Tesis

Estudio del núcleo Ectomamilar durante el desarrollo embrionario de aves

ELENA FÉLIX DOMÍNGUEZ

2015



Estudio del núcleo Ectomamilar durante el desarrollo embrionario de aves

Elena Félix Domínguez

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Ciencias de la Salud, Patología animal, producción animal y ciencia y tecnología de los alimentos Las Palmas de Gran Canaria, España 2015

Estudio del núcleo Ectomamilar durante el desarrollo embrionario de aves

Doña Elena Félix Domínguez

Tesis presentada como requisito para optar al grado de: Doctora en Biología

> Directora: Doctora Dña. Lilián Rosa Pérez Santana

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Ciencias de la Salud, Patología animal, producción animal y ciencia y tecnología de los alimentos Las Palmas de Gran Canaria, España 2015

Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo. Benjamin Franklin (1706-1790).

No hay que temer a nada en la vida, solo hay que comprender sus secretos. Marie Curie (1895-1969).

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi directora, Lilián Pérez Santana, su confianza en mí y por haberme abierto esta ventana hacia el fascinante mundo de la ciencia.

A los miembros del departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, en especial a la Doctora Dña Blanca Mompeó, por su apoyo incondicional.

A Fabiola, Juanfra, Susana y Eduardo, amigos y compañeros del departamento

A Paqui, que me enseñó el verdadero amor a la ciencia. Sin ti nada hubiera sido igual.

A los miembros del Departamento de Anatomía Humana de la Universidad de Murcia, en especial a Luis Puelles y Margaret por su apoyo científico y personal.

A Chelo, Juanu, Luisa y Sylvia, compañeros de andanzas de Murcia.

Antonia y Ana Delgado, compañeras y amigas de la Universidad de La Laguna.

A Carlos, por tu infinita paciencia

A todas aquellas personas que de un modo u otro me han apoyado y ayudado para que este trabajo llegue a su fin.

A mi familia que siempre ha confiado en mí.

A Juan Andrés, tu amor y apoyo incondicional me han dado el empujón necesario para llegar hasta aquí.

A mis padres

*A Paq*ui

Contenido

Pág.

П

1.INTRODUCCIÓN	12
Desarrollo del SNC de los vertebrados	16
1. Morfogénesis Temprana: Neurulación	17
2. Vesiculación y segmentación	21
3. Morfogénesis secundaria	29
Diencéfalo	
1. Diencéfalo: organización nuclear	
a) Pretectum (P1)	
b) Tálamo: Complejos nucleares del Tálamo	
c) Epitálamo	35
d) Pretálamo	
e) Eminencia pretalámica, actualmente se denomina habénula pretalámica (Atlas,	2007) 36
El sistema visual	
1. Vías visuomotoras	
2. El sistema óptico accesorio (AOS)	
Núcleo Ectomamilar	44
Justificación y Objetivo	49
2.MATERIAL Y MÉTODOS	51
Obtención y procesamiento del material	
1. Obtención	53
Procesamiento	54
1. Histología	54
Cortes	54
Fijacion	54
Parafina	55

Inclusión y corte en parafina	
l Incion	
Inclusión y corte en vibratomo	
Tinción	59 59
Protocolo de AChE (Acetilcolinesterasa) (Modificado de Karnovsky v Rotts 64)	
Timidina Tritiada	
3.RESULTADOS	64
1. Estudio de la citoarquitectura y localización del núcleo Ectomamilar (Em) durante el	1
desarrollo emprionario mediante la tincion con Cresil Violeta	
2. Expresión de la proteína Engrailed-2 durante el desarrollo del Núcleo Ectomamilar.	71
3. Seguimiento temporal del nacimiento de las neuronas que van a formar el núcleo c Timidina Tritiada	on 73
4. Marcaie de las neuronas que forman la población del Núcleo Ectomamilar	75
a) Patrón de marcaje de la proteína Calretinina	75
b) Patrón de marcaje de la proteína Calbindina	
c) Patrón de expresión de las células Acetilcolinesterasa	79
4.FIGURAS	
4.FIGURA 1	
4.FIGURAS FIGURA 1FIGURA 2	
4.FIGURAS FIGURA 1 FIGURA 2 FIGURA 3	
4.FIGURA 1 FIGURA 2 FIGURA 3 FIGURA 4	82
4.FIGURAS FIGURA 1 FIGURA 2 FIGURA 3 FIGURA 4 FIGURA 5	82 83 85 87 89 91
4.FIGURAS FIGURA 1 FIGURA 2 FIGURA 3 FIGURA 4 FIGURA 5 FIGURA 6	82 83 85 87 89 91 93
4.FIGURAS. FIGURA 1 FIGURA 2 FIGURA 3 FIGURA 4 FIGURA 5 FIGURA 6 FIGURA 7	82 83 85 87 89 91 93 95
4.FIGURAS. FIGURA 1 FIGURA 2 FIGURA 3 FIGURA 4 FIGURA 5 FIGURA 6 FIGURA 7 FIGURA 8	82 83 85 87
4.FIGURAS. FIGURA 1 FIGURA 2 FIGURA 3 FIGURA 4 FIGURA 5 FIGURA 6 FIGURA 7 FIGURA 8 FIGURA 9	82 83 85 87 89 91 93 93 95 97 99
4.FIGURAS	82 83 85 87 89 91 93 93 95 97 99

FIGURA 12)5
FIGURA 13)7
FIGURA 14)9
FIGURA 15	11
FIGURA 16	13
FIGURA 17	15
FIGURA 18	17
FIGURA 1911	19
FIGURA 20	21
FIGURA 21	23
FIGURA 22	25
FIGURA 23	27
FIGURA 24	29
FIGURA 25	31
FIGURA 26	33
FIGURA 27	35
FIGURA 28	37
FIGURA 29	39
FIGURA 30	11
5.DISCUSIÓN14	-3
1. Citoarquitectura y origen del Núcleo Ectomamilar en el embrión de pollo	14
2. Migración de las células del Núcleo Ectomamilar14	19
3. Distribución de las células del Núcleo Ectomamilar15	52
a) CB y CR	52 56
6 CONCLUSIONES 15	8

7.BIBLIOGRAFÍA

1.Introducción

Introducción

El núcleo Ectomamilar constituye una parte de una vía visual que integra mucha información y hasta el momento ha sido muy poco estudiada, el sistema óptico accesorio. En esta vía están implicadas, la retina y estructuras pertenecientes al hipotálamo, cerebelo, mesencéfalo y tálamo entre otras. Muchas de estas conexiones aún no han sido descritas. Nuestro estudio pretende aportar datos que permitan un mejor conocimiento de este núcleo implicado en esta vía accesoria así como su desarrollo durante la embriogénesis del pollo.

Si bien la anatomía y función del núcleo ectomamilar (EM) o núcleo de la raíz óptica basal (nBOR), como también se denomina, son conocidas (Clarke, 1977; Brauth y Karten, 1977;Fite y col.,1977; Brecha y Karten, 1979; Fite y col., 1979; Reiner y col.,1979; Brecha y col.,1980; Fite y col.,1981; Rio y col.,1983; Semm y col.,1984; Wylie, 1996) y lo sitúan en el seno de un sistema neural de creciente interés, muchos aspectos de su desarrollo permanecen ignorados, en particular cuándo se originan sus neuronas y el modo en que éstas alcanzan la posición superficial característica, para relacionarse sinápticamente con la vía óptica accesoria o basal. Los datos anatómico fisiológicos disponibles para esta formación permiten tomarlo en consideración como un modelo causal *sui generis* para llegar a comprender mejor la conectividad de un subsistema retiniano importante por su relación con los sistemas vestibulocerebelosos y los núcleos oculomotores.

En todos los vertebrados los núcleos retinorecipientes en el pretecho y AOS (Sistema óptico accesorio) están envueltos en el análisis de flujo óptico y la generación de OKR (movimientos optokinéticos). Debido a esta importante función el núcleo Ectomamilar ha sido objeto de diferentes investigaciones y su denominación ha ido variando a medida que los estudios morfogenéticos se han

actualizado, así se han referido a él como: ganglio ovoide (Bellonci, 1883), núcleo ventral mesencefálico (Rio J, 1979), ganglio ectomamilar (Ramón y Cajal, 1898), núcleo peduncular de la Raíz Óptica Basal, (nBOR, Karten y col., 1977), núcleo ectomamilar (Edinger ,1888; Palgrem, 1921; Rendahl, 1924; Cowan y col., 1961; Repérant, 1973; Brauth y Kartén, 1977.

Muchos autores situaban a este núcleo en el tegmento mesencefálico, pero siguiendo una definición embriológica más actualizada Martinez de la Torre (1985) observó en reptiles que este núcleo hace relieve en la superficie caudoventral del diencéfalo. En aves observa que dicha población es el componente más ventral de la porción comisural del sinencéfalo (Prosómero 1) junto con el núcleo Pretectal externo (PE); aparece caudal, ventral y medial al extremo inferior del PE, en forma de un acúmulo ovalado de eje mayor rostrocaudal, en el que se detectan neuronas grandes, medianas y pequeñas dentro de un neuropilo.

En aves, estas estructuras son los núcleos LM o PE del pretecho y nBOR o núcleo ectomamilar del AOS.

Los homólogos mamíferos de LM y nBOR son respectivamente, NOT del pretecho y MTN y LTN del AOS (Iwaniuk A y col. 2009).

En muchos artículos, el LM y nBOR han sido erróneamente agrupados juntos en el AOS, pero a pesar de sus similares funciones, Giolli y col. (2006) enfatizó que los núcleos optokinéticos en el pretecho y AOS difieren con respecto a su conectividad y neuroquímica.

El objetivo de esta Tesis es profundizar en el estudio detallado del desarrollo de este núcleo en embriones de pollo. Para ello realizamos un seguimiento temporal

del nacimiento de las neuronas que forman el núcleo para estudiar su origen, así como el estudio del desplazamiento de su población neuronal.

Antes de entrar a detalle de los objetivos a continuación se presenta una revisión sobre el núcleo Ectomamilar dentro del contexto del desarrollo, organización y evolución del cerebro y, en particular, del Diencéfalo.

Desarrollo del SNC de los vertebrados

El encéfalo humano comparte un patrón morfológico básico y fundamental con todos los demás vertebrados. La siguiente sinopsis de las principales características de este patrón se basa, principalmente, en los estudios embriológicos clásicos de los investigadores suecos Bergquist y Kallén y sus colaboradores, 1954; Kallen, 1965; Vaage, 1969; Keyser, 1972, y en el trabajo reciente de Puelles y Rubenstein y de sus colaboradores (Rubenstein & Puelles, 1993).

- Las paredes laterales del encéfalo pueden ser divididas en una serie de unidades o campos básicos formados por la intersección de neurómeros de orientación transversal con zonas de disposición longitudinal.
- Dos dominios longitudinales, la placa basal y alar, se extienden a lo largo del neuroeje. La zona limitante longitudinal o límite alar-basal, finaliza rostralmente justo detrás del quiasma óptico. Este límite se aproxima al concepto de surco limitante de His (His, 1983), el cual básicamente separaba las neuronas de diferenciación precoz de la placa basal de las células más tardías de la placa alar. Este límite se puede rastrear en todos los vertebrados mediante marcadores moleculares.
- Las unidades morfológicas básicas representan complejos radiales tridimensionales, que se extienden desde la superficie ventricular hasta la superficie pial (meníngea). Cada una de estas unidades forma un centro de

proliferación, que produce células postmitóticas que migran en sentido radial y que, después de alcanzar su posición final, participan en la formación de diferentes clases de estructuras.

1. Morfogénesis Temprana: Neurulación

Para comprender el cerebro debemos entender cómo surge y los cambios que sufre a lo largo de la vida.

Los primeros procesos del desarrollo animal siguen un patrón fijo. Tras la fecundación una serie de rápidas divisiones celulares subdividen al cigoto y lo transforman en una mórula que pasa a denominarse blástula cuando sus grandes células se disponen como una pelota hueca con una cavidad interna llamada blastocisto. A continuación se desencadena un proceso de movilización masiva de células que se conoce como gastrulación, en las que se forman las tres capas germinales del embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo.

Paralelamente al proceso de gastrulación comienza otro igualmente importante, conocido como inducción primaria. Básicamente consiste en que las células del mesodermo intraembrionario axial (la placa precordal y prolongación cefálica) ejercen un potente efecto sobre las tres hojas embrionarias induciendo y organizando su ulterior desarrollo. Esta inducción primaria puede ser descompuesta, según la hoja embrionaria sobre la que actúa, en inducción neural, inducción mesodérmica e inducción endodérmica.

La primera manifestación visible del efecto de la inducción neural es el cambio de morfología celular, la cual lleva consigo una reorganización del

citoesqueleto en una serie de pasos dinámicos que hacen inestable la forma plana inicial de la placa neural y la llevan a replegarse sobre sí misma. Vemos así la elevación progresiva de las crestas neurales, formando primero un canal neural y luego llegando a cerrarse por adhesión y fusión de los dos bordes que se encuentran mutuamente en la línea media dorsal. Este proceso de "canalización", lo denominamos neurulación. Es importante que la neurulación culmine con la transformación del canal neural en un tubo neural completamente cerrado. Quedan zonas abiertas transitoriamente al exterior- rostral y caudal, que llamamos neuroporos anterior y posterior. El cierre del tubo neural progresa en ambas direcciones hasta completarse, primero rostralmente y algo más tarde caudalmente.

Conforme progresa la neurulación, el canal neural se va alargando y plegando sobre su línea media ventral para producir el tubo neural.

Tras la neurulación, se instaura una fase de proliferación intensa del neuroepitelio, generándose el aumento de superficie característico de los procesos de vesiculación y segmentación. Todas las células neuroepiteliales se dividen, aunque a diferente ritmo (ciclos mitóticos de diferente duración) lo que da lugar a las expansiones y contracciones (vesículas, neurómeros) de la forma cerebral incipiente. Tras la fase de proliferación y crecimiento rápido inicial, se sucede un largo periodo en el que esta proliferación neuronal continúa, pero acompañada de producción de células cuyos cuerpos abandonan la capa ventricular y se acumulan en la capa marginal generando la capa del manto. Este proceso, así como los movimientos que realizan dentro de esta capa hasta llegar a su lugar de diferenciación definitiva, se denomina migración neuronal. La migración neuronal se ha definido en dos tipos de acuerdo con la orientación y dirección del movimiento celular, aunque hay clases de neuronas que realizan ambos tipos de migración en diferentes fases de su diferenciación inicial:

- Migración radial: es el movimiento desde la capa ventricular a la capa del manto, siguiendo básicamente la dirección radial del neuroepitelio circundante. Es el tipo de migración más importante en el encéfalo de los mamíferos.
- Migración tangencial: es el movimiento paralelo a la superficie del tubo neural, dentro de la capa del manto. Este mecanismo de migración va a producir fundamentalmente un desplazamiento a otro entorno histogenético vecino o lejano.



Figura 1.El esquema ilustra las etapas del cierre del tubo neural. A. 18 días; B.20 días; C. 22 días; E. corte transversal del embrión de 18 días; F. corte transversal del embrión de 20 días; G. corte transversal del embrión de 22 días de incubación.(Tomado de Sanes D, 2002).

a) Génesis temprana en aves:

El estudio de estas dos fases, gastrulación y neurulación, en embriones de aves es más rápida debido a que su desarrollo sigue una serie de 46 estadios que cronológicamente comienza con la fecundación del huevo y finaliza con su rotura y el nacimiento del polluelo. Esta serie de estadíos (HH) debe su nombre a sus creadores (Hamburger & Hamilton, 1951). Este desarrollo embrionario es considerablemente rápido ya que los 46 estadíos se completan en 21 días. (Tabla 1) En aves, la neurulación comienza a las veintidós horas desde la fecundación, cuando el embrión se encuentra en el estadío HH7. A las veintisiete horas comienza el cierre del tubo neural (HH9) quedando el neuroporo abierto hasta el estadío HH11.

La flexura cefálica se inicia en el estadío HH10 y la flexura pontina es visible desde HH27 y se incrementa considerablemente en HH31. El cerebelo se reconoce desde el décimo día (HH36) y la primera fisura aparece el décimo primer día (HH37). En el embrión de ave los rasgos esenciales del cerebro están presentes el décimo segundo día (HH38). (Dubbeldam JL, 1998).

2. Vesiculación y segmentación

La regionalización del cerebro es un proceso progresivo que empieza muy temprano, durante la neurulación y vesiculación (Marín y Rubenstein, 2002).

El modelo prosomérico del desarrollo del prosencéfalo (Bulfone y col., 1993; Figdor y Stern, 1993; Puelles y Rubenstein, 1993; Rubenstein ycol., 1994), postula que antes del cierre completo del neuroporo anterior aparecen ya las vesículas ópticas, que se forman por evaginación de sendos territorios circulares a cada lado del extremo anterior del tubo neuronal. Poco después de la primera aparición de las vesículas ópticas distinguimos a grandes rasgos tres regiones abombadas del tubo neural: 1. El prosencéfalo primario, que comprende toda la porción anterior dilatada del tubo, incluyendo a las vesículas ópticas como divertículos laterales.

2. El mesencéfalo o vesícula intermedia.

3. El rombencéfalo o región trasera, que en realidad consta desde un principio de al menos tres vesiculaciones independientes.

Desde su propuesta inicial (Puelles y Rubenstein, 1993), el modelo prosomérico ha sufrido pequeñas variaciones para encajar nuevos datos e interpretaciones sobre el desarrollo del prosencéfalo (Martínez y Puelles, 2001; Puelles, 2001; Puelles y Rubenstein, 2003). En todas sus versiones (Fig.2), el prosencéfalo primario queda dividido en dos dominios transversales anteroposteriores como consecuencia de una subdivisión secundaría, formándose dos protovesículas: el diencéfalo caudalmente y el prosencéfalo secundario rostralmente. El prosencéfalo secundario va a estar constituido por el hipotálamo ventralmente, el telencéfalo dorsalmente y las vesículas ópticas a cada lado, mientras que el diencéfalo dará lugar al tálamo y pretecho dorsalmente, y varios territorios tegmentales ventralmente (Puelles y col., 1987; Puelles y Rubenstein, 2003) (Fig. 2). Mientras que el prosencéfalo secundario es precordal, y queda bajo la influencia de señales inductoras precordales, el diencéfalo es principalmente epicordal (Shimamura y col., 1995; Echevarría y col., 2003). La existencia de estas dos subdivisiones en el prosencéfalo - prosencéfalo secundario y diencéfalo y la extensión de cada una queda también apoyada por datos de mutaciones de genes reguladores del desarrollo, que afectan a una u otra subdivisión de forma distinta. Por ejemplo, los mutantes de Six3 (que se expresa específicamente en el prosencéfalo secundario) presentan una ausencia de formación del prosencéfalo

secundario, pero la formación del diencéfalo no está afectada (Lagutin y col., 2003). La subdivisión segmentaria del diencéfalo ha guedado también apoyada por estudios de transplantes (López-García y col., 2004). La concepción del diencéfalo y del prosencéfalo secundario propuesta por el modelo (que está apoyada por los estudios de genes reguladores del desarrollo y mapas de destino) contradice los estudios neuroanatómicos clásicos, que incluyen en el diencéfalo tanto el tálamo como el hipotálamo. Una de las principales aportaciones del modelo prosomérico es que ofrece un eje de coordenadas que permite entender mejor los patrones de expresión génica, los efectos o resultados de mutaciones, inducciones, trasplantes y otras manipulaciones experimentales, así como la disposición de las subdivisiones del prosencéfalo con respecto a los ejes. Por ejemplo, el modelo implica que el tálamo ventral (p3) es rostral al tálamo dorsal (p2), mientras que las vesículas telencefálicas, evaginadas desde la región más dorsal de la placa alar del prosencéfalo secundario, están constituidas solo por territorio alar (Fig. 2). Además, el modelo se puede aplicar a las distintas especies de vertebrados y predice la existencia de prosómeros y subdivisiones intraprosoméricas homólogas entre los distintos grupos (Puelles, 1995; Puelles y col., 1996).

La regionalización del cerebro es un proceso progresivo que empieza muy temprano, durante la neurulación y vesiculación (Marín y Rubenstein, 2002).

El modelo prosomérico del desarrollo del prosencéfalo (Bulfone y col., 1993; Figdor y Stern, 1993; Puelles y Rubenstein, 1993; Rubenstein ycol., 1994), postula que antes del cierre completo del neuroporo anterior aparecen ya las vesículas ópticas, que se forman por evaginación de sendos territorios circulares a cada lado del extremo anterior del tubo neuronal. Poco después de la primera aparición de las vesículas ópticas distinguimos a grandes rasgos tres regiones abombadas del tubo neural:

- El prosencéfalo primario, que comprende toda la porción anterior dilatada del tubo, incluyendo a las vesículas ópticas como divertículos laterales.
- 2. El mesencéfalo o vesícula intermedia.
- 3. El rombencéfalo o región trasera, que en realidad consta desde un principio de al menos tres vesiculaciones independientes.

El avance de los procesos de crecimiento y especificación genética de las partes del tubo neuronal (ahora controlado por genes de segmentación e interacciones morfogenéticas entre las diferentes vesículas) conduce a la **subdivisión transversal** de las vesículas primarias en segmentos o neurómeros, particularmente en el prosencéfalo (cuyos segmentos se denominarán prosómeros) y en el rombencéfalo (segmentos llamados rombómeros y pseudorombómeros). Así el prosencéfalo primario se desdobla en prosencéfalo secundario y diencéfalo.

El prosencéfalo secundario es, como su nombre indica, la porción más rostral, e incluye las vesículas ópticas a cada lado. Su parte basal formará el territorio hipotalámico del cerebro adulto. Su parte dorsal es inicialmente simple, pero presentan más tarde el abombamiento bilateral de las vesículas telencefálicas, a partir de las cuales deriva el telencéfalo adulto. El extremo rostral del tubo neuronal queda a nivel de la lámina terminal, en el extremo anterior de la región preóptica, la prospectiva región quiasmática y la región anterobasal del hipotálamo. El borde del neuroporo anterior cerrado coincide con la futura comisura anterior.

La protovesícula diencefálica se subdivide a su vez en tres segmentos o prosómeros 1-3 (P1-P3). De atrás a delante, estos contienen

respectivamente en sus partes dorsales los territorios prospectivos del pretectum o región pretectal (P1 alar), Tálamo mas epitálamo y glándula pineal (P2 alar), y pretálamo (P3 alar).

Las respectivas partes ventrales de los neurómeros diencefálicos se encuentran por detrás de la región mamilar la concepción embriológica moderna que acabamos de resumir choca con el concepto clásico de "diencéfalo", ya que en este se interpreta el territorio hipotalámico como la base del diencéfalo en vez de como la base del prospectivo telencéfalo, donde se hace terminar erróneamente el eje longitudinal.

Al igual que existe la división transversal, se distingue una **subdivisión longitudinal** primaria, que es pronto traducida en histogénesis diferencial. Esto quiere decir que la especificación, proliferación y diferenciación de neuronas se regula de forma independiente y cronológicamente diferente en distintas áreas dorsoventrales de la pared de cada segmento. Se distinguen 4 columnas longitudinales que atraviesan a cada lado tanto el diencéfalo como el prosencéfalo secundario, continuándose las de la derecha con las de la izquierda en el extremo más rostral (Fig. 2). Se trata de las placas alar, basal, del suelo y del techo.

 La placa basal, incluye sucesivas áreas histogenéticas segmentarias en serie, caracterizadas por presentar diferenciación precoz y terminar rápidamente su producción neuronal. Ello da lugar a poblaciones neuronales de tamaño más bien reducido. Como características generales de su conectividad tienden a establecer conexiones con otras áreas basales del neuroeje, pudiendo alcanzar sus axones la médula espinal.

Se ha estudiado poco la región basal diencefálica, ocupada también por las partes más rostrales de la sustancia negra. Se puede englobar los tres territorios basales en los conceptos de *tegmento* pretectal (P1), tegmento prerrubal o talámico (P2) y tegmento post mamilar o pretalámico (P3) refiriéndose a su posición relativa ya sea al pretectum, al núcleo rojo y al complejo mamilar/retromamilar. La columna basal se continúa asimismo en el prosencéfalo secundario, constituyendo el hipotálamo basal.

- La placa del suelo, es un concepto reciente (antiguamente se pensaba que esta placa terminaba en el istmo). Se refiere al territorio longitudinal presente en la parte ventral y media de las vesículas más rostrales del tubo neural. Esta zona longitudinal se caracteriza por presentar un periodo neurogenético relativamente más tardío que la placa basal. Se descompone en una parte *caudal epicordal* (desarrollada sobre el extremo anterior de la notocorda) en el mesencéfalo y el diencéfalo propiamente dicho (p1-p3), y una parte *rostral precordal* (desarrollada sobre la placa precordal) en el suelo del hipotálamo.
- La placa alar es el territorio longitudinal más extenso, lo cual es debido a la prolongada actividad proliferativa y la retardada diferenciación neuronal que la caracteriza. Funcionalmente, las poblaciones neuronales alares presentan grandes diferencias entre sí, ya que tienden a especializarse considerablemente. En general, la placa alar produce las astas posteriores de la médula y las columnas sensitivas del tronco encefálico, el cerebelo, ciertos núcleos ístmicos, los cuerpos cuadrigéminos, el pretectum, el tálamo, el pretálamo, la retina y el telencéfalo.

La placa del techo, adopta esencialmente tres aspectos histogenéticos a lo largo del eje anteroposterior. En la médula, cerebelo, istmo, mesencéfalo, pretectum y lámina comisural telencefálica queda reducida a la línea media dorsal, con una estructura de tabique astroglial radial, pobre en neuronas, con una función análoga a la placa del suelo (banda epicordal) en lo que respecta a la guía de fibras a su través (formación de comisuras y decusaciones). Podemos destacar de caudal a rostral la comisura blanca posterior de la médula, la comisura cerebelosa, la comisura posterior (P1), la comisura habenular (p2) y las comisuras hipocámpica y del cuerpo calloso (Fig. 2).



Figura 2. Esquema donde se ilustra la incurvación axial y la segmentación transversal del tubo neural rostral en relación a las partes del mesodermo axial (placa precordal y notocorda). El límite alar basal aparece representado por líneas discontinuas. La flecha representa la flexura cefálica. Abreviaturas: Cb,Cerebelo; D, Diencéfalo; PP, Placa precordal; M, Mesencéfalo; NC, Notocorda; Tel, Telencéfalo; SP,secundario; Is, Istmo; p1-p3, Prosómeros ; r1-6, Rombómeros 1-6; r7-11, Pseudorombómeros 7-11 (Puelles y col., 2003).

Desde fases muy tempranas del proceso de neurulación, el tubo neuronal incipiente se comienza a doblar sobre su eje longitudinal. Inicialmente se marca centralmente la flexura cefálica, cuyo ápice se centra en la zona ventral del diencéfalo (P2-P3).

Esta flexura se identifica en fases subsiguientes del desarrollo de tal manera que el suelo del hipotálamo se aproxima a la región pontina del rombencéfalo, quedando el diencéfalo y el mesencéfalo en torno al ápice de la flexura.

Más caudalmente aparece la flexura cervical en la transición del bulbo a la medula espinal. Esta inflexión del eje de concavidad también ventral, es menos marcada. Una tercera flexura constante es la flexura pontina, la cual muestra una concavidad dorsal opuesta a las anteriores y esta centrada en la región R3-R4 del rombencéfalo.

3. Morfogénesis secundaria

A partir de la forma segmentada del tubo neural llegamos a la forma adulta del SNC, si tenemos en cuenta ciertos procesos de desarrollo desigual, que generan nuevos relieves o cambios de la forma aparente. Uno de los motores básicos de estas transformaciones tardías es la progresiva restricción de la capacidad proliferativa del tubo neural a los territorios dorsales y, en menor medida, en ciertas regiones ventrales paramedianas. Como resultado general, las estructuras de origen dorsal crecen mucho más y llegan a formar una parte desproporcionadamente grande del cerebro adulto (telencéfalo, tálamo, techo diencefálico). A este efecto de proliferación diferencial se suma la **migración tangencial** de grandes poblaciones neuronales desde el labio rómbico, las cuales se desplazan activamente a varias posiciones secundarias en la región ventral del tubo neural, donde generan sendos relieves (núcleos pontinos y oliva bulbar). Finalmente, el crecimiento de grandes paquetes de fibras cerca de la superficie contribuye igualmente a moldear la forma final del cerebro.

30

La morfogénesis secundaria del diencéfalo implica un crecimiento desproporcionado de sus elementos neuroméricos p1-p3 (pretectum, tálamo y pretálamo).

Diencéfalo

El diencéfalo es la porción encefálica situada inmediatamente rostral al mesencéfalo y representa la continuación caudal del prosencéfalo hasta el hipotálamo. Al igual que el mesencéfalo, el diencéfalo es una porción impar de forma irregularmente tubular. Posee una cavidad ventricular que es notablemente más voluminosa que la que vemos en el mesencéfalo y recibe el nombre de III ventrículo.

Tradicionalmente, el diencéfalo humano se divide en cuatro zonas dispuestas en sentido dorsoventral: epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo. Esta subdivisión, que se basó en los estudios anatómicos comparativos de Herrick (1933) pronto se difundió y fue aplicada también al diencéfalo embrionario humano. El hipotálamo clásico representaba la parte más ventral del diencéfalo, donde formaría el suelo del tercer ventrículo y contribuiría al desarrollo de sus paredes laterales, actualmente desde un punto de vista estrictamente embriológico (segmentación neural), el hipotálamo es el "suelo" solamente de la región precordal del prosencéfalo secundario (formado por hipotálamo, ojo y telencéfalo).

El patrón anteroposterior del diencéfalo conduce a la especificación diferencial molecular y la regionalización en tres segmentos o neurómeros, conocidos en los últimos tiempos como prosómeros, los cuales comparten un esquema de organización con todas las zonas longitudinales fundamentales que son continuas

unas a partir de las otras. Un mapa detallado de estos prosómeros de destino en la etapa del tubo neural se produjo recientemente trazando los principales derivados alares y basales (García-López et al 2004). La principal diferencia de este trabajo con lo después publicado en el atlas (Puelles et al 2007) es que esos autores colocan el núcleo retromamilar en el diencéfalo en P3 y en el atlas se cree que la colocación correcta es en el hipotálamo. Esto afecta a la clasificación de otros núcleos que se originan en la zona.

Por tanto, el diencéfalo propiamente dicho consta de tres segmentos epicordales o neurómeros (sinencéfalo , parencéfalo posterior y parencéfalo anterior). Sus respectivas porciones alares desarrollan las agrupaciones nucleares del pretecho (P1), del tálamo(P2) y del pretálamo (P3) respectivamente. Sus porciones más ventrales (placa del suelo) aparecen comprimidas en la parte rostral de la fosa interpeduncular, entre los cuerpos mamilares y la raíz del III par craneal.

El sinencéfalo (P1) genera la región pretectal o pretectum y una zona tegmental dentro de la que se diferencian el núcleo intersticial de Cajal y la parte parvocelular del núcleo rojo. El parencéfalo posterior (P2) da origen al epitálamo (núcleos habenulares mas epífisis) y al tálamo (tálamo dorsal), mientras que el pretálamo (tálamo ventral)(P3) se desarrolla dentro del parencéfalo anterior. Según Puelles (Puelles L, 2001) el tercer neurómero diencefálico, P3, incluye la eminencia pretalámica en su parte más dorsal.



Figura 3. Esquema donde se representan los tres prosómeros o neurómeros en los que se divide el Diencéfalo. La línea continua indica el límite alar/basal.p1-p3, prosómeros 1-3. (Puelles L, 2003)

1. Diencéfalo: organización nuclear

a) Pretectum (P1)

El pretectum es una región exclusivamente alar perteneciente al prosómero 1 y que se encuentra encajado entre el tálamo del diencéfalo y el mesencéfalo. (Fig. 4).

Se distinguen tres territorios en el pretectum. Caudalmente está el pretectum comisural, caracterizado por ser la zona ocupada por las fibras de la comisura posterior y las neuronas que nacen en esta zona y se incorporan al manto atravesando el plano de estas fibras, una zona intermedia relativamente estrecha, llamada pretectum yuxtacomisural, donde nacen núcleos específicos. Finalmente, por delante de este se encuentra el territorio pretectal mas rostral, el pretectum precomisural, el cual ya limita por delante con el tálamo. Este territorio es el que produce la población pretectal más voluminosa,

el núcleo pretectal anterior. En su parte superficial recibe proyecciones de la vía óptica.

Una formación que parece derivar del pretectum yuxtacomisural superficial, es el complejo terminal de la vía óptica basal, descompuesto en un pequeño núcleo terminal dorsolateral y un núcleo terminal medial de la vía óptica basal. Este último se encuentra desplazado en posición muy ventral, abrazado por la sustancia negra compacta. Dorsalmente a estos dos grupos yuxtacomisurales aparece el núcleo olivar pretectal, el centro pretectal para el reflejo pupilar.

Estos tres núcleos reciben proyecciones ópticas a través de un contingente particular de axones retinianos, el tracto óptico basal, que circula primero basal a la cintilla óptica, separado de la misma desde detrás del quiasma óptico hasta llegar al núcleo terminal medial, (núcleo ectomamilar) al que cede terminales. Luego sigue por el tracto peduncular transverso, un delgado filamento que se ve cruzar superficialmente el pie del pedúnculo en dirección dorsal, hasta encontrar al núcleo terminal dorsolateral y el núcleo olivar pretectal.

b) Tálamo: Complejos nucleares del Tálamo

La voluminosa masa nuclear del tálamo (Fig.4) se desarrolla en la placa alar del prosómero 2, complementada directamente por el epitálamo o complejo habenular. Su gran tamaño se correlaciona con el desarrollo de la corteza cerebral y otras formaciones telencefálicas con las que sus neuronas se relacionan estrechamente. Se considera el tálamo como la principal puerta de entrada de señales al telencéfalo. Esta masa nuclear se encuentra atravesada por las numerosas fibras aferentes y eferentes que aseguran su conectividad. Tales fibras tienden a acumularse en determinadas zonas, llamadas láminas medulares. Se distingue así la lámina medular externa y la lámina medular interna del tálamo. La lámina medular externa es una extensa cáscara anterior, lateral y ventral, que separa al tálamo del pretálamo y recibe también el nombre zona limitans intertalámica. Coincide con el límite interneuromérico alar entre P2 y P3.

c) Epitálamo

Esta región nuclear, también llamada habénula, es un pequeño añadido dorsal al tálamo. El epitálamo posee dos subdivisiones principales: núcleos habenulares lateral y medial. Ambos proyectan a través del tracto retroflejo, que recorre longitudinalmente el suelo de P1, del mesencéfalo y del istmo y finalmente alcanza el núcleo interpeduncular el cual se extiende en la línea media, a caballo del rafe medio, a través de los rombómeros 1 y 2. Al llegar al núcleo interpeduncular, el tracto retroflejo se comporta de un modo único en el cerebro tal y como fue descrito por Santiago Ramón y Cajal: los axones zigzaguean repetidas veces a través de la línea media superficial, dentro del núcleo entrecruzándose con los del lado contrario, aparentemente sinaptando con neuronas a todo lo largo del complejo. Algunas fibras terminales, sobre todo del núcleo habenular lateral, proyectan también sobre los núcleos del rafe cercanos, así como sobre la sustancia negra y el área tegmental ventral del mesencéfalo y diencéfalo caudal.

Asociada al epitálamo, en su techo, está la glándula pineal o epífisis. Esta especialización del techo no contiene neuronas, estando compuesta por células gliales y células especiales llamadas pinealocitos. La glándula está densamente inervada por terminales serotoninérgicos procedentes de los núcleos del rafe, cuyo transmisor, la serotonina, aparentemente es usado por los pinealocitos para producir melatonina, su secreción principal.

d) Pretálamo

Es una región alar derivada del prosómero p3 diencefálico, se subdivide en tres grandes dominios histogenéticos: La eminencia pretalámica y las regiones pretalámica rostral y caudal.

Esta región se aplana progresivamente durante su desarrollo en la cercanía del ovoide talámico, quedando sus poblaciones neuronales desfiguradas por el paso a través de su territorio de todas las fibras que interconectan el tálamo con el telencéfalo. Las poblaciones neuronales del pretálamo no presentan proyecciones ascendentes al telencéfalo, limitándose a mantener conexiones longitudinales ipsi- y contralaterales con otras partes alares del prosencéfalo extratelencefálico y del mesencéfalo y conexiones dorsoventrales sobre la placa basal subyacente.

e) Eminencia pretalámica, actualmente se denomina habénula pretalámica (Atlas, 2007)

Esta pequeña región nuclear dorsal se comporta topológicamente con relación al pretálamo exactamente como lo hace el epitálamo con relación al tálamo (epi-pretálamo). La eminencia pretalámica (en P3 dorsal) y el epitálamo (en P2 dorsal) se encuentran unos a continuación


del otro y ambos contactan dorsalmente con la tela coroidea del III ventrículo, por detrás del techo del orificio interventricular.

Figura 4. Esquema que representa la estructura general del pretecho, tálamo y pretálamo (alar y basal). Tomado de Puelles y col., 2008, Neuroanatomía.

El sistema visual

El sistema visual consiste en algunas vías paralelas, y cada una de ellas cumple una función específica. El procesamiento de la información visual ya está presente a nivel de la retina, en donde se distinguen diferentes capas, siendo una de ellas la capa de células ganglionares y la capa de fibras del nervio óptico (**Fig. 5**).

Los axones de las células ganglionares pasan sobre la superficie interna de la retina y convergen hacia el polo posterior del ojo, donde atraviesan agujeros en la esclerótica y forman entonces el nervio óptico. Los nervios ópticos se dirigen hacia el quiasma óptico, que está situado en la base del encéfalo en la porción más rostral del hipotálamo. Dentro del quiasma óptico, ocurre una decusación parcial: las fibras provenientes de las mitades nasales de las retinas, que incluyen la proyección del campo visual monocular, cruzan hacia el lado opuesto; las que provienen de las mitades temporales de las retinas no cruzan. Después de esta decusación parcial, los axones de las células ganglionares de la retina continúan sin interrupción por detrás del quiasma como dos tractos ópticos divergentes. Éstos se arquean alrededor de las caras laterales del diencéfalo hasta que alcanzan los cuerpos geniculados laterales, donde terminan la mayoría de sus fibras. Sin embargo, algunas fibras continúan en dirección mediocaudal y se dirigen a través del tubérculo cuadrigémino superior al colículo superior, a la región pretectal y a los núcleos terminales del sistema óptico accesorio.



Figura 5. Vía visual central. Tomado de Puelles, 2008, neuroanatomía.

1. Vías visuomotoras

Las vías visuomotoras incluyen las vías reflejas para acomodación, vergencia y estabilización del ojo, y las vías involucradas en los sacádicos voluntarios y el seguimiento suave de objetos en movimiento. Existen dos sistemas principales que impulsan los movimientos oculares conjugados. Uno es el arco reflejo de tres neuronas del reflejo oculovestibular, que conecta cada conducto semicircular, a través de los núcleos vestibulares, con los pares de músculos que mueven el ojo en el plano de este plano semicircular. Este sistema fue desarrollado en invertebrados para estabilizar la posición del ojo en el espacio y se mantuvo presente, escasamente alterado, en el encéfalo de mamíferos. Las vías utilizadas por el reflejo oculovestibular son compartidas por el reflejo optocinético, reflejo que estabiliza el ojo por los movimientos de seguimiento suave y genera movimientos sacádicos. Este reflejo junto con el oculovestibular reciben su información acerca del "desplazamiento retiniano" del sistema óptico accesorio y del núcleo del tracto óptico. El seguimiento suave comprende el procesamiento de información sobre dirección y velocidad de un objeto que es rastreado por las áreas corticales visuales y la supresión simultánea del reflejo oculovestibular.

Los sacádicos son movimientos oculares rápidos que redirigen la línea de la vista hacia un área de interés y aseguran que el punto diana caiga sobre la fóvea muy pequeña.

2. El sistema óptico accesorio (AOS)

A partir del quiasma óptico, ciertas fibras retinianas se separan en bloque de la cintilla óptica (también conocida como tracto óptico lateral o principal) y circulan paralelamente a ella por el diencéfalo en una posición algo más ventral, formando el tracto óptico accesorio o basal. Este paquete de fibras procede de un subtipo especial de neuronas ganglionares y va dirigido específicamente a unos núcleos de la región pretectal. Al llegar a esta región sus fibras la recorren superficialmente de ventral a dorsal, pasando por el tracto peduncular transverso, para sinaptar sobre sus dianas. Su posición nos indica dónde se encuentra lateralmente el límite entre el pretectum y el mesencéfalo (Van der Want y col., 1992).

Los núcleos terminales de la vía óptica basal: dorsal, lateral y medial, (Fig. 6) proceden de un esbozo embrionario único y reciben por la vía óptica basal un subconjunto particular de axones retinianos procedentes de células ganglionares que detectan el movimiento del fondo de la escena visual con relación a los objetos en primer plano. Esto se produce cuando estamos en movimiento; por ejemplo, al avanzar por una carretera, los árboles y las casas se desplazan aparentemente a los lados respecto al fondo y a nosotros. Una parte de esta población neuronal pretectal computa los desplazamientos horizontales ٧ otra parte los desplazamientos verticales. Sus proyecciones hacia el cerebelo, puente oliva bulbar y formación reticular median las respuestas ocumolotoras reflejas que conocemos como reflejo de nistagmus u optocinético en estos dos planos espaciales. Este reflejo, desencadenado automáticamente al movernos en el medio que nos rodea, consiste en dos fases: primero ocurre un seguimiento lento con ambos ojos de algún objeto cercano que parece desplazarse y, luego se salta rápidamente (movimiento sacádico) a un segundo objeto cuando se pierde de vista al primero, para seguirlo lentamente. Se piensa que es una actividad exploratoria automática del

mundo visual, ya que el análisis de lo que estamos viendo al mover así los ojos nos informa de la distancia relativa y del movimiento autónomo de los objetos. Con respecto a la distancia, las cosas más cercanas parecen desplazarse cuantitativamente más que las lejanas. Sin embargo, todos los objetos inmóviles poseerán vectores de movimiento aparente divergentes que son congruentes en su perspectiva espacial con nuestro propio movimiento, que es el causante único del suyo aparente. Cualquier detalle visual de la escena que se destaque por presentar un vector incongruente llamará potencialmente la atención, ya que implica que algo se está moviendo por sí mismo, independientemente de nosotros. Por lo tanto, el aparentemente inocente vaivén ocular del nistagmus es una trampa inconsciente para detectar y localizar cosas que se mueven por sí mismas en el mundo circundante. Es un procesamiento vital para todo animal que se desplaza en su medio, ya sea para localizar víctimas, cuando se actúa como depredador, o para localizar depredadores que nos puedan tomar por posibles víctimas. Incluso los invertebrados tienen un mecanismo similar (Blair y col., 1999).

Un estudio reciente del Sistema óptico accesorio (Giolli y col., 2006) pone de manifiesto las similitudes y diferencias en la organización anatómica del AOS en mamíferos y no mamíferos, resaltando un gran avance en distintas áreas como por ejemplo aquellas en las que Van der Want y col., demostraron que un prominente sistema de neuronas Gabaérgicas del núcleo MTN contactan con el soma y dendritas de neuronas no Gabaérgicas del NOT.

Otra contribución para entender el AOS ha resultado del estudio de los neurotransmisores y receptores cuya conclusión es que la mayoría de las neuronas MTN-NOT son Gabaérgicas. Schmidt y col., en sus estudios farmacológicos revelaron que la bicuculina, un receptor antagonista del GABA A, incrementa la actividad espontánea NOT/DTN sin ninguna acción

inhibitoria sobre las neuronas Gabaérgicas de MTN que proyectan sobre NOT. De esta forma vincularon receptores GABA B y no GABA A con el control de estabilización de la mirada.



Figura 6. Esquema que representa un mapa topológico del recorrido de la cintilla óptica y la vía óptica basal o accesoria, con la posición de sus territorios de proyección. Tomado de Puelles L y col., 2008

Núcleo Ectomamilar

El núcleo ectomamilar (EM) o núcleo de la raíz óptica basal (nBOR) es una importante población diencefálica caudoventral, que se encuentra bajo el relieve formado por el tracto tectotalámico en su recorrido hacia la comisura supraóptica ventral. Esta formación recibe la raíz del tracto óptico basal, siendo esta proyección constante en los tetrápodos, presentándose de forma claramente homóloga en aves y reptiles (Martínez de la Torre, 1985). Este núcleo, forma parte del sistema Óptico Accesorio, una vía visual paralela a la principal que junto con el núcleo lentiformis mesencefálico (LM) o pretectal externo (PE) el cual es un núcleo del pretectum, están envueltos en el análisis del movimiento aparente del campo visual ("optic field flow") que resulta del movimiento propio.

El pretectum y el sistema óptico accesorio están altamente conservados en vertebrados: el LM es el homólogo en aves del núcleo pretectal del tracto óptico en mamíferos (NOT) y el núcleo de la raíz óptico basal (nROB) en aves es el homólogo de los núcleos terminal lateral y medial (MTN, LTN) del AOS en mamíferos (Simpson,1984; Fite,1985; McKenna & Wallman,1985; Weber,1985; Simpson et al.,1988b; Gamlin,2005; Giolli et al.,2005) (Fig. 7).

El núcleo pretectal externo (PE) y el núcleo Ectomamilar (EM) reciben proyección retiniana de una subpoblación específica de células ganglionares sensibles al desplazamiento de los estímulos, y proyecta al vestibulocerebelo, vehiculando esta información visual al cerebelo, a efectos de permitirle modular los reflejos optomotores (Clarke, 1977; Brauth y Karten, 1977; Fite y col., 1977; Brecha y Karten, 1979; Wylie, 1996).



Fiigura 7. Proyecciones eferentes del MTN, de acuerdo con experimentos en rata y conejo. (Tomado de la Figura 12, Giolli y col., 1984).

Estudios neuroanatómicos han indicado que el nBOR no es homogéneo, está constituido por diferentes tipos de células (Brecha et al., 1980; Zayats et al., 2002). En palomas, Brecha et al. (1980) describió tres tipos diferentes de células:

grandes células estrelladas (\approx 500 µm²), células ovoides medianas (\approx 300 µm²), y pequeñas células fusiformes (\approx 150 µm²). En pollos, Zayats et al.(2002) describió neuronas grandes (\approx 1000 µm²) las cuales eran multipolar o fusiforme, neuronas multipolar de mediano tamaño (\approx 500 µm²) y neuronas pequeñas (\approx 100-150 µm²) que eran fusiformes o multipolares.

El núcleo Ectomamilar es receptor de aferencias desde las células retinales desplazadas. Es rico en neurotransmisores y neuropéptidos, muchos de los cuales derivan de la retina (Britto et al., 1998). Este centro es altamente sensible a dianas en movimiento y está implicado en el nistagmo optokinético (OkN) vertical (McKenna y Wallman 1985) aunque un componente horizontal no puede ser excluido (Gioanni et al 1983b). Wylie y Frost (1990 a) discernieron cuatro divisiones que contienen células sensibles a movimientos hacia arriba, abajo, delante y atrás. Parte de las células son sensibles a estimulación binocular. La inervación GABAérgica parece ser importante en el control del OKN horizontal y vertical (Bonaventure 1992).

Wylie et al., (2007) propusieron funciones a los diferentes tipos de neuronas del nBOR, ya que no está considerado como una estructura homogénea y está constituida por diferentes subtipos morfológicos de neuronas, con proyecciones particulares. Esta hipótesis se basó en estudios hechos por Prochnow et al (2007), en los cuales encontró que neuronas NOT en la rata que proyectan al NOT contralateral y al colículo superior ipsilateral tiene diferentes propiedades electrofisiológicas de las que proyectan al IO. Las primeras están envueltas en movimiento sacádico y las segundas en una fase lenta del nistagmo optokinético.

Brecha et al (1980) observaron que el complejo nBOR se divide en: nBOR principal, nBORd (pars dorsalis) y nBORI (pars lateralis) y mediante una inyección de 3HLeucina / 3H- Prolina demostró que el nBOR proyecta al vestibulocerebelo:

Folia IX c,d , al complejo olivar inferior, al núcleo oculomotor, al n. intersticial de Cajal, al LM ipsilateral (Wylie et al.,1997), al tálamo dorsal (Wylie et al 1998b), a la línea media del mesencéfalo y al núcleo Ectomamilar contralateral. **(Fig. 8)**.



Figura 8. Resultados de una doble tinción desarrollada en palomas. Secciones coronales en secuencia rostro caudal. Los pequeños puntos indican terminales de axón teñidos anterogradamente de una inyección de BAD en el núcleo ectomamilar izquierdo, donde los puntos grandes representan los xomas teñidos retrógradamente de inyecciones bilaterales en la formación hipocampal. (Tomado de Figura 6, Wylie y col., 1999).

McKenna y Wallman (1981) encontraron que el nBOR lateralis es continuo con el LM y representa la parte caudomedial del LM. Además mostraron que con respecto a la preferencia de dirección del estímulo visual el lateralis se asemeja al LM más que al nBOR. En docenas de especies de aves, Iwaniuk y Wylie (2007) observaron en secciones coronarias teñidas con Nissl que el lateralis es continuo con LM y que las conexiones del nBOR, con el nBOR contralateral y el núcleo oculomotor no envuelven al lateralis. Por estas razones Wylie et al (2007) consideran que el nBOR lateralis forma parte del LM más que del complejo nBOR.

Aunque existen diferencias entre las especies (Giolli y col., 2006), el núcleo ectomamilar de especies no mamíferas y los núcleos del AOS de mamíferos podrían ser vistos como estructuras homólogas, anatómicamente, funcionalmente y en términos de mayoría, aunque posiblemente de no todas, las conexiones nerviosas básicas. La especificidad de proyecciones retinofugales a los núcleos del AOS parece estar determinado durante los estadios embrionarios por la presencia, tanto en células retinales, en las neuronas y neuropilos de estos núcleos, de un subconjunto específico de Cadherinas (moléculas de adhesión) llamadas cadherina6B y cadherina 7 (Wohrn y col., 1998).

Justificación y Objetivo

El cerebro de pollo es un modelo ideal para los estudios en el desarrollo embrionario, ya que tiene un fácil control de incubación y por tanto es relativamente sencillo conseguir embriones en los periodos necesarios para el estudio. Son de fácil manejo y además la proximidad filogenética de las aves con los mamíferos y reptiles ayuda a reconocer homologías en las estructuras. Existe una gran cantidad de estudios dedicados a las proyecciones y función del nBOR, pero muy pocos sobre su aparición y cómo sus neuronas migran desde su origen hasta su localización final. Teniendo en cuenta esto, con este trabajo hemos querido abordar aspectos desconocidos del núcleo Ectomamilar a lo largo del desarrollo embrionario del pollo.

Partiendo de la base de que el núcleo ectomamilar o nBOR no es homogéneo (Brecha et al., 1980; Zayats et al., 2002) nos hemos centrado en la identificación y distribución de sus poblaciones neuronales. Para ello, hemos recurrido al estudio de identificación del tipo de neuronas mediante la expresión de cuatro tipos de proteinas: Engrailed-2, acetilcolinesterasa, calbindina y calretinina.

• Objetivos generales:

Estudiar la estructura, el origen y la diferenciación del núcleo ectomamilar o nBOR durante la embriogénesis en aves y de esta forma ampliar conocimientos sobre el sistema óptico accesorio al que pertenece.

- Objetivos específicos:
 - A) Estudiar cuándo nacen y migran las diversas poblaciones neuronales del nBOR.

Estos datos son importantes para su correlación con información en la literatura sobre cuándo y dónde aparecen determinadas expresiones génicas, así como con la cronología de maduración del perfil químico y de las conexiones de las diversas poblaciones neuronales del nBOR.

B) Cómo maduran en el nBOR sus diferentes subpoblaciones neuronales. Localizar y seguir paso a paso la maduración en el seno del neuropilo de las neuronas químicamente caracterizables que forman esta población.

2.Material y métodos

Material y métodos

En nuestro trabajo hemos utilizado embriones de pollo ya que el estudio de la morfogénesis del cerebro en aves ha contribuido ampliamente a un mejor entendimiento de su organización y al reconocimiento de homologías entre los cerebros de diferentes vertebrados.

Todos los animales utilizados a lo largo de la tesis fueron tratados de acuerdo con la normativa Española (Ley 32/2007, de 7 de Noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio) y de la Unión Europea para el cuidado y manejo de animales de experimentación (2007/526/CE).



Tabla1. Estadio de desarrollo según Hamilton y Hamburger en el embrión de pollo.

Obtención y procesamiento del material

1. Obtención.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 150 embriones de pollo (Gallus gallus) provenientes de huevos de gallinas fertilizados obtenidos, 24 horas después de la puesta, de una granja local.

Posteriormente, los huevos fueron incubados en una incubadora automática (Masalles, Barcelona) en atmósfera húmeda a 37° C durante las horas necesarias para la obtención de los embriones en los estadios de interés siguiendo las tablas de Hamilton y Hamburger (1951) (Tabla 1). El número de embriones puede ser dividido en dos grupos, un grupo de 70 embriones incluidos y cortados en parafina y otro grupo de 80 embriones, de los cuales unos 30 fueron incluidos en agarosa y el resto en gelatina. Cada uno de estos grupos se puede subdividir en 15 estadios, desde el estadio HH26 (5 días de incubación) hasta HH45 (20 días de incubación). Usando en cada estadio aproximadamente 5 embriones.

Procesamiento

1. Histología.

Cortes

Horizontal corregido: paralelo al plano que pasa desde el centro del ojo al centro del tectum (paralelo al tracto óptico). Este tipo de corte te utiliza debido a que el tubo neural no es recto.

Fijacion

Para proceder a la fijación abrimos la cáscara del huevo y extraemos el embrión, que rápidamente sumergimos en PBS (tampón fosfato salino 0.1M, ph 7'3) frío. A continuación, se siguió dos procedimientos dependiendo de la edad de los embriones:

Hasta 9 días de incubación (HH 35) fueron decapitados, pelados y fijadas sus cabezas mediante inmersión aproximadamente 24 horas en fijador Clarke (3:1, etanol 100%, ácido acético).

Los embriones de más de 9 días de incubación (HH35-HH42) fueron sometidos a una perfusión transcardiaca de paraformaldehído al 4% (PFA 4%), seguida de una noche de postfijación en la misma solución fijadora.

Parafina

Inclusión y corte en parafina

Para su inclusión en parafina, la deshidratación se realizó de manera progresiva, mediante lavados en etanol 70%, etanol 96% y etanol 100%. El tiempo que debe permanecer el tejido en cada uno de los alcoholes depende del volumen de éste, así por ejemplo, una cabeza de un embrión de 9 días (HH35) requiere dos lavados de dos horas cada uno en alcohol. A continuación el tejido se sumerge en butanol, un alcohol miscible con la parafina, donde permanece una noche para proceder seguidamente a su inclusión. La inclusión en parafina se realiza en una estufa de vacío a una temperatura de 60°C, el tiempo preciso de inclusión y la utilización de vacío dependen asimismo del volumen del tejido. Así una cabeza de un embrión de 9 días requiere tres baños con parafina nueva de dos horas cada uno, en un medio donde se ha hecho vacío de -60 atmósferas. A continuación hacemos los bloques de parafina en un molde metálico a temperatura ambiente, orientando de forma adecuada la cabeza del embrión para posteriormente cortarlo en el plano elegido. Una vez solidificado el bloque procedemos a su corte en un microtomo de parafina, ajustando el grosor de las secciones a 10 micras. Posteriormente los cortes son montados en portas sobre una plancha a 48°C. Las secciones se adhieren a los portas con una solución de albúmina de huevo preparada y filtrada previamente (clara de huevo, glicerina y timol).

Los cortes fueron ordenados en los portas en dos series paralelas, siendo utilizada una de ellas para la tinción de cresil violeta, destinada al estudio citoarquitectónico. Sobre la otra serie realizamos una inmunohistoquímica usando como primario el anticuerpo monoclonal 4D9 que detecta la proteína que codifica para el gen Engrailed-2, de origen mesencefálico.

Tinción

Una de las series obtenidas del corte en microtomo de parafina se destina al estudio citoarquitectónico de los embriones. Este estudio se realizó con la tinción de cresil violeta aunque algunas series realizadas en Murcia fueron teñidas con Tionina-rojo neutro. Para ambas tinciones, se procede en primer lugar a desparafinar los cortes mediante inmersión en xilol (dos baños de media hora cada uno). A continuación hidratamos progresivamente el tejido en baños de etanol de gradación decreciente (dos baños de etanol 100%, dos en etanol 96%, uno en etanol 70%) y agua destilada. Sumergimos los cortes en el colorante de cresil durante 3-5 minutos, en el caso de tionina- rojo neutro, se sumerge primero durante un minuto en la tionina, se hace un lavado y a continuación un baño de un minuto en el rojo neutro. Seguidamente lavamos en agua destilada y deshidratamos progresivamente el tejido en la bateria de los alcoholes. Finalmente, sumergimos los portas en xilol y se cubren con cubreobjetos en el medio Eukitt®.

Inmunohistoquímica

La otra serie obtenida del corte de microtomo de parafina es procesada para la detección inmunohistoquímica del tejido de pollo con el anticuerpo 4D9 (IgG, Developmental Hybridoma Bank, Iowa). Para la realización de la inmunohistoquímica las secciones son desparafinadas como relatamos anteriormente. Posteriormente lavamos los portas en PBS + T (PBS 0'1 M pH 7'3, tritón al 0'75%) dos veces diez minutos cada vez y a continuación mantenemos los portas durante 30 minutos en 0'3% H2O2 en PBS-T protegidos de la luz, para la eliminación en el tejido de peroxidasa endógena. Después lavamos de nuevo con PBS-T y dejamos los portas en una disolución prebloqueante de PBS-Gelatina-Tritón-Lisina (PBS 0'1M pH 7'3, gelatina al 2%, tritón al 25%) durante sesenta minutos. Lavamos durante diez minutos en PBS-Gelatina-Tritón-Azida (azida 0'1%) y procedemos a incubar las secciones en una disolución del anticuerpo 4D9D4 anti-engrailed/invected (DSHB, The University of Iowa) en PBS-G-T-A, concentración 1:2, durante 48 horas en la nevera. Pasado este tiempo lavamos las secciones en PBS-G-T y a continuación tres veces en PBS-T. Incubamos las secciones en el anticuerpo secundario GAM-Biot disuelto en PBS-G-T a una concentración 1/200 durante dos horas. Volvemos a lavar en PBS-T e incubamos durante una hora en el complejo anti-avidina-biotina (vector), concentración 1:300 disuelto en PBS-T. Lavamos de nuevo con PBS-T y tampón Tris (Tris-HCl 0'05M pH 7'4) y procedemos al revelado de la peroxidasa, utilizando como sustrato de la reacción enzimática H2O2 0'03% y Diaminobencidina (DAB) diluida al 0'05% en tampón Tris. Finalmente se para la reacción en tampón Tris cuando la observación bajo la lupa muestra el estado óptimo del marcaje. Se deshidratan las secciones y se cubren los portas en el medio Eukitt.

Agarosa y gelatina

Inclusión y corte en vibratomo

Los embriones destinados al estudio de cómo las subpoblaciones neuronales ingresan y maduran en el nBOR se procesaron para su inclusión y corte en el vibratomo.

La fijación de los embriones se llevó a cabo de la misma forma expuesta anteriormente. Una vez fijados los cerebros, son incluidos en un medio preparado de agarosa (Agarose D-1 LOW EEO, Pronadisa) disuelta en PB (Tampón fosfato 0.1M) calentado al microondas durante 30-60 segundos. Para eliminar las burbujas se pone al baño maria a 60°. Orientamos lo cerebros en el interior de un molde de plástico y esperamos a su solidificación. En algunos casos la inclusión se realizó en bloques de gelatina (gelatina 15%, sacarosa 20% en PB).

Realizamos secciones en el vibratomo de 50µm de grosor. Los cortes flotantes son recogidos en:

- Dos series paralelas en placas multiwell de 6 pocillos con medio PB para proceder a la realización de las técnicas de inmunohistoquímica como se ha detallado en el apartado anterior para la detección de las proteinas calbindina y calretinina (Swant Swis Abs) con una variante, que el anticuerpo secundario es GAR-Biot (policlonal).
- Tres series paralelas en placas multiwell de 6 pocillos con medio PB para realizar a una serie la inmunohistoquímica

para la detección de la proteína 4D9, ya descrita, otra serie para el estudio citoarquitectónico con la tinción Tionina-rojo neutro y en la tercera serie, la detección de AChE (Merck 1.12002.0005).

Tinción

Una vez recogidos los cortes del vibratomo se ordenan en los portas y se dejan secar toda la noche. A continuación se procede igual que los cortes de parafina.

Protocolo de AChE (Acetilcolinesterasa) (Modificado de Karnovsky y Rotts 64)

La tercera serie paralela cortada al vibratomo es recogida en cortes flotantes y se les realiza un lavado en Buffer Acetato pH 6 (acetato sódico anhidro 0.82g + 100ml de agua destilada). A continuación, se incuban entre 2- 6 horas en una disolución compuesta por:

S-Acetylthiocholiniodid (5mg), Buffer (6.5ml) ,citrato Sódico 0.1M (0.5ml), sulfato de cobre 30mM (1ml), Buffer (1ml), ferricianuro potásico 5mM (1ml). Cada compuesto se va añadiendo por este orden. Después da la incubación, en la que nos acercamos más a las dos horas que a las seis, se realiza un lavado en Buffer. Finalmente procedemos a montar los cortes en un porta que dejamos secar toda la noche. Al día siguiente, deshidratamos en la batería de alcoholes y se cubren las preparaciones con el medio Eukitt®.



AChE (Silver, 1974), Las altas temperaturas y los tiempos largos de fijación reducen la efectividad de la reacción. El pH bajo disminuye la intensidad de la reacción y su difusión es menor.

Timidina Tritiada

Material autorradiográfico: una dosis sencilla de Timidina tritiada (20 μ Ci/embrión, actividad específica 44 Ci/mmol) fueron pipeteadas sobre el embrión desde el estadio HH9 en adelante. Tratando al menos dos

especimenes en intervalos de seis horas entre los estadíos HH9-HH14, e intervalos de ocho horas entre HH15-HH30. Todos los embriones fueron sacrificados en estadíos HH37/38.

Después de la fijación en paraformaldehído al 4%, los cerebros diseccionados fueron embebidos en metacrilato plástico JB- 4 y cortados en serie en un plano paralelo al tracto óptico (transversal al istmo) con un ajuste del grosor de 3 micrometros. Una de cada cinco series fue guardada y preparadas para autorradiografía. Se usó una dilución 1:1 de emulsión llford K2, expuesta entre 4-5 semanas y contrateñidas con Cresil violeta.

Clasificación e identificación de los Núcleos diencefálicos

La identificación de las diferentes regiones y núcleos diencefálicos se hizo con la ayuda de los cortes realizados en posición horizontal corregido, teñidos con cresil violeta y el Atlas de Luis puelles y colaboradores (2007), atlas estereotáxico. A continuación se detalla el nombre y abreviaturas adoptadas recientemente en el atlas y las abreviaturas de terminología más antigua de Karten y Hodos (1967):

Núcleos superficiales

Karten y Hodos (1967)	Puelles y col. (2007)
GT: griseum tectalis	idem
GV: n geniculado ventral	PG: núcleo pregeniculado
ITO: n. intersticial del tracto óptico	IGL: intergeniculado
PE: pretectal externo	LT: núcleo lateral medial
SS: n. sinencefálico superficial	APTs

Nivel medial (superficial)

Karten y Hodos (1967)	Puelles y col. (2007)
DL: n dorsolateral	ldem
LA: n. lateralis anterior	APT: n Pretectal anterior
PPC: n. precomisural principal	idem
PPT : n. pretectal principal	PrPT: n. Pretectal principal
Rt: n. rotundus	idem
SpL: n. espiriforme	idem

Nivel medial (profundo)

Karten y Hodos (1967)	Puelles y col. (2007)
DLP: n. dorsolateral posterior	ldem
EM: n. ectomamilar	MT: n. terminal medial
PCSV: n. posterior de la comisura	Idem
supraóptica ventral	
SRt: n. subrotundus	idem
SPM: n. espiriforme medial (posterior,	idem
anterior)	

3.Resultados

Resultados



Figura. 3.1 Esquema de cerebro de paloma en una visión ventral donde se indica el corte horizontal corregido, paralelo al tracto óptico. Tomado de J.L Dubbeldam., 1998.

1. Estudio de la citoarquitectura y localización del núcleo Ectomamilar (Em) durante el desarrollo embrionario mediante la tinción con Cresil Violeta

El núcleo Ectomamilar es un núcleo superficial fácil de detectar en cerebros ya maduros gracias a que se localiza en el característico abultamiento que presenta la zona ventral del diencéfalo (Figura 3.2). Los primeros indicios de aparición del núcleo se observan en un embrión en el estadio HH34 (8 días de incubación).



Figura 3.2. Visión Ventral de un cerebro de paloma, mostrando la localización del nBOR. Tomado de J.L Dubbeldam., 1998.

El tamaño del núcleo es diferente desde su nacimiento en el estadio HH30/33 (6-8 días de incubación) hasta que consigue su posición final en el estadio HH38 (12 días de incubación). A partir de aquí el tamaño y la forma del núcleo permanecen estables y no difieren a lo largo del desarrollo embrionario.

En el estadio HH34 (8 días de incubación) **(figura 1 A, B, C)** se observa tres secciones horizontales, las secciones se realizan paralelas al tracto óptico, a nivel del diencéfalo teñidas con violeta de Cresilo y organizadas de más superficiales hasta más profundas, entendiéndose por superficiales aquellas que están más cerca de la superficie pial de la zona ventral del diencéfalo. En las secciones más superficiales comienza a apreciarse una banda de células teñidas en lo que es el inicio de la formación del abultamiento de la superficie pial del prosómero 1 del diencéfalo y que caracteriza y distingue al núcleo Ectomamilar ya maduro. En la zona caudal del diencéfalo, zona más próxima al techo óptico (TO), existen agrupaciones de células teñidas formando bandas a lo largo de toda la sección que se corresponden con agrupaciones celulares pertenecientes a las diferentes vesículas que se observan en la imagen: mesencéfalo (parte inferior de la imagen), diencéfalo (toda la zona central, y telencéfalo (parte superior de la imagen). A medida que vamos hacia secciones más profundas (Fig.1 C), observamos la aparición de una gran masa redondeada moderadamente teñida que ocupa prácticamente toda la zona rostral del diencéfalo, el Tálamo (T). Hacia la zona caudal del diencéfalo, entre el techo óptico y el Tálamo se distingue un grupo de células ligeramente teñidas (señalado como GT) que se corresponden con el núcleo Griseum tectal

En el estadio HH35 (9 días de incubación) se observa una sección superficial (Figura 2 A, B, C, D). la parte derecha de la imagen se corresponde con la zona caudal y la zona rostral se encuentra en la parte izquierda. Nos encontramos a nivel del hipotálamo (HT) y a este nivel observamos distintas agrupaciones teñidas que se corresponden con los siguientes núcleos ópticos o núcleos retinorecipientes: a la derecha del núcleo ectomamilar encontramos al ITO, núcleo que se identifica gracias a esa capa laxa de células grandes que abraza al núcleo Rotundus (Rt), a su lado se encuentra el SS (sinencefálico superficial) que se caracteriza porque se observa dos capas, una más profunda compacta con células grandes y otra más superficial laxa compuesta por células de pequeño tamaño y ya en la zona más caudal, el PE (pretectal externo) que está formado por células de gran tamaño, el cual se pone en contacto con el núcleo Ectomamilar.

A su vez, el núcleo Ectomamilar (Em) se localiza debajo de un tracto, el tracto tectotalámico y que en la imagen se observa como una zona con forma redondeada sin teñir. El quiasma óptico se observa en este tipo de cortes por debajo del hipotálamo. En la figura.2B observamos la longitud que alcanza el núcleo desde la zona más caudal (techo óptico) hasta la zona más rostral (hipotálamo). También destaca **(en la figura. 2 B-D)** que la intensidad de tinción del núcleo es homogénea en este estadio y las células se presentan como una gran masa en la que no se distingue sus diferentes tamaños. En la Figura 2C y D se aprecia que dentro del núcleo la tinción sigue un gradiente desde la zona central hasta el techo óptico, esto quiere decir, que la tinción se vuelve más intensa a medida que nos acercamos al techo óptico.

En el embrión de HH36 (10 días de incubación), (Fig.3 A, B, C) se muestran tres imágenes de una misma sección horizontal corregida del diencéfalo. Las figuras.3 Ay B, muestran la misma imagen a distintos aumentos y la figura.3C, muestra el lado derecho de la sección. El núcleo Ectomamilar (Em) se localiza en la zona ventral, debajo del tracto tectotalámico. Este tracto se reconoce porque se encuentra en la zona central del diencéfalo con una forma redondeada sin tinción El crecimiento de este tracto produce una separación entre el núcleo Ectomamilar y el resto de núcleos ópticos. Esta zona se corresponde con el prosómero 2, el cual incluye las agrupaciones nucleares que se observan en la zona superior de la sección por encima del tracto tectotalámico identificadas como SS e ITO. El GV se corresponde con el prosómero 3 y el PE con el prosómero 1. En la figura.3A se aprecia al igual que ocurre en el estadio anterior que el núcleo Ectomamilar tiene su zona caudal más intensamente teñida que la zona rostral, mostrando un gradiente en la intensidad de tinción desde la zona caudal a la zona rostral. En la figura.3B se observa la misma imagen a mayor aumento, y aquí apreciamos con

mayor detalle que el centro del núcleo que se corresponde con la parte más rostral del núcleo, presenta una menor tinción. En la parte inferior de la imagen y muy próximo el núcleo Ectomamilar se observa el mesencéfalo (mes).

Observando la imagen de un embrión HH38 (12 días de incubación) llegamos a lo que se denomina estadio intermedio del desarrollo, en esta etapa el diencéfalo muestra un aspecto relativamente maduro y ya es posible distinguir con claridad los diversos núcleos, los cuales ya están completamente formados y por lo tanto, a partir de aquí es cuando su citoarquitectura no varía (Fig.5 A, B, C).

En la **Figura 5 A** se observa la mitad derecha del diencéfalo y se distingue en su zona ventral, parte inferior de la imagen, el núcleo Ectomamilar, que tiene una forma más redondeada debido a lo superficial del corte. Justo por encima de éste encontramos el característico tracto tectotalámico con su forma redondeada y sus fibras sin teñir. Este tracto separa el núcleo Ectomamilar de las otras agrupaciones nucleares que sí se encuentran teñidas. En esta sección superficial no se observa el núcleo Griseum tectal (GT) que separa el prosómero 1 del techo óptico. Se distingue en la zona caudal del diencéfalo, en la parte derecha, al lado del núcleo Ectomamilar las células teñidas del núcleo PE, el cual se expande y se pone en contacto con las células del núcleo Ectomamilar (Fig.5B). A la izquierda del PE (prosómero 1) en una posición ventral y hacia la izquierda de la imagen se observa unas grandes células teñidas que pertencen al núcleo SS. Este núcleo es característico porque se distinguen dos capas de células, una capa inferior laxa y otra superior compacta. En el mismo dominio (Prosómero2) a su izquierda en una posición que en la imagen se ve superior encontramos el ITO característico por sus grandes células y ya en la zona superior izquierda de la figura se observa el GV (prosómero 3), este núcleo se distingue porque está formado por tres capas. En esta

figura se observa con mayor claridad, que en anteriores estadios, las diferentes capas que forman los núcleos ópticos, esto se debe a que ya en este estadio se distinguen los neuropilos teñidos, con lo cual llegamos a distinguir los diferentes tamaños de las células que los forman. En la figura 5, B se observa a un mayor aumento la tinción de las células que forman el núcleo ectomamilar y cómo las células del núcleo PE llegan hasta él. La figura 5,C nos muestra una sección más profunda y ahí ya destaca la aparición de una agrupación celular que no fue observada en la sección más superficial, el Griseum tectal (GT) que separa al núcleo PE del techo óptico (OT).

Como se indicó antes, desde HH38 (12 días de incubación) en adelante, la citoarquitectura del núcleo no varía, sin embargo la tinción se intensifica y se distinguen mejor los núcleos que muestran los diferentes tamaños de sus células. Gracias a que la forma de los núcleos se hace más clara observamos en el embrión en estadio HH39 (13 días de incubación) **(Fig. 6A)**, cómo el núcleo cruza los tres prosómeros. Una porción del núcleo se encuentra en el dominio del prosómero 1, como se ha descrito anteriormente, las células del PE (Pretectal externo) tocan al nEM (núcleo ectomamilar), esto corresponde con la zona más caudal del núcleo por lo tanto más cercano al techo óptico. La zona media del núcleo se encuentra en el mismo dominio que los núcleos SS (sinencefálico superficial) e ITO (núcleo intesrticial) que pertenecen al prosómero 2. La zona más rostral del núcleo se corresponde con el prosómero 3 ya que en este dominio encontramos al GV (núcleo geniculado ventral).

En un embrión en estadio HH44 (18 días de incubación) (Fig. 10 B) se observa con mayor aumento la mezcla de células de diferentes tamaños que conforman el núcleo Ectomamilar.

2. Expresión de la proteína Engrailed-2 durante el desarrollo del Núcleo Ectomamilar

Para observar el desplazamiento de la población neuronal desde el nacimiento del núcleo en el estadio HH30/33 (6-7 días de incubación) hasta su posición final en el estadio HH38 (12 días de incubación), analizamos la expresión de la proteína engrailed-2.

En el embrión de pollo de estadio HH34 (8 días de incubación) el diencéfalo está relativamente inmaduro y el núcleo Ectomamilar aún se encuentra en formación (Figura. 12 E, F) por tanto, son muy pocas las células encontradas en este estrato superficial.. Esta proteína es de origen mesencefálico, por lo que se observa en estas dos secciones la reacción intensa de las células inmunopositivas del mesencéfalo. Señalado con flechas, en la parte izquierda de ambas imágenes observamos una ligera inmunorreacción a la proteína En-2 en el lugar donde se localizará el futuro relieve del núcleo Ectomamilar. Se encuentra en la zona caudal del diencéfalo, en la imagen se observa por encima del techo óptico.

En un embrión de estadio HH37 (11 días de incubación) se observa agrupaciones de células En-2 positivas localizadas en el mesencéfalo (mes) (**Fig. 13**). Por encima del mesencéfalo, en la parte derecha de la imagen observamos otro grupo de células inmunopositivas localizadas en la zona caudoventral del diencéfalo, estas células inmunopositivas pertenecen al núcleo Ectomamilar. Como se puede observar en esta imagen en la zona del diencéfalo no encontramos más células En-2 positivas, por lo que las células de los demás núcleos ópticos son En-2 negativas. Fijándonos en la intensidad de inmunoreacción de las células En-2 positivas dentro del núcleo, observamos que existe una mayor

expresión de las células de la zona caudal, es decir, la más cercana al techo óptico.

En la figura 13F se observa con mayor detalle las células En-2 positivas. En la parte inferior de la imagen destacan las células En-2 positivas del mesencéfalo y en la zona superior también encontramos una gran cantidad de células que expresan la proteína, es el núcleo Ectomamilar. Destaca en esta imagen que el espacio entre ambos dominios, entre el mesencéfalo y el núcleo Ectomamilar, existe la presencia de células Engrailed positivas. Esto revela la existencia de un desplazamiento de las células del mesencéfalo hacia el diencéfalo y más concretamente al núcleo Ectomamilar, ya que es el único núcleo observado en el diencéfalo que expresa la proteína.

En el embrión de estadio HH38 (Fig. 13K) se muestra también la expresión de la proteína Engrailed, y la migración de las células desde el mesencéfalo hasta el núcleo ectomamilar (su color es diferente porque la reacción de esta inmunohistoquímica se intensificó con sulfato amónico de níquel.

Desde el estadio HH 38 (12 días de incubación) en adelante la expresión de la proteína en el núcleo continua con el mismo patrón, pero a medida que nos adentramos en estadios más maduros se hace más evidente qué células del núcleo expresan la proteína En-2 (Fig. 14 E, F). Las células del núcleo que presentan la mayor intensidad de expresión de la proteína engrailed-2 son aquellas que se encuentran localizadas más caudalmente dentro del núcleo y forman una concha alrededor de la zona central del núcleo. También existen células inmunopositivas en la parte ventral y rostral del núcleo pero se encuentran más dispersas. Esto se observa claramente gracias al abultamiento característico que presenta el núcleo y que ya en este estadio se encuentra totalmente desarrollado. Esta
agrupación de células En-2 positivas forma lo que se denomina una concha de células parvocelulares que rodea a las células centrales del núcleo que son inmunonegativas. Observamos en estos estadios más avanzados que ya están perfectamente definidos los diferentes núcleos retinorecipientes del diencéfalo y resalta que éstos son En-2 negativos y que las células inmunopositivas del núcleo ectomamilar no invaden los dominios de aquellos núcleos que se encuentran más próximos (Fig. 15 G, H, I).

3. Seguimiento temporal del nacimiento de las neuronas que van a formar el núcleo con Timidina Tritiada

La timidina tritiada es un marcador de la proliferación celular acumulativo que permite precisar para cada área histogenética dónde se producen neuronas del núcleo Ectomamilar y los momentos en los que comienza y termina su periodo de producción.

En el embrión inyectado en HH33 A221 (Fig. 23 A-F) se observa con la tinción de Cresil violeta la disposición de las células. En la parte más dorsal del núcleo existe una mayor cantidad de células grandes mientras que en la zona ventral las células son más pequeñas y dispersas. Fijándonos en el marcaje de Timidina Tritiada, son aquellas células en las que se observa el núcleo de color negro, existe dispersión de las células marcadas pero hay un gran número de estas células que se dirigen hacia la línea media.

En la Fig 23 F. Las células marcadas están formando unas bandas alternas con células no marcadas. La gran mayoría de células marcadas

son células de gran tamaño, esto quiere decir que ya habían nacido cuando el embrión fue inyectado. Para descubrir cuándo nacieron estas células, debíamos verlas desmarcadas en embriones inyectados más jóvenes.

En el embrión inyectado en HH31 A87 (Fig. 22) aparece una mayor cantidad de células marcadas y por lo tanto una disminución de células desmarcadas, las cuales se encuentran muy dispersas, las células ya teñidas estaban naciendo en el momento de la inyección y las desmarcadas aún no habían nacido. En los cortes más superficiales (Fig. 22 A, B, C) se observa la misma cantidad de células marcadas que aquellas que no lo están. Ambos tipos de células se encuentran dispersas por todo el núcleo ectomamilar. A medida que profundizamos en las secciones (Fig. 22 D, E, F) las células marcadas las encontramos en los bordes del núcleo. Incluso un mayor número de células marcadas en la zona rostrodorsal, es decir aquellas células que se encuentran más cerca del techo óptico y en la parte superior del núcleo.

El embrión de pollo inyectado en HH 30 A207 (Fig. 21) muestra que las células del núcleo se encuentran prácticamente desmarcadas, sin teñir. Esto quiere decir que las células aún no habían nacido, su nacimiento es posterior a este periodo. Existe un mayor número de células marcadas en la zona central del núcleo y es aquí donde se encuentran las células de mayor tamaño (Fig. 21 A, B). Estas células que se encuentran marcadas con la timidina tritiada siguen un gradiente en el marcaje hacia el techo óptico, es decir, existe un menor número de células marcadas en la zona al hipotálamo y el número de células marcadas se incrementa a medida que nos acercamos al techo óptico (Fig. 21 C. D).

4. Marcaje de las neuronas que forman la población del Núcleo Ectomamilar

Cada proteína ligadora de calcio presenta un patrón espaciotemporal distinto en la región del diencéfalo durante el desarrollo embrionario del pollo. Se observa una gran cantidad de células inmunoreactivas para calretinina en el núcleo ectomamilar y núcleos ópticos, desde estadíos tempranos, mientras que existe muy bajo número de células inmunoreactivas para la calbindina.

A continuación decribiremos el desarrollo de las neuronas y fibras que contienen proteínas ligadoras de calcio.

a) Patrón de marcaje de la proteína Calretinina

En general se aprecia que desde estadios muy tempranos existe una gran cantidad de células inmunoreactivas para la calretinina.

La inmunorreactividad para Calretinina es muy abundante en el diencéfalo en desarrollo. En HH34 (8 días de incubación) ya se observan grupos de células y tractos calretininapositivos (CR+) que recorren el diencéfalo (Fig. 24). En este estadio de desarrollo tan temprano no se observa el abultamiento característico de la zona ventral del diencéfalo donde se localiza el núcleo ectomamilar, pero si se observan las fibras que atraviesan los prosómeros del diencéfalo y los diferentes límites entre el mesencéfalo y rombencéfalo.(Fig. 24 B, C) así como aquellos núcleos cuyo nacimiento son anteriores al núcleo

ectomamilar. (Fig. 24F, G). También se diferencia el abultamiento característico del tálamo (Fig. 24 E).

En el embrión en estadio HH36 (10 días de incubación) (Fig. 25 A-E) se observa el núcleo Ectomamilar con células inmunoreactivas para CR, (CR+) con morfología de neuroblastos migratorios o neuronas muy inmaduras. En cortes más superficiales (Fig. 25 A, B) se observa el óptico y las células CR+ de los diferentes núcleos techo retinorecipientes del diencéfalo. Debido a la inclinación, unos 45º, en la que se coloca el embrión cuando va a ser seccionado para dar lugar al corte horizontal corregido y aunque el núcleo ectomamilar es superficial, no se observa en las figuras con las secciones más superficiales. De esta figura cabe destacar que los núcleos retinorecipientes, el PE (prosómero 1), el SS y el ITO (prosómero 2) que se observan son CR+, al contrario que el núcleo Griseum tectal (GT) cuyas células no presentan reacción a esta proteína. En este mismo estadio pero en la figura 25 A, B, se observa que el núcleo Sinencefálico superficial, SS (APTs Puelles 2007, Atlas) presenta una menor abundancia de células CR+ que el ITO cuya proteína está fuertemente expresada, diferenciándose sus células de gran tamaño y en el GV se observa una ligera intensidad en la expresión de la proteína en sus capas laxas.

Como ya se ha mencionado anteriormente el abultamiento característico ayuda en la interpretación del núcleo ectomamilar (Fig. 25 B, C, D), observamos que existe una moderada inmunoreactividad de las células del núcleo si comparamos con la inmunoreactividad intensa del ITO (Figs. 25 A y 26 D, E). La distribución de células CR+ en el núcleo se observa en este estadio (Figs. 25 C, D, E y 26 A, B) muy homogéneo, hay una gran cantidad de células CR+ en el centro del nEm, presentándose el núcleo como una gran masa indiferenciada,

en el cual a lo largo de toda su longitud encontramos una gran inmunoreactividad sin diferenciarse la llamada concha que rodea al centro o núcleo propiamente dicho. El nEm queda unido al PE el cual contiene una abundancia de células CR+ similar al nEm, en ambos núcleos la intensidad en la expresión de la proteína CR es igualmente moderada. Observando a un mayor aumento el núcleo (Fig. 25 D, E) se distingue esa mezcla de tamaño de las células que forman las distintas subpoblaciones del núcleo.

En embriones en el estadio HH37 (11 días de incubación) (Fig. 26 A-C) las células CR+ siguen un patrón diferenciado, se observa un mayor acumulo o abundancia de células CR+ en la zona caudal del núcleo que en la parte más rostral, dónde las células se encuentran más dispersas. Centrándonos en el núcleo ectomamilar (Fig. 26 A) observamos que la abundancia y distribución de células que expresan calretinina es heterogéneo. En la zona caudal del núcleo, la porción del núcleo que cruza los dominios del prosómero 1, la intensidad y abundancia de células CR+ es superior a la zona central. Esta porción central presenta una intensidad ligera de expresión y además se encuentra rodeada por una población de células que se encuentra dorsal presentan una inmunoreactividad más intensa, dando lugar a lo que se conoce como la concha de células parvocelulares.

En etapas ya consideradas estadíos tardíos del desarrollo, embriones en estadio HH43 (17 días de incubación) (Fig. 28 A-E), en el cual los núcleos ya están formados, la distribución de las células CR+ en el núcleo Ectomamilar sigue siendo similar a la observada en etapas embrionarias más tempranas, pero ahora estas células son maduras y se distingue mucho mejor la diferencia de tamaños de las diferentes células que conforman el núcleo en estudio y que unas células tienen sus neuropilos más inmunoteñidos que otras. En este estadio que el núcleo ha finalizado su formación y se distingue claramente la subdivisión que existe observamos (Fig. 28 C, D) que la parte dorsocaudal del núcleo presenta un mayor número de células CR+ que se encuentran más densamente agrupadas que en la zona ventrorostral, (esta zona incluye la porción central del núcleo y la porción más rostral). En el centro del núcleo se observa un reducido número de células CR+, sin embargo, la población de células que forman la concha que rodea la población central del núcleo presenta una mayor abundancia y expresión de la proteína. También se observa que las células más dorsales tienen un neuropilo mayor que las células que forman parte de la porción ventral. (Fig. 28 C, D).

En la figura 28 E, destaca cómo el complejo del nEM propiamente dicho y su concha parvocelular se continúan con el núcleo PE.

b) Patrón de marcaje de la proteína Calbindina

La expresión de la proteína CB está restringida a unos pocos subnúcleos, pero se observa que en la zona dorsal del diencéfalo es más abundante que en la zona ventral. (Fig. 29 A-F).

Observando un embrión en el estadio HH36 (10 días de incubación) (Fig. 29 F) resalta una intensa expresión de la proteína calbindina en la zona del hipotálamo. Se observa en la Figura 29 E, en la que el núcleo contiene un bajo número de células CB+ que se encuentran dispersas y además son de pequeño tamaño. A pesar de la reducida expresión de células CB+, se observa (Figs. 29 D, E) que en el núcleo Ectomamilar éstas se encuentran localizadas en la porción más dorsocaudal del núcleo, más cercanas al techo óptico. Esta mismas observaciones las encontramos en los embriones que se encuentran en el estadio HH37 (11 días de incubación) **(Fig.29 A-F)** la distribución de las células CB+ es igual de reducida y el tamaño de sus células sigue siendo pequeño. El resto de núcleos vecinos al núcleo Ectomamilar también presentan una baja inmunoreactividad a la proteína calbindina. Esta situación se observa en el resto de embriones preparados para esta técnica inmuhistoquímica **(Fig. 30)**.

c) Patrón de expresión de las células Acetilcolinesterasa

En embriones de estadíos tempranos en nuestro estudio, HH34 (8 días de incubación) (Fig. 12 A-D) se observa que existe ya una cierta expresión de células acetilcoinesterasa positivas en la zona donde se localizarán los diferentes núcleos ópticos. En cortes más profundos en los que ya se distinguen los diferentes prosómeros y la gran masa del tálamo, se observa una ligera actividad.

En los embriones de 12 días de incubación (HH38) (Fig. 14 E-F) ya se distinguen todos los núcleos retinorecipientes cuya actividad acetilcolinesterasa positiva es moderada. En este estadío aún temprano el núcleo ectomamilar ya se encuentra formado y podemos observar que la actividad difiere dentro del núcleo, ya que la zona caudoventral presenta un mayor actividad acetilcolinesterasa positiva que la zona más medial del núcleo, donde encontramos una menor actividad o una actividad más ligera.

Ya en embriones de estadío HH39 (13 días de incubación) (Fig. 15 H-K) la estructura nuclear está ampliamente finalizada por tanto a partir de esta edad ya comenzamos a distinguir dentro del núcleo los diferentes neuropilos con actividad AChE positiva. Y como se puede observar en la zona central del núcleo se observa una menor intensidad de actividad acetilcolinesterasa positiva, al contrario de lo que ocurre en la zona dorsocaudal y en la que se corresponde con la llamada concha parvocelular que rodea a la zona central y resulta tener una actividad más intensa.

A medida que avanzamos en los diferentes estadíos la actividad se vuelve cada vez más intensa en el neuropilo del núcleo Ectomamilar pero no existe variación en el patrón de expresión (Figs 15-17, 19, 20).

4.Figuras

Sección horizontal de un embrión en estadio HH34 (8 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. sección más superficial, de dorsal a ventral. Se observa (señalado con la flecha de la izquierda) en el borde apical una banda de células teñidas que se corresponden con los núcleos ópticos. B. Sección intermedia, al finalizar el tectum óptico (OT), encontramos el Griseum tectal (GT). C. Sección más profunda, muestra una voluminosa masa de células, el tálamo (T), que se corresponde con el prosómero 2. Rostral al Tálamo se encuentra la zona limitante intratalámica, límite interneuromérico entre p2 y p3. Caudal al Tálamo nos encontramos el prosómero 1, señalado con P1.



Sección horizontal de un embrión en estadio HH35 (9 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. microfotografía en la que se observan los diferentes núcleos ópticos del diencéfalo. B. el núcleo Ectomamilar se localiza por debajo del tracto tectotalámico. C. sección en la que se observa en núcleo Ectomamilar en el abultamiento ventral del diencéfalo que lo caracteriza. D. El núcleo ectomamilar y los núcleos retinorecipientes. *EM, núcleo ectomailar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; PE, pretectal externo; R, rotundus; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*





Sección horizontal de un embrión en estadio HH36 (10 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. microfotografía que muestra el lado izquierdo del diencéfalo. Se observa el núcleo ectomamilar separado del resto de núcleos ópticos por el tracto tectotalámico. B. A mayor aumento se distingue una mayor intensidad de tinción en la porción más caudal del núcleo, hacia el techo óptico (OT) .C. microfotografía que muestra el lado derecho del diencéfalo observándose el núcleo Ectomamilar y resto de núcleos diencefálicos. EM, núcleo ectomailar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; R, rotundus; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.



Sección horizontal de un embrión en estadio HH37 (11 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. microfotografía en la que se distinguen los distintos núcleos ópticos diencefálicos. B. se observa ambos lados del hipotálamo los núcleos ectomamilares debajo del tracto tectotalámico. En la parte inferior de distingue el quiasma óptico.C. Detalle del núcleo ectomamilar. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; R, rotundus; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Sección horizontal de un embrión en estadio HH38 (12 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. Sección más superficial de la serie. En el núcleo ectomamilar se observan los distintos tamaños de sus células. Se distinguen las diferentes capas que forman a los núcleos retinorecipientes .B. Detalle del núcleo ectomamilar donde se observa su forma redondeada y que sus células se continúan con el PE. C. Sección de mayor profundidad en la que aparece el GT que limita al prosómero 1 del techo óptico. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Sección horizontal de un embrión en estadio HH39 (13 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. Sección en la que se observa que el núcleo Ectomamilar atraviesa los tres prosómeros. B. Sección más superficial donde se observa el quiasma óptico en la parte superior de la imagen y el núcleo Ectomamilar inferior al tracto óptico. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*





Sección horizontal de un embrión en estadio HH40 (14 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. Microfotografía de una sección superficial donde se observa el núcleo ectomamilar por debajo del tracto óptico (to).B. Detalle del núcleo Ectomamilar donde distingue los diferentes tamaños de sus células. C. se observan los diferentes núcleos ópticos y la forma redondeada del núcleo Ectomamilar. D. Sección a mayor aumento. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo;; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Sección horizontal de un embrión en estadio HH42 (16 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. Sección donde se observan los el núcleo ectomamilar y su situación con respecto al resto de núcleos ópticos. B. Mayor aumento de la sección anterior. C. mismo nivel de corte que la imagen A pero lado contrario. D. Detalle del núcleo Ectomamilar a mayor aumento. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Sección horizontal de un embrión en estadio HH43 (17 días de incubación). Tinción cresil violeta. A y C. microfotografías que muestra los distintos núcleos diencefálicos. B y D. Relación que existe entre el núcleo Ectomamilar y los núcleos ópticos que limitan con él. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; HT, hipotálamo; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; R, rotundus; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Sección horizontal de un embrión en estadio HH44 (18 días de incubación). Tinción cresil violeta. A. * Microfotografías que muestran el diferente tamaño de las células que componen el núcleo Ectomamilar B. localización del núcleo Ectomamilar C. Detalle de la imagen B.





Sección horizontal de un embrión en estadio HH45 (19 días de incubación). Tinción cresil violeta. A y C.microfotografías que muestran la localización del núcleo Ectomamilar y el resto de núcleos retinorecipientes. B y D. muestran las subpoblaciones de células que encontramos dentro del núcleo. Se distinguen las células parvocelulares, células de mayor tamaño, que forman la concha que rodea a las células del centro. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Sección horizontal de un embrión en estadio HH34 (8 días de incubación). A, B, C y D. expresión de las células AChE + la inmunoreactividad es baja debido a que los núcleos están en proceso de formación. E y F. Expresión de la proteína en-2. Existe baja expresión de esta proteína en el diencéfalo, al contrario de lo que ocurre en el mesencéfalo.



Expresión de la proteína engrailed-2 en el núcleo Ectomamilar. A Y B. muestran la sección horizontal de un embrión de estadio HH37 (11 días de incubación) teñida con cresil violeta. Señala la localización del núcleo ectomamilar y su relación con el resto de núcleos. C, E y F. expresión de la proteína engrailed-2 en un embrión de estadio HH37. D, G y H. expresión de la proteína en un embrión de estadio HH36. J. tinción de cresil violeta en un embrión en estadio HH38. K y L. expresión de la proteína en-2 en un embrión de estadio HH38. Las imágenes señaladas con (*) y (**) muestran con mayor detalle la expresión de las células en-2+. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo;; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*


Imágenes de secciones horizontales del diencéfalo en un embrión en estadio **HH 38 (12 días de incubación)** mostrando tinción de tionina-rojo neutro (A,B) en el núcleo ectomamilar y núcleos ópticos comparada con la expresión de la proteína en-2 (C,D) y la expresión de la acetilcolinesterasa (AChE) (E,F). *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Imágenes de secciones horizontales corregidos del diencéfalo en un embrión en estadio **HH 39 (13 días de incubación)** mostrando tinción de tionina rojo-neutro (A-D) en el núcleo ectomamilar y resto de núcleos retinorecipientes comparada con la expresión de la proteína engrailed-2 en el nEM. (E-G) y la intensidad de expresión de la AChE tanto en el núcleo ectomamilar como en el resto de núcleos diencefálicos.. B: detalle de la imagen mostrada en A. Citoarquitectura del núcleo ectomamilar y situación con respecto al resto de núcleos ópticos. F: detalle de la imagen E que muestra las células en-2+ del nEM y cómo el resto de núcleos son engrailed-2 negativos. G: muestra la expresión de las proteínas en-2+ tanto en el núcleo ectomamilar como en el mesencéfalo. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Imágenes de secciones horizontales corregidos del diencéfalo en un embrión en estadio HH 40 (14 días de incubación) mostrando tinción de tionina rojo-neutro (A-D) en el núcleo ectomamilar y núcleos y estructuras vecinas comparadas con la expresión de la proteína en-2 en el núcleo y mesencéfalo (E-G) y la intensidad de expresión de los núcleos diencefálicos (H-J). B: detalle de la imagen A que muestra una sección superficial del núcleo ectomamilar por debajo del tracto óptico. F: detalle de la imagen E, en la que se observa la expresión de la proteína engrailed-2 en el núcleo ectomamilar. G: muestra las células en-2 positivas del núcleo ectomamilar. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*





Imágenes de secciones horizontales corregidos del diencéfalo en un embrión en estadio **HH 41 (15 días de incubación)** mostrando la intensidad de expresión de la acetilcolinesterasa en los núcleos ópticos (A,C, D) y con mayor detalle en el núcleo ectomamilar (B). *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Microfotografías de una sección horizontal de un embrión en estadio **HH41 (15** días de incubación) que muestran la expresión de la proteína engrailed-2 en el núcleo ectomamilar (A-D). B: detalle de la imagen A que muestra una mayor acumulación de las células en-2+ en la zona caudal del núcleo. Las células que forman el centro del núcleo se observan menos inmunoreactivas que las células que forman la concha (C, D).



Imágenes de secciones horizontales corregidos del diencéfalo en un embrión en estadio HH 42 (16 días de incubación) mostrando tinción de tionina rojo-neutro (A-F) en el núcleo ectomamilar y núcleos ópticos comparadas con la expresión de la proteína engrailed-2 (G-L) en el núcleo ectomamilar y la intensidad de expresión de la acetilcolinesterasa (AChE) en los núcleos diencefálicos (M-O). H: detalle de la imagen G donde se muestra las células en-2 + del núcleo ectomamilar. N: detalle de la imagen M, donde se muestra la nueva terminoñogía de los núcleos (en rojo). *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Imágenes de secciones horizontales corregidos del diencéfalo en un embrión en estadio HH 45 (19 días de incubación) mostrando tinción de tionina rojo-neutro (A, B) en el núcleo ectomamilar y núcleos ópticos comparadas con la expresión de la proteína engrailed-2 (E, F) en el núcleo ectomamilar y la intensidad de expresión de la acetilcolinesterasa (AChE) en los núcleos diencefálicos (C, D). F: detalle de la imagen E donde se muestra las células en-2 + del núcleo ectomamilar. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Autoradiografía contrateñida con cresil violeta que muestra el núcleo Ectomamilar de un embrión inyectado con Timidina Tritiada en el estadio **HH30** y sacrificado en el estadio HH38 A207 (A-D). C y D muestran el detalle de las células del núcleo. Más detalle en texto.



Autoradiografía contrateñida con cresil violeta que muestra el núcleo Ectomamilar de un embrión inyectado con Timidina Tritiada en el estadio **HH31** y sacrificado en el estadio HH39 (A 87) (A-F).



Autoradiografía contrateñida con cresil violeta que muestra el núcleo Ectomamilar de un embrión inyectado con Timidina Tritiada en el estadio **HH33** y sacrificado en el estadio HH38 (A 221) (A-F).



Expresión de la proteína Calretinina en una sección horizontal de un embrión en estadio **HH34 (8 días de incubación)**. Imagen que muestra los paquetes de fibras calretinina positivas (CR+) que atraviesan el diencéfalo (B, C) comparadas con la tinción de Cresil violeta (A). En secciones más profundas comienza a distinguirse la expresión CR+ (D-G) en el Tálamo.







HH34

Т

Т

CR

Expresión de la proteína Calretinina (CR) en una sección horizontal de un embrión en estadio **HH36 (10 días de incubación)**. Se muestra la actividad calretinina positiva que existe en el núcleo ectomamilar y las fibras calretinina positivas (CR+) que limitan hipotálamo y el diencéfalo (A- C)). D: detalle de la imagen C, que muestra la actividad CR+ en el núcleo ectomamilar. E: detalle a mayor aumento de los neuropilos CR+. *EM, núcleo ectomamilar;; to, tracto óptico.*



Expresión de la proteína Calretinina (CR) en una sección horizontal de un embrión en estadio HH37 (11 días de incubación) (A-C) y embrión en estadio HH 39 (13 días de incubación) (D-F). Se muestra la actividad calretinina positiva que existe en el núcleo ectomamilar y resto de núcleos ópticos. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico; HYP, hipotálamo; XSOi, decusación supraóptica.*



CR

HH37







Expresión de la proteína Calretinina (CR) en una sección horizontal de un embrión en estadio **HH41 (15 días de incubación)** (A-D).Se muestra la actividad calretinina positiva que existe en el núcleo ectomamilar y resto de núcleos ópticos (A,C). B y D: detalles de las imágenes Ay B respectivamente en la que se muestra las células CR+ del núcleo ectomamilar. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*



Expresión de la proteína Calretinina (CR) en una sección horizontal de un embrión en estadio **HH43 (17 días de incubación)** (A-E).Se muestra la actividad calretinina positiva que existe en el núcleo ectomamilar y resto de núcleos ópticos. E: detalle en la que se muestra las células CR+ del núcleo ectomamilar y cómo este se continúa con el PE. *EM, núcleo ectomamilar; GV, Geniculado ventral;; ITO, núcleo intersticial del tracto óptico; mes, mesencéfalo; PE, pretectal externo; SS, sinencefálico superficial; to, tracto óptico.*











Expresión de la proteína Calbindina (CB) en una sección horizontal de un embrión en estadio HH36 (10 días de incubación) (A-F) y un embrión en el estadio HH37 (11 dias de incubación) (G-L) .Se muestra la actividad calbindina positiva que existe en el núcleo ectomamilar (A-C). C: detalle en la que se muestra las células CB+ del núcleo ectomamilar. F: alta expresión de células CB+ que se observa en el hipotálamo, esto contrasta con la baja reactividad que existe en el diencéfalo.





Expresión de la proteína Calbindina (CB) en una sección horizontal de un embrión en estadio HH41 (15 días de incubación) (A-C) y un embrión en el estadio HH43 (17 dias de incubación) (D-F) .Se muestra la actividad calbindina positiva que existe en el núcleo ectomamilar (B y C) e hipotálamo. A: detalle en la que se muestra las células CB+ del núcleo ectomamilar. La baja expresión de células CB+ se muestra en la imagen D. E y F: detalle de la expresión de células CB+ en el núcleo ectomamilar.





5.Discusión

Discusión

1. Citoarquitectura y origen del Núcleo Ectomamilar en el embrión de pollo

Nuestros resultados corroboran lo anteriormente publicado sobre la citoarquitectura del núcleo Ectomamilar (MT, Puelles et al, 2007, Atlas) el cual se caracteriza por su relieve en la superficie caudoventral del Diencéfalo (Martínez de la Torre, 1985) y los diferentes tamaños de células que presenta el núcleo (Brecha y col, 1980). El núcleo Ectomamilar consiste en una masa nuclear central formada por una mezcla de células de diferentes tamaños y que se encuentra rodeada dorsalmente por una concha parvocelular, conocida anteriormente como núcleo periectomamilar o subnúcleo dorsal del BOR. También se corrobora con los datos obtenidos que el núcleo Ectomamilar se extiende a lo largo de los tres prosómeros.

Para obtener nuestros datos se han realizado los cortes horizontales corregidos a nivel superficial e intermedio y la descripción se ha hecho siguiendo el atlas de cerebro de pollo de Puelles y col.(2007) también se han descritos brevemente las masas de células vecinas con el mismo dominio neuromérico o las que cruzan rostral o caudal los límites interneuroméricos. De esta forma, se establecieron los límites entre los diferentes neurómeros o prosómeros y la relación que existe entre cada uno de los núcleos que se encuentran en los distintos prosómeros con el núcleo objeto de esta tesis, el núcleo Ectomamilar, confirmando de esta manera que el núcleo cruza efectivamente los tres prosómeros cuando alcanza la madurez. (Puelles y col., 2007).

En nuestro estudio, en los primeros estadios del desarrollo, cuando aún el núcleo no ha finalizado su formación y no ha terminado la morfogénesis
secundaria, la observación del núcleo se dificulta por ello tomamos como referencias núcleos que se han originado más tempranamente como por ejemplo, el GT (García-Calero y col, 2002), el cual es una formación retinorecipiente que separa el pretecho (P1) del mesencéfalo.

En este estadio no se distinguen los diferentes tamaños de las células del núcleo, esto se debe a que aún sus células están naciendo.

Esta diversidad de formas citoarquitectónicas comienzan a aclararse progresivamente en los siguientes días de incubación. El principal cambio se encuentra en el incremento de la compresión rostrocaudal durante la formación de los distintos núcleos de P1 y P2. Esta compresión avanza como un gradiente desde la zona ventral a la dorsal. Puelles y col., 2007).

En el estadio HH35 (9 días de incubación) el núcleo Ectomamilar se encuentra localizado debajo del Tracto óptico, ya en este estadio se observa la longitud que alcanza el núcleo desde la zona más caudal (techo óptico) hasta la zona más rostral (hipotálamo). En la zona más caudal se encuentra el antiguamente denominado Sinencéfalo o Prosómero 1 (P1), en su área comisural destaca el núcleo de células grandes PE (LM), en el área precomisural de P1se encuentra el SS en el que destaca su capa laxa con células pequeñas y una capa profunda compacta de células grandes y ventral a estos núcleos el nEM el cuál es continuo laterodorsalmente con el núcleo lateral, LM (Puelles et al 2007, Atlas). El área yuxtacomisural de P1 es prácticamente inapreciable ya que queda reducido en el estrato superficial a una línea (Ferrán y col., 2009). Lo mismo ocurre en el prosómero 2 en el cuál encontramos dorsalmente al nEm una fila de células grandes, en cortes más profundos se observa cómo abraza al núcleo Rotundus, esta fila de células se corresponde con el ITO.

A medida que nos encontramos en estadios más avanzados del desarrollo, los diferentes dominios diencefálicos complican en gran medida la interpretación

de los datos debida a la deformación morfogenética que sufre (Ferrán JL y col., 2009). Podemos destacar, tras nuestras observaciones y basándonos en estas deformaciones morfogenéticas de cada uno de los prosómeros que los diferentes estratos del Prosómero3 no se comprimen tan fuertemente como lo hace el prosómero 2, donde los complejos nucleares intermedios se comprimen superficialmente en dirección rostrocaudal por las grandes masas superficiales del pretálamo y pretectum y esto produce que sus componentes superficiales queden reducidos , entre ellos el núcleo ITO (IGL, Puelles et al 2007, Atlas) que se extiende de una forma comprimida hacia la zona ventral hasta el núcleo Ectomamilar en cuya porción media (P2) parece contribuir, al igual que existe una continuidad entre el núcleo ectomamilar y el PE (Núcleo terminal lateral y dorsal, Puelles y col. 2007, atlas). En nuestro caso, gracias al abultamiento característico de la zona ventral del diencéfalo el núcleo ectomamilar se hace más fácilmente detectable.

Como observaron Rendhal 1924 y Kuhlenbeck (1939) la histogénesis de la primera capa del manto de los diferentes prosómeros enseña pronúcleos (estrato neuronal inmaduro) en cada uno de sus dominios, cada uno de los cuales crece y se diferencia con o sin proceso de migración y al final emergen varios núcleos definitivos. Los núcleos que comparten un origen común tienden a mostrar características moleculares compartidas, aunque existen excepciones.

La diferenciación neuronal ocurre entre los días 2-5 de incubación en el manto de los diferentes prosómeros (HH20-27; Puelles et al 1987), por tanto el periodo apropiado para examinar el estadio pronuclear de la capa del manto es en los estadios HH28-32 (6-7 días de incubación) el cual representa el punto final de la neurogénesis local (Crossland y Uchwat 1983, Martínez de la Torre 1987).

Nuestro estudio citoarquitectónico comienzan en un periodo posterior ya que los primeros datos han sido obtenidos a partir de HH34 (8 días de incubación), estadio intermedio del desarrollo, cuando el núcleo comienza a formarse y sus células aún no se encuentran situadas en su localización final. Según nuestros datos de neurogénesis, comenzar el estudio citoarquitectónico en los estadios HH28-32, dificulta la interpretación de los datos porque es en este periodo cuando el núcleo Ectomamilar aún no se ha originado por completo. Como ya se ha mencionado anteriormente el abultamiento característico donde se encuentra el núcleo facilita la interpretación. A medida que avanza el desarrollo esta deformación morfogenética junto con la maduración de los diferentes núcleos aclara la morfología de las estructuras nucleares.

Neurogénesis de las células del Núcleo Ectomamilar

El marcaje con timidina tritiada revela la duración del ciclo de las células progenitoras neurales. Tras la inyección en el embrión en desarrrollo las células en fase S (fase de síntesis) incorporan el marcador en su ADN y se desplazan hacia la superficie pial. Cuando las células marcadas pasan a la fase M son reconocibles como figuras mitóticas en la superficie ventricular. El número de células en fase M aumenta a medida que las células en fase S recorren el ciclo celular. Cuando estas células completan la fase M y pasan a G1 y luego a fase S, se alejan de la superficie ventricular y ya no se cuentan como figuras mitóticas. Cuando las primeras células acaban su segunda fase S y vuelven a entrar en la mitosis, aumenta otra vez el número de células mitóticas marcadas y se observa un segundo valor máximo al cabo de 12 horas.

El marcaje con timidina pone de manifiesto un progresivo incremento en el número de células marcadas mientras éstas se dividen. La timidina sólo está disponible para su incorporación durante la primera hora después de la

inyección.

Además de la información sobre el ciclo celular, la timidina también sirve para determinar los puntos temporales precisos de la embriogénesis en que se generan las neuronas y la glía, es decir, cuándo de volvieron post mitóticas. Mientras las células progenitoras se están dividiendo activamente sintetizan ADN e incorporan la timidina. Sin embargo, dado que sólo se dispone de timidina para unas cuantas horas, las células progenitoras que siguen dividiéndose diluyen su marcador con el tiempo. Por contraste, las células que se retiran del ciclo celular poco después y se vuelven post mitóticas permanecen fuertemente marcadas. Por tanto, las neuronas post mitóticas generadas (nacidas) en el plazo de un día tras la inyección presentarán núcleos claramente marcados y las generadas en fases posteriores estarán marcadas con menor intensidad. En general, en la misma región se forman antes las neuronas grandes que las neuronas pequeñas. (Sanes D, 2002).

Analizamos los patrones de Neurogénesis en el núcleo Ectomamilar del embrión de pollo que habían recibido Timidina Tritiada en los estadíos HH30, HH31 y HH33 y con nuestros datos podemos concretar que el nacimiento de las primeras neuronas del núcleo son en los estadios HH30/33.

Al observar el embrión que fue inyectado en el estadio HH33 (Fig. 23) las células de mayor tamaño las encontramos en la zona dorsal del núcleo y las más pequeñas en la zona ventral. Las células que se encuentran marcadas son las de mayor tamaño y están en su mayoría localizadas en la región caudal del núcleo, esto quiere decir que ya habían nacido cuando el embrión fue inyectado. Para descubrir cuándo estas células grandes nacieron, debíamos verlas desmarcadas en embriones inyectados más jóvenes.

Observando estadios más pequeños podemos conocer en qué momento nacieron estas células grandes, esto quiere decir que en los estadios

tempranos las neuronas de nueva formación están marcadas y a medida que se desarrolla el embrión estas células se dividen y sus hijas llevan la timidina de la madre y por eso se observa un mayor número de células marcadas aunque de una forma más diluida. Observando el embrión inyectado en HH30 (Fig. 21), las células del núcleo se encuentran prácticamente sin teñir, esto quiere decir que aún no habían nacido cuando el embrión fue inyectado. Así que al observar el estadio intermedio HH31 (Fig. 22) se observa que hay un mayor número de células marcadas que en HH30 y esto nos hace pensar que estaban naciendo en el momento de la inyección. Las células nacidas en HH30 ya en HH33 no se encuentran marcadas

2. Migración de las células del Núcleo Ectomamilar

Patrón de Marcaje la proteína En-2 en el núcleo ectomamilar durante el desarrollo embrionario del pollo

Los genes *Engrailed*, *En1* y *En2*, son genes homeobox que se expresan durante el desarrollo del SNC de vertebrados en dominios espaciales definidos en las presuntivas regiones influenciadas por el IsO (núcleo Istmoóptico): el mesencéfalo y rombencéfalo rostral, sugiriendo su implicación en el desarrollo de estas áreas. Los genes *En* fueron identificados originalmente en base a su homología con el gen de *Drosophila engrailed* (*en*), perteneciente a la clase de genes denominada de polaridad de segmento (Joyner y Martin, 1987). El gen *en* de *Drosophila* tiene múltiples funciones entre las cuales se encuentra la organización de segmentos y el desarrollo del SNC de la mosca. En ratones, la expresión de los genes *En* comienza temprano en el desarrollo, con una expresión parcheada inicial que posteriormente se fusiona para posicionarse en el prospectivo territorio del IsO (McMahon y col., 1992). En el cerebro adulto, ambos genes presentan una

expresión coordinada en núcleos motores del puente y sustancia negra y En2, además, aparece en células del cerebelo. Estudios en ratones mutantes han demostrado que los miembros de la familia Engrailed son fundamentales para el correcto desarrollo de estructuras derivadas de los territorios mesencefálico y cerebelar. Ratones mutantes para el gen *En2*, una mutación que es viable, muestran una reducción del tamaño del cerebelo y del colículo inferior (Millen y col., 1994). Se ha demostrado que el fenotipo de este mutante no tiene mayores consecuencias funcionales, debido, posiblemente, a una redundancia funcional parcial con el gen En. Ratones mutantes homocigóticos para el gen En1 mueren en el nacimiento, presentando múltiples malformaciones, demostrando que En1 es fundamental para el desarrollo y regionalización del SNC, y que en especial es crítico para el desarrollo de las estructuras mesencefálicas y cerebelares (Wurst y col., 1994). Diversas investigaciones han demostrado que los genes En son esenciales para la regionalización de los territorios mesencefálico-rombencefálico (Joyner, 1996; Liu y Joyner, 2001; Wurst y Bally-Cuif, 2001, y referencias del IsO).

La expresión temprana de la proteína En-2 (comienza en HH 9) está restringida a una porción del tubo neural que contiene el primordio del cerebelo, la región ístmica y el Grises mesencefálico y forma un gradiente decreciente caudalmente y rostralmente desde un punto alto localizado alrededor de la constricción entre cerebro medio y posterior. S. Millet y Alvarado-Mallart (1990) con experimentos pollo/codorniz sugieren que el gen En-2 podría estar implicado en la especificación mesencefálica y cerebelar y que su expresión no está restringida a células neuroepiteliales, sino que se han observado en neuronas postmitóticas a través del desarrollo del ratón y alguna vez en ratón adulto, donde podría estar envuelto en diferentes mecanismos tales como diferenciación de neuronas o establecimiento de proyecciones neuronales.

Según nuestros datos, a medida que avanzamos en los estadios, va quedando más patente que las células que conforman el núcleo central del Ectomamilar son químicamente diferentes a las células que las rodean formando esa concha, tanto por la diferencia del tamaño de sus células, como la diferencia química que existe entre ellas y con las masas nucleares próximas al núcleo.

En embriones de estadios intermedios se observa cómo existe migración desde la zona del mesencéfalo hasta la zona rostroventral del núcleo que se corresponde con P2 y P3 (p2MT y p3MT, Puelles et al, 2007, Atlas), el abultamiento del núcleo Ectomamilar nos facilita la observación de una población de células En-2 positivas que forma una concha de células parvocelulares alrededor de lo que se denomina el núcleo central o Em propiamente dicho (nMT). Este marcaje tan heterogéneo dentro del núcleo confirma la diferencia química que existe entre las células de la zona central del núcleo y las células que forman la concha parvocelular. Las células parvocelulares de la concha son más inmunorreactivas al anticuerpo que las células centrales del núcleo en el cuál hay una mezcla de células de diferentes tamaños. En esta zona central encontramos células inmuno positivas y células inmuno negativas. También son altamente inmunorreactivas las células que se encuentran en la zona más caudal del núcleo. Esta diferencia de marcaje hace pensar que las células del centro del núcleo proceden de un origen diferente al de las células que conforman la concha parvocelular. El núcleo al contener diferentes tamaños y al ser químicamente diferente lleva a pensar que cada grupo de células según su tamaño proviene de un origen diferente. Las células parvocelulares que forman la concha y parte de la zona central parece ser que tienen su origen en el mesencéfalo ya que en las diferentes figuras podemos observar que existe una migración desde el mesencéfalo hasta el núcleo. Esto concuerda con lo publicado por Ferrán et al, 2009 en el que propone que el núcleo Em maduro del P1 (P1MT) consiste en una porción nuclear densa, MT propio con mezcla de células de diferentes tamaños, el cuál está cubierto por una concha parvocelular, MTSh, (anteriormente conocido como núcleo periectomamilar o subnúcleo dorsal del BOR). Según sus estudios las células Pax-7 positivas se encuentran dentro de esta concha que rodea al centro del núcleo, cuyas células son Six-3 positivas y Pax-7 negativas. Según Ferrán, las células Six-3 positivas son elementos migrados desde un origen cercano al dominio de la placa basal, pero esto aún debe ser investigado.

En las diferentes figuras donde se muestra las células inmunopositivas del núcleo Ectomamilar se observa cómo el núcleo se continúa laterodorsalmente con el PE (LT, Puelles et al 2007, Atlas) sin que sus células invadan los dominios del este núcleo, cuyas células son inmunonegativas al igual que el resto de núcleos retinorecipientes y/o tectorecipientes. Esto también confirma que aunque ambos núcleos forman el sistema óptico basal y tienen proyecciones similares, químicamente son diferentes ya que su origen es diferente.

3. Distribución de las células del Núcleo Ectomamilar.

a) CB y CR

La calretinina (CR) y la calbindina D-28K (CB) pertenecen a la gran familia EFhand calcium-binding proteins, proteínas ligadoras de calcio (CaBP), donde también se encuentra la parvalbúmina (PV). Las CaBP son de gran utilidad en neurociencia por su papel como marcadores neuronales. Se encuentran en diferentes neuronas que pertenecen a un mismo grupo celular o a grupos diferentes. Por ejemplo, la CB y la CR se coexpresan en un subgrupo cuantitativamente importante de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta, mientras que la PV se encuentra en la mayor parte de las neuronas GABAérgicas de la sustancia nigra reticular (González-Hernández y Rodríguez, 2000).

Su alta solubilidad les permite estar presentes en el citosol así como en dendritas distales y axones e inclusive en los botones sinápticos. Estas características son las idóneas para estudiar la morfología celular, la integración sináptica y la distribución de poblaciones neuronales dentro del Sistema nervioso.

Estudios previos muestran que las proteínas ligadoras de calcio intracelular se encuentran en diferentes poblaciones celulares del sistema nervioso de aves y que en general muestran un patrón similar de distribución en diferentes especies por lo que se han utilizado como marcadores de poblaciones neuronales concretas en diferentes especies a lo largo de la escala filogenética. (Santana y col, 2003).

Nuestros resultados indican que cada proteína ligadora de calcio muestra un patrón espaciotemporal de expresión distinto durante el desarrollo del N. Em. Ambas proteínas se expresan en los estadíos iniciales del desarrollo del núcleo pero con distinta intensidad.

La CR y la CB están presentes en el diencéfalo desde etapas tempranas del desarrollo embrionario aunque la abundancia de las células CR+ en mucho mayor que las células CB+. No existe ningún tipo de paralelismo de los patrones de expresión de CB y CR durante el desarrollo del diencéfalo y particularmente en el núcleo EM. La expresión de la actividad CB en el núcleo ectomamilar durante el desarrollo es prácticamente nula, aunque existen cierto número de células dispersas en el núcleo. En cambio, la expresión de la actividad CR es mucho más intensa desde el principio, ésta es la proteína ligadora de calcio más abundante y la que se expresa más temprano en el

núcleo.

El número y grado de maduración va aumentando de forma gradual durante el desarrollo. Como observamos en nuestras preparaciones teñidas con Cresil Violeta a partir del estadio HH30 se pueden distinguir en el diencéfalo los primordios de los núcleos retinorecipientes y a partir de HH34 el núcleo Ectomamilar. Estos primordios se distinguen en base a citoarquitectura. Comparando secciones teñidas inmunohistoquímicamente para Calretinina con secciones de niveles similares teñidas con Cresil Violeta existe una diferencia en la cantidad de células CR+ presentes en la zona caudal del núcleo frente a las observadas en la zona más rostral. Esta diferencia se acentúa más en embriones que se encuentran en el estadio HH38 (12 días de incubación) donde la densidad de células CR+ aumenta gradualmente, ya que en este estadio el núcleo ya ha finalizado su formación y comienza a distinguirse las diferentes subpoblaciones que lo forman.

El nEm queda unido al PE el cual contiene una abundancia de células CR+ similar al nEm siendo la expresión de la CR intensa en ambos núcleos. Se distinguen los neuropilos de sus grandes células y que tengan similar abundancia, se puede deber a que tienen mismas proyecciones y funciones (Iwaniuk y col., 2009).

La disposición y abundancia relativa de las células CR+ es muy diferente con respecto a la observada usando la tinción inmunohistoquímica para Calbindina.

Estudios previos han mostrado la expresión temprana de Calbindina y Calretinina durante el desarrollo embrionario del Núcleo Pretectal (Santana y col., 2003), según sus datos la distribución de calretinina en el núcleo Pretectal es la misma en pollos jóvenes, adultos y viejos, en cambio la distribución de células calbindina positivas es muy baja, casi ausente, en aves jóvenes y adultos, pero este número de células CB positivas aumenta considerablemente en aves viejas. Estos datos de la baja actividad en embriones de pollo concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo, prácticamente no existe marcaje de células con actividad CB positivas en el núcleo Ectomamilar y las que se observan se encuentran dispersas en la zona caudoventral del núcleo. Nuestros datos se basan exclusivamente en embriones y no se ha realizado ningún experimento con pollos adultos.

b) AChE

La tinción tan temprana de AChE en el SN de pollo está en concordancia con las evidencias que nos muestran que el AChE está envuelto en el desarrollo neural y como parece influye directamente en el desarrollo neural, a través de un mecanismo no catalítico, contribuyendo también a la formación inicial de tractos axónicos (Torrao et al, 2000).

Este transmisor químico central aparece tempranamente en el Sistema Nervioso y parece ser responsable de mecanismos de sinaptogénesis. En estudios previos se ha observado que la expresión en algunas estructuras es pasajera pero en el caso del núcleo Ectomamilar se observa su expresión a lo largo de todo el desarrollo e incluso su expresión se ha mantenido en adultos (Santana y col.,2003).

La acumulación de AChE citoplasmático ocurre también en jóvenes neuronas postmitóticas (Miki el al., 1981a ; Miki and Mizoguti, 1982). La AChE es usada como un marcador temprano de la diferenciación neuronal y por ello la utilidad de la histoquímica de AChE para la identificación de neuroblastos dentro de una población mixta de células inmaduras es evidente.

Nosotros hemos estudiado el patrón de marcaje que sigue los neuroblastos AChE positivos en el núcleo Ectomamilar a lo largo de su desarrollo y según nuestros datos existe una ligera actividad durante los estadios más tempranos de nuestro estudio y una actividad moderada durante los estadios intermedios, en el que las células acetilcolinesterasa positivas se encuentran dispersas en el núcleo pero la expresión se incrementa en estadios más tardios del desarrollo del pollo.

En los estadios más tempranos (HH34) sí es cierto que existe inmunoreactividad en el núcleo, lo que ocurre es que esta inmunoreactividad

no se encuentra homogéneamente a lo largo de su extensión, sino que es mayor la actividad en la zona caudoventral que en la zona central. En esta zona central encontramos una inmunoreactividad más ligera, esto puede ser debido a que en estos estadios el núcleo aún está formándose y las células que conforman esta zona central están migrando desde otras zonas, lo cual apoya a lo que aporta Ferrán y col. (2009), que dice que las células de la zona central presentan una genoarquitectura diferente que las células que forma la concha parvocelular. Además también se debe a que los neuropilos van madurando. Todos estos datos concuerdan con lo publicado por Torrao y col, (2000), que demuestra que desde estadíos muy tempranos ya existe una gran inmunoreactividad. Esta intensidad no se reduce en ningún momento, se mantiene el mismo modelo de expresión desde HH38 (12 días de incubación) hasta el adulto, en el cual pasa de una inmunoreactividad moderada a intensa.

Esto se mantiene aunque el empaquetamiento glial de los núcleos y los neuropilos, crecimiento de neuropilos y otros fenómenos celulares secundarios introducen cambios incluso después de la eclosión del huevo.

6.Conclusiones

Conclusiones

- Nuestros resultados corroboran lo anteriormente publicado sobre la citoarquitectura del núcleo Ectomamilar el cual se caracteriza por su relieve en la superficie caudoventral del Diencéfalo y los diferentes tamaños de células que presenta el núcleo.
- Se observa que el núcleo Ectomamilar cruza los tres neurómeros o prosómeros (p1-p3).
- Según nuestras observaciones las células del núcleo Ectomamilar aún no habían nacido en el estadio HH30, su nacimiento es posterior a este periodo.
- 4. El nacimiento del núcleo se produce entre los estadios HH30/33 (6-8 días de incubación) y el tamaño del núcleo es diferente desde estos estadios iniciales hasta que consigue su posición final en el estadio HH38 (12 días de incubación). A partir de aquí el tamaño y la forma del núcleo permanecen estables y no difieren a lo largo del desarrollo embrionario.
- 5. Se observa que los primeros indicios de aparición del núcleo Ectomamilar tienen lugar en el estadio HH34 (8 días de incubación).
- Se revela, con la proteína de origen mesencefálico engrailed-2, la existencia de un desplazamiento de las células desde el mesencéfalo hacia el diencéfalo, para formar el núcleo Ectomamilar.

- 7. Se observan con Engrailed-2 diferencias de marcaje en las diferentes zonas del núcleo: en su zona central y en la concha alrededor de esta. Existe un mayor número de células marcadas en la zona que rodea al núcleo y es aquí donde se encuentran las células de mayor tamaño.
- Se observa una gran cantidad de células inmunoreactivas para calretinina en el núcleo ectomamilar y núcleos ópticos, desde estadios tempranos.
- 9. En la zona caudal del núcleo la intensidad y abundancia de células CR+ es superior a la zona central. Esta porción central presenta una intensidad ligera de expresión y presenta dorsalmente una población de células con una inmunoreactividad más intensa, dando lugar a la concha de células parvocelulares. También se observa que éstas células más dorsales tienen un neuropilo mayor que las células que forman parte de la porción ventral.
- 10. El núcleo Ectomamilar, así como el resto de núcleos vecinos a este, presentan una baja inmunoreactividad a la proteína calbindina
- 11.La expresión de células Acetilcolinesterasa positivas difiere dentro del núcleo. En la zona central del núcleo se observa una menor intensidad de actividad acetilcolinesterasa positiva, al contrario de lo que ocurre en la zona dorsocaudal y que se corresponde con la concha parvocelular que rodea a la zona central y que tiene una actividad más intensa.

7.Bibliografía

Bibliografía

Alvarado-Mallart RM, Sotelo C (1984) Homotopic and heterotopic transplantations of quail tectal primordia in chick embryos: organization of the retinotectal projections in the chimeric embryos. Dev Biol 103: 378-398.

Alvarado-Mallart RM, Martinez S, Lance-Jones C (1990) Pluripotenciality of the 2days-old avian germinative neuroepithelium. Dev Biol 139: 75-88.

Alvarez R, Sotelo C, Alvarado-Mallart RM (1993) Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. J Comp Neurol 333: 597-615.

Araki I, Nakamura H (1999) Engrailed defines the position of dorsal dimesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. Development 126: 5127-5135.

Ariel M, Rosenberg AF (1991) Effects of synaptic drugs on turtle optokinetic nystagmus and the spike responses of the basal optic nucleus. Vis neurosci 7: 431-440.

Arndt K, Redies C (1996) Restricted expression of R-Cadherin by brain nuclei and neural circuits of the developing chicken brain. J Comp Neurol 373: 373-399.

Bloch-Gallego E, Millet S, Alvarado-Mallart RM (1996) Further observations on the susceptibility of diencephalic prosómeros to En-2 induction and on the resulting histogenetic capabilities. Mech Dev 58: 51-63.

Becker T, Redies C (2003) Internal structure of the nucleus rotundus revealed by mapping cadherin expression in the embryonic chicken visual system. J Comp Neurol 467:536-548.

Brecha N, Karten HJ (1979) Accesory optic projections upon oculomotor nuclei and vestibulocerebelum. Science 203:913-916.

Brecha N, Karten HJ, Hunt SP (1980) Projections of the nucleus of the basal optic root in the pigeon: an autoradiographic and horseradish peroxidase study. J Comp Neurol 189: 615-670.

Britto LRG, Gasparotto O, Hamassaki D (1990) Visual telencephalon modulates directional selectivity of accessory optic neurons in pigeons. Vis Neurosci 4: 3-10.

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

Britto LRG, Hamassaki-Britto D, Keyser KT, , Karten HJ, Lindstrom JM (1992) Neurons of the chick brain and retina expressing both α- bungarotoxin-intensitive nicotinic acetylcholine receptors: an immunohistochemical analysis. Brain Res 590: 193-200.

Britto LRG, Torrao AS, Hamassaki-Britto D (1994) Effects of retinal lesions upon the distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the chick visual system. J Comp Neurol 350: 473-484.

Burns S, Wallman J (1981) Relation of single unit properties to the oculomotor function of the nucleus of the basal optic root (AOS) in chickens. Exp Brain Res 42: 171-180.

Bagnoli P, Fontanesi G, Alesci R, Erichsen JT (1992) Distribution of neuropeptide Y, substance P and Choline acetyltransferase in the developing visual system of the pigeon and effects of unilateral retina removal. J Comp Neurol 318: 392-414.

Bally-Cuif L, Alvarado-Mallart RM, Darnell DK, Wassef M (1992) Relationship between Wnt-1 and En-2 expression domains during early development of normal and ectopic met-mesencephalon. Development 115: 999-1009.

Cambronero F, Puelles L (2000) Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. J Comp Neurol 427: 522-545.

Challet E, Miceli D (1996) Distribution of serotonin- immunoreactivity in the brain of the pigeon (Columba livia). Anat Embryol 193: 209-227.

Con N, Canbilen A, Bradley PM, Kaplan S (2003) Quantitative features of the nucleus rotundus in the brain of pre and post- hatch chicks. Dev Brain Res 146:71-77.

Couly G, Le Dourain (1990) Head morphogenesis in embryonic avian chimeras: evidence for a segmental pattern in the ectoderm corresponding to the neuromeres. Development 108: 543-558.

Crossland WJ, Uchwat CJ (1983) Neurogenesis in the chick ventral lateral geniculate and ectomamillary nuclei: relationship of soma size to birthdate. Developmental Brain Res 6: 33-46.

Crowder NA, Lehmann H, Parent MB, Wylie D (2003) The accessory optic system contributes to the spatio-temporal tuning of motion-sensitive pretectal neurons. J Neurophysiol 90: 1140-1151.

Dávila JC, Guirado S, Puelles L (2000) Expression of calcium-binding proteins in the diencephalons of the lizard Psamodromus algirus. J Comp Neurol 427: 67-92.

De Castro F, Cobos I, Puelles L, Martinez S (1998) Calretinin in pretecto- and

olivocerebellar projections in the chick: immunohistochemical and experimental study. J Comp Neurol 397: 149-162.

Diaz C, Yanes C, Trujillo CM, Puelles L (2000) Cytoarchitectonic subdivisions in the subtectal midbrain of the lizard Gallotia galloti. J Neurocytol 29: 569-593.

Diekamp B, Hellmann B, Troje NF, Wng SR, Güntürkün O (2001) Electrophysiological and anatomical evidence for a direct projection from the nucleus of the basal optic root to the nucleus rotundus in pigeons. Neurosci Letters 305: 103-106.

Ehrlich D, Mark R (1984) An atlas of the primary visual projections in the brain of the chick Gallus gallus. J Comp Neurol 223: 592-610.

Ehrlich D, Mark R (1984) Topography of primary visual centres in the brain of the chick, Gallus gallus. J Comp Neurol 223: 611-625.

Ferrán JL, Dutra de Oliveira E, Merchán P, Sandoval JE, Sanchez-Arrones L, Martínez de la Torre M y Puelles L (2009). Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. J.Comp. Neurol 517:405-451.

Fite KV, Brecha N, Karten HJ, Hunt SP (1981) Displaced ganglion cells and the accessory optic system of the pigeon. J Comp Neurol 195: 279-288.

Fidgor MC, Stern CD (1993) Segmental organization of embryonic diencephalons. Nature 363: 630-634.

Fontanesi G, Traina G, Bagnoli P (1993) Somatostatin-like immunoreactivity in the pigeon visual system: developmental expression and effects of retina removal. Vis Neurosci 10: 271-285.

Fraser S, Keynes R, Lumsden A (1990) Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. Nature 344:431-435.

Gamlin PDR, Cohen DH (1986) A second ascending visual pathways from the TO to the telencephalon in the pigeon (Columba livia). J Comp Neurol 250: 296-310.

Gamlin PDR, Cohen DH (1988) Retinal projections to the pretectum in the pigeon (columba livia). J Comp Neurol 269: 1-17

Gamlin PDR, Cohen DH (1988) Projections of the retinorecipient pretectal nuclei in the pigeon (Columba livia). J Comp Neurol 269:18-46.

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

Gänzler SII, Redies G (1995) R-Cadherin expression during nucleus formation in the chicken forebrain neuromeres. J Neurosci 6: 4157-4172.

García-Calero E, Martinez-de la –Torre M, Puelles L (2002) The avian griseum tectale: cytoarchitecture, NOS expresión and neurogenesis. Brain Res Bull 57: 353-357.

García-López R, Vieira C, Echevarría D, Martínez S (2004) Fate map of the diencephalon and the zone limitants at the 10-somites stage in chick embryos. Dev Biol 268: 514-530.

Gardner CA, Darnell DK, PooleSJ (1988) Expression of an engrailed-like gene during development of the early embryonic chick nervous system. J Neurosci Res 21: 426-437.

Gardner CA, Barald KF (1991) The cellular environment controls the expression of engrailed-like protein in the cranial neuroepithelium of quail-chick chimeric embryos. Development 113: 1037-1048.

Gardino PF, Schmal AR, Calaza K (2004) Identification of neurons with AChE and NADPH-diaphorase activities in the centrifugal visual system of the chick. J Chem Neuroanat 27: 267-273.

Gioanni H, Rey J, Villalobos J, Richard D, Dalbera A (1983) Optokinetic nystagmus in the pigeon (Columba livia) II. Role of the pretectal nucleus of the accessory optic system (AOS). Exp Brain Res 50:237-247.

Gioanni H, Rey J, Villalobos J, Richard D, Dalbera A (1983) Optokinetic nystagmus in the pigeon(Columba livia) III. Role of the nucleus ectomamillaris (n EM): interactions in the accessory optic system (AOS). Exp Brain Res 50: 248-258.

Giolli RA, Blanks R, Lui F (2006) The accessory optic system: basic organization with an update on connectivity, neurochemistry and function. Prog Brain Res 151: 409-443.

Giolli RA, Peterson GM (1985) Gabaaergic neurons comprise a major cell type in rodent visual relay nuclei: an immunocytochemical study of pretectal and accessory optic nuclei. Exp Brain Res 61: 194-203.

Golden J, Zitz JC (1997) Cell migration in the developing chick diencephalon. Development 124: 3525-3533.

Granda RH, Crossland WJ (1989) GABA-like immunoreactivity of neurons in the chicken diencephalons and mesencephalon. J Comp Neurol 287: 455-469.

Gu Y, Wang Y, Wang S-H (2002) Visual responses of neurons in the nucleus of the basal optic root to stationary stimuli in pigeons. J Neurosci Res 67: 698-704.

Heyers D, Luksch H, Redies C (2004) Selective synaptic cadherin expression by traced neurons of the chicken visual system. Neuroscience 127: 901-912.

Hu M, Naito J, Chen Y, Ohmori Y (2003) Afferent and efferent connections of the nucleus rotundus demonstrated by WGA-HRP in the chick. J Anat Histol Embryol 32: 335-340.

Hu M, Naito J, Chen Y, Ohmori Y, Fukuta K (2004) Morphological characteristics of tectal neurons of layer I projecting to the nucleus geniculatus lateralis ventralis in chick. J Vet Med Sci 66: 1015-1016.

Iwaniuk A, Pahan J, Gutiérrez-Ibáñez C, Wylie D (2009) Expression of calciumbinding proteins in cerebellar-and inferior olivary-projecting neurons in the nucleus lentiformis mesencephali of pigeons. Vis Neurosci 26: 341-347.

Karten HJ, Fite KV, Brecha N (1977) Specific projection of displaced retinal ganglion cells upon the accessory optic system in the pigeon (Columbia livia). Proc.Natl.Acad.Sci. 4: 1753-1756.

Keynes R, Lumsden A (1990) Segmentation and the origin of regional diversity in the vertebrate central nervous system. Neuron 2: 1-9.

Labandeira-García JL, Guerra-Seisas MJ, Labandeira-García JA, Jorge-Barreiro FJ (1989) Afferent connections of the oculomotor nucleus in the chick. J Comp Neurol 282: 523-534.

Larsen CW, Zeltser LM, Lumsden A (2001) Boundary formation and compartition in the avian diencephalons. J Neurosci 21 (13): 4699-4711.

Martínez S, Alvarado-Mallart RM (1989) Transplanted mesencephalic quail cells colonize selectively all primary visual nuclei of chick diencephalons: a study usin heterotopic transplant. Dev Brain Res 47: 263-274.

Martínez S, Alvarado-Mallart RM (1990) Expression of the homeobox chick-en gene in chick/quail chimaeras with inverted mes-metencephalic grafts. Dev Biol 139:432-436.

Martínez de la Torre M, Garda AL, Puelles E, Puelles L (2002) GBX2 expression in the late embryonic chick dorsal thalamus. Brain Res Bull 57:435-438.

McKenna OC, Wallman J (1985) Accessory optic system and pretectum of birds: comparisons with those of other vertebrates. Brain Behav Evol 26:91-116.

Medina L, Reiner A (2000) Do birds posses homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? Trends Neurosci 23:1-12.

Miceli D, Repérant J, Bertrand C, Rio JP (1999). Functional anatomy of the avian centrifugal visual system. Behav Brain Res 98: 207-210.

Milán FJ, Puelles L (2000) Patterns of calretinin, calbindin and TH expression are consistent with the prosomeric map of the frog diencephalons. J Comp Neurol 419: 96-121.

Millet S, Alvarado-Mallart RM (1995) Expression of the homeobox-containing gene En-2 during the development of the chick central nervous system. European J Neurosci 7: 777-791.

Miyakawa N, Sato K, Momose-Sato Y (2004) Optical detection of neural function in the chick visual pathway in the early stages of embryogenesis. European J Neurosci 20: 1133-1149. Montagnese CM, Mczey SE, Csillag A (2003) Efferent conections of the dorsomedial thalamic nuclei of the domestic chick (Gallus domesticus). J Comp Neurol 459: 301-326.

Montgomery NM, Fite KV, Grigonis AM (1985) The pretectal nucleus lentiformis mesencephali of Rana pipiens. J Comp Neurol 234: 264-275.

Morgan B, Frost BJ (1981) Visual response characteristics of neurons in Nucleus of Basal Optic Root of pigeons. Exp Brain Res 42: 181-188.

Morona R, González A (2009) Immunhistochemical localization of calbindin-D28K and calretinin in the brainstem of anuran and urodele amphibians. J Comp Neurol 515: 503-537.

Müller K, Hirano S, Puelles L, Redies C (2004) OL-Protocadherin expression in the visual system of the chicken embryo. J Comp Neurol 470: 240-255.

Naito J, Chen Y (2004) Morphologic analysis and classification of ganglion cells of the chick retina by intracellular injection of lucifer yellow and retrograde labelling with Dil. J Comp Neurol 469: 360-376.

Natal CL, Britto LRG (1987) The pretectal nucleus of the optic tract modulates the direction selectivity of accessory optic neurons in rats. Brain Res 419: 320-323.

Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C (2009) El Sistema Nervioso Central Humano. Tomo 1 y 2. Ed. Médica Panamericana.

Nowicki JL, Takimoto R, Burke C (2003) The lateral somatic frontier: dorso-ventral aspects of antero-posterior regionalization in avian embryos. Mech Dev: 227-240.

Peduzzi JD, Crossland WJ (1983) Anterograde transneuronal degeneration in the ectomamillary nucleus and ventral geniculate nucleus of the chick. J Comp Neurol 213: 287-300.

Peduzzi JD, Crossland WJ (1983) Morphology of normal and deafferented neurons in the chick. Ectomamillary nucleus. J Comp Neurol 213:301-309. Pérez-Villegas EM, Olivier C, Spassky N, Poncet C, Cochard P, Zalc B, Martínez S (1999) Early specification of oligodendrocytes in the chick embryonic brain. Dev Biol 216: 98-113.

Pétursdóttir G (1990) Vestibulo.ocular projection in the 11-day chicken embryo: pathway specificity. J Comp Neurol 297: 283-297.

Prochnow N, Lee P, Hall WC, Schmidt M (2007) In vitro properties of neurons in the rat pretectal nucleus of the optic tract (NOT). J Neurophysiol 97: 3574-3584.

Puelles L, Rubenstein JL (2003) Forebrain gene expression domains and the envolving prosomeric model. Trends Neurosci vol 26, (9): 469-476. Review.

Puelles L (2001) Evolution of the nervous system brain segmentation and forebrain development in amniotes. Brain Res Bull vol 55, 6: 696-710.

Puelles L, Martínez S, Martínez de la Torre M (1988) The locus of optic nerve head representation in the retinotopic projection over nucleus geniculatus lateralis ventralis and nucleus griseum tectalis in the chick also lacks a retinal. Neurosci Letters 85: 35-39.

Puelles L, Guillén M, Martínez de la Torre M (1991) Observations on the fate of nucleus superficialis magnocellularis of Rendahl in the avian diencephalon, bearing on the organization and nomenclature of neighboring retinorecipient nuclei. Anat Embryol 183: 221-233.

Puelles L, Martínez S, Martínez de la Torre M (2008) Neuroanatomía. Ed. Médica Panamericana.

Puelles L, Amat JA, Martínez de la Torre M (1987) Segment-related, mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos: I. topography of AChE (+) neuroblasts up to stage HH 18. J Comp Neurol 266: 247-268.

Puelles L, Martinez de la Torre M, Paxinos G, Watson C, Martínez S (2007). The chick brain in stereotaxic coordinates. An atlas featuring neuromeric subdivisions and mammalian homologies. Elsevier.

Presson J, Fernald RD, Max M (1985) The organization of retinal projections to the diencephalon and pretectum in the cichlid fish, Haplochromis burtoni. J Comp Neurol 235: 360-374.

Redies C, Treubert-Zimmermann U, Luo J (2003) Cadherins as regulators for the emergence of neural nets from embryonic divisions. J Physiol Paris 97: 5-15.

Redies C, Ast M, Nakagawa S, Takeichi M, Martínez de la Torre M, Puelles L (2000) Morphologic fate of diencephalic prosomeres and their subdivisions revealed by mapping cadherin expression. J Comp Neurol 421:481-514.

Redies C, Arndt K, Ast M (1997) Expression of the cell adhesion molecule Axonin-1 in neuromeres of the chicken diencephalons. J Comp Neurol 381 (2): 230-252.

Reiner A et al (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. J Comp Neurol 473: 377-414.

Reiner A, Karten HJ, Brecha C (1982) Enkephalin-mediated basal ganglia influences over the optic tectum: immunohistochemistry of the tectum and the

lateral spiriform nucleus in pigeon. J Comp Neurol 208: 37-53.

Reiner A, Brecha C, Karten HJ (1982) Basal ganglio pathways to the tectum: the afferent and efferent connections of the lateral spriform nucleus of pigeon. J Comp Neurol 208: 16-36.

Reiner A, Brauth SE, Kitt CA, Karten HJ (1980) Basal ganglionic pathways to the tectum: studies in reptiles. J Comp Neurol 193: 565-589.

Reiner A, Brecha C, Karten HJ (1979) a specific projection of retinal displaced ganglion cells to the nucleus of the basal optic root in the chicken. Neuroscience 4: 1679-1688.

Rétaux S, Harris WA (1996) Engrailed and retinotectal topography. Trends. Neurosci 12: 542-546.

Rio JP (1979) The nucleus of the basal optic root in the pigeon: an electron microscope study. Arch Anat Microscop 68:17-27.

Rio JP, Villalobos J, Miceli D, Repérant J (1983) Efferent projections of the visual wulst upon the nucleus of the basal optic root in the pigeon. Brain Res 271: 145-151.

Rubenstein JLR, Shimamura K, Martínez S, Puelles L (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. Annu Rev Neurosci 21: 445-477.

Rubenstein JLR, Martínez S, Shimamura K, Puelles L (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. Science 266: 578-580.

Sanes Dan H., Reh Thomas A., Harris William A.(2002) El desarrollo del Sistema Nervioso. Editorial Ariel, Barcelona.

Santana R, Reiner A, Britto L, Toledo C (2003) Differential effects of aging of the distribution of calcium-binding proteins in a pretectal nucleus of the chicken brain. J Chem Neuroanat 26: 195-208.

Selleck M, Bronner-Fraser M (1995) Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. Development 121: 525-538.

Senut MC, Alvarado-Mallart RM (1987) Cytodifferentiation of quail tectal primordium transplantes homotopically into the chick embryo. Dev Brain Res 32: 187-205.

Shepherd IT, Taylor JSH (1995) Early development of efferent projections from the chick tectum. J Comp Neurol 354:501-510.

Shimamura K, Hartigan DJ, Martínez S, Puelles L, Rubenstein JLR (1995) Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. Development 121: 3923-3933.

Shimizu T, Cox K, Karten HJ, Britto LRG (1994) Cholera toxin mapping of retinal projectios in pigeon (Columba livia), with emphasis on retinohypothalamic connections. Vis Neurosci 11: 441-446.

Shimizu T, Karten HJ (1990) Immunistochemical analysis of the visual Wulst of the pigeon (Columba livia). J Comp Neurol 300: 346-369.

Simpson JI (1984) The accessory optic system. Ann Rev Neurosci 7: 13-41.

Simpson JI, Leonard CS, Soodak RE (1988) The accessory optic system of rabbit II. Spatial organization of direction selectivity. J Neurophysiol 60 (6): 2055-2072.

Stern CD, Fraser SE, Keynes RJ, Primmett DRN (1988) A cell lineage analysis of

segmentation in the chick embryo. Development 104: 231-244.

Székeley AD, Csillag A, Görcs T (1992) Neuropeptide Y innervation of retinorecipient layers of chick optic tectum. J Neurocytol 21: 148-156.

Thanos S, Mey J (2001) Development of the visual system of the chick II: Mechanisms of axonal guidance. Brain Res Rev 35: 205-245.

Tömböl T, Ngo TD, Egedy GY (1992) EM and EM Golgi study on structure of nucleus rotundus in chicks. J Hirnforsch 33: 216-234.

Tsai HM, Garber BB, Larramendi L (1981) 3H-Thymidine autoradiographic analysis of telencephalic histogenesis in the chick embryo: I. neuronal birthdates of telencephalic components in situ. J Comp Neurol 198:275-292.

Tsai HM, Garber BB, Larramendi L (1981) 3H-Thymidine autoradiographic analysis of telencephalic histogenesis in the chick embryo: II. Dynamics of neuronal migration, displacement and agregation. J Comp Neurol 198:293-306.

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

Wang Y, Gu Y, Wang S (2000) Modulatory effects of the nucleus of the basal optic root on rotundal neurons in pigeons. Brain Behav Evol 56:287-292.

Wang Y, Gu Y, Wang S (2000) Feature detection of visual neurons in the nucleus of the basal optic root in pigeons. Brain Res Bull 51 (2): 165-169.

Wang Y, Gu Y, Wang S (2001) Directional responses of basal optic neurons are modulated by the nucleus lentiformis mesencephali in pigeons. Neurosci Letters 311: 33-36.

176

Wild JM (1992) Direct and indirect "cortico"-rubral and rubro-cerebellar cortical projections in the pigeon. J Comp Neurol 326: 623-636.