ($\Phi\Theta\Psi$). Debido a la acumulación del error (medido con un láser y una videocámara, ver *mediciones inerciales* y Figura 7) en las determinación de la trayectoria fue necesario implementar un algoritmo que minimice el error hasta obtener una congruencia entre los valores determinados de manera independiente con el IMU y con el sistema láser imageneológico (ver Figura 7). Para llevar a cabo el proceso que comprende la adquisición de datos inerciales y la determinación de los parámetros cinemáticos del movimiento de la cabeza se desarrollaron 5 archivos de código fuente escritos en lenguaje de programación Python (versión 2.7.9 disponible en <http://www.python.org>) en base a lo descrito por Borenstein et al. (2009) y por Woodman (2007). El código de los archivos *adquisición_IMU.py*, *trayectoria_IMU.py* y parte de *funciones_IMU.py* fue desarrollado gentilmente por Bryan Reynaert. A continuación se describe brevemente la acción que realiza cada uno de los programas (ver Figura 8) y en el apéndice se muestra el código fuente comentado.

adquisicion_IMU.py: Inicializa la comunicación serial con el arduino, adquiere la información sincronizada con una señal para gatillar un evento y almacena los datos en un archivo con 7 columnas en formato CSV (*comma-separated values*). Las primeras 3

columnas corresponden a la señales de los ejes equis (x), i griega (y) y zeta (z) provenientes del acelerómetro lineal. Las columnas 3, 4 y 5 corresponden a los ejes fi (ϕ), teta (θ) y psi (ψ) respectivamente de velocidad angular medida con el giróscopo. La última columna corresponde a una señal que permite sincronizar los datos inerciales con el estímulo eléctrico.

trayectoria_IMU.py: Resta la señal basal del giróscopo previa al estímulo. Luego filtra las velocidades angulares igualando a cero aquellos valores inferiores a 4 °/s (elimina la acumulación del error debido al ruido). Calcula la orientación integrando la velocidad angular con respecto al tiempo. La aceleración lineal expresada en bits entregados por el microprocesador arduino es transformada a valores de voltaje y luego “a” veces la aceleración de gravedad (g). La aceleración lineal se suaviza calculando la media móvil central con $n = 7$. Las señales de aceleración contienen una componente debida al movimiento del sensor y otra debida a la aceleración de gravedad, la cual se descompone en los tres ejes del acelerómetro dependiendo de su orientación. El filtro complementario permite descontar la aceleración de gravedad a las señales acelerométricas utilizando la orientación calculada a partir del giróscopo (muy preciso y no es susceptible a fuerzas externas) y del acelerómetro (no acumula error experimental). Posteriormente se igualan a cero todos los valores de aceleración inferiores a 0,035 G (eliminación del ruido). Finalmente se integra dos veces la aceleración con respecto al tiempo para obtener la posición del sensor. Todas las integraciones se realizan con el método numérico de la regla del trapecio. La frecuencia de muestreo para ambos dispositivos inerciales fue de 1 kHz.

deteccion_IMU.py: Como una medida de la orientación de la mirada, se calcula la proyección del eje X del acelerómetro sobre una esfera de 30 cm radio, que se mantiene

fija durante el movimiento de la cabeza, a partir de la posición y la orientación del IMU (vector pico o pIMU, ver Figura 7). Luego se calcula la distancia ortodrómica entre pIMU y pIMU en el instante previo, como una medida del desplazamiento angular de la mirada. La distancia ortodrómica permite expresar el desplazamiento angular, de modo que 1° en una esfera unitaria corresponde a una distancia estándar en cualquier parte de la superficie de la esfera. El inicio y el término del movimiento se determinaron en base a un criterio de umbral de velocidad angular de $20^\circ/\text{s}$.

parametros_IMU.py: Calcula el tiempo transcurrido entre el inicio del estímulo y el inicio del movimiento, latencia; la distancia ortodrómica entre pIMU en el instante inicial y el momento final del movimiento, amplitud; la velocidad máxima; la duración del movimiento y la dirección. La dirección se expresa en grados, con 0° para el movimiento vertical hacia arriba, 90° para el movimiento netamente horizontal hacia la dirección contralateral al sitio estimulado, -90° para movimientos hacia ipsilateral y 180 o -180° para movimientos hacia abajo.

funciones_IMU.py: Se definen funciones y variables utilizadas en *trayectoria_IMU.py*, *deteccion_IMU.py* y *parametros_IMU.py*.

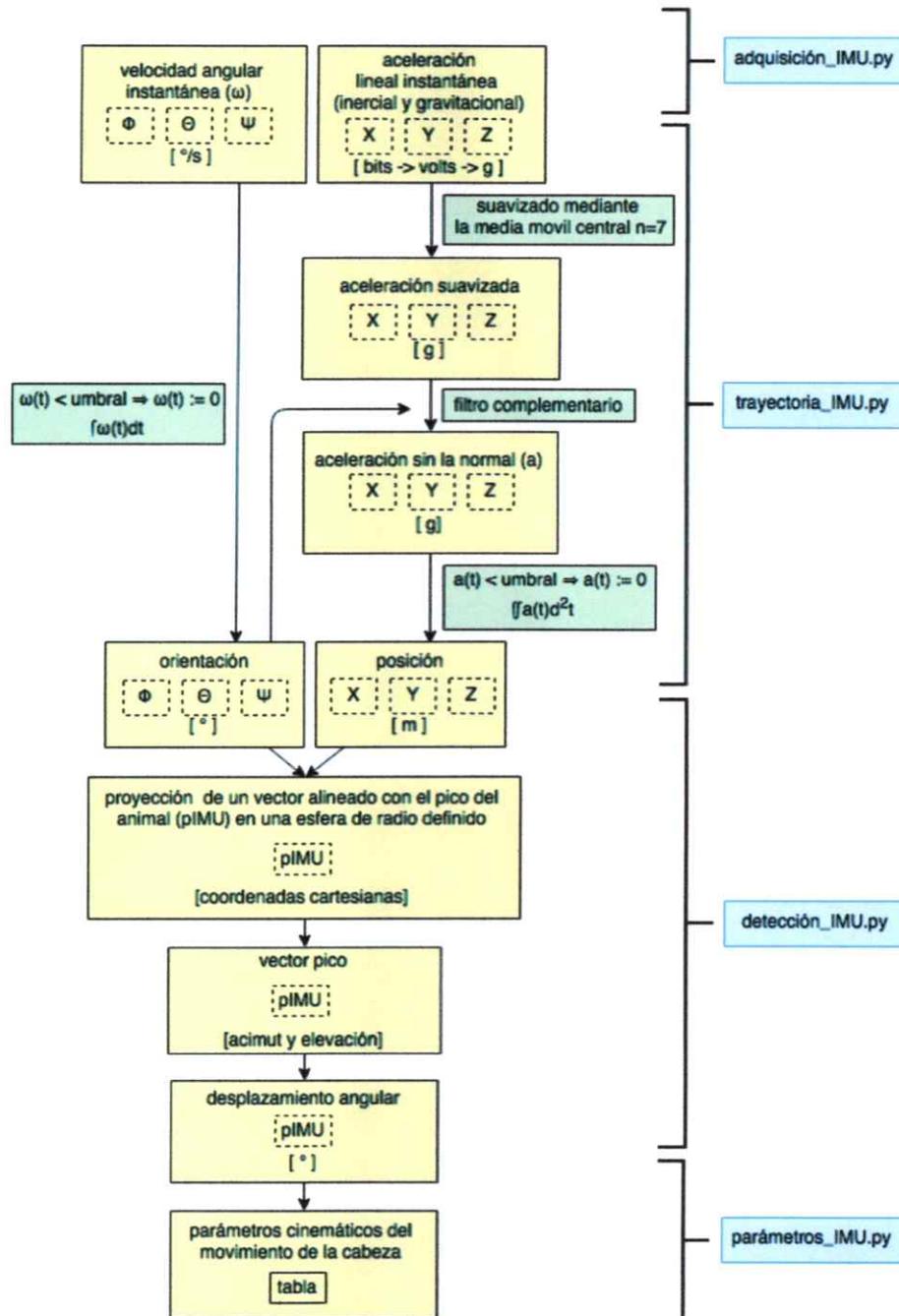


Figura 8. Análisis de los datos adquiridos con el sistema de medición inercial (IMU). Amarillo, magnitudes calculadas y entre corchetes se muestran las respectivas unidades. Rectángulos con línea discontinua, señales adquiridas y procesadas. Verde, funciones que se aplican a las señales. Azul, archivos de código fuente (con corchetes se indica la etapa del proceso en la cual intervienen).

Análisis estadísticos: Se realizó un estudio paramétrico para determinar el efecto de los parámetros de la microestimulación eléctrica sobre los parámetros cinemáticos de los movimientos de la cabeza (Figuras 19 y 22). Se confeccionaron curvas estímulo-respuesta,

las cuales fueron ajustadas a una función exponencial ($R = [R_0 - Meseta] \times e^{-p/\tau} + Meseta$) o a una función sigmoide ($R = [Meseta^n \times p^n] / [K_{0,5}^n + p^n]$) según el caso. R : respuesta (calculada con el programa *parametros_IMU.py*, ver análisis de datos). p : parámetro del estímulo (ver Figura 4). R_0 : respuesta evocada cuando $p = 0$. $Meseta$: meseta de la respuesta. τ : constante de tiempo. $K_{0,5}$: valor de p cuando R corresponde a la mitad de la *meseta*. n : coeficiente de Hill. Todos los ajustes a las curvas estímulo-respuesta y los cálculos estadísticos se realizaron con programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA.).

Ablación del tectum óptico: A 5 palomas se les extirpó el tectum óptico ipsilateral a los electrodos implantados en el GLv (10 sitios en el GLv. Una vez implantados los electrodos en el GLv y realizadas todas las mediciones, los animales se anestesiaron y se siguieron todos los procedimientos rutinarios de cirugía que se detallaron previamente. Se realizó una craneotomía en la región temporal para acceder al tectum. Se extirpó el TeO con una pipeta de Pasteur de vidrio esterilizada con la punta doblada y acoplada a una manguera, una trampa de vacío construida con un kitasato y una bomba de vacío (BOECO Germany, R-300). Se rellenó el espacio con un hemostático local absorbible de gelita y se selló con cera de hueso. Luego de dos días de recuperación, los animales fueron sometidos a las mismas mediciones realizadas antes de la ablación. En la Figura 9 se muestra la reconstrucción histológica de un caso de ablación tectal. En el recuadro B se observan dos perspectivas del encéfalo, donde se aprecia que una porción del tectum anterior permaneció intacta después de la ablación. Los electrodos implantados en el GLv de este

animal están en loci representados en la porción del TeO que fue extirpada, regiones intermedia y posterior.

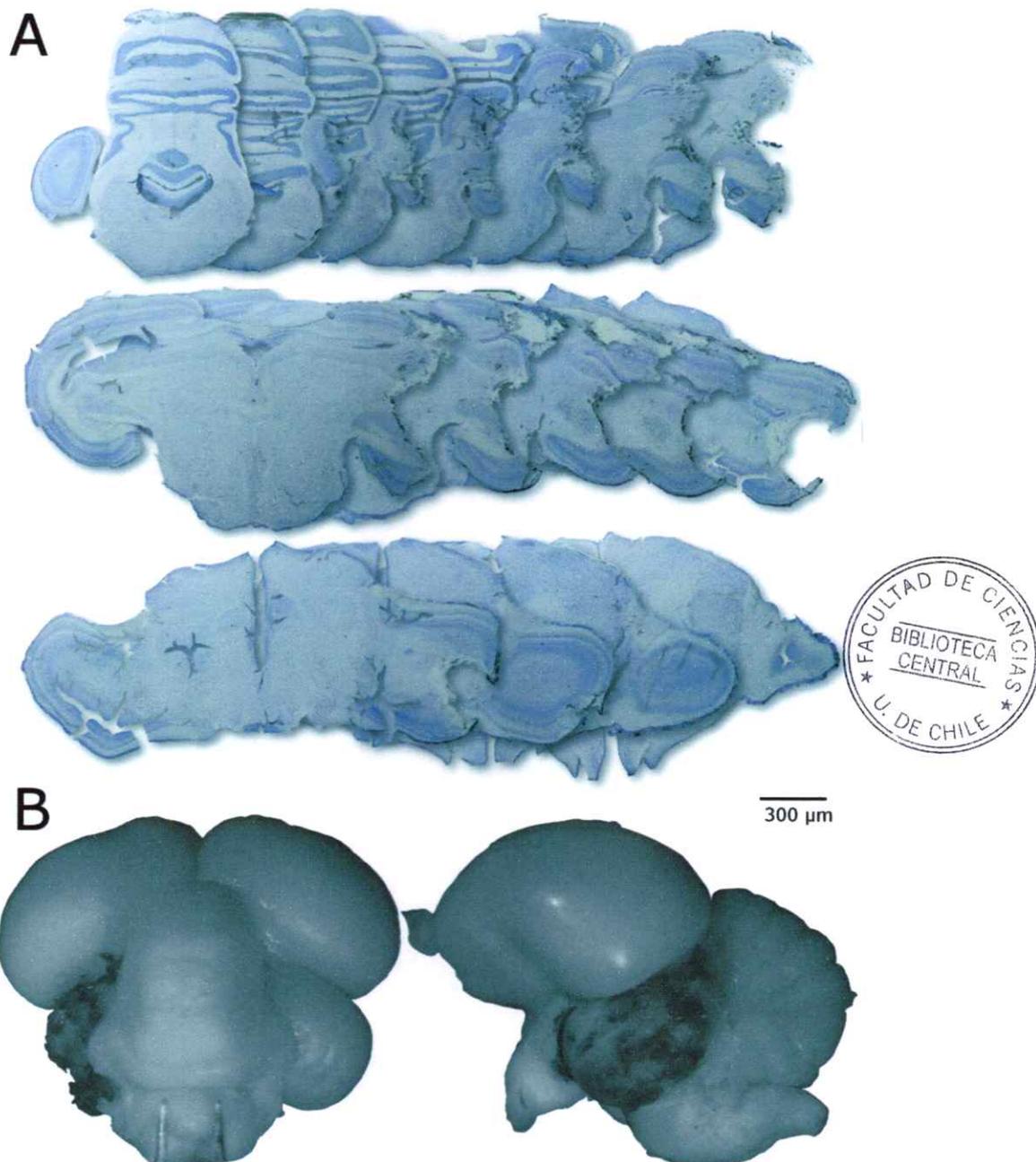


Figura 9. Reconstrucción histológica de un caso de ablación del tectum óptico ipsilateral al electrodo implantado en el GLv. A: La serie avanza de posterior a anterior hacia la derecha y hacia abajo. B: Vista posterior y lateral del encéfalo con la ablación del TeO izquierdo. La barra de calibración es la misma para A y B.

Detección de los movimientos espontáneos de la cabeza

Se registró la aceleración lineal y la velocidad angular de la cabeza (Figura 10). La configuración experimental en estas mediciones fue la misma que la que se indica en la Figura 7. Se utilizó el acelerómetro ADXL335 (ANALOG DEVICES) y el giróscopo 3D analógico LPY503AL (ANALOG DEVICES), ambos conectados directamente a la tarjeta de adquisición (Nacional Instruments PCI-6024E). Se analizaron los 3 componentes lineales y los 3 componentes angulares del movimiento de manera separada. Para cada sitio estudiado, contamos como mínimo con una hora de registro en presencia de luz y una hora en oscuridad. En ambas condiciones se registró al animal con y sin los efectos del fármaco apomorfina, un agonista de dopamina que genera un aumento de la actividad motora en las palomas (ver sección siguiente). La duración del movimiento de la cabeza se contabilizó a partir del momento en que cualquiera de señales correspondientes a la velocidad o aceleración mostrara un cambio superior a 2 veces el cuadrado de la raíz del promedio de la señal (rms). El término del movimiento se situó en el momento en que todas las señales alcanzaron valores menores a 3 veces el rms de la señal que viene a continuación. En la Figura 10 se muestra un evento del movimiento de la cabeza. Además, se utilizó una cámara de video digital (SONY, DCR-SX45) para monitorear los movimientos de la cabeza de los animales. Las filmaciones fueron hechas a 60 Hz. Estas nos permitieron verificar la dirección del movimiento y a qué tipo de conducta corresponde cada movimiento registrado (cambio de orientación de la mirada, picotazo, agitación de la cabeza, etc.). Conjuntamente se registró la actividad multiunitaria en la lámina interna del GLv (Figura 10, *traza inferior*).

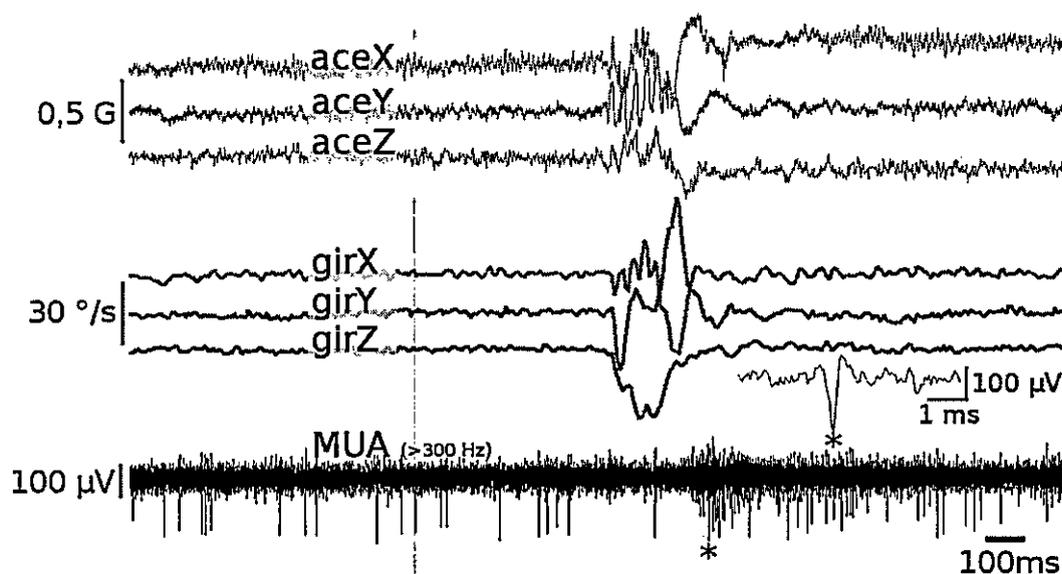


Figura 10. Registro multiunitario en la lámina interna del GLV asociado a movimientos de la cabeza. Se muestra un evento de movimiento de un animal en la condición fotópica bajo los efectos de la apomorfina. Se registraron 6 señales correspondientes a velocidades angulares y aceleraciones lineales. La actividad multiunitaria registrada en la lámina interna del GLV está filtrada digitalmente por sobre los 300 Hz. El asterisco corresponde a una espiga que se muestra ampliada en el tiempo. aceX, aceY, aceZ, ejes x, y, z del acelerómetro. girX, girY, girZ, ejes x, y, z del giróscopo. La frecuencia de muestreo de los sensores inerciales fue de 1,6 kHz para los ejes x e y del acelerómetro, 550 Hz para el eje z del acelerómetro y de 140 Hz para cada uno de los 3 ejes del giróscopo. Abajo a la derecha se muestra la barra que corresponde a la escala temporal de las 7 señales sincronizadas.

Aplicación del agonista

Los animales despiertos con implantes crónicos, al ser inmovilizados, después de alguno minutos experimentan una disminución en los movimientos de la cabeza y en ocasiones se duermen. Para activar a los animales en estas condiciones se les inyectó intramuscularmente (3 mg/Kg de animal) un agonista de dopamina (R-(-)-Apomorfina clorhidrato hemihidrato, SIGMA-Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL en suero salino estéril. Se ha descrito que la apomorfina induce comportamientos estereotipados en palomas adultas (Goodman, 1981).

RESULTADOS

Análisis de la densidad de las corrientes evocadas visualmente

Al registrar los potenciales de campo a lo largo un transecto dorso-ventral que incluye al GLv, se observaron potenciales evocados por luz producto de las masivas aferencias visuales que presenta este núcleo. Considerando la topografía del GLv descrita en trabajos previos (Crossland y Uchwat, 1979; Guiloff et al., 1987; Mpodozis y Karten, 2004; Vega-Zuniga et al., 2014) es posible hacer un análisis de la densidad de corriente (CSD, ver *métodos*) producida por las sinapsis activadas por luz. Se estimuló con un flash de luz en cada uno de los puntos de registro y se midió el potencial local de campo (LFP). Se observaron dos señales características (Figura 11). Una de ellas corresponde a una fuente de corriente ubicada en la lámina interna y la otra a un sumidero ubicada entre 250 y 300 μm hacia ventral, en la lámina externa. La posición del electrodo fue corroborada posteriormente mediante lesiones electrolíticas ($n = 29$ lesiones en 19 animales). Al realizar 36 CSDs (Figura 12, $n = 36$ transectos en 19 animales), encontramos un patrón característico en todas las penetraciones. Una fuente de corriente en la lámina interna y un sumidero en la lámina externa. De esta manera, las señales fisiológicas (fuente y sumidero de corriente) se utilizaron en esta tesis como referencia para localizar *in vivo* las subregiones del GLv.

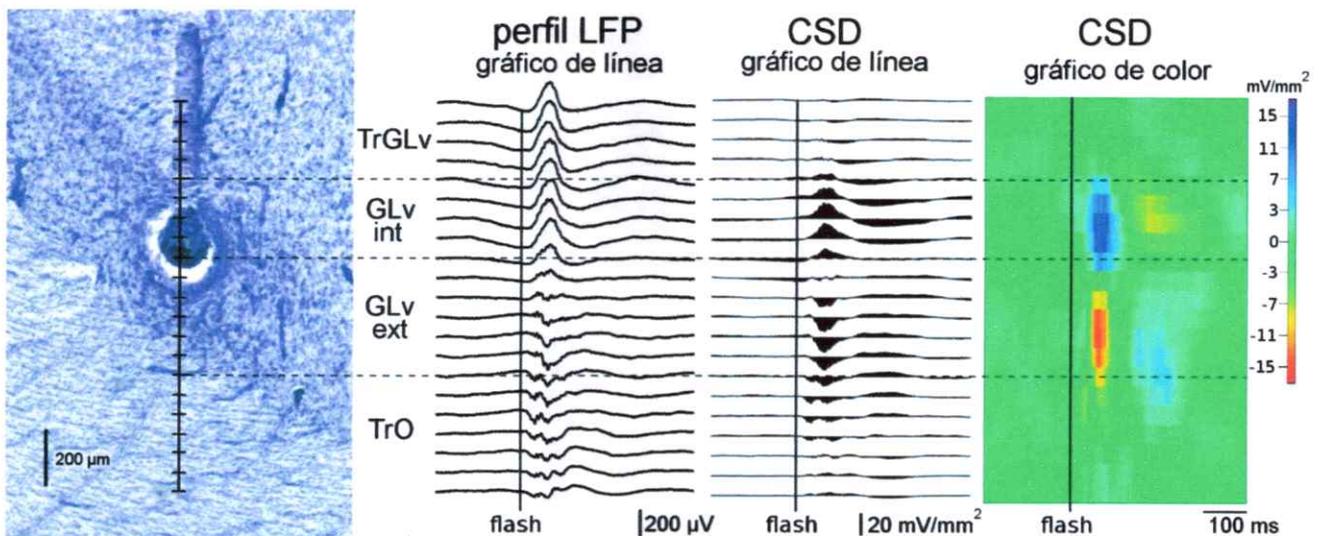


Figura 11. Análisis de la densidad de la corriente a lo largo del eje dorso ventral del GLv. A la izquierda se muestra una microfotografía a 10X de la lesión electrolítica hecha en la lámina interna del GLv. Con una línea continua vertical se indica la orientación del transecto realizado. Se muestran cada uno de los 21 sitios de registro ubicados cada 50 μm . La segunda columna indica el potencial de campo evocado por luz en cada profundidad. La tercera columna muestra el curso temporal de la densidad de corriente en cada punto de registro. En la columna derecha, el CSD expresa la densidad de la corriente con el código de colores que se indica a la derecha del gráfico. Con una línea vertical continua se indica el inicio del pulso de luz. La escala temporal para el LFP y para el CSD se muestra en el extremo inferior derecho.

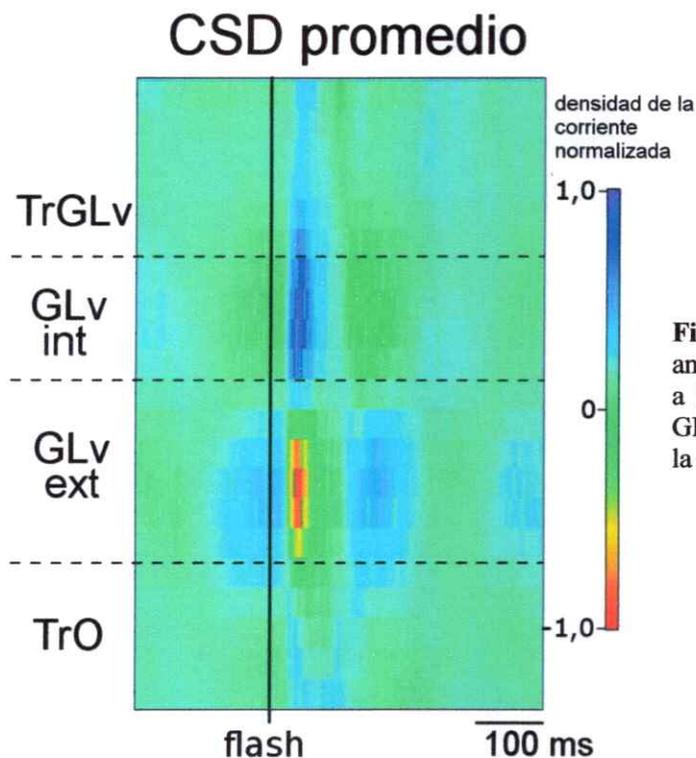


Figura 12. Promedio ($n = 36$) del análisis de la densidad de la corriente a lo largo del eje dorso ventral del GLv. La explicación de esta figura es la misma de la Figura 11.

Caracterización de los campos receptivos

Al monitorear el LFP en el GLv con parlantes de audio, encontramos que la intensidad de la respuesta visualmente evocada variaba dependiendo de la región del campo visual en la cual se situaba el estímulo. Para caracterizar esta respuesta medimos el LFP evocado ubicando la fuente de luz en distintas zonas del campímetro (ver *métodos*). Se ubicó el electrodo de registro en la lámina externa del GLv, en base al perfil fisiológico característico que revela el CSD, y medimos el LFP evocado ubicando la fuente de luz en distintas zonas del campímetro (ver *métodos*). Encontramos que para cada locus la respuesta visual tiene un máximo en una región acotada del campo visual y la intensidad de la respuesta decae a medida que el estímulo se aleja del centro de esta región. Se confeccionó un mapa para las respuestas de cada sitio del GLv ajustando el pico del LFP evocado y se determinó el centro y el ancho del campo receptivo (Figura 13, izquierda; ver *métodos*). Se encontró que el 80% de la respuesta máxima estaba restringida a una región de 8° de radio en promedio. Tomando en cuenta que la región frontal del campo visual de la paloma tiene una mayor representación en el GLv que los campos excéntricos (Crossland y Uchwat, 1973), evaluamos si había diferencia de tamaño entre los CRs (Figura 13, derecha). Encontramos que el radio de los CRs frontales ($\bar{X} = 6^\circ$, $n = 9$ locus en 7 animales) fue significativamente menor ($Mann - Whitney U = 14$; $P < 0,05$) que el radio de los CRs más excéntricos ($\bar{X} = 10^\circ$, $n = 8$ locus en 7 animales).

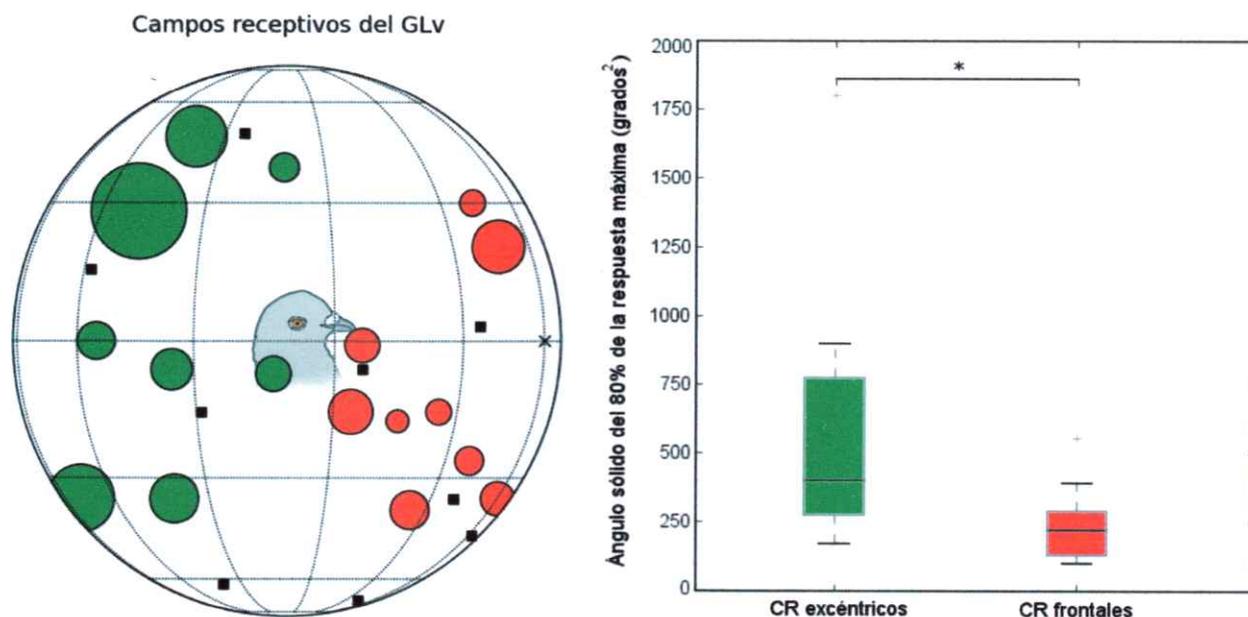


Figura 13. Ubicación y tamaño de los campos receptivos frontales (rojos) y excéntricos (verdes) del GLv. Izquierda: Ubicación del centro del campo receptivo de 17 loci del GLv, 9 frontales y 8 excéntricos $> 54^\circ$ respecto de la proyección del vector conformado entre la línea interauricular y la punta del pico (cruz). El tamaño de los círculos representa el ángulo sólido conformado por la curva de isonivel (ajuste gaussiano 2D) del 80% de la respuesta máxima (ver Figura 5, *métodos*). Los cuadrados negros representan el centro aproximado de campos receptivos de los cuales no se midió su tamaño. Derecha: diagrama de cajas que muestra las diferencias de tamaños entre los campos frontales y los campos excéntricos.

Movimientos oculares en animales con la cabeza restringida de movimiento

Evaluamos el efecto de la microestimulación eléctrica en distintas regiones visuales sobre la orientación del ojo contralateral dentro de la órbita ocular. Las palomas anestesiadas fueron ubicadas en un estereotáxico en la posición estándar (Nalbach et al., 1990) y se instaló un sistema de seguimiento ocular basado en una cámara infrarroja (ver *métodos*). Introdujimos en el cerebro de las palomas ($n = 3$ transectos en 3 animales) un microelectrodo a lo largo de un transecto en el sentido dorso-ventral desde el telencéfalo hasta el tracto óptico y luego realizamos otro transecto en el TeO del mismo animal (Figuras 14). En el primer transecto microestimulamos eléctricamente en 7 regiones en

las cuales encontramos potenciales evocados por luz. No encontramos cambios significativos en la posición del ojo al estimular las regiones telencefálicas con respuesta visual, el tracto óptico y los distintos estratos del tectum óptico, el principal centro visual primario de las aves. En el TeO, al aumentar la amplitud del estímulo sobre cierto umbral observamos que el animal levantó la cola y las plumas del cuello, desarrollando una respuesta de alertividad. Tampoco encontramos efecto en la posición del ojo al estimular el núcleo mesencefálico lateral parte dorsal (MLD), un relevo sensorial auditivo. En uno de los casos, en el núcleo DLL (uno de los 5 núcleos del complejo GLd de las aves; Güntürkün y Karten, 1991) encontramos una respuesta de 1° de desplazamiento ocular (cercana al límite de resolución de la técnica) y en dos de los casos en el núcleo rotundus (Rt, relevo sensorial entre el TeO y el telencéfalo visual; Karten y Hodos, 1967) el desplazamiento fue de 1 y 2°. Consistentemente en los 3 casos estudiados, la estimulación en la zona ubicada entre el Rt y el GLv generó movimientos de casi 4° de amplitud y en el GLv los movimientos oculares fueron de alrededor de 5°, que fue la máxima amplitud encontrada a lo largo del transecto y la región en donde se realizó una lesión electrolítica para verificar la posición del electrodo. Estos resultados demuestran que la estimulación eléctrica en estructuras que constituyen relevos sensoriales (MLD) y visuales (Wulst, LSt, TrO y TeO) no es suficiente para evocar movimientos oculares en la paloma. Si bien en más de una estructura visual se generaron movimientos de orientación visual (DLL, Rt y GLv), éstos ocurrieron en el GLv con mayor consistencia y mayor amplitud.

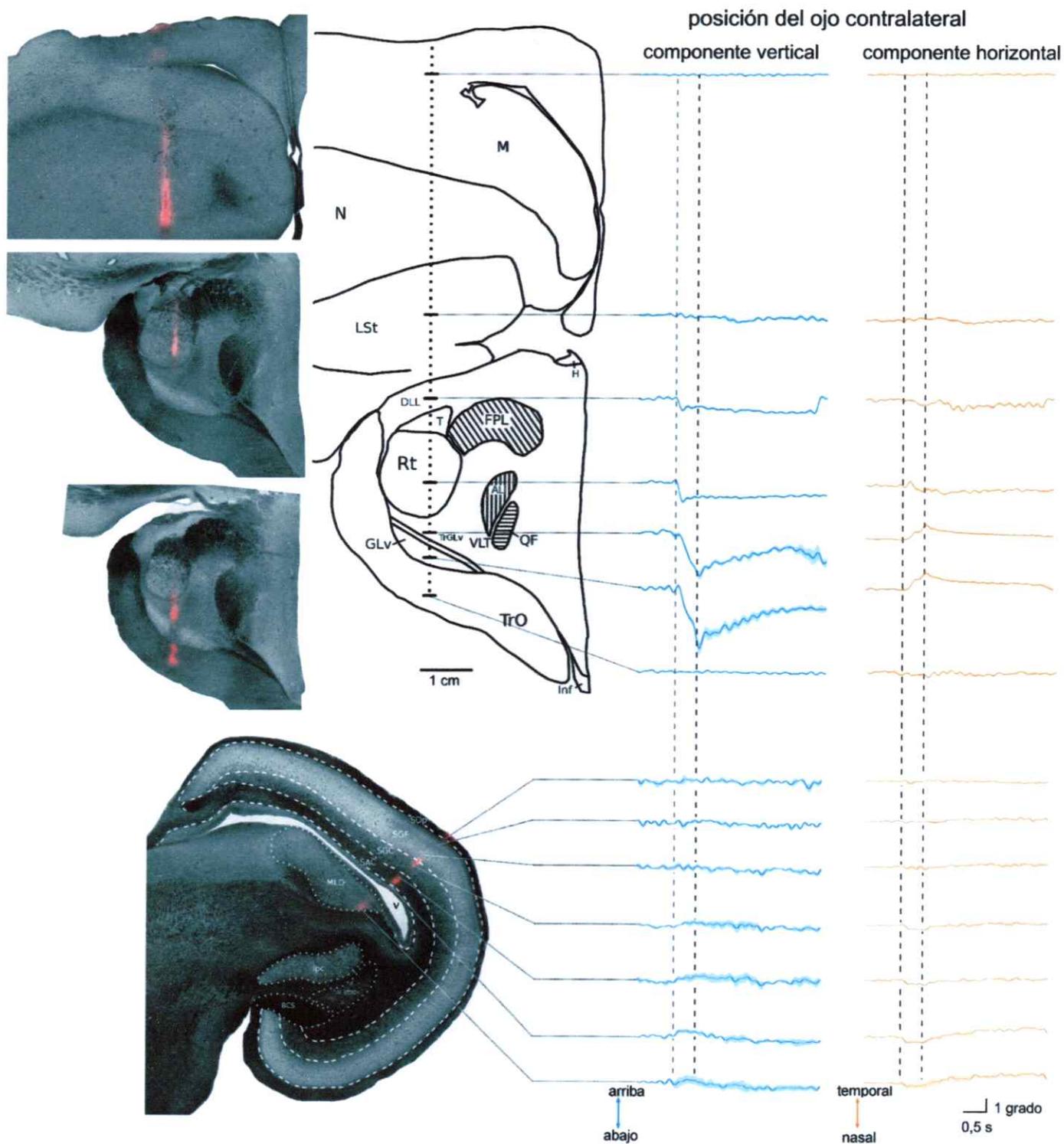


Figura 14. Efecto de la microestimulación eléctrica en estructuras visuales sobre la posición del ojo contralateral. Izquierda: Se muestra la marca fluorescente dejada por el electrodo embebido en DiI. Derecha: Se aplicó un tren de pulsos catódicos monofásicos ($300 \mu\text{A}$, 300 Hz , $300 \mu\text{s}$) en las fibras de proyección del GLv y en siete estructuras con actividad visual: *Hyper pallium apicale* o *Wulst* visual, LSt, DLL, Rt, GLv, TrO y TeO (Estructura compuesta por SOp, SGF, SGC y SAC). En (continúa)

cada uno de los puntos de estimulación se muestra el promedio (comp. vertical azul y comp. horizontal naranja) del desplazamiento vertical y horizontal del ojo contralateral. Se muestra uno de 3 experimentos realizados. Se realizaron 10 repeticiones para cada sitio de estimulación. El error estándar se muestra con una banda (comp. vertical celeste y comp. horizontal naranja claro) en torno al promedio. Cada par de líneas punteadas indica el inicio y el término del estímulo. Abreviaciones: *mesopallium* (M), *nidopallium* (N), *fasciculus prosencephali lateralis* (FPL), *tractus quinfofrontalis* (QF), *Ansa lenticulares* (Al), *nucleus triangularis* (T), *nucleus habenularis* (H), *infundibulum* (Inf), *lateral striatum* (LSt), *nucleus rotundus* (Rt) y *Nucleus dorsolateralis anterior thalami pars lateralis* (DLL), *tectum óptico* (TeO), *stratum opticum* (SOp), *stratum griseum et fibrosum superficiale* (SGF), *stratum griseum centrale* (SGC), *stratum album centrale* (SAC), *nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis* (MLD), *ventriculus* (V), *nucleus isthmi pars parvocellularis* (Ipc), *nucleus isthmi pars magnocellularis* (Imc), *brachium colliculi superioris* (BCS).

Para evaluar si la amplitud de los movimientos oculares se ve disminuida por el efecto de la anestesia, estimulamos la lámina interna del GLv en un animal despierto con la cabeza restringida (Figura 15, Tabla 1, n = 2 sitios en un animal). La restricción del movimiento se logró mediante el uso de pernos implantado en el cráneo, con la finalidad de no generar puntos de presión en el animal que pudieran generar dolor. Se midió la posición de ambos ojos con el mismo sistema de seguimiento ocular ocupado en la Figura 14. Encontramos que la estimulación evocó movimientos no conjugados de ambos ojos y con una dirección y con una amplitud que no varió significativamente cuando los parámetros de la estimulación permanecieron constantes. Para los dos sitios estudiados la amplitud del desplazamiento ocular fue de 5° y 2° para el ojo contra lateral y de 6° y 3° para el ojo ipsilateral (ver Tabla 1). En el animal despierto no hubo un aumento evidente de la amplitud de los movimientos oculares evocados eléctricamente en el GLv. Sin embargo, observamos contracciones musculares en la región del cuello del animal evocadas eléctricamente, un efecto que ya se apreciaba más levemente en los animales anestesiados al estimular el GLv con estímulos subumbrales para los movimientos oculares.

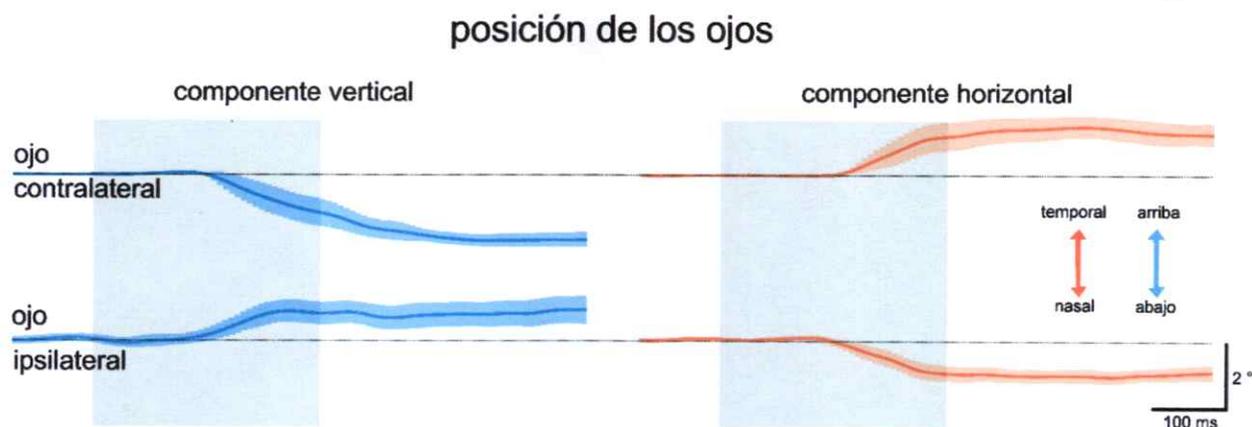


Figura 15. Movimientos oculares de ambos ojos evocados al microestimular eléctricamente un animal despierto con la cabeza restringida de movimiento. Los ojos ipsilateral y contralateral hacen referencia a la ubicación del electrodo implantado en el GLv. La simbología de las trazas es la misma utilizada en la Figura 14. Las bandas verticales grises corresponden a la duración del estímulo (tren de pulsos bifásico cátodo-primero, 300 μ A, 300 Hz, 300 μ s pulso, 300 ms tren).

Activación de la musculatura del cuello en animales anestesiados

A continuación realizamos experimentos agudos en animales anestesiados para determinar con mayor precisión espacial la región desde la cual se evocan las contracciones musculares del cuello que observamos en los experimentos previamente mencionados. Estas contracciones se midieron registrando el desplazamiento de un imán adosado a la superficie de la musculatura del cuello. El cambio de la posición del imán se detectó con un sensor magnético (ver *métodos*), lo cual se traduce en un cambio de voltaje. Se realizaron transectos a lo largo del eje dorso-ventral del GLv. Para cada penetración, se utilizó el CSD como referencia para determinar la ubicación de las respectivas subregiones del GLv. En la Figura 16, se muestra uno de los casos. Al estimular eléctricamente entre 500 μ m por sobre el centro de la lámina interna y 300 μ m más abajo con pulsos cátodo-primero, se observaron contracciones de la musculatura del cuello. El pico de la respuesta se situó 100 μ m por sobre el límite dorsal de la lámina interna del GLv. Al normalizar los valores de voltaje para cada una de las penetraciones (n = 7 transectos en 3 animales), encontramos que la región en la cual se genera el mayor

pico de contracción está 200 μm por sobre el centro de la lámina interna (Figura 17). Esta región es donde se encuentran los conos axónicos de las células de proyección de la lámina interna del GLv y es de donde surge el tracto eferente del GLv (TrGLv; Vega et al., 2015).

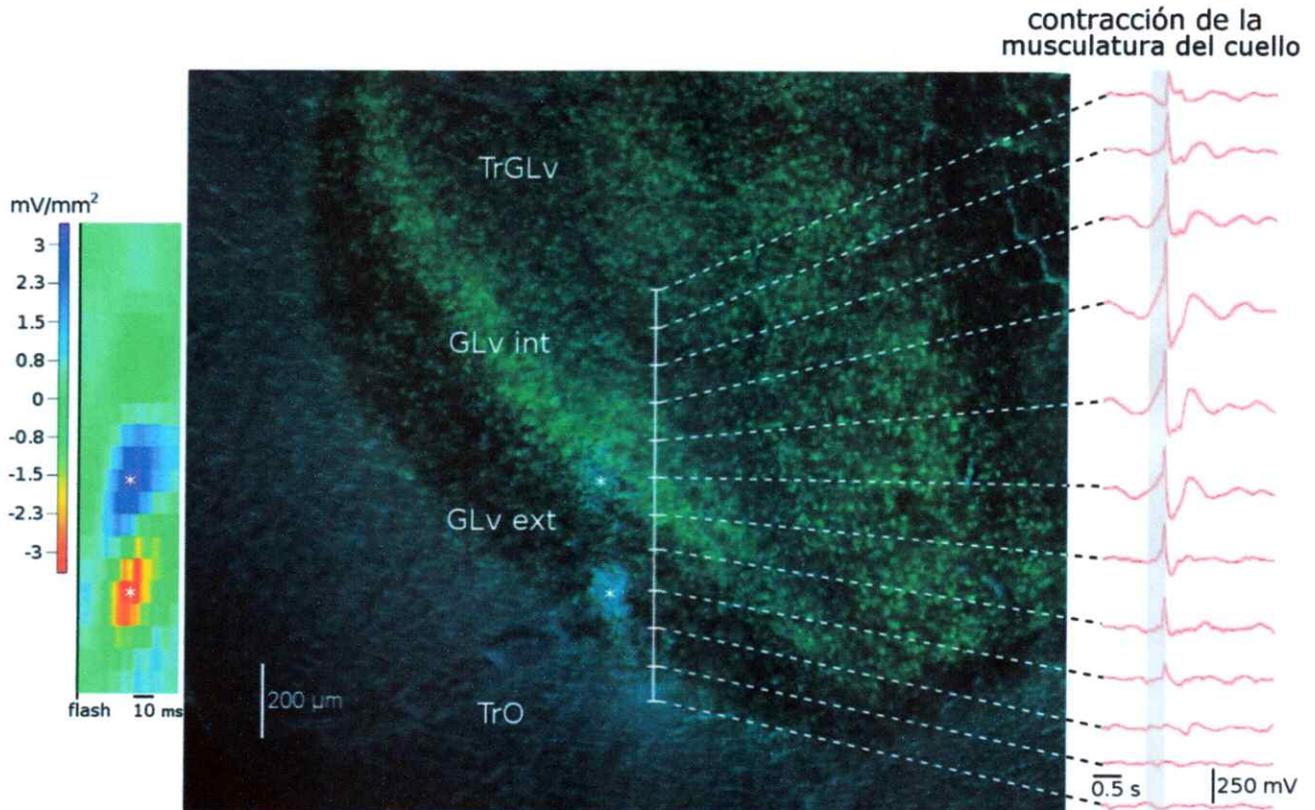


Figura 16. Efecto de la microestimulación eléctrica en el GLv sobre la contracción muscular del cuello. A la izquierda se muestran el CSD correspondiente (ver *métodos*) con el eje espacial a escala con la foto y alineando la fuente y el sumidero de corriente con la lámina interna y la lámina externa del GLv respectivamente (asteriscos). Al centro, las lesiones electrolíticas y la ubicación de los 12 sitios de estimulación, separados por 100 μm . Verde, la tinción fluorescente Nissl. Azul, la tinción fluorescente DAPI. En la imagen se aprecian las dos marcas de color celeste, estas corresponden a las cicatrices gliales, producto de las lesiones electrolíticas (asteriscos). Las lesiones se efectuaron en la lámina interna y en la lámina externa, en base a los datos obtenidos por el CSD. En todos los puntos de estimulación se aplicó un tren de pulsos bifásicos cátodo-primero (150 μA , 300 Hz, 300 μs pulso, 300 ms tren). A la derecha se muestra el curso temporal del cambio voltaje del sensor magnético como una medida del cambio de posición del imán adosado al músculo. En rojo se muestra el promedio para cada sitio y con una franja rosada en torno al promedio, se muestra el error estándar ($n = 10$ repeticiones). La franja gris indica la duración del estímulo. La microfotografía fue sacada a 4X. Las abreviaciones son las mismas que en la Figura 1.

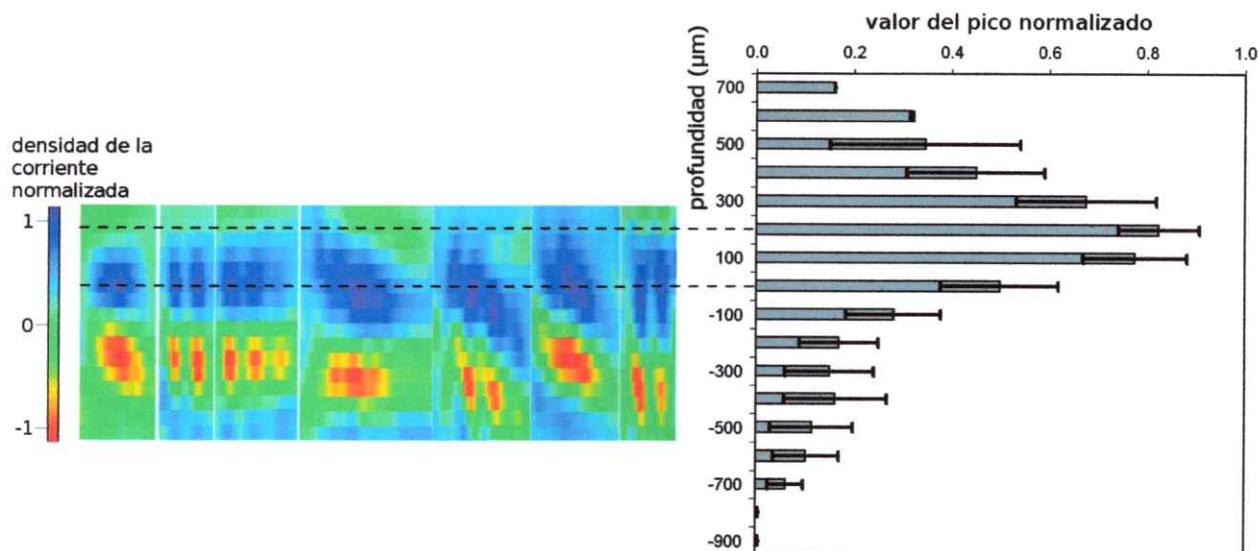


Figura 17. Región que genera la máxima respuesta muscular del cuello frente a la estimulación eléctrica a lo largo de un transecto en el GLv. Se realizaron 7 penetraciones en 3 animales, 3 de las cuales se confirmaron con lesiones en las láminas interna y externa. En todos los casos el estímulo y la metodología fue la misma que se detalla en la Figura 14. A la izquierda se muestran los CSD de cada una de las 7 penetraciones alineados por el centro del sumidero de la corriente. En cada CSD los valores de la densidad de corriente se normalizaron entre 1 y -1 en relación a los valores máximos y mínimos respectivamente. A la derecha se muestra el promedio del valor del pico de la respuesta para cada profundidad. Las barras de error representan el error estándar. Los valores de voltaje para cada penetración fueron normalizados respecto del valor del pico máximo alcanzado en ese transecto. Los valores de profundidad, están referenciados al sitio correspondiente al centro de la lámina interna del GLv, estimado en virtud del CSD. La línea punteada negra superior indica el punto de máxima respuesta. La línea punteada negra inferior muestra el punto en el cual fueron alineados los 7 experimentos.

Cambios de orientación de la mirada evocados eléctricamente en animales despiertos

Se ha descrito que previo al inicio de los movimientos de la cabeza gatillados en FEF (Elsley et al., 2007) y en el CS (Guitton et al., 1980; Roucoux et al., 1980; Corneil et al., 2002a; Corneil et al., 2002b) del mono, ocurren contracciones en los músculos del cuello. Dado que la microestimulación eléctrica en el GLv (Figuras 16 y 17) genera contracciones de los músculos del cuello de la paloma, implantamos crónicamente electrodos en la lámina interna del GLv para evaluar el efecto de la microestimulación eléctrica sobre la orientación de la mirada. Medimos la posición de los ojos dentro de la órbita ocular con una cámara infrarroja adosada a la cabeza del animal y la posición y orientación de la

cabeza con dispositivos de medición inercial (ver *métodos*). Como una primera aproximación, solo analizamos los distintos componentes de las señales inerciales sin integrarlas (Figura 18).

Hallamos que la estimulación de un locus del GLv gatilla movimientos oculares de ambos ojos y de la cabeza ($n = 4$ sitios en 3 animales). Al igual que en los casos con la cabeza restringida, al estimular en un mismo sitio, los movimientos oculares exhibieron una amplitud y dirección del movimiento constantes cuando los parámetros del estímulo se mantuvieron fijos (Figura 18). Tanto la dirección como la amplitud variaron cuando se estimuló en distintos sitios con un mismo estímulo. La amplitud máxima de los movimientos oculares fue de 6° . En ninguno de los sitios estudiados se encontró una relación evidente entre la ubicación del campo receptivo del sitio estimulado y la dirección de los movimientos oculares. En todos los sitios, excepto uno (paloma 3B), los CRs estaban situados en el cuadrante inferior y posterior del campo visual y los movimientos oculares de ambos ojos fueron no conjugados. El único sitio con un CR ubicado en la región frontal inferior del campo visual generó movimientos oculares convergentes hacia la región frontal inferior del campo visual (Tabla 1). Se requiere de un mayor muestreo para evaluar si la relación entre el tipo de movimiento ocular evocado en un sitio del GLv y la ubicación del CR respectivo siguen una tendencia significativa.

En todos los casos estudiados con la cabeza del animal libre de movimiento ($n = 4$ implantes en 3 animales) el umbral de corriente necesario para detectar movimientos oculares fue mayor que el umbral de corriente necesario para detectar movimientos de la cabeza. La latencia de los movimientos oculares también fue siempre superior a la latencia de los movimientos de la cabeza (Tabla 1), lo cual nos sugiere que los movimientos

oculares podrían estar siguiendo a los movimientos de la cabeza. En todos los casos, la amplitud del movimiento de la cabeza fue considerablemente superior a los movimientos oculares. La latencia de los movimientos oculares también fue siempre superior a la latencia de los movimientos de la cabeza (ver Tabla 1). La dirección hacia donde se dirigió la cabeza fue siempre la misma para el mismo sitio y distinta cuando se estimuló distintos sitios. Además el cuadrante en donde se situó el CR del sitio estimulado fue el mismo hacia donde se dirigía el pico del animal al ser estimulado. Para analizar cuantitativamente y en mayor detalle la cinemática de estos complejos movimientos de la cabeza fue necesario reconstruir la trayectoria del desplazamiento de la cabeza y de los cambios de orientación de la cabeza (ver medición de la respuesta conductual y análisis de datos en *métodos*).

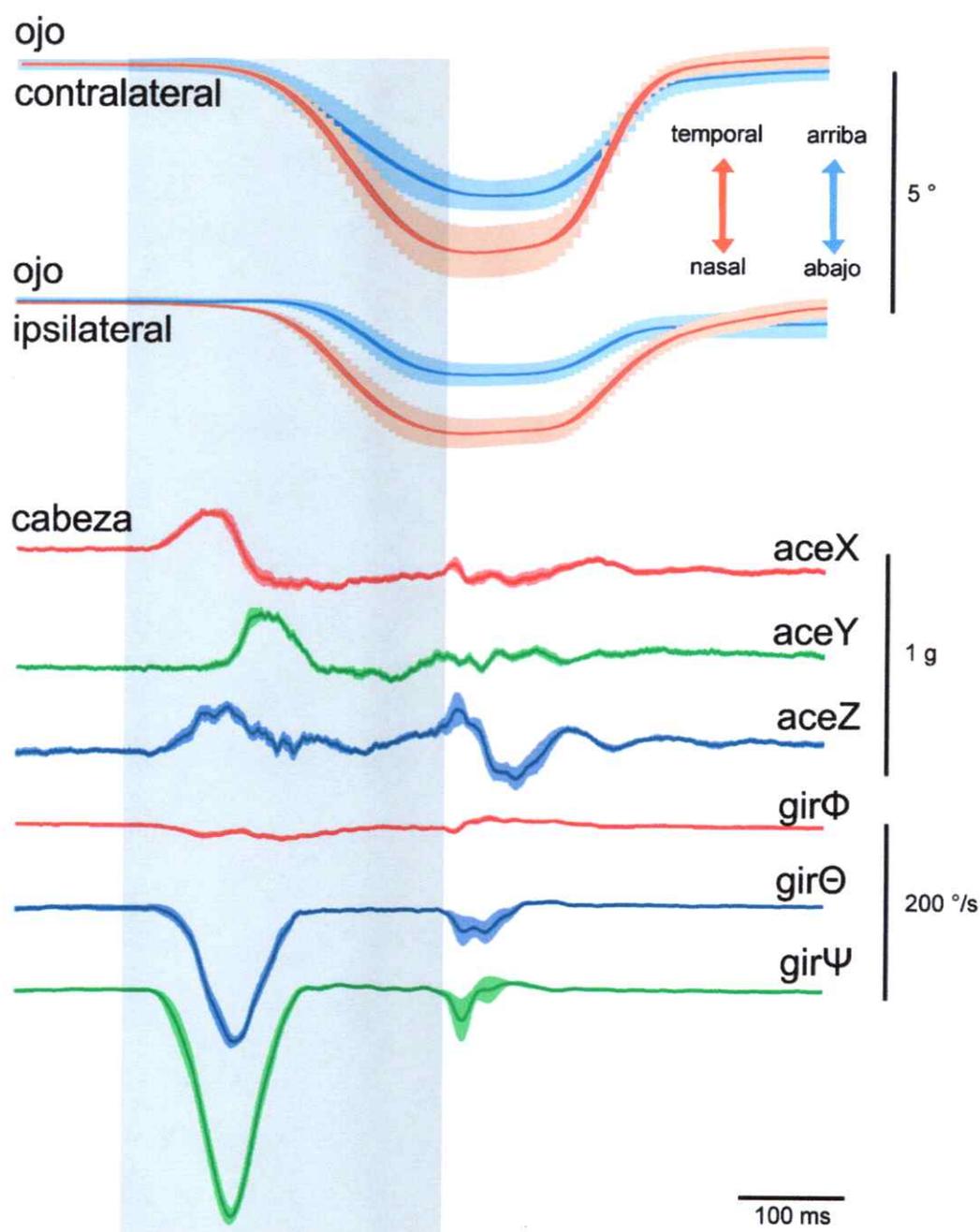


Figura 18. Movimientos oculares y de la cabeza evocados al microestimar eléctricamente el GLv de una paloma despierta con la cabeza libre de movimiento. Se muestran las señales acelerométricas y giroscópicas que describen el complejo movimiento de la cabeza. La integración de estas señales para calcular la posición y la orientación de la cabeza se realiza en los análisis posteriores y se detalla en los métodos. La simbología y los colores de las señales oculométricas son las mismas que en la Figura 14 y 15. Todas las trazas corresponden al promedio de 10 repeticiones y la banda en torno al promedio de color más claro representa el error estándar. Las bandas verticales grises corresponden a la duración del estímulo y los parámetros del estímulo son los mismos que en la Figura 15.

Tabla 1. Descripción de las propiedades de los movimientos de los ojos y de la cabeza evocados eléctricamente en el GLv.

		paloma 1A	paloma 1B	paloma 2	paloma 3A	paloma 3B	paloma 4
ojo ipsilateral	componente horizontal (°)	5	2	4	3	3	6
	componente vertical (°)	6	2	0	1	2	1
	umbral (μ A)	150	120	200	250	150	200
	latencia (ms)	85	103	88	112	120	97
	dirección	nasal- inferior	nasal- superior	inferior	temporal- dorsal	nasal- inferior	nasal- inferior
ojo contralateral	componente horizontal (°)	2	2	5	3	4	4
	componente vertical (°)	5	3	3	2	3	5
	umbral (μ A)	200	120	150	200	180	200
	latencia (ms)	92	100	90	108	137	126
	dirección	temporal- inferior	temporal- inferior	temporal- superior	nasal-dorsal	nasal-inferior	temporal- dorsal
tipo de movimiento ocular		no conjugado	no conjugado	no conjugado	no conjugado	convergencia	no conjugado
cabeza	amplitud (°)	-	-	> 30	> 30	> 8	> 30
	umbral (μ A)	-	-	40	50	30	40
	latencia (ms)	-	-	61	65	32	53
	dirección	-	-	contralateral	contralateral- inferior	contralateral- inferior	Contralateral- inferior

En la Figura 19 se muestra la trayectoria del movimiento de la cabeza evocado en 6 sitios distintos del GLv (ver Figura 7, *métodos*). Se observa que la dirección, la amplitud (Figura 19, izquierda), la latencia, la velocidad máxima y la duración del movimiento (Figura 19, derecha) se asocian con el sitio de estimulación. Se puede ver también, que el perfil del curso temporal de la velocidad angular es simétrico. Para el resto de los casos estudiados, el grado de estereotipia del movimiento evocado y la simetría de los perfiles temporales

de la velocidad angular no mostraron diferencias evidentes respecto de lo que se muestra en la Figura 19.

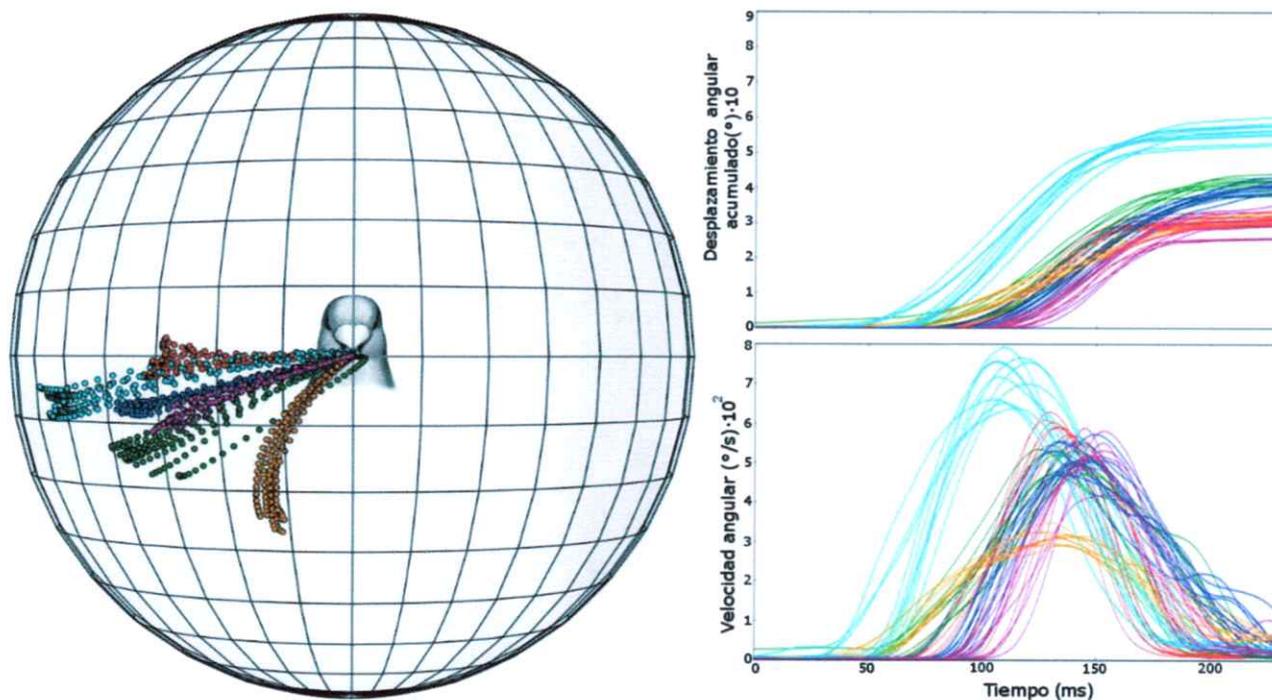
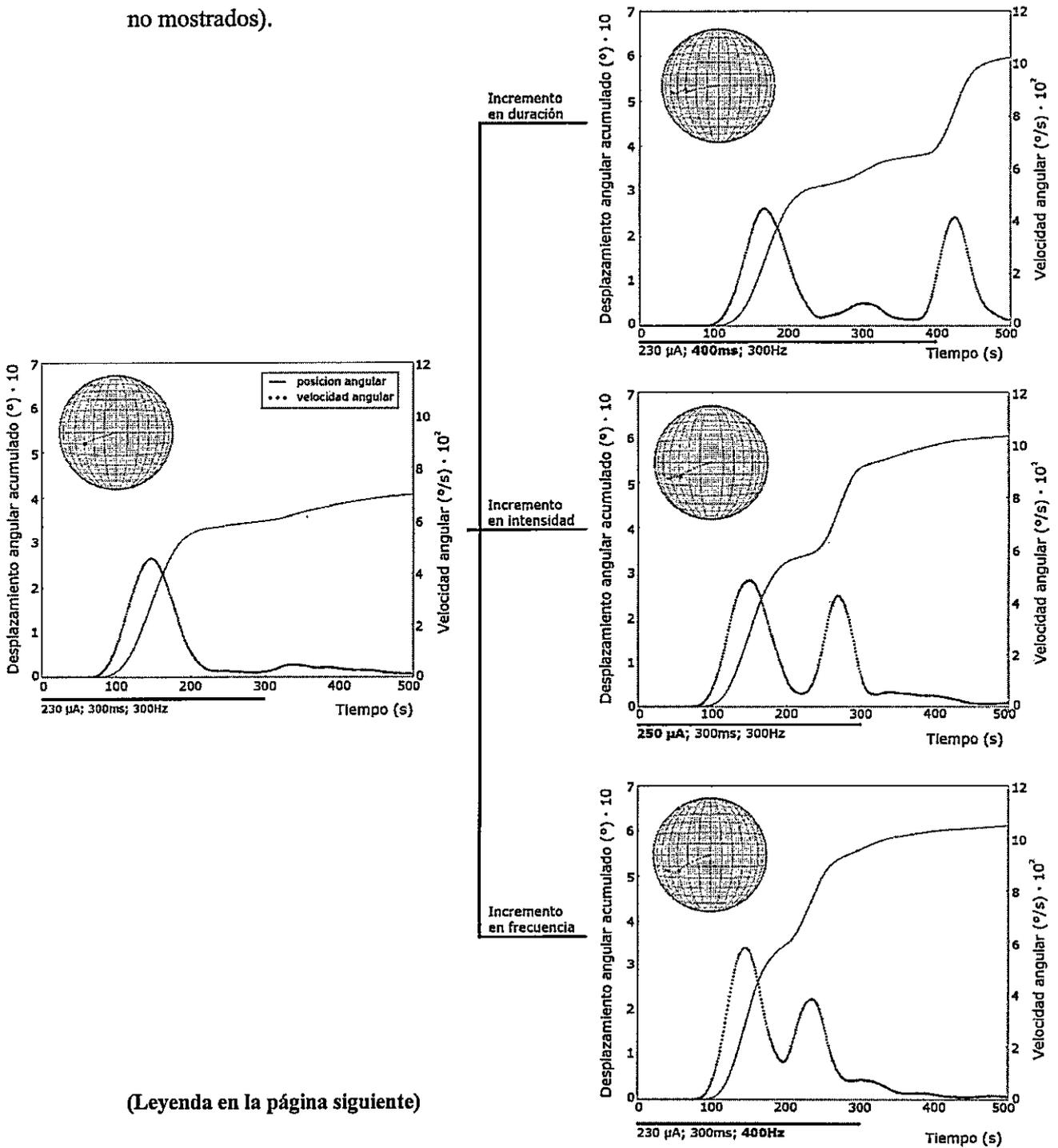


Figura 19. Curso temporal del movimiento de la cabeza producto de la microestimulación en distintos *loci* del GLv. Izquierda: La orientación instantánea de la cabeza se expresa como la proyección del pico del animal en una esfera de 30 cm de radio (ver Figura 7, *métodos*). Cada punto graficado en la esfera corresponde a la proyección del pico del animal en un instante (tasa de muestreo: 1 kHz) durante la trayectoria del movimiento de la cabeza. Se muestran 10 eventos de estimulación para 6 sitios distintos en el GLv. Cada sitio se presenta con un color distinto. Las líneas horizontales representan paralelos y están separados por 10° de latitud. Las líneas que van de un polo a otro son meridianos y están separadas por 10° de longitud. En todos los casos la orientación inicial de la cabeza es la misma y el pico del animal apunta al ecuador y al meridiano central. Derecha superior e inferior: Desplazamiento angular instantáneo y velocidad angular instantánea. El código de colores es el mismo utilizado en la izquierda. En todos los casos se aplicó un tren de pulsos bifásicos cátodo-primero ($150 \mu\text{A}$, 300 Hz, 300 μs pulso, 300 ms tren) y el tiempo 0 corresponde al inicio del estímulo.

Cuando la duración del estímulo se prolongó sobre un determinado umbral, se gatilló un segundo evento discreto de movimiento de la cabeza (Figura 20, izquierda arriba), el cual se ejecutó hacia la misma dirección que el primer evento. El mismo efecto se observó al incrementar la intensidad o la frecuencia del estímulo por sobre un cierto umbral que

dependió del sitio de estimulación (Figura 20, izquierda al medio y abajo). En algunos casos se observó un tercer y hasta un cuarto evento gatillado por un solo estímulo (datos no mostrados).



(Leyenda en la página siguiente)

Figura 20. El aumento de los parámetros del estímulo por sobre un umbral generan más de un evento discreto de movimiento de la cabeza. Derecha: El eje vertical izquierdo corresponde al desplazamiento angular acumulado (traza continua) y el eje de la izquierda a la velocidad angular (traza punteada). La barra horizontal indica la duración del estímulo. En la parte superior izquierda del recuadro se muestra la trayectoria de la proyección del pico en el campímetro (ver Figura 7, métodos). Los recuadros de la izquierda se presentan con la misma simbología utilizada en la derecha. Arriba, al medio y abajo: se muestra que un aumento en la duración, la intensidad o en la frecuencia del estímulo, respectivamente, pueden gatillar un segundo movimiento discreto de la cabeza.

A continuación se estudió el efecto en la cinemática del primer evento de movimiento de la cabeza al variar la intensidad, la frecuencia y la duración del estímulo eléctrico (ver Medición de la respuesta conductual, métodos). Cuando hubo más de un movimiento de la cabeza solo se consideró el primer evento. Para esto, se estimuló un sitio en el GLv y se cambió un parámetro del estímulo, dejando los otros fijos. Los parámetros del movimiento que se estudiaron fueron la dirección, la duración, la latencia, la velocidad máxima y la amplitud (ver Análisis de datos, métodos). Los valores que se muestran corresponden al promedio de los parámetros cinemáticos medidos en 12 sitios distintos del GLv en 8 animales.

Dirección y duración: La dirección y la duración del movimiento de la cabeza no cambian significativamente con los parámetros del estímulo (la pendiente no difiere significativamente de cero; $P > 0,05$; prueba F de Fisher; Figura 21 J-O). La dirección y la duración del movimiento evocado son diferentes en cada uno de los sitios estimulados del GLv ($P < 0,0001$; prueba F de Fisher).

Latencia: La latencia del movimiento decreció exponencialmente con la amplitud y con la frecuencia del estímulo hasta llegar a un valor que no cambió con el aumento de los parámetros del estímulo (ajuste exponencial [$R^2_{ponderado} > 0,98$] versus regresión lineal [$P < 0,05$; prueba F de Fisher]; Figura 21, B y C). En los casos 1113_1 y 1013_1 la

latencia se ajustó mejor a una exponencial que a una recta cuando se restringió el valor de la meseta al valor de la respuesta evocada por el valor máximo del parámetro del estímulo dentro del rango estudiado (Figura 21 B,C). La duración del estímulo no tuvo ningún efecto en el valor de la latencia de los movimientos (la pendiente no difiere de cero; $P > 0,05$; prueba F de Fisher; Figura 21 A). Las latencias de los movimientos evocados y las mesetas los ajustes exponenciales correspondientes a cada sitio son diferentes para cada uno de los sitios del GLv ($P < 0,0001$; prueba F de Fisher).

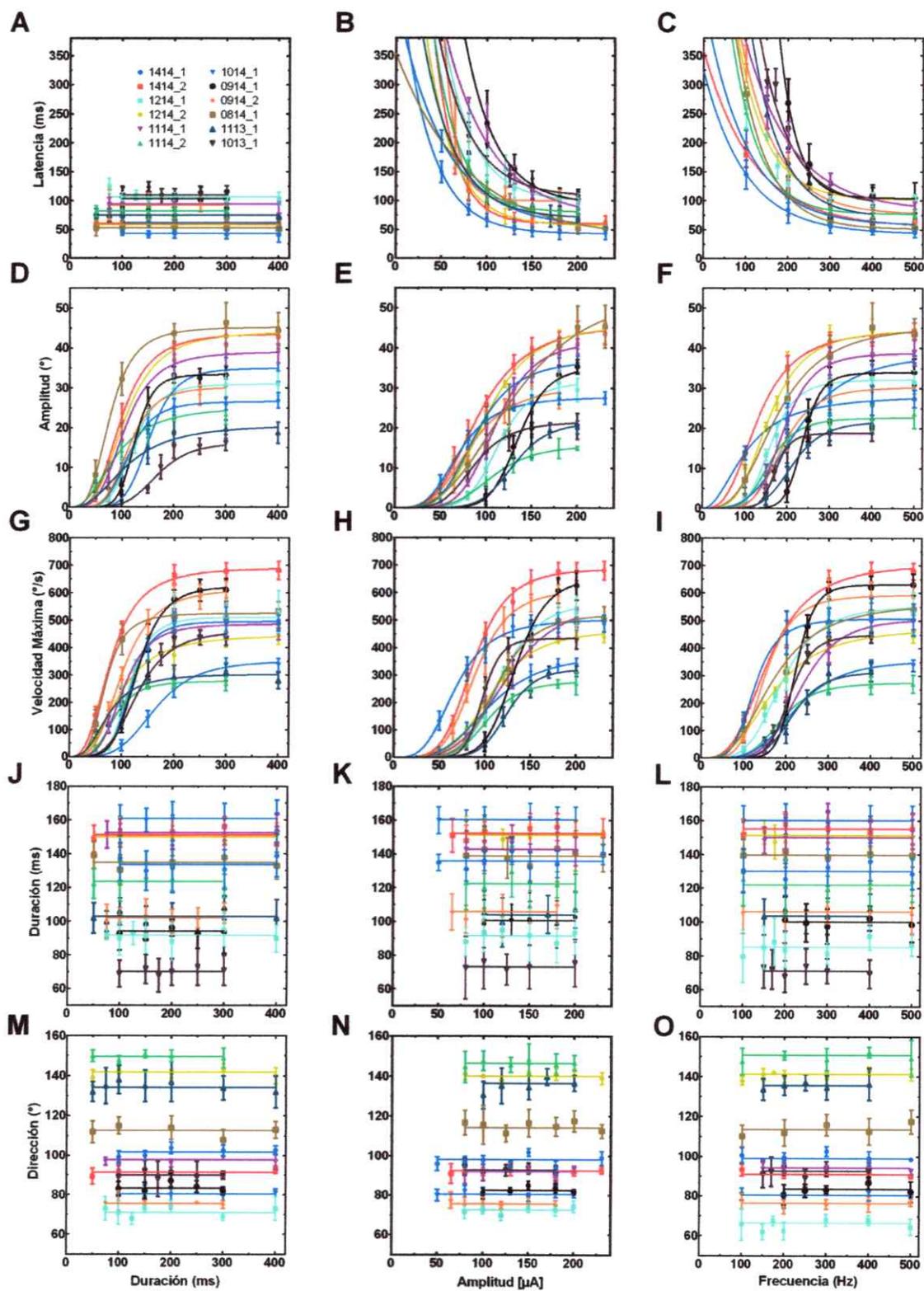
Amplitud y velocidad: La velocidad máxima y la amplitud del movimiento creció con los parámetros del estímulo hasta llegar a una meseta (ajuste sigmoideal [$R^2_{ponderado} > 0,98$] versus regresión lineal [$P < 0,05$; prueba F de Fisher; Figura 21, D-I]). En los casos 0914_1, 1013_1 y 1113_1 la respuesta se ajustó mejor a una sigmoide que a una recta cuando se restringió el valor de la meseta al valor de la respuesta evocada por el valor máximo del parámetro del estímulo dentro del rango estudiado (Figura 21 D, E, I). Las mesetas de las amplitudes y velocidades máximas fueron diferentes para cada uno de los sitios del GLv ($P < 0,0001$; prueba F de Fisher).

De esta manera, al estimular un sitio del GLv el movimiento evocado de la cabeza posee una latencia, una duración y una dirección característica y con estímulos saturantes se obtienen también una velocidad máxima y una amplitud característica del sitio. Cuando la posición inicial de la cabeza es constante, estos parámetros cinemáticos característicos de cada sitio definen una dirección y una posición final de la cabeza una vez que el movimiento ha cesado, lo cual se puede describir con un vector que llamaremos el vector motor característico (VMC) del sitio.

Evaluamos la relación entre la dirección y la amplitud del VMC de 25 sitios del GLv en 15 animales con la dirección y la amplitud del CR correspondiente.

Dirección: Encontramos que la dirección del VMC se correlaciona linealmente con la dirección del CR del sitio estimulado (Figura 22 B; $r = 0,89$; $P < 0,0001$; prueba de correlación de Pearson). Separamos los sitios de estimulación en dos grupos, uno con CRs más excéntricos (hasta 60° de excentricidad respecto de la proyección del pico en posición estándar, ver *métodos*) y el otro con CRs frontales más cercanos a la zona del campo visual que proyecta el área roja (región temporo-dorsal de la retinas de las palomas con una alta concentración de fotorreceptores, Figura 22 A; hasta 60° de excentricidad). La correlación de la dirección del VMC y los CRs fue significativa en ambos grupos (CRs frontales $r = 0,97$; $P < 0,0001$; prueba de correlación de Pearson. CRs excéntricos $r = 0,84$; $P < 0,0001$; prueba de correlación de Pearson). Las pendientes de ambas regresiones fueron significativamente distinta ($P < 0,01$; prueba F de Fisher; observe las respectivas bandas del 95% de confianza en la Figura 22 B). Para los CRs excéntricos la pendiente fue significativamente menor que 1 ($0,56 \pm 0,21[CI_{95}]$; $P < 0,001$; prueba F de Fisher) y para los CRs excéntricos la pendiente no fue significativamente distinta de 1 ($1,025 \pm 0,20[CI_{95}]$; $P > 0,05$; prueba F de Fisher) para los CRs frontales.

Parámetros de la Respuesta de Movimiento



(Leyenda en la página siguiente)

Figura 21. Efecto de los parámetros de la microestimulación eléctrica (duración, amplitud y frecuencia) sobre los parámetros cinemáticos de la respuesta de movimiento de la cabeza (latencia, amplitud, velocidad máxima, duración y dirección) en 12 sitios del GLv (8 animales). Los puntos corresponden al promedio de 10 repeticiones y las barras de error indican la desviación estándar para cada promedio. Para cada grupo de datos se presenta en línea continua la regresión lineal (A, J-O), una función de ajuste exponencial (B, C) y una función de ajuste sigmoïdal (D-I). Para mayor detalle de los ajustes, ver análisis de estadísticos en los métodos. Los códigos de colores mostrados en A corresponden al código de cada animal seguido de “_” y el número del sitio de estimulación. Para toda la Figura los códigos son los mismos que en A.

Amplitud: La amplitud del VMC se correlaciona linealmente con la excentricidad del CR del sitio estimulado (Figura 22 C; $r = 0,62$; $P < 0,001$; prueba de correlación de Pearson). Sin embargo, la correlación de la amplitud del VMC y los CRs fue significativa y mayor en ambos grupos por separado (CRs frontales $r = 0,79$; $P < 0,001$; prueba de correlación de Pearson. CRs excéntricos $r = 0,91$; $P < 0,001$; prueba de correlación de Pearson). Las pendientes de ambas regresiones no fueron significativamente distinta ($P > 0,05$; prueba F de Fisher) pero si los interceptos ($P < 0,0001$; prueba F de Fisher).

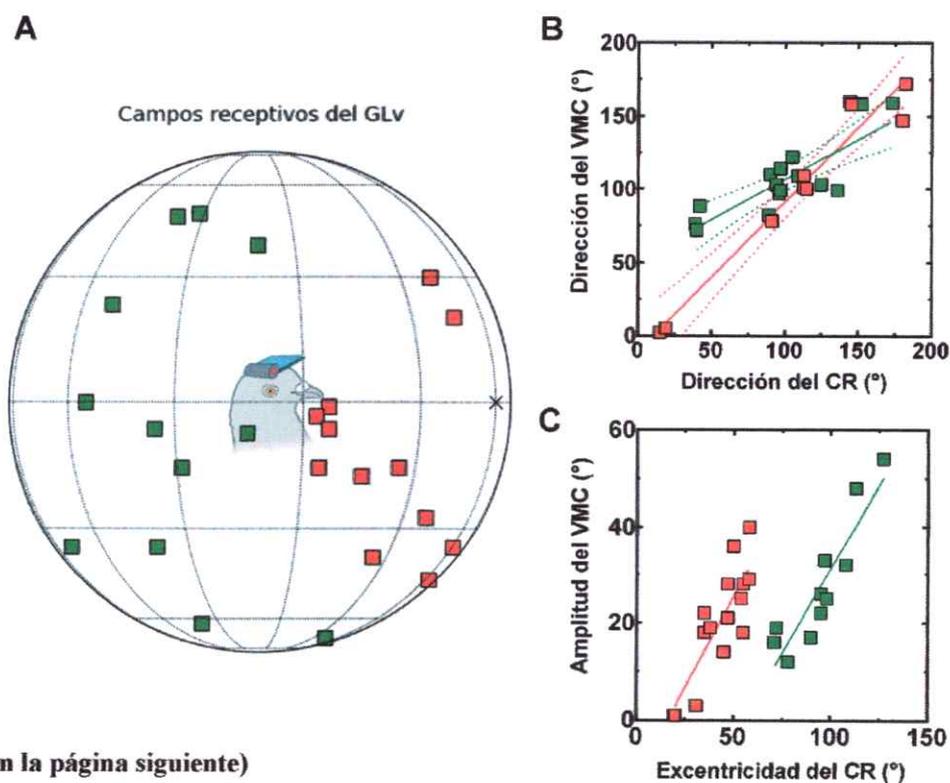
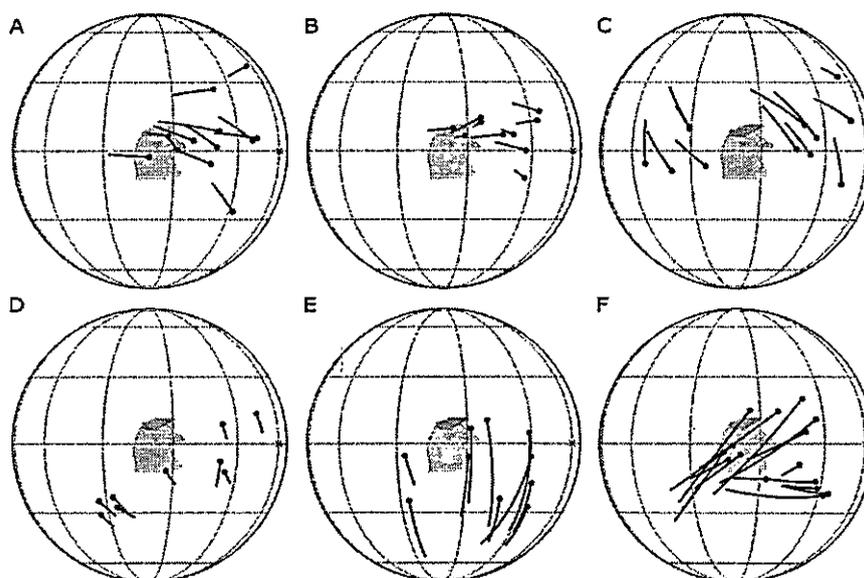


Figura 22. Relación entre la ubicación de los campos receptivos de distintos loci del GLv y el vector motor característico del locus correspondiente. A: Se muestra la ubicación de los campos receptivos evaluados. El sistema de coordenadas y la posición de la paloma son iguales a las Figuras 5 y 13. En rojo los CRs cercanos al área del campo visual donde proyecta el área roja (fóvea temporal) y en verde los CRs más excéntricos. B: Dirección de los CRs y de los VMCs. C: Excentricidad de los CRs y amplitud de los VMCs. Todas las dimensiones expresadas en A y en B de los CRs y de los VMCs han sido calculadas de la misma manera que en las Figuras 13 y 20 respectivamente. Las líneas roja y verde corresponden a las regresiones lineales calculadas tomando en cuenta los sitios rojos y verdes respectivamente. Las líneas punteadas rojas y verdes en A indican los límites superior e inferior de las respectivas bandas de confianza del 95%.

Para ver si el movimiento evocado eléctricamente de la cabeza depende de la posición inicial de la misma, se midió la posición final de la cabeza al estimular el GLv con el pico del animal apuntando hacia distintas posiciones iniciales. El estímulo utilizado fue aquel que consiguió generar el VMC del sitio estudiado cuando el animal está en la posición inicial estándar (el pico apuntando hacia la cruz en las Figuras 5, 13 y 22). Encontramos que tanto la dirección como la amplitud del movimiento no se ven afectadas por la posición inicial de la cabeza (Figura 23). Considerando que el campo visual del animal se mueve solidariamente con la cabeza, podemos decir que los movimientos generados al estimular el GLv son dirigidos hacia un punto en el espacio visualmente referenciado.



(Leyenda en la página siguiente)

Figura 23. Efecto de la posición inicial de la cabeza sobre el VMC de 6 sitios del GLv en 4 animales (A-F). El sistema de coordenadas y la posición del cuerpo de la paloma es la misma que en las Figuras 5, 13 y 22. Las líneas negras representan un vector que describe las trayectorias individuales de los movimientos de la cabeza evocados eléctricamente. Los puntos indican la proyección del pico del animal durante la posición inicial de la cabeza.

Efecto de la ablación del TeO

Si consideramos las aferencias tectales que llegan a la lámina externa del GLv, podríamos pensar que la respuesta conductual observada al estimular el GLv se debe a la activación de los centros generadores de patrones motores mediante la activación retrógrada de las aferencias tectales. Evaluamos el efecto de la ablación de TeO sobre los cambios de orientación de la mirada evocados por la microestimulación eléctrica en el GLv ipsilateral (ver ablación del tectum óptico, *métodos*). No encontramos ninguna diferencia en cuanto a la dirección y a la latencia de los movimientos oculares gatillados en la condición de cabeza restringida (2 sitios en un animal) y de cabeza libre (4 sitios en 3 animales). Tampoco encontramos ninguna diferencia cualitativa en la relación de dependencia de los parámetros del estímulo sobre los parámetros cinemáticos del movimiento de la cabeza (4 sitios en 2 animales). Luego estudiamos cuantitativamente el efecto en la cinemática del movimiento de la cabeza al variar los parámetros del estímulo eléctrico en 2 sitios del GLv de un animal con y sin el tectum óptico ipsilateral al GLv estimulado (Figura 24).

Dirección y duración: Al igual que en la condición con TeO, al extirpar el lóbulo tectal la duración y la dirección del movimiento no se vieron afectadas por los parámetros del estímulo (la pendiente no difiere significativamente de cero; $P > 0,05$; prueba F de Fisher). Ninguna de las curvas estímulo-respuesta mencionadas fue significativamente distinta al evaluarlas en la condición con y sin TeO (Figura 24 J-O; $P > 0,05$; ANOVA de dos vías).

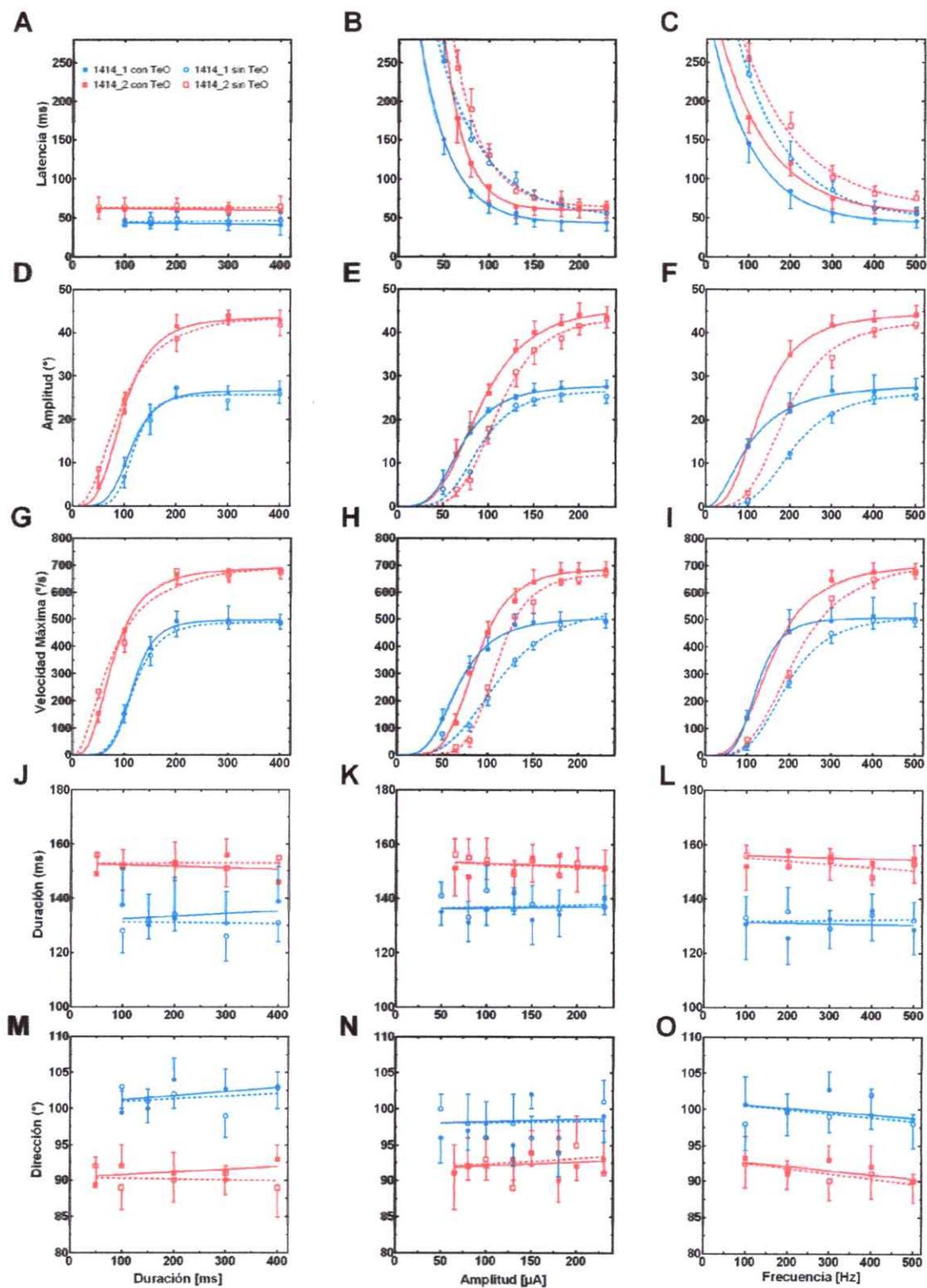


Latencia: La latencia de la respuesta en función de la duración del estímulo no fue significativamente distinta en la condición sin TeO con respecto a la condición con TeO (Figura 24 A; $P > 0,05$; ANOVA de dos vías). La latencia del movimiento en función de la amplitud y la frecuencia del estímulo (Figura 24 B, C) se ajustaron significativamente a una función exponencial mejor que a una regresión lineal ($P < 0,05$; prueba F de Fisher). En ambos sitios implantados, el efecto de la extirpación tectal sobre las curvas estímulo-respuesta fue significativo ($P < 0,0001$; ANOVA de dos vías). Sin embargo, en ninguno de estos casos se afectó significativamente el valor de la meseta del ajuste exponencial ($P > 0,05$; prueba F de Fisher).

Amplitud y velocidad: La amplitud y la velocidad del movimiento en función de la duración del estímulo (Figura 24 D, G) se ajustaron significativamente a una función sigmoideal ($R^2_{ponderado} > 0,96$) mejor que a una regresión lineal ($P < 0,05$). En ambos implantes, el efecto de la extirpación tectal sobre las curvas estímulo-respuesta no fue significativo ($P > 0,05$; ANOVA de dos vías). La amplitud y la velocidad del movimiento en función de la amplitud y la frecuencia del estímulo (Figura 24 E, F, H, I) se ajustaron significativamente a una función sigmoideal ($R^2_{ponderado} > 0,97$) mejor que a una regresión lineal ($P < 0,05$; prueba F de Fisher). En ambos implantes, el efecto de la extirpación tectal sobre las curvas estímulo-respuesta fue significativo ($P < 0,0001$; ANOVA de dos vías). Sin embargo, en ninguno de estos casos se afectó significativamente el valor de la meseta del ajuste sigmoideo ($P > 0,05$; prueba F de Fisher).

En resumen, se encontró que al extirpar el tectum óptico ipsilateral al GLv estimulado en los dos sitios evaluados (en un animal) no se produjo ningún cambio significativo en el valor de los parámetros cinemáticos característicos del sitio de estimulación. Estos resultados demuestran que existe al menos una vía que no incluye al TeO ipsilateral por medio de la cual la estimulación eléctrica en el GLv inicia movimientos de orientación visual. Sin embargo, con la ablación tectal se vio afectada la rapidez con la cual se alcanzan algunos de los valores característicos de los sitios de estimulación (Figura 24 B, C, E, F, H, I). Esto último sugiere que el TeO podría tener un efecto potenciador sobre la acción del GLv ipsilateral sobre los centros motores implicados en la generación de los movimientos de orientación visual, puesto que la ablación del TeO ipsilateral exige mayor cantidad de corriente y frecuencia para alcanzar las respuestas características del sitio de estimulación en el GLv.

Parámetros de la Respuesta de Movimiento



Parámetros de la Microestimulación

(Leyenda en la página siguiente)

Figura 24. Efecto de los parámetros de la microestimulación eléctrica (duración, amplitud y frecuencia) sobre los parámetros cinemáticos de la respuesta de movimiento de la cabeza (latencia, amplitud, velocidad máxima, duración y dirección) en 2 sitios del GLv de una paloma con y sin el tectum óptico ipsilateral al GLv implantado. La simbología, los ajustes y los datos de los sitios implantados 1414_2 y 1414_1 con el TeO son los mismos presentados en la Figura 21. Los símbolos abiertos y las líneas discontinuas corresponden a los promedios y a los ajustes respectivamente de las respuestas medidas después de la ablación tectal.

Movimientos espontáneos de la cabeza en animales despiertos

Preparamos animales con implantes crónicos de electrodos ($n = 8$ sitios en 6 animales) y estudiamos la relación entre la actividad multiunitaria en la lámina interna del GLv y los movimientos espontáneos de la cabeza del animal (ver Figura 10, *métodos*). Al alinear el curso temporal de la tasa de disparo con el inicio del movimiento en presencia de luz, encontramos que en 5 de los 8 sitios estudiados inmediatamente después del inicio del movimiento hubo una disminución en la frecuencia de descarga y luego un aumento. En 3 de los sitios encontramos un aumento en la frecuencia de descarga después del inicio del movimiento. En la Figura 25 se muestran 2 sitios de registro pertenecientes al mismo animal. En el sitio 1 (Figura 25 A) hubo una disminución y luego un aumento de la frecuencia de descarga y en el sitio 2 (Figura 25 B) solo un aumento. Al realizar este mismo experimento en oscuridad, observamos en los 8 sitios de registro que los cambios en la frecuencia de descarga asociados a movimientos de la cabeza persistieron pero con distinta intensidad, mostrándonos que también en oscuridad los cambios en la frecuencia de disparo registrados en la lámina interna se asocian al inicio de los movimientos de la cabeza.

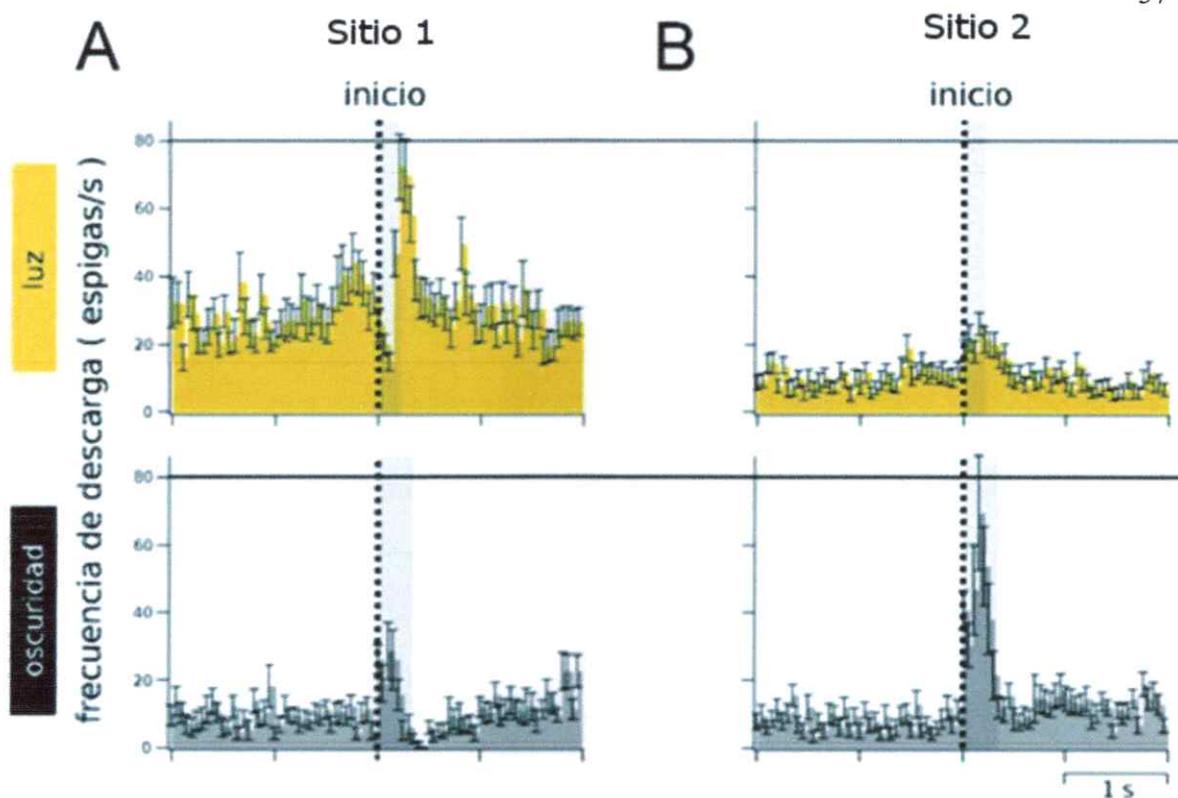


Figura 25. Frecuencia de descarga registrada en la lámina interna del GLv asociada a movimientos de la cabeza en presencia de luz y en oscuridad. En A y en B se muestran 2 sitios de registro distintos en el mismo animal. Se construyeron histogramas de la frecuencia de disparo durante los 2 segundos previos y los 2 segundos posteriores a los eventos de movimiento de la cabeza. La ventana temporal de cada punto tiene una duración de 50 ms. Los histogramas se alinearon con el inicio del movimiento. Las barras de error representan el error estándar. La línea punteada representa el inicio del movimiento. Las barras verticales de color gris claro indican la duración promedio de los eventos. Para la condición fotópica se promediaron 39 eventos de movimiento y para la condición en oscuridad 23.

DISCUSIÓN

La microestimulación eléctrica en la lámina interna del GLv de la paloma genera movimientos sacádicos estereotipados de los ojos y de la cabeza. Los parámetros cinemáticos de los movimientos de la cabeza son característicos del sitio de estimulación y estos movimientos dirigen el pico del animal hacia el CR del sitio estimulado. La posición inicial de la cabeza no pareció afectar la amplitud ni la dirección de los movimientos evocados, indicando que la cabeza se mueve tomando como referencia las coordenadas retinianas del espacio visual. Para producir movimientos sacádicos de la cabeza los centros motores deben generar comandos en una secuencia temporal adecuada a un grupo relevante de motoneuronas. Estos comandos deben tomar en cuenta la viscosidad, elasticidad y la fuerza inercial que restringe los movimientos de la cabeza y la arquitectura y las propiedades fisiológicas de los músculos del cuello. Dada la complejidad de estos requerimientos, es notable que un mismo tren de pulsos de corriente entregados en el GLv genere movimientos de la cabeza, rápidos y precisos. A continuación discutiremos los resultados de esta tesis comenzando por la caracterización fisiología del GLv. Luego comentaremos la técnica de la microestimulación eléctrica y el uso de ésta en el estudio de los movimientos de orientación visual. Discutiremos nuestros resultados de microestimulación eléctrica en el cerebro de la paloma y en particular en la lámina interna del GLv. Analizaremos el efecto de la ablación del TeO sobre la respuesta

motora evocada al estimular el GLv. Comentaremos los resultados del registro de la actividad multiunitaria en la lámina interna del GLv asociado a movimientos espontáneos de la cabeza de la paloma. Finalmente, pondremos en contexto las respuestas conductuales gatilladas al microestimular eléctricamente el GLv con estudios previos que describen conductas de orientación visual en la paloma.

Caracterización fisiológica del GLv

La disposición espacial de la fuente y del sumidero de corrientes evocadas por estímulos de luz que encontramos en el GLv apunta a la presencia de una activación sináptica en la lámina externa. El sumidero de corriente que se observa podría corresponder a las dendritas postsinápticas de las células de la lámina interna, las cuales podrían estar dando cuenta de la fuente de corriente que se observa entre 250 y 300 μm por sobre el sumidero (Figuras 11 y 12). La correspondencia entre la fuente de corriente y la lesión electrolítica en la lámina interna nos permitió ubicar los electrodos en la lámina interna o en la lámina externa durante los experimentos *in vivo*.

En el GLv de las aves se han descrito mediante registros extracelulares distintas propiedades visuales. Maturana y Varela (1982) mostraron que en el GLv de la codorniz hay respuestas cromáticas con campos receptivos acotados, ubicados preferentemente en la parte anterior del campo visual y aparentemente organizados de manera retinotópica en concordancia con los resultados anatómicos descritos en el pollo (Crossland y Uchwat, 1979). Pateromichelakis (1979) mostró que en el GLv del pollo hay al menos 5 tipos distintos de unidades que responden a estímulos de movimiento u ON/OFF y que

aparentemente las unidades con campos receptivos más pequeños responden a estímulos ubicados en la porción nasal del campo visual.

En este trabajo estudiamos las propiedades fisiológicas de las respuestas visuales registradas extracelularmente en la lámina interna del GLv de la paloma. Encontramos que los CRs de estas unidades son acotados y que los CRs frontales en el campo visual, y que proyectan al área roja de la retina, son menores en tamaño que los CRs más excéntricos (Figura 13). Estos resultados en la paloma coinciden con lo descrito por Pateromichelakis. En el pollo, la región del GLv que recibe proyecciones correspondientes al área roja posee un factor de magnificación mayor que las regiones del GLv que poseen campos receptivos más excéntricos (Crossland y Uchwat, 1979). En consecuencia el tamaño de los campos receptivos descritos en esta tesis y el factor de magnificación del espacio visual en el GLv descritos en el pollo apuntan a que la operación en la cual el GLv estaría involucrado se realiza con mayor precisión en la región frontal del animal, hacia donde apunta la fovea temporal o área roja de la paloma.

Experimentos de microestimulación eléctrica en el cerebro: limitaciones y usos

La anatomía del GLv descrita en la literatura, y comentada en la introducción de esta tesis, junto con nuestros resultados (Figura 3) indican que el GLv es una estructura con masivas aferencias visuales que proyecta a regiones con un fuerte compromiso premotor. Estas evidencias constituyen el sustrato estructural que sugiere el carácter sensomotor para el GLv. La caracterización de la fisiología sensorial realizada en la primera parte de esta tesis (Figuras 11, 12, 13) concuerda con el ordenamiento retinotópico evidenciado por la anatomía. Una manera de abordar la relación funcional del GLv con los centros

premotores es activar regiones del GLv y observar la respuesta del animal. Los experimentos de microestimulación eléctrica permiten sugerir una relación causal entre la activación de las estructuras cerebrales y las respuestas conductuales (Tehovnik et al. 2006). Sin embargo, los resultados deben ser interpretados con los cuidados pertinentes considerando las limitaciones de la técnica (Ranck, 1975; Tehovnik, 1996). A continuación revisaremos algunas de las limitaciones de esta técnica y algunas aplicaciones en el estudio de la función de estructuras cerebrales con especial atención a las regiones visuales.

Los dispositivos que se utilizan para microestimar eléctricamente activan a las neuronas de manera simultánea con una intensidad de corriente, duración del pulso, frecuencia y duración del tren de estímulos preconfigurada. Sin embargo las neuronas que disparan en conjunto con una respuesta conductual no disparan todas simultáneamente y tampoco generan andanadas de actividad a una tasa y duración uniforme. Por lo tanto no se puede asumir que la actividad neuronal que media una respuesta conductual y la estimulación eléctrica que gatilla esa respuesta son necesariamente equivalentes (Tehovnik, 1996). Por otro lado, la ubicación anatómica del sitio de estimulación debe ser compatible con la incertidumbre asociada a la dispersión de la corriente. Bajas intensidades de corriente pueden activar axones que se originan en el sitio de estimulación pero también axones de paso (Yeomans, 1990). La cinemática y la métrica de los movimientos evocados eléctricamente se pueden ver afectadas por el estado conductual de los animales (Masino y Knudsen, 1993; Tehovnik et al., 2003).

A pesar de estas limitaciones, la microestimulación eléctrica ha permitido elucidar la organización funcional de un gran número de estructuras sensoriales y motoras tales como

los mapas topográficos en diversas zonas de la corteza visual y motora del mono (Tehovnik et al. 2006). La microestimulación eléctrica ha sido ampliamente utilizada también para inferir cómo ciertas estructuras cerebrales median determinadas conductas. Estímulos de corriente entregados en áreas corticales del mono (e.g. corteza visual primaria, corteza extraextriada, corteza parietal y temporal, corteza motora y premotora, y corteza prefrontal incluyendo FEF) y subcorticales (e.g. tracto óptico, núcleo geniculado lateral y medial, pulvinar, núcleo rojo, colículo superior, gris periacueductal) pueden ser detectados por el macaco (para una lista completa revisar Doty, 1965). De hecho, los monos pueden ser entrenados para discriminar entre diferentes sitios de estimulación, diferentes tipos de estímulos como pulsos catódicos o anódicos, trenes de pulsos de alta o baja frecuencia. Sin embargo, el hecho de que los monos puedan detectar o discriminar entre distintos estímulos eléctricos nos dice poco de qué es lo que los monos están experimentando en esas condiciones (Tehovnik et al., 2003).

Se han observado movimientos de orientación visual (involuntarios o que no requieren de entrenamiento previo) evocados eléctricamente desde distintas estructuras visuales. Sin embargo, estos tipos de movimientos no pueden ser evocados desde todas las estructuras visuales. El umbral de intensidad de corriente necesaria para que un estímulo sea detectado es siempre inferior al umbral necesario para evocar respuestas motoras (Tehovnik y Slocum, 2013), sugiriendo que la generación de un percepto o de una respuesta motora evocada desde estructuras sensoriales no requieren necesariamente de la activación de los mismos elementos neuronales. Los movimientos sacádicos de los ojos pueden ser evocados desde regiones de la neocorteza que no se asocian con la producción de perceptos visuales (fosfenos) [e.g. área lateral intraparietal, campo ocular frontal (FEF) y

medial, corteza prefrontal, y otros (Tehovnik y Slocum, 2004)], por lo tanto el hecho de que en una estructura cerebral se puedan evocar eléctricamente movimientos oculares, no implica necesariamente que esos movimientos oculares ocurran como consecuencia de fosfenos evocados por la microestimulación eléctrica (Tehovnik et al., 2005). Por otro lado, en las regiones en las cuales se generan movimientos de orientación visual evocados eléctricamente, las estructuras corporales implicadas en los cambios de orientación son variadas (cabeza, ojos, torso o una combinación de estas estructuras) y el orden con el cual se suceden los movimientos también puede variar. E.g. en una pequeña región de la corteza frontal dorsomedial (SEF) la microestimulación eléctrica evoca movimientos de los ojos que siguen a los movimientos de la cabeza, mientras que en la corteza prefrontal (FEF) la microestimulación eléctrica genera movimientos de la cabeza que siguen a los movimientos de los ojos (Chen y Tehovnik, 2007). La estimulación en el CS resulta en conductas de orientación hacia el CR del sitio estimulado o en respuestas motoras aversivas, donde el animal se orienta alejando la mirada del CR del sitio de estimulación (Gandhi et al., 2011). Los movimientos evocados eléctricamente en las estructuras visuales pueden ser estereotipados o no serlo. Por ejemplo los movimientos de la cabeza evocados eléctricamente en FEF y en SEF del mono tienen amplitudes variables e impredecibles entre un evento de estimulación y otro (Tu y Keating, 2000; Martínez-Trujillo et al., 2003; Chen y Walton, 2005; Chen, 2006). En cambio los movimientos de la cabeza evocados al estimular eléctricamente el TeO de la lechuza son estereotipados y dirigen la línea de la vista hacia el CR del sitio estimulado (du Lac y Knudsen, 1990).

Experimentos de microestimulación eléctrica en el cerebro de la paloma

En esta tesis, el objetivo fue evaluar el rol de una estructura visual de la paloma (el GLv) en las conductas de orientación visual y aportar evidencias que permitan esclarecer, dentro del diverso repertorio de conductas de orientación, en cuál o cuáles de aquellas conductas el GLv podría estar implicado directamente.

Microestimulamos eléctricamente en un núcleo auditivo, en distintas estructuras visuales y en el tracto óptico de la paloma y medimos el cambio de la posición del ojo contralateral al sitio estimulado (Figura 14). Encontramos que la región en la cual se gatilló la respuesta de mayor amplitud fue el GLv. Esta respuesta fue de hasta 5° y se observó en los 3 casos estudiados. A medida que el electrodo se alejaba del GLv, la respuesta fue menor y menos consistente entre los casos. En DLL y en el núcleo Rt se observaron movimientos oculares en algunos de los casos y estos fueron de entre 1 y 2°. En una primera instancia el electrodo fue introducido hasta el TrO para registrar la actividad visual a lo largo del transecto. Luego se retrajo el electrodo estimulando en los distintos sitios. Existe la posibilidad de que las respuestas observadas en el DLL y en el Rt correspondan a un artefacto, ya que no podemos descartar que al estimular en las porciones dorsales del transecto, parte de la corriente inyectada se haya propagado a través de líquido cefaloraquídeo y que se hayan estimulado tejidos en las porciones ventrales del transecto. Sin embargo, en varios de los sitios estimulados no hubo una respuesta oculomotora detectable. Esto evidencia que no toda microestimulación eléctrica en las estructuras sensoriales de la paloma genera movimientos de los ojos. Luego evaluamos si los movimientos oculares evocados eléctricamente en el GLv de las palomas anestesiadas son de una amplitud equivalente en las palomas despiertas. Cuando estimulamos en el GLv en una paloma despierta con la



cabeza restringida de movimiento, observamos que se movieron estereotipadamente ambos ojos con una amplitud similar a la encontrada en las estimulaciones con la paloma anestesiada (comparar Figura 14, 15 y Tabla 1). Estos resultados sugieren fuertemente de una manera directa que el GLv posee un rol visuomotor.

Al estimular el GLv observamos que además de moverse los ojos, se activó la musculatura del cuello. Esto ocurrió incluso con estímulos bifásicos menores a los 30 μ A (subumbrales para el movimiento ocular, datos no mostrados). Al utilizar estímulos 4 veces superiores al umbral para las contracciones de la musculatura del cuello, observamos que la región de máxima respuesta motora estaba en el inicio del tracto de los axones de las células de proyección a los núcleos motores (TrGLv, a 100 μ m de los somas de la lámina interna, Figuras 16 y 17). Estas contracciones musculares del cuello observadas en los animales con la cabeza restringida sugieren que la estimulación eléctrica en el GLv podría tener un efecto sobre la posición de la cabeza. Las aves tienen grandes ojos, cabezas livianas, cuellos flexibles, y típicamente mueven sus ojos moviendo la cabeza. La mayoría de las aves realizan movimientos oculares con una amplitud limitada, en palomas hasta 17° (Bloch et al., 1984), pero la función principal de éstos movimientos es la de "afinar" los movimientos sacádicos de la cabeza (Wallman y Letelier, 1993). Tomando en cuenta nuestros resultados y la relevancia que tienen los movimientos de la cabeza en las aves, implantamos crónicamente electrodos en la lámina interna del GLv para estudiar en mayor detalle el efecto de la microestimulación eléctrica de esta estructura. Hasta la fecha no hay ningún estudio publicado que utilice implantes crónicos en el GLv de un vertebrado para estudiar el efecto de la activación de la neuronas de esta región mediante microestimulación eléctrica. Una de las razones es el difícil acceso a esta región

(aproximadamente 10 mm desde la superficie del telencéfalo de una paloma; ver Figura 14). Por otro lado, la escasa información fisiológica disponible sobre el GLv impide identificar durante la realización de experimentos agudos la posición del electrodo. Estas dificultades fueron sorteadas en este trabajo gracias a la caracterización fisiológica que realizamos para esta región (Figuras 11, 12, 13).

La estimulación del GLv en animales con la cabeza libre generó movimientos sacádicos de ambos ojos y de la cabeza. Los movimientos oculares evocados fueron estereotipados y la amplitud de estos movimientos nunca excedió 6° (Figura 18 y Tabla 1). Los movimientos oculares se iniciaron siempre posteriormente a los movimientos de la cabeza, sugiriendo que los ojos siguen a la cabeza. Los movimientos estereotipados de la cabeza y de los ojos fueron característicos del sitio de estimulación (Tabla 1). Los movimientos de la cabeza alcanzaron una extensión de hasta 54° con un solo evento y 120° en 4 eventos discretos gatillados por un solo estímulo eléctrico. Estos resultados sugieren que los cambios de orientación de la mirada evocados al estimular el GLv implican la activación de centros generadores de patrones involucrados en la coordinación motora de ambos ojos y de la cabeza. Como los movimientos de la cabeza contribuyen en mayor medida que los movimientos oculares a los cambios de la mirada evocados en el GLv decidimos analizar en mayor detalle los movimientos de la cabeza, los cuales incluyeron rotaciones y traslaciones (Figura 18; análisis de datos, *métodos*).

Al integrar las componentes traslacionales y rotacionales del movimiento de la cabeza, encontramos que los parámetros cinemáticos del movimiento (dirección, amplitud, latencia, velocidad máxima y duración) son estereotipados y dependen del sitio de estimulación (Figura 19). Cuando la duración, la amplitud o la frecuencia del estímulo

superan cierto umbral, un solo estímulo puede generar un segundo evento discreto de movimiento de la cabeza con un perfil temporal de la velocidad y la dirección similares a los del primer evento (Figura 20). En este trabajo nos centramos en caracterizar en detalle solamente en primer evento evocado por la microestimulación.

Observamos que la dirección y la duración del movimiento no dependen de los parámetros del estímulo eléctrico (duración, amplitud y frecuencia; Figura 21 M-O y J-L) y son características de cada sitio. La latencia del movimiento disminuye exponencialmente con la amplitud y la frecuencia del estímulo (Figura 21 B y C) hasta llegar a un valor que depende del sitio de estimulación. No se encontró un efecto de la duración del estímulo sobre la latencia del movimiento dentro de los rangos de amplitud de corriente y frecuencia evaluados (Figura 21 A). Sin embargo, en algunos casos observamos que con intensidades menores de corriente la latencia del movimiento es mayor al estimular con duraciones cortas (datos no mostrados). No podemos descartar que, utilizando estímulos con valores de intensidad y frecuencia más bajos que los que utilizamos en este estudio, la duración del estímulo tenga un efecto sobre la latencia del movimiento. La velocidad máxima y la amplitud del movimiento de la cabeza aumentan con los parámetros del estímulo hasta un valor fijo que define una velocidad máxima y una amplitud características del sitio de estimulación (21 D-I). La dirección y la amplitud del movimiento características de un sitio en el GLv pueden ser descritas por un vector, al cual llamamos el vector motor característico (VMC) de dicho sitio cuando la posición inicial de la cabeza es estándar.

Evaluamos la correlación entre la dirección y la amplitud del VMC y la dirección y la amplitud del campo receptivo del respectivo sitio de estimulación. Encontramos que tanto

la dirección como la amplitud están correlacionadas (Figura 22). De modo que al estimular la lámina interna del GLv se gatillan movimientos de orientación visual (ambos ojos y la cabeza) que dirigen la región frontal del campo visual hacia el campo receptivo del sitio estimulado. Sin embargo, al estimular en los sitios frontales, la correlación entre la dirección del VMC y CR es mayor que al estimular los sitios más excéntricos (Figura 22 B). Considerando que la región frontal del campo visual está mayormente representada en el GLv, es probable que esta diferencia en la precisión con la que la paloma apunta hacia el campo receptivo del sitio estimulado pueda deberse al área del GLv estimulada. Por lo tanto, las estimulaciones en sitios del GLv con CRs periférico podrían estar teniendo efecto sobre una región del GLv aferentada por una porción de la retina mayor que las porciones de la retina que aferentan a los sitios de estimulación en el GLv con CRs frontales. Si los axones que aferentan las distintas regiones del GLv abarcan una extensión similar, el efecto que podrían tener sobre la activación motora podría ser parecido a lo observado al activar los distintos loci del GLv utilizando microelectrodos. Además, la correlación entre la amplitud del VMC y la excentricidad del CR aumenta considerablemente cuando separamos los sitios en dos grupos (Figura 22 C). Tomando en cuenta la dirección y la amplitud de los movimiento de la cabeza, la precisión con la cual la paloma apunta al CR del sitio estimulado es considerablemente mayor al estimular los sitios del GLv con CR frontales respecto de los sitios con CR excéntricos. Encontramos que la posición inicial de la cabeza no afecta la dirección ni la amplitud de los movimientos (Figura 23). Este resultado indica que los movimientos están referenciados al campo visual en vez de seguir referencias somáticas o vestibulares.

Efecto de la ablación tectal

Considerando las aferencias tectales del GLv, nos preguntamos si acaso el efecto observado al microestimular el GLv se lleva a cabo producto de la activación retrógrada del TeO. Al extripar el Teo ipsilateral al GLv estimulado observamos que las propiedades cinemáticas de los movimientos evocados características del sitio de estimulación se mantuvieron inalteradas (Figura 24). Esto nos demuestra que el GLv ejerce un control sobre los generadores de movimientos de orientación visual independientemente del TeO ipsilateral. Considerando que el GLv no proyecta al telencéfalo, es probable que el control sobre los generadores de patrones motores sea directo.

Actividad multiunitaria asociada a movimientos espontáneos de la cabeza

Al registrar la actividad multiunitaria en el GLv, encontramos que la frecuencia de descarga cambia asociada a movimientos de la cabeza (Figura 25). Un cambio de actividad que ocurre después del movimiento de la cabeza podría ocurrir debido a un cambio en la escena visual. Sin embargo, los cambios en la tasa de disparo asociados a los movimientos de la cabeza persisten en oscuridad. No podemos saber si la actividad registrada en la condición con luz corresponde a las mismas unidades registradas en la condición en oscuridad. De todas maneras, este resultado demuestra que en el GLv hay una actividad neuronal asociada a los movimientos de la cabeza que no es puramente visual y amerita ser estudiada. Esta actividad neuronal podría subyacer a un "control *ongoing*" ejercido por el GLv o a una copia eferente proveniente de otro lugar o de sitios heterotópicos del mismo GLv. A futuro sería interesante realizar este análisis separando los movimientos en base a la dirección que van dirigidos. De esa manera sería posible determinar la actividad

neuronal asociada a movimientos dirigidos hacia regiones cercanas al campo receptivo del sitio de registro y compararlas con la actividad asociada a movimientos dirigidos hacia otras regiones del campo visual. También sería interesante realizar experimentos conductuales que permitan evaluar si hay correlación entre la actividad neuronal del GLv y movimientos de la cabeza visualmente guiados hacia distintas regiones del campo visual. Estas evidencias de carácter correlacional podrían develar la presencia de una actividad neuronal previa a los movimientos dirigidos hacia el campo receptivo del sitio registrado, lo cual aportaría una evidencia que apoyaría el rol funcional del GLv sobre los movimientos de orientación visual.

Comparación con movimientos del repertorio conductual de la paloma

Previamente, en la paloma han sido descritas dos conductas estereotipadas de orientación visual que preceden al movimiento de captura de los granos de alimento. Estas han sido designadas con los nombres F1 y F2, y corresponden a dos instancias de fijación visual. La primera consiste en una fijación de la cabeza a una distancia de 10 cm del grano de comida. Durante este primer evento de fijación el pico apunta hacia el grano con un error de $10,3 \pm 4,2^\circ [DS]$. F2 consiste en una segunda fijación de la cabeza desde donde el pico apunta hacia el grano a una distancia de 5,6 cm con un error de $1,8 \pm 1,6^\circ [DS]$. Finalmente, desde F2 se gatilla el picotazo balístico (Goodale, 1983). Ambas conductas de fijación son precedidas de movimientos de la cabeza visualmente guiados. Cesaretti et al. (1997), mostró que cuando a las palomas se les presentaban claves visuales en la región frontal del campo visual ($< 24^\circ$), orientan la cabeza hacia la clave visual mediante un solo evento antes de picar la clave. Cuando la clave es presentada en la periferia del campo visual, se

orientan mediante dos movimientos sucesivos de la cabeza. Esto nos muestra que las palomas emplean movimientos discretos sucesivos para orientarse hacia claves visuales, tales como podría ser un grano.

Las sacadas de la cabeza evocadas al estimular el GLv muestran varias características similares a los movimientos de aproximación visualmente guiados que describen Goodale (1983) y Cesaretti et al. (1997). Un estímulo visual como un grano, ubicado en la periferia del campo visual podría activar un locus del GLv con un CR excéntrico, con lo cual el animal orientaría su cabeza situando al grano dentro de la región frontal del nuevo campo visual reubicado. En una segunda instancia, el mismo grano ahora podría estimular visualmente un locus del GLv con un CR frontal y generar que el pico del animal apunte con mayor precisión hacia la ubicación del grano. Una manera de poder a prueba esta idea sería replicar los experimentos de Goodale y ver si los movimientos de aproximación que llevan a las posiciones de fijación F1 y F2 se ven alteradas cuando se produce una lesión local en el GLv.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la actividad neuronal generada por la microestimulación eléctrica en la lámina interna del GLv de la paloma gatilla la coordinada serie de comandos motores que subyacen a los movimientos de orientación visual observados. Estos movimientos son similares a los movimientos de aproximación visualmente referenciados que realiza la paloma en los momentos previos al picar los granos de comida. Las evidencias neuroanatómicas permiten describir al GLv como una región con masivas aferencias visuales, que no presenta proyecciones ascendentes hacia el telencéfalo y que tiene conexiones recíprocas con el tegmento motor medial implicado en los movimientos de orientación visual. Los movimientos de la cabeza evocados eléctricamente en el GLv descritos en esta tesis poseen parámetros (dirección, duración, latencia, velocidad máxima de saturación, amplitud de saturación) que no dependen de los parámetros del estímulo y que son característicos del sitio de estimulación. Esta es la primera evidencia directa que sitúa al GLv como actor en el control de las conductas de orientación visual y el primer mapa neuronal de los movimientos de la cabeza visualmente referenciados ubicado en el tálamo de un vertebrado. Estos resultados invitan a realizar estudios de microestimulación eléctrica en el GLv de otros organismos, en especial en aquellos sobre los cuales hay una amplia literatura asociada a los movimientos de orientación visual como el ratón, el gato y el mono.

BIBLIOGRAFÍA

- Bloch S, Rivaus S, Martinoya C.** (1984). Comparing frontal and lateral viewing in the pigeon. III. Different patterns of eye movements for binocular and monocular fixation. *Behav Brain Res* 13: 173–182.
- Borenstein J, Ojeda L, Kwanmuang S.** (2009). Heuristic Reduction of Gyro Drift For Personnel Tracking Systems. *J Navig* 62: 41–58.
- Butler A, Northcutt R.** (1973). Architectonic studies of the diencephalon of *Iguana iguana* (Linnaeus). *J Comp Neurol* 149: 439–462.
- Butler A, Hodos W.** (1996). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy, Evolution and Adaptation*. Wiley-Liss. New York.
- Büttner U, Fuchs A.** (1973). Influence of saccadic eye movements on unit activity in simian lateral geniculate and pregeniculate nuclei. *J Physiol* 36: 127–141.
- Büttner U, Büttner-Ennever J, Henn V.** (1977). Vertical eye movement-related activity in the rostral mesencephalic reticular formation of the alert monkey. *Brain Res* 130: 239–252.
- Cesaretti G, Kusmic C, Musumeci D.** (1997). Binocular field in pigeons: Behavioral measures of stimulus detection and coding. *Arch Ital Biol* 135: 131–143.
- Corneil B, Olivier E, Munoz D.** (2002a). Neck muscle responses to stimulation of monkey superior colliculus. I. Topography and manipulation of stimulation parameters. *J Neurophysiol* 88: 1980–1999.
- Corneil B, Olivier E, Munoz D.** (2002b). Neck muscle responses to stimulation of monkey superior colliculus. II. Gaze shift initiation and volitional head movements. *J Neurophysiol* 88: 2000–2018.
- Crossland W, Uchwat C.** (1979). Topographic projections of the retina an optic tectum upon the ventral lateral geniculate nucleus in the chick. *J Comp Neurol* 185: 87–106.
- Chen L, Walton M.** (2005). Head movement evoked by electrical stimulation in the supplementary eye field of the rhesus monkey. *J Neurophysiol* 94: 4502–4519.

Chen L. (2006). Head movements evoked by electrical stimulation in the frontal eye field of the monkey: evidence for independent eye and head control. *J Neurophysiol* 95: 3528–3542.

Chen L, Tehovnik E. (2007). Cortical control of eye and head movements: integration of movements and percepts. *Eur J Neurosci* 25(5): 1253–1264.

DiCarlo J, Lane J, Hsiao S, Johnson K. (1996). Marking microelectrode penetrations with fluorescent dyes. *J Neurosci Meth* 64: 75–81.

Doty R. (1965). Conditioned reflexes elicited by electrical stimulation of the brain in macaques. *J Neurophysiol* 28: 623–640.

Dubbeldam J. (1998). The Neural Substrate for 'Learned' and 'Nonlearned' Activities in Birds: A Discussion of the Organization of Bulbar Reticular Premotor Systems with Side-Lights on the Mammalian Situation. *Acta Anat* 163: 157–172.

du Lac S, Knudsen E. (1990). Neural maps of head movement vector and speed in the optic tectum of the barn owl. *J Neurophysiol* 63(1): 131–146.

Elsley J, Nagy B, Cushing S, Corneil B. (2007.) Widespread Presaccadic Recruitment of Neck Muscles by Stimulation of the Primate Frontal Eye Fields. *J Neurophysiol* 98: 1333–1354.

Fujikado T, Noda H. (1987). Saccadic eye movements evoked by micro-stimulation of lobule VII of the cerebellar vermis of macaque monkeys. *J Physiol* 394: 573–594.

Gamlin P. (2006). The pretectum: connections and oculomotor-related roles. *Prog Brain Res* 151: 379–405.

Gandhi N, Katnani H. (2011). Motor functions of the superior colliculus. *Annu Rev Neurosci* 34: 205–231.

Gioanni H, Palacios A, Sansonetti A, Varela F. (1991). Role of the nucleus geniculatus lateralis ventralis (GLv) in the optokinetic reflex: a lesion study in the pigeon. *Exp Brain Res* 86: 601–607.

Goodale M. (1984). Visually guided pecking in the pigeon (*Columba livia*). *Brain Behav Evol* 22: 22–41.

Goodman I. (1981). Amphetamine and apomorphine induced stereotyped behaviour in adult pigeon. *Pharmacol Biochem Behav* 15: 701–704.

Graybiel A. (1974). Visuo-Cerebellar and Cerebello-Visual Connections Involving the Ventral Lateral Geniculate Nucleus. *Exp Brain Res* 20: 303–306.

Guiloff G, Maturana H, Varela F. (1987). Cytoarchitecture of the avian ventral lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 264: 509–526.

Guitton D, Crommelinck M, Roucoux A. (1980). Stimulation of the Superior Colliculus in the Alert Cat I. Eye Movements and Neck EMG Activity Evoked when the Head is Restrained. *Exp Brain Res* 39: 63–73.

Güntürkün O, Karten H. (1991). An immunocytochemical analysis of the lateral geniculate complex in the pigeon, (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 314(4): 721–49.

Johnston D, Wu M. (1995). *Foundations of cellular neurophysiology*. The MIT Press.

Jones E. (1985). *The Thalamus*. New York: Plenum Press. Hall, W., Ebner, F. (1970). Thalamotelencephalic projections in the turtle (*Pseudemys scripta*). *J Comp Neurol* 140: 101–122.

Harrington M. (1997). The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev* 21(5): 705–727.

Hashimoto M, Ohtsuka K. (1995). Transcranial magnetic stimulation over the posterior cerebellum during visually guided saccades in man. *Brain* 118: 1185–1193.

Hayakawa Y, Nakajima T, Takagi M, Fukuhara N, Abe H. (2002). Human cerebellar activation in relation to saccadic eye movements: a functional magnetic resonance imaging study. *Ophthalmol* 216: 399–405.

Horowitz G, Newsome W. (1999). Separate signals for target selection and movement specification in the superior colliculus. *Science* 284: 1158–1161.

Hughes C, Chi D. (1983). Visual function in the ventral lateral geniculate nucleus of the cat. *Exp Neurol* 79: 611–621.

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

Karten H, Hodos W, Nauta W, Revzin A. (1973). Neural connections of the “visual wulst” of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon (*Columbia livia*) and owl (*Speotyto cunicularia*). *J Comp Neurol* 150: 253–78.

Krauzlis R, Miles F. (1998). Role of the oculomotor vermis in generating pursuit and saccades: effects of microstimulation. *J Neurophysiol* 80: 2046–2062.

Marín G, Henny P, Letelier JC, Sentis E, Karten H, Mrosko B, Mpodozis J. 2001. A simple method to microinject solid neural tracers into deep structures of the brain. *J Neurosci Methods* 106: 121–129.

Martinez-Trujillo J, Klier E, Wang H, Crawford J. (2003). Contribution of head movement to gaze command coding in monkey frontal cortex and superior colliculus. *J Neurophysiol* 90: 2770–2776.

Masino T, Grobstein P. (1989). The organization of descending tectofugal pathways in frog, *Rana pipiens*. 1. Lateralization, parcellation and an intermediate spatial representation. *Exp Brain Res* 75: 227–244.

Masino T, Knudsen E. (1992). Anatomical pathways from the optic tectum to the spinal cord subserving orienting movements in the barn owl. 1992 *Exp Brain Res* 92: 194–208.

Masino T, Knudsen E. (1993). Orienting Head Movements Resulting from Electrical of the Brainstem Tegmentum in the Barn Owl. *J Neurosci* 13: 351–370.

Maturana H, Varela F. (1982). Color-Opponent Responses in the Avian Lateral Geniculate: A Study in the Quail (*Coturnix coturnixjaponica*). *Brawn Res* 247: 227–241.

Miceli D, Reperant J, Villalobos J, Dionne L. (1987). Extratelencephalic projections of the avian visual Wulst. A quantitative autoradiographic study in the pigeon *Columba livia*. *J Hirnforsch* 28: 45–57.

Moore R. (1978). Central neural control of circadian rhythms. *Front Neuroendocrino* 5: 185–206.

Mpodozis J, Letelier JC, Marín G, Cecchi C, Henny P, Madrid C, Morales D, Sentis E, Karten H. (2000). Anatomical and physiological properties of the ventral nucleus of the lateral geniculate of the pigeon (*Columba livia*). *J Physiol-London* 523:50.

Mpodozis J, Karten H. (2004). Afferent and efferent connections of the avian nucleus Geniculatus Lateralis, pars ventralis. A study in the pigeon. Society for Neuroscience. Washington, DC. Resumen 983.11. Disponible en www.sfn.org.

Nalbach H, Wolf-Oberhollenz F, Kirschfeld K. (1990). The pigeon's eye viewed through an ophthalmoscopic microscope: orientation of retinal landmarks and significance of eye movements. *Vision Res* 30: 529–540.

Nicholson C. (1973). Theoretical analysis of field potentials in anisotropic ensembles of neuronal elements. *IEEE Trans Biomed Eng* 20: 278–88.

Nicholson C, Freeman A. (1975). Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *J Neurophysiol* 38: 356–368.

Nieuwenhuys R, Donkelaar H, Nicholson C. (1998). The central nervous system of vertebrates. Springer. Vol 3.

Niirni K, Kanaseki T, Takimoto T. (1963). The comparative anatomy of the ventral nucleus of the lateral geniculate body in mammals. *J Comp Neurol* 121: 313–324.

Noda H, Fujikado T. (1987). Involvement of Purkinje cells in evoking saccadic eye movements by microstimulation of the posterior cerebellar vermis of monkeys. *J Neurophysiol* 57: 1247–1261.

Livingston C, Mustari M. (2000). The anatomical organization of the macaque pregeniculate complex. *Brain Res* 876: 166–179.

Livingston C, Fedder S. (2003). Visual-Ocular Motor Activity in the Macaque Pregeniculate Complex. *J Neurophysiol* 90: 226–244.

Pateromichelakis S. (1979). Response properties of units in the lateral geniculate nucleus of the domestic chick. *Brain Res* 167: 281–296.

Pickard G, Turek F. (1983). The suprachiasmatic nuclei: two circadian clocks? *Brain Res* 268: 201–10.

Quessy S, Freedman E. (2004). Electrical stimulation of rhesus monkey nucleus reticularis gigantocellularis. I. Characteristics of evoked head movements. *Exp Brain Res* 156(3): 342–356.

Ranck J. (1975). Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: A review. *Brain Res* 98: 417–440.

Raphan T, Cohen B. (1978). Brainstem mechanisms for rapid and slow eye movements. *Ann Rev Physiol* 40: 527–552.

Rodieck R. (1979). Visual Pathways. *Annu Rev Neurosci* 2: 193–225.

Roucoux A, Guitton D, Crommelinck M. (1980). Stimulation of the Superior Colliculus in the Alert Cat II. Eye and Head Movements Evoked when the Head is Unrestrained. *Exp Brain Res* 39: 75–85.

Scudder C, Kaneko C, Fuchs A. (2002). The brainstem burst generator for saccadic eye movements: a modern synthesis. *Exp Brain Res* 142(4): 439–462.

Shimizu T, Cox K, Karten H, Britto L. (1994). Cholera toxin mapping of retinal projections in pigeons (*Columba livia*), with emphasis on retinohypothalamic connections. *Vis Neurosci* 11: 441–446.

- Simpson I.** (1984). The accessory optic system. *Annu Rev Neurosci* 7: 13–41.
- Sparks D.** (1986). Translation of sensory signals into commands for the control of saccadic eye movements: the role of the primate superior colliculus. *Physiol rev* 66: 118–171.
- Sparks D.** (2002). The brainstem control of saccadic eye movements. *Nat Rev Neurosci* 3: 952–964.
- Suzuki D, Keller E.** (1988). The role of the posterior vermis of monkey cerebellum in smooth pursuit eye movement control. I. Eye and head movement-related activity. *J Neurophysiol* 59: 1–18.
- Tehovnik E.** (1996). Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *J Neurosci Meth* 65(1): 1–17.
- Tehovnik E, Slocum W, Carvey C.** (2003). Behavioural state affects saccadic eye movements evoked by microstimulation of striate cortex. *Eur J Neurosci* 18(4): 969–979.
- Tehovnik E, Slocum W.** (2004). Behavioural state affects saccades elicited electrically from neocortex. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 13–25.
- Tehovnik E, Slocum W, Carvey C, Schiller P.** (2005). Phosphene induction and the generation of saccadic eye movements by striate cortex. *J Neurophysiol* 93(1): 1–19.
- Tehovnik E, Tolia S, Sultan F, Slocum W, Logothetis N.** (2006). Direct and indirect activation of cortical neurons by electrical microstimulation. *J Neurophysiol* 96(2): 512–521.
- Tehovnik E, Slocum W.** (2013). Electrical induction of vision. *Neurosci Biobehav Rev* 37: 803–818.
- Tu T, Keating E.** (2000). Electrical stimulation of the frontal eye field in a monkey produces combined eye and head movements. *J Neurophysiol* 84: 1103–1106.
- Vega-Zuniga T, Mpodozis J, Karten H, Marín G, Hain S, Luksch H.** (2014). Morphology, projection pattern, and neurochemical identity of Cajal's "centrifugal neurons": The cells of origin of the tectoventrete pathway in pigeon (*Columba livia*) and chicken (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol* 522: 2377–2396.
- Vega-Zuniga T, Marín G, González-Cabrera C, Planitscher E, Hartmann A, Marks V, Mpodozis J, Luksch H.** (2015). Microconnectomics of the pretectum and ventral

thalamus in the chicken (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol*. Publicado en línea, en impresión. doi: 10.1002/cne.23941

Waitzman D, Silakov V, DePalma-Bowles S, Ayers S. (2000). Effects of reversible inactivation of the primate mesencephalic reticular formation. I. Hypermetric goal-directed saccades. *J Neurophysiol* 83:(4) 2260–2284.

Walton M, Freedman E. (2014). Activity of long-lead burst neurons in pontine reticular formation during head-unrestrained gaze shifts. *J Neurophysiol* 111(2): 300–312.

Wallace M, Wilkinson L, Stein B. (1996). Representation and integration of multiple sensory inputs in primate superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 76, 1246–1266.

Wallman J, Letelier J. (1993). Eye movements, head movements and gaze stabilization in birds. En Zeigler H, Bishop H. (editores). *Vision, brain and behavior in birds* (pp. 245-263). MIT Press. Cambridge, MA.

Woodman O. (2007). An introduction to inertial navigation. University of Cambridge. Computer Laboratory. Reporte técnico 696. Disponible en <http://www.cl.cam.ac.uk/techreports>

Wurtz R, Goldberg M. (1972). Activity of superior colliculus in behaving monkey. IV. Effects of lesions on eye movement. *J Neurophysiol.* 35: 587–596.

Yang Y, Yang Y, Shu-Rong W. (2008). Neuronal circuitry and discharge patterns controlling eye movements in the pigeon. *J Neurosci* 28(42): 10772–10780.

Ye B, Kim Y, Nam H, Lee H, Nam C, Heo J. (2010). Clinical manifestations of cerebellar infarction according to specific lobular involvement. *Cereb* 9: 571–579.

Yeomans J. (1990). Principles of brain stimulation. New York: Oxford UP.

APÉNDICE

Los programas escritos para analizar las señales provenientes del IMU fueron escritos en el lenguaje de programación Python 2.7.9 (<https://www.python.org/>) y utilizaron los módulos Numpy 1.8.2 (<http://www.numpy.org/>), Scipy 0.14.0 (<http://www.scipy.org/>) y Matplotlib 1.4.2 (<http://matplotlib.org/>). Los programas que se muestran a continuación están comentados. Las funciones y variables con la primera letra mayúscula están definidas en el programa funciones_IMU.py. En los comentarios del código, los acentos y las ñ se omiten intensionalmente por asuntos de compatibilidad.

adquisicion_IMU.py:

```
#!/usr/bin/python
'''
Descripcion: inicializa La comunicacion serial con el arduino, adquiere La
informacion sincronizada con una señal para gatillar un evento y almacena Los
datos en un archivo de salida.
Archivos: genera una archivos.txt con el nombre especificado.
Formato de salida: ax[i],ay[i],az[i],gX[i],gX[i],gX[i],sinc[i]\n
Sintaxis: adquisicion_IMU.py [nombre del archivo de salida]
'''

import serial
import sys
import time

nombreArchivo = sys.argv[1]+'.txt'

puerto = serial.Serial('COM3', 128000)
time.sleep(3) # tiempo para que La comunicacion serial se establezca.

# Limpieza del puerto serial antes de comenzar a adquirir
datos = ''
caracter = puerto.read(1)
while caracter != 'N':
```

```

    caracter = puerto.read(1)
    while puerto.inWaiting() == 0:
        pass
    datos += caracter
    caracter = puerto.read(1)
    datos += caracter

    if datos != 'SYNC':
        print datos
        print 'datos desincronizados'

# Lectura y decodificacion de bytes enviados por arduino.
def readInts(puerto):
    datos = []
    for i in range(10):
        datos.append(puerto.read())
    datos = map(ord, datos)
    ax = (datos[0] << 2) | (datos[1] >> 6) # datos[0] corresponde al primer
        # byte
    ay = ((datos[1] & 0x3F) << 4) | (datos[2] >> 4)
    az = ((datos[2] & 0x0F) << 6) | (datos[3] >> 2)

    sinc = datos[3] & 0x01 # sinc = sincronizacion de Los datos del IMU con
        # una se\u00f1al que puede ser ocupada para gatillar un
        # evento, en este caso La microestimulacion electrica

    gx = (datos[4] << 8) | datos[5]
    gy = (datos[6] << 8) | datos[7]
    gz = (datos[8] << 8) | datos[9]

    if gx >= 32768: # guarda numeros negativos con el metodo de complemento de 2
        gx -= 32768*2 # "
    if gy >= 32768: # "
        gy -= 32768*2 # "
    if gz >= 32768: # "
        gz -= 32768*2 # "

    return (ax, ay, az, gx, gy, gz, sinc)

# Inicializacion de variables
iteracion = True
buffer = []

# Limpieza del puerto serial antes de comenzar a adquirir
while puerto.inWaiting() != 0:
    print puerto.read()
print 'Presione ENTER para iniciar adquisicion'
raw_input()
puerto.write('b')

# Adquisicion
try:

```

```

while iteracion:
    t0 = time.time()
    for i in range(1500):
        (ax, ay, az, gx, gy, gz, sinc) = readInts(puerto)
        buffer.append(','.join(map(str, (ax, ay, az, gx, gy, gz, sinc))))
        if sinc == 1:
            print 'Evento gatillado'
            print 1.0/((time.time()-t0)/1500.0), 'Hz'

# Termino del registro con Ctrl+c
except KeyboardInterrupt:
    salida = open(nombreArchivo, 'w')
    salida.write('\n'.join(buffer))
    salida.close()
    sys.exit()

```

trayectoria_IMU.py:

```

#!/usr/bin/python
'''
Descripcion: calcula La posicion y orientacion del eje x del acelerometro a partir
de La velocidad angular y La aceleracion lineal
Archivos: genera archivos.esf a partir de todos Los archivos.txt del directorio
actual.
Formato de entrada: ax[i],ay[i],az[i],gx[i],gy[i],gz[i],sinc[i]\n
Formato de salida: orientX[i];orientY[i];orientZ[i];pX[i];pY[i];pZ[i]\n
Sintaxis: trayectoria_IMU.py
'''

from pylab import *
from scipy import optimize
from funciones_IMU import *
from numpy import copy as npcopy, multiply
import os
import numpy as np
import math

# En Los 100 ms previos a La seÑal de sincronizacion no deben haber # movimiento
para poder configurar La seÑal basal

# Parametros de calculo
hasta = 1000
iPts_a = 0 # puntos que se consideran para calibrar La normal inicial
iPts_b = 99 # "
gCorte = 4 # umbral de corte para filtrar velocidad angular (grados/s)
pasadas = 30 # aproximacion infinitesimas entre dos puntosmedidos por el gir
aPts = 3 # puntos para calcular La media movil central de La aceleracion
acpg = 180 # configura normal inicial, acimut
elpg = 90 # configura normal inicial, elevacion
alpha = 0.985 # filtro complementario
aCorte = 0.035 # umbral de corte para filtrar aceleracion lineal (G)

```

```

# Configura La ruta del directorio actual
actualdir = os.getcwd()

# Lista con nombres de Los archivos presentes en el directorio actual
archivoLista = os.listdir(actualdir)

# Bucle que procesa cada archivo
for archivoNumero, archivoNombre in enumerate(archivoLista):
    if archivoNombre[-3:] == 'txt': # actua solo si el archivo termina en txt
        datos = open(archivoNombre, 'r').read().split('\n')
        while '' in datos:
            datos.remove('')
        salida = open(archivoNombre[:-4] + '.esf', 'w') # extension de salida
        del datos[:Desde] # borra datos hasta el punto "Desde"
        del datos[hasta:] # borra datos Desde el punto "hasta"

        N = len(datos)
        # Valores en Volts de 0g aparentes
        # Vref=3.3 ; conversor AD del arduino de 10 bits => 2^10 = 1023
        vi = 511 * 3.3 / 1023

        ax = zeros(N)
        ay = zeros(N)
        az = zeros(N)
        aDX = zeros(N)
        aDY = zeros(N)
        aDZ = zeros(N)
        vX = zeros(N)
        vY = zeros(N)
        vZ = zeros(N)
        pX = zeros(N)
        pY = zeros(N)
        pZ = zeros(N)
        gx = zeros(N)
        gy = zeros(N)
        gz = zeros(N)
        sinc = zeros(N)
        calcgX = zeros(N)
        calcgY = zeros(N)
        calcgZ = zeros(N)
        orientX = zeros(N)
        orientY = zeros(N)
        orientZ = zeros(N)

        for i, linea in enumerate(datos):
            linea = map(float, linea.split(','))
            (ax[i], ay[i], az[i], gX[i], gY[i], gZ[i], sinc[i]) = linea

# Calibracion giroscopo
# Compensacion: promedio de Los 100 ms previos al evento
gX_compensa = 0
gY_compensa = 0

```

```

gZ_compensa = 0

for i in range(iPts_a, iPts_b):
    gX_compensa += gX[i]
    gY_compensa += gY[i]
    gZ_compensa += gZ[i]

gX_compensa = gX_compensa/(iPts_b-iPts_a+1)
gY_compensa = gY_compensa/(iPts_b-iPts_a+1)
gZ_compensa = gZ_compensa/(iPts_b-iPts_a+1)

gX = gX - gX_compensa
gY = gY - gY_compensa
gZ = gZ - gZ_compensa

# Filtro. Bajo cierto umbral de gCorte, g[i] = 0
RemoveError(gX, gCorte)
RemoveError(gY, gCorte)
RemoveError(gZ, gCorte)

# Transformacion a radianes infinitesimales
gX *= (pi/180.0)*Dt/pasadas
gY *= (pi/180.0)*Dt/pasadas
gZ *= (pi/180.0)*Dt/pasadas

# Transformacion a ejes del acelerometro (disposicion de Los sensores)
tmp = gX * -1
gX = gY
gY = tmp

# Calibracion del acelerometro
# Paso de bits a voltaje
ax *= 3.3 / 1023
ay *= 3.3 / 1023
az *= 3.3 / 1023

# Asignacion de valor de voltaje al instante inicial con aceleración = 0
# Se le asigna a vi el valor de cuentas en que durante la mayor parte
# del tiempo la sumatoria vectorial de xyz es 0
vi = optimize.leastsq(Errfunc, vi, args=(ax, ay, az))[0]

# Paso de voltajes a G
ax -= vi
ay -= vi
az -= vi
ax /= (vi/5.0)
ay /= (vi/5.0)
az /= (vi/5.0)

# Suavizado de Las aceleraciones
ax = MovAvg(ax, aPts)
ay = MovAvg(ay, aPts)

```

```

az = MovAvg(az, aPts)

# Configuración de La normal inicial
acp = math.radians(acpg)
elp = math.radians(elpg)
xp = 1.0*sin(elp)*cos(acp) # coordenadas esfericas a cartesianas
yp = 1.0*sin(elp)*sin(acp) # "
zp = 1.0*cos(elp) # "
# Gravedad en el mundo global del imu
aNormal = matrix([sum(ax[iPts_a:iPts_b])/(iPts_b-iPts_a), \
sum(ay[iPts_a:iPts_b])/(iPts_b-iPts_a), sum(az[iPts_a:iPts_b])/(iPts_b-iPts_a)].T
equis = matrix([xp, yp, zp]).T # -1,0,0 (ac=180;el=90). el vector -x del
# sensor alineado con el pico del animal
C = matrix([[1, 0, 0], [0, 1, 0], [0, 0, 1]]) # matriz de Los cosenos
# directores

# Calculo de aceleracion menos La normal (filtro complementario)
for i in range(N):
    sigma = sqrt(gX[i]**2 + gY[i]**2 + gZ[i]**2)
    B = matrix([[0, -1*gZ[i], gY[i]], [gZ[i], 0, -1*gX[i]], [-1*gY[i], \
gX[i], 0] ])
    if sigma == 0:
        factor = eye(3)
    else:
        factor = (eye(3) + (sin(sigma)/sigma) * B + ((1- \
cos(sigma))/sigma**2)* B * B )
    for j in range(pasadas):
        C = C * factor
        equisNuevo = C * equis
        gravedadPro = C.T * aNormal
        gravedadPro = multiply(gravedadPro, alpha) + multiply(matrix([ax[i], \
ay[i], az[i]]).T, 1-alpha)
        aNormal = C * gravedadPro
        calcgX[i] = gravedadPro[0,0]
        calcgY[i] = gravedadPro[1,0]
        calcgZ[i] = gravedadPro[2,0]
        ac = C * matrix([ax[i] - gravedadPro[0,0], ay[i] - gravedadPro[1,0], \
az[i] - gravedadPro[2,0]]).T
        aDX[i] = ac[0,0]
        aDY[i] = ac[1,0]
        aDZ[i] = ac[2,0]
        orientX[i] = equisNuevo[0,0]
        orientY[i] = equisNuevo[1,0]
        orientZ[i] = equisNuevo[2,0]

aDXF2 = npcopy(aDX)
aDYF2 = npcopy(aDY)
aDZF2 = npcopy(aDZ)

# Filtro. Bajo cierto umbral de aCorte, a[i] = 0
RemoveError(aDXF2, aCorte)
RemoveError(aDYF2, aCorte)

```

```

RemoveError(aDZF2, aCorte)

# Supuesto de que para aceleraciones constantes dv/dt = 0
movX = DetectMov(aDXF2)
movY = DetectMov(aDYF2)
movZ = DetectMov(aDZF2)

# Calculo de La velocidad lineal
vX[0] = 0
vY[0] = 0
vZ[0] = 0

# Integracion de La aceleracion lineal * filtro DetectMov()
for i in range(N-1):
    vX[i+1] = (vX[i] + (aDX[i+1] + aDX[i]) *Dt*9.81/2)*movX[i+1]
    vY[i+1] = (vY[i] + (aDY[i+1] + aDY[i]) *Dt*9.81/2)*movY[i+1]
    vZ[i+1] = (vZ[i] + (aDZ[i+1] + aDZ[i]) *Dt*9.81/2)*movZ[i+1]

# Calculo de La posicion
pX[0] = 0
pY[0] = 0
pZ[0] = 0

# Integracion de La velocidad lineal
for i in range(N-1):
    pX[i+1] = pX[i] + (vX[i+1]+vX[i])*Dt/2
    pY[i+1] = pY[i] + (vY[i+1]+vY[i])*Dt/2
    pZ[i+1] = pZ[i] + (vZ[i+1]+vZ[i])*Dt/2

for i in range(N):
    salida.write(';'.join(map(str, [orientX[i], orientY[i], orientZ[i], \
pX[i], pY[i], pZ[i]])) + '\n')

salida.close()

```

deteccion_IMU.py:

```

#!/usr/bin/python
'''
Descripcion: determina el inicio y el termino del desplazamiento angular de La
proyeccion del pico en una esfera de radio especificado.
Archivos: genera tabla_it.txt a partir de todos los archivos.esf del directorio
actual.
Formato de entrada: orientX[i];orientY[i];orientZ[i];pX[i];pY[i];pZ[i]\n
Formato de salida: inicio[i], termino[i]
Sintaxis: deteccion_IMU.py
'''
from numpy import *
from pylab import *
from funciones_IMU import *
import math

```

```

import os

# Ruta del directorio actual
actualdir = os.getcwd()

# Lista con los nombres de los archivos del directorio actual
archivoLista = os.listdir(actualdir)

# Nombre del archivo de salida
for archivoNumero, archivoNombre in enumerate(archivoLista):
    if archivoNombre[-3:] == 'esf':
        nombreSalida = archivoNombre[:-5]+'tabla_it.txt'
        break

salida = open( nombreSalida, 'w' )

archivoNumero = 0
for archivoNumero, archivoNombre in enumerate(archivoLista):
    if archivoNombre[-3:] == 'esf': # se actua solo si el archivo termina en esf
        archivoNumero += 1
        datos = open(archivoNombre, 'r').read().split('\n')
        datos.pop(-1)

        posX = []
        posY = []
        posZ = []
        oriX = []
        oriY = []
        oriZ = []
        aci = []
        ele = []
        distancia_ortodromica = []
        vel_distancia_ortodromica = []
        distancia_ortodromica_acumulada = 0

        for i, linea in enumerate(datos):
            # Calculo de la proyeccion
            (oX, oY, oZ, pX, pY, pZ) = map(float, linea.split(';'))
            posX.append(pX)
            posY.append(pY)
            posZ.append(pZ)
            oriX.append(oX)
            oriY.append(oY)
            oriZ.append(oZ)

            # Proyeccion sobre una esfera unitaria
            lmbda = sqrt((oX*pX + oY*pY + oZ*pZ)**2 - (pX**2 + pY**2 + pZ**2 - \
radius**2) ) - (oX*pX + oY*pY + oZ*pZ)
            ppX = (pX + lmbda * oX)/radius
            ppY = (pY + lmbda * oY)/radius
            ppZ = (pZ + lmbda * oZ)/radius

```

```

# Transformacion de coordenadas cartesianas a esfericas
r_unitario = sqrt(ppX**2+ppY**2+ppZ**2)
ele.append( (math.degrees(math.acos(ppZ/r_unitario))) *-1 + 90 )
aci.append( (math.degrees(math.atan( ppY/ppX ))) *-1      )

# Calculo del desplazamiento angular
for i in range(len(datos)-1):
    # Desplazamiento angular instantaneo
    eleaci_a = ele[i], aci[i]
    eleaci_b = ele[i+1], aci[i+1]
    o_i = Ortodromica(eleaci_a, eleaci_b)
    # Desplazamiento angular acumulado
    distancia_ortodromica_acumulada += o_i
    distancia_ortodromica.append(distancia_ortodromica_acumulada)
distancia_ortodromica.append(distancia_ortodromica[-1])

# Suavizado y derivacion de Las magnitudes angulares
distancia_ortodromica_cruda = copy(distancia_ortodromica)
v_distancia_ortodromica_cruda = \
copy(Derivada_3pt(distancia_ortodromica_cruda , Dt))

# Filtros de detecccion de umbrales de Las magnitudes angulares
inicio_vel, termino_vel = DetectVelAng(v_distancia_ortodromica_cruda)
inicio = inicio_vel
termino = termino_vel

if archivoNumero == 1:
    salida.write(';'.join(map(str, [inicio, termino])))
else:
    salida.write('\n'+';'.join(map(str, [inicio, termino])))

salida.close()

```

parametros_IMU.py:

```

#!/usr/bin/python
'''
Descripcion: calcula Los parametros cinematicos del movimiento de La cabeza del
animal.
Archivos: genera parametros cinematicos en parametros.csv a partir de tabla_it.txt
Formato de entrada: inicio[i], termino[i]
Formato de salida: Latencia;tamagno;max_vel;duracion;direccion\n
                  [ms];[grados];[grados/s];[ms];[grados];\n
                  Latencia[i];tamagno[i];max_vel[i];duracion[i];direccion[i]\n
 Sintaxis: parametros_IMU.py
'''
from numpy import *
from pylab import *
from funciones_IMU import *
import math
import os

```

```

#Parametros de calculo
doPts = 0          # suavizado:cuantos puntos hacia adelante y hacia atras
vdoPts = 10       # suavizado:cuantos puntos hacia adelante y hacia atras
punto_inicial = 0, 0 # punto de partida expresado en elevacion, acimut
punto_ref = 90, 0  # referencia vertical expresada en elevacion, acimut

#Capturo la ruta del directorio actual
actualdir = os.getcwd()

#Genero una lista con todos Los nombres de Los archivos presentes en actualdir
archivoLista = os.listdir(actualdir)

#Asigna nombre al archivo de salida
for archivoNumero, archivoNombre in enumerate(archivoLista):
    if archivoNombre[-3:] == 'esf':
        nombreSalida = archivoNombre[:-5]+'parametros.csv'
        break

#Genera un archivo de salida
salida = open(nombreSalida, 'w')

inic = []
term = []

for archivoNumero, archivoNombre in enumerate(archivoLista):
    if archivoNombre[-3:] == 'esf':
        nametabla = archivoNombre[:-5]+'tabla_it.txt'
        fileTabla = open(nametabla, 'r').read().split('\n')
        break

salida.write('latencia'+';'+ 'tamagno'+';'+ 'max_vel'+';'+ 'duracion'+';'+ 'direccion'\
+ '\n')
salida.write('[ms];[grados];[grados/s];[ms];[grados];\n')

#Desde tabla creada por angc
for i, linea in enumerate(fileTabla):
    (ini, ter) = map(int, linea.split(';'))
    inic.append(ini)
    term.append(ter)

contador = 0
for archivoNumero, archivoNombre in enumerate(archivoLista):
    if archivoNombre[-3:] == 'esf': # se actua solo si el archivo termina en esf
        datos = open(archivoNombre, 'r').read().split('\n')
        datos.pop(-1)

        posX = []
        posY = []
        posZ = []
        oriX = []
        oriY = []

```

```

oriZ      = []
aci       = []
ele       = []
distancia_ortodromica      = []
v_distancia_ortodromica   = []
a_distancia_ortodromica   = []
distancia_ortodromica_acumulada = 0

#Lee y procesa Las lineas de Los datos extraidos del archivo.esf
for i, linea in enumerate(datos):
    #Calculo de La proyeccion a partir de orientaciones(o) y posiciones(p)
    (oX, oY, oZ, pX, pY, pZ) = map(float, linea.split(';'))
    posX.append(pX)
    posY.append(pY)
    posZ.append(pZ)
    oriX.append(oX)
    oriY.append(oY)
    oriZ.append(oZ)
    #Proyeccion sobre una esfera unitaria
    lmbda = sqrt((oX*pX + oY*pY + oZ*pZ)**2 - (pX**2 + pY**2 + pZ**2 - \
Radio**2) ) - (oX*pX + oY*pY + oZ*pZ) # proyeccion sobre una esfera unitaria
    ppX = (pX + lmbda * oX)/Radio
    ppY = (pY + lmbda * oY)/Radio
    ppZ = (pZ + lmbda * oZ)/Radio

    # Curso temporal de Las proyecciones, grados coord. esfericas
    r_unitario = sqrt(ppX**2+ppY**2+ppZ**2)
    ele.append( (math.degrees(math.acos(ppZ/r_unitario))) *-1 + 90 )
    aci.append( (math.degrees(math.atan( ppY/ppX )) *-1      ) )

#Calculo del desplazamiento angular
for i in range(len(datos)-1):
    #Desplazamiento angular instantaneo
    eleaci_a = ele[i], aci[i]
    eleaci_b = ele[i+1], aci[i+1]
    o_i = Ortodromica(eleaci_a, eleaci_b)
    #Desplazamiento angular acumulado
    distancia_ortodromica_acumulada += o_i
    distancia_ortodromica.append(distancia_ortodromica_acumulada)
distancia_ortodromica.append(distancia_ortodromica[-1])

#Suavizado y derivacion de Las magnitudes angulares
distancia_ortodromica = MovAvg(distancia_ortodromica, doPts)
v_distancia_ortodromica = Derivada_3pt(distancia_ortodromica, Dt)
v_distancia_ortodromica = MovAvg(v_distancia_ortodromica, vdoPts)

#Corrimiento de 100ms, tal que el cero corresponda al inicio del estimulo
dt_ms = Dt*1000
ejex = [-100*dt_ms]
ejex_i = ejex[0]
for i in range(1,len(aci)):
    ejex_i += dt_ms

```

```

    ejex_i = round(ejex_i, 4)
    ejex.append(ejex_i)

    #Asigna valor en segundos al inicio y termino del movimieto
    #[desde tabla creada por angc]
    inicio = inic[contador]
    termino = term[contador]
    latencia = ejex[inicio] # Latencia, pto en el cual comienza el mov. en ms
    t_termino = ejex[termino]

    #Calculo de parametros de salida
    duracion = t_termino - latencia
    tamagno = distancia_ortodromica[termino]
    punto_final = round(ele[termino], 5), round(aci[termino], 5)
    cuadrante_aci = round(aci[termino], 5)
    direccion = Direccion(punto_inicial, punto_ref, punto_final)
    if cuadrante_aci < 0:
        direccion *= -1
    lat_velmax, max_vel = Maximo(v_distancia_ortodromica, inicio, termino)

    #Cambio de Los puntos por comas
    latencia = str(latencia).replace('.', ',')
    tamagno = str(tamagno).replace('.', ',')
    max_vel = str(max_vel).replace('.', ',')
    duracion = str(duracion).replace('.', ',')
    direccion = str(direccion).replace('.', ',')

salida.write(latencia+';'+tamagno+';'+max_vel+';'+duracion+';'+direccion+';'+'\n')
    contador += 1

salida.close()

```

funciones_IMU.py:

```

#!/usr/bin/python
'''
Funciones y variables ocupadas en programas que deben estar ubicados en la misma
ruta que funciones_IMU.py
'''
from numpy import copy as npcopy
from pylab import *
import math

#Parametros
Desde = 902 # borra datos hasta el punto "Desde"
Dt = 0.000997 # delta t entre un punto y otro, en segundos
initPts_a = 903 # cuantos puntos se consideran para calibrar la normal inicial
initPts_b = 1002 # "
Radio = 0.025 # radio de la esfera, en metros

```

```

class Index:
    def salir(self, event):
        exit()
    def siguiente(self, event):
        close('all')

def Derivada_3pt(f, dt):
    # Define el tamaño de la lista derivada
    dfdt = [0.0] * len(f)
    # Define el primer punto con la diferencia hacia adelante
    dfdt[0] = (f[1] - f[0]) / dt
    # Define los puntos con la diferencia central o de 3 pts
    for t in range(1, len(f)-1):
        dfdt[t] = (f[t+1] - f[t-1]) / (2*dt)
    # Define el último punto con la diferencia hacia atrás
    dfdt[-1] = (f[-1] - f[-2]) / dt
    return dfdt

def Ortodromica(eleaci_a, eleaci_b):
    #Latitud = elevacion (0 a 90 norte; 0 a -90 sur)
    #Longitud = acimut (positivo este, derecha de la paloma)
    ele1, aci1 = eleaci_a
    ele2, aci2 = eleaci_b
    dEle = math.radians(ele2 - ele1)
    dAci = math.radians(aci2 - aci1)
    a = (math.sin(dEle / 2) * math.sin(dEle / 2) +
         math.cos(math.radians(ele1)) * math.cos(math.radians(ele2)) *
         math.sin(dAci / 2) * math.sin(dAci / 2))
    distancia_ortodromica = 2 * math.atan2(math.sqrt(a), math.sqrt(1 - a))
    distancia_ortodromica = math.degrees(distancia_ortodromica)
    return distancia_ortodromica

def Direccion(punto_a, punto_b, punto_c):
    # Lados del triángulo, expresados en ángulos centrales
    ab = Ortodromica(punto_a, punto_b)
    ac = Ortodromica(punto_a, punto_c)
    cb = Ortodromica(punto_c, punto_b)
    ab = math.radians(ab)
    ac = math.radians(ac)
    cb = math.radians(cb)
    denominador = (math.sin(ac)*math.sin(ab))
    if denominador == 0:
        alfa = 0
    else:
        # Teorema del coseno de la trigonometría esférica
        alfa = ((math.cos(cb) -
math.cos(ac)*math.cos(ab))/(math.sin(ac)*math.sin(ab)))
        alfa = math.acos(alfa)
        alfa = math.degrees(alfa)
    return alfa

def Maximo(lista, inicio, fin):

```

```

maximo_valor = 0
maximo_indice = 0
for indice,valor in enumerate(lista):
    if inicio <= indice <= fin:
        if valor > maximo_valor:
            maximo_valor = valor
            maximo_indice = indice
        else:
            pass
return maximo_indice, maximo_valor

def DetectMov(entrada):
    salida = ones(len(entrada))
    count = 0
    for i in range(len(entrada)):
        if entrada[i] == 0:
            count += 1
            if count == 120:
                for j in range(120):
                    salida[i-j] = 0
            elif count > 120:
                salida[i] = 0
        else:
            count = 0
    return salida

# Deteccion de movimiento en base a un criterio de velocidad angular
def DetectVelAng(entrada):
    umbral_1 = 0.2 * (10**2)
    umbral_2 = 0.5 * (10**2)
    umbral_3 = 0.2 * (10**2)
    umbral_4 = 0.6 * (10**2)
    umbral_5 = 0.2 * (10**2)
    paso = 0
    inicioIndice = 0
    terminoIndice = 0
    for i in range(99,len(entrada)):
        if paso == 0:
            if entrada[i] > umbral_1:
                paso = 1
                inicioIndice = i
        if paso == 1:
            if entrada[i] > umbral_2:
                paso = 2
        if paso == 2:
            if entrada[i] < umbral_3:
                paso = 3
                terminoIndice = i
        if paso == 3:
            if entrada[i] > umbral_4:
                paso = 4
        if paso == 4:

```

```

        if entrada[i] < umbral_5:
            paso = 5
        return inicioIndice, terminoIndice

# Encuentra el mejor voltaje para La aceleracion = 0
def Errfunc(param, ax, ay, az):
    ax = npcopy(ax[:100])
    ay = npcopy(ay[:100])
    az = npcopy(az[:100])
    ax -= param
    ay -= param
    az -= param
    ax /= (param/5.0)
    ay /= (param/5.0)
    az /= (param/5.0)
    ax = ax**2
    ay = ay**2
    az = az**2
    err = (1 - sqrt(ax + ay + az))
    return sum(err**2)

# Suaviza La onda y promediando n puntos para delante y para atras
def MovAvg(y, n):
    x = zeros(len(y))
    for i in range(n):
        x[i] = y[i]
    for i in range(n, len(y)-n):
        for j in range(2*n+1):
            x[i] += y[i+j-n]
        x[i] /= 2*n+1
    for i in range(len(y)-n, len(y)):
        x[i] = y[i]
    return x

# Valor de cero a todos Los puntos de La onda con valores inferiores al umbral
def RemoveError(y, umbral):
    for i in range(len(y)):
        if abs(y[i]) < umbral:
            y[i] = 0

```