

Tesis Doctoral

Neuronas binoculares y neuronas direccionales de un artrópodo y sus posibles funciones en comportamientos guiados visualmente

Scarano, María Florencia

2018

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:

Scarano, María Florencia. (2018). Neuronas binoculares y neuronas direccionales de un artrópodo y sus posibles funciones en comportamientos guiados visualmente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6367_Scarano

Cita tipo Chicago:

Scarano, María Florencia. "Neuronas binoculares y neuronas direccionales de un artrópodo y sus posibles funciones en comportamientos guiados visualmente". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6367_Scarano

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

Neuronas binoculares y neuronas direccionales de un artrópodo y sus posibles funciones en comportamientos guiados visualmente

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

Lic. María Florencia Scarano

Director de Tesis: **Dr. Daniel Tomsic**
Directora Asistente: **Dra. Julieta Sztarker**
Consejero de Estudios: **Dr. Daniel Tomsic**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria. Departamento de
Fisiología, Biología Molecular y Celular (DFBMC-UBA)
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET)

Buenos Aires, Abril 2018

Resumen

Título: Neuronas binoculares y neuronas direccionales de un artrópodo y sus posibles funciones en comportamientos guiados visualmente

Los artrópodos son animales muy activos y en gran medida guían su comportamiento por la visión. Estas características en combinación con ventajas destacables para el abordaje experimental, hacen que algunos artrópodos sean modelos muy utilizados en el estudio de los mecanismos neurofisiológicos y los principios computacionales que subyacen a la detección visual de movimientos. La mayoría de los artrópodos tienen dos ojos formadores de imágenes y, como en otros animales visuales, algunos de sus comportamientos fundamentales requieren combinar la información que ingresa por ambos. Sin embargo, poco se sabe a nivel neurofisiológico sobre el modo en que los artrópodos integran la información proveniente de ambos ojos. Además de procesos de integración binocular, muchos comportamientos requieren de la percepción visual de la dirección de los objetos en movimiento. Por ejemplo, la habilidad para perseguir a una presa que se mueve requiere mantener su imagen fija en una región de la retina, lo que implica percibir continuamente las direcciones en que la imagen se desvía del punto de fijación. El conocimiento de los elementos neurales y mecanismos por los cuales los artrópodos llevan adelante los comportamientos de fijación y seguimiento visual de objetos que se mueven, son aun más desconocidos que en lo mencionado para el procesamiento binocular.

Realizando registros intracelulares en el animal intacto y no anestesiado, investigamos las respuestas electrofisiológicas de un gran número de neuronas gigantes de la lóbula (tercer neuropilo óptico) a estímulos visuales de movimiento presentados en distintas partes del campo visual, en condiciones de visión binocular y monocular. La gran mayoría de las neuronas con campo receptivo orientado frontalmente mostraron responder a estímulos presentados tanto a uno como a otro ojo por separado, es decir mostraron tener respuestas binoculares. El rango de binocularidad observado comprende desde neuronas exclusivamente binoculares, pasando por neuronas de respuesta binocular y monocular equivalentes, hasta neuronas estrictamente monoculares. Considerando el perfil eléctrico de cada neurona distinguimos los registros como presinápticos o postsinápticos, a partir de lo cual clasificamos a cada neurona registrada como ipsilateral o contralateral al lado de registro. Mientras las primeras proyectarían desde la lóbula enviando río abajo la información visual (neuronas centrípetas), las

segundas traerían hacia la lóbula la información visual percibida desde el ojo contralateral (neuronas centrífugas). Un análisis de la intensidad y de la latencia de respuesta monocular y binocular de las neuronas ipsilaterales y contralaterales por separado, reveló resultados coincidentes con estas predicciones. La interpretación de estos y otros resultados nos condujo a formular un modelo circuital simple, aunque de gran valor heurístico, de la transferencia interocular de información visual de movimiento en un artrópodo.

Por otro lado, descubrimos y caracterizamos neuronas altamente sensibles al sentido y la dirección de movimiento de objetos. Encontramos que estas neuronas responden con alta frecuencia de potenciales de acción cuando un objeto se mueve alejándose del punto visual de fijación del animal, y se inhiben toda vez que el objeto se dirige hacia allí. Se trataría de un sistema de neuronas detectoras de desvío al servicio de comportamientos que implican la fijación y seguimiento visual de objetos que se mueven. Luego de caracterizar fisiológicamente a estas neuronas realizamos marcaciones intracelulares que permitieron identificarlas morfológicamente. Todas las neuronas direccionales que marcamos mostraron amplias arborizaciones en la lóbula, proyectando hacia el protocerebro lateral en donde se ramificaron en un glomérulo óptico específico, una estructura anatómica bien delimitada y hasta ahora no descripta. Además, mostraron una proyección hacia la *lobula plate*, llegándose a observar, en algunos casos, arborizaciones en la misma.

Animales tan diversos como humanos y moscas comparten la necesidad de procesar eficazmente la información visual de movimientos para navegar evitando colisiones, seguir el movimiento de objetos, estimar distancias, etc. Estos desafíos compartidos llevan a suponer que los mecanismos fundamentales de detección visual de movimiento podrían ser comunes a diversos organismos. Los resultados de esta tesis aportan datos sobre dos aspectos del procesamiento visual casi inexplorados en artrópodos, que sin duda cumplen funciones muy relevantes en la organización de sus comportamientos, como lo son la integración binocular y la detección de la dirección de movimientos.

Palabras clave: artrópodo, cangrejo, *Neohelice granulata*, visión, electrofisiología, binocularidad, Neuronas gigantes de la lóbula, Neuronas sensibles a la dirección, glomérulo óptico.

Abstract

Title: Binocular neurons and directional neurons of an arthropod and their possible role in visually guided behaviors

Arthropods are very active animals and largely guide their behavior by vision. These characteristics in combination with remarkable advantages for experimentation make some arthropods suitable models for studying the neurophysiological mechanisms and the computational principles that underlie visual motion detection. Most arthropods have two image-forming eyes and, as in other visual animals, some of their fundamental behaviors require combining the information that enters through both of them. However, little is known at the neurophysiological level about the way in which arthropods integrate the information coming from both eyes. In addition to binocular integration processes, many behaviors require visual perception of the direction of motion. For example, the ability to pursue a moving prey requires fixing and tracking it with a region of the retina, which implies perceiving the directions in which the image deviates from the fixation point. The knowledge of the neural elements and mechanisms by which the arthropods carry out the behaviors of fixation and visual tracking of a moving object are even more unknown than the aforementioned binocular processing.

Performing intracellular recordings in the third optic neuropil of an intact and non-anesthetized animal, we investigated the electrophysiological responses of a large number of lobula giant neurons to visual motion stimuli presented in different parts of the visual field, under binocular and monocular conditions. The vast majority of neurons with a frontally oriented receptive field were shown to respond to stimuli presented to one eye and to the other eye separately, that is, they showed binocular responses. The range of observed binocularity encompasses exclusively binocular neurons, neurons with equivalent binocular and monocular responses, and strictly monocular neurons. Considering the electrical profile of each neuron, we characterized the recordings as presynaptic or postsynaptic. Accordingly, we classified each recorded neuron as ipsilateral or contralateral in relation to the registration side. While the former would project downstream from the lobula (centripetal neurons), the latter would bring to the lobula the visual information perceived from the contralateral eye (centrifugal neurons). An analysis of the intensity and latency of monocular and binocular responses of ipsilateral and contralateral neurons separately yielded results supporting these predictions. The interpretation of these and other results led us to propose a simple circuitual model with

heuristic value of the interocular transference of visual motion information in an arthropod.

On the other hand, we discovered and characterized neurons highly sensitive to the direction of movement of objects. We found that these neurons respond with high frequency of action potentials when an object moves away from the visual fixation point of the animal, and they are inhibited whenever the object is directed towards it. This appears to represent a system of deviation detector neurons at the service of those behaviors that involve the fixation and visual tracking of moving objects. After physiologically characterizing these neurons, we performed intracellular staining that allowed us to identify them morphologically. All the stained directional neurons showed extensive arborization in the lobula, projecting towards the lateral protocerebrum where they branched into a specific optic glomerulus, a well-defined anatomical structure previously undescribed. In addition, they showed a projection towards the lobula plate, where arborizations could be seen in some preparations.

Animals as diverse as humans and flies share the need to efficiently process motion visual information to navigate avoiding collisions, to follow the movement of objects, to estimate distances, etc. This makes tenable to assume that common fundamental mechanisms for visual motion processing may exist in different organisms. The results of this thesis provide substantial data on two aspects of the visual processing so far almost unexplored in arthropods, such as binocular integration and detection of the direction of movements, which undoubtedly fulfill very important functions in the organization of their behaviors.

Key words: arthropod, crab, *Neohelice granulata*, vision, electrophysiology, binocularity, Lobula giant neurons, Direction sensitive neurons, optic glomeruli.

A la vida...

Abreviaturas

DOG: *directional optic glomerulus* - Glomérulo óptico direccional

EB: estímulo barra

EP: estímulo panorámico

EVP: estímulo visual de peligro

ICM: índice de contribución monocular

IPL: índice de preferencia de lado

IPO: índice de preferencia por objetos

IPP: índice de persistencia de respuesta frente al estímulo panorámico

IPB: índice de persistencia de respuesta frente a repeticiones del estímulo barra

LCDC: *lobula complex directional cell* – Célula direccional del complejo lobular

LG: *lobula giant* – Gigante de la lóbula

PA: potencial de acción

RO: respuesta optomotora

Índice

Introducción general.....	1
1. Invertebrados como modelos para estudiar sistemas visuales	4
2. El cangrejo <i>Neohelice granulata</i> como modelo de estudio.....	5
3. Anatomía del sistema nervioso en artrópodos	8
4. Los lóbulos ópticos y el sistema visual de <i>Neohelice</i>	9
5. Retinotopía de los neuropilos ópticos	11
6. Neuronas gigantes de la lóbula (LG)	13
7. Integración visual binocular	16
8. Neuronas visuales binoculares.....	17
9. Comportamientos visuales de fijación.....	21
10. Resumen de antecedentes de neuronas direccionales en artrópodos.....	25
Hipótesis y objetivos	28
Materiales y métodos.....	29
1. <i>Neohelice granulata</i>	30
2. Registros electrofisiológicos.....	30
2.1. Preparación	30
2.2. Dispositivo experimental.....	32
3. Estímulos visuales.....	33
4. Protocolo de registro y estimulación	34
5. Tinciones intracelulares	35
6. Análisis estadístico	36
Resultados. Parte 1: Integración de la información binocular en <i>Neohelice granulata</i>.....	37
Materiales y métodos.....	38
1. División reversible del campo visual	38
2. Oclusión monocular reversible	39
3. Estímulos visuales utilizados	40
4. Análisis de datos.....	40
5. Registros simultáneos intracelulares de neuronas en ambos lóbulos ópticos.....	42
<u>Capítulo 1:</u> Transferencia contralateral de información visual de movimiento	43
Resultados	43
1. Respuesta de las LG a estímulos contralaterales, ipsilaterales y bilaterales.....	43
2. Clasificación de neuronas LG por su grado de integración binocular	47
3. Contribuciones de cada ojo a la respuesta binocular de las LG.....	51
4. ¿Binocularidad o ampliación de campos receptivos?	54
5. Comparación entre las contribuciones de cada ojo a la respuesta binocular de las LG frente a distintas direcciones de movimiento	56

Conclusiones.....	59
Capítulo 2: Neuronas ipsilaterales y contralaterales de la lóbula.....	61
Resultados	61
1. Clasificación de los registros de las neuronas de la lóbula en presinápticos y postsinápticos.....	61
2. Análisis de la intensidad y latencia de respuesta de neuronas pre y postsinápticas	64
3. Proyecciones de las neuronas de la lóbula	66
4. Registros intracelulares simultáneos en las dos lóbulas	69
Discusión.....	70
Apéndice de casos particularmente interesantes registrados ocasionalmente...	74
1. Neuronas de campo receptivo dinámico.....	74
2. Binocularidad diferencial.....	76
Discusión.....	78
Discusión general de la Parte 1	79
Resultados. Parte 2: Control neuronal de comportamientos de fijación y seguimiento visual de objetos que se mueven	86
Capítulo 3: Caracterización fisiológica de las LCDC.....	88
Materiales y métodos.....	88
1. Estímulos visuales utilizados y posicionamiento del cangrejo en relación a los monitores de estimulación.....	88
2. Estimación de campos receptivos	89
3. Índices de comparación.....	89
Resultados	91
1. Respuesta diferencial a la dirección y sentido de movimiento de un objeto	91
2. Campo receptivo.....	94
3. Efecto de las repeticiones del estímulo.....	104
4. Respuesta a un estímulo panorámico	106
Discusión.....	111
Capítulo 4: Caracterización morfológica de las LCDC	117
Introducción	117
1. La lóbula de <i>Neohelice granulata</i>	117
2. La <i>lobula plate</i> y el complejo lobular de <i>Neohelice granulata</i>	119
Materiales y métodos.....	121

1. Caracterización y reconstrucción morfológica	121
Resultados	121
1. Caracterización morfológica.....	121
2. Correspondencia entre ubicación del árbol dendrítico y área del campo receptivo	128
Discusión.....	130
Capítulo 5: El glomérulo óptico direccional.....	134
Introducción	134
Materiales y métodos.....	135
1. Reconstrucción de la forma y posición del glomérulo óptico direccional.....	135
2. Análisis de preparados histológicos.....	135
Resultados	136
Discusión.....	141
Discusión general de la Parte 2.....	144
Bibliografía.....	150

Introducción general

Hace más de 600 millones de años, aparecieron en organismos primitivos los primeros fotorreceptores capaces de detectar la luz. Probablemente, estos organismos acuáticos se vieron favorecidos utilizando la fototaxia para la migración vertical y por la aparición de los ritmos circadianos (Nilsson, 2009). Fue luego, durante la explosión cámbrica que ocurrió hace 540 millones de años, que los planes corporales de los animales comenzaron a evolucionar rápidamente (Conway Morris, 2000a, 2000b, 2006) y con ellos emergieron los ojos formadores de imágenes y los sistemas visuales. Desde ese momento los ojos y los cerebros se han diversificado y han evolucionado adquiriendo nuevas capacidades de procesamiento visual que permiten a muchos animales guiar una enorme cantidad de comportamientos esenciales para su supervivencia.

De este modo, los animales que guían su comportamiento con la visión, extraen constantemente información del entorno en el que están inmersos. El sentido de la visión permite obtener información a distancia de manera inmediata. Características tales como el color, la forma, el movimiento, muchas de ellas incluso imperceptibles por el ojo humano como por ejemplo el ángulo de polarización de la luz, permiten a los animales determinar el significado de los estímulos y así decidir cómo responder. En particular, la detección visual de movimientos, está presente en casi todos los animales capaces de ver y, junto a la detección de luz y oscuridad, serían las más antiguas y básicas de las capacidades visuales (Nakayama, 1985). La visión del movimiento permite obtener claves del entorno, procesarlas y así obtener información sobre el tamaño, distancia y velocidad de un determinado objeto.

Las imágenes en movimiento se proyectan sobre la retina y se descomponen en miles de puntos. En cada uno de ellos, la luminosidad y el contraste varían generando, en conjunto, un patrón espaciotemporal sumamente dinámico. Esa señal es captada en cada uno de los ojos por los fotorreceptores, procesada en la retina y luego a través de complejos circuitos cerebrales para ser interpretada por el animal como movimiento.

Los desplazamientos de imágenes sobre la retina (estímulos de movimiento) pueden tener dos orígenes diferentes. Por un lado existen los que se generan como consecuencia de los movimientos propios del animal (movimientos egocéntricos), generando un flujo óptico consistente en el desplazamiento de todo el panorama visual (figura 1A, B). Por otro lado, los desplazamientos de imágenes sobre la retina pueden provenir del movimiento de objetos externos. En este último caso el movimiento ocurre en porciones discretas de la retina, mientras que el panorama general se mantiene estático (movimientos alocéntricos). Los movimientos egocéntricos generan sobre la retina un flujo óptico que puede descomponerse en dos. Por un lado los que corresponden al

movimiento de rotación, pueden describirse con una matriz de vectores paralelos entre sí, con un mismo sentido (figura 1A). Por otro lado los que corresponden al desplazamiento en línea recta o traslación pueden representarse con una matriz en donde los vectores están alineados radialmente alrededor del foco de expansión (figura 1B)(Krapp et al., 1998). Los movimientos alocéntricos en un fondo estático generan sobre la retina un patrón que puede describirse con una matriz en la que todos los vectores tienen valor nulo excepto aquellos que describen al objeto que se está moviendo (figura 1C).

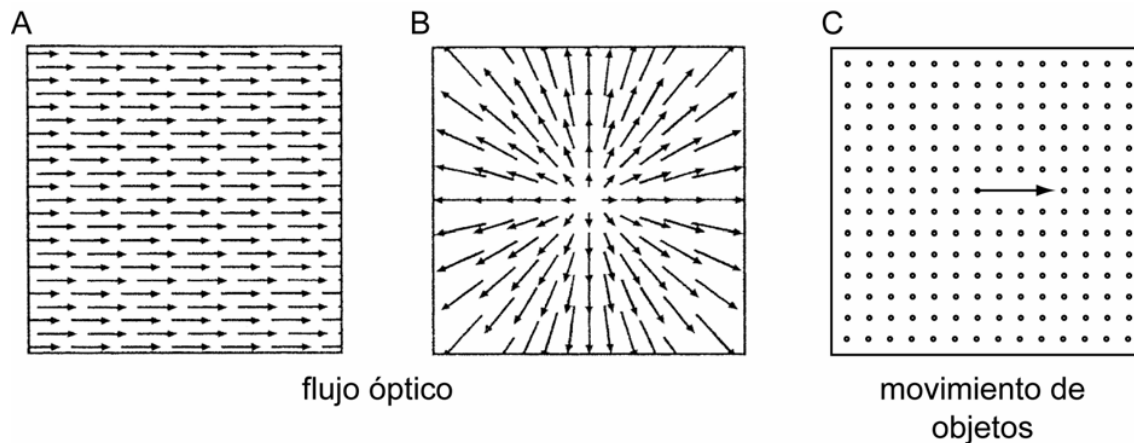


Figura 1. Vectores de velocidad que se generan en la retina como consecuencia de movimientos egocéntricos o alocéntricos. A. En un animal que rota en sentido antihorario sobre su eje. B. En un animal que se traslada en línea recta hacia adelante. La longitud de cada vector es proporcional a la velocidad del flujo óptico, por lo que durante la traslación la velocidad es cero en la dirección de avance y los puntos más alejados tienen mayor velocidad. Adaptado de (Barnes et al., 2002) C. En un animal que está quieto y percibe un objeto puntual que se mueve. Hay un solo vector de velocidad y el resto del panorama está estático.

Generalmente el movimiento que percibe un animal es una combinación de las tres situaciones descritas en la figura 1. Los animales se desplazan y rotan al mismo tiempo, mientras que perciben estímulos en movimiento. Cada una de las componentes de movimiento interfiere con las otras, de modo que la interpretación del movimiento de un objeto dentro del flujo óptico generado por el animal es una tarea compleja. Sin embargo, los animales que guían su comportamiento con la visión logran resolver esa complejidad para orientarse, navegar y detectar el movimiento de objetos sin dificultad.

1. Invertebrados como modelos para estudiar sistemas visuales

Cuando observamos algo, una cierta cantidad de luz llega a nuestros fotorreceptores, esta información pasa luego por una red de conexiones neuronales en serie y en paralelo, para que finalmente reconozcamos o interpretemos el significado de un estímulo como una cara amiga, una amenaza, o simplemente un paisaje. Casi tan pronto como cuando se reconoció que las neuronas eran células individuales que se conectaban entre sí (Ramón y Cajal, 1906), se hizo evidente que las redes de conectividad, además de mostrar un alto grado de complejidad, seguían ciertos patrones estereotipados. Desde ese entonces, los neurocientíficos intentan comprender cómo surgen estos circuitos y cómo, una vez formados, dan lugar a una gran diversidad de procesos cerebrales.

Hace más de un siglo, Santiago Ramón y Cajal, utilizando la técnica de Golgi, desarrolló la *doctrina de la neurona* en la que se pone de manifiesto que las neuronas son la formación básica y funcional del sistema nervioso. Por su invaluable hallazgo se lo conoce hasta hoy en día como el padre de la neurobiología moderna. Ramón y Cajal también notó que existían sorprendentes similitudes entre los circuitos neuronales que participan del procesamiento de la visión en vertebrados y en moscas. Durante las últimas décadas, una gran cantidad de estudios estructurales y funcionales apoyaron fuertemente sus observaciones (Ver revisión en Sanes y Zipursky, 2010). Es decir que, sin ser homólogos, los sistemas visuales de vertebrados e insectos comparten una gran cantidad de atributos estructurales, funcionales y de desarrollo.

Las características funcionales de los sistemas visuales se han estudiado durante mucho tiempo, tanto en mamíferos como en insectos. En particular, para la visión del movimiento las similitudes más sorprendentes se han hecho evidentes sólo en estudios recientes. Para detectar que un objeto se mueve, es necesario combinar la información de intensidad lumínica de al menos dos puntos distantes en el espacio visual. Evidencias morfológicas y funcionales, permitieron hacer una comparación entre los sistemas visuales de mamíferos e insectos, esto condujo a proponer que en ambos sistemas el primer paso para extraer la información visual de movimiento consiste en la separación de la información visual primaria en dos vías (*ON-OFF*): la vía *ON* que procesa el movimiento de un borde más luminoso que el fondo sobre el que se mueve y la vía *OFF* que procesa el movimiento de un borde menos luminoso que el fondo sobre el que se mueve. En cada una de las vías se produce de manera separada el cómputo de la dirección de movimiento. En las moscas, esta detección aparece en las células T4 y T5, mientras que en vertebrados se observa en las células ganglionares. Luego, la información primaria de movimiento de ambas vías converge en la siguiente sinapsis, resultando en cuatro grupos de neuronas

ON-OFF, cada grupo selectivo para una de las cuatro direcciones cardinales. Dado que esta estrategia general se encuentra presente tanto en vertebrados como en insectos, parecería ser una solución eficiente para calcular la dirección del movimiento visual, ya sea que está presente en ambos grupos de animales por convergencia evolutiva o por homología desde un ancestro común que existió hace 550 millones de años (Borst y Helmstaedter, 2015).

Una de las ventajas que confiere el estudiar el sistema visual en invertebrados, es que sus cerebros son más pequeños y están compuestos por una menor cantidad de elementos que los de vertebrados. Por ejemplo, una mosca de la fruta tiene cerca de 135,000 neuronas (Alivisatos et al., 2012), mientras que se estima que las aves tienen entre 136 millones y 2,17 billones de neuronas (Olkowicz et al., 2016). A pesar de las grandes diferencias en el tamaño del cerebro y en la cantidad de neuronas, tanto moscas como aves pueden llevar a cabo exitosamente, aunque con ciertas diferencias, comportamientos de navegación de vuelo, persecución de presas, evitación de obstáculos, evitación de predadores, etc. Debido a que tienen un menor número de neuronas, sería razonable pensar que la redundancia de funciones en distintos elementos de los cerebros de invertebrados se encuentra mucho más restringida que en vertebrados. Posiblemente sea por eso que los circuitos resultan ser más simples y más fáciles de estudiar. Además, es relativamente sencillo metodológicamente registrar algunas neuronas centrales en invertebrados, ya que poseen un gran tamaño que las hace fácilmente identificables. Por otro lado, muchas neuronas de invertebrados muestran una gran complejidad morfológica, lo que permite la compartimentalización funcional de distintos dominios del árbol neurítico (ej.: Jacobs et al., 1986).

El estudio comparado de los sistemas visuales puede informar sobre principios generales, o eventualmente sobre soluciones alternativas a problemas de procesamiento visual que son comunes a vertebrados e invertebrados.

2. El cangrejo *Neohelice granulata* como modelo de estudio

El cangrejo *Neohelice granulata* (figura 2A), es el animal estudiado en esta tesis. Hace casi 10 años, este animal ya ocupaba el sexto lugar en la escala de los cangrejos más estudiados (Spivak, 2010). Además de estudios de carácter ecológico y fisiológico, *Neohelice* ha sido utilizado durante las últimas tres décadas para estudios de neurobiología del comportamiento, principalmente en aspectos relacionados con procesos de aprendizaje y memoria visual. Los abordajes han sido comportamentales,

farmacológicos, electrofisiológicos neuroanatómicos y moleculares (revisado en Tomsic y Romano, 2013).

En su hábitat natural (figura 2B), los cangrejos son predados por gaviotas cangrejas (*Larus atlánticus*) (figura 2C), chimangos (*Milvago chimango*) y varias otras especies de aves, ante cuya presencia suelen responder desplegando un comportamiento de escape que, en algunas ocasiones, está acompañado de un despliegue defensivo con sus quelas hacia el agresor. En algunas circunstancias el comportamiento de inmovilidad o congelamiento es también utilizado como estrategia para pasar desapercibido.

En el laboratorio, es posible evocar una respuesta de escape en *Neohelice* utilizando un estímulo visual de peligro (EVP) que consiste en el movimiento en arco de una pantalla negra por encima del animal que, por evocar una respuesta de escape, estaría siendo interpretada como el ataque de un predador. La respuesta de escape, o más precisamente su modificación ha sido utilizada en el laboratorio para el estudio del aprendizaje y la memoria (por ejemplo: Tomsic et al., 1993, 1998; Pedreira et al., 2002; Pedreira y Maldonado, 2003). Este paradigma de memoria visual, consiste en la reducción de la respuesta de escape como consecuencia de una cantidad de repeticiones espaciadas de un EVP que demuestra ser inocuo. El animal aprende y recuerda por largo tiempo la inocuidad del estímulo y la memoria se manifiesta como una menor respuesta de escape a ese EVP (ej.: Tomsic et al., 1993). La memoria visual generada por las presentaciones repetidas espaciadas de un estímulo puede durar desde 24 hs hasta más de una semana dependiendo de la frecuencia de estimulación en el entrenamiento. Esta memoria se denomina contexto-señal, ya que depende del contexto en el que se forma y tiene elementos tanto asociativos como no asociativos (Tomsic y Romano, 2013).



Figura 2. El cangrejo *Neohelice granulata*. A. Cangrejo macho adulto en la entrada de su cueva. B. Rías de San Clemente del Tuyú, hábitat natural con ejemplares de *Neohelice granulata*. C. Gaviota cangrejera, *Larus atlanticus*, a punto de preñar a un cangrejo.

Durante los últimos años, además de los estudios que se enfocaban principalmente en temas de aprendizaje visual y memoria, la utilización de *Neohelice* como modelo experimental ha dado lugar a numerosos estudios: de la fisiología de la visión (Berón de Astrada y Tomsic, 2002; Tomsic et al., 2003; Medan et al., 2007, 2015; Berón de Astrada et al., 2011); neuroetológicos en el campo (Fathala et al., 2010; Fathala y Maldonado, 2010; Hemmi y Tomsic, 2015); de la neuroanatomía del sistema visual (Sztarker et al., 2005, 2009; Sztarker y Tomsic, 2014; Bengochea et al., 2018); comparaciones neurofisiológicas entre distintas poblaciones (Magani et al., 2016); estudios de interacción social (Pedetta et al., 2010). Así es que *Neohelice* ha llegado a constituir un modelo de estudio de la neurobiología del comportamiento en artrópodos altamente reconocido (para revisiones recientes ver: Tomsic, 2016; Tomsic et al., 2017).

Una característica destacable de este animal, es que al tener un caparazón duro y resistente, es posible hacer registros intracelulares estables en el individuo inmovilizado pero intacto mientras está aprendiendo (ej.: Berón de Astrada y Tomsic, 2002). Esta preparación ha permitido la caracterización fisiológica y morfológica de diversos tipos

celulares involucrados en el procesamiento de la información visual en crustáceos decápodos (ej.: Berón de Astrada et al., 2001, 2009; Berón de Astrada y Tomsic, 2002; Medan et al., 2007). Además, ha permitido la identificación de neuronas visuales detectoras de movimiento que se encuentran involucradas en el aprendizaje y la memoria (ver luego).

3. Anatomía del sistema nervioso en artrópodos

El cerebro de los artrópodos está organizado en tres partes denominadas protocerebro, deutocerebro y tritocerebro, clasificación que corresponde al origen embrionario y está conservada en todos los artrópodos. En el caso particular de los crustáceos decápodos como *Neohelice granulata*, el protocerebro está dividido en una parte lateral y otra medial. El protocerebro lateral forma parte del lóbulo óptico y está conectado con el protocerebro medial que se encuentra en el ganglio supraesofágico, a través del tracto protocerebral.

En el sistema nervioso de los decápodos se distinguen tres centros nerviosos principales: los lóbulos ópticos, el ganglio supraesofágico y los ganglios torácicos. Cada lóbulo óptico, como dijimos, se conecta con el ganglio supraesofágico por el tracto protocerebral (figura 3). Los lóbulos ópticos tienen funciones relacionadas fundamentalmente con la percepción sensorial visual y el control neuroendocrino. El ganglio supraesofágico tiene tanto funciones sensoriales como motoras y se conecta con los ganglios torácicos a través de los conectivos circumesofágicos (figura 3). Los ganglios torácicos tienen principalmente funciones vegetativas y motoras (Sandeman et al., 1993) y en los cangrejos se encuentran fusionados.

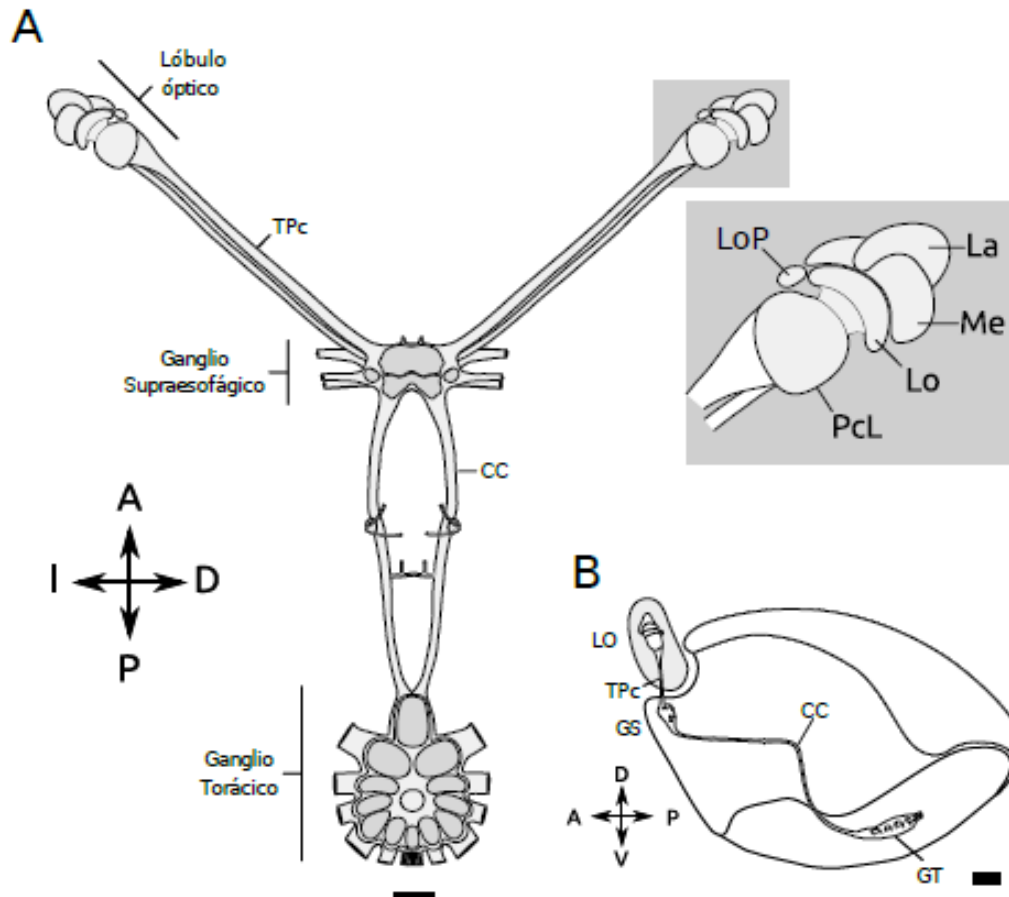


Figura 3. Sistema nervioso de *Neohelice granulata*. A. Esquema que representa los ganglios más conspicuos del sistema nervioso del cangrejo. El mismo se compone de dos lóbulos ópticos, un ganglio supraesofágico (GS) y un ganglio torácico (GT) ubicados dentro del cefalotórax. El lóbulo óptico (ver imagen ampliada) está compuesto por cuatro neuropilos ópticos: lámina (La), médula (Me), lóbula (Lo), placa lobular o *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 cefalotórax, desde este proyectan los conectivos circumesofágicos (CC) hasta el ganglio torácico (GT). D: Dorsal, V: Ventral, P: Posterior, A: Anterior, I: Izquierda, D: Derecha, LO: Lóbulo óptico, Escalas: 500µm. Esquemas modificados de (Hepp et al., 2013).

4. Los lóbulos ópticos y el sistema nervioso visual de *Neohelice*

Los ojos de *Neohelice granulata*, a diferencia de insectos y otros artrópodos, están montados sobre pedúnculos móviles. Cada ojo consiste en aproximadamente 9000 omatidias que se distribuyen alrededor del extremo del pedúnculo, excepto por una pequeña franja de cutícula orientada hacia la región medial del animal (figura 4A, Berón de Astrada et al., 2012). De este modo, el campo receptivo de cada ojo es casi total,

abarcando los 360° en el eje azimutal. Esto implica que los campos receptivos de ambos ojos se superponen completamente.

Dentro de cada pedúnculo ocular se encuentra el lóbulo óptico que está compuesto por cuatro neuropilos ópticos y por una serie de neuropilos protocerebrales reunidos convencionalmente bajo el nombre de protocerebro lateral. Los cuatro neuropilos ópticos son: la lámina, la médula, la placa lobular (en adelante *lobula plate*) y la lóbula (figura 4B; Sztarker et al., 2005).

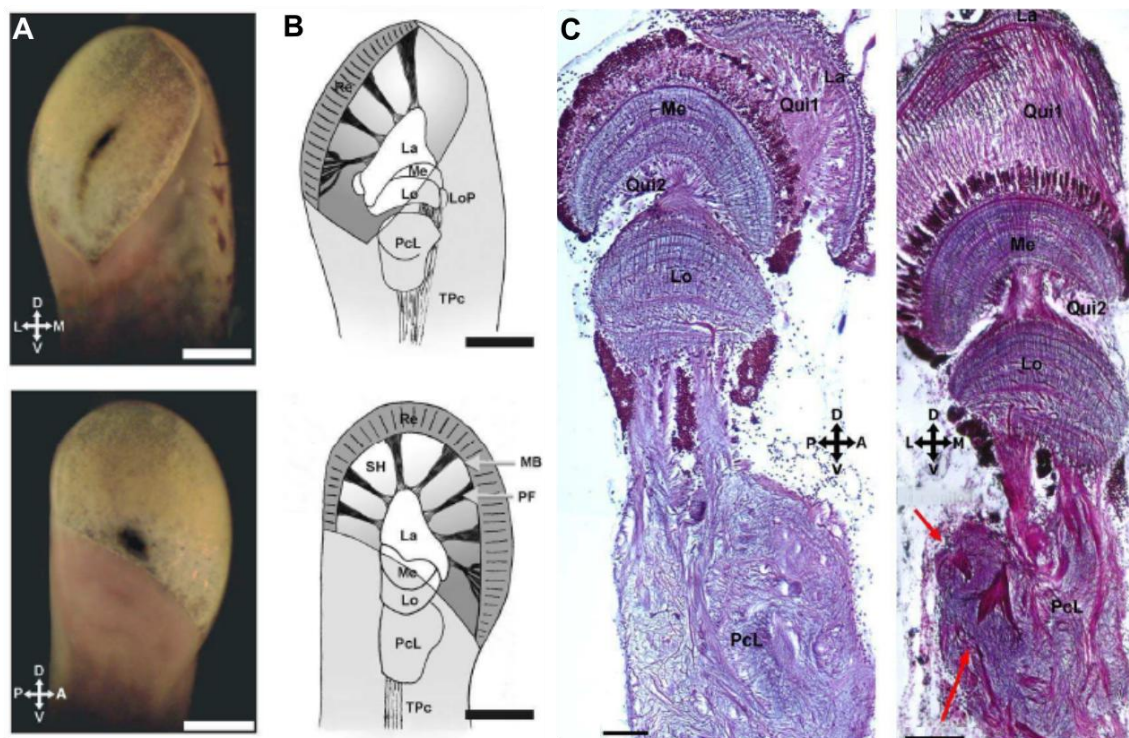


Figura 4. Los lóbulos ópticos de *Neohelice granulata*. A. Fotografías y B. Esquemas de las principales estructuras nerviosas de los lóbulos ópticos, en vista frontal (panel superior) y vista lateral (panel inferior). C. Tinción de Bodian mostrando la fibroarquitectura de los neuropilos ópticos. Se observa una organización en columnas intersecadas por procesos tangenciales. En cambio el protocerebro lateral no muestra una organización estructural definida. Izquierda: corte longitudinal. Derecha: corte transversal. Las flechas rojas muestran distintas estructuras que forman parte de los cuerpos hemielipsoides dentro del protocerebro lateral. Re: retina; MB: membrana basal; PF: fibras de los fotorreceptores; La: lámina; Me: médula; Lo: lóbula; PcL: protocerebro lateral; TPc: tracto protocerebral; Qui1: primer quiasma óptico; Qui2: segundo quiasma óptico. Escala: 500µm. Figuras tomadas de Berón de Astrada y Tomsic, 2002; Sztarker et al., 2005.

Como en todos los artrópodos, los neuropilos ópticos de *Neohelice*, muestran una organización columnar retinotópica. Las neuronas columnares que descienden desde la retina se organizan en “cartuchos” o unidades columnares anatómico-funcionales. Esta

organización columnar, se encuentra intersecada por estratos tangenciales que están compuestos principalmente por procesos laterales de neuronas columnares, neuronas amácrinas y neuritas de las neuronas tangenciales (Strausfeld and Näsel, 1980; Sztarker et al., 2005). Por el contrario, el protocerebro lateral, más próximo al ganglio supraesofágico no presenta una organización estructural tan claramente definida (figura 4C).

5. Retinotopía de los neuropilos ópticos

La organización columnar retinotópica de los neuropilos ópticos de los artrópodos implica que columnas de neuronas vecinas entre sí reciben información de regiones vecinas del campo visual (Berón de Astrada et al., 2011).

Los fotorreceptores proyectan sus axones directamente hacia la lámina sin entrecruzamientos (Stowe, 1977). Luego, los neuropilos se conectan entre sí a través de proyecciones columnares que se entrecruzan formando quiasmas entre la lámina y la médula y, más abajo, entre la médula y la lóbula. En *Neohelice*, se ha descripto el patrón general de proyección de las columnas visuales entre los neuropilos (Berón de Astrada et al., 2011). La figura 5 muestra las posiciones y orientaciones de dichos quiasmas.

Las líneas de colores de la figura 5 muestran qué posición del campo receptivo representa cada región en los neuropilos. El primer quiasma (QO1), que está entre la lámina y la médula invierte las posiciones relativas en el eje azimutal (líneas amarilla y violeta), de este modo lo que el cangrejo ve en posición frontal (0°) está representado en la región lateral de la médula y lo que ve en posición posterior (180°) está representado en la región medial (inversión de las proyecciones en el eje lateromedial de la médula). El segundo quiasma (QO2), que está entre la médula y la lóbula, mantiene en la lóbula las posiciones relativas en el eje azimutal tal cual están en la médula, pero invierte las posiciones relativas en el eje vertical (líneas verde y celeste), de modo que lo que el animal ve por encima del ecuador está mapeado en la región anterior de la lóbula y lo que ve por debajo del ecuador en la región posterior. Es decir que el primer quiasma óptico invierte la representación retinotópica del eje azimutal en la médula lateromedialmente, luego el segundo quiasma óptico invierte el mapa de las posiciones visuales en elevación en la lóbula anteroposteriormente (Berón de Astrada et al., 2011).

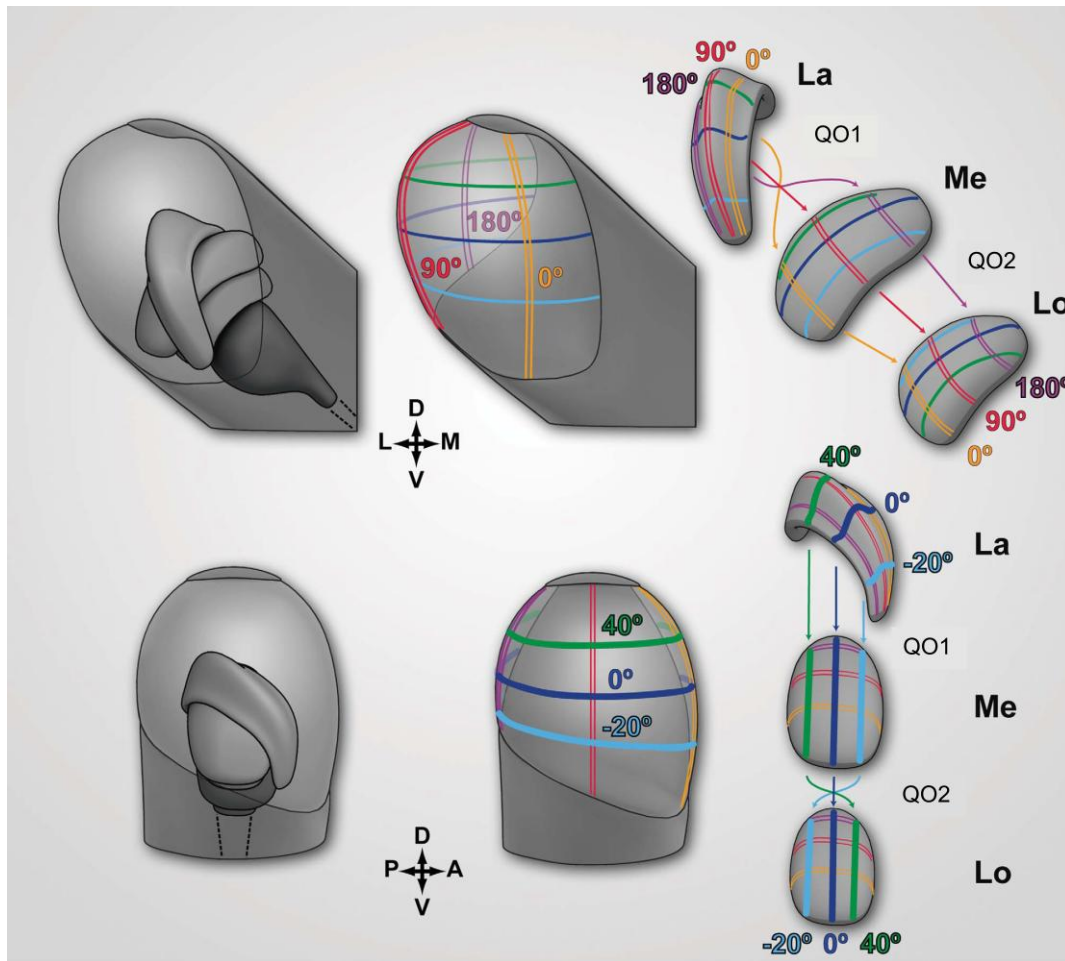


Figura 5. Mapa del espacio visual en los neuropilos ópticos de *Neohelice*. Los paneles superior e inferior representan vistas frontal y lateral del ojo derecho y sus neuropilos ópticos. Las líneas verticales de color representan las posiciones meridionales a lo largo de la retina en 0° (amarillo), 90° (rojo) y 180° (violeta), mientras que las líneas horizontales representan las posiciones en elevación respecto del ecuador del ojo. El código de color se conserva a través de los tres neuropilos ópticos y los quiasmas. En el cangrejo el primer quiasma óptico invierte el orden de representación correspondiente al eje azimutal (panel de arriba), mientras que el segundo quiasma óptico invierte el orden correspondiente al eje vertical (panel de abajo). La, lámina; Me, médula; Lo, lóbula; QO1, primer quiasma óptico; QO2, segundo quiasma óptico. Figura adaptada de Berón de Astrada et al., 2011.

Habiendo descripto de forma general el sistema visual de *Neohelice*, cabe mencionar que cuando una señal luminosa es captada por los fotorreceptores en la retina y convertida en una señal electrofisiológica, esa señal se modifica a medida que progresa centrípetamente a través de los centros de integración y procesamiento. Mientras que las primeras neuronas en recibir información responden a estímulos tan simples como un cambio en la luminosidad, las que siguen comienzan a responder a características mucho más específicas de los estímulos visuales como por ejemplo la dirección y sentido de un objeto en movimiento en determinada región del campo receptivo. En los artrópodos, esto

es posible gracias a la organización y el funcionamiento de las unidades columnares y a que existen neuronas tangenciales capaces de vincular las señales de diferentes columnas, integrando así los cambios de luminosidad que se producen sobre una amplia región de la superficie del ojo.

6. Neuronas gigantes de la lóbula (LG)

Wiersma y colaboradores investigaron las respuestas a estímulos visuales de neuronas de varias especies de crustáceos realizando registros extracelulares en el tracto protocerebral (revisión en Wiersma et al., 1982). Como se trataba de registros extracelulares, estas neuronas sólo pudieron ser caracterizadas por sus respuestas fisiológicas, medidas como frecuencia de potenciales de acción, a distintos estímulos. Además, por ser registros extracelulares, no era posible teñirlas específicamente para determinar su ubicación y su morfología. La caracterización fisiológica, sin embargo, permitió identificar neuronas individuales con respuestas tónicas frente a un pulso de luz y otras que respondían específicamente a estímulos visuales en movimiento (revisado en Wiersma et al., 1982). Posteriormente, Glantz y colaboradores realizaron registros y marcaciones intracelulares en neuronas visuales de crustáceos. Eso les permitió realizar una descripción detallada de las características morfológicas, aunque esos estudios comprendían principalmente neuronas de la lámina y la médula, que mostraron responder intensamente a estímulos de luz pero no eran particularmente sensibles a estímulos de movimiento (Glantz y Kirk, 1980; Kirk et al., 1982; Glantz, 2001; Glantz et al., 2002).

Durante los últimos 20 años, en el laboratorio se han llevado a cabo una cantidad de estudios en *Neohelice granulata* que, combinando análisis comportamentales, anatómicos y electrofisiológicos (ej.: Berón de Astrada & Tomsic 2002; Berón de Astrada et al. 2009; Berón de Astrada et al. 2011; Sztarker 2005; Sztarker et al. 2009; Medan et al. 2007, 2015) permitieron, entre otras cosas, identificar y caracterizar un conjunto de neuronas sensibles al movimiento, que parecen cumplir un papel determinante en el procesamiento de imágenes de objetos puntuales y en el control de comportamientos guiados visualmente (ej.: Tomsic et al., 2003; Sztarker y Tomsic, 2004, 2008, 2011; Oliva et al., 2007). Estas neuronas muestran la mayoría de las características descritas por Wiersma y col. para las fibras sensibles al movimiento estudiadas con registros extracelulares desde el tracto protocerebral (Wiersma et al., 1982). Las siguientes son características generales compartidas por este grupo de neuronas: 1) mayor sensibilidad por el movimiento que por cambios estacionales 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 la mayoría de los casos, sensibilidad a estímulos mecánicos aplicados en distintas partes del cuerpo del animal (Berón de Astrada y Tomsic, 2002). Inicialmente estas neuronas fueron llamadas NDM (Neuronas detectoras de movimiento). Luego, se encontró que estas neuronas no eran simples detectoras de movimiento, sino que su actividad también reflejaba cambios comportamentales a corto y a largo término (ver luego), de modo que por analogía con neuronas de morfología y función similar, que habían sido descriptas en langostas de tierra (Fotowat y Gabbiani, 2011), se las nombró neuronas gigantes de la lóbula (LG por su denominación en inglés *Lobula Giant*). Como su nombre lo indica, se trata de neuronas muy grandes que poseen árboles dendríticos extensos abarcando gran parte de la lóbula. Son, en general, neuronas de campo amplio que integran información que llega desde numerosas columnas visuales (Berón de Astrada y Tomsic, 2002).

El análisis detallado de las características morfológicas y fisiológicas de las LG, permitió clasificarlas en 4 grupos (figura 6): se dividen en monoestratificadas de tipo 1 y 2 (MLG1 y MLG2) y biestratificadas tipo 1 y 2 (BLG1 y BLG2) (Medan et al., 2007). El número de elementos de cada clase que se halla en la lóbula de cada lado es: MLG1, 16 elementos que se disponen anatómicamente de forma que sus campos receptivos individuales (de alrededor de 118 grados) se superponen parcialmente recogiendo en conjunto información de los 360° del panorama visual (Medan et al., 2015); Las MLG2 y BLG2, aparentemente 1 solo elemento de cada clase, ambos de campo receptivo total; BLG1, al menos 3 elementos de campo receptivo total (Medan, 2007; Medan et al., 2007). Cada uno de los tipos morfológicos mencionados presenta propiedades intrínsecas singulares, que se manifiestan en el grado y tipo de actividad espontánea, y respuestas fisiológicas diferenciadas frente a distintos tipos de estimulación visual, lo que permite diferenciarlas entre ellas y de otras neuronas (figura 6).

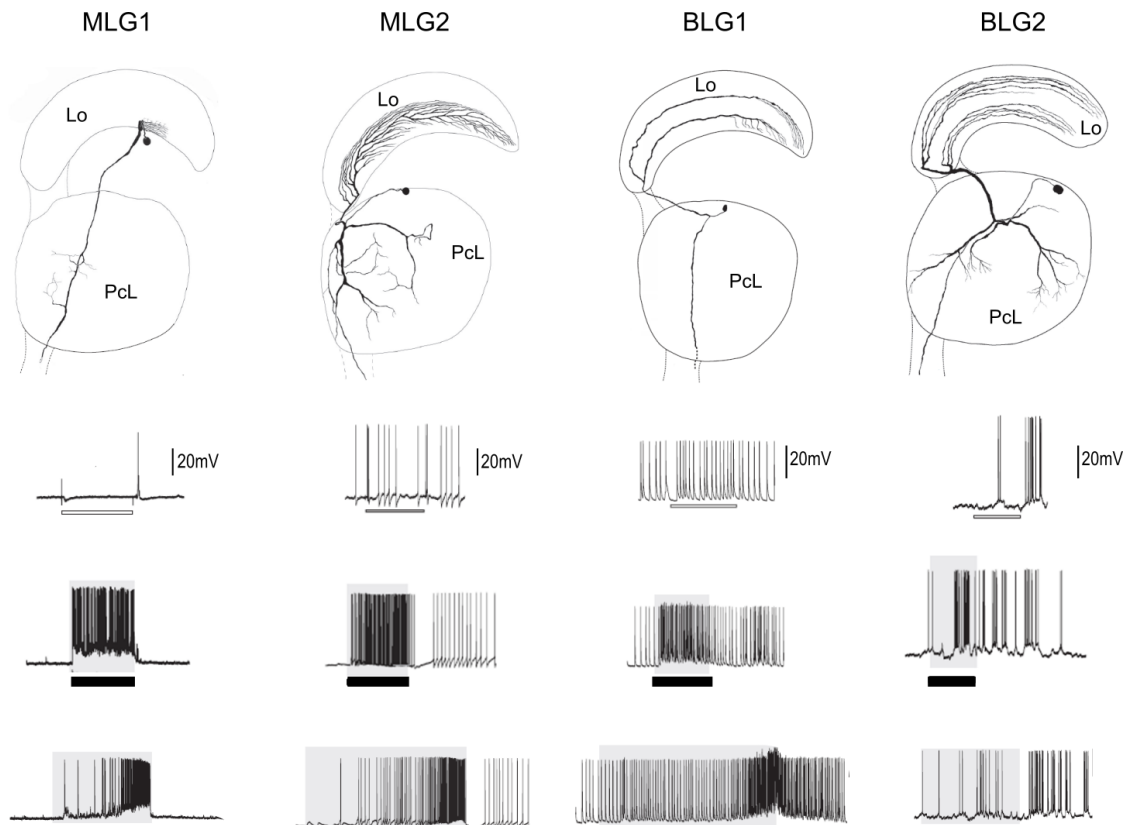


Figura 6. Esquemas de la morfología de las neuronas gigantes de la lóbula. Los dos esquemas de la izquierda corresponden a las neuronas monoestratificadas (MLG1 y MLG2). Los dos esquemas de la derecha corresponden a las neuronas biestratificadas (BLG1 y BLG2). Debajo de los esquemas se muestra un ejemplo de la respuesta fisiológica a un pulso de luz, al movimiento y a un objeto que se aproxima (*looming*), respectivamente, característica de cada uno de los tipos celulares. Las barras en la primera fila de registros representan la duración de un pulso de luz que dura 1 s. Las barras negras debajo de los registros de la segunda fila representan el movimiento de un estímulo visual que dura 1,6 s. La duración expansión del estímulo que se aproxima (3,36 s) está representada por el sombreado gris en la tercera fila de registros. Figura modificada de Medan et al., 2007.

Un descubrimiento importante fue que un EVP como el utilizado para evocar respuestas de escape en el laboratorio, también evocaba una clara respuesta en las LG. Además, existe una estrecha correlación entre la actividad comportamental del animal y la respuesta de las neuronas LG (Tomsic et al., 2003). Se observó también que estas neuronas reflejaban los cambios comportamentales a corto y largo término que se producían luego de la estimulación repetitiva teniendo muy probablemente un rol fundamental en la formación y mantenimiento de las memorias visuales en el cangrejo (Tomsic et al., 2003).

Como se describió al principio de esta introducción, la visión del movimiento puede tener dos orígenes bien distintos, con características particulares en cada caso, que evocan en el cangrejo distintas respuestas comportamentales. El movimiento de un objeto (representado en la figura 1C) podría ser ejemplificado con la presentación de un EVP que evoca una respuesta de escape. Como ya describimos, este tipo de respuesta disminuye a medida que el estímulo se repite. Por otro lado, el movimiento egocéntrico rotacional (representado figura 1A) evoca una respuesta optomotora que se sostiene en el tiempo (Tomsic, 2016). Dado que las LG responden a la visión del movimiento, se comparó la respuesta de neuronas LG a un estímulo panorámico con la evocada por un estímulo puntual, se encontró que claramente los estímulos panorámicos generaban una respuesta de menor intensidad y que dicha respuesta desaparecía rápidamente, indicando que las LG están más relacionadas con la detección de objetos que con el análisis de flujo óptico generado por los movimientos del propio animal (Medan et al., 2007).

Respecto de la sensibilidad por la dirección y el sentido de movimiento, ninguna de las 4 clases de LG caracterizadas hasta el presente mostró responder con preferencia a la estimulación en algún sentido particular de movimiento, aunque las MLG1 mostraron una mayor respuesta a estímulos moviéndose en el eje azimutal que en el eje vertical (Medan et al., 2015).

7. Integración visual binocular

La mayoría de los animales visuales perciben el mundo a través de dos ojos, pero ¿cuáles serían las ventajas que aporta la entrada de información por dos lugares distintos? El tener dos ojos en vez de uno, en primer lugar, otorga la capacidad de ampliar el campo visual del animal, lo que resulta evidente sobre todo en animales donde los campos monoculares se extienden ampliamente por fuera de la región de superposición binocular, en estos animales usualmente los ojos se encuentran orientados hacia los costados de la cabeza, como es el caso de muchas aves, peces, anfibios y reptiles. En segundo lugar, en las regiones de superposición binocular habría un incremento de la relación señal-ruido, lo que permitiría obtener información visual de mucha mayor calidad. Cabe recordar aquí que los cangrejos tienen un campo visual de 360° y por lo tanto el área de superposición binocular es total. En tercer lugar, el poseer dos ojos posibilita que el animal pueda efectuar estimaciones de distancia y tamaño absoluto por estereopsis, que consiste en comparar las imágenes de un mismo punto en el espacio visual, obtenidas con uno y otro ojo. Finalmente y en cuarto lugar, podría contribuir en la estimación de la velocidad y la dirección de movimiento de objetos (ej.: Collett, 1977; Fox, 1977; Rossel, 1983).

Estas y otras ventajas se hacen por demás evidentes cuando comparamos el desempeño comportamental en diversas tareas entre animales binoculares y animales a los que se les ocluye uno de los ojos. En el caso de los artrópodos, fundamentalmente en insectos y crustáceos, existen muchos ejemplos de ese tipo de manipulaciones experimentales y las consecuencias que éstas tienen sobre el comportamiento (por ej.: Maldonado y Rodríguez, 1972; Rossel, 1983; Kral, 2008). Por ejemplo, estudios realizados en la mantis religiosa mostraron que cuando se bloquea la visión de uno de los ojos, estos animales pierden la capacidad de estimar la distancia a una presa y así poder atraparla (Maldonado y Rodríguez, 1972). Este tipo de trabajos muestran la absoluta importancia que tiene el procesamiento de la información binocular en la vida de estos animales.

Los artrópodos son, en general, animales altamente visuales. Guían muchos de sus comportamientos mediante el procesamiento binocular del flujo óptico (figuras 1A y B) y del movimiento de objetos (figura 1C). Algunos de los estudios realizados hasta ahora se han centrado en mostrar que usan la información binocular del movimiento panorámico para controlar su trayectoria de navegación (Nalbach, 1993; Krapp et al., 2001; Duistemars et al., 2012) mientras que otros han mostrado que usan el procesamiento binocular para estimar el tamaño y la distancia de un objeto en el contexto de comportamientos de captura de presas (Nityananda et al., 2016). La capacidad de estimar distancias por estereopsis está condicionada por la separación entre los ojos (Collett et al., 1987). Por eso, en animales como por ejemplo los insectos o en cangrejos como el violinista que tienen los ojos muy cercanos entre sí, esta habilidad sería limitada. Por otro lado, cangrejos como *Neohelice* tienen una separación considerable entre los ojos, de modo que la estereopsis podría ser un mecanismo importante para la estimación de distancias.

Para que los atributos que confiere la binocularidad puedan manifestarse, la información adquirida por separado en cada ojo debe transitar el sistema nervioso hasta confluir en algún sitio del cerebro y combinarse. A nivel celular, este sitio está representado por neuronas binoculares, es decir neuronas que responden a información que ingresa tanto por uno como por el otro ojo.

8. Neuronas visuales binoculares

En mamíferos, neuronas individuales que responden a estímulos que ingresan tanto por uno como por otro ojo se observan recién a partir de la corteza visual primaria (Kuffler y Nicholls, 1976). En gatos, se estudió la respuesta de neuronas binoculares de la corteza visual que respondían cuando se presentaban estímulos visuales en cada ojo de manera independiente. Algunas de estas células respondían de modo similar cuando se

presentaban estímulos visuales en uno u otro ojo, sin embargo muchas veces la respuesta neuronal era más intensa cuando el estímulo era visto con un ojo que con otro, evidenciándose así distintos grados de dominancia. Además, los campos receptivos de estas neuronas binoculares correspondían a partes aproximadamente homólogas de las dos retinas, de modo que, por ejemplo, una neurona con campo receptivo en la parte correspondiente a la región nasal de un ojo, tenía campo receptivo en la parte correspondiente a la región temporal del otro ojo (Hubel y Wiesel, 1959). Por otro lado, las neuronas binoculares no mostraban preferencia por las distintas orientaciones de estímulos alargados y en muchas de ellas, al excitar simultáneamente a los dos ojos se obtenía una respuesta sinérgica.

Al examinarse las interacciones binoculares de neuronas de la corteza estriada en monos macacos, se observó que aproximadamente la mitad de ellas respondían, al igual que las neuronas binoculares de los gatos, cuando los estímulos eran vistos exclusivamente con uno u otro ojo. Los campos receptivos de estas neuronas también mostraron ser coincidentes anatómicamente. Sin embargo, la otra mitad de las neuronas binoculares de macacos mostraron en general diferentes propiedades de respuesta. Estas neuronas no respondían o respondían muy sutilmente cuando el estímulo era presentado en uno de los ojos, pero se obtenían respuestas robustas cuando el estímulo se presentaba simultáneamente en la posición adecuada de ambos ojos. Algunas de estas células mostraban respuestas más intensas cuando los ojos estaban alineados de manera tal que se estimularan regiones de la retina coincidentes en ambos ojos, en otras se observaba una disparidad en la posición de los dos campos receptivos. En función de estas observaciones, se propuso que estas neuronas estarían involucradas en el procesamiento de la información de profundidad por estereopsis y se les dio el nombre de “neuronas binoculares de profundidad” (Hubel y Wiesel, 1970).

En insectos y crustáceos se han identificado neuronas sensibles al flujo óptico panorámico o al movimiento de objetos que reciben información binocular. Estas neuronas se encuentran ubicadas en el ganglio supraesofágico, una de las áreas centrales del cerebro (ver figura 3) (Wood y Glantz, 1980; Wertz et al., 2008; Rosner y Homberg, 2013). Sin embargo, se descubrió que la integración binocular de información visual implicada en el procesamiento del flujo óptico panorámico ya tenía lugar en neuronas de la *lobula plate*. La dirección del flujo óptico panorámico en los ojos depende del tipo de movimiento egocéntrico. El movimiento de rotación (figura 1A) genera dos direcciones de movimiento diferentes en la retina, en un ojo de adelante hacia atrás y en el otro de atrás hacia adelante. Por el contrario, el movimiento de traslación (figura 1B) hacia adelante o hacia atrás, genera un flujo óptico dirigido de adelante hacia atrás o de atrás hacia

adelante en ambos ojos. Algunas de las neuronas tangenciales de campo amplio que se hallan en la *lobula plate* combinan la información de movimiento de ambos ojos, conformando un circuito acoplado eléctricamente entre ambos hemisferios, lo cual permite codificar y distinguir entre ambos tipos de movimiento egocéntrico (por ej.: Krapp et al., 2001; Hennig et al., 2011; Suzuki et al., 2014). Además, en crustáceos, Wiersma y colaboradores habían descrito algunas neuronas sensibles al movimiento con respuesta binocular, pero al tratarse de registros extracelulares tomados del tracto protocerebral, las características fisiológicas de respuesta de estas neuronas, así como su localización en el sistema nervioso, no pudieron ser establecidas (Wiersma et al., 1982).

Si bien se conoce con bastante detalle el modo en que ocurre la integración visual binocular del flujo óptico panorámico en neuronas de la *lobula plate* de insectos, poco se sabe acerca de la integración visual binocular del movimiento de objetos en los neuropilos ópticos de los artrópodos. El único antecedente lo constituye un estudio realizado sobre las neuronas LG de *Neohelice granulata*. En ese estudio se evaluó la respuesta de distintas neuronas LG a un objeto en movimiento (EVP) que se presentó de manera exclusivamente ipsilateral (lado en que se registraba la neurona) o exclusivamente contralateral (lado contrario al de registro). Dado que los ojos de los cangrejos tienen un campo visual de 360°, para presentar el estímulo de manera exclusiva en un ojo u otro se utilizó una división que separaba los campos visuales de ambos ojos (figura 7A). Se observó que estas neuronas podían responder intensamente a estímulos visuales que se presentaban tanto del lado ipsilateral como del contralateral. Para cada LG las respuestas frente a estimulaciones ipsilaterales eran sorprendentemente similares (en intensidad y forma) a las obtenidas frente a estimulaciones contralaterales (figura 7B), aunque, como es esperable, las latencias de respuesta eran significativamente menores ante la estimulación ipsilateral (Sztarker y Tomsic, 2004). Si bien los resultados muestran claramente que la información visual que ingresa por un lado del cerebro es transferida a las LG del otro lado del cerebro del animal, se desconoce el modo en que esta transferencia es llevada a cabo.

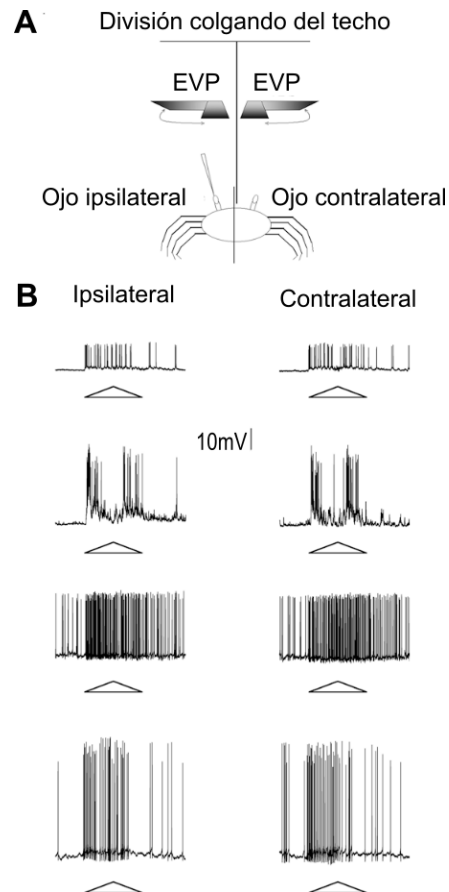


Figura 7. Las neuronas LG responden tanto a estimulación visual ipsilateral como contralateral. A. Cada uno de los ojos fue estimulado de manera independiente con dos EVP separados por una división. Para separar el campo visual entre ambos ojos, se utilizó una pieza de cartón negro sellada a lo largo de la línea media del caparazón siguiendo el contorno del caparazón dorsal. Esto permitía una separación completa del campo visual entre los ojos. B. Respuestas de cuatro neuronas LG al EVP presentado exclusivamente del lado ipsilateral (registros de la izquierda) o exclusivamente contralateral (registros de la derecha). (Sztarker y Tomsic, 2004). Nótese la diferencia de respuestas entre distintas neuronas, a la vez que la similitud de respuestas de cada neurona frente a la estimulación ipsi y contralateral.

Comprender la manera en que el circuito de las neuronas LG integra la información visual para guiar el comportamiento requiere entre otras cosas conocer la forma en que la información visual es conducida de un lado al otro del cerebro del animal y cómo ésta es procesada. Para los cangrejos como *Neohelice* que se mueven en un mundo plano de dos dimensiones, gran cantidad de información visual biológicamente relevante, como la referida a las interacciones sociales de competencia y cortejo, ubicación de refugios, etc., acontecen en torno al horizonte visual (Zeil y Hemmi, 2006). Prueba de la importancia que tiene para el animal lo que ocurre a nivel del horizonte visual, es la presencia de una banda de máxima resolución que posee *Neohelice* a nivel del ecuador del ojo, el cual mantiene alineado con la línea del horizonte (Berón de Astrada et al., 2012). Este tipo de especializaciones se ha observado también en muchos otros animales que habitan zonas planas (ej.: guepardos, conejos, algunos perros; Hughes, 1985). En igual sentido, las neuronas del tipo MLG1 de *Neohelice*, forman un ensamble que le permite al animal detectar movimientos en los 360 grados de posición azimutal y tienen el centro de sus campos receptivos verticales alineados con el horizonte (Medan et al., 2015). Sin

embargo, cabe mencionar que, los resultados sobre binocularidad mencionados en el párrafo anterior corresponden a condiciones en donde los estímulos eran presentados exclusivamente en la región dorsal del campo visual del cangrejo. Por lo tanto desconocemos el grado efectivo de integración binocular que poseen las neuronas LG en regiones las regiones de mayor agudeza, correspondientes al horizonte visual del animal.

A nivel del horizonte los cangrejos pueden hacer un cálculo robusto de las distancias entre objetos (Hemmi y Zeil, 2003). El estudio que lo muestra se realizó en cangrejos violinistas, que tienen una separación pequeña entre ambos ojos, eso limita la posibilidad de calcular las distancias por estereopsis (Collett, 1987). En efecto, el estudio asume que ese cálculo lo realizarían por una combinación de información a partir del conteo de pasos y un método de estimación de distancias por declinación (Layne et al., 2003a, 2003b). En los cangrejos que tienen una mayor distancia entre sus dos ojos, como *Neohelice*, este cálculo podría hacerse o verse mejorado a partir del cómputo de distancia por estereopsis. Como mencionamos previamente, para la estereopsis es necesario combinar información de ambos ojos, lo que requiere como primera condición la existencia de neuronas que procesen información binocular de imágenes a nivel del horizonte visual del animal. La existencia de tales neuronas constituye la primera hipótesis de esta tesis.

9. Comportamientos visuales de fijación

La implementación de muchos comportamientos esenciales para la vida de los animales, como la navegación, la evitación de predadores, el cortejo, la persecución de presas, etc., requiere la percepción de la dirección de movimiento. Según su finalidad, podríamos definir los siguientes tipos de respuesta comportamental:

El primero es el de respuestas optocinéticas o respuestas optomotoras. Se trata de comportamientos que tienen como finalidad estabilizar el flujo óptico que se genera sobre la retina cuando el animal se mueve, a través de la realización de movimientos compensatorios (Land, 1999a). Por ejemplo, cuando un animal rota hacia la derecha sobre su eje vertical, la imagen se desplaza sobre su retina hacia la izquierda a gran velocidad. Por lo general, la velocidad del desplazamiento de la imagen sobre la retina supera los límites de resolución temporal de los sistemas visuales, ocasionando que la imagen resulte borrosa. Para solucionarlo, los animales siguen con movimientos de los ojos (ej.: humanos y otros mamíferos, cangrejos; Land, 1999a), de la cabeza (ej.: aves; Pratt, 1982) o de todo el cuerpo (ej.: insectos; Duistermars et al., 2007) el movimiento del panorama visual. Por lo general, la respuesta optomotora consiste en ciclos compuestos de

movimientos lentos de seguimiento de la imagen panorámica que se desplaza, que permiten obtener información de una imagen estabilizada, y de movimientos rápidos de recuperación de la posición conocidos como movimientos sacádicos. Este tipo de comportamientos compensatorios estabilizan las imágenes panorámicas que se desplazan, ayudando con ello a extraer, por ejemplo, la información de un objeto que se mueve en un contexto en el que todo el panorama visual se está moviendo como consecuencia de movimientos egocéntricos (ej.: Nordström y O'Carroll, 2009).

El segundo es el de respuestas de fijación de objetos. Este tipo de comportamiento puede estar destinado a cumplir distintas funciones. Por ejemplo, durante el vuelo de cortejo entre dos moscas, en el que el macho persigue a la hembra, se observa claramente que a pesar de los movimientos acrobáticos del vuelo, la mosca que persigue suele seguir con mucha precisión el recorrido de la que va adelante. Este comportamiento requiere que, a pesar del extraordinario flujo de imágenes que se desplaza sobre su retina por sus propios movimientos, la mosca que persigue pueda fijar en una determinada región de la retina de alta resolución la pequeña imagen de la mosca que va adelante (Land y Collett, 1974).

La fijación visual de objetos en una región de la retina de especial sensibilidad (*tracking*) es inherente también a los comportamientos en todos los animales que persiguen a sus presas guiándose por la visión. Una vez que un predador detecta a su potencial presa, la persigue hasta que se encuentra lo suficientemente cerca para atacarla. Durante la persecución, el predador debe seguir con su vista la imagen de la presa, lo que puede implicar el movimiento de los ojos, de la cabeza o de todo el cuerpo (Land, 1999a). Por ejemplo, las aves, como la lechuza, siguen visualmente (y algunas veces también auditivamente) a sus presas a través de movimientos de la cabeza (Fux y Eilam, 2009). Los patrones de movimiento de la cabeza durante las persecuciones, se han estudiado en varias especies de aves y se ha observado que están destinados a mantener la imagen de la presa en la fovea, que es la zona de la retina con mayor cantidad de neuronas y por lo tanto de mayor resolución (ej.: en gaviotas, Land, 1999b; en halcones, Tucker et al., 2000). Incluso, varias especies de aves tienen dos foveas en cada ojo y despliegan movimientos de la cabeza que están dirigidos a mover la imagen de una fovea a la otra lo cual les permite estimar con precisión la distancia a la que se encuentra la presa (Stamp Dawkins, 2002). El comportamiento de fijación de imágenes en determinada región de la retina de especial resolución que tiene como objetivo la persecución de presas también se ha estudiado en invertebrados. Experimentos recientes en libélulas muestran las habilidades de estos pequeños animales para detectar, perseguir y capturar pequeñas moscas en vuelo (Mischiati et al., 2015; Wardill et al., 2017). Estos animales aparentemente utilizan

una estrategia de persecución paralela en la que continuamente reducen el vector de distancia a la presa mientras que ésta mantenga constante su dirección de vuelo. Cuando la presa modifica su dirección, la libélula corrige su posición de modo que la reducción de la distancia continúe de manera constante. Durante toda la persecución, la imagen de la presa se mantiene en una parte específica de la retina (4° de azimut y 7° de elevación) que corresponde aproximadamente a la zona de la fovea de máxima resolución (Mischiati et al., 2015). En resumen, existen estudios realizados en una gran cantidad de especies de animales que muestran que los comportamientos de persecución de una potencial presa requieren que el animal que persigue fije la imagen del objetivo en una región de la retina de alta resolución o fovea (“foveación” o *tracking*). Si la presa, que generalmente está en movimiento se aleja de esa región, el predador cambia la posición de sus ojos, de su cabeza, o de su cuerpo, de manera de compensar ese desvío. Así, el animal continuamente está “foveando” a su presa, lo cual le permite perseguirla y atacarla con un alto grado de precisión.

La evitación de predadores por parte de las presas también requiere o puede verse beneficiada de la fijación y seguimiento visual de la imagen del predador. Durante los comportamientos de evasión guiados visualmente, los animales suelen escapar manteniendo al objeto de peligro detrás de ellos (si el animal corre, vuela o nada más rápido hacia adelante). En el caso de la mayoría de los cangrejos, que cuando escapan lo hacen corriendo de costado, la imagen del estímulo visual de peligro queda a uno de los dos lados (Land y Layne, 1995). En *Neohelice*, se encontró que la zona de máxima resolución en el plano azimutal se encuentra en el polo lateral del ojo (Berón de Astrada et al., 2012), por lo que cabe esperar que los animales fijen los objetos de interés en esa región. Los cangrejos no realizan fijación visual de objetos a través de movimientos oculares (Barnes y Nalbach, 1993), sino que lo hacen rotando todo su cuerpo (Land y Layne, 1995). Cuando el objeto amenazante cambia su trayectoria y por lo tanto su imagen se desplaza del polo lateral del ojo, el cangrejo rota su cuerpo para poder volver a ubicar la imagen en el punto de fijación y seguir alejándose del objeto corriendo de costado. Pero ¿cómo sabe el cangrejo cuándo y cuánto se desplazó la imagen de peligro como para cambiar correspondientemente la dirección de su carrera? La evasión de predadores se ha descrito de manera detallada en el cangrejo violinista (*Uca pugliator*) (Land y Layne, 1995). Estos cangrejos mostraron tener un sistema de control visual que les permite mantener a potenciales predadores en posición lateral. El análisis de la respuesta de escape permitió definir dos componentes del sistema de evasión que se emplean simultáneamente: uno *traslacional* que consiste en el alejamiento directo desde la posición que ocupa el objeto, sin cambiar la orientación del cuerpo. Es decir que, por

ejemplo, si el objeto se acerca desde adelante o desde atrás, el cangrejo se desplaza respectivamente hacia atrás o hacia adelante, pero sin rotar su cuerpo. El otro componente, *rotacional*, implica la rotación del cuerpo del animal, de modo de mantener el estímulo siempre cerca de los 90° del eje longitudinal del cuerpo, es decir en uno de los polos laterales. El primer mecanismo implica cambios en la dirección de traslación en relación al cuerpo, el último sólo implica rotación. Las observaciones sugirieron que el método más común de escape era la rotación acompañada de escape lateral, (Land y Layne, 1995). Como se observa en la figura 8, hay una alta correspondencia entre el ángulo que forma el estímulo visual amenazante con el cangrejo y la velocidad de giro del animal. Apenas el objeto se desplaza de la zona de fijación, el cangrejo realinea su cuerpo para volver a ubicarlo en el área de fijación de su ojo. Este mecanismo implica una retroalimentación continua ya que el animal ajusta constantemente su posición respecto de la posición del estímulo. El comportamiento de rotación frente a un cambio en la posición del objeto indica que los animales son sensibles a los desvíos del objeto con respecto al punto de fijación.

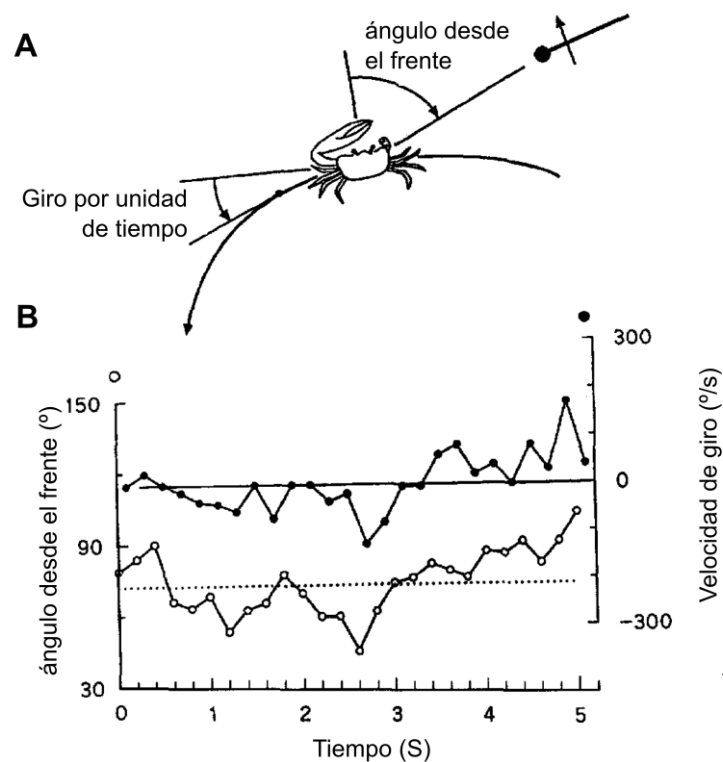


Figura 8. Mecanismo de rotación del cangrejo violinista para la evitación de predadores. A. Diagrama de un cangrejo escapando de un objeto amenazante, que muestra el ángulo con el eje corporal del cangrejo y la velocidad angular instantánea que se midió. B. Registro de 5 segundos de un cangrejo que se aleja corriendo de un objeto que se mueve de manera irregular. Se observa la similitud entre el curso temporal de la posición angular del estímulo relativa al cangrejo y la velocidad de giro del cangrejo. Figura tomada de Land y Layne, 1995.

Los elementos neurales y mecanismos por los cuales tanto los insectos como los crustáceos llevan adelante los comportamientos de fijación y seguimiento de imágenes de objetos que se mueven son prácticamente desconocidos.

10. Resumen de antecedentes de neuronas direccionales en artrópodos

Para realizar la corrección de desvíos descripta en la sección anterior, los animales deben contar con un mecanismo de detección de tales desvíos. Para que tal sistema sea eficiente, sería necesario que los elementos que lo componen tengan sensibilidad a la dirección y sentido de movimientos en el polo lateral del animal. Por tal motivo a continuación hablaremos de los antecedentes de neuronas direccionales en artrópodos.

Durante las últimas décadas se han descripto en artrópodos una gran cantidad de neuronas visuales sensibles a la dirección del movimiento (insectos: ej.: Wehner, 1981; Hausen y Egelhaaf, 1989; DeVoe et al., 1982; crustáceos: ej.: Wiersma y Yanagisawa, 1971; Sandeman et al., 1975).

En la *lobula plate* de distintas especies de moscas se ha descripto extensamente un importante grupo de interneuronas, las neuronas tangenciales de la *lobula plate* (LPTCs). Por el gran tamaño de sus procesos (más de 10µm de diámetro), estas células fueron de las primeras interneuronas visuales de insectos en ser registradas intracelularmente. En cada hemisferio, existen cerca de 60 LPTCs diferentes, cada una de las cuales puede ser identificada individualmente por sus características anatómicas y fisiológicas. En general, las LPTCs son sensibles al movimiento en determinada dirección y sentido (que es el sentido preferido) y se inhiben con el movimiento en la misma dirección, pero en sentido contrario (que es el sentido anti-preferido o nulo)(revisado en Borst y Haag, 2002). Haciendo experimentos de ablación y observando la similitud entre la respuesta de las LPTC y los distintos tipos de comportamientos guiados visualmente, se concluyó que estas neuronas analizan el flujo óptico generado por el movimiento del propio animal y guían la ejecución de las respuestas optomotoras y el control de la trayectoria de vuelo (Heisenberg et al., 1978; Geiger y Näsels, 1981; Geiger y Näsels, 1982; Hausen y Wehrhahn, 1983, 1990). Los distintos tipos de LPTC se pueden agrupar según la dirección de movimiento en que responden en dos clases: las que son sensibles al movimiento horizontal (*HS-horizontal sensitive*) y las que responden al movimiento vertical (*VS-vertical sensitive*) (Borst y Haag, 2002).

En varias especies de moscas también se describieron neuronas gigantes de la lóbula que se encontraban presentes únicamente en los machos de estas especies, las MLG (por su sigla en inglés *male-specific lobula giant*) (Strausfeld y Gronenberg, 1990; Trischler et al., 2007). Mediante registros intracelulares se encontró que estas neuronas respondían a objetos pequeños. Los machos de estas moscas (y no las hembras) tienen una zona en la retina de mayor resolución visual que tendría un rol determinante en la persecución de hembras para aparearse (Land y Eckert, 1985). Se ha descrito morfológicamente (Strausfeld, 1991) y fisiológicamente (Gilbert y Strausfeld, 1991), que tanto las neuronas columnares como los 12 tipos de MLG reciben información de esa zona de mayor resolución, excepto por un único subtipo, la MLG3, que recibe información de otras áreas del campo visual. El campo receptivo de las MLG, entonces, se encuentra direccionado hacia la zona de mayor resolución de la retina de las moscas, que es con la cual siguen visualmente a la hembra durante una persecución (Land y Collett, 1974). Además, algunos de los sub-tipos de estas neuronas mostraron cierto grado de direccionalidad (Gilbert y Strausfeld, 1991). Estas evidencias tomadas en conjunto llevaron a los autores de los distintos trabajos citados a proponer que las MLG estarían implicadas en comportamientos de persecución de hembras que generalmente suelen concluir con la cópula (ej.: Trischler et al., 2007). Sin embargo, otros autores proponen que las MLG responden a estímulos de flujo óptico panorámico (Gilbert y Strausfeld, 1991) y que en realidad no serían tan buenas para codificar la persecución de un objeto, de hecho son peores para esa función que las LPTC descritas en el párrafo anterior, de las cuales se sabe que claramente están asociadas con el análisis de flujo óptico (Nordström y O'Carroll, 2009).

En la lóbula de las abejas, también se sabe que hay neuronas sensibles a la dirección y sentido de movimiento (Kaiser y Bishop, 1970; DeVoe et al., 1982). Una cantidad importante de evidencias sugiere que estas neuronas, al igual que las LPTC descritas en moscas subyacen en alguna medida a los comportamientos optomotores (Kaiser y Bishop, 1970), responden excitándose cuando el panorama se mueve en sentido preferido e inhibiéndose cuando lo hace en sentido nulo.

En la lóbula de las libélulas se encuentran neuronas detectoras de movimiento de objetos pequeños (STMD, *Small Target Movement Detector*), que están probablemente involucradas en la búsqueda de presas, parejas o rivales. Mediante registros intracelulares de neuronas del tercer neuropilo óptico se observó la presencia de dos tipos de detectores de movimiento: neuronas sensibles a objetos pequeños (STDM) y neuronas sensibles a barras en movimiento (O'Carroll, 1993). Existen cerca de 20 tipos diferentes de neuronas STMD según sus características fisiológicas (O'Carroll, 1993; Nordstrom y O'Carroll,

2006). Sólo algunas de estas neuronas mostraron tener una cierta preferencia por el sentido de movimiento. Es decir que respondieron disparando más PA en la dirección preferida que en la nula, aunque en ningún caso se observaron inhibiciones en el sentido de movimiento nulo (O'Carroll, 1993).

En crustáceos se registraron extracelularmente neuronas con sensibilidad al sentido de movimiento, pero nuevamente, al tratarse de registros extracelulares realizados en el tracto protocerebral, estas no pudieron ser identificadas (Horridge y Sandeman, 1964; Wiersma y Yanagisawa, 1971). En el cangrejo *Neohelice granulata*, las MLG1 descritas en la sección 6 mostraron una mayor respuesta a objetos moviéndose en dirección horizontal que vertical, pero no hubo preferencia por el sentido de movimiento (Medan et al., 2007, 2015). Los otros 3 tipos de LG no mostraron ningún tipo de preferencia por la dirección y sentido de movimiento. Sin embargo, ocasionalmente se registraron neuronas que, cuando se estimulaban visualmente con un objeto que recorre un arco, parecían tener una mayor respuesta al movimiento en sentido horario que anti-horario o viceversa, incluso en algunas de ellas se observó un componente inhibitorio asociado al sentido nulo (Berón de Astrada y Tomsic, 2002). Estas neuronas fueron encontradas con muy baja frecuencia por lo que no lograron ser marcadas e identificadas. Una posible causa es que el estímulo utilizado no era el apropiado para detectar direccionalidad.

En resumen, el conocimiento sobre neuronas direccionales en artrópodos es escaso, y casi exclusivamente referido a las neuronas tangenciales de la *lobula plate*. En estas neuronas, sus propiedades de direccionalidad con relación a un comportamiento, el control del curso durante la navegación, está bien establecido (Hardcastle y Krapp, 2016). Por el contrario, en los pocos otros ejemplos de neuronas direccionales que se conocen, se ignora la manera en que esa propiedad participa en la organización de algún comportamiento. En definitiva, hasta donde sabemos no existe ninguna descripción, al menos en invertebrados, de neuronas sensibles a la dirección visual de movimiento de un objeto cuyo funcionamiento haya podido ser relacionado con algún comportamiento específico.

Hipótesis y objetivos

Basándonos en el desempeño comportamental que muestra *Neohelice granulata*, las dos hipótesis generales de esta tesis son:

“En el cerebro del cangrejo existen neuronas binoculares sensibles a movimiento de objetos a nivel del horizonte visual”

“En el cerebro del cangrejo existen neuronas sensibles a la dirección y sentido de movimiento de objetos, que forman parte de un mecanismo de detección de desvíos.”

Los objetivos específicos del trabajo consisten en:

- 1) Estudiar la posible existencia de neuronas binoculares y el modo en que integran la información visual, centrando nuestro estudio en células sensibles a objetos que se mueven frente al animal. Para ello, analizaremos la sensibilidad de las neuronas LG de *Neohelice* a objetos percibidos en distintas condiciones de visión binocular o monocular.
- 2) Revelar la existencia de neuronas direccionales, que puedan estar implicadas en la detección de desvíos que requiere el comportamiento de fijación de objetos en el polo lateral del ojo. En caso de hallarse tales elementos se realizará su caracterización fisiológica y morfológica.

Materiales y métodos

1. *Neohelice granulata*

Los animales utilizados fueron cangrejos de la especie *Neohelice granulata* (Sakai et al., 2006). Esta especie antes se ubicaba dentro del género *Chasmagnathus* (Dana, 1851). La especie pertenece a la superclase Crustácea, clase Malacostraca, orden Decapoda (Infraorden: Brachyura; Superfamilia: Grapsoidea; Familia: Varunidae). Para todos los experimentos se utilizaron machos adultos de entre 2,7 y 3,1 cm de ancho de caparazón y peso medio $17 \pm 0,2$ g.

Neohelice es un cangrejo semiterrestre eurihalino que habita zonas costeras del sudoeste del Océano Atlántico, desde el Golfo de San José (lado norte de la Península de Valdés) en la Patagonia Argentina hasta la laguna Araruama en Río de Janeiro, Brasil. Estos animales ocupan los bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición entre agua dulce y marina.

Los animales fueron capturados en los estuarios de agua salobre de San Clemente del Tuyú, provincia de Buenos Aires, Argentina, en donde la salinidad del agua se mantiene a lo largo del año entre 12 y 14‰. Luego de su captura, cada 15-20 días, son trasladados al laboratorio en donde se almacenan en contenedores plásticos de 35 x 48 x 27 cm conteniendo una profundidad de 0,5 cm de agua marina artificial preparada con Red Sea Coral Pro (salinidad 10-14‰ – pH:7,4-7,6). La habitación en la que se mantuvieron los animales tiene las paredes y el techo de policarbonato (translúcidas), por lo que se encontraban expuestos a luz natural. La temperatura se mantuvo entre 15 y 24 °C. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 9 y las 20hs durante los primeros 15 días de llegados los animales al laboratorio.

2. Registros electrofisiológicos

2.1. Preparación

Se realizaron registros intracelulares *in vivo* en neuronas de los lóbulos ópticos que se encuentran en los pedúnculos oculares de *Neohelice* siguiendo el procedimiento que ya se empleaba en el laboratorio, descrito en (Berón de Astrada et al., 2001). Brevemente, cada animal se sujeta firmemente con una pinza de ancho regulable por los costados del caparazón, dejando libre el movimiento de las patas. Con una tira de goma se sujetan las quelas para inmovilizarlas (figura 9A). Los pedúnculos oculares se fijan al caparazón con pegamento acrílico de secado rápido (La Gotita) en su posición normal de observación que corresponde a aproximadamente 50° respecto de la línea horizontal, luego se refuerza con

una pequeña ménsula de aluminio en forma de L para mejorar la estabilidad mecánica. Mediante un pequeño orificio en la parte dorsal del cefalotórax se coloca un electrodo de referencia en contacto con la hemolinfa (figura 9B). El animal se monta en el equipo de registro y bajo lupa se realiza una pequeña incisión para remover la región dorsal de cutícula de uno de los pedúnculos, quedando un orificio de aproximadamente 500µm que permite el acceso al lóbulo óptico (figura 9C) con el microelectrodo de registro que se encuentra posicionado de manera aproximadamente paralela al pedúnculo (figura 9D). El descenso del microelectrodo se controla con pequeños movimientos de un micromanipulador.

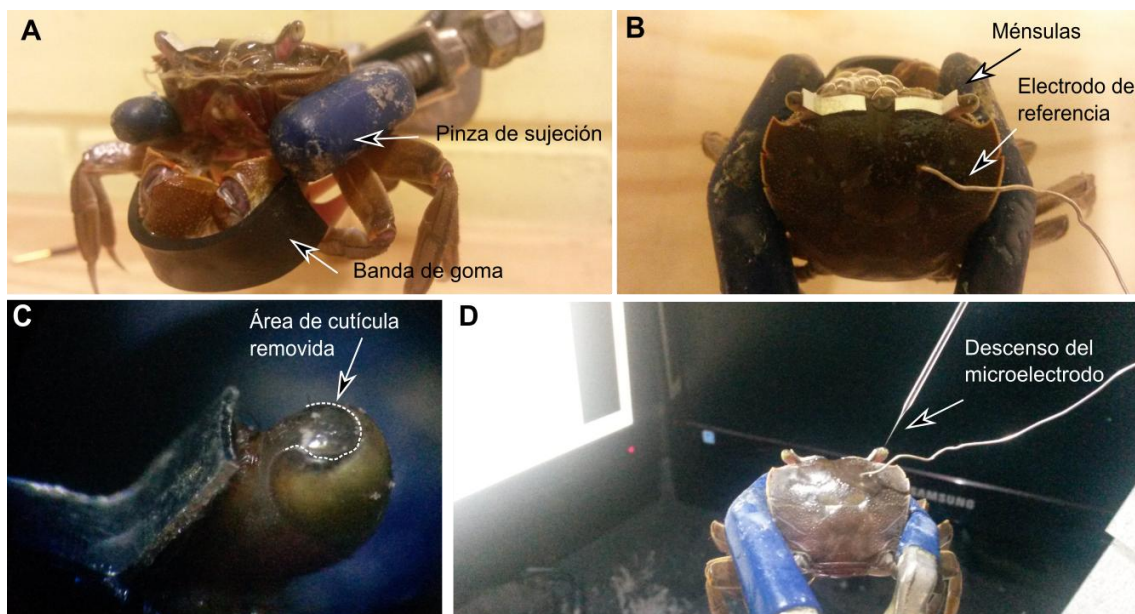


Figura 9. Preparación del cangrejo para registros intracelulares. A. El animal se sujeta con una pinza por ambos lados del caparazón. El movimiento de las quelas se previene pegándolas entre sí con una banda de goma. B. Los pedúnculos oculares se fijan al caparazón con pegamento acrílico de secado rápido y se aplican ménsulas metálicas para aumentar la estabilidad mecánica. El electrodo de referencia se inserta en el cefalotórax del animal para lo cual se realiza un pequeño orificio. C. Área de cutícula que se remueve de los pedúnculos para tener acceso a los lóbulos ópticos. D. El animal montado en el *setup* de electrofisiología, la foto muestra la posición del microelectrodo mientras desciende hacia el lóbulo óptico.

Para realizar los microelectrodos, se utilizan capilares de vidrio borosilicato (World Precision Instruments, Inc. Florida, USA) de 1,2mm de diámetro externo y 0,68mm de diámetro interno. Los capilares se estiran con un *puller* Sutter P97, y luego se llenan con KCl 3M, obteniéndose resistencias de entre 30 y 90 MΩ.

2.2. Dispositivo experimental

El dispositivo experimental consiste de una caja de Faraday cubierta por arriba y en tres de sus costados para prevenir estimulación visual no controlada desde el exterior, por delante de la caja se utiliza una cortina. Dentro de la caja se ubican dos monitores de pantalla plana (Samsung S20C300L, 19,5", a una tasa de refresco de 60Hz y una resolución de 1600x900 pixeles) posicionados a 35 cm en forma diagonal con respecto al frente del animal, como se muestra en la figura 10.

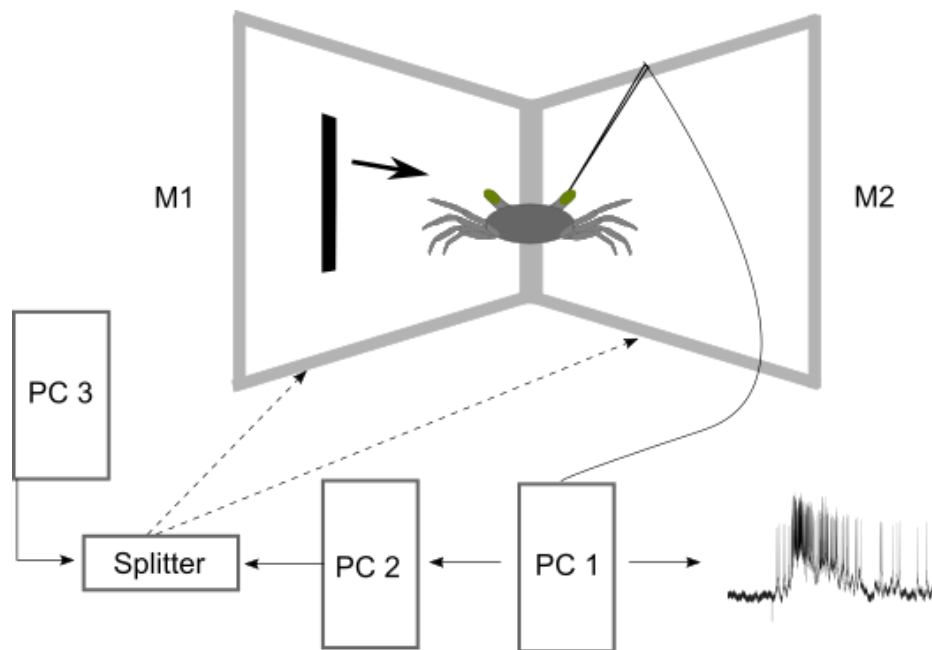


Figura 10. Dispositivo experimental. El *setup* de electrofisiología está montado sobre una mesa antivibratoria y está rodeado por una caja de Faraday de paredes sólidas y una cortina por delante para crear un entorno visual perfectamente aislado. El dispositivo para estimulación consiste en dos monitores (M1 y M2) colocados frontolateralmente. El cangrejo se sujeta con una pinza metálica a un estativo. La administración de imágenes y adquisición de datos se realiza con dos PC. La PC1 es utilizada para el registro de la actividad electrofisiológica, así como para gatillar a la PC2. La PC2 (utilizando el programa Presentation 5.3) genera las imágenes que se proyectan en el o los monitores. La señal de video es enviada desde la PC2 a un separador de señales de dos canales con interruptores controlables manualmente desde afuera de la caja de Faraday. De esta manera, se puede seleccionar si la señal aparecerá en ambos monitores o en cualquiera de ellos en cada momento sin perturbar al animal.

Los estímulos visuales son generados por la PC2 usando un software comercial (Presentation 5.3, Neurobehavioral Systems, Albany, USA). La PC3 se usa para generar una pantalla en blanco.

Las imágenes generadas con la PC2 y la PC3 son respectivamente multiplicadas a través de dos *splitter* y luego son seleccionadas entre una o la otra por medio de un conmutador manual ubicado fuera de la caja, para ser enviadas a cada uno de los dos monitores. De esta forma se puede optar por presentar el estímulo en cualquiera de los dos monitores o en ambos, eligiéndose así qué parte del campo receptivo del animal estimular.

La PC1 desencadena el comienzo del estímulo mediante un pulso TTL que envía a la PC2 y simultáneamente realiza la adquisición de datos. Esto permite alinear el curso temporal de los estímulos con el registro de las respuestas electrofisiológicas.

Las señales se amplificaron (Axoclamp 2B, Axon Instruments), digitalizaron a 10kHz (Digidata 1440A, Axon Instruments) y adquirieron con Clampex (pClamp9) para su análisis *off-line* con Clampfit (pClamp9). Durante los experimentos también se monitoreó la señal fisiológica con un osciloscopio analógico. Los animales eran periódicamente observados a través de un pequeño orificio en la cortina frontal de la caja de Faraday.

3. Estímulos visuales

Estímulo barra (EB):

Los estímulos visuales utilizados consisten en barras negras de 4 x 21cm, la imagen de esas barras subtiende sobre la retina del animal ubicado en la posición de registro un ángulo de 6° x 37°. Las barras se mueven sobre un fondo blanco en dirección vertical u horizontal en uno u otro sentido (hacia arriba, abajo, derecha o izquierda). El movimiento es siempre perpendicular al eje mayor de la barra y a una velocidad de 11 cm/s equivalente a velocidad angular de aproximadamente 19° por segundo. La distancia recorrida por el estímulo que se mueve horizontalmente es de 37cm, cubriendo un arco de 65°. El estímulo que se mueve verticalmente recorre una distancia de 17cm y cubre un arco de 33°. Para evitar el efecto en la respuesta fisiológica de la aparición y desaparición del estímulo desde y hacia el borde del monitor, la posición inicial y final de los estímulos mantiene una distancia de 1 cm con los bordes.

Estímulo panorámico (EP):

Para estudiar la sensibilidad de las neuronas por el movimiento panorámico, se usó un estímulo que consiste en un patrón de barras negras verticales (4 x 21cm) espaciadas entre sí 4 cm sobre un fondo blanco, moviéndose a una velocidad de 11 cm/s. Nótese que este patrón está formado por barras idénticas a la que compone el estímulo

barra. La imagen del estímulo panorámico en ambos monitores genera un flujo óptico, que representaría para el animal información de que está rotando sobre su propio eje.

4. Protocolo de registro y estimulación

Una vez preparado y posicionado el animal, se visualiza el pequeño orificio realizado en el pedúnculo con una lupa estereoscópica y se comienza a descender con el microelectrodo a través de ese orificio, no siendo posible visualizar las células que se van a registrar. El descenso se realiza en pequeños pasos acompañados de pulsos de sobrecompensación de la capacitancia (*buzz*) y observándose en todo momento los registros eléctricos en el osciloscopio y la computadora. Eventualmente se produce un cambio abrupto del voltaje registrado, que generalmente indica la entrada del microelectrodo en una célula. Cuando esto sucede se deja estabilizar el registro durante unos segundos. En la mayoría de los casos, debido a la ruptura abrupta de la membrana celular causada por la penetración del electrodo en la neurona, se observa una alta frecuencia PA. En muchos casos la estabilización del registro se favorece inyectando corriente negativa (entre 0,3 y 1 nA), que luego se retira lentamente antes de dar comienzo al experimento.

Una vez que el registro es estable, se procede a evaluar la respuesta de la neurona a distintos estímulos para saber si se trata de una neurona sensible al movimiento. Extensos estudios previos han demostrado que todas las neuronas sensibles al movimiento que se registraron en el lóbulo óptico tienen sus arborizaciones dendríticas en la lóbula (tercer neuropilo). Los resultados de aquellas neuronas que han sido teñidas en este trabajo son coincidentes con esas observaciones (ej.: Berón de Astrada y Tomsic, 2002; Medan et al., 2007). Estas neuronas responden más al movimiento que a cambios en la intensidad de luz. Además, la respuesta fisiológica a un pulso de luz de algunas de las neuronas de la médula (segundo neuropilo; por ejemplo las neuronas *dimming* y las *sustaining*) son muy características, de modo que cuando se encuentra alguna respuesta de este tipo se sabe que el electrodo está atravesando el segundo neuropilo, por lo que se continúa descendiendo lentamente hasta comenzar a encontrar las neuronas sensibles al movimiento del tercer neuropilo. Si la respuesta al pulso de luz no es característica de una neurona de identidad ya conocida, se mueve la mano o un rectángulo de cartón alrededor del cangrejo y se observa si la neurona responde o no al movimiento. Para los experimentos de la primera parte de esta tesis se buscaba registrar neuronas LG que, por su gran tamaño, se suelen encontrar con alta probabilidad. Una vez en la lóbula, aproximadamente el 85% de las neuronas que logran registrarse establemente muestran

buena respuesta al movimiento con las características fisiológicas ya descritas para estas neuronas (Medan et al., 2007). En los experimentos realizados en la segunda parte de esta tesis se buscó registrar específicamente neuronas sensibles a la dirección de movimiento, por lo que una vez que se confirmaba que respondían al movimiento se realizaba una prueba rápida con barras moviéndose en distintas direcciones. La frecuencia con la que las neuronas direccionales eran registradas varió abruptamente durante el período de realización de estos experimentos (aproximadamente dos años), alternando períodos de muy bajo éxito (una neurona direccional registrada en un mes de experimentos) con cortos períodos de muy buena probabilidad (cinco neuronas direccionales registradas en dos días de experimentos).

Una vez que se está registrando una célula de interés, se desciende la cortina negra que tapa la cara frontal de la caja de Faraday. En estas condiciones se dejan pasar al menos 2 o 3 minutos, de modo que la actividad espontánea se normalice.

Luego se presenta la imagen estacionaria del estímulo (barra o panorámico), y pasados al menos 30 segundos se da inicio al movimiento del mismo. El orden de estimulación (pantalla y dirección de movimiento) es aleatorizado y los estímulos se presentan con un intervalo entre ensayos de al menos un minuto para disminuir el efecto de la repetición.

5. Tinciones intracelulares

Luego de preparar a cada animal para registros electrofisiológicos y montarlo en el dispositivo de estimulación, se carga la punta del electrodo con neurobiotina 5% (Tris 50 mM, KCl 500 mM, pH=7,6) y se completa el electrodo con KCl 3M. Una vez completado el protocolo de estimulación para caracterizar fisiológicamente una neurona de interés se utilizan pulsos cuadrados de corriente de 500 ms de +2 a +5 nA para que la neurobiotina ingrese iontoforéticamente en la célula por un período de entre 20 min y 2 horas. Durante la inyección se hacen pausas para monitorear el estado de la neurona, evaluando su potencial de membrana y la respuesta a algún estímulo visual representativo. Luego de la inyección se deja difundir el marcador en el animal vivo entre 1 y 4 horas y luego, se realiza la disección extrayendo el lóbulo óptico. Se fija el tejido en 4% PFA (paraformaldehído) durante toda la noche. Luego se hacen 5 lavados cada 20 min con PTA (Buffer fosfato 0,1M, 2% Tritón, 0,1% Azida sódica) y se lo pasa a una solución 1/200 de Streptavidina-Alexa 647 o Streptavidina-DyLight 594 en donde se deja incubando durante 24 hs. Finalmente se lava 5 veces cada 20 min con PTA y se deshidrata en concentraciones

crecientes de alcoholes, para luego ser aclarado en metilsalicilato y montado en portaobjetos perforados. Para la observación del tejido en *whole-mount* se utiliza un microcopio confocal Olympus FV300. Se escanea el tejido tomando fotografías cada 1,5-10 μm a una resolución de 1024 x 1024 píxeles (Olympus Fluoview 1000).

6. Análisis estadístico

Para los análisis cuantitativos, se incluyen en los análisis las neuronas que responden con un mínimo de 10 PA frente a al menos una de las condiciones de estimulación. Los resultados se expresan como medias $\pm$ EE (error estándar).

En todos los casos se pudo utilizar estadística paramétrica. Para revelar diferencias de respuesta se utilizó la prueba *t* de Student para muestras pareadas o ANOVA de medidas repetidas de uno o dos factores. Se utilizaron las pruebas post hoc de comparaciones múltiples de Tukey o Bonferroni, según el caso. Para comparar ajustes de distribuciones, se utilizó la prueba *F* de suma de cuadrados. Todos los análisis estadísticos se realizaron con OriginPro8 SR0 (*OriginPro Corporation*) o con GraphPad Prism (*GraphPad Software*).

Las metodologías específicas de análisis de datos y estadística se detallan en cada sección según el diseño experimental.

Resultados

Parte 1: Integración de
información binocular en
Neohelice granulata

En esta primera parte se muestran los resultados de la búsqueda y caracterización de neuronas en el lóbulo óptico del cangrejo que integran información binocular de objetos en movimiento. Mediante distintos experimentos avanzamos en dirección a comprender cómo se da la transferencia de información entre un lóbulo óptico y el otro. Centramos nuestro estudio en la respuesta a estímulos que se presentan en la región ecuatorial del campo visual frontal dado que, siendo esta la parte del campo visual donde las proyecciones de un mismo objeto sobre ambos ojos subtiende el mayor ángulo posible, es la región en donde el mecanismo de estereopsis operaría con mejor precisión y donde tendría mayor relevancia.

Materiales y métodos

1. División reversible del campo visual

Para poder investigar la sensibilidad de las neuronas de un lado del cerebro frente a estímulos visuales de movimiento presentados a uno u otro ojo, desarrollamos un dispositivo experimental que nos permitió bloquear reversiblemente la visión de cada ojo a esos estímulos mientras realizábamos los registros intracelulares. El dispositivo consistió en una placa rectangular de cartón opaco negro que estaba sujeto a través de un dispositivo de control de altura regulable al techo de la caja de Faraday. El borde inferior de la placa estaba calado con la forma del contorno del caparazón del cangrejo de modo que se acoplaba a lo largo de su línea media sagital. El borde calado estaba recubierto con una pieza de goma blanda y opaca que permitía un ajuste suave al caparazón. El dispositivo se podía mover hacia arriba y hacia abajo separando por completo los campos visuales de ambos ojos. El movimiento se controlaba remotamente desde afuera de la jaula de Faraday por un motor paso a paso activado manualmente, de modo que cuando durante el descenso el borde modelado de la placa se encontraba próximo al caparazón del animal, se continuaba acercándolo muy suavemente y en pequeños pasos bajo continuo control visual, hasta ajustar el dispositivo al contorno dorsal del animal (figura 11).

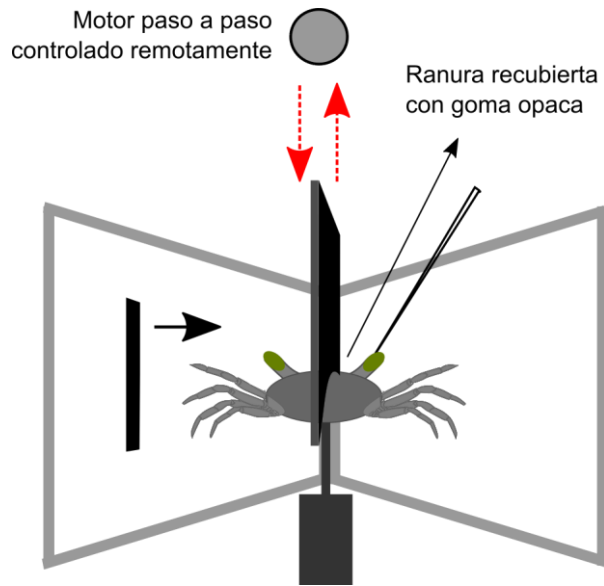


Figura 11. Dispositivo para dividir reversiblemente el campo visual de ambos ojos. El animal se encuentra montado en el dispositivo experimental detallado en la sección general de materiales y métodos. Desde el techo de la caja de Faraday se sostiene una pieza de cartón opaco negro con una ranura que tiene la forma del caparazón del cangrejo calada en su borde inferior. El borde de la ranura está recubierto por una goma blanda y opaca para lograr un buen ajuste al cangrejo. El cartón, controlado por un motor paso a paso, puede moverse hacia arriba y hacia abajo separando por completo el campo visual de ambos ojos.

2. Oclusión monocular reversible

Otro experimento que permitió evaluar la sensibilidad de las neuronas tanto en condiciones de estimulación binoculares como monoculares, consistió en bloquear la visión del ojo contralateral de manera reversible con un capuchón hecho de papel aluminio. De esta manera se pudo evaluar la respuesta de las neuronas a la visión monocular, cuando el animal veía el estímulo únicamente con el ojo ipsilateral y luego (o antes), sin el capuchón, es decir en condición binocular.

3. Estímulos visuales utilizados

Los estímulos visuales consistían en la barra negra que se describió en la sección general de materiales y métodos (Estímulo Barra). El estímulo se presentó por separado o simultáneamente en las dos pantallas, moviéndose hacia la derecha, hacia la izquierda, hacia abajo o hacia arriba, siempre perpendicular a su eje mayor, en condición monocular (con la división colocada entre los ojos) y binocular (sin la división). El orden de presentación de los estímulos, de la pantalla en que se presentaban y de la condición monocular o binocular fue balanceado a lo largo de los experimentos.

4. Análisis de datos

Los experimentos comprendían la presentación del estímulo moviéndose en las cuatro direcciones, en cada pantalla de forma independiente y en ambas pantallas simultáneamente, con y sin la división del campo visual, es decir, 24 estímulos administrados en aproximadamente 35 minutos de registro intracelular. Durante ese tiempo el animal esporádicamente movía las patas, causando en algunos casos la pérdida del registro de la neurona antes del final del experimento. A pesar de esto, pudimos completar toda la serie de estimulación en 34 animales. Aproximadamente uno de cada tres experimentos pudieron ser completados y además, en algunos pocos de ellos se pudo completar una segunda serie. En esos casos, la repetición del estímulo en la misma condición, mostró evocar respuestas altamente consistentes. La respuesta neuronal se consideró como la cantidad de potenciales de acción evocados entre el inicio y el final del movimiento del estímulo.

Para cuantificar las respuestas de las neuronas en la condición binocular (sin división del campo visual) a los estímulos movidos en el lado contralateral o ipsilateral, calculamos un índice de preferencia de lado (IPL). El IPL compara el número de potenciales de acción (PA) evocados por el estímulo ipsilateral con el que evoca un estímulo contralateral.

$$IPL = \frac{\text{Número de PA ipsi} - \text{Número de PA contra}}{\text{Número total de PA}}$$

Este índice varía entre -1 y 1: -1 corresponde a una preferencia exclusivamente contralateral, mientras que 1 corresponde a una preferencia exclusivamente ipsilateral. Debido a que los cangrejos tienen un campo visual de 360°, es posible que las neuronas respondan a un estímulo contralateral cuando lo ven con el ojo ipsilateral, de modo que el IPL no es un índice para caracterizar la binocularidad sino para caracterizar la ubicación del campo receptivo de cada neurona.

Por otro lado, con el fin de determinar la contribución de cada ojo a las respuestas obtenidas en condiciones binoculares, evaluamos las respuestas de cada neurona a la estimulación contralateral o ipsilateral con o sin la división del campo visual (ver arriba). Esto nos permitió calcular un índice de contribución monocular (ICM) para cada neurona, que es un índice normalizado análogo a los utilizados para describir circuitos binoculares en mamíferos y otras especies (Hubel et al., 1962; Ramdya y Engert, 2008). El ICM compara el número de PA evocado en visión binocular contra el evocado en visión monocular:

$$ICM = 1 - \frac{\text{Número de PA binocular} - \text{Número de PA monocular}}{\text{Número total de PA}}$$

Este índice varía entre 0 y 2, donde valores cercanos a 0 reflejan una respuesta monocular nula, valores alrededor de 1 reflejan respuestas monoculares y binoculares similares y valores cercanos a 2 reflejan una respuesta exclusivamente monocular que se suprime bajo visión binocular. Dada la variación natural de la actividad esperada en las neuronas registradas en un animal intacto y despierto, adoptamos un criterio conservador utilizado previamente en estudios relacionados para definir una diferencia de respuesta (por ejemplo, Livingstone y Conway, 2003; Ramdya y Engert, 2008). De acuerdo con ese criterio, se consideró que dos respuestas eran diferentes solo si diferían en más del 50% en la cantidad de PA evocados por el estímulo, ese porcentaje corresponde a valores ICM menores y mayores a 0,67 y 1,33 respectivamente.

Para medir la latencia de respuesta consideramos el tiempo transcurrido entre el comienzo del movimiento del estímulo y el primer PA evocado. Esto se determinó manualmente para distinguir los PA evocados por el estímulo de aquellos generados por actividad espontánea. Solo se tuvieron en cuenta los datos de latencia para los registros en donde esta distinción pudo establecerse de manera confiable.

5. Registros simultáneos intracelulares de neuronas en ambos lóbulos ópticos

Una manera de evaluar la interacción entre neuronas de ambos lóbulos ópticos es a través de la realización de registros intracelulares simultáneos en el animal vivo, lo que plantea un gran desafío metodológico. Para la realización de estos registros dobles simultáneos se accedió primero por uno de los pedúnculos. Una vez que, por el tipo de respuesta de las neuronas (ver métodos generales), confirmamos que el electrodo se encontraba ya registrando en la lóbula, ingresamos y descendimos con otro electrodo por el pedúnculo contralateral hasta ubicarlo también en la lóbula. A partir de allí, buscamos neuronas LG en uno y otro lóbulo óptico hasta lograr tener un registro estable con ambos electrodos. Una vez logrado esto, se realizaron inyecciones de corriente en una de las neuronas hasta aumentar al menos 3 veces su frecuencia de disparo espontánea, y se analizaron los posibles cambios ocurridos en la neurona contralateral. Luego se realizó el mismo procedimiento pero en dirección contraria, es decir aplicando la inyección de corriente en la otra neurona.

Capítulo 1: Transferencia contralateral de información visual de movimiento.

Resultados

1. Respuesta de las LG a estímulos contralaterales, ipsilaterales y bilaterales

Con el fin de evaluar las propiedades binoculares de neuronas sensibles a objetos moviéndose a nivel del horizonte, primero investigamos su capacidad para responder a estímulos presentados en el lado ipsilateral (el lado de registro) y en el lado contralateral de forma independiente, o en ambos lados simultáneamente (bilateral). Se registraron y analizaron 113 neuronas de 85 cangrejos que respondían al movimiento de la barra. En la figura 12 se ilustran ejemplos de la variedad de respuestas que obtuvimos a la barra moviéndose de izquierda a derecha en distintas neuronas. Los registros superiores son de una neurona que respondió con mayor intensidad al estímulo presentado en la pantalla ipsilateral, los registros del medio son de una neurona que respondió preferentemente al estímulo presentado en la pantalla contralateral y los registros inferiores son de una neurona que respondió de similar forma ante el estímulo moviéndose en cada una de las dos pantallas.

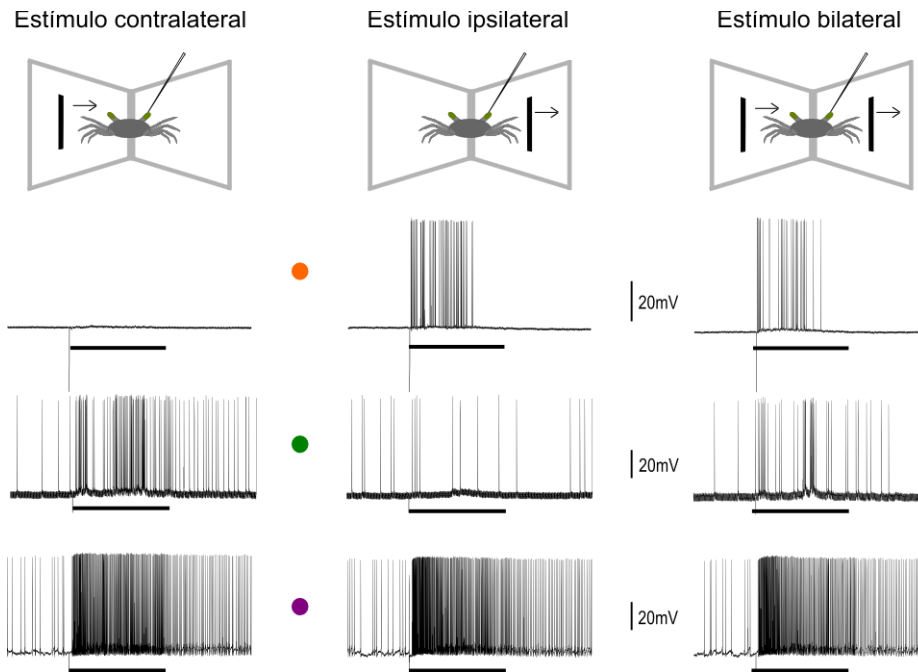


Figura 12. Ejemplos de neuronas que responden con distintos niveles de preferencia al movimiento de una barra en las distintas regiones del campo receptivo. La fila de arriba es una representación esquemática del dispositivo experimental que muestra los monitores de estimulación y la ubicación del cangrejo con el electrodo posicionado para registrar en los neuropilos ópticos que están dentro del pedúnculo derecho (no está en escala). A la izquierda el estímulo se presenta en el lado contrario al de registro (estimulación contralateral), en el centro el estímulo se presenta en el mismo lado de registro (estimulación ipsilateral), y a la derecha el estímulo se presenta simultáneamente en los dos monitores (estimulación bilateral). En todos los casos la barra se mueve hacia la derecha durante 3,36 s (barra negra horizontal debajo de los registros). Los tres registros de arriba son de una neurona que responde mayormente a estimulación ipsilateral aunque también a estimulación bilateral pero no a contralateral, los registros del medio corresponden a una neurona que responde a estimulación contralateral (preferentemente) y bilateral pero no a ipsilateral y los registros de abajo son de una neurona que responde igual a cada lado de estimulación.

En cada experimento, se presentaron barras que se movían hacia la izquierda, hacia la derecha, hacia abajo y hacia arriba. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos no fue posible obtener registros a las 4 direcciones, en cada uno de ambos monitores por separado y simultáneamente. Además, algunas neuronas mostraban respuestas en a una dirección y sentido de movimiento en particular. Consecuentemente, el número de neuronas analizadas fue diferente para las distintas direcciones y sentidos de movimiento. Esos números fueron: hacia la derecha, $n=105$; hacia la izquierda, $n=94$; hacia abajo, $n=91$; hacia arriba, $n=84$. En la figura 13 se ven los promedios de potenciales de acción evocados en cada una de las direcciones y sentidos de movimiento del estímulo,

en cada uno de los lados de estimulación. Con independencia de la dirección de movimiento, el número de potenciales de acción evocados por el estímulo ipsilateral fue siempre significativamente mayor que el evocado por la presentación contralateral del mismo estímulo. Por otro lado, el promedio de potenciales de acción evocados por estimulación bilateral tendió a ser menor al promedio de los evocados por estimulación ipsilateral en todos los casos, alcanzando valores de significancia estadística para los estímulos verticales (ANOVA de un factor de medidas repetidas; comparaciones múltiples de Tukey) (figura 13, lado izquierdo).

Para evaluar las respuestas de las neuronas individuales utilizamos el IPL (figura 13, lado derecho, ver métodos). La distribución de frecuencias del IPL muestra que, para las 4 direcciones de movimiento, la mayoría de las neuronas registradas tienen valores comprendidos entre $\pm 0,33$, eso significa que respondieron de manera bastante similar al estímulo presentado en uno u otro lado. Sin embargo, algunas neuronas mostraron IPL por encima o por debajo de estos valores, lo cual indica que respondieron con al menos un 50% más de PAs al estímulo presentado de un lado que del otro. La distribución de los IPL individuales de las neuronas (puntos rojos) muestra que hay un mayor número de neuronas con valores de IPL positivos, lo que significa que respondían más a la estimulación ipsilateral que a la contralateral. De hecho, para las 4 direcciones de movimiento se observa que una mayor cantidad de neuronas (10 en los primeros dos casos) respondieron exclusivamente al estímulo cuando éste se presentaba en el lado ipsilateral (IPL = 1), mientras que para los cuatro casos solo una o dos neuronas respondieron exclusivamente al lado contralateral (IPL = -1). En general, la forma de la distribución de frecuencias de IPL es similar para las cuatro direcciones de movimiento. En cuanto a las neuronas con los valores absolutos de IPL más altos se identificaron como neuronas MLG1, que tienen campos receptivos más pequeños y por lo tanto limitados a una sola pantalla (Medan et al., 2007, 2015) o como pertenecientes a un grupo de neuronas de la lóbula sensibles a la dirección y al sentido de movimiento de la barra que se describen en la segunda sección de esta tesis. Debido a que tienen un campo receptivo acotado a la región visual lateral del campo ipsilateral, estas células no fueron consideradas en los análisis que siguen.

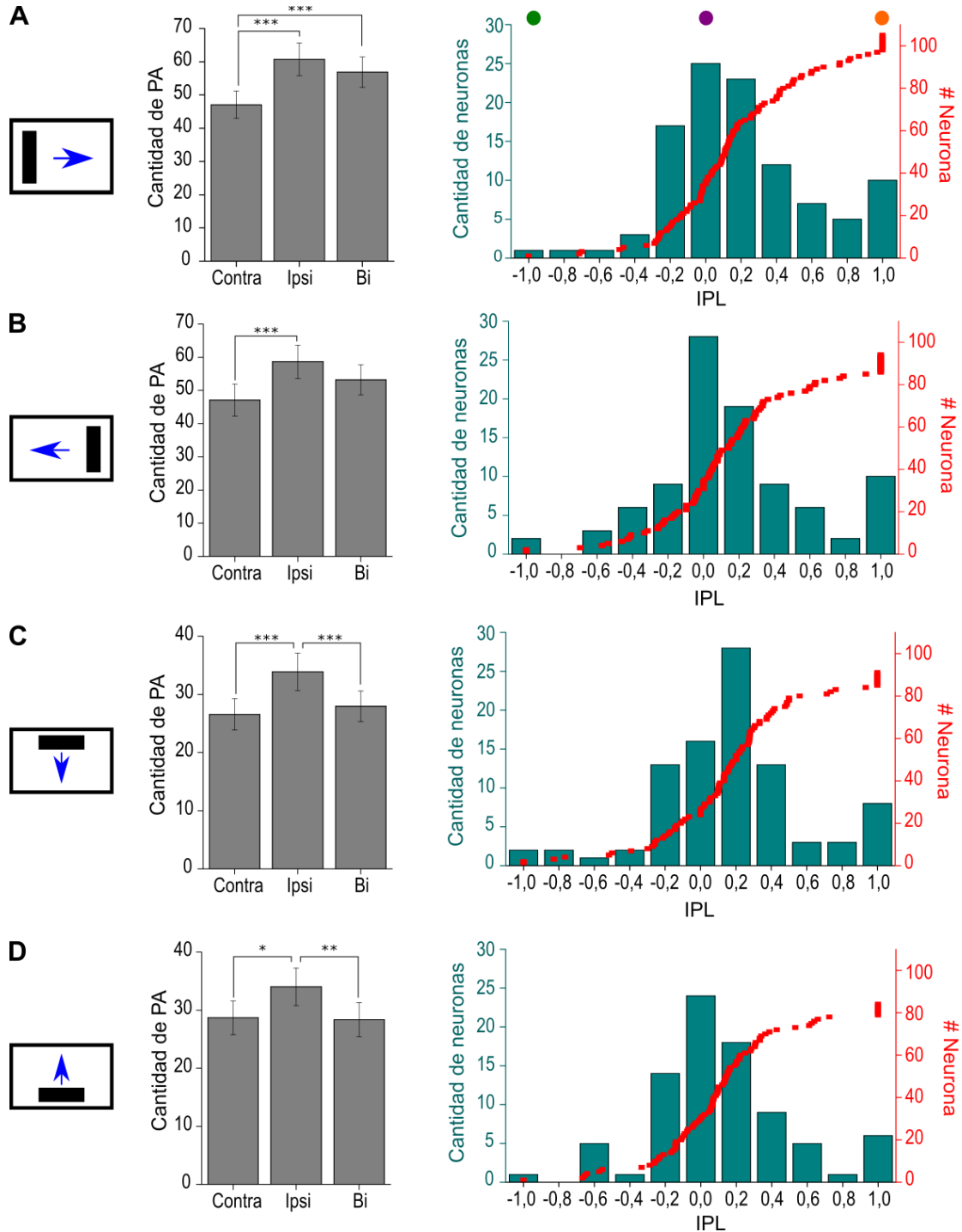


Figura 13. Evaluación de la preferencia de neuronas de la lóbula a distintos lados de estimulación. A la izquierda: dirección y sentido de movimiento de la barra. En el medio: número medio de potenciales de acción evocados en el mismo grupo de neuronas por estimulación contralateral (Contra), estimulación ipsilateral (Ipsi) o estimulación bilateral (Bi). A la derecha: distribución de frecuencias de los valores de IPL (Índice de preferencia de lado) para las neuronas registradas. Los puntos rojos representan el IPL individual de cada una de las neuronas registradas. Los puntos violeta, naranja y verde representan la posición en el histograma de los correspondientes registros ilustrados en la figura 12. A. Para la barra moviéndose de izquierda a derecha, n=105. B. Barra moviéndose de derecha a izquierda, n=94. C. Barra moviéndose de arriba abajo, n=91. D. Barra moviéndose de abajo a arriba, n=84. Las barras representan media $\pm$ EE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

2. Clasificación de neuronas LG por su grado de integración binocular

Para evaluar en qué medida las LG integran la información que es percibida por uno y otro ojo, se registró la respuesta de neuronas sensibles al movimiento en las cuatro direcciones de estimulación en condición binocular (sin división entre los ojos) y en condición monocular (con división entre los ojos). Como el propósito primero de estos experimentos era evaluar si las neuronas podían responder a los estímulos vistos de forma independiente por uno u otro ojo, concentramos el análisis solo en aquellas neuronas cuyos campos receptivos se encontraban ubicados hacia el frente, es decir repartidos entre ambos monitores. Por otra parte, completar los experimentos frente a las 4 direcciones de estimulación, en los dos monitores, con y sin el tabique, presentaba el desafío de registrar intracelularmente de forma estable la neurona por más de 35 min (ver métodos de esta parte). Al igual que como se explicó antes, aquí también el número de neuronas que pudieron ser analizadas fue diferente para las distintas direcciones y sentidos de movimiento. Esos números fueron: hacia la derecha, $n=42$; hacia la izquierda, $n=35$; hacia abajo, $n=38$; hacia arriba, $n=37$.

En líneas generales, se observó que del conjunto de neuronas registradas algunas mostraban un grado de integración binocular mayor que otras y que, en distintas neuronas, cada ojo contribuía de manera diferente a la respuesta de la neurona. Para simplificar la comprensión del análisis que se muestra a continuación, sólo mostraremos los resultados para una de las direcciones de estimulación, la que corresponde al estímulo moviéndose de izquierda a derecha, que es la dirección para la cual pudo obtenerse el mayor número de registros. Más adelante, mostraremos que estos resultados son equivalentes si repetimos este análisis para la respuesta de las neuronas frente a los estímulos moviéndose en las demás direcciones.

De las 105 neuronas que mostraron respuesta en al menos uno de los lados de estimulación frente al estímulo moviéndose hacia la derecha (figura 13A), 94 respondieron a la presentación del estímulo en ambos lados (11 lo hicieron sólo a uno u otro lado). De esas 94 neuronas, en 42 experimentos logramos registrar además sus respuestas monoculares a estimulación contralateral e ipsilateral, (es decir, en 42 casos los estímulos se presentaron en cada monitor y en ambos simultáneamente, con y sin el tabique entre los ojos). La figura 14A da una muestra de la variabilidad de respuestas frente a este estímulo que registramos en diferentes neuronas. En función de sus respuestas a las distintas condiciones de estimulación, las neuronas se clasificaron en categorías, las que se explican en detalle a continuación. La figura 14B muestra el código

asignado a cada categoría. El código está compuesto por dos dígitos, cada uno de los cuales toma el valor 0, 1 o 2, de acuerdo al valor del índice de contribución monocular (ver en métodos de esta parte y más adelante en este mismo capítulo) con estimulación contralateral (primer dígito) y del índice de contribución monocular con estimulación ipsilateral (segundo dígito) de la neurona. La figura 14B contiene además un esquema conceptual de las vías que podrían explicar las respuestas observadas en cada neurona ejemplificada a la izquierda.

Las categorías de la figura 14, se pueden describir de la siguiente manera:

-*Categoría 1-1*: incluye la mayoría de las neuronas registradas (41%) y corresponde a neuronas que tienen respuestas similares a estimulación monocular y binocular, tanto para estímulos contralaterales como ipsilaterales. Las respuestas a estimulación contralateral podrían explicarse únicamente por la visión monocular del ojo contralateral, asimismo, las respuestas a estimulación ipsilateral podrían explicarse únicamente por la visión monocular del ojo ipsilateral. La visión binocular no aumenta ninguna de las respuestas (ver los registros 1-1 y el esquema en la fig. 14).

-*Categoría 0-0*: incluye neuronas que mostraron tener una respuesta robusta solo en condiciones de visión binocular. El 7% de las neuronas están dentro de esta categoría. Las respuestas a estímulos contralaterales e ipsilaterales requieren la integración de la información que entra por ambos ojos. Las respuestas en condiciones de visión monocular son insignificantes (registros 0-0 y esquema en la fig. 14).

-*Categoría 0-1*: contiene el segundo tipo de neuronas más representado en la totalidad de neuronas registradas (27%), son neuronas con poca o ninguna respuesta a la estimulación monocular contralateral pero respuestas monoculares y binoculares similares cuando se estimula ipsilateralmente. Por lo tanto, las respuestas a ambos lados de estimulación se obtienen principalmente de la información que entra por el ojo ipsilateral (0-1 en la fig. 14).

-*Categoría 1-0*: incluye neuronas con respuestas monoculares y binoculares similares cuando la estimulación es contralateral, pero con poca respuesta a la estimulación monocular ipsilateral. Por lo tanto, las respuestas a ambos lados de estimulación se obtienen principalmente de la entrada de información por el ojo contralateral. El 2% de las neuronas entran en esta categoría (1-0 en la fig. 14).

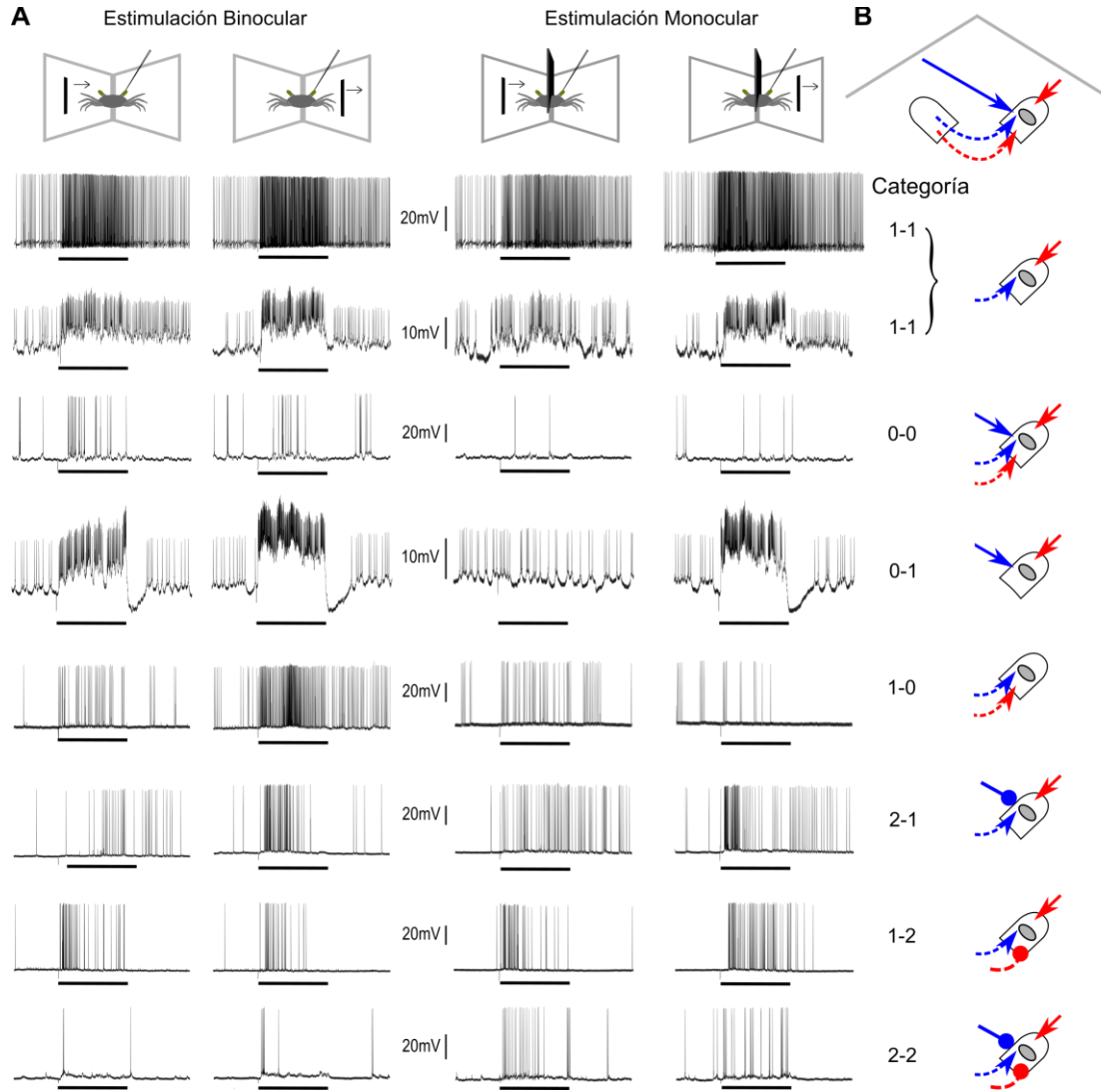


Figura 14. Variedad de respuestas de neuronas gigantes de la lóbula (LG) a estimulación contralateral o ipsilateral en condición binocular y monocular. A. Ejemplos de neuronas LG (cada fila es una única neurona) que pertenecen a distintas categorías (desde 0-0 hasta 2-2) definidas por el ICMc y el ICMi descrito en el texto. Como la categoría 1-1 es la más frecuente, se muestran dos ejemplos. En las dos columnas de la izquierda los cangrejos ven el estímulo con los dos ojos (condición binocular). En las dos columnas de la derecha el cangrejo tiene un tabique entre ambos ojos, por lo que puede percibir el estímulo sólo con un ojo (condición monocular). B. El esquema de arriba muestra el razonamiento general usado para interpretar cada una de las categorías de respuesta ilustradas debajo. Las líneas sólidas representan información entrando por el ojo ipsilateral y las líneas punteadas representan información que entra por el ojo contralateral. Los colores rojo y azul son para los estímulos presentados del lado ipsilateral o contralateral, respectivamente. El óvalo gris representa la neurona LG registrada. Las terminaciones en forma de flecha o de círculo representan vías excitatorias e inhibitorias, respectivamente. Cada esquema representa la combinación de vías que podría explicar las respuestas de la correspondiente neurona alineada a la izquierda.

-*Categoría 1-0*: incluye neuronas con respuestas monoculares y binoculares similares cuando la estimulación es contralateral, pero con poca respuesta a la estimulación monocular ipsilateral. Por lo tanto, las respuestas a ambos lados de estimulación se obtienen principalmente de la entrada de información por el ojo contralateral. El 2% de las neuronas entran en esta categoría (1-0 en la fig. 14).

-*Categoría 2-1*: el 5% del total de neuronas tuvieron respuestas monoculares y binoculares similares a estimulación ipsilateral, pero con respuestas binoculares que son más débiles que las monoculares cuando la estimulación es contralateral (2-1 en la fig. 14). Las respuestas a estimulación ipsilateral podrían explicarse sólo por la entrada monocular del ojo ipsilateral. Las respuestas a estimulación contralateral estarían determinadas por los aportes excitatorios del ojo contralateral y los inhibitorios del ojo ipsilateral.

-*Categoría 1-2*: corresponde a las neuronas que muestran respuestas monoculares y binoculares similares con estimulación contralateral, pero con estimulación ipsilateral las respuestas son más débiles en condición binocular que en condición monocular. Aquí, las respuestas a la estimulación contralateral pueden explicarse solo por la información que entra monocularmente por el ojo contralateral. Las respuestas binoculares a la estimulación ipsilateral se reducirían por la entrada de conexiones inhibitorias del ojo contralateral. El 2% de las neuronas son parte de esta categoría (1-2 en la fig. 14).

-*Categoría 2-2*: comprende una proporción considerable de neuronas (15%), que muestran respuestas monoculares, pero que se inhiben en condiciones de estimulación binocular para ambos lados de estimulación. Para los estímulos ipsilaterales, estas neuronas recibirían aportes excitatorios del ojo ipsilateral y aportes inhibitorios del ojo contralateral, mientras que para la estimulación contralateral recibirían aportes excitatorios del ojo contralateral e inhibición del ojo ipsilateral (2-2 en la figura 14).

-Finalmente, la *categoría 2-0* comprendería neuronas con respuesta monocular más alta que la binocular a la estimulación contralateral, y respuesta monocular débil a la estimulación ipsilateral, mientras que la *categoría 0-2* comprendería neuronas con respuesta monocular más alta que la binocular a la estimulación ipsilateral, y respuesta monocular débil a estimulación contralateral. No se registró ninguna neurona que correspondiese a ninguna de las dos últimas categorías.

3. Contribuciones de cada ojo a la respuesta binocular de las LG

Para evaluar en qué medida contribuye cada ojo a la respuesta binocular de las LG comparamos, en primer lugar, la respuesta promedio de todas las neuronas frente al estímulo presentado en un lado, en otro y en ambos simultáneamente, en condición binocular y monocular. En la figura 15A se ven los promedios de PA evocados por el estímulo que se mueve hacia la derecha en cada una de las condiciones de estimulación. El análisis estadístico mostró que las respuestas difieren significativamente según el lado en que se presenta el estímulo (Ipsi, Contra o Bilateral), siendo menor la respuesta a estímulos contralaterales que a estímulos ipsi o bilaterales (figura 15A). Este resultado coincide con lo que habíamos observado en el análisis de la figura 13, que contenía un mayor número de neuronas, todas evaluadas en la condición binocular. Por otro lado, la comparación entre la respuesta evocada en condición binocular y monocular, aunque muestra una tendencia, no mostró ser estadísticamente diferente (ANOVA de dos factores para medidas repetidas Lado: $F_{(2, 82)} = 15.01$, $p < 0.001$; Condición: $F_{(1, 41)} = 1.62$, $p = 0.21$; Lado x Condición: $F_{(2, 82)} = 2.48$, $p = 0.09$). Es decir que en todos los casos, independientemente de la condición de estimulación (binocular o monocular), la respuesta a estímulos ipsilaterales fue mayor que a estímulos contralaterales (Comparaciones múltiples de Tukey: contralateral vs. ipsilateral $p < 0.001$; figura 15A). Sin embargo, lo más importante a destacar es que, aún en la condición de estimulación monocular, hay una importante respuesta a estímulos contralaterales. En esta condición, el cangrejo no ve el estímulo con el ojo ipsilateral (el del lado de registro), de modo que toda la respuesta que vemos se debe a la transferencia de información que ingresa desde el ojo contralateral. Por lo tanto, el resultado demuestra de modo contundente que gran cantidad de información de movimiento que ingresa por el ojo contralateral alimenta las neuronas que registramos en el lado ipsilateral.

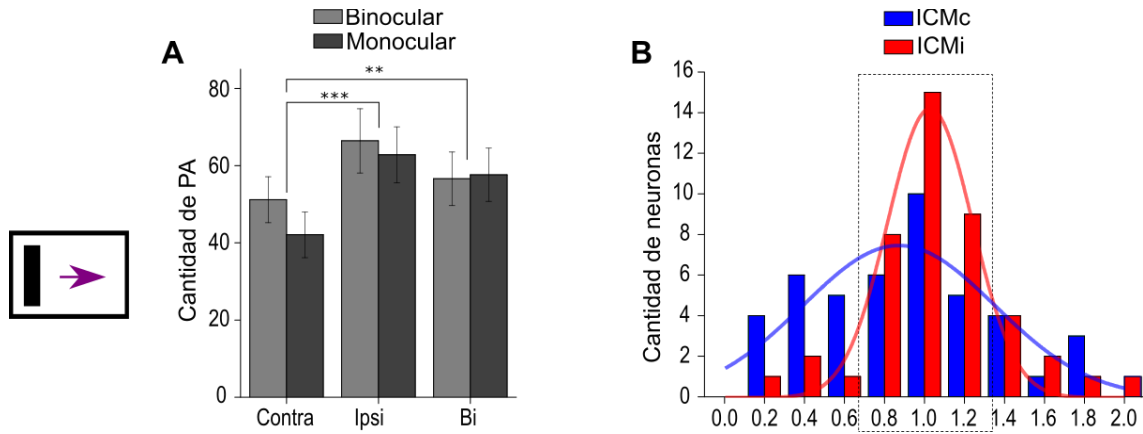


Figura 15. Respuestas binoculares y monoculares a estímulos contralaterales e ipsilaterales. A. Intensidad media de respuesta a estímulos contralaterales (Contra), ipsilaterales (Ipsi) y bilaterales (Bi) para una barra moviéndose hacia la derecha (n=42). Barras gris claro (Condición Binocular), barras gris oscuro (Condición monocular). Las barras muestran media $\pm$ EE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. B. Histograma de la distribución de las neuronas de acuerdo a sus valores de ICM (ver en el texto). Barras azules: ICM contralateral. Barras rojas: ICM ipsilateral.

Para evaluar la contribución de cada uno de los ojos (contralateral e ipsilateral) a las respuestas binoculares que se obtuvieron en cada neurona, utilizamos un índice de contribución monocular, ICM (ver métodos). La figura 15B muestra la distribución de frecuencias del ICM calculado con la respuesta al estímulo que se mueve hacia la derecha presentado del lado contralateral e ipsilateral (ICMc e ICMi, respectivamente). Se observa que la distribución del ICMi está centrada en 1, con la mayoría de las neuronas comprendidas entre 0,67 y 1,33, eso implica que para estímulos presentados del lado ipsilateral, las respuestas en condición monocular y binocular son similares. Por otro lado, la distribución del ICMc, muestra una distribución algo más extendida y con el centro levemente desplazado hacia valores menores, es decir que un número considerable de neuronas tomaron valores menores a 0,67. Para esas neuronas, la contribución del ojo contralateral a la respuesta binocular fue mínima, de modo que la respuesta que se observa en condiciones de estimulación binocular se explicaría principalmente por la información que ingresa desde el ojo ipsilateral. La prueba F de suma de cuadrados, mostró que el ajuste era significativamente mejor cuando los datos se ajustaban a dos Gaussianas diferentes (una para ICMc y otra para ICMi) que cuando se ajustaban a una sola ($F_{(3, 16)} = 8.58$, $p < 0,01$). En otras palabras, si bien claramente hay un alto grado de integración binocular evidenciado por la robusta respuesta que se observa al estimular el ojo contralateral en condiciones monoculares, en una cantidad considerable de neuronas la información que llega desde el ojo contralateral es menor que la que entra por el ojo ipsilateral.

Otra manera de estudiar las interacciones binoculares en las distintas neuronas, consistió en analizar de manera individual los ICMi e ICMc de ambos ojos para cada una de las unidades registradas. En la figura 17 se encuentran graficados los valores de ambos ICM de cada neurona, de cuya combinación se establecieron las nueve categorías descritas en las páginas 48-50 e ilustradas en la figura 14. En la figura 17 las categorías están separadas por líneas punteadas. Para la definición de las categorías se consideró que las respuestas monoculares eran distintas de las binoculares cuando había una diferencia de al menos el 50% en la cantidad de PA evocados. Como se puede observar, dado que la mayoría de las neuronas mostraron valores similares de ICMi e ICMc, éstas parecen agruparse alrededor de una recta de pendiente 1. Es decir que, para esas neuronas, ambos ojos (ipsi y contralateral) contribuyeron igualmente a la respuesta binocular. Sin embargo, algunas de las neuronas mostraron valores de ICM mayores para un ojo que para el otro, lo que indica que en esos casos uno de los ojos contribuyó de manera preponderante a la respuesta binocular. Una gran proporción de los casos en que se observa esa asimetría corresponde a neuronas que pertenecen a la categoría 0-1, para las cuales la contribución del ojo contralateral fue menor que la del ojo ipsilateral (figura 17).

Los círculos vacíos de la figura 17 corresponden a un experimento que se explicará en detalle más adelante.

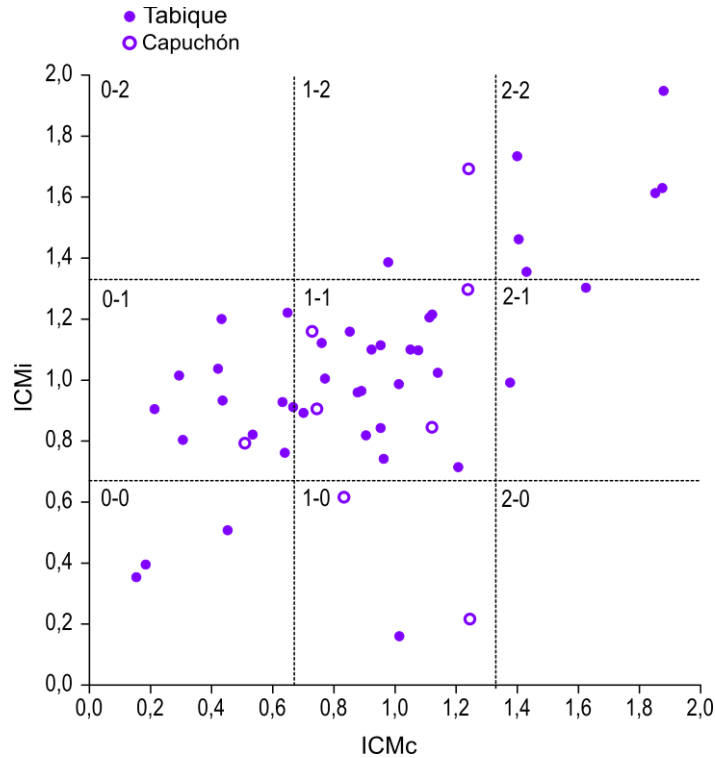


Figura 17. Gráfico de dispersión de los valores de ICMc e ICMi para cada neurona. ICM ipsilateral en el eje de ordenadas e ICM contralateral en el eje de abscisas. Cada punto representa una neurona registrada. Los puntos llenos corresponden a neuronas que fueron registradas con y sin la división entre los ojos. Los puntos vacíos corresponden a neuronas que fueron registradas con y sin el capuchón en el ojo contralateral. Las líneas punteadas definen los límites entre categorías denominadas de 0-0 a 2-2 como se describe en el texto.

4. ¿Binocularidad o ampliación de campos receptivos?

Los resultados mostrados hasta aquí corresponden a un experimento en el que se utilizó un tabique entre los dos ojos para dividir el campo visual del animal, de ese modo impedimos que el animal pudiera ver el estímulo con los dos ojos (visión binocular). El análisis de las contribuciones monoculares de cada ojo y de las interacciones binoculares entre ambos llevado a cabo en las secciones anteriores implica necesariamente que las neuronas estudiadas tienen un campo receptivo amplio que abarca ambos lados de estimulación (ipsi y contralateral). Así, cada neurona estaría recibiendo información sobre la totalidad del campo receptivo desde cada uno de los ojos, de modo que existiría superposición total en cada punto del espacio. Alternativamente, la visión del campo izquierdo y derecho podría ser provista por el ojo izquierdo y derecho respectivamente, es decir que los campos receptivos no estarían superpuestos sino que serían complementarios. La primera alternativa es compatible con el potencial uso de la

binocularidad para, por ejemplo, estimar distancias por estereopsis. Sin embargo, el uso de la división entre los ojos, no nos permitió evaluar la respuesta de las neuronas a un estímulo moviéndose del lado contralateral cuando era visto solamente por el ojo ipsilateral, es decir que siempre que se evocó una respuesta monocular a estímulos contralaterales, esta respuesta provenía del ojo contralateral. Por lo tanto, los resultados que obtuvimos podrían también ser compatibles con neuronas que recibieran información desde el ojo ipsilateral sobre el campo receptivo orientado hacia el lado ipsilateral y desde el ojo contralateral sobre el campo receptivo contralateral. Para decidir entre estas dos posibilidades, realizamos otro experimento en donde evaluamos si las neuronas respondían cuando el ojo que estaba viendo era el ipsilateral pero el estímulo era presentado del lado contralateral. En este experimento, en lugar de usar el tabique divisorio, usamos un capuchón de papel de aluminio para cubrir reversiblemente el ojo contralateral (ver en métodos de esta parte). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18. Al igual que en los experimentos anteriores, no se observa una diferencia en la intensidad de respuesta según si los estímulos se presentan mono o binocularmente, por lo que podemos decir que las neuronas responden a estímulos contralaterales vistos con el ojo ipsilateral.

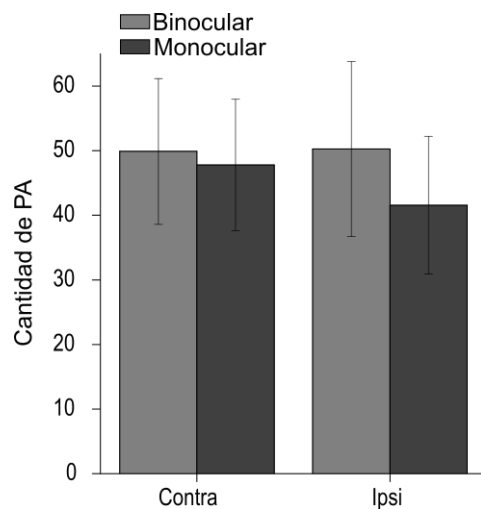


Figura 18. Respuesta media a estímulos contralaterales e ipsilaterales en condición binocular o monocular obtenida en experimentos con capuchón en el ojo contralateral. No hay diferencias significativas entre los distintos lados y condiciones de estimulación. A diferencia del experimento anterior, en este experimento los estímulos contralaterales se ven, en la condición monocular, con el ojo ipsilateral. Contralateral (Contra), Ipsilateral (Ipsi). Barras gris claro (condición binocular), barras gris oscuro (condición monocular).

Los ICM de las 8 neuronas registradas en esta condición experimental se incluyeron también en la figura 17 (círculos vacíos). Cabe señalar que en estos experimentos el ICMc tiene un significado diferente de la contribución monocular que en

los experimentos anteriores. Mientras que en los experimentos con el tabique divisorio la respuesta monocular a la estimulación contralateral fue provocada por la información visual que entraba por el ojo contralateral, en el experimento del capuchón la respuesta monocular a la estimulación contralateral fue consecuencia de la visión del movimiento del estímulo con el ojo ipsilateral. Excepto por un único caso, en la figura 17 se observa que todas las neuronas evaluadas con el experimento del capuchón (círculos vacíos) tuvieron ICMc cercanos a 1, indicando que las respuestas a estímulos contralaterales fueron similares en la condición binocular y en la condición monocular (en la que estaba siendo visto por el ojo ipsilateral). La importancia de estos resultados, es que demuestran que las neuronas reciben información de los mismos puntos en el espacio a través de ambos ojos, es decir que procesan binocularmente la información de un objeto en movimiento.

5. Comparación entre las contribuciones de cada ojo a la respuesta binocular de las LG frente a distintas direcciones de movimiento

Para evaluar si las interacciones binoculares de las neuronas LG eran dependientes de la dirección y sentido de movimiento de los estímulos, se realizó el análisis de contribuciones monoculares a la respuesta binocular que se muestra en la figura 15, para cada una de las direcciones de movimiento. En primer lugar, se compararon los promedios de intensidades de respuesta para cada lado de estimulación y para la estimulación simultánea de ambos lados, en condiciones binoculares y monoculares, para cada una de las direcciones de movimiento. Las figuras 19A, B, C y D muestran los resultados en respuesta a estímulos moviéndose hacia la derecha (mismos gráficos de la figura 15; $n=42$), izquierda ($n=35$), abajo ($n=38$), arriba ($n=37$), respectivamente. En los paneles de la izquierda vemos la respuesta promedio a cada lado de estimulación (Contra, Ipsi, Bilateral) en cada condición (mono y binocular). Al igual que para la barra moviéndose a la derecha que analizamos previamente (figura 19A), en todos los casos la respuesta a estímulos contralaterales es menor que a estímulos ipsilaterales, independientemente de la condición (mono o binocular). Es interesante notar que para las barras moviéndose en dirección vertical (figuras 19C y D) la diferencia entre respuestas bi y monoculares alcanza la significancia estadística, siendo menor la respuesta a estímulos presentados monocularmente que binocularmente (Comparaciones múltiples de Tukey para el factor condición binocular o monocular, significativos para estímulos ipsilaterales y contralaterales, indicados con asteriscos en las figuras 19C y D). Sin embargo la respuesta a estímulos presentados en condición monocular sigue siendo robusta cuando el estímulo

se presenta en el lado contralateral, lo que indica que al menos de modo parcial la información de movimientos verticales también se transfiere de un lado al otro del cerebro. Respecto de la distribución de índices que puede observarse para los mismos estímulos en los paneles izquierdos de las figuras 19B, C y D, vemos que para los ICMi se encuentra centrada en uno y para los ICMc levemente desplazada a la izquierda al igual que para los estímulos moviéndose a la derecha vistos en la figura 15A. Sólo para una de las direcciones evaluadas (hacia abajo, figura 19C) ambas distribuciones ajustaron mejor a una única Gaussiana ($F_{(3,16)}=0,81$, $p=0,5$).

En conjunto estos resultados muestran que independientemente de la dirección de movimiento de los estímulos presentados, hay una importante transferencia de información a las neuronas registradas desde el ojo contralateral. Por otro lado, una cantidad considerable de neuronas, si bien integran información binocular, reciben un aporte mayor del ojo ipsilateral que del ojo contralateral.

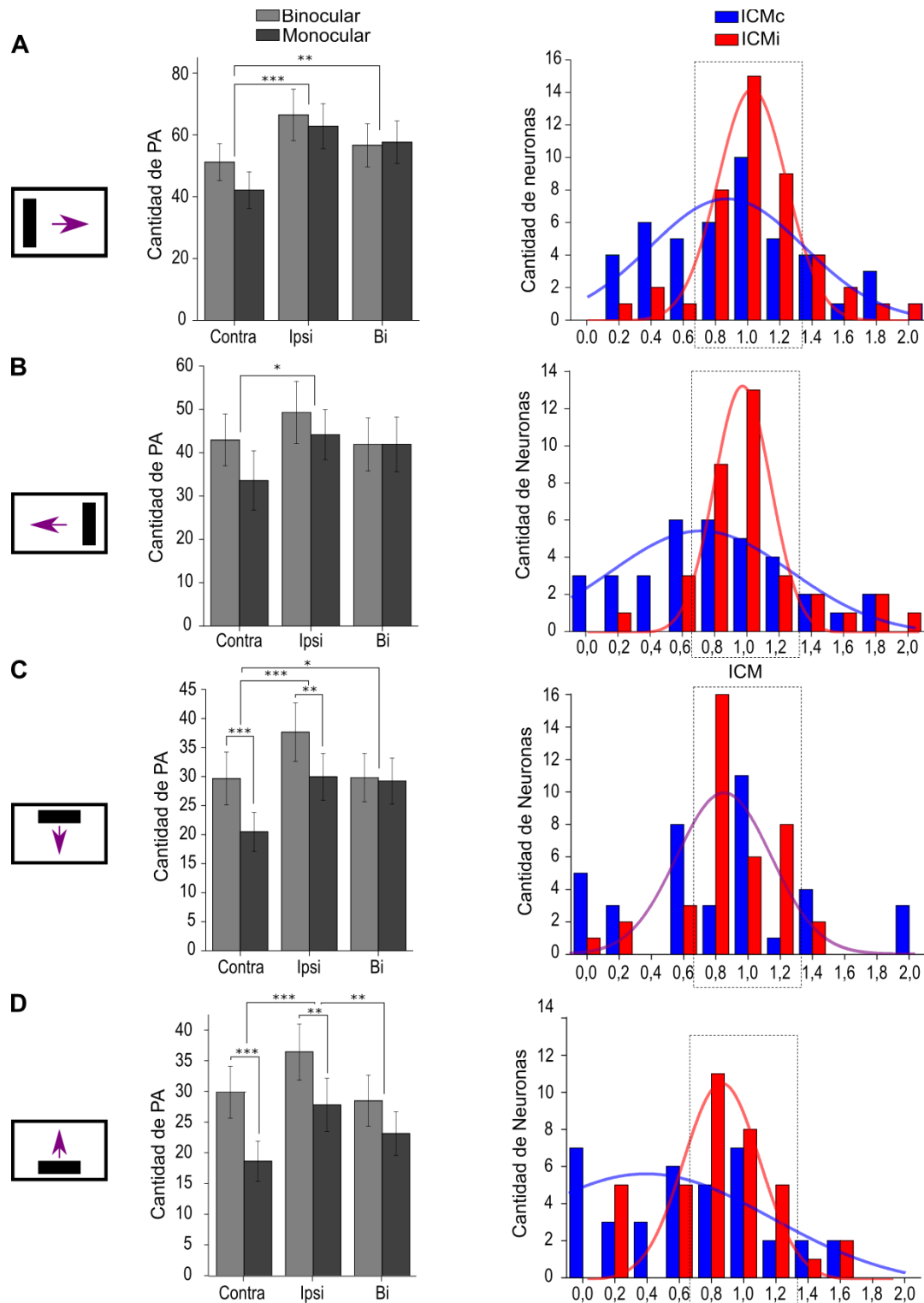


Figura 19. Respuestas binoculares y monoculares a estímulos contralaterales e ipsilaterales. A la izquierda: Dirección y sentido de movimiento de la barra. En el centro: Intensidad media de respuesta a estímulos contralaterales (Contra), ipsilaterales (Ipsi) y bilaterales (Bi). Barras gris claro (Condición Binocular), barras gris oscuro (Condición monocular). Las barras muestran media $\pm$ EE. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005. A la derecha: Histograma de la distribución de neuronas de acuerdo a sus valores de ICM (ver en el texto). Barras azules: ICM contralateral. Barras rojas: ICM ipsilateral. Para una barra moviéndose A. hacia la derecha (n=42). B. Hacia la izquierda (n=35). C. Hacia abajo (n=38). D. hacia arriba (n=37).

Conclusiones

En este capítulo investigamos en qué medida las neuronas LG de *Neohelice* integran binocularmente la información del movimiento de un objeto en el campo frontal y al nivel del horizonte visual. La mayoría de las neuronas LG tienen campos receptivos amplios que abarcan el espacio visual frontal izquierdo y derecho del animal (figura 13 - paneles de la derecha). Eso nos permitió evaluar sus respuestas a un objeto que se mueve en uno u otro lado o en los dos simultáneamente, tanto en condiciones de binocularidad como en condición monocular.

Los resultados obtenidos de los experimentos mostraron que, con independencia de la dirección de movimiento del estímulo, las neuronas de la lóbula de cada lado reciben información del movimiento de objetos que ingresan por el ojo del lado opuesto. Las principales conclusiones que se desprenden de los análisis realizados tienen validez para todas las direcciones de movimiento. Estas son:

- 1) La gran mayoría de las LG reciben la información visual de objetos en movimiento que se percibe con cada uno de los dos ojos, aunque la contribución de cada ojo es diferente para las distintas neuronas (figuras 14, 15 y 19).
- 2) En promedio, la respuesta al movimiento del lado contralateral fue menor que al movimiento ipsilateral, tanto en condiciones de monocularidad como de binocularidad (figuras 13, 15 y 19 – paneles de la izquierda). Aun así, queda en evidencia que el campo receptivo de la mayoría de las LG abarca una gran parte del espacio visual contralateral (figura 18). En la mayoría de las neuronas, este campo comprende la superposición de los campos que aportan cada uno de los ojos, por lo que la neurona recibe información realmente binocular de un mismo punto del espacio.
- 3) En promedio, las respuestas a estímulos ipsilaterales y bilaterales (ipsi y contra simultáneamente) fueron similares, tanto en condiciones binoculares (figura 13) como monoculares (figuras 15 y 19). Es decir que la presencia de un segundo objeto en movimiento no produce, como podría esperarse, un incremento de la respuesta respecto de la evocada por un solo estímulo. Probablemente esto se debe a algún proceso de inhibición lateral que es el que

hace que las LG respondan más intensamente a un objeto en movimiento que al flujo óptico panorámico (Medan et al., 2007; Tomsic, 2016).

- 4) Cuando el estímulo se mueve en dirección horizontal, si bien hay una tendencia a que la respuesta en condiciones monoculares sea menor que en condiciones binoculares, hay una gran similitud en la intensidad de respuestas en cualquiera de los lados de estimulación. Por otro lado, cuando el estímulo se mueve en dirección vertical, hay una diferencia significativa en la respuesta que evoca cuando es visto binocular o monocularmente.

Capítulo 2: Neuronas ipsilaterales y contralaterales de la lóbula

Resultados

1. Clasificación de los registros de las neuronas de la lóbula en presinápticos y postsinápticos

En 1982, DeVoe y colaboradores descubrieron en abejas un grupo de neuronas de la lóbula sensibles al flujo óptico que integran información binocular (DeVoe et al., 1982). Si bien en otros insectos el procesamiento del flujo óptico se lleva a cabo en la *lobula plate*, las abejas, que no tienen *lobula plate*, integran la función de este neuropilo en la lóbula. Se describió que tales neuronas presentaban procesos tangenciales que se extendían a través del mosaico retinotópico de la lóbula y convergían en un axón que proyectaba hacia el lado contralateral del cerebro, en donde arborizaban con un patrón similar en la lóbula opuesta. De acuerdo con los perfiles eléctricos de los registros intracelulares, en ese trabajo los autores concluyeron que algunas neuronas estaban siendo registradas cerca de su región de entrada sináptica (registros postsinápticos), por lo que eran elementos ipsilaterales al lado de registro, mientras que otras neuronas estaban siendo registradas en su región de salida, es decir en sus terminales (registros presinápticos), por lo que eran elementos que proyectaban desde la lóbula contralateral. Cada uno de los dos grupos mostró ciertas características específicas en su perfil eléctrico.

Los registros postsinápticos (ipsilaterales) se caracterizaron por tener:

- 1) Potenciales de acción pequeños, de modo que en ningún caso llegaban a revertir el signo del potencial de membrana.
- 2) Los potenciales de acción en ningún caso mostraban hiperpolarizaciones por debajo del potencial de reposo al finalizar.
- 3) Descargas de potenciales de acción montadas sobre una depolarización y presencia de actividad sináptica sub-umbral.

Por otro lado, el segundo grupo, de registros presinápticos (contralaterales) se caracterizó por tener:

- 1) Potenciales de acción más grandes que incluso en muchos casos revertían el potencial de membrana, alcanzando un valor cercano a cero o sobrepasándolo.
- 2) Los potenciales de acción mostraban hiperpolarizaciones por debajo del potencial de reposo al finalizar.
- 3) No mostraban actividad sináptica sub-umbral.

En base a este antecedente y mirando la variedad de perfiles en la figura 14, analizamos las amplitudes de potenciales de acción de todas las neuronas registradas. Como se puede observar en la figura 20A, este análisis indica que los resultados se distribuyen de manera bimodal. Por lo tanto, proponemos que se pueden aplicar los criterios usados por DeVoe y colaboradores (1982) para separar nuestros registros de neuronas de la lóbula del cangrejo. La figura 20B esquematiza en qué parte estaría siendo registrada la neurona (ipsi o contralateralmente) y la figura 20C muestra dos ejemplos que resumen las características del perfil eléctrico utilizadas para definir que una neurona fue registrada desde su lado de entrada, es decir que es una neurona ipsilateral y para definir que una neurona fue registrada desde su lado de salida, es decir una neurona contralateral. Al aplicar estos criterios conjuntamente en registros de 42 neuronas en las que se completó el experimento con la barra moviéndose a la derecha, evaluamos que 22 de ellas se registraron postsinápticamente y 19 se registraron presinápticamente, mientras que una de las neuronas no se pudo asignar a ninguna de las dos categorías. Esta clasificación fue realizada independientemente por tres personas y en la gran mayoría de las neuronas los tres coincidimos en aquellas que clasificamos como pre o postsinápticas. La figura 20D muestra con diferentes colores la distribución de las neuronas de los dos grupos dentro de las categorías de ICM descritas en el capítulo anterior. En el gráfico se observa que la gran mayoría de las neuronas postsinápticas tuvieron un ICMi cercano a 1 (círculos celestes), es decir que la respuesta a estímulos ipsilaterales fue similar en condiciones de binocularidad y de monocularidad. Ese resultado sería el esperado si la neurona que estamos registrando tiene su entrada del lado ipsilateral, como es el caso de las neuronas registradas postsinápticamente. Por otro lado, para la mayoría de las neuronas presinápticas (cuadrados verdes) se obtuvieron ICMc cercanos a 1, es decir que la respuesta a estímulos contralaterales fue similar en condiciones de binocularidad y de monocularidad. Nuevamente, ese es el resultado que esperaríamos si la neurona que

registramos tiene su entrada del lado contralateral, y por lo tanto en este caso estaríamos registrando la salida, por lo que el registro muestra características presinápticas.

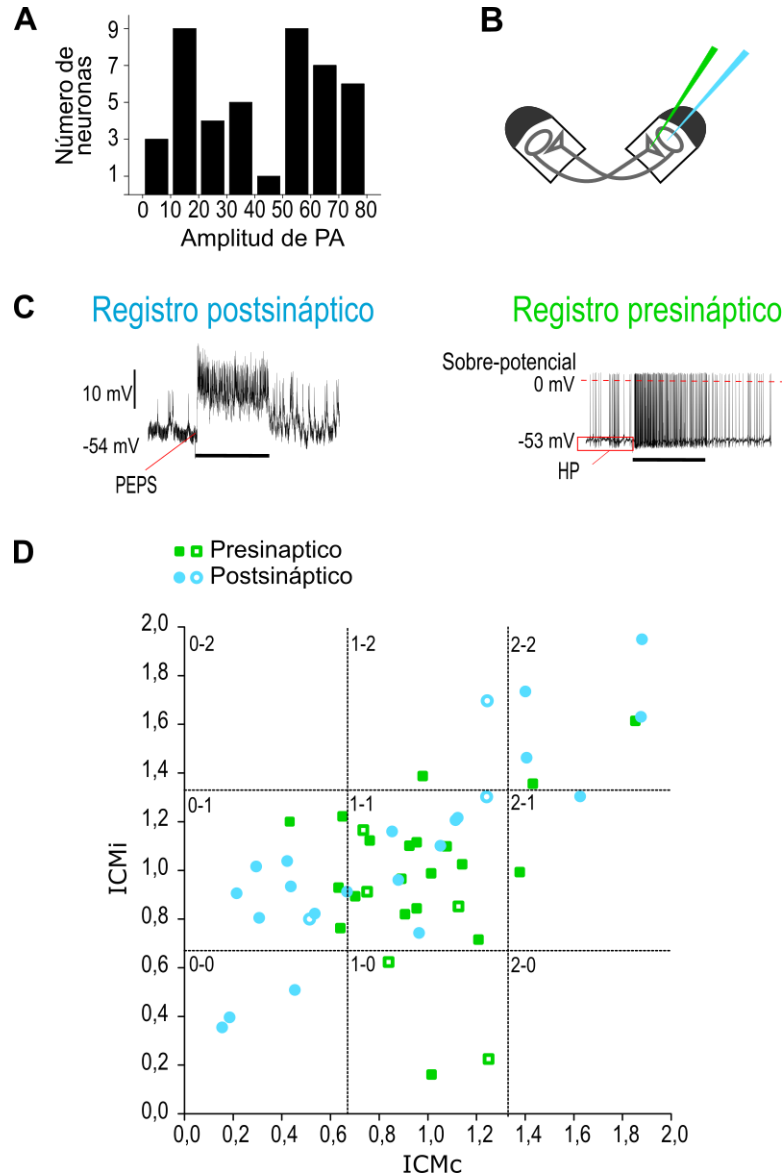


Figura 20. Neuronas registradas presinápticamente o postsinápticamente. A. Distribución de frecuencias de neuronas de acuerdo a la amplitud de sus potenciales de acción. B. Esquema que representa un registro postsináptico (celeste) o presináptico (verde) en la lóbula para ayudar a interpretar los resultados que siguen. C. Ejemplos de dos neuronas que ilustran las principales diferencias en los perfiles eléctricos usadas como criterio para distinguir registros postsinápticos y presinápticos (PEPS, potencial excitatorio postsináptico; HP, hiperpolarización al finalizar cada PA). La barra negra debajo de los registros representa el movimiento del estímulo y dura 3,36 s. D. ICMi e ICMc para cada neurona registrada. Es el mismo gráfico de la figura 17, pero aquí los círculos celestes corresponden a neuronas postsinápticas y los cuadrados verdes a neuronas presinápticas. Los símbolos llenos son de experimentos que se realizaron separando los campos visuales con un tabique y los símbolos vacíos con un capuchón que tapa el ojo contralateral.

2. Análisis de intensidad y latencia de respuesta de neuronas pre y postsinápticas.

Para evaluar si cada uno de los grupos de neuronas definidos en la sección anterior mostraba propiedades de integración binocular específicas, se analizaron por separado los registros de las neuronas postsinápticas y presinápticas comparando la intensidad de respuesta a estimulación ipsilateral y contralateral en condiciones binoculares y monoculares. Dentro del grupo de neuronas postsinápticas (figura 21A), se observa que la respuesta total a estimulación contralateral fue significativamente menor que a la estimulación ipsilateral, eso confirma el efecto de preferencia por estimulación ipsilateral descrito en el capítulo 1 (ANOVA de dos factores para medidas repetidas, lado: $F_{(1, 21)} = 8,41$, $p = 0,009$). Por otro lado, no hubo un efecto significativo de la condición monocular o binocular ($p = 0,149$), pero sí hubo interacción significativa del lado x condición ($p < 0,001$). Cuando realizamos comparaciones *post hoc* vimos que la estimulación monocular contralateral evocó significativamente menos PA que la estimulación binocular contralateral y que la estimulación monocular ipsilateral (comparación múltiple de Bonferroni: $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente), sin embargo, no se hallaron diferencias entre las respuestas binoculares y monoculares cuando se estimuló ipsilateralmente. Estos resultados indican por un lado que la respuesta binocular al movimiento contralateral de las neuronas registradas postsinápticamente está compuesta sólo en parte por la información que llega desde el ojo contralateral. Por otro lado, que sólo con la información que entra por el ojo ipsilateral se puede explicar la totalidad de la respuesta binocular de estas neuronas a un estímulo ipsilateral. En contraposición, dentro del grupo de neuronas registradas presinápticamente (fig. 21B), no se observaron diferencias estadísticas, excepto por el efecto general de preferencia por la estimulación ipsilateral a la contralateral (ANOVA de dos factores para medidas repetidas, lado: $F_{(1, 18)} = 11,18$, $p = 0,004$). Dado que suponemos que estas neuronas estarían trayendo información visual desde la lóbula contralateral, su respuesta a la estimulación monocular ipsilateral (estímulo que en la condición experimental no se ve con el ojo contralateral) debe provenir completamente de información recibida por neuronas ipsilaterales. El hecho de que las respuestas binoculares y monoculares sean tan similares, tanto para la estimulación contralateral como para la ipsilateral, indicaría que la información que llega desde el ojo contralateral puede explicar completamente la respuesta binocular de estas neuronas.

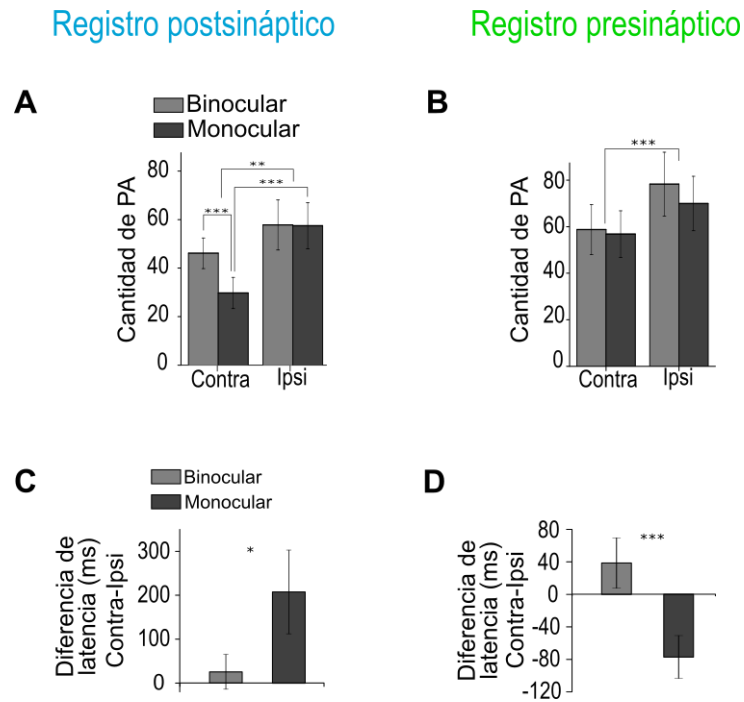


Figura 21. Intensidad y latencia de respuesta de neuronas registradas postsináptica y presinápticamente. A y B. Número medio de potenciales de acción evocados en neuronas registradas postsinápticamente (A) y presinápticamente (B) a estimulación contralateral (Contra) o ipsilateral (Ipsi) en condición binocular (Barras gris claro) o monocular (barras gris oscuro). C y D. Diferencia en la latencia media de respuesta a estimulación contralateral e ipsilateral en condición binocular (gris claro) o monocular (gris oscuro) para registros postsinápticos (C) y presinápticos (D). Las barras muestran media $\pm$ EE. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$.

Además de evaluar la intensidad de respuesta de cada grupo de neuronas, evaluamos la diferencia en la latencia de respuesta a estimulación contralateral e ipsilateral para cada neurona. En condiciones binoculares, esperábamos que no hubiera diferencia en la latencia para ninguno de los dos grupos, ya que en esta condición el estímulo está siendo visto por ambos ojos, de modo que la latencia que observamos es la misma que la que obtendríamos si se estuviera percibiendo el estímulo por el ojo por el que la información llegue primero, sea cual sea ese ojo. Tal como se esperaba, en condiciones binoculares, no hubo diferencia (el valor promedio de las diferencias no fue estadísticamente distinto de 0), tanto para el grupo de registros postsinápticos como para en el grupo de neuronas registradas presinápticamente (figura 21C, D). Sin embargo, en la condición monocular el grupo de neuronas registradas postsinápticamente mostró un valor promedio de las diferencias de latencia positivo (es decir, mayor latencia para la estimulación contralateral que para la estimulación ipsilateral) que fue significativamente

mayor que el mostrado en la condición binocular (fig. 21C; prueba $t(18) = 1,946$, $p=0,034$). Por otro lado, las neuronas registradas presinápticamente mostraron un valor medio negativo (es decir, una latencia más corta para estimulación contralateral que para estimulación ipsilateral), y que fue significativamente menor que el mostrado en la condición binocular (fig. 21D; prueba $t(15) = 4,082$, $p<0,001$). Estos resultados son consistentes con neuronas que tienen su sitio de entrada en el lado ipsilateral y contralateral, respectivamente.

3. Proyecciones de las neuronas de la lóbula

La gran mayoría de las neuronas LG investigadas en esta tesis mostraron responder a estímulos visuales correspondientes a objetos en movimiento presentados independientemente a cada ojo. Esos resultados demuestran que hay una gran cantidad de transferencia de información visual entre las dos lóbulas. Pero ¿qué evidencias anatómicas existen de que tal conexión exista en el cangrejo?

En estudios previos, se realizaron tinciones intracelulares que permitieron revelar la existencia de cuatro tipos distintos de LG (Berón de Astrada y Tomsic, 2002; Medan et al., 2007), sin embargo, por más de que se intentaran distintos tiempos de difusión post-tinción, nunca se lograron seguir los axones más allá del tracto protocerebral. Para resolver este problema, el Dr. Berón de Astrada realizó tinciones masivas de la lóbula utilizando colorantes conjugados con dextrano, método que había mostrado ser efectivo para revelar proyecciones neuronales en el cangrejo (Berón de Astrada et al., 2011; Bengochea et al., 2018). Aunque la tinción masiva no permite identificar neuronas individuales, la aplicación local dentro de la lóbula asegura que las proyecciones teñidas provengan de las neuronas de este neuropilo. Analizamos dichos preparados para observar posibles conexiones entre los dos tractos protocerebrales. La figura 22A y B muestra las proyecciones teñidas en el ganglio supraesofágico de una preparación donde el colorante se aplicó en la lóbula izquierda (que no aparece en la foto). Se tiñeron un número considerable de neuronas con sus axones transcurriendo a lo largo del tracto protocerebral. Esas proyecciones arborizan en diferentes regiones del ganglio supraesofágico, la mayoría lo hacen del lado en el que se aplicó el colorante (flechas blancas en las figuras 22A, B). Algunas de las fibras que atraviesan el cerebro corren por arriba (anterior) del cuerpo central (*central body*, figura 22A) y otras por debajo (posterior, figura 22B), para luego entrar en el tracto protocerebral contralateral. Siguiendo estas proyecciones más allá del tracto protocerebral, exploramos la presencia de marca en el lóbulo óptico contralateral. Sólo en unas pocas ocasiones pudimos ver algo

de marca, pero era débil y estaba restringida a la parte inferior del protocerebro lateral. Aunque estos resultados no son concluyentes, la presencia de fibras teñidas que ascienden por el tracto protocerebral contralateral respalda la suposición de que hay neuronas que conectan directamente las dos lóbulas.

Además, reanalizando las neuronas LG previamente teñidas intracelularmente por la Dra. Medan, encontramos que los elementos de la clase BLG1 (Medan et al., 2007) presentaban características morfológicas compatibles con especializaciones postsinápticas o presinápticas en la lóbula (fig. 22C-G). La figura 22C muestra una neurona BLG1 en la que claramente se tiñó el soma, mientras que la figura 22D muestra una neurona similar, pero sin soma. Evaluando 8 neuronas BLG1 teñidas, vimos que 5 de ellas tenían soma en el lado de registro mientras que las otras 3 no. En todos los casos, la presencia del soma estaba asociada con ramificaciones delgadas típicas de estructuras postsinápticas (fig. 22F), mientras que su ausencia se asoció con ampollas terminales o varicosidades (fig. 22G) típicas de las estructuras presinápticas (Strausfeld, 1976). De acuerdo con lo esperado por los resultados explicados en la sección 1, la amplitud media del PA de las neuronas con soma teñido fue menor que la de las neuronas sin él ($10,8 \pm 1,98$ vs. $53,33 \pm 6,01$ respectivamente, $p < 0,001$). En un preparado (fig. 22E), la inyección intracelular de neurobiotina en una BLG1 hizo que se co-tiñeran 3 neuronas BLG1, una de ellas con soma y procesos terminales delgados, y las otras dos soma y con varicosidades en sus terminales. Estos resultados indican que: 1) hay más de una BLG1 por lóbula; 2) hay elementos ipsilaterales eferentes y elementos aferentes (muy probablemente contralaterales); 3) los patrones de ramificación generales de estos elementos eferentes o aferentes son similares; 4) hay un acoplamiento entre estos elementos evidenciado por el pasaje de colorante entre uno y otro.

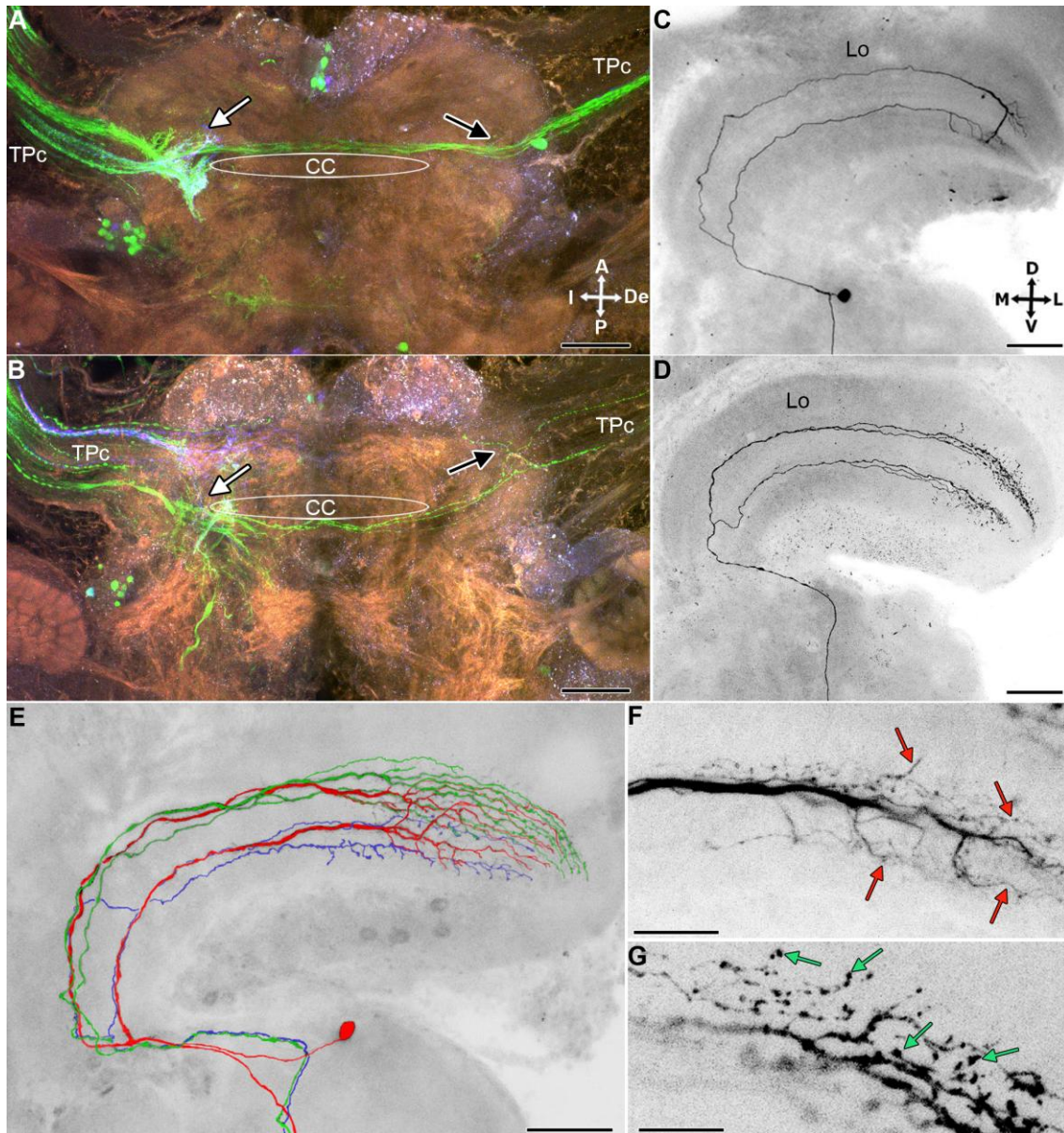


Figura 22. Evidencia anatómica de integración binocular entre lóbulos ópticos. A, B. Se aplicaron colorantes conjugados con dextrano en la lóbula izquierda. Se pueden ver fibras teñidas en el tracto protocerebral izquierdo (PcT) que ingresan al ganglio supraesofágico. Las figuras muestran dos subconjuntos de imágenes confocales de aproximadamente 75µm de espesor tomadas a distinta profundidad del preparado. Pueden observarse claramente dos tractos neuronales que atraviesan el cerebro uno anterior (A) y el otro posterior (B) al cuerpo central (CC). Muchas de las fibras teñidas salen del ganglio supraesofágico a través del tracto protocerebral (TPc) opuesto para ingresar al lóbulo óptico derecho. La mayoría de las arborizaciones se ven del lado en el que se aplicó el colorante (flechas blancas), pero también se pueden observar algunas arborizaciones en el lado contralateral (flechas negras). C, D. Dos ejemplos de neuronas del tipo BLG1 teñidas intracelularmente que muestran características compatibles con morfologías postsinápticas o presinápticas. La BLG1 en C muestra el soma y procesos delgados que se ramifican, eso es consistente con el tipo de arborización dendrítica. La BLG1 en D carece de soma y presenta arborizaciones consistentes con un árbol terminal, que contiene muchos procesos varicosos. E. En este preparado se co-tiñeron 3 neuronas BLG1, dos de las cuales mostraron características presinápticas (la verde y la azul) y una de ellas postsinápticas (la roja). Se agregaron los colores para distinguir las tres neuronas. Una parte de la neurona roja y de una de las

neuronas verdes se ampliaron en F y G respectivamente, allí se pueden apreciar los detalles de las especializaciones postsinápticas (flechas rojas) y las especializaciones presinápticas (flechas verdes). Lo: lóbula, A: anterior, P: posterior, I: izquierda, De: derecha, M: medial, L: lateral, D: dorsal, V: ventral. Barra de escala: 100 μ m A-E, 20 μ m F, G.

4. Registros intracelulares simultáneos en las dos lóbulas

En el análisis de los perfiles eléctricos que llevamos a cabo en la sección 1 vimos que el número de neuronas que fueron registradas postsinápticamente (que son locales de la lóbula en la que se está registrando) fue similar al número de neuronas que se registraron presinápticamente (que proyectarían desde la lóbula opuesta). Esa clasificación fue respaldada por las diferencias que se hallaron luego en las latencias de respuesta. Esto, en conjunto con las evidencias anatómicas mostradas en la figura 22, nos condujo a intentar registrar simultáneamente dos neuronas LG, una de cada lóbula, para explorar sus potenciales conexiones por medio de estimulación eléctrica intracelular. Realizar registros intracelulares en las dos lóbulas simultáneamente en un animal parcialmente inmovilizado y prácticamente intacto es un experimento desafiante. Sin embargo, logramos realizar 17 dobles registros estables. Luego de impalar y estabilizar las dos neuronas, confirmando que ambas eran LGs y que respondían a estímulos visuales de movimiento tanto en el monitor de la izquierda como en el de la derecha, inyectamos un pulso de 500 ms de corriente en una de ellas, de intensidad suficiente como para hacerla disparar al menos tres veces por encima de su frecuencia espontánea y observamos si esto tenía algún efecto en la segunda neurona. En 11 de los experimentos pudimos invertir el procedimiento y hacer aumentar la tasa de disparos de la segunda neurona (figura 23). En 4 experimentos sólo pudimos aumentar la frecuencia de disparo de PA en una de las dos neuronas. Por último en dos experimentos no se pudo aumentar la frecuencia de ninguna de las dos neuronas del par. Cabe mencionar que todas las neuronas en las que las inyecciones de corriente no lograron afectar la frecuencia espontánea, mostraron tener perfiles eléctricos correspondientes a un registro presináptico. En estas neuronas, probablemente la ineficacia de las inyecciones de corriente se debió a que se estaban aplicando a una gran distancia del sitio de iniciación de potenciales de acción, el que estaría ubicado más cerca del sitio de entrada de la neurona, en la lóbula contralateral. Esta observación es consistente con la idea de que las neuronas registradas presinápticamente son elementos aferentes a la lóbula.

Se tuvieron en cuenta los resultados de los experimentos en los que al menos una de las neuronas pudo ser efectivamente excitada, es decir que inyectando corriente se logró aumentar su frecuencia de disparo. Luego de una meticulosa observación de cada

uno de los registros, concluimos que en ninguno de los casos se detectaron cambios eléctricos en la neurona que estaba siendo registrada en la lóbula contralateral, ni en su potencial de membrana, ni en su frecuencia de disparo de potenciales de acción, ni en su actividad sináptica sub-umbral, que pudieran estar relacionados con los trenes de PA evocados en la primer neurona. En la figura 23 se muestran dos ejemplos de dobles registros en los que se pudo excitar a ambas neuronas.

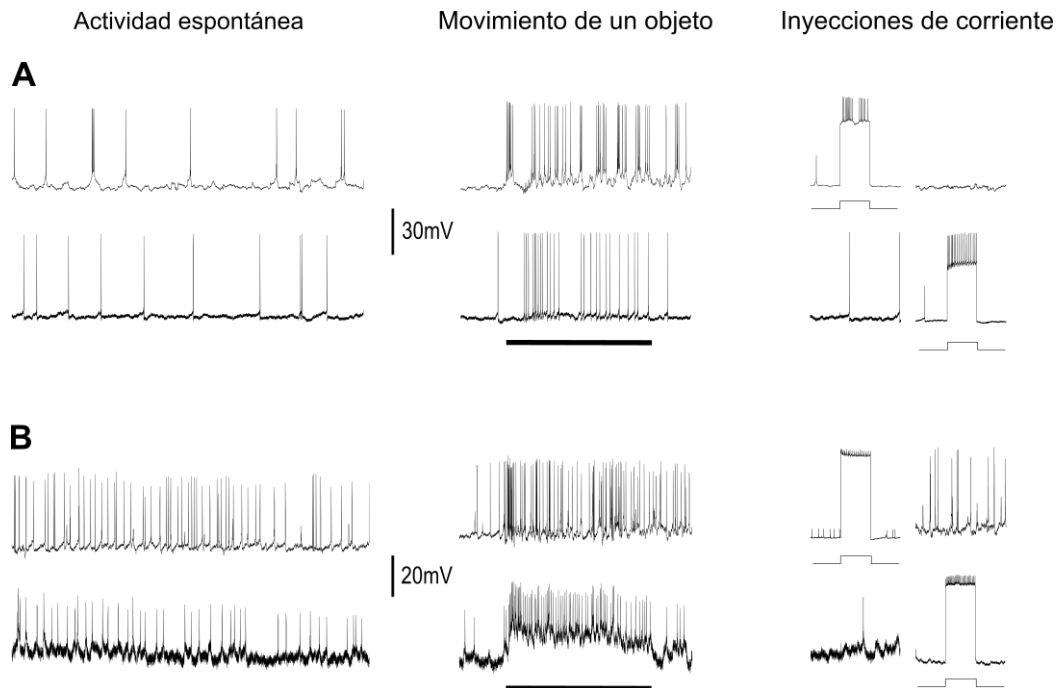


Figura 23. Registros simultáneos de dos neuronas LG de lóbulos ópticos opuestos. A, B. Dos ejemplos de experimentos de dobles registros de LG. Primera columna, actividad espontánea. Segunda columna, respuesta a un estímulo visual de movimiento, que en este caso se movió durante 2,2 s (barra horizontal negra). Tercera columna, ausencia de actividad evocada en una neurona (trazo inferior) durante la inyección de un pulso de corriente depolarizante suficiente para hacer que la otra neurona (trazo superior) aumente su frecuencia de PA al menos tres veces sobre la actividad espontánea. Cuarta columna, lo mismo que en la tercera pero la inyección se aplica en la otra neurona.

Discusión

En este capítulo logramos hacer una distinción entre elementos ipsilaterales y contralaterales de la lóbula. Para eso nos basamos principalmente en criterios que utilizaron DeVoe y colaboradores (1982), evaluando los perfiles electrofisiológicos. Eso nos permitió dividir los registros de las neuronas LG en dos grupos (figura 20). Uno de los

grupos está representado por neuronas con perfiles de respuesta compatibles con un registro postsináptico, mientras que el otro por neuronas con un perfil compatible con registros presinápticos. Cuando estimulamos monocularmente, el grupo de neuronas registradas postsinápticamente mostró que la latencia de respuesta a estímulos ipsilaterales era más corta que a estímulos contralaterales (figura 21C), respaldando la idea de que su sitio de entrada está en la misma lóbula que estamos registrando (es decir, que son neuronas ipsilaterales). Por otro lado, el grupo de neuronas registradas presinápticamente, mostró una latencia más corta a estímulos contralaterales que a estímulos ipsilaterales (figura 21D), lo cual indicaría que su sitio de entrada está en la lóbula opuesta (es decir, que son elementos contralaterales registrados en sus proyecciones terminales del lado ipsilateral).

Estas interpretaciones, además, fueron avaladas por datos anatómicos. En primer lugar, las tinciones masivas con dextrano en la lóbula revelaron la existencia de dos tractos que conectan las regiones del cerebro que se encuentran dentro de los pedúnculos oculares (figura 22A y B). En segundo lugar, las neuronas BLG1 teñidas intracelularmente mostraron especializaciones morfológicas compatibles con neuronas registradas pre o postsinápticamente (22C-G).

Habiendo mostrado que las neuronas LG integran información de ambos ojos y que parece haber elementos que transmiten información de movimiento entre las dos lóbulas, intentamos investigar su conexión registrando simultáneamente dos LG, una de cada lado. Sin embargo, no pudo detectarse ningún indicio de conexiones eléctricas entre las parejas de neuronas registradas. Dado que hay diferentes tipos de LG y que aún no se sabe con certeza cuántos elementos hay dentro de cada tipo, una posible explicación es que no hayamos podido acertar en ningún caso la combinación correcta de neuronas. Otra posibilidad es que para que la neurona LG que estamos registrando responda por transferencia de información desde el ojo contralateral, sea necesario que muchas neuronas juntas viniendo desde el ojo contralateral transmitan su respuesta a esa neurona. Esa sumatoria de entradas podría tener lugar en la misma lóbula como sugieren los elementos que se tiñeron en la figura 22E, o bien en regiones bilaterales del ganglio supraesofágico, en donde se observan arborizaciones de las neuronas teñidas (flechas de la figura 22A, B). Estos y otros aspectos de los principales hallazgos obtenidos hasta aquí, como la existencia de las interacciones inhibitorias necesarias para explicar la disminución de la respuesta observada bajo condiciones binoculares en algunas neuronas (figura 14, últimos tres registros), se resumen en los esquemas de la figura 24.

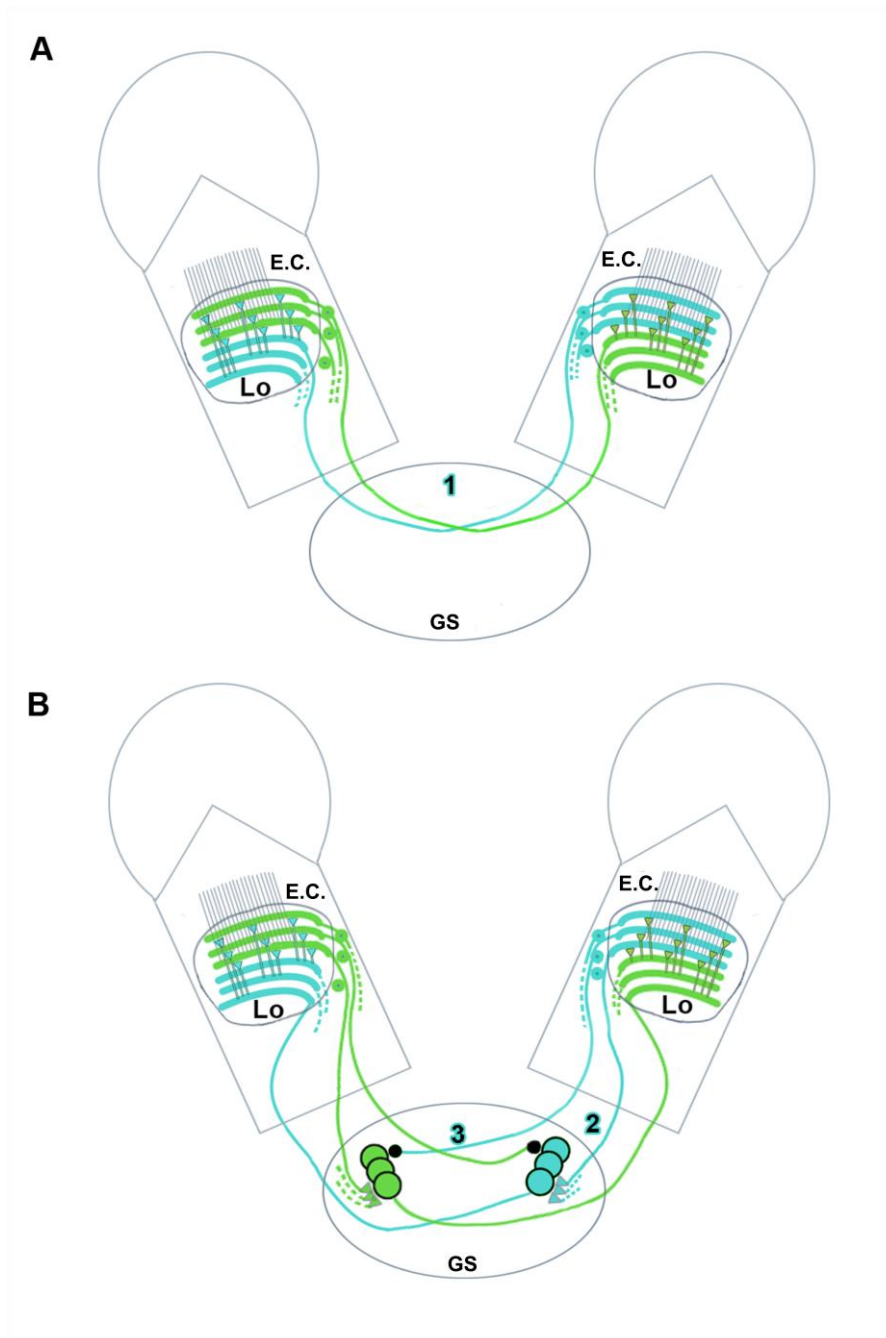


Figura 24. Modelo esquemático de las conexiones binoculares entre neuronas LG de lados opuestos del cerebro según las interpretaciones de los resultados obtenidos. A, B. El esquema se dividió en dos para facilitar la comprensión. Las neuronas gigantes de la lóbula reciben información de movimiento del ojo ipsilateral por un lado a través de entradas columnares (E.C.) y por otro lado a través de neuronas que proyectan desde el ojo contralateral. Los elementos celestes representan vías centrípetas (eferentes) de la lóbula derecha que, después de atravesar el cerebro medio, llevan información a la lóbula izquierda (los elementos especulares están representados en verde). Los triángulos representan las sinapsis excitatorias y los círculos negros las sinapsis inhibitorias. Lo: lóbula, GS: ganglio supraesofágico.

La representación en la figura 24A incluye una vía directa con elementos que se proyectan directamente hacia la lóbula opuesta (1) y la representación en la figura 24B incluye vías menos directas con al menos un relevo sináptico en el ganglio supraesofágico (2). Estas vías que en la figura se representan por conjuntos de tres elementos, podrían estar compuestas por múltiples unidades, como lo sugieren los resultados obtenidos: la alta proporción de neuronas LG que tuvieron respuesta binocular (figura 15), la variedad de respuestas (figura 14) y el número de proyecciones teñidas que se pueden ver cruzando el cerebro en la figura 22A, B. La existencia de interacciones inhibitorias cruzadas (3) sería necesaria para explicar los resultados de las categorías 2-1, 1-2 y 2-2 de las figuras 14 y 17. Las líneas discontinuas de la figura 22 representan elementos adicionales similares a los representados en el esquema. Muchas terminales excitatorias de diferentes neuronas llegando a neuronas individuales indican que cada LG recibiría la entrada de numerosos elementos desde el lado contralateral.

Apéndice de casos particularmente interesantes registrados ocasionalmente

Durante la realización de los experimentos de los cuales obtuvimos los resultados presentados hasta ahora, se obtuvieron registros de neuronas con características muy peculiares e interesantes. Además de las neuronas sensibles a la dirección de movimiento, cuya caracterización constituye la segunda parte de esta tesis, se registraron neuronas que mostraron características complejas de integración binocular. Algunas de ellas respondieron modificando su campo receptivo según si el animal estaba viendo el estímulo con un solo ojo o con los dos, otras mostraron integrar la información obtenida de ambos ojos pero sólo para una determinada dirección de movimiento del objeto. Debido a la poca cantidad de veces que estas neuronas fueron registradas y a que no pudieron ser teñidas, no se pudo realizar una descripción detallada de las mismas, pero de todos modos, creemos importante dejar constancia de su existencia y por eso las incluimos en esta parte. El reporte de estos elementos, contribuye a formar idea de la complejidad de la integración binocular de la información visual

1. Neuronas de campo receptivo dinámico

Estas neuronas, de las cuales se registraron 3 unidades, mostraron modificar la posición de su campo receptivo según si estaban percibiendo el estímulo con los dos ojos, o solo con uno como consecuencia de la presencia o no del tabique.

Los registros de la figura 25A y B corresponden a dos neuronas que en condiciones de estimulación binocular tienen su campo receptivo restringido al lado ipsilateral, es decir que del lado contralateral los estímulos no evocan ninguna respuesta. Cuando se evalúa monocularmente la respuesta de estas neuronas, se observa que además de la respuesta evocada por estímulos ipsilaterales, responden también a estímulos contralaterales. Es decir que estas neuronas muestran respuesta a estímulos contralaterales sólo cuando estos son percibidos únicamente con el ojo contralateral (condición monocular). En la condición binocular, el estímulo del lado contralateral está siendo visto con ambos ojos. Al parecer, la visión de estímulos contralaterales con el ojo ipsilateral inhibe la respuesta que tendría esa neurona si el animal sólo estuviera viendo el

estímulo con el ojo contralateral. Se registraron dos neuronas con este mismo comportamiento.

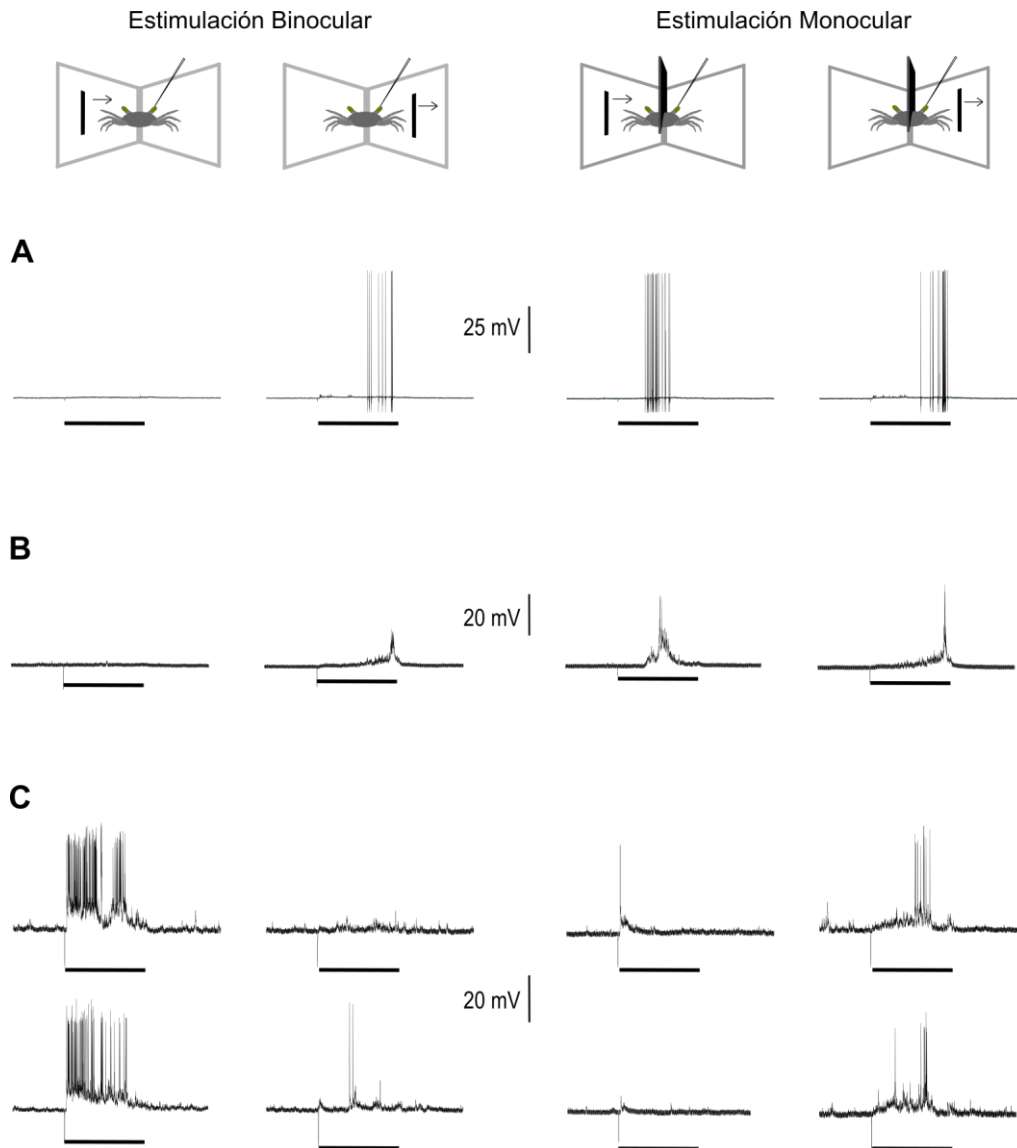


Figura 25. Ejemplos de neuronas cuyo campo receptivo se modifica al separar los campos visuales de ambos ojos. A. B. Los registros corresponden a dos neuronas que, al ver el estímulo con ambos ojos (estimulación binocular), responden solamente cuando el estímulo se presenta del lado ipsilateral (primeras dos columnas). En cambio, cuando se divide el campo visual con un tabique y por lo tanto el estímulo es percibido por un solo ojo (estimulación monocular), estas neuronas responden a un estímulo que se mueve tanto del lado ipsilateral como del contralateral (últimas dos columnas). C. En condiciones binoculares, esta neurona responde sólo cuando el estímulo es presentado del lado contralateral. En condiciones monoculares la respuesta contralateral desaparece, mientras que aparece una nueva respuesta frente al estímulo presentado ipsilateralmente. La segunda fila muestra la repetición del estímulo presentado en cada uno de los lados en ambas condiciones. La barra negra debajo de los registros representa el movimiento del estímulo durante 3,36 s.

Los registros de la figura 25C pertenecen a una neurona que, en contraposición a las anteriores, en condiciones binoculares mostraron responder sólo a los estímulos contralaterales y no a los ipsilaterales. En cambio, si se evalúa la respuesta de esta neurona monocularmente, se observa que ya no hay respuesta del lado contralateral, pero ahora observamos respuesta a estímulos presentados del lado ipsilateral. Al estimular binocularmente esta respuesta no estaba presente. Al igual que en el caso anterior, es posible que, en condiciones binoculares la visión con el ojo contralateral del estímulo presentado del lado ipsilateral esté inhibiendo la respuesta de la neurona. En condiciones monoculares, el estímulo ipsilateral es visto solamente con el ojo ipsilateral, por lo que tal inhibición no estaría presente, y así es que vemos la respuesta a estímulos presentados de ese lado. Podría decirse que en condiciones binoculares esa respuesta estaba “enmascarada”. Por otro lado, en este caso, para la condición de estimulación monocular, desaparece la respuesta a estímulos contralaterales que se ve en la condición binocular. Al parecer, para evocar esa respuesta, es necesario que el cangrejo esté viendo el movimiento del estímulo contralateral con ambos ojos. La segunda fila muestra repeticiones de los estímulos presentados de ambos lados, en ambas condiciones, indicando que en todos los casos las respuestas son altamente reproducibles. Sólo se registró una neurona con este comportamiento.

2. Binocularidad diferencial

Unas pocas neuronas ($n=5$) mostraron tener distintas propiedades de binocularidad según la dirección de movimiento de los objetos. En el ejemplo de la figura 26, todos los registros pertenecen a la misma unidad. En la primera fila, vemos que para una barra que se mueve hacia abajo la neurona claramente integra información binocular, ya que vemos respuestas a estimulación monocular contralateral o ipsilateral, similares a las que se ven en condiciones de estimulación binocular. Sin embargo, cuando la barra se mueve hacia arriba, la neurona no parece integrar la información proveniente de ambos ojos, ya que no muestra respuesta a estimulación monocular contralateral, es decir que la respuesta a estimulación contralateral observada en la condición binocular se debería a que el estímulo está siendo visto con el ojo ipsilateral. En otras palabras, el ICMc de esta neurona (definido en la sección precedente), está cerca de 1 para el estímulo que se mueve hacia abajo y cerca de 0 para el estímulo que se mueve hacia arriba.

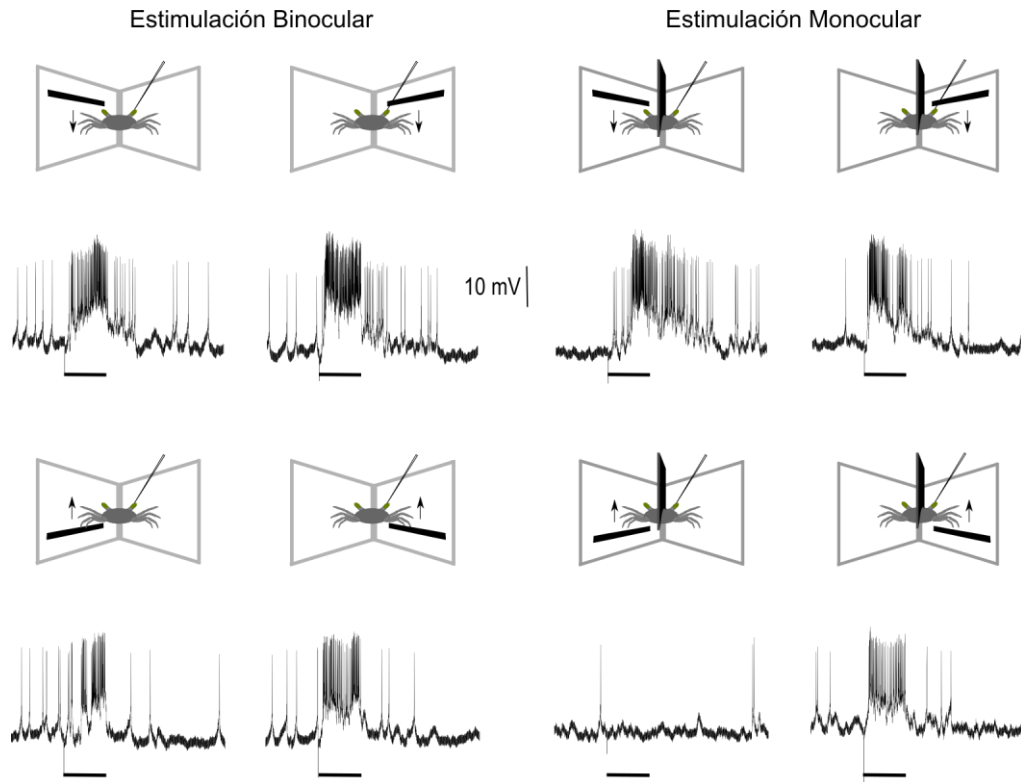


Figura 26. Ejemplo de neurona que mostró ser binocular para un estímulo y no para otro. Todos los registros de esta figura pertenecen a la misma neurona. En la fila de arriba, el estímulo es una barra que se mueve hacia arriba. La respuesta a un estímulo contralateral monocular es similar a la respuesta contralateral binocular, lo que indica un alto grado de procesamiento binocular. En la fila de abajo el estímulo es una barra que se mueve hacia abajo. La respuesta a un estímulo contralateral visto monocularmente es prácticamente nula, lo que indica que la visión con el ojo contralateral no contribuye a la respuesta de la neurona. La barra negra debajo de los registros representa el movimiento del estímulo durante 1,7 s.

De las 5 neuronas registradas que mostraron tener esta propiedad de integrar información binocular dependiendo de la dirección y sentido de movimiento de los estímulos, 2 mostraron integrar información binocular en todos los sentidos menos en el ascendente (una de ellas es la mostrada en la figura 26), es decir que para los estímulos moviéndose en el resto de los sentidos (hacia derecha, izquierda o abajo), aunque con distintas intensidades, siempre se observó al menos algo de respuesta cuando se presentaban contralateralmente y eran observados de manera monocular. Por otro lado, dos de las neuronas mostraron integrar información binocular sólo cuando el estímulo se movía hacia la derecha, es decir que para ninguna de las otras direcciones (hacia la izquierda, arriba o abajo), se observó respuesta a estímulos contralaterales vistos monocularmente. Finalmente, una de las 5 neuronas, mostró integrar información binocular cuando los estímulos se movían en dirección horizontal en cualquiera de ambos

sentidos y no cuando se movían en dirección vertical (ni cuando se movían hacia arriba ni cuando se movían hacia abajo).

Discusión

Los casos que describimos en este apartado, contribuyen a comprender la gran complejidad del circuito que opera para integrar la información visual que es percibida por ambos ojos. Aunque estas neuronas fueron registradas de manera esporádica, en la mayoría de los casos pudo repetirse la presentación de al menos alguno de los distintos estímulos en las distintas condiciones, indicando que el resultado es robusto e indudable.

Dado el escaso conocimiento de estos elementos, sería prematuro aventurar cualquier especulación sobre su rol funcional, sin embargo, su existencia da cuenta de la presencia de neuronas con propiedades de procesamiento y transformación de sus campos receptivos que, hasta donde sabemos, no han sido nunca antes descritas en ningún animal.

Discusión general de la Parte 1

Los experimentos realizados en esta primera parte nos permitieron estudiar cómo ocurren los procesos de integración binocular del movimiento de objetos a nivel del horizonte visual en cangrejos. Una de las observaciones más destacable que se desprende de los resultados obtenidos, es coincidente con los resultados previos de binocularidad en *Neohelice* (Sztarker y Tomsic, 2004), e indica que las neuronas LG no sólo reciben información visual de movimiento desde el ojo ipsilateral, sino que además codifican la información de objetos en movimiento que son vistos con el ojo contralateral. En otras palabras, esto quiere decir que las LG son neuronas binoculares.

Sin embargo, recordemos que a diferencia de los experimentos que se realizaron en esta tesis en donde los estímulos visuales fueron presentados a nivel del horizonte visual del animal, para los experimentos de binocularidad realizados anteriormente en *Neohelice* se habían utilizado estímulos visuales de movimiento presentados en la región dorsal del campo visual del animal. Más allá de que en ambos casos se observó un gran flujo de información visual llegando desde el ojo contralateral, los resultados obtenidos estimulando la región ecuatorial difieren considerablemente de los que se habían obtenido para estímulos presentados en la región dorsal. Cuando se evaluó la integración de la información visual binocular en el campo dorsal, se observó que todas las neuronas LG evaluadas respondían de manera prácticamente idéntica en intensidad, forma, patrón de disparo, etc., cuando el estímulo era visto exclusivamente con el ojo ipsilateral o cuando era visto sólo con el ojo contralateral. En cambio, los resultados aquí obtenidos estimulando la región ecuatorial del campo visual, mostraron una gran variabilidad en el grado de integración binocular, de modo que algunas neuronas tuvieron respuestas similares frente a la estimulación exclusivamente contralateral que a la exclusivamente ipsilateral, mientras que otras mostraron grandes diferencias. La resolución visual de *Neohelice* varía en las distintas regiones del ojo, es mayor en la zona ecuatorial y disminuye considerablemente hacia las regiones ventral y dorsal (Berón de Astrada et al., 2012). Mientras que las imágenes de un predador aéreo son percibidas con la región dorsal del ojo, las imágenes de objetos moviéndose que el animal percibe a nivel del horizonte se corresponden en la mayoría de los casos con los movimientos de conespecíficos. La detección de estas imágenes y su procesamiento son necesarios para las interacciones sociales como las de cortejo, de apareamiento, de defensa de sus cuevas, de huida o de persecución de otros individuos (por ejemplo: Hemmi y Zeil, 2003; Sal Moyano et al., 2014; Tomsic et al., 2017). *Neohelice* presenta, además de la franja de máxima resolución que se manifiesta por las especializaciones ópticas en el ecuador del ojo (Berón de Astrada et al., 2012), neuronas como las MLG1 cuyo centro del campo receptivo vertical se ubica asimismo a nivel del horizonte visual (Medan et al., 2015). Estas especializaciones

indican que las necesidades de detección y procesamiento visual varían ampliamente entre las diferentes regiones del campo visual. Dado que una gran proporción de las LG mostraron tener un campo receptivo amplio, esas necesidades de detección podrían estar determinando la existencia de propiedades de binocularidad específicas dependientes de la región del campo receptivo. Así, podría ser que una misma neurona LG tenga distintas propiedades de integración binocular cuando el animal ve objetos en movimiento con la región dorsal que cuando lo hace con la parte ecuatorial de sus ojos.

Si bien los resultados del capítulo 1 muestran que existe transferencia de información de movimiento desde el ojo contralateral (figuras 14 y 15) y además esa transferencia ocurre cuando los estímulos se mueven en ambas direcciones, tanto vertical como horizontal (figura 19), es interesante observar también las diferencias en el grado de integración binocular. En primer lugar, las diferencias entre los resultados obtenidos para las direcciones de movimiento horizontal y vertical, sugieren que el procesamiento y suma de la información que proviene de ambos ojos ocurre de manera diferente dependiendo de la dirección en la que se mueve el objeto. Al observar el conjunto de neuronas registradas, no detectamos diferencias significativas en la intensidad de respuesta evocada por un estímulo que se movía en dirección horizontal a nivel del horizonte visual, cuando éste era visto con uno o con los dos ojos (figuras 15, 19A y B). Por otro lado, frente a estímulos que se movían en la dirección vertical, se observó que las respuestas monoculares eran en promedio de menor intensidad que las binoculares, tanto con la presentación de estímulos del lado contralateral como del lado ipsilateral (figura 19C, D).

Otra cuestión que podría parecer llamativa es la similitud entre las respuestas binoculares y monoculares frente a un mismo estímulo. Podría esperarse que una neurona binocular responda más intensamente cuando recibe información desde ambos ojos que cuando los estímulos son vistos por uno solo de los ojos, es decir que haya un efecto de sumación entre la información visual que proviene de cada uno de los ojos. De hecho, en otra serie de experimentos comportamentales y electrofisiológicos que se realizaron previamente en *Neohelice*, se estudió tanto la respuesta de escape como la respuesta electrofisiológica de las LG evocadas por un estímulo visual de peligro (EVP) que remedaba a un predador aéreo. Ambas respuestas fueron evaluadas en condiciones binoculares y además en condiciones monoculares (ocluyendo la visión de uno de los ojos). Los resultados de los experimentos comportamentales mostraron que la respuesta de escape evocada frente al EVP en animales monoculares era un 50% menos intensa que la evocada en animales binoculares, lo que podría explicarse en términos de una disminución de las capacidades sensoriales al ocluir uno de los ojos (Hermitte et al., 1995; Sztarker y Tomsic, 2008). Los resultados de los experimentos electrofisiológicos con

neuronas LG frente al mismo estímulo, también mostraron que estas neuronas respondían con menor intensidad cuando los estímulos eran vistos monocularmente (Sztarker y Tomsic, 2008). Dado que la actividad de las LG mostró correlacionar estrechamente con la respuesta comportamental en una gran variedad de situaciones, la disminución de su actividad como consecuencia de la oclusión de un ojo podría explicar la reducción en la intensidad de la respuesta de escape. Sin embargo, los resultados electrofisiológicos hallados en esta tesis fueron diferentes. Como se detalló en el párrafo anterior, para estímulos que se mueven en dirección horizontal a nivel del horizonte visual, no hubo diferencias si el estímulo era visto con uno o con los dos ojos. En cambio, para estímulos que se movían en dirección vertical a nivel del horizonte visual, los resultados obtenidos fueron similares a los que se observaron anteriormente con el EVP (Sztarker y Tomsic, 2008), es decir que las LG mostraron una menor intensidad de respuesta en condiciones de monocularidad que en condiciones de binocularidad.

En resumen, tanto cuando los estímulos se presentaron en la región dorsal del campo visual (resultados previos a esta tesis), como cuando se presentaron en la región ecuatorial moviéndose en dirección vertical (resultados del capítulo 1), se observó que las respuestas monoculares eran menores que las binoculares. Por otro lado, cuando los estímulos se presentaron en la región ecuatorial moviéndose en dirección horizontal, las respuestas binoculares y monoculares eran iguales. Una posible interpretación de los resultados está relacionada con el significado de la dirección de movimiento y la posición de los estímulos en el campo visual y es la siguiente: como se mencionó en la introducción, el integrar la información proveniente de ambos ojos provee múltiples ventajas, entre ellas la de estimar la distancia a otros individuos por estereopsis. Los animales como *Neohelice* que viven en un ambiente plano probablemente hagan uso de esta ventaja para interactuar con otros cangrejos que se mueven también en dirección horizontal, de modo que la integración binocular de estímulos que se mueven en esta dirección sería más provechosa que la de estímulos que se mueven en la vertical.

La presentación de un estímulo *looming* (imagen de expansión bidimensional correspondiente a un objeto que se aproxima) evoca en *Neohelice* una respuesta de escape robusta y bien direccional que se ha estudiado en detalle (Oliva et al., 2007). Cuando el estímulo se presenta desde un costado del animal evoca escapes que, de forma muy predecible, se realizan con dirección opuesta al estímulo. En cambio, cuando el estímulo se aproxima exactamente desde arriba, el animal responde más tardíamente y su dirección de escape hacia uno u otro lado parece ser impredecible. Tanto la impredecibilidad del comportamiento como el retardo del inicio de la respuesta sugieren un proceso de

decisión en la elección por el lado hacia el cual escapar. El estudio detallado del comportamiento de elección de lado ante un *looming* dorsal tanto en condiciones binoculares como monoculares, sumado a los efectos de asimetrías visuales contextuales manipuladas experimentalmente tales como el grado de iluminación sobre la elección por el lado de escape, en conjunto con la posible participación de las neuronas LG en este proceso de elección, permitieron formular un modelo sencillo de competencia interocular para la decisión del lado de escape, según el cual podría existir una competencia entre las intensidades de la respuesta de la LG de ambos lóbulos ópticos, que define la dirección en la que se va a realizar el escape. La idea sería que las LG del lado que respondan más intensamente determinarían el escape hacia el lado opuesto. Este modelo, que pudo ser puesto a prueba tanto a nivel electrofisiológico como comportamental, permite predecir con un alto grado de confianza los resultados comportamentales obtenidos en función de las respuestas neuronales (Molinas, 2015).

Los resultados obtenidos en esta tesis suman evidencia a favor de la hipótesis que propone al modelo de dominancia ocular como mecanismo para la toma de la decisión del lado de escape. En primer lugar, cabe aclarar que los estímulos utilizados en esta tesis consistían en imágenes de objetos que se movían en trayectoria tangencial al animal, es decir que eran bien diferentes de los estímulos de aproximación que se utilizaron en el estudio que permitió proponer el modelo en cuestión. En segundo lugar, la respuesta de las LG frente a estos estímulos mostró ser claramente mayor cuando éstos se presentaban del lado ipsilateral, tanto en condiciones binoculares como monoculares (figuras 13 y 19), esto permite predecir que la respuesta de escape en tales condiciones sería hacia el lado contralateral, que es de hecho lo que se observó para ese tipo de estímulos (Scarano y Tomsic, 2014).

Por otro lado, como se mencionó previamente, el estudio de las interacciones binoculares permitió determinar que el grado de contribución de cada uno de los ojos, varía ampliamente entre las distintas neuronas LG, observándose interacciones tanto de tipo inhibitorias como excitatorias (figura 14). Los distintos niveles de contribución de cada uno de los ojos a la respuesta binocular, podrían entonces interpretarse como distintos grados de dominancia de cada uno de los ojos. El modelo de dominancia interocular que se propuso anteriormente para predecir la toma de decisiones en una situación de incertidumbre como la de un *looming* dorsal, implica que debe existir un diálogo directo, aunque complejo, entre las neuronas que codifican la información de movimiento de un lado y otro del cerebro (Molinas, 2015). Los resultados de esta tesis son compatibles con esa interpretación.

La mayoría de los animales visuales se sirven de las ventajas que confiere integrar la información visual provista por ambos ojos para desempeñar una gran cantidad de comportamientos guiados visualmente. Sir Isaac Newton en su tratado de óptica (1704) fue uno de los primeros científicos en señalar que para la binocularidad sea funcional, la información de ambos ojos debe convergir en el mismo sitio del cerebro. Newton razonó que sería necesario un entrecruzamiento (o un quiasma) parcial de las fibras en los nervios ópticos para que exista un sistema con visión binocular funcional que permita estimar distancias por estereopsis (Newton, 1704). Tiempo después, sus predicciones anatómicas fueron confirmadas con disecciones del quiasma óptico en mamíferos (Polyak, 1957). Como se describió en la introducción, las neuronas binoculares de mamíferos, que se han estudiado principalmente en gatos y en primates, aparecen a partir de la corteza visual. En otros vertebrados como los anfibios o los peces teleósteos, se encontraron neuronas binoculares ya en el tectum óptico (por ejemplo: Finch y Collett, 1983). En esta primera parte de resultados, estudiamos neuronas que integran información binocular en un artrópodo. Las neuronas estudiadas se encontraban en la lóbula y cabe mencionar que no se han encontrado neuronas que integren información binocular en áreas más periféricas del cerebro del cangrejo (Sztarker y Tomsic, 2004). Si bien podría parecer que la lóbula de los artrópodos representa una etapa mucho menos central de procesamiento visual que la corteza visual de los mamíferos, en realidad el número de sinapsis que hay en el camino más directo desde los fotorreceptores hasta las neuronas que integran información binocular, parece ser similar en ambos casos.

Como un comentario colateral a estas observaciones, cabe mencionar que así como los resultados mostrados en esta tesis indican la existencia en un artrópodo como *Neohelice* de distintas contribuciones monoculares a la respuesta binocular o, dicho de otro modo, neuronas que mostraron distintos grados de dominancia interocular, en la corteza visual primaria de mamíferos se han hallado también neuronas que cubren el rango completo de dominancia interocular, es decir, desde neuronas que responden exclusivamente a estímulos vistos con el ojo contralateral hasta neuronas que responden exclusivamente a estímulos vistos con el ojo ipsilateral, pasando por todos los niveles de contribución intermedios (por ejemplo: Sengpiel et al., 1995; Kara y Boyd, 2009). Este tipo de similitud funcional entre ambos sistemas, aunque no se haya realizado una detallada comparación en los distintos niveles de dominancia de otros sistemas, podría sumarse a los atributos compartidos entre los sistemas visuales de vertebrados y artrópodos, algunos de los cuales fueron comentados en la introducción de esta tesis.

Respecto de las distintas utilidades que podría concretamente tener para *Neohelice* la capacidad de combinar, integrar y procesar la información que ingresa por ambos ojos,

actualmente en nuestro laboratorio se están analizando videos del comportamiento de captura de presas que se evoca en estos cangrejos como consecuencia del movimiento de un objeto pequeño que se mueve al ras del suelo. Las observaciones preliminares de los mismos indican que en la última etapa de persecución, el cangrejo salta sobre la presa con sus quelas abiertas para atraparla. Para ejecutar ese tipo de comportamientos, parece ser necesario estimar con precisión la distancia al objetivo (Salido, Gancedo y Tomsic, comunicación personal). En función de los resultados obtenidos, podemos decir que los procesos de integración binocular que se estudiaron en esta tesis ocurren sin lugar a dudas en la región ecuatorial del campo visual del animal, más precisamente en el área frontolateral, y es esta la región en la que el animal percibe estímulos visuales que lo guían en comportamientos como, por ejemplo, los enfrentamientos con sus rivales, la captura de sus presas y manipulación de sus alimentos con sus quelas. La ejecución precisa de estos comportamientos requiere, o estaría en gran medida beneficiada, por la capacidad del animal para integrar la información binocular.

Resultados

Parte 2: Control neuronal de
comportamientos de fijación y
seguimiento visual de objetos que
se mueven.

En esta segunda parte de la tesis emprendimos la búsqueda de elementos neuronales que pudieran estar involucrados en el mecanismo que subyace a los comportamientos de fijación y seguimiento visual de objetos que, como se describió en la introducción general, realizan muchos animales. Dado que *Neohelice granulata* tiene en cada ojo un área de mayor resolución en el polo lateral (Berón de Astrada et al., 2012), los comportamientos de fijación que implican la rotación y el continuo reposicionamiento de todo el cuerpo del animal respecto al estímulo, están dirigidos a mantener el objeto visual en esa región de mayor resolución del ojo (Land y Layne, 1995). Un mecanismo que controle dichos comportamientos debería incluir elementos sensibles a la dirección de movimiento que funcionen como detectores de desvíos de la posición del objeto con respecto a la posición de referencia o fijación. En los capítulos 3, 4 y 5, mostraremos las características fisiológicas y morfológicas de elementos neuronales que parecen cumplir ese rol.

La denominación que utilizaremos para las neuronas descriptas en esta parte es LCDC por su sigla en inglés (*Lobula Complex Directional Cells*).

Capítulo 3: Caracterización fisiológica de las LCDC

Materiales y métodos

1. Estímulos visuales utilizados y posicionamiento del cangrejo en relación a los monitores de estimulación.

Para evaluar la sensibilidad por la dirección y sentido de movimiento de un objeto de las LCDC y su respuesta al flujo óptico, utilizamos el estímulo barra (EB) y el estímulo panorámico (EP) descritos en la sección de materiales y métodos generales.

La posición del cangrejo respecto a los monitores de estimulación se esquematiza en vista dorsal en la figura 27. Los primeros registros de neuronas direccionales que obtuvimos fueron realizados con la disposición de la figura 27A. En este caso los monitores (representados por líneas negras) están posicionados frontolateralmente, del mismo modo que en los experimentos de binocularidad realizados durante la primera parte de esta tesis. Luego, cambiamos la posición del cangrejo en el dispositivo experimental de modo que pudiéramos presentar los estímulos en toda la región ipsilateral al ojo de registro, tanto del lado anterior como del lado posterior (figura 27B). En ambos casos, en el eje de referencia azimutal, se fijó el cero en la posición correspondiente a la línea media rostral del cangrejo, definiéndose los valores negativos a la izquierda y positivos a la derecha.

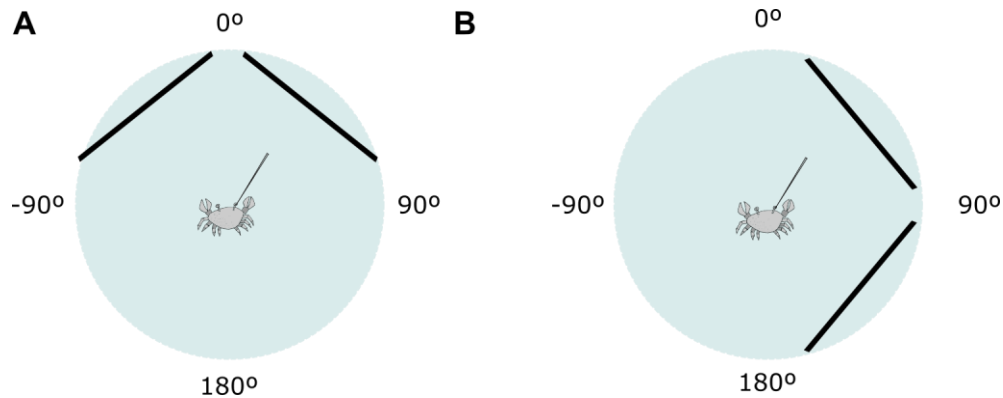


Figura 27. Esquema en vista dorsal que muestra la posición del cangrejo en relación a los monitores de estimulación en el dispositivo experimental.

2. Estimación de campos receptivos

Para la descripción del campo receptivo de estas neuronas se analizaron las depolarizaciones y la frecuencia instantánea de PA generadas por la presentación del estímulo moviéndose en sentido preferido, y las hiperpolarizaciones generadas por la presentación del estímulo moviéndose en sentido nulo. Los campos receptivos azimutales se obtuvieron ajustando una distribución Gaussiana a los potenciales de membrana evocados durante la presentación de los estímulos (Kuffler, 1953; Lennie, 1998). El ajuste Gaussiano dio estimaciones para los parámetros μ y σ , la media representa el centro del campo receptivo en el azimut, el desvío estándar se utilizó para estimar el ancho del campo receptivo. Se consideró el ancho del campo receptivo como el arco que abarca el 95% de la actividad de la neurona ($\text{media} \pm 2 \text{ DE}$).

3. Índices de comparación

Para poder comparar distintos aspectos de las respuestas de las LCDC se utilizaron los siguientes índices:

Para evaluar la persistencia de la respuesta de las LCDC frente a repeticiones del estímulo barra, se utilizó un índice de persistencia frente a la barra (IPB) que compara la respuesta (cantidad de PA evocados) obtenida frente al EB presentado por primera vez con la obtenida para el mismo estímulo luego de 10 repeticiones espaciadas entre sí por 10 s.

(R1: cantidad de PA evocados en el primer ensayo; R10: cantidad de PA evocados en el décimo ensayo).

$$IPB = 1 - \frac{R1 - R10}{R1}$$

Este índice puede tomar valores que van entre 0 (si la respuesta en el ensayo 10 es 0, es decir que se redujo hasta desaparecer) y 1 (si la respuesta en el ensayo 10 es igual a la respuesta en el ensayo 1, es decir que se mantuvo).

Para evaluar el posible rol de las LCDC en el procesamiento del flujo óptico panorámico se utilizaron dos índices. Uno es el índice de persistencia de respuesta frente al estímulo panorámico (IPP) que evalúa la persistencia de la respuesta al EP a lo largo de 10 s. (R (1 s): Cantidad de PA evocados durante el primer segundo de estimulación; R (10 s): cantidad de PA evocados entre el segundo 10 y el 11 de estimulación continua)

$$IPP = 1 - \frac{R(1\ s) - R(10\ s)}{R(1\ s)}$$

Este índice puede tomar valores entre 0 (si la respuesta a los 10 s ha desaparecido completamente) y 1 (si la respuesta inicial se sostiene con la misma intensidad a los 10 s).

Por último, para comparar la respuesta de las LCDC evocada frente a un EB con la evocada por un EP. Este índice, que llamamos de preferencia por objetos (IPO), compara la respuesta (cantidad de PA) evocada por un EB en un segundo (el de mayor actividad), con la evocada por un EP en el mismo período de tiempo. (R (EB): cantidad de PA evocados en 1 s por el EB; R (EP): cantidad de PA evocados en 1 s por el EP)

$$IPO = \frac{R(EB) - R(EP)}{R(EB) + R(EP)}$$

Este índice puede tomar valores de entre -1 (cuando la neurona responde al EP pero no al EB) y 1 (cuando la neurona responde al EB pero no al EP). Valores cercanos a cero indicarían que las respuestas a ambos estímulos fueron similares.

Resultados

1. Respuesta diferencial a la dirección y sentido de movimiento de un objeto.

Las que a partir de los resultados de esta tesis hemos denominado LCDC del cangrejo, son neuronas cuya característica diagnóstica es presentar una definida sensibilidad visual a la dirección y sentido del movimiento de objetos. Se han obtenido registros de 51 neuronas de 46 cangrejos que mostraban esta característica. En la figura 28 se muestran tres ejemplos de registros de estas neuronas, cada fila incluye registros de la respuesta de una misma neurona a las distintas direcciones y sentidos de movimiento. En el eje azimutal, cuando el objeto se mueve en un sentido, responden con una gran depolarización y alta frecuencia de potenciales de acción. En cambio, cuando el objeto se mueve en el sentido contrario responden con una evidente hiperpolarización (figura 28, primeras dos columnas). Siguiendo una convención bien establecida (ej.: Eckert y Bishop, 1978; Schnell et al., 2012), definiremos al sentido de movimiento que genera respuesta excitatoria en la neurona como su sentido preferido y al que genera respuesta inhibitoria (o nula) como su sentido nulo. Cuando el objeto se mueve a lo largo del eje vertical las LCDC no muestran respuesta o, en el caso de aquellas pocas que muestran algo de respuesta, la misma es comparativamente débil (figura 28, últimas dos columnas). De hecho, un análisis de los promedios de respuestas de 15 neuronas LCDC a las que se evaluó en las cuatro direcciones de movimiento del objeto, confirma que las mismas presentan una clara preferencia por movimientos horizontales en un único sentido. Frente al movimiento vertical, de las 15 neuronas 8 no mostraron respuesta apreciable, 4 mostraron algo de respuesta direccional aunque siempre de una magnitud mucho menor que al movimiento horizontal y 3 respondieron con una inhibición en ambos sentidos. En la figura 29 se muestra un análisis de los promedios de las respuestas de esas 15 neuronas a las distintas direcciones y sentidos de movimiento. Como se observa en la figura 29A, la frecuencia de disparo de potenciales de acción sólo aumenta significativamente frente a un estímulo que se mueve en el sentido preferido de la dirección horizontal. Por otro lado, el potencial de membrana en promedio (figura 29B) cambia significativamente sólo para estímulos que se mueven en dirección horizontal, con depolarizaciones en el sentido preferido e hiperpolarizaciones en el sentido nulo.

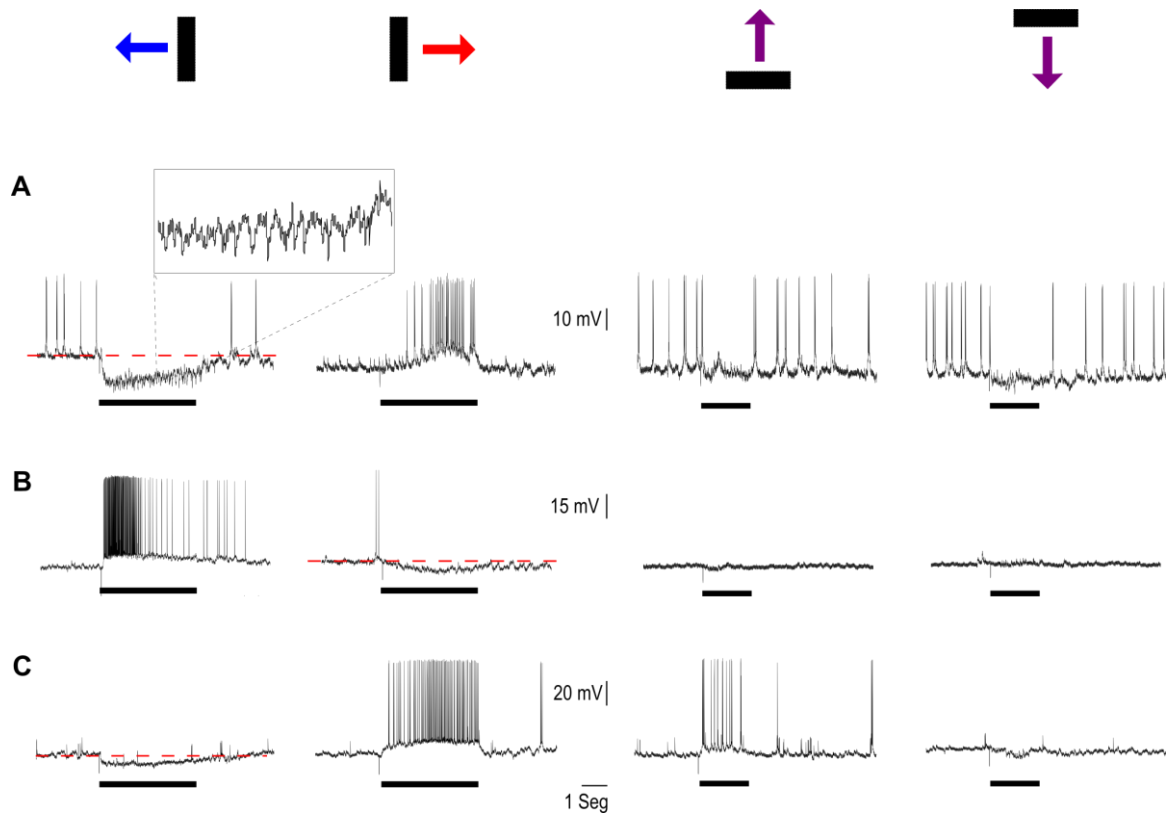


Figura 28. Respuestas de neuronas LCDC. A, B, C. Ejemplos representativos de tres neuronas que responden de manera diferencial a la dirección y sentido de movimiento de un objeto. En la parte de arriba de la figura se indica la dirección y sentido de movimiento de la barra. Cuando el objeto se mueve en el eje azimutal (dos primeras columnas), el sentido preferido de movimiento evoca una gran depolarización y una descarga de alta frecuencia de potenciales de acción (segunda columna en los ejemplos A y C; primera columna en el ejemplo B). El movimiento del objeto en el sentido contrario (nulo) evoca una marcada hiperpolarización y supresión de los disparos espontáneos, en los casos donde los hay (ejemplo primera columna en el ejemplo A). El movimiento del objeto en el eje vertical no produce cambios en el potencial de reposo de la célula en la mayoría de los casos. Cuando los hay son mucho más sutiles que los evocados por movimientos en el eje azimutal (últimas dos columnas).

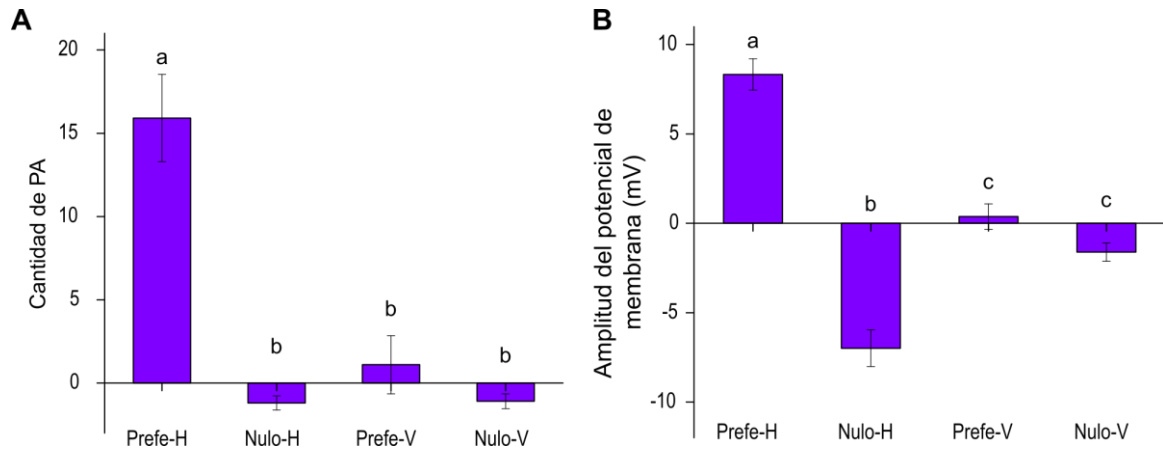


Figura 29. Comparación de la intensidad de respuesta frente a distintas direcciones y sentidos de movimiento. A. Promedio de la cantidad de potenciales de acción evocados por el movimiento del estímulo en las distintas direcciones y sentidos. La respuesta fue relativizada a la duración del estímulo. B. Promedio de la amplitud del cambio en el potencial de membrana evocado en respuesta a estímulos moviéndose en las distintas direcciones y sentidos. Prefe: sentido preferido; Nulo: sentido nulo; H: dirección horizontal; V: dirección vertical. ANOVA de un factor: $F_{(3,42)}=28,22$, $p<0,0001$. Comparaciones múltiples de Tukey: las barras que comparten letras iguales no son estadísticamente diferentes ($n=15$).

En la figura 28, se muestran tres ejemplos de LCDC sobre los cuales señalaremos características que están presentes en algunas y no en otras neuronas.

- 1) Algunas de las LCDC registradas mostraron tener actividad espontánea (figura 28A) mientras que otras fueron completamente silenciosas en ausencia de estímulos (figura 28B-C).
- 2) Como se puede ver en los ejemplos de la figura 28A y C, en muchas de las neuronas se observó la presencia de pequeños potenciales excitatorios postsinápticos (PEP) y de potenciales inhibitorios postsinápticos (PIP). En aquellas neuronas en las que las hiperpolarizaciones frente al estímulo en sentido nulo resultaron ser más pronunciadas, se observó claramente una alta frecuencia de PIP durante el periodo de estimulación (primera columna de la figura 28A - recuadro punteado).
- 3) En el ejemplo de la figura 28C, se puede observar que el movimiento de la barra hacia arriba evoca una respuesta excitatoria y el movimiento hacia abajo una pequeña inhibición. Si bien este tipo de respuesta al movimiento vertical de la barra se observó en algunas otras neuronas ($n=4$; 26%), siempre la intensidad de la respuesta fue mucho menor a la evocada por la barra moviéndose en dirección horizontal (figura 29). La presencia de una sutil respuesta al

movimiento vertical sólo en algunas neuronas sugiere que probablemente en esos casos, al preparar el animal para los registros electrofisiológicos, el pedúnculo ocular se haya fijado al caparazón con un pequeño desvío respecto de su posición natural, por lo que los movimientos horizontales podrían percibirse con una componente (más pequeña) vertical.

- 4) Finalmente, como se observa en el ejemplo de la figura 28A, en algunas neuronas los PA se disparaban agrupados en ráfagas.

El potencial de reposo promedio de estas neuronas fue de $-49,15 \pm 1,42$ mV ($n=51$). Los estímulos moviéndose en sentido preferido evocaron una depolarización promedio de $6,25 \pm 0,48$ mV ($n=51$) que desencadenó trenes de potenciales de acción de alta frecuencia cuyo promedio, medido durante un segundo fue de $30,65 \pm 3,28$ Hz ($n=51$). El promedio de la frecuencia instantánea máxima fue de $123,64 \pm 10,8$ Hz ($n=51$). Las hiperpolarizaciones debidas al estímulo visual moviéndose en sentido nulo mostraron, en algunos casos, ser muy pronunciadas, siendo su promedio de $6,53 \pm 0,54$ mV ($n=51$) y llegando en algún caso a valores de 19,52 mV.

2. Campo receptivo

Además de mostrar una respuesta altamente direccional, cada una de estas neuronas mostró responder al estímulo barra (EB) sólo en una región bien delimitada del campo visual del animal. Como se explicó en la sección de métodos, usando la respuesta evocada por estímulos moviéndose en ambos monitores, ajustamos el potencial de membrana y la frecuencia instantánea de PA a una distribución de Gauss y así estimamos el centro y el ancho del campo receptivo tanto excitatorio como inhibitorio de cada neurona registrada.

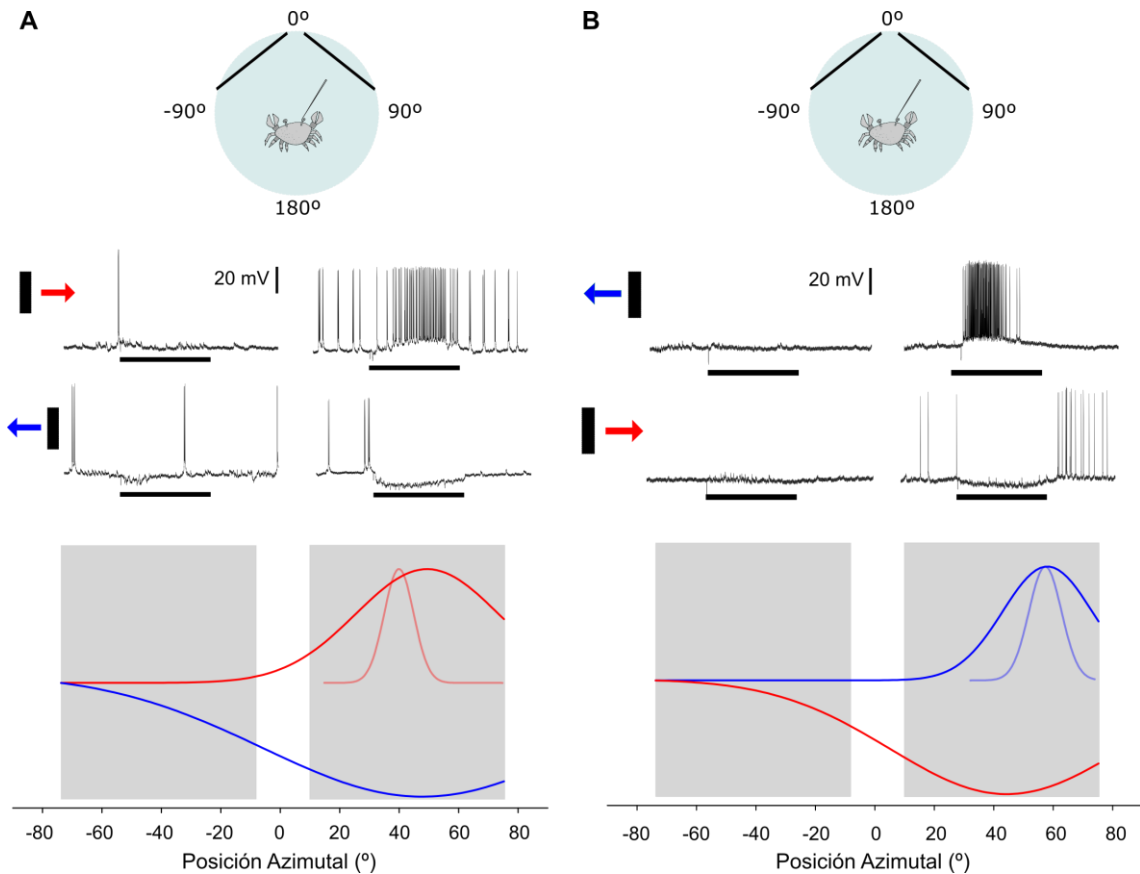


Figura 30. Estimación del campo receptivo de dos neuronas direccionales. Se muestran dos ejemplos (A, B) en donde se ajustaron las respuestas evocadas por estímulos presentados en ambos monitores a distribuciones Gaussianas. En rojo se representa el movimiento en sentido horario. En azul se representa el movimiento en sentido antihorario. Para cada uno de los dos ejemplos se muestra: Arriba: Esquema de cómo se encuentra posicionado el animal frente a los monitores. Los registros fueron realizados en el ojo derecho. Inmediatamente debajo: La primera fila de registros ilustra la respuesta evocada al movimiento en sentido preferido: horario (A) o antihorario (B), la segunda fila de registros representa la respuesta evocada al movimiento en sentido nulo: antihorario (A) u horario (B). En ambos casos sólo se observó respuesta en los registros que se muestran a la derecha, que fueron los obtenidos con la presentación del estímulo en el monitor de la derecha (lado ipsilateral o de registro). Debajo de los registros: Ajustes a distribuciones Gaussianas del potencial de membrana durante la respuesta excitatoria (curva hacia arriba) y de la respuesta inhibitoria (curva hacia abajo). Estos ajustes resultan de combinar la respuesta obtenida presentando los estímulos secuencialmente en ambos monitores. La curva más clara en las respuestas excitatorias corresponde al ajuste Gaussiano realizado para la frecuencia instantánea de potenciales de acción evocados por durante la estimulación. El área gris de estos gráficos representa la región del campo visual del cangrejo que fue estimulada. Nótese que cuando el estímulo se mueve en sentido antihorario se invierte la correspondencia entre las posiciones del estímulo y el curso temporal del trazo electrofisiológico, por lo que el ajuste para esta dirección se realizó invirtiendo el curso temporal del registro de actividad.

Los registros electrofisiológicos de la figura 30 muestran la respuesta de dos neuronas al movimiento en el eje azimutal en las dos pantallas (ver esquema superior) con respuesta preferida en sentidos opuestos. Cuando el estímulo comenzó a moverse en sentido horario (flechas rojas) en el monitor de la derecha, la neurona de la figura 30A se depolarizó gradualmente y aumentó la frecuencia de disparo de PA, en cambio la neurona de la figura 30B se hiperpolarizó y disminuyó la frecuencia de disparo de PA. Cuando el movimiento del estímulo fue en sentido antihorario (flechas azules) en el monitor de la derecha, la neurona de la figura 30A se hiperpolarizó gradualmente y la neurona de la figura 30B se depolarizó aumentando la frecuencia de disparo de PA. Para estímulos moviéndose en el monitor de la izquierda no se observaron respuestas (registros de la izquierda en fig. 30A y B). Dado que los trazos electrofisiológicos mostrados reflejan el curso temporal del registro, al invertirse el sentido de movimiento del estímulo la parte inicial de los registros inferiores corresponde a la posición en el espacio que se estimula durante la parte final de los registros superiores. En la parte inferior de la figura 30 se muestran los ajustes a distribuciones Gaussianas para ambas neuronas (ver métodos de este capítulo). Para la realización de estos ajustes las respuestas al movimiento en sentido antihorario se invirtieron respecto de las obtenidas para el sentido horario de modo de quedar alineadas con la actividad correspondiente a posiciones equivalentes del estímulo en el espacio. Luego se combinaron las respuestas a estimulación en ambos monitores y se ajustaron a una distribución Gaussiana.

Se registraron diez LCDC con el cangrejo posicionado de frente a los monitores de estimulación. De las 10, 5 tuvieron preferencia de dirección horaria y las otras 5 antihoraria. En la figura 31 se muestra el centro y ancho de campo receptivo excitatorio (CRE), de potenciales de acción (CRPA) e inhibitorio (CRI) estimados para todas ellas. Calcular el CRPA, permite diferenciar las señales que recibe la neurona (señales de entrada) que se corresponden con la depolarización de la membrana (CRE), de las señales que esta envía (de salida) que se corresponden con la frecuencia de PA (CRPA).

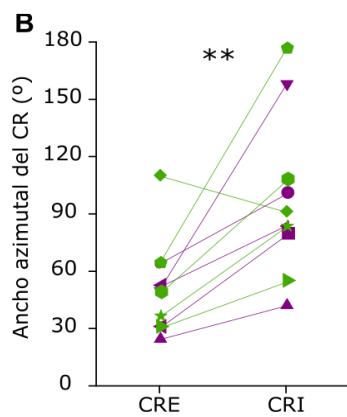
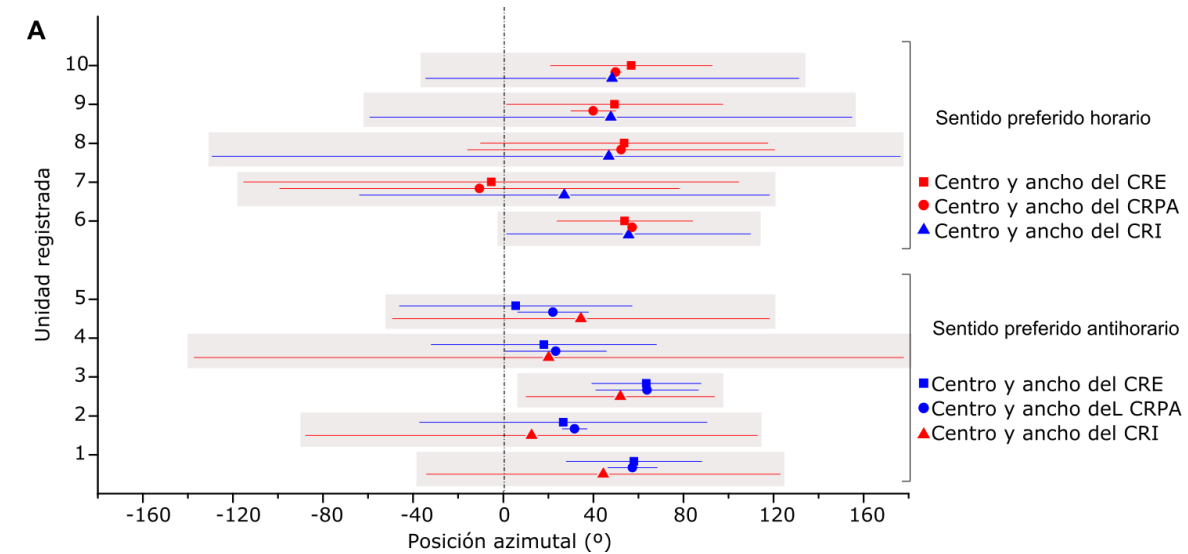


Figura 31. Centro y ancho del campo receptivo. A. Centro y ancho (símbolos y líneas respectivamente) del campo receptivo excitatorio (CRE), inhibitorio (CRI) y del definido por la frecuencia de potenciales de acción (CRPA), para cada unidad registrada representado en el eje visual azimutal. Cada sombreado gris enmarca las respuestas de una misma neurona. Las neuronas 1 a 5 tienen sentido preferido antihorario, las neuronas 6 a 10 tienen sentido preferido horario. Los colores rojo y azul definen los resultados obtenidos frente a los sentidos de movimiento horario y antihorario respectivamente. B. Comparación del ancho del campo receptivo excitatorio (CRE) y del campo receptivo inhibitorio (CRI). El CRI es significativamente más grande que el CRE ($t(9) = 3,71$; $p = 0,002$). En violeta las neuronas que tienen sentido preferido horario, en verde las que tienen sentido preferido antihorario.

Excepto por un caso (neurona 7) en que el centro del campo receptivo estaba levemente desplazado a la izquierda, todas las neuronas mostraron tener el centro de su campo receptivo (tanto excitatorio como inhibitorio) claramente orientado hacia la derecha, es decir ubicado del lado ipsilateral al electrodo de registro (en todos los casos el registro se realizó en el lóbulo óptico derecho).

Por otro lado, para 9 de las 10 neuronas, el CRI fue más ancho que el CRE (figura 31B). El único caso en que el CRI tuvo un ancho menor que el CRE fue el de la neurona que mostró tener el centro de su CRE levemente desplazado hacia la izquierda en la figura 31A, que parecería ser un caso particular.

Notablemente, de las 10 neuronas registradas hasta aquí, la mitad tuvieron sentido preferido antihorario (neuronas 1 a 5 en la figura 31) y la otra mitad tuvieron sentido preferido horario (neurona 6 a 10 en la figura 31).

Observando la figura 31A, vemos que con una única excepción, el centro del campo receptivo de todas las neuronas se encontraba en el lado ipsilateral al lado de registro (lado derecho del animal). Por lo tanto, resulta de interés extender el estudio de estas neuronas explorando en más detalle su sensibilidad al espacio visual lateral, del lado ipsilateral. Como se mencionó anteriormente, *Neohelice* presenta una mayor resolución visual en el polo lateral del ojo (Berón de Astrada et al., 2012) que es, además, la zona en que el animal fija visualmente los objetos. Por ese motivo, los resultados que se muestran de aquí en adelante surgen de registrar LCDC con el cangrejo posicionado como se esquematizó en la figura 27B, es decir rotado 90° respecto de la posición en la que se encontraban en los experimentos previamente descritos. Así, fue posible abarcar con los estímulos direccionales todo el campo receptivo lateral del animal tanto en la región anterior al polo lateral del ojo como en la posterior.

En la figura 32 se muestran nuevamente dos ejemplos de ajustes para la estimación de los parámetros de los CRE, CRPA y CRI, determinados por estimulación con los monitores en posición lateral al animal.

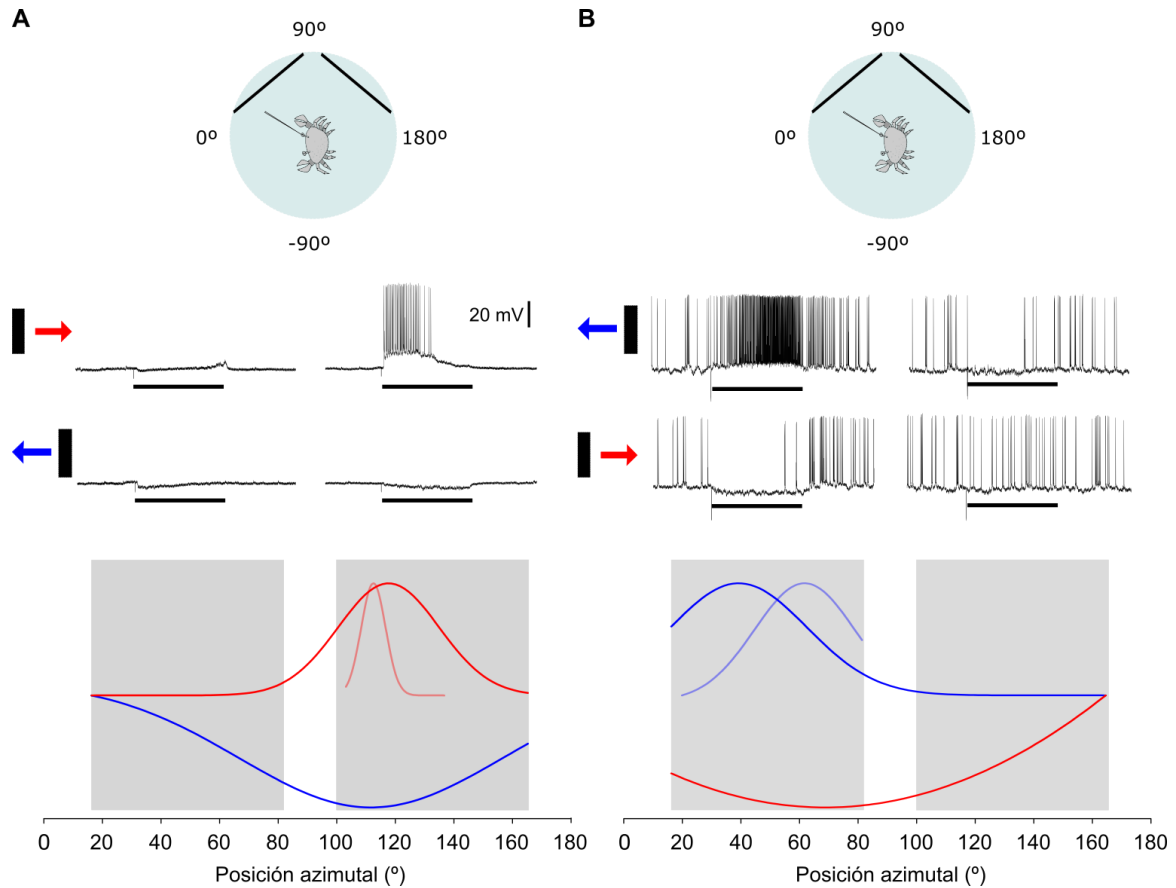


Figura 32. Estimación del campo receptivo de dos neuronas direccionales. Se muestran dos ejemplos (A, B) en donde se ajustaron las respuestas evocadas por estímulos presentados en ambos monitores a distribuciones Gaussianas. En rojo se representa el movimiento en sentido horario. En azul se representa el movimiento en sentido antihorario. Para cada uno de los dos ejemplos se muestra: Arriba: Esquema de cómo se encuentra posicionado el animal frente a los monitores. El animal se encuentra rotado 90° respecto de la figura 30. Los registros fueron realizados en el ojo derecho. Inmediatamente debajo: La primera fila de registros ilustra la respuesta evocada al movimiento en sentido preferido: horario (A) o antihorario (B), la segunda fila de registros representa la respuesta evocada al movimiento en sentido nulo: antihorario (A) u horario (B). Debajo de los registros: Ajustes a curvas Gaussianas normalizadas del potencial de membrana durante la respuesta excitatoria (hacia arriba) y de la respuesta inhibitoria (hacia abajo). Estos ajustes resultan de combinar la respuesta obtenida presentando los estímulos secuencialmente en ambos monitores. La curva más clara representa el CRPA. El área gris de estos gráficos representa la región del campo visual del cangrejo que fue estimulada. Otros detalles como en la figura 31.

Una de las primeras diferencias que notamos al registrar neuronas LCDC estimulando la región lateral del campo visual del animal es que se encontraron tanto neuronas que respondían cuando el estímulo se presentaba en un monitor como en el otro. Es decir, que algunas neuronas tenían el campo receptivo orientado hacia la región lateral anterior del campo receptivo del animal y otras hacia la región lateral posterior.

En cada uno de los ejemplos de la figura 32 se muestran los registros que corresponden a la respuesta obtenida con la presentación del estímulo en el monitor que abarca el campo visual lateral-posterior y el que abarca el campo lateral-anterior del lado ipsilateral del animal. Los registros de la figura 32A muestran que esa neurona respondió sólo cuando el estímulo se movía en el monitor que está ubicado en una posición lateral-posterior. Por otro lado, los registros de la figura 32B muestran que esa neurona respondió sólo cuando el estímulo se movía en el monitor que está posicionado en la zona lateral-anterior. Una característica notable del ejemplo de la figura 32B es que cuando el estímulo se movía en sentido preferido en el monitor anterior evocaba una intensa respuesta excitatoria y cuando lo hacía en el posterior evocaba una clara respuesta inhibitoria. El mismo fenómeno, aunque en menor magnitud estuvo presente en otras neuronas. Por ejemplo, puede observarse también en la neurona mostrada en la parte A de la figura 32, en donde un componente inhibitorio aparece al comienzo del trazo de respuesta al monitor anterior en la dirección preferida. La presencia de esta inhibición como respuesta al movimiento del estímulo en sentido preferido en una región del espacio visual que se corresponde con los bordes del CRE, podría tener la finalidad de acentuar esos bordes, definiendo con mayor precisión los límites del campo receptivo de la dirección preferida.

Se registraron 41 neuronas en las que se evaluaron sus respuestas a estímulos presentados en la región visual lateral del animal. Se pudo calcular el campo receptivo para 35 de ellas, que corresponden a las que pudieron ser estimuladas en ambas direcciones, en ambos monitores y en las que, además, se pudo realizar exitosamente el ajuste a una distribución Gaussiana. En algunos casos no se pudo realizar dicho ajuste para el campo receptivo inhibitorio, debido a que la amplitud de la hiperpolarización no fue lo suficientemente grande. Pero en la mayoría de los casos se logró realizar un buen ajuste al potencial de membrana excitatorio e inhibitorio, obteniéndose las correspondientes estimaciones de centro y ancho de los campos receptivos.

En la figura 33 se representan los CRE, CRPA y CRI para las neuronas registradas estimulando lateralmente. Las unidades registradas 1 a 11 mostraron tener sentido preferido antihorario, es decir que son las que respondieron excitatoriamente cuando la barra se movió desde una posición más posterior hacia una posición más anterior en el campo visual lateral del animal, e inhibitoriamente cuando la barra se movió desde una posición más anterior hacia una posición más posterior. Por otro lado, las unidades registradas 12 a 35 mostraron tener respuesta excitatoria en sentido horario, es decir cuando la barra se movía desde una posición más anterior hacia una posición más posterior y respuestas inhibitorias cuando se movía en el sentido contrario.

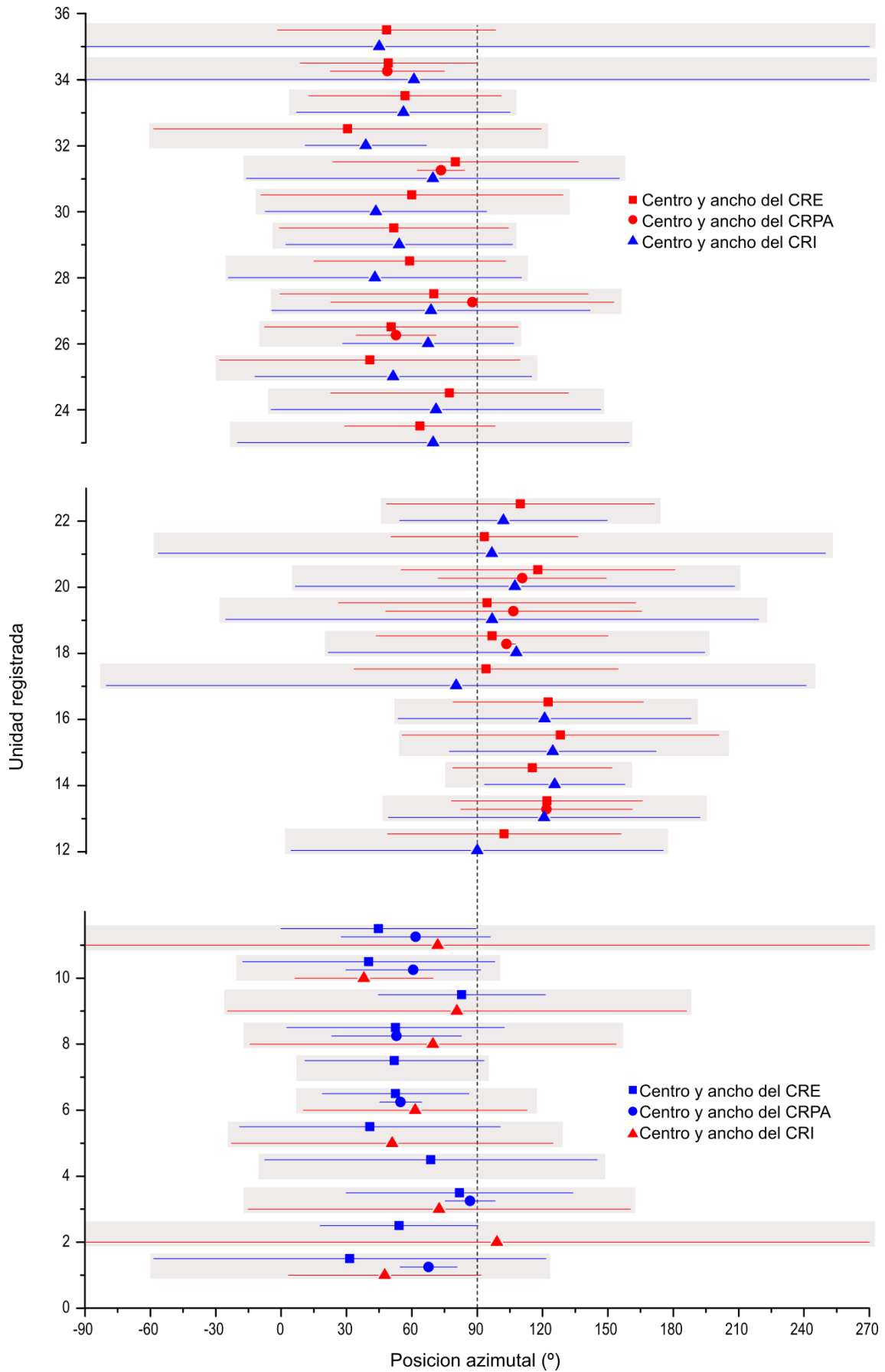


Figura 33. Centro y ancho del campo receptivo de las neuronas que fueron registradas con estímulos presentados en el campo visual lateral del cangrejo. Centros y anchos (símbolos y líneas respectivamente) de los campo receptivos excitatorios (CRE) de potenciales de acción (CRPA) e inhibitorios (CRI) de cada neurona registrada, representados en el eje visual azimutal del animal. En rojo se representa la respuesta a estímulos que se mueven en sentido horario y en azul a estímulos que se mueven en sentido antihorario. Los sombreados grises enmarcan las tres mediciones de las respuestas de una misma neurona. Las unidades registradas 1 a 11 tienen sentido preferido antihorario (movimiento del estímulo desde posterior hacia anterior) y de 12 a 35 sentido preferido horario (movimiento del estímulo desde anterior hacia posterior).

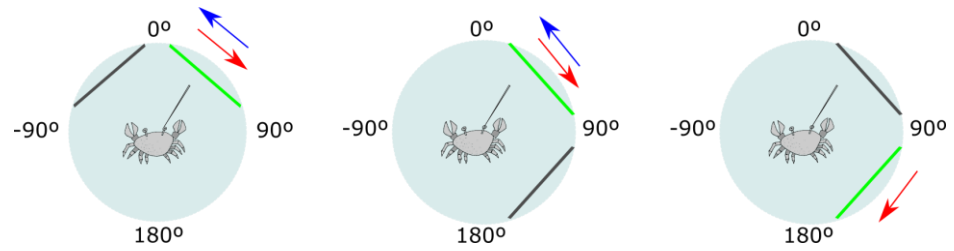
A diferencia de las 10 neuronas que se habían registrado con estímulos presentados en el frente del animal, algunas de las neuronas registradas con estimulación lateral mostraron tener un CRI más angosto que el CRE. Sin embargo, la mayoría (22 de 35) mostraron tener un campo receptivo inhibitorio más ancho que el excitatorio. Algunas neuronas mostraron incluso tener un CRI estimado que cubre los 360°.

Teniendo en cuenta todas las LCDC registradas hasta aquí vemos, en primer lugar, una clara asimetría en la cantidad de elementos registrados para cada uno de los sentidos de movimiento preferidos: en total a lo largo de esta tesis se registraron 51 neuronas (10 en condiciones de estimulación frontal y 41 en condiciones de estimulación lateral), de las cuales 31 tuvieron sentido preferido horario y 20 sentido preferido antihorario.

En la condición del animal ubicado de frente a las pantallas, todas las neuronas registradas (con una única excepción) tuvieron su campo receptivo del lado ipsilateral, siendo el número de unidades con preferencias de respuestas horaria y antihoraria similar. Por otro lado, en la condición del animal posicionado lateralmente a las pantallas, encontramos neuronas con el centro de su campo receptivo en la parte antero-lateral y neuronas con su centro de campo receptivo en la parte postero-lateral. Cuando consideramos la preferencia de sentido de movimiento, encontramos que el número de unidades con preferencia por movimiento horario (desde anterior hacia posterior – unidades registradas 12 a 35 en la figura 33) supera en una relación de aproximadamente 2 a 1 (24 vs 11) a las unidades con preferencia de sentido antihorario (desde posterior hacia anterior – unidades registradas 1 a 11 en la figura 33). Resulta interesante que, el grupo de neuronas con sentido preferido horario mostró una distribución uniforme (11 vs 13) en la ubicación de los campos receptivos a uno y otro lado del polo lateral del ojo del animal (punto correspondiente a los 90° marcado con línea punteada en la figura 33). Por el contrario, en el grupo de neuronas con sentido preferido antihorario todas (n=11) tuvieron el centro de su campo receptivo en una posición por debajo de los 90°, esto es, hacia la parte anterior del campo visual del animal. Visto de otro modo, en la parte antero-lateral se

encontró un número balanceado de neuronas con preferencia horaria (13) y antihoraria (11), lo que es plenamente coincidente con los resultados que se obtuvieron en los experimentos con los monitores de frente al animal, en el que las neuronas respondieron solamente al monitor de la derecha (es decir en la misma región antero-lateral del campo visual) en un número balanceado de preferencia horaria (5) y antihoraria (5) (fig. 31). En la parte postero-lateral, solo se registraron neuronas con preferencia horaria.

En la tabla 1 se resumen estos números junto con los promedios de centro y ancho de todos los campos receptivos para todas las neuronas registradas. Los esquemas de arriba de la tabla muestran la posición en la que se posicionaba el cangrejo respecto de los monitores de estimulación. Los datos están separados según el campo receptivo de la neurona. El primer esquema y los promedios que se muestran debajo de éste, corresponden a las neuronas que fueron registradas con el cangrejo de frente, situación en la que sólo se registraron neuronas con su campo receptivo en el monitor de la derecha, obteniéndose registros de neuronas tanto con uno como con otro sentido preferido. El segundo esquema y los promedios que se muestran debajo de éste, corresponden a neuronas que fueron registradas con el cangrejo en posición lateral a los monitores y que respondieron cuando los estímulos se presentaban en el monitor posicionado antero-lateralmente, en este caso también se obtuvieron registros de neuronas con sentido preferido horario y antihorario. El tercer esquema y los promedios que se muestran debajo de éste, corresponden a neuronas que tenían el centro de su campo receptivo orientado postero-lateralmente. En este último caso sólo se registraron neuronas con sentido preferido horario.



		Centro (°)	Ancho (°)	Centro (°)	Ancho (°)	Centro (°)	Ancho (°)
CRE	H	41,69±11,82 (n=5)	38,33±25,79 (n=5)	56,83±3,88 (n=13)	56,36±4,14 (n=13)	108,86±3,94 (n=11)	54,52±3,52 (n=11)
	AH	34,33±11,33 (n=5)	43,93±7,32 (n=5)	54,74±5,03 (n=11)	52,73±5,28 (n=11)		
CRPA	H	37,77±12,41 (n=5)	34,03±18,47 (n=5)	65,70±9,13 (n=4)	30,09±12,03 (n=4)	110,69±4,02 (n=4)	34,69±11,77 (n=4)
	AH	39,64±8,77 (n=5)	15,47±3,33 (n=5)	67,44±5,37 (n=7)	18,89±4,69 (n=7)		
CRI	AH	32,69±7,32 (n=5)	144,29±57,1 (n=5)	65,81±6,20 (n=9)	133,12±43,5 5 (n=9)		
	H	45,14±4,76 (n=5)	102,21±20,4 (n=5)	58,46±3,16 (n=12)	113,82±33,5 (n=12)	106,68±4,55 (n=11)	88,61±12,77 (n=11)

Tabla 1. Promedios de los centros y anchos de los campos receptivos estimados para todas las neuronas registradas. Los esquemas de arriba muestran la posición del cangrejo en relación a los monitores de estimulación. La línea verde representa el monitor en el que se ubicaba el centro del campo receptivo de las neuronas registradas. Las flechas roja y azul representan el movimiento del estímulo en sentido horario (H) o antihorario (AH), respectivamente. Cuando los estímulos se presentan en el monitor localizado antero-lateralmente (primeros dos esquemas), encontramos neuronas tanto con sentido preferido horaria como antihoraria. Cuando el estímulo se presenta en el monitor localizado postero-lateralmente (tercer esquema) sólo encontramos neuronas con sentido preferido horario. CRE: campo receptivo excitatorio. CRPA: campo receptivo de potenciales de acción. CRI: campo receptivo inhibitorio. Los valores están expresados como media ± EE.

3. Efecto de las repeticiones del estímulo

Como se describió en la introducción, en *Neohelice* la presentación de un EVP causa una intensa respuesta de escape que decae rápidamente como consecuencia de la repetición del estímulo que muestra ser inocuo. Las neuronas LG responden de manera intensa al mismo estímulo que desencadena la respuesta de escape al EVP (Berón de Astrada y Tomsic, 2002), reflejando estrechamente el nivel de respuesta comportamental, su reducción por estimulación repetida y su recuperación espontanea frente a distintos tipos de entrenamiento (Tomsic et al., 2003). En esta sección investigaremos si la modificación de

las respuestas que ocurre en las LG como consecuencia de la estimulación repetida, ocurre también en las LCDC.

Para evaluar la persistencia de la respuesta de las LCDC a la estimulación repetida, medimos la respuesta de las neuronas a la presentación de 10 estimulaciones idénticas (EB en la dirección preferida) separadas cada 10 s. La figura 34 muestra el promedio de las respuestas obtenidas en 17 LCDC. Para comparar, se muestran también los resultados obtenidos frente al mismo estímulo y régimen de presentaciones en 13 neuronas LG. Las respuestas obtenidas de cada neurona fueron normalizadas al primer ensayo para que las tasas de caída entre neuronas que muestran distinta intensidad de respuesta inicial sean comparables. Luego, las respuestas normalizadas fueron promediadas.

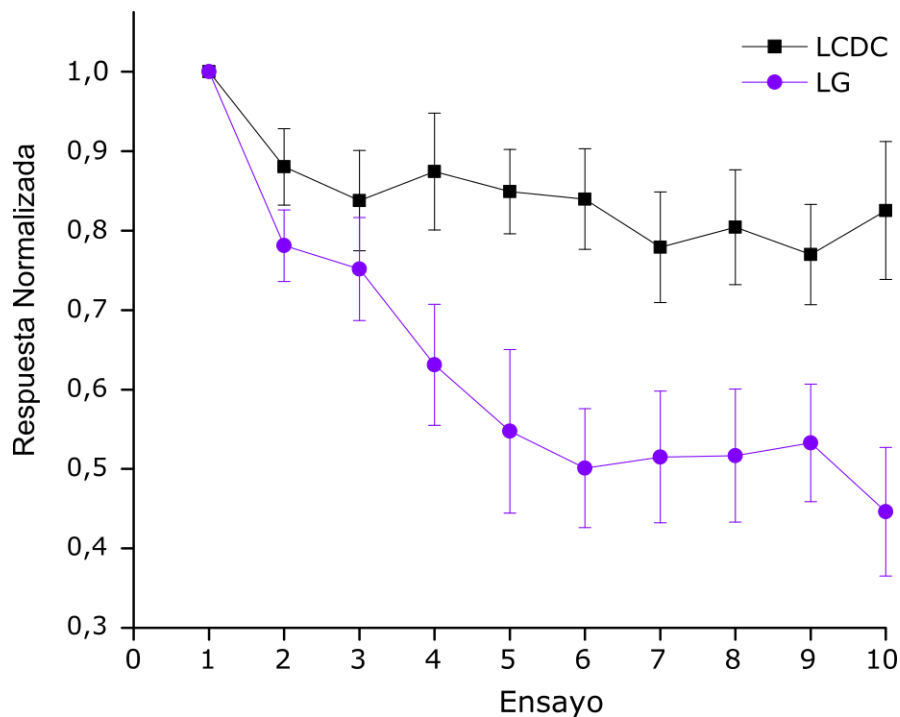


Figura 34. Las LCDC, a diferencia de las neuronas LG, sostienen su nivel de respuesta a lo largo de los ensayos. Respuestas neuronales promedio (cantidad de potenciales de acción) de LCDC (n=17) evocadas por la presentación de una barra moviéndose en el sentido preferido comparadas con las respuestas de neuronas LG (n=13) evocadas por la presentación de una barra moviéndose en uno u otro sentido (en cantidades balanceadas para el conjunto de neuronas), con repeticiones en el mismo sentido para cada neurona, en dirección horizontal, en ambos casos con un intervalo de 10 s entre ensayos. Las respuestas de cada neurona fueron normalizadas al primer ensayo. El gráfico muestra medias $\pm$ EE.

Contrastando con lo que ocurre en las LG, en las LCDC se ve una leve reducción inicial de la respuesta entre el primer y segundo ensayo, pero la respuesta luego se sostiene

sin declinar a lo largo de los siguientes 9 ensayos. Mientras que en las neuronas LG la respuesta en el ensayo 10 se redujo en un 60 % respecto del valor inicial, en las LCDC esa disminución fue mucho menor, en promedio de aproximadamente solo el 15%. Por lo tanto, el sostenimiento de la respuesta de las LCDC es un carácter diagnóstico más que permite distinguirlas de las LG.

4. Respuesta a un estímulo panorámico

Como se mencionó en la introducción general de esta tesis, casi todos los sistemas que se conocen de neuronas direccionales en artrópodos procesan el flujo óptico de información que se genera sobre la retina del animal como consecuencia del desplazamiento o rotación del propio animal, y no estarían relacionadas con el procesamiento de la dirección de movimiento de objetos puntuales.

Los comportamientos evocados por un objeto que se mueve, como es el caso de la respuesta de escape a un estímulo visual de peligro, suelen mostrar una tendencia a habituarse rápidamente frente a la estimulación repetida. Por el contrario la respuesta optomotora (RO) generada por la rotación visual del panorama, es un reflejo que no se habitúa. En *Neohelice*, la RO desencadenada por un patrón de barras panorámico en torno al animal permanece inalterada a lo largo de 15 ensayos durante 45 minutos de estimulación (Tomsic, 2016). Sin embargo, cuando se comparó la respuesta de neuronas LG a un estímulo panorámico con la evocada por un estímulo puntual, se encontró que claramente los estímulos panorámicos generaban una respuesta de menor intensidad y que dicha respuesta se habituaba, indicando que las LG están más relacionadas con la detección de objetos que con el análisis de flujo óptico (Medan et al., 2007; Tomsic, 2016).

Para evaluar un rol potencial de las LCDC en el procesamiento del flujo óptico registramos la respuesta de 26 neuronas al estímulo panorámico (EP – descrito en métodos generales). Las mismas neuronas fueron también evaluadas en su respuesta al estímulo barra (EB).

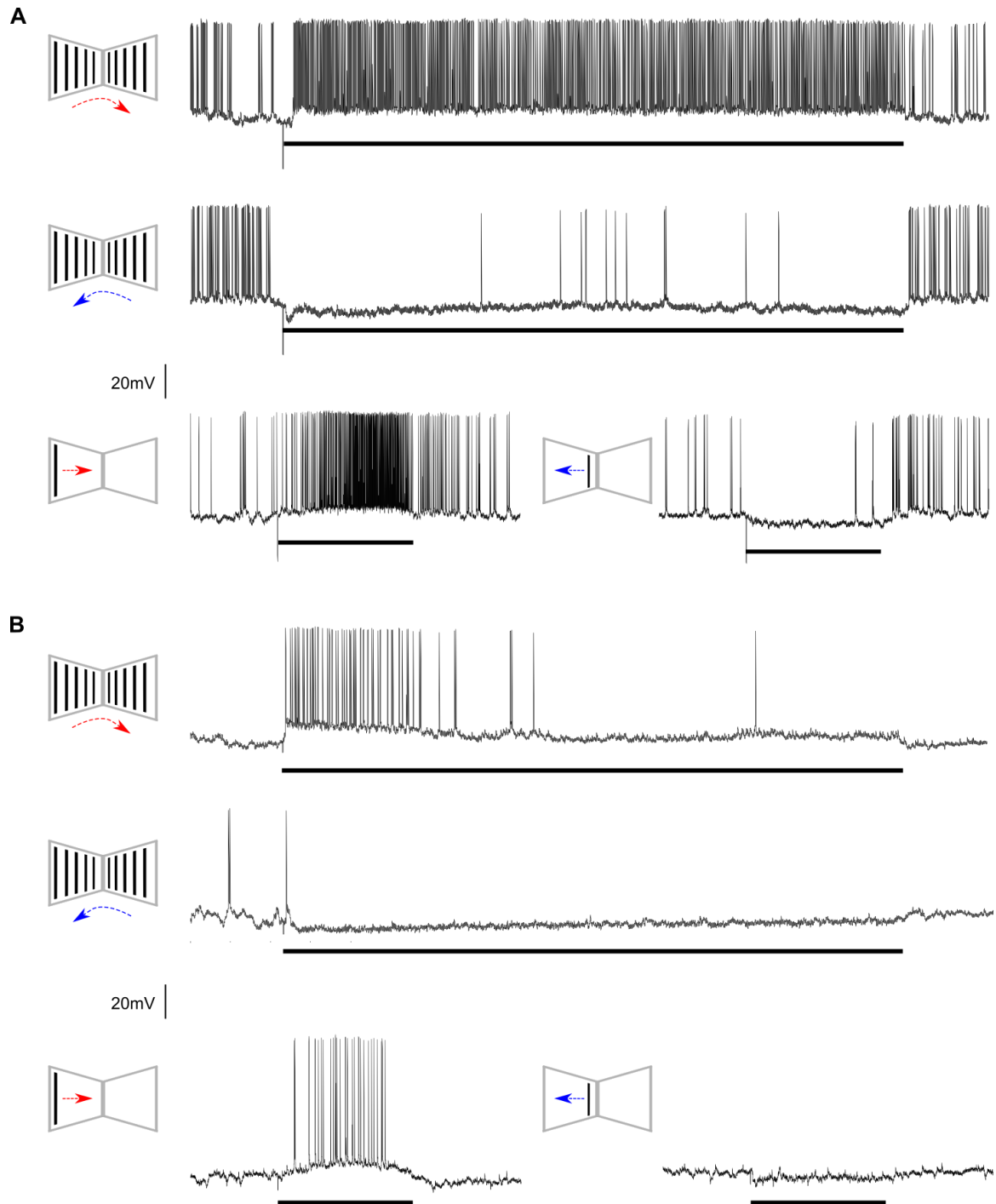


Figura 35. Dos ejemplos de la respuesta de LCDC a un estímulo panorámico (EP) y a una barra (EB) moviéndose en ambos sentidos. A. La neurona sostiene su respuesta al EP hasta el final de la estimulación (15 s) tanto en sentido preferido, con depolarización y alta frecuencia de disparo de potenciales de acción, como en sentido nulo, con una sostenida hiperpolarización. **B.** La respuesta de esta neurona al EP va decayendo mientras transcurre el tiempo de estimulación hasta casi desaparecer. En el sentido preferido, al finalizar la presentación del estímulo, la amplitud de la depolarización es menor y ya no se disparan potenciales de acción. En el sentido nulo también disminuye la amplitud de la hiperpolarización. En la última fila de ambos ejemplos se muestra la respuesta a una barra que se mueve en ambos sentidos (duración del EB: 3,36 s).

Los resultados obtenidos muestran algunas diferencias entre las distintas LCDC registradas. En la figura 35 se ven dos ejemplos que lo ilustran: el primero de ellos (figura 35A) muestra una LCDC que sostuvo la respuesta al EP durante todo el tiempo de estimulación, siendo prácticamente la misma al inicio y al final, en ambos sentidos de estimulación (excitación o inhibición según sentido preferido o antipreferido). En esta neurona el EB evocó una respuesta con mayor frecuencia máxima de disparo de PA que el EP. Contrariamente, el ejemplo de la figura 35B muestra una disminución de intensidad de la respuesta, tanto excitatoria como inhibitoria durante el EP. La frecuencia máxima alcanzada en la respuesta al sentido preferido de movimiento fue menor para el EB que para el EP.

Para investigar si era posible distinguir tipos diferentes de LCDC y la posible participación de algunos de esos elementos en el procesamiento del flujo óptico, comparamos la cantidad de PA evocados durante el primer segundo de estimulación con la que aún persistía a los 3, 6 y 10 segundos, tomando siempre una ventana temporal de 1 s para el cálculo. Los resultados para las 26 neuronas se muestran en la figura 36.

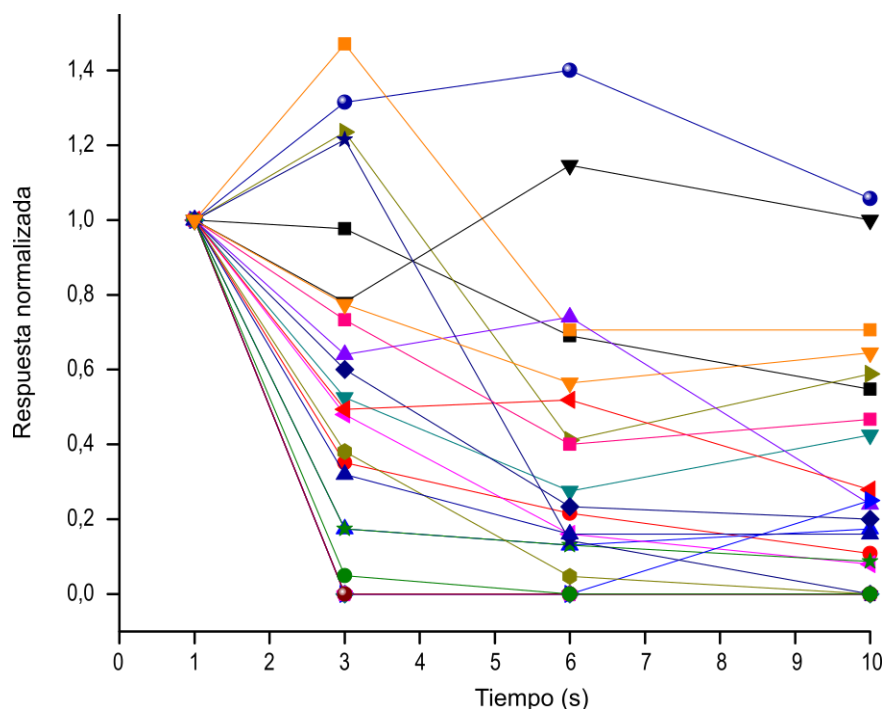


Figura 36. Respuesta a un estímulo panorámico de las LCDC a lo largo del tiempo. La respuesta tiende a reducirse a lo largo del tiempo para la mayoría de las neuronas, aunque algunas sostienen su respuesta hasta el final. Sin embargo, no se observa un patrón que permita identificar dos o más grupos claramente diferenciados (n=26).

Observando estos datos, detectamos que de las seis neuronas que más sostuvieron su respuesta frente a la presentación del estímulo panorámico, cinco de ellas tenían sentido preferido horario, es decir que respondieron de manera excitatoria cuando el estímulo panorámico se desplazaba en sentido antero-posterior (o retrógrado). Esta observación es de especial interés a la luz de recientes experimentos comportamentales realizados en el laboratorio, que se comentarán en la discusión.

Para evaluar si algunas de las neuronas respondían preferencialmente al flujo óptico y otras al movimiento de objetos, se comparó la respuesta media evocada por un EP (cantidad de PA durante el 1er segundo de respuesta) con la evocada por un EB (cantidad de PA durante un intervalo de tiempo de respuesta de 1 s coincidiendo con la estimulación del centro del campo receptivo de la neurona). Como puede verse en la figura 37A, no hubo diferencias significativas en la intensidad de respuesta obtenida para ambos estímulos (t de student pareado: $t(24)=0,26$; $p=0,79$). Sin embargo, como al observar respuestas individuales se evidenciaban diferencias entre distintas neuronas (figura 35), se calculó un índice de preferencia de objeto (IPO) para determinar cuántas neuronas respondían más al EB y cuántas al EP (descrito en métodos de este capítulo). Valores de IPO cercanos a cero implican que las respuestas a ambos estímulos son similares, valores cercanos a 1 indican preferencia por el EB mientras que valores cercanos a -1 indican que el estímulo preferido es EP. En la figura 37B se observa la distribución de valores de IPO obtenida.

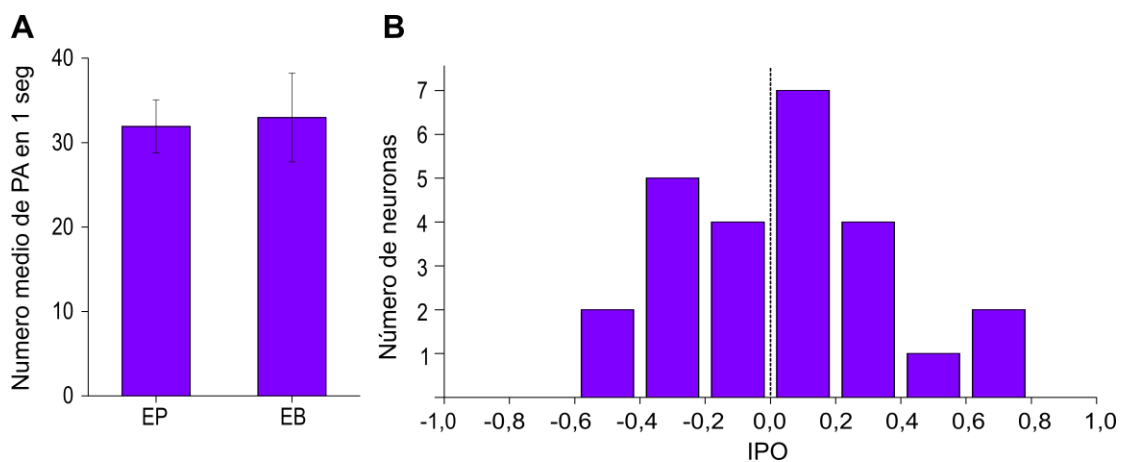


Figura 37. Comparación de la respuesta de las LCDC frente a un estímulo panorámico (EP) o a un estímulo barra (EB). A. Cantidad media de PA evocados por el EP y el EB a lo largo de un segundo de estimulación. No se encontraron diferencias significativas ($t(24)=0,26$; $p=0,79$). B. Distribución de valores del IPO para 26 LCDC, mostrando que la mayoría de las LCDC tienen un índice cercano a cero (el 77% de las neuronas con IPO entre $\pm 0,4$, lo que implica que las diferencias en las respuestas son de menos del 43%), por lo que no puede decirse que haya una marcada preferencia por alguno de los estímulos.

Luego, nos propusimos evaluar si las neuronas que mostraron una preferencia por la barra (IPO más altos) eran aquellas que redujeron su respuesta más rápidamente frente al estímulo panorámico). Para eso se calculó el índice de persistencia de la respuesta frente a estímulos panorámicos (IPP, descripto en métodos) y se comparó con el IPO para cada neurona. La figura 38A muestra que no hubo correlación entre ambos índices ($R = -0,04$; $p = 0,86$).

Por otro lado, evaluamos si las neuronas que más sostenían su respuesta hasta el final del EP eran las mismas que mostraban una respuesta más sostenida a lo largo de 10 ensayos de estimulación con el EB. Para eso calculamos el índice de persistencia de respuesta frente a repeticiones del estímulo barra (IPB, descripto en métodos) y se comparó con el IPP para cada neurona. La figura 38B muestra que tampoco hubo correlación entre ambos índices ($R = -0,03$; $p = 0,49$).

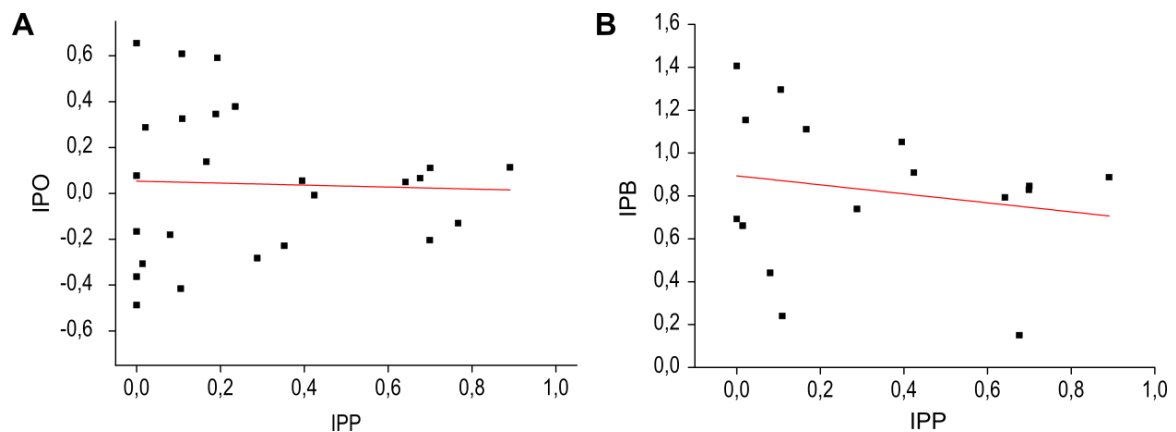


Figura 38. Prueba de correlaciones entre índices. A. No hay correlación significativa entre el índice de persistencia de respuesta al estímulo panorámico (IPP) con el índice de preferencia de objetos (IPO) $R = -0,04$; $p = 0,86$, indicando que las LCDC que redujeron su respuesta más rápidamente frente a un estímulo panorámico no son las mismas que respondieron más a un estímulo barra. B. No hay correlación significativa entre el IPP y el índice de persistencia de respuesta frente a repeticiones del estímulo barra (IPB) $R = -0,03$; $p = 0,49$. Indicando que las LCDC que más sostuvieron su respuesta durante el estímulo panorámico, no son las mismas que las que más sostuvieron su respuesta frente a la presentación repetitiva de una barra.

En función de los resultados obtenidos, no podemos decir que las LCDC tengan una preferencia clara hacia el EB o hacia el EP usados en estos experimentos. Tal falta de preferencia podría implicar que estas neuronas se encuentren relacionadas tanto con el procesamiento de la dirección de movimiento de objetos como del panorama.

Discusión

Los resultados de este capítulo muestran la existencia de elementos neuronales visuales sensibles a la dirección y sentido de movimiento en crustáceos. Las LCDC aquí descritas prácticamente no son sensibles al movimiento en dirección vertical (figuras 28 y 29), lo cual tiene sentido para un animal como *Neohelice*, cuya vida transcurre en un ambiente plano, en el que la mayoría de los movimientos visuales, sean panorámicos generados por los movimiento del propio individuo, como puntuales mayoritariamente protagonizados por el movimiento de conespecíficos, ocurren en direcciones cercanas a la horizontal. Las LCDC son altamente sensibles al movimiento en la dirección horizontal, muestran respuestas excitatorias en un sentido (sentido preferido) e inhibitorias en el otro (sentido nulo). Algunas de las LCDC registradas tuvieron un sentido preferido de movimiento horario y otras antihorario (figura 28).

Respecto de los campos receptivos, es interesante destacar esta característica de las LCDC en contraste con lo que se vio durante la primera parte de esta tesis para las neuronas LG. Al estudiar la respuesta de las LG, vimos que la gran mayoría respondían a estímulos visuales de movimiento tanto del lado ipsilateral como del lado contralateral (figura 13), estas neuronas mostraban en general tener un campo receptivo amplio. Ese fue justamente el atributo de las LG que nos permitió estudiar los procesos de integración binocular del modo en que lo hicimos. En contraposición, las LCDC presentadas en este capítulo mostraron responder sólo en una región restringida del espacio visual (figuras 30 y 32), lo que indica que tienen un campo receptivo más acotado. Además, los centros de estos campos receptivos se ubicaban siempre del lado ipsilateral al registro (figuras 31 y 33). Es decir que no se encontraron neuronas que mostraran tener una respuesta máxima del lado contralateral. De este modo, el conjunto de LCDC de lado izquierdo y derecho del cerebro mapean respectivamente los hemi-campos visuales izquierdo y derecho del animal, por lo que para mapear el campo visual completo es necesaria la información visual proveniente de ambos ojos. Contrariamente a lo que sucede con los mecanismos de estereopsis, que requieren que la información provista por ambos ojos se combine en neuronas binoculares para poder ser computada, los mecanismos de detección de desvíos podrían funcionar sin la necesidad de esa combinación. Es decir, usando información complementaria (y no necesariamente combinada) de ambos ojos.

En la figura 39 se muestra una representación esquemática de los campos receptivos y el sentido preferido de las LCDC registradas con el cangrejo posicionado de frente a los monitores (figura 39A) y con el cangrejo posicionado lateralmente a los

monitores (figura 39B). Cada flecha en la figura representa a una neurona y el sentido de la flecha es su sentido preferido (rojo: horario; azul: antihorario). Las flechas se ubicaron dentro del cuadrante en el cual se localizaba el centro del campo receptivo de cada neurona. En la condición con el cangrejo de frente a los monitores, se registraron la misma cantidad de elementos con uno y otro sentido preferido y todos los elementos registrados (excepto uno) tenían el centro de su campo receptivo desplazado hacia la derecha respecto de la línea media del animal, o sea en posición ipsilateral al lado de registro (figura 39A). Cuando el cangrejo fue estimulado lateralmente (figura 39B), se hallaron el doble de elementos con sentido preferido horario que antihorario. Además, de las neuronas que mostraron tener su campo receptivo en la región postero-lateral, todas tenían dirección preferida en sentido horario.

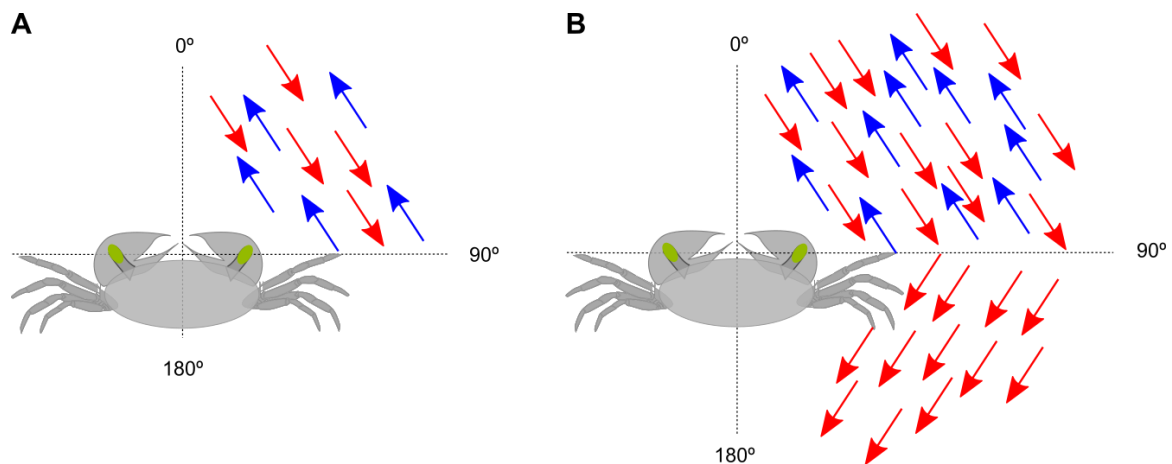


Figura 39. Representación esquemática de las LCDC registradas. Cada flecha representa una LCDC registrada. Las posiciones de las flechas representan aproximadamente la posición en el espacio del centro del CRE de cada LCDC. Las flechas rojas representan neuronas que tuvieron sentido preferido horario y las flechas azules neuronas que tuvieron sentido preferido antihorario. A. LCDC registradas con el cangrejo posicionado de frente a los monitores de estimulación. B. LCDC registradas con el cangrejo posicionado lateralmente a los monitores de estimulación.

Los comportamientos de fijación y seguimiento que realizan los cangrejos pueden tener distintos propósitos. Por un lado los que implican evitación de un predador o persecución de una presa, por otro lado aquellos que implican relaciones sociales como el enfrentamiento de un macho con otro por defensa del territorio o el comportamiento de cortejo hacia una hembra.

Para evitar a sus predadores, los cangrejos fijan su imagen lateralmente que, además de ser para *Neohelice* la zona de mayor resolución del ojo, es la dirección en la que corren de forma más veloz. Cuando un objeto visual se mueve apartándose de la zona lateral, el cangrejo rota su cuerpo de manera de volver a ubicar la imagen del objeto en la posición lateral del ojo (recordemos que los cangrejos no realizan movimiento de fijación a través de movimientos de los ojos). Así, estos animales mantienen fijado a un objeto sobre la región de máxima resolución de su ojo, realizando un continuo ajuste de la orientación de cuerpo respecto a la posición del objeto (figura 8 - Land y Layne, 1995). Investigaciones en curso del laboratorio, muestran que este tipo de mecanismo de fijación y seguimiento se observa también en comportamientos, como por ejemplo el de persecución de presas.

Además de los comportamientos que requieren la fijación del objeto visual en el polo lateral del ojo, los cangrejos despliegan otros comportamientos guiados visualmente que pueden requerir la fijación visual del objeto en el frente del animal. Tomemos el ejemplo de dos machos que se enfrentan. Cuando un cangrejo se aproxima demasiado hacia la cueva en la que reside otro cangrejo, los animales se posicionan frontalmente uno respecto del otro, manteniendo cada uno a su oponente en un punto de fijación justo delante de él, para poder exhibir sus quelas y, en caso de ser necesario utilizarlas en la confrontación. A medida que se desplazan, ambos cangrejos corrigen su orientación respecto del otro, de modo de mantenerse siempre enfrentados. Este tipo de comportamientos, al igual que el de seguimiento de presas, requiere detectar continuamente los desvíos del objeto de un determinado punto. Sin embargo, a diferencia de lo descrito para los comportamientos de evitación y de persecución, en los comportamientos de confrontación el punto de fijación del objeto de interés se encuentra al frente del animal (Land y Layne, 1995).

El comportamiento de fijación y seguimiento visual lateral, relacionado con la respuesta de escape, así como el de fijación visual frontal, relacionado con confrontaciones y cortejo, han sido descritos en el cangrejo violinista *Uca pugilator* (Land y Layne, 1995). Más aun, los mismos autores proponen un modelo teórico acerca de cómo operaría la detección de los desvíos que permiten mantener la fijación. Sin embargo, hasta donde conocemos, no existe ningún estudio experimental de neuronas que puedan funcionar como elementos de detección de desvíos que hayan sido vinculadas estrechamente con algún comportamiento de fijación en ningún animal. Un mecanismo que controle tales conductas debería incluir elementos sensibles a la dirección de movimiento que funcionen como detectores de desvíos con una retroalimentación visual continua de la posición del objeto

visual. Sería esperable que esos elementos orienten su campo receptivo a un lado y otro del centro de fijación y que respondan cuando el objeto se aleja del mismo.

El conjunto de neuronas que registramos y mostramos en este capítulo cumple con esas características, por lo que postulamos que estarían relacionadas con los comportamientos de fijación y seguimiento visual del cangrejo. En el esquema de la figura 39B se ve claramente que hay elementos que responden cuando el objeto se aleja del polo lateral del ojo (90°). Estos están representados por las flechas rojas en la región postero-lateral y por flechas azules en la región antero-lateral. Así, este sistema de neuronas funcionaría como un mecanismo detector de desvíos, de modo que cuando el objeto se aleja del punto de fijación, algunas de estas neuronas responden y de este modo activarían el circuito que en última instancia desencadenaría el comportamiento de rotación para volver a posicionar el objeto de interés en el área de fijación, el polo lateral del ojo (90°).

En *Neohelice*, ha comenzado a estudiarse el comportamiento de captura de presas, realizando experimentos de campo y de laboratorio que consisten en mover una pequeña esfera (o *dummy*) sujeta de un hilo al ras del suelo. Los cangrejos interpretan a ese estímulo como una potencial presa y en muchos casos la persiguen hasta atraparla. En videos obtenidos de estos experimentos, se observa que cuando el animal detecta el movimiento de la presa, corre detrás de ella persiguiéndola de costado, es decir fijando su posición en el polo lateral de uno de sus ojos. Una vez que se encuentra cerca de la presa, *Neohelice* rota posicionándose de frente a ella para atraparla con sus quelas. Esta última fase del comportamiento de captura sugiere la existencia de un segundo punto de fijación, que en este caso se ubicaría en posición frontal (observaciones preliminares de experimentos actualmente en curso en el laboratorio, aún no publicados).

Además de las neuronas que responden cuando el animal ve un objeto que se aleja del polo lateral del ojo, también registramos algunas neuronas que tienen su campo receptivo orientado hacia la región anterior y que responden cuando el objeto se acerca hacia el polo lateral del ojo (flechas rojas en la parte superior de las figuras 39A y B). Es entendible que del otro lado del cerebro, en el lóbulo óptico contralateral, existan elementos especulares a los que registramos, que tengan su campo receptivo orientado antero-lateralmente y su dirección preferida sea también desde anterior hacia posterior. Esto nos conduce a proponer la existencia de un segundo sistema de seguimiento visual con su punto de fijación situado en posición frontal (0°), constituido por elementos que responden cuando el objeto se aleja de esa posición hacia la izquierda o hacia la derecha. Este sistema podría ser utilizado para llevar a cabo aquellos comportamientos que requieren la fijación del objeto en la parte frontal del campo visual.

En resumen, los resultados expuestos en este capítulo nos permiten proponer una hipótesis, que consiste en la existencia de dos mecanismos independientes de fijación y seguimiento visual de objetos que funcionarían de modo secuencial durante el comportamiento de captura de presas en *Neohelice granulata*:

- El primero, que tiene su punto de fijación en el polo lateral del ojo (90°) estaría compuesto de elementos neuronales que responden con una alta frecuencia de PA cuando el objeto se aleja hacia adelante o hacia atrás de ese punto de fijación. En la figura 39B, este sistema estaría representado por las flechas azules entre 0° y 90° y por las flechas rojas entre 90° y 180° . Cada vez que el objeto se aleja del polo lateral de uno de los ojos, las neuronas de este sistema desencadenarían el reposicionamiento del cangrejo respecto del objeto, para volver a ubicarlo en el punto de fijación.

- El segundo sistema, entraría en funcionamiento una vez que el cangrejo se encuentra bastante cerca de su presa, o en las situaciones de confrontación con otro cangrejo descriptas más arriba. Este mecanismo tiene su punto de fijación justo por delante, en la línea media del animal (0°) y estaría compuesto en el lado izquierdo y derecho del cerebro, por elementos neuronales que responden con una alta frecuencia de PA cuando el objeto se aleja hacia la izquierda o hacia la derecha, respectivamente, de ese punto de fijación. En la figura 39AB, este sistema estaría representado por las flechas rojas entre 0° y 90° . Cada vez que el objeto se aleja de la línea media del cangrejo, éste reposiciona su cuerpo de manera de volver a fijar el objeto frente a sus ojos. Así, el animal finalmente ataca a su presa o confronta a su oponente con ambas quelas.

Según la hipótesis propuesta, la activación de ambos sistemas conduciría a la ejecución de los movimientos de rotación que permiten compensar los desvíos detectados, reubicando al objeto en uno de los dos puntos de fijación (0° o $\pm 90^\circ$), de acuerdo al comportamiento en cuestión. Para que estos sistemas sean efectivos, deben tener una retroalimentación continua de la información visual que reciben. Dado que el animal permanentemente debe corregir su posición respecto del estímulo, las neuronas que comanden dicho comportamiento no deberían reducir su tasa de disparo mientras el comportamiento de fijación y seguimiento visual continúe. Cuando estimulamos de manera repetitiva a las LCDC (figura 34), vimos que estas neuronas, prácticamente no reducían su intensidad de respuesta a través de las repeticiones del estímulo. Este resultado también constituye una evidencia en favor de la hipótesis propuesta.

Respecto del procesamiento del flujo óptico, no fue posible establecer una generalidad en cuanto a la preferencia de las LCDC por un estímulo panorámico o por un estímulo puntual. Algunas de ellas mostraron respuestas robustas y consistentes tanto a uno como a otro tipo de estímulo, otras mostraron preferencia por alguno de ambos. Sin embargo, el hecho de que todas respondan al EB con un campo receptivo acotado y en distintas posiciones para las distintas unidades registradas, indica que seguramente están codificando, además de la dirección de movimiento, la posición del objeto en el espacio visual. Es posible que dentro del grupo de neuronas direccionales que registramos puedan existir sub-tipos con distintas propiedades de procesamiento. Para investigarlo será necesario realizar experimentos variando distintos parámetros de los estímulos visuales, como el tamaño, la velocidad, la posición en la que se presentan, etc.

Recientemente se han realizado experimentos comportamentales en *Neohelice* con el fin de estudiar su respuesta optomotora. Para eso se utilizaron estímulos panorámicos del mismo tipo que los que utilizamos en esta tesis. Los resultados de esos experimentos mostraron que la respuesta optomotora era más intensa cuando los animales veían el estímulo con un solo ojo y además el estímulo se movía en sentido antero-posterior respecto de ese ojo. Es decir, cuando el animal veía el estímulo con el ojo derecho, el sentido de movimiento que evocaba mayores respuestas comportamentales era el sentido horario, en cambio cuando el ojo que veía era el izquierdo, las respuestas más intensas se evocaban con estímulos moviéndose en sentido anti-horario (Barnatan, 2017). Esos resultados, permitieron proponer la hipótesis de que las neuronas encargadas de procesar la información visual del flujo óptico panorámico en *Neohelice*, presentarían un único sentido preferido de movimiento en cada lóbulo óptico (en ambos, el sentido retrógrado). Los resultados mostrados en este capítulo sugieren que algunas de las LCDC registradas parecerían procesar la información del flujo óptico ya que tienen una respuesta que se sostiene con alta intensidad a lo largo de 15 segundos de estimulación. Si bien no fue posible clasificar del conjunto de neuronas cuales participarían de esa función, la observación de que 5 de las 6 LCDC que más sostienen su respuesta frente al estímulo panorámico tengan sentido preferido retrógrado, apoya la hipótesis propuesta en base a los resultados comportamentales de Barnatan.

Capítulo 4: Caracterización morfológica de las LCDC.

Introducción

1. La lóbula de *Neohelice granulata*

Las distintas LCDC que se caracterizaron en esta tesis, mostraron tener grandes arborizaciones en la lóbula, por tal motivo en primer lugar se realizará una breve descripción de este neuropilo.

La neuroarquitectura de la lóbula de *Neohelice* se conoce con bastante detalle. En este neuropilo, los distintos tipos celulares tienen sus procesos tangenciales en distintas orientaciones: o bien a lo largo del eje anteroposterior, o bien sobre el eje lateromedial. Por ese motivo cuando se observa un corte histológico de la lóbula su apariencia es diferente según la orientación de la sección. Si la sección es transversal se observan cuatro estratos de procesos tangenciales orientados lateromedialmente. De la periferia al centro, estos estratos se conocen como las capas lateromediales tangenciales primera a cuarta (LMT1 a 4, figura 40A y C) (Sztarker et al., 2005). Estas capas están separadas por regiones que contienen arborizaciones de elementos columnares e interneuronas locales, así como procesos de las grandes neuronas tangenciales que corren anteroposteriormente. LMT1 y LMT4 poseen procesos relativamente finos, mientras que LMT2 y LMT3 contienen fibras tangenciales largas, de diámetro ancho que aumentan en grosor hacia el lado medial de la lóbula. Tinciones intracelulares confirmaron que es en esas dos capas en donde se extienden los procesos dendríticos de las LG biestratificadas (Medan et al., 2007). Por otro lado, si se observa un corte de sección longitudinal de la lóbula se observan 5 estratos compuestos por procesos tangenciales orientados anteroposteriormente. De la periferia al centro se denominan capas tangenciales anteroposteriores (APT1 a 5, figura 40B y D) (Sztarker et al., 2005).

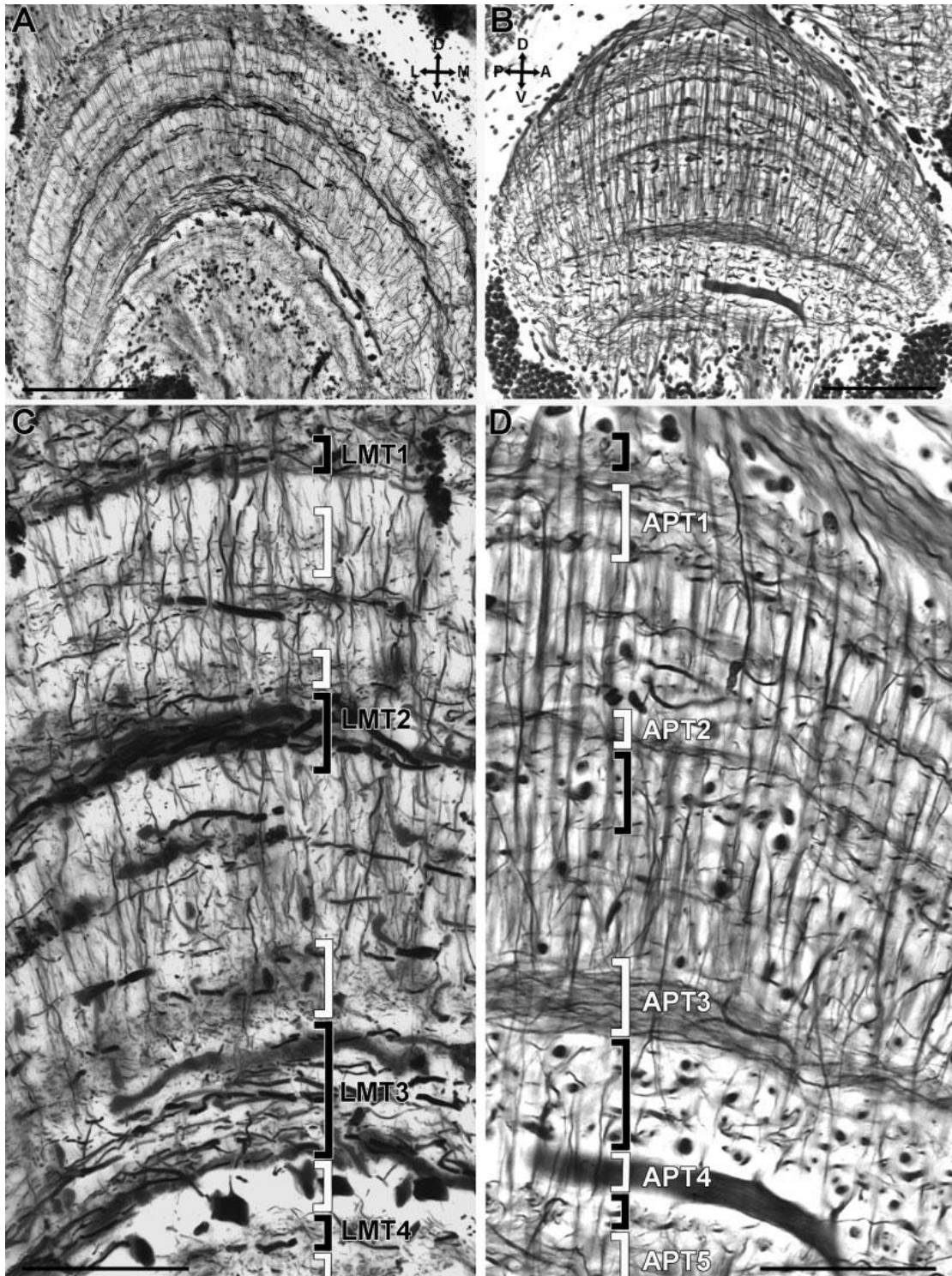


Figura 40. Neuroarquitectura de la lóbula. Secciones transversal (A) y longitudinal (B) de la lóbula (12 μ m) teñidas con la técnica de Bodian. C y D son magnificaciones de A y B respectivamente. Las secciones transversales muestran cuatro estratos (corchetes negros) que incluyen procesos tangenciales lateromediales, nombrados LMT1 a 4. Los estratos lateromediales están separados por niveles intermedios que consisten en procesos colaterales y tangenciales de elementos columnares y de procesos tangenciales que se extienden ortogonalmente que se aprecian como bandas grises formadas por los perfiles de axones de diversos tamaños seccionados transversalmente (corchetes blancos en C). Estos procesos tangenciales se observan en los cortes longitudinales donde definen 5 estratos anteroposteriores (APT1 a 5). Imagen tomada de Sztarker et al., 2005.

2. La *lobula plate* y el complejo lobular de *Neohelice granulata*

La mayoría de las LCDC que pudieron ser caracterizadas morfológicamente mostraron una rama que proyectaba directamente hacia la *lobula plate*. En algunos casos se observaron arborizaciones en la misma, por tal motivo describiremos brevemente dicho neuropilo.

La *lobula plate* ha sido estudiada en detalle en insectos Dípteros (ej.: Hausen, 1982; Borst y Egelhaaf, 1989; Krapp et al., 2001; Borst y Haag, 2002). Su importancia funcional reside principalmente en el procesamiento de la direccionalidad del flujo óptico que se produce sobre la retina como consecuencia de movimientos egocéntricos. La *lobula plate* es un neuropilo de forma alargada y chata en el que se definen 4 capas. Se ha demostrado que las neuronas que arborizan en cada una de las capas responden al movimiento en una de las cuatro direcciones cardinales (Buchner et al., 1984).

Dentro de la *lobula plate* de la mosca se han descrito cerca de 60 tipos de LPTC (*lobula plate tangential cells*). Estas son neuronas de campo receptivo amplio que colectan retinotópicamente información de las neuronas columnares y su rol funcional se relaciona directamente con el control del curso de navegación durante el desplazamiento del animal. Cada LPTC se ramifica específicamente en una de las cuatro capas y por lo tanto es sensible a una dirección de movimiento en particular. Las HS son sensibles al movimiento horizontal y las VS son sensibles al movimiento vertical (Borst y Haag, 2002).

En crustáceos, históricamente se pensaba que las neuronas columnares de la médula sólo proyectaban hacia la lóbula, pero en las últimas décadas se describieron conexiones hacia un pequeño neuropilo, que se plantea homólogo a la *lobula plate* de insectos, en varios grupos de crustáceos malacostracos (Strausfeld, 1998, 2005; Sinakevitch et al., 2003; Sztarker et al., 2005; Harzsch y Hansson, 2008). Más recientemente se realizó una descripción detallada de su neuroarquitectura y su retinotopía en *Neohelice granulata* (Bengochea et al., 2018). En la figura 41 se puede observar su posición relativa dentro del pedúnculo ocular. La *lobula plate* de los cangrejos consiste en un pequeño neuropilo alargado. En el eje dorsoventral se encuentra localizada a la misma altura que la lóbula, junto al extremo medial anterior de la misma (figura 41a, b y c). El aspecto general del neuropilo es diferente en uno y otro eje: en el plano lateromedial (figuras 41d y e), muestra un aspecto bastante uniforme, mientras que en el plano anteroposterior se observa una simetría bilateral (figura 41f). Cada una de las mitades presenta distintas capas en donde arborizan neuronas tangenciales, que se pueden observar en las figuras 41e y f (flechas amarillas). La *lobula plate* está conectada con la lóbula a través de un haz de procesos

columnares delgados (figura 41d y e, puntas de flechas amarillas) y con la médula a través de otro haz (figura 41f punta de flecha).

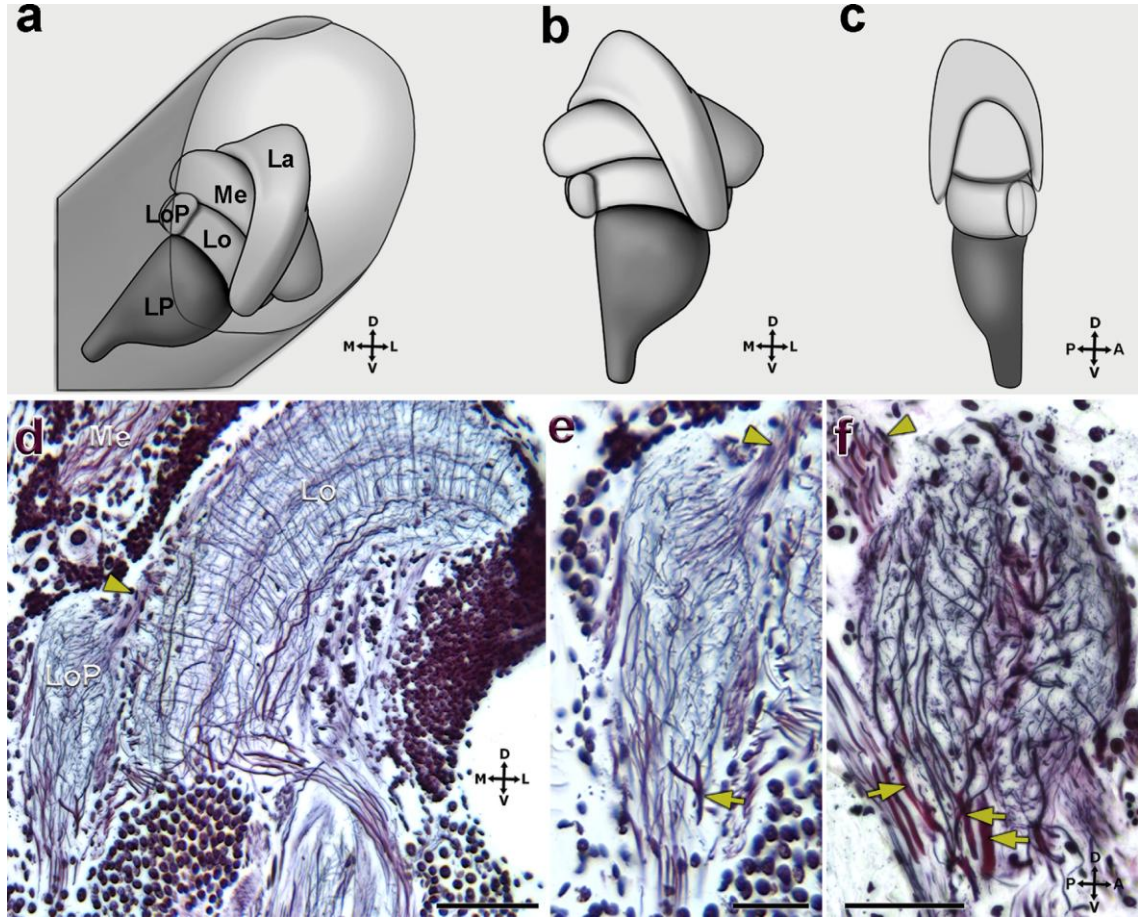


Figura 41. Características generales de la lobula plate de cangrejos. A. Esquema que representa la vista anterior de un pedúnculo izquierdo de *Neohelice granulata* en su posición natural. La organización de los neuropilos ópticos dentro del pedúnculo ocular se ve por transparencia (B, C). Para simplificar las descripciones el ojo se considera en posición vertical. B. Vista anterior. C. Vista medial. La lobula plate se localiza en una posición anterior medial. D. Sección transversal teñida con Bodian (12 μ m) de la lóbula y lobula plate del cangrejo *Hemigrapsus sanguineus*. E. Magnificación de D que muestra en detalle la lobula plate. En esta vista transversal el neuropilo presenta un aspecto uniforme. Las puntas de flecha señalan los tractos que conectan con la lóbula. Sección longitudinal teñida con Bodian (12 μ m) de la lobula plate de *Neohelice granulata*. En esta vista anteroposterior la lobula plate muestra una aparente simetría bilateral compuesta por dos mitades y una estructura central. La punta de flecha señala los tractos que conectan con la médula. Las flechas señalan ejemplos de neuronas tangenciales que se ven en E y F. La, lámina; Me, médula; Lo, lóbula; LoP: lobula plate; LP, Protocerebro lateral. Barras de escala: 50 μ m en D, F; 25 μ m en E. Imagen tomada de Bengochea et al., 2018.

Materiales y métodos

1. Caracterización y reconstrucción morfológica

De las 51 neuronas que fueron registradas e identificadas como neuronas direccionales cuya fisiología se describió en el capítulo anterior, se pudieron teñir 15, aunque varias de ellas de modo parcial. Como se describió en la parte de métodos, una vez caracterizadas fisiológicamente, se inyectaron con neurobiotina y luego se revelaron con streptavidina acoplada a algún fluoróforo. Debido a que la molécula de neurobiotina es pequeña, algunas veces atraviesa gap junctions, de modo que si dos neuronas están acopladas eléctricamente entre sí, al inyectar una de ellas es probable que se co-tiña la neurona vecina.

Utilizamos el software Neurolucida para realizar las reconstrucciones de la morfología neuronal. La reconstrucción utilizando este programa consiste en tomar un conjunto de imágenes seriadas obtenidas con el microscopio confocal de un preparado e ir calcando la neurona en cada una de las imágenes, de esta forma se obtiene una reconstrucción tridimensional de la o las neuronas teñidas. Cuando se trataba de un preparado en el que se marcó más de una neurona por co-tinción, algunas veces no era evidente a qué neurona pertenecía un determinado proceso neurítico. En esos casos, la observación de varias tinciones de un mismo tipo de neurona, en conjunto con la visualización de las reconstrucciones tridimensionales nos permitió resolver la morfología de los distintos tipos neuronales. Por otro lado, la reconstrucción tridimensional de las neuronas también permitió determinar las posiciones relativas respecto a los distintos neuropilos.

Resultados

1. Caracterización morfológica.

Las figuras 42, 43 y 44 muestran a modo de ejemplo tres reconstrucciones de neuronas LCDC. El análisis de los distintos preparados en conjunto con la reconstrucción de estos reveló que la totalidad de las LCDC teñidas tienen en común las siguientes características:

- El árbol dendrítico se extiende por la capa LMT1 de la lóbula (figura 42A, B). En la figura 42A, se muestra una proyección en el eje z de imágenes confocales obtenidas de un lóbulo óptico escaneado en toda su profundidad. Debido a que la neurona arboriza en la capa más superficial de la lóbula y a que la superficie de ese neuropilo es curva tanto en el eje anteroposterior como en el eje lateromedial, al observar la proyección completa parece que la neurona se extiende sobre casi todas las capas de la lóbula. Sin embargo, en la figura 42B se muestra un subconjunto de las imágenes confocales proyectadas y se puede observar con claridad que la neurona arboriza sólo en la capa más superficial (LTM1).
- El árbol dendrítico que arboriza en LTM1 consiste en una neurita primaria que está orientada en el eje antero posterior (terminando hacia el extremo anterior) que da origen a varias neuritas secundarias que corren perpendiculares a ésta y que por lo tanto están orientadas en el eje lateromedial dentro de la capa LMT1 de la lóbula. Las neuritas secundarias progresan afinándose hacia el extremo lateral. Esto se observa con claridad en las vistas dorsales de las figuras 42D y 44D.
- La neurita principal desciende por el extremo posterior de la lóbula hacia el protocerebro lateral. Todas las LCDC que se tiñeron mostraron tener marcadas arborizaciones en una estructura ovoide bien delimitada del protocerebro lateral que se encuentra ubicada posteriormente, muy superficial y más cerca del extremo medial que del lateral (figuras 42, 43 y 44). Esta estructura, que no se encuentra descrita en *Neohelice* ni en otros crustáceos, es de especial interés ya que estaría integrando la información proveniente de un conjunto de neuronas direccionales. Por tal motivo el capítulo 5 estará dedicado especialmente al estudio de la morfología de este núcleo. Por ahora sólo mencionaremos que, por su estructura, muy probablemente se trata de un glomérulo óptico que integra información sobre la dirección de movimiento.
- En la mayoría de las tinciones realizadas se observaron proyecciones que se dirigían directamente hacia la *lobula plate*. En algunos casos también se observaron arborizaciones en la misma (figuras 43 y 44). El hecho de que casi siempre haya proyecciones hacia la *lobula plate* aunque no siempre se vean

arborizaciones, sugiere que algunas veces la marcación de la neurona pudo haber sido incompleta. Dado que estas neuronas mostraron tener arborizaciones dendríticas tanto en la lóbula como en la *lobula plate* decidimos llamarlas Neuronas Direccionales del Complejo Lobular o en inglés *Lobula Complex Directional Cell* (LCDC).

- Todas las LCDC que marcamos parecen ser neuronas locales, es decir que ninguna mostró proyecciones que desciendan por el protocerebro lateral y que salgan del lóbulo óptico como suele verse en las LG. Aparentemente, estas neuronas interconectan la lóbula con la *lobula plate* y el glomérulo ovoide del protocerebro sin salir del lóbulo óptico.

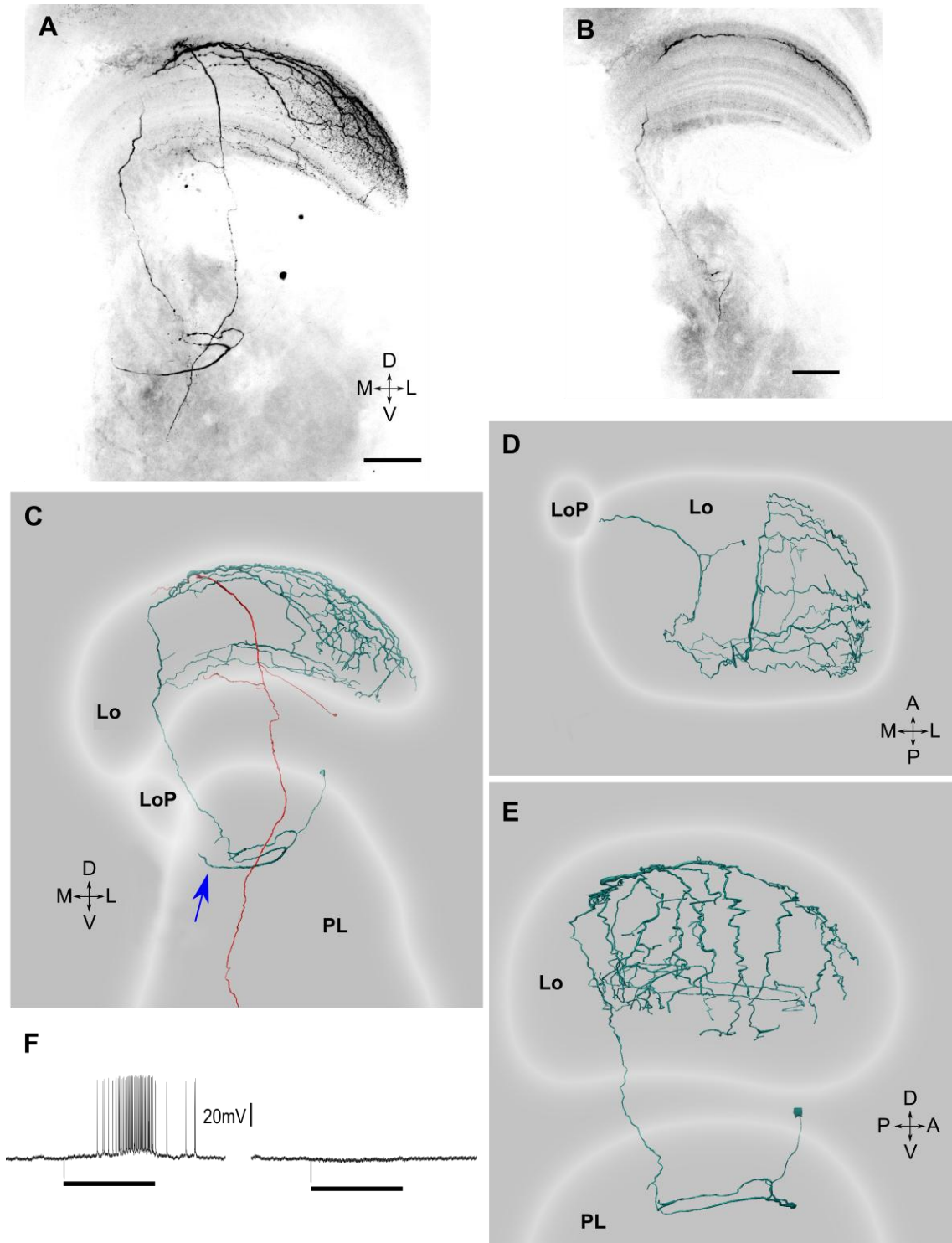


Figura 42. Ejemplo representativo de reconstrucción de una LCDC1. A. Proyección de una serie de imágenes confocales de una neurona direccional teñida con neurobiotina. Debido a que la lóbula tiene una superficie curva tanto en el eje anteroposterior como en el eje lateromedial, y a que la neurona arboriza en LMT1 (bien superficial), las arborizaciones parecerían penetrar en el interior de la lóbula. Sin embargo eso se debe al efecto de proyectar toda la serie de imágenes confocales B. Proyección de un subconjunto de las imágenes confocales mostradas en A en donde se puede apreciar que las arborizaciones tangenciales están sólo en la capa LMT1. C, D y E. Vista posterior, dorsal y lateral, respectivamente, de la reconstrucción tridimensional en NeuroLucida para la tinción que se muestra en A. Debido a la presencia de dos somas y a la comparación de varios preparados, se

pudo determinar que corresponde a la co-tinción de dos neuronas: una LCDC (cyan) y una neurona columnar que desciende atravesando la lóbula y el protocerebro lateral (rojo). La neurona columnar sólo se muestra en C. Notar en la LCDC la rama que sale del protocerebro haciendo una curva abrupta y dirigiéndose hacia anterior y medial, en donde se encuentra la *lobula plate* (flecha azul). En D se observa la disposición de la arborización de la lóbula: una neurita principal atraviesa la lóbula por su eje anteroposterior dando origen a neuritas secundarias que corren, paralelas entre sí sobre el eje lateromedial. Lo: lóbula, LoP: *lobula plate*, PCL: protocerebro lateral. M: medial, L: lateral, A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral. Escala: 100µm. F. Respuestas electrofisiológicas registradas de la neurona teñida y reconstruida frente a una barra moviéndose en sentido preferido y nulo, respectivamente.

Como se mencionó, todas las neuronas teñidas que se pudieron analizar compartían las características que se detallaron. Sin embargo, también se observaron algunas diferencias entre distintas LCDC, lo cual nos permitió realizar una clasificación de las mismas en al menos dos grupos morfológicos:

El primero, que llamaremos LCDC1, se encuentra ejemplificado en las figuras 42 y 43. Las neuronas de este subtipo tienen el soma posicionado justo por encima del protocerebro lateral, ubicado aproximadamente en el centro del eje lateromedial, levemente desplazado hacia el extremo lateral. Desde el soma se prolonga una neurita hacia la parte medial que se bifurca. Una de las ramas hace una curva abrupta hacia la zona anterior y proyecta hacia la *lobula plate* (figuras 42D y 43B), en donde algunas veces se observaron ramificaciones (figura 43B). La otra rama se dirige hacia el glomérulo óptico en donde se ramifica en pequeños procesos que luego salen del glomérulo en dirección dorsal y vuelven a convergir (anastomosis, flechas verdes en la figura 43), dirigiéndose hacia la lóbula en donde arborizan como ya se describió previamente. Siempre que se marcó este tipo morfológico se observó que también se teñía además un elemento columnar con el cual hacía contacto en LMT1 y que descendía por el protocerebro lateral, dirigiéndose hacia el nervio óptico. Esta neurona columnar se encuentra representada en rojo en la figura 42C, su soma se encuentra localizado superficialmente por debajo de la lóbula. La co-tinción de estos dos elementos en 3 preparados sugiere que probablemente se encuentran acoplados eléctricamente.

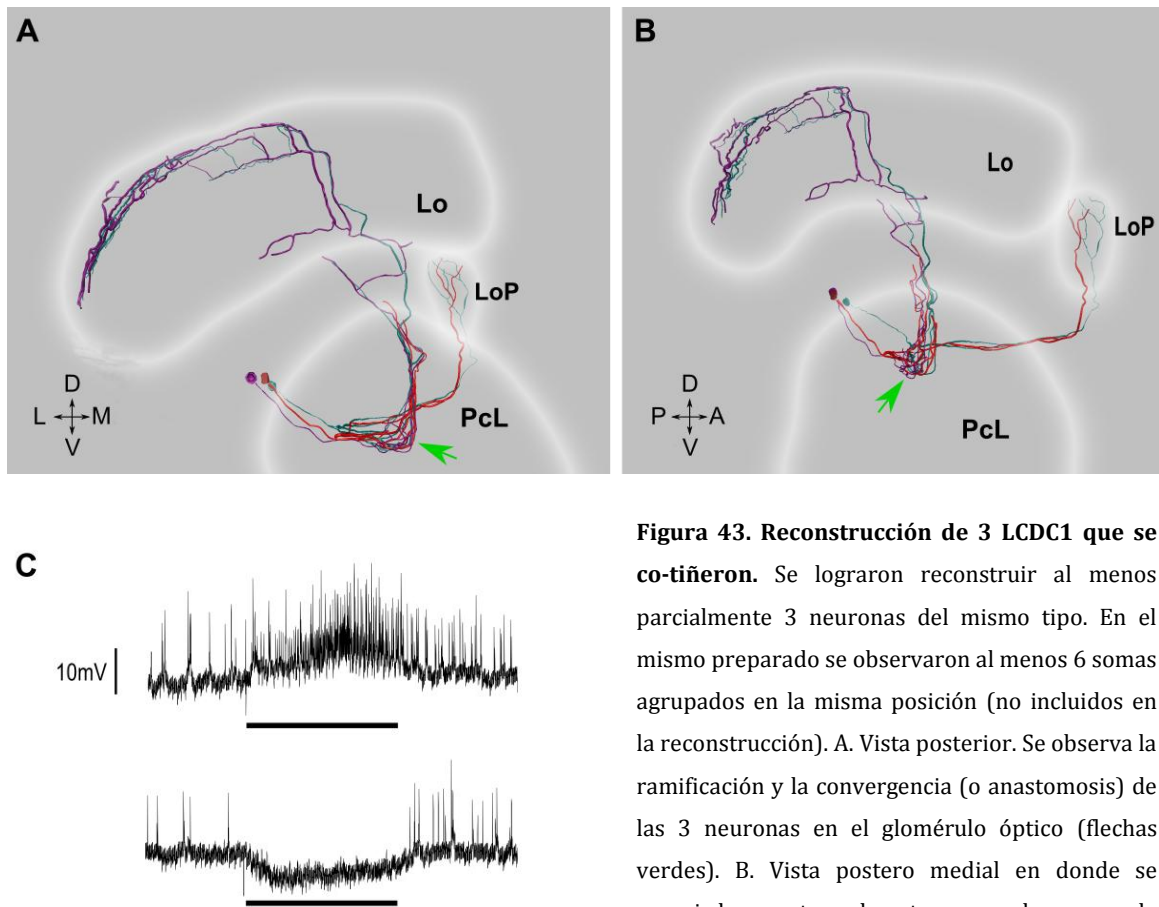


Figura 43. Reconstrucción de 3 LCDC1 que se co-teñieron. Se lograron reconstruir al menos parcialmente 3 neuronas del mismo tipo. En el mismo preparado se observaron al menos 6 somas agrupados en la misma posición (no incluidos en la reconstrucción). A. Vista posterior. Se observa la ramificación y la convergencia (o anastomosis) de las 3 neuronas en el glomérulo óptico (flechas verdes). B. Vista postero medial en donde se aprecia la curvatura abrupta que conduce a una de las ramas de estas neuronas hacia la *lobula plate*.

Lo: lóbula; LoP: *lobula plate*; PcL: protocerebro lateral. D: dorsal, V: ventral, L: lateral, M: medial. C. Respuestas electrofisiológicas registradas de la neurona teñida y reconstruida frente a una barra moviéndose en sentido preferido y nulo, respectivamente. En los registros se observan distintos tamaños de PA, probablemente correspondientes a cada una de las neuronas del mismo tipo co-teñidas.

El segundo de los subtipos, LCDC2, se encuentra ejemplificado en la figura 44. En este caso, el soma está posicionado superficialmente en el extremo medial del protocerebro lateral, justo por debajo de la *lobula plate*. La neurita que sale del soma se bifurca casi inmediatamente dando origen por un lado a unos procesos delgados que van hacia la *lobula plate* y por otro a una rama de mayor calibre que luego vuelve a bifurcarse. Una de las ramas originadas de esta última bifurcación se dirige posteriormente hacia el glomérulo óptico en donde se ramifica masivamente (figura 44B). La otra sube hacia el primer estrato de la lóbula en donde arboriza como se describió anteriormente.

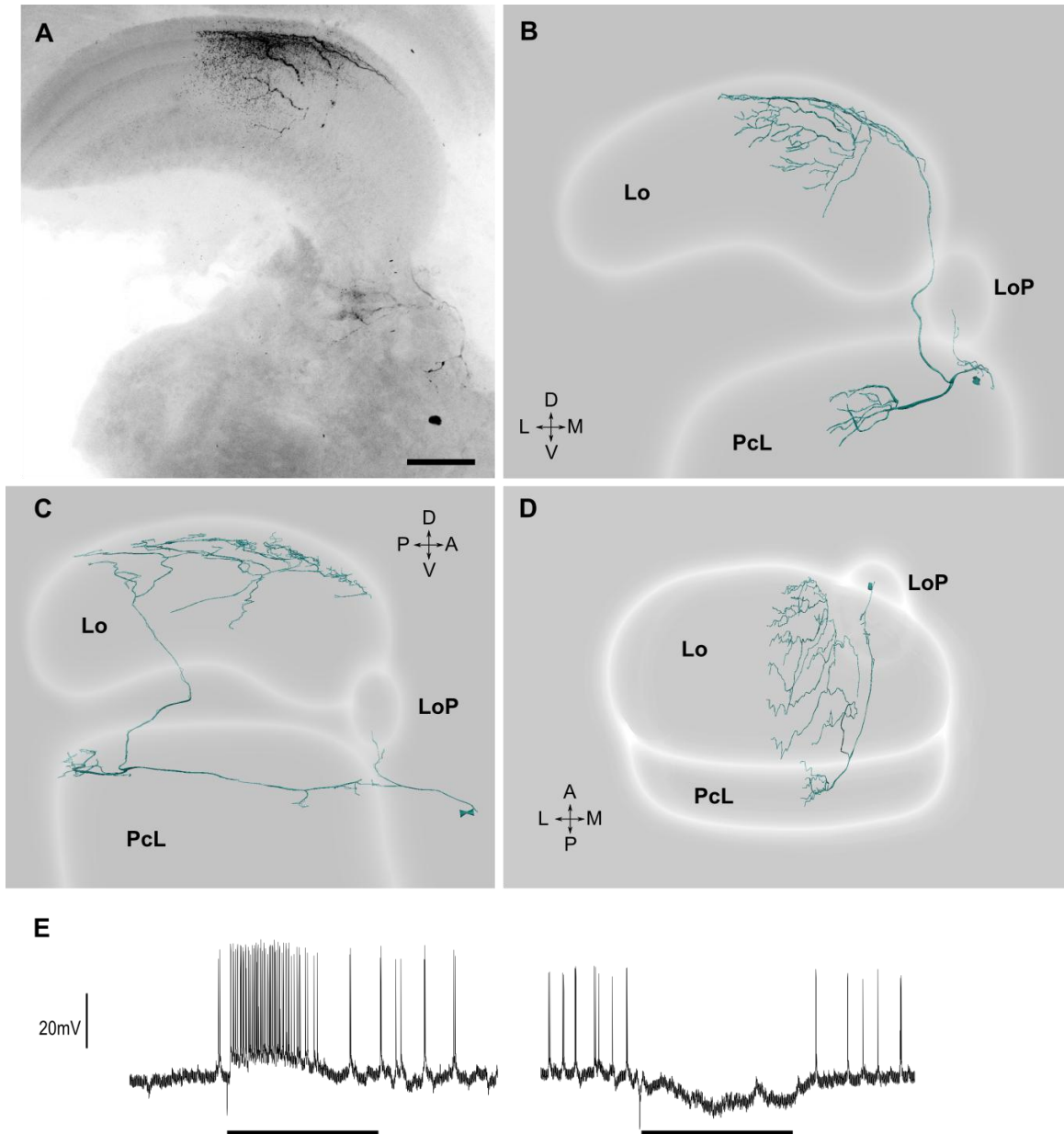


Figura 44. Ejemplo representativo de reconstrucción de una LCDC2. A. Proyección de un taco de imágenes confocales de una neurona direccional teñida con neurobiotina. B, C y D. Vista posterior, lateral y dorsal, respectivamente, de la reconstrucción tridimensional en Neurolucida para la tinción que se muestra en A. El soma se encuentra posicionado en la parte medial al protocerebro lateral, por debajo de la *lobula plate*. Lo: lóbula, LoP: *lobula plate*, PcL: protocerebro lateral D: dorsal, V: ventral, L: lateral, M: medial, A: anterior, P: posterior. Escala: 100µm. E. Respuestas electrofisiológicas registradas de la neurona teñida y reconstruida frente a una barra moviéndose en sentido preferido y nulo, respectivamente.

De los 15 preparados que se lograron teñir, en 12 se tiñeron neuronas que pudieron ser clasificadas en uno de los dos tipos descriptos. Tres de los preparados mostraron neuronas que pertenecían al tipo LCDC1 (en uno de los casos, el de la figura 43, se co-

tiñeron varias de este tipo) y 9 al tipo LCDC2. Cuando observamos las respuestas fisiológicas de cada una de ellas encontramos que los tres preparados en los que se tiñeron neuronas que pertenecían al tipo LCDC1, tenían el campo receptivo fisiológico orientado hacia adelante y sentido preferido horario o antihorario. Las nueve neuronas que pertenecían al tipo LCDC2, tenían el campo receptivo fisiológico orientado lateralmente hacia adelante o hacia atrás. Dentro de este tipo también se observaron tanto neuronas con sentido preferido horario como antihorario, sin que la preferencia por cada sentido estuviese correspondientemente relacionada con la región lateral-posterior y la región lateral-anterior, lo que hubiese sugerido fuertemente que el tipo particular de las LCDC2 forman el sistema de detección de desvíos lateral. Excepto por la orientación del campo receptivo, no se pudieron detectar otras diferencias en la respuesta fisiológica que tuvieran alguna correspondencia con los dos tipos morfológicos descritos, de modo que no fue posible establecer que los distintos tipos morfológicos tuvieran distintos roles funcionales.

2. Correspondencia entre ubicación del árbol dendrítico y área del campo receptivo.

En el capítulo 3 se observó que cada una de las LCDC registradas procesaba individualmente un sector restringido del espacio visual. Además, las marcaciones de las distintas neuronas mostraron una neurita principal que cruzaba anteroposteriormente la lóbula. Una observación más meticulosa de los preparados revela que, en distintas neuronas, esa neurita principal atraviesa la lóbula en distintas posiciones a lo largo del eje lateromedial. Estas dos observaciones en conjunto plantean la posibilidad de que exista una correspondencia entre la posición de la neurita principal en la lóbula y la ubicación del campo receptivo de la LCDC. En otras palabras, buscamos investigar si, como se demostró previamente para las neuronas MLG1 del cangrejo (Medan et al., 2015), existe una equivalencia entre las posiciones de los campos receptivos anatómicos y los campos receptivos funcionales de las LCDC.

La figura 45 muestra tres ejemplos de correspondencia. En la figura 45A se muestra la posición en la que se encontraba el cangrejo respecto de los monitores de estimulación. En la figura 45B vemos la proyección de imágenes confocales de la lóbula de 3 preparados en los que se marcó una LCDC. La línea punteada en cada una de las tres imágenes muestra la posición de la neurita principal que, aunque debido a la curvatura de la superficie de la lóbula la neurita pareciera descender, atraviesa la lóbula desde el extremo posterior hasta el anterior por la capa más superficial de la lóbula (LTM1).

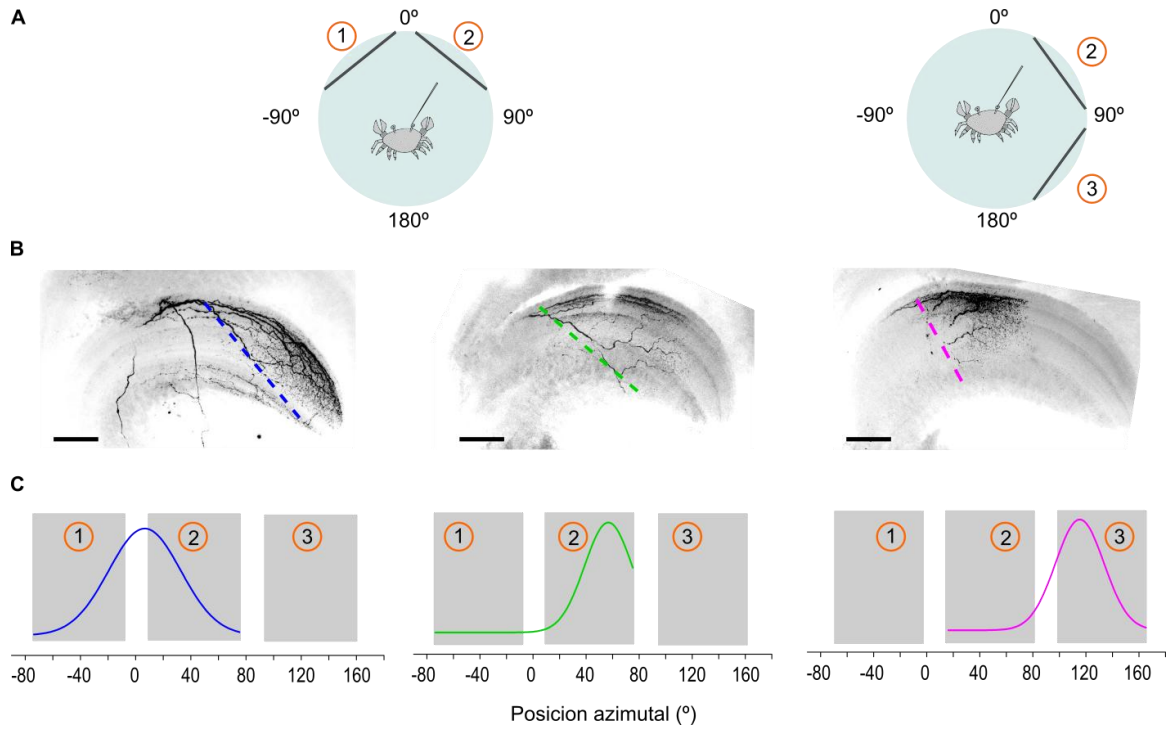


Figura 45. La posición de la neurita principal de las LCDC en el eje lateromedial de la lóbula codifica el eje azimutal. Ejemplos de tres neuronas que fueron caracterizadas fisiológicamente y luego teñidas con neurobiotina. A. Esquema de la posición del cangrejo en el dispositivo de estimulación. Para los primeros dos ejemplos los estímulos se presentaron en dos monitores que estaban frente al animal. Para el tercer ejemplo los estímulos se presentaron en dos monitores que estaban posicionados al costado del animal. B. Proyecciones sumadas en z de una serie de imágenes confocales para 3 neuronas diferentes teñidas. En línea punteada se indica la posición de la neurita principal que atraviesa la lóbula en el eje anteroposterior. Escala: 100 μ m. C. Ajustes Gaussianos del CRE de cada una de las neuronas en B, en respuesta a una barra que se mueve en la dirección preferida de cada neurona. Los paneles grises 1, 2 y 3 refieren a la posición de presentación de la barra indicada en A. En el primer ejemplo, la neurita principal cruza la lóbula lateralmente y el campo receptivo de la neurona está orientado frontalmente. En el segundo ejemplo, la neurita principal cruza por el centro de la lóbula y el campo receptivo está orientado lateral y anteriormente. En el tercer ejemplo, la neurita principal cruza la lóbula medialmente y el campo receptivo está orientado lateral y posteriormente.

La figura 45C muestra la posición del campo receptivo para cada una de las neuronas teñidas, los números hacen referencia a los monitores de estimulación (figura 45A). De izquierda a derecha se observa que la neurona representada en azul tiene su árbol dendrítico posicionado lateralmente y su campo receptivo fisiológico es frontal (cerca de 0°). La neurona representada en verde, muestra un árbol dendrítico cruzando por el medio de la lóbula y su campo receptivo fisiológico es lateral (alrededor de 90°). Finalmente, la neurona representada en magenta muestra arborizaciones dendríticas desplazadas hacia el lado medial y su campo receptivo fisiológico es lateral-posterior (cerca de 120°). De las 15 LCDC que marcamos, en 10 de ellas la posición de la neurita principal y del árbol dendrítico en la lóbula fue clara. En todas ellas, al comparar la localización del árbol dendrítico con la

posición de su campo receptivo fisiológico, hallamos una correspondencia: las neuronas que mostraron tener su árbol dendrítico hacia el extremo lateral tenían su campo receptivo orientado hacia el frente del animal (posición que corresponde a los 0° en el eje azimutal), mientras que aquellas que mostraron un árbol dendrítico cubriendo la zona central de la lóbula o aún más medialmente, tenían su campo receptivo orientado hacia el polo lateral del ojo (posición que corresponde a los 90°) o incluso hacia atrás de éste.

En estudios previos, se caracterizó la disposición del mosaico retinotópico desde la retina hasta la lóbula de *Neohelice*. Como se detalló en la introducción general (figura 5), hay dos quiasmas en el lóbulo óptico, uno entre la lámina y la médula y otro entre la médula y la lóbula. El primer quiasma, es un entrecruzamiento en sentido lateromedial de las proyecciones columnares que transcurren entre la lámina y la médula (sin entrecruzamiento anteroposterior). El segundo quiasma ocurre entre médula y lóbula y consiste de un entrecruzamiento de las proyecciones columnares en sentido anteroposterior (sin entrecruzamiento lateromedial). Por lo tanto, los resultados obtenidos mostraron ser coincidentes con la retinotopía descrita previamente para *Neohelice* (Berón de Astrada et al., 2011; Medan et al., 2015), permitiéndonos afirmar que las LCDC, además de procesar información de la dirección y sentido de movimiento de un objeto, forman en la primer capa de la lóbula un mapa retinotópico de la posición del objeto en el espacio visual.

Discusión

La *lobula plate*, como se mencionó anteriormente, ha sido descrita en insectos dípteros. Su principal función conocida es la del procesamiento del flujo óptico del panorama visual durante la navegación. Este procesamiento es llevado a cabo a través de neuronas altamente sensibles a la dirección y sentido de movimiento, las LPTC (ej.: Borst y Haag, 2002). En crustáceos, por otro lado, se ha encontrado una pequeña estructura que se asume homóloga a la *lobula plate* (Sztarker et al., 2005; Bengochea et al., 2018). Algunos autores sugieren que debido a su pequeño tamaño no es posible que en su retinotopía esté representado todo el campo visual, como sí ocurre en la *lobula plate* de insectos. Debido a que hasta el momento no existen registros fisiológicos de las neuronas de este neuropilo, la interpretación que propone su homología con la *lobula plate* de insectos, es aún motivo de debate (Thoen et al., 2018).

Los resultados de esta tesis muestran que algunas de las LCDC responden de manera claramente sostenida al flujo óptico panorámico (figura 35), además esa respuesta tiene un aspecto muy similar a la de las LPTC de insectos dípteros frente al mismo tipo de estímulo.

Por otro lado el estudio de su morfología reveló en la mayoría de ellas una conexión con la *lobula plate* (figura 43 y 44). Este conjunto de resultados, aporta entonces la primera evidencia fisiológica sobre neuronas que: 1) son sensibles a la dirección y sentido de movimiento; 2) responden al flujo óptico panorámico; 3) arborizan en la *lobula plate*. Estas son características de las LCDC que se comparten con las LPTC de insectos. Dado que además las LCDC arborizan en la *lobula plate* del cangrejo, los resultados proveen un fuerte apoyo a la idea de que este neuropilo tiene la misma función que en insectos.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, la *lobula plate* de insectos dípteros tiene 4 capas, en cada una de las cuales se describieron neuronas tangenciales (LPTC) que responden a una de las cuatro direcciones cardinales. La *lobula plate* de *Neohelice* tiene, al igual que la de las moscas, 4 capas (Bengochea et al., 2018). Todas las neuronas teñidas mostraron arborizaciones en la lóbula y una gran proporción de neuronas mostró una rama que se dirigía directamente hacia la *lobula plate*. En algunos casos llegaron a observarse algunos procesos delgados ramificándose en este neuropilo, aunque en ningún caso fue posible resolver en qué capas de la *lobula plate* se encontraban las arborizaciones. Los cangrejos, a diferencia de las moscas, se mueven principalmente en dos dimensiones caminando sobre el suelo, por lo que los movimientos relevantes para su vida suceden en el eje azimutal. Probablemente esa sería la razón de que en *Neohelice* sólo se hayan encontrado LCDC con uno u otro sentido preferido en el eje azimutal, lo cual representa 2 de las 4 direcciones cardinales. En efecto, basándose en evidencias morfológicas, Bengochea y colaboradores (2018) hipotetizaron que de haber una separación funcional por capas ésta sería redundante, estando un sentido de movimiento representado en dos capas y el otro sentido de movimiento en las otras dos capas.

En la langosta de río (*Crayfish*) se caracterizó un grupo de 14 neuronas de la médula con campos receptivos amplios pero bien definidos (Wiersma y Yamaguchi, 1966). Estas neuronas, llamadas *sustaining*, mostraban una clara respuesta excitatoria frente a un pulso de luz. Mediante registros intracelulares seguidos de inyecciones de fluoróforos, Kirk y colaboradores demostraron que cada neurona *sustaining* tenía una arborización dendrítica restringida a la porción de la médula que correspondía a su campo receptivo fisiológico. Por lo tanto, concluyeron que la posición del árbol dendrítico combinada con la organización retinotópica de los neuropilos ópticos determinaban el campo receptivo visual de cada *sustaining* (Kirk et al., 1982).

En *Neohelice*, las MLG1 sensibles al movimiento de objetos, forman un ensamble de 16 elementos tangenciales distribuidos a lo largo del eje lateromedial de la lóbula. Cada

unidad colecta información de una zona bien definida del plano azimutal y el ensamble completo representa los 360°. También para estas neuronas usando registros y marcaciones intracelulares se logró establecer la correspondencia entre el campo receptivo fisiológico de cada neurona y la localización anatómica de cada MLG1 en la lóbula (Medan et al., 2015). Los resultados obtenidos en ese trabajo por Medan y colaboradores, que incluyen estudios comportamentales, sugieren fuertemente que el ensamble de MLG1 de *Neohelice* funciona como un codificador continuo de la posición de un objeto que se mueve en el plano azimutal. Vale sin embargo recordar que estas neuronas no muestran ninguna preferencia por la dirección de movimiento del objeto.

Los resultados de esta tesis, muestran una correspondencia entre la posición en el espacio visual del campo receptivo fisiológico de las LCDC y el área de la lóbula en que éstas arborizan. A partir de esa correspondencia notamos que las arborizaciones en la lóbula se posicionaban de acuerdo a la retinotopía del sistema visual de *Neohelice* (figura 5). Dada esta correspondencia entre la posición de los árboles dendríticos en la lóbula y el campo receptivo fisiológico de la neurona, podemos entonces decir con certeza que se trata de neuronas que integran no sólo la información de dirección y sentido de movimiento de un objeto, sino que también codifican su posición en el plano azimutal. Otra observación que se desprende de los resultados obtenidos es que las LCDC, al igual que las MLG1, forman un ensamble de neuronas que mapean gran parte del espacio visual. En este caso, no podemos decir qué cantidad de LCDC mapean el espacio visual de *Neohelice* en cada lóbula. Debido a que no se encontraron LCDC que tuvieran su campo receptivo fisiológico orientado hacia la zona contralateral (capítulo 3) posiblemente este ensamble de neuronas en cada lóbula no cubre los 360° del espacio visual sino que, en su conjunto, el sistema de las LCDC cubren el espacio visual del hemi-campo ipsilateral (180°). Cabe mencionar que por ese motivo las LCDC no muestran, como en el caso de las LG analizadas en la primera parte de esta tesis, superposición binocular de sus campos receptivos o, que de haber superposición, estaría restringida a una pequeña porción en la zona medial del campo visual del animal. Por otro lado, la complementariedad de los campos receptivos de las LCDC de ambas lóbulas provee al animal la representación completa del campo visual.

En este capítulo se realizó una descripción de la anatomía de las LCDC que permitió distinguir dos tipos morfológicos. Sin embargo no pudieron hallarse diferencias en la respuesta fisiológica de las LCDC que tuvieran correspondencia con los tipos morfológicos. Es posible que la diferencia en la posición del soma entre un tipo morfológico y otro esté relacionada con la posición del árbol dendrítico en la lóbula. Las LCDC1, que tienen el soma en posición más lateral, mostraron también arborizaciones más laterales en la lóbula y por

eso sus campos receptivos estuvieron posicionados más frontalmente. Por otro lado las LCDC2, que tienen el soma en posición medial, mostraron arborizaciones en la lóbula que cubrían zonas más centrales o mediales y por lo tanto sus campos receptivos eran laterales o posteriores.

Capítulo 5: El glomérulo óptico direccional.

Introducción

El protocerebro lateral de los insectos dípteros está compuesto por un sistema de estructuras discretas que, por su estructura en forma de ovillo, reciben el nombre de glomérulos ópticos. En moscas se han encontrado 27 glomérulos ópticos que ocupan una porción importante del volumen del protocerebro lateral (Strausfeld y Okamura, 2007). Los axones de los distintos tipos de neuronas que descienden del complejo lobular se proyectan hacia glomérulos específicos, es decir que cada glomérulo óptico recibe terminales axónicas convergentes de un conjunto de neuronas de un mismo tipo. Los glomérulos están parcialmente envueltos por procesos de la glía y se suelen ver cubiertos de dendritas y terminales de interneuronas locales que conectan a los glomérulos por dentro y entre sí de manera análoga a como lo hacen las interneuronas locales de los lóbulos antenales. Como veremos, tanto a nivel estructural como funcional, el sistema de glomérulos ópticos es comparable con el de los glomérulos de los lóbulos antenales (Okamura y Strausfeld, 2007; Strausfeld et al., 2007; Strausfeld y Okamura, 2007).

Se han identificado fisiológicamente en libélulas y abejas neuronas que responden selectivamente a la orientación de una barra (O'Carroll, 1993; Yang y Maddess, 1997) en las cuales el campo receptivo subtiende todo el campo visual monocular. Dado que sus respuestas son independientes de la posición del estímulo en el campo visual, se propuso que esas neuronas sensibles a la orientación probablemente recibían entradas periféricas de varias neuronas similares con la misma respuesta selectiva a la orientación (Yang y Maddess, 1997). Aunque se desconoce la identidad y localización de las neuronas registradas por O'Carroll (1993) y por Yang y Maddess (1997), la organización de los lóbulos ópticos en abejas y libélulas es esencialmente similar a la de Dípteros, de los que se tiene gran cantidad de información anatómica. La convergencia observada en moscas de un mismo tipo de neuronas retinotópicas en un glomérulo, sugieren que en tales glomérulos se codifican las propiedades de los estímulos independientemente de su posición en el espacio, es decir que codifican la información de “qué” en vez de “dónde” (Strausfeld y Okamura,

2007). Si bien existe una cantidad de información morfológica que avala esta hipótesis, concretamente se sabe muy poco sobre cuál es el rol funcional de los glomérulos ópticos y de las neuronas que los integran.

Como único antecedente en crustáceos, Strausfeld y Näsel, 1980, describieron morfológicamente en crayfish la presencia de pequeños neuropilos proximales a la lóbula, los *optic foci*, de estructura glomerular, muy probablemente homólogas a la de los insectos. En este capítulo se realizará una descripción morfológica de un glomérulo óptico que encontramos en el protocerebro lateral de *Neohelice* que estaría integrando la información codificada en las LCDC descriptas en los dos capítulos anteriores.

Materiales y métodos

1. Reconstrucción de la forma y posición del glomérulo óptico direccional.

Partiendo de los preparados que se utilizaron para las reconstrucciones de LCDC que se mostraron en el capítulo 4, usamos el software Neurolucida para reconstruir tridimensionalmente la superficie del glomérulo óptico direccional. Sobre la misma imagen se marcó la posición por la que la o las LCDC teñidas en ese preparado entraban o salían del glomérulo. Para determinar la posición relativa a otros neuropilos también se reconstruyó la superficie de la lóbula.

2. Análisis de preparados histológicos

Para analizar la estructura del glomérulo óptico se utilizaron preparados tratados con las técnicas de Bodian y Golgi realizados previamente por la Dra Sztarker. La técnica de Bodian (1937) tiñe los microtúbulos permitiendo evidenciar la estructura de las células, éste es un método de tinción masiva con el cual se tiñen todas las neuronas indiscriminadamente permitiendo visualizar la neuroarquitectura general pero no detalles de la morfología de células únicas. Por otro lado, la técnica de Golgi tiñe al azar un número limitado de células pero en su totalidad, eso permite visualizar los detalles morfológicos de las neuronas que se tiñeron. Utilizando algunos de los preparados impregnados con la técnica de Golgi, se realizaron reconstrucciones de las neuronas teñidas dentro del glomérulo usando una cámara lúcida para dibujarlas.

Resultados

Todas las LCDC teñidas mostraron arborizar en una estructura discreta, glomerular, localizada en el protocerebro lateral. Resulta interesante esta estructura porque allí convergen una cantidad de neuronas que, además de ser del mismo tipo morfológico, codifican el mismo tipo de información, la de dirección de movimiento. Esta estructura glomerular, estaría entonces integrando la información de todas estas neuronas, es decir la información de dirección y sentido de movimiento en distintos puntos del espacio visual. Por tales motivos decidimos llamar a esta estructura Glomérulo Óptico Direccional (DOG, por su sigla en inglés *Directional Optic Glomerulus*).

El DOG se encuentra ubicado en la región más distal del protocerebro lateral, próximo a la lóbula, en la superficie posterior. Tiene un tamaño de aproximadamente 50 x 50 x 100 μm (en los ejes dorsoventral, anteroposterior y lateromedial, respectivamente). Las flechas en la figura 46 muestran su posición en un preparado teñido por técnica de Bodian (figura 46A, C) y otro teñido por técnica de Golgi (figura 46B, C).

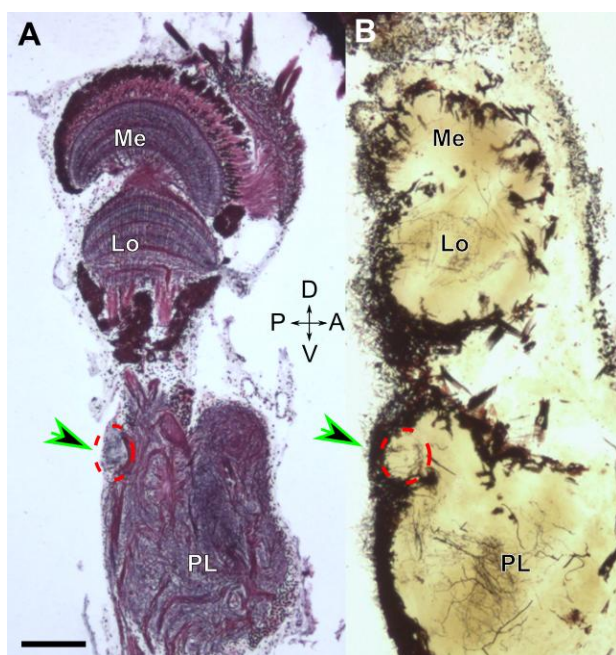
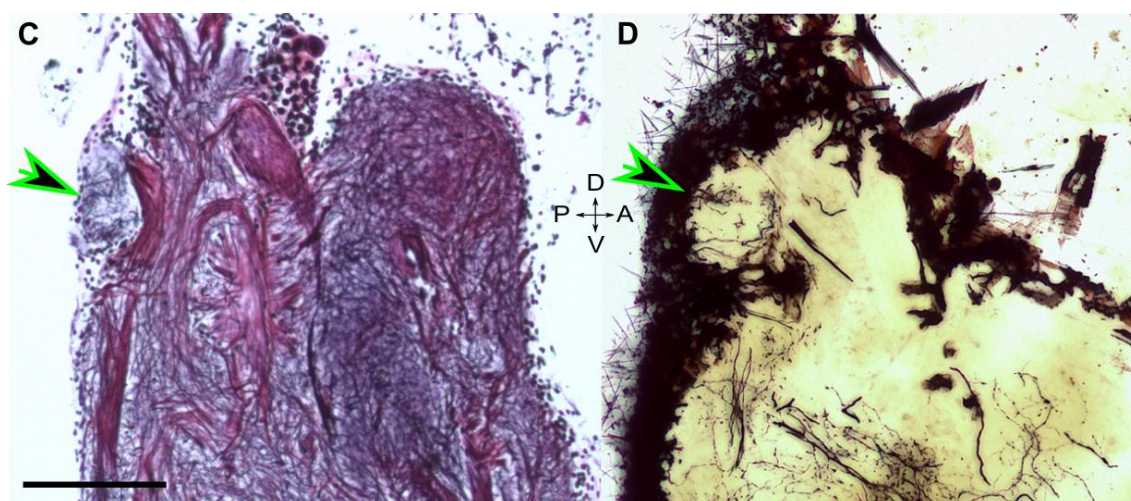


Figura 46. Posición del glomérulo óptico direccional en el lóbulo óptico. A.B. Corte sagital del lóbulo óptico de *Neohelice granulata* teñido por el método de Bodian, en secciones de aproximadamente 12 μm (A) y por el método de Golgi, en secciones de aproximadamente 40 μm (B). Se observa en ambos casos que el DOG se localiza en la parte dorsal del protocerebro lateral, próximo a la lóbula, superficialmente en la cara posterior del protocerebro lateral (puntas de flecha, óvalo punteado rojo). C.D. Mayor aumento de los mismos preparados. En el preparado teñido con la técnica de Golgi (D) se marcaron procesos de algunas neuronas. Me, médula; Lo, lóbula; PL, protocerebro lateral; D, dorsal; V, ventral; P, posterior; A, anterior. Escala: 100 μm .



En el capítulo anterior, se clasificó a las LCDC en dos tipos. Analizándolos con respecto a su comunicación al DOG, vimos que las LCDC1 se conectan con el glomérulo por dos regiones, desde la parte dorsal, comunicándolo con la lóbula y también desde la región más lateral de la lóbula donde se encuentran los somas (figura 47A). Cuando las neuronas ingresan al DOG se ramifican y esos procesos luego parecen volver a unirse formando dentro del glomérulo una estructura tipo anastomosis. La figura 47B fue obtenida de la reconstrucción de las superficies de la lóbula (violeta) y del DOG (azul) del mismo preparado que una de las reconstrucciones mostradas en el capítulo 4 donde varias LCDC1 fueron co-teñidas (figura 47A), en magenta están representadas las proyecciones de las LCDC1 marcadas en la tinción que comunican a las neuronas con el DOG. Las figuras 47C y D muestran un corte histológico en donde se observa el glomérulo en la misma orientación.

Como se puede ver, la forma en el plano anteroposterior es circular, además en el corte se observan las proyecciones que lo comunican por el extremo anterior con las LCDC1. Las puntas de flecha en la figura 47D indican lo que probablemente son esos mismos tractos en un preparado realizado con la técnica de tinción masiva de Bodian.

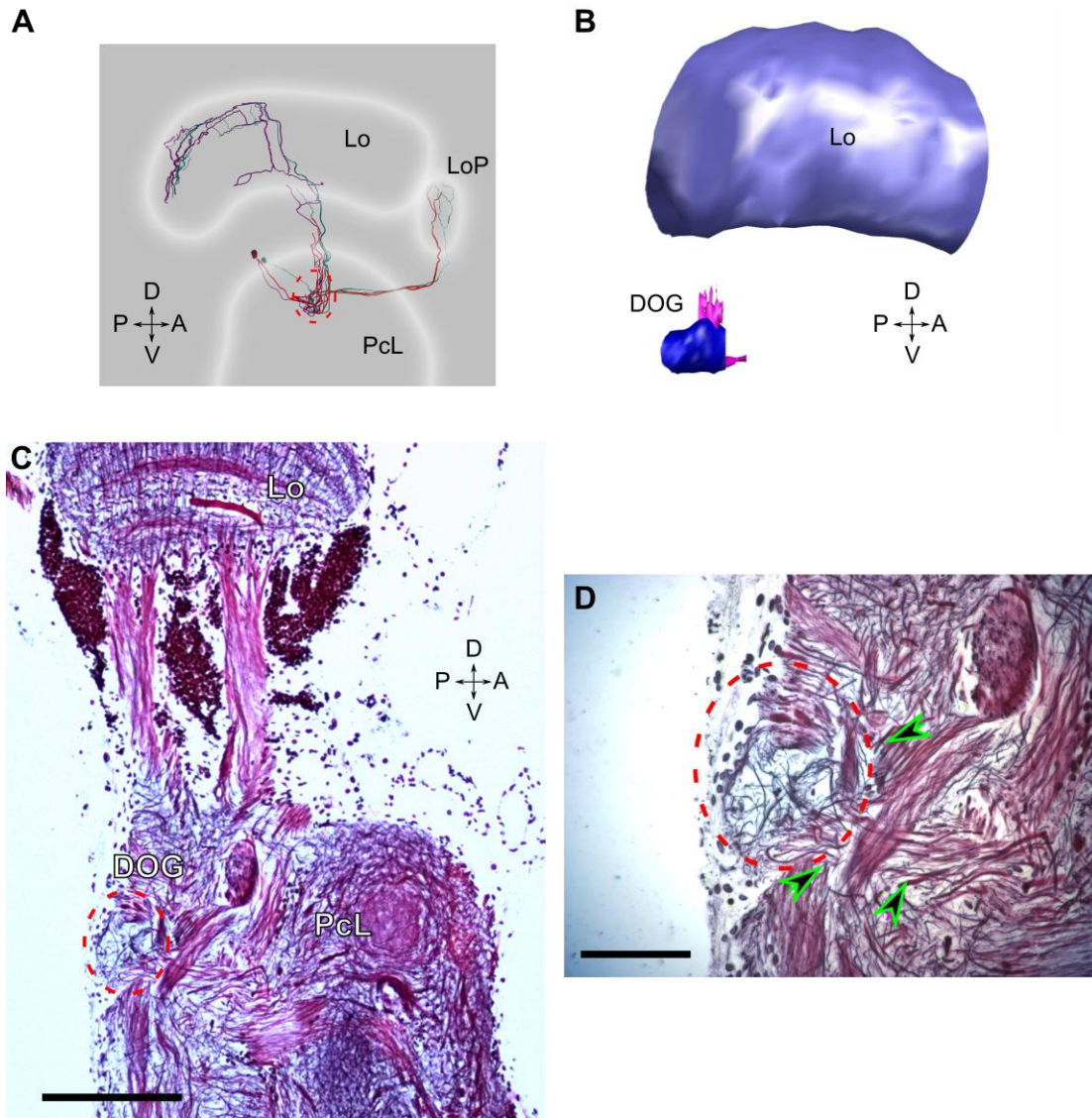


Figura 47. Tractos de neuronas LCDC tipo 1 que conectan con el glomérulo óptico direccional. A. Reconstrucción de un conjunto de LCDC1 co-teñidas. B. Reconstrucción de la superficie de la lóbula (violeta) y del DOG (azul) realizada a partir del mismo preparado que A. En magenta se ven las proyecciones que comunican con el DOG. C. Tinción de Bodian en donde se ven probablemente las mismas proyecciones de B conectando con el DOG. Sección sagital de aproximadamente 12µm de espesor. Escala: 100µm. D. Detalle en mayor aumento de los tractos neuronales que comunican con el DOG, las flechas señalan las proyecciones de las LCDC1. Escala: 50µm. D, dorsal; V, ventral; P, posterior; A, anterior.

Por otro lado, las LCDC2 se conectan con el DOG desde la parte medial del protocerebro lateral. Como se observa en la figura 48A, el soma de este subtipo de neuronas está ubicado inmediatamente por debajo de la *lobula plate*, desde allí se proyecta una neurita hacia la zona posterior, llegando al DOG desde la parte medial del mismo. En la figura 48B se ve una reconstrucción de la superficie de la lóbula (violeta) y del DOG (azul) con una proyección de la LCDC2 que fue reconstruida en la figura 48A (verde). Esas mismas proyecciones se marcaron también en un preparado teñido con la técnica de Bodian (figura 48C, D – punta de flecha verde).

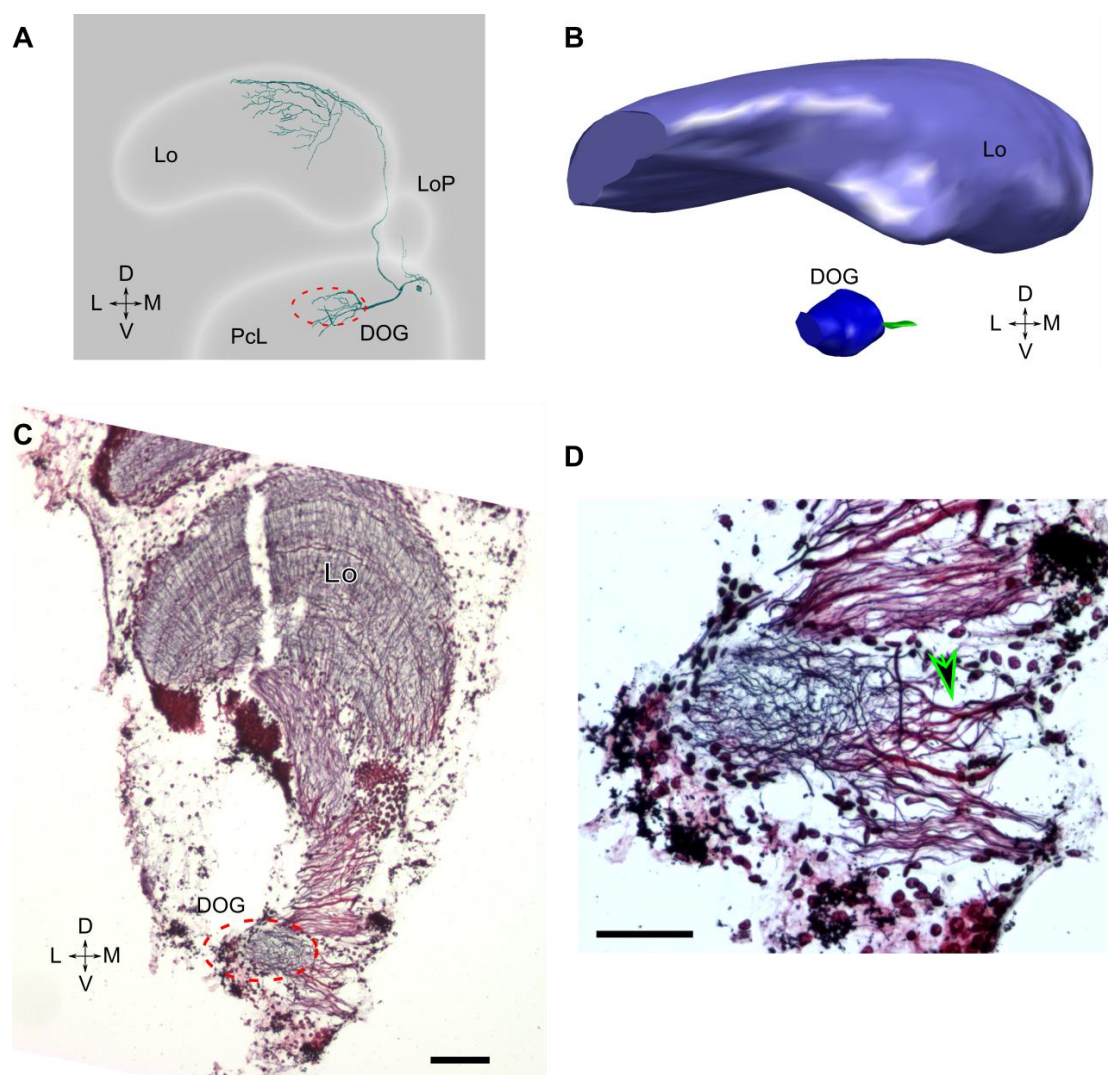


Figura 48. Tractos de neuronas LCDC tipo 2 que entran o salen del glomérulo óptico direccional. A. Reconstrucción de una LCDC2 teñida. B. Reconstrucción de la superficie de la lóbula (violeta) y del DOG (azul) realizada a partir del mismo preparado que la reconstrucción de A. En verde se ve la proyección entrando o saliendo del DOG. C. Corte longitudinal de aproximadamente 12 μm de un preparado tratado con tinción de Bodian en donde se ven proyecciones similares a las de B entrando o saliendo del DOG. El DOG se indica con un óvalo de línea punteada roja. D. Detalle fotografiado con mayor aumento, la flecha señala las proyecciones de las LCDC2. Escalas: 50 μm . D, dorsal; V, ventral; L, lateral; M, medial.

Además de las reconstrucciones que nos permitieron estudiar la forma y posicionamiento del DOG, se observaron preparados impregnados con la técnica de Golgi en los que se encontraron marcados algunos procesos dentro del mismo. Algunos de éstos podrían pertenecer a LCDC y otros a interneuronas que reciban la información direccional de las mismas. Para poder analizar las especializaciones de esas terminales, usando una cámara lúcida se dibujaron y reconstruyeron mientras eran observadas con el microscopio. En la figura 49 se muestran los resultados obtenidos para uno de los preparados: A es una foto del preparado, B, C y D son dibujos que corresponden a los procesos de neuronas recuadrados en A. Las terminales reconstruidas en B, por ejemplo, muestran una gran cantidad de varicosidades con estructura globular o de “ampollas” que han sido descritas frecuentemente como terminales presinápticas de invertebrados (Strausfeld y Bassemir, 1983). Eso indicaría que dichas neuronas están llevando información hacia el glomérulo, probablemente siendo procesos derivados de las LCDC. Si la información que llega de varias neuronas direccionales se integra en el glomérulo, deberíamos encontrar otras neuronas que estén recibiendo esa información. Las terminales neuronales de la figura 49D se van afinando progresivamente, correspondiéndose con la morfología característica de los procesos postsinápticos.

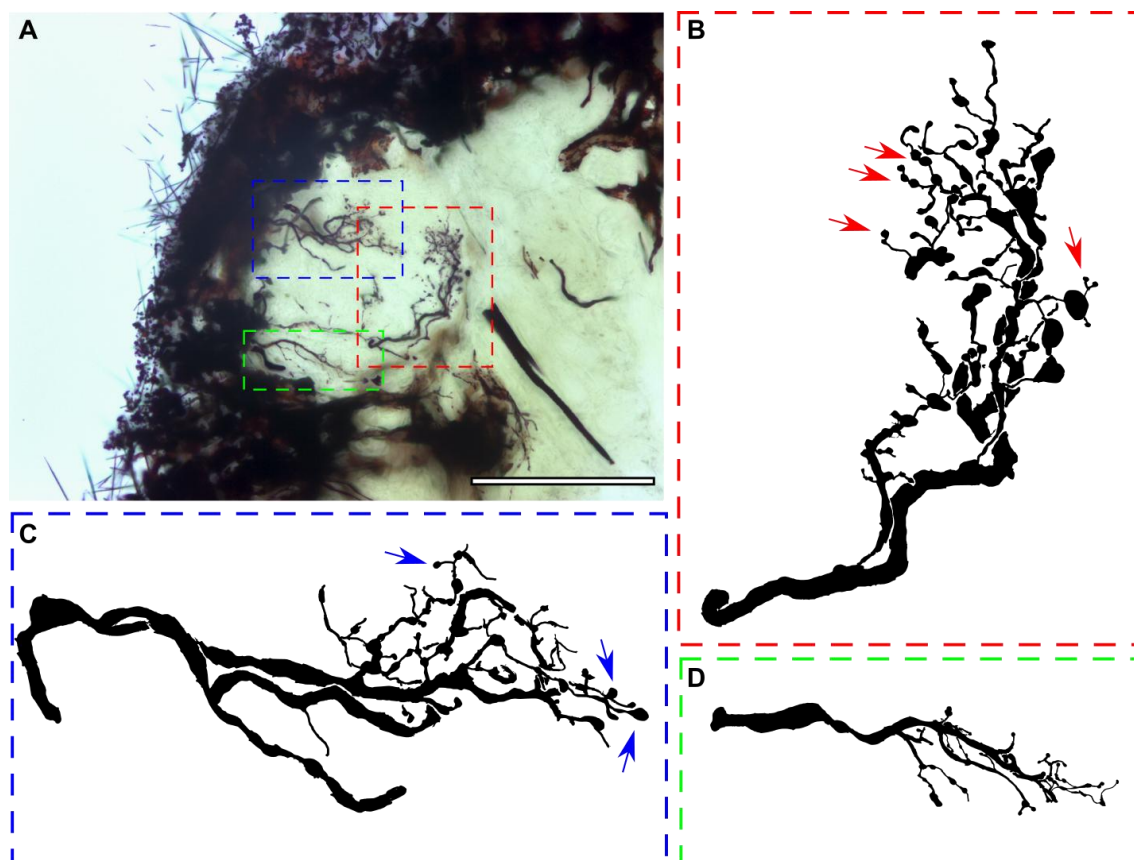


Figura 49. Detalle de neuronas que arborizan en el glomérulo óptico direccional. A. Foto de un preparado obtenido mediante la técnica de Golgi en donde se observa el glomérulo óptico direccional y a partir del cual se obtuvieron las reconstrucciones que se muestran en B, C y D. Las reconstrucciones de B y C muestran especializaciones globulares que se corresponden con una morfología presináptica (flechas rojas y azules) mientras que en la reconstrucción de D los procesos se van afinando progresivamente, lo cual es característico de especializaciones postsinápticas. Escala: 50 μ m

Discusión

En este capítulo se describió una estructura bien definida del protocerebro lateral en la que convergen un cierto número de neuronas que codifican la información de la dirección de movimiento. Esta estructura mostró ser similar a los glomérulos ópticos descritos en insectos.

En moscas se registró electrofisiológicamente un conjunto de neuronas de un mismo tipo que convergían en un mismo glomérulo óptico (Strausfeld et al., 2007). Cuando se evaluó la respuesta de esas neuronas a la orientación de una barra no se encontraron respuestas evidentes, las neuronas mostraron ser silenciosas y, si bien mostraban pequeños cambios en el potencial de membrana, en ningún caso se evocaban potenciales de acción. Luego se registraron las interneuronas locales que formaban parte del glomérulo óptico y lo

conectaban con otros centros en el cerebro y en el ganglio torácico y se encontró que esas neuronas respondían claramente a la orientación de la barra. En base a esos resultados los autores concluyen que en el glomérulo óptico se produce una integración de las pequeñas señales evocadas por la orientación de la barra en cada una de las neuronas que convergen allí (que en este caso eran pequeñas neuronas columnares de la lóbula). Es decir que si bien cada una de las neuronas que individualmente llegan al glomérulo, no transmite información por sí sola, la señal que sale del glomérulo codifica la información de la orientación de la barra, en ese sentido sería información que emerge de la combinación de señales dentro del glomérulo (Strausfeld et al., 2007). Para el DOG descrito en este capítulo, debido a la variedad en el tipo de procesos neuríticos hallados en él (ver por ejemplo la figura 49), no sabemos si las LCDC aportan información de dirección al DOG o la extraen de él. Sin embargo, esto último parecería improbable, dado el gran árbol dendrítico que estas neuronas extienden por la lóbula y la correspondencia de su posición con el campo receptivo fisiológico de la neurona (capítulo 4). De acuerdo con las respuestas electrofisiológicas, la información de posición y dirección de movimiento ya está claramente codificada en las LCDC que convergen en el DOG, por lo que es posible que la combinación de esas señales de como resultado nueva información, por ejemplo sobre el desvío de objetos con respecto a un punto de fijación.

La organización glomerular en el cerebro de los insectos tradicionalmente se asocia con los lóbulos antenales, que son los neuropilos de primer orden de la vía olfativa del insecto. La observación de que las neuronas que salen de los primeros neuropilos ópticos se dirigen hacia un sistema comparable de neuropilos discretos, condujo a proponer que el sistema visual y el sistema olfativo tenían un plan de organización común en el que convergen los canales de información en estructuras glomerulares discretas (Strausfeld y Okamura, 2007). En el sistema olfatorio, células idénticas entre sí que tienen receptores para una determinada clase de moléculas odorantes, envían sus axones a un glomérulo específico en el lóbulo antenal. En los lóbulos ópticos también se observa, aunque hasta el momento sólo a nivel morfológico, una convergencia de canales iguales entre sí a un único glomérulo. La similitud entre los glomérulos olfativos y ópticos se ve reforzada por la organización de interneuronas locales en ambos sistemas glomerulares (Strausfeld et al., 2007). La gran similitud en la estructura de ambos sistemas nos conduce inevitablemente a preguntarnos sobre el origen evolutivo de los glomérulos. Un estudio realizado en *Drosophila*, mostró que cuando el receptor Notch está inactivo durante la segunda etapa larvaria, se interrumpe el desarrollo del ojo compuesto para dar lugar a una antena rudimentaria (Kumar y Moses, 2001). Ese resultado junto con las similitudes tanto

morfológicas como funcionales entre glomérulos ópticos y olfatorios sugiere fuertemente un origen común para ambos sistemas sensoriales.

Discusión general de la Parte 2

A lo largo de esta parte de la tesis, revelamos la existencia de neuronas visuales sensibles a la dirección y sentido de movimiento en crustáceos, las LCDC. Estas neuronas fueron caracterizadas fisiológica y morfológicamente, lo cual nos permitió proponer que podrían estar involucradas en el control de comportamientos de fijación y seguimiento visual. Muchas de las características observadas a lo largo de estos tres capítulos, sugieren que, probablemente, dentro del grupo de neuronas estudiadas, puedan distinguirse en el futuro, mediante nuevos experimentos, distintos sub-tipos neuronales dedicados al control de diferentes estrategias comportamentales.

Las LCDC, al igual que las LG (neuronas gigantes de la lóbula) descritas anteriormente, tienen un amplio árbol dendrítico que cubre gran parte de la lóbula y muestran una robusta respuesta frente al movimiento de objetos. Sin embargo, este novedoso grupo de neuronas mostró ciertas características que permiten definirlos como un grupo diferente al de las LG. Esas características se enumeran a continuación:

- 1) Las LCDC, mostraron una respuesta altamente selectiva a la dirección y sentido de movimiento. Esta característica no se hallaba presente en ninguno de los sub-tipos de LG. Sólo en el caso de las MLG1 se había observado un cierto grado de preferencia por movimientos en dirección horizontal en comparación con movimientos en dirección vertical (Medan et al., 2015), pero no había una clara preferencia respecto del sentido de movimiento.
- 2) Sus amplias arborizaciones se extienden por la capa más superficial de la lóbula (LMT1). Ninguna de las LG descritas anteriormente mostraron arborizaciones en esa capa.
- 3) Persistencia de la respuesta frente a repeticiones del estímulo. Como se describió en la introducción general, las neuronas LG muestran una marcada reducción en la intensidad de la respuesta como consecuencia de la repetición de un estímulo visual de movimiento. Además, la respuesta fisiológica cae a lo largo de las repeticiones con la misma dinámica que lo hacer la respuesta de escape evocada por el mismo estímulo. Contrariamente, en las LCDC prácticamente no disminuye la intensidad de respuesta como consecuencia de las repeticiones de un estímulo. Como se discutió en el capítulo 3, esta característica está posiblemente relacionada con el rol que desempeñan estas neuronas.
- 4) Algunas de las LCDC registradas mostraron una intensa respuesta a estímulos de flujo óptico panorámico que se mantenía durante al menos 15 s. En

contraposición, todas las LG responden más intensamente a estímulos de objetos en movimiento que a estímulos panorámicos (Medan et al., 2007). Esta característica de algunas de las LCDC registradas sugiere que podrían estar involucradas en el control del curso de navegación al igual que las LPTC de insectos dípteros.

- 5) Mientras que 3 de los 4 tipos de neuronas LG descriptas previamente son sensibles a la estimulación mecánica, es decir que aumentan su frecuencia de disparo frente a estímulos táctiles en las patas del cangrejo, las LCDC descriptas en esta tesis no mostraron ningún tipo de respuesta frente a ese tipo de estímulos.
- 6) Las LCDC son neuronas locales. En todas las tinciones obtenidas y analizadas se observó que estas neuronas no salían del lóbulo óptico. Al parecer estarían interconectando la lóbula con la *lobula plate*, mostrando también una clara conectividad con el DOG. Contrariamente todas las LG muestran un axón que desciende por el protocerebro lateral, abandonando el lóbulo óptico a través del nervio óptico.

Respecto de esta última característica de las LCDC, cabe preguntarse cómo sería posible que participen entonces en el control de comportamientos de fijación y seguimiento de objetos que se mueven (o cualquier otro comportamiento), si no se proyectan más allá del lóbulo óptico. En primer lugar, vimos que el conjunto de neuronas forma un ensamble que codifica no solo la dirección y sentido de movimiento de un objeto sino también su posición en el espacio visual (capítulo 3). Como vimos en el capítulo 5, al parecer la información de todo el ensamble se integraría en el DOG. En este glomérulo se hallaron procesos neuronales tanto dendríticos como axónicos, por lo que podría ser que la información que allí converge sea combinada y tomada por otras neuronas que desciendan por el nervio óptico hacia los centros de integración motora, incluyendo al sistema locomotor para que el animal realice la compensación del desvío del objeto de su punto de fijación. En segundo lugar, en dos preparados en los que se marcó una LCDC de tipo 1, también se marcó una segunda neurona columnar que hacía contacto con ella en LMT1 y descendía atravesando la lóbula y el protocerebro lateral en dirección al nervio óptico. El hecho de que ese tipo de neurona columnar se haya teñido en dos preparados, sugiere que probablemente está acoplada eléctricamente con las LCDC, por lo que también podrían ser este tipo de neuronas las que envíen información descendente hacia los centros neurales de control motor.

En el capítulo 3, propusimos la hipótesis de que las LCDC estarían funcionando como neuronas que detectan los desvíos de un objeto de una zona particular de la retina. Se han descrito en otros animales neuronas detectoras de desvíos, aunque en general se trata de neuronas que parecen estar más relacionadas con el control de la navegación que con comportamientos de fijación y seguimiento de objetos puntuales. A continuación se comenta un ejemplo de esos hallazgos.

Las langostas (*Locusta migratoria*), son insectos migratorios que recorren con su vuelo largas distancias. Si bien el vuelo de la langosta consiste básicamente en movimientos rítmicos de las alas, durante sus travesías se encuentran expuestas a factores ambientales, como por ejemplo el viento, que pueden desviarlas de su curso. La corrección de tales desvíos se lleva a cabo mediante sistemas sensoriales que permiten detectar las señales de error. Estas señales son captadas a través de los ojos compuestos, los ocelos, los pelos sensibles al viento sobre la cabeza y las antenas. La información se transmite desde esos órganos sensoriales hacia centros motores que controlan los movimientos de la cabeza, las alas, las patas y el abdomen a través de una población de neuronas detectoras de desvíos (DDNs).

Se han identificado morfológicamente cinco tipos de DDN en la langosta y se han descrito detalladamente. Una de ellas, la TCG, detecta las desviaciones del curso mediante cambios en el flujo de aire sobre la cabeza (Bacon y Tyrer, 1978). Las otras cuatro integran información multimodal para detectar los desvíos: PI(2)5 recibe información visual de un ojo compuesto y se inhibe con viento que viene desde el frente (Hensler, 1988); DNI, DNC y DNM reciben información visual de los ojos compuestos y del ocelo ipsilateral, contralateral y medio, respectivamente y muestran una respuesta excitatoria frente al viento frontal (Rowell y Reichert, 1986).

Las DDN no responden a objetos pequeños, pero sí responden al movimiento del panorama diferencialmente de acuerdo a la dirección. A través de los ocelos también responden a la inclinación y al giro artificial del horizonte visual. Una característica interesante de estas neuronas es que cada uno de los tipos codifica un atributo específico de desviación del curso. Por ejemplo, las DNI responden a la rotación sobre el eje longitudinal del animal, sólo si el giro es en sentido horario y además esa dirección aleja al animal de su alineación con el horizonte natural en su posición de vuelo. Esa neurona no responde si el giro es en sentido antihorario, pero tampoco lo hace en sentido horario si esa dirección acerca al animal a su alineación con el horizonte natural (Reichert y Rowell, 1986). Por lo tanto, se ha propuesto que las DNI no son simples detectoras de movimiento, sino que se comportan como un detector de desvíos programado para detectar las consecuencias

sensoriales específicas de estímulos que ocurren naturalmente durante el patrón de vuelo. Reichert y Rowell también encontraron que las DDN son presinápticas a las interneuronas torácicas (TIN), las cuales proyectan directamente a interneuronas específicas que modulan el vuelo.

Las DDN, por lo tanto, comparten ciertas características con las LCDC descritas en la segunda parte de esta tesis. Si bien se trata de neuronas que claramente están relacionadas con el control de navegación y no con la fijación de objetos, las DDN muestran, al igual que las LCDC, un sentido preferido de movimiento que además está condicionado por la posición relativa del animal respecto de un estímulo externo que, en el caso de las langostas, es la posición del horizonte natural, y en el caso de los cangrejos es la posición retinal de un objeto en el plano azimutal.

En resumen, la ejecución de muchos comportamientos esenciales para la vida de los animales, como la navegación, la captura de presas, la evitación de predadores, el cortejo, etc., algunos de los cuales fueron descritos en la introducción general de esta tesis, requiere de la percepción de la dirección y sentido de movimiento, del animal con respecto a su entorno, o de un estímulo externo respecto al animal. Como se describió en los párrafos precedentes, distintos sistemas sensoriales pueden contribuir a la percepción de tales movimientos. Incluso, algunos sistemas de detección de desvíos como el descrito para las DDN de langostas integran la información de más de un sistema sensorial.

Los resultados expuestos en esta parte de la tesis, permiten proponer la existencia de dos sistemas de neuronas detectoras de desvíos de objetos con puntos de fijación diferentes, uno al frente del cangrejo y el otro en posición lateral. Cada uno de los sistemas estaría dedicado a la ejecución de distintos comportamientos. Ambos sistemas están integrados por neuronas que son sensibles a un sentido del movimiento en una región particular de la retina, y al sentido opuesto en otra región, es decir, que combinan la información del sentido de movimiento del objeto con información de la ubicación espacial del mismo respecto del animal. Esta combinación, es lo que permite detectar si la imagen del objeto en cuestión se aleja de un punto particular de la retina en el que el animal intenta mantenerla.

Para poner a prueba la hipótesis propuesta a partir de los resultados obtenidos en esta tesis, será necesario realizar experimentos comportamentales, en el laboratorio y en el campo, que permitan estudiar en detalle los comportamientos que requieren la fijación de un objeto en una zona particular de la retina, como es el caso de los de captura de presas o de los que están relacionados con la evitación de predadores, tal como sugieren algunas observaciones preliminares. En ese sentido y para tal fin, además de los experimentos que

se están realizando en el laboratorio con pequeños objetos que se mueven al ras del suelo emulando presas y filmando las respuestas de persecución de esos objetos que ejecutan los cangrejos, se está trabajando en la puesta a punto de un dispositivo que permitirá registrar de manera muy precisa la trayectoria de movimiento de un cangrejo frente a distintos estímulos visuales. La realización de experimentos utilizando ese dispositivo, nos permitirá establecer mayores correspondencias entre la respuesta comportamental de corrección de desvíos por parte del animal y la actividad de las LCDC aquí descriptas.

Bibliografía

- Alivisatos AP, Chun M, Church GM, Greenspan RJ, Roukes ML, Yuste R (2012) The Brain Activity Map Project and the Challenge of Functional Connectomics. *Neuron* 74:970-974.
- Bacon J, Tyrer M (1978) The tritocerebral commissure giant (TCG): A bimodal interneurone in the locust, *Schistocerca gregaria*. *J Comp Physiol A* 126:317-325.
- Barnatan YB (2017) Respuesta optomotora en el cangrejo *Neohelice granulata*: caracterización del estímulo desencadenador óptimo, análisis de visión monocular y estudio interespecífico. Tesis de licenciatura. FCEN-Universidad de Buenos Aires.
- Barnes WJ, Johnson A, Horseman G, Macauley M (2002) Computer-aided studies of vision in crabs. *Mar Freshw Behav Physiol* 35:37-56.
- Barnes WJP, Nalbach HO (1993) Eye movements in freely moving crabs: Their sensory basis and possible role in flow-field analysis. *Comp Biochem Physiol - Part A Physiol* 104:675-693.
- Bengochea M, Berón de Astrada M, Tomsic D, Sztarker J (2018) A crustacean lobula plate: Morphology, connections, and retinotopic organization. *J Comp Neurol* 526:109-119.
- Berón de Astrada M, Bengochea M, Medan V, Tomsic D (2012) Regionalization in the eye of the grapsid crab *Neohelice granulata* (= *Chasmagnathus granulatus*): variation of resolution and facet diameters. *J Comp Physiol A* 198:173-180.
- Berón de Astrada M, Medan V, Tomsic D (2011) How visual space maps in the optic neuropils of a crab. *J Comp Neurol* 519:1631-1639.
- Berón de Astrada M, Sztarker J, Tomsic D (2001) Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings in vivo. *J Comp Physiol A Sensory, Neural, Behav Physiol* 187:37-44.
- Berón de Astrada M, Tomsic D (2002) Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 188:539-551.
- Berón de Astrada M, Tuthill JC, Tomsic D (2009) Physiology and morphology of sustaining and dimming neurons of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsidae). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195:791-798.

- Borst a., Haag J (2002) Neural networks in the cockpit of the fly. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 188:419-437.
- Borst a, Egelhaaf M (1989) Principles of visual motion detection. *Trends Neurosci* 12:297-306.
- Borst A, Helmstaedter M (2015) Common circuit design in fly and mammalian motion vision. *Nat Neurosci* 18:1067-1076.
- Buchner E, Buchner S, Bülthoff H (1984) Identification of [3H]deoxyglucose-labelled interneurons in the fly from serial autoradiographs. *Brain Res* 305:384-388.
- Collett TS (1977) Stereopsis in toads. *Nat Publ Gr* 267:349-351.
- Collett TS (1987) Binocular depth vision in arthropods. *Trends Neurosci* 10:1-2.
- Collett TS, Udin SB, Finch DJ (1987) A possible mechanism for binocular depth judgements in anurans. *Exp Brain Res* 66:35-40.
- Conway Morris S (2000a) The Cambrian «explosion»: Slow-fuse or megatonnage? *Proc Natl Acad Sci* 97:4426-4429.
- Conway Morris S (2000b) Evolution : Bringing Molecules Into Fold. *Cell* 100:1-11.
- Conway Morris S (2006) Darwin's dilemma: the realities of the Cambrian «explosion». *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361:1069-1083.
- DeVoe RD, Kaiser W, Ohm J, Stone LS (1982) Horizontal movement detectors of honeybees: Directionally-selective visual neurons in the lobula and brain. *J Comp Physiol A* 147:155-170.
- Duistemars B, Care R, Frye M (2012) Binocular interactions underlying the classic optomotor responses of flying flies. *Front Behav Neurosci* 6:1-19.
- Duistemars BJ, Chow DM, Condro M, Frye MA (2007) The spatial, temporal and contrast properties of expansion and rotation flight optomotor responses in *Drosophila*. *J Exp Biol* 210:3218-3227.
- Eckert H, Bishop LG (1978) Anatomical and physiological properties of the vertical cells in the third optic ganglion of *Phaenicia sericata* (Diptera, Calliphoridae). *J Comp Physiol A* 126:57-86.

- Fathala MDV, Kunert MC, Maldonado H (2010) A field model of learning: 2. Long-term memory in the crab *Chasmagnathus granulatus*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 196:77-84.
- Fathala MDV, Maldonado H (2010) Shelter use during exploratory and escape behaviour of the crab *Chasmagnathus granulatus*: a field study. J Ethol 29:263-273.
- Finch DJ, Collett TS (1983) Small-field, binocular neurons in the superficial layers of the frog optic tectum. Proc R Soc Lond B Biol Sci 217:491-497.
- Fotowat H, Gabbiani F (2011) Collision detection as a model for sensory-motor integration. Annu Rev Neurosci 34:1-19.
- Fox R (1977) Stereopsis in the Falcon. Science 197:79-81.
- Fux M, Eilam D (2009) How barn owls (*Tyto alba*) visually follow moving voles (*Microtus socialis*) before attacking them. Physiol Behav 98:359-366.
- Geiger G, Nässel DR (1981) Visual orientation behavior of flies after selective laser beam ablation of interneurons. Nature 293:398-399.
- Geiger G, Nässel DR (1982) Visual processing of moving single objects and wide-field patterns in flies: Behavioural analysis after laser-surgical removal of interneurons. Biol Cybern 44:141-149.
- Gilbert C, Strausfeld NJ (1991) The functional organization of male-specific visual neurons in flies. J Comp Physiol A 169:395-411.
- Glantz RM (2001) Polarization analysis in the crayfish visual system. J Exp Biol 204:2383-2390.
- Glantz RM, Kirk MD (1980) Intercellular dye migration and electrotonic coupling within neuronal networks of the crayfish brain. J Comp Physiol A 140:121-133.
- Glantz RM, Miller CS, Wiese K (2002) Signal processing in the crayfish optic lobe: contrast, motion and polarization vision. En: The crustacean nervous system, pp 486. Berlin: Springer.
- Hardcastle BJ, Krapp HG (2016) Evolution of Biological Image Stabilization. Curr Biol 26:R1010-R1021.

- Harzsch S, Hansson BS (2008) Brain architecture in the terrestrial hermit crab *Coenobita clypeatus* (Anomura, Coenobitidae), a crustacean with a good aerial sense of smell. BMC Neurosci 9:1-35.
- Hausen K (1982) Motion sensitive interneurons in the optomotor system of the fly - I. The horizontal cells: Structure and signals. Biol Cybern 45:143-156.
- Hausen K, Wehrhahn C (1983) Microsurgical Lesion of Horizontal Cells Changes Optomotor Yaw Responses in the Blowfly *Calliphora erythrocephala*. Proc R Soc B Biol Sci 219:211-216.
- Hausen K, Wehrhahn C (1990) Neural circuits mediating visual flight control in flies. II. Separation of two control systems by microsurgical brain lesions. J Neurosci 10:351-360.
- Heisenberg M, Wonneberger R, Wolf R (1978) Optomotor-blindH31-a *Drosophila* mutant of the lobula plate giant neurons. J Comp Physiol A 124:287-296.
- Hemmi JM, Tomsic D (2015) Differences in the escape response of a grapsid crab in the field and in the laboratory. J Exp Biol 218:3499-3507.
- Hemmi JM, Zeil J (2003) Robust judgement of inter-object distance by an arthropod. Nature 421:160-163.
- Hennig P, Kern R, Egelhaaf M (2011) Binocular integration of visual information: a model study on naturalistic optic flow processing. Front Neural Circuits 5:4.
- Hensler K (1988) The Pars intercerebralis neurone PI(2)5 of locusts: convergent processing of inputs reporting head movements and deviations from straight flight. J Exp Biol 140:511-533.
- Hepp Y, Tano MC, Pedreira ME, Freudenthal RAM (2013) NMDA-like receptors in the nervous system of the crab *Neohelice granulata*: A neuroanatomical description. J Comp Neurol 521:2279-2297.
- Hermitte G, Aggio J, Maldonado H (1995) Failure of interocular transfer in two types of learning in the crab *Chasmagnathus*. J Comp Physiol A 177:371-378.
- Horridge GA, Sandeman DC (1964) Nervous control of optokinetic responses in the crab, *Carcinus*. Proc R Soc B 161:216-246.

- Hubel BYDH, Wiesel a DTN, Hubel DN, Wiesel TN, Hubel BYDH, Wiesel a DTN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN (1959) Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol* 148:574-591.
- Hubel DH, Wiesel TN (1970) Stereoscopic vision in macaque monkey: Cells sensitive to binocular depth in area 18 of the macaque monkey cortex. *Nature* 225:41-42.
- Hughes A (1985) Chapter 9: New perspectives in retinal organisation. En: *Progress in Retinal Research*, pp 243-313.
- Jacobs G a, Miller JP, Murphey RK (1986) Integrative mechanisms controlling directional sensitivity of an identified sensory interneuron. *J Neurosci* 6:2298-2311.
- Kaiser W, Bishop LG (1970) Directionally selective motion detecting units in the optic lobe of the honeybee. *Z vergl Physiol* 67:403-413.
- Kara P, Boyd JD (2009) A micro-architecture for binocular disparity and ocular dominance in visual cortex. *Nature* 458:627-631.
- Kirk MD, Waldrop B, Glantz RM (1982) The crayfish sustaining fibers. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 146:175-179.
- Kral K (2008) Spatial vision in binocular and monocular common field grasshoppers (*Chorthippus brunneus*). *Physiol Entomol* 33:233-237.
- Krapp HG, Hengstenberg B, Hengstenberg R (1998) Dendritic structure and receptive-field organization of optic flow processing interneurons in the fly. *J Neurophysiol* 79:1902-1917.
- Krapp HG, Hengstenberg R, Egelhaaf M (2001) Binocular contributions to optic flow processing in the fly visual system. *J Neurophysiol* 85:724-734.
- Kuffler SW (1953) Discharge Patterns and Functional Organization of Mammalian Retina. *J Neurophysiol* 16:37-68.
- Kuffler SW, Nicholls JG (1976) A cellular approach to the function of the nervous system.
- Kumar JP, Moses K (2001) EGF Receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell* 104:687-697.

- Land M, Layne J (1995) The visual control of behavior in fiddler crabs. 2. Tracking control systems in courtship and defense. *J Comp Physiol A* 177:91-103.
- Land MF (1999a) Motion and vision: Why animals move their eyes. *J Comp Physiol - A Sensory, Neural, Behav Physiol* 185:341-352.
- Land MF (1999b) The roles of head movements in the search and capture strategy of a tern (Aves, Laridae). *J Comp Physiol - A Sensory, Neural, Behav Physiol* 184:265-272.
- Land MF, Collett TS (1974) Chasing behaviour of houseflies (*Fannia canicularis*). *J Comp Physiol* 89:331-357.
- Land MF, Eckert H (1985) Maps of the acute zones of fly eyes. *J Comp Physiol A* 156:525-538.
- Layne JE, Barnes WJ, Duncan LM (2003a) Mechanisms of homing in the fiddler crab *Uca rapax* 1. Spatial and temporal characteristics of a system of small-scale navigation. *J Exp Biol* 206:4413-4423.
- Layne JE, Barnes WJ, Duncan LM (2003b) Mechanisms of homing in the fiddler crab *Uca rapax* 2. Information sources and frame of reference for a path integration system. *J Exp Biol* 206:4425-4442.
- Lennie P (1998) Single units and visual cortical organization. *Perception* 27:889-935.
- Livingstone MS, Conway BR (2003) Substructure of Direction-Selective Receptive Fields in Macaque V1. *J Neurophysiol* 89:2743-2759.
- Magani F, Luppi T, Nunez J, Tomsic D (2016) Predation risk modifies behaviour by shaping the response of identified brain neurons. *J Exp Biol* 219:1172-1177.
- Maldonado H, Rodriguez E (1972) Depth perception in the praying mantis. *Physiol Behav* 8:751-759.
- Medan V (2007) Caracterización morfológico-funcional de neuronas sensibles al movimiento involucradas en comportamientos visuales del cangrejo *Chasmagnathus*. Tesis de doctorado. FCEN-Universidad de Buenos Aires.
- Medan V, Berón De Astrada M, Scarano F, Tomsic D (2015) A network of visual motion-sensitive neurons for computing object position in an arthropod. *J Neurosci* 35:6654-6666.

- Medan V, Oliva D, Tomsic D (2007) Characterization of lobula giant neurons responsive to visual stimuli that elicit escape behaviors in the crab *Chasmagnathus*. J Neurophysiol:2414-2428.
- Mischiati M, Lin H-T, Herold P, Immler E, Olberg R, Leonardo A (2015) Internal models direct dragonfly interception steering. Nature 517:1-13.
- Molinas J (2015) Estudio de la toma de decisiones en un invertebrado: elección del lado de escape ante un estímulo de peligro de aproximación dorsal. Tesis de doctorado. FCEN-Universidad de Buenos Aires.
- Nakayama K (1985) Biological image motion processing: A review. Vision Res 25:625-660.
- Nalbach G (1993) The halteres of the blowfly *Calliphora* - I. Kinematics and dynamics. J Comp Physiol A 173:293-300.
- Newton I (1704) Opticks: Or, A Treatise of the Reflections, Refractions, Inflections & Colours of Light. McGraw-Hill book Company, Incorporated.
- Nilsson D-E (2009) The evolution of eyes and visually guided behaviour. Philos Trans R Soc B Biol Sci 364:2833-2847.
- Nityananda V, Tarawneh G, Rosner R, Nicolas J, Crichton S, Read J (2016) Insect stereopsis demonstrated using a 3D insect cinema. Sci Rep 6:18718.
- Nordström K, O'Carroll DC (2006) Small object detection neurons in female hoverflies. Proc R Soc B Biol Sci 273:1211-1216.
- Nordström K, O'Carroll DC (2009) Feature detection and the hypercomplex property in insects. Trends Neurosci 32:383-391.
- O'Carroll D (1993) Feature-detecting neurons in dragonflies. Nature 362:541-543.
- Okamura J-Y, Strausfeld NJ (2007) Visual system of calliphorid flies: motion- and orientation-sensitive visual interneurons supplying dorsal optic glomeruli. J Comp Neurol 500:189-208.
- Oliva D, Medan V, Tomsic D (2007) Escape behavior and neuronal responses to looming stimuli in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae). J Exp Biol 210:865-880.

- Olkowicz S, Kocourek M, Lučan RK, Porteš M, Fitch WT, Herculano-Houzel S, Němec P (2016) Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proc Natl Acad Sci* 113:7255-7260.
- Pedetta S, Kaczer L, Maldonado H (2010) Individual aggressiveness in the crab *Chasmagnathus*: Influence in fight outcome and modulation by serotonin and octopamine. *Physiol Behav* 101:438-445.
- Pedreira ME, Maldonado H (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863-869.
- Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H (2002) Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22:8305-8311.
- Polyak (1957) The vertebrate visual system. Chicago: University of Chicago Press: Chicago: University of Chicago Press.
- Pratt DW (1982) Saccadic eye movements are coordinated with head movements in walking chickens. *J Exp Biol* 97:217-223.
- Ramdyk P, Engert F (2008) Emergence of binocular functional properties in a monocular neural circuit. *Nat Neurosci* 11:1083-1090.
- Reichert H, Rowell CHF (1986) Neuronal circuits controlling flight in the locust: how sensory information is processed for motor control. *Trends Neurosci* 9:281-283.
- Rosner R, Homberg U (2013) Widespread sensitivity to looming stimuli and small moving objects in the central complex of an insect brain. *J Neurosci* 33:8122-8133.
- Rossel S (1983) Binocular stereopsis in an insect. *Nature* 302:821-822.
- Rowell CHF, Reichert H (1986) Three descending interneurons reporting deviation from course in the locust II. Physiology. *J Comp Physiol A Sensory, Neural, Behav Physiol* 158:765-774.
- Sal Moyano MP, Gavio MA, Mclay CL, Luppi T (2014) Variation in the post-copulatory guarding behavior of *Neohelice granulata* (Brachyura, Grapsoidea, Varunidae) in two different habitats. *Mar Ecol* 36:1185-1194.

- Sandeman DC, Erber J, Kien J (1975) Optokinetic eye movements in the crab. *J Comp Physiol* 101:243-258.
- Sandeman DC, Scholtz G, Sandeman R (1993) Brain Evolution in Decapod Crustacea. *J Exp Zool* 265:112-133.
- Sanes JR, Zipursky SL (2010) Design Principles of Insect and Vertebrate Visual Systems. *Neuron* 66:15-36.
- Scarano F, Tomsic D (2014) Escape response of the crab *Neohelice* to computer generated looming and translational visual danger stimuli. *J Physiol* 108:141-147.
- Schnell B, Raghu SV, Nern A, Borst A (2012) Columnar cells necessary for motion responses of wide-field visual interneurons in *Drosophila*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 198:389-395.
- Sengpiel F, Blakemore C, Harrad R (1995) Interocular suppression in the primary visual cortex: a possible neural basis of binocular rivalry. *Vision Res* 35:179-195.
- Sinakevitch I, Douglass JK, Scholtz G, Loesel R, Strausfeld NJ (2003) Conserved and Convergent Organization in the Optic Lobes of Insects and Isopods, with Reference to Other Crustacean Taxa. *J Comp Neurol* 467:150-172.
- Spivak ED (2010) The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: An emergent animal model from emergent countries. *Helgol Mar Res* 64:149-154.
- Stamp Dawkins M (2002) What are birds looking at? Head movements and eye use in chickens. *Anim Behav* 63:991-998.
- Stowe S (1977) The retina-lamina projection in the crab *Leptograpsus variegatus*. *Cell Tissue Res* 185:515-525.
- Strausfeld NJ (1991) Structural organization of male-specific visual neurons in calliphorid optic lobes. *J Comp Physiol A* 169:379-393.
- Strausfeld NJ (1998) Crustacean-insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain Behav Evol* 52:186-206.
- Strausfeld NJ (2005) The evolution of crustacean and insect optic lobes and the origins of chiasmata. *Arthropod Struct Dev* 34:235-256.

- Strausfeld NJ, Bassemir UK (1983) Cobalt-coupled neurons of a giant fibre system in Diptera. *J Neurocytol* 12:971-991.
- Strausfeld NJ, Gronenberg W (1990) Descending Neurons Supplying the Neck and Flight Motor of Diptera: Organization and Neuroanatomical Relationships With Visual Pathways. 972:954-972.
- Strausfeld NJ, Näsel DR (1980) Neuroarchitecture of brain regions that subserve the compound eyes of crustacea and insect. En: *Handbook of sensory physiology*, vol VIII/6B, pp 1-132. Berlin: Springer Verlag.
- Strausfeld NJ, Okamura J-Y (2007) Visual System of Calliphorid Flies: Organization of Optic Glomeruli and Their Lobula Complex Efferents. *J Comp Neurol* 504:287-297.
- Strausfeld NJ, Sinakevitch I, Okamura J-Y (2007) Organization of Local Interneurons in Optic Glomeruli of the Dipterous Visual System and Comparisons with the Antennal Lobes. *Dev Neurobiol* 73:609-620.
- Suzuki Y, Morimoto T, Miyakawa H, Aonishi T (2014) Cooperative integration and representation underlying bilateral network of fly motion-sensitive neurons. *PLoS One* 9:22-25.
- Sztarker J, Strausfeld N, Andrew D, Tomsic D (2009) Neural organization of first optic neuropils in the littoral crab *Hemigrapsus oregonensis* and the semiterrestrial species *Chasmagnathus granulatus*. *J Comp Neurol* 513:129-150.
- Sztarker J, Strausfeld NJ, Tomsic D (2005) Organization of optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab. *J Comp Neurol* 411:396-411.
- Sztarker J, Tomsic D (2004) Binocular visual integration in the crustacean nervous system. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190:951-962.
- Sztarker J, Tomsic D (2008) Neuronal correlates of the visually elicited escape response of the crab *Chasmagnathus* upon seasonal variations, stimuli changes and perceptual alterations. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 194:587-596.
- Sztarker J, Tomsic D (2011) Brain modularity in arthropods: individual neurons that support «what» but not «where» memories. *J Neurosci* 31:8175-8180.

- Sztarker J, Tomsic D (2014) Neural organization of the second optic neuropil, the medulla, in the highly visual semiterrestrial crab *Neohelice granulata*. J Comp Neurol 522:3177-3193.
- Thoen HH, Sayre ME, Marshall J, Strausfeld NJ (2018) Representation of the stomatopod's retinal midband in the optic lobes: Putative neural substrates for integrating chromatic, achromatic and polarization information. J Comp Neurol 526:1148-1165.
- Tomsic D (2016) Visual motion processing subserving behavior in crabs. Curr Opin Neurobiol 41:113-121.
- Tomsic D, Berón de Astrada M, Sztarker J (2003) Identification of individual neurons reflecting short- and long-term visual memory in an arthropod. J Neurosci 23:8539-8546.
- Tomsic D, Massoni V, Maldonado H (1993) Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: ontogenic, ecological and opioid modulation correlates. J Comp Physiol A 173:621-633.
- Tomsic D, Pedreira ME, Romano A, Hermitte G, Maldonado H (1998) Context-US association as a determinant of long-term habituation in the crab chasmagnathus. Anim Learn Behav 26:196-209.
- Tomsic D, Romano A (2013) A Multidisciplinary Approach to Learning and Memory in the Crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. En: Invertebrate Learning and Memory, 1.^a ed. (Menzel R, Benjamin PR, eds), pp 337-355.
- Tomsic D, Sztarker J, Berón de Astrada M, Oliva D, Lanza E (2017) The predator and prey behaviors of crabs: from ecology to neural adaptations. J Exp Biol 220:2318-2327.
- Trischler C, Boeddeker N, Egelhaaf M (2007) Characterisation of a blowfly male-specific neuron using behaviourally generated visual stimuli. J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol 193:559-572.
- Tucker V a, Tucker a E, Akers K, Enderson JH (2000) Curved flight paths and sideways vision in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). J Exp Biol 203:3755-3763.
- Wardill TJ, Fabian ST, Pettigrew AC, Stavenga DG, Nordström K, Gonzalez-Bellido PT (2017) A Novel Interception Strategy in a Miniature Robber Fly with Extreme Visual Acuity. Curr Biol 27:854-859.

- Wertz A, Borst A, Haag J (2008) Nonlinear Integration of Binocular Optic Flow by DNOVS2, A Descending Neuron of the Fly. *J Neurosci* 28:3131-3140.
- Wiersma CAG, Roach JL, Glantz R. (1982) Neural integration in the optic system. En: *The biology of crustacea*, vol 4. Neural integration and Behavior. (Sandeman D.C., Atwood HL, eds), pp 1-31. New York.
- Wiersma CAG, Yamaguchi T (1966) The neural components of the optic nerve as studied by single unit analysis. *J Comp Neurol* 128:333-358.
- Wiersma CAG, Yanagisawa K (1971) On types of interneurons responding to visual stimulation present in the optic nerve of the rock lobster, *Panulirus interruptus*. *J Neurobiol* 2:291-309.
- Wood HL, Glantz RM (1980) Distributed Processing by Visual Interneurons of Crayfish Brain. I. Response Characteristics and Synaptic Interactions. *J Neurophysiol* 43:741-752.
- Yang E-C, Maddess T (1997) Orientation-sensitive Neurons in the Brain of the Honey Bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* 43:329-336.
- Zeil J, Hemmi JM (2006) The visual ecology of fiddler crabs. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol* 192:1-25.