

Tesis Doctoral

Caracterización morfológica y fisiológica de las neuronas de proyección que comunican el segundo con el tercer ganglio óptico en artrópodos

Bengochea, Mercedes

2017

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bengochea, Mercedes. (2017). Caracterización morfológica y fisiológica de las neuronas de proyección que comunican el segundo con el tercer ganglio óptico en artrópodos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6225_Bengochea

Cita tipo Chicago:

Bengochea, Mercedes. "Caracterización morfológica y fisiológica de las neuronas de proyección que comunican el segundo con el tercer ganglio óptico en artrópodos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6225_Bengochea

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Caracterización morfológica y fisiológica de las neuronas de proyección que comunican el segundo con el tercer ganglio óptico en artrópodos.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área:
Ciencias Biológicas

Mercedes Bengochea

Director de tesis: **Dr. Martín Berón de Astrada**
Consejero de Estudios: **Dra. Lidia Szczupak**

Lugar de trabajo: Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (FBMC-UBA)
Instituto de Fisiología y Biología Molecular y Celular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET).

Fecha de defensa: 05 de Abril de 2017

Resumen

Título: Caracterización morfológica y fisiológica de las neuronas de proyección que comunican el segundo con el tercer ganglio óptico en artrópodos

La visión de movimiento provee claves esenciales para guiar comportamientos críticos como la detección de presas, predadores y coespecíficos. En los decápodos crustáceos e insectos pterigotas, la codificación de la información visual de movimiento está asociado con el procesamiento visual en el tercer ganglio óptico, la lóbula. Allí, las neuronas tangenciales gigantes (LG) integran información visual de delgadas neuronas columnares y la envían al cerebro medio guiando las respuestas comportamentales correspondientes. A pesar de la importancia de estas neuronas columnares en la codificación visual, estas no habían podido ser estudiadas electrofisiológicamente dado su delgado calibre. En esta tesis, desarrollamos una aproximación experimental para realizar registros poblacionales *in vivo* de estas pequeñas neuronas con técnicas de imágenes funcionales de fluorescencia sensible a calcio.

En primer lugar, estudiamos la citoarquitectura de la lóbula y caracterizamos cuatro estratos donde arborizan las neuronas columnares de entrada de la lóbula. Luego nos centramos en estudiar cómo distintos parámetros de un estímulo de movimiento afectan la actividad de las neuronas columnares. Las respuestas más intensas las obtuvimos al enfrentar al animal a estímulos oscuros que a frente estímulos claros, y frente a estímulos rápidos que a estímulos lentos. Además, estudiamos la respuesta comportamental de evitación de los cangrejos frente a las mismas características visuales con las que fueron estudiadas las neuronas transmedulares. Encontramos que la actividad en las neuronas transmedulares correlaciona fuertemente con la intensidad de la respuesta de escape evocada por dichos estímulos.

Por otra parte, cuando un animal es confrontado a una repetición de estímulos de movimiento que resultan ser inocuos, la mayoría de los animales aprenden a ignorar el estímulo. A pesar de que muchos artrópodos se habitúan a la presentación reiterada de objetos en movimiento, los sitios y mecanismos neuronales que subyacen a éste fenómeno aún no han sido identificados. Encontramos aquí que las neuronas columnares que transmiten la información al segundo ganglio óptico persisten en responder frente a la estimulación reiterada de estímulos de movimiento. Sin embargo, las neuronas columnares que transmiten la información visual del segundo ganglio óptico al tercero, la lóbula, suprimen su actividad frente a la misma estimulación. Esta rápida reducción en la actividad de las neuronas aferentes a la lóbula, que es de corta

duración y restringida únicamente al área entrenada de la retina, concuerda con los cambios comportamentales observados frente al mismo entrenamiento visual.

Por último, nos propusimos estudiar si la adaptación en columnas visuales entrenadas a ciertos atributos se generaliza a objetos en movimiento novedosos. Entrenamos a los animales a un atributo visual y evaluamos la generalización a un nuevo atributo presentado en el mismo área de estimulación. Obtuvimos una recuperación parcial de la respuesta de calcio de neuronas adaptadas tanto a la dirección de movimiento como al contraste cuando fueron evaluadas con el atributo visual novedoso. La presentación de dos atributos visuales a la hora de la evaluación no mostró diferencias significativas respecto al cambio de un único atributo.

Los resultados obtenidos en esta tesis son consistentes con la participación del tercer ganglio óptico en la codificación de estímulos de movimiento en artrópodos. Más aún, dado que las neuronas columnares se originan en el segundo ganglio óptico, la información visual de movimiento comenzaría a codificarse en el segundo neuropilo óptico. Nuestros resultados muestran que los comportamientos guiados por la visión de movimiento quedan determinados, en gran medida, por las propiedades de codificación de las neuronas columnares que comunican la médula con la lóbula.

Palabras claves: Artrópodo, imágenes funcionales de calcio, comportamiento animal, adaptación sensorial, detección de movimiento.

Abstract

Title: Morphological and physiological characterization of projection neurons that communicate the second with the third optical ganglion in arthropods.

Object motion detection provides essential cues for a wide variety of behaviors such as mate, prey, or predator detection. In insects and decapod crustaceans, encoding of object motion is associated to visual processing in the third retinotopic optic ganglion, the lobula. In this neuropile, giant tangential neurons (LGs) integrate visual information from small field columnar neurons and relay it to the midbrain where behavioural responses would be finally shaped. Despite the importance of these columnar neurons in visual coding, they could not be studied electrophysiologically because of their thin caliber. In thesis, we developed an experimental approach to record *in vivo* the population responses of this small neurons using functional techniques of calcium sensitive fluorescence.

First, we studied the neuroarchitecture of the lobula and characterized four input strata where arborizes the columnar neurons that connect the medulla with the lobula. Then, we studied the activity of the columnar neurons that feed onto the third ganglion when stimulated by different parameters of object motion. The high-speed stimuli produced the strongest calcium responses; the dark stimuli evoked greater responses than the clear ones. In addition, we studied the behavioral escape response of crabs against the same visual characteristics with which the transmedullary neurons were studied. We found that activity in transmedullary neurons strongly correlates with the intensity of the escape response evoked by these stimuli.

On the other hand, when an animal is confronted with the repeated sight of a moving object that turns out to be irrelevant, most animals will learn to ignore it. Although many arthropods exhibit behavioural adaptation to repetitive moving objects, the sites and neural mechanisms that underlie this phenomenon have not yet been identified. We found that peripheral columnar neurons that convey visual information into the second optic neuropil persist in responding to the repeated presentation of an innocuous moving object. However, activity in the columnar neurons that convey the visual information from the second to the third optic neuropil is suppressed during high-frequency stimulus repetitions. In accordance with the animal's behavioural changes, the suppression of neural activity is fast but short lasting and restricted to the retina's trained area and agrees with the behavioral changes observed with the same visual training.

Finally, we studied whether adaptation in trained visual columns to certain attributes is generalized to novel moving objects. We trained animals to one visual parameter and evaluated the generalization to a new attribute presented in the same area of stimulation. We obtained a partial recovery of the calcium response of neurons adapted to both the direction of movement and the contrast when the animals were evaluated with the opposite trained visual attribute. The presentation of two visual attributes at the time of the evaluation did not show significant differences regarding the change of a single attribute.

The results obtained in this thesis are consistent with the involvement of the third optic ganglion in object motion coding in arthropods. Moreover, as the neurons studied originate in the second optic ganglion, object motion information would indeed begin to be encoded in the second optic ganglion. Our results show that movement-guided behaviors are largely determined by the coding properties of the columnar neurons that communicate the medulla with the lobula.

Keywords: Arthropod, calcium imaging, animal behaviour, sensorial adaptation, movement detection.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido previamente presentados en las siguientes publicaciones:

Estudios sobre la neuroarquitectura de la lóbula: Los resultados presentados en el capítulo 1 de esta tesis surgen de un trabajo comenzado en mi tesina de licenciatura que fue profundizado en los primeros años del doctorado dando lugar a la siguiente publicación

Bengochea, M., & Berón de Astrada, M. (2014). Organization of columnar inputs in the third optic ganglion of a highly visual crab. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2), 61-70.

Estudios de imágenes funcionales de calcio:

Berón de Astrada, M. , **Bengochea, M.**, Sztarker, J., Delorenzi, A., & Tomsic, D. (2013). Behaviorally related neural plasticity in the arthropod optic lobes. *Current Biology*, 23(15), 1389-1398.

Indice

1	Introducción General	1
1.1	Porqué estudiar sistemas visuales en invertebrados	1
1.2	El cangrejo <i>Neohelice</i> como modelo de estudio	2
1.3	Anatomía del sistema nervioso en artrópodos	4
1.3.1	El lóbulo óptico	5
1.4	El sistema visual del cangrejo <i>Neohelice granulata</i>	7
1.4.1	Ojo compuesto	7
1.4.2	Retinotopía de los ganglios ópticos	7
1.5	Procesamiento de la información visual en canales paralelos	15
1.5.1	Visión acromática. Segregación de canales ON-OFF	16
1.6	Visión de movimiento	17
1.6.1	Modelo de correlación de Hassentein-Reichardt	18
1.7	Flujo óptico y objetos en movimiento	19
1.7.1	Detección de direccionalidad en neuronas de la <i>lobula plate</i>	20
1.7.2	Detección de objetos en movimiento en neuronas de la lóbula	21
2	Hipótesis y objetivos	25
3	Materiales y métodos generales	28
3.1	<i>Neohelice granulata</i>	28
3.2	Estudios morfológicos	28
3.2.1	Dextranos fluorescentes	28
3.2.2	Aplicación del colorante	29
3.2.3	Obtención de imágenes	30
3.3	Estímulos visuales	31
3.4	Estudios fisiológicos	32
3.4.1	Estudios de imágenes de calcio en <i>Neohelice granulata</i>	32
3.4.2	Registros ópticos	33
3.4.3	Análisis de imágenes funcionales de fluorescencia	34
3.5	Estudios de respuestas de evasión	35
3.5.1	Dispositivo experimental	35
3.5.2	Análisis de respuestas comportamentales	35
3.6	Análisis estadístico	36

4	Neuroarquitectura de la lóbula y la <i>lobula plate</i> de <i>Neohelice granulata</i>	38
4.1	Introducción	38
4.2	Materiales y métodos	39
4.3	Resultados	40
4.3.1	Elementos de entrada a la lámina y la médula de <i>Neohelice</i>	40
4.3.2	Estratos de entrada a la lóbula	43
4.3.3	Variación en el espesor de los elementos de entrada a la lóbula	45
4.3.4	Posición relativa de los estratos de entrada de la lóbula y los estratos tangenciales	45
4.3.5	Elementos de entrada a la <i>lobula plate</i>	48
4.4	Conclusiones	54
5	Respuesta poblacional de calcio de neuronas transmedulares frente a estímulos de movimiento	56
5.1	Introducción	56
5.2	Materiales y métodos	57
5.2.1	Estímulos visuales	58
5.3	Resultados	60
5.3.1	Validación de la preparación experimental	60
5.3.2	Sintonía de la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares y del comportamiento de escape frente a variaciones en la velocidad.	63
5.3.3	Sintonía de la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares y del comportamiento de escape frente a variaciones de contraste	68
5.4	Conclusiones	75
6	Plasticidad neuronal asociada al comportamiento de escape de <i>Neohelice granulata</i>	77
6.1	Introducción	77
6.1.1	Propiedades electrofisiológicas de las LG durante el entrenamiento	77
6.1.2	Estudios de generalización en las LG	79
6.2	Materiales y métodos	80
6.3	Resultados	80
6.3.1	Respuestas de calcio en los estratos de entrada a la lóbula frente a un entrenamiento masivo	80
6.3.2	La reducción de la respuesta de calcio es específica del área entrenada de la retina	81
6.3.3	Registros electrofisiológicos y ópticos de las neuronas columnares aferentes a la médula	83
6.4	Conclusiones	85

7	Procesamiento visual en canales paralelos en el cangrejo <i>Neohelice granulata</i>	87
7.1	Introducción	87
7.2	Materiales y métodos	88
7.3	Resultados	90
7.3.1	Generalización de la adaptación para direcciones de movimiento	90
7.3.2	Generalización de la adaptación para contrastes opuestos	93
7.3.3	Generalización de la adaptación para dirección y contraste	94
7.4	Conclusiones	96
8	Discusión General	98
8.1	Neuroarquitectura de la lóbula y la <i>lobula plate</i>	99
8.2	Canales visuales en <i>Neohelice granulata</i>	100
8.3	Plasticidad neuronal relacionada a comportamientos evasivos en el cangrejo	102
8.4	Generalización de la adaptación	103
	Bibliografía	105

1 Introducción General

1.1. Porqué estudiar sistemas visuales en invertebrados

Los sistemas visuales de la mayoría de los animales estudiados poseen tanto similitudes estructurales como funcionales (para una revisión ver [Sanes 2010]). La evolución ha moldeado a los ojos permitiéndoles transducir distinto tipo de información acerca de distintos parámetros visuales del mundo exterior. Los ojos pueden realizar varias funciones, desde la simple determinación de la cantidad de luz hasta la formación de imágenes. La información sobre la imagen formada en la retina a través de la óptica del ojo se transfiere a los centros ulteriores de procesamiento del cerebro para llevar a cabo comportamientos relevantes.

Hace un siglo, Cajal observó sorprendentes similitudes entre los circuitos neuronales que subyacen a la visión en vertebrados y moscas. Cajal argumentó que los sistemas visuales de vertebrados y moscas eran esencialmente idénticos en aspectos claves: "Si desde el órgano visual del insecto descontamos el hecho crucial de la dislocación del soma, entonces la analogía entre el aparato visual (de los vertebrados e insectos) se convierte casi en identidad" [Cajal 1915]. En uno de los dibujos más notables de aquella era temprana, Cajal translocó el soma de las neuronas de la mosca a la posición equivalente que tendrían en vertebrados sin alterar el ganglio. Notó que había diferencias fundamentales entre los sistemas ópticos de las moscas y de los vertebrados pero sostuvo que, en lo que respecta a la organización nerviosa, el plan esencial se mantuvo con pequeñas variaciones y retoques de adaptaciones. En las últimas décadas, estudios estructurales y funcionales han apoyado fuertemente la visión de Cajal [Sanes 2010]. Paralelamente, estudios genéticos han revelado algunos mecanismos moleculares comunes que controlan el desarrollo de los sistemas visuales de vertebrados y artrópodos que también sugieren un origen evolutivo común.

Los invertebrados constituyen la mayoría de las especies conocidas de vida animal en la Tierra y han conquistado casi todos los hábitats imaginables, desde un calamar gigante que nada en las profundidades frías y oscuras del mar a una hormiga minúscula que forrajea en el suelo de la selva tropical. Esta adaptabilidad extraordinaria sería, en gran medida gracias a sus órganos sensoriales y particularmente, a sus sistemas visuales que median tareas claves como encontrar comida, localizar coespecíficos, escapar de predadores y navegar en el espacio. A pesar de que la mayoría de los invertebrados no poseen una gran agudeza visual, muchos poseen la habilidad de ver en condiciones de muy baja luminosidad, percibir colores o incluso el ángulo de polarización de la luz y muchos, también, poseen una excelente capacidad para

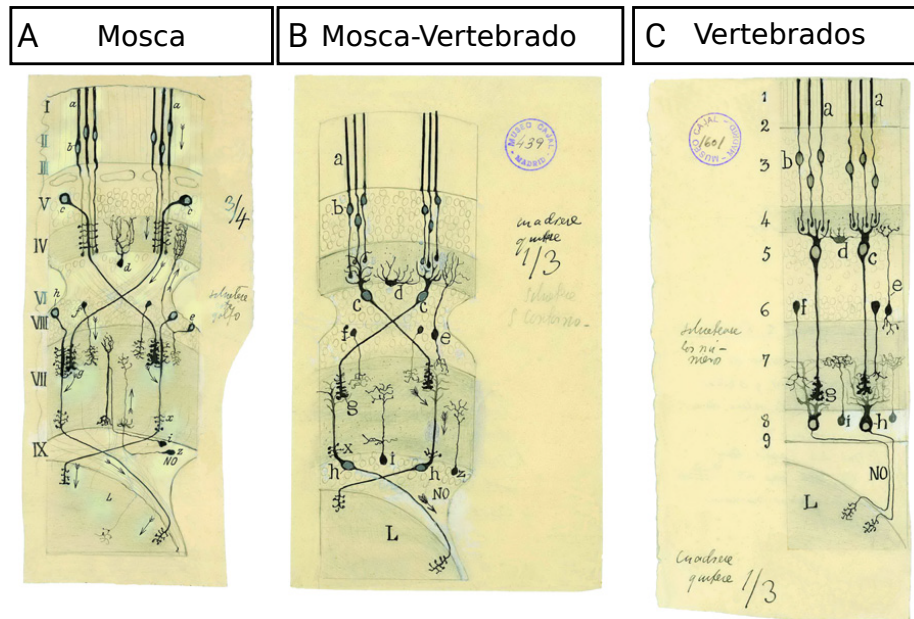


Figura 1.1: **(A)** Esquema que ilustra los distintos elementos neuronales del sistema visual de la mosca. **(B)** En este dibujo del sistema visual del insecto, Cajal “movió” los cuerpos celulares para corresponderlos con las posiciones en los vertebrados, sin cambiar las posiciones de los contactos sinápticos. **(C)** Esquema de los principales tipos celulares de la retina de vertebrados. Los números arábigos indican las regiones de la retina de los vertebrados que Cajal vio similares a las capas correspondientes marcadas con números romanos en el panel izquierdo. Adaptado de [Sanes 2010].

detectar movimientos. Debido a su pequeño tamaño, que impone una limitación espacial, los invertebrados a menudo poseen circuitos neuronales comparativamente simples de células para descifrar eficientemente información visual compleja, lo que ha permitido desentrañar principios fundamentales de la visión en animales (e.g. [O’Carroll 1993, Borst 2015]). De hecho, muchos de estos circuitos -y los cálculos que realizan- han sido utilizados con éxito para crear sistemas visuales artificiales en robots [Zufferey 2007], aeronaves [Frew 2004] y vehículos autónomos [Green 2004].

1.2. El cangrejo *Neohelice* como modelo de estudio

Neohelice granulata es un cangrejo semiterrestre de la familia *Grapsidae*, que pasa largos períodos de tiempo fuera del agua. Este constituye un modelo de estudio con múltiples ventajas [Maldonado 2002]. Por un lado, conforma una población natural que habita en estuarios -sitios donde el mar se mezcla con agua dulce- formando grandes comunidades. El hecho de que vivan en zonas de transición con constantes cambios de salinidad y de cantidad de agua, los haría muy resistentes a las manipulaciones experimentales (Figura 1.2A y B). Por otro lado, estos animales son altamente visuales y despliegan una gran variedad de conductas frente a distintos tipos de estímulos. En lo que refiere a esta tesis, nos centraremos en su respuesta de escape

frente a una amenaza visual. En las playas, su hábitat natural, los cangrejos son predados por gaviotas quienes los capturan empleando una variedad de estrategias de aproximación (Figura 1.2C, [Berón 2003]). Si bien la respuesta de escape es su reacción más común, ante la presencia cercana de éstas u otras aves (no necesariamente predadoras de cangrejos), *Neohelice* puede presentar también reacciones defensivas con sus quelas o bien un comportamiento de inmovilidad (congelamiento).



Figura 1.2: El cangrejo *Neohelice granulata*. (A). Hábitat de *Neohelice granulata*. (B). Cangrejo macho adulto en el campo. (C). Gaviota cangrejera predando a un cangrejo.

En condiciones de laboratorio, la respuesta de escape es fácilmente evocable por medio de una pantalla opaca que se mueve encima (o alrededor) del animal y que por lo tanto constituye un estímulo visual de peligro (VDS, por sus iniciales en inglés *Visual Danger Stimulus*). Frente a este estímulo, que no lleva aparejadas consecuencias inmediatas para el cangrejo, *Neohelice* despliega una característica respuesta de escape que decae luego de unas pocas presentaciones sucesivas del estímulo. La reducción de la respuesta de escape a la presentación repetida del VDS no puede ser explicada en términos de fatiga motora o adaptación sensorial [Lozada 1990], siendo el comportamiento consecuencia de un fenómeno de habituación que fue profundamente estudiado en Laboratorio de Neurobiología de la Memoria (para una revisión

ver [Maldonado 2002]).

La reducción de la respuesta de escape del cangrejo constituye un comportamiento plástico, en el que la respuesta se modifica producto de que el animal aprende que el VDS no representa un peligro real [Maldonado 2002]. Esta reducción de la respuesta al VDS puede durar de 24 hs a 5 días en función de la frecuencia de estimulación en el entrenamiento. Un entrenamiento espaciado de 15 o más ensayos con un intervalo entre ensayos mayor a 30 segundos da lugar a una memoria que dura hasta 5 días, siendo dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas y ARN. Se la denomina memoria contexto-señal ya que es un aprendizaje asociativo en el que se asocia la no peligrosidad del VDS con el contexto de entrenamiento [Hermitte 1999, Pedreira 1996]. En cambio, la memoria adquirida por 300 ensayos con un intervalo entre ensayos menor a 9 segundos (entrenamiento masivo), da lugar a una memoria que dura 24 horas, es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas y ARN y se la denomina memoria señal. Este último fue considerado un ejemplo de habituación a largo término en el que solo se aprende de la inocuidad del estímulo [Pedreira 1998].

Si bien los estudios descriptos hasta ahora en *Neohelice* se han concentrado en temas relacionados a estos aprendizajes visuales y memorias, el modelo ha dado lugar también a una gran diversidad de estudios agonísticos y de interacción social [Kaczer 2007, Pedetta 2010], de la fisiología de la visión [Beron de Astrada 2002, Tomsic 2003, Medan 2007, Oliva 2007, Beron de Astrada 2011, Medan 2015], de estudios neuroetológicos en el campo [Fathala 2010a, Fathala 2010b], de toma de decisiones y orquestación hormonal del comportamiento [Kaczer 2011, Klappenbach 2012] constituyendo un modelo de estudio del comportamiento en artrópodos altamente reconocido en la comunidad neuroetológica.

1.3. Anatomía del sistema nervioso en artrópodos

Muchos de los ganglios nerviosos de artrópodos poseen un alto grado de conservación. Sin embargo, la organización general del sistema nervioso de artrópodos reconoce distintos tipos de agrupamiento de los ganglios (o neuropilos) en centros nerviosos según el grupo filogenético en cuestión. Cada uno de estos centros nerviosos está compuesto por un conjunto de ganglios o neuropilos que se conectan entre sí a través de tractos. En cada neuropilo los cuerpos neuronales se encuentran agrupados en la periferia del mismo. Los neuropilos pueden tener una estructura geoméricamente ordenada o no, siendo los dos tipos de ordenamientos geométricos más frecuentes los esféricos y los columnares.

En particular, el sistema nervioso de un decápodo adulto está compuesto por tres centros nerviosos principales: los lóbulos ópticos, el ganglio supraesofágico y el ganglio torácico (Figura 1.3). Los lóbulos ópticos se conectan con el ganglio supraesofágico por medio del tracto protocerebral, mientras que el ganglio supraesofágico se conecta con el ganglio torácico mediante los conectivos circumesofágicos (Figura 1.3). Los primeros dos cumplen funciones fundamentalmente de percepción sensorial y cognitivas, mientras que el ganglio torácico cumple

principalmente funciones vegetativas y motoras [Sandeman 1993].

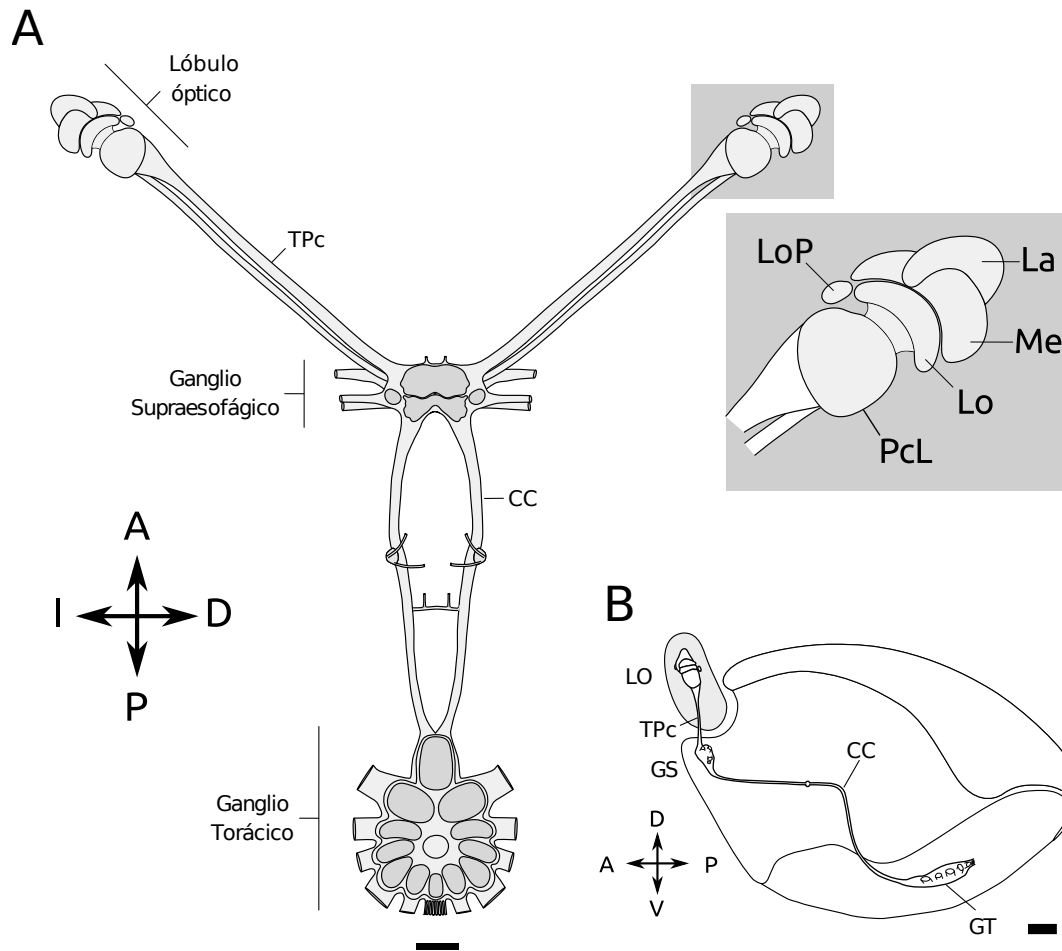


Figura 1.3: Sistema nervioso de *Neohelice granulata*. **(A)**. Esquema que representa los ganglios más conspicuos del sistema nervioso del cangrejo. El mismo se compone de dos lóbulos ópticos, un ganglio supraesofágico (GS) y un ganglio torácico (GT) ubicados dentro del cefalotórax. *Inset*: El lóbulo óptico está compuesto por cuatro ganglios ópticos: lámina (La), Médula (Me), Lóbula (Lo), *Lobula plate* (LoP) y el protocerebro lateral (PcL). **(B)**. Esquema del cuerpo del cangrejo en vista lateral que muestra la ubicación de los principales ganglios nerviosos. Los lóbulos ópticos se encuentran ubicados en los pedúnculos oculares, están conectados a través del tracto protocerebral (TPc) con el ganglio supraesofágico ubicado dentro del cefalotorax, desde este proyectan los conectivos sircumesofágicos (CC) hasta el ganglio torácico (GT). D: Dorsal, V: Ventral, P: Posterior, A: Anterior, I: Izquierda, D: Derecha, LO: Lóbulo óptico, Escalas: 500 μ m.

1.3.1. El lóbulo óptico

A diferencia de los insectos y otros crustáceos, los decápodos tienen sus ojos ubicados en los extremos de pedúnculos móviles. En la cúpula de los dos pedúnculos oculares se encuentran las estructuras ópticas y la retina (Figura 1.4, panel izquierdo). Dentro del pedúnculo se encuentra el lóbulo óptico que está compuesto por cuatro neuropilos ópticos y por una serie de neuropilos protocerebrales tradicionalmente reunidos bajo el nombre protocerebro lateral. Los

cuatro neuropilos ópticos son: la lámina, la médula, la placa lobular (de aquí en más *lobula plate*) y la lóbula [Sandeman 1993].

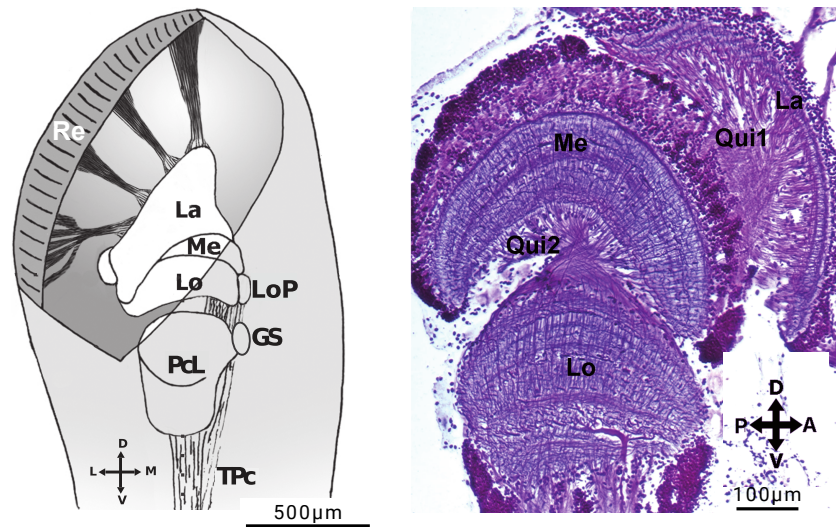


Figura 1.4: El lóbulo óptico del cangrejo *Neohelice granulata*. Izquierda: esquema de las principales estructuras nerviosas del lóbulo óptico. Derecha: tinción de Bodian que muestra una vista medial general de una sección longitudinal del lóbulo óptico de *Neohelice*. Se puede observar que la lámina, la médula y la lóbula poseen una neuroarquitectura ordenada. Los elementos neuronales se encuentran dispuestos en arreglos columnares y estratos horizontales formando un arreglo retinotópico. Modificado de [Sztarker 2005]. Re: Retina, La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, LoP: *Lobula plate*, GS: Glándula del seno, PcL: Protocerebro Lateral, TPc: Tracto protocerebral, Qui1: Primer quiasma óptico, Qui2: Segundo quiasma óptico, D: Dorsal, V: Ventral, P: Posterior, A: Anterior.

Los neuropilos ópticos presentan una citoarquitectura columnarmente ordenada (Figura 1.4, panel derecho). Las neuronas del sistema visual se disponen dando lugar a columnas visuales que son interceptadas por otras neuronas que corren horizontalmente. Estas últimas se denominan neuronas tangenciales en el sistema nervioso de artrópodos. Los procesos neuronales, dendritas y arborizaciones axónicas, de ambos tipos neuronales participan en la integración y/o modulación de la información visual. Estos procesos se ubican en estratos específicos definiendo la estructura laminar del ganglio. Las láminas o estratos están formados por dos tipos distintos de procesos: I) procesos que corresponden a las dendritas o terminales de neuronas columnares los que, por lo general, se extienden a través de un número relativamente pequeño de columnas; y II) procesos que corresponden a neuronas tangenciales que normalmente abarcan un gran número de columnas. En el corte longitudinal del lóbulo óptico mostrado en el panel derecho de la Figura 1.4 puede observarse la disposición paralela de las columnas visuales en la lámina, médula y lóbula de *Neohelice* [Sztarker 2005].

Dada la similitud de la neuroarquitectura de los ganglios ópticos de artrópodos, se cree que los crustáceos decápodos e insectos pterigotas serían grupos hermanos [Friedrich 1995].

Dado que en esta tesis nuestro modelo de estudio es el cangrejo *Neohelice*, en las siguientes secciones nos enfocaremos en hacer una descripción morfológica los ganglios ópticos de decápodos; sin dejar de tener presente que las características generales son válidas también para insectos.

1.4. El sistema visual del cangrejo *Neohelice granulata*

1.4.1. Ojo compuesto

La visión en crustáceos adultos se realiza fundamentalmente a través de los ojos compuestos [Richter 2002]. Al igual que la mayoría de los artrópodos, *Neohelice* posee ojos de aposición ubicados en el extremo de los pedúnculos móviles (Figura 1.5A-B). La retina está conformada por aproximadamente 9000 unidades ópticas hexagonales discretas, llamadas omatidios, que se encuentran distribuidas alrededor de toda la zona superior de los pedúnculos excepto por una pequeña porción de cutícula en la región medial (Figura 1.5C,[Beron de Astrada 2011]). Esta distribución de omatidios resulta en un campo visual monocular prácticamente total, abarcando 360° en el eje azimutal y 150° en la elevación.

Cada uno de los omatidios posee una lente que enfoca la luz de una porción acotada del campo visual sobre su propio grupo de 8 fotorreceptores (Figura 1.5D-E [Sztarker 2005]). Los ocho axones de los fotorreceptores de cada omatidio se extienden formando un haz hasta la membrana basal de la retina. Dado que los 8 fotorreceptores de cada omatidio censan la luz para el mismo área del campo visual, cada paquete axonal representa una unidad de muestreo de la retina que dará origen a cada columna visual de los ganglios ópticos.

1.4.2. Retinotopía de los ganglios ópticos

Como consecuencia de la organización retinotópica columnar del sistema visual, puntos vecinos del campo visual se encuentran representados a nivel neuronal en columnas visuales vecinas [Beron de Astrada 2011, Strausfeld 1980]. La Figura 1.6 muestra el patrón general de proyección de las columnas visuales desde la retina hasta tres de los neuropilos ópticos [Beron de Astrada 2011].

Los fotorreceptores en la superficie de la retina proyectan sin cruzamientos a la lámina. Como se indica por el código de color de las líneas de la Figura 1.6, las posiciones en el eje horizontal y en el vertical están representadas a lo largo de los ejes menor y mayor de la lámina. Los campos visuales frontal, lateral y posterior son mapeados respectivamente en las áreas medial, central y lateral de la lámina. Los campos visuales debajo, a nivel, o sobre el ecuador del ojo son mapeados en las partes anterior, central, y posterior del neuropilo respectivamente. Las posiciones relativas en el plano vertical se conservan a lo largo del eje anteroposterior de la médula y el mapa de las posiciones azimutales se invierte a lo largo del eje lateromedial de la médula. Es decir que, el primer quiasma óptico invierte la representación retinotópica del eje azimutal. Por otro lado, el segundo quiasma óptico invierte el mapa de las posiciones visuales

en la elevación de manera que el campo visual inferior está representado en la parte posterior de la lóbula, mientras que el superior está representado en la parte anterior (Figura 1.6).

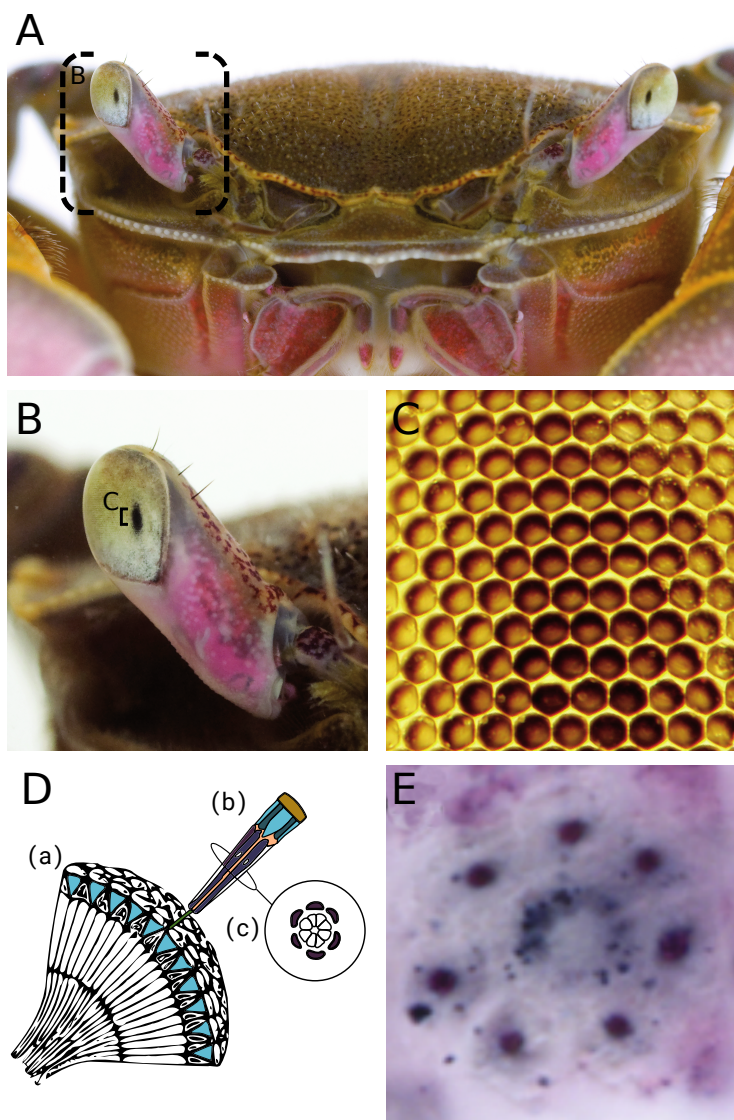


Figura 1.5: Ojo compuesto de *Neohelice granulata*. (A) Vista frontal de un cangrejo macho adulto en el laboratorio. En la foto se puede observar la posición normal de sus pedúnculos oculares móviles (líneas punteadas). (B) Fotografía tomada a mayor aumento del pedúnculo derecho del animal. (C) Se muestra un detalle del ojo compuesto (delimitado por el corchete en B) que incluye parte de la pseudopupila (omatidios oscuros). (D) Esquema del ojo compuesto. (a) Aspecto general, (b) Esquema de un omatidio, (c) Corte tangencial de un omatidio donde se esquematizan los 8 fotorreceptores. (E) Sección tangencial de un omatidio teñido utilizando la tinción de Bodian (tomado de [Sztarker 2006]).

En relación al flujo general de información visual, la señal luminosa captada por los fotorreceptores es traducida a una señal eléctrica que se modifica e integra progresivamente a

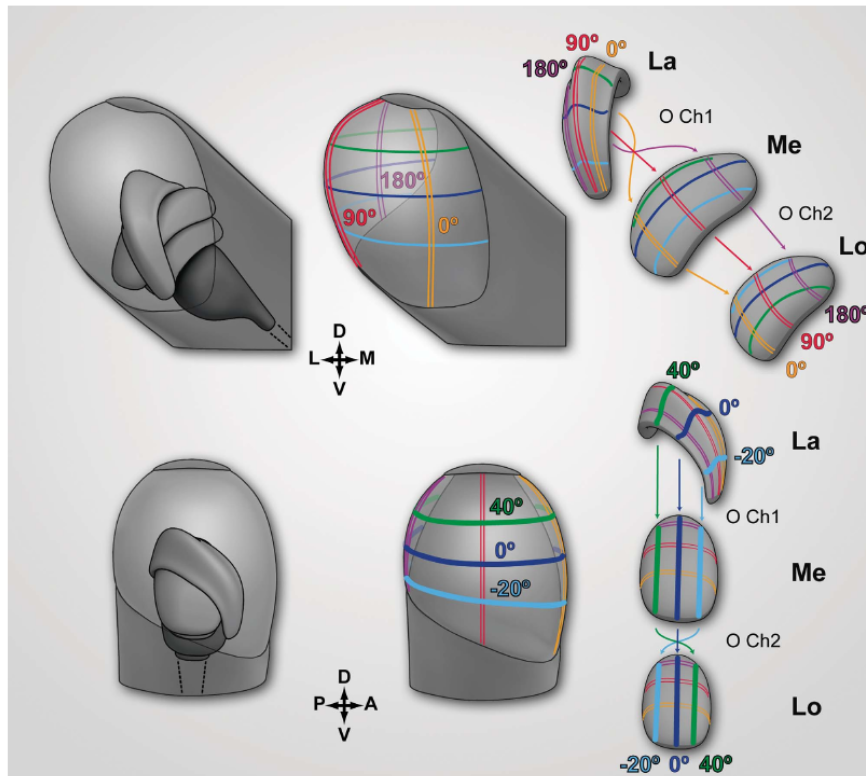


Figura 1.6: Mapas retinotópicos de tres de los neuropilos ópticos del cangrejo. El panel superior y el inferior representan vistas frontales y laterales del ojo derecho y de sus neuropilos ópticos. Las líneas verticales representan las posiciones meridianas a lo largo de la retina, mientras que las líneas horizontales representan posiciones en el eje azimutal. El código de color se conserva en los tres neuropilos ópticos y los quiasmas ópticos. La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, O Ch1, primer quiasma óptico, OCh2 segundo quiasma óptico, D: Dorsal, V: Ventral, A: Anterior, P: Posterior, M: Medial, L: Lateral. Tomado de [Beron de Astrada 2011].

medida que fluye en forma centrípeta hacia el sistema nervioso central de los animales. Mientras que las neuronas más periféricas del sistema responden sólo a cambios de luminosidad, las neuronas más centrales comienzan a responder a atributos específicos de los estímulos visuales. De este modo, neuronas más centrales pueden resultar prácticamente insensibles a cambios generales de iluminación pero sumamente reactivas a algún parámetro específico del estímulo como puede ser cierta dirección y/o sentido del movimiento en su campo receptivo. Este mecanismo progresivo de integración ocurre gracias a la organización escalonada de estratos laminares donde se procesa y extrae la información visual relevante de cada columna visual (o un número pequeño de éstas) para cada pequeña región del campo visual.

En las siguientes secciones detallaremos lo que se conoce hasta el momento en cuanto a la composición neuronal de cada uno de los neuropilos ópticos.

1.4.2.1. Primer neuropilo óptico: La lámina

La lámina es el neuropilo óptico mejor estudiado en decápodos [Hafner 1973, Hafner 1974, Nässel 1975, Nässel 1977, Strausfeld 1980, Wang-Bennett 1989, Glantz 2000, Kleinlogel 2003]. Posee una estructura elongada cuyo eje mayor se extiende desde la zona posteromedial hasta la zona anterolateral del pedúnculo ocular. Los cuerpos celulares de las neuronas de la lámina se ubican en su mayoría por encima y en la periferia del neuropilo [Sztarker 2005].

La lámina constituye el primer neuropilo óptico en el que se procesa la información visual. La morfología y la relación entre los distintos tipos neuronales que conforman la lámina de los decápodos ha sido extensamente estudiada en *Neohelice granulata* [Sztarker 2005, Sztarker 2009]. La neuroarquitectura del primer neuropilo óptico refleja la encontrada en los siguientes, neuronas columnares que son intersectadas por procesos tangenciales [Sztarker 2005]. En base a tinciones con técnicas de plata se describieron en la lámina un estrato plexiforme y dos estratos conformados por procesos tangenciales largos (corren de modo paralelo a la superficie de la lámina Figura 1.7). Los axones de siete de los ocho fotorreceptores provenientes de un omatidio arborizan juntos en el estrato plexiforme. Los dos estratos conformados por procesos tangenciales largos integrarían y modularían la información proveniente de columnas vecinas.

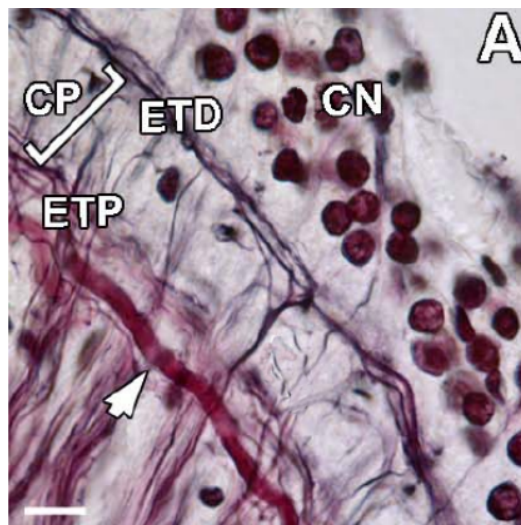


Figura 1.7: Neuroarquitectura de la lámina. Sección transversal de una preparación de Bodian que muestra que la lámina está compuesta por una capa plexiforme (CP) y dos capas formadas por procesos tangenciales, el estrato tangencial distal (ETD) y el proximal (ETP) y cuerpos neuronales de las células monopolares (CN). Se observan procesos de neuronas tangenciales corriendo por cada uno de los estratos (cabeza de flecha blanca). Escala: 10µm. Modificado de [Sztarker 2006].

En la capa plexiforme se encuentran las dendritas de las neuronas columnares de proyección que envían la información retinotópicamente a través del primer quiasma óptico hacia la

médula. Se han descrito morfológicamente 15 tipos neuronales que comunican la lámina con la médula de *Neohelice*. Las más numerosas son las neuronas denominadas monopolares (neuronas M). En todas las columnas visuales, se encuentra repetido un subgrupo de 5 neuronas monopolares (M1, M2n, M2b, M3 y M4) por lo que se cree habría, al menos, cinco canales por los que se canaliza la comunicación entre la lámina y la médula. También se han identificado neuronas retinotópicas eferentes denominadas T que ya habían sido descritas en decápodos y en varios órdenes de insectos, enfatizando las similitudes entre insectos y crustáceos [Sztarker 2009].

1.4.2.2. Segundo neuropilo óptico: La médula

La médula se ubica por debajo de la lámina y tiene forma de domo elongado siendo el eje lateromedial más largo que el anteroposterior [Sztarker 2005]. Los cuerpos celulares se ubican por encima y a los lados del neuropilo (Figura 1.4). La médula recibe información de la retina a través del octavo fotorreceptor (R8) y de la lámina a través de las distintas neuronas de proyección [Sztarker 2005, Sztarker 2009]. La citoarquitectura de la médula que mejor ha sido descrita en decápodos es la de la langosta de río *Procambarus clarkii* (de aquí en más *crayfish*). Las neuronas de la médula pueden clasificarse en: neuronas locales, las que proyectan centrífugamente hacia la lámina y las que proyectan centrípetamente hacia regiones más centrales del sistema nervioso. Dentro de las que proyectan centrípetamente se pueden establecer 4 grandes grupos: (1) Neuronas columnares que conectan la médula con la *lobula plate*; (2) Neuronas columnares que conectan la médula con la lóbula; (3) Células que conectan la médula con distintos centros del protocerebro lateral y (4) Células que proyectan por un tracto medial directamente al ganglio supraesofágico y/o al lóbulo óptico contralateral [Strausfeld 1980]. En la figura tal mostramos únicamente las neuronas transmedulares de *crayfish*.

En el cangrejo *Neohelice*, las proyecciones del tipo (1) y (2) comprenden distintas neuronas columnares llamadas neuronas transmedulares y neuronas columnares de tipo Y [Sztarker 2014]. Se describieron más de 50 subtipos de estas neuronas de proyección saliendo desde la médula sin que se pudiera identificar sobre cuál neuropilo óptico arborizan [Sztarker 2014]. En esta tesis, dado que con la metodología que usaremos no podemos discriminar entre neuronas transmedulares y de tipo Y, que las neuronas transmedulares son mayoritarias y para simplificar su denominación, nos referiremos a ellas de manera genérica como neuronas transmedulares.

1.4.2.3. Tercer neuropilo óptico: La *lobula plate*

En ciertos órdenes de insectos (Coleóptera, Lepidóptera y Díptera) la lóbula se halla acompañada por un cuarto neuropilo bien desarrollado, la *lobula plate*. Tanto la lóbula como la *lobula plate* reciben proyecciones retinotópicas de la médula. La *lobula plate* es un neuropilo de forma alargada y chata, en su interior se encuentran neuronas tangenciales (LPTC: *lobula plate tangential cells*) de gran diámetro que colectan información de neuronas columnares y

proyectan sus axones hacia centros cerebrales ubicados río abajo [Strausfeld 1998].

Mediante técnicas de Golgi e impregnaciones en cobalto, se ha hecho una descripción anatómica bastante exhaustiva de los elementos de la *lobula plate* en moscas. Cada hemisferio cerebral alberga alrededor de 60 LPTC. Estas neuronas tienen procesos neuríticos de hasta 10µm de diámetro, por lo que fueron de las primeras neuronas en ser registradas intracelularmente [Borst 2002].

En crustáceos recién se documentó la existencia de un neuropilo de similares características a la *lobula plate* hace relativamente poco tiempo y su citoarquitectura es apenas conocida [Sinakevitch 2003]. Mediante el análisis de preparados de Bodian realizados en lóbulos ópticos de *Neohelice granulata* también se logró identificar un neuropilo semejante a la *lobula plate* en cangrejos (Figura 1.8). Este neuropilo se halla ubicado en la zona anteromedial del lóbulo óptico, adyacente a la lóbula y por encima de la glándula del seno (Figura 1.4A). Al igual que en los insectos, se observaron neuronas tangenciales relativamente grandes, posiblemente colectoras, que proyectan centrípetamente.

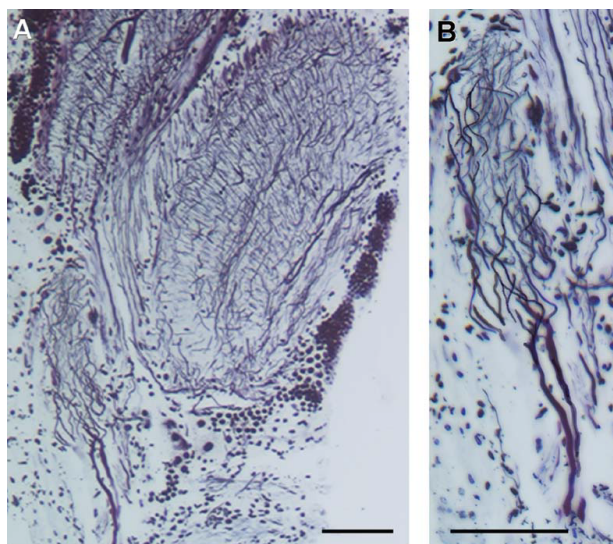


Figura 1.8: La *lobula plate* de los cangrejos. (A) Tinción de Bodian de la lóbula y la *lobula plate*, se muestra una sección transversal donde parecería que la *lobula plate* recibe información de la médula por medio de axones no cruzados. (B) La misma posee neuronas tangenciales de gran tamaño cuyos axones proyectan al cerebro medio. Escala: 100 µm. Modificado de [Sztarker 2006]

1.4.2.4. Tercer neuropilo óptico: La lóbula

La lóbula de los decápodos se ubica anidada debajo de la médula y como ésta, tiene forma de domo elongado. Los cuerpos celulares de las neuronas de la lóbula se ubican por debajo del neuropilo [Sztarker 2005]. En función de la arborización de las neuronas columnares

en la lóbula de *crayfish* se describieron siete estratos [Strausfeld 1980]. En tres de ellos arborizan las neuronas transmedulares que proyectan desde la médula: Li1, Li2, Li3 (Li por sus siglas en inglés *Lobula input*, Figura 1.9A). Estos estratos corresponderían con tres niveles de entrada de información desde la médula hacia la lóbula. El resto de los estratos queda definido por las arborizaciones de neuronas columnares de salida de la lóbula.

Una caracterización diferente de los estratos de la lóbula de crustáceos decápodos fue realizada en cangrejos a partir de tinciones de Bodian que marcan procesos gruesos que generalmente corren tangencialmente por los ganglios ópticos. En un corte transversal del neuropilo se ven claramente cuatro estratos formados por procesos tangenciales que corren lateromedialmente (LM: lateromedial, T: tangencial; Figura 1.9B, panel izquierdo). Desde la periferia hacia el centro se los denomina LMT 1-4. Los estratos LMT1 y LMT4 están compuestos por elementos tangenciales relativamente delgados, en cambio, los estratos LMT2 y LMT3 contienen neuronas de mayor diámetro que se ensanchan hacia la parte medial del neuropilo. Cortes longitudinales de la lóbula, en cambio, permiten observar otros estratos. Estos están compuestos por procesos tangenciales que corren anteroposteriormente. Desde la periferia hacia el centro se los denomina APT 1-5 (AP: anteroposterior, T: tangencial; Figura 1.9B, panel derecho).

Elementos de salida de la lóbula de crustáceos decápodos Registros intracelulares de neuronas de la lóbula de *Neohelice* permitieron el estudio de un grupo genérico de células sensibles al movimiento [Beron de Astrada 2002]. Estas comandarían la respuesta de escape de los cangrejos frente a objetos en movimiento que simulan un riesgo para los animales [Beron de Astrada 2002, Tomsic 2003, Oliva 2007]. Por analogía con las células con morfología y función similar en langostas de tierra [Fotowat 2011a], se nombró a estas células neuronas gigantes de la lóbula (LG, por su traducción al inglés de *Lobula Giant*). Su denominación hace referencia a que poseen árboles dendríticos gruesos y extensos que corren tangencialmente por la lóbula. Se trata de elementos de campo receptivo amplio, que integran la información proveniente de las columnas visuales que van atravesando a lo largo del neuropilo [Beron de Astrada 2002]. Coloraciones intracelulares revelaron la existencia de arborizaciones tangenciales dendríticas en uno o dos estratos [Beron de Astrada 2002]. Se las clasificó así en dos grandes grupos dependiendo del tipo de arborización que presentan: LG monoestratificadas y biestratificadas. La morfología general de las LG incluye: 1) Al menos una ancha arborización dendrítica tangencial en la lóbula, 2) El soma localizado por debajo del neuropilo y 3) Un axón que deja el neuropilo a través del tracto protocerebral hacia el ganglio supraesofágico.

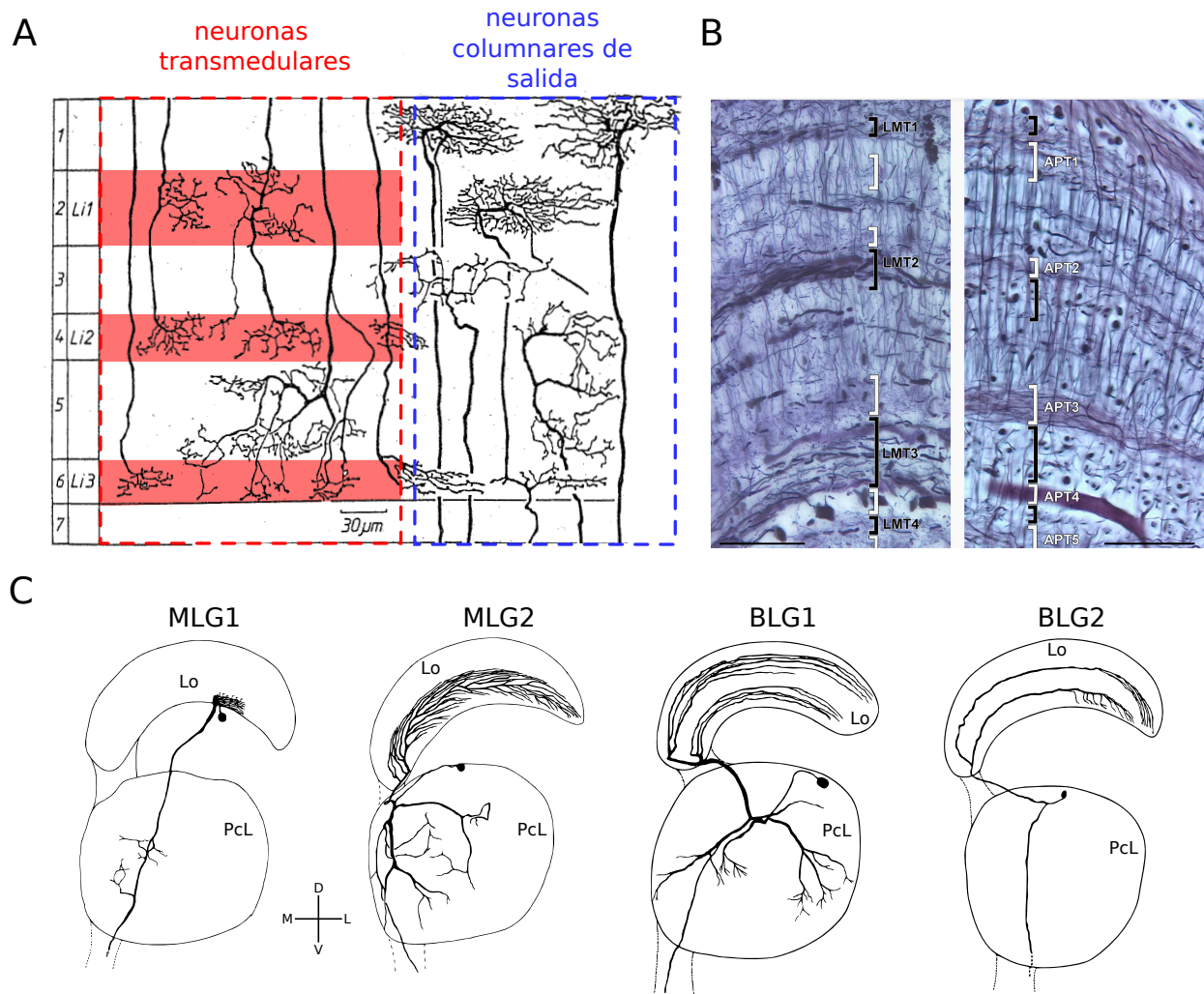


Figura 1.9: Elementos neuronales de la lóbula. **(A)** Descripción de las neuronas columnares de la lóbula en *crayfish* (modificado de [Strausfeld 1980]). El recuadro rojo muestra las proyecciones de las neuronas transmedulares, mientras que el azul muestra las neuronas columnares de salida. Tres de los siete estratos de la lóbula reciben proyecciones de neuronas columnares provenientes de la médula (Li1, Li2, Li3, rectángulos rojos). **(B)** Neuroarquitectura de la lóbula. A la izquierda se muestra una sección transversal y a la derecha una sección longitudinal de la lóbula. La sección transversal revela cuatro estratos (corchetes negros) que comprenden los procesos lateromediales LMT1-4. La sección longitudinal revela los estratos APT1-5 (corchetes blancos, modificado de [Sztarker 2005]). **(C)** Esquemas de la morfología de las neuronas gigantes de la lóbula (LG). Los dos esquemas superiores corresponden a las neuronas monoestratificadas MLG1 (izquierda) y MLG2 (derecha). Los esquemas inferiores corresponden a las neuronas biestratificadas BLG1 (izquierda) y BLG2 (derecha). Modificado de [Medan 2007]. Escala en B: 50 µm.

Un estudio más detallado de la morfología y la fisiología de estas neuronas de salida de la lóbula permitió clasificarlas en cuatro tipos neuronales: neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 1 (MLG1), neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 2 (MLG2), neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 1 (BLG1) y las neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 2 (BLG2) (Figura 1.9C, [Medan 2007]).

Mediante la combinación de tinciones masivas e individuales de elementos neuronales

con registros intracelulares *in vivo*, se observó que las neuronas MLG1 forman un sistema de 16 elementos ordenados retinotópicamente que en conjunto abarcan los 360° del campo visual en el eje azimutal [Medan 2015]. Estas células son claramente reconocibles dado que, a diferencia de las otras LG, tienen su neurita primaria (8-10 μm de diámetro) en la capa APT4 orientada en el eje anteroposterior (Figura 1.9C). Las neuritas primarias de las 16 MLG1 corren en paralelo y cada una da origen a neuritas secundarias perpendiculares que corren en forma lateromedial en la capa LMT3, en estrecho contacto con los procesos de las otras LG.

El árbol dendrítico de las MLG2 consiste en procesos que corren por la capa LMT3 (Figura 1.9C) cubriendo todo el arreglo retinotópico del neuropilo. En el extremo medial de la lóbula, las neuritas convergen en un único proceso que desciende hacia el protocerebro lateral donde arboriza en distintas zonas del mismo y da origen a un axón que desciende por el tracto protocerebral. Dado su gran tamaño y a la similitud morfológica de las distintas tinciones obtenidas, se cree que existe una única neurona MLG2 por lóbula.

Las neuronas BLG1 poseen una clara organización biestratificada. La neurita distal y la proximal, atraviesan el neuropilo por los estratos LMT2 y LMT3 respectivamente (Figura 1.9C). En el polo medial, las dos neuritas convergen en una fibra axonal que proyecta sin ramificarse hacia el tracto protocerebral (Figura 1.9C).

Las dendritas de la neuronas biestratificadas BLG2 también corren por los estratos LMT2 y LMT3 (Figura 1.9C). Estas ramificaciones convergen en el polo medial en un proceso de mayor diámetro que desciende hacia el protocerebro lateral arborizando en distintos núcleos del mismo (Figura 1.9C).

En correspondencia con sus arborizaciones tangenciales corriendo a lo largo de toda la lóbula, colectando información de todo el arreglo de columnas, las neuronas MLG2, BLG1 y BLG2 poseen un campo receptivo total.

1.4.2.5. El protocerebro lateral

El protocerebro lateral se ubica por debajo de la lóbula. Su denominación refiere al origen embrionario común de los neuropilos que lo componen [Sandeman 1992]. En esta estructura nerviosa, los cuerpos neuronales se ubican en distintos agrupamientos de somas en la periferia de los neuropilos. Estos están involucrados en el procesamiento e integración de información de distintas modalidades sensoriales [Sandeman 1992]. Se reportó que a este nivel llega información de origen visual, olfatorio, táctil y postural [Bullock 1965, Yoshino 1983, Blaustein 1988].

1.5. Procesamiento de la información visual en canales paralelos

La información de una imagen que llega a la retina se descompone en miles de puntos con información de intensidad lumínica que es canalizada desde los fotorreceptores hasta el

cerebro. Tanto cuando el animal se desplaza como cuando observa un objeto en movimiento, el estado de iluminación de cada fotorreceptor varía momento a momento, por lo que el patrón de información visual que percibe el sistema nervioso es sumamente dinámico. Las señales de intensidad lumínica captadas por un fotorreceptor son progresivamente filtradas e integradas en la columna visual correspondiente. En *Neohelice* hay una columna visual por cada omatidio del ojo compuesto [Sztarker 2009].

Como se mencionó anteriormente, cada columna está conformada por un gran número de neuronas columnares dispuestas en paralelo, donde las distintas neuronas columnares integran y extraen información sobre distintos atributos visuales en el campo visual sampleado por el omatidio y su periferia cercana. Esta información es subsiguientemente integrada, o simplemente colectada, por neuronas con extensos procesos dendríticos laterales que proyectan centripetamente llevando la información río abajo del sistema visual. En general, estas neuronas tienen un campo receptivo amplio ya que incorporan la información de más de una columna visual.

Un ejemplo sencillo de este análisis en paralelo lo constituyen las vías cromáticas y acromáticas de procesamiento de la información visual. La capacidad del sistema visual para usar la información contenida en cuanto a la composición de la longitud de onda de la luz se llama visión de color. La visión de color requiere una diferencia en la absorbancia espectral de los pigmentos de los fotorreceptores. Los animales que poseen al menos dos pigmentos visuales con diferente sensibilidad espectral pueden tener visión de color siempre y cuando los pigmentos se encuentren en diferentes fotorreceptores. Los insectos y crustáceos poseen, al menos, dos tipos de fotorreceptores con distintas propiedades de absorción. Estos presentan fibras visuales cortas que proyectan al primer neuropilo óptico (lámina) o fibras visuales largas que proyectan al segundo neuropilo (médula). En moscas, por ejemplo, las fibras largas (R7 y R8, R: fotoReceptor) dan lugar a la vía cromática y las fibras cortas constituyen una vía acromática involucrada en funciones como la detección de movimiento donde las diferencias de color aportan poca o nada de información (ver Subsección 1.5.1). A partir de este origen diferencial, las vías cromáticas y acromáticas están separadas a lo largo de la vía visual pero la extracción de información de ambos canales se realiza en paralelo en cada columna visual [Strausfeld 1991].

En abejorros los estratos más distales presentan respuestas a estímulos de color menos complejas en relación a las obtenidas en los estratos más proximales, sugiriendo que las neuronas arborizando en distintos estratos procesarían aspectos cada vez más complejos de la composición de color de la escena visual [Paulk 2009].

1.5.1. Visión acromática. Segregación de canales ON-OFF

En relación a la visión acromática tanto en vertebrados como en invertebrados se ha observado que la información respecto al “encendido” o al “apagado” de un fotorreceptor se segrega en canales neuronales distintos, canales que se denominan ON u OFF respectivamente. En artrópodos, tanto en moscas como en *crayfish*, se ha comprobado que la información visual

se segrega río abajo de los fotorreceptores en canales ON u OFF. Particularmente, distintos tipos de neuronas monopolares de la lámina que proyectan sobre distintos estratos de la médula han mostrado respuestas preferenciales para estímulos que implican la iluminación u el oscurecimiento en parches pequeños de la escena visual [Strother 2014].

El modelo artrópodo donde esta segregación de información ha sido mejor estudiada es la mosca *Drosophila melanogaster* (e.g. [Borst 2014]). Tanto en estudios fisiológicos como comportamentales, se observó que las neuronas monopolares de la lámina L1 y L2 son las principales neuronas de entrada a ambos circuitos, siendo las L1 las neuronas que codifican el canal ON y las neuronas L2 el canal OFF ([Joesch 2010, Clark 2011], en insectos las neuronas monopolares se abrevian con la letra L mientras que en crustáceos se las abrevia con la letra M). Complementariamente, las neuronas de la lámina L3 [Silies 2013, Shinomiya 2014] y L4 [Takemura 2011, Meier 2014] proveen una contribución adicional a la vía de procesamiento OFF.

Estudios de imágenes de fluorescencia sensible a calcio de neuronas columnares locales y transmedulares muestran que estos canales se mantienen segregados a nivel de la médula. Ciertas neuronas columnares presentan respuestas de calcio exclusivamente a estímulos ON (M1 y Tm3) y otras (Tm1, Tm2, Tm4 y Tm9) responden exclusivamente a estímulos OFF [Meier 2014, Strother 2014].

Así, como en la mosca se estudiaron principalmente neuronas columnares de la médula con imágenes de fluorescencia, en crustáceos decápodos se estudiaron neuronas tangenciales colectoras de la médula que responden de manera oponente a cambios en la intensidad lumínica [Glantz 2001, Beron de Astrada 2009]. Las neuronas colectoras tangenciales *sustaining* y *dimming* conforman un canal oponente de codificación de intensidad de luz donde la primeras responden a estímulos ON y las segundas a estímulos OFF. Estas son neuronas de campo receptivo amplio que interceptan y colectan la información de un gran número de columnas visuales. Estas neuronas proyectan sobre el ganglio central y su información sería utilizada para guiar el reflejo optomotor de los animales [Glantz 2002].

Los elementos neuronales recién mencionados presentan respuestas a cambios estáticos de luminosidad, siendo relativamente insensibles al movimiento. La visión de movimiento juega un rol fundamental en el comportamiento animal. En la sección siguiente, introduciremos lo que se conoce hasta ahora en cuanto al procesamiento de estímulos de movimiento en artrópodos.

1.6. Visión de movimiento

Mientras que muchos animales visuales carecen de visión binocular o de color, la capacidad de detectar objetos en movimiento está presente en casi todos los animales capaces de ver y, junto a la detección de luz y oscuridad, serían de las más antiguas y básicas de las capacidades visuales [Nakayama 1985]. La visión de movimiento provee claves esenciales para una gran variedad de comportamientos. En particular, la detección de movimiento permite obtener

información sobre el entorno pudiendo determinar el tamaño, distancia, dirección y velocidad de un objeto en movimiento. Estas características, entre otras, permiten al observador determinar el significado del estímulo y por lo tanto, predecir si conllevará a una experiencia positiva, negativa o neutra.

El mundo en movimiento se proyecta sobre la retina en forma de un patrón espaciotemporal de intensidad lumínica. A partir de esta señal dinámica, la recuperación de la información local sobre el sentido del movimiento de una imagen sería la primera etapa de extracción de información conductualmente relevante. Entender cómo las interacciones y el cableado de una multitud de células nerviosas recuperan y procesan esa información crítica para luego transmitirla al cerebro constituye una meta central en el campo de las neurociencias. En particular, la percepción del movimiento es, por mucho, la modalidad visual mejor estudiada en invertebrados [Borst 2014, Fotowat 2011b].

1.6.1. Modelo de correlación de Hassentein-Reichardt

La detección visual de movimiento requiere del procesamiento de información sobre los cambios espaciales y temporales en el patrón de intensidad lumínica originados por el movimiento de al menos un punto [Koch 1989]. Los mecanismos que describen cómo las neuronas computan la información sobre el sentido de movimiento se han estudiado extensamente, comenzando con un trabajo seminal en insectos que luego se validó en el resto de los invertebrados y vertebrados estudiados. En 1961, Hassentein y Reichardt [Reichardt 1961] desarrollaron su ahora famoso modelo de correlación homónimo. A partir de estudiar la respuesta optomotora (la tendencia a girar con el campo visual para mantener un rumbo recto en el entorno percibido) del escarabajo *Chlorophanus*. Este modelo consiste en dos canales de entrada (detectores) espacialmente separados, donde la respuesta de un canal está retardada en comparación con la del otro detector (el retardo en el canal está señalizado por la caja con un τ en la Figura 1.10). Este desfase temporal entre los detectores permite la amplificación selectiva de la dirección. Esto se logra por una operación de multiplicación (señalizada por un círculo con una M en el circuito de la Figura 1.10) de las señales generadas por el movimiento delante del detector, la que solo produce respuesta cuando las señales retardadas y no retardadas coinciden en el tiempo en el punto M. De este modo, la respuesta indica que un punto/borde se estaba desplazando, dentro de cierto rango de velocidades, en el sentido preferido en un campo visual pequeño. A estas unidades de detección de movimiento se las denominó detectores elementales de movimiento.

De esta manera, cuatro detectores que se encuentren correctamente cableados pueden describir el movimiento en las cuatro direcciones canónicas (izquierda, derecha, arriba y abajo) para un campo visual pequeño. La integración de la actividad de distintos detectores de campo pequeño permitiría la detección del movimiento sobre un campo visual más amplio (ej. [Borst 2002]). De este modo, la información del movimiento para cada punto del espacio

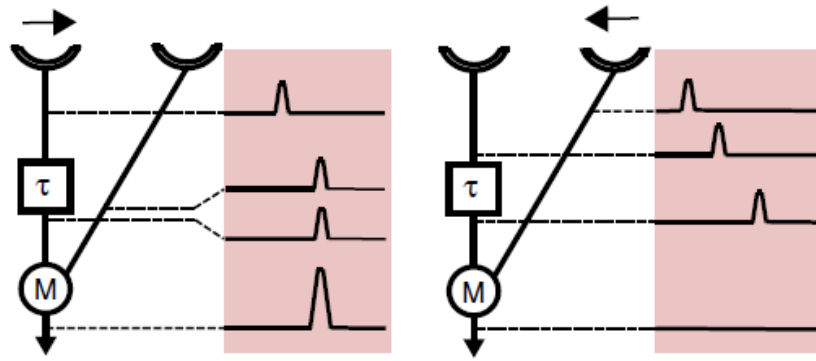


Figure 1.10: El modelo de detección de movimiento de Reichardt. El modelo se basa en el filtrado temporal diferencial de dos canales de entrada espacialmente separados, retrasando una señal con respecto a otra. Calcula la dirección del movimiento del objeto mediante la multiplicación (M) de la señal en dos puntos adyacentes luego de que uno de ellos tuvo una demora (τ). Panel izquierdo: el movimiento de izquierda a derecha en este caso hace que estas señales retardada y no retardada lleguen simultáneamente a una etapa de procesamiento subsiguiente donde se multiplican y se amplifican (M) como señal de movimiento. Panel derecho: el movimiento en la dirección opuesta donde el retardo separa las señales en el tiempo conduce a una salida nula. Adaptado de [Behnia 2015].

se codificaría en neuronas columnares que interactúan con las columnas vecinas, mientras que neuronas tangenciales colectarían la información retinotópica del movimiento integrándola para un campo receptivo más amplio [Douglass 1995].

1.7. Flujo óptico y objetos en movimiento

Los desplazamientos de imágenes sobre la retina pueden tener dos orígenes bien diferentes. Por un lado existen los que se generan como consecuencia del propio movimiento del animal y por otro, los que provienen del desplazamiento de objetos externos.

Estos dos tipos de movimiento que se generan sobre la retina pueden ser representados por mapas vectoriales en donde cada flecha representa la dirección y velocidad de movimiento local de la imagen [Koenderink 1987]. En los casos en que es el animal quien se desplaza, el flujo óptico que se generará sobre su retina puede descomponerse en dos elementos: movimientos de giro del animal (rotación sobre su eje vertical, Figura 1.11A) y movimientos en línea recta (traslación hacia delante y atrás, Figura 1.11B, [Krapp 1998]). Finalmente, el movimiento de un objeto sobre un fondo estático puede ser representado por una matriz en donde todos los vectores valen cero exceptuando a los que caracterizan la dirección y sentido de movimiento del objeto (Figura 1.11C).

El conjunto de antecedentes en artrópodos indican que la extracción de información respecto al flujo óptico tendría lugar en la *lobula plate* mientras que el análisis sobre el movimiento de objetos tendría lugar en la lóbula ([Beron de Astrada 2013], pero ver [Egelhaaf 1985]).

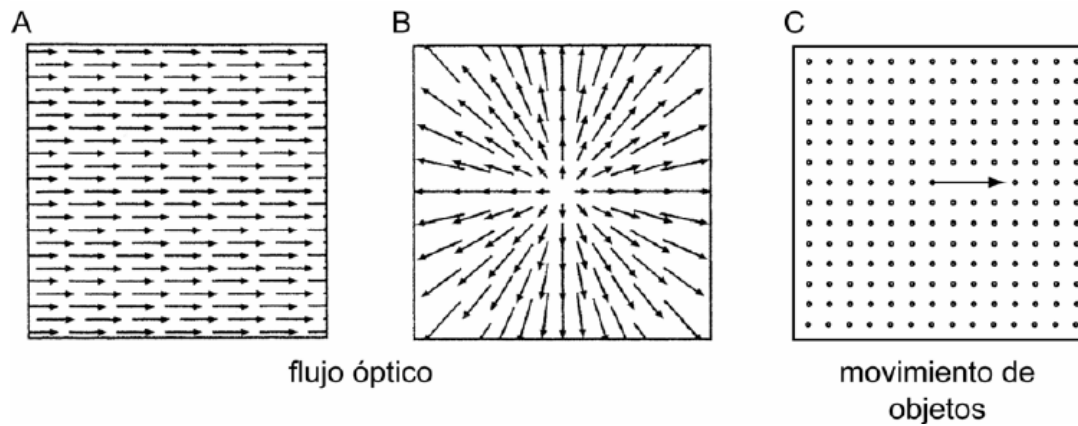


Figura 1.11: Flujo óptico y objetos en movimiento. (A) Vectores de flujo óptico producidos en la retina de un animal que rota en sentido antihorario sobre su eje. (B) Vectores que representan el movimiento de traslación hacia adelante del animal. La longitud de cada vector es proporcional a la velocidad del flujo óptico de cada punto. Por lo tanto, durante la traslación la velocidad es cero en la dirección del avance y puntos progresivos más alejados tienen mayor velocidad, con un máximo a 90° del eje de traslación. Adaptado de [Barnes 2002]. (C) Cuando un objeto puntual se mueve sobre la retina, existe un único vector de velocidad mientras que el resto del panorama permanece estático.

1.7.1. Detección de direccionalidad en neuronas de la *lobula plate*

Las neuronas tangenciales de salida (LPTC) de la *lobula plate* fueron de las primeras en ser registradas intracelularmente en insectos [Douglass 1998]. Se propuso que estas células integrarían o colectarían la información de los detectores elementales de movimiento. En cada *lobula plate* se pueden identificar cerca de 60 neuronas distintas en función de su anatomía y propiedades fisiológicas, conformándose varias subclases en relación a la preferencia por la orientación del movimiento, por su tipo de respuesta eléctrica, por la zona del cerebro a donde proyectan e incluso por sus propiedades de integración visual [Borst 2002]. En general, las LPTC son excitadas por movimientos en una dirección e inhibidas por movimientos en la dirección contraria. El estudio de imágenes funcionales de calcio en neuronas de la *lobula plate* de insectos, en simultáneo con la presentación de patrones de movimiento en las cuatro direcciones cardinales, mostraron que la actividad neuronal se encuentra confinada únicamente a uno de los cuatro estratos del ganglio, dependiendo de la dirección a la cual se esté moviendo el estímulo [Maisak 2013]. Según experimentos de ablación y las similitudes entre las respuestas de estas neuronas y los distintos tipos de comportamientos guiados por la visión, se concluyó que estas neuronas analizan el flujo óptico generado por el movimiento del propio del animal y guían la ejecución de las respuestas optomotoras y el control de la trayectoria del vuelo [Borst 2002].

1.7.2. Detección de objetos en movimiento en neuronas de la lóbula

La detección visual de objetos o blancos (*targets*) en movimiento se encontró asociada a grandes neuronas, en muchos casos neuronas gigantes, de campo amplio que llevan información de la lóbula al cerebro medio de distintos artrópodos. El conocimiento actual en el área proviene de estudios realizados en distintos modelos experimentales como por ejemplo en libélulas, langostas, moscas y cangrejos (moscas: [Hennig 2012, Nordström 2012]; libélulas: [O'Carroll 1993]; langostas: [Fotowat 2011a]; mosca de la fruta: [Wu 2016]; cangrejos: [Beron de Astrada 2002, Tomsic 2013]). A continuación, introduciremos los modelos que han sido mejor estudiados.

En la lóbula de las libélulas y las moscas polinizadoras se encuentran células detectoras de movimiento de objetos pequeños (STMD, *Small Target Movement Detectors*) que se cree estarían involucradas en la búsqueda de presas, parejas, o rivales. Mediante registros intracelulares de neuronas del tercer ganglio óptico se observó la presencia de dos tipos de detectores de movimiento: neuronas sensibles a objetos pequeños (STMD) y neuronas sensibles a barras en movimiento [O'Carroll 1993]. Las neuronas STMD están implicadas en la detección de objetos y se caracterizan por su precisa sintonización: responden fuertemente a estímulos que subtienden 1-3° del campo visual sin responder a grandes barras (mayores a 10°) o a patrones de estímulos de campo amplio [Nordström 2006]. Las libélulas y moscas polinizadoras, poseen cerca de 20 tipos diferentes de neuronas STMD [O'Carroll 1993, Nordström 2006]) que varían en tamaño y localización del campo receptivo, direccionalidad y su habilidad de discriminar objetos en un ambiente visual ruidoso. Mientras los estudios actuales se centran en entender los mecanismos computacionales que subyacen a la selectividad de las neuronas STMD por objetos pequeños, poco se sabe acerca de cómo estas neuronas contribuyen al comportamiento. Sin embargo, sí se sabe que algunas de las neuronas STMD proyectan hacia centros nerviosos superiores donde harían sinapsis con neuronas descendentes premotoras [Nordström 2009, Olberg 1986], involucradas en el control de movimiento de las alas [Olberg 1981, Olberg 2012].

La evitación de objetos con trayectoria de colisión ofrece un excelente modelo en el laboratorio para estudiar los mecanismos neuronales de la integración sensorio-motriz en el contexto de un comportamiento natural. En langostas los procesos sensoriales y motores que subyacen a estos mecanismos han sido estudiados con gran detalle: Estos animales poseen un tipo neuronal que fue identificado y nombrado como neurona gigante de la lóbula (LGMD, *Lobula Giant Movement Detector*), que responde a figuras relativamente pequeñas que se desplazan en su campo visual receptivo. Sin embargo, su activación máxima se observa cuando se le presentan estímulos que involucran la aproximación de objetos con trayectorias de colisión [Rowell 1977]. Cada neurona LGMD hace sinapsis con neuronas descendentes contralaterales detectoras de movimiento [Rind 1984, Killmann 1985]. En respuesta a un estímulo de expansión (*looming*) la tasa de disparo de estas neuronas aumenta gradualmente y llega a su respuesta máxima a un determinado tiempo antes de que ocurriese la colisión. Se propuso que la actividad de estas

células señalizan el tiempo restante antes de una eventual colisión [Gabbiani 1999]. Respuestas similares han sido encontradas en neuronas de una gran variedad de especies (palomas, [Sun 1998]; ranas: [Nakagawa 2010]; peces: [Preuss 2006]; moscas: [Fotowat 2009]).

1.7.2.1. Neuronas gigantes de la lóbula, aprendizaje visual y memoria en *Neohelice*

En los primeros estudios realizados en neuronas de la lóbula del cangrejo *Neohelice*, se identificaron células sensibles al movimiento que responden de manera intensa al mismo estímulo VDS que desencadena la respuesta de escape en *Neohelice* (Figura 1.12,[Beron de Astrada 2002]). Las mismas presentaban las siguientes características: 1) mayor sensibilidad por el movimiento que por cambios estacionarios en la iluminación; 2) gran independencia de su respuesta con respecto a la iluminación ambiental (o el contraste entre el objeto en movimiento y el fondo); 3) una gran tendencia a disminuir su respuesta frente a la estimulación reiterada; 4) en algunos casos, sensibilidad a estímulos mecánicos aplicados en distintas parte del cuerpo del animal; 5) cierta direccionalidad [Beron de Astrada 2002, Tomsic 2003].

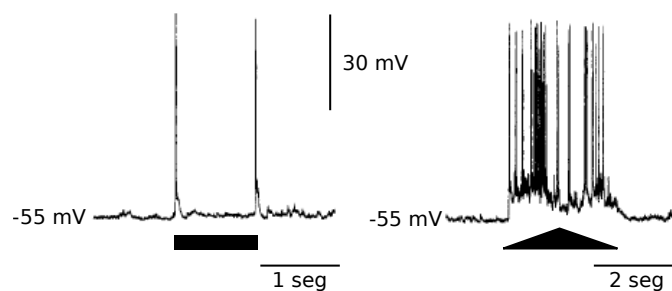


Figura 1.12: Registros intracelulares de neuronas detectoras de movimiento frente a estímulos estacionarios y de movimiento. Las LG muestran una mayor sensibilidad al estímulo de movimiento (triángulo) que a cambios en la luminosidad general producidos por el encendido y apagado de una luz (barra) [Beron de Astrada 2002].

Medan y colaboradores refinaron luego la caracterización fisiológica de estas células sensibles al movimiento [Medan 2007]. Describieron diferentes clases de neuronas tangenciales de campo amplio altamente sensibles a objetos en movimiento pero no al flujo óptico. Se cree que dos de estas clases, las MLG1 y 2 [Medan 2007] juegan un rol central en la transformación visuomotora involucrada en la respuesta a objetos de aproximación [Oliva 2007, Oliva, D & Tomsic 2012, Oliva 2014, Oliva 2016]. Si bien habría una única neurona MLG2 por lóbula, las MLG1 forman un ensamble compuesto de 16 células distribuidas a lo largo de la lóbula conteniendo la representación de todo el espacio visual del animal [Medan 2015]. Esta disposición neuronal convierte al ensamble en un buen candidato para codificar la posición en el espacio de un objeto en movimiento. Las neuronas BLG1 responden

a movimientos presentados en todo el campo visual del animal respondiendo por igual a movimientos en el plano azimutal como vertical lo que indicaría que podrían estar señalando la elevación del objeto en el eje vertical. En cambio, las neuronas BLG2 presentan una respuesta al movimiento bifásica con independencia de la dirección o el sentido del movimiento, dado que se trata de neuronas centrales, es posible que su respuesta posea un nivel de integración tal que no sea fácil relacionarla con una característica específica del estímulo [Medan 2007, Medan 2008].

La respuesta de escape del cangrejo al VDS puede verse afectada por una gran variedad de condiciones experimentales como, por ejemplo, variaciones estacionales, cambios en las características del estímulo visual, y si el estímulo es percibido de manera mono o binocular. En estudios electrofisiológicos realizando las mismas variaciones experimentales se observó que, consistentemente con el comportamiento animal, la respuesta de las neuronas LG se veía igualmente afectada (Figura 1.13A-B, [Sztarker 2008, Sztarker 2011]). El análisis realizado mostró que el perfil de disparo de potenciales de acción no sólo correlaciona con la reacción comportamental, sino que se anticipa a la respuesta de escape en aproximadamente 120 milisegundos (Figura 1.13C, [Tomsic 2003, Oliva 2007, Oliva 2016]).

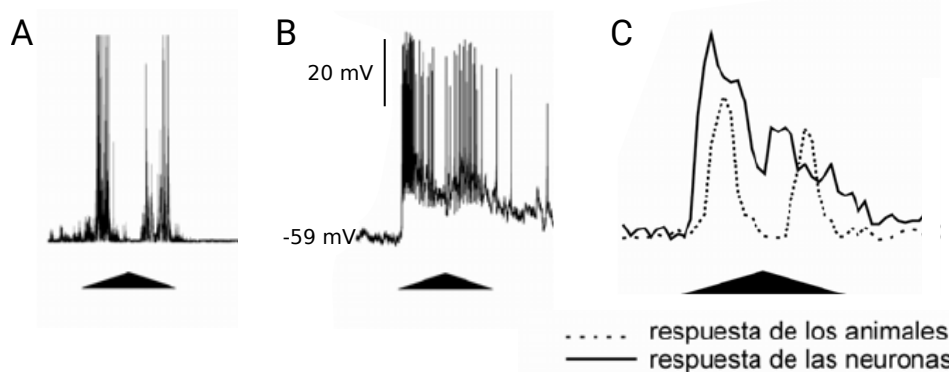


Figura 1.13: Respuestas comportamentales y neuronales al estímulo visual de peligro. **(A)** Registro en unidades arbitrarias de la respuesta de escape al VDS (triángulo negro). **(B)**. Registro de la respuesta de una neurona LG a la misma estimulación. **(C)** Histograma periéstímulo de las respuestas neuronales y comportamentales derivadas de datos poblacionales. Adaptado de [Tomsic 2003]

La tasa de reducción y recuperación de la respuesta de las LG a distintos tipos de entrenamiento coinciden notablemente con los cambios que ocurren a nivel comportamental [Tomsic 2003]. Quince ensayos de presentación del VDS en un entrenamiento masivo (intervalo entre ensayos de 2 segundos) lleva a una marcada reducción de la respuesta (Figura 1.14A-C), la cual se recupera completamente luego de 15 minutos sin estimulación, tanto a nivel comportamental (Figura 1.14Ai y C) como neuronal (Figura 1.14Bi y C). La reducción de la respuesta de las LG es específica del estímulo de movimiento, ya que la respuesta a un pulso de luz antes y después del entrenamiento no se vio afectada. Mediante presentación de

otros protocolos de entrenamiento que sí dan lugar a memorias de largo término también se observa una clara correlación entre la actividad de las neuronas LG y la respuesta de escape. Actualmente se postula que estos elementos tendrían un rol fundamental en la adquisición y mantenimiento de memorias visuales en el cangrejo [Tomsic 2003].

En conjunto, todos estos hallazgos neurofisiológicos indican que la lóbula del cangrejo no es simplemente un neuropilo periférico de procesamiento visual, sino que también está involucrada en el análisis de características adscriptas comúnmente a “centros de alto procesamiento” [Tomsic 2003, Sztarker 2005].

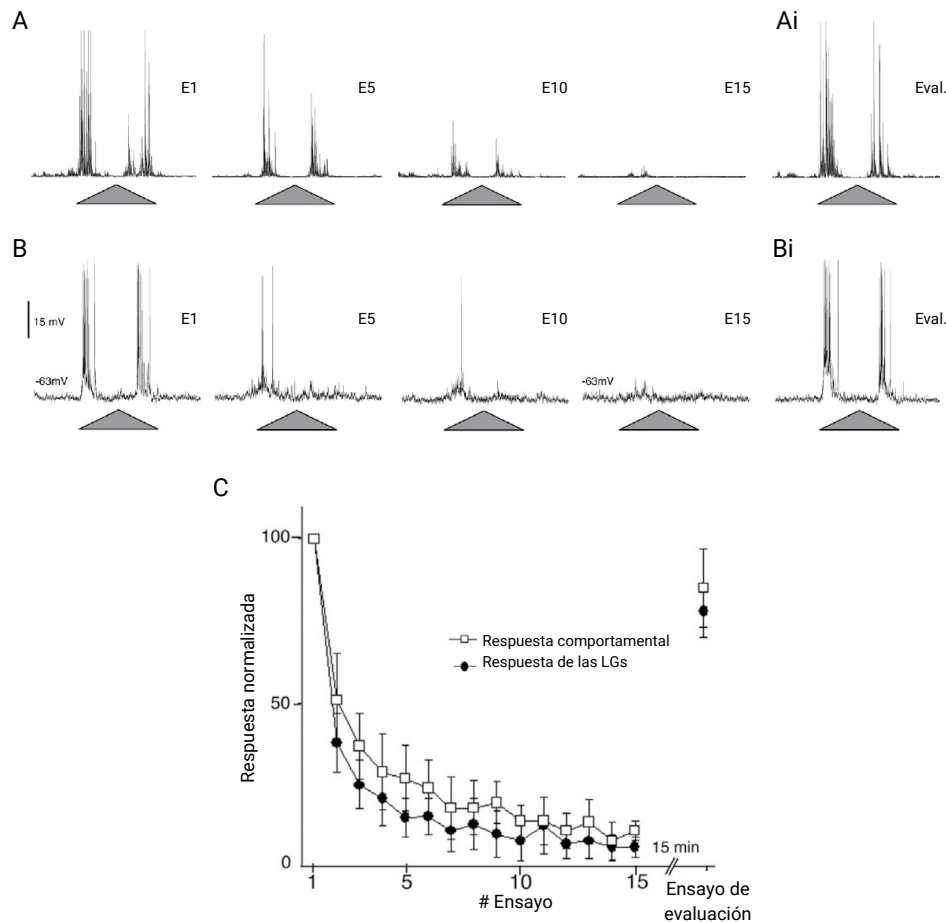


Figura 1.14: Las LG reflejan los cambios conductuales en respuesta a la estimulación repetida del VDS. (A). Intensidad de la respuesta de escape de un cangrejo a una secuencia de 15 ensayos de entrenamiento masivo. **A** muestra la respuesta para los ensayos 1, 5, 10 y 15; mientras que **Ai** muestra la respuesta para un ensayo de evaluación realizado 15 minutos luego del entrenamiento. (B). Los trazos pertenecen a registros intracelulares de una neurona LG frente a la misma estimulación. **B** muestra los registros obtenidos para los ensayos 1, 5, 10 y 15 y en **Bi** se muestra el registro obtenido para un ensayo luego de 15 minutos de finalizado el entrenamiento. (C). Respuestas neuronales promedio comparadas con respuestas comportamentales promedio evocadas por los distintos ensayos con el VDS (triángulo). El gráfico muestra medias $\pm$ error estándar. Adaptado de [Beron de Astrada 2013].

2 Hipótesis y objetivos

Al momento de comenzar esta tesis, todo lo que se conocía sobre detección de movimiento en artrópodos se sabía a partir de estudios electrofisiológicos de neuronas integradoras de salida de la lóbula y de la *lobula plate*. Según estudios morfológicos, en artrópodos, las neuronas presinápticas a las neuronas integradoras de salida de la lóbula -que comandarían distintos comportamientos de rápida ejecución frente a objetos en movimiento- serían neuronas columnares (e.g. [Douglass 2003, Sztarker 2005]). La Figura 2.1 presenta un esquema simplificado de la organización funcional de los ganglios ópticos que sirven a la ejecución rápida de comportamientos asociados a la detección de movimiento.

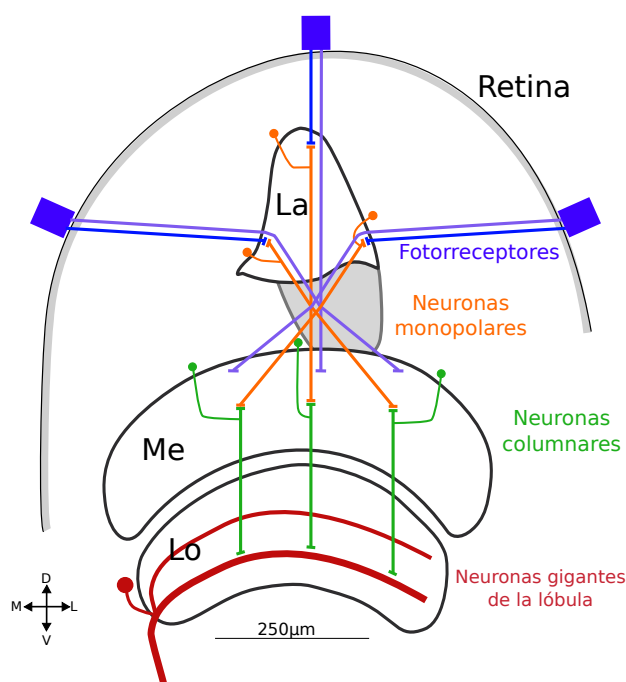


Figura 2.1: Esquema de la organización funcional de los neuropilos visuales de artrópodos.

Las neuronas columnares serían las primeras neuronas del sistema visual que codificarían el movimiento, tendrían un campo receptivo de unos pocos grados y convergerían sobre las neuronas integradoras de salida de la lóbula. Sin embargo, su fisiología no había podido ser estudiada en artrópodos debido a su delgado calibre [Borst 1989, Douglass 1995]. Dada la

importancia que tendrían estas neuronas columnares en el procesamiento de información sobre movimiento, y otros canales visuales, en esta tesis nos propusimos estudiar la anatomía general y la fisiología de las neuronas columnares de la lóbula; en particular, de las neuronas transmedulares que llevan la información de la médula a la lóbula. La hipótesis básica general con la que comenzamos este estudio podría resumirse como:

Las neuronas columnares de la lóbula codifican información de movimiento que luego es integrada por las neuronas colectoras de salida de la lóbula.

A pesar de que se ha demostrado que la lóbula es un centro de alto nivel de procesamiento e integración visual [Tomsic 2003, Sztarker 2005], en crustáceos hay muy pocos estudios en los que exploraron su neuroarquitectura. [Strausfeld 1980, Sztarker 2005]. Por otra parte, estas descripciones no pueden ser finamente complementadas ya que la descripción de la lóbula del *crayfish* se realizó en base a estratos definidos por las arborizaciones de neuronas columnares y la de la lóbula de cangrejos por estratos donde corren las arborizaciones de neuronas tangenciales.

Objetivo 1: Caracterizar morfológicamente los estratos de la lóbula donde proyectan las neuronas que llevan la información desde la médula y su ubicación relativa respecto de aquellos por donde corren las dendritas de las neuronas LG.

En artrópodos, la segregación de los distintos canales visuales en estratos anatómicos del sistema nervioso se ha estudiado en los dos primeros neuropilos ópticos. El gran número de interneuronas que conforman las columnas indicaría que una segregación de canales paralelos estaría teniendo lugar en cada columna visual, sugiriendo la extracción de un gran número de parámetros locales tales como dirección, velocidad, orientación y contraste. Distintas neuronas transmedulares que arborizan en uno más estratos de la lóbula podrían estar codificando esos distintos canales de información. Dado que la actividad de las neuronas transmedulares no había podido ser estudiada previamente, no podemos saber cuánto de la actividad observada en las neuronas de salida de la lóbula, encargadas de comandar la respuesta de escape de los cangrejos, es heredada de la actividad de sus neuronas presinápticas. En esta tesis, desarrollamos una metodología para estudiar la actividad poblacional de estas células con técnicas de fluorescencia sensible a calcio.

Objetivo 2: Estudiar la codificación de distintos parámetros visuales asociados a objetos en movimiento en los estratos de entrada de información a la lóbula. Evaluar en que medida la entrada de información a la lóbula correlaciona con la respuesta comportamental provocada por dichos estímulos visuales.

Estudios realizados en artrópodos indican que la presentación repetida de objetos en movimiento da lugar a cambios en la respuesta de las neuronas de salida de la lóbula, sugiriendo que serían la causa del cambio en los comportamientos que estas comandan. Sin embargo, en

qué lugar del sistema nervioso ocurren primeramente los cambios que ya se observan a nivel de las neuronas de salida de lóbula no había podido ser determinado.

Objetivo 3: Estudiar si las neuronas transmedulares constituyen un sitio de plasticidad frente a la presentación reiterada de objetos en movimiento.

En el caso de que se observara una modificación de la respuesta de las neuronas transmedulares por el entrenamiento con determinados objetos en movimiento; y teniendo en cuenta que las neuronas transmedulares codificarían distintos atributos visuales; nos propusimos el último objetivo de esta tesis.

Objetivo 4: Estudiar si la adaptación en columnas visuales entrenadas a ciertos atributos se generaliza a objetos en movimiento novedosos.

3 Materiales y métodos generales

3.1. *Neohelice granulata*

Los animales utilizados fueron cangrejos semiterrestres machos adultos de la especie *Neohelice granulata*, superclase *Crustacea*, clase *Malacostraca*, orden *Decapoda*, familia *Grapidae*. Los animales utilizados para los experimentos comportamentales poseían un ancho de caparazón de 2,7 a 3 cm y un peso medio de $17 \pm 0,2$ gr, mientras que para los estudios de imágenes funcionales de calcio, los animales utilizados fueron más pequeños, siendo su ancho de caparazón de 2,3 a 2,5 cm.

Neohelice es un cangrejo eurihalino que habita la zona costera de Argentina, Brasil y Uruguay dónde la salinidad promedio de las aguas se mantiene a lo largo del año entre 1,2 y 1,4 ‰. Para éste estudio, los animales fueron recolectados en las rías de San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires, Argentina [Pedreira 1998] y llevados al Laboratorio de Neurobiología de la Memoria. Los animales fueron colocados en recipientes plásticos de 35x48x27 cm con una densidad de 20 cangrejos por recipiente conteniendo 0,5 cm de profundidad de agua marina artificial preparada con hw-Marinex (1,0-1,4 ‰ de salinidad y pH de 7,4-7,6). Fueron mantenidos en un ciclo de 12hs luz-oscuridad y la temperatura entre 20 y 24 °C. Los experimentos fueron realizados durante el día y dentro de las primeras dos semanas desde el momento en que arribaron al laboratorio.

3.2. Estudios morfológicos

3.2.1. Dextranos fluorescentes

Las coloraciones masivas con dextranos acoplados a moléculas fluorescentes fueron realizadas utilizando los siguientes colorantes: dextrano Alexa - Fluor 488, dextrano Texas - Red, dextrano -Fluoresceína, dextrano - Tetrametilrodamina (3000MW, Molecular Probes). Los dextranos fluorescentes son empleados rutinariamente para trazar proyecciones neuronales. Una vez dentro de las células, migran anterogradamente hacia las terminales axonales y retrogradamente hacia las dendritas coloreando así la totalidad de la neurona ([Utting 2000, Grienberger 2012], Figura 3.1). Otra de las ventajas que presentan es que pueden aplicarse fácilmente en forma de cristales, no pasan contactos sinápticos ni uniones comunicantes y son incorporados por las neuronas por diversos mecanismos celulares [Kobbert 2000]. Los dextranos son polisacáridos

hidrofílicos caracterizados por su buena solubilidad en agua y baja toxicidad. Los dextranos de peso molecular de 3 a 10 kDa son los que generalmente se prefieren para el trazado neuronal ya que se transportan más efectivamente y pueden ser fijados con aldehídos luego de la coloración.

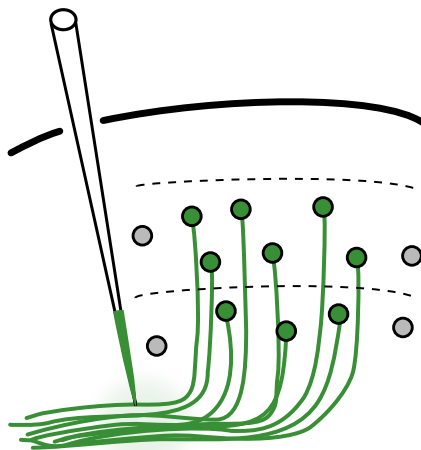


Figura 3.1: Esquema que ilustra la tinción con colorantes fluorescentes acoplados a dextranos. Un microelectrodo de vidrio conteniendo el colorante es introducido dentro del tejido nervioso dejando un *spot* de colorante en el área de interés. El mismo es incorporado por las células de la región migrando retrograda y anterogradamente tiñendo así la totalidad de las células que lo incorporaron.

3.2.2. Aplicación del colorante

Las tinciones masivas fueron realizadas utilizando microelectrodos de vidrio cargados con el colorante Figura 3.1. Se hidrataron los cristales de dextrano con agua destilada sobre un portaobjetos y se lo dejó secar al resguardo de la luz para prevenir que el colorante se fotoblanquee. Luego, fue lentamente rehidratado con condensación de humedad ambiente apoyando el portaobjeto en hielo hasta obtener una consistencia similar al caramelo. Se untó el colorante en la punta del microelectrodo y se lo dejó secar nuevamente.

Para colocar el colorante en los distintos ganglios ópticos, los cangrejos fueron anestesiados en hielo, sujetos con una pinza ajustable por ambos lados del tórax (Figura 3.2A) y colocados bajo una lupa de disección. Luego, el pedúnculo izquierdo fue rotado y fijado cuidadosamente en posición horizontal teniendo en cuenta la orientación de los ganglios ópticos (Figura 3.2B). Una pequeña porción de cutícula fue removida dejando expuesta las membranas perineurales y músculos que fueron disecados para exponer el sistema nervioso (Figura 3.2C).

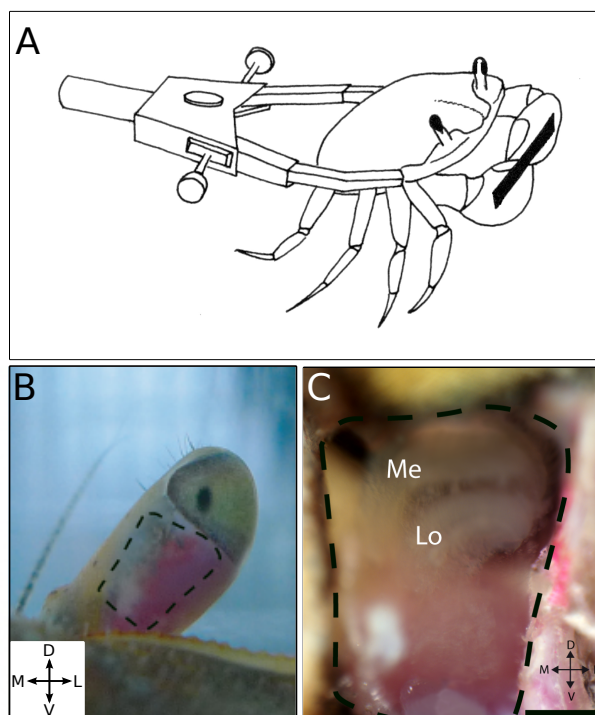


Figura 3.2: Preparación experimental. **(A)** Esquema que muestra al cangrejo sujetado con una pinza ajustable a los lados del caparazón, dejando libre el movimiento de las patas. Una tira de goma es pegada en las quelas para prevenir su movimiento. **(B)** Para realizar la incisión en la cutícula del pedúnculo, este se fija con un adhesivo instantáneo en posición horizontal teniendo en cuenta la posición de los neuropilos ópticos dentro del pedúnculo. Se realiza una incisión rectangular en la cutícula (líneas punteadas). **(C)** Luego, se disecan las membranas y los músculos que se encuentran por debajo de la cutícula hasta exponer los neuropilos ópticos de interés.

Para colorear las distintas vías neuronales del sistema visual del cangrejo se introdujo a mano el microelectrodo cubierto con cristales del colorante en los neuropilos ópticos de interés durante aproximadamente 10 segundos. Transcurrido este tiempo queda un *spot* de colorante en el área deseada [Gelperin 1997] (ver Figura 3.1). Después se volvió a colocar la pieza de cutícula removida anteriormente y se lo selló con cemento de hidróxido de calcio.

Luego de 24 horas de realizada la tinción, lapso en el cual el dextrano se incorpora a las neuronas y migra hacia los neuropilos donde estas neuronas proyectan, se anestesió al animal en hielo y se disecó el lóbulo óptico. Se fijó el tejido *overnight* a 4° C en 4% m/v de paraformaldehído en *buffer* fosfato 0,1M, pH 7,2. Se lo lavó tres veces en *buffer* fosfato (PBS) y se lo deshidrató con concentraciones crecientes de etanol durante 20 min. Luego de dos inmersiones en etanol 100 %, el tejido fue aclarado *overnight* en metilsalicilato.

3.2.3. Obtención de imágenes

Las imágenes del lóbulo óptico se obtuvieron en condición de *whole mount*. Como *a priori* no podíamos saber de que lado del tejido quedaría la marca de interés, el tejido fue

montando en un portaobjetos especialmente diseñado para poder escanear el preparado tanto desde una vista anterior como posterior. El portaobjeto se encontraba perforado de lado a lado, en uno de sus lados se pegó un cubreobjeto con esmalte de uñas transparente y se lo dejó secar dejando una cámara sellada donde luego se colocó el tejido y se selló con metilsalicilato. Se lo cubrió con otro cubreobjeto y se escaneó el tejido desde su lado posterior y/o anterior lo que permite mejor calidad de las imágenes según la cercanía de la marca a una u otra superficie del tejido. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Olympus FV 1000 o FV 300 (Láseres utilizados: láser de Ar 488nm; láser HeNe verde 543nm; láser HeNe rojo 633).

Se tomaron secciones ópticas seriadas cada 1, 5 o 10 μm dependiendo la zona del preparado a estudiar. Según el caso, los objetivos utilizados fueron Olympus 10X, 20X, 40X y 60X siendo los últimos dos de inmersión en agua.

Las imágenes que se presentan en esta tesis se realizaron superponiendo imágenes seriadas obtenidas con el microscopio confocal en el programa Fluoview ó ImageJ. Ajustes posteriores de las imágenes fueron realizados con el programa Adobe Photoshop CS4. Cabe señalar que más allá de las imágenes elegidas para ilustrar, los resultados presentados en esta tesis surgen del seguimiento y análisis de toda la pila de imágenes obtenidas para cada ganglio óptico. Este procedimiento nos permitió no solo distinguir mayores detalles, sino conocer precisamente la orientación desde la cuál el lóbulo óptico fue escaneado.

3.3. Estímulos visuales

Los estímulos visuales fueron generados con una PC utilizando el *software* comercial (Presentation 5.3, Neurobehavioral Systems, Albany, CA). Dado que los experimentos fisiológicos y los estudios comportamentales fueron realizados en distintos dispositivos experimentales, los estímulos fueron diseñados para cada dispositivo en particular de manera que no variaran los parámetros visuales de interés. En el Capítulo 5 y el Capítulo 7 de esta tesis, utilizamos frentes en movimiento (ver Figura 5.1B). Los frentes consistieron en un borde de contraste que se desplaza a lo largo del área de estimulación a velocidad angular constante. En el Capítulo 6 el estímulo visual de peligro (VDS) fue generado digitalmente manteniendo las características ópticas del VDS físico original [Maldonado 2002]. Los VDS generados en la computadora resultaron ser muy efectivos a la hora de desencadenar la respuesta de escape en el cangrejo y no se encontraron diferencias entre las respuestas generadas por el movimiento real de la pantalla de cartón y la simulación de computadora, ya sea a nivel comportamental como neuronal [Medan 2007, Oliva 2007]. El mismo consistió en una barra negra de 3.2 cm x 1.1 cm presentada en el monitor de estimulación, subtendiendo el mismo ángulo que el VDS original (30° x 10° , Figura 3.3). Al igual que en los experimentos electrofisiológicos realizados anteriormente en el laboratorio [Beron de Astrada 2002, Tomsic 2003], el ciclo de movimiento del VDS fue completado en 2.2 segundos. Cada uno de los 15 ensayos de un entrenamiento consistió en dos de estos ciclos de movimiento separados por 2 segundos. El desplazamiento del VDS estimuló

un área de aproximadamente $30^\circ \times 40^\circ$ del campo visual del animal. La fase de ida y vuelta del VDS es representada en la tesis por los lados laterales de un triángulo y el tiempo total del ciclo por su base.

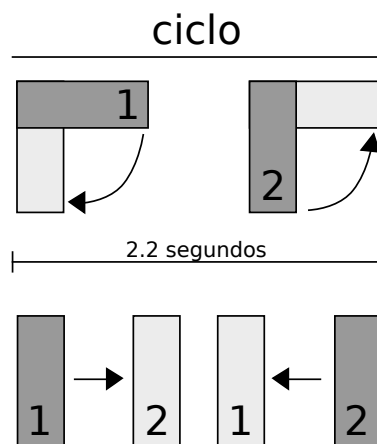


Figura 3.3: Trayectoria y sentido de desplazamiento del VDS. El panel superior ilustra el desplazamiento del VDS físico utilizado históricamente en el laboratorio y el panel inferior muestra el VDS digitalizado utilizado en esta tesis. En ambos casos el VDS barre un área de $30^\circ \times 40^\circ$ en aproximadamente 2.2 segundos.

3.4. Estudios fisiológicos

3.4.1. Estudios de imágenes de calcio en *Neohelice granulata*

Para realizar la tinción se utilizó el mismo procedimiento explicado anteriormente para los estudios morfológicos con el pedúnculo colocado en posición horizontal y con la región frontal del ojo mirando hacia ventral (Subsección 3.2.2). Se usó el marcador dextrano *Calcium Green-1* (3kDa Molecular Probes) cuya fluorescencia es sensible a la concentración de calcio. En general, en esta tesis estudiaremos la actividad de calcio de las neuronas transmedulares a nivel de sus terminales en la lóbula. Para ello, el indicador de calcio fue aplicado en la médula en la región del ganglio que mapea la zona donde se presentaron los estímulos visuales (parte frontal del ojo, el mapa retinotópico de la lámina, médula y lóbula del cangrejo pueden verse en la Figura 1.6). Luego de la topicación con el colorante, se mantuvo al animal sin perturbaciones durante 2-3 hs para permitir que el mismo sea incorporado y migre intracelularmente. Transcurrido ese tiempo, se removió la cutícula nuevamente exponiendo los ganglios ópticos. El animal fue sumergido en solución salina dentro de un contenedor acrílico transparente debajo del microscopio de fluorescencia (Figura 3.4; Solución salina de cangrejo (en mM): 468 NaCl, 9.46 KCl, 7.5 MgCl₂, 12.53 CaCl₂, 2 glucosa, y 5 HEPES; pH 7.75). El monitor de estimulación fue colocado debajo del animal y, para todos los experimentos realizados en esta tesis, la distancia entre el ojo de registro y el monitor fue de 5 cm. En general, la lóbula fue observada con un objetivo 20X de inmersión en agua (NA 0.5, Olympus).

Dado que se conoce que los cangrejos poseen integración binocular [Sztarker 2004], el

ojo contralateral fue tapado de manera tal de estudiar únicamente el procesamiento de la información visual proveniente del ojo ipsilateral.

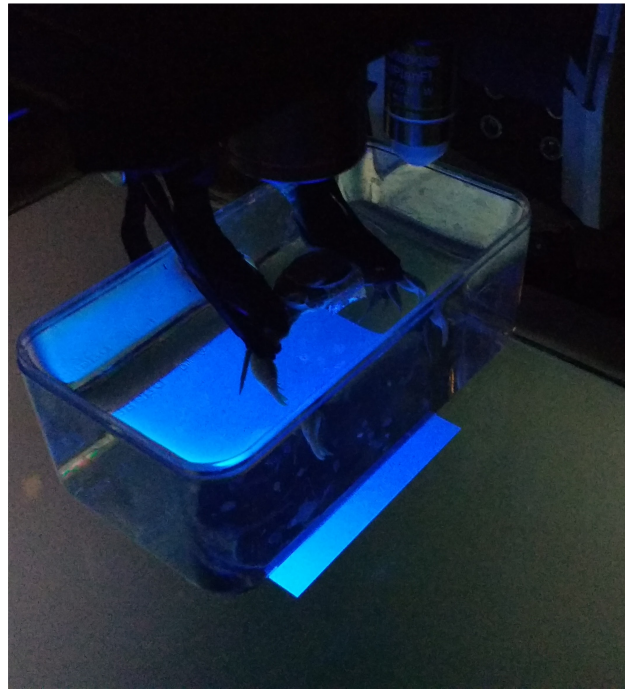


Figura 3.4: Preparación del cangrejo para registros de imágenes de calcio. Fotografía que ilustra como es posicionado el cangrejo debajo del microscopio de fluorescencia. El cangrejo con el lóbulo óptico expuesto y con las neuronas teñidas con el dextrano fluorescente sensible a calcio, es sujetado con una pinza ajustable y colocado debajo del microscopio de fluorescencia. Luego, se tapó el ojo contralateral con un capuchón de papel aluminio para evitar la estimulación visual contralateral. Debajo del cangrejo, a 5 cm, se encuentra el monitor de estimulación.

3.4.2. Registros ópticos

Los registros de imágenes de calcio fueron realizados con un microscopio de epifluorescencia estándar (Olympus BX51WI) usando el sistema de *imaging* de TILL Photonics (TILL Photonics GmbH, FEI Company). A través de un monocromador (TILL Polychrom V) se utilizó luz de excitación de 488nm. La misma se mantuvo encendida entre los marcos de registro de forma tal de obtener una iluminación constante de la luz de excitación del microscopio durante los registros. Los filtros presentes en el microscopio están compuestos por un espejo dicróico de 525nm y un filtro de emisión pasabajos de 530nm (Figura 3.5). Las imágenes fueron tomadas con una cámara monocromática CCD de 14 bit (Andor iXon DU885K) a -70°C , bñeadas a 4x4 píxeles, obteniéndose como resultado imágenes finales de 251x250 píxels.

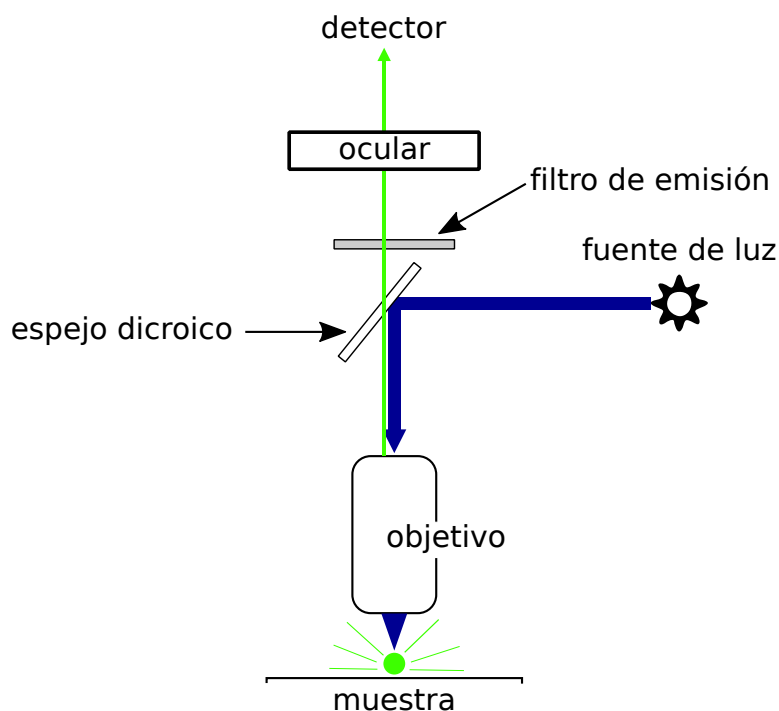


Figura 3.5: Esquema básico de la iluminación del microscopio de fluorescencia utilizado. La luz de excitación de 488nm emitida por la fuente de luz. El espejo dicroico de 525nm refleja la luz azul que excita al fluorocromo (*Calcium Green-1*) y, además, deja pasar la luz verde emitida por la muestra. La luz emitida de la muestra pasa a través del espejo dicroico y a través del filtro de emisión pasabajo de 530nm alcanzando los oculares y luego al detector.

Dado que la luz de excitación del microscopio alcanza a los fotorreceptores, la estimulación visual de los animales se inició 5 segundos después del encendido de la luz de excitación. De este modo, se esperó un tiempo prudencial para que se adapten los fotorreceptores a la luz de excitación del microscopio disminuyendo su interferencia con la percepción del estímulo visual. Por otra parte, para que la luz emitida por el estímulo visual no alcance la cámara se restringió la luz de estimulación del monitor únicamente a los diodos azules (pico de emisión ~465nm). Esta es mayoritariamente bloqueada por el filtro de emisión del microscopio. La luz del monitor que alcanza el ojo del animal tiene una intensidad de 150 mW/m².

El protocolo utilizado para registrar las señales de calcio frente a las distintas estimulaciones visuales presentadas consistió en la adquisición de 122 marcos a una tasa de ~10 Hz (tiempo de exposición de 100 milisegundos y un intervalo entre marcos de 2 milisegundos).

3.4.3. Análisis de imágenes funcionales de fluorescencia

El cambio relativo de fluorescencia medido en las áreas de interés fue calculado como $\frac{\Delta F}{F} = \frac{F - F_0}{F_0} * 100$, tomando como referencia (F_0) el promedio de los 5 marcos anteriores al comienzo de la estimulación visual. Dado que existe la posibilidad de que una parte de la luz producida por el monitor de estimulación sea registrada por la cámara, todas las imágenes fueron

corregidas sustrayendo a las imágenes de la preparación experimental las imágenes obtenidas del mismo preparado frente a la misma estimulación pero con la luz de excitación apagada. Este procedimiento se realizó para cada tipo de estímulo visual presentado. Por último, cabe señalar que la estimulación visual por sí misma no provocó señales fluorescentes en la preparación.

Solo en el experimento de la Figura 7.4 (Subsección 7.3.3) se necesitó realizar una corrección de $\frac{\Delta F}{F}$, debido a cambios en la fluorescencia por fotoblanqueo (*bleaching*), mientras que en el resto de los experimentos el fotoblanqueo fue despreciable al momento de la estimulación visual y no se necesitó de una corrección. Los análisis de imágenes de fluorescencia fueron realizados utilizando el programa FIJI [Schindelin 2012] y los datos resultantes fueron analizados con el programa R (R Core Team (2015), Version 3.2.3) y RStudio.

3.5. Estudios de respuestas de evasión

3.5.1. Dispositivo experimental

Los animales fueron colocados de a uno en un dispositivo simulador de locomoción, descrito previamente (Figura 3.6A, [Oliva 2007]). Este consistía en una esfera de poliestireno expandido de 16 cm de diámetro, flotando en un recipiente parcialmente lleno con agua. Se pegó en la parte dorsal del caparazón de los cangrejos una varilla de sujeción de madera, que se insertó en una guía metálica, posicionada verticalmente arriba de la esfera. Dado que tanto esta guía como la varilla eran cuadradas, los animales no podían rotar en torno a su propio eje en el dispositivo. En el dispositivo, entonces, los cangrejos podían adoptar su posición natural de locomoción y mover las patas libremente, pero permanecían siempre en el mismo lugar. La esfera tenía asociados dos sensores de posición (mice de PC) colocados de forma perpendicular entre sí, lo que permitía determinar un sistema de coordenadas “x” e “y”. Por otra parte, de forma equidistante a estos sensores, se colocaron dos láminas de un material flexible como punto extra de apoyo para impedir los desplazamientos horizontales de la esfera. Los movimientos del animal generaron la rotación de la bola. Los sensores registraron la posición de la esfera en ambas coordenadas cada 16,7 ms.

El simulador se encontraba rodeado de 4 monitores (Phillips 107T, Suzhou, China; dimensión horizontal y vertical 32 cm 24 cm respectivamente, tasa de refresco 60 Hz) a 20 cm de distancia del animal. Los estímulos visuales fueron presentados en el monitor derecho del animal y los demás monitores permanecieron encendidos mostrando una pantalla blanca (Figura 3.6B).

3.5.2. Análisis de respuestas comportamentales

Las señales de los sensores ópticos fueron adquiridas utilizando el mismo *software* de estimulación visual, Presentation (Presentation 5.3, Neurobehavioral Systems Inc., Albany, CA,

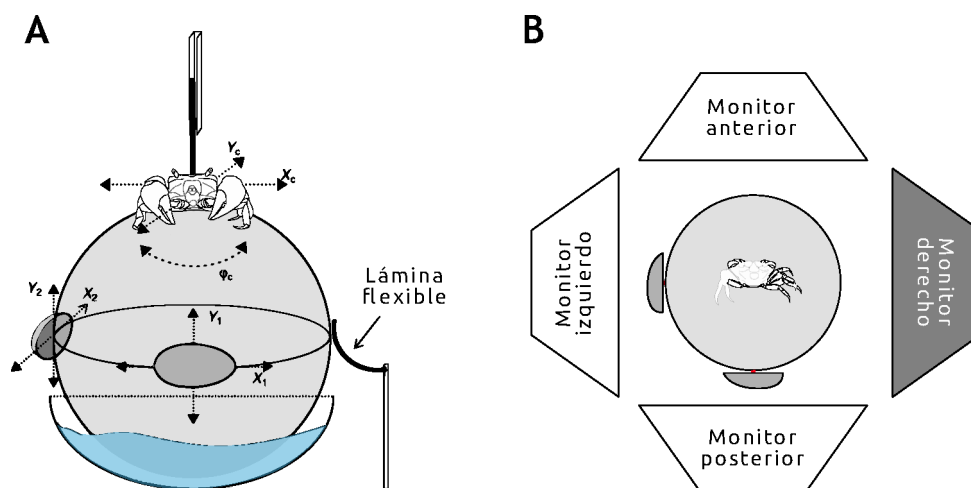


Figura 3.6: Estudio de la actividad locomotora frente a estímulos de movimiento. **(A)** La actividad locomotora fue estudiada en un dispositivo de caminata que consistió en una esfera de telgopor que podía ser libremente rotada por el cangrejo. La locomoción fue medida mediante el registro de la rotación de la esfera con dos sensores ópticos. **(B)** El dispositivo para realizar la estimulación visual consistió en cuatro monitores localizados a 20 cm del animal. Dos de los monitores se encontraban a ambos lados del animal, uno en frente y uno detrás del mismo. Los experimentos fueron realizados utilizando estímulos generados por una PC y proyectados siempre en el monitor derecho del animal (esquemmatizado en gris).

USA). Las posiciones de los sensores ópticos fueron colectadas cada 16.7 mseg. Con los datos registrados por ambos sensores durante una estimulación se generaron dos archivos (uno por cada sensor) que fueron combinados y analizados *off-line* con el programa Matlab (Matlab 2011b, versión 7.13.0.564). Durante la estimulación visual, los animales fueron también observados mediante una cámara *web*.

A partir de los datos obtenidos utilizando R y RStudio se calcularon: (1) la distancia recorrida por los animales en 16,7 ms y (2) la velocidad instantánea de los cangrejos durante cada ensayo (dividiendo ese dato de distancia por 0,0167). El perfil temporal de la velocidad instantánea fue suavizado realizando el promedio de 6 marcos (aproximadamente 100 milisegundos). El análisis cuantitativo del perfil suavizado consistió en la medición de la máxima velocidad instantánea y el área bajo la curva de la velocidad instantánea (distancia recorrida) desde el comienzo de la estimulación visual hasta 100 milisegundos luego del fin de la misma.

3.6. Análisis estadístico

Se utilizaron test paramétricos t-Student para análisis de datos pareados ó prueba de t-Welch para no pareados. Como test no paramétrico se utilizó el de Wilcoxon para la comparación entre dos grupos. En aquellos experimentos que tenían más de dos grupos las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un ajuste de modelos lineales mixtos (Paquete del R lmer4). Los p valores están indicados en la sección de resultados, un $p < 0.05$ fue elegido como el nivel

estadístico de diferencia. Los datos presentados corresponden a las medias $\pm$ error estándar de la media y el n indica el número de animales. En cada sección de resultados se indicará y profundizará en el análisis realizado.

4 Neuroarquitectura de la lóbula y la *lobula plate* de *Neohelice granulata*

4.1. Introducción

Los ganglios ópticos de artrópodos se encuentran organizados en unidades columnares ordenadas retinotópicamente intersectadas por procesos ortogonales, generalmente largos, que corren tangencialmente por los ganglios. Las unidades columnares consisten principalmente en neuronas columnares mientras que los estratos tangenciales comprenden procesos laterales largos de neuronas columnares, células amácrinas y neuritas de células tangenciales. Desde un punto de vista funcional, los distintos elementos columnares extraerían información respecto a atributos visuales específicos para un campo receptivo acotado correspondiente al de uno o pocos omatidios. Estos elementos columnares alimentarían distintas neuronas tangenciales colectoras de campo amplio que llevan la información a centros nerviosos rio abajo implicados en guiar comportamientos específicos [Glantz 1998, Haag 2010, Paulk 2008, Tomsic 2003].

Como se mencionó en el Capítulo 1, en insectos y decápodos la lóbula y la *lobula plate* son ganglios claves en el procesamiento de la información visual de movimiento [Beron de Astrada 2002, Glantz 2006, Horseman 2011, O'Shea 1974, Paulk 2008].

En insectos, la mayoría de los elementos columnares de ambos ganglios y sus conexiones han sido ampliamente estudiados, encontrándose una gran variedad de neuronas columnares (aproximadamente 46 tipos) arborizando en uno o varios estratos de los ganglios. Las arborizaciones de las neuronas columnares de la médula que proyectan a la lóbula definen 6 estratos, mientras que las neuronas columnares provenientes de la médula y la lóbula que proyectan a la *lobula plate* definen 4 estratos [Strausfeld 1970, Fischbach 1989].

Sin embargo, es poca la bibliografía disponible en cuanto a la morfología de las neuronas columnares de la lóbula de crustáceos decápodos, siendo el trabajo de Strausfeld & Nassel [Strausfeld 1980] la única referencia disponible hasta el momento. En un trabajo reciente realizado en el laboratorio, mediante tinciones con técnicas de plata, se lograron reconstruir unas pocas células columnares que proyectan desde la médula hacia la lóbula que no difieren mayormente de las descritas para *crayfish* (Figura 1.9A, Figura 4.1, [Sztarker 2014]). Por último, cabe señalar que la neuroarquitectura de la *lobula plate* de decápodos no había sido estudiada hasta el momento.

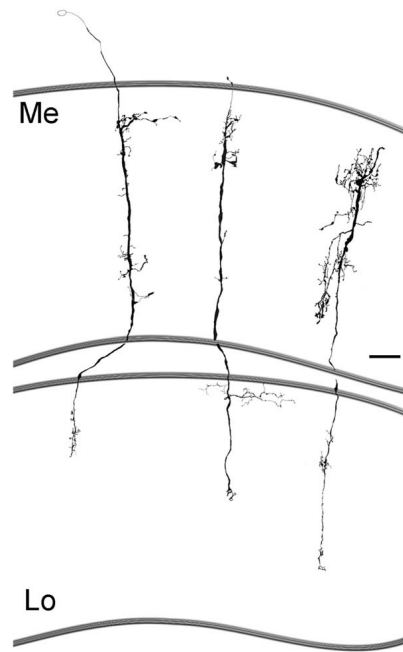


Figura 4.1: Ejemplos de reconstrucciones de neuronas transmedulares arborizando a distintas profundidades de la lóbula. Me: Médula, Lo: Lóbula. Escala 15 μm . Tomado de [Sztarker 2014].

En este capítulo, mediante la utilización de dextranos fluorescentes, profundizamos en el conocimiento de los elementos neuronales columnares que comunican la médula con: 1) la lóbula y 2) la *lobula plate*, y los elementos que comunican la lóbula con la *lobula plate*. Si bien en los capítulos siguientes de esta tesis estudiaremos con imágenes funcionales de calcio únicamente la comunicación entre la médula y la lóbula, las tinciones mostradas al final de este capítulo aportaron información totalmente novedosa sobre la neuroarquitectura de la *lobula plate* y su comunicación con la médula y la lóbula de decápodos.

4.2. Materiales y métodos

Para estudiar las distintas vías neuronales del sistema visual del cangrejo realizamos tinciones masivas con colorantes fluorescentes acoplados a dextranos según lo desarrollado en el Capítulo 3. El colorante fue aplicado en distintos centros nerviosos dependiendo de las neuronas de proyección a estudiar. Para los casos de estudios de retinotopía, aplicamos dos colorantes distintos en distintas zonas del mismo ganglio.

Las imágenes que corresponden a las tinciones de Bodian, técnicas de reducción de plata, fueron realizadas por la Dra. Sztarker. El análisis conjunto de esos preparados y los realizados mediante las tinciones masivas con dextranos fluorescentes nos permitió evidenciar la organización básica de la *lobula plate* de *Neohelice*. Las reconstrucciones anatómicas de las neuronas columnares de la *lobula plate* fueron realizadas a partir de la pila de imágenes obtenidas con el microscopio confocal mediante la utilización del software Neurolucida.

Dado que en la posición normal de observación los pedúnculos oculares, (y por lo tanto del

lóbulo óptico) se encuentran inclinados con respecto al caparazón del animal, a lo largo de esta tesis y, con el fin de simplificar la visualización de las tinciones, mostraremos y esquematizaremos los distintos neuropilos ópticos rotados de manera que queden en orientación vertical.

4.3. Resultados

4.3.1. Elementos de entrada a la lámina y la médula de *Neohelice*

Los colorantes acoplados a dextranos no habían sido usados previamente para estudiar la citoarquitectura de los ganglios ópticos en artrópodos. Por eso, antes de estudiar las proyecciones columnares entre la médula y la lóbula, entre la médula y *lobula plate* o entre la lóbula y la *lobula plate*, verificamos que esta tinción reprodujera lo que se conoce respecto a los ganglios mejor estudiados en decápodos, la lámina y la médula. En decápodos, la información visual es censada por la retina ubicada en el extremo de los pedúnculos oculares (Figura 4.2A). La información fluye retinotópicamente desde la retina hacia la lámina a través de siete fotorreceptores (denominados R1-R7) y hacia la médula a través de un solo fotorreceptor (R8) (Figura 4.2B, [Beron de Astrada 2011, Sztarker 2009]). Para estudiar las proyecciones de los fotorreceptores teñimos las células de la retina con aplicaciones locales de cristales de dextrano conjugados a moléculas fluorescentes (Figura 4.2C). La tinción reveló el típico arreglo biestratificado de las terminales de los fotorreceptores observados en otros cangrejos y otros decápodos (Figura 4.2D, corchete [Sztarker 2009]). Dado que en los extremos laterales de las tinciones masivas la densidad de colorante es menor, pudimos observar grandes terminales orientadas dorso-ventralmente que son características de las terminales de los fotorreceptores en artrópodos (Figura 4.2E). En la médula, observamos fibras delgadas que terminan superficialmente como protuberancias irregulares que se asemejan a las terminales R8 descritas en *Neohelice* y otros cangrejos (Figura 4.2D; F, punta de flecha blanca, [Sztarker 2009]).

La médula recibe información visual de la lámina vía el primer quiasma óptico (Figura 1.6, [Beron de Astrada 2011]) a través de interneuronas visuales de segundo orden denominadas células monopolares de la lámina (M) y las células T [Sztarker 2009]. En *Neohelice*, se identificaron morfológicamente al menos diez tipos diferentes de células monopolares y dos tipos de células T. Los axones de estas neuronas columnares se extienden a través del primer quiasma óptico y terminan retinotópicamente a varias profundidades en la médula distal. Todas estas vías de entrada de información a la médula tienen arborizaciones que se extienden dentro de una única columna visual [Sztarker 2014]. Para teñir las neuronas de entrada a la médula, aplicamos el dextrano fluorescente en la lámina (Figura 4.3A, asterisco).

Los elementos mayoritariamente teñidos correspondieron a proyecciones columnares con arborizaciones terminando a distintos niveles de la médula distal (Figura 4.3B-D,F,G). Como se observó anteriormente con impregnaciones de plata (técnica de Golgi), estas terminales se encuentran confinadas a una columna visual. A pesar de que la tinción masiva no parece ser la

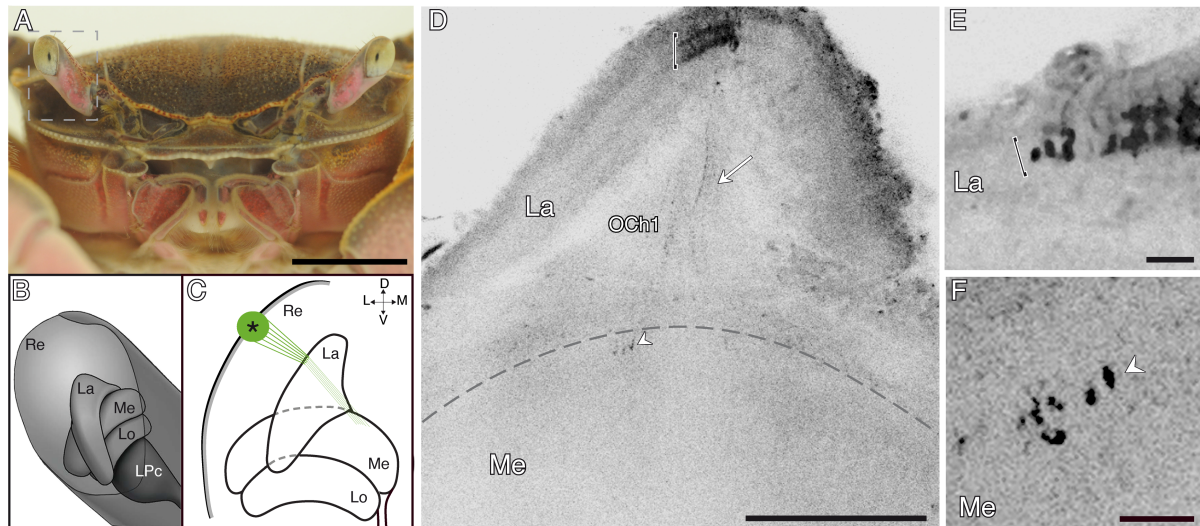


Figura 4.2: El sistema visual de *Neohelice granulata* y tinciones masivas de las proyecciones de los fotorreceptores. (A) Vista frontal de un cangrejo macho adulto. (B) Diagrama de un pedúnculo derecho (líneas punteadas en (A)) que ilustra la retina del ojo compuesto y la organización del lóbulo óptico. (C) El esquema ilustra el sitio de la aplicación del colorante y el patrón esperado de las proyecciones teñidas en la lámina (líneas verdes). (D) Sección óptica transversal que muestra las terminales de los fotorreceptores (R1-R7) teñidas en la lámina (corchete). Los fotorreceptores R8 cruzan el primer quiasma óptico entre la lámina y la médula (flecha blanca) y termina superficialmente en la médula (punta de flecha blanca). (E) Fotografía de las terminales de los fotorreceptores (R1-R7) en otra preparación. (F) Ampliación de las terminales de R8 en otra preparación. Re: Retina, La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, LPc: Protocerebro Lateral, OCh: Primer quiasma óptico, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial. Escalas en A: 1cm, en D:100 µm, en E y F 50 µm.

técnica más adecuada para caracterizar morfológicamente neuronas individuales, en la periferia de las mismas pudimos reconocer distintas neuronas individuales de entrada a la médula descritas recientemente en *Neohelice* [Sztarker 2014]. Por ejemplo, las neuronas en las Figura 4.3H-K corresponden a distintas neuronas monopolares de la lámina, similares a los subtipos neuronales: M4, M2, A2 y A1 respectivamente; mientras que en la Figura 4.3L y M se pueden observar neuronas tipo T [Sztarker 2014].

Además, en algunas preparaciones intensamente teñidas pudimos observar fibras columnares finas con arborizaciones en la médula proximal (Figura 4.3D y E). Estas fibras se parecen a las de las neuronas centrífugas C2 y C3 de insectos [Strausfeld 1970]. Las terminales de las neuronas C2 y C3 se habían identificado previamente en la lámina de *Neohelice*, pero no su localización en la médula [Sztarker 2009].

Los resultados de las Figura 4.2 y Figura 4.3 indican que las tinciones masivas con colorantes fluorescentes acoplados a dextranos tiñen la mayoría de las neuronas columnares de entrada a la lámina y a la médula descritas previamente. Por consiguiente, utilizamos esta metodología para investigar los estratos de entrada de información a la lóbula y a la *lobula plate*.

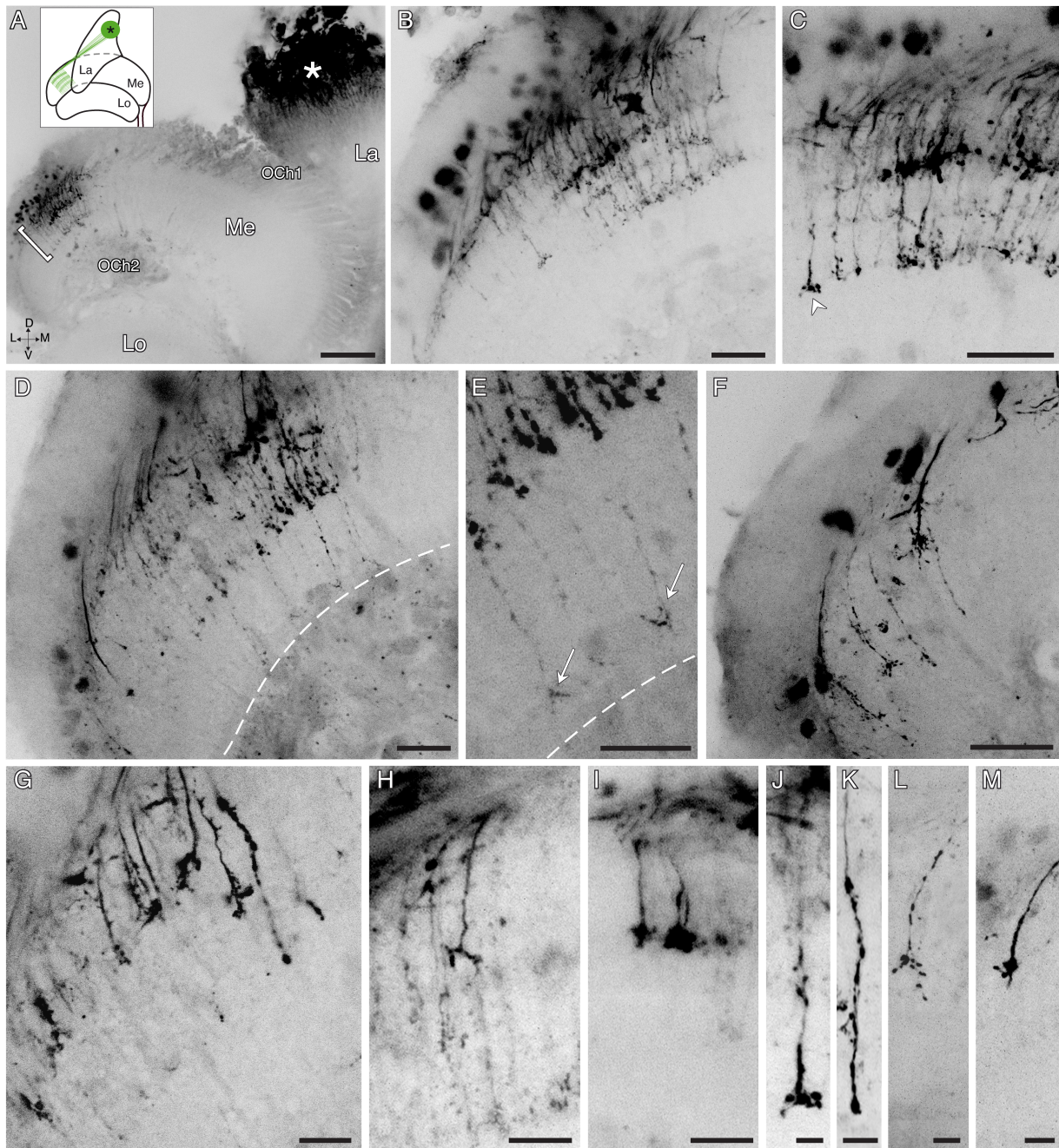


Figura 4.3: Tinciones masivas de las neuronas que conectan la lámina con la médula. **(A)** Aplicamos los cristales de dextrano fluorescente (asterisco) en la lámina (esquema superior). El panel muestra una sección transversal del ganglio óptico en el cual se observan distintas fibras teñidas llegando a la médula (corchete). **(B-D,F,G)** Preparaciones representativas en las cuales las neuronas que conectan la lámina con la médula terminan en distintos niveles de la médula. **(D y E)** En algunas pocas preparaciones, observamos finas fibras que arborizan en un estrato proximal de la médula (flechas en **E**). Las líneas punteadas delimitan el borde proximal del neuropilo. **(H-M)** En los extremos de las tinciones se distinguen células individuales. Las neuronas en los paneles **H-K** corresponden a distintas células monopolares mientras que las neuronas en los paneles **L y M** corresponden a células T [Sztarker 2014]. La célula monopolar del panel **J** corresponde a la neurona marcada con una flecha blanca en el panel **C**. La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, LPC: Protocerebro Lateral, OCh1: Primer quiasma óptico, OCh2: Segundo quiasma óptico, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial. Escalas en A:100 μ m, en B-D,F: 50 μ m, en E: 35 μ m, en G-I: 25 μ m y en J-M: 10 μ m.

4.3.2. Estratos de entrada a la lóbula

Las neuronas que proyectan desde la médula hacia lóbula se tiñeron por aplicación del colorante en la médula (Figura 4.4A y B, asteriscos). Según lo esperado, observamos neuronas columnares de proyección cruzando hacia la lóbula a través del segundo quiasma óptico (Figura 4.4A y B). Las arborizaciones de esas neuronas columnares se observaron escalonadas en 4 grandes estratos (Figura 4.4B y C, corchetes). Los dos estratos distales siempre resultaron ser los más anchos y los dos estratos más proximales los más delgados. Además, el estrato más proximal solía ser el menos teñido. La posición relativa de los tres estratos más distales coinciden con los tres estratos de entrada de la lóbula (Li1, Li2 y Li3) descritos en *crayfish* (Figura 1.9A, [Strausfeld 1980]). Por este motivo, nosotros también designamos a estos estratos Li1, Li2 y Li3 y asignamos al último estrato el nombre de Li4.

4.3.2.1. Subestratos de entrada a la lóbula

En aquellos preparados en que se tiñeron las columnas del centro de la lóbula -donde las columnas visuales son más largas y las imágenes son paralelas a los elementos columnares- se puede apreciar que los estratos columnares Li1, Li2 y Li3 están, en realidad, conformados por subestratos (Figura 4.4 D-F). El estrato Li1 está compuesto por cuatro subestratos (Figura 4.4D). El subestrato más distal, Li1-1, es el más ancho de todos mientras que el Li1-3 y Li1-4 son los que sistemáticamente mostraron más marca fluorescente. El estrato Li2, en cambio, está compuesto por tres subestratos (Figura 4.4E). Estos subestratos tienen anchos similares y mostraron una intensidad de fluorescencia similar. En algunas preparaciones intensamente marcadas, también observamos un estrato tangencial fino entre Li2-1 y Li2-2 (no mostrado). El estrato Li3 está compuesto por dos subestratos (Figura 4.4F). El estrato Li3-1 siempre resultó más delgado y de menor intensidad que el subestrato Li3-2. Con respecto al estrato Li4, no observamos ninguna evidencia consistente de subestratificación (Figura 4.4G).

4.3.2.2. Composición de los estratos de entrada

Los distintos estratos y subestratos están compuestos por arborizaciones de neuronas columnares. La Figura 4.4H muestra una sección óptica central de la lóbula en la cual la tinción resultó poco densa y pueden distinguirse arborizaciones terminales. La Figura 4.4I muestra arborizaciones de distintas neuronas columnares principalmente en los estratos Li2 y Li3; y la Figura 4.4J muestra neuronas columnares probablemente del mismo tipo que arborizan en el estrato Li3 (flechas). Los paneles siguientes de la Figura 4.4 ilustran algunas neuronas individuales que pudimos reconocer en los bordes de las tinciones masivas (Figura 4.4K-Q). La Figura 4.4K y L muestran neuronas individuales con terminaciones cortas, restringidas a única columna, que parecen arborizar únicamente en los estratos Li1 y Li2 respectivamente (flechas). Alternativamente, la neurona en la Figura 4.4M arboriza en dos estratos, Li1 y Li3 (puntas de flecha). Las ilustraciones de las Figura 4.4N y O corresponden a la periferia de la lóbula donde

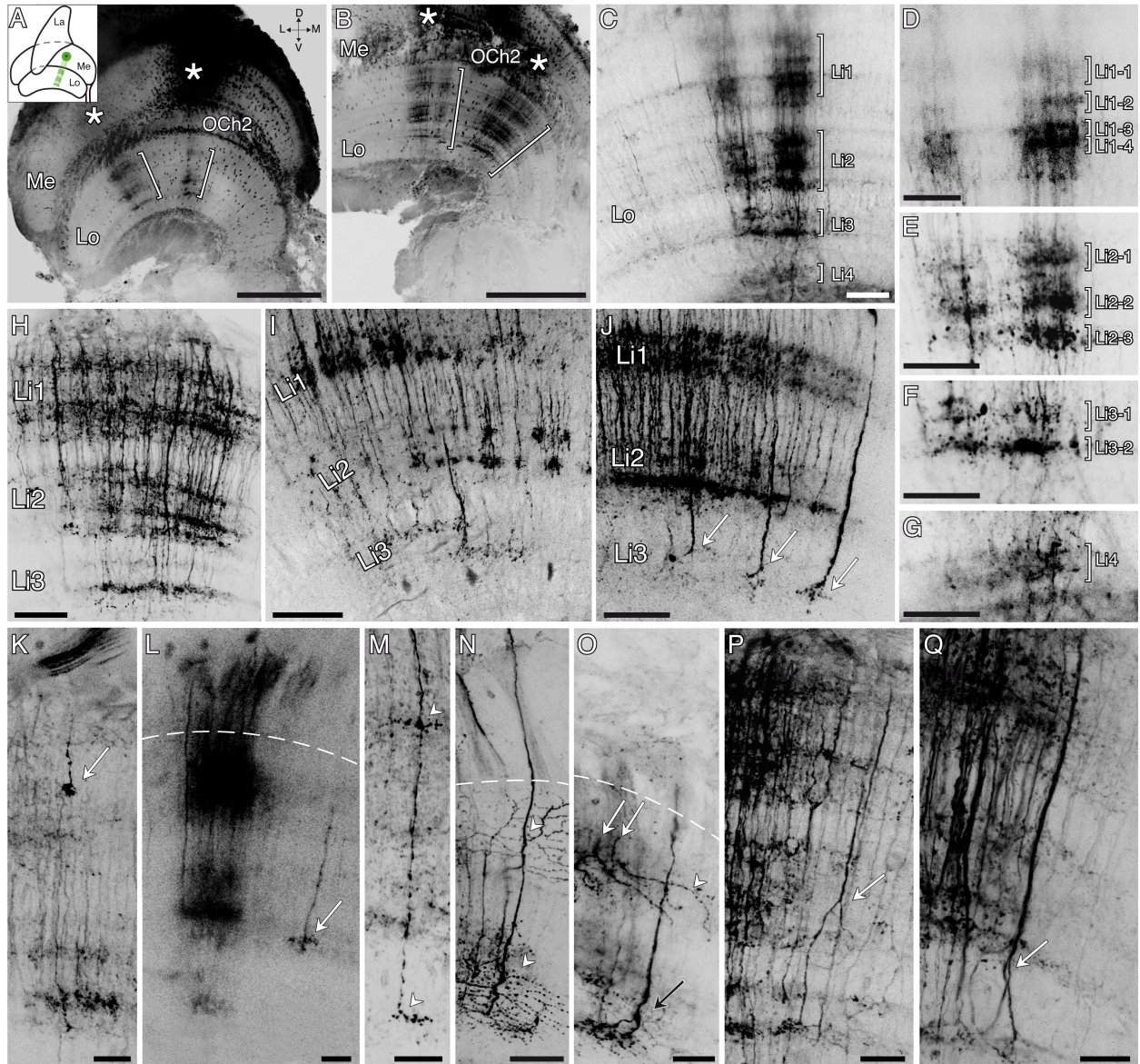


Figura 4.4: Organización de los estratos columnares de entrada a la lóbula. **(A y B)** Aplicamos los cristales de dextrano fluorescentes (asterisco) en el medio de la médula (esquema). Las imágenes corresponden a una sección óptica transversal de la médula y de la lóbula en las cuales las proyecciones de las neuronas columnares de la médula pueden verse cruzando el segundo quiasma óptico (OCh2) y arborizando a distintos niveles de la lóbula (corchetes en **A** y **B**). **(C)** Las neuronas columnares de proyección de la médula arborizan en cuatro estratos principales en la lóbula denominados Li1, Li2, Li3 y Li4. **(D-G)** Ampliación de los elementos de entrada mostrados en el panel **C**. **(D)** El estrato Li1 está compuesto por cuatro substratos denominados desde la periferia hacia el centro Li1-1-4). **(E)** El estrato Li2 está compuesto por tres substratos denominados Li2-1-3). **(F)** El estrato Li3 está estructurado por dos substratos denominados Li3-1 y Li3-2. **(G)** En el estrato Li4 no se observa substratificación. **(H-J)** Regiones de las tinciones masivas donde la marca fluorescente es menos densa. **(H)** Se pueden observar ramificaciones colaterales en distintos estratos de la lóbula. **(I)** Se pueden observar distintas arborizaciones de terminales tanto en Li2 como en Li3. **(J)** Tres neuronas aparentemente del mismo tipo presentan arborizaciones terminales en Li3 (flechas blancas). **(K-Q)** Distintas neuronas individuales identificadas en los bordes de algunas de las tinciones masivas. *Continúa en la página siguiente →*

(**K**) Neurona con ramas terminales restringidas únicamente al estrato Li1. El panel **L** muestra una neurona con arborizaciones terminales confinadas únicamente al estrato Li2. Los paneles **M** y **N** ilustran neuronas con arborizaciones en dos estratos (Li1 y Li3, punta de flecha blanca). En **O** dos tipos diferentes de neuronas resultaron teñidas, una con terminaciones en Li1 (flechas blancas) y otra con arborizaciones que terminan en Li3 (flecha negra). (**P y Q**) Elementos neuronales con bifurcaciones verticales que arborizan en el estrato Li3 (flechas blancas). Las bifurcaciones ocurren en el subestrato Li2-2 (**P**) y Li2-3 (**Q**). Líneas punteadas en **L**, **N** y **O** delimitan el borde distal de la lóbula. La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, LPc: Protocerebro Lateral, OCh2: Segundo quiasma óptico, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial. Escalas en A-B :200 μm , en C-G: 25 μm y en K-Q: 15 μm .

las columnas visuales son más cortas (ver Subsección 4.3.3). Las neuronas de la Figura 4.4N comparten el patrón de arborización con la neurona de la Figura 4.4M. En cambio, en la Figura 4.4O se pueden distinguir dos tipos neuronales. Un tipo neuronal (flechas blancas) con arborizaciones terminales extendiéndose a varias columnas visuales en Li1 (punta de flecha blanca) y otra con terminaciones en Li3 (flecha negra) con un patrón de arborización similar al de la neurona mostrada en la figura Figura 4.4J. Notar que en los paneles N y O la extensión vertical de la lóbula es considerablemente menor que en los paneles previos ya que estas secciones ópticas corresponden a la periferia del neuropilo. Por otra parte, en distintos preparados encontramos que la neurita principal de neuronas que finalmente arborizan en Li3, parece bifurcarse en Li2-2 o Li2-3 extendiéndose luego por columnas visuales vecinas (Figura 4.4P y Q respectivamente).

4.3.3. Variación en el espesor de los elementos de entrada a la lóbula

A partir de secciones ópticas transversales y longitudinales de la lóbula notamos que el espesor de, al menos, Li1 y Li2 parece ser mayor en el centro del neuropilo que en la periferia (Figura 4.5A-C). La medición del espesor de cada estrato resultaría en una estimación con mucho error dado el pequeño tamaño de los mismos. Como la variación en el espesor de los estratos parece estar relacionada con la forma arriñonada del neuropilo, estimamos dicha variación relativa midiendo el largo de las columnas visuales de la lóbula. Este largo lo medimos desde la superficie apical del ganglio hasta el estrato Li3 cuya posición puede ser fácilmente estimable por autofluorescencia (ver Subsección 4.3.4). La Figura 4.5D muestra que a lo largo de una sección transversal hay un aumento en el largo de las columnas hacia el centro del ganglio. Observamos una variación similar a lo largo de una sección en el eje longitudinal (Figura 4.5E). Estos resultados indican que las columnas visuales de mayor longitud están localizadas en el centro de la lóbula.

4.3.4. Posición relativa de los estratos de entrada de la lóbula y los estratos tangenciales

A partir de tinciones realizadas con técnicas de reducción de plata [Sztarker 2005] se habían definido en la lóbula cuatro estratos compuestos por procesos que corren tangencialmente

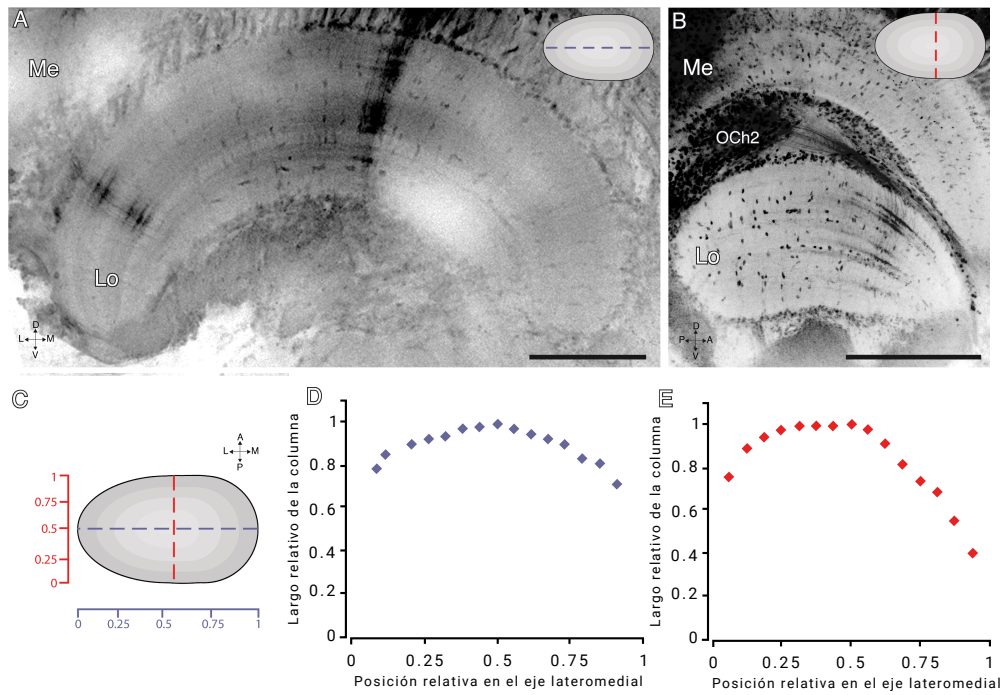


Figura 4.5: Extensión vertical de la lóbula a través de eje lateromedial y anteroposterior. **(A)** Sección óptica transversal de la lóbula con dos poblaciones de neuronas columnares teñidas; unas localizadas en el lado lateral de la lóbula y otras en el medio de la misma. **(B)** Sección óptica longitudinal de la lóbula con proyecciones teñidas desde el centro hacia el lado anterior del neuropilo. **(C)** Esquema de una vista tangencial de la lóbula que ilustra las posiciones analizadas. **(D)** Cuantificación del largo de las columnas relativas a través de una sección transversal de la lóbula. **(E)** Cuantificación del largo relativo de las columnas a través de una sección óptica del eje longitudinal. Las mediciones están normalizadas al tamaño columnar máximo. La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, LPc: Protocerebro Lateral, OCh2: Segundo quiasma óptico, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial, A: Anterior, P: Posterior. Escalas en A-B:100 μ m.

en dirección lateromedial (LMT) y cinco estratos compuestos por procesos que corren tangencialmente en dirección anteroposterior (APT, ver Figura 1.9B). Para reunir la información de los estratos de entrada a la lóbula (Figura 4.4) definidos por las arborización de neuronas columnares con la información de los procesos tangenciales, teñimos los estratos LMT, mediante la aplicación de cristales de dextrano en el lado medial de la lóbula (Figura 4.6A-B, asterisco). Desde la superficie distal de la lóbula hasta la proximal, reconocimos teñidos cuatro estratos LMT (LMT1, LMT2, LMT3 y LMT4). Adicionalmente, encontramos coloreados procesos lateromediales más delgados que corren entre los estratos LMT1 y LMT2 y entre los estratos LMT2 y LMT3 (Figura 4.6B, puntas de flechas).

Para reconocer las capas tangenciales que corren en el eje anteroposterior (APT1-APT5) utilizamos la posición relativa de los estratos tangenciales lateromediales como referencia. Identificamos APT2, APT3 y APT5 como las capas de la lóbula que poseen menor autofluorescencia. Estas se pueden identificar tanto en preparaciones donde realizamos tinciones como en las que

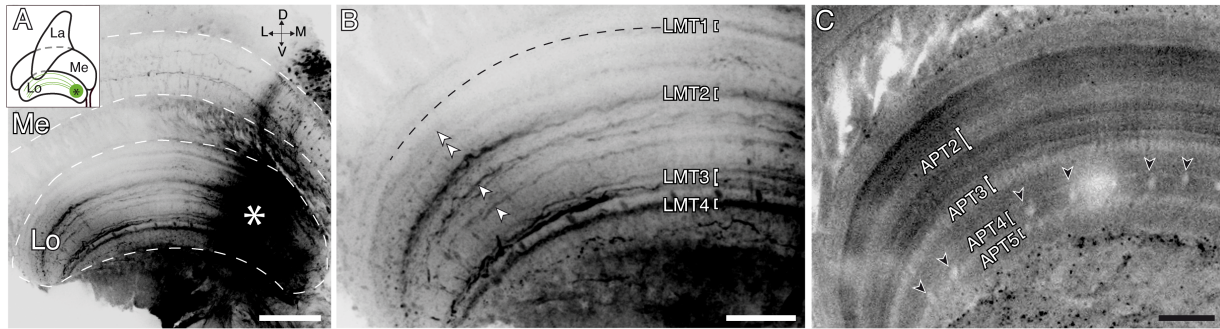


Figura 4.6: Identificación de las capas tangenciales lateromediales y anteroposteriores de la lóbula. **(A)** Aplicamos cristales de dextrano fluorescentes en el lado medial de la lóbula (asterisco, esquema). La imagen muestra una sección óptica transversal de la lóbula. **(B)** Ampliación de la sección óptica mostrada en **A**. Identificamos las capas lateromediales tangenciales previamente descritos en la lóbula del cangrejo (LMT1, LMT2, LMT3 y LMT4; [Sztarker 2005]). Las flechas blancas señalan los procesos más finos corriendo lateromedialmente entre los estratos LMT1 y LMT2; y entre LMT2 y LMT3. **(C)** Las capas tangenciales anteroposteriores (APT2-APT4) fueron identificadas por su baja autofluorescencia. La dendrita principal de la neurona monoestratificada gigante de la lóbula (flecha negra) puede ser reconocida también por su baja autofluorescencia. La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, LPC: Protocerebro Lateral, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial. Escalas en A: 100 μ m; B-C: 50 μ m.

no (Figura 4.6C). Además, sabemos que las principales neuritas de las neuronas gigantes de la lóbula monoestratificadas corren a lo largo del estrato APT4 [Medan 2007] y que estas neuritas se pueden distinguir por autofluorescencia ya que se encuentran regularmente distribuidas a lo largo del eje lateromedial del neuropilo (Figura 4.6C, punta de flecha negra). Desafortunadamente, no pudimos encontrar ninguna característica morfológica evidente para identificar el estrato APT1 por autofluorescencia.

Luego, teniendo en cuenta la posición relativa de los distintos estratos tangenciales de la lóbula y el perfil de autofluorescencia de las preparaciones, pudimos hacer coincidir los estratos definidos por las arborizaciones de las neuronas columnares, en principio, aferentes a la lóbula con las capas definidas por los procesos tangenciales. En la Figura 4.7 se muestra un esquema que ilustra las posiciones relativas de los distintos estratos. Encontramos que los subestratos Li3-1 y Li3-2 colocalizarían con el estrato tangencial LMT3 por donde arborizan las cuatro neuronas LG, indicando que habría una comunicación directa con las mismas. Sin embargo, no podemos descartar que las LG reciban información por parte de interneuronas columnares de relevo entre las neuronas columnares aferentes a la lóbula y las LG que no podemos detectarlas con esta tinción. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que existan conexiones entre las neuronas columnares aferentes y las neuronas columnares de salida de la lóbula ni que existan conexiones directas de otras neuritas que no podemos revelar con esta técnica.

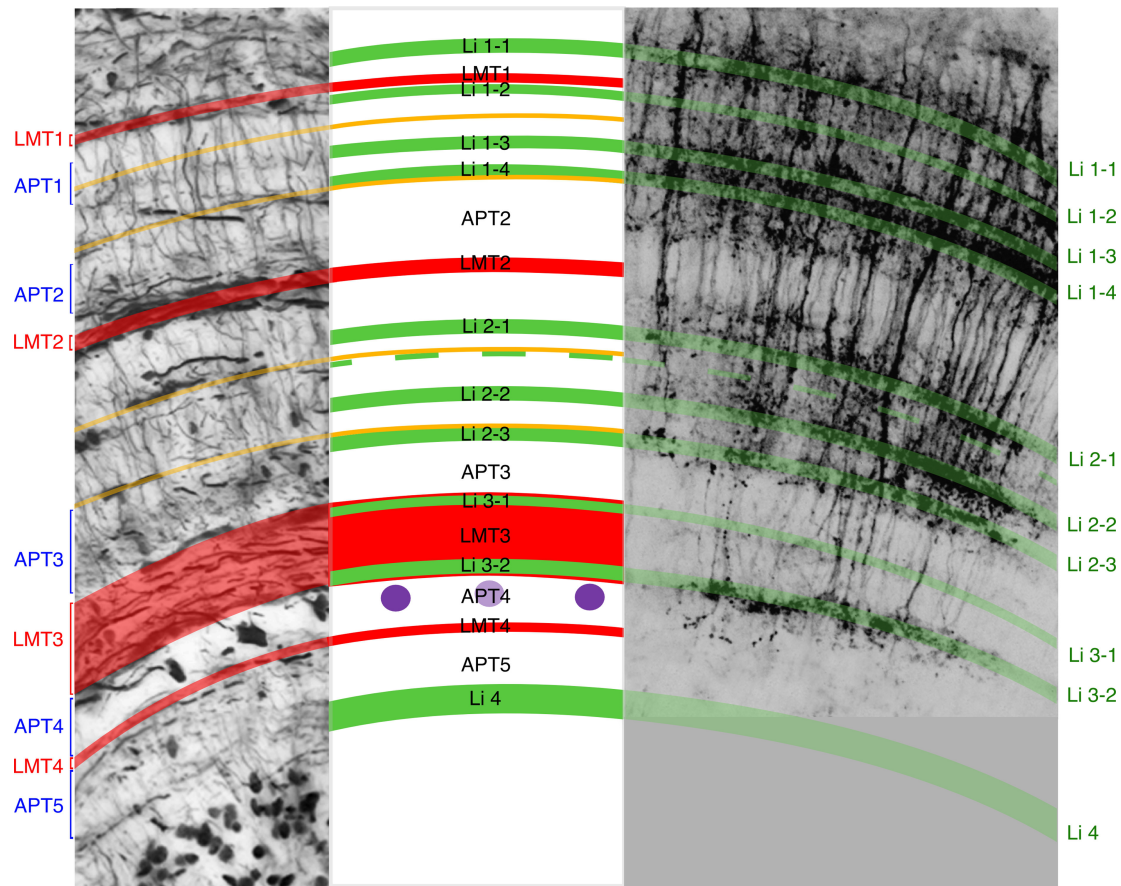


Figura 4.7: Esquema interpretativo de la neuroarquitectura de la lóbula del cangrejo. **Izquierda:** Sección transversal de una tinción de plata reducida (modificada de [Sztarker 2005]). Los procesos tangenciales están marcados hacia la izquierda. Las capas lateromediales están coloreadas en rojo y las que están en naranja corresponden a las capas tangenciales más finas. **Derecha:** Sección óptica de una tinción masiva con dextranos fluorescentes de los elementos de entrada a la lóbula. Los estratos de entrada están coloreados en verde. La sección óptica finaliza antes del estrato Li4, es por eso que incorporamos un rectángulo gris para dibujar la posición relativa de este estrato en el esquema. El diagrama entre las dos fotografías sintetiza la posición relativa estimada de las capas tangenciales y los estratos de las neuronas columnares. LMT: Estrato Lateromedial Tangencial, APT: Estrato Anteroposterior Tangencial, Li: Estrato de entrada a la lóbula.

4.3.5. Elementos de entrada a la *lobula plate*

Tinciones realizadas con técnicas de plata reducida (Bodian) en el lóbulo óptico de *Neohelice* por la Dra. Sztarker habían revelado que la *lobula plate* se encuentra ubicada en la zona anteromedial del lóbulo óptico, adyacente a la lóbula y por encima de la glándula del seno; y que este neuropilo posee una forma chata y alargada a lo largo del eje dorso-ventral [Sztarker 2005]. La Figura 4.8A muestra un esquema de una vista anterior del pedúnculo izquierdo con la ubicación espacial de los ganglios ópticos en la posición normal de observación, mientras que la Figura 4.8D muestra una tinción de Bodian de parte del lóbulo óptico de donde se observa la ubicación espacial de la *lobula plate*. El estudio más detallado de esos preparados junto a los

preparados de tinciones masivas con dextranos nos permitieron profundizar la caracterización anatómica de este ganglio. El análisis de los 23 preparados realizados muestra que, en comparación a los otros ganglios ópticos, la *lobula plate* es mucho más pequeña siendo su tamaño aproximadamente de 80-100 μm en el eje lateromedial, 100-120 μm en el eje anteroposterior y 200 μm en el eje dorso-ventral, revelando que en realidad no se trata de una estructura chata sino más bien oblonga (mediciones realizadas en animales de 2.7 a 3 cm de ancho de caparazón).

En la Figura 4.8B y E se muestra una vista anterior de la *lobula plate* donde se puede observar el tracto por el cual corren finos procesos que la conectan con la lóbula (Figura 4.8E, punta de flecha). En una vista medial se observa que este neuropilo también recibe proyecciones a través de un tracto que lo comunica con la médula (Figura 4.8C y F, punta de flecha roja). Por otro lado, esta vista también permite distinguir que la *lobula plate* tiene una estructura bi-lobulada. Mediante el análisis de estos preparados observamos procesos gruesos que descendían de la *lobula plate* hacia centros nerviosos proximales que, por la disposición de sus neuritas a lo largo del eje dorso-ventral y por analogía con insectos, podrían constituir neuronas colectoras de salida (Figura 4.8E y F, flechas negras).

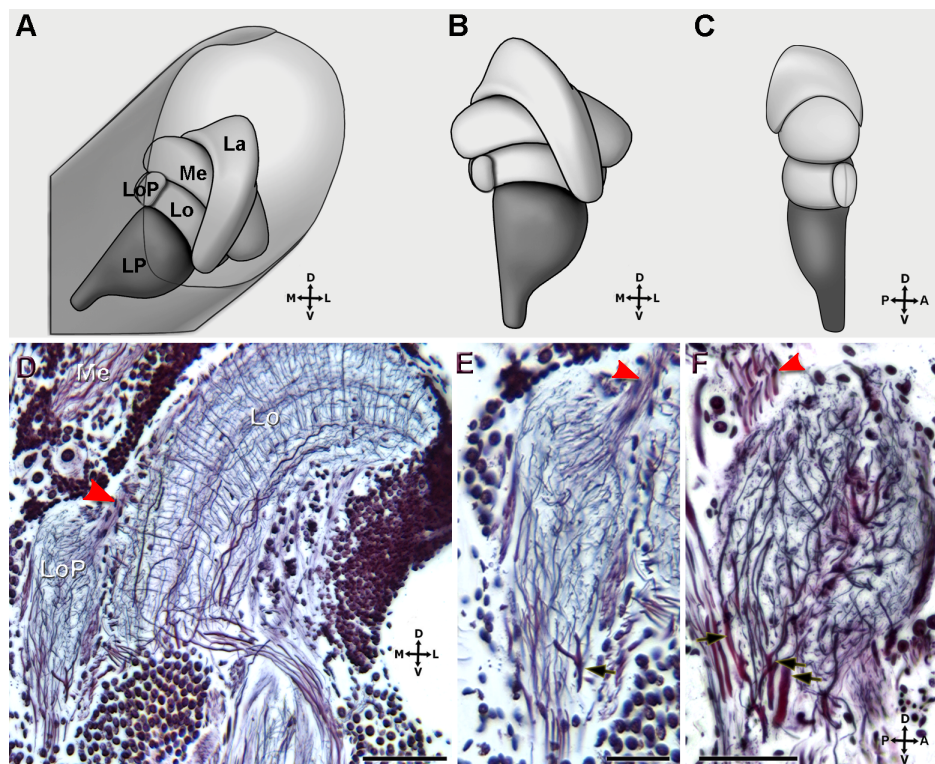


Figura 4.8: Estructura general y ubicación de la *lobula plate* de *Neohelice granulata*. (A-C) Esquemas del lóbulo óptico en una vista anterior (A-B) y en una vista medial (C) del pedúnculo izquierdo que muestra la ubicación espacial de la *lobula plate*. (D-F) Tinciones realizadas con técnicas de Bodian del lóbulo óptico de *Neohelice*. En (D) se muestra parte del lóbulo óptico donde se puede observar la *lobula plate* adyacente a la lóbula en su parte antero-medial y el tracto que la comunica con la lóbula (punta de flecha). En (E) se muestra un detalle del preparado mostrado en (D) donde se puede observar que el tracto que comunica la lóbula con la *lobula plate* (punta de flecha). También se distinguen procesos que descienden hacia otros centros nerviosos (flecha). Continúa en la página siguiente →

(F) Fotografía de una vista medial de la *lobula plate* donde se observa el tracto que la comunica con la médula (punta de flecha) y gruesos procesos que descienden hacia centros nerviosos proximales (flechas negras). La: lamina, Me: Médula, Lo: Lóbula, LoP: *Lobula Plate*, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial, A: Anterior, P: Posterior ; Escalas en D: 100 μ m, E y F: 50 μ m.

Con el fin de estudiar el mapa retinotópico del ganglio aplicamos dos colorantes fluorescentes en dos zonas distintas de la médula en 9 preparados. En el preparado que se muestra en la Figura 4.9A el colorante revelado en rojo (Texas Red) fue colocado en una zona lateral de la médula, mientras que el colorante revelado en verde (Alexa 488) fue colocado en la zona más

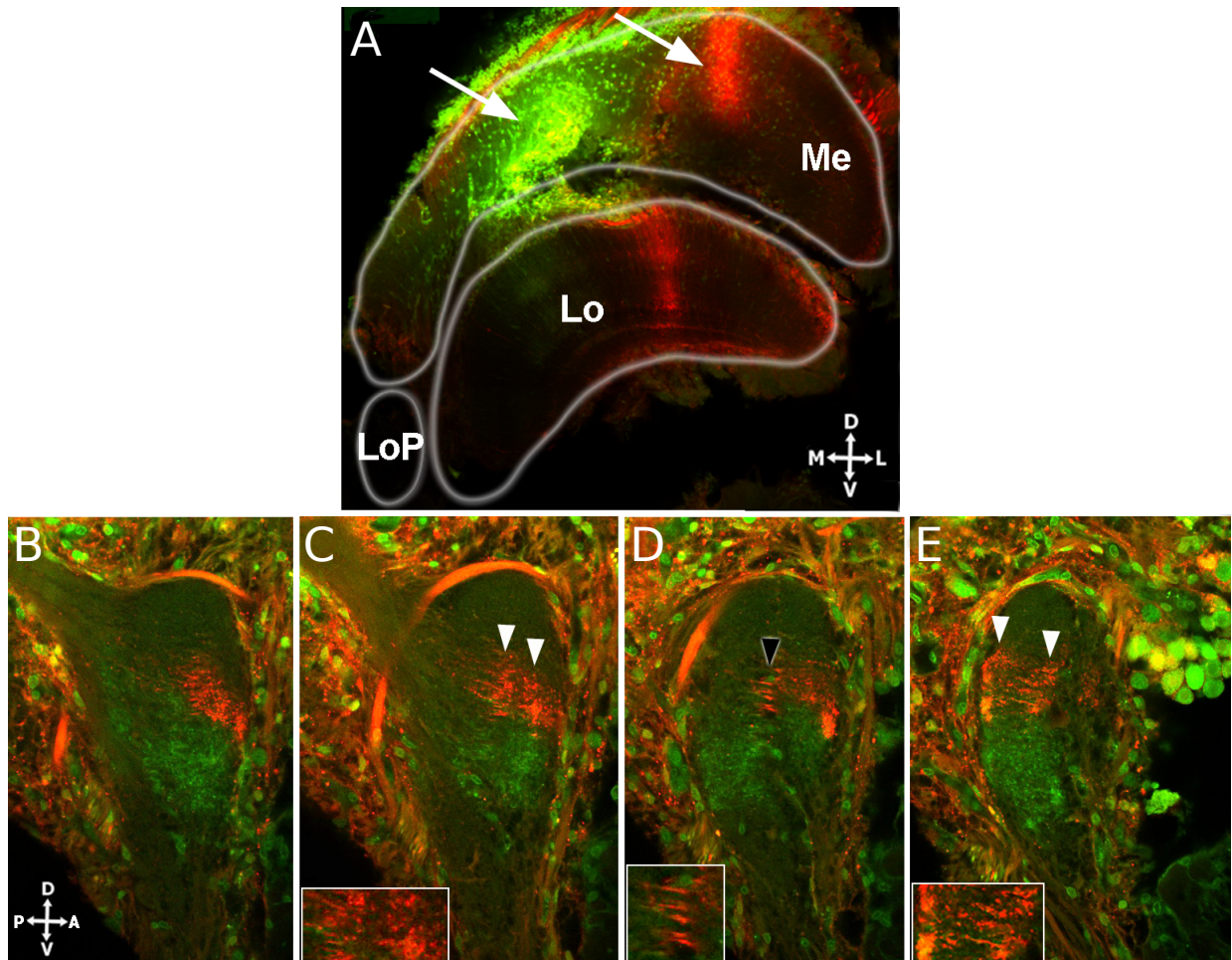


Figura 4.9: Proyecciones de neuronas que conectan la médula con la *lobula plate* de *Neohelice*. (A) Sección óptica obtenida con el microscopio confocal que muestra la topicación realizada con dos colorantes fluorescentes acoplados a dextrano en dos zonas de la médula. El colorante rojo (Texas Red) fue colocado en la zona lateral de la médula, mientras que el colorante verde (Alexa 488) fue colocado en la zona media de la médula. (B-E) Distintas secciones ópticas obtenidas del mismo preparado donde pueden observarse las proyecciones de las neuronas que conectan la médula con la *lobula plate*. En las imágenes B y C puede verse claramente el tracto por el que corren las neuronas que conectan ambos neuropilos. Las arborizaciones de las neuronas columnares que conectan a la médula con la *lobula plate* definen cuatro estratos. En cada uno de los lóbulos se encuentran dos estratos (punta de flecha blanca). La punta de flecha negra en D indica el tracto entre los dos lóbulos donde no hay arborización neuronal. El panel inferior izquierdo en C, D y E muestra un detalle de las arborizaciones. Me: Médula, Lo: Lóbula, LoP: *Lobula plate*, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial, A: Anterior, P: Posterior.

medial neuropilo. La *lobula plate* presentó dos áreas teñidas correspondientes a las proyecciones de las células que habían incorporado el colorante en la médula. Los patrones obtenidos indican que las neuronas que proyectan desde la zona lateral de la médula arriban a la zona dorsal de la *lobula plate* mientras que las neuronas que proyectan desde la zona medial de la médula poseen arborizaciones en la zona ventral de la *lobula plate* (Figura 4.9 B-E). Este resultado revela un cruzamiento de las columnas que llevan información de la médula a la *lobula plate*.

El análisis detallado de este tipo de tinciones reveló que las arborizaciones de las neuronas columnares provenientes de la médula se encuentran confinadas a cuatro zonas que conformarían cuatro estratos del ganglio. Dos de estos estratos se encuentran en uno de los lóbulos (Figura 4.9 C) y los otros dos en el otro (Figura 4.9 E, puntas de flecha). Nunca se observaron arborizaciones en la separación de los lóbulos (Figura 4.9 D, punta de flecha).

La aplicación de colorantes fluorescentes acoplados a dextrano en la lóbula en 11 preparados revelan el tracto anterior que conecta la lóbula con la *lobula plate* en concordancia con lo observado a partir de las tinciones de Bodian y Golgi (Figura 4.10A-B) donde se observan neuronas finas entrando a la *lobula plate*. El patrón de proyección de estas neuronas sobre la *lobula plate* muestra una organización retinotópica consistente con la obtenida mediante tinciones en la médula. La Figura 4.10C muestra una sección óptica de la lóbula y *lobula plate* donde se ve que las neuronas que proyectan desde la zona lateral de la lóbula, arborizan en la zona dorsal de la *lobula plate* (Figura 4.10E) mientras que las proyectan desde una zona más medial de la lóbula (Figura 4.10D) arborizan en una región más ventral de la *lobula plate* (Figura 4.10F). Por otra parte, al igual que las neuronas que comunican la médula con la *lobula plate*, las neuronas que comunican la lóbula con la *lobula plate* parecen arborizar en cuatro capas de la misma (puntas de flecha blanca, Figura 4.10G).

A partir de las secciones ópticas seriadas obtenidas con el microscopio confocal realizamos reconstrucciones 3D con el *software* Neurolucida de la morfología general del ganglio y de neuronas individuales de proyección. La Figura 4.11A muestra una sección del tejido teñido con la técnica de Bodian donde se observan los tractos que la comunican con la médula y la lóbula, mientras que la Figura 4.11B muestra el esquema de la morfología general de la *lobula plate* obtenido luego de dibujar el contorno del ganglio con el programa Neurolucida. Se muestran también el tracto posterior que la conectan con la médula (en celeste), el tracto anterior que la conecta con la lóbula (en rosa) y la separación entre ambos lóbulos (en azul).

En 10 preparaciones pudimos reconstruir neuronas individuales a partir de las tinciones masivas. Confirmamos que las neuronas que proyectan de la médula a la *lobula plate* arborizan en cuatro estratos (Figura 4.10C). Observamos que cada una de las neuronas que conectan la médula con la *lobula plate* poseen arborizaciones en dos de los cuatro estratos (Figura 4.11D-E). Si numeramos los estratos del 1 al 4 de posterior a anterior, podemos identificar dos subpoblaciones de neuronas columnares: una que arboriza en los estratos 1 y 3 (Figura 4.11D) y otra que arboriza en los estratos 2 y 4 (Figura 4.11E). La Figura 4.11F muestra reconstrucciones particulares de estas neuronas. En una de ellas logramos identificar el soma de la neurona sobre

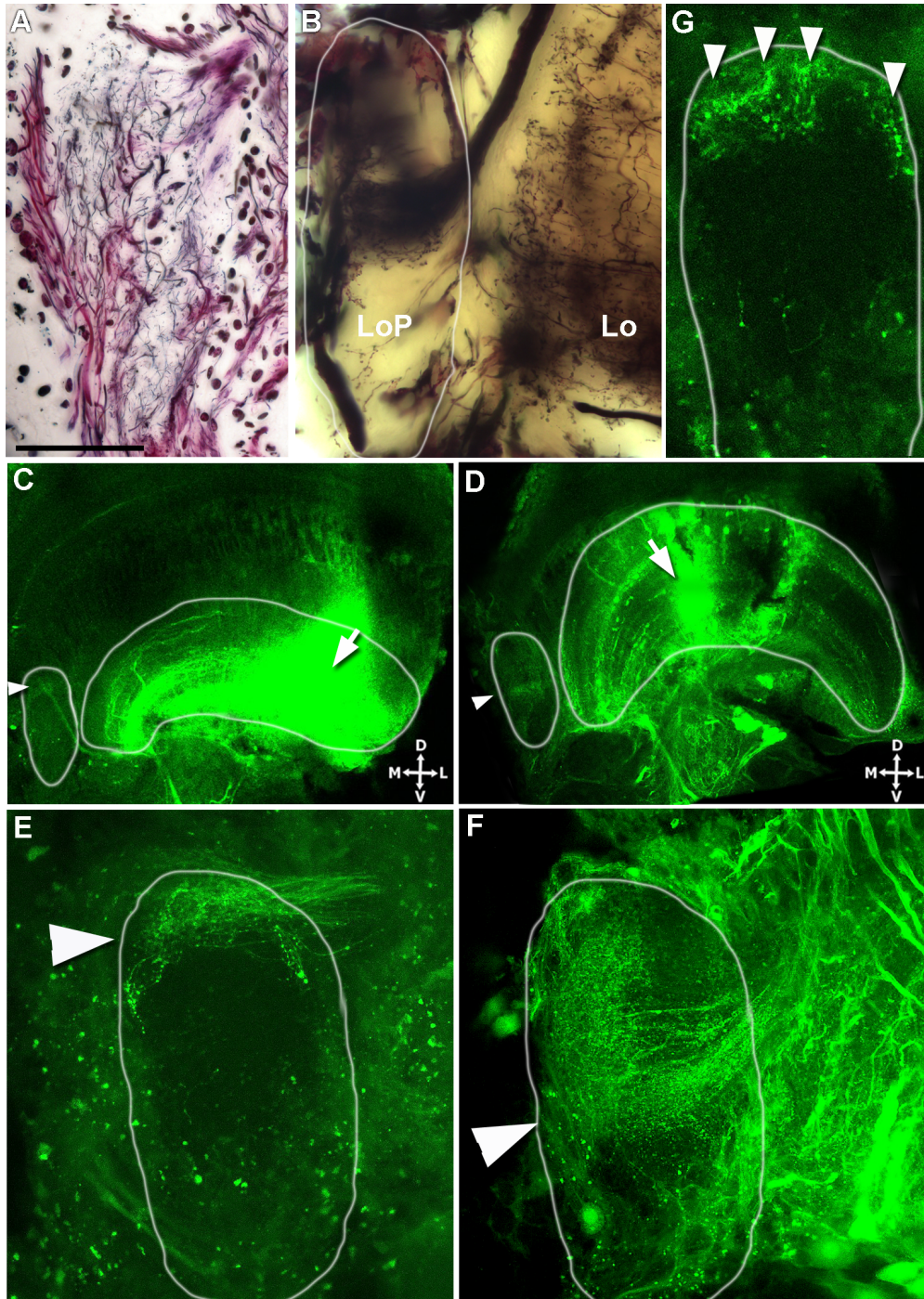


Figura 4.10: Proyecciones de la lóbula a la *lobula plate* de *Neohelice*. (**A y B**) Imágenes de la *lobula plate* obtenidas con la técnica de Bodian (**A**) y con la técnica de Golgi (**B**) donde se observa el tracto que la comunica con la lóbula. (**C y E**) Imagen obtenida a partir de un microscopio confocal. Las neuronas de proyección teñidas cuando el colorante es colocado en la zona lateral de la lóbula (**C**, flecha) arborizan en un área dorsal de la *lobula plate* (**C y E**, punta de flecha). (**D y F**) Cuando el colorante es colocado en el medio de la lóbula (**D**, flecha), las proyecciones en la *lobula plate* se encuentran más ventrales (**D y F**, punta de flecha). (**G**) Se observan cuatro capas donde arborizan las neuronas columnares de proyección entre la lóbula y la *lobula plate*. Me: Médula, Lo: Lóbula, LoP: *Lobula plate*, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial, A: Anterior, P: Posterior. Escala en A: 100 μ m.

el lado posterior del neuropilo (Figura 4.11G). En cambio, las reconstrucciones obtenidas a partir de neuronas de proyección que conectan la lóbula con la *lobula plate* muestran que cada una de estas neuronas poseen una única arborización confinada a un único estrato (Figura 4.11H). Revisando tinciones de Golgi, encontramos que un único preparado presentaba teñida una de estas neuronas (Figura 4.11I). Observamos que efectivamente su arborización se encuentra limitada a un único estrato.

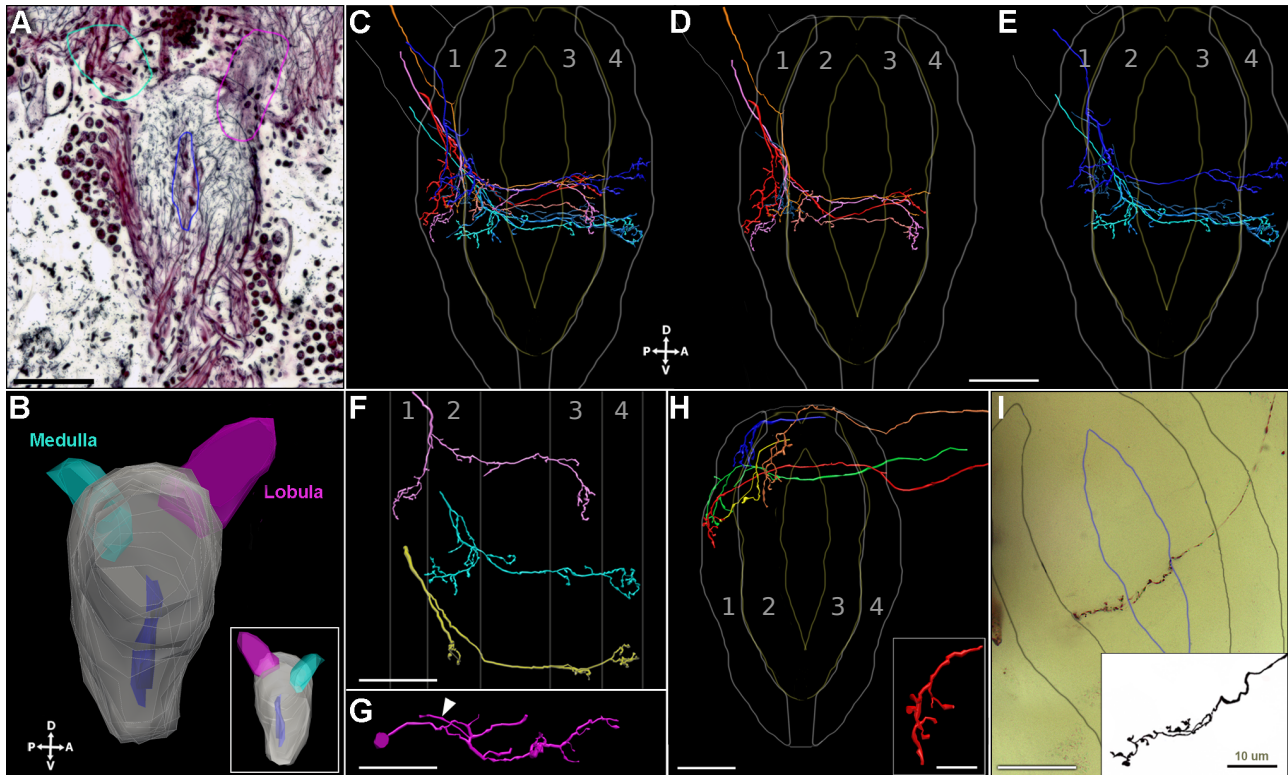


Figura 4.11: Elementos de entrada a la *lobula plate*. (A) Tractos de entrada a la *lobula plate* revelados a partir de la tinción de Bodian. Se señala el tracto de entrada desde la médula en celeste, el tracto que comunica con la lóbula en rosa y la separación de los lóbulos en azul. (B) Esquema de una vista medial que muestra la morfología general del neuropilo. El esquema inferior derecho muestra una vista lateral (C) Reconstrucción de neuronas columnares de proyección que provienen de la médula. Se observan dos clases de neuronas columnares, unas arborizando en los estratos 1 y 3 (D) y otras arborizando en los estratos 2 y 4 (E). (F) Ejemplos de neuronas individuales mostradas en (E). (G) Ejemplo de una neurona columnar de proyección que conecta la médula con la *lobula plate* donde pudo visualizarse el soma. (H) Reconstrucción de neuronas columnares individuales que proyectan desde la lóbula a la *lobula plate*. El panel inferior derecho muestra un detalle de una arborización. (I) Tinción de una neurona realizada por la Dra. Sztarker mediante la técnica de Golgi donde se puede observar una neurona de proyección proveniente de la lóbula que arboriza en una zona acotada de la *lobula plate*. El panel inferior derecho muestra la reconstrucción de dicha neurona. Me: Médula, Lo: Lóbula, LoP: *Lobula plate*, D: Dorsal, V: Ventral, A: Anterior, P: Posterior. Escalas en A: 50 μ m, en D,H,I: 25 μ m.

4.4. Conclusiones

En este capítulo empleamos tinciones masivas para caracterizar los estratos de entrada a la lóbula y para localizarlos en relación a los estratos compuestos por elementos tangenciales [Sztarker 2005]. Primero demostramos que las tinciones masivas con indicadores fluorescentes acoplados a dextranos nos permitieron identificar los principales elementos de entrada de los dos neuropilos mejor estudiados en decápodos: la lámina y la médula. Luego, caracterizamos los estratos de entrada de la lóbula. Si bien en la discusión general volveremos sobre algunos de los resultados de este capítulo, cabe señalar aquí que en el sistema visual de los artrópodos las arborizaciones terminales finas parecen ser características de terminales dendríticas mientras que las arborizaciones terminales anchas y varicosas parecen ser características de terminales axónicas [Fischbach 1989]. Por este motivo, la apariencia varicosa de las arborizaciones de los estratos de la lóbula revelados en este trabajo sugieren que estos estratos llevan principalmente información visual a la lóbula. Sin embargo, no descartamos que en nuestras tinciones masivas también se tiñan procesos dendríticos de neuronas que lleven información de la lóbula a la médula (vías eferentes). Teniendo en cuenta estas consideraciones y de acuerdo a la caracterización previa de la neuroarquitectura de la lóbula de *crayfish* [Strausfeld 1980], denominamos a las capas de la lóbula descritas en este trabajo como estratos de entrada a la lóbula (Li1, Li2, Li3 y Li4). A partir de este momento, y a lo largo de toda la tesis, denominaremos a las neuronas columnares teñidas al aplicar el colorante en la médula como neuronas transmedulares.

Encontramos que en la lóbula del cangrejo hay cuatro estratos de entrada. El estrato Li1 se encuentra justo por encima de la segunda capa compuesta por procesos anteroposteriores (APT2, [Sztarker 2005]) y parece alcanzar la superficie distal de la lóbula; el estrato Li2 se encuentra encima del estrato APT3 y por debajo del LMT2; Li3 se haya entre el estrato APT3 y el APT4, es decir, que colocaliza con el estrato LMT3 por donde arborizan las cuatro neuronas LG; mientras que Li4 se encuentra debajo del estrato APT5 cerca de la superficie proximal de la lóbula (Figura 4.7). Además, los estratos de entrada están compuestos por distintos números de substratos y el espesor de los estratos se relaciona con la forma del neuropilo. Finalmente, las arborizaciones que conforman los substratos del estrato Li3 se encuentran en el estrato por donde arborizan las neuronas LG (LMT3), sugiriendo que habría una comunicación directa con las mismas. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que existan conexiones entre las neuronas transmedulares con las LG a través de neuritas de las mismas LG o de las columnares mismas (por ejemplo en el estrato LMT2) que no podamos revelar con esta técnica. Tampoco descartamos la posibilidad de que las LG reciban información de interneuronas columnares de relevo ubicadas entre las neuronas transmedulares y las LG.

Por otra parte, aprovechando las tinciones de las neuronas columnares de proyección describimos la neuroarquitectura de la *lobula plate* del cangrejo, la primera realizada en un crustáceo. Encontramos que la *lobula plate* recibe información colateral de neuronas que la conectan con la médula y la lóbula a través de dos tractos independientes. El seguimiento de las

proyecciones neuronales llegando desde la médula nos permitió caracterizar el mapa retinotópico de la *lobula plate*. El campo visual frontal (procesado en lado lateral de la médula, Figura 1.6) mapea en la región dorsal de la *lobula plate* mientras que el campo visual lateral (procesado en el centro de la médula) mapea en la región central de la *lobula plate*. Identificamos cuatros estratos de la *lobula plate* sobre los que arborizan las neuronas de proyección. La reconstrucción de neuronas individuales a partir de tinciones masivas con el software Neurolucida mostraron dos subpoblaciones de células: las que arborizan en los estratos 1 y 3, y las que arborizan en los estratos 2 y 4. En relación a las neuronas que proyectan desde la lóbula solo encontramos neuronas arborizando en un único estrato de la *lobula plate*.

5 Respuesta poblacional de calcio de neuronas transmedulares frente a estímulos de movimiento

5.1. Introducción

La detección de movimiento en ambientes naturales constituye una tarea compleja si consideramos que las escenas naturales varían enormemente en cuanto al brillo, contraste y estructura espacial. La información de movimiento se extrae de patrones de contraste espacio-temporales en la retina. Dicha tarea implica distinguir entre figura-fondo, detectar bordes y adaptarse visualmente al rango dinámico de la escena visual. A pesar de la importancia de este cómputo para la gran diversidad de comportamientos guiados por el movimiento, los mecanismos que subyacen al procesamiento de movimiento y el contraste espacial no son completamente entendidos en ninguno de los organismos hasta ahora estudiados.

En insectos y crustáceos, el procesamiento de información sobre objetos en movimiento se encontró asociado a neuronas de salida de la lóbula (e.g. mosca azul [Hennig 2012], langostas [Fotowat 2011a], libélulas [O'Carroll 1993] y moscas polinizadoras [Nordström 2012]). Esta asociación se basa en un conjunto grande y diverso de correlaciones observadas entre los niveles de actividad de estas neuronas y la intensidad de los comportamientos evocados por distintos tipos de objetos en movimiento. Estas correlaciones se observan para distintas variaciones de los atributos visuales que definen al objeto en movimiento, como ser: el tamaño, su contraste respecto al fondo, su dirección y velocidad. Otro tipo de correlaciones tienen que ver con la modificación en la respuesta neuronal, en general provocada por la presentación repetida del estímulo visual, y una consistente modificación de la respuesta comportamental asociada [Gray 2005, Olberg 1981]. Estas últimas reconocen modificaciones tanto de corto como de largo término [Tomsic 2003].

Los sistemas de detección de objetos en movimiento que han sido mejor estudiados son: el de detección de características en la mosca [Hennig 2012]; el sistema de detección de objetos pequeños compuesto por las neuronas detectoras de movimiento, denominadas STMD, involucradas en la detección de presas, compañeros o rivales en libélulas y moscas polinizadoras [O'Carroll 1993, Nordström 2012]; y el sistema de neuronas gigantes de la lóbula detectoras de movimiento (LGMD) implicadas en el comportamiento de evasión en langostas

(para una revisión, ver [Fotowat 2011b]). Las neuronas de la lóbula implicadas en la detección de objetos en movimiento, como las STMD, LGMD y LG tienen muchas características comunes: I) son neuronas tangenciales de campo amplio que recogen la información del arreglo columnar retinotópico en la lóbula y proyectan al cerebro medio; II) responden más fuertemente a estímulos puntuales de movimiento que a estímulos de campo amplio; III) muestran una marcada disminución de la respuesta a la presentación repetitiva de un estímulo visual [Gray 2005, Tomsic 2003, Bolzon 2009]. En todos estos casos, los comportamientos que guiarían estas neuronas visuales son principalmente comportamientos que requieren una ejecución rápida como lo son los de persecución o huida.

Como se dijo en el Capítulo 1, todo lo que se conoce en artrópodos sobre procesamiento de objetos en movimiento y su relación con el comportamiento proviene de estudios electrofisiológicos realizados en estas neuronas de salida de la lóbula, poco y nada se sabe sobre el rol de sus neuronas columnares presinápticas. Por ejemplo: ¿Las curvas de sintonía de las neuronas de salida de la lóbula son moldeadas por eventos de integración que tienen lugar en estas mismas neuronas, o son heredadas de las propiedades de sus neuronas presinápticas? ¿La plasticidad observada en la respuesta de estas neuronas de salida de la lóbula se debe a cambios plásticos intrínsecos y/o son cambios presinápticos?

Por otra parte, en el Capítulo 4, a través de tinciones masivas, mostramos que las neuronas de proyección de la médula definirían cuatro estratos de entrada de información a la lóbula. Cada uno de estos estratos está conformado por distintos subestratos en los cuales arborizarían distintos tipos de neuronas de proyección de la médula (ver Subsección 4.3.2). Dado que en el sistema visual la información se extraería en canales paralelos (color, borde, dirección de movimiento) para un mismo punto del campo visual y que encontramos una gran diversidad de neuronas en cada columna visual, ¿qué información se codifica en las neuronas que arborizan en los distintos estratos y subestratos de la lóbula?

Para empezar a abordar las preguntas planteadas, desarrollamos una técnica para estudiar la actividad poblacional de calcio en las terminales de las neuronas transmedulares.

5.2. Materiales y métodos

Para medir las respuestas de calcio en los estratos de entrada de la lóbula, colocamos dextrano conjugado a un colorante sensible a calcio (*Calcium green-1*) en la médula. El pedúnculo fue colocado en posición horizontal (Figura 5.1A) quedando la parte del ojo que normalmente mira a frontal mirando hacia ventral. A través de un monitor ubicado ventralmente realizamos la estimulación visual (Figura 5.1B) y registramos ópticamente la respuesta poblacional de calcio de las neuronas transmedulares. La señal emitida por la muestra fue cuantificada como la media relativa del cambio en la fluorescencia de tres regiones de interés (ROI) seleccionadas manualmente. Estas corresponden a los primeros tres estratos de arborizaciones columnares en la lóbula. La extensión del eje vertical de cada ROI fue definida como la extensión aproximada

de cada estrato determinado por la imagen de fluorescencia cruda (Figura 5.1C). La extensión tangencial (u horizontal) del ROI incluyó alrededor de 5 a 10 columnas visuales (resultando en un campo receptivo azimuthal de 10-20°, ver [Beron de Astrada 2011]). Como el estrato Li4 nunca mostró respuestas de calcio, de aquí en más, nos centraremos en las respuestas de Li1-Li3.

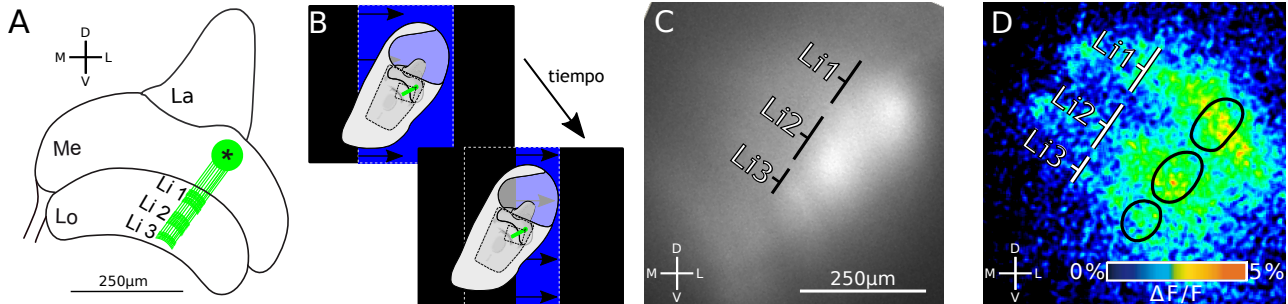


Figura 5.1: Coloración masiva de neuronas transmedulares que llevan información a la lóbula. (A) Se aplicaron cristales de dextrano acoplados a colorantes sensibles a calcio (*Calcium Green-1*) en la médula de manera de teñir las neuronas transmedulares. Aproximadamente tres horas después, el animal fue colocado debajo de un microscopio de fluorescencia. (B) Vista dorsal de la preparación. Se esquematiza la incisión realizada en la cutícula, por transparencia se puede observar el movimiento del estímulo presentado. Se registró ópticamente y en simultáneo la actividad de las neuronas transmedulares. (C) Imagen cruda de fluorescencia obtenida con el microscopio de registro. (D) Ejemplo de una respuesta de calcio obtenida durante un registro en particular. El cambio de fluorescencia relativo se muestra en escala de falso color. Se pueden distinguir los tres estratos de las neuronas columnares que llevan información a la lóbula y se muestra un ejemplo de los ROIs utilizados para medir la respuesta de calcio de cada estrato en particular (áreas dibujadas en negro). La: Lamina; Me: Médula; Lo: Lóbula; Li: Lóbula *input* strata, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial.

El análisis cuantitativo de los datos consistió en la medición de los máximos del cambio de fluorescencia relativa para cada ROI durante la estimulación visual. También se midió el área bajo la curva del cambio relativo de fluorescencia durante el tiempo de estimulación visual. Dado que ambas mediciones arrojaron resultados equivalentes, por simplicidad, en algunos experimentos sólo mostraremos la medición de los máximos de la respuesta de calcio. En la Figura 5.4, la latencia fue medida como el tiempo al máximo de la respuesta de calcio desde el comienzo de la estimulación visual.

5.2.1. Estímulos visuales

En este capítulo estudiamos distintos parámetros visuales relacionados con el movimiento de un objeto: velocidad, contraste y frentes consecutivos de polaridad opuesta con distintos desfases temporales.

Para realizar las curvas de sintonía de velocidad, presentamos frentes negros verticales de 60° de altura desplazándose horizontalmente sobre un fondo iluminado a las siguientes velocidades angulares: 10-20-30-60-120 y 240°/s. Los frentes constituyen estímulos visuales muy sencillos ya que implican un único borde con contraste avanzando por un fondo dado (en este caso, un borde oscuro vertical avanzando sobre el fondo iluminado). Los estímulos fueron pro-

gramados de modo que la velocidad angular fuera constante durante toda la presentación para un observador ubicado en la posición del ojo del cangrejo.

Para realizar las curvas de sintonía de contraste, utilizamos seis frentes de intensidad variable (de blanco a negro) sobre un fondo gris de intensidad media. Dado que la escala RGB de intensidad de los monitores se extiende de 0 a 255, utilizamos ese rango para denotar la intensidad utilizada: La intensidad media (gris) del fondo es designada como 128, el frente negro como 0 y el frente claro como 255 (cabe recordar que este último es blanco para los experimentos comportamentales (RGB, 255:255:255) y azul (RGB, 255:0:0) en los de *imaging*, ver Subsección 3.4.2). Los valores de intensidad de los frentes oscuros utilizados fueron: 0, 42, 84; y los claros: 170, 212, 255. El contraste resultante se cuantificó por la diferencia de intensidad relativa entre frente y fondo según la fórmula de Michelson:

$$Contraste = \frac{(I_{frente} - I_{fondo})}{(I_{frente} + I_{fondo})}$$

La intensidad de iluminación se midió con un fotómetro colocado en la posición del ojo. Las mediciones de los valores de contraste informados con los del dispositivo donde se realizaron los experimentos comportamentales. El contraste medido para cada estímulo fue (frente:contraste): 0: -0.90; 42: -0.73; 84: -0.34; 170: 0.22; 212: 0.35; 255: 0.43.

Para los experimentos de alto contraste de polaridad Figura 5.9, donde el frente negro (0) se desplaza sobre un fondo blanco (255), y viceversa, el contraste obtenido fue (frente:contraste): 0: -0.96 y 255: 0.96.

Para evaluar la respuesta a dos estímulos consecutivos de distinto contraste, presentamos un frente negro (valor RGB:0) desplazándose a 30°/s sobre un fondo claro (valor RGB: 255) seguido por un frente a 30°/s que restituye el valor de luminosidad del fondo. El desfase entre los frentes fue fijado a distintos tiempos, siendo los intervalos de tiempo utilizados: 0.20, 0.43, 0.92, 1.43, 1.94 y 2.5 segundos.

Como se mencionó en el Capítulo 3, tanto los estudios fisiológicos como los comportamentales fueron realizados en distintos dispositivos experimentales, por lo que los estímulos visuales fueron diseñados de manera tal de mantener las mismas velocidades y tamaños angulares en ambos dispositivos a pesar de que las áreas de estimulación fueran distintas. En los experimentos comportamentales, el monitor de 32cm x 27cm (800 x 600px) se encontraba a 20 cm del cangrejo subtendiendo un ángulo de 77° x 68°. En los experimentos de *imaging*, el monitor de 33.5 x 27cm (800 x 600px) se encontraba a 5 cm del ojo del cangrejo. En este caso restringimos el área de estimulación a 7.65cm x 27cm por lo que el área de estimulación subtendió un ángulo de aproximadamente 75° x 147°.

Dado que la distancia del ojo al monitor de estimulación difiere en los dispositivos experimentales, la intensidad lumínica que recibe el ojo en ambas aproximaciones es distinta. En relación a los experimentos de contraste, nos limitamos a mantener las relaciones crecientes o decrecientes de contraste del objeto respecto del fondo, sin igualar la intensidad de luz a nivel del ojo en ambos dispositivos.

Antes de comenzar el protocolo de estimulación, los animales fueron colocados en el dispositivo experimental donde se los mantuvo sin perturbación visual durante 3 minutos para los experimentos de *imaging* y 10 minutos para los experimentos comportamentales. Todos los animales recibieron todos los estímulos de manera aleatoria con una separación entre estímulos de 3 minutos tanto para el caso de los experimentos de *imaging* como para los experimentos comportamentales.

Para analizar diferencias en las respuestas de los distintos estratos frente a los tratamientos realizamos un análisis de modelos lineales mixtos, elegimos como variable a analizar el máximo valor del cambio de fluorescencia o el área total del cambio de fluorescencia medida durante el tiempo de estimulación. Se tomaron como factores fijos al estímulo, al estrato y la interacción entre estímulos y estratos; y como factor aleatorio al animal.

5.3. Resultados

5.3.1. Validación de la preparación experimental

5.3.1.1. Registros ópticos en las neuronas LG

Dado que en este capítulo utilizamos la técnica de imágenes funcionales de calcio para evaluar la actividad de neuronas de entrada a la lóbula, primero mostraremos la validación de la misma. Para ello, medimos la actividad de las neuronas LG las cuales han sido estudiadas previamente y de quienes conocemos su respuesta electrofisiológica [Beron de Astrada 2002, Tomsic 2003, Medan 2007, Oliva 2007]. Las neuronas LG conectan dos estratos tangenciales de la lóbula con el ganglio central. Las dendritas de 3 de los 4 tipos de LG descritas se extienden a lo largo de gran parte del mapa retinotópico y convergen hacia el lado medial de la lóbula en una única y gran neurita de salida [Beron de Astrada 2002, Medan 2007]. Para teñir las neuronas LG, realizamos una incisión en la cutícula (Figura 5.2A) de manera de exponer los ganglios ópticos (Figura 5.2B). Aplicamos los cristales de dextrano *calcium green-1* en el lado medial de la lóbula y esperamos a que las neuronas incorporen el colorante y lo transporten retrogradamente (aproximadamente 3 horas). La Figura 5.2C y Figura 5.2D muestran imágenes tomadas con el microscopio confocal *a posteriori* de realizar los registros de fluorescencia (mostrados en la Figura 5.2F, H). La mancha blanca señalada con el asterisco corresponde al sitio donde fue colocado el colorante sensible a calcio en la lóbula (Figura 5.2C y D). En todas la preparaciones realizadas encontramos dos estratos tangenciales marcados en la lóbula que se corresponden con los estratos LMT2 y LMT3, por los que corren las neuronas LG (ver Figura 4.6).

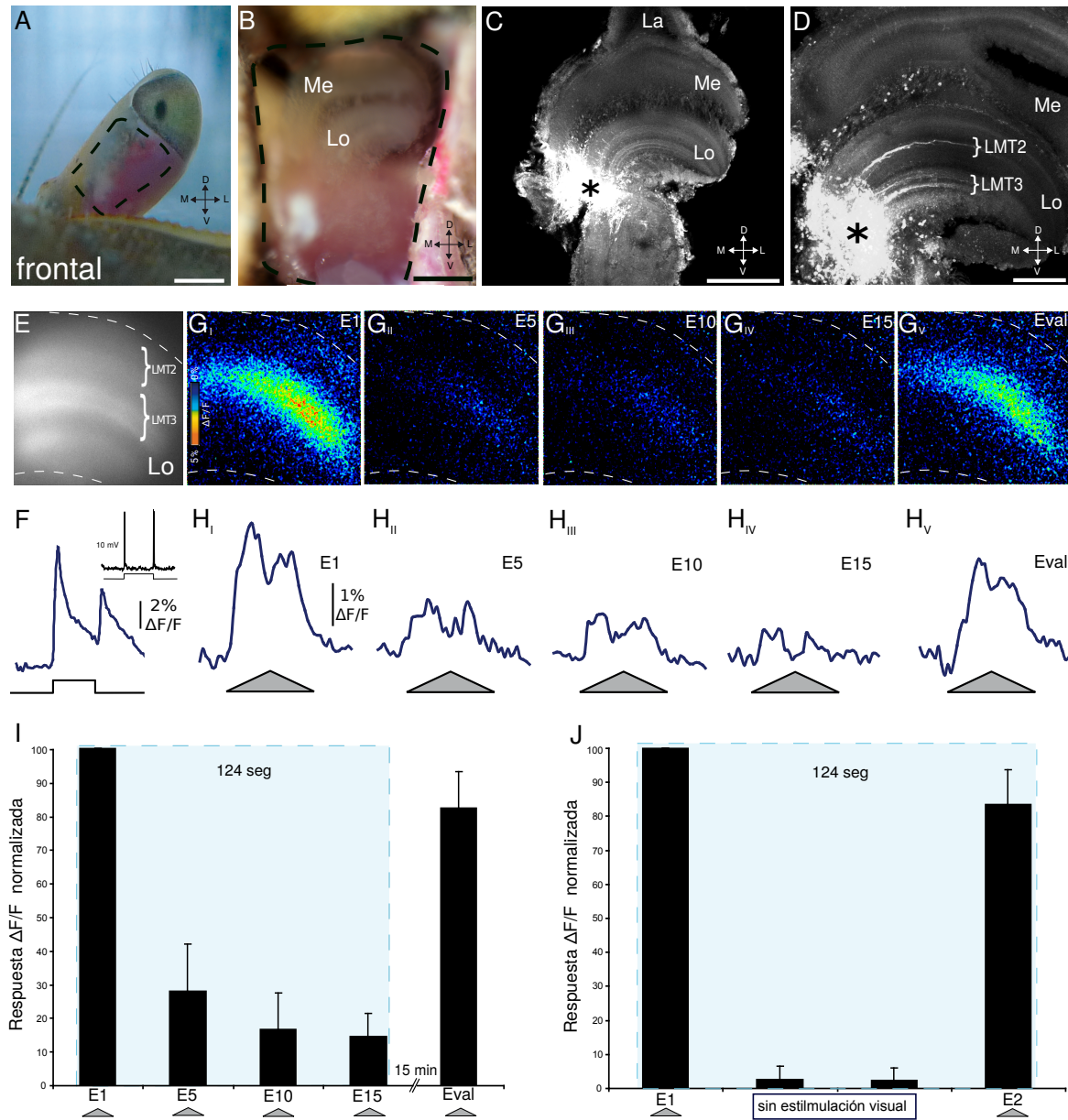


Figura 5.2: Registros ópticos en las neuronas LG. (A y B) Vista posterior del ojo derecho del cangrejo, la línea punteada indica la zona de la incisión realizada para exponer los ganglios ópticos del animal. (C) Imagen tomada con el microscopio confocal que muestra el sitio de topicación con el colorante (asterisco). (D) Un detalle del mismo preparado a otra una profundidad del tejido. Se pueden observar los estratos tangenciales por donde arborizan las dendritas de las neuronas LG (LMT2 y LMT3). (E) Fotografía tomada con el microscopio de registro de la parte lateral de la lóbula donde se pueden observar los estratos tangenciales lateromediales teñidos. (F) Cambio de fluorescencia relativa media en una preparación particular para un ROI que comprende el estrato LMT3 en respuesta a un pulso de luz de 1 segundo de duración. La dinámica de la respuesta de la neurona LG fue similar a la respuesta obtenida previamente en el laboratorio utilizando técnicas electrofisiológicas (*inset*). (G y H) Patrones de actividad evocada por el VDS (G) Imagen del marco de máxima respuesta de calcio al VDS. Las respuestas de calcio se observan principalmente en el estrato LMT3. (H) Curso temporal del cambio de fluorescencia relativa en respuesta al VDS. (I) Datos promedio normalizados al primer ensayo. El porcentaje de respuesta en el ensayo 15 fue de $14\% \pm 6.4\%$ (t test, $p < 0.001$, $n = 6$). El porcentaje de respuesta en el ensayo de evaluación fue de $83.9\% \pm 8.5\%$ ($n = 6$). (J) Mismo protocolo de registro óptico pero presentando sólo dos estímulos VDS separados por el mismo tiempo que transcurrió entre el ensayo 1 y el 15 del entrenamiento anterior. El porcentaje de respuesta en el ensayo de evaluación fue de $84.6\% \pm 7.8\%$ ($n = 6$). Escalas en A: $500\mu\text{m}$, en B y C: $250\mu\text{m}$ y en D: $100\mu\text{m}$. La: Lamina; Me: Médula; Lo: Lóbula; LMT: Estrato tangencial lateromedial, D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial.

La respuesta de calcio obtenida frente a un pulso de luz (encendido y apagado del monitor; estímulo al que denominamos ON-OFF) fue siempre de tipo fásica (Figura 5.2E y F). Frente a estos estímulos, las neuronas LG presentan el mismo tipo de respuesta electrofisiológica (*inset*, Figura 5.2F; Figura 1.12). En general, las señales se observaron en el estrato LMT3 y fueron mucho más débiles o indetectables en el estrato LMT2. El otro estímulo que usamos fue el estímulo visual de peligro (VDS) que también provocó señales de calcio mayoritariamente en el estrato LMT3. Este estímulo consiste en una barra en movimiento que presenta una fase de ida y una fase de vuelta al sitio de inicio del movimiento (Sección 3.3). Frente a este estímulo, el perfil temporal de la respuesta de calcio (Figura 5.2Gi, Figura 5.2Hi) resultó muy similar a la respuesta electrofisiológica que tienen las neuronas LG (ver Figura 1.13C). La señal de calcio registrada para el desplazamiento del VDS presenta un primer pico correspondiente a la primer fase de desplazamiento del VDS y luego un segundo pico (de menor amplitud que el primero) correspondiente a la segunda fase de desplazamiento. El siguiente paso fue analizar la señal de calcio frente a una presentación repetitiva del VDS (Subsubsección 1.7.2.1). Para evitar iluminar la preparación con la luz de excitación del microscopio durante toda la sesión de entrenamiento (15 ensayos separados por 2 segundos) registramos las respuestas de calcio en los ensayos 1, 5, 10 y 15 del entrenamiento (E1, E5, E10, y E15, respectivamente; Figura 5.2Gi–Giv y Hi–Hiv). La presentación repetida del VDS produjo una aguda y profunda reducción en la respuesta de calcio. Esta se recuperó a sus niveles iniciales al presentar un ensayo VDS de evaluación 15 minutos luego de finalizado el entrenamiento (Figura 5.2Gv, Hv, I), resultado que también coincide con la respuesta electrofisiológica de las neuronas LG (ver Figura 1.14).

Para confirmar que la reducción medida en la respuesta de calcio era debida a la presentación repetida del VDS y no a algún efecto indeseado de las condiciones de registro óptico (e.g. *bleaching* o adaptación de los fotorreceptores por encendido de la luz de excitación del microscopio); realizamos exactamente el mismo protocolo de registro pero, en vez de presentar 15 ensayos de entrenamiento con el VDS, presentamos solamente dos ensayos separados por el tiempo correspondiente al ensayo 1 y al ensayo 15 del entrenamiento original (intervalo entre los dos ensayos = 124 segundos). Los resultados en la Figura 5.2J muestran que la respuesta al primer y al segundo ensayo del VDS fueron muy similares confirmando que la reducción en la respuesta de calcio observada anteriormente se debía a la repetición en la presentación del VDS. En conjunto, estos resultados muestran que las respuestas de calcio de las neuronas de salida de la lóbula, medidas con esta nueva preparación, coinciden con las esperadas según registros electrofisiológicos registrados previamente.

5.3.1.2. Patrón de la respuesta de calcio en los estratos de entrada de la lóbula

Dado el ordenamiento retinotópico de los elementos columnares que conectan los distintos ganglios ópticos (ver Figura 1.6), se puede predecir el patrón espacio-temporal de activación de las neuronas columnares en la lóbula frente a la presentación de un estímulo de movimiento en un campo amplio. Para evaluar el mapa retinotópico en la lóbula del cangrejo teñimos

las neuronas transmedulares aplicando el colorante en la médula. Luego, estudiamos sobre los estratos de entrada de la lóbula la señal de calcio obtenida durante la presentación de una barra en movimiento. La misma se trasladaba desde el lado anterior hacia el lado lateral de la retina (panel superior, Figura 5.3). El desplazamiento de la barra provocó un patrón de actividad de las células transmedulares en la posición esperada según el ordenamiento retinotópico. La respuesta de calcio se observó primeramente en el lado lateral de la lóbula y se desplazó hacia el lado medial conforme avanzaba estímulo. El patrón espacio-temporal obtenido coincide con el predicho a partir del mapa retinotópico del neuropilo (esquema a la izquierda del panel superior de la Figura 5.3). El movimiento de una barra en la dirección opuesta evocó un patrón de respuesta inverso (panel inferior Figura 5.3). Este resultado prueba que, en la configuración en que se realizan aquí los registros ópticos, logramos activar secuencialmente las columnas visuales que proyectan de la médula a lóbula.

5.3.2. Sintonía de la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares y del comportamiento de escape frente a variaciones en la velocidad.

La Figura 5.4A muestra una imagen de la lóbula obtenida con el microscopio de fluorescencia donde se observan los tres estratos de entrada a la lóbula en los que hemos obtenido respuestas de calcio (Li1-Li3). Los animales fueron estimulados con frentes negros que se desplazaban horizontalmente de anterior a lateral del animal sobre un fondo claro a seis velocidades diferentes: 10 - 20 - 30 - 60 - 120 y 240 °/s (en las Figura 5.4C-E se ilustra el momento de inicio y finalización de los estímulos en el rectángulo gris inferior).

Las tres imágenes alineadas verticalmente en Figura 5.4B ilustran el cambio de fluorescencia en código de falso color (para el marco correspondiente a la respuesta máxima) para tres de las seis velocidades evaluadas. En la Figura 5.4C se muestra el perfil temporal del cambio de fluorescencia total (promediando la respuesta de los tres estratos) obtenido en un preparado representativo. En la Figura 5.4D se muestra el perfil temporal del cambio de fluorescencia total promedio para todos los animales estudiados (n=9). Como era de esperar, la latencia a la máxima señal de calcio una vez iniciado el estímulo disminuyó a medida que aumentaba la velocidad de los frentes debido a que el estímulo llega antes al campo receptivo de las columnas sobre las que se está midiendo (Figura 5.4F). Las respuestas máximas fueron mayores para frentes de velocidades rápidas que para los de velocidades más lentas (Figura 5.4G). El área de la respuesta de calcio durante la presentación del estímulo fue, en cambio, mayor para velocidades bajas (Figura 5.4H, círculos). Teniendo en cuenta que a velocidades lentas el estímulo demora más tiempo en recorrer la región de estimulación visual, podemos normalizar el área medida por la duración total de la estimulación para obtener un estimador de la respuesta por unidad de tiempo.

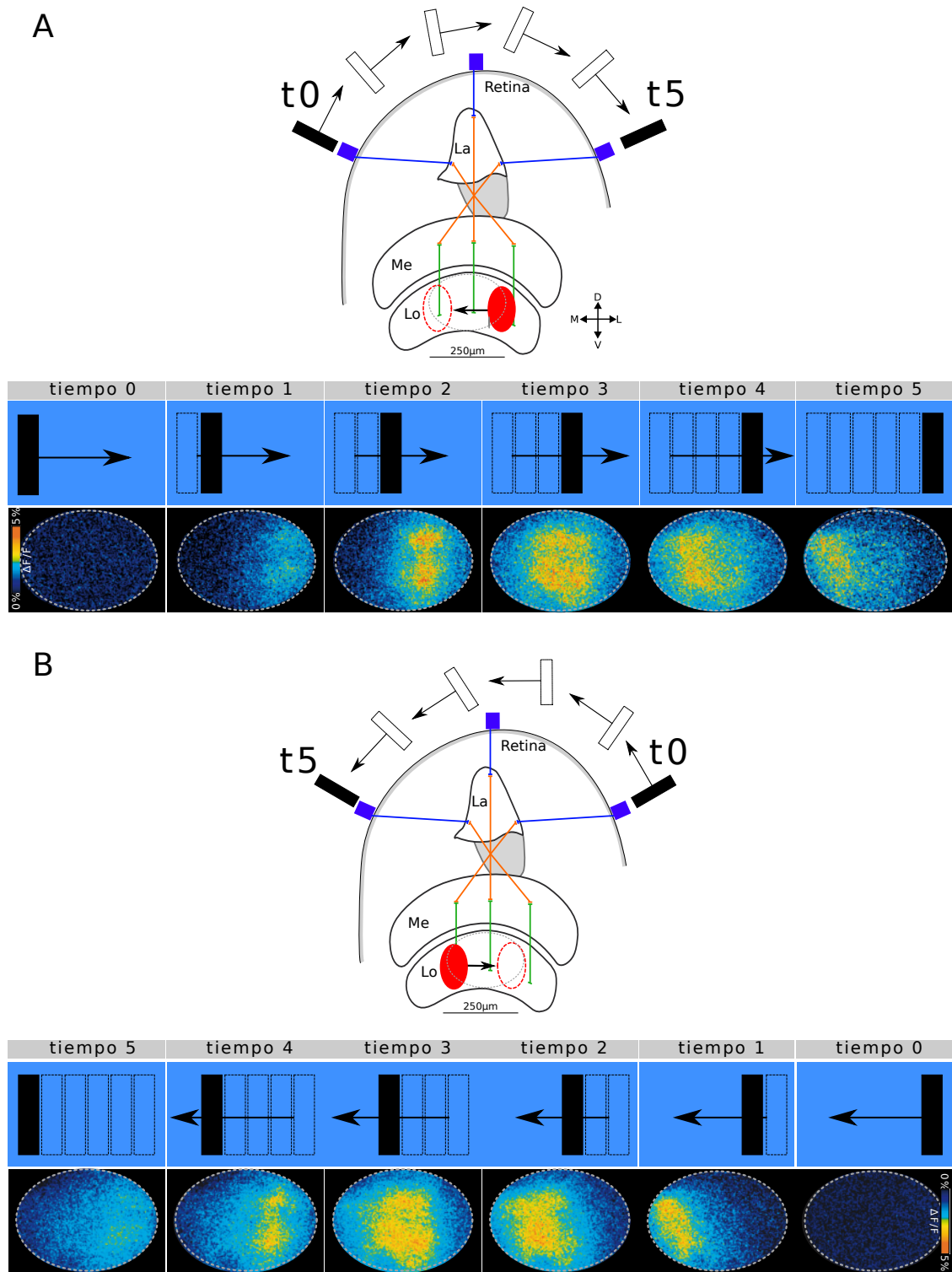


Figura 5.3: La actividad de los elementos columnares de la lóbula evidencian el ordenamiento retinotópico de los ganglios ópticos de *Neohelice granulata*. **(A)** Arriba: esquema que ilustra el patrón de activación esperado de las neuronas columnares de la lóbula (representado por el óvalo rojo en la lóbula) frente a la presentación de una barra que se desplaza de anterior hacia lateral de la retina. Con el fin de ilustrar más claramente el arreglo espacial de estimulación, la barra la dibujamos desplazándose desde el lado medial del animal hacia el lado lateral. En el esquema se muestra Abajo: Señal de calcio obtenida para distintos tiempos de desplazamiento de la barra. **(B)** Misma situación, pero el desplazamiento de la barra ocurre en la dirección contraria. La línea punteada gris indica el área registrada en la lóbula. La: Lámina; Me: Médula; Lo: Lóbula; D: Dorsal, V: Ventral, L: Lateral, M: Medial.

La respuesta promedio por unidad de tiempo de estimulación, vuelve a dar una curva creciente como era la de respuesta máxima (Figura 5.4H, triángulos). En síntesis, la respuesta acumulada de calcio es mayor para velocidades lentas pero por unidad de tiempo de estimulación las respuestas de calcio son mayores para velocidades rápidas.

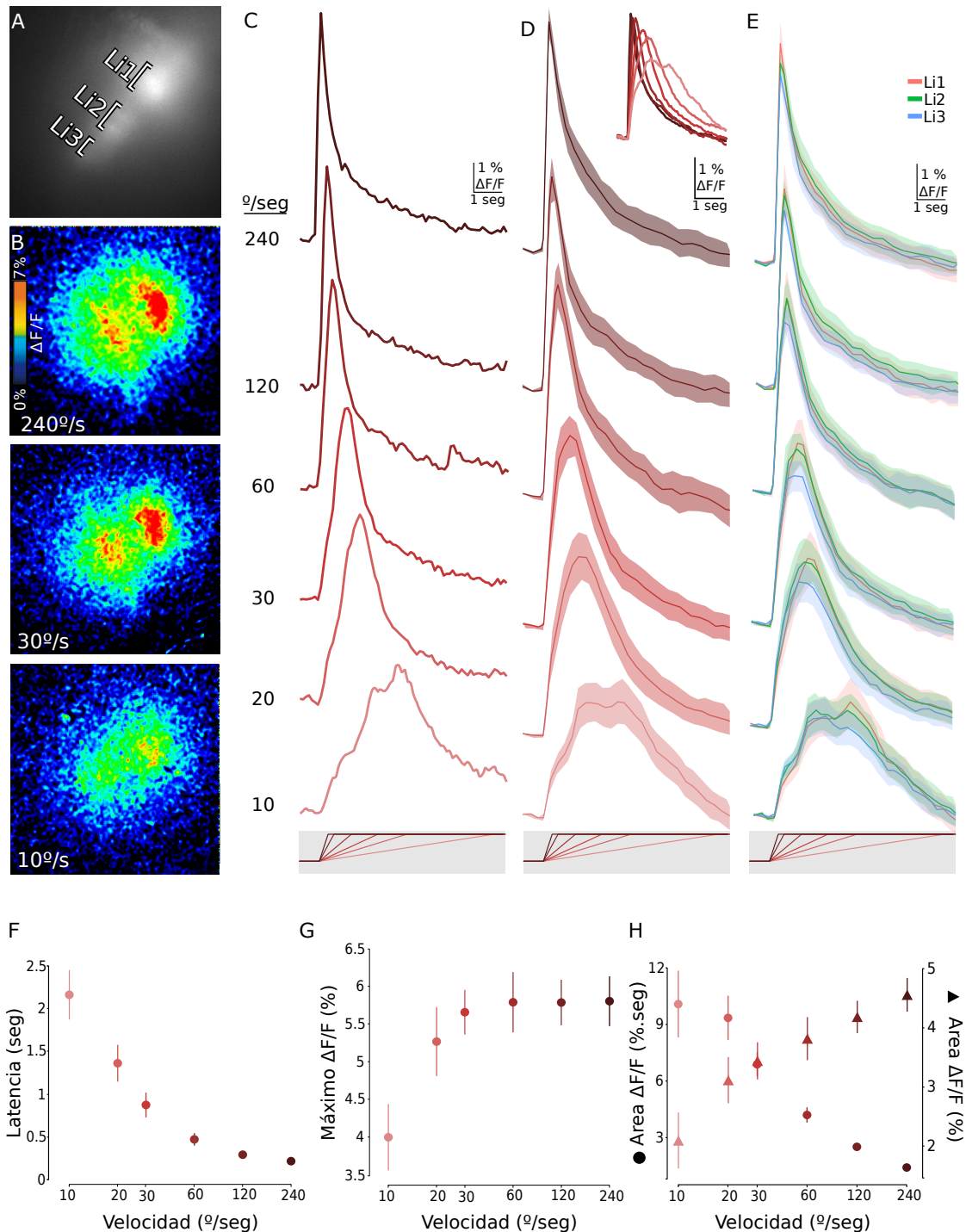


Figura 5.4: Sintonía de la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares frente a variaciones en la velocidad. (A) Imagen de una parte de la lóbula obtenida con el microscopio de fluorescencia. Se pueden observar los tres estratos de entrada a la lóbula. (B) Ejemplo representativo de una respuesta de calcio en código de falso color durante la presentación de un frente negro desplazándose a 240, 60 y 10 $^{\circ}/s$. Continúa en la página siguiente →

(C-E) Perfil temporal del cambio de fluorescencia para un animal representativo (C) para el promedio de 9 animales (D) y para cada estrato de entrada (E) al ser enfrentados a las distintas velocidades. El *inset* en D muestra los perfiles temporales superpuestos. El rectángulo gris debajo de los registros temporales muestra la dinámica de desplazamiento de las distintas velocidades. (F). Latencias al máximo de fluorescencia medidas desde el inicio del movimiento del frente en función de la velocidad (en escala logarítmica). (G) Máximo de fluorescencia relativa medido durante la presentación del estímulo en función del logaritmo de la velocidad. Al realizar el modelo lineal mixto observamos un efecto significativo del factor velocidad ($p < 0.001$). (H) Área total de la respuesta de calcio durante todo el protocolo de adquisición (círculos) y área por unidad de tiempo (triángulo). Las líneas en D y E representan media $\pm$ error estándar. Los gráficos F, G y H muestran la media $\pm$ error estándar.

Por otra parte, estudiamos si la información visual en relación a la velocidad del movimiento se encuentra anatómicamente segregada en los estratos de entrada de la lóbula (Figura 5.4E). Para cada velocidad, la respuesta de calcio medida tiene perfiles temporales similares en los tres estratos, alcanza máximos similares y posee áreas similares. La interacción entre estratos y velocidades no resultó significativa para el análisis de máximos ni para el área de fluorescencia (modelo lineal mixto, $p = 0.99$ para ambos análisis, $n = 9$).

Nuestro siguiente paso fue estudiar si la respuesta diferencial de las neuronas transmedulares frente a las distintas velocidades correlaciona con la respuesta de escape de los animales. Mediante un simulador de locomoción [Oliva 2007], estudiamos la respuesta de escape de los animales ($n = 17$) cuando fueron enfrentados con el mismo conjunto de estímulos. La presentación de los frentes en movimiento provocó una clara respuesta de escape para la mayoría de los estímulos presentados (Figura 5.5). Las velocidades más rápidas, 120 y 240 °/s, provocaron una inmediata reacción de sobresalto en los animales pero no llegaron a desencadenar un escape, posiblemente debido a la rapidez y corta duración del estímulo (Figura 5.5A, [Zeil 2006]). La Figura 5.5B muestra la velocidad instantánea máxima obtenida para las distintas velocidades de estimulación. La respuesta general presenta la típica forma de campana que se obtiene en estudios en los que se barren las velocidades de estimulación [Jung 2011, Barnett 2010, Jones 2010, Dror 2001]. Si tomamos todas las velocidades evaluadas, no se obtiene una correlación lineal significativa entre la respuesta de calcio obtenida en las neuronas transmedulares y la respuesta de escape de los animales ($R^2 = -0.22$, $p = 0.77$, Figura 5.5C). Sin embargo, esta correlación mejora notablemente si excluimos los tratamientos que no desencadenaron una respuesta de escape (frentes a 120 y 240°/s) ($R^2 = 0.85$, $p = 0.05$, Figura 5.5D).

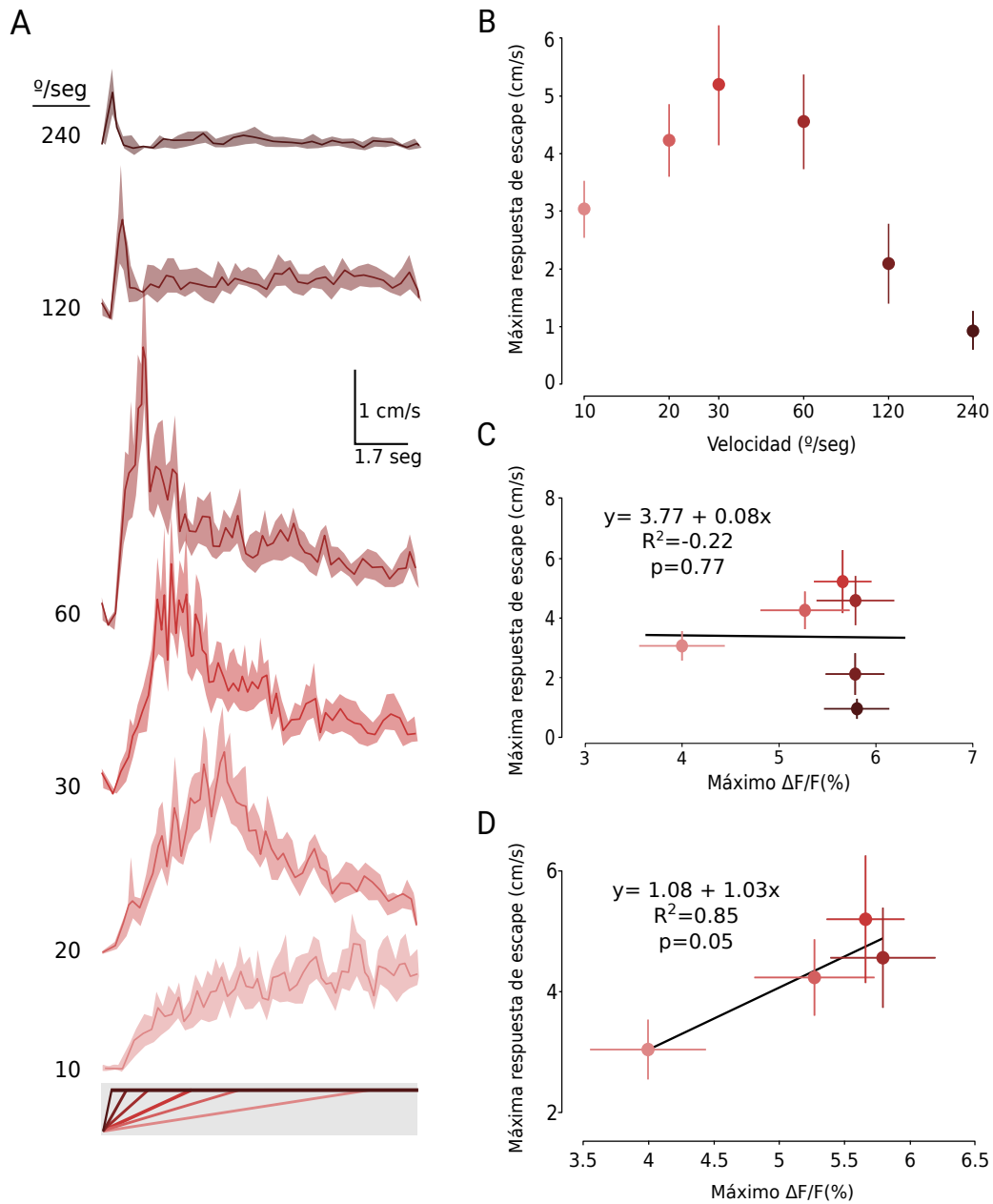


Figura 5.5: Sintonía de la respuesta de escape frente a variaciones en la velocidad. **(A)** Perfil temporal promedio de la velocidad instantánea de la respuesta de escape frente a distintas velocidades del frente negro. El rectángulo gris debajo de los registros temporales muestra la dinámica de desplazamiento de las distintas velocidades (n=17). **(B)** Velocidad instantánea máxima en función de la velocidad (en escala logarítmica). **(C)** Análisis de correlación lineal entre la velocidad instantánea máxima de escape y el máximo del cambio de fluorescencia medido en las neuronas transmedulares. **(D)** Análisis de correlación lineal tomando sólo los estímulos que desencadenan una respuesta de escape. Las líneas en **A** muestran la media $\pm$ error estándar. Los gráficos **B**, **C** y **D** muestran la media $\pm$ error estándar.

5.3.3. Sintonía de la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares y del comportamiento de escape frente a variaciones de contraste

Para investigar cómo afecta el contraste a la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares presentamos seis frentes con intensidades variables barriendo de blanco a negro sobre un fondo de intensidad intermedia (Figura 5.6A, esquemas a la derecha). Dado que en el experimento anterior la mayor respuesta de calcio y la mayor respuesta de escape de los animales la obtuvimos para la velocidad de $30^\circ/\text{s}$, en éste y en los siguientes experimentos usamos esa velocidad. Los perfiles temporales del cambio de fluorescencia de la Figura 5.6A muestran que a medida que los frentes son más oscuros la actividad de calcio aumenta. En cambio, cuando la polaridad del contraste se invierte (frentes claros avanzando sobre un fondo más oscuro) las señales de calcio se mantienen débiles para la gama de estímulos presentados ($n=8$).

Medimos el máximo (Figura 5.6C) y el área (Figura 5.6D) de las respuestas de calcio de las neuronas transmedulares durante la presentación del estímulo. Al no modificarse la velocidad, los perfiles temporales de las respuestas son muy similares entre estímulos modificándose principalmente la respuesta máxima alcanzada (ver *inset*, Figura 5.6A). Para los frentes oscuros las respuestas de calcio aumentan con un contraste creciente y las respuestas a los frentes claros son más débiles (t-Welch (oscuros vs claros), $p<0.001$, Figura 5.6C-D).

Por otra parte, estudiamos si la información visual en relación al contraste del objeto en movimiento se encuentra anatómicamente segregada en los estratos de entrada de la lóbula. Para cada contraste, la respuesta de calcio medida tiene perfiles temporales similares en los tres estratos, alcanza máximos similares y posee áreas similares (Figura 5.6B). La interacción entre los estratos y los contrastes no resultó significativa para el análisis de máximos ni para el área de fluorescencia (modelo lineal mixto, $p=1$, $n=8$ para ambos análisis). La no diferencia en la actividad de los estratos para los distintos tratamientos (interacción estrato-estímulo) se seguirá repitiendo a lo largo de la tesis por lo que, por simplicidad, dejaremos de mostrar la estadística asociada.

La mayor respuesta a estímulos oscuros que a claros también se aprecia cuando se presentan estímulos estáticos de luminosidad. Para comparar de manera limpia las respuestas al ON y al OFF, realizamos un experimento en el cual generamos dos nuevos estímulos que implicaban un único cambio de iluminación. De esta manera, obtuvimos la respuesta únicamente al encendido o apagado del área de estimulación. El perfil temporal del cambio de fluorescencia relativa obtenido frente al apagado (OFF) o encendido (ON) del área de estimulación se muestra en la Figura 5.7A ($n=15$). Las respuestas de calcio para el estímulo OFF son mayores que para el estímulo ON (Figura 5.7B; t-test, ON vs OFF, $p<0.05$). La constante de tiempo de caída de las señales de calcio frente al estímulo OFF resultaron significativamente mayores que al ON ($\tau_{\text{OFF}} = 1.13 \pm 0.14$ seg; $\tau_{\text{ON}} = 0.8 \pm 0.08$ seg; t-test, $p < 0.05$, Figura 5.7A).

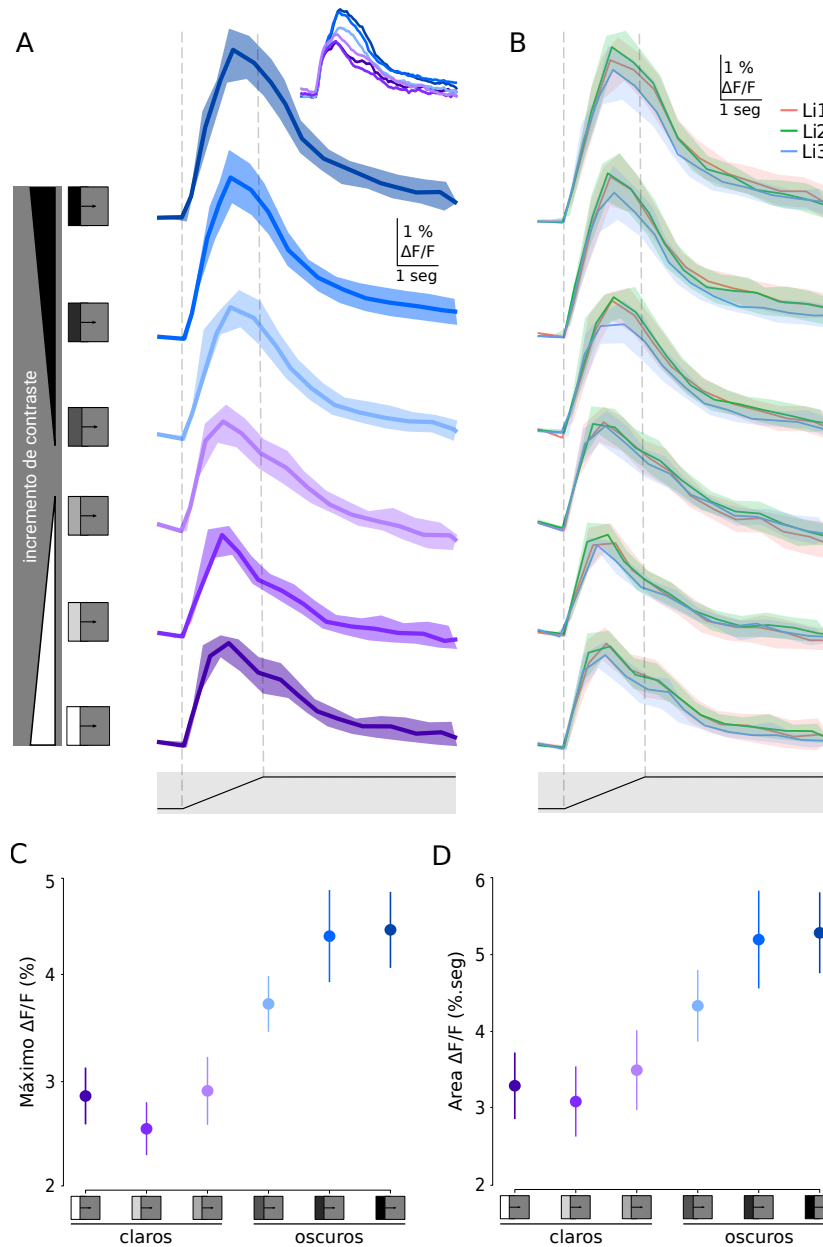


Figura 5.6: Sintonía de la respuesta de calcio de las neuronas transmodulares frente a variaciones de contraste. **(A)** Perfil temporal promedio del cambio de fluorescencia para cada estímulo presentado (n=8). El *inset* muestra los perfiles temporales superpuestos. Esquemas a la izquierda: de arriba hacia abajo las intensidades utilizadas fueron (frente:fondo): 0:128, 42:128, 84:128, 170:128, 212:128, 255:128). El rectángulo gris debajo de los registros temporales muestra la dinámica de desplazamiento del frente a 30°/s. **(B)** Perfil temporal discriminado para cada estrato de entrada de lóbula. **(C)** Máximo del cambio de fluorescencia para cada estímulo de contraste. **(D)** Área del cambio de fluorescencia para cada estímulo de contraste. Los gráficos **A** y **B** muestran la media $\pm$ error estándar.

En otro experimento, comparamos la respuesta al oscurecimiento del área de estimulación por el movimiento del frente negro (30°/s) con la respuesta al escalón OFF (Figura 5.7C). En coincidencia con el rol asignado a la lóbula en la detección de movimiento, las respuestas al frente fueron mayores que para el cambio instantáneo de iluminación (t-Welch (pulso vs movimiento), $p < 0.05$, $n_{\text{(pulso)}} = 7$, $n_{\text{(mov)}} = 9$).

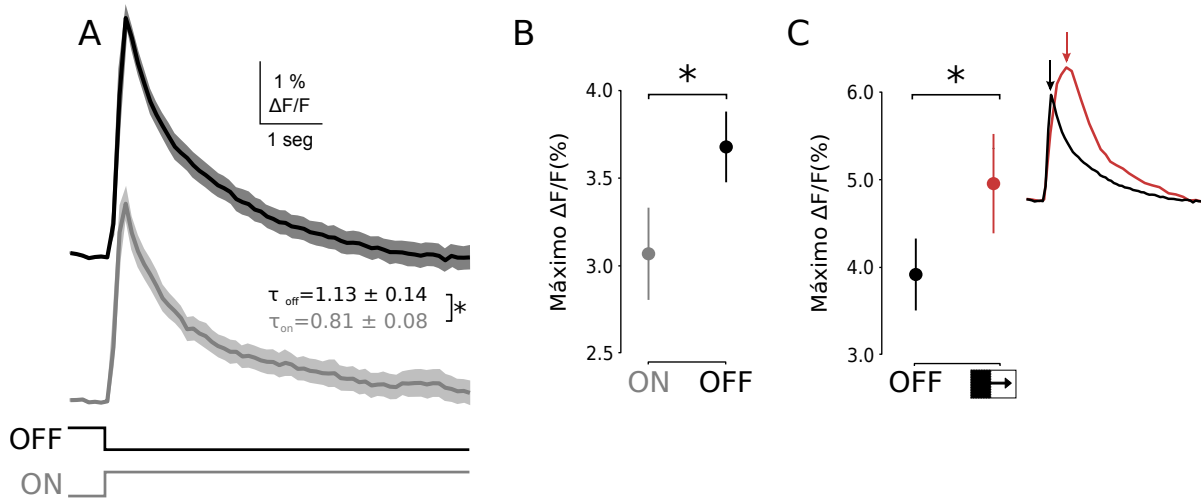


Figura 5.7: Sintonía de la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares frente a estímulos estáticos de iluminación en un área del monitor que comprende un cuadrado de tamaño angular subtendido de $75^\circ \times 75^\circ$ ubicado justo debajo del ojo compuesto del cangrejo. **(A)** Perfil temporal promedio de la señal de calcio obtenida para un escalón OFF (negro) y para un escalón ON (gris). Análisis de decaimiento (tau) del cambio de fluorescencia relativa para cada estímulo. Se ajustaron los datos de los 3 segundos posteriores al escalón a la ecuación $y = Ae^{(-t / \tau)} + y_0$ ($n=15$). **(B)**. Máximo del cambio de fluorescencia promedio obtenido en el momento del cambio de luminosidad. **(C)** Amplitud promedio del máximo del cambio de fluorescencia para un escalón OFF y para un frente que se desplaza de anterior a lateral ($\rightarrow$). El *inset* arriba a la derecha muestra los perfiles temporales de ambos estímulos ($n_{(pulso)}=7$, $n_{(mov)}=9$.) Las líneas en **A** representan la media $\pm$ error estándar y el gráfico **B** muestra la media y el error estándar.

Con el fin de continuar explorando la relación entre la actividad de las neuronas transmedulares y la respuesta de escape, evaluamos el comportamiento de los animales al ser estimulados con los mismos frentes de contrastes. La Figura 5.8A muestra el perfil de velocidad instantánea para cada estímulo presentado ($n=15$). Los frentes claros prácticamente no provocaron respuesta de escape, los frentes oscuros provocaron respuestas que tiene un perfil temporal similar pero aumentan con el contraste de los estímulos. El análisis de velocidad instantánea máxima de escape mostró que para los estímulos claros (RGB: 255, 212 y 170) las velocidades están cerca de los niveles de actividad espontánea (línea punteada en Figura 5.8B) y que la velocidad de la respuesta de escape aumenta a medida que los estímulos se vuelven más oscuros (RGB: 84, 42 y 0) (Figura 5.8B, Wilcoxon-test (oscuros vs claros), $p < 0.001$). Estas respuestas se encuentran altamente correlacionadas con las respuestas de calcio de las neuronas transmedulares ($R^2=0.90$, $p=0.002$, Figura 5.8C).

La presentación de frentes claros no provocó respuestas de escape en los animales a pesar de haber provocado una clara activación de las neuronas transmedulares. El hecho de que las neuronas de entrada a la lóbula respondan efectivamente a frentes claros pero no lleguen a dar lugar a la respuesta de escape de los animales (que se sabe que son guiadas por neuronas de

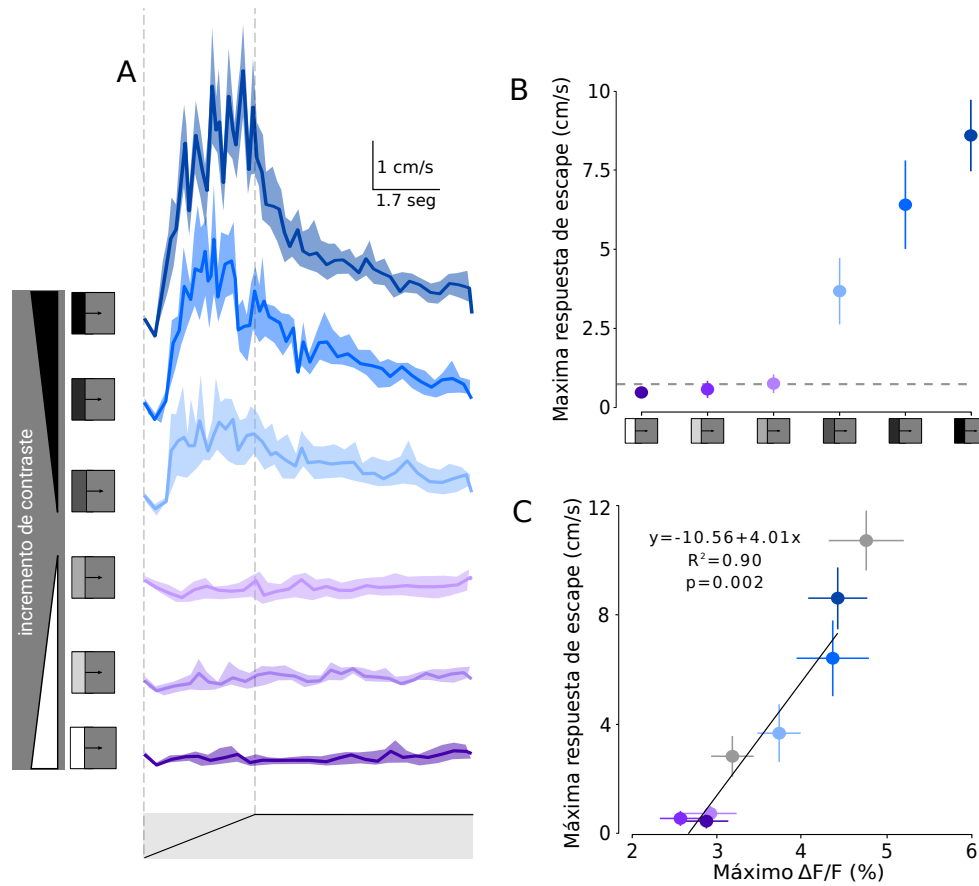


Figura 5.8: Sintonía de la respuesta de escape frente a variaciones de contraste. **(A)** Perfil temporal de la velocidad instantánea obtenida para cada frente de contraste. El rectángulo gris debajo de los registros temporales muestra la dinámica de desplazamiento del frente a 30°/s. **(B)** La máxima velocidad instantánea alcanzada para cada estímulo presentado. La línea punteada indica el nivel de actividad exploratoria espontánea. **(C)** Análisis de correlación lineal entre la máxima respuesta de escape y el máximo de fluorescencia en las neuronas transmedulares. En gris se muestran los valores obtenidos para estímulos de polaridad máxima (frente:fondo=0:255 y 255:0, ver más adelante).

salida de la lóbula) sugiere tres posibles hipótesis: I) las neuronas que codifican información sobre frentes claros no constituyen un *input* para la neuronas que guían la respuesta de escape; II) constituyen un *input* pero es necesario un mínimo nivel de actividad (tipo umbral) de las neuronas transmedulares para evocar la respuesta de escape de los animales o III) frente a la presentación de estímulos claros podrían estar siendo reclutadas un mayor número de neuronas inhibitorias (por lo que la señal de calcio no correlacionaría con la excitación de las LG).

Para comenzar a estudiar estas hipótesis, aplicamos estímulos con el máximo contraste que nos permite nuestro sistema de estimulación de modo de aumentar al máximo posible los niveles de respuesta neuronal y comportamental. Utilizamos un frente negro (RGB:0) con fondo blanco (RGB:255) o frente blanco (RGB:255) con fondo negro (RGB:0; cabe recordar que en el experimento anterior el fondo era siempre RGB: 128, Figura 5.9). En los experimentos de *imaging* las respuestas medidas ($n=8$) resultaron mayores, aunque no estadísticamente distintas de las obtenidas para la misma intensidad de frente pero contra un fondo gris (máximo $\Delta F/F$

negro-gris = $4.41 \pm 0.35 \%$, máximo $\Delta F/F$ negro-blanco = $4.75 \pm 0.44 \%$, t-Welch, $p = 0.51$; máximo $\Delta F/F$ blanco-gris = $2.87 \pm 0.26 \%$, máximo $\Delta F/F$ blanco-negro = $3.18 \pm 0.25 \%$, t-Welch, $p = 0.45$). En los experimentos comportamentales también las respuestas medidas ($n=20$) fueron mayores que las obtenidas para el mismo frente sobre un fondo gris (Máximo Vel. Inst. negro-gris = 8.60 ± 1.13 cm/s, Máximo Vel. Inst. negro-blanco = 10.7 ± 1.10 cm/s, t-Welch, $p = 0.19$; Máximo Vel. Inst. blanco-gris = 0.48 ± 0.16 cm/s, Máximo Vel. Inst. blanco-negro = 2.84 ± 0.75 cm/s, Welch t-test, $p < 0.05$). Por último, como era de esperar en base a las curvas del experimento anterior, el frente negro provocó más respuesta que el “blanco” en los experimentos de *imaging* (t-Welch (negro vs blanco), $p < 0.05$, Figura 5.9A), y en los experimentos comportamentales (t-Welch (negro vs blanco), $p < 0.001$, Figura 5.9B).

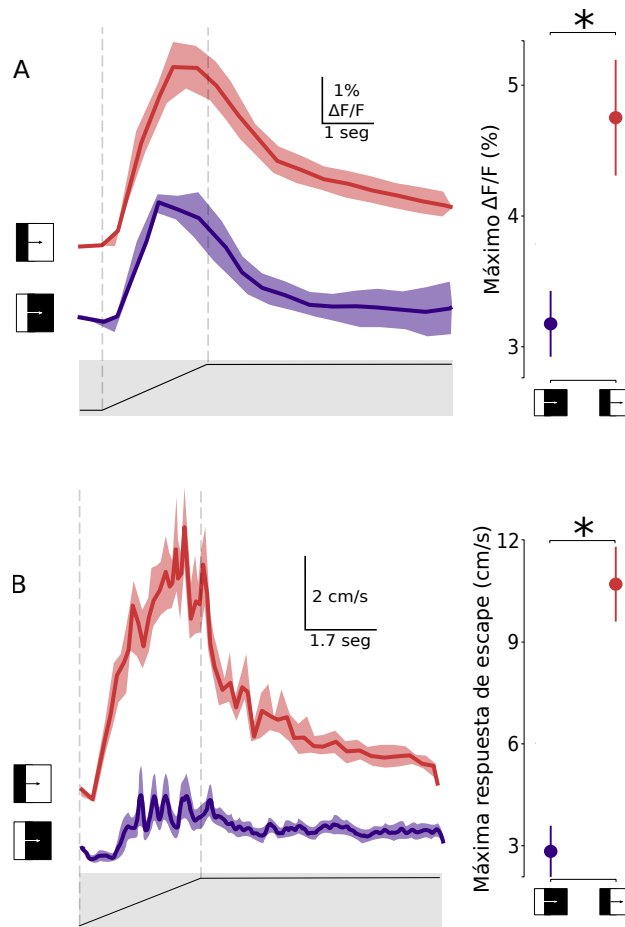


Figura 5.9: Respuesta de calcio de las neuronas transmedulares y de la respuesta de escape de los animales frente a estímulos de máximo contraste. **(A)** Izquierda: perfil temporal promedio del cambio de fluorescencia para cada estímulo presentado (figura:fondo= 0:255 y 255:0). Derecha: máximo del cambio de fluorescencia obtenido para cada estímulo ($n=8$). **(B)** Izquierda: perfil temporal de la velocidad instantánea obtenida para cada frente de contraste presentado. Derecha: máxima velocidad instantánea alcanzada para cada estímulo presentado ($n=20$). El rectángulo gris debajo de los registros temporales muestra la dinámica de desplazamiento del frente a $30^\circ/\text{s}$.

Si bien ahora los animales escapan al frente blanco, lo que apoya la hipótesis II), el aumento de la señal de calcio obtenida no difiere significativamente cuando el mismo frente se

desplaza sobre un fondo gris o un fondo negro. Dado el error experimental que se tiene en las mediciones de *imaging* y a juzgar por la correlación de la Figura 5.8C, difícilmente una pequeña modificación de la fluorescencia, la que sería necesaria para comenzar a producir una respuesta de escape, se diferencie significativamente de las que ya mostraron no desencadenarla (comparar señales obtenidas para los frentes claros en Figura 5.6C y Figura 5.9A). De cualquier modo, si se superponen los datos de éste experimento con la curva de correlación de la Figura 5.8C, puede apreciarse que los resultados son consistentes con la hipótesis II.

Para evaluar si la respuesta comportamental depende de superar un mínimo de actividad neuronal (umbral), realizamos un nuevo experimento en donde estudiamos la respuesta al frente claro sobre un sistema que fue previamente activado mediante la presentación de un frente negro. Para ello, los estímulos visuales se realizaron presentando dos frentes consecutivos de polaridad opuesta que se trasladaban horizontalmente a 30°/s (una transición de blanco a negro y la siguiente de negro a blanco) de manera secuencial separados por intervalos de tiempo crecientes (Figura 5.10A).

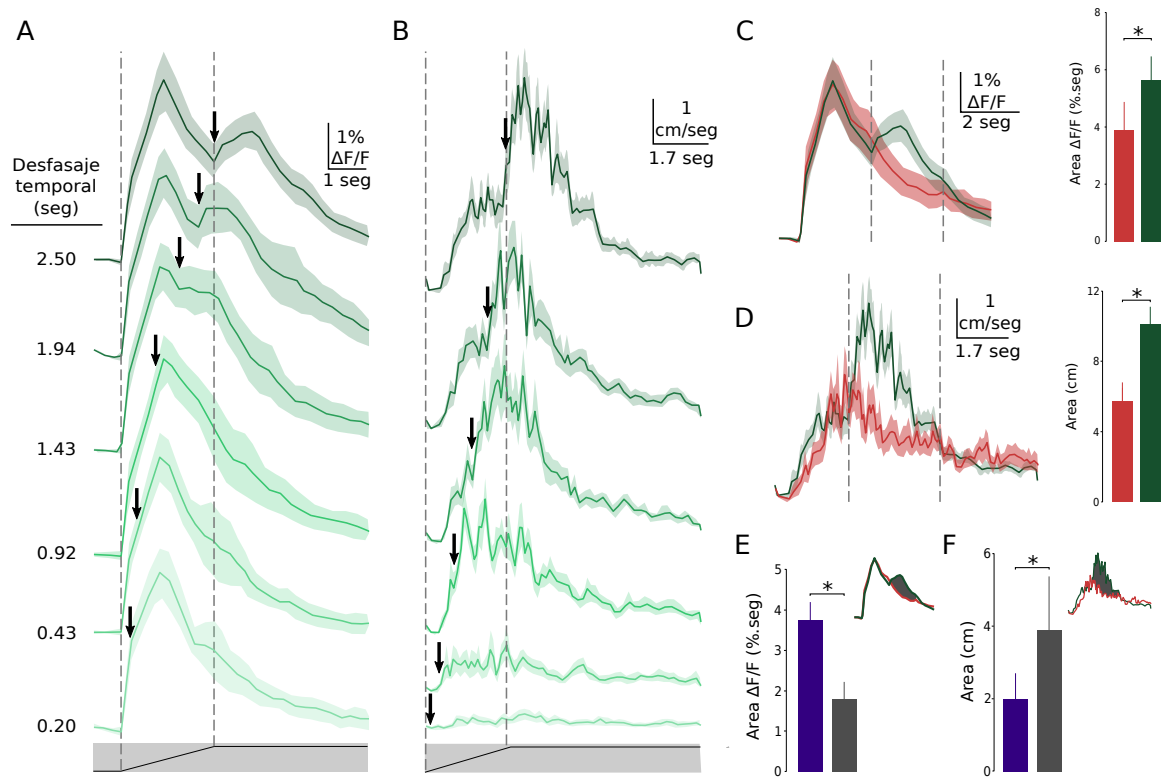


Figura 5.10: Los frentes consecutivos de la polaridad opuesta con una ventana temporal específica revelan el comportamiento de escape en el animal para el frente blanco. (A) El perfil temporal promedio de las señales de calcio para un frente negro que se desplaza sobre un fondo blanco seguido por un frente blanco presentado en distintos momentos ($n=7$). (B) Velocidad instantánea promedio obtenida para cada estímulo ($n=33$). Las líneas punteadas en la parte inferior indican el inicio y fin del movimiento del frente negro y las flechas indican el inicio del frente blanco a diferentes tiempos. Las líneas indican la media $\pm$ error estándar. (C y D) Izquierda: el perfil temporal de la señal de calcio (C) y de la respuesta de escape (D) obtenida para un frente negro (trazo rojo) superpuesto con el mismo estímulo seguido por un frente blanco (trazo verde). Continúa en la página siguiente $\rightarrow$

Las líneas punteadas delimitan el momento en el cual se desplaza el frente blanco. Derecha: Cuantificación del área bajo la curva en la ventana de tiempo delimitada por las líneas punteadas. **(E)** Respuesta de calcio acumulada únicamente al frente blanco en el experimento de máxima polaridad de contraste (Figura 5.9) y la respuesta de calcio obtenida para el frente blanco del presente experimento (*inset*, área sombreada). La amplitud de las respuestas de calcio obtenidas fueron mayores para el caso de la presentación del frente blanco únicamente (t-Welch, $p < 0.05$). **(F)** Se observó lo contrario al medir la amplitud de las respuestas de escape correspondiente al desfase más grande en relación con la presentación de sólo el frente blanco (Wilcoxon test, $p < 0.001$).

Todos los estímulos evocaron señales de calcio en las neuronas transmedulares. La Figura 5.10A ilustra el perfil temporal promedio de la señal de calcio obtenida para las secuencias presentadas ($n=7$). Los estímulos menores a 0.92 segundos de desfase provocaron un aumento de las señales de calcio en cuyo perfil temporal se observa un solo pico que superpone la respuesta a ambos frentes, mientras que las respuestas de calcio obtenidas para desfases mayores a 0.92 segundos muestran dos picos correspondientes a la respuesta desencadenada por cada frente de contraste. En la respuesta comportamental se puede distinguir la respuesta al segundo frente (frente blanco) para desfases mayores a 1.43 y es muy clara para el estímulo con mayor desfase (Figura 5.10B).

El mayor desfase presentado entre frentes es de 2.5 segundos, siendo éste el tiempo que tarda el frente negro en llegar al final del área de estimulación. Las Figura 5.10C y D superponen las respuestas a este estímulo con la obtenida cuando se presentó un único frente negro para el caso de *imaging* (Figura 5.9A) y comportamiento (Figura 5.9B) respectivamente. Dado que durante los primeros 2.5 segundos de estimulación los estímulos son idénticos, el perfil temporal de respuesta obtenido para cada uno resultan prácticamente idénticos. Si comparamos las respuestas únicamente durante la presentación del frente blanco, tiempo delimitado por las líneas punteadas en Figura 5.10C y D, observamos que la amplitud de la señal de calcio obtenida para el estímulo con desfase resultó significativamente mayor que la amplitud obtenida para el frente negro (Figura 5.10C, t-test (desfase vs no desfase), $p < 0.05$). Al realizar el mismo análisis con los perfiles temporales de la velocidad instantánea de escape, también observamos una diferencia significativa en las respuestas desencadenadas por ambos estímulos (Figura 5.10D, t-test, $p < 0.05$). Estos resultados sugieren que el aumento de la respuesta de escape se debería al aumento de la actividad de las neuronas transmedulares dada la aparición del frente claro.

Finalmente, podríamos estimar las respuestas al frente blanco de este experimento restando el área bajo la curva de ambos perfiles temporales desde que aparece hasta que desaparece el frente blanco de la pantalla (delimitado por las líneas punteadas en Figura 5.10C y D). Si ahora comparamos esta estimación con la respuesta obtenida para el frente blanco del experimento anterior (Figura 5.9) observamos que en éste último experimento, una aparente menor respuesta de calcio se corresponde con una mayor respuesta de escape (Figura 5.10E y F).

Si bien es posible que la estimación de la respuesta de calcio para este último experimento arrastre distintos tipos de errores, lo que parece bastante claro es que un frente blanco precedido

del frente negro aumenta la respuesta comportamental a los niveles desencadenados por el primer frente negro (primer trazo en la Figura 5.10B) mientras que cuando el frente blanco no estuvo precedido del frente negro el aumento observado en la velocidad resulta mucho menor (Figura 5.9B; Figura 5.10D). Nuevamente, éste resultado es consistente con la hipótesis II.

5.4. Conclusiones

En este capítulo registramos por primera vez la actividad poblacional de neuronas transmedulares en un artrópodo. La configuración experimental para medir respuestas de calcio por imágenes de fluorescencia arrojó resultados sobre las neuronas LG equivalentes a los obtenidos electrofisiológicamente (Subsubsección 5.3.1.1). Por otra parte, la activación secuencial de las neuronas columnares que proyectan de la médula a lóbula (Subsubsección 5.3.1.2) indica que I) somos capaces de aplicar estímulos visuales controlados y registrar al mismo tiempo la respuesta de calcio evocada en las columnas visuales que mapean el sitio de estimulación elegido y II) constituye la primera demostración fisiológica del particular mapa retinotópico de los ganglios ópticos de cangrejos, el que se había obtenido con técnicas morfológicas [Beron de Astrada 2011].

Los resultados de la sección Subsección 5.3.2 indican que las neuronas transmedulares responden diferencialmente a frentes que se mueven con distintas velocidades angulares y, salvo que estos sean muy rápidos, su actividad correlaciona con la intensidad de la respuesta de escape evocada por dichos estímulos. Por otra parte, las respuestas de las neuronas transmedulares mostraron una mayor sensibilidad a estímulos de movimiento que a estímulos estacionarios de oscurecimiento; y a frentes oscuros moviéndose sobre un fondo gris que a los de polaridad opuesta. En el mismo sentido, se había visto que la tasa de disparo de potenciales de acción de las neuronas LG es mayor a escalones de iluminación OFF que ON [Medan 2007] y responden más a objetos con trayectorias de aproximación cuando estos son oscuros que cuando son claros [Oliva 2010]. Consistentemente, si bien los pulsos de luz no provocan respuestas comportamentales, encontramos que la respuesta de calcio de las neuronas transmedulares está altamente correlacionada con la respuesta de escape de los animales al variar el contraste de los frentes de movimiento (Subsección 5.3.3).

Por último, en este capítulo encontramos una alta correlación entre la actividad de los estratos de entrada a la lóbula y el comportamiento de escape de los animales. Según lo propuesto para artrópodos, la decisión de ejecutar una respuesta rápida comportamental resultaría de integrar la actividad de las neuronas columnares de la lóbula en neuronas colectoras de salida [Fotowat 2011a, Hennig 2012, Nordström 2012, O'Carroll 1993]. A juzgar por los resultados de este capítulo, esta integración implicaría a un filtro pasabajos de las señales columnares rápidas (ver Subsección 5.3.2, velocidades rápidas) y a un umbral de intensidad de respuesta que se debe superar para que se refleje la actividad de las neuronas transmedulares en la respuesta comportamental (Figura 5.9 y Figura 5.10). Una posibilidad es que dicho umbral quede definido por un reclutamiento inhibitorio basal (y fijo) que se evidencia en la respuesta obtenida

frente a estímulos de baja saliencia. De esta manera, sólo los estímulos visuales que generen respuestas excitatorias que superen esta inhibición desencadenarán respuestas comportamentales de escape.

En insectos, la presentación de estímulos visuales de tipo ON u OFF puede dar lugar a respuestas confinadas a estratos específicos en la médula [Maisak 2013, Strother 2014]. En los experimentos de este capítulo no vimos una segregación de la información de contraste, ni de velocidad de movimiento, en los estratos de entrada a la lóbula en los que sí observamos robustas respuestas de calcio (Li1, Li2 y Li3; nunca observamos respuestas en Li4). Nuestros estudios morfológicos (Capítulo 4) muestran que hay una gran diversidad de neuronas transmedulares proyectando de la médula a la lóbula. La diversidad de neuronas columnares en artrópodos se cree asociada a que distintos atributos visuales se codificarían en distintos canales neuronales. Cabe señalar que por la metodología utilizada, estas diferencias no la buscamos en los valores del cambio de fluorescencia para cada estrato (factor estrato) ya que estos valores pueden estar sesgados y ser susceptible de distintas fuentes de variabilidad en distintas preparaciones. Esto puede deberse a que en distintos preparados puede diferir parcialmente la cantidad y tipo de neuronas que se marcan; algunas de las cuales, además, pueden no ser estimuladas por quedar su campo receptivo fuera del área de estimulación aportando, de todos modos, a la fluorescencia basal; y, en el mismo sentido, distintas preparaciones quedan con leves diferencias en su alineación lo que puede afectar el grado de superposición en z de los estratos teñidos. En donde sí esperaríamos encontrar diferencias fisiológicamente relevantes es en la interacción entre el factor estímulo y el factor estrato. Sin embargo, la ausencia de interacción sugiere que la actividad en los estratos covaría para los atributos visuales estudiados.

6 Plasticidad neuronal asociada al comportamiento de escape de *Neohelice granulata*

6.1. Introducción

Como mencionamos anteriormente, en insectos y crustáceos, también se había observado una correlación entre la actividad de neuronas de salida de la lóbula y el comportamiento frente a la presentación repetida de estímulos visuales de movimiento [Gray 2005, Olberg 1981]. Tanto en las neuronas STMD (libélulas y moscas polinizadoras), en las LGMD (langostas), como en las neuronas LG (cangrejos) se observó una reducción de su respuesta a la presentación repetitiva de estímulos (por ejemplo, [Gray 2005, Olberg 1981]). Sin embargo, no se había podido determinar el sitio de plasticidad neuronal que da cuenta de la reducción en la respuesta de las neuronas de salida de la lóbula (ver [Rowell 1976]). El principal objetivo de este capítulo es localizar el sitio de plasticidad que da cuenta de la reducción en la respuesta de las neuronas tangenciales de la lóbula en el cangrejo *Neohelice*. A continuación introduciré algunos antecedentes relevantes a los resultados de este capítulo.

6.1.1. Propiedades electrofisiológicas de las LG durante el entrenamiento

En *Neohelice* la presentación de un VDS causa una intensa respuesta de escape que decae rápidamente como consecuencia de una alta frecuencia de repetición del estímulo que muestra ser inocuo [Maldonado 2002]. El efecto de este entrenamiento masivo (intervalo entre ensayos de estimulación 2 segundos) es de corta duración ya que la respuesta se recupera casi completamente luego de 15 minutos en ausencia de estimulación [Pedreira 1998]. A nivel de las neuronas LG se observó que su tasa de disparo de potenciales de acción refleja estrechamente el perfil de respuesta comportamental (Figura 1.14, [Beron de Astrada 2013]).

Se ha reportado que muchos cambios comportamentales inducidos por el entrenamiento están relacionados, al menos en parte, con cambios en las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas involucradas en dichos comportamientos [Zhang 2003]. En el laboratorio se observó que la drástica reducción de la respuesta de las neuronas LG a la presentación repe-

tida del VDS no parece ser causada por un cambio en la excitabilidad neuronal (Figura 6.1A).

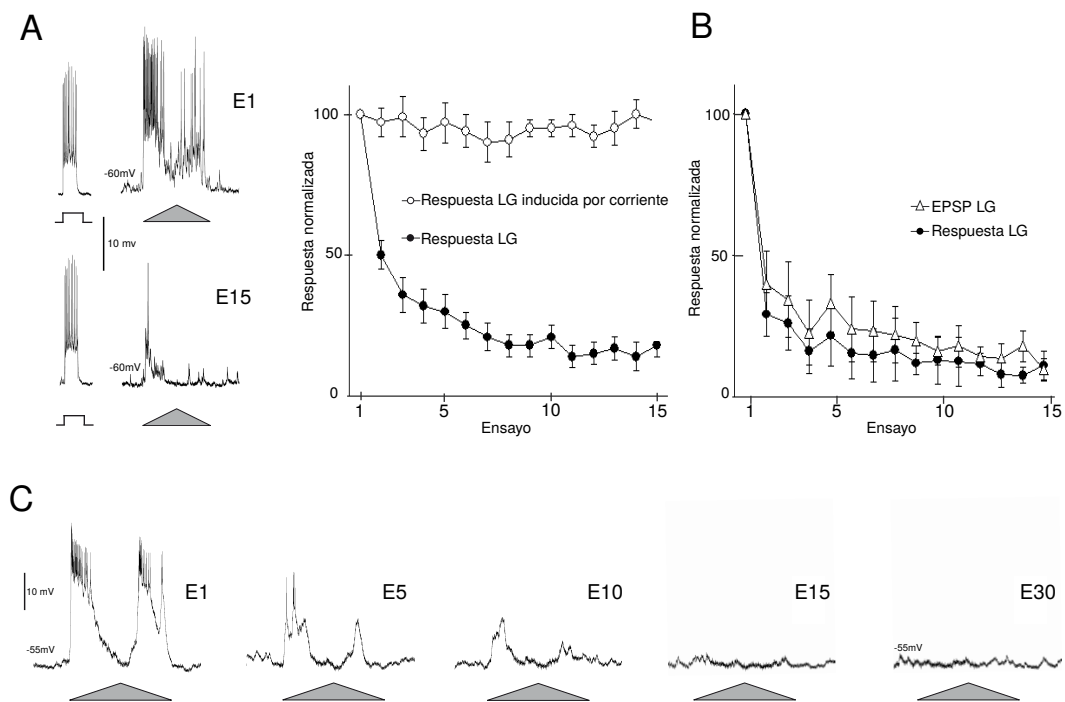


Figura 6.1: Propiedades electrofisiológicas de las LG frente a un entrenamiento masivo. **(A)** Un pulso de corriente depolarizante de 500 milisegundos de duración fue inyectado en las neuronas LG 1.5 segundos antes de cada ensayo de entrenamiento. Los registros electrofisiológicos muestran la respuesta de una neurona LG a un pulso de corriente (izquierda) y a un VDS (derecha) para los ensayos 1 y 15. **(B)** Relación entre el área del potencial post-sináptico excitatorio (EPSP) y el número de potenciales de acción evocados por el VDS. **(C)** Respuesta de una neurona LG a un entrenamiento con 30 ensayos.

La reducción en el número de potenciales de acción evocados por el VDS coinciden con un decaimiento de los potenciales excitatorios postsinápticos medidos en las neuronas LG (EPSP, Figura 6.1B). Esto ocurre aún cuando las neuronas LG ya han dejado de disparar potenciales de acción (Figura 6.1C, comparar los EPSP entre E10 y E30) lo que sugiere que el decaimiento de la señal no es consecuencia del *output* de la célula (por ejemplo, por inhibición recurrente). Por otra parte, en los registros nunca se observó que durante el entrenamiento el potencial de membrana de las neuronas LG se hiperpolarizara por debajo de su potencial original (Figura 6.1C), o que la frecuencia de disparo de potenciales espontáneos se alterara durante los últimos ensayos del entrenamiento visual (no mostrado). En conjunto, estas evidencias sugieren que la modificación observada en la tasa de disparo de las neuronas LG podría deberse a cambios plásticos en sitios dentrícticos distantes del electrodo de registro, a nivel de sus sinapsis de entrada o en neuronas presinápticas. El mismo escenario se encontró en las neuronas LGMD de langostas [Rowell 1976].

6.1.2. Estudios de generalización en las LG

Esta reducción de la respuesta de las neuronas de salida de la lóbula de libélulas, langostas y cangrejos se circunscribe al campo visual entrenado. Si durante el entrenamiento se estimula un nuevo área del campo visual las respuestas de las neuronas se recuperan. En nuestro laboratorio se había estudiado este fenómeno en relación a la capacidad de generalización de la respuesta aprendida [Sztarker 2006]. Para ello, se habían usado dos estímulos VDS. El protocolo consistió en un entrenamiento masivo de 14 presentaciones con un VDS (VDS 1, Figura 6.2A). La evaluación consistió en la presentación inmediata de 1 ensayo con el VDS no entrenado (VDS 2). Los registros electrofisiológicos mostraron que la reducción de los potenciales de acción evocados en las neuronas LG por entrenamiento en un campo visual (CV1) no afectó la respuesta a un estímulo presentado en un campo visual diferente (CV2, Figura 6.2B). Utilizando este protocolo de entrenamiento se obtuvieron resultados equivalentes para la respuesta de escape del animal [Sztarker 2006].

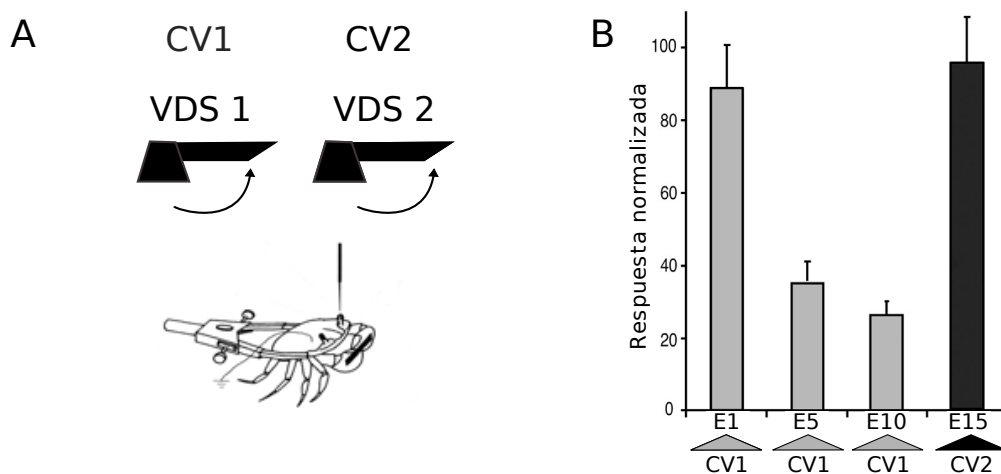


Figura 6.2: La reducción de la respuesta causada por la repetición de VDS es retinotópicamente específica. **(A)** Se presentaron 14 ensayos con un VDS localizado en una parte del campo visual del cangrejo (CV1) y el siguiente ensayo idéntico situado en un campo visual vecino (CV2). La distancia angular entre ambos campos visuales estimulados fue de 10° . **(B)** El gráfico muestra la cuantificación de la respuesta electrofisiológica obtenida a partir de registros intracelulares de las neuronas LG.

Este resultado sugiere que la plasticidad quedaría espacialmente acotada (en términos de columnas visuales) pero no permite precisar si esta ocurre en dominios dendríticos acotados de las LG, a nivel de sus sinapsis de entrada o a nivel de sus neuronas presinápticas.

6.2. Materiales y métodos

Para los distintos experimentos realizados en este capítulo, el colorante sensible a calcio fue colocado en un área específica del ganglio de interés. Para el caso de las tinciones de las neuronas transmedulares aplicamos el colorante en la médula (Figura 6.3A) y registramos la actividad de sus terminales en la lóbula. Para estudiar las proyecciones de las neuronas monopolares aplicamos el colorante en la lámina (Figura 6.5A) y registramos la actividad de sus terminales en la médula.

En esta tesis, el VDS fue generado digitalmente manteniendo las características ópticas del VDS físico original (ver Sección 3.3 [Maldonado 2002]). Al igual que en los experimentos electrofisiológicos realizados anteriormente en el laboratorio [Beron de Astrada 2002, Tomsic 2003], el ciclo de movimiento del VDS (un rectángulo de $30^\circ \times 10^\circ$) fue completado en 2.2 segundos.

Para evaluar si la adaptación de las neuronas columnares era específica del campo visual entrenado, realizamos un entrenamiento masivo de 14 ensayos centrados en un punto del campo visual del animal y presentamos un ensayo de evaluación en un área visual vecina. La separación angular promedio entre ambos VDS fue de 10° .

La actividad de las neuronas transmedulares fue medida como en el Capítulo 5. Para la medición de la actividad de las neuronas monopolares, frente a la imposibilidad de distinguir estratos, usamos un único ROI que abarcó los estratos donde arborizan las neuronas monopolares en la médula.

El análisis cuantitativo de los datos consistió en la medición de los máximos del cambio de fluorescencia relativa para cada ROI durante la estimulación visual. Para el análisis de los datos, normalizamos la señal de calcio obtenida para cada ensayo a la actividad registrada al primer ensayo del entrenamiento.

6.3. Resultados

6.3.1. Respuestas de calcio en los estratos de entrada a la lóbula frente a un entrenamiento masivo

Para estudiar la respuesta de las neuronas transmedulares frente a un entrenamiento masivo, colocamos el colorante sensible a calcio en la médula y registramos su actividad en las terminales que se encuentran en la lóbula. La Figura 6.3A muestra la imagen de fluorescencia basal de la lóbula del preparado cuya respuesta se ilustra de C_I a C_{IV} y se cuantifica de D_I a D_{IV} . La Figura 6.3B muestra el curso temporal del cambio de fluorescencia relativa a un pulso OFF. Todas las preparaciones mostraron respuestas fásicas de calcio al encendido y al apagado de un pulso de luz. Estos resultados, son consistentes con las respuestas electrofisiológicas obtenidas de las neuronas columnares que proyectan de la médula al a lóbula (ver Figura 6.6 al final de

este capítulo) y con la respuesta obtenida para neuronas LG (ver Figura 1.12). La Figura 6.3C_I muestra la señal de calcio obtenida en el marco correspondiente a la respuesta máxima frente a la primer presentación del VDS y la Figura 6.3D_I muestra el curso temporal del cambio de fluorescencia relativa en cada estrato de entrada de la lóbula. La presentación repetitiva del VDS provocó una rápida y profunda caída de la respuesta de calcio en los tres estratos (Figura 6.3C_I-C_{IV}, Figura 6.3D_I-D_{IV} y Figura 6.3E), siendo el porcentaje de respuesta inicial en el ensayo 15 el siguiente: Li1, $10.1 \pm 3.9\%$; Li2, $9.2 \pm 3.7\%$; Li3, $8 \pm 2.3\%$ (t-test (1 vs E15), $p < 0.001$, $n=6$). Según lo esperado por la respuesta de las neuronas LG y el comportamiento, la respuesta de los elementos columnares se recuperaron casi completamente luego de 15 minutos sin estimulación (Figura 6.3C_v, Figura 6.3D_v y Figura 6.3E). El porcentaje de respuesta inicial en el ensayo de evaluación fue el siguiente: Li1, $94.7 \pm 5.7\%$; Li2, $91.9 \pm 5.5\%$; Li3, $95.4 \pm 5.6\%$ ($n = 6$).

Realizamos el mismo experimento control que en la Subsubsección 5.3.1.1 para confirmar que la reducción medida en la respuesta de calcio era debida a la presentación repetida del VDS y no a algún efecto indeseado de las condiciones de registro óptico. Presentamos solamente dos ensayos VDS separados por el tiempo correspondiente al ensayo 1 y al ensayo 15 del entrenamiento original (intervalo entre los dos ensayos = 124 segundos).

La respuesta de calcio al primer y al segundo ensayo con el VDS fueron muy similares (Figura 6.3F), siendo el porcentaje de la respuesta inicial en el ensayo 2: Li1, $89.1 \pm 4.6\%$; Li2, $89.3 \pm 4.9\%$; Li3, $86.9 \pm 5.4\%$ ($n=6$). Este resultado confirma que la fuerte reducción en la respuesta de calcio de las neuronas columnares aferentes de la lóbula es consecuencia de la presentación repetitiva del estímulo de peligro y no del protocolo de registro utilizado.

6.3.2. La reducción de la respuesta de calcio es específica del área entrenada de la retina

Los resultados obtenidos en la sección anterior sugieren que la modificación observada en la respuesta de las neuronas LG por un entrenamiento masivo podría explicarse por los cambios ocurridos en sus neuronas presinápticas. Teniendo en cuenta este resultado, cabe esperar que la recuperación de las neuronas LG al estimular un campo visual no entrenado (Subsección 6.1.2) se deba a la respuesta de los elementos columnares vecinos que no fueron entrenados y cuya actividad no habría sido afectada por el entrenamiento.

Para evaluar esta hipótesis, presentamos en el monitor de estimulación 14 ensayos con el VDS (E1-E14) en un área del campo visual (CV1) y el ensayo número 15 (E15) en un área vecina no entrenada (CV2) y registramos las señales de calcio asociadas en las terminales de las neuronas transmedulares (Figura 6.4A). Desde el comienzo del entrenamiento, mostramos en la pantalla los dos estímulos VDS. Previo a realizar el entrenamiento, presentamos un único ensayo VDS en cada una de las áreas a estimular (CV1 y CV2, la respuesta a este estímulo la denominaremos línea de base) para asegurarnos que las neuronas transmedulares teñidas

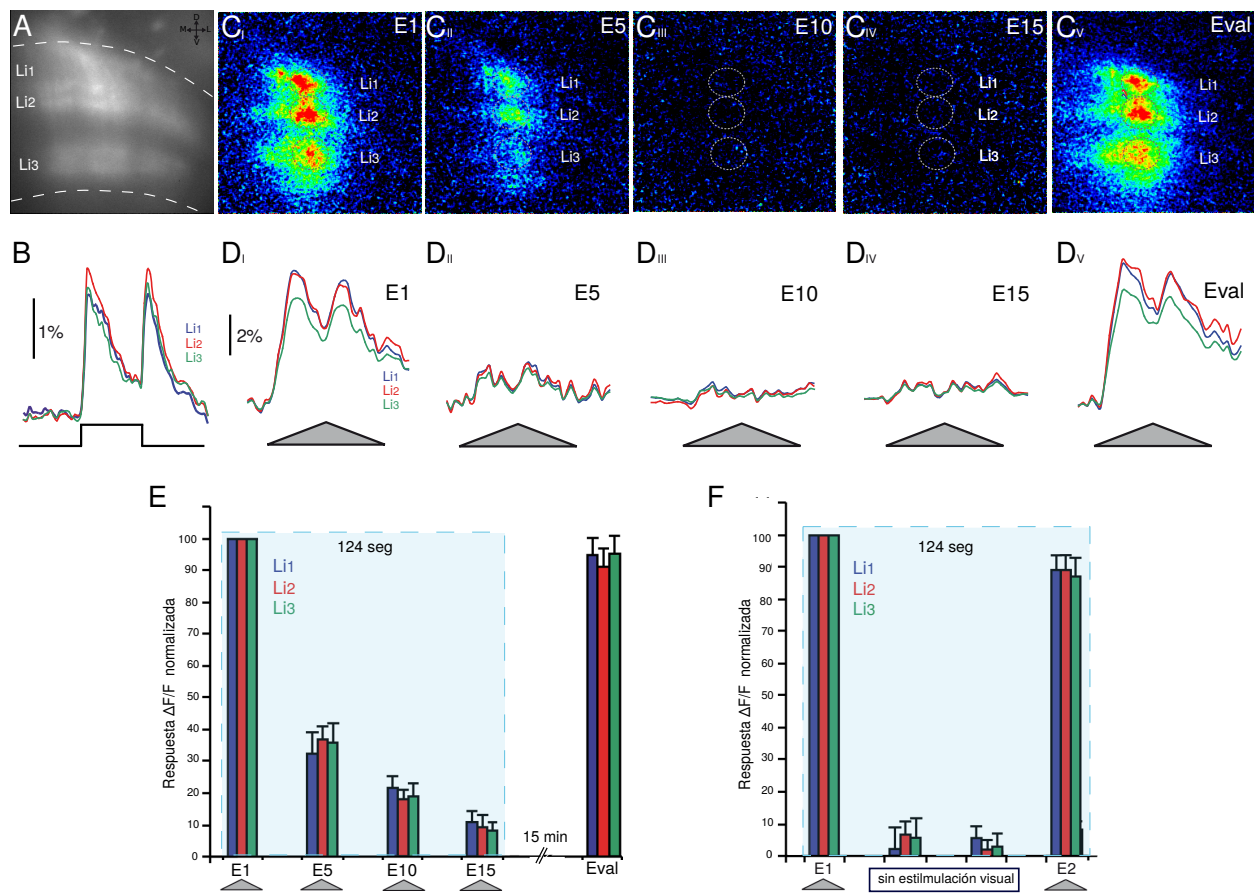


Figura 6.3: La respuesta de calcio de las neuronas columnares aferentes de la lóbula decae con la presentación repetitiva del estímulo VDS. **(A)** Imagen que muestra parte de la lóbula obtenida con el microscopio de fluorescencia. **(B)** Cambio de fluorescencia relativa media de una preparación particular de las regiones de la lóbula Li1, Li2 y Li3 en respuesta a un pulso OFF **(C y D)** En la figura **(Ci)** se muestra una respuesta de calcio en código de falso color a una estimulación con el VDS. En **(Di)** se muestra el curso temporal del cambio de fluorescencia en respuesta al VDS en los estratos Li1, Li2 y Li3. Los entrenamientos masivos con el VDS produjeron, en los tres estratos de entrada, una rápida y profunda reducción en la respuesta de calcio **(Ci–Civ y Di–Div)**. La respuesta de calcio a un ensayo de evaluación realizado 15 minutos después del entrenamiento se muestra en la Figura **Cv y Dv**. Los círculos punteados en **(Ci)–(Cv)** ejemplifican las regiones de interés seleccionadas para analizar la respuesta de calcio al estímulo visual. **(E)** Datos promedio normalizados del entrenamiento masivo con el VDS ($n=6$). **(F)** Respuesta de calcio en un grupo independiente de animales registrados con el mismo protocolo de registro óptico que en **(E)** pero conteniendo únicamente dos ensayos VDS separados por el mismo tiempo que separa a los ensayos 1 y 15 ($n=6$). Los gráficos muestran las medias $\pm$ error estándar.

censan las áreas a estimular. Las respuestas obtenidas durante el entrenamiento fueron normalizadas a esta respuesta previa. Dado que las respuestas obtenidas en los tres estratos no mostraron diferencias (Figura 6.3), aquí presentamos el promedio de esas respuestas. Al presentar un nuevo estímulo en un área visual vecina del campo entrenado, encontramos que la actividad de los elementos columnares vecinos no se ve afectada por el entrenamiento (Figura 6.4B). El porcentaje de la respuesta respecto de la línea de base para el ensayo 15 fue de $94.6 \pm 4.5\%$

(t-test (línea de base en CV2 vs E15), $p = 0.29$, $n = 6$, Figura 6.4B).

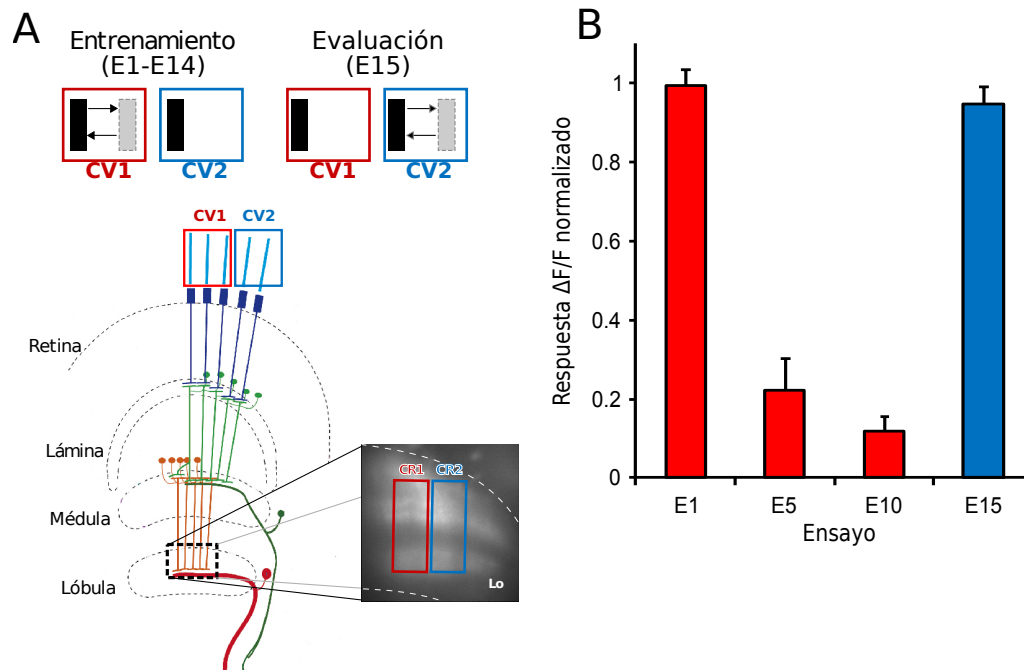


Figura 6.4: El entrenamiento visual en una región particular del campo visual solo produce adaptación de las neuronas columnares que censan el área entrenada. **(A)** Esquema que ilustra el protocolo de presentación de los estímulos utilizados. Durante el entrenamiento, uno solo de ellos (ilustrado en rojo) va a desplazarse entrenando un área del campo visual particular (CV1). En el ensayo de evaluación (E15), el otro VDS (ilustrado en azul) va a desplazarse estimulando un nuevo set de neuronas columnares que censan otro área del campo visual (CV2). **(B)** Cuantificación de la señal de calcio obtenida de las neuronas columnares aferentes de la lóbula registradas como en la Figura 6.3 ($n=6$). El gráfico muestra la media $\pm$ error estándar.

6.3.3. Registros electrofisiológicos y ópticos de las neuronas columnares aferentes a la médula

La reducción de la respuesta registrada en las neuronas aferentes a la lóbula (Subsección 6.3.1) puede, a su vez, ser consecuencia de cambios plásticos que tienen lugar en ellas misma o en sus elementos presinápticos. La información visual fluye retinotópicamente hacia la médula directamente desde la retina a través del receptor R8 y desde la lámina principalmente a través de las células monopares (ver Figura 4.2 y Figura 4.3). Todas las neuronas monopares hasta ahora descritas en decápodos tienen dendritas en la lámina y sus axones se extienden a varias profundidades de la médula (ver Figura 6.5A-F, Subsubsección 1.4.2.1, Subsección 4.3.1, [Sztarker 2009]). En *crayfish* se han registrado y caracterizado células monopares provenientes de una única columna visual (M1-M4) [Wang-Bennett 1987]. Estos estudios mostraron que las neuronas monopares M1-M4 no disparan potenciales de acción canónicos,

exhiben una respuesta hiperpolarizante al encendido de una luz y frecuentemente presentan respuestas depolarizantes al apagado. En el laboratorio, se pudo registrar repetidamente la actividad de estas neuronas monopolares de *Neohelice*. La Figura 6.5G muestra el registro electrofisiológico de una neurona monopolar del cangrejo frente a un pulso de luz y la Figura 6.5H muestra la respuesta de la misma célula a un entrenamiento masivo con el VDS. En ninguna de las neuronas monopolares registradas se encontró una reducción en su respuesta frente a un entrenamiento masivo (porcentaje de la respuesta inicial obtenido en el E15= $103 \pm 6.1\%$, t-test, $p = 0.62$, $n = 11$, [Beron de Astrada 2013]).

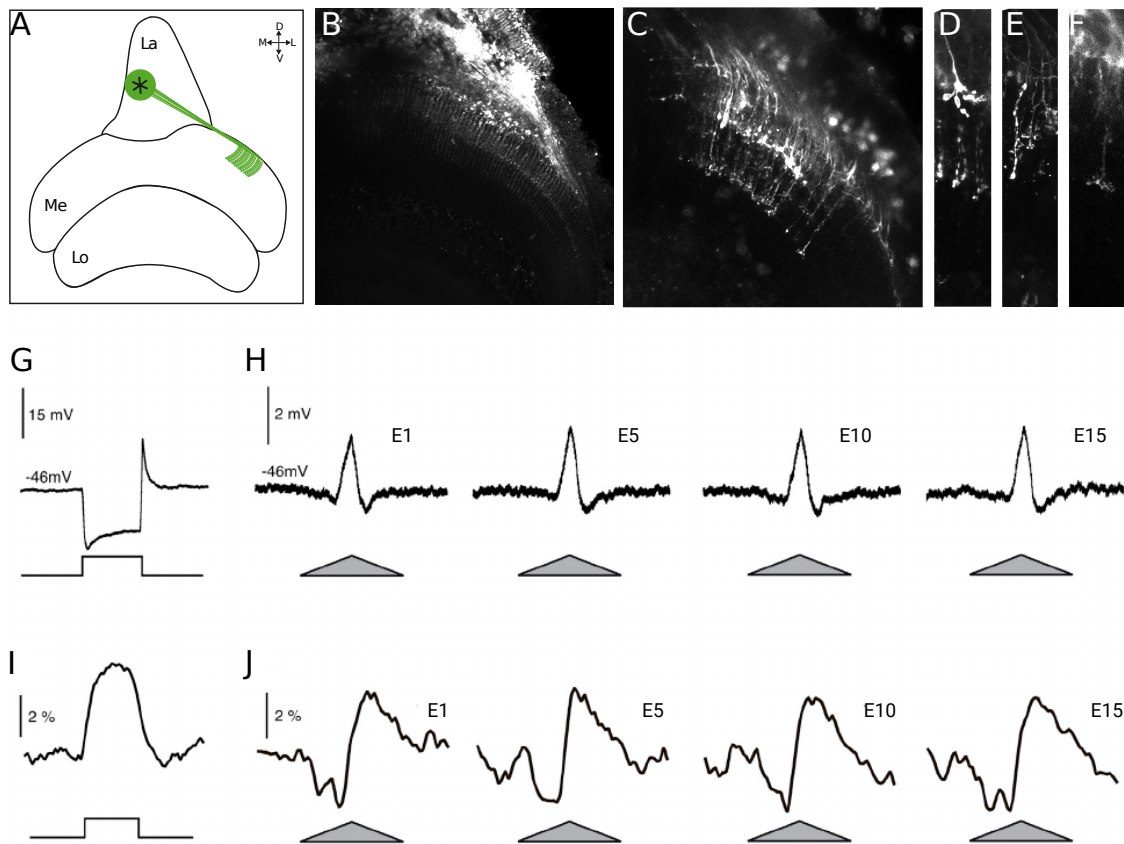


Figura 6.5: La información que viaja de la lámina a la médula no se ve afectada por la presentación repetitiva del VDS. **(A)** Los elementos neuronales que conectan la lámina con la médula fueron teñidos aplicando dextrano fluorescente en la lámina. **(B)** Imagen confocal de la médula que muestra los elementos neuronales que unen la lámina y la médula. **(C)** Detalle de la proyección de elementos teñidos a una profundidad de la médula diferente. **(D-F)** Ampliación en otra preparación en la que se pueden reconocer elementos individuales teñidos. **(G)** Registros electrofisiológicos realizados previamente en el laboratorio muestra la respuesta electrofisiológica de una neurona monopolar de la lámina a un pulso de luz. **(H)** Respuesta electrofisiológica de la misma célula frente a un entrenamiento masivo con el VDS. Los trazos muestran respuestas en los ensayos 1, 5, 10 y 15. **(I)** Registro óptico de una población neuronal del cambio relativo en la fluorescencia frente a un pulso de luz. **(J)** Respuestas de calcio de la población neuronal a presentaciones repetidas del VDS.

Estos resultados electrofisiológicos no excluyen la posibilidad de que una subclase particular de este u otro tipo neuronal que lleve información al segundo neuropilo óptico pueda ser afectado por la presentación repetitiva del VDS. Si bien esta posibilidad es muy difícil de descartar, realizamos un análisis poblacional de las respuestas de calcio de las terminales en la médula de los receptores R8 y de las neuronas que proyectan desde la lámina. Con este propósito, aplicamos el colorante sensible a calcio en la lámina tiñiendo las neuronas de proyección hacia la médula (Figura 4.3B-F). Dada la forma particular de la lámina, es difícil aplicar el colorante en el área que mapea la región visual donde presentamos el VDS. De todas maneras, en muchas preparaciones obtuvimos consistentemente respuestas a un pulso de luz ($n=5$), y en dos de estas preparaciones la respuesta al VDS fue lo suficientemente robusta como para poder ser evaluada. Dada la dificultad para reconocer los estratos subyacentes, definimos solamente una gran área de interés (ROI) en la cual analizamos la respuesta de calcio poblacional. La respuesta obtenida frente a un pulso de luz de las neuronas que proyectan en la médula fue de tipo tónica (Figura 6.5I). En las preparaciones en las cuales obtuvimos una respuesta robusta al VDS, la señal de calcio poblacional no mostró cambios evidentes ni en la amplitud ni en el perfil temporal a lo largo del entrenamiento. En la Figura 6.5J se muestra el registro de uno de estos preparados (correspondiente a la tinción mostrada en Figura 6.5B y C). La evidencia obtenida de los registros electrofisiológicos y de los registros ópticos indicaría que la información visual que llega a la médula desde las neuronas monopolares no se vería afectada por la presentación reiterada de un objeto en movimiento.

6.4. Conclusiones

Los resultados de este capítulo indican que la reducción en la respuesta de las neuronas gigantes de salida de la lóbula se originan en la reducción de la actividad de sus neuronas presinápticas (Subsección 6.3.1). Si bien, no se puede descartar que algunos tipos neuronales aferentes a la lóbula mantengan su respuesta frente a la estimulación repetida, la caída drástica en la actividad de los tres estratos de entrada indicaría que esto no estaría ocurriendo.

En artrópodos, dado el delgado calibre de las neuronas transmedulares ha sido casi imposible registrar su actividad electrofisiológica. En el laboratorio en una única oportunidad se pudo registrar una de estas neuronas [Beron de Astrada 2013]. La misma presentó dos grupos de arborizaciones terminales, una en la zona proximal y otra en la zona distal de la lóbula (Figura 6.6A-B). Revisando el preparado pudimos determinar que estas arborizaciones se encuentran en los estratos Li1 y Li3 caracterizados en esta tesis (nótese la similitud de esta neurona columnar con la descrita en Figura 4.4M y O). Frente a un pulso de luz la neurona respondía con una fuerte depolarización al encendido y apagado del estímulo (Figura 6.6C). Por otra parte, al igual que lo observado en este capítulo, el entrenamiento masivo con el VDS provocó una reducción de su respuesta electrofisiológica (Figura 6.6D). Por tratarse de un único registro y de un único tipo de neurona transmedular, en su momento resultaba difícil extraer

conclusiones respecto a la generalidad de este resultado. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de este capítulo, cabe señalar ahora la consistencia entre este registro intracelular y las respuestas poblacionales de calcio aquí estudiadas.

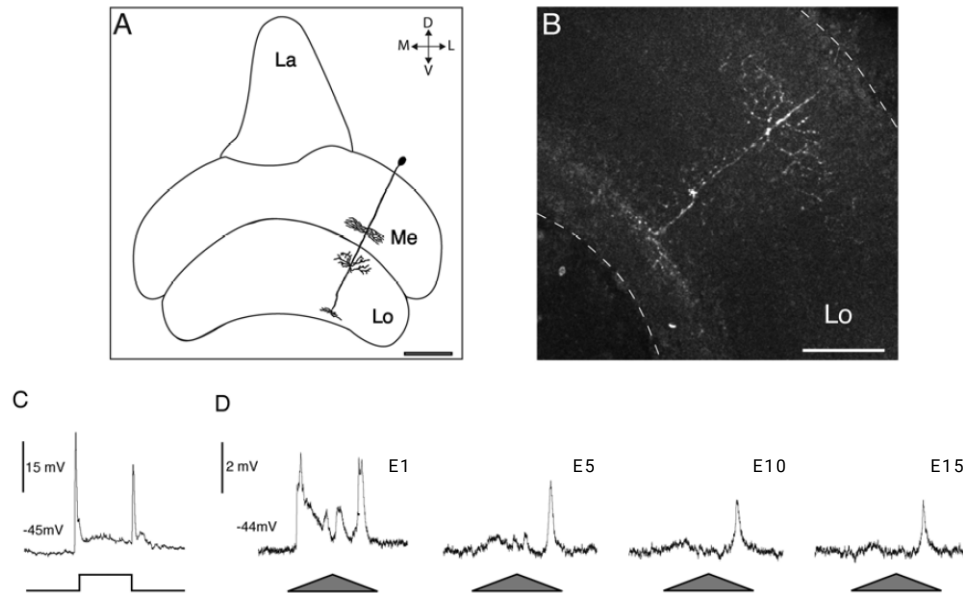


Figura 6.6: Registro intracelular y tinción de una única neurona transmedular en *Neohelice*. **(A)** Reconstrucción de la neurona teñida. **(B)** Fotografía tomada con el microscopio confocal de las arborizaciones de la neurona. **(C)** La neurona presenta una fuerte depolarización al encendido y apagado de un pulso de luz. **(D)** Respuesta electrofisiológica obtenida frente a la estimulación masiva con el VDS. La: Lámina, Me: Médula, Lo: Lóbula, M: Medial, L: Lateral, D: Dorsal, V: Ventral. Escalas en A: 100 μm y en B: 50 μm .

Por otra parte, encontramos que esta reducción en la respuesta de las neuronas transmedulares está confinada a las columnas visuales entrenadas (Subsección 6.3.2). Además, dada la ausencia de evidencias de que las neuronas monopolares modifiquen su actividad por estimulación repetida (Subsección 6.3.3), la plasticidad asociada al movimiento repetido de objetos debería tener lugar en elementos columnares de la médula.

7 Procesamiento visual en canales paralelos en el cangrejo *Neohelice granulata*

7.1. Introducción

La generalización es una capacidad cognitiva que permite tratar a estímulos similares como equivalentes habilitando a responder frente a ellos de la misma manera. Esta capacidad promovería la economía cognitiva, permitiendo respuestas adaptativas a objetos más o menos novedosos. El principio básico de la generalización es que los animales que han aprendido a responder a la presencia de un estímulo, transferirán su elección a nuevos estímulos que se evalúen en términos de su similitud a lo largo de una o múltiples dimensiones [Stach 2005].

Como vimos en el Capítulo 1, los artrópodos poseen circuitos neuronales especializados para detectar distintas características de los estímulos visuales como el color, el vector de polarización de la luz, decrementos e incrementos de la luminosidad, y la dirección y el sentido del movimiento (Sección 1.5, Subsección 1.7.1). Estos trabajos se centraron principalmente en estudiar la respuesta de neuronas de la lámina, la médula y la *lobula plate*. El único estudio realizado en la lóbula en cuanto a la segregación anatómica de atributos visuales fue realizado en abejorros [Paulk 2008]. En este trabajo, realizaron estudios electrofisiológicos sobre neuronas colectoras de la lóbula que arborizan en los distintos estratos en los que está compartimentalizada (6 estratos). En particular, observaron que las neuronas que arborizan en los estratos más distales resultan indiferentes a estímulos de color pero son sensibles al movimiento, mientras que las neuronas que arborizan en las capas más proximales responden a claves de color y movimiento [Paulk 2008].

Teniendo en cuenta que: I) los antecedentes en artrópodos muestran que distintos atributos visuales se procesan en circuitos neuronales distintos; II) en el cangrejo encontramos una gran variedad de neuronas transmedulares llegando a la lóbula (Capítulo 4); III) la actividad de las neuronas transmedulares está altamente correlacionada con la respuesta de escape de los animales (Capítulo 5); IV) la presentación repetida de objetos en movimiento (que mostraron ser inocuos) produce una drástica reducción de la respuesta de las neuronas transmedulares (Capítulo 6); en este capítulo, nos propusimos estudiar en qué medida la adaptación visual producida por la presentación repetida de frentes en movimiento con determinados atributos

visuales se generaliza a frentes que presentan otros atributos. En otros términos, ¿la aparición de un objeto novedoso en un área visual previamente adaptada al movimiento de cierto objeto, rescata la actividad en las columnas visuales correspondientes?

7.2. Materiales y métodos

Para estudiar la generalización entre canales de información visual utilizamos un protocolo de entrenamiento que adapta a los elementos columnares a un atributo visual particular e inmediatamente evaluamos el nivel de respuesta a un nuevo estímulo que difiere en uno o más atributos visuales. Para adaptar las neuronas columnares presentamos un protocolo de entrenamiento masivo de 14 ensayos con un intervalo entre ensayos de 3 segundos. Para evaluar si la adaptación se generaliza a otros atributos visuales, 3 segundos después del ensayo 14 presentamos un ensayo que contiene uno o dos cambios respecto del estímulo con el que se entrenó. Por otra parte, previo a el entrenamiento, realizamos estimulaciones únicas con los estímulos a entrenar para conocer en cada preparación la respuesta basal a los mismos (líneas de base de respuesta). Las respuestas durante el entrenamiento y la evaluación de la generalización fueron normalizadas a su respuesta basal. En una misma preparación se presentaron en orden aleatorio todos los tratamientos de cada experimento.

Al igual que en el Capítulo 5, los estímulos visuales utilizados consistieron en frentes que se desplazaban horizontalmente a $30^\circ/\text{s}$. Cada ensayo consistió en dos segundos de movimiento del frente. Una vez que el mismo llegó al final del área de estimulación, la pantalla se mantuvo estática por 1 segundo. Luego, la pantalla retornó a su condición inicial y se mantuvo así durante 3 segundos hasta comenzar el siguiente ensayo de estimulación. Los atributos visuales utilizados fueron contraste y dirección. El intervalo entre entrenamientos fue de 8 minutos y, durante este tiempo, se aplicaron estímulos deshabitantes que implicaban cambios estáticos de luminosidad (pulsos de luz). Previo a realizar los experimentos, los animales fueron colocados en el dispositivo experimental y se los mantuvo sin estimulación por un período de 3 minutos (experimentos fisiológicos) o 10 minutos (experimentos comportamentales). Detallaremos ahora los distintos entrenamientos visuales realizados:

- Estímulos que cambian la dirección del movimiento: Evaluamos la generalización entre frentes con movimiento lateral y dirección opuesta. Los frentes eran negros desplazándose a $30^\circ/\text{s}$ sobre un fondo claro. Presentamos 14 ensayos con un frente que se desplazaba de medial a lateral (de aquí en más a este desplazamiento lo abreviaremos como ML) ó de lateral a medial del animal (LM) y un ensayo de evaluación que se desplazaba en la dirección opuesta. Se realizaron en paralelo entrenamientos control sin cambio de la dirección del movimiento en el ensayo 15.

- Estímulos que cambian la polaridad del contraste: Evaluamos la generalización entre frentes claros y oscuros. Para que el cambio de polaridad del estímulo implique solamente el cambio de luminosidad del frente mismo, estos fueron presentados sobre un fondo gris de

intensidad media (RGB:128). La adaptación del canal de oscurecimiento (OFF) consistió en la presentación de 14 frentes oscuros (RGB:0). Para evaluar la generalización a un estímulo de polaridad opuesta, el ensayo de evaluación consistió en el movimiento de un frente claro (ON; RGB:255) sobre el mismo fondo gris (grupo al que denominaremos OFF-ON) . Se realizó también el experimento inverso, adaptar al canal ON y evaluar la generalización al canal OFF (grupo ON-OFF). En paralelo realizamos entrenamientos controles que no presentaban un cambio de contraste en el ensayo número 15 (grupos ON-ON y OFF-OFF).

- Estímulos que cambian el contraste y la dirección de movimiento: Aquí estudiamos la generalización entre frentes que difieren en uno o dos atributos visuales. Todos los grupos fueron evaluados con el mismo estímulo. En particular, entrenamos a un frente OFF que se desplazaba de lateral a medial (LM) y realizamos la evaluación con un frente ON que se desplazaba de medial a lateral (ML). Este grupo recibe dos cambios en el ensayo de evaluación y lo denominaremos Cte y Dir. Los entrenamientos controles implicaron cambios sólo en la dirección (Dir), cambios sólo en el contraste (Cte) y otro que no implicaba ningún cambio (Control).

Como se vio en el Capítulo 5, los estímulos claros desencadenan bajas respuestas de calcio. En el último de los experimentos de este capítulo indagamos sobre diferencias en respuestas neuronales a estímulos claros, que se encuentran cercanas al error experimental de la metodología utilizada. Es por esta razón que aquí mostraremos las respuestas neuronales medidas como el área del cambio en la fluorescencia y no el máximo. Por tratarse de respuestas débiles, el error relativo en la determinación del área resulta menor que el error relativo para las mediciones del máximo de la respuesta. De todos modos, el máximo de la respuesta de fluorescencia también fue analizado arrojando las mismas tendencias que el área. Por otra parte, si bien en los experimentos presentados anteriormente en esta tesis no había sido necesario realizar correcciones por fotoblanqueo, en los experimentos de este capítulo sí fue necesario. Para 4 de los 14 animales utilizados en el último experimento corregimos la señal de calcio mediante la resta de un ajuste exponencial obtenido a partir de la misma señal.

Por otro lado, para el experimento donde evaluamos la generalización entre frentes desplazándose con distinta dirección, analizamos también la respuesta comportamental. Entrenamos a dos grupos de animales: Unos que fueron entrenados con frentes que se desplazaban de adelante hacia atrás del animal (equivalentes a los frentes ML) y otros que fueron entrenados con frentes que se desplazaban de atrás hacia adelante del animal (equivalentes a los frentes LM). En el ensayo de evaluación se les presentó un frente que se desplazaba en dirección opuesta al del entrenamiento. Para ambos, los grupos control no presentaban cambios de dirección en el ensayo de evaluación. Como ambos grupos arrojaron los mismos resultados (no mostrado), aquí presentamos los datos promediados de ambos entrenamientos, analizando cambio dirección (grupo entrenado) *versus* no cambio de dirección (grupo control) en el ensayo de evaluación.

Para analizar la diferencia entre los distintos tratamientos realizamos un análisis de modelos lineales mixtos. Tomamos como factores fijos al tipo de entrenamiento realizado y el número de ensayos presentados y como factor aleatorio al animal. Para realizar la comparación

estadística entre los modelos utilizamos el paquete del R multcomp.

7.3. Resultados

7.3.1. Generalización de la adaptación para direcciones de movimiento

Dado que los cangrejos con los que trabajamos viven en un ambiente plano [Layne 1997] y que la dirección vertical estaría menos representada en sus sistema nervioso [Beron de Astrada 2012], elegimos estudiar la generalización entre direcciones de movimiento laterales opuestas. La Figura 7.1 muestra el perfil temporal de la respuesta de calcio de los estratos de entrada a la lóbula a estos frentes. Nótese que el pico promedio de la respuesta al frente que avanza de medial a lateral (ML, trazo azul) ocurre luego que el obtenido frente a la dirección inversa de movimiento (LM, trazo rojo). Este desfase entre los picos se debe a que al frente que se desplaza con dirección ML le lleva más tiempo alcanzar el “campo receptivo promedio” de las columnas que se están cuantificando. Por como hacemos la tinción, este “campo receptivo” se ubica más cerca del lado lateral. Nótese también que al finalizar el desplazamiento del frente, la pantalla permanece en esa condición durante un segundo para luego retornar al fondo inicial. Este *reseteo*, que es necesario para poder realizar una estimulación secuencial utilizando el mismo fondo, produce una nueva activación de las neuronas columnares. No tendremos en cuenta esta respuesta en nuestros análisis ya que aquí solo cuantificamos la respuesta al movimiento (ver Capítulo 3).

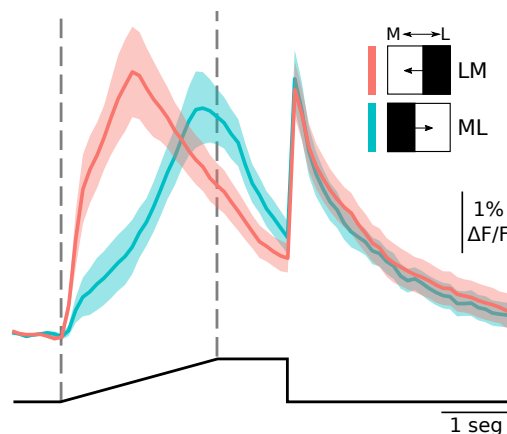


Figura 7.1: Respuesta de las neuronas columnares transmedulares a frentes que se desplazan horizontalmente con direcciones opuestas. Perfil temporal promedio del cambio de fluorescencia relativo para un frente OFF que se desplaza de lateral a medial (LM, trazo rojo) y para uno que se desplaza de medial a lateral (ML, trazo azul). El esquema debajo del registro ilustra la dinámica del estímulo visual. La línea punteada indica el inicio y el fin del movimiento del frente ($n=10$). M: Medial, L: Lateral. Las líneas muestran la media $\pm$ error estándar.

En la Figura 7.2A se muestra, a modo de ejemplo, el perfil temporal de la actividad

de calcio para los distintos ensayos del entrenamiento visual realizado (ensayos 1 a 14, se muestran únicamente los entrenamientos de LM) y para el ensayo de evaluación con un frente desplazándose en la misma y en dirección opuesta (Figura 7.2A, E15-Eval). Con este protocolo, esperábamos adaptar, entre otras, a una subpoblación de neuronas columnares sensibles a esa dirección de movimiento. Un nuevo frente, desplazándose en la dirección opuesta nos permitiría revelar el grado de generalización entre frentes. El análisis de las respuestas normalizadas del último ensayo de entrenamiento (Ensayo 13) muestra que, con independencia de la fuerza de estimulación de los estímulos utilizados (ver valores indicados en el pie de la Figura 7.2C), ambas direcciones provocan un nivel de adaptación relativo similar, siendo el valor normalizado obtenido para el E13 del entrenamiento de ML: 0.29 ± 0.04 y para el entrenamiento de LM: 0.29 ± 0.03 (Figura 7.2C, t-Welch (E13_{ML} vs E13_{LM}), $p=0.92$, $n_{ML}=22$, $n_{LM}=19$).

El cambio en la dirección de movimiento en el ensayo de evaluación desencadenó respuestas muy inferiores a las obtenidas sin entrenamiento previo (línea de base normalizada=1) indicando un alto grado de generalización. Para los animales que fueron entrenados con frentes desplazándose de LM, obtuvimos una respuesta en el ensayo de evaluación (LM-ML) de 0.38 ± 0.07 ; para los animales que fueron entrenados con frentes desplazándose de ML, obtuvimos una respuesta en el ensayo de evaluación (ML-LM) de 0.43 ± 0.04 .

Al comparar cada cambio de condición en el ensayo 15 con su respectivo control observamos diferencias significativas para los dos tipos de entrenamientos visuales (Figura 7.2C; Modelo lineal mixto (ML-ML vs ML-LM), $p<0.001$, $n_{ML-ML}=7$, $n_{ML-LM}=11$; Modelo lineal mixto (LM-LM vs LM-ML), $p<0.001$, $n_{LM-LM}=10$, $n_{LM-ML}=9$). Por otro lado, también observamos diferencias significativas al comparar la respuesta al mismo estímulo de evaluación, pero con entrenamientos previos distintos (Figura 7.2C; Modelo lineal mixto (ML-ML vs LM-ML), $p<0.005$, $n_{ML-ML}=7$, $n_{LM-ML}=9$; Modelo lineal mixto (LM-LM vs ML-LM), $p<0.001$, $n_{LM-LM}=10$, $n_{ML-LM}=11$). Este aumento de la señal de calcio por el cambio de atributo visual indica que el grado de respuesta a un estímulo particular depende del estímulo con el cual fue entrenado.

Mediante el simulador de locomoción [Oliva 2007], estudiamos la respuesta de escape de los animales cuando fueron enfrentados al mismo tipo de entrenamiento. En la Figura 7.2B se muestra el perfil temporal de la velocidad instantánea para los distintos ensayos del entrenamiento realizado. El trazo azul corresponde al grupo control al que no se le presentó cambio de dirección en el ensayo de evaluación y el trazo rojo corresponde al grupo con cambio de dirección (Figura 7.2B, E15-Eval). La Figura 7.2D muestra el área de la respuesta de escape normalizada al primer ensayo del entrenamiento obtenida para los distintos ensayos. Frente al ensayo de evaluación, se observa una leve recuperación del grupo con cambio de condición que no llega a ser significativa (Wilcoxon test (E15 del grupo con cambio de dirección vs E15 del grupo sin cambio de dirección), $p=0.20$, $n_{TR}=27$, $n_{CT}=24$).

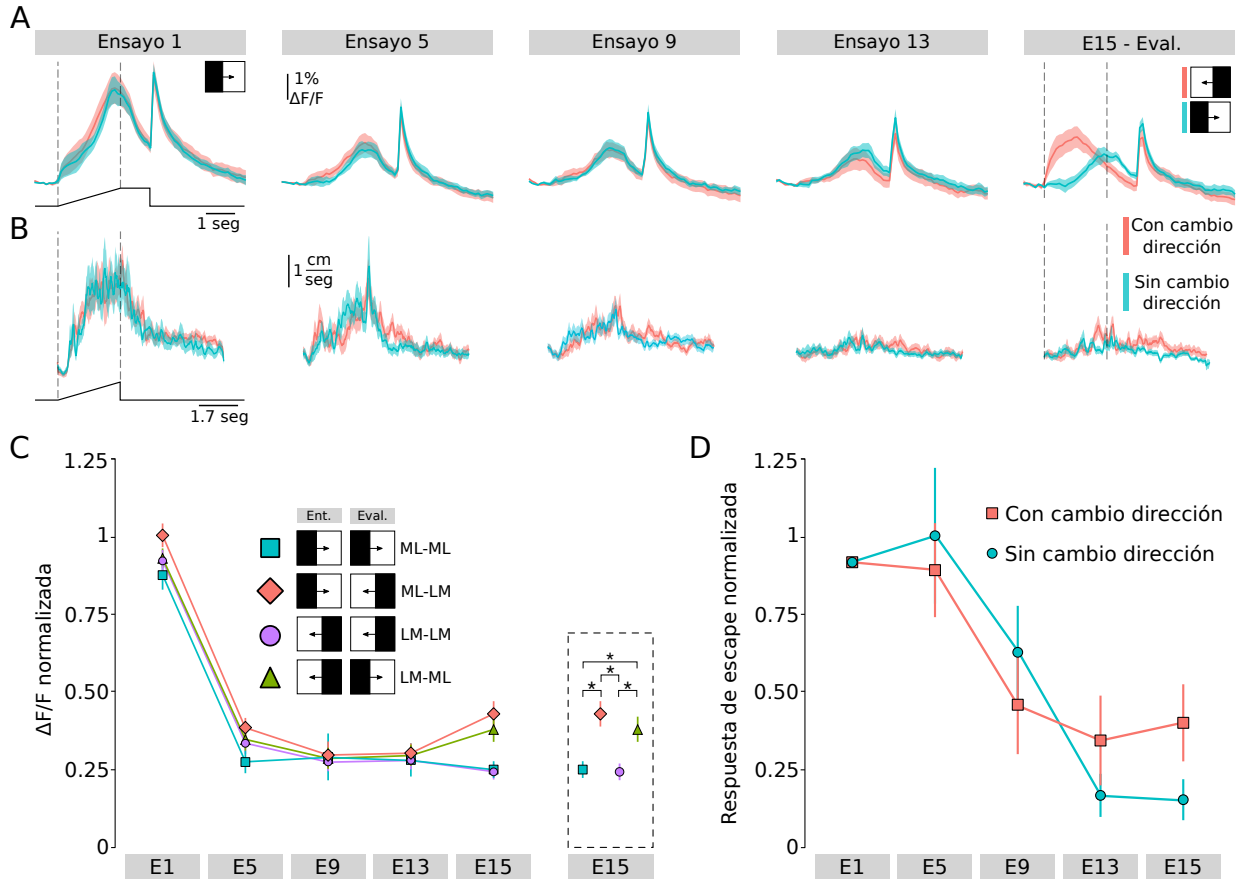


Figura 7.2: Adaptación diferencial a la inversión en las direcciones del movimiento de un objeto. **(A)** Respuesta de calcio promedio de las neuronas columnares transmedulares a una secuencia de 15 presentaciones de un frente negro que se desplaza horizontalmente con una separación de 3 segundos entre estímulos. Los trazos azules corresponden al entrenamiento control mientras que el trazo rojo corresponde al grupo que tuvo cambio de dirección en el ensayo de evaluación ($n=10$). El trazo negro debajo de los perfiles temporales de respuesta en el ensayo 1 indica la dinámica de desplazamiento del frente. Las líneas punteadas indican el comienzo y el fin del movimiento del frente. **(B)** Perfil temporal de la velocidad instantánea para cada uno de los ensayos del grupo entrenado con cambio de dirección (trazo rojo, $n=31$) y del grupo control sin cambio de dirección (trazo azul, $n=28$) en el ensayo de evaluación. **(C)** Análisis de la respuesta de calcio normalizada a su línea de base para cada uno de los entrenamientos realizados. Los valores obtenidos para cada grupo en el Ensayo 1 fueron (entrenamiento - evaluación)= ML-ML: $5.39 \pm 0.74 \text{ \%} \cdot \text{seg}$, ML-LM: $5.54 \pm 0.85 \text{ \%} \cdot \text{seg}$, LM-LM: $6.35 \pm 0.79 \text{ \%} \cdot \text{seg}$, LM-ML: $6.43 \pm 0.67 \text{ \%} \cdot \text{seg}$. El rectángulo punteado muestra los valores desplegados obtenidos para cada grupo en el E15. **(D)** Cuantificación de la respuesta de escape normalizada a la respuesta obtenida en el primer ensayo de entrenamiento. En **A** y **B** se muestran la media $\pm$ error estándar. En **C** y **D** se grafica la media $\pm$ error estándar.

En conjunto, entonces, encontramos que existe un alto grado de generalización de la reducción de las respuestas neuronales pero también cierto grado de recuperación de las mismas al presentar un atributo visual novedoso. A partir de la metodología usada para medir la recuperación comportamental resulta difícil sacar conclusiones dado el error experimental que tiene la metodología usada.

7.3.2. Generalización de la adaptación para contrastes opuestos

Estudiamos también la generalización en la reducción de las respuestas para frentes con distinta polaridad de contrastes sobre un fondo de igual intensidad. Al igual que lo observado en el Capítulo 5, la respuesta evocada por cada estímulo resultó significativamente distinta, siendo mayor para los estímulos oscuros (OFF) que para los claros (ON) (t-test (OFF vs ON), $p < 0.005$, $n = 10$).

La estimulación repetida, tanto con un frente ON como con uno OFF, dio lugar a una marcada reducción de la respuesta de calcio (Figura 7.3A, $n = 9$). El análisis de las respuestas normalizadas del último ensayo de entrenamiento (Ensayo 13) muestra que, con independencia de la fuerza de estimulación de los estímulos utilizados (ver valores indicados en el pie de la Figura 7.3B), ambos contrastes provocan un nivel de adaptación relativo similar, siendo el valor normalizado obtenido para el E13 del entrenamiento OFF: 0.22 ± 0.05 y para el entrenamiento ON: 0.29 ± 0.06 (Figura 7.3B, t-test ($E13_{ON}$ vs $E13_{OFF}$), $p = 0.16$, $n = 18$).

Al igual que en el experimento anterior, realizamos un análisis de las respuestas de calcio normalizadas a su actividad previa al entrenamiento. El cambio en el contraste del frente en el ensayo 15 desencadenó respuestas inferiores a las obtenidas para el mismo estímulo pero sin entrenamiento previo, indicando la generalización de la adaptación (Figura 7.3B, $E15_{OFF-OFF} = 0.28 \pm 0.08$; $E15_{OFF-ON} = 0.50 \pm 0.08$; $E15_{ON-ON} = 0.16 \pm 0.04$; $E15_{ON-OFF} = 0.78 \pm 0.07$). Con este análisis, se revelan diferencias significativas para cada cambio de polaridad de contraste presentado respecto a su control sin cambio de condición (Figura 7.3B, Modelo lineal mixto (ON-ON vs ON-OFF), $p < 0.001$, $n_{ON-ON} = 8$, $n_{ON-OFF} = 9$; Modelo lineal mixto (OFF-ON vs OFF-OFF), $p < 0.05$, $n_{OFF-ON} = 8$, $n_{OFF-OFF} = 9$). Por otra parte, si comparamos la respuesta de calcio al mismo estímulo visual en el ensayo de evaluación para animales que fueron entrenados con estímulos de distinta polaridad, observamos que la respuesta fue siempre mayor cuando el entrenamiento fue realizado con el estímulo de polaridad opuesta. Esto fue así, incluso, cuando los estímulos de entrenamiento eran más fuertes que el del ensayo de evaluación (Figura 7.3B, Modelo lineal mixto (OFF-ON vs ON-ON), $p < 0.001$, $n = 8$; Modelo lineal mixto (OFF-OFF vs ON-OFF), $p < 0.001$, $n = 9$). Este aumento de la respuesta obtenido al cambio en el contraste del frente indica que el grado de respuesta a un cierto estímulo depende del estímulo con el cual se entrenó. Por lo que, si bien hay un alto grado de generalización en la reducción de las respuestas, también existe cierto grado de especificidad de la respuesta sugiriendo que se estarían activando canales neuronales distintos con uno y otro tipo de contraste.

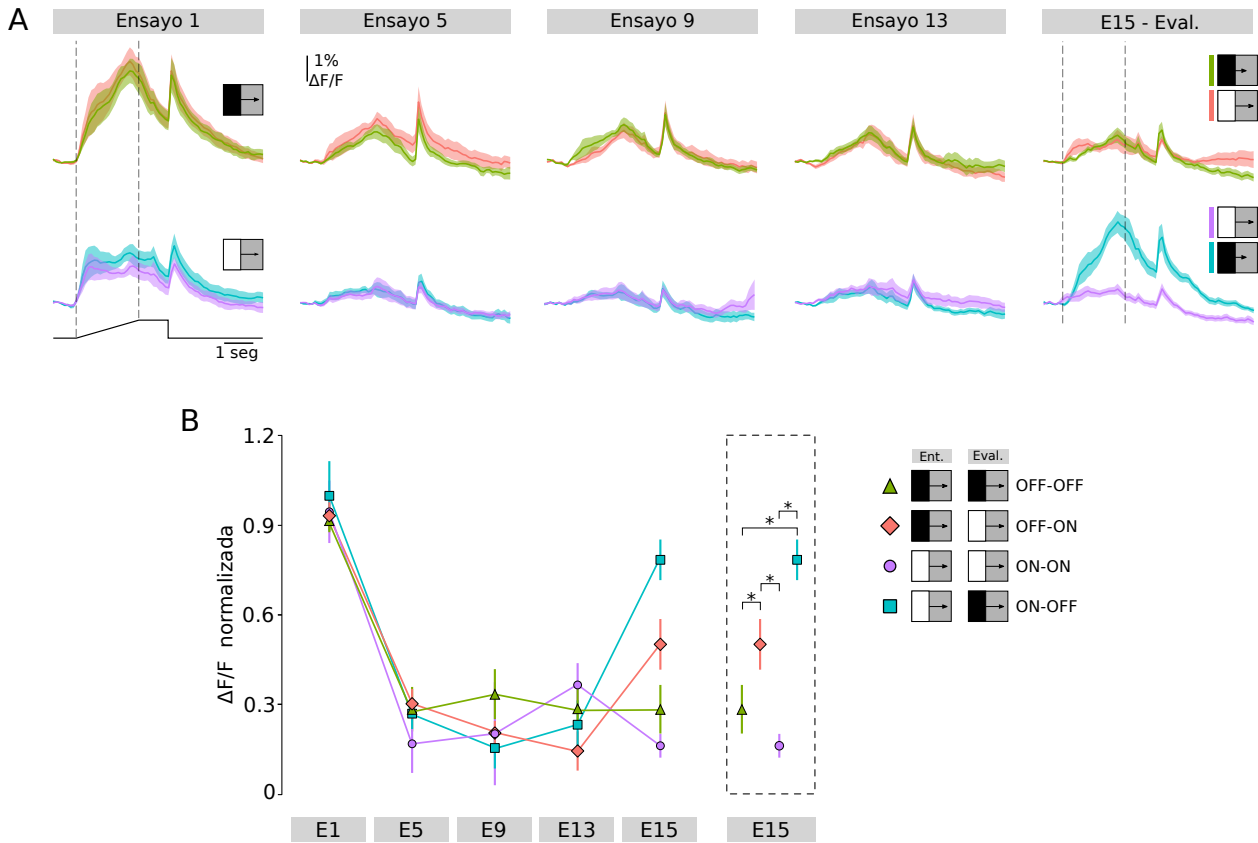


Figura 7.3: Adaptación diferencial a distintos contrastes de un objeto en movimiento. **(A)** Los trazos verdes y rojos de los ensayos 1 al 13 corresponden a un entrenamiento realizado con un frente OFF. En el E15, el trazo rojo corresponde al grupo que fue evaluado con un cambio de contraste (se le presentó un frente ON) mientras que el trazo verde corresponde al grupo control (sin cambio de contraste en el E15). En el panel inferior, el trazo azul y violeta corresponden a entrenamientos realizados con un frente ON (ensayos 1 al 13). En el E15, se muestra la respuesta obtenida al cambiar el contraste del frente (trazo azul) en comparación al grupo que no recibió cambio de contraste (trazo violeta, $n=9$). El trazo negro debajo de los perfiles temporales de respuesta indica la dinámica de desplazamiento del frente. Las líneas punteadas indican el comienzo y el fin del movimiento del frente. **(B)** Análisis de la respuesta de calcio normalizada a su línea de base para cada uno de los entrenamientos realizados. Los valores obtenidos para cada grupo en el Ensayo 1 fueron (entrenamiento - evaluación) = OFF-OFF: 6.00 ± 0.85 %seg, OFF-ON: 6.61 ± 0.99 %seg, ON-OFF: 3.99 ± 0.72 %seg, ON-ON: 3.01 ± 0.52 %seg. El rectángulo punteado muestra los valores desplegados obtenidos para cada grupo en el E15. En **A** se muestra la media $\pm$ error estándar. En **B** se grafica la media $\pm$ error estándar.

7.3.3. Generalización de la adaptación para dirección y contraste

Los resultados encontrados hasta aquí muestran que luego de la adaptación a un atributo visual particular, como puede ser el contraste o la dirección de movimiento, la respuesta poblacional de las neuronas transmedulares puede recuperarse si se produce un cambio en la estimulación respecto a los atributos visuales entrenados. Sin embargo, la recuperación de la respuesta obtenida al estímulo de evaluación no alcanza los niveles de actividad inicial obtenidos a los correspondientes estímulos de base. Nos preguntamos ahora, si el cambio en dos atributos

visuales al momento de la evaluación da lugar a una recuperación de la respuesta mayor que frente a un solo cambio.

Dado I) que los frentes OFF presentan una recuperación relativa mayor de la respuesta de calcio que los estímulos ON (Subsección 5.3.3) y II) que la hipótesis del experimento de esta sección apunta a observar un mayor aumento de la respuesta en el ensayo de evaluación, utilizamos un estímulo débil (un frente ON) como estímulo de evaluación. De esta manera, en el caso de obtener mayores señales de calcio en el ensayo de evaluación que las obtenidas hasta el momento, nos aseguramos de no saturar el sistema pudiendo evidenciar una eventual mayor señal al presentar el estímulo. Habiendo fijado la condición de evaluación, realizamos entrenamientos con un grupo que solo cambia el contraste (Cte), otro que solo cambia la dirección (Dir) y otro que cambia contraste y dirección siglas (Cte y Dir). Además, realizamos un grupo control (Control) que presenta igual contraste e igual dirección de movimiento en el ensayo de evaluación.

El análisis de las respuestas normalizadas para los cuatro entrenamientos muestra que, con independencia de la fuerza de estimulación de los estímulos utilizados (ver valores indicados en el pie de la Figura 7.4B), todos los estímulos provocan un nivel de adaptación relativo similar, siendo el valor normalizado obtenido para el E13 del grupo Control: 0.03 ± 0.01 ; del grupo Cte: 0.16 ± 0.04 ; del grupo Dir: 0.11 ± 0.05 y del grupo Cte y Dir: 0.20 ± 0.05 (Modelo lineal mixto, Contraste Tukey, $p=0.72$, $n_{\text{Cte}} = n_{\text{Dir}} = n_{\text{Cte y Dir}} = 14$, $n_{\text{Control}}=13$) .

Al igual que en los experimentos anteriores, no ocurre una recuperación total de la respuesta (línea de base normalizada=1) en los ensayos de evaluación (Ensayo 15 del grupo Control: 0.16 ± 0.04 ; del grupo Cte: 0.35 ± 0.07 ; del grupo Dir: 0.36 ± 0.12 ; del grupo Cte y Dir: 0.44 ± 0.09 ; Figura 7.4B).

El entrenamiento con un frente ON que se desplaza de lateral a medial provocó una marcada reducción de la respuesta que se vio recuperada parcialmente si se presentaba el mismo estímulo en la evaluación pero con distinta dirección de movimiento (Figura 7.4B, Modelo lineal mixto (E15 Dir vs E15 Control, $p=0.18$, $n_{\text{Control}}=14$, $n_{\text{Dir}}=11$). El ensayo de evaluación presentado luego de un entrenamiento con un frente OFF que se desplazaba con la misma dirección de movimiento arrojó diferencias significativas respecto al control (Modelo lineal mixto (E15 Cte vs E15 Control, $p<0.05$, $n_{\text{Cte}}=n_{\text{Control}}=14$). El ensayo de evaluación presentado luego de un entrenamiento con los dos atributos cambiados también arrojó diferencias significativas respecto al control (Figura 7.4B, Modelo lineal mixto (E15 Cte y Dir vs Control), $p<0.05$, $n_{\text{Control}}=14$, $n_{\text{Cte y Dir}}=13$).

Finalmente, una rápida inspección de los resultados resulta suficiente para notar que el nivel de respuesta del grupo que tuvo dos atributos visuales distintos de entrenamiento respecto a la evaluación responde de manera similar que a los que tuvieron una sola diferencia. Los valores obtenidos en el E15 para cada grupo fueron: Control: 2.79 ± 0.72 %.seg; Cte: 5.19 ± 0.93 %.seg, Dir: 5.77 ± 1.06 %.seg, Cte y Dir: 5.89 ± 1.04 %.seg.

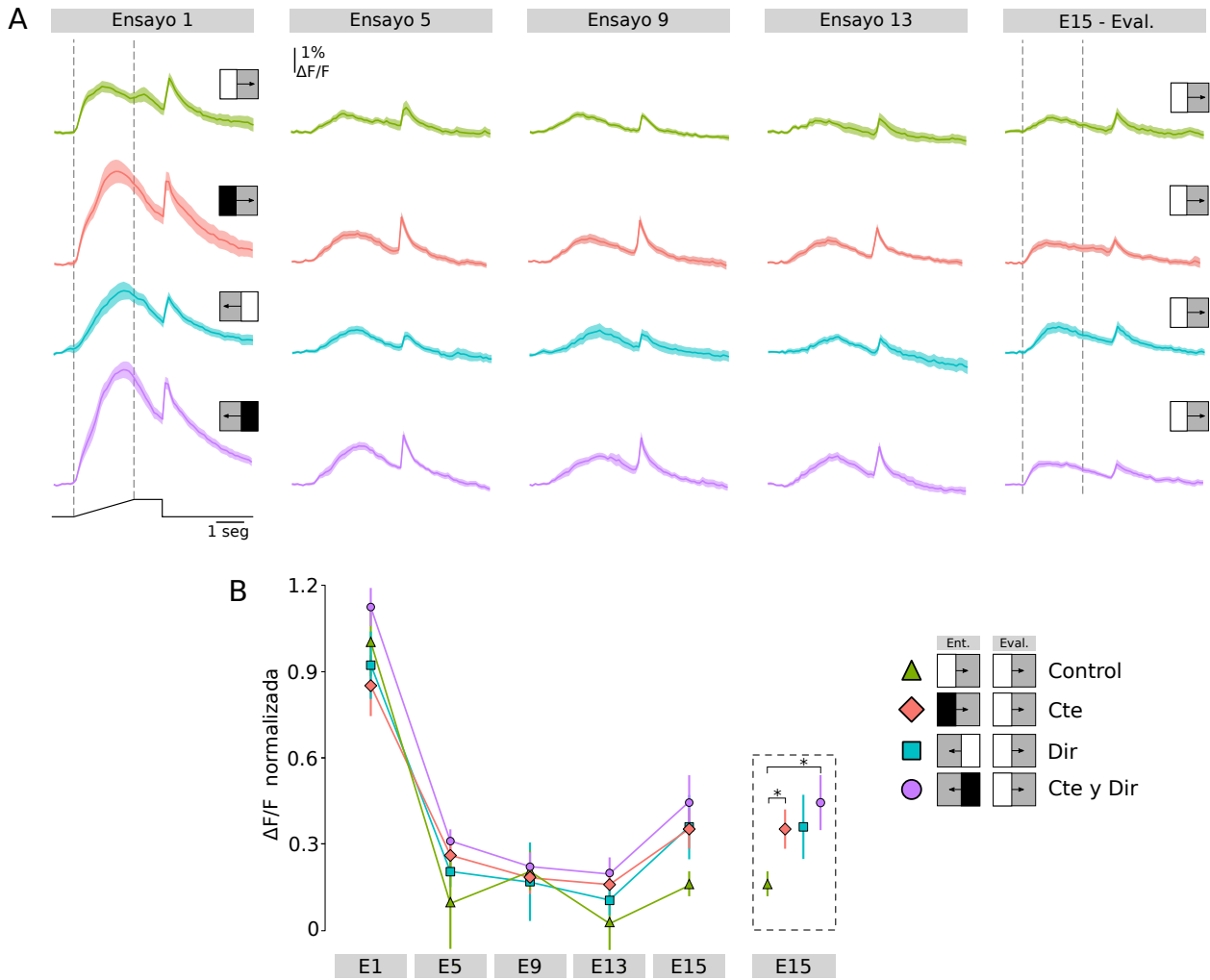


Figura 7.4: Adaptación diferencial a distintos atributos visuales de un objeto en movimiento. **(A)** Respuesta de calcio promedio de las neuronas transmedulares. El trazo verde corresponde al grupo Control, el trazo rojo al grupo Cte, el trazo celeste al grupo Dir y el trazo violeta al grupo Cte y Dir. Para todos los grupos el ensayo de evaluación consistió en la presentación de un frente ON desplazándose de medial a lateral. El trazo negro debajo de los perfiles temporales de respuesta indica la dinámica de desplazamiento del frente. Las líneas punteadas indican el comienzo y el fin del movimiento ($n = 14$). **(B)** Análisis de la respuesta de calcio normalizada a su línea de base para cada uno de los entrenamientos realizados. Los valores obtenidos para cada grupo en el Ensayo 1 fueron= Cte: $13.66 \pm 2.72\% \cdot \text{seg}$, Dir: $10.88 \pm 1.63\% \cdot \text{seg}$, Cte y Dir: $17.54 \pm 1.11\% \cdot \text{seg}$, Control: $8.66 \pm 1.33\% \cdot \text{seg}$. El rectángulo punteado muestra los valores desplegados obtenidos para cada grupo en el E15. En **A** se muestra la media $\pm$ error estándar. En **B** se grafica media $\pm$ error estándar.

7.4. Conclusiones

El objetivo de los experimentos realizados en este capítulo fue estudiar en qué medida la adaptación de las columnas visuales se generaliza a elementos neuronales que codificarían otros atributos visuales. Es decir, estudiar en qué medida la adaptación provocada por la presentación repetida de un estímulo visual de peligro se generaliza a estímulos novedosos que no mostraron

ser inocuos. Elegimos para estudiar este fenómeno atributos visuales que se sabe son canalizados, al menos parcialmente, en circuitos neuronales distintos (polaridad del contraste y dirección de movimiento). Para ambos tipos de estímulos, la señal de calcio en los ensayos de evaluación no alcanzó los niveles de respuestas para los mismos estímulos sin preadaptación, por lo que concluimos que habría generalización (Subsección 7.3.1, Subsección 7.3.2).

Estos resultados muestran también una recuperación parcial de la respuesta frente a los estímulos novedosos (Subsección 7.3.1, Subsección 7.3.2). En general, esta recuperación fue más o menos pequeña pero consistente y estadísticamente significativa. En artrópodos, se ha documentado que tanto el contraste como la dirección de movimiento son codificados en circuitos neuronales específicos [Maisak 2013, Meier 2014, Strother 2014]. Por ello, interpretamos la recuperación parcial de la respuesta frente a los objetos novedosos por la activación de una subpoblación de neuronas columnares que responderían específicamente al atributo novedoso y que no habrían experimentado generalización.

Dado los riesgos que puede implicar para un animal dejar de escapar frente a un estímulo de peligro que no ha mostrado ser inocuo comenzamos a estudiar la recuperación de la respuesta de escape por estimulación de un área del sistema visual que fue previamente adaptada. Como frente a estímulos claros desplazándose sobre un fondo oscuro prácticamente no habíamos obtenido respuesta de escape, solo enfrentamos a los animales a cambios en la dirección de movimiento. Estos resultados mostraron una leve recuperación de la respuesta de escape que resultó marginalmente significativa.

En el último de los experimentos del capítulo pretendíamos comenzar a estudiar si el grado de diferencia entre el estímulo entrenado y el novedoso se relacionaba con el nivel de respuesta de los estratos de entrada de la lóbula. Sin embargo, a pesar de lo esperado, no encontramos diferencias. El grupo pre-entrenado a dos atributos visuales distintos a los de la evaluación respondió de manera muy similar al grupo pre-entrenado a un solo atributo, ¿por qué estas diferencias no se suman? Retomaremos éste tema en la Discusión General.

8 Discusión General

Al comienzo de esta tesis era escasa la información bibliográfica acerca de la morfología y fisiología de los elementos columnares de la lóbula en artrópodos. El cangrejo *Neohelice* resultó ser un excelente modelo para el estudio de las neuronas transmedulares que conectan el segundo con el tercer neuropilo óptico. Dada la robustez de las señales de calcio obtenidas frente a las distintas estimulaciones presentadas y a la facilidad que brinda el cangrejo de poder medir la actividad poblacional de las neuronas transmedulares pudimos estudiar cómo distintos parámetros de un estímulo visual son procesados en estas neuronas.

Particularmente, estudiamos cómo distintos parámetros visuales de un objeto en movimiento influyen sobre la actividad de calcio de las neuronas transmedulares en la lóbula y sobre la respuesta de escape del animal. Para ello, realizamos dos tipos de diseños experimentales que incluían curvas de sintonía visual y estudios de adaptación. Las curvas de sintonía se realizaron presentando distintos grados de variación de un atributo visual. Presentamos frentes que se desplazaban a distinta velocidad, frentes con distinto contraste y variaciones en el desfase temporal entre frentes de contrastes opuestos. Por otro lado, identificamos el sitio de plasticidad que da cuenta de los cambios comportamentales frente a un entrenamiento masivo. Luego, realizamos dos diseños experimentales para estudiar la generalización de esta adaptación. El primero implicaba evaluar la generalización de la respuesta de adaptación mediante la estimulación repetitiva en un área particular del campo visual y un ensayo de evaluación en otra área del campo visual. El segundo implicaba estimular el mismo área del campo visual entrenando a un atributo particular y evaluar la generalización en el mismo área con un atributo diferente.

El análisis de las señales de calcio de las neuronas transmedulares evocadas por distintos parámetros de un estímulo (Capítulo 5) indican que las neuronas transmedulares responden diferencialmente a frentes que se mueven con distintas velocidades angulares. Por otra parte, las respuestas de las neuronas transmedulares mostraron una mayor sensibilidad a estímulos de movimiento que a estímulos estacionarios de oscurecimiento; y a frentes oscuros moviéndose sobre fondos claros que a los de polaridad opuesta.

El estudio de la respuesta de evitación de los cangrejos frente a las mismas características visuales con las que fueron estudiadas las neuronas transmedulares, nos permitió explorar las consecuencias comportamentales de la activación diferencial de las neuronas de proyección que conectan la médula con la lóbula. Encontramos que la actividad en las neuronas transmedulares correlaciona fuertemente con la intensidad de la respuesta de escape evocada por dichos

estímulos.

También presentamos evidencia de que el decremento de la respuesta de las LG al movimiento repetitivo de objetos se produce por un decremento drástico de la actividad de elementos columnares de la médula. Este decremento se limita a los elementos retinotópicos entrenados, lo que permite al sistema visual responder a nuevos estímulos de movimiento que aparecen en nuevas áreas de la retina. Por otro lado, el cambio en un atributo visual con respecto al estímulo de entrenamiento, presentado en el mismo área, da lugar a una recuperación parcial de la respuesta de calcio que resulta ser mayor que la que se observa si no se cambiara dicho atributo visual. Este resultado indicaría que existe cierto grado de especificidad pero, también, algún grado de generalización dado que no se recupera la totalidad de la respuesta al cambiar un atributo visual del estímulo entrenado (Capítulo 7).

El conjunto de correlaciones encontradas entre la actividad de las neuronas transmedulares y la respuesta de escape, sugieren que habría una relación causal entre la activación de estas neuronas y la evocación de la respuesta comportamental.

8.1. Neuroarquitectura de la lóbula y la *lobula plate*

En estructuras altamente ordenadas, como la lóbula y la *lobula plate*, el conocimiento detallado de la neuroanatomía de un ganglio puede brindar información acerca de sus posibles funciones. A pesar de la relevancia de estos neuropilos en el procesamiento de la información del movimiento, los estudios sobre su neuroarquitectura son escasos en decápodos.

En esta tesis, basados en una metodología que se comprobó era apropiada para teñir los elementos columnares aferentes a la lámina y médula, identificamos cuatro estratos distintos en la lóbula del cangrejo que la comunican con la médula. Al profundizar el análisis de los distintos estratos de entrada en el centro de la lóbula notamos que, excepto por el estrato Li4, cada uno de ellos se encuentra conformado por un número distinto de subestratos. Las arborizaciones colaterales que componen un subestrato se pueden originar en neuronas columnares que arborizan a un solo nivel de la lóbula o en neuronas que arborizan en más de un nivel. Cada columna visual de los ganglios ópticos de los artrópodos está conformada a la altura del primer quiasma óptico por más de 15 tipos neuronales diferentes [Sztarker 2009], mientras que a nivel del segundo quiasma óptico hay alrededor de 50 neuronas diferentes [Strausfeld 1976, Sztarker 2014]. Una caracterización detallada de las distintas neuronas aferentes de la lóbula va más allá de las posibilidades de la metodología utilizada en esta tesis, principalmente porque neuronas individuales son reconocibles sólo en los bordes de las tinciones masivas. Además, es posible que con la resolución actual y sin una imagen básica de búsqueda - como es el caso de los resultados para los primeros dos ganglios ópticos - no podamos distinguir entre una neurona columnar individual y dos o más neuronas teñidas. Sin embargo, en los bordes de algunas de las preparaciones realizadas pudimos identificar un patrón de arborización neuronal que se asemeja al de las neuronas transmedulares que ya habían sido descriptas en *crayfish* o registradas previamente

con técnicas de tinción intracelular (Figura 1.9A, Figura 6.6).

Las similitudes en la organización funcional de la lóbula del cangrejo y *crayfish* resultan destacables cuando se considera que *Astacidea* y el *Brachyura* divergieron hace más de 300 millones de años [Porter 2005] y que las especies de decápodos difieren significativamente en cuanto a su ecología y comportamiento.

Teniendo en cuenta la posición relativa de los distintos estratos tangenciales descritos previamente en la lóbula de *Neohelice*, las tinciones realizadas y el perfil de autofluorescencia de las preparaciones, pudimos hacer coincidir los estratos definidos por las arborizaciones de las neuronas transmedulares aferentes a la lóbula con las capas definidas por los procesos tangenciales. Este análisis indicaría que los elementos columnares descritos en esta tesis son presinápticos a las LG. Pero, ¿son algunos de estos elementos columnares de entrada a la lóbula directamente presinápticos a las LG?. Las neuronas LG extienden sus dendritas a través del estrato LMT2, LMT3 y APT4 [Beron de Astrada 2002, Medan 2007]. Li1 se encuentra en la lóbula distal muy por encima del estrato LMT2, mientras que el estrato Li2 se encuentra debajo del estrato LMT2. Así, Li3 que se encuentra entre el estrato APT3 y APT4 es el único estrato de entrada que en LMT3 colocalizaría con las dendritas de las LG. Sin embargo, se necesitaría más evidencia para comprobar que efectivamente hay una conexión sináptica directa entre Li3 y las dendritas de las LG como, por ejemplo, una corroboración directa mediante técnicas de microscopia electrónica o más evidencia fisiológica que combine registros electrofisiológicos de las neuronas transmedulares y las LG.

Como se mencionó en el Capítulo 1 la identificación de un ganglio que tendría características similares a la *lobula plate* de insectos, es reciente en crustáceos [Sinakevitch 2003, Sztarker 2005]. En esta tesis, aprovechando las tinciones realizadas para estudiar las neuronas transmedulares, describimos por primera vez la neuroarquitectura de la *lobula plate* de un crustáceo. Encontramos que éste ganglio recibe información colateral de neuronas que la conectan con la médula y la lóbula a través de dos tractos independientes. El seguimiento de las proyecciones neuronales llegando desde la médula y la lóbula nos permitió caracterizar el mapa retinotópico del ganglio. Identificamos cuatro estratos sobre los que arborizan distintas neuronas de proyección de la médula y la lóbula. Las características observadas en la *lobula plate* del cangrejo, ahora sí, revelan una analogía con la *lobula plate* de insectos [Fischbach 1989].

8.2. Canales visuales en *Neohelice granulata*

El análisis de la información visual permite a los animales distinguir si una imagen en movimiento corresponde, por ejemplo, a un coespecífico, un predador o una presa. Además de forma y tamaño, la evaluación visual provee información acerca de dónde y cuándo (en qué

dirección, velocidad, etc.) ocurre el movimiento con respecto al observador. La clasificación de los estímulos y su traducción en comportamientos adaptativos, podría estar dado por ensambles de neuronas con sensibilidad diferente para las distintas características o parámetros que definen las imágenes en movimiento; de esta manera, la identificación de los estímulos resultaría de la combinación de respuestas relativas de los distintos elementos del sistema. Teniendo en cuenta la complejidad espacial y temporal de las escenas visuales naturales, se podría esperar una gran diversidad de neuronas y propiedades de respuesta fisiológica necesarias para dar lugar a todo el repertorio de comportamientos complejos que presentan los animales.

En artrópodos, la segregación de los distintos canales visuales en estratos anatómicos del sistema visual ya había sido estudiada en los dos primeros neuropilos ópticos. La médula contiene el mayor número de neuronas de todos los neuropilos ópticos y está caracterizada por una gran variedad de tipos morfológicos [Strausfeld 1976, Ribi 1981]. El gran número y diversidad de interneuronas en las columnas sugiere que una segregación retinotópica de canales paralelos está teniendo lugar en cada punto de muestreo visual y esto sugeriría el cálculo de un gran número de parámetros locales tales como dirección, velocidad, orientación y contraste. Las neuronas transmedulares que estratifican en más de una capa podrían estar integrando esos distintos canales de información. Desde esta perspectiva, podrían existir neuronas dedicadas a detectar la velocidad y dirección de movimiento, la orientación de un borde, el tamaño y forma de un objeto, etc. A juzgar por el número de neuronas columnares que se originan en la médula, este ganglio constituiría una estación clave del procesamiento visual en artrópodos. En el mismo sentido, es a partir de la médula que la información visual diverge hacia distintas áreas del cerebro.

Dado que las neuronas de salida de la lóbula han sido implicadas en guiar distintas respuestas comportamentales en artrópodos, nos propusimos estudiar si la actividad de las neuronas que llevan la información visual desde la médula correlaciona con la actividad comportamental. Encontramos que el máximo de velocidad instantánea desarrollada por los animales correlaciona con la señal de calcio obtenida para distintas velocidades de desplazamiento, salvo para aquellas que son muy rápidas sugiriendo que el inicio de la respuesta de escape requiere cierto tiempo de integración de la señal visual [Zeil 2006].

En un trabajo previo del laboratorio, se estudió la importancia de la variación en el contraste entre la figura y el fondo sobre la actividad de las LG y el comportamiento [Oliva 2010]. Utilizando estímulos de aproximación observaron que las neuronas LG y los cangrejos responden preferentemente a estímulos conformados por figuras negras con fondos claros. En esta tesis, nos propusimos estudiar si ésta preferencia era, en realidad, una preferencia heredada de la sensibilidad de las neuronas presinápticas a las LG. Para ello, variamos el contraste de un frente en movimiento sobre un fondo de intensidad intermedia. Los estímulos OFF desencadenaron mayores niveles de respuesta que los estímulos ON. Sin embargo, cuando la respuesta a los frentes claros se montaban sobre una respuesta previa su influencia sobre el comportamiento se volvió relevante. Esto sugiere que sería necesario un cierto nivel mínimo de estimulación,

posiblemente sobre las LG, para superar el umbral del sistema a partir del cuál se desencadena la respuesta de escape de los animales.

Con la resolución de las imágenes de calcio lograda aquí, no hemos podido evidenciar una actividad diferencial de los estratos Li1-Li3 frente a los estímulos presentados. Sin embargo, esto no significa que no haya tal segregación. La técnica desarrollada nos permite medir la respuesta de calcio de una población de neuronas transmedulares, siendo el cambio en la fluorescencia observado el resultado de la excitación simultánea de una gran variedad de neuronas que arborizan en distintos niveles de la lóbula. Esto quiere decir que podrían existir neuronas columnares que detecten específicamente la velocidad del movimiento, su dirección o el contraste pero con la técnica empleada en este trabajo no pudimos discriminarlas. También podría ocurrir que las diferencias de actividad no se den a nivel de estratos sino a nivel de subestratos. Para poder evaluar esta posibilidad sería necesario realizar la misma serie de experimentos pero utilizando un microscopio de mayor resolución. Además podría ocurrir que haya más de un tipo celular arborizando en distintos estratos que procesen la misma información visual, pudiendo ser esta redundancia otra causa de la ausencia de segregación.

8.3. Plasticidad neuronal relacionada a comportamientos evasivos en el cangrejo

Mediante el estudio de la señal de calcio de los estratos de entrada a la lóbula encontramos que estímulos de movimiento a alta frecuencia producen una profunda reducción de la actividad de los estratos Li1-Li3 (trazo verde, Figura 8.1B). Esta reducción en la actividad anticipa el decremento en la actividad de las neuronas LG (trazo rojo, Figura 8.1B). Estos resultados muestran que, a pesar de que la adaptación comportamental a la repetición del estímulo VDS correlaciona con la actividad de las neuronas LG, la adaptación visual toma lugar un paso antes en elementos columnares de la médula. Dada la variedad de tareas a las que sirve la información visual, está claro que la reducción de la actividad neuronal como consecuencia de cierta experiencia visual no debe ocurrir en etapas de procesamiento visual en extremo tempranas (e.g. como ser fotorreceptores). La constancia en la respuesta de las neuronas monopolares (neuronas de segundo orden, trazo naranja Figura 8.1B) frente a la estimulación repetida es consistente con esta idea. Más aún, es consistente con la idea de que recién en la médula ocurre una importante canalización de la información visual y derivación de información a distintos centros nerviosos. Por otra parte, el que la plasticidad quede acotada a las columnas visuales estimuladas permite al sistema seguir respondiendo a estímulos novedosos que aparezcan en otras áreas del campo visual (Figura 8.1B, CV2).

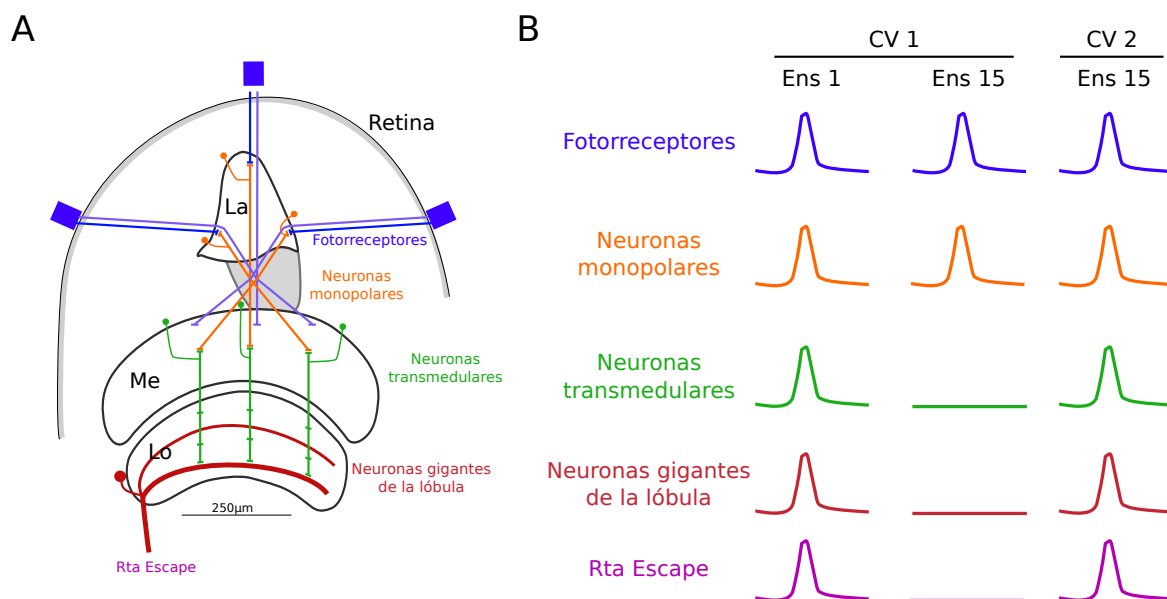


Figura 8.1: La adaptación a la presentación reiterada de un objeto en movimiento ocurre en vías visuales periféricas. **(A)** Esquema de tres de los ganglios ópticos y las neuronas que los conectan. Los fotorreceptores (azul) llevan la información a las neuronas monopolares (naranja). En la médula, las neuronas monopolares se comunican con las neuronas transmedulares (verde). Sucesivamente, las neuronas columnares se comunican con las neuronas gigantes de la lóbula (rojo), respuesta de escape de los animales (violeta) frente a un estímulo de peligro. **(B)** Esquema que ilustra la respuesta obtenida a 15 estimulaciones repetidas de un VDS. Las líneas en código de color ilustran la respuesta al ensayo 1 y al ensayo 15 en cada etapa del procesamiento. El ensayo 15 fue presentado en el mismo (CV1, panel medio) o en distinto (CV2, panel derecho) campo visual. Adaptado de [Nordström 2013] en referencia al trabajo de esta tesis.

8.4. Generalización de la adaptación

En esta tesis estudiamos también la generalización entre atributos visuales. Encontramos que existe cierto nivel de generalización y de especificidad en la respuesta para los atributos novedosos estudiados. Al no conocer acabadamente como se canaliza la información visual en los circuitos neuronales particulares resulta aventurado especular sobre posibles elementos neuronales sobre los que recaiga la plasticidad que da cuenta de los fenómenos de generalización aquí observados. Por ejemplo, ¿se debe la disminución en la respuesta del estímulo novedoso -respecto de su respuesta de base- a que éste se codifica, al menos en parte, a través circuitos neuronales compartidos con el estímulo pre-adaptado? O bien, ¿los circuitos neuronales son distintos pero la adaptación de uno disminuye la ganancia del otro? En cualquier caso, interpretamos la recuperación en la respuesta como la activación de elementos neuronales que no habían sido estimulados previamente. En el último de los experimentos del Capítulo 7, se evaluó la respuesta al cambio en uno o dos atributos visuales respecto de los ya adaptados. En los distintos ensayos de evaluación los niveles de actividad resultaron muy similares. Una posibilidad que de cuenta de este resultado es que cada combinación de atributos visuales active

una población de neuronas independiente. Por lo tanto, la respuesta obtenida al cambio en dos atributos produciría el mismo nivel de recuperación que la respuesta al cambio en un único atributo.

Por otro lado, también evaluamos la generalización de la adaptación a nivel comportamental. A pesar de lo esperado, observamos una recuperación de la respuesta comportamental que no alcanzó a ser significativa. Creemos que posiblemente el protocolo de entrenamiento utilizado haya sido muy largo, afianzando en los animales una respuesta segura, como es la de decidir quedarse quieto, al ser enfrentados con el estímulo novedoso. Sería interesante continuar con estos experimentos en un futuro, realizando modificaciones al protocolo de entrenamiento. Por otro lado, sería interesante evaluar también la respuesta comportamental del animal a estos estímulos utilizando otra aproximación experimental, como por ejemplo, medir los cambios que se producen en la respuesta cardíaca [Burnovicz 2009]. Esta es una medida muy sensible, con menor variabilidad que la respuesta de escape, y que, además, puede ser registrada al mismo momento que se toman las imágenes de fluorescencia. Más aún, esta aproximación podría permitirnos evaluar la respuesta comportamental a estímulos sutiles, como los frentes claros, que no desencadenarían respuestas de escape.

Bibliografía

- [Barnes 2002] W. Jon. Barnes, Aaron Johnson, Geoff Horseman and Martin Macauley. *Computer-aided studies of vision in crabs*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, vol. 35, no. 1-2, pages 37–56, jan 2002.
- [Barnett 2010] Paul D Barnett, Karin Nordström and David C O’Carroll. *Motion adaptation and the velocity coding of natural scenes*. Current biology : CB, vol. 20, no. 11, pages 994–9, jun 2010.
- [Behnia 2015] R Behnia and C Desplan. *Visual circuits in flies: Beginning to see the whole picture*. Current Opinion in Neurobiology, vol. 34, pages 125–132, 2015.
- [Beron de Astrada 2002] M Beron de Astrada and D Tomsic. *Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura)*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, vol. 188, no. 7, pages 539–551, 2002.
- [Beron de Astrada 2009] M Beron de Astrada, JC Tuthill and D Tomsic. *Physiology and morphology of sustaining and dimming neurons of the crab Chasmagnathus granulatus (Brachyura: Grapsidae)*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, vol. 195, no. 8, pages 791–798, 2009.
- [Beron de Astrada 2011] M Beron de Astrada, V Medan and D Tomsic. *How visual space maps in the optic neuropils of a crab*. Journal of Comparative Neurology, vol. 519, no. 9, pages 1631–1639, jun 2011.
- [Beron de Astrada 2012] M Beron de Astrada, M Bengochea, V Medan and D Tomsic. *Regionalization in the eye of the grapsid crab Neohelice granulata (=Chasmagnathus granulatus): variation of resolution and facet diameters*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, vol. 198, no. 3, pages 173–180, mar 2012.
- [Beron de Astrada 2013] M Beron de Astrada, M Bengochea, J Sztarker, A Delorenzi and D Tomsic. *Behaviorally related neural plasticity in the arthropod optic lobes*. Current biology, vol. 23, no. 15, pages 1389–98, aug 2013.
- [Berón 2003] María Paula Berón. *Dieta de juveniles de Gaviota Cangrejera (Larus atlanticus) en estuarios de la provincia de Buenos Aires*. Hornero, vol. 18, no. 2, pages 113–117, 2003.

- [Blaustein 1988] D Blaustein, CD Derby, RB Simmons and AC. Beall. *Structure of the Brain and Medulla Terminalis of the Spiny Lobster Panulirus argus and the Crayfish Procambarus clarkii, with an Emphasis on Olfactory Centers*. Journal of Crustacean Biology, vol. 8, no. 4, page 493, nov 1988.
- [Bolzon 2009] DM. Bolzon, K. Nordstrom and DC. O'Carroll. *Local and large-range inhibition in feature detection*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, vol. 29, no. 45, pages 14143–50, nov 2009.
- [Borst 1989] a Borst and M Egelhaaf. *Principles of visual motion detection*. Trends in neurosciences, vol. 12, no. 8, pages 297–306, aug 1989.
- [Borst 2002] A Borst and J Haag. *Neural networks in the cockpit of the fly*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, vol. 188, no. 6, pages 419–437, 2002.
- [Borst 2014] A Borst. *In search of the holy grail of fly motion vision*. The European journal of neuroscience, vol. 40, no. 9, pages 3285–93, nov 2014.
- [Borst 2015] A Borst and M Helmstaedter. *Common circuit design in fly and mammalian motion vision*. Nature Neuroscience, vol. 18, no. June, pages 1–10, 2015.
- [Bullock 1965] T. Bullock and G.A. Horridge. *Structure and function in the nervous systems of invertebrates.*, 1965.
- [Burnovicz 2009] A Burnovicz, D Oliva and G Hermitte. *The cardiac response of the crab Chasmagnathus granulatus as an index of sensory perception*. The Journal of experimental biology, vol. 212, no. Pt 2, pages 313–24, jan 2009.
- [Cajal 1915] SR Cajal and D Sanchez. *Contribucion al Conocimiento de los Centros Nerviosos de los Insectos*. Imprenta de Hijos de Nicholas Moja, Madrid, 1915.
- [Clark 2011] D Clark, L Bursztyn, M Horowitz, M Schnitzer and T Clandinin. *Defining the computational structure of the motion detector in Drosophila*. Neuron, vol. 70, no. 6, pages 1165–77, jun 2011.
- [Douglass 1995] J K Douglass and N J Strausfeld. *Visual motion detection circuits in flies: peripheral motion computation by identified small-field retinotopic neurons*. J Neurosci, vol. 15, no. 8, pages 5596–5611, 1995.
- [Douglass 1998] J K Douglass and N J Strausfeld. *Functionally and anatomically segregated visual pathways in the lobula complex of a calliphorid fly*. The Journal of comparative neurology, vol. 396, no. 1, pages 84–104, jun 1998.

- [Douglass 2003] J K Douglass and N J Strausfeld. *Retinotopic pathways providing motion-selective information to the lobula from peripheral elementary motion-detecting circuits*. J Comp Neurol, vol. 457, no. 4, pages 326–344, 2003.
- [Dror 2001] Ron O. Dror, David C. O’Carroll and Simon B. Laughlin. *Accuracy of velocity estimation by Reichardt correlators*. Journal of the Optical Society of America A, vol. 18, no. 2, page 241, 2001.
- [Egelhaaf 1985] M Egelhaaf. *On the neuronal basis of figure-ground discrimination by relative motion in the visual system of the fly*. Biological Cybernetics, vol. 52, no. 2, pages 123–140, jun 1985.
- [Fathala 2010a] M del V Fathala, L Iribarren, M C Kunert and H Maldonado. *A field model of learning: 1. Short-term memory in the crab Chasmagnathus granulatus*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, vol. 196, no. 1, pages 61–75, 2010.
- [Fathala 2010b] M del V Fathala, M C Kunert and H Maldonado. *A field model of learning: 2. Long-term memory in the crab Chasmagnathus granulatus*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, vol. 196, no. 1, pages 77–84, 2010.
- [Fischbach 1989] K Fischbach and A Dittrich. *The optic lobe of Drosophila melanogaster. I. A Golgi analysis of wild-type structure*. Cell and Tissue Research, vol. 258, no. 3, pages 441–475, dec 1989.
- [Fotowat 2009] H. Fotowat, A. Fayyazuddin, J. H. Bellen and F. Gabbiani. *A novel neuronal pathway for visually guided escape in Drosophila melanogaster*. J. Neurophysiol., vol. 102, pages 875–885, 2009.
- [Fotowat 2011a] H Fotowat, RR Harrison and F Gabbiani. *Multiplexing of motor information in the discharge of a collision detecting neuron during escape behaviors*. Neuron, vol. 69, no. 1, pages 147–58, jan 2011.
- [Fotowat 2011b] Haleh Fotowat and Fabrizio Gabbiani. *Collision detection as a model for sensory-motor integration*. Annual review of neuroscience, vol. 34, pages 1–19, jan 2011.
- [Frew 2004] E Frew, T Mcgee, Z Kim, X Xiao, S Jackson, M Morimoto, S Rathinam, J Padial and R Sengupta. *Vision-Based Road-Following Using a Small Autonomous Aircraft 12*. 2004.
- [Friedrich 1995] M Friedrich and D Tautz. *Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods*. Nature, vol. 376, no. 6536, pages 165–167, jul 1995.
- [Gabbiani 1999] F Gabbiani, H Krapp and G Laurent. *Computation of object approach by a wide-field, motion-sensitive neuron*. J. Neurosci., vol. 19, pages 1122– 1141, 1999.

- [Gelperin 1997] A Gelperin and J Flores. *Vital staining from dye-coated microprobes identifies new olfactory interneurons for optical and electrical recording*. Journal of neuroscience methods, vol. 72, no. 1, pages 97–108, mar 1997.
- [Glantz 1998] R M Glantz and a McIsaac. *Two-channel polarization analyzer in the sustaining fiber-dimming fiber ensemble of crayfish visual system*. Journal of neurophysiology, vol. 80, no. 5, pages 2571–83, nov 1998.
- [Glantz 2000] R M Glantz, C S Miller and D R Nässel. *Tachykinin-related peptide and GABA-mediated presynaptic inhibition of crayfish photoreceptors*. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 20, no. 5, pages 1780–1790, 2000.
- [Glantz 2001] R M Glantz. *Polarization analysis in the crayfish visual system*. J Exp Biol, vol. 204, no. Pt 14, pages 2383–2390, 2001.
- [Glantz 2002] Raymon M. Glantz and Clyde S. Miller. *Signal Processing in the Crayfish Optic Lobe: Contrast, Motion and Polarization Vision*. In The Crustacean Nervous System, pages 486–498. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2002.
- [Glantz 2006] RM. Glantz and JP. Schroeter. *Polarization contrast and motion detection*. Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology, vol. 192, no. 9, pages 905–14, sep 2006.
- [Gray 2005] JR Gray. *Habituated visual neurons in locusts remain sensitive to novel looming objects*. The Journal of experimental biology, vol. 208, no. Pt 13, pages 2515–2532, 2005.
- [Green 2004] WE Green, PY Oh and G Barrows. *Flying insect inspired vision for autonomous aerial robot maneuvers in near-earth environments*. In IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2004. Proceedings. ICRA '04. 2004, pages 2347–2352 Vol.3. IEEE, 2004.
- [Grienberger 2012] C Grienberger and A Konnerth. *Imaging calcium in neurons*. Neuron, vol. 73, no. 5, pages 862–85, mar 2012.
- [Haag 2010] J Haag, A Wertz and A Borst. *Central gating of fly optomotor response*. Pnas, vol. vol. 107, no. 46, pages 20104–20109, 2010.
- [Hafner 1973] G S Hafner. *The neural organization of the lamina ganglionaris in the crayfish: a Golgi and EM study*. The Journal of Comparative Neurology, vol. 152, no. 3, pages 255–280, 1973.
- [Hafner 1974] G S Hafner. *The ultrastructure of retinula cell endings in the compound eye of the crayfish*. Journal of Neurocytology, vol. 3, no. 3, pages 295–311, 1974.

- [Hennig 2012] P Hennig and M Egelhaaf. *Neuronal encoding of object and distance information: a model simulation study on naturalistic optic flow processing*. Frontiers in Neural Circuits, vol. 6, no. March, pages 1–15, 2012.
- [Hermitte 1999] G Hermitte, ME Pedreira, D Tomsic and H Maldonado. *Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab Chasmagnathus*. Neurobiology of Learning and Memory, vol. 71, no. 1, pages 34–49, 1999.
- [Horseman 2011] B G Horseman, M W Macauley and W J Barnes. *Neuronal processing of translational optic flow in the visual system of the shore crab Carcinus maenas*. J Exp Biol, vol. 214, no. Pt 9, pages 1586–1598, 2011.
- [Joesch 2010] M Joesch, B Schnell, SV Raghu, DF Reiff and A Borst. *ON and OFF pathways in Drosophila motion vision*. Nature, vol. 468, no. 7321, pages 300–4, nov 2010.
- [Jones 2010] Peter W Jones and Fabrizio Gabbiani. *Synchronized neural input shapes stimulus selectivity in a collision-detecting neuron*. Curr Biol, vol. 20, no. 22, pages 2052–2057, nov 2010.
- [Jung 2011] Sarah Nicola Jung, Alexander Borst and Juergen Haag. *Flight activity alters velocity tuning of fly motion-sensitive neurons*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, vol. 31, no. 25, pages 9231–7, jun 2011.
- [Kaczer 2007] L Kaczer, S Pedetta and H Maldonado. *Aggressiveness and memory: subordinate crabs present higher memory ability than dominants after an agonistic experience*. Neurobiology of Learning and Memory, vol. 87, no. 1, pages 140–148, 2007.
- [Kaczer 2011] L Kaczer, M Klappenbach and H Maldonado. *Dissecting mechanisms of reconsolidation: octopamine reveals differences between appetitive and aversive memories in the crab Chasmagnathus*. European Journal of Neuroscience, vol. 34, no. 7, pages 1170–1178, oct 2011.
- [Killmann 1985] F Killmann and F. Schurmann. *Both electrical and chemical transmission between the lobula giant movement detector and the descending contralateral movement detector neurons of locusts are supported by electron microscopy*. J. Neurocytol., vol. 14, pages 637–52, 1985.
- [Klappenbach 2012] M Klappenbach, H Maldonado, F Locatelli and L Kaczer. *Opposite actions of dopamine on aversive and appetitive memories in the crab*. Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.), vol. 19, no. 2, pages 73–83, jan 2012.

- [Kleinlogel 2003] S Kleinlogel, NJ Marshall, JM Horwood and MF Land. *Neuroarchitecture of the color and polarization vision system of the stomatopod Haptosquilla*. The Journal of Comparative Neurology, vol. 467, no. 3, pages 326–342, dec 2003.
- [Kobbert 2000] C Kobbert, R Apps, I Bechmann, J L Lanciego, J Mey and S Thanos. *Current concepts in neuroanatomical tracing*. Progress in neurobiology, vol. 62, no. 4, pages 327–351, nov 2000.
- [Koch 1989] C Koch. *Seeing Chips: Analog VLSI Circuits for Computer Vision*. Neural Computation, vol. 1, no. 2, pages 184–200, 1989.
- [Koenderink 1987] JJ Koenderink and AJ van Doorn. *Facts on optic flow*. Biological Cybernetics, vol. 56, no. 4, pages 247–254, jun 1987.
- [Krapp 1998] H G Krapp, B Hengstenberg and R Hengstenberg. *Dendritic structure and receptive-field organization of optic flow processing interneurons in the fly*. J Neurophysiol, vol. 79, no. 4, pages 1902–1917, 1998.
- [Layne 1997] J Layne, M Land and J Zeil. *Fiddler crabs use the visual horizon to distinguish predators from conspecifics: a review of the evidence*. J Mar Biol Ass UK, vol. 77, pages 43–54, 1997.
- [Lozada 1990] M Lozada, A Romano and H Maldonado. *Long-term habituation to a danger stimulus in the crab Chasmagnathus granulatus*. Physiology & Behavior, vol. 47, no. 1, pages 35–41, 1990.
- [Maisak 2013] M Maisak, J Haag, G Ammer, E Serbe, M Meier, A Leonhardt, T Schilling, A Bahl, GM Rubin, A Nern, B Dickson, Di Reiff, E Hopp and A Borst. *A directional tuning map of Drosophila elementary motion detectors*. Nature, vol. 500, no. 7461, pages 212–6, aug 2013.
- [Maldonado 2002] H Maldonado. *Crustaceans as models to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in Chasmagnathus*. The crustacean nervous system, pages 314–327, 2002.
- [Medan 2007] V Medan, D Oliva and D Tomsic. *Characterization of lobula giant neurons responsive to visual stimuli that elicit escape behaviors in the crab Chasmagnathus*. Journal of neurophysiology, vol. 98, no. 4, pages 2414–28, oct 2007.
- [Medan 2008] V Medan. *Caracterización morfológico-funcional de neuronas sensibles al movimiento involucradas en comportamientos visuales del cangrejo Chasmagnathus*. PhD thesis, Buenos Aires, 2008.

- [Medan 2015] V Medan, M Beron De Astrada, F Scarano and D Tomsic. *A network of visual motion-sensitive neurons for computing object position in an arthropod*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, vol. 35, no. 17, pages 6654–66, 2015.
- [Meier 2014] M Meier, E Serbe, MS Maisak, J Haag, BJ Dickson and A Borst. *Neural circuit components of the Drosophila OFF motion vision pathway*. Current biology : CB, vol. 24, no. 4, pages 385–92, feb 2014.
- [Nakagawa 2010] H. Nakagawa and K. Hongjian. *Collision-sensitive neurons in the optic tectum of the bullfrog, Rana catesbeiana*. J. Neurophysiol., vol. 104, pages 2487–2499, 2010.
- [Nakayama 1985] K Nakayama. *BIOLOGICAL IMAGE MOTION PROCESSING: A REVIEW*. Vision Res, vol. 25, no. 5, pages 63–660, 1985.
- [Nässel 1975] D R Nässel. *The organization of the lamina ganglionaris of the prawn, Pandalus borealis (Kröyer)*. Cell and Tissue Research, vol. 163, no. 4, pages 445–464, nov 1975.
- [Nässel 1977] D R Nässel. *Types and arrangements of neurons in the crayfish optic lamina*. Cell and Tissue Research, vol. 179, no. 1, pages 45–75, 1977.
- [Nordström 2006] K Nordström and DC O’Carroll. *Small object detection neurons in female hoverflies*. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society, vol. 273, no. February, pages 1211–1216, 2006.
- [Nordström 2009] K Nordström and DC O’Carroll. *Feature detection and the hypercomplex property in insects*. Trends in neurosciences, vol. 32, no. 7, pages 383–91, jul 2009.
- [Nordström 2012] K Nordström. *Neural specializations for small target detection in insects*, 2012.
- [Nordström 2013] Karin Nordström and Paloma T. Gonzalez-Bellido. *Invertebrate vision: Peripheral adaptation to repeated object motion*. Current Biology, vol. 23, no. 15, pages 655–656, 2013.
- [O’Carroll 1993] D O’Carroll. *Feature-detecting neurons in dragonflies*. nature, pages 541–543, 1993.
- [Olberg 1981] RM. Olberg. *Object- and self-movement detectors in the ventral nerve cord of the dragonfly*. Journal of Comparative Physiology ? A, vol. 141, no. 3, pages 327–334, 1981.
- [Olberg 1986] M Olberg. *Identified target-selective visual interneurons descending from the dragonfly brain.*, 1986.

- [Olberg 2012] RM Olberg. *Visual control of prey-capture flight in dragonflies.*, 2012.
- [Oliva, D & Tomsic 2012] D Oliva, D & Tomsic. *Visuo-motor transformations involved in the escape response to looming stimuli in the crab Neohelice (Chasmagnathus) granulata.*, 2012.
- [Oliva 2007] D Oliva, V Medan and D Tomsic. *Escape behavior and neuronal responses to looming stimuli in the crab Chasmagnathus granulatus (Decapoda: Grapsidae).* The Journal of Experimental Biology, vol. 210, no. Pt 5, pages 865–880, 2007.
- [Oliva 2010] D Oliva. *Mecanismos de detección visual y evitación de colisiones en un nuevo modelo experimental , el cangrejo Chasmagnathus granulatus.* 2010.
- [Oliva 2014] D Oliva and D Tomsic. *Computation of object approach by a system of visual motion-sensitive neurons in the crab Neohelice.* Journal of Neurophysiology, vol. 112, no. 6, pages 1477–1490, 2014.
- [Oliva 2016] D Oliva and D Tomsic. *Object approach computation by a giant neuron and its relation with the speed of escape in the crab Neohelice.* The Journal of Experimental Biology, no. September, 2016.
- [O’Shea 1974] Michael O’Shea and J. L D Williams. *The anatomy and output connection of a locust visual interneurone; the lobular giant movement detector (LGMD) neurone.* Journal of Comparative Physiology, vol. 91, no. 3, pages 257–266, 1974.
- [Paulk 2008] AC Paulk, J Phillips-Portillo, AM Dacks, JM Fellous and W Gronenberg. *The processing of color, motion, and stimulus timing are anatomically segregated in the bumblebee brain.* J Neurosci, vol. 28, no. 25, pages 6319–6332, jun 2008.
- [Paulk 2009] AC Paulk, A Dacks and W Gronenberg. *Color processing in the medulla of the bumblebee (Apidae: Bombus impatiens).* The Journal of comparative neurology, vol. 513, no. 5, pages 441–56, apr 2009.
- [Pedetta 2010] S Pedetta, L Kaczer and H Maldonado. *Individual aggressiveness in the crab Chasmagnathus: Influence in fight outcome and modulation by serotonin and octopamine.* Physiology & Behavior, vol. 101, no. 4, pages 438–445, nov 2010.
- [Pedreira 1996] ME Pedreira, B Dimant and H Maldonado. *Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab Chasmagnathus.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, vol. 54, no. 3, pages 611–617, 1996.
- [Pedreira 1998] M E Pedreira, A Romano, D Tomsic, M Lozada and H Maldonado. *Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab Chasmagnathus.* Animal Learning and Behavior, vol. 26, no. 1, pages 34–45, 1998.

- [Porter 2005] ML Porter, M Pérez-Losada and K Crandall. *Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times*. Molecular phylogenetics and evolution, vol. 37, no. 2, pages 355–69, nov 2005.
- [Preuss 2006] T. Preuss, P.E. Osei-Bonsu, C. Weiss, S.A., Wang and D.S. Faber. *Neural representation of object approach in a decision-making motor circuit*. J. Neurosci., vol. 26, pages 3454–3464, 2006.
- [Reichardt 1961] W Reichardt. *Autocorrelation, a principle for the evaluation of sensory information by the central nervous system.*, 1961.
- [Ribi 1981] WilliA. Ribi and Marlies Scheel. *The second and third optic ganglia of the worker bee*. Cell And Tissue Research, vol. 221, no. 1, pages 17–43, nov 1981.
- [Richter 2002] S Richter. *Evolution of Optical Design in the Malacostraca (Crustacea)*. In The Crustacean Nervous System, pages 512–524. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2002.
- [Rind 1984] FC Rind. *A chemical synapse between two motion detecting neurones in the locust brain.*, 1984.
- [Rowell 1976] C Rowell, M O 'Shea, J Williams and B O 'Shea. *THE NEURONAL BASIS OF A SENSORY ANALYSER , THE ACRIDID MOVEMENT DETECTOR SYSTEM*. J. exp. Biol, vol. 68, no. 2, pages 289–308, oct 1976.
- [Rowell 1977] CHF Rowell, M OShea and JLD Williams. *The neuronal basis of a sensory analyser, the acridid movement detector system: IV, The preference for small-field stimuli*. pages 157–185, 1977.
- [Sandeman 1992] D Sandeman, R Sandeman and CM Schmidt. *Morphology of the Brain of Crayfish , Crabs , and Spiny Lobsters : A Common Nomenclature for Homologous Structures*. no. 1985, pages 304–326, 1992.
- [Sandeman 1993] D C Sandeman, G Scholtz and R E Sandeman. *Brain evolution in decapod Crustacea*. Journal of Experimental Zoology, vol. 265, no. 2, pages 112–133, 1993.
- [Sanes 2010] J R Sanes and S L Zipursky. *Design principles of insect and vertebrate visual systems*. Neuron, vol. 66, no. 1, pages 15–36, 2010.
- [Schindelin 2012] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, J. Tinevez, Da White, V Hartenstein, Kevin Eliceiri, P Tomancak and A Cardona. *Fiji: an open source platform for biological image analysis*. Nature Methods, vol. 9, no. 7, pages 676–682, 2012.

- [Shinomiya 2014] K Shinomiya, T Karuppudurai, TY Lin, Z Lu, CH Lee and IA Meinertzhagen. *Candidate Neural Substrates for Off-Edge Motion Detection in Drosophila*. Current Biology, vol. 24, no. 10, pages 1062–1070, may 2014.
- [Silies 2013] M Silies, DM Gohl, YE Fisher, L Freifeld, DA Clark and TR Clandinin. *Modular Use of Peripheral Input Channels Tunes Motion-Detecting Circuitry*. Neuron, vol. 79, no. 1, pages 111–127, jul 2013.
- [Sinakevitch 2003] I Sinakevitch, J K Douglass, G Scholtz, R Loesel and N J Strausfeld. *Conserved and convergent organization in the optic lobes of insects and isopods, with reference to other crustacean taxa*. The Journal of comparative neurology, vol. 467, no. 2, pages 150–72, dec 2003.
- [Stach 2005] S Stach and M Giurfa. *The influence of training length on generalization of visual feature assemblies in honeybees*. Behavioural Brain Research, vol. 161, no. 1, pages 8–17, 2005.
- [Strausfeld 1970] N J Strausfeld and A D Blest. *Golgi studies on insects. Part I. The optic lobes of Lepidoptera*. Philos Trans Roy Soc Lond B, vol. 258, pages 81–223, 1970.
- [Strausfeld 1976] Nicholas James Strausfeld, editeur. Atlas of an Insect Brain. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1976.
- [Strausfeld 1980] N J Strausfeld and D R Nässel. *Neuroarchitectures serving compound eyes of Crustacea and insects*. Handbook of sensory physiology, vol. 7, page 68, 1980.
- [Strausfeld 1991] N J Strausfeld and J K Lee. *Neuronal basis for parallel visual processing in the fly*. Vis Neurosci, vol. 7, no. 1-2, pages 13–33, 1991.
- [Strausfeld 1998] N J Strausfeld. *Crustacean-insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates*. Brain Behav Evol, vol. 52, no. 4-5, pages 186–206, 1998.
- [Strother 2014] J Strother, A Nern and M Reiser. *Direct observation of ON and OFF pathways in the Drosophila visual system*. Current biology : CB, vol. 24, no. 9, pages 976–83, may 2014.
- [Sun 1998] H Sun and E Frost. *Computation of different optical variables of looming objects in pigeon nucleus rotundus neurons*. Nat. Nat Neurosci, vol. 1, pages 296–303, 1998.
- [Sztarker 2004] J Sztarker and D Tomsic. *Binocular visual integration in the crustacean nervous system*. Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, vol. 190, no. 11, pages 951–962, nov 2004.

- [Sztarker 2005] J Sztarker, NJ Strausfeld and D Tomsic. *Organization of optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab*. J Comp Neurol, vol. 493, no. 3, pages 396–411, 2005.
- [Sztarker 2006] J Sztarker. *Organizacion neuroanatomica y funcional de neuronas involucradas en diferentes aspectos del aprendizaje visual de Chasmagnathus*. PhD thesis, Buenos Aires, 2006.
- [Sztarker 2008] J Sztarker and D Tomsic. *Neuronal correlates of the visually elicited escape response of the crab Chasmagnathus upon seasonal variations, stimuli changes and perceptual alterations*. Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, vol. 194, no. 6, pages 587–596, 2008.
- [Sztarker 2009] J Sztarker, N Strausfeld, D Andrew and D Tomsic. *Neural organization of first optic neuropils in the littoral crab Hemigrapsus oregonensis and the semiterrestrial species Chasmagnathus granulatus*. The Journal of Comparative Neurology, vol. 513, no. 2, pages 129–150, 2009.
- [Sztarker 2011] J Sztarker and D Tomsic. *Brain modularity in arthropods: individual neurons that support "what" but not "where" memories*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, vol. 31, no. 22, pages 8175–80, jun 2011.
- [Sztarker 2014] J Sztarker and D Tomsic. *Neural organization of the second optic neuropil, the medulla, in the highly visual semiterrestrial crab Neohelice granulata*. Journal of Comparative Neurology, vol. 522, no. 14, pages 3177–3193, 2014.
- [Takemura 2011] S Takemura, T Karuppururai, CY Ting, Z Lu, CH Lee and I Meinertzhagen. *Cholinergic circuits integrate neighboring visual signals in a Drosophila motion detection pathway*. Current biology : CB, vol. 21, no. 24, pages 2077–84, dec 2011.
- [Tomsic 2003] D Tomsic, M Beron de Astrada and J Sztarker. *Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod*. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 23, no. 24, pages 8539–8546, 2003.
- [Tomsic 2013] D Tomsic and A Romano. *A Multidisciplinary Approach to Learning and Memory in the Crab Neohelice (Chasmagnathus) granulata*, volume 22. Elsevier Inc., 2013.
- [Utting 2000] M Utting, H Agricola, R Sandeman and D Sandeman. *Central complex in the brain of crayfish and its possible homology with that of insects*. The Journal of comparative neurology, vol. 416, no. 2, pages 245–61, jan 2000.

- [Wang-Bennett 1987] Lolin T. Wang-Bennett and Raymon M. Glantz. *The functional organization of the crayfish lamina ganglionaris*. Journal of Comparative Physiology A, vol. 161, no. 1, pages 147–160, 1987.
- [Wang-Bennett 1989] LT T Wang-Bennett, C Pfeiffer, J Arnold and RM M Glantz. *Acetylcholine in the crayfish optic lobe: concentration profile and cellular localization*. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, vol. 9, no. 6, pages 1864–1871, 1989.
- [Wu 2016] M Wu, A Nern, W Williamson, M Morimoto, M Reiser, G Card, G Rubin, M Dabauvalle, M. Schmidt, G. Qin, C. Wichmann, R. Kittel, S.J. Sigrist, E. Buchner, CR. Gerfen, X. Zhuang, Y. Wang, GM. Rubin, LL. Looger, C. Sigmund, GM. Rubin, LK. Scheffer, IA. Meinertzhagen, DB. Chklovskii, TR. Laverty, F. Long, L. Qu, SD. Murphy, K. Rokicki, T. Safford, K. Shaw, JH. Simpson, A. Sowell, S. Tae, Y. Yu and CT. Zugates. *Visual projection neurons in the Drosophila lobula link feature detection to distinct behavioral programs*. eLife, vol. 5, pages E2391–E2398, dec 2016.
- [Yoshino 1983] M. Yoshino, Y. Kondoh and M. Hisada. *Projection of statocyst sensory neurons associated with crescent hairs in the crayfish Procambarus clarkii Girard*. Cell and Tissue Research, vol. 230, no. 1, pages 37–48, mar 1983.
- [Zeil 2006] J Zeil and J Hemmi. *The visual ecology of fiddler crabs*. Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology, vol. 192, no. 1, pages 1–25, jan 2006.
- [Zhang 2003] W Zhang and D Linden. *The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability*. Nature reviews. Neuroscience, vol. 4, no. 11, pages 885–900, nov 2003.
- [Zufferey 2007] JC Zufferey, A Klaptocz, A Beyeler, JD Nicoud and D Floreano. *A 10-gram vision-based flying robot*. Advanced Robotics, vol. 21, no. 14, pages 1671–1684, jan 2007.