



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

Sensibilidad visual de neuronas gigantes al tamaño de objetos en movimiento y su relación con el comportamiento de escape en el cangrejo *Neohelice granulata*

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

Lic. Estela Manuela Lanza

Director de Tesis: **Dr. Daniel Tomsic**

Consejero de Estudios: **Dr. Arturo Romano**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroetología.

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (DFBMC-UBA)

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE, UBA-CONICET)

Buenos Aires, 2022

DEDICATORIA

A la memoria del Profesor Héctor Maldonado, quien fundó y dirigió el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria. Le agradezco al Profesor por su valiosísimo legado científico y también por su invaluable legado humano, que persiste en la calidez y el cariño con la que es recordado por quienes han tenido el privilegio de trabajar con él.

También a la memoria de Víctor Lanza, mi padre. A quien le agradezco, entre muchas otras cosas, por haber fomentado la curiosidad que derivó en mi interés por la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A Daniel, por haber confiado en mí para realizar juntos este trabajo.

A todo el personal técnico y administrativo del IFIByNE, incluyendo a los directores del Instituto, por habernos acompañado en el gran desafío que significó la mudanza y por tener en cuenta nuestras necesidades en el diseño y el funcionamiento del nuevo edificio.

A todos los miembros de lo que ha sido el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria, donde comenzó esta Tesis, por sus aportes y su compañía.

A mi familia por ayudarme y acompañarme siempre en todo lo que hago.

A Fer, por sostenerme siempre, por jugar en mi equipo, porque la palabra compañero le queda corta.

A Flor, por enseñarme todos los aspectos de la electrofisiología que no están en los libros, por su compañía, sus consejos y su paciencia.

A Julieta por todos sus aportes durante estos años.

A la Tana, por acompañarme tomando mate, por el ragú, el tiramisú, el nutella y todo lo que hace bien.

A Ale por sus valiosos conocimientos sobre programación y arduinos y por su compañía.

A Carla, a Brian y a Yao por las mejores pescas, la musicalización, los mates con café y tantas otras genialidades.

A Momo por su colaboración en el análisis estadístico y el modelado en R.

Título: Sensibilidad visual de neuronas gigantes al tamaño de objetos en movimiento y su relación con el comportamiento de escape en el cangrejo *Neohelice granulata*.

Resumen

La visión de movimiento provee claves esenciales para una gran variedad de comportamientos. En particular, la detección de movimiento permite obtener información sobre el entorno pudiendo determinar el tamaño, distancia, dirección y velocidad de un objeto en movimiento. Estas características, entre otras, permiten al observador determinar el significado del estímulo. Entender cómo las interacciones y el cableado de una red de células nerviosas recuperan y procesan esa información crítica para luego determinar una respuesta comportamental constituye una meta central en el campo de las neurociencias.

En su hábitat natural *Neohelice granulata* es depredado por gaviotas cangrejeras y otras especies de aves. Frente a depredadores los cangrejos suelen responder desplegando un comportamiento de escape. Por otro lado, esta especie persigue y caza cangrejos más pequeño de su misma especie y del género *Uca*. En condiciones experimentales, se ha visto que el cangrejo *N. granulata* responde al movimiento de objetos grandes con escapes, mientras que objetos pequeños y medianos desplazándose por el suelo evocan persecuciones. Así mismo, se ha visto que, si bien el movimiento de objetos pequeños desplazándose a nivel del suelo evocan persecuciones, el mismo objeto pequeño elevado a 10 cm del suelo evoca respuestas de escape.

En estos cangrejos la actividad de neuronas individuales frente a estímulos visuales que evocan claras respuestas comportamentales puede ser registrada intracelularmente en el animal vivo. Estudios previos indican que neuronas gigantes de la lóbula (LG) comandan las respuestas comportamentales (escape y freezing) frente a estímulos grandes y estímulos de looming, que son considerados estímulos visuales de peligro. Sin embargo, nunca se había evaluado la respuesta fisiológica de las neuronas LG frente a estímulos de tamaños pequeños y medianos, ni a estímulos de diferente elevación, ni tampoco se había investigado si las LG podrían tener un rol en la respuesta predatoria de *N. granulata* o si existen en el cangrejo neuronas especializadas en la detección del movimiento de objetos pequeños como las que se han encontrado en insectos.

En este trabajo de Tesis hemos logrado el objetivo de evaluar frente a estímulos de distinto tamaño y elevación, la respuesta de las 5 clases de neuronas gigantes detectoras de movimiento previamente descritas (MLG1, MLG2, BLG1, BLG2 y LCDC), a la vez que también exploramos las respuestas a estos estímulos de neuronas no identificadas previamente. Además, se utilizó un dispositivo de locomoción simulada o treadmill, que permitió medir la actividad locomotora del animal mientras se lo exponía a los distintos estímulos visuales. Como no es posible hacer registros intracelulares mientras que el animal se mueve en el treadmill, para poder inferir la influencia de cada tipo de LG sobre la respuesta comportamental hemos comparado la respuesta predicha por los modelos estadísticos de cada tipo de neurona para cada estímulo con el modelo que predice la velocidad máxima durante el escape evocada por cada estímulo.

Las principales conclusiones son: A) La actividad de las MLG2 es un buen predictor de la máxima velocidad de escape evocada por cada estímulo. B) Las MLG1 presentan algunas propiedades similares a las de las neuronas hipercomplejas de vertebrados. C) Las neuronas direccionales del complejo lobular (LCDC) son sensibles a la dirección del movimiento de estímulos de todos los tamaños, siempre que se desplacen a la altura del ecuador. D) Existen neuronas que responden con mayor intensidad al movimiento de los objetos pequeños

Palabras clave: visión, cangrejo, *Neohelice granulata*, neuronas de la lóbula, respuesta de escape, respuestas predatorias, toma de decisiones, detección de movimiento.

Subject: Visual sensitivity of giant neurons to the size of moving objects and its relationship to escape behavior in the crab *Neohelice granulata*.

Abstract

Motion vision provides essential cues for a wide variety of behaviors. In particular, motion detection allows obtaining information about the environment, being able to determine the size, distance, direction and speed of a moving object. These characteristics, among others, allow the observer to determine the meaning of the stimulus. Understanding how the interactions and wiring of a network of nerve cells retrieve and process this critical information to then, determine a behavioral response is a central goal in the field of neuroscience.

In its natural habitat, Gulls and other bird species prey upon *Neohelice granulata*. Faced with predators, crabs usually respond by displaying escape behavior. On the other hand, this species pursues and hunts smaller crabs of its own species and of the *Uca* genus. Under experimental conditions, the crab *N. granulata* has shown to respond to the movement of large objects with escapes, while small and medium-sized objects moving along the ground evoke chases. Likewise, it has been seen that, although the movement of small objects moving at ground level evokes chases, the same small object raised 10 cm from the ground evokes escape responses.

In these crabs, the activity of individual neurons against visual stimuli that evoke clear behavioral responses can be recorded intracellularly in the living animal. Previous studies indicate that giant lobula neurons (LG) command behavioral responses (escape and freezing) to large stimuli and looming stimuli, which are considered visual stimuli of danger. However, the physiological response of LG neurons to stimuli of small and medium sizes, or to stimuli of different elevations, had never been evaluated, nor had it been investigated whether LG neurons could play a role in the predatory response of *N. granulata* or if there are neurons in the crab specialized in detecting the movement of small objects like those found in insects.

In this thesis we have achieved the objective of evaluating the response of the 5 classes of previously described movement-detecting giant neurons (MLG1, MLG2, BLG1, BLG2 and LCDC) against stimuli of different sizes and elevations, we also explored the responses of previously unidentified neurons to these stimuli. In addition, a simulated locomotion device or treadmill was used, which allowed to measure the locomotor activity of the animal while it was exposed to different visual stimuli. As it is not possible to make intracellular recordings while the animal moves on the treadmill, in order to infer the influence of each type of LG on the behavioral response, we have compared the response predicted by the statistical models of each type of neuron for each stimulus with the model that predicts the maximum velocity during escape evoked by each stimulus.

The main conclusions are: A) MLG2 activity is a good predictor of the maximum escape velocity evoked by each stimulus. B) MLG1 have some properties similar to those of vertebrate hypercomplex neurons. C) The directional neurons of the lobular complex (LCDC) are sensitive to the direction of movement of stimuli of all sizes, as long as they move at the height of the equator. D) There are neurons that respond more intensely to the movement of small objects.

Keywords: vision, crab, *Neohelice granulata*, lobula neurons, escape response, predatory responses, decision-making, motion detection.

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE.....	6
SECCIÓN 1:	9
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	10
1.1 Desde el procesamiento sensorial hasta el sistema nervioso central	10
1.2 Porqué estudiar sistemas visuales en artrópodos	11
1.3 El cangrejo <i>Neohelice granulata</i>	13
1.4 <i>Neohelice granulata</i> como modelo experimental	15
1.5 El sistema nervioso de <i>N. granulata</i>	16
1.6 El sistema visual de <i>N. granulata</i>	17
1.7 Los Neuropilos Ópticos.....	21
1.8 Neuronas gigantes de la lóbula y del complejo lobular	25
1.9 Clasificación de las neuronas gigantes de la lóbula y del complejo lobular	27
1.10 El circuito visual de artrópodos.....	28
1.11 La visión del movimiento	31
1.12 La fisiología detrás de la respuesta de escape de <i>Neohelice</i>	33
1.13 La fisiología detrás de la detección de objetos pequeños	35
1.14 Resumen de antecedentes.....	38
1.15 Hipótesis General y Objetivos	39
SECCIÓN 2: MATERIALES Y METODOS	40
2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1 Animales.....	41
2.2 Preparación electrofisiológica.....	41
2.3 Dispositivo experimental para electrofisiología.....	44
2.4 Protocolo de registro y estimulación para electrofisiología	46
2.5 Identificación de neuronas LG.....	47
2.6 Estímulos visuales de movimiento en experimentos de electrofisiología	48
2.7 Análisis de los registros de electrofisiología	50
2.8 Dispositivo experimental para medir la respuesta visuomotora	50
2.9 Adquisición y procesamiento de los datos de la actividad locomotora.....	52
2.10 Protocolo experimental para medir la respuesta visuomotora	53
2.11 Estímulos visuales de movimiento para medir la respuesta visuomotora	54

2.12	Análisis estadístico	55
SECCIÓN 3: RESULTADOS		58
3	MLG1: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación.	59
3.1	Antecedentes sobre Neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula Tipo 1	59
3.2	Descripción de la Muestra.....	61
3.3	Análisis estadístico	65
3.4	Perfil de respuesta de las neuronas del tipo MLG1 predicha por el modelo.....	67
4	MLG2: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación.	70
4.1	Antecedentes sobre Neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula Tipo 2	70
4.2	Descripción de la Muestra.....	71
4.3	Análisis estadístico de los datos.....	74
4.4	Perfil de respuesta de las neuronas del tipo MLG2 predicha por el modelo.....	76
5	BLG1: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación	80
5.1	Antecedentes sobre Neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula de Tipo 1.....	80
5.2	Descripción de la Muestra.....	81
5.3	Análisis estadístico de los datos	83
5.4	Perfil de respuesta de las neuronas BLG1 predicho por el modelo	85
6	BLG2: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación	89
6.1	Antecedentes sobre Neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula de Tipo 2.....	89
6.2	Descripción de la Muestra.....	90
6.3	Análisis estadístico de los datos	92
6.4	Perfil de respuesta de las neuronas BLG2 predicho por el modelo	94
7	Respuesta comportamental del cangrejo <i>Neohelice granulata</i> frente a estímulos de distintos tamaños y elevación.....	98
7.1	Tratamiento de los datos	99
7.2	Análisis estadístico de los datos.....	101
7.3	Perfil de la respuesta comportamental predicha por el modelo	102
8	Correspondencias entre el comportamiento y la fisiología	104
8.1	Respuesta fisiológica de las LG en el monitor derecho.....	104
8.2	Análisis de la correlación.....	107
8.3	La actividad de las LG como predictor de la velocidad máxima de escape	107
9	Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas LCDC a estímulos de diferente tamaño y elevación.	110

9.1	Antecedentes sobre las Neuronas Direccionales del Complejo Lobular	110
9.2	Descripción de la Muestra.....	111
9.3	Análisis estadístico de los datos	115
10	Neuronas candidatas a detectoras de movimiento de objetos pequeños	119
10.1	Neurona que responde preferencialmente al movimiento de objetos pequeños ...	119
10.2	Neurona con CR excitatorio e inhibitorio y alta respuesta al movimiento de objetos pequeños sobre el ecuador.....	122
10.3	Neurona con alta respuesta al movimiento de objetos pequeños.....	126
10.4	Neurona con CR acotado y alta respuesta al movimiento de objetos pequeños bajo el ecuador	128
11	Neuronas no identificadas con respuestas Inhibitorias.....	130
11.1	Descripción de la Muestra.....	130
11.2	Perfil de Rta. De las neuronas del Grupo 1 en el monitor donde hubo respuestas inhibitorias	131
11.3	Perfil de Rta. de las neuronas del Grupo 2 en el monitor donde se dio la máxima inhibición.....	133
11.4	Análisis estadístico de los datos de las neuronas del grupo 2	135
SECCIÓN 4: CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN		138
Sensibilidad de las neuronas LG al tamaño y elevación de objetos en movimiento		139
Respuesta comportamental del cangrejo <i>Neohelice granulata</i> frente a estímulos de distintos tamaños y elevación.....		142
Respuestas fisiológicas de las LG y su influencia en el comportamiento		144
La actividad de las MLG2 es un buen predictor de la máxima velocidad evocada por cada estímulo.....		144
Las MLG1 presentan algunas propiedades similares a las neuronas hipercomplejas		145
La respuesta de las neuronas BLG2 decae gradualmente con el tamaño del estímulo....		149
Perfil de respuesta de las BLG1		150
Las neuronas direccionales (LCDC) son sensibles a la dirección del movimiento de estímulos de todos los tamaños, siempre que se desplacen del ecuador		151
La detección de objetos pequeños en <i>N. granulata</i>		152
Perspectivas futuras.....		155
Bibliografía		156

SECCIÓN 1: INTRODUCCIÓN GENERAL



1 INTRODUCCIÓN GENERAL

"Todo nuestro conocimiento arranca del sentido,
pasa al entendimiento y termina en la razón."
Immanuel Kant.

1.1 Desde el procesamiento sensorial hasta el sistema nervioso central

Todos los organismos vivos dependen de información sobre su medio externo e interno. Para garantizar la homeostasis es necesario monitorear los cambios en el medio interno asegurando la adecuada regulación de los procesos metabólicos. Para lograrlo los seres vivos cuentan con sistemas de *feedback* que incluyen sensores que detectan cambios en un estímulo y órganos efectores que deben responder de manera rápida a estos cambios. De igual importancia es la adquisición de información del mundo exterior que permite responder a los cambios del ambiente.

La necesidad de responder a los cambios en el medio externo surgió muy temprano en la historia de la vida, siendo la quimio-recepción el sentido más antiguo desde el punto de vista evolutivo. Está presente en organismos tan simples como las bacterias, que son capaces de detectar y responder a sustancias específicas de su ambiente con comportamientos quimiotáxicos (Matilla & Krell, 2017). Por tanto, los mecanismos básicos de la percepción ya estaban presentes incluso antes del surgimiento de los metazoos.

La transición Ediacárico-Cámbrico es uno de los períodos más estudiados en la historia de la vida, caracterizado por los profundos cambios ambientales y biológicos asociados a la radiación adaptativa de los organismos con simetría bilateral. Estos cambios incluyen el advenimiento de la depredación macroscópica, un aumento en el tamaño y el contenido energético de los organismos y la proliferación de animales nectónicos. El efecto general de estas transiciones fue un notable aumento de la complejidad del medio marino. Según la Teoría de la Información del Paisaje (Plotnick et al., 2010) esta mayor complejidad espacial, a su vez, impulsó la aparición de órganos sensoriales macroscópicos en los bilaterales móviles. Hubo un aumento en el contenido de información del medio marino acompañado por un incremento en la necesidad y luego en la capacidad de los organismos metazoos de obtener y procesar esta información. Esto condujo al desarrollo de sistemas nerviosos que permitieran analizar esta información y actuar en base a ella, así las células nerviosas disgregadas formaron ganglios y sistemas de ganglios. Si bien el tejido nervioso, al igual que otros tejidos blandos, no fosiliza fácilmente; los fósiles más antiguos donde se aprecia el sistema nervioso datan del cámbrico. El

más antiguo y completo descubierto hasta la fecha pertenece a *Chengjiangocaris kunmingensis*, un artrópodo primitivo que vivió hace 520 millones de años (Jie et al., 2016). Este protoartrópodo tenía un cordón nervioso con ganglios espaciados, cada uno de ellos asociados a un par de patas.

Monk y Paulin (Monk & Paulin, 2014) vinculan la evolución de las neuronas a la evolución de la depredación entre animales. El registro fósil sugiere que los animales desarrollaron sistemas nerviosos poco después del advenimiento de la depredación macroscópica, hace 550 millones de años. Los animales precámbricos eran mayoritariamente filtradores, con cuerpos blandos y simples. En los subsiguientes 20 millones de años vemos apariciones de muchas innovaciones, incluyendo los ojos. Animales simples e indefensos habían desarrollado armas y armaduras (valvas, órganos perforadores, mandíbulas, dientes, espinas). La evidencia fósil directa e indirecta más temprana de los sistemas nerviosos se remonta a esta época, lo que sugiere que el origen de las neuronas capaces de generar P.A puede ser explicado por la necesidad de tomar decisiones inmediatas bajo la amenaza inminente de ser comido o de la oportunidad transitoria de atacar a una presa. Las primeras neuronas sensoriales podrían haber actuado como detectores de proximidad de otros animales que disparaban (dado un cierto umbral) desencadenando acciones como atacar o huir, en el momento preciso.

1.2 Porqué estudiar sistemas visuales en artrópodos

Los artrópodos son muy diversos, casi el 80% de las especies animales pertenecen a este phylum (Brusca, 1990; Wilson, 1988). Los artrópodos ofrecen muchas oportunidades para la investigación neurocientífica. La complejidad en su comportamiento y sus sistemas nerviosos de fácil acceso los convierte en excelentes modelos tanto para experimentos de laboratorio como para estudios de campo. Los crustáceos, los hexápodos (principalmente insectos) y los quelicerados se han utilizado ampliamente en la investigación neurobiológica (ver Strausfeld, 2012). Durante muchas décadas, el sistema nervioso de los artrópodos ha proporcionado nuevos conocimientos sobre los mecanismos de procesamiento visual. A pesar de que comúnmente se etiquetan como "simples", la evidencia sugiere que algunos artrópodos tienen cerebros notablemente complejos.

Aunque los antepasados de los artrópodos y nosotros, los mamíferos, nos separamos hace más de 600 millones de años, nuestro genoma, plan corporal y estructura básica del sistema nervioso comparten similitudes sorprendentes. Es interesante notar cuántas funciones son compartidos entre los sistemas nerviosos de artrópodos y vertebrados: Su desarrollo está impulsado por genes homólogos; los canales iónicos son similares en neuronas de artrópodos y vertebrados;

en ambos casos, las neuronas se comunican entre sí a través de sinapsis, químicas o eléctricas (que también son producto de genes homólogos), expresan los mismos neurotransmisores e incluso la segmentación del SNC (cerebro y cordón nervioso) comparte una organización general en ambos taxa (Smarandache-Wellmann, 2016).

Muchos conceptos universales de las neurociencias se descubrieron en artrópodos, como la función inhibitoria del neurotransmisor GABA (Kravitz et al., 1962), los mecanismos de la sinapsis eléctrica (Furshpan & Potter, 1959), la organización de sustratos neuronales involucrados en la toma de decisiones conductuales (Herberholz & Marquart, 2012), la detección de coincidencias como mecanismo para desencadenar respuestas conductuales (Revisión en Edwards et al., 1999) y los mecanismos neuronales y moleculares de la formación y consolidación de la memoria a largo plazo (Bierbower et al., 2013; Davis, 2011; Eisenhardt, 2014; Menzel & Erber, 1978; Pedreira & Maldonado, 2003). A su vez, la investigación sobre artrópodos ha proporcionado ejemplos de adaptaciones neuronales únicas, sin paralelo en los vertebrados. Las soluciones neuronales que se encuentran en los artrópodos han inspirado soluciones en los campos de la ingeniería, la robótica y la neurociencia computacional. Por ejemplo, el estudio del comportamiento y la neurofisiología de langostas de tierra (Fotowat & Gabbiani, 2007; Rind & Bramwell, 1996; Sobel, 1990) ha llevado al desarrollo de algoritmos para evitar colisiones (Fu et al., 2021; Hartbauer, 2017); experimentos en donde abejas reconocían a objetos por su altura (Srinivasan et al., 1989) han inspirado el diseño de robots capaces de navegar en entornos con obstáculos (Franceschini et al., 1992); el estudio de abejas volando a través de túneles (Srinivasan et al., 1996) ha dado lugar al desarrollo de algoritmos que le permiten a los robots navegar por pasillos utilizando el procesamiento de imágenes (Argyros et al., 2004; Sandini et al., 1993; Santos-Victor et al., 1993) y el estudio del comportamiento exploratorio de crayfish ha posibilitado el desarrollo de nuevos algoritmos de navegación y mapeo espacial (Heußlein et al., 2010; Volz et al., 2012).

El procesamiento de la información visual de los artrópodos también comparte varias características con el de los mamíferos; por ejemplo, el algoritmo computacional para la detección de movimiento en insectos y humanos comparten algunas características: la información de movimiento se extrae de la información visual primaria en vías paralelas ON y OFF; en cada vía, el proceso de detección de movimiento elemental implica la correlación de señales con diferentes dinámicas temporales; y la información de movimiento primaria de ambas vías converge, lo que da como resultado cuatro grupos de neuronas selectivas para las cuatro direcciones cardinales (Adelson & Bergen, 1985; Borst & Helmstaedter, 2015; Joesch et al., 2010; Reichardt, 1987).

Hace ya más de un siglo Santiago Ramón y Cajal argumentó que los sistemas visuales de vertebrados y moscas tienen el mismo plan basal en lo que respecta a la organización nerviosa (Cajal & Sanchez, 1915). En su comparación Cajal redibujó a las células monopolares de la mosca reubicando los somas, y así transformándolas en neuronas bipolares retinianas de vertebrado. Desde entonces, estudios estructurales han revelado que, ambos tipos de neuronas, en la lámina de la mosca y en la capa plexiforme de la retina de vertebrado, reciben su input de las células fotorreceptoras mediante sinapsis de tipo ribbon (Meinertzhagen, 1993).

1.3 El cangrejo *Neohelice granulata*

El cangrejo *Neohelice granulata* (Dana, 1851), previamente conocido como *Chasmagnathus granulatus*, es un cangrejo semiterrestre excavador que se encuentra en la zona intermareal de estuarios, marismas y manglares del Atlántico sur del continente americano. La especie habita desde el Golfo San José, norte de la Patagonia, Argentina (42°25'S; 64°36'W), hasta Lagoa Araruama, Río de Janeiro, Brasil (22°57'S; 42°50'W) (Spivak, 2010). Su taxonomía se detalla en la **TABLA 1**.

N. granulata tiene un ciclo de vida complejo, con formas plantónicas en sus primeros estadios (4 o 5 estadios de zoea, dependiendo de las condiciones ambientales y un estadio de megalopa), los adultos son bentónicos y son activos tanto en tierra como en agua. El ancho del cuerpo del adulto es de entre 16 y 20 mm en promedio, los machos pueden llegar a medir más de 35 mm de ancho (Angeletti & Cervellini, 2015). Esta especie habita en regiones con características muy dinámicas y enfrenta cambios drásticos de salinidad (0 a 60 psu), altitud de mareas (pocos centímetros a 9 m), temperaturas y factores bióticos (disponibilidad de alimento y presencia de depredadores)(Rodríguez & Luppi, 2020).

Estos cangrejos excavan cuevas semi-permanentes en el barro, dentro de regiones densamente pobladas llamadas cangrejales (Spivak, 1997). Los cangrejos utilizan sus cuevas para protegerse de la acción de las olas, de las temperaturas extremas y para prevenir la desecación (Angeletti et al., 2018). Las cuevas son importantes reservorios de agua, ya que en tierra *Neohelice granulata* necesita renovar el agua utilizada para la respiración (Escapa et al., 2007). Además, estas estructuras les proveen de refugio contra el ataque de los predadores aéreos y terrestres durante los periodos de marea baja y protegen del ataque de predadores acuáticos durante los periodos de marea alta. Las cuevas son también el sitio donde ocurren dos importantes eventos en la vida de los cangrejos como las mudas y la reproducción (Angeletti et al., 2018).

N. granulata tiene hábitos alimenticios variados, se lo considera omnívoro (Lancia et al., 2014). Esta especie es capaz de alimentarse de cangrejos más pequeños de su propia especie y también de cangrejos violinistas de la especie *Uca uruguayensis* (Bas et al., 2019; Daleo et al., 2003).

Existe cierto grado de dimorfismo sexual, los machos tienen quelas notablemente más grandes que las hembras, además el abdomen de las hembras es notablemente más ancho y está preparado para portar los huevos hasta la eclosión (**FIGURA 1**).



Figura 1: A. Espécimen macho de *Neohelice granulata*. B. Espécimen hembra de *Neohelice granulata*, existe cierto grado de dimorfismo sexual, las quelas de las hembras son notoriamente más pequeñas. C. Estos cangrejos excavan cuevas que usan como refugio. D. *N. granulata* es presa de gaviotas y otras aves. E. Este cangrejo es capaz de preda cangrejos más pequeños de su propia especie y de la especie *Uca Uruguayensis*. F. Habitan en regiones densamente pobladas llamadas cangrejales.

Taxonomía de *Neohelice granulata*

Filum	Arthropoda
Subfilum	Crustacea
Clase	Malacostraca
Subclase	Eumalacostraca
Superorden	Eucarida
Orden	Decapoda
Suborden	Pleocyemata
Infraorden	Brachyura
Sección	Eubrachyura
Subsección	Thoracotremata
Superfamilia	Grapsoidea
Familia	Varunidae
Subfamilia	Cyclograpsinae
Género	<i>Neohelice</i>
Especie	<i>N. granulata</i>

Tabla 1 - Taxonomía de *Neohelice granulata*

1.4 *Neohelice granulata* como modelo experimental

N. granulata se ha convertido en la actualidad en una de las especies de cangrejos más estudiadas a nivel mundial, después de otras 5 especies (*Carcinus maenas*, *Callinectes sapidus*, *Scylla serrata*, *Cancer pagurus* y *Cancer magister*), y puede ser considerado como un modelo animal emergente para investigaciones relacionadas con la bioquímica, fisiología y ecología (Spivak, 2010).

Un análisis bibliométrico reveló que desde 1985 hasta 2018 ha habido 571 publicaciones sobre esta especie. El 51% se ocupaba de aspectos ecológicos (ecología de comunidades y ecosistemas, ecotoxicología, ciclo de vida, comportamiento y parasitología), mientras que el 45% se dedicaba a biología general y neurofisiología (Rodríguez & Luppi 2020).

En el campo de la neurobiología, el profesor Héctor Maldonado y sus discípulos pusieron a prueba a *Neohelice granulata* en varios paradigmas de aprendizaje, demostrando la capacidad de este cangrejo para adquirir y retener diferentes tipos de memoria. En esta línea de investigación, *N. granulata* ha sido y continúa siendo el sujeto experimental en estudios relacionados con dos áreas: la neurobiología del aprendizaje y la memoria y el control neuronal de comportamientos guiados por la visión (Para revisiones ver Tomsic & Romano, 2013 y Tomsic & Maldonado, 2014).

En cuanto al abordaje neurofisiológico de los comportamientos guiados por la visión, los crustáceos decápodos, en particular los cangrejos semiterrestres, ofrecen ventajas particulares (Tomsic & Sztarker, 2019). La accesibilidad a regiones del cerebro del cangrejo en donde se procesa la información visual (y de otras modalidades), la presencia de neuronas gigantes y el exoesqueleto duro del animal que permite sostenerlo firmemente sin dañarlo, brindan la posibilidad de realizar registros electrofisiológicos intracelulares estables en el animal despierto y prácticamente intacto (Berón de Astrada & Tomsic, 2002). Además, al ser una especie adaptada a ambientes altamente variables, *N. granulata* tiene mecanismos contra la desecación que lo predisponen para las condiciones experimentales (Tomsic & Sztarker, 2019). A diferencia de otros modelos animales, en esta especie las respuestas de neuronas individuales a estímulos visuales pueden ser investigadas con registros intracelulares en condiciones donde esos estímulos son percibidos por el animal en su total integridad. Esto hace posible evaluar el funcionamiento de neuronas individuales en el contexto donde naturalmente operan (i.e. dentro del animal intacto), lo cual es relevante para comprender los mecanismos neuronales que subyacen al comportamiento.

Además, *Neohelice granulata* presenta comportamientos robustos evocados visualmente, tanto el comportamiento de escape como el de persecución de presas pueden ser evocados y medidos fácilmente en condiciones experimentales de laboratorio (Gancedo et al., 2020).

1.5 El sistema nervioso de *N. granulata*

El sistema nervioso central de los decápodos consta de 3 regiones principales: Los ganglios de los lóbulos ópticos, el ganglio supra esofágico y los ganglios torácicos (**FIGURA 2**).

El ganglio supra esofágico tiene funciones relacionadas con el procesamiento de la información sensorial y la integración multimodal. Además, tiene un rol importante en el aprendizaje y la formación de memorias (Freudenthal & Romano, 2000; Hepp et al., 2016). Este ganglio contiene varios neuropilos, los más fáciles de localizar a simple vista son los olfativos. Estos están situados uno a cada lado del ganglio supra esofágico. Otra estructura que cabe mencionar son los lóbulos accesorios, estos son centros de alto procesamiento que reciben información visual, olfatoria y mecanosensorial, están involucrados en la exploración multimodal del medio ambiente (Sandeman et al., 2014).

El ganglio supra esofágico se conecta con los ganglios torácicos y los ganglios comisurales a través de los conectivos circunmesofágicos. Los ganglios comisurales inervan el sistema digestivo, mientras que los ganglios torácicos inervan principalmente el corazón, los pleómeros y las extremidades.

Los lóbulos ópticos se conectan con el ganglio supra esofágico a través del tracto protocerebral y el nervio oculomotor. Los lóbulos ópticos incluyen al protocerebro lateral y a los 4 neuropilos ópticos: la lámina, la medula, la lóbula y la lóbula plate (Sztarker et al., 2005), los neuropilos ópticos se detallarán más adelante.

El protocerebro lateral contiene varios neuropilos, dos de ellos, los cuerpos hemielipsoides y la médula terminal, son considerados centros de alto procesamiento. Estos neuropilos no muestran entradas directas de las fibras sensoriales primarias y no tienen salidas directas a las neuronas motoras (Sandeman et al., 2014). La médula terminal recibe información del tracto olfatorio globular, el tracto protocerebral, los neuropilos ópticos y los cuerpos hemielipsoides (Blaustein et al., 1988; Sandeman et al., 2014). Los cuerpos hemielipsoides se consideran un centro de alto procesamiento relacionado con la memoria, homólogo a los mushroom bodies de los insectos y análogo a la arquicorteza (o corteza del lóbulo límbico) de los vertebrados (Maza et al., 2016; Wolff & Strausfeld, 2015).

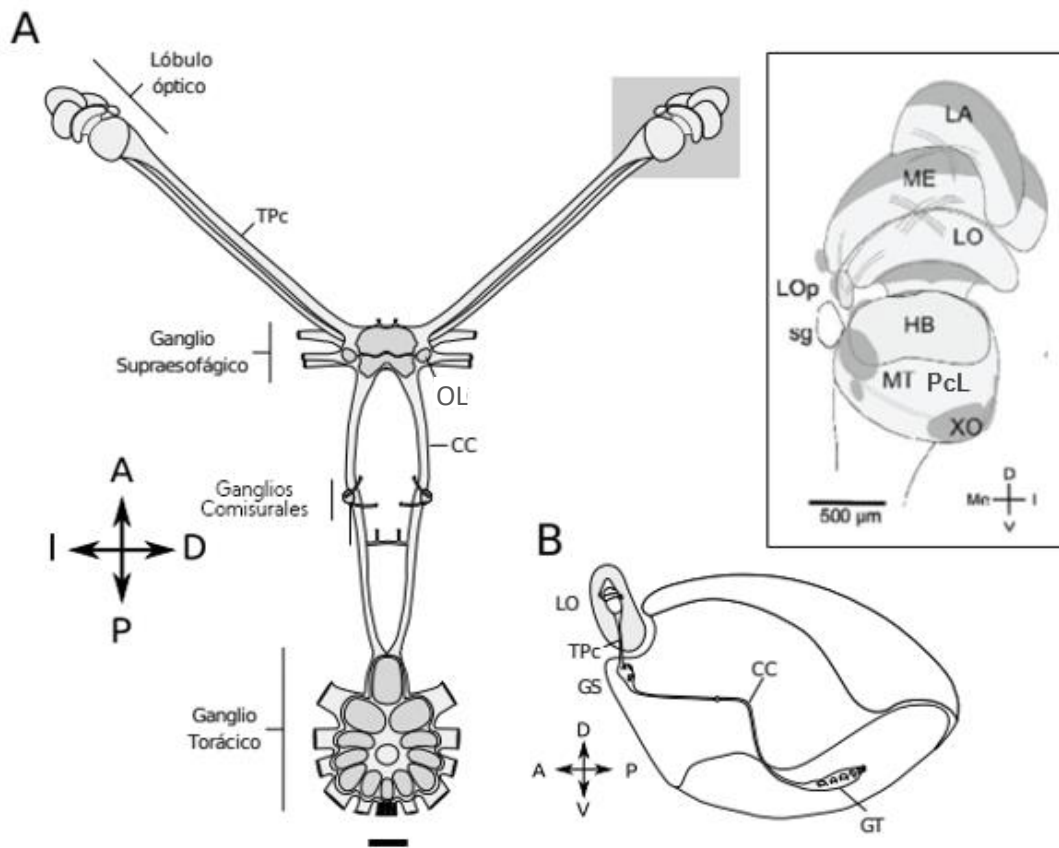


Figura 2. Sistema nervioso de *Neohelice granulata*. (A). Esquema de los principales ganglios del sistema nervioso del cangrejo. El mismo se compone de dos lóbulos ópticos, un ganglio supraesofágico (GS), en el que se señala el lóbulo olfatorio (OL) y un ganglio torácico (GT) ubicados dentro del cefalotórax. Escala: 2 mm. Inset: El lóbulo óptico está compuesto por cuatro neuropilos ópticos: lámina (La), Médula (Me), Lóbula (Lo), Lobula plate (LoP) y el protocerebro lateral (PcL), este último contiene a los cuerpos hemielipsoides (HB) y a la médula terminalis (MT). También se señalan el Órgano X (XO) y la glándula del seno (SG). Los clústeres de somas están coloreados de gris. (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) (que va acompañado del nervio oculomotor) con el ganglio supraesofágico ubicado dentro del cefalotorax, desde este proyectan los conectivos circumesofágicos (CC) hasta el ganglio torácico (GT). D: Dorsal, V: Ventral, P: Posterior, A: Anterior, I: Izquierda, D: Derecha. Modificado de Hepp et al., 2013 y Maza et al., 2016.

1.6 El sistema visual de *N. granulata*

Ojos y retina

Esta especie cuenta con ojos compuestos de aposición. Los ojos compuestos se componen de unidades llamadas omatidios. Cada omatidio contiene una lente, 8 fotorreceptores y células pigmentarias. En el eje central de cada omatidio, los fotorreceptores forman colectivamente un cono translucido llamado rabdómero rodeado por células pigmentarias primarias y secundarias (**FIGURA 3**). En cada omatidio la lente enfoca la luz en dirección al rabdómero, la luz proveniente de cualquier dirección no paralela al eje del rabdómero es absorbida por las células pigmentarias que lo rodean. De los 8 fotorreceptores, 7 (R 1-7) proyectan sus axones hasta la lámina (primer neuropilo óptico), mientras que el octavo (R8) proyecta directamente hacia la médula (segundo neuropilo óptico) (Alkaladi et al., 2013; Sztarker et al., 2005). En decápodos, los R 1-7

generalmente expresan pigmentos cuyos máximos de absorción se encuentran entre el azul y el verde, el R8 suele expresar pigmentos sensibles a ondas más cortas, entre el UV y el violeta. Esto se ha observado en varias especies de cangrejos (Cronin & Forward, 1988; Forward et al., 2004; Martin & Mote, 1982), en crayfish (Cummins & Goldsmith, 1981), en langostas de mar (Cummins et al., 1984) y camarones (Cronin & Frank, 1996).

A diferencia del ojo compuesto de los insectos, los ojos de los cangrejos se encuentran situados sobre pedúnculos móviles (**FIGURA 4**). En el caso de *N. granulata*, el adulto cuenta con aproximadamente 9000 omatidios en cada ojo (Berón de Astrada et al., 2012). Los omatidios se distribuyen todo alrededor de la punta del pedúnculo ocular, excepto por un área estrecha de cutícula ubicada hacia el lado medial del animal, de modo que cada ojo cuenta con un campo visual casi completo en el plano azimutal.

La resolución de la retina de *Neohelice* no es uniforme, sus ojos poseen una banda horizontal de mayor agudeza visual todo alrededor del ecuador en complemento con una zona de alta resolución en el lado lateral del ojo ((Berón de Astrada et al., 2012). Estas zonas de mayor resolución son adaptaciones al ambiente plano en el que habita esta especie y a los comportamientos del animal (Tomsic et al., 2017).

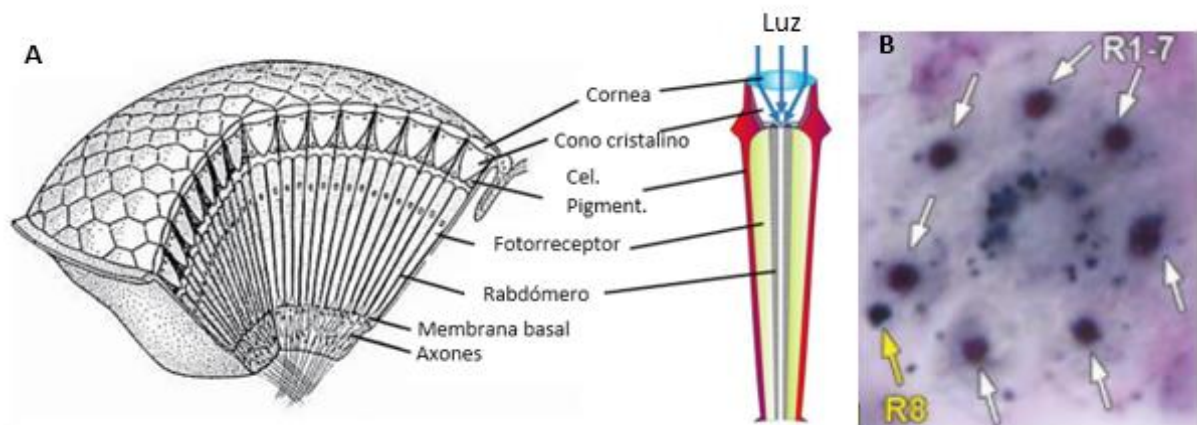


Figura 3 : **A** Esquema del ojo compuesto de los artrópodos con un detalle del omatido y sus elementos constitutivos, modificado de Land & Nilsson, 2012. **B** Tinción Bodian de corte tangencial de un omatidio a la altura de los somas de los fotorreceptores de *N. granulata* (tomada de Sztarker, 2006). Los fotorreceptores del 1 al 7 se encuentran rodeando el rabdómero, mientras que el R8 presenta una posición marginal y es más pequeño.



Figura 4 Los ojos de los cangrejos se encuentran situados sobre pedúnculos móviles. Sobre la retina se observa la pseudopupila, donde las omatidias colineales al observador se ven oscurecidas porque absorben luz incidente.

Especializaciones de la retina y su relación con el ambiente y la organización del comportamiento.

Si bien estos cangrejos pueden desplazarse en todas las direcciones respecto a su eje longitudinal, la dirección preferida para correr a mayor velocidad es de lado, es decir, a 90° respecto al eje longitudinal del cuerpo. Tanto en *N. granulata* como en cangrejos *Uca* se ha visto que rotan el cuerpo para fijar y mantener a los estímulos de peligro en la fóvea del polo lateral (región de máxima agudeza visual) (Land & Layne, 1995), especialmente en circunstancias en las que no disponen de sus cuevas (Hemmi & Tomsic, 2015). Por lo tanto, el aumento de resolución en el lado lateral del ojo podría ayudar al animal a controlar con precisión su escape (Smolka & Hemmi, 2009). Recientemente se ha visto que *N. granulata* también utiliza esta zona de alta resolución en la persecución de presas, rotando el cuerpo para fijar dummies pequeños durante la persecución hasta encontrarse lo suficientemente cerca de la presa para atacar (Gancedo et al., 2020). En otro tipo de comportamientos, como por ejemplo cuando confrontan con otro individuo, los cangrejos suelen fijar visualmente a su oponente en la región frontal y rotan para mantenerlo en esa posición, indicando así la existencia de otro punto de fijación. La fijación en

el polo lateral o frontal depende del tipo de estímulo visual que experimenta el animal y por lo tanto del tipo de comportamiento evocado.

Como ya se mencionó, los cangrejos *Neohelice* y *Uca* poseen una banda horizontal de mayor resolución visual vertical alrededor del ecuador del ojo. Estos cangrejos mantienen activamente la banda de alta resolución alineada con el horizonte y se ha visto que inclinan sus pedúnculos oculares para compensar los cambios posturales, como ocurre también en otras especies de cangrejos que habitan ambientes similares (Layne et al., 1997). Por otro lado, los cangrejos estabilizan el flujo panorámico que se genera durante sus desplazamientos mediante el movimiento de los pedúnculos en el plano horizontal. Sin embargo, el movimiento de los pedúnculos no es utilizado para la fijación de objetos. Estos animales fijan a los objetos en el polo lateral de alguno de sus ojos o en la parte frontal mediante la rotación de todo el cuerpo (Land & Layne, 1995).

Los cangrejos del género *Uca* usan la posición de los objetos en relación con el horizonte para distinguir a los potenciales depredadores, es decir, solo escapan de los estímulos visuales presentados sobre el horizonte (Layne et al., 1997). En un mundo plano, como las marismas, la distancia a la que se encuentra un determinado objeto en contacto con el suelo está codificada en su posición en la retina. Para un objeto de una determinada altura, cuanto más lejos esté del observador, más cerca se verá de la línea del horizonte visual. Además, todo lo que sea más grande que el cangrejo se verá por encima del horizonte visual y cuanto mejor sea su resolución vertical, mejor se podrá realizar esta discriminación (Zeil & Al-Mutairi, 1996; Zeil & Hemmi, 2019), ver **FIGURA 5** y **FIGURA 6**. *Neohelice* parece también utilizar la misma regla, se ha visto que el mismo dummy pequeño puede desencadenar un escape si se presenta sobre el horizonte, o una persecución si se presenta debajo del horizonte (Tomsic et al., 2017).

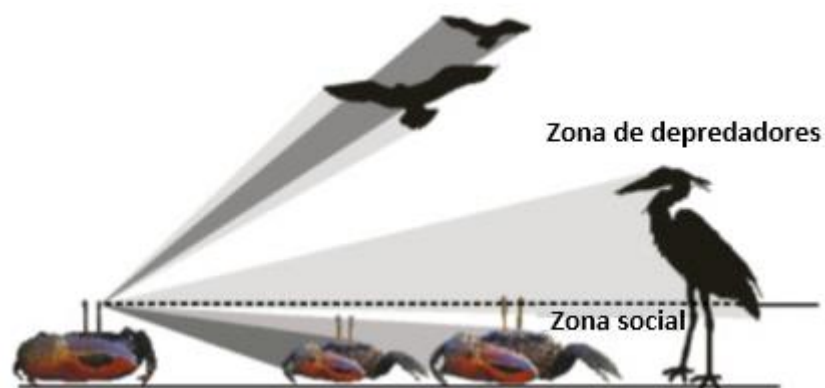


Figura 5. Al habitar un ambiente plano, los cangrejos del género *Uca* usan la posición de los objetos en relación con el horizonte para distinguir a los potenciales depredadores. Modificado de (Zeil & Hemmi, 2006).



Figura 6. Neohelice granulata habita en marismas, en este ambiente llano la información visual de movimientos más rica está cercana al horizonte visual y la dirección preponderante de los movimientos ocurren en el eje horizontal (Medan et al. 2015, Tomsic et al., 2017).

1.7 Los Neuropilos Ópticos

Los cuatro neuropilos ópticos (lámina, médula, lóbula y lóbula plate) mantienen una organización retinotópica. La organización es columnar, cada columna representa una unidad de muestreo de la retina, es decir, un omatidio. Los 8 fotorreceptores de cada omatidio forman un paquete de axones que dará origen a cada columna visual que atraviesa los ganglios ópticos. De esta forma, los puntos vecinos del campo visual se encuentran representados a nivel neuronal en columnas visuales vecinas (Berón De Astrada et al., 2011; Strausfeld & Nässel, 1980). Además de la organización columnar, los neuropilos ópticos presentan estratos formados por procesos tangenciales de neuronas que colectan información de las neuronas columnares y modulan la información visual y de otras modalidades (szarker et. al, 2006).

Existen dos quiasmas, el primero entre la lámina y la medula, donde se produce una inversión en el eje lateromedial. El segundo quiasma se encuentra entre la medula y la lóbula, donde se produce una inversión en el eje anteroposterior (**FIGURA 7**).

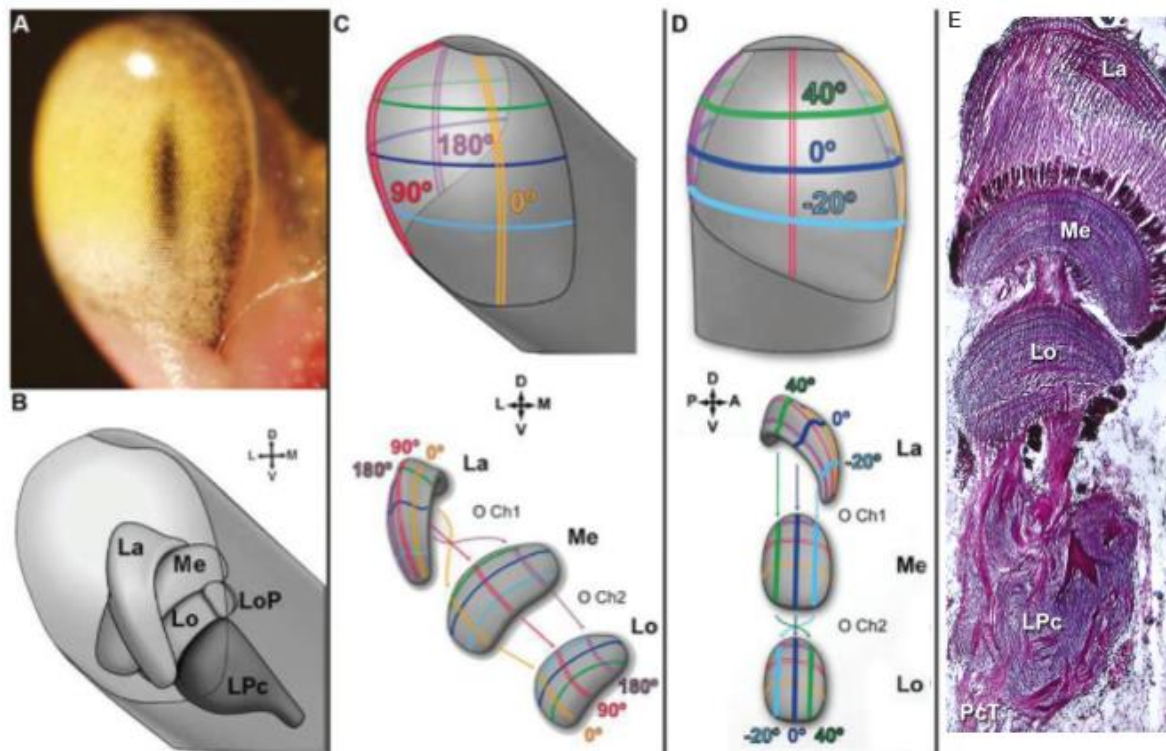


Figura 7 A. Fotografía del ojo derecho de *Neohelice*, vista anterior. B. Organización de los neuropilos ópticos dentro del pedúnculo ocular. Lámina (La), médula (Me), lóbula (Lo) y lóbula plate (LoP), protocerebro lateral (LPc). C y D. Mapas visuales de los neuropilos ópticos del cangrejo vistos en una vista frontal (C) y una vista lateral (D). Las líneas de color verticales representan las posiciones de los meridianos a lo largo de la retina a 0° (amarillo), 90° (rojo) y 180° (violeta), mientras que las líneas horizontales representan las posiciones de elevación en el ecuador del ojo (azul) y 40° por encima (verde) y 20° por debajo del ecuador (azul claro). Los cangrejos tienen dos quiasmas, el primero situado entre la lámina y la médula (CH 1) y el segundo, ubicado entre médula y lóbula (CH 2). A, B, C y D Modificadas de Astrada et al., 2012. E. Tinción de Bodian del lóbulo óptico que muestra la disposición columnar retinotópica de La, Me y Lo (la LoP no se ve en esta vista), también se observa el protocerebro lateral (LPc) y su tracto descendente (PcT) tomada de Tomsic et al., 2017.

Lámina

La lámina es el neuropilo más cercano a la retina y ha sido estudiada en detalle en *N. granulata* (Sztarker et al., 2005, 2009) y también en otros decápodos (Glantz et al., 2000; Hafner, 1973; Hafner, 1974; Kleinlogel et al., 2003; Nässel, 1975; Nässel, 1977; Strausfeld & Nässel, 1980; Wang-Bennett et al., 1989).

Este neuropilo está conformado por columnas visuales que son intersectadas por tres estratos: un estrato plexiforme y dos estratos conformados por procesos tangenciales (el distal y el proximal), donde se integra y se modula la información de columnas vecinas (Sztarker et al., 2005). Los somas de las neuronas de la lámina se encuentran mayoritariamente ubicados sobre este neuropilo y en su periferia (Sztarker et al., 2005).

En el estrato plexiforme arborizan las terminales de los fotorreceptores (excepto los R8) y también arborizan las dendritas de las neuronas columnares (neuronas monopolares y neuronas

T) que llevan información desde la lámina a la médula, que es el segundo neuropilo óptico. A su vez, las neuronas centrífugas traen información desde la médula (Glantz et al., 2002; Sztarker et al., 2009).

Las neuronas columnares más abundantes son las monopolares. Existen varios subtipos de neuronas monopolares. Cinco de estos subtipos de neuronas monopolares están presentes en todas las columnas visuales, lo que sugiere que la información visual es procesada en paralelo en al menos 5 canales (Sztarker et al., 2009). Algunos subtipos de células monopolares que se encuentran en *Neohelice* también se encuentran en insectos adaptados a bajas intensidades de luz. Estos subtipos se caracterizan por sus amplias arborizaciones, relacionadas con la sumación espacial (Theobald et al., 2006). La presencia de estos subtipos neuronales en *Neohelice* se ha interpretado como una adaptación al hecho de que parte de sus actividades se llevan a cabo bajo aguas turbias (Sztarker et al., 2009).

Existen células amácrinas en la lámina, que son neuronas sin axones que abarcan varias columnas y presentan procesos pre y post sinápticos (Sztarker et al., 2009). Estas neuronas son responsables de la inhibición lateral entre las terminales de fotorreceptores (Glantz & Bartels, 1994; Glantz et al., 2000).

Médula

La médula es el segundo neuropilo óptico, situado río abajo de la lámina y del primer quiasma óptico. La medula ha sido descrita en Crayfish (Strausfeld & Nässel, 1980) y con más detalle en *N. granulata* (Sztarker & Tomsic, 2014). Este neuropilo recibe información directa de la retina mediante los axones de los fotorreceptores R8. Además, recibe información de la lámina mediante las terminaciones de las neuronas monopolares y las células T. Como ya se mencionó, la retinotopía se conserva en este neuropilo. Las neuronas transmedulares y las neuronas Y (Sztarker & Tomsic, 2014), son neuronas que integran los inputs de las neuronas que traen información desde la lámina y sus terminales presumiblemente se proyectan en la lóbula (el tercer neuropilo óptico) y en la lóbula plate (cuarto neuropilo). Los somas de las neuronas medulares se ubican sobre y a los lados de este neuropilo.

La estructura de las neuronas transmedulares sugiere que la información visual se procesa en varios canales en paralelo. Algunas neuronas transmedulares responden a un pulso de luz con respuestas de tipo on – off (despolarizaciones transientes al inicio y al final del pulso) (Berón de Astrada et al., 2001).

También existen neuronas centrífugas columnares que presentan procesos presinápticos en la médula (Sztarker & Tomsic, 2014).

Desde el punto de vista fisiológico se han identificado dos tipos de neuronas tangenciales en la médula: las neuronas dimming (DN) y las sustaining (SN) (Berón de Astrada et al., 2009). Ambos tipos integran información de neuronas columnares y descienden hacia el protocerebro lateral. Son neuronas que disparan P. A. En el caso de las DN, frente a un pulso de luz se produce una hiperpolarización tónica y una disminución de la frecuencia de disparo. En cambio, las SN responden al pulso de luz con una despolarización tónica y un aumento en la frecuencia de disparo. Estas respuestas codifican tanto la intensidad como la duración del pulso de luz. Ambos tipos de neuronas son sensibles al plano de polarización de la luz (Berón de Astrada et al., 2009).

Lóbula plate

Este neuropilo fue caracterizado en insectos dípteros, donde se demostró que tiene un rol importante en el procesamiento de información del flujo óptico y el control de respuestas optomotoras (Borst et al., 2010). En *N. granulata*, la lóbula plate es un pequeño neuropilo que forma parte del complejo lobular junto con la lóbula. Se ha encontrado evidencia de que la lóbula plate de decápodos y de insectos son estructuras homologas (Bengochea et al., 2018; Sztarker et al., 2005). La lóbula plate recibe información retinotópica de neuronas columnares de la médula (MLPC) y de neuronas columnares de la lóbula (LLPC). Existen neuronas tangenciales que procesan la información entre columnas (LPTC), algunas llevan información al protocerebro lateral y otras descienden por el tracto protocerebral hacia áreas más centrales (Bengochea et al., 2018). En *N. granulata* se han encontrado neuronas gigantes del complejo lobular, son neuronas de la lóbula algunas de las cuales arborizan también en la lóbula plate (Scarano et al., 2020) (Ver sección Neuronas Gigantes de la Lóbula y del Complejo Lobular).

Lóbula

La lóbula es el tercer neuropilo óptico, ubicado río abajo del segundo quiasma. Recibe información retinotópica de la medula mediante las neuronas transmedulares. Al igual que la lámina y la médula está formado por neuronas columnares y neuronas con amplios procesos tangenciales. Los somas de las neuronas de la lóbula se ubican por debajo de este neuropilo (Sztarker et al., 2005).

La lóbula es un centro de alto nivel de integración cerebral (Sztarker et al., 2005; Sztarker & Tomsic, 2011; Tomsic et al., 2003). Algunas de sus funciones están relacionadas con la detección del movimiento. La detección visual de objetos en movimiento se encontró asociada a neuronas con árboles dendríticos de gran tamaño, en muchos casos neuronas gigantes, de campo amplio que llevan información de la lóbula al cerebro medio. Neuronas similares han sido descritas en distintos artrópodos. Por ejemplo, en libélulas, langostas y moscas (moscas: Hennig & Egelhaaf,

2012; libélulas: O'Carroll, 1993; sírfidos: Nordström, 2012; langostas: Fotowat & Gabbiani, 2011; mosca de la fruta: Wu et al., 2016; cangrejos: Berón de Astrada & Tomsic, 2002; Medan et al., 2007). En *N. granulata* se han identificado 5 tipos de neuronas tangenciales detectoras de movimiento que serán descritas a continuación.

1.8 Neuronas gigantes de la lóbula y del complejo lobular

La percepción del movimiento ha sido y continúa siendo muy estudiada en artrópodos (Borst et al., 2020; De Agrò et al., 2021; Mauss et al., 2017; Nicholas et al., 2020; Rigosi & O'Carroll, 2021) En crustáceos, en una serie de trabajos seminales Wiersma y colaboradores identificaron neuronas sensibles al movimiento mediante registros extracelulares del tracto protocerebral en varias especies (revisión en Wiersma et al., 1982). Estas neuronas se caracterizan por ser más sensibles al movimiento que a los cambios estacionarios en la intensidad de la luz, responder al movimiento independientemente del contraste entre el objeto y el fondo, presentar una disminución de las respuestas frente a estimulación repetida y en algunos casos responder también a estímulos mecánicos aplicados al cuerpo o las patas del animal. Sin embargo, por haberse utilizado registros extracelulares, la morfología y la ubicación de estas neuronas no fue establecida.

En *Locusta* (langosta de tierra) se ha descrito un tipo neuronal llamado neurona gigante de la lóbula (LGMD, *Lóbula Giant Movement Detector*). Su denominación hace referencia a que poseen árboles dendríticos gruesos y extensos (Fotowat & Gabbiani, 2011). Este tipo de neuronas responde a objetos que se desplazan en su campo visual receptivo. Sin embargo, su activación máxima se observa cuando se le presentan estímulos que involucran la aproximación de objetos con trayectorias de colisión (Rowell et al., 1977). En la lóbula de moscas macho (exclusivamente) se han encontrado neuronas direccionales que responden al movimiento (Gilbert & Strausfeld, 1991), hay evidencia de que podrían formar parte de un sistema de neuronas que permita la persecución e interceptación de targets (Collett & Land, 1978; Gronenberg & Strausfeld, 1991). En la lóbula de odonatos y sírfidos se realizaron registros intracelulares de neuronas que son sensibles a la orientación del movimiento de barras (O'Carroll, 1993), y células detectoras de movimiento de objetos pequeños (STMD, Small Target Movement Detectors) (Nordstrom & O'Carroll, 2006; O'Carroll, 1993).

A partir de registros intracelulares en la lóbula de *Neohelice* se encontró un grupo de células sensibles al movimiento que comparten características con las neuronas detectoras de movimientos identificadas por Wiersma y con las LGMD de *Locusta* (Berón de Astrada & Tomsic,

2002; Medan et al., 2007). Se trata de neuronas de campo amplio que integran información de numerosas columnas visuales, se las denominó LG (neuronas gigantes de la lóbula, en inglés lobula giant). Estas no son simples detectoras de movimiento, sino que por el paralelismo entre su respuesta y la respuesta comportamental, se concluyó que juegan un papel central en las transformaciones visuomotoras implicadas en el control de la velocidad y dirección del escape de los cangrejos frente a estímulos visuales de peligro (Oliva et al., 2007; Oliva & Tomsic, 2014, 2016). Además, las LG mostraron gran capacidad para modificar su respuesta con el aprendizaje y reflejar memorias de larga duración, junto con capacidad de integración multimodal y binocular (Scarano et al., 2018; Sztarker & Tomsic, 2004, 2011; Tomsic et al., 2003). Desde la lóbula, las LGs proyectan sus axones hacia el cerebro medio y, directa o indirectamente, hacia el ganglio torácico donde se coordina la ejecución de los patrones locomotores (Medan et al., 2007).

A partir de la morfología y la fisiología de estas neuronas se las clasificó en cuatro tipos neuronales (Medan et al., 2007): neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 1 (MLG1), neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 2 (MLG2), neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 1 (BLG1) y las neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula tipo 2 (BLG2). La morfología general de las LG incluye al menos una ancha arborización dendrítica tangencial en la lóbula, El soma localizado por debajo del neuropilo y un axón que sale del neuropilo a través del tracto protocerebral hacia el ganglio supraesofágico.

Recientemente ha sido identificado un nuevo tipo de neurona en *Neohelice* que responde al movimiento de objetos y/o del panorama visual. Estas neuronas presentan una marcada direccionalidad, respondiendo con un aumento de la frecuencia de disparo frente a objetos que se mueven en su dirección preferencial e inhibiéndose fuertemente frente a objetos que se desplazan en la dirección opuesta (Scarano et al., 2020). Las neuronas que responden de manera diferente a los estímulos visuales que se mueven en direcciones opuestas se denominan neuronas direccionales. Neuronas con tales características se encuentran tanto en el sistema visual de invertebrados, ej: neuronas tangenciales de la lóbula plate (Juergen Haag et al., 1997, 1999; Schnell et al., 2010) como en el de vertebrados, ej: células ganglionares direccionales (Kanjhan & Sivyer, 2010; Kim et al., 2008).

Las neuronas direccionales encontradas en *Neohelice* presentan amplias arborizaciones tangenciales en el complejo lobular (complejo formado por la lobula y la lobula plate), por lo que se las nombró células direccionales del complejo lobular (LCDC por sus siglas en inglés).

Además de su marcada direccionalidad, las LCDC presentan otras características que las diferencian de los 4 tipos de neuronas LG antes descritas:

- 1) No presentan una disminución de las respuestas frente a estimulación repetida.
- 2) Presenta arborizaciones en la lóbula, en la lóbula plate y en una región del protocerebro lateral que ha sido denominada neuropilo direccional del protocerebro lateral (Scarano et al., 2020).
- 3) No proyectan sus axones a lo largo del tracto protocerebral.

1.9 Clasificación de las neuronas gigantes de la lóbula y del complejo lobular

A partir de registros intracelulares seguido de tinciones se pudieron definir con claridad tanto propiedades intrínsecas (tasa de actividad espontánea, actividad regular o en salvas, frecuencia máxima de disparos, etc.) como de preferencia por distintos estímulos visuales (flujo panorámico vs objeto singular, estímulos de looming vs tangenciales, preferencia por el eje de movimiento, sensibilidad direccional, etc.) y diferencias en los tamaños de los campos receptivos y en las capacidades de integración multimodal (visual y mecanosensorial) (Medan et al. 2007; Scarano et al., 2020). La experiencia provista a partir de muchos resultados de registros seguidos de tinciones nos brinda un alto grado de confianza para actualmente, a partir de las mediciones fisiológicas, saber el tipo de grupo morfológico al que pertenecen las neuronas gigantes de la lóbula que por su gran tamaño registramos más frecuentemente. Esto evita la necesidad de dedicar tiempo (y consecuentemente riesgo de pérdida prematura del registro de la célula) al proceso de inyección del colorante intracelular, liberando así tiempo para dedicarlo a caracterizar en mayor detalle las preferencias de estímulo de los distintos tipos de neuronas gigantes de la lóbula. En la **TABLA 2** se muestran algunas de las propiedades importantes que distinguen y permiten discriminar entre distintos tipos de neuronas detectoras de movimiento gigantes de la lóbula.

Tipo de Neurona	Actividad Espontánea	Campo Receptivo	Sensibilidad Mecánica	Respuesta al movimiento de una Barra	Direccionalidad	Respuesta al Looming	Respuesta al Pulso de Luz	Morfología
BLG2	Salvas de 2 a 5 P. A.	Amplio	SI	Breve hiperpolarización seguida de Tren de P. A.	No Direccional	No acompaña la dinámica de la expansión. Aumento de la frecuencia durante la expansión y una caída de la frecuencia en la última etapa.	Breve hiperpol. al inicio y final del pulso	Biestratificada
BLG1	Alta y Regular	Total, no uniforme	SI	Aumento de la frecuencia de disparo que persiste al final del estímulo	No Direccional	Aumento de la frecuencia de disparo que continua alta (respecto a la frecuencia espontánea) luego de la expansión	Hiperpolarización inicial y luego aumento en la frecuencia de disparo	Biestratificada
MLG2	Variable	Total, uniforme	SI	Aumento de la frecuencia de disparo seguida de una hiperpolarización luego del estímulo	No Direccional	Aumento de la frecuencia de disparo seguida de una despolarización luego de finalizado estímulo	Respuesta excitatoria transiente al inicio y final del pulso	Monoestratificada
MLG1	Silenciosa	Circunscripto	NO	Alta frecuencia, spikes montados sobre EPSP	Leve direccionalidad	Alta frecuencia de disparo en las últimas etapas de la expansión	Respuesta bifásica. Puede ocurrir una despolarización, una hiperpolarización o un único P. A. tanto al ON como al OFF	Monoestratificada
LCDC	Variable	Amplio, frontal o lateral	NO	Los estímulos traslacionales en sentido preferido evocan respuestas excitatorias	Son altamente direccionales. La respuesta evocada por estímulos que se mueven en sentido antipreferido son inhibitorias.	Muy débil	No responde	Ramificaciones en la lobua, en el glomero direccional del PCL y en la LoP

Tabla 2 - Características que permiten distinguir distintos tipos de neuronas gigantes de la lóbul y el complejo lobular (Medan et al., 2007; Scarano et al., 2020).

1.10 El circuito visual de artrópodos

Los fotorreceptores de los artrópodos responden a un pulso de luz con una despolarización tónica gradual proporcional a la intensidad de la luz (Glantz, 1968). Como ya se mencionó, existen fotorreceptores de fibras cortas (En *N. Granulata* R 1-7) y fotorreceptores de fibras largas (En *N. Granulata* R8). Las fibras cortas constituyen una vía acromática involucrada en funciones como la detección de movimiento (Borst, 2014). Las vías cromáticas y acromáticas están separadas y el procesamiento de la información ocurre en paralelo en cada columna visual (Strausfeld, 1991).

La visión de *Drosophila* y el circuito neuronal subyacente ha sido un modelo de investigación clave para comprender como es computada la información visual en artrópodos. El estudio de los circuitos neuronales que subyacen a la visión de *Drosophila* comenzó hace aproximadamente medio siglo, y ahora el campo está en auge debido al desarrollo de herramientas genéticas (Zhu, 2013). En *drosophila* (y presumiblemente en todos los artrópodos) en la vía acromática la

información respecto al “encendido” y al “apagado” de un fotorreceptor se segrega en canales neuronales distintos denominados ON y OFF, respectivamente, de modo equiparable a lo que ocurre en vertebrados. Algunas neuronas monopolares de la lámina participan de la vía ON mientras que otras participan de la vía OFF (Clark et al., 2011; Joesch et al., 2010; Meier et al., 2014; Shinomiya et al., 2014; Silies et al., 2013; Takemura et al., 2013). Estudios de imágenes de fluorescencia sensible a calcio de neuronas columnares locales y transmedulares muestran que estos canales se mantienen segregados a nivel de la médula. Ciertas neuronas columnares presentan respuestas de calcio exclusivamente a estímulos ON (Mi1 y Tm3) y otras (Tm1, Tm2, Tm4 y Tm9) responden exclusivamente a estímulos OFF (Meier et al., 2014; Strother et al., 2014). La información de las columnas visuales es integrada por neuronas con extensos procesos dendríticos laterales que proyectan centripetamente llevando la información río abajo del sistema visual. En general, estas neuronas tienen un campo receptivo amplio ya que incorporan la información de más de una columna visual.

En los últimos 20 años nuestro laboratorio ha hecho grandes avances en en la comprensión del sistema visual de *N. granulata*. Si bien el circuito visual no ha sido completamente mapeado, se ha logrado registrar varias clases de neuronas. En la **FIGURA 8** se muestra un esquema con algunos de los elementos caracterizados hasta ahora del circuito visual de *N. granulata*. Es muy importante tener en cuenta que este es un esquema extremadamente simplificado, ya que tan solo en la medula se han identificado alrededor de 60 tipos distintos de neuronas columnares (Sztarker & Tomsic, 2014).

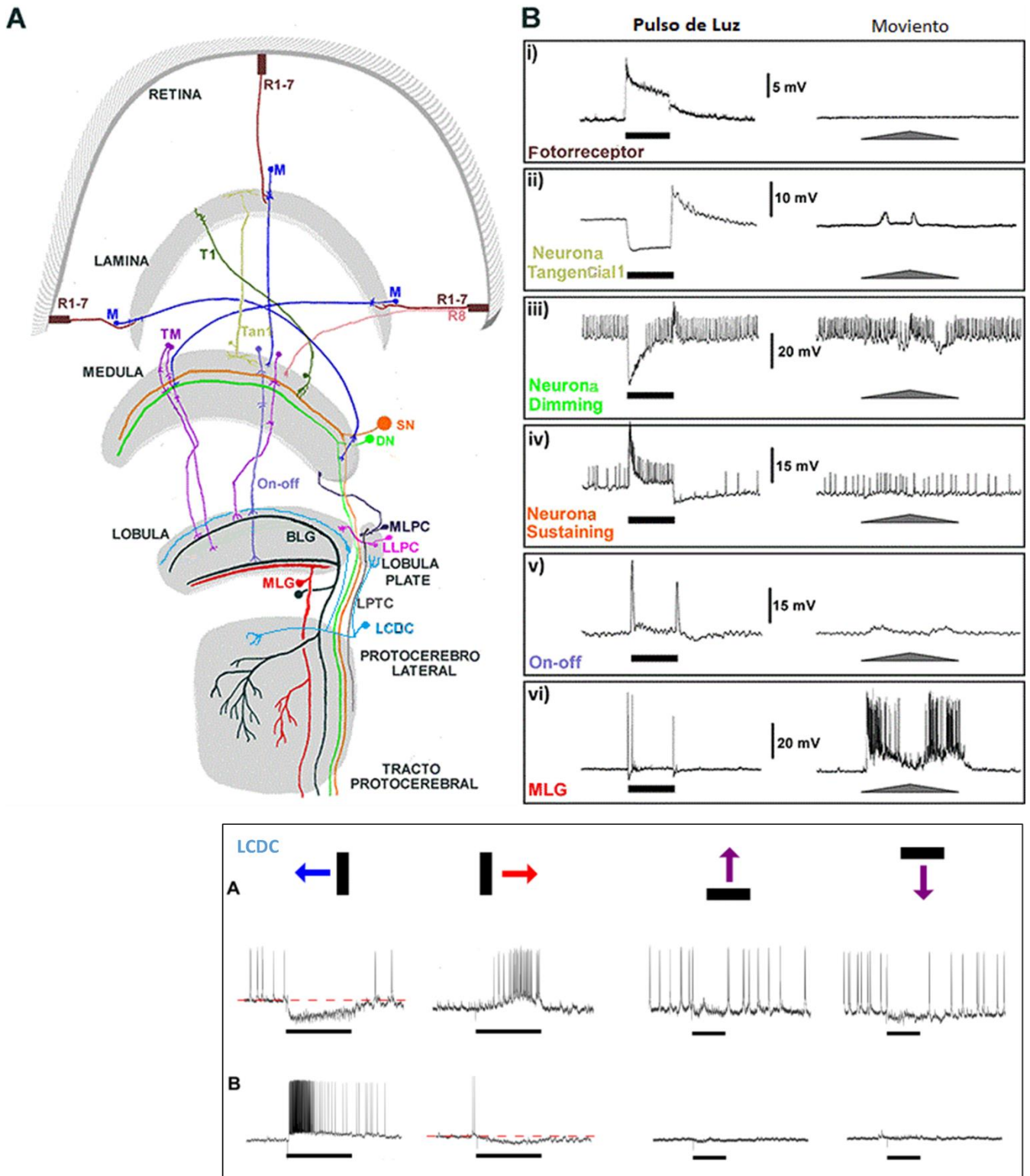


Figura 8: Esquema del circuito visual de *Neohelice*. El esquema central representa la ubicación y morfología general de algunas de las neuronas visuales identificadas. También se muestran las respuestas electrofisiológicas a un pulso de luz de 1 segundo (barra horizontal), que caracterizan a cada tipo celular. Las neuronas gigantes de la lóbula (LG) responden de manera más robusta al movimiento de un objeto que a un pulso de luz. Los dos lados superiores del triángulo debajo del segundo trazo del LG, representan los movimientos hacia adelante y hacia atrás de una pantalla negra rectangular que se mueve 25 cm por encima del cangrejo. La base del triángulo representa 2,2 segundos. Las neuronas direccionales del complejo lobular (LCDC) son sensibles al sentido del movimiento en el eje horizontal. Las barras dibujadas arriba representan el movimiento de un objeto virtual de 4×21 cm. En cada columna: movimiento

horizontal de atrás hacia adelante (azul), movimiento horizontal de adelante hacia atrás (rojo), hacia arriba y hacia abajo, respectivamente. Ambas neuronas (A y B) responden al movimiento horizontal, pero muestran direcciones preferidas opuestas. RI-R8: fotorreceptores; M: Neurona monopolar; T1, célula T de tipo 1; TM: neurona transmedular; SN: neurona sustainig; DN: neurona dimming; MLPC: célula columnar de la médula a la lóbula plate; LLPC, célula columnar de la lóbula plate a la lóbula; LPTC: célula tangencial de la lóbula plate; LCDC: neurona direccional del complejo lobular; BLG, neurona gigante biestratificada de la lóbula ; MLG: neurona gigante monoestratificada de la lóbula. Modificado de Tomsic & Sztarker, 2019.

1.11 La visión del movimiento

Nos encontramos dentro de un vagón del tren detenido en la estación, vemos por la ventana que a nuestro lado se encuentra detenido el tren que va en la dirección contraria. Escuchamos la bocina que anuncia el arranque y miramos por la ventana mientras vemos que aceleramos y vamos dejando atrás al tren vecino, hasta que nos damos cuenta de que es el otro tren el que se ha ido y nosotros seguimos inmóviles en la estación ¿Qué ha pasado? Hemos confundido el movimiento de un objeto que se desplaza en nuestro campo visual con nuestro propio movimiento. Los movimientos en el entorno generan un patrón espaciotemporal de intensidad lumínica sobre nuestra retina, a partir del cual el sistema nervioso reconstruye la información sobre las características de esos movimientos. La ilusión óptica del tren se produce porque, normalmente, el movimiento del panorama es un indicador de nuestro propio movimiento, aunque en este caso es producto del desplazamiento de un objeto grande que ocupa casi todo nuestro campo visual y porque además, al ser un movimiento pasivo (es el tren el que realiza el trabajo y no nuestros músculos) no contamos con ninguna información más que la visual.

Cuando un animal se desplaza o rota sobre su eje se genera un flujo óptico sobre su retina. El movimiento que se genera en la retina puede ser representado mediante mapas vectoriales, donde cada vector representa la velocidad y dirección del movimiento (Koenderink & van Doorn, 1987). Los movimientos de rotación y traslación generan mapas distintos (**FIGURA 9**) la rotación produce un flujo laminar, mientras que la traslación genera un flujo radial expansivo. Por otro lado, cuando un objeto se mueve y el observador se encuentra estático se genera un mapa en el cual todos los vectores son nulos a excepción de los que describen el movimiento del objeto. Cabe señalar que estas representaciones de movimientos “puros” son una reducción de la realidad, un animal que persigue una presa debe poder extraer la información del movimiento del target y diferenciarla del flujo óptico producto de su propio movimiento (traslaciones, rotaciones e incluso ambas a la vez). La evidencia señala que en artrópodos la extracción de información respecto al flujo óptico tendría lugar en la lóbula plate mientras que el análisis sobre el movimiento de objetos tendría lugar en la lóbula (Berón de Astrada et al., 2013; Egelhaaf, 1985; Magani et al., 2016).

La detección de objetos en movimiento permite obtener información sobre el estímulo pudiendo determinar el tamaño, distancia, dirección y velocidad del mismo. Estas características, entre otras, permiten al observador interpretar al estímulo y otorgarle un valor (peligroso, apetitivo o neutro), a partir del cual el animal debe tomar una decisión rápida sobre cómo actuar.

Uno de los primeros modelos de detección de movimiento es el detector de movimiento elemental descrito por Hassenstein y Reichardt (Hassenstein & Reichardt, 1956). Consta de dos subunidades simétricas. Ambas subunidades tienen un receptor que puede ser estimulado por una señal lumínica. La señal dentro de una de las subunidades se retrasa en el tiempo, después del filtro temporal, se multiplica por la señal recibida de la otra subunidad. Así, dentro de cada subunidad, se multiplican los dos valores de brillo, uno recibido directamente de su receptor con un retardo de tiempo y el otro recibido del receptor adyacente. Los valores multiplicados de las dos subunidades luego se sustraen para producir la salida. La dirección preferida está determinada por dicha salida (positiva o negativa), la dirección que produce un resultado positivo es la dirección preferida.

En los insectos, una versión más compleja de este detector de movimiento, que incluye información tanto del canal OFF como el canal ON, constituye una entrada importante en los niveles más altos del procesamiento de movimiento y estarían involucrados en la detección de patrones de flujo óptico (Borst & Haag, 2002). Se ha demostrado que las células tangenciales de la lobula plate (LPTC) de dípteros reciben información de los detectores de movimiento locales, de acuerdo con el modelo mencionado (Egelhaaf et al., 1989; Haag et al., 2004; Hassenstein & Reichardt, 1956).

Si bien los cálculos necesarios para extraer información sobre el movimiento de targets ha sido el foco de intensa investigación en artrópodos, aun no hay un consenso sobre qué modelo describe mejor el procesamiento de dicha información visual para la detección de movimiento. Sin embargo, modelos derivados del modelo elemental Hassenstein y Reichardt que incluyen canales ON y OFF han logrado predecir características de distintas neuronas detectoras de objetos pequeños en movimiento (Wiederman et al., 2013).

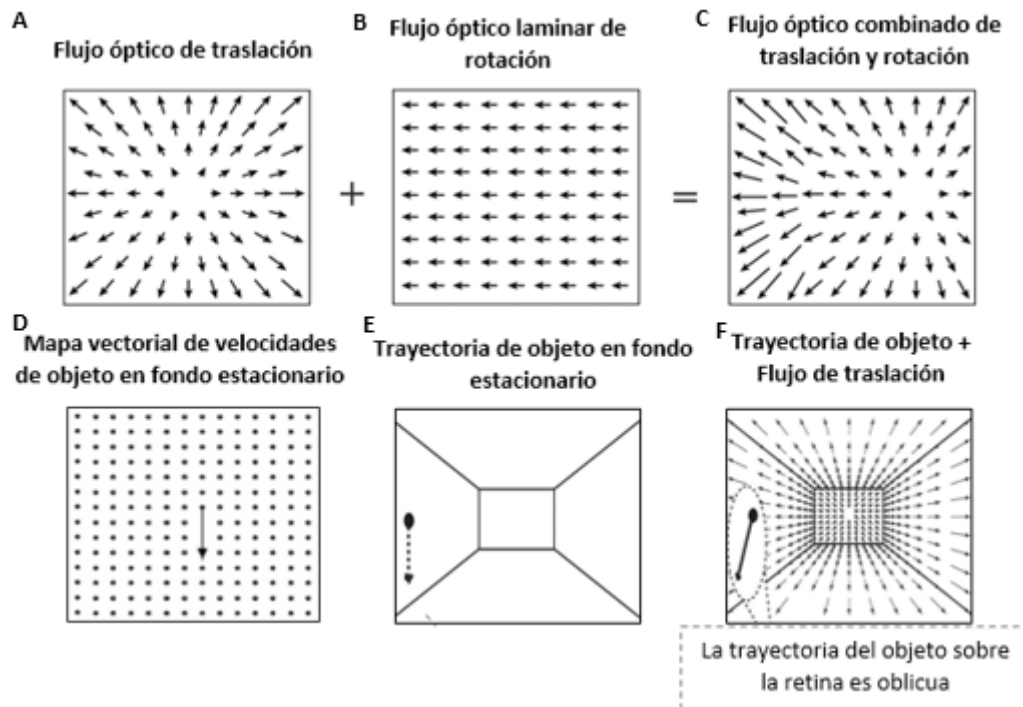


Figura 9 A. Vectores que representan el movimiento de traslación hacia adelante del animal. La longitud de cada vector es proporcional a la velocidad del flujo óptico de cada punto. Por lo tanto, durante la traslación la velocidad es cero en la dirección del avance y puntos más alejados tienen mayor velocidad, con un máximo a 90° del eje de traslación. B. Vectores de flujo óptico producidos en la retina de un animal que rota en sentido antihorario sobre su eje. C. Flujo óptico cuando hay traslación y rotación al mismo tiempo. D Cuando un objeto puntual se mueve sobre la retina, existe un único vector de velocidad mientras que el resto del panorama permanece estático. E. La trayectoria de un objeto cayendo sobre un fondo estacionario. F. Debido a un componente del movimiento del observador, la trayectoria resultante del objeto en la retina resulta oblicua. Modificado de Kuang et al., 2017.

1.12 La fisiología detrás de la respuesta de escape de *Neohelice*

En su hábitat natural *Neohelice* es predado por gaviotas cangrejas (*Larus atlánticus*) y otras especies de aves. Frente a depredadores los cangrejos suelen responder desplegando un comportamiento de escape, en ocasiones acompañado con un despliegue defensivo con sus quelas. En algunas circunstancias el comportamiento de inmovilidad (freezing) es también utilizado como primera estrategia para intentar 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 de una pantalla negra por encima del animal, la cual estaría siendo interpretada como un depredador.

En los primeros estudios realizados en neuronas de la lóbula del cangrejo *Neohelice*, se identificaron células sensibles al movimiento que responden de manera intensa al mismo estímulo visual de peligro que desencadena la respuesta de escape (Beron de Astrada & Tomsic 2002). Estas neuronas luego fueron identificadas como LG (Medan et al. 2007).

En *Neohelice*, la respuesta de escape provocada por el EVP disminuye después de algunas presentaciones (habitación). La estimulación de alta frecuencia (entrenamiento masivo) produce una supresión de escape de manera rápida, pero de corta duración, mientras que la estimulación de baja frecuencia (entrenamiento espaciado) da como resultado un cambio de comportamiento que se da más lento, pero es más duradero. Las tasas de reducción y recuperación de la respuesta de las LG, tanto en el entrenamiento masivo como en el espaciado, coinciden notablemente con los cambios que ocurren a nivel conductual (Tomsic et al., 2003). El entrenamiento masivo produce una reducción rápida y profunda de la respuesta, que se recupera completamente después de 15 minutos tanto a nivel conductual como neuronal (Tomsic et al., 2003). Por el contrario, el entrenamiento espaciado da como resultado una reducción más lenta y menos profunda de la respuesta, pero los cambios perduran en el tiempo (Tomsic et al., 2009). El cambio de respuesta es específico para el estímulo en movimiento, porque la respuesta de la neurona a un pulso de luz medido antes y después de la presentación repetida del estímulo de entrenamiento no se ve afectada (Tomsic et al., 2003).

La respuesta de escape del cangrejo frente al EVP puede verse afectada por una gran variedad de condiciones experimentales como variaciones estacionales, cambios en las características del estímulo visual y si el estímulo es percibido de manera mono o binocular. En estudios electrofisiológicos se observó que, consistentemente con el comportamiento animal, la respuesta de las neuronas LG se veía igualmente afectada por los mismos factores (Sztarker & Tomsic, 2008, 2011). El perfil de disparo de potenciales de acción de las LG no sólo correlaciona con la reacción comportamental, sino que se anticipa a la respuesta de escape en aproximadamente 120 milisegundos (Oliva et al., 2007; Oliva & Tomsic, 2016; Tomsic et al., 2003). También se ha visto que en las memorias contexto dependientes las LG no son compatibles con el componente de memoria de contexto visual. Esto demostró que la memoria con respecto a "qué" y "dónde" se almacenan por separado en el cerebro artrópodo (Sztarker & Tomsic, 2011).

Los EVP generados en la computadora resultan efectivos para desencadenar la respuesta de escape en el cangrejo y no se encontraron diferencias entre las respuestas generadas por el movimiento real de la pantalla negra y la simulación de computadora, tanto a nivel comportamental como neuronal (Medan et al., 2007, Oliva et al., 2007).

La presentación de un estímulo looming (imagen 2D en expansión que desde el punto de vista del observador simula un objeto que se acerca) generada por computadora también evoca en *Neohelice* una respuesta de escape robusta que se ha estudiado en detalle (Oliva et al., 2007).

Se ha demostrado que las MLG1 y MLG2 responden particularmente a imágenes de objetos que se acercan con tasas de disparo que codifican la velocidad angular de la expansión de la imagen y envían esta información para controlar de modo instantáneo la velocidad del escape, es decir que funcionan como elementos centrales de la transformación visuomotora (Oliva et al., 2007; Oliva & Tomsic, 2014, 2016).

Las neuronas de tipo BLG2 responden fuertemente al comienzo de la expansión, pero se inactiva cuando la imagen continúa agrandándose. El curso temporal de la actividad BLG2 frente a los estímulos que se acercan coincide con un freezing transitorio que se observada en los animales antes de iniciar el escape, lo que sugiere un posible papel de este tipo de neurona en este comportamiento (Tomsic, 2016).

Durante varias décadas nuestro laboratorio se enfocó en la respuesta de escape del cangrejo frente a EVP. Pero resultados recientes revelaron la existencia de una respuesta igualmente robusta, aunque de sentido antagónico. Se trata de la respuesta de persecución y captura frente a la detección visual de objetos pequeños, que pueden interpretarse como estímulos visuales apetitivos (EVA). Mediante el uso de dummies de tres tamaños diferentes (esferas negras de 1 cm de diámetro, 1.8 cm y 3 cm) desplazándose por el suelo a tres velocidades diferentes (rápida: 45.1 ± 0.8 cm/s; media: 18.5 ± 0.4 cm/s y lenta: 8.2 ± 0.2 cm/s) en una arena artificial, se identificaron las condiciones de estimulación que favorecen la respuesta predatoria (RP) y la probabilidad de terminar con una captura de presa exitosa. La RP fue provocada con alta probabilidad por el dummy de tamaño mediano, menos eficazmente por el de tamaño pequeño, y muy poco por el grande (que mayormente provocó respuestas evasivas que consistieron en alejarse del estímulo o desplegar las quelas de manera defensiva) (Gancedo et. al 2020).

1.13 La fisiología detrás de la detección de objetos pequeños

Muchos animales dependen de la visión para detectar objetos como conespecíficos, depredadores y presas. A pesar de estar equipados con ojos de baja resolución y cerebros pequeños, muchos insectos muestran una gran habilidad para detectar y perseguir targets pequeños. Depredadores como las libélulas dependen de la detección visual de presas en movimiento, mientras que otros insectos no depredadores deben poder detectar conespecíficos para lograr aparearse. Se han encontrado neuronas especializadas en la detección de objetos en movimiento en el complejo lobular de varios grupos de insectos. Las neuronas detectoras de movimiento de objetivos pequeños (STMD, por small target movement detector) que se encuentran en los lóbulos ópticos de libélulas (O'Carroll, 1993) y sírfidos (Nordstrom & O'Carroll,

2006) muestran una respuesta robusta frente a objetos pequeños (1° a 3°) y una respuesta débil o nula a objetos más grandes ($> 10^\circ$) o al movimiento del panorama visual. La respuesta de STMD al movimiento del objeto no se ve afectada por la adición de movimiento de fondo con la misma velocidad (es decir, sin diferencias de velocidad Nordström et al., 2006; Wiederman & O'Carroll, 2011). Esto se puede modelar (Wiederman et al., 2008) utilizando el perfil espacio-temporal donde el borde de contraste oscuro del target (OFF) es seguido inmediatamente por un cambio de contraste brillante (ON). Los modelos que incorporan la correlación temporal de señales ON y OFF, junto con adaptación rápida y fuerte inhibición espacial, conducen a respuestas robustas al movimiento del target en el panorama visual (Wiederman et al., 2008). Las libélulas y los machos sírfidos tienen alrededor de 20 STMD diferentes que varían en términos de tamaño y ubicación del campo receptivo, direccionalidad y capacidad para discriminar targets sobre fondos complejos. Algunas STMD inervan el ganglio subesofágico (Nordström et al., 2006), donde hacen sinapsis con neuronas descendentes (TSDN), que controlan el movimiento de las alas de la libélula (Olberg, 1981, 2012). Otras STMDs inervan el cerebro medio (Barnett et al., 2007) donde podrían hacer sinapsis con las STMDs centrífugas (CSTMDs, Geurten et al., 2007).

En *Drosophila* se ha encontrado que las neuronas columnares de la lóbula LC11 responden al movimiento omnidireccional de un objeto pequeño de $2,2^\circ$ mientras que presenta baja o ninguna respuesta frente al parpadeo de la luz (flicker, en inglés), ni responde a las barras en movimiento ni a los patrones panorámicos. El bloqueo de las corrientes iónicas inhibitorias mediante Picrotoxina (inhibidor no competitivo de GABA) elimina la sensibilidad a los objetos pequeños y facilita las respuestas a barras y flujos panorámicos. Estas neuronas son demasiado pequeñas para registros intracelulares, pero se las ha estudiado mediante *imaging* de calcio. Las dendritas de cada LC11 inervan múltiples capas de la lóbula abarcando numerosas columnas. Varias LC11 vecinas codifican el movimiento del objeto de forma retinotópica, pero las terminales de los axones se fusionan en una estructura glomerular en el protocerebro donde se pierde la retinotopía (Keleş & Frye, 2017).

En machos de la mosca *Calliphora* se ha encontrado una neurona presumiblemente especializada en la detección de objetos pequeños en movimiento. La MLG1 (male lobula giant 1) responde bien a los puntos en movimiento, pero despolarizaciones inducidas por una barra que se mueve hacia arriba son más fuertes que las respuestas a un punto que se mueve en la misma dirección (Trischler et al., 2007). Este hecho contrasta con un estudio previo en el que se utilizaron barras de ancho variable para estimular MLG1 y el objeto más pequeño indujo las más grandes amplitudes de respuesta (Wachenfeld & Hausen, 1994). Esta discrepancia puede deberse a diferencias en los estímulos utilizados en los dos estudios. Sin embargo, con respecto

al movimiento horizontal, la MLG1 responde mejor a pequeños puntos en movimiento que a barras en movimiento, por lo que puede considerarse una neurona detectora de objetos pequeños.

Como se mencionó en el apartado anterior, existen en la lóbula neuronas gigantes que responden a estímulos visuales de peligro y que se presume que comandan la respuesta de escape y el comportamiento de freezing. En contraste a la respuesta de escape, la persecución de una presa o una pareja sexual implica la detección de estímulos apetitivos. En varias especies de insectos se ha visto que estos comportamientos estarían comandados por neuronas especializadas que responden al movimiento de objetos pequeños que también se encuentran en la lóbula. La lóbula es un centro de alto nivel de procesamiento e integración visual (Sztarker et al., 2005; Tomsic et al., 2003), estando involucrada en distintos comportamientos guiados por la visión, por esta razón es probable que la interpretación del estímulo visual, la asignación de un valor (negativo, positivo o neutro) y la selección de la respuesta conductual ocurra, en buena medida, en este mismo neuropilo.

1.14 Resumen de antecedentes

La visión de movimiento provee claves esenciales para una gran variedad de comportamientos. En particular, la detección de movimiento permite obtener información sobre el entorno pudiendo determinar el tamaño, distancia, dirección y velocidad de un objeto en movimiento. Estas características, entre otras, permiten al observador determinar el significado del estímulo. Entender cómo las interacciones y el cableado de una red de células nerviosas recuperan y procesan esa información crítica para luego determinar una respuesta comportamental constituye una meta central en el campo de las neurociencias.

Como ya se mencionó en la introducción, se ha visto que *N. granulata* responde al movimiento de objetos grandes con escapes, mientras que objetos pequeños desplazándose por el suelo evocan persecuciones. Así mismo, se ha visto que, si bien el movimiento de objetos pequeños desplazándose a nivel del suelo evocan persecuciones, el mismo objeto pequeño elevado a 10 cm del suelo evoca respuestas de escape. Esto es compatible con lo observado en cangrejos del género *Uca*, que interpretan como depredador a objetos en movimiento que superen el horizonte visual y como conespecíficos a objetos que se mueven por debajo de este horizonte. También se mencionó que las LG comandarían las respuestas comportamentales (escape y freezing) frente a estímulos grandes y estímulos de looming, que son considerados estímulos visuales de peligro. Sin embargo, nunca se ha evaluado la respuesta fisiológica de las neuronas LG frente a estímulos de tamaños pequeños y medianos, ni a estímulos de diferente elevación y aún no se ha investigado si las LG pudieran tener un rol en la respuesta predatoria de *N. granulata* o si existen en el cangrejo clases de neuronas de la lóbula especializadas en la detección del movimiento de objetos pequeños como las que se han encontrado en la lóbula de algunos insectos.

Por otro lado, recientemente se han identificado neuronas direccionales en el complejo lobular de *Neohelice*. Se ha propuesto que estas neuronas podrían ser parte de un sistema de fijación de objetos en las zonas de alta resolución del campo visual. La respuesta de este tipo de neuronas no se ha evaluado frente a objetos de distinto tamaño ni elevación. Esto resulta de interés porque tanto en las respuestas de escape como en la respuesta de persecución se ha visto que estos cangrejos fijan a los objetos en movimiento en el polo lateral del ojo, donde tienen su zona de mayor resolución.

1.15 Hipótesis General y Objetivos

Hipótesis General

Nuestra hipótesis general es que, en los artrópodos, los procesos de toma de decisiones que ocurren cuando un animal categoriza a un objeto como un predador o como una presa al que debe reaccionar con rapidez, pueden emerger de interacciones que ocurren en microsistemas de neuronas gigantes con gran capacidad de integración. Particularmente para nuestro modelo experimental, el cangrejo, proponemos que los comportamientos de escapar o perseguir a un objeto guiándose visualmente son decididos y elaborados fundamentalmente a partir del procesamiento de información que tiene lugar en las neuronas gigantes de la lóbula (3er neuropilo óptico del cerebro de los artrópodos).

Objetivos:

- 1) Determinar la sensibilidad de las 4 clases de neuronas LGs a estímulos visuales de distinto tamaño y elevación.
- 2) Caracterizar los comportamientos del animal frente a estímulos visuales de diferente tamaño y elevación.
- 3) Evaluar si existen neuronas similares a las STMD de odonatos en la lóbula del cangrejo.
- 4) Evaluar la respuesta de las LPDC frente a objetos de distinto tamaño y elevación.
- 5) Evaluar en neuronas aun no identificadas las respuestas a estímulos de distinto tamaño y elevación.

SECCIÓN 2: MATERIALES Y METODOS



2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Los cangrejos utilizados en este trabajo de Tesis fueron especímenes macho de la especie *Neohelice granulata* (antes *Chasmagnathus granulatus*), descrita por primera vez por Dana (Dana, 1851).

N. granulata es un cangrejo semiterrestre, eurihalino y excavador de fondos blandos. Habita en estuarios tropicales y subtropicales de América del Sur. Se distribuye desde el Golfo San José, norte de la Patagonia Argentina, a través de Uruguay hasta Río de Janeiro, Brasil (Spivak, 2010). Los animales utilizados en los experimentos fueron capturados en rías de San Clemente del Tuyu, Buenos Aires, Argentina. Se colectaron animales con un ancho de caparazón en el rango de 2.7 y 3.1 cm y un peso medio de 17 ± 0.2 g.

Los animales fueron transportados al laboratorio donde se mantuvieron en un solárium con ciclos naturales de luz/oscuridad, la temperatura se mantuvo en un rango de 15°C a 30°C. Fueron mantenidos en contenedores plásticos (35 x 48 x 27 cm) de a 20 animales, con una profundidad de 2 cm de agua marina artificial (salinidad 10 a 14 ‰ - pH de 7.4 a 7.6) preparada con la fórmula comercial Red Sea Coral Pro. El agua de los contenedores fue remplazada cada 2 días. Los experimentos se realizaron entre las 10 y las 22 horas en los primeros 15 días posteriores a la pesca.

2.2 Preparación electrofisiológica

Una de las ventajas de *N. granulata* como modelo para el estudio de las bases neurobiológicas de comportamientos guiados por la visión, es que permite llevar a cabo registros intracelulares *in vivo* de neuronas de los lóbulos ópticos en animales prácticamente intactos y no anestesiados (Ej. Berón de Astrada & Tomsic, 2002).

El exoesqueleto duro de estos cangrejos permite que se lo sujete firmemente con una pinza, facilitando la posibilidad de realizar registros estables sin mayores manipulaciones. En la preparación las patas del cangrejo quedaron libres y el animal

podía moverlas en el aire, mientras que las quelas se sujetaron con una goma para evitar movimientos que puedan perturbar los registros.

Antes de comenzar la preparación del animal se chequeaba el estado general del mismo. Al dar vuelta el cangrejo colocando el dorso sobre una superficie, un animal sano debe ser capaz de darse vuelta y retornar a su posición natural rápidamente. De no lograrlo es un indicador de mala salud. También se chequeó que los animales no hayan perdido ninguna de las patas marchadoras ni las quelas y además, que la retina no presente manchas.

Los pedúnculos oculares de los cangrejos son móviles, el ángulo natural de los pedúnculos cuando el animal se encuentra sobre un sustrato plano es de 50°. En la preparación los pedúnculos se fijaron con adhesivo acrílico de pegado rápido (nombre comercial La Gotita) con un ángulo de 60° - 70° respecto a la horizontal para facilitar los registros, alineando el eje en que están dispuestos los neuropilos ópticos con la trayectoria del electrodo. Para reforzar la fijación se utilizaron pequeñas ménsulas de aluminio. Si bien todos los registros fueron realizados en el lóbulo óptico del lado derecho, se fijaron ambos ojos para asegurar que las posiciones de los ojos no varíen entre registros (**FIGURA 10 A**).

Se realizó un pequeño orificio en la parte dorsal del cefalotórax en el cual se colocó un electrodo de referencia (alambre de plata) en contacto con la hemolinfa. El electrodo de referencia fue fijado con parafina en el dorso del animal (**FIGURA 10 B**).

Bajo una lupa se removió una pequeña porción de la cutícula en la región dorsal del ojo, dejando un orificio de aproximadamente 500 μm de diámetro por donde se descendió el electrodo (**FIGURA 10 C**). En los casos en los que fue necesario, luego de posicionado el electrodo, el orificio fue sellado con vaselina sólida para evitar la pérdida de hemolinfa y los movimientos pulsátiles causados por la misma. En la mayoría de los casos la hemolinfa se coaguló sellando naturalmente el orificio. El descenso del electrodo fue controlado con un micromanipulador. La penetración de las neuronas se hizo sin visualización de los elementos a registrar.

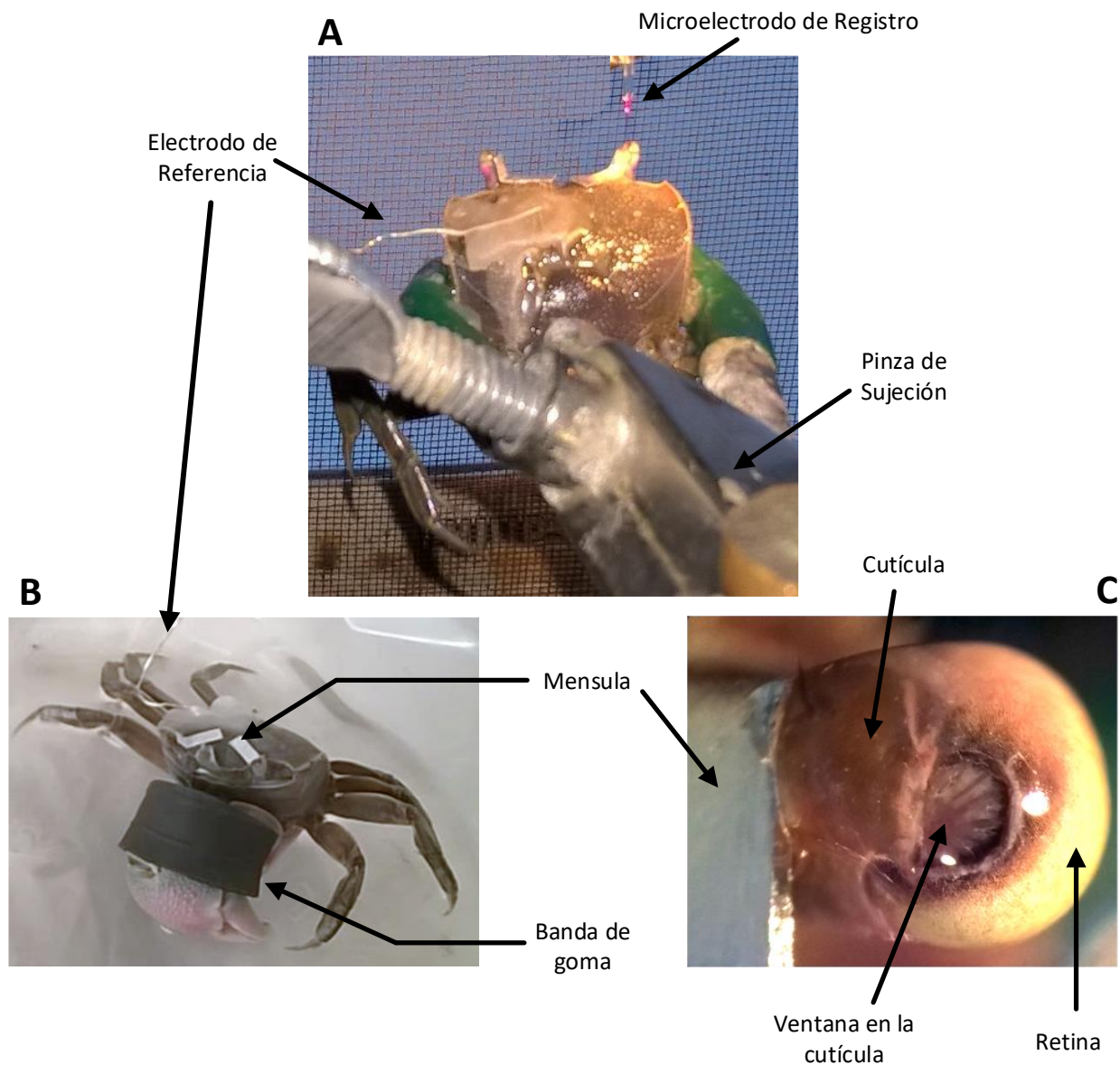


Figura 10. A) Cangrejo ubicado en el setup de electrofisiología. B) Animal luego del experimento. C) Ventana en la cutícula para inserción del electrodo. Dentro de la ventana se observan fibras blanquecinas, se trata de haces de fibras constituidas por los axones de los fotorreceptores en su descenso hacia la lámina (aumento 40x).

Los electrodos fueron realizados a partir de capilares de vidrio de borosilicato (World Precision Instruments Inc., Florida, USA) de 1.2 mm de diámetro externo y 0.68 mm de diámetro interno. Los capilares fueron estirados con un puller (Sutter P-97), al llenar los electrodos con solución KCl 3M se obtuvieron resistencias de 30 – 100 MΩ.

En más del 95% de los casos los animales permanecieron en perfectas condiciones luego de finalizados los experimentos, retornando a su comportamiento natural una vez liberados de la pinza.

2.3 Dispositivo experimental para electrofisiología

El dispositivo (**FIGURA 11**) se ubicaba dentro de una caja de Faraday cubierta por arriba y 3 de sus lados para evitar la estimulación visual no controlada, la cara delantera contó con una cortina negra que se bajaba luego de impalar una neurona de interés y antes de realizar su registro. Dentro de la caja se ubicaron 3 monitores de pantalla plana (Philips 107T, de 17", con tasa de refresco de 89Hz y una resolución de 800x600 pixeles) localizados al frente y a los costados del animal a una distancia de 20 cm. Un cuarto monitor se ubicaba colgando sobre el animal, pero no fue utilizado y por lo tanto se encontró apagado en esta serie de experimentos. Frente a los monitores se ubicaron pantallas anti-réflex para evitar reflejos que causaran estimulación visual no controlada. Una malla metálica frente a cada monitor se utilizó para atenuar el ruido eléctrico provocado por los mismos (**FIGURA 10A**). El dispositivo experimental, salvo por la caja de Faraday y los dispositivos de control, estaba montado sobre una mesa antivibratoria para amortiguar las perturbaciones externas que pudieran desestabilizar los registros.

El sistema también contó con 3 computadoras (PC1, PC2 y PC3). Las señales eléctricas se amplificaron (Axoclamp 2B, Axon instruments), se digitalizaron a 10kHz (Digidata 1322, Axon Instruments) y se grabaron en la PC1 mediante el software Clampex (pClamp10) para su análisis off-line. Simultáneamente, la PC1 desencadenaba la presentación de estímulos enviando un pulso eléctrico hacia un arduino conectado con la PC2. Esto permitió sincronizar el curso temporal de los estímulos con el registro de respuestas electrofisiológicas. Los estímulos fueron generados por la PC2 utilizando el programa Psychtoolbox-3 junto a MatLab. La PC3 solamente se utilizó para generar un fondo blanco. Las señales de video tanto de la PC2 como de la PC3 eran enviadas a un

splitter que las distribuía en 3 canales. Cada uno de estos canales contenía las señales generadas por ambas PCs. Las 2 señales salientes de cada splitter eran derivadas hacia un data switcher. La señal de salida de cada uno de los 3 data switcher era enviada a uno de los 3 monitores del setup empleados para estimulación visual. Los data switcher desde los cuales el experimentador seleccionaba cuál de las 2 señales (la de la PC2 o la de la PC3) sería enviada a cada monitor, se encontraba ubicado fuera de la caja de Faraday. De este modo los estímulos o el fondo neutro sin estímulo podían ser presentados de modo independiente o simultáneo a cada uno de los 4 monitores. Durante los experimentos la señal electrofisiológica se monitoreo en un osciloscopio analógico y en el monitor de la computadora.

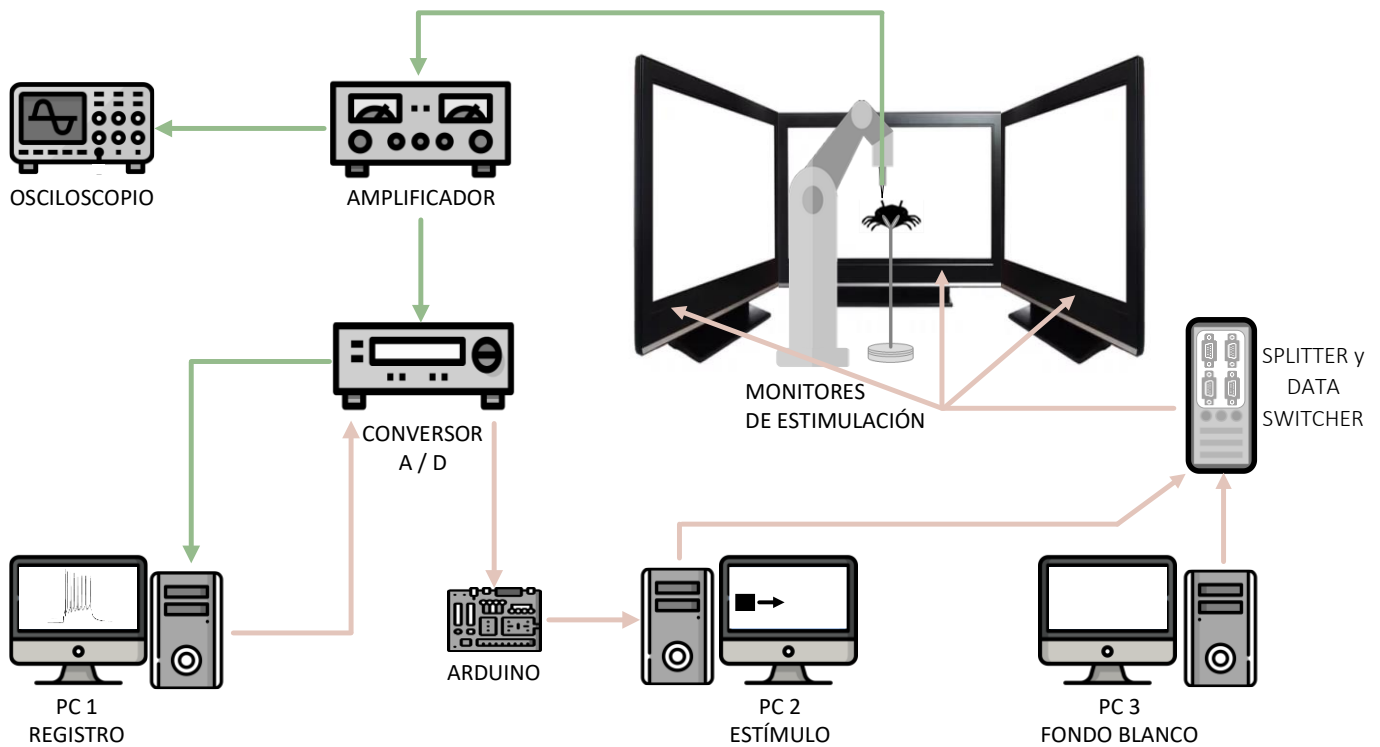


Figura 11. Esquema del setup de electrofisiología. Las señales electrofisiológicas se amplificaron (Axoclamp 2B, Axon instruments), se digitalizaron a 10kHz (Digidata 1322, Axon Instruments) y se grabaron en la PC1 mediante el software Clampex (pClamp10) para su análisis off-line. La PC1 desencadenaba la presentación de estímulos enviando un pulso eléctrico hacia un arduino conectado con la PC2. Esto permitió sincronizar el curso temporal de los estímulos con el registro de respuestas electrofisiológicas. Los estímulos fueron generados por la PC2 utilizando el programa Psychtoolbox-3 junto a MatLab. La señal de video fue enviada a los monitores de estimulación. Un switcher permitió seleccionar a que monitor se enviara la imagen, mientras que los otros monitores permanecían con un fondo blanco. La PC3 solamente se utilizó para generar el fondo blanco de los monitores donde no se estaba transmitiendo el estímulo, estaba conectada al mismo splitter que la PC2. Durante los experimentos la señal electrofisiológica se monitoreo con un osciloscopio analógico.

2.4 Protocolo de registro y estimulación para electrofisiología

Una vez que el animal estuvo preparado y posicionado se lo dejó habituarse al contexto del setup por 10 minutos. Luego se comenzó a descender el electrodo por el orificio en la cutícula del pedúnculo derecho. El descenso se realizaba de a pequeños pasos, acompañados de pulsos de sobrecompensación de la capacitancia (buzz). Durante el descenso del microelectrodo se observó el voltaje en el osciloscopio analógico y en el osciloscopio digital de la PC1. Un aumento en la diferencia de voltaje era indicador de que se había penetrado una célula. En algunos casos se generaban P.A. por el daño que produce el electrodo al penetrar en la membrana celular de las neuronas. Cuando esto sucedía primero se dejaba estabilizar el voltaje de membrana. Luego, para corroborar si se trataba de una neurona del sistema visual se utilizaba un flash de luz de 1 seg. de duración y una intensidad de aproximada de $100\text{W}/\text{m}^2$. El pulso de luz fue generado por una lámpara de xenón ubicada fuera de la jaula de Faraday, cuya luz fue conducida por un cable de fibra óptica cuyo extremo se ubicó a 5 cm del ojo en el cual se realizaron los registros. La duración del pulso de luz fue controlada mediante un obturador electromagnético (shutter) gatillado por la PC1. Al iluminar prácticamente todo el ojo, este tipo de estímulos permite evocar respuesta en neuronas visuales independientemente de la orientación de su campo receptivo.

En el caso de obtener una respuesta al pulso de luz, se procedía a evaluar la respuesta a distintos estímulos visuales en varios monitores para determinar si se trataba de una neurona sensible al movimiento de objetos. Se sabe que este tipo de neuronas arborizan en la lóbula, tercer neuropilo óptico, mientras que las neuronas que tienen una respuesta sostenida ante un pulso de luz y no responden al movimiento (e.g. neuronas tangenciales) o responden poco (neuronas dimming y neuronas sustaining) se encuentran en la lámina y en la medula respectivamente (Berón de Astrada et al., 2001, 2009), ver **Figura 8**. Si bien los registros se realizan a ciegas (sin visualizar los elementos a registrar), en base a los estudios previos de caracterización funcional y morfológica, el tipo de respuesta de las neuronas permiten determinar con alta certeza en que neuropilo se está registrando. Como nuestro interés fue registrar respuestas al movimiento de objetos, las neuronas que buscamos registrar eran las que se encuentran en la lóbula.

Una vez encontrada una neurona de interés, se bajaba la cortina negra que cubría la caja de Faraday. En estas condiciones se dejaba pasar 1 o 2 minutos hasta que la actividad espontánea se estabilizara. Luego se presentó la imagen estacionaria del objeto por 2 segundos y a continuación se desencadenó el movimiento del objeto de un extremo de la pantalla al otro. Luego del movimiento el estímulo permaneció estacionario en la posición final por 8 segundos. El orden de estimulación (tipo de estímulo y pantalla) fue aleatorio. El intervalo entre estímulos fue de al menos 30 segundos, o hasta que la actividad espontánea se normalizara. Los registros de cada neurona duraron desde 20 minutos hasta 2 horas.

2.5 Identificación de neuronas LG

Las LG son elementos centrales del circuito de detección de movimiento involucrados muy centralmente en sofisticados procesos de transformación visuomotora (Ej. Medan et al., 2015; Oliva & Tomsic, 2014, 2016), incluyendo procesos de aprendizaje y memoria del cangrejo (Sztarker & Tomsic, 2011; Tomsic et al., 2003). Por esta razón interesa evaluar su sensibilidad de respuesta frente a objetos de diversos tamaños.

Por su tamaño las LG son las neuronas más probables de impalar en la lóbula. Para confirmar la identidad de la neurona impalada, se siguieron los criterios de identificación fisiológica descritos por Medan (Medan et al., 2007). Es decir, se tuvo en cuenta características que sirven de indicador para la clasificación entre distintas LG. Las características evaluadas fueron la respuesta a un flash de luz de 1 seg. de duración, la respuesta al estímulo de *Looming* (estímulo con movimiento en expansión), la actividad espontánea, el tamaño del campo receptivo, la morfología del potencial de acción y la presencia o ausencia de trenes de P.A. Las neuronas de tipo LCDC se identificaron principalmente por la marcada direccionalidad de sus respuestas (Scarano et al., 2020).

En algunos casos la identificación se complementó con información morfológica. Se realizaron tinciones intracelulares cargando el electrodo con una solución neurobiotina 5% (Tris 50 mM, KCL 500 mM, Ph=7.6). Para realizar las tinciones, luego del protocolo de estimulación visual se utilizaron pulsos cuadrados de hasta +5 nA de 500 ms de duración para que la neurobiotina ingrese a la célula por iontoforesis. Las inyecciones de corriente duraron entre 20 minutos y 1 hora, se realizaron pausas para chequear el

estado de la neurona evaluando la respuesta a un estímulo visual. Luego de las inyecciones se permitió que la neurobiotina se difundiera por 1 hora en el animal vivo. Luego se adormeció al animal con frío y se extrajo el lóbulo óptico del ojo derecho. El tejido se fijó en una solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 5 lavados de 20 min. cada uno con solución PTA (Buffer fosfato 0.1M, Triton 2%, Azida sódica 0.1%, pH=7.4). Luego se incubó durante 24 hs. en una solución 1/200 de streptavidina-Alexa 647. Luego se realizaron 5 lavados con solución PTA de 20 min. cada uno seguidos de una deshidratación con concentraciones crecientes de etOH (pasos de 20 min en soluciones 30%, 50%, 70%, 90%, 100% etOH). El tejido fue montado en un portaobjetos y aclarado con metilsalicilato. Para la observación y obtención de imágenes se utilizó un microscopio confocal Olympus FV300. El tejido fue escaneado tomando fotografías cada 5 μm con una resolución de 1024 x 1024 pixeles utilizando el software Olympus Fluoview 1000.

2.6 Estímulos visuales de movimiento en experimentos de electrofisiología

Los estímulos utilizados fueron imágenes de objetos negros sobre fondo blanco. Los objetos fueron una barra (24 x 6 cm, que representa un tamaño angular (Θ) de aproximadamente $62^\circ \times 17^\circ$), un cuadrado grande (6 x 6 cm, $\Theta = 17^\circ$), un cuadrado mediano (3 x 3 cm, $\Theta = 8^\circ$), un cuadrado pequeño a la altura del ecuador (1.5 x 1.5 cm, $\Theta = 4^\circ$), el mismo cuadrado pequeño elevado 10 cm sobre el ecuador (aproximadamente 26° de elevación y por lo tanto $\Theta = 3,4^\circ$) y el mismo cuadrado pequeño 10 cm bajo el ecuador (aproximadamente -26° de elevación y $\Theta = 3,4^\circ$) (**FIGURA 12**).

Para garantizar que todos los estímulos exciten la misma porción del CR (en el sentido horizontal), el recorrido de cada figura comprendió siempre los mismos puntos de inicio y fin en cada monitor. Todos los estímulos se movieron a la misma velocidad (18 cm/seg.). Debido a que todos los estímulos recorrieron la misma porción del espacio y a la misma velocidad, el tiempo de recorrido fue diferente para estímulos de distinto ancho, la duración de cada estímulo se detalla en la **TABLA 3**.

Para evitar el efecto de la aparición y desaparición del estímulo en los bordes del monitor, la posición inicial y final de los bordes de los estímulos mantuvo una distancia de 1 cm respecto a los bordes de la pantalla.

Cuando no se observaba sensibilidad direccional, en la mayoría de los experimentos los estímulos se desplazaron de izquierda a derecha. En experimentos en los que la direccionalidad del estímulo era de importancia, además de utilizar las figuras que se movían en sentido de izquierda a derecha, también se utilizaron las mismas figuras con movimiento de derecha a izquierda.

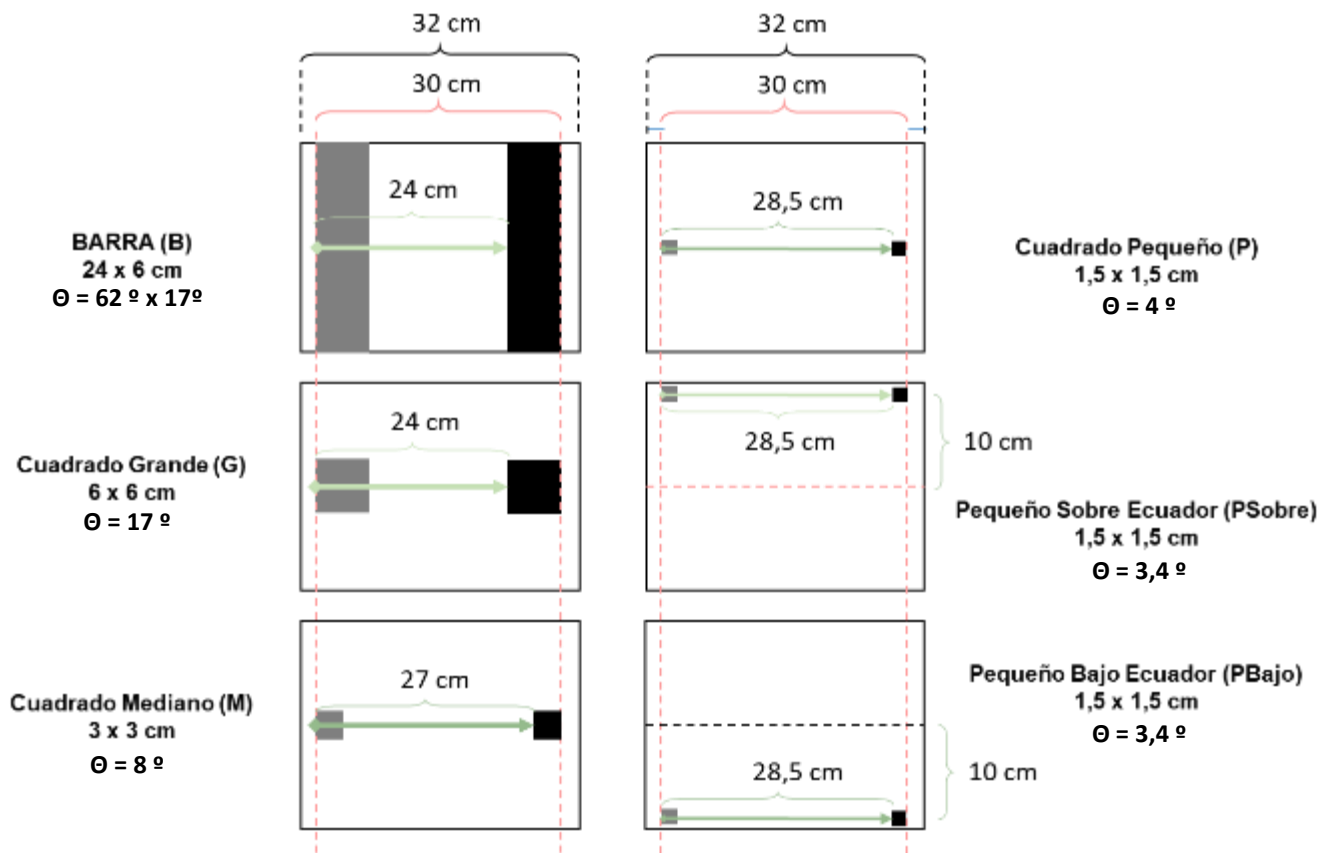


Figura 12. Esquema a escala de los estímulos utilizados. En gris se muestra la posición inicial de cada objeto y en negro la posición final. Para garantizar que todos los estímulos exciten la misma porción del C.R. (en el sentido horizontal), el recorrido de cada figura comprendió siempre los mismos puntos de inicio y fin en cada monitor (línea punteada roja). Todos los estímulos se movieron a la misma velocidad (18 cm/seg.) Debido a que todos los estímulos recorrieron la misma porción del espacio y a la misma velocidad, el largo de recorrido fue diferente para estímulos de distinto ancho (Flecha verde). Más detalles en la Tabla 3.

ESTÍMULO	Velocidad (cm/seg)	Recorrido (cm)	Tiempo (seg)
B	18.00	24.00	1.33
G	18.00	24.00	1.33
M	18.00	27.00	1.50
PBAJO	18.00	28.50	1.58
PEC	18.00	28.50	1.58
PSOBRE	18.00	28.50	1.58

Tabla 3. Características de cada estímulo

2.7 Análisis de los registros de electrofisiología

El análisis y procesamiento de los registros se realizó mediante el software Clampfit del paquete pClamp (Axon Instruments), Excell del paquete Microsoft Office 2016 (Microsoft) y RStudio v1.2. (RStudio Inc).

Debido a que cada neurona era impalada a ciegas en el animal vivo, no hubo control a priori sobre el sitio de impalación de cada neurona. No obstante, se reconoce que registros obtenidos cerca de la entrada sináptica presentan P.A. de menor amplitud y actividad subumbral de mayor amplitud, mientras que registros obtenidos más cerca de la zona de inicio muestran P.A. de mayor amplitud y actividad subumbral de menor amplitud (Medan et al., 2007). Dado que el interés estaba centrado en la información que las neuronas pueden transmitir río abajo para afectar el comportamiento, el análisis se realizó cuantificando su señal de salida, es decir, los potenciales de acción. A estos efectos, el hecho de que las neuronas pudiesen estar siendo registradas desde sitios distintos de su árbol neurítico no afectó nuestra variable de medición. En neuronas que presentaron respuestas inhibitorias se analizó también la diferencia en el potencial de membrana causada por la estimulación.

2.8 Dispositivo experimental para medir la respuesta visuomotora

El dispositivo experimental utilizado para medir la actividad locomotora evocada por estímulos visuales fue diseñado, construido y calibrado en nuestro laboratorio (**FIGURA 13**). Este dispositivo es una versión similar a la que ha sido utilizado anteriormente (por ejemplo, Oliva et al., 2007). La nueva versión del dispositivo consiste en una esfera de telgopor de 20,7mm de diámetro que flota sobre un flujo de aire continuo. El cangrejo se colocó sobre la esfera y fue fijado en una posición mediante una varilla adherida a la

parte dorsal del cefalotórax (**FIGURA 14**) que se introdujo dentro de una guía sostenida por un pescante. La varilla no le permitía rotar al animal, pero si se podía desplazar hacia arriba y hacia abajo dentro de la guía, de manera que el animal podía sentir su propio peso y tomar su postura natural. Al intentar desplazarse, el movimiento del animal se transfería a la esfera, cuyos movimientos eran medidos mediante 2 mice ópticos (Logitech M90) ubicados perpendicularmente uno respecto del otro (**FIGURA 13**). La lente de cada mouse fue reemplazada por una lente Phillips modelo CAY046 lo que permite amplificar la distancia y rango de lectura de los mice. Para registrar las lecturas de los mice se utilizó una computadora con sistema operativo Linux (PC1), porque permite leer el desplazamiento del mouse en el eje X e Y por separado. Un programa escrito en Python recopiló la información de los mice y permitió obtener la posición cada 8 ms (Díaz Guastavino, 2020).

El dispositivo estaba rodeado por 5 monitores: uno izquierdo, uno derecho, uno frontal, uno posterior y uno superior que se encontraba suspendido sobre el cangrejo (**FIGURA 14C**). El sistema de presentación y distribución de estímulo sobre los distintos monitores en este equipo fue equivalente al descrito anteriormente para el equipo de los experimentos de electrofisiología. Debido a que los animales realizan los escapes y persecuciones fijando a los objetos en el polo lateral del ojo (Berón de Astrada et al., 2012), se optó por realizar la estimulación visual solo en uno de los monitores laterales. Esto permite poder medir la velocidad de traslación con mayor simplicidad, evitando los intentos de rotación por parte del cangrejo. Se eligió el monitor derecho para lograr una mejor comparación con los datos electrofisiológicos, ya que en los experimentos de electrofisiología se registró la respuesta de neuronas en el lóbulo óptico derecho.

Una cámara digital situada en un extremo del monitor superior permitió supervisar el comportamiento del animal mientras el experimento se llevaba a cabo.

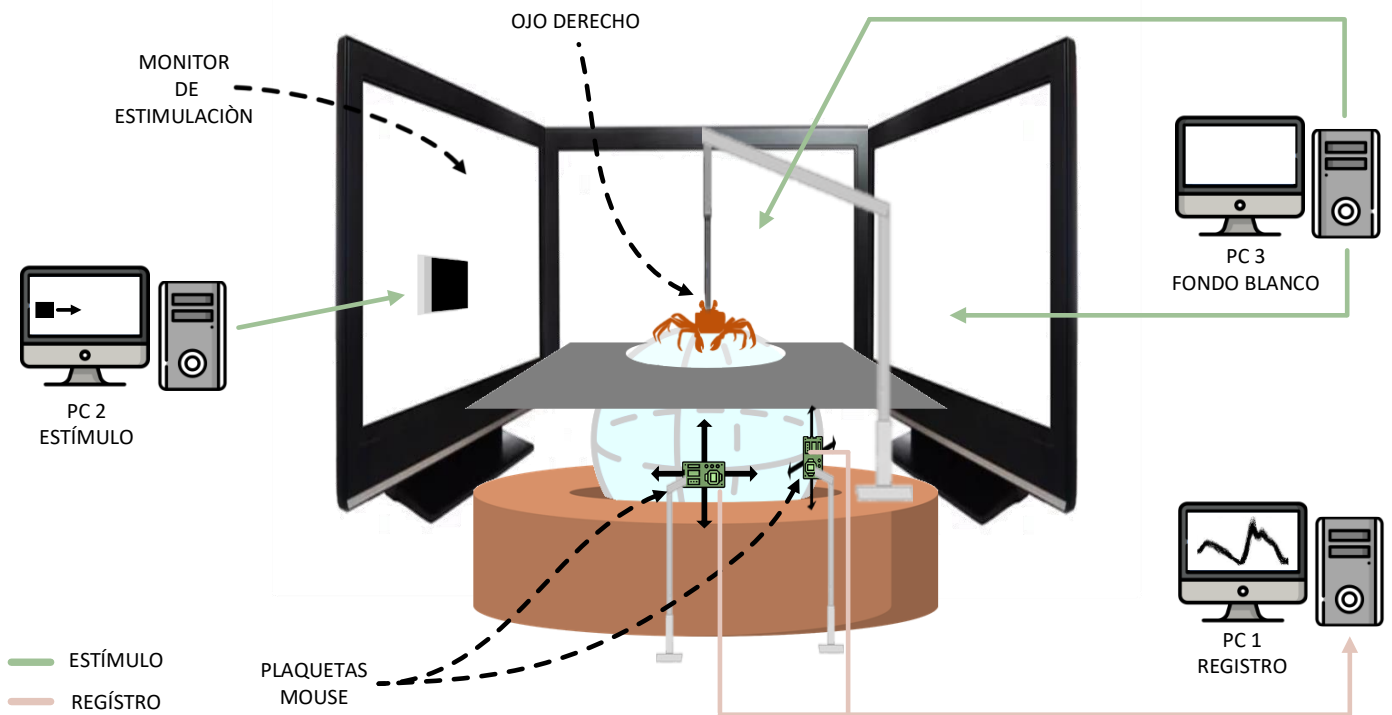


Figura 13. Esquema dispositivo de registro de la actividad locomotora. Al intentar desplazarse, el movimiento del animal se transfiere a la esfera, cuyos movimientos son medidos mediante 2 mice ópticos ubicados perpendicularmente uno del otro. Para registrar las lecturas de los mice se utilizó una computadora con sistema operativo Linux (PC1). El dispositivo está rodeado por 5 monitores: uno izquierdo, uno derecho, uno frontal, uno posterior y uno superior. Se optó por realizar la estimulación visual en el monitor derecho. Para presentar los estímulos se utilizó la PC2 y los programas psictoolbox y MatLab. La PC3 se utilizó para proyectar el fondo blanco en los monitor frontal, trasero e izquierdo. El monitor superior permaneció apagado y no forma parte del esquema.

2.9 Adquisición y procesamiento de los datos de la actividad locomotora

A medida que el animal caminaba sobre la esfera los movimientos eran registrados por los sensores ópticos (de cada mouse). Estos sensores estaban ubicados en el plano ecuatorial, a 19 mm de la esfera y a 90 grados uno del otro. Los sensores ópticos miden el desplazamiento en unidades ópticas relativas (U.O.) que van del 1 al 127. En cada ensayo, un programa realizado en Python (en la PC1), permitió compaginar los datos ópticos de cada sensor y cada eje para cada instante. Las medidas se tomaron cada 8 ms.

Para transformar los datos de desplazamiento medidos en U.O. a cm, se multiplicaron los valores medidos de cada mouse por el factor de conversión obtenido en la calibración del dispositivo. La calibración y validación de este dispositivo fue parte de la tesis de Licenciatura de Juan Martín Díaz Guastavino (Díaz Gustavino, 2020).

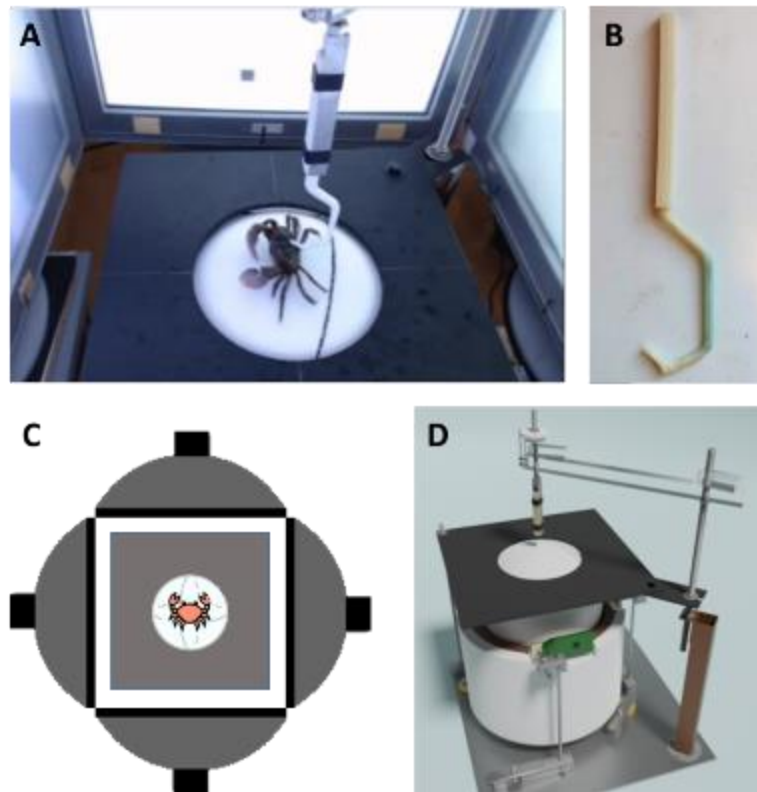


Figura 14. A) Fotografía del animal en el dispositivo experimental. **B)** Detalle de la varilla de sujeción del cangrejo. El diseño curvo permite minimizar los obstáculos en el campo visual del animal. **C)** Esquema del dispositivo en vista superior, el animal está rodeado por 4 monitores. El monitor a la derecha del animal se utilizó para proyectar los estímulos, mientras que los demás permanecieron en blanco. **D)** Detalle del treadmill (Ilustración de Juan Martín Díaz Guastavino).

Mediante un programa realizado en MatLab se transformaron los datos de desplazamiento en velocidad, dividiendo por el intervalo de tiempo entre cada dato y el anterior. Finalmente, para calcular la velocidad traslacional, se calculó la hipotenusa entre las velocidades calculadas en el eje X de cada mouse. Debido a que la resolución temporal del dispositivo es muy alta se generaron bases de datos muy pesadas, con una precisión de medida que resultaba irrelevante para los objetivos de este trabajo. Por esto y para una mayor practicidad se optó por promediar las velocidades en bins de 100 milisegundos. Por lo tanto, el perfil de velocidades de cada animal frente a cada estímulo ha sido levemente suavizado.

2.10 Protocolo experimental para medir la respuesta visomotora

Antes de comenzar cada experimento se chequeaba el estado general del animal como se describió en la sección de electrofisiología.

A cada animal se le pegó una varilla de plástico hueca en su dorso utilizando adhesivo acrílico. Para reducir el estrés causado por la manipulación se dejó reposar al animal en contenedores de vidrio individuales por 10 minutos.

Al principio de cada ensayo se colocó el animal sobre la esfera de telgopor. Luego de colocar al cangrejo se lo dejó adaptar durante 10 minutos mientras que todos los monitores permanecieron en blanco (adaptación al setup). A continuación, se presentó el estímulo de manera estacionaria por 15 segundos y luego se desencadenó el movimiento del objeto de un extremo de la pantalla al otro del monitor derecho. Luego del movimiento el estímulo permaneció estacionario en la posición final por 8 segundos antes de desaparecer. La velocidad de caminata espontánea fue medida con el objeto estacionario durante los 5 segundos previos al inicio de su movimiento. Una vez finalizado el ensayo el animal fue removido del dispositivo y se lo dejó reposar en un frasco individual por al menos 10 minutos antes de volver a colocarlo en el setup para medir su respuesta a otro estímulo. Así se repitió el protocolo para cada tipo de estímulo hasta finalizar con los 5 estímulos (FIGURA 15).

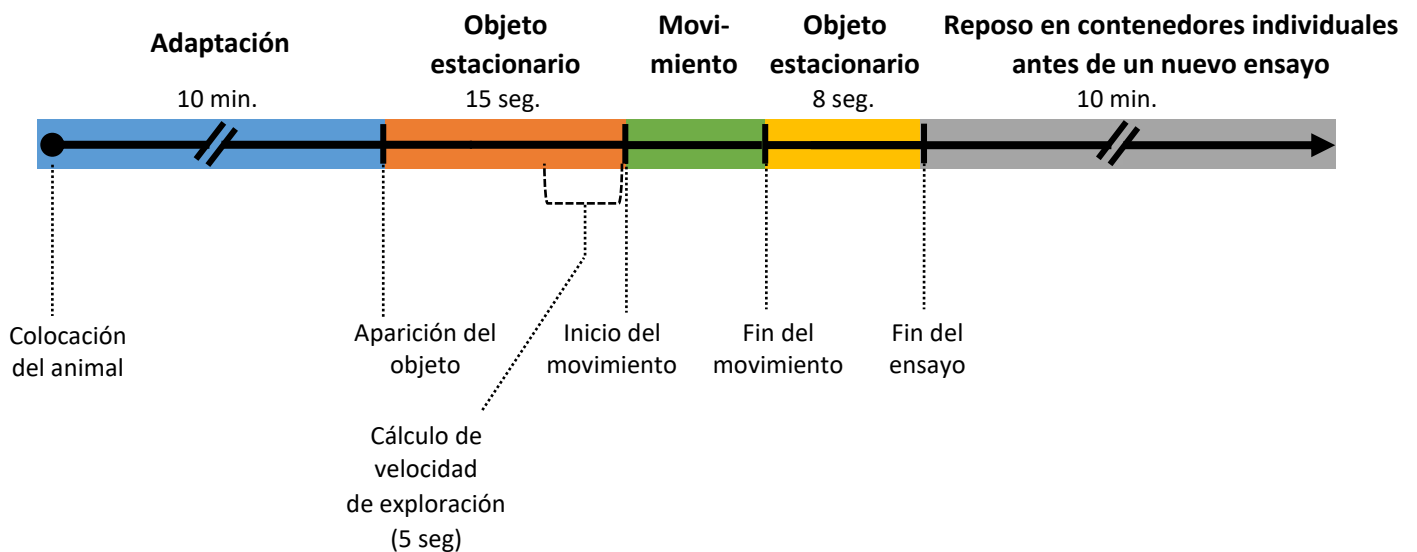


Figura 15 – Protocolo experimental para cada ensayo de medición de la respuesta visomotora.

2.11 Estímulos visuales de movimiento para medir la respuesta visomotora

Los estímulos utilizados en los experimentos comportamentales fueron 5 de los 6 estímulos utilizados en los experimentos de electrofisiología. El cuadrado pequeño bajo el ecuador no fue incluido por quedar parcialmente oculto a la vista del animal por la plancha negra que rodea la esfera, y que tiene por objeto simular el nivel del piso.

El sistema opera mediante un loop abierto, en el que el animal no puede alterar su orientación ni distancia real respecto al estímulo mientras corre sobre la esfera sin desplazarse ni rotar sobre su propio eje.

2.12 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias en las respuestas evocadas por los distintos estímulos se utilizaron modelos lineales generalizados en el software RStudio.

Los modelos lineales tradicionales se basan en estimaciones por el método de los Cuadrados Mínimos como el Análisis de Varianza (ANOVA) y el Análisis de Covarianza (ANACOVA), entre otros. Las premisas del ANOVA basado en un modelo lineal tradicional implican la normalidad de los datos. En ocasiones no es correcto suponer una distribución Normal. Por ejemplo, si se trata de conteos o proporciones, que son variables discretas. Además, los modelos lineales clásicos suponen que la varianza del error es constante entre las observaciones (homocedasticidad). Sin embargo, en las ciencias biológicas es común que la varianza de las observaciones aumente con el valor de la media. También es común realizar mediciones repetidas en el tiempo sobre las mismas unidades experimentales, lo que lleva a incumplir el supuesto de independencia (Zar, 2010).

Existen contextos donde no es posible utilizar modelos lineales clásicos para el análisis de varianzas porque no se cumplen los supuestos de independencia, normalidad, homocedasticidad y linealidad requeridos para su utilización. Estas limitantes han contribuido al surgimiento de modelos lineales generalizados (GLM, *Generalized Linear Models*), que aportan variaciones al modelo lineal tradicional, permitiéndole al mismo ser aplicado a un rango más amplio de datos (Zar, 2007).

En el modelo lineal tradicional se modela la media de la variable respuesta como una función lineal de las variables explicativas, mientras que en un GLM se modela una función no lineal de la media (función link o función de enlace) a través de una combinación lineal de las variables explicativas. Esto permite que en un GLM la distribución probabilística de la variable respuesta pueda ser cualquiera de la familia

exponencial (Gamma, Poisson, Binomial, entre otras) (Macchiavelli & Torres-Saavedra, 2018).

Los GLMs más usados en la actualidad son los Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMMs, Generalized Linear Mixed Models). La idea básica de este tipo de modelo es que existe una heterogeneidad natural entre los individuos (unidades experimentales), pudiendo dicha variabilidad ser representada por una distribución de probabilidad (Macchiavelli & Torres-Saavedra, 2018). La estimación de parámetros en estos modelos se realiza mediante procedimientos de máxima verosimilitud. Los procedimientos de estimación de los GLMMs posibilitan reducir los sesgos cuando los datos están incompletos y/o desbalanceados, permiten ajustar datos dispersos y permiten además modelar la estructura de los errores estándar (Bolker et al., 2009).

En experimentos de electrofisiología lograr registrar los 18 tratamientos (6 estímulos x 3 monitores, con 30 segundos de tiempo entre estímulos) en todas las neuronas fue un gran desafío porque el electrodo era susceptible a salirse de la neurona por los movimientos de las patas del animal o ante vibraciones que puedan ocurrir y que no sean amortiguadas por la mesa antivibratoria. Más aún, parte de este trabajo de Tesis fue llevado a cabo en un periodo muy especial del laboratorio en el cual se realizó una mudanza desde el Pabellón II de Ciudad Universitaria al nuevo Pabellón IFIBYNE, también en Ciudad Universitaria, que aún se encontraba en construcción. Debido a esto, hubo periodos en los cuales la recolección de datos ha sido muy difícil y varios registros quedaron incompletos (con uno o varios estímulos faltantes). Esta es la razón principal por la que se optó por utilizar GLMMs, ya que no son sensibles al desbalanceo de los datos, no interpretan de manera errónea a las pseudo-replicas y sirven no solo para datos con una distribución Normal de probabilidades, sino para cualquier distribución de la familia exponencial.

Los programas como RStudio permiten probar varios modelos y seleccionar el modelo que mejor ajusta a los datos. Además, RStudio facilita poner a prueba los supuestos de los GLM y GLMM (López-González & Ruiz Soler, 2011). Por esta razón en esta Tesis el modelado, selección del modelo que mejor ajuste a cada serie de datos y puesta a prueba de supuestos del modelo fue llevado a cabo mediante el Software RStudio. Para medir la bondad de ajuste y elegir el modelo que mejor se ajuste se utilizó un índice

denominado Criterio de Información de Akaike (AIC) (Akaike, 1977). En cada sección de resultados se detalla las características principales del modelo pertinente.

SECCIÓN 3: RESULTADOS



3 MLG1: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación.

3.1 Antecedentes sobre Neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula Tipo 1

Las neuronas del tipo MLG1 constituyen un ensamble retinotópico de 16 neuronas distribuidas en el eje lateromedial de la lóbula. Cada una de estas neuronas tiene un campo receptivo acotado de alrededor de 120 grados, con un considerable grado de superposición. Entre todas las MLG1 mapean los 360º grados del campo visual de cada ojo (Berón de Astrada et al., 2011), Ver **FIGURA 16**. Hay más unidades MLG1 dedicadas a cubrir el campo visual lateral, es decir, el área de máxima resolución óptica, que es utilizada por el animal para fijar objetos en movimiento. Todo esto sugiere que el ensamble de las MLG1 es capaz de codificar y transmitir información sobre la posición de los objetos, esta información estaría codificada como un vector de población o *population vector* (Medan et al., 2015). En cuanto al eje vertical del CR de las MLG1, el centro del campo se encuentra a nivel del ecuador del ojo (Medan et al., 2015). Además, las neuronas MLG1 son notoriamente más sensibles a objetos que se mueven horizontalmente que a los que se mueven verticalmente (Medan et al., 2015). Estas características son claras adaptaciones al mundo plano en el que habita el cangrejo, donde la mayor parte del movimiento de los objetos corresponde a los movimientos de los cangrejos vecinos a lo largo del plano horizontal (Tomsic et al., 2017).

Se ha estudiado la respuesta de las MLG1 frente a estímulos de looming y se ha encontrado evidencia de que estas neuronas tendrían un papel en el control de la dirección y la velocidad del escape (Oliva & Tomsic, 2014; Medan et al., 2015). La tasa de disparo de las neuronas MLG1 sigue la dinámica de expansión de los estímulos de looming, mientras que la figura en expansión permanece por debajo de 35 grados, es decir, durante la etapa inicial del escape (Oliva & Tomsic, 2014), de una manera que se corresponde con la velocidad de escape (Oliva et al., 2007).

Se ha estudiado las respuestas de estas neuronas frente a estímulos generados por computadora utilizando barras y cuadrados grandes desplazándose (Medan et al. 2007), pero nunca se han contrastado las respuestas de este tipo de neuronas frente a estímulos transnacionales de una variedad de tamaños y a estímulos pequeños a distintas alturas del campo visual.

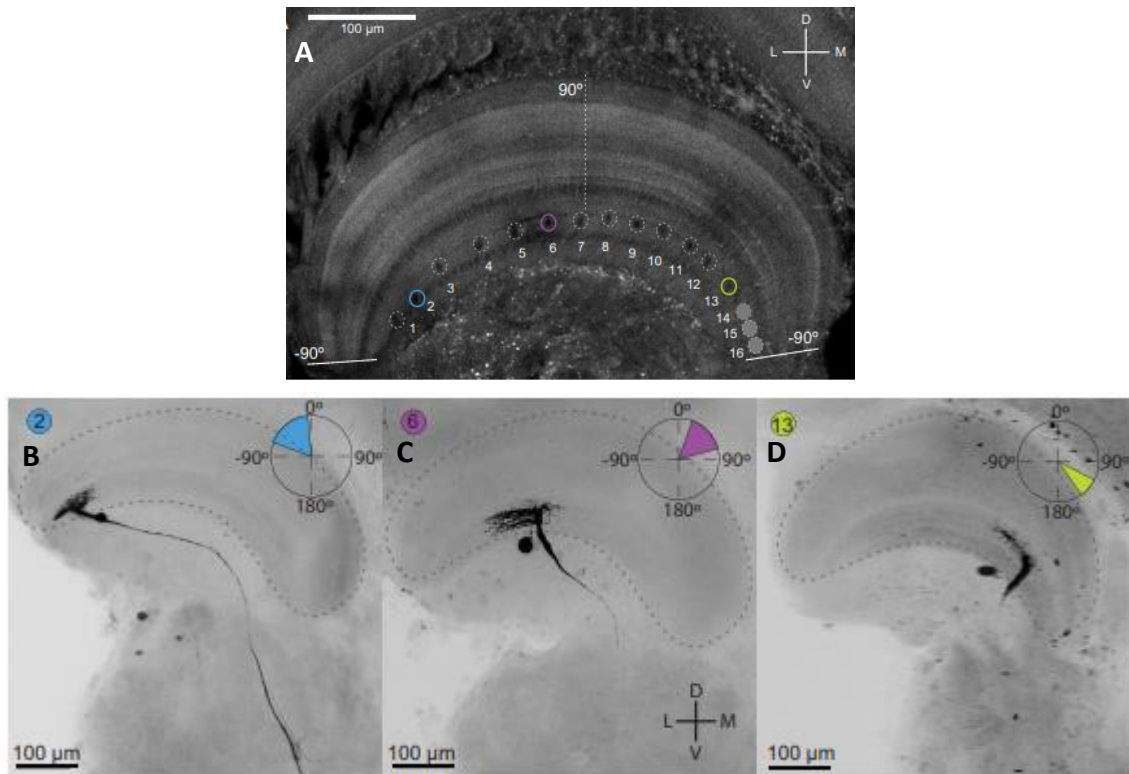


Figura 16 - A. Representación de la posición relativa de cada neurona MLG1 dentro de la lóbula en una sección transversal. Ejemplos de neuronas (de izquierda a derecha) en las regiones lateral, central y media del lóbulo. B, C y D: tinciones de neuronas MLG1, estas neuronas corresponderían a los elementos número 2, 6 y 13, (identificados con un código de color). Los gráficos polares muestran la ubicación del campo receptivo de cada neurona. Imágenes de Medan et al. 2015.

3.2 Descripción de la Muestra

Para evaluar la respuesta de las MLG1 evocada por objetos de distinto tamaño y elevación se registró la respuesta fisiológica frente a los diferentes estímulos, de 33 neuronas MLG1 correspondientes a 33 animales diferentes.

Características de la muestra:

- 16 neuronas presentaron su campo receptivo exclusivamente en el monitor frontal.
- 12 neuronas presentaron su campo receptivo exclusivamente en el monitor derecho.
- El campo receptivo de 3 de las neuronas MLG1 estudiadas abarcaba parte del monitor frontal y parte del monitor derecho.
- El campo receptivo de 2 de las neuronas estudiadas abarcaba parte del monitor izquierdo y parte del frontal.

En las siguientes figuras (**FIGURA 17**, **FIGURA 18**, **FIGURA 19**) se muestran, respectivamente, el registro de una neurona MLG1 cuyo campo receptivo (CR) se ubica en la región del campo visual correspondiente al monitor frontal; una cuyo CR se ubica en la región correspondiente al monitor derecho; y otra cuyo CR abarca parte del monitor izquierdo y parte del frontal. En los registros se evidencia que estímulos de diferentes tamaños y estímulos pequeños de diferente elevación evocan respuestas de distinta intensidad. Al observar los datos crudos de las respuestas registradas de las 33 neuronas (**FIGURA 20**) también se aprecia que las MLG1 respondieron con intensidades diferentes a los distintos estímulos en el monitor donde se evocaron las máximas respuestas. Para poder hacer un análisis estadístico que tenga en cuenta la falta de independencia de medidas repetidas en una misma neurona, utilizamos un modelo lineal mixto generalizado.

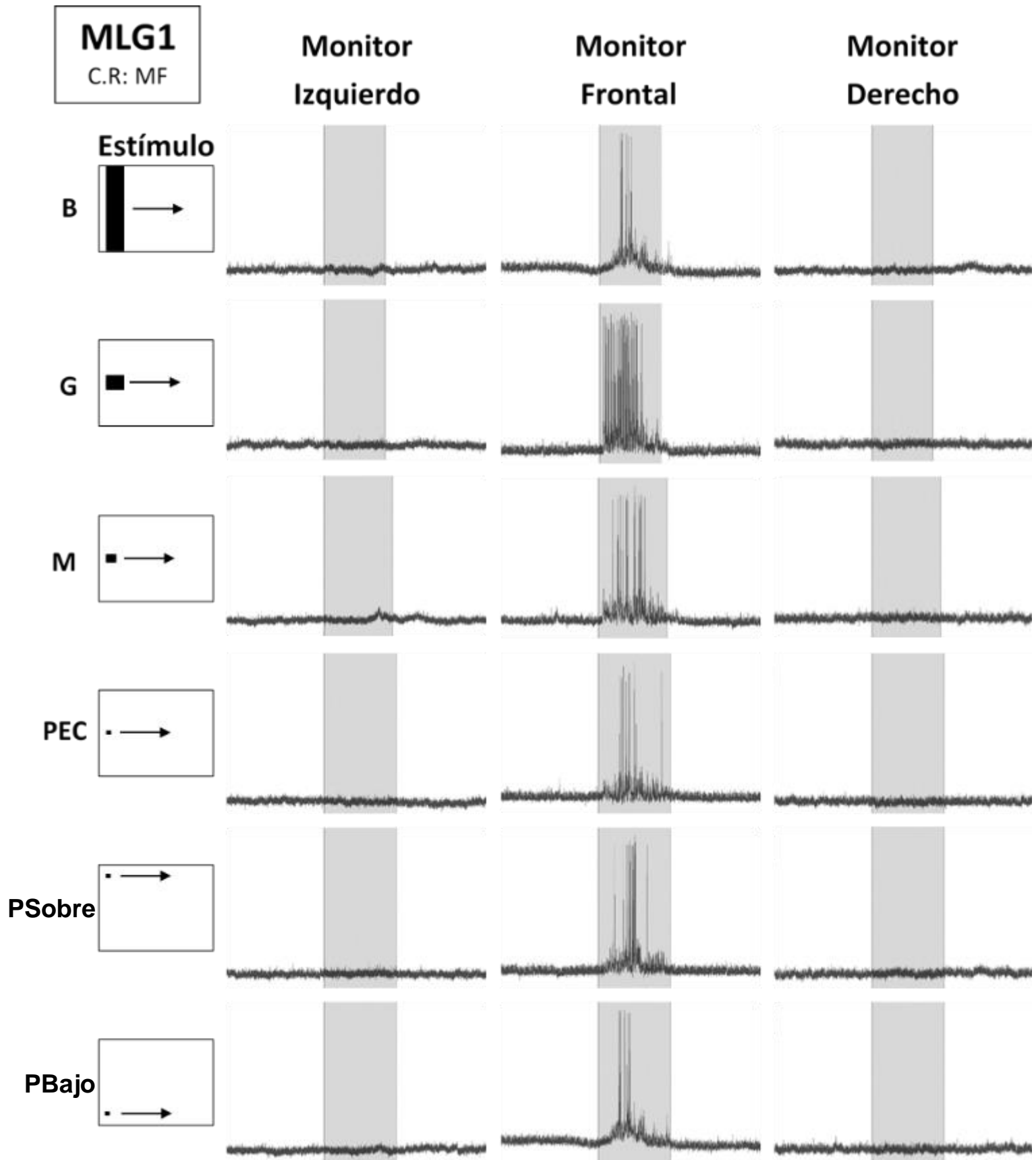


Figura 17 - Registro intracelular de neurona MLG1 con C.R. en la región frontal. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

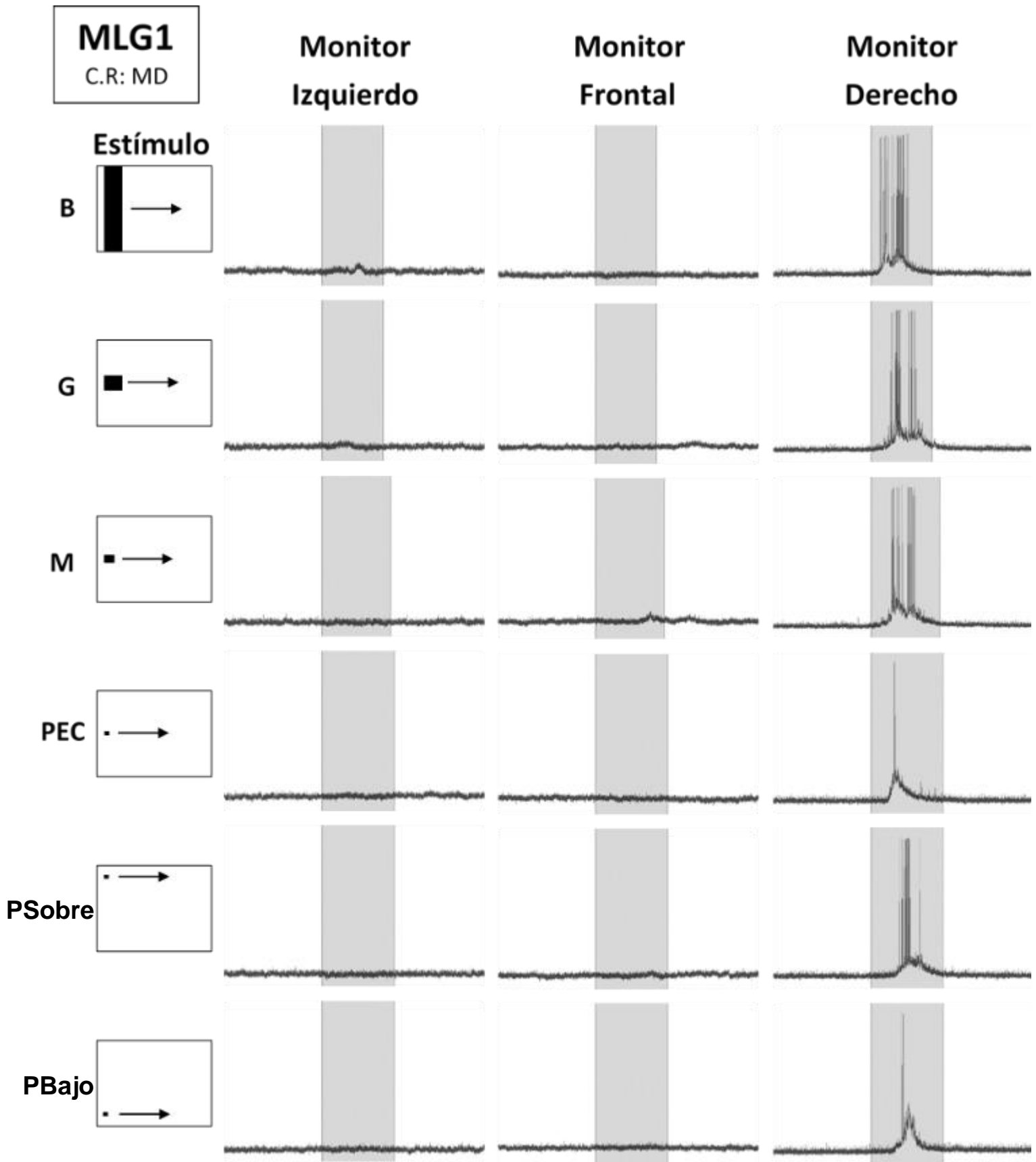


Figura 18 – Registro intracelular de neurona MLG1 con C.R. en la región derecha. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

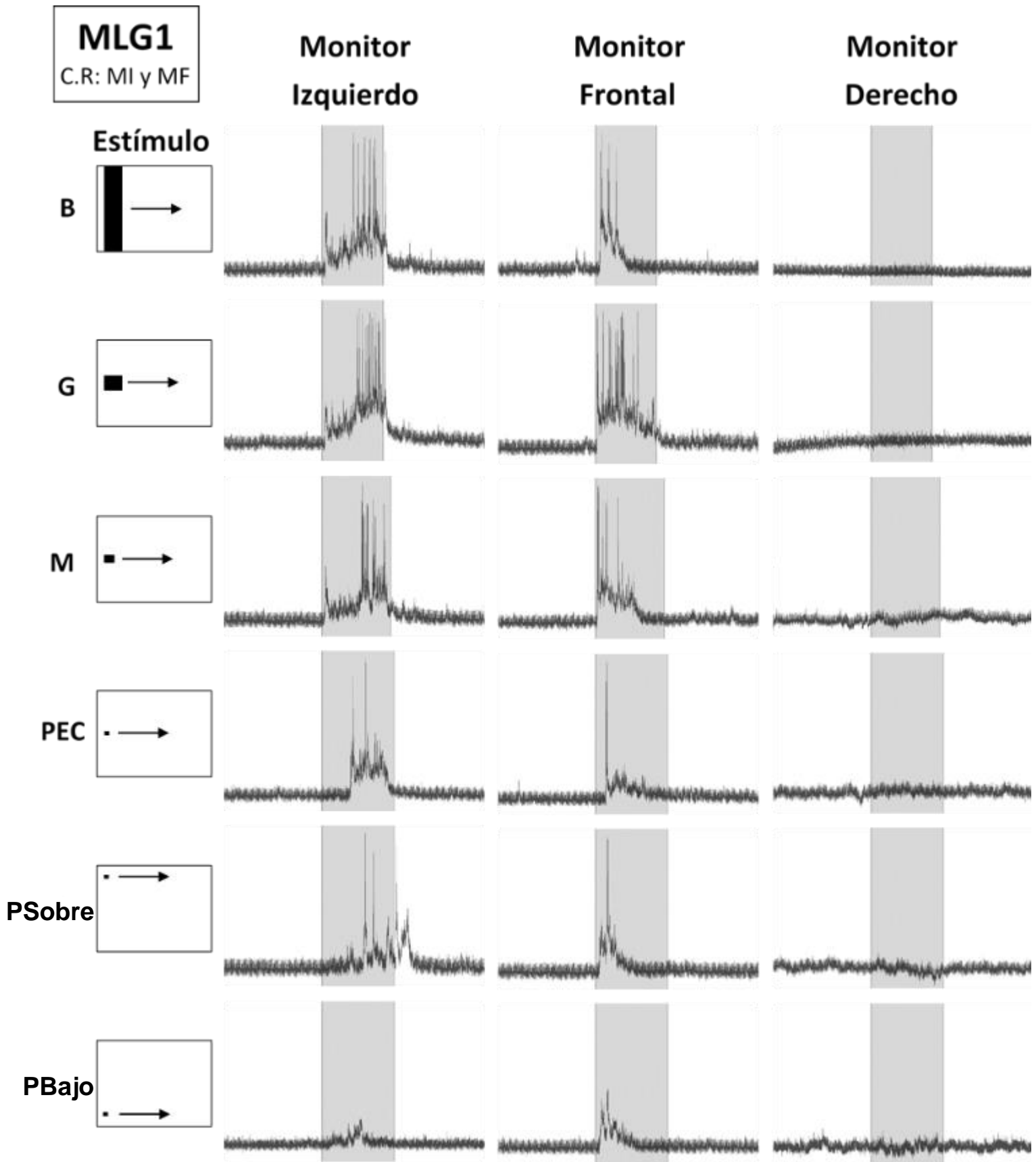


Figura 19 – Registro intracelular de neurona MLG1 un C.R. que abarca parte del MI y parte del MF. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

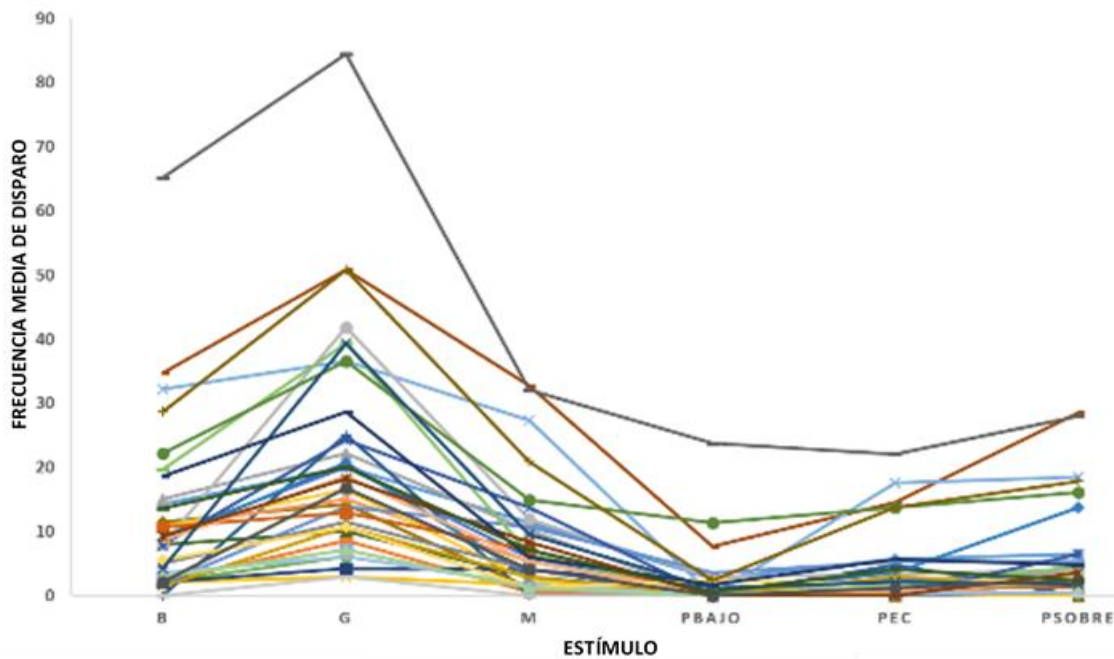


Figura 20 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo en cada una de las 33 neuronas. El gráfico se confeccionó utilizando los datos registrados en el monitor donde cada neurona presentó la máxima respuesta (centro del campo receptivo). Cada punto equivale a la frecuencia media de disparo (spikes/seg.) durante el paso del estímulo. Cada línea de color corresponde a una neurona diferente.

Los registros se realizaron siempre en el ojo derecho del animal. El arreglo retino-tópico de las neuronas MLG1 y la posición del ojo hace improbable el registro de las neuronas MLG1 cuyo CR mapea la región del campo visual donde se ubica el monitor izquierdo, por esta razón están sub-representadas en la muestra. Sin embargo, las neuronas que presentaron respuesta en el monitor izquierdo no presentan particularidad respecto al resto de las MLG1, por ello no fueron removidas de la muestra.

3.3 Análisis estadístico

Para cada neurona de las 33 MLG1 de la muestra tomamos los datos registrados al estimular en el monitor donde se obtuvieron las máximas respuestas, es decir el monitor donde se encuentra el centro del campo receptivo de cada neurona.

Con el objetivo de evaluar las diferencias estadísticas en la tasa de disparo evocada por cada estímulo se aplicó un modelo lineal mixto generalizado mediante el paquete “glmmTMB” (Brooks et al., 2017) del programa R. Los supuestos del modelo fueron puestos a prueba mediante un análisis de residuos utilizando el paquete “DHARMA” (Hartig, 2016).

Características del Modelo

- Variable respuesta: Número de spikes/s evocados por el estímulo.
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Binomial negativa.
- Factor aleatorio: ID de la neurona. De esta manera el modelo tiene en cuenta la falta de independencia entre registros de la respuesta a distintos estímulos realizados en la misma neurona.
- Offset: Tiempo que dura cada estímulo.
- Variable explicativa 1: Tipo de estímulo. Consta de 6 niveles: Barra, Cuadrado grande, Cuadrado mediano, Cuadrado pequeño en el ecuador, cuadrado pequeño sobre el ecuador y cuadrado pequeño bajo el ecuador.
- Variable explicativa 2: Monitor donde se obtuvo la máxima rta. Consta de 3 niveles: Monitor izquierdo, frontal y derecho.
- Función link del modelo: logística (Los cálculos son realizados en la escala logarítmica).

Al estudiar el efecto del estímulo en la respuesta se realizó un análisis de la devianza (chi cuadrado de Wald), equivalente al ANOVA que se utiliza en los modelos lineales generales. Se estudiaron las variables ESTÍMULO, MONITOR DE MÁXIMA RESPUESTA y la interacción entre ambas.

Antes de adentrarnos en los resultados del test estadístico definimos el significado del efecto de cada variable explicativa (estímulo, monitor donde se obtuvo la máxima respuesta y su interacción).

- Una diferencia significativa del efecto ESTÍMULO implicaría que las neuronas de tipo MLG1 responden con distinta intensidad (tasa de disparo) a los estímulos presentados, siendo más sensibles a algunos estímulos que a otros (Por ejemplo, respuestas más intensas al cuadrado grande y menos intensas a los cuadrados pequeños).
- Una diferencia significativa en el efecto MONITOR DE MÁXIMA RESPUESTA implicaría que las MLG1 que comparten su campo receptivo en un monitor particular (por caso el derecho), presentan respuestas más intensas que las MLG1 que tienen su campo en otro monitor (por caso el frontal), independientemente del estímulo.
- Un efecto significativo de la interacción ESTÍMULO:MONITOR significaría que neuronas MLG1 con campos receptivos en una región particular (por caso

monitor derecho) presentarían una sensibilidad a los estímulos diferente respecto a las MLG1 cuyo CR se encuentre en otra región del campo visual (por caso el monitor frontal). Un ejemplo hipotético de esta situación sería que las neuronas MLG1 que tienen su CR en el monitor derecho respondan más intensamente a las barras que a los demás estímulos, mientras que las MLG1 que tienen su campo en el monitor frontal respondan más intensamente al cuadrado mediano.

La prueba de Chi cuadrado de Wald (TABLA 4) indicó que, de acuerdo al tipo de estímulo se evocan respuestas de distinta intensidad. Por otro lado, el efecto monitor no fue significativo. Además, la interacción entre estímulo y monitor tampoco resultó significativa. Esta falta de significancia en la interacción implica que las MLG1 que tienen el centro de su campo receptivo en distintos monitores no difieren en cuanto a la sensibilidad al tamaño y a la elevación del estímulo visual.

Análisis de la devianza (Chi cuadrado de Wald)

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	360,68	5	< 2.2e-16 ****
MONITOR DE MAX. RTA.	4,04	2	0,13
MONITOR DE MAX:ESTIMULO	13,49	10	0,20

Cod. de Signif: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*'

Tabla 4 - Test de Chi cuadrado de Wald para la muestra de 33 neuronas MLG1 en el monitor donde se obtuvo la máxima respuesta.

3.4 Perfil de respuesta de las neuronas del tipo MLG1 predicha por el modelo

Del modelo se obtiene la respuesta predicha para cada estímulo en el monitor donde se evoca la máxima respuesta (TABLA 5).

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	11,88	1,99	8,55	16,52
G	24,54	3,89	17,95	33,54
M	9,56	1,63	6,83	13,39
PBAJO	1,55	0,39	0,94	2,56
PEC	3,97	0,75	2,74	5,75
PSOBRE	6,01	1,09	4,21	8,59

Tabla 5 – Tasa de disparo predicha (Hz) por el modelo para la muestra de 33 neuronas MLG1.

Para determinar si las diferencias entre las tasas de disparo son estadísticamente significativas se realizó el test de Tukey con una corrección para el cálculo de 6 estimadores (TABLA 6). El perfil de la respuesta de las neuronas MLG1 predicho por el modelo se muestra en el siguiente gráfico (FIGURA 21). Donde se observa que el cuadrado grande evocó la mayor respuesta (24.54 ± 3.89 Hz). Los estímulos de la barra y el cuadrado mediano produjeron respuestas aproximadamente 50% menores a las evocadas por el cuadrado grande (11.8 ± 1.99 Hz y 9.56 ± 1.63 Hz respectivamente). Los cuadrados pequeños evocaron las respuestas más bajas. Entre los estímulos pequeños el cuadrado que se desplaza sobre el ecuador evocó la mayor respuesta (6.01 ± 1.09 Hz) seguido por el cuadrado pequeño que se desplaza en el ecuador (3.97 ± 0.75 Hz), aunque la diferencia entre estos no fue significativa. El que se desplaza bajo el ecuador generó respuestas de baja intensidad (1.55 ± 0.39 Hz), con diferencias significativas con relación tanto al cuadrado pequeño en el ecuador como sobre el mismo.

CONTRASTE	COCIENTE DE TASAS	ERROR STD	T RATIO	P VALOR
B / G	0,48	0,05	-6,96	< 0,0001 ****
B / M	1,24	0,15	1,78	0,48
B / PBAJO	7,65	1,72	9,07	< 0,0001 ****
B / PEC	3,00	0,44	7,53	< 0,0001 ****
B / PSOBRE	1,98	0,27	4,95	< 0,0001 ****
G / M	2,57	0,28	8,66	< 0,0001 ****
G / PBAJO	15,80	3,43	12,73	< 0,0001 ****
G / PEC	6,19	0,83	13,53	< 0,0001 ****
G / PSOBRE	4,08	0,51	11,23	< 0,0001 ****
M / PBAJO	6,16	1,39	8,06	< 0,0001 ****
M / PEC	2,41	0,36	5,93	< 0,0001 ****
M / PSOBRE	1,59	0,22	3,32	0,0132*
PBAJO / PEC	0,39	0,09	-3,95	0,0014**
PBAJO / PSOBRE	0,26	0,06	-5,82	< 0,0001 ****
PEC / PSOBRE	0,66	0,11	-2,60	0,10

Codigos de Significancia: 0 '****' - 0.001 '****' - 0.01 '***' - 0.05 '**'

Tabla 6 – Test de Tukey para 6 estimadores de la tasa de disparo de las neuronas MLG1 predicha por el modelo.

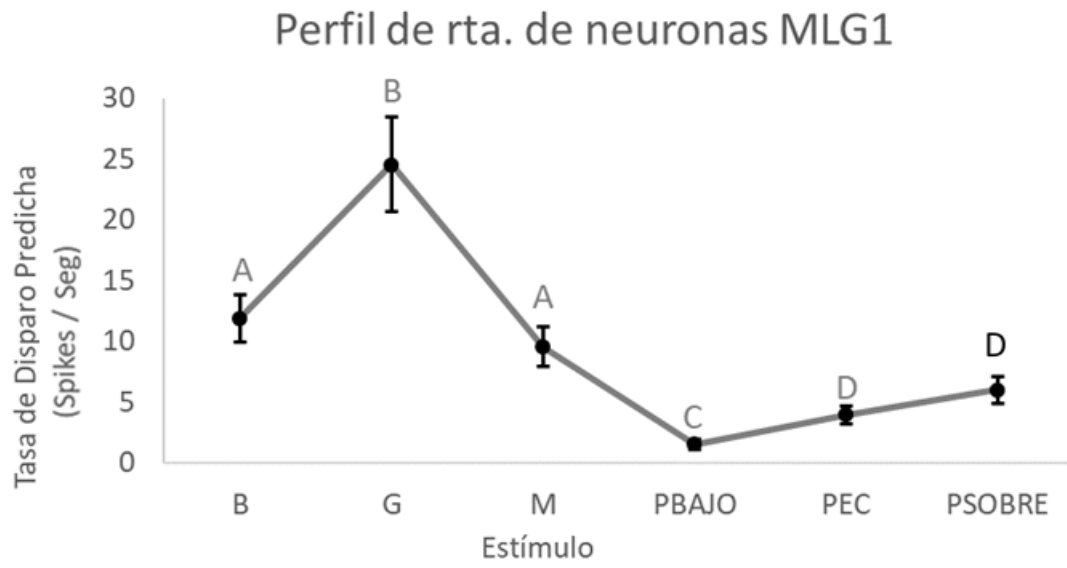


Figura 21 – Perfil de Rta de las neuronas MLG1. Cada vértice représenta la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. $n = 33$ neuronas.

4 MLG2: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación.

4.1 Antecedentes sobre Neuronas Monoestratificadas Gigantes de la Lóbula Tipo 2

A diferencia de las MLG1, aparentemente hay una sola neurona MLG2 en cada lóbula, cuyo campo receptivo abarca el total del campo visual del cangrejo (Medan et al., 2007). Esta clase de neurona presenta arborizaciones tangenciales que recorren toda la lóbula, colectando información de todo el arreglo de columnas (**FIGURA 22**).

Frente a estímulos en expansión las neuronas MLG2 responden, al igual que las MLG1, con un aumento progresivo en la tasa de disparo, pero que frecuentemente es seguido de un breve período de hiperpolarización y supresión de disparos después del cese del estímulo (Medan et al. 2007; Oliva y Tomsic 2016). A diferencia de las MLG1, la neurona MLG2 responde a los estímulos que se acercan desde cualquier lugar del campo visual del cangrejo y codifican la información sobre objetos que se expanden incluso más allá de los 35 grados. Utilizando una amplia variedad de dinámicas de expansión, se encontró que la neurona MLG2 codifica fielmente la velocidad angular de los estímulos que se acercan y probablemente esté involucrada en el control de la respuesta de escape (Oliva & Tomsic, 2016).

La respuesta al movimiento traslacional de una barra en el eje horizontal consiste en un tren sostenido de potenciales de acción durante el movimiento del estímulo, generalmente seguido de una hiperpolarización que suprime los disparos durante varios cientos de milisegundos (Medan et al. 2007). Nunca se han contrastado las respuestas de este tipo de neuronas frente a estímulos trasnacionales de una variedad de tamaños y a estímulos pequeños a distintas alturas del campo visual.

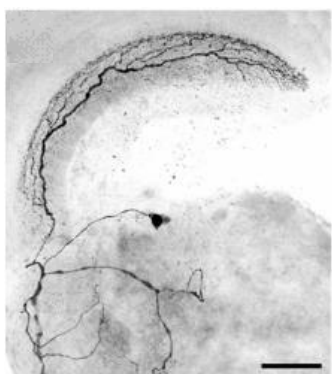


Figura 22 - Fotografía mediante microscopía confocal del árbol dendrítico de una neurona MLG2 teñida. Escala: barra = 100 μ m. Tomada de Medan et al. 2007.

4.2 Descripción de la Muestra

Para evaluar la respuesta de las MLG2 evocada por objetos de distinto tamaño y elevación se registró la respuesta fisiológica de 41 neuronas del tipo MLG2 de 41 animales.

Lograr registrar los 18 tratamientos (6 estímulos x 3 monitores, con 30 segundos de tiempo entre estímulos) en todas las neuronas es un gran desafío porque el electrodo es susceptible a salirse de la neurona por los movimientos de las patas del animal o ante vibraciones que puedan ocurrir y que no sean amortiguadas por la mesa antivibratoria. Por esta razón en varias neuronas no se lograron registrar los 18 estímulos. Sin embargo, al tener en cuenta la población total de datos, todos los estímulos están bien representados. Cabe mencionar que, en algunas neuronas incluso se obtuvieron registros repetidos de varios de los estímulos. En esos casos se pudo observar que en cada neurona las respuestas repetidas a un mismo estímulo y monitor fueron consistentes. En la **TABLA 7** se informa el n de cada tratamiento.

Estímulo	Monitor		
	MI	MF	MD
B	27	38	32
G	31	38	33
M	26	37	25
PBAJO	22	35	25
PEC	31	39	34
PSOBRE	25	35	24

Tabla 7 – Cantidad de neuronas MLG2 por tratamiento.

La **FIGURA 23** muestra la respuesta electrofisiológica de una neurona MLG2 en la que se logró registrar la respuesta a los 18 estímulos. Para cada estímulo se midió el número de spikes durante el movimiento de la figura. Las neuronas MLG2, a diferencia de las MLG1, presentan actividad espontánea. La frecuencia espontánea fue medida durante 2 segundos previos al paso de cada estímulo para poder ser incluida en el modelo como una covariable. De esta manera la frecuencia predicha evocada por cada estímulo será calculada por el modelo teniendo en cuenta la frecuencia basal.

Otra diferencia entre las MLG1 y las MLG2 es que el CR de las MLG2 es amplio y abarca todo el campo visual. Si bien el CR no es completamente uniforme, al observar los

registros vemos que la respuesta evocada por el mismo estímulo en distintos monitores es muy similar.

En la **FIGURA 24** se muestran los datos crudos de las respuestas registradas de las 41 neuronas MLG2. Estas neuronas respondieron con intensidades diferentes a los distintos estímulos. En claro contraste con las neuronas MLG1 cuyo campo receptivo se circunscribe casi exclusivamente a un monitor, el de las MLG2 es amplio, lo que se observa por que en cada neurona se registran respuestas en todos los monitores, como se observa en el ejemplo de la **FIGURA 23**. Para poder hacer un análisis estadístico que tenga en cuenta la falta de independencia de medidas repetidas en una misma neurona, utilizaremos nuevamente un modelo lineal mixto generalizado.

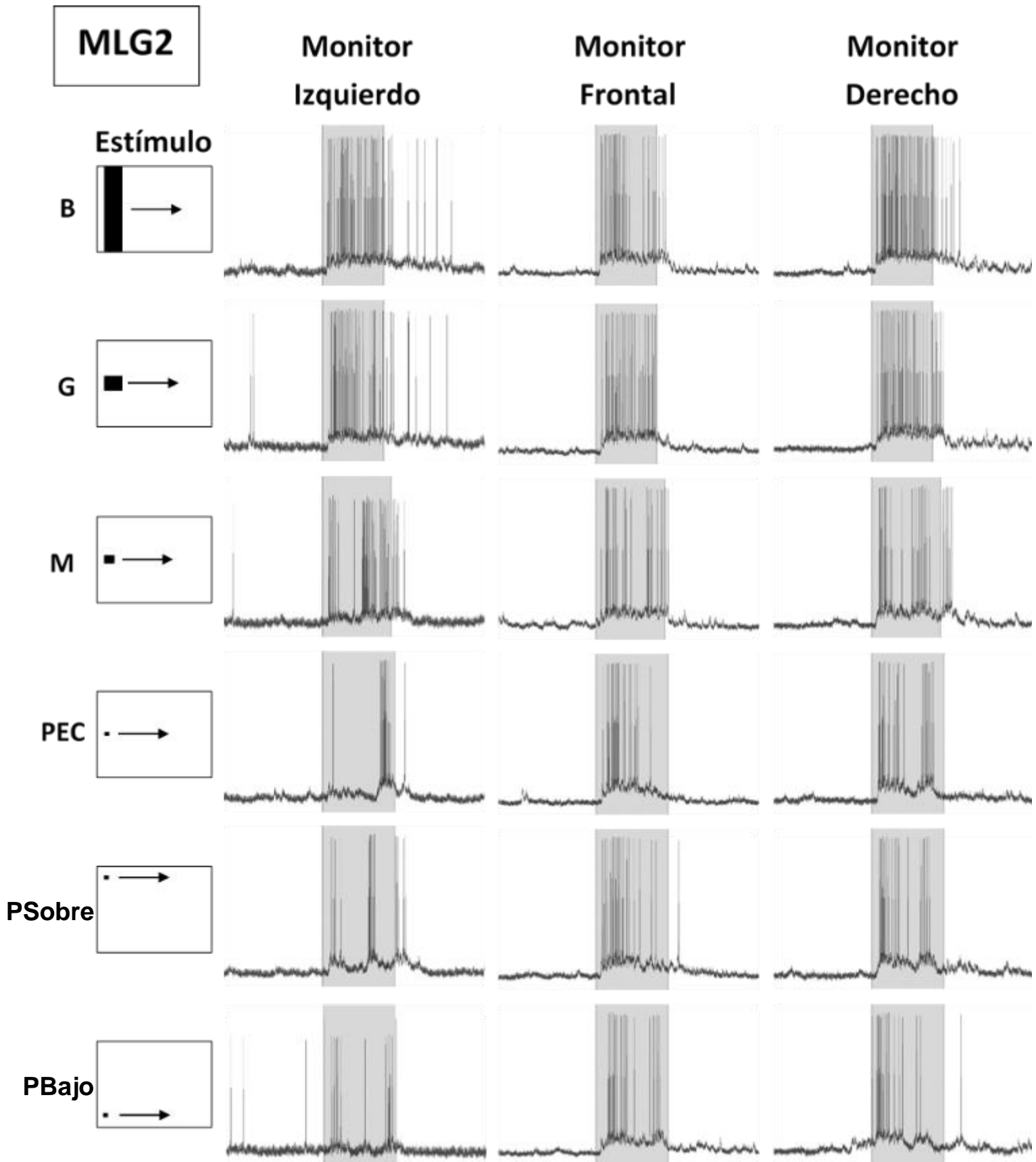


Figura 23 – Registro intracelular de neurona MLG2. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

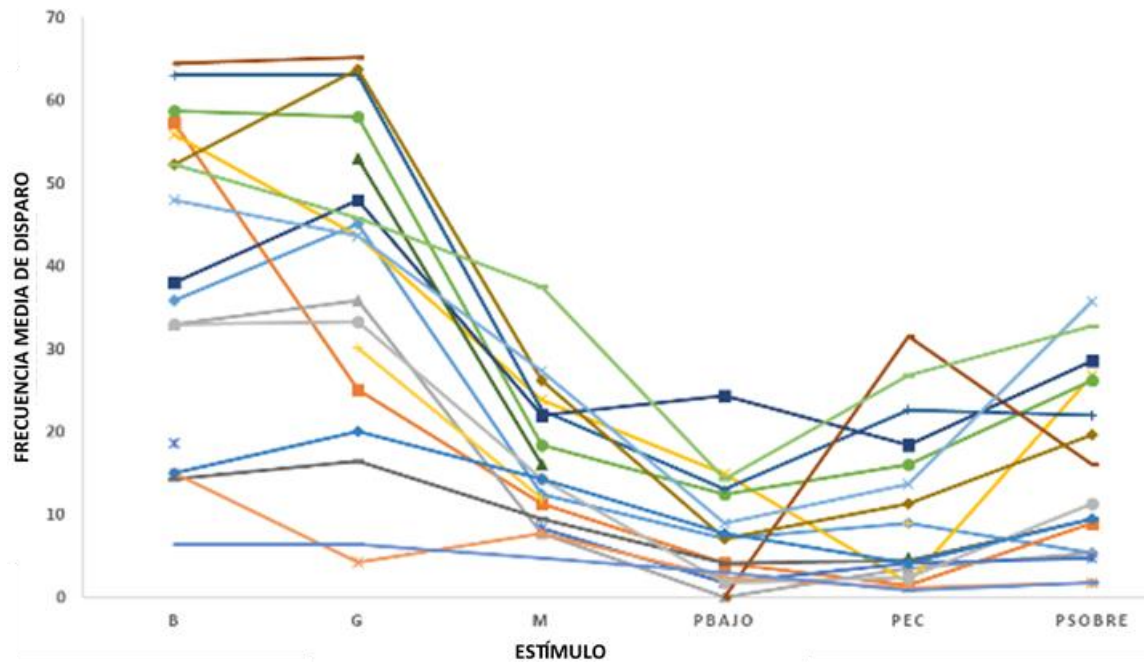


Figura 24 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo en cada una de las 41 neuronas MLG2. El gráfico se confecciono utilizando los datos registrados en el monitor donde cada neurona presentó la máxima respuesta (centro del campo receptivo). Cada punto equivale a la frecuencia media de disparo (spikes/seg.) durante el paso del estímulo menos la frecuencia espontanea calculada previo al paso de cada estímulo. Cada línea de color corresponde a una neurona diferente.

4.3 Análisis estadístico de los datos

Para evaluar las diferencias estadísticas en la tasa de disparo evocada por cada estímulo se aplicó un modelo lineal mixto generalizado mediante el paquete “glmmTMB” (Brooks et al., 2017) del programa R. Los supuestos del modelo fueron puestos a prueba mediante un análisis de residuos utilizando el paquete “DHARMA” (Hartig, 2016).

Características del Modelo

- Variable respuesta: Número de spikes durante el paso del estímulo.
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Binomial negativa.
- Factor aleatorio: ID de la neurona.
- Covariable: Actividad basal (frecuencia espontánea previa al paso de cada estímulo).
- Offset: Tiempo que dura cada estímulo.
- Variable explicativa 1: Tipo de estímulo. Consta de 6 niveles: Barra, Cuadrado grande, Cuadrado mediano, Cuadrado pequeño en el ecuador, cuadrado pequeño sobre el ecuador y cuadrado pequeño bajo el ecuador.
- Variable explicativa 2: Monitor. Consta de 3 niveles: Monitor izquierdo, frontal y derecho.

- Función link del modelo: logística (Los cálculos son realizados en la escala logarítmica).

En cada neurona se identificó al monitor donde se obtuvieron las respuestas de mayor, mediana y menor intensidad. El 68,4% (28 de 41) de las neuronas MLG2 obtuvieron su máxima respuesta en el monitor frontal, el 26,3% (11 de 41) en el monitor derecho y solamente el 5,3% (2 de 41) en el monitor izquierdo (monitor contralateral al ojo donde se registró la respuesta). En cuanto al monitor donde se registraron intensidades medianas, el monitor derecho representa un 43,8%, el frontal un 31,3% y el izquierdo un 25%. Por último, las respuestas más bajas se presentaron principalmente en el monitor izquierdo representando un 76,9% de las neuronas, seguido del frontal con un 15,4% y finalmente el monitor derecho (monitor ipsilateral) con un 7,7%. Cabe aclarar que, si bien las máximas y mínimas respuestas se obtienen por estimulación en los monitores frontal e izquierdo respectivamente, no hay diferencias importantes entre las respuestas evocadas en cada monitor (como se observa en los registros de la **FIGURA 23**). Sin embargo, como el CR no es completamente uniforme hemos tomado como criterio estudiar el perfil de las respuestas en cada monitor para evaluar si las preferencias al tamaño y elevación de los objetos en movimiento se conservan a lo largo del CR o si hay variaciones.

La distribución de las intensidades de respuesta según el monitor donde se obtuvo se resume en la **TABLA 8**.

MLG2			
	Máximo	Medio	Mínimo
MI	5,3%	25,0%	76,9%
MF	68,4%	31,3%	15,4%
MD	26,3%	43,8%	7,7%
	100%	100%	100%

Tabla 8 – Distribución de la intensidad de respuesta según el monitor donde fue evocada. MI: Monitor izquierdo. MD: monitor derecho. MF: monitor frontal.

La prueba de Chi cuadrado de Wald (**TABLA 9**, **TABLA 10** y **TABLA 11**) realizada en cada grupo de monitores (máxima, mediana y menor intensidad de respuesta) indica en los tres casos que:

- El tipo de estímulo tiene un efecto en la intensidad de la respuesta (spikes / seg).
- El monitor (derecho, frontal o izquierdo) donde se proyectaron los estímulos no tiene un efecto significativo en la respuesta.
- La interacción entre estímulo y monitor no resulto significativa. Esta falta de significancia en la interacción implica que en todos los monitores el perfil de respuesta es igual.

- Como era de esperar, la frecuencia espontanea tiene un efecto significativo en la respuesta al estímulo.

Análisis de la devianza (Chi cuadrado de Wald)

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	139.98	5	< 2e-16 ****
MONITOR	2.14	2	0.10
ACTIVIDAD BASAL	6.89	1	0.03*
ESTIMULO:MONITOR	9.19	10	0.51

Cod. de Signif: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 9 – Análisis de la Devianza en Monitor de Máxima respuesta Neuronas MLG2

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	117.50	5	< 2e-16 ****
MONITOR	1.19	2	0.6
ACTIVIDAD BASAL	0.73	1	0.04*
ESTIMULO:MONITOR	5.86	10	0.83

Cod. de Signif: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 10 – Análisis de la Devianza en Monitor de Mediana respuesta Neuronas MLG2

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	172.31	5	< 2.00e-16 ****
MONITOR	2.05	2	0.4
ACTIVIDAD BASAL	5.55	1	0.01848 *
ESTIMULO:MONITOR	16.66	10	0.08228 .

Cod. de Signif: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 11 – Análisis de la Devianza en Monitor de Mínima respuesta Neuronas MLG2

4.4 Perfil de respuesta de las neuronas del tipo MLG2 predicha por el modelo

Se modeló la respuesta para cada sector del CR (monitor de máxima, media y mínima intensidad de respuesta) y se obtuvo la respuesta predicha para cada estímulo (TABLA 12, TABLA 13 y TABLA 14).

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	38.96	7.41	26.55	57.10
G	41.32	8.46	27.35	62.40
M	18.46	4.07	11.84	28.80
PBAJO	8.01	2.85	3.91	16.40
PEC	10.69	2.59	6.56	17.40
PSOBRE	22.26	4.78	14.45	34.30

Tabla 12 – Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Máxima respuesta

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	41.10	6.02	30.74	55.10
G	34.30	4.80	25.90	45.30
M	22.20	3.48	16.27	30.40
PBAJO	11.40	2.42	7.43	17.40
PEC	14.60	2.40	10.53	20.30
PSOBRE	21.30	3.60	15.16	29.80

Tabla 13 - Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Mediana respuesta

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	17.42	2.95	12.44	24.39
G	13.90	2.42	9.82	19.66
M	11.53	2.23	7.85	16.94
PBAJO	3.15	0.84	1.86	5.35
PEC	6.42	1.19	4.44	9.30
PSOBRE	5.62	1.24	3.62	8.73

Tabla 14 - Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Mínima respuesta

Para determinar si las diferencias entre las tasas de disparo son estadísticamente significativas se realizó el test de Tukey con una corrección para el cálculo de 6 estimadores. El perfil de sensibilidad de las MLG2 se muestra en las siguientes figuras (FIGURA 25, FIGURA 26 y FIGURA 27).

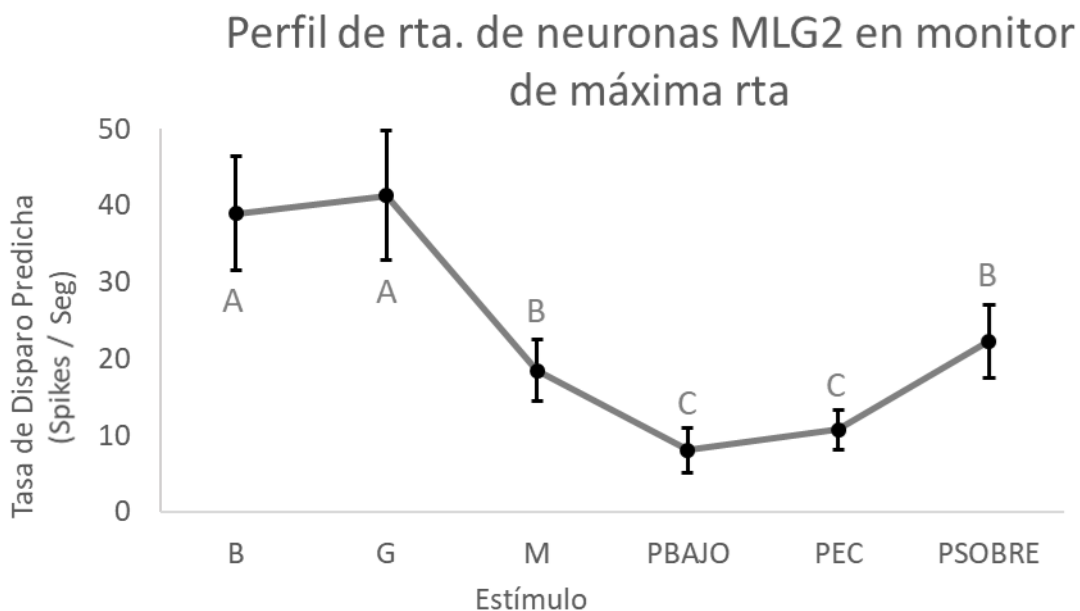


Figura 25 – Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Máxima respuesta. Cada vértice representa la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

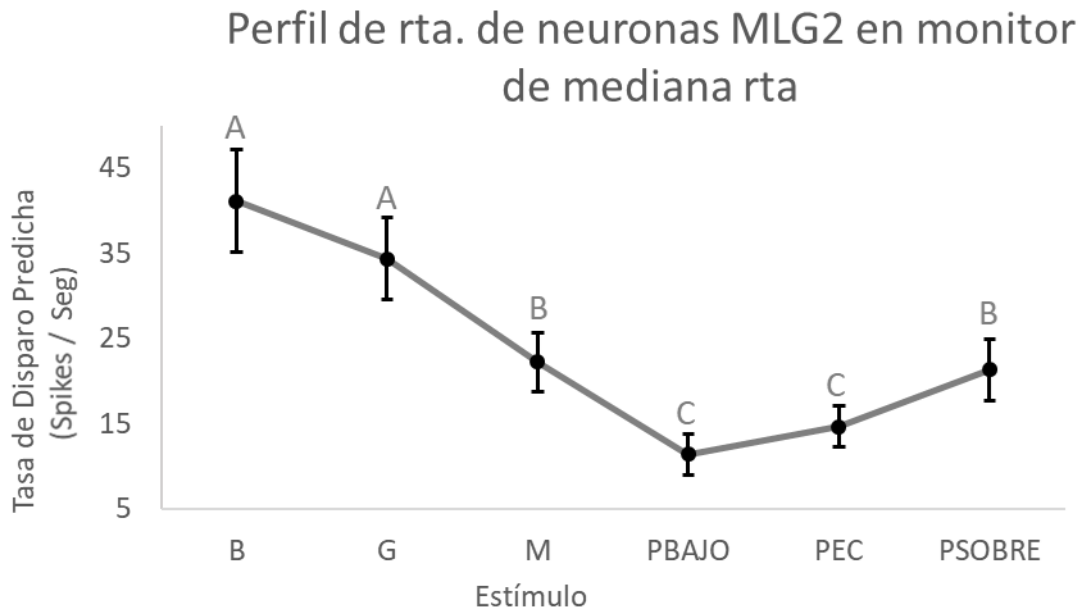


Figura 26 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Mediana respuesta. Cada vértice representa la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

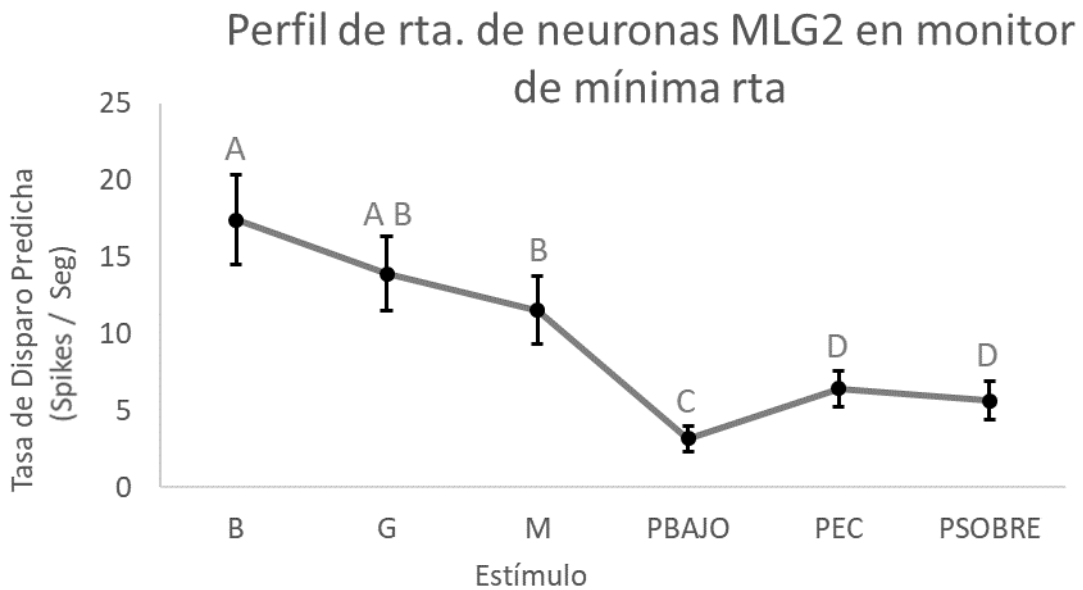


Figura 27 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Mínima respuesta. Cada vértice representa la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

Lo primero que se observa es que el perfil de sensibilidades a los diferentes estímulos mayormente se conserva a lo largo del campo receptivo, con algunas leves diferencias en el monitor donde se registraron las menores respuestas.

A diferencia de las MLG1, la barra y el cuadrado grande generan las respuestas de mayor intensidad, sin diferencias significativas entre estos dos estímulos. En las áreas más sensibles de CR (monitores donde se evocaron las respuestas mayores y medianas) el objeto pequeño elevado evoca respuestas mayores en comparación a los otros objetos pequeños, estas son de intensidad similar a la respuesta evocada por el cuadrado mediano. Los cuadrados pequeños en el ecuador y por debajo del mismo evocan las respuestas menos intensas. En el área menos sensible del CR la sensibilidad a la elevación del objeto pequeño se pierde y la tasa de disparo evocada por el PEC y el PSOBRE no presentan diferencias significativas, mientras que el PBAJO genera respuestas extremadamente débiles. En esta área menos sensible del campo también se pierden las diferencias entre las respuestas evocadas por el cuadrado grande y el mediano.

5 BLG1: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación

5.1 Antecedentes sobre Neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula de Tipo 1

En estudios previos, a partir de tinciones intracelulares, se determinó que existen al menos 3 neuronas BLG1 en cada lóbula. En la **FIGURA 28** se muestra una tinción de una neurona de esta clase. El campo receptivo de cada BLG1 abarca el total del campo visual, aunque la intensidad de la respuesta no es homogénea a lo largo del campo (Medan et al., 2007). La respuesta de las BLG1 al movimiento se caracteriza por un incremento en la frecuencia de disparo de P.A. que, a diferencia de las MLG2, nunca es seguido por una inhibición cuando cesa el movimiento. Más aún, luego de la finalización del movimiento estas neuronas suelen continuar disparando P.A. a una frecuencia mayor a la frecuencia espontánea, lo que también las diferencia de las MLG1.

Las BLG1 responden a objetos en expansión con una despolarización gradual y un incremento en la frecuencia de disparo. Sin embargo, a diferencia de las MLG1 y las MLG2, las BLG1 continúan disparando luego del final de la expansión (Tomsic et al. 2017).

Estudios preliminares en los que se utilizaron barras horizontales que se desplazaban en el eje vertical (datos no publicados), indican que las neuronas BLG1 parecen tener cierta sensibilidad a la elevación del estímulo, lo que hace que estos elementos sean potencialmente capaces de codificar la distancia a un objeto ubicado sobre el suelo (Hemmi & Zeil, 2003) o de categorizar un objeto visual por su elevación (Layne et al., 1997). De ahí nuestro interés en contrastar la respuesta de esta clase de neurona al movimiento de objetos de una variedad de tamaños y de diferente elevación, ya que nunca se ha hecho.

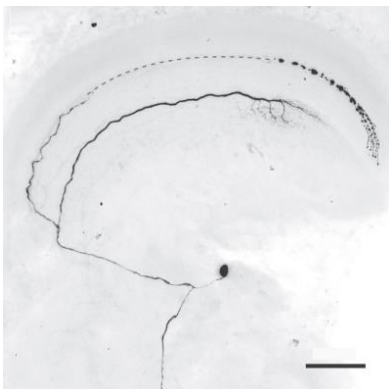


Figura 28 - Fotografía confocal de tinción de neurona BLG1 tomada de Medan et al. 2007. La Escala: Barra = 100µm.

5.2 Descripción de la Muestra

Para evaluar la respuesta de las BLG1 evocada por objetos de distinto tamaño y elevación se registró la respuesta fisiológica de 37 neuronas BLG1, de 37 animales diferentes, durante el paso de cada estímulo. Por las razones que ya se mencionaron en las secciones anteriores, no todos los tratamientos tienen el mismo n. Sin embargo, al tener en cuenta la población total de datos, todos los estímulos están bien representados.

En la **TABLA 15** se informa el n de cada tratamiento.

B1	MONITOR		
	IZQUIERDO	FRONTAL	DERECHO
ESTIMULO			
B	26	30	29
G	22	28	27
M	16	26	20
PBAJO	19	26	27
PEC	22	29	30
PSOBRE	19	27	24

Tabla 15 – Cantidad de neuronas BLG1 por tratamiento.

Las neuronas del tipo BLG1 tienen una frecuencia basal alta y muy regular, con una media de 7.6 ± 1.7 Hz calculada por Medan (Medan et al, 2007).

La **FIGURA 29** muestra la respuesta electrofisiológica de una neurona BLG1 en la que se logró registrar la respuesta a los 18 estímulos. Previo al paso de cada estímulo se registró la frecuencia de disparo de la neurona para incluirla en el modelo como covariable. De esta manera la frecuencia predicha evocada por cada estímulo será calculada por el modelo teniendo en cuenta la frecuencia basal.

En la **FIGURA 30** muestran los datos crudos de las respuestas registradas de las 37 neuronas BLG1. Estas neuronas respondieron con intensidades diferentes a los distintos estímulos. Para poder hacer un análisis estadístico que tenga en cuenta la falta de independencia de medidas repetidas en una misma neurona, utilizaremos nuevamente un modelo lineal mixto generalizado.

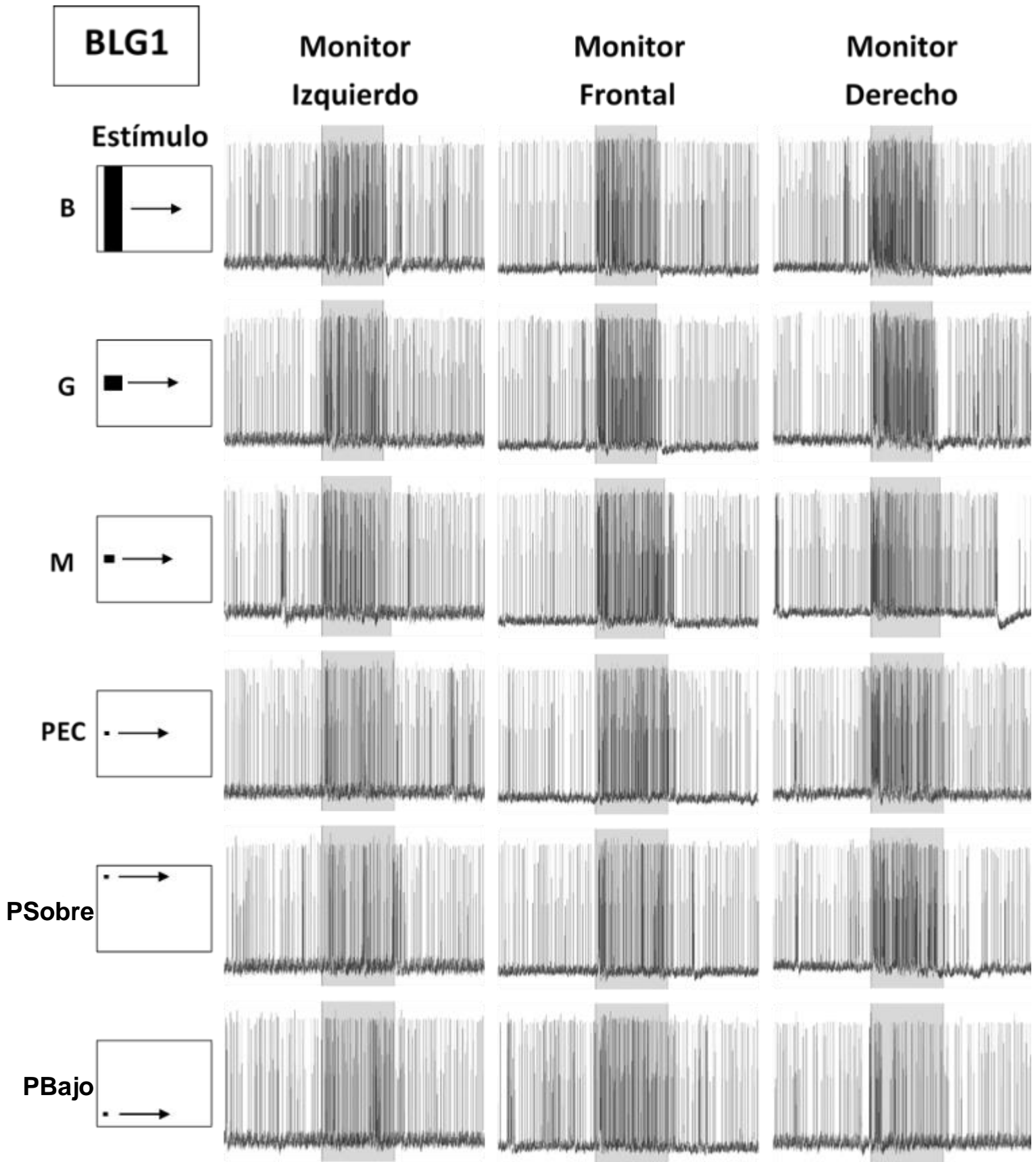


Figura 29 – Registro intracelular de neurona BLG1. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

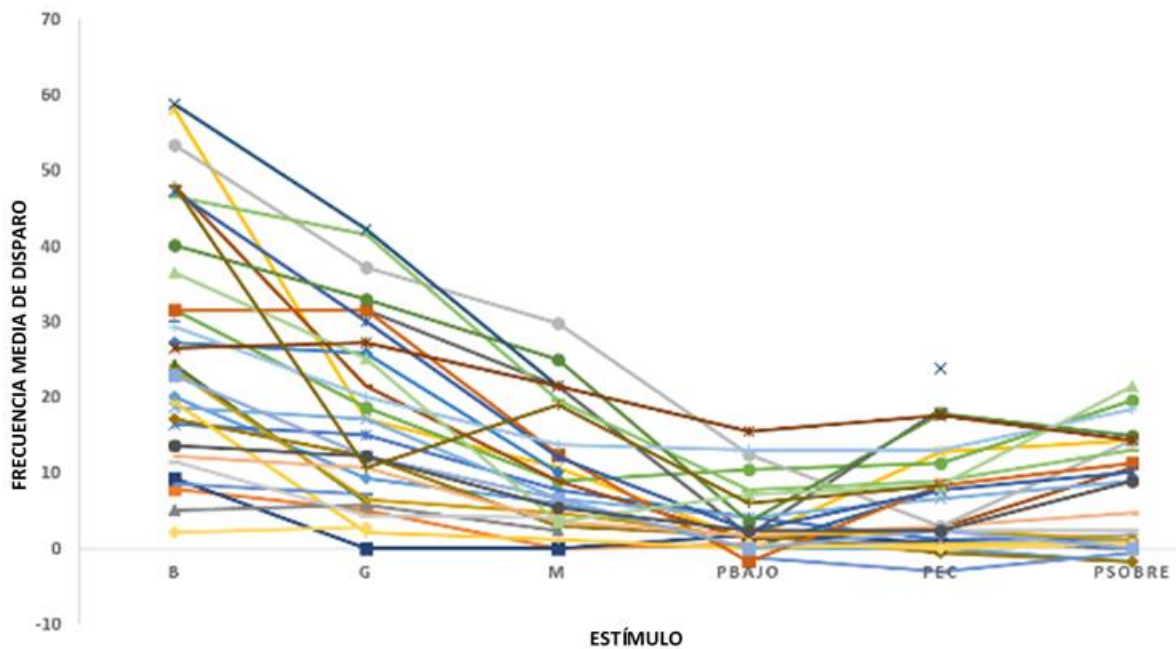


Figura 30 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo en cada una de las 37 neuronas BLG1. El gráfico se confeccionó utilizando los datos registrados en el monitor donde cada neurona presentó la máxima respuesta (centro del campo receptivo). Cada punto equivale a la frecuencia media de disparo (spikes/seg.) durante el paso del estímulo menos la frecuencia espontánea calculada previo al paso de cada estímulo. Cada línea de color corresponde a una neurona diferente.

5.3 Análisis estadístico de los datos

Para evaluar las diferencias estadísticas en la tasa de disparo evocada por cada estímulo se aplicó un modelo lineal mixto generalizado mediante el paquete “glmmTMB” (Brooks et al., 2017) del programa R. Los supuestos del modelo fueron puestos a prueba mediante un análisis de residuos utilizando el paquete “DHARMA” (Hartig, 2016).

Características del Modelo

- Variable respuesta: Número de spikes durante el paso del estímulo.
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Binomial negativa.
- Factor aleatorio: ID de la neurona.
- Covariable: Actividad basal (frecuencia espontánea previa al paso de cada estímulo).
- Offset: Tiempo que dura cada estímulo.
- Variable explicativa 1: Tipo de estímulo. Consta de 6 niveles: Barra, Cuadrado grande, Cuadrado mediano, Cuadrado pequeño en el ecuador, cuadrado pequeño sobre el ecuador y cuadrado pequeño bajo el ecuador.
- Variable explicativa 2: Monitor. Consta de 3 niveles: Monitor izquierdo, frontal y derecho.

- Función link del modelo: logística (Los cálculos son realizados en la escala logarítmica).

En cada neurona se identificó al monitor donde se obtuvieron las respuestas de mayor, mediana y menor intensidad. El 54,3% (20 de 37) de las neuronas BLG1 obtuvieron su máxima respuesta en el monitor frontal, el 37,1% (14 de 37) en el monitor derecho y solamente el 8,6% (3 de 37) en el monitor izquierdo (monitor contralateral). En cuanto al monitor donde se registraron intensidades medianas, el monitor derecho representa un 48,3%, el izquierdo un 34,5% y el frontal un 17,2%. Por último, las respuestas más bajas se presentaron principalmente en el monitor izquierdo representando un 56,5% de las neuronas, seguido del frontal con un 26,1% y finalmente el monitor derecho, monitor ipsilateral con un 17,4%.

De esta forma la distribución de las intensidades de respuesta según el monitor donde se obtuvo se resume en la **TABLA 16**.

BLG1			
	Máximo	Medio	Mínimo
MI	8,6%	34,5%	56,5%
MF	54,3%	17,2%	26,1%
MD	37,1%	48,3%	17,4%
	100%	100%	100%

Tabla 16 – Distribución de la intensidad de respuesta según el monitor donde fue evocada. MI: Monitor izquierdo. MD: monitor derecho. MF: monitor frontal.

La prueba de Chi cuadrado de Wald (**TABLA 17**, **TABLA 18** y **TABLA 19**) realizada en cada grupo de monitores (máxima, mediana y menor intensidad de respuesta) indica en los tres casos que:

- El tipo de estímulo tiene un efecto en la intensidad de la respuesta (spikes / seg).
- El monitor (derecho, frontal o izquierdo) donde se proyectaron los estímulos no tiene un efecto significativo en la respuesta.
- La interacción entre estímulo y monitor no resulto significativa. Esta falta de significancia en la interacción implica que en todos los monitores el perfil de respuesta es igual.
- Como era de esperar, la frecuencia espontanea tiene un efecto significativo en la respuesta al estímulo.

Análisis de la devianza (Chi cuadrado de Wald)

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	286.25	5	< 2.00e-16 ****
MONITOR	3.62	2	0.2
ACTIVIDAD BASAL	5.51	1	0.01887*
ESTIMULO:MONITOR	18.64	10	0.075

Cod. de Signif: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 17 – Análisis de la Devianza en Monitor de Máxima respuesta Neuronas BLG1

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	244.88	5	< 2.20e-16 ****
MONITOR	3.89	2	0.1
ACTIVIDAD BASAL	14.95	1	0.00011*
ESTIMULO:MONITOR	14.45	10	0.15

Cod. de Signif: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 18 – Análisis de la Devianza en Monitor de Mediana respuesta Neuronas BLG1

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	177.90	5	< 2.20e-16 ****
MONITOR	0.07	2	1.0
ACTIVIDAD BASAL	9.97	1	0.0015*
ESTIMULO:MONITOR	21.47	10	0.07

Cod. de Signif: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 19 – Análisis de la Devianza en Monitor de Mínima respuesta Neuronas BLG1

5.4 Perfil de respuesta de las neuronas BLG1 predicho por el modelo

Se modeló la respuesta para cada sector del CR (monitor de máxima, media y mínima intensidad de respuesta) y se obtuvo la respuesta predicha para cada estímulo (TABLA 20, TABLA 21 Y TABLA 22).

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	45.50	6.69	34.07	60.80
G	34.90	4.95	26.40	46.20
M	23.80	3.73	17.50	32.50
PBAJO	14.30	4.97	7.16	28.40
PEC	16.80	3.21	11.10	25.50
PSOBRE	24.40	4.23	14.87	39.90

Tabla 20 – Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Máxima respuesta

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	37.30	3.87	30.40	45.80
G	32.30	3.49	26.10	40.00
M	26.90	3.15	21.40	34.00
PBAJO	17.00	2.02	13.40	21.50
PEC	18.40	2.12	14.70	23.10
PSOBRE	23.60	2.67	18.80	29.50

Tabla 21– Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Mediana respuesta

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	27.70	4.38	20.25	37.90
G	23.10	3.63	16.89	31.50
M	18.10	3.11	12.87	25.50
PBAJO	13.50	2.26	9.66	18.80
PEC	12.80	2.12	9.20	17.80
PSOBRE	18.00	2.91	13.02	24.80

Tabla 22 – Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Mínima respuesta

Para determinar si las diferencias entre las tasas de disparo son estadísticamente significativas se realizó el test de Tukey con una corrección para el cálculo de 6 estimadores. El perfil de sensibilidad de las BLG1 se muestra en las figuras (FIGURA 31, FIGURA 32 y FIGURA 33).

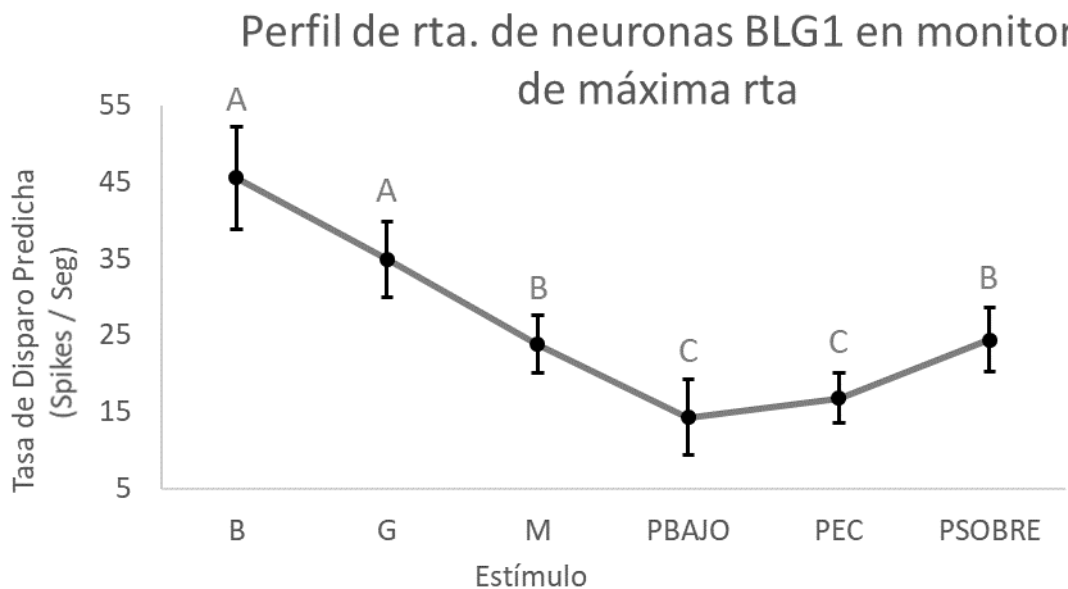


Figura 31 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Máxima respuesta. Cada vértice représenla la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

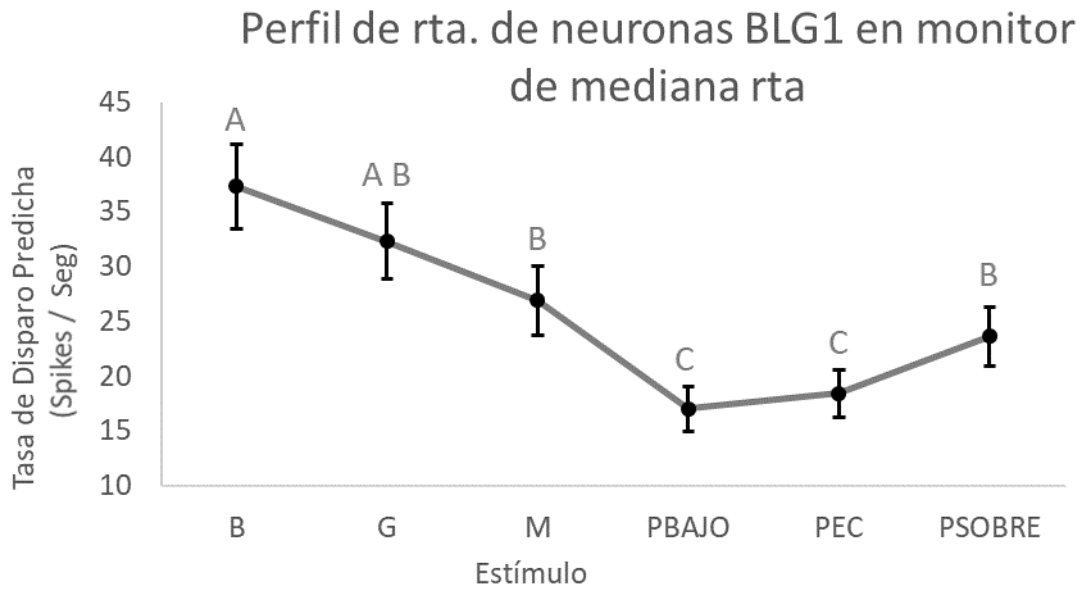


Figura 32 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Mediana respuesta. Cada vértice représena la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

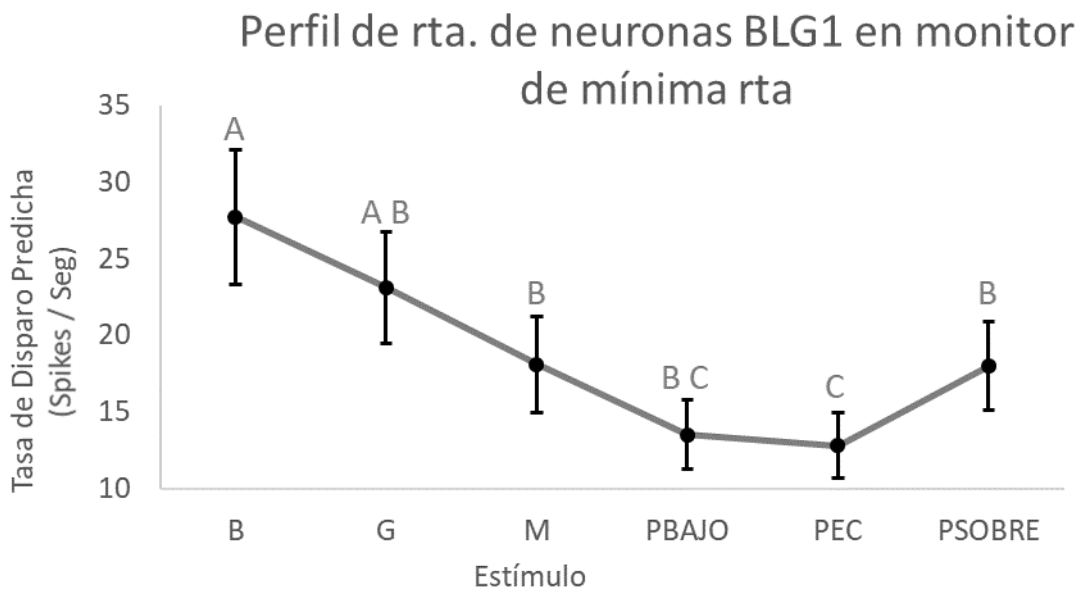


Figura 33 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Mínima respuesta. Cada vértice représena la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

Lo primero que se observa es que el perfil de sensibilidades a los diferentes estímulos mayormente se conserva a lo largo del campo receptivo.

La barra evocó respuestas significativamente más intensas que el cuadrado mediano y los cuadrados pequeños en todo el campo receptivo.

El cuadrado grande en el centro del campo receptivo (monitor de máxima respuesta) evocó respuestas similares en magnitud a las provocadas por la barra y significativamente mayores a las provocadas por el cuadrado mediano. En el resto de los monitores el cuadrado grande provoca frecuencias de disparo intermedias, que no llegan a ser significativamente diferentes a las respuestas evocada por la barra y a las evocadas por el cuadrado mediano.

En cuanto a los estímulos pequeños, el PEC y el PBAJO provocaron las respuestas menos intensas, mientras que el PSOBRE evocó respuestas de mayor intensidad respecto a los otros estímulos pequeños y similares en magnitud al cuadrado mediano. En el área menos sensible del CR las respuestas frente al cuadrado grande, el mediano y los cuadrados pequeños se tornan similares, habiendo diferencias significativas solamente respecto al PEC (que evoco las respuestas más débiles).

6 BLG2: Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas a estímulos de diferente tamaño y elevación

6.1 Antecedentes sobre Neuronas Biestratificadas Gigantes de la Lóbula de Tipo 2

Aparentemente existe una sola neurona BLG2 en cada lóbula con un campo receptivo amplio. Estas células son espontáneamente activas, presentando salvas de 2 a 5 P.A. (Medan et. al., 2007). La **FIGURA 34** muestra una tinción de una neurona BLG2.

Las neuronas de esta clase responden al comienzo de la expansión de los estímulos de looming, cuando ocurre el freezing del animal. La actividad de esta clase de neurona se detiene mientras el estímulo continúa expandiéndose, en la misma etapa en la que las neuronas MLG1 y MLG2 comienzan a disparar y el cangrejo comienza a huir (Tomsic et al., 2017). Esto sugiere que las BLG2 podrían tener un rol en la toma de decisiones referidas al cambio de estrategias conductuales frente a un estímulo visual de peligro.

Este grupo de neuronas se diferencia de las otras clases de LG en cuanto a que su respuesta al movimiento es bifásica, comienza por una hiperpolarización, seguida de un incremento en la frecuencia de salvas y el número de P.A. por salva (Medan et al., 2007). Esto ocurre tanto en los estímulos de expansión como en los estímulos de movimiento traslacional.

Nunca se ha contrastado la respuesta de esta clase de neuronas frente a estímulos de una variedad de tamaños y estímulos pequeños con distinta elevación.

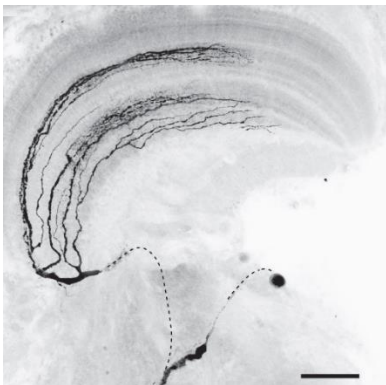


Figura 34 - Fotografía confocal de tinción de neurona BLG2 tomada de Medan et al., 2007. La Escala: Barra = 100µm.

6.2 Descripción de la Muestra

Para evaluar la respuesta a objetos de distinto tamaño y elevación se registró la respuesta fisiológica de 29 neuronas BLG2, de 29 animales diferentes, durante el paso de cada estímulo. Por las razones que ya se describieron, no todos los tratamientos tienen el mismo n. Sin embargo, al tener en cuenta la población total de datos, todos los estímulos están bien representados.

En la **TABLA 23** se informa el n de cada tratamiento.

B2	MONITOR		
	IZQUIERDO	FRONTAL	DERECHO
B	22	29	28
G	18	29	24
M	18	25	21
PBAJO	17	22	19
PEC	21	27	27
PSOBRE	16	19	21

Tabla 23 – Cantidad de neuronas BLG2 por tratamiento.

Las neuronas del tipo BLG2 tienen actividad espontánea, presentando bursts de 2 a 5 spikes. En promedio la frecuencia espontánea media es de 3 ± 0.5 Hz (Medan et al., 2007).

La **FIGURA 35** muestra la respuesta electrofisiológica de una neurona del tipo BLG2 en la que se logró registrar la respuesta a los 18 estímulos. Previo al paso de cada estímulo se registró la frecuencia de disparo de la neurona para incluirla en el modelo como covariable. De esta manera la frecuencia predicha evocada por cada estímulo será calculada por el modelo teniendo en cuenta la frecuencia basal promedio.

En la **FIGURA 36** se muestran los datos crudos de las respuestas registradas de las 29 neuronas BLG2. Estas neuronas respondieron con intensidades diferentes a los distintos estímulos. Para poder hacer un análisis estadístico que tenga en cuenta la falta de independencia de medidas repetidas en una misma neurona, utilizaremos nuevamente un modelo lineal mixto generalizado.

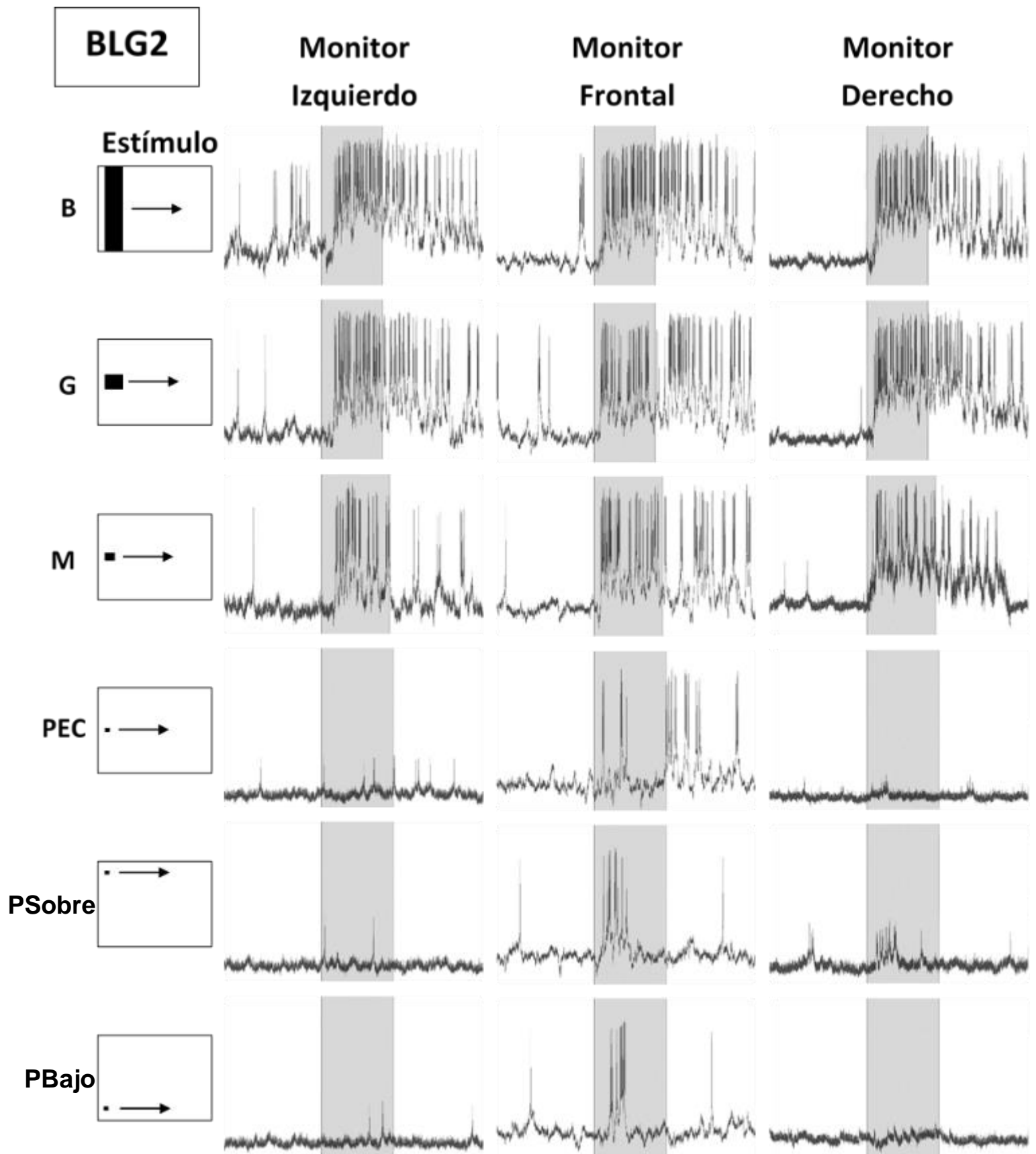


Figura 35 – Registro intracelular de neurona BLG2. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

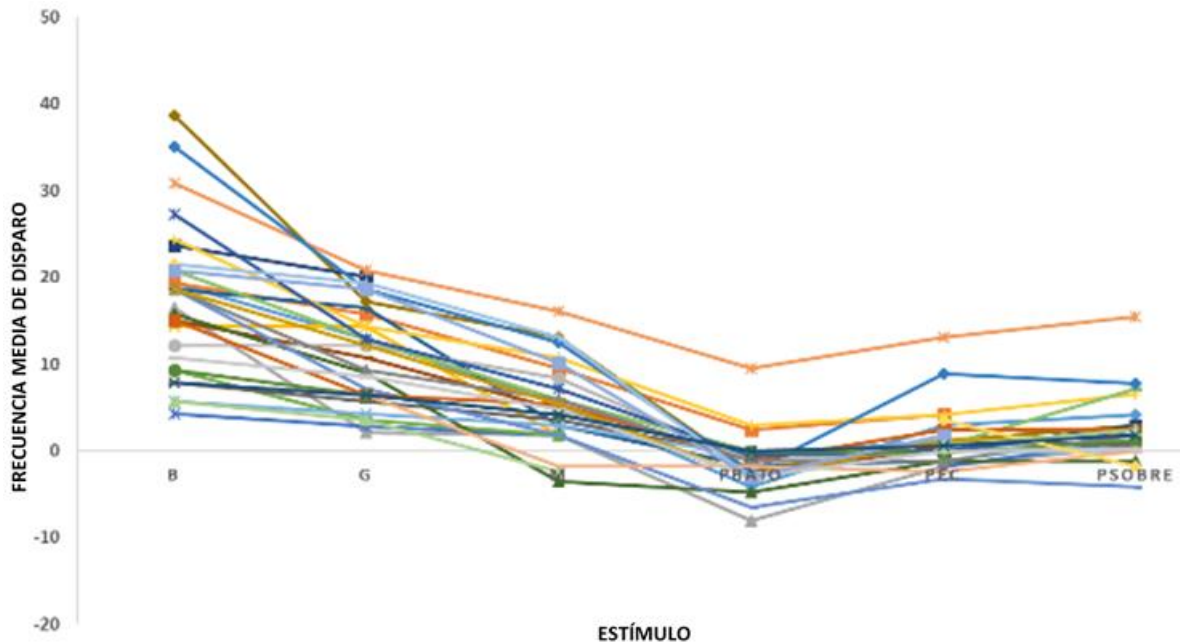


Figura 36 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo en cada una de las 29 neuronas BLG2. El gráfico se confecciono utilizando los datos registrados en el monitor donde cada neurona presentó la máxima respuesta (centro del campo receptivo). Cada punto equivale a la frecuencia media de disparo (spikes/seg.) durante el paso del estímulo menos la frecuencia espontanea calculada previo al paso de cada estímulo. Cada línea de color corresponde a una neurona diferente.

6.3 Análisis estadístico de los datos

Para evaluar las diferencias estadísticas en la tasa de disparo evocada por cada estímulo se aplicó un modelo lineal mixto generalizado mediante el paquete “glmmTMB” (Brooks et al., 2017) del programa R. Los supuestos del modelo fueron puestos a prueba mediante un análisis de residuos utilizando el paquete “DHARMA” (Hartig, 2016).

Características del Modelo

- Variable respuesta: Número de spikes durante el paso del estímulo.
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Binomial negativa.
- Factor aleatorio: ID de la neurona.
- Covariable: Actividad basal (frecuencia espontánea previa al paso de cada estímulo).
- Offset: Tiempo que dura cada estímulo.
- Variable explicativa 1: Tipo de estímulo. Consta de 6 niveles: Barra, Cuadrado grande, Cuadrado mediano, Cuadrado pequeño en el ecuador, cuadrado pequeño sobre el ecuador y cuadrado pequeño bajo el ecuador.
- Variable explicativa 2: Monitor. Consta de 3 niveles: Monitor izquierdo, frontal y derecho.

- Función link del modelo: logística (Los cálculos son realizados en la escala logarítmica).

En cada neurona se identificó al monitor donde se obtuvieron las respuestas de mayor, mediana y menor intensidad. El 57,9% (17 de 29) de las neuronas BLG2 obtuvieron su máxima respuesta en el monitor frontal, el 26,3% (8 de 29) en el monitor derecho y solamente el 15,8% (4 de 29) en el monitor izquierdo (monitor contralateral). En cuanto al monitor donde se registraron intensidades medianas, el monitor derecho representa un 52,6%, el izquierdo un 26,3% y el frontal un 21,1%. Por último, las respuestas más bajas se presentaron principalmente en el monitor izquierdo representando un 57,9% de las neuronas, seguido del frontal con un 26,3% y finalmente el monitor derecho, monitor ipsilateral con un 15,8%.

De esta forma la distribución de las intensidades de respuesta según el monitor donde se obtuvo se resume en la **Tabla 24**.

BLG2			
	Máximo	Medio	Mínimo
MI	15,2%	20,0%	60,0%
MF	51,5%	28,0%	20,0%
MD	33,3%	52,0%	20,0%
	100%	100%	100%

Tabla 24 – Distribución de la intensidad de respuesta según el monitor donde fue evocada. MI: Monitor izquierdo. MD: monitor derecho. MF: monitor frontal.

La prueba de Chi cuadrado de Wald (**Tabla 25**, **Tabla 26** y **Tabla 27**) realizada en cada grupo de monitores (máxima, mediana y menor intensidad de respuesta) indica en los tres casos que:

- El tipo de estímulo tiene un efecto en la intensidad de la respuesta (spikes / seg).
- El monitor (derecho, frontal o izquierdo) donde se proyectaron los estímulos no tiene un efecto significativo en la respuesta.
- La interacción entre estímulo y monitor no resulto significativa. Esta falta de significancia en la interacción implica que en todos los monitores el perfil de respuesta es igual.
- Como era de esperar, la frecuencia espontanea tiene un efecto significativo en la respuesta al estímulo.

Análisis de la devianza (Chi cuadrado de Wald)

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	480.00	5	< 2.00e-16 ****
MONITOR	0.21	2	0.9
ACTIVIDAD BASAL	5.83	1	0.0157 *
ESTIMULO:MONITOR	16.32	10	0.09 ·

Cod. de Signif: 0 '*****' - 0.001 '****' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 25 – Análisis de la Devianza en Monitor de Máxima respuesta Neuronas BLG2.

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	268.14	5	< 2.20e-16 ****
MONITOR	2.22	2	0.3
ACTIVIDAD BASAL	11.65	1	0.00064*
ESTIMULO:MONITOR	15.44	10	0.11

Cod. de Signif: 0 '*****' - 0.001 '****' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 26 – Análisis de la Devianza en Monitor de Mediana respuesta Neuronas BLG2.

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr(>Chisq)
ESTIMULO	172.31	5	< 2.00e-16 ****
MONITOR	2.05	2	0.4
ACTIVIDAD BASAL	5.55	1	0.01848 *
ESTIMULO:MONITOR	16.66	10	0.08228 ·

Cod. de Signif: 0 '*****' - 0.001 '****' - 0.01 '**' - 0.05 '*' - 0.1 '.' - 1

Tabla 27 – Análisis de la Devianza en Monitor de Mínima respuesta Neuronas BLG2.

6.4 Perfil de respuesta de las neuronas BLG2 predicho por el modelo

Se modeló la respuesta para cada sector del CR (monitor de máxima, media y mínima intensidad de respuesta) y se obtuvo la respuesta predicha para cada estímulo (TABLA 28, TABLA 29 y TABLA 30).

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	27.30	3.07	21.86	34.09
G	17.90	2.13	14.15	22.63
M	13.32	1.65	10.43	17.01
PBAJO	5.06	0.87	3.61	7.09
PEC	5.11	0.80	3.75	6.96
PSOBRE	6.97	1.04	5.19	9.35

Tabla 28– Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Máxima respuesta

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	23.53	3.65	17.29	32.02
G	18.08	2.89	13.16	24.82
M	13.67	2.33	9.75	19.17
PBAJO	4.40	0.95	2.87	6.75
PEC	8.85	1.65	6.11	12.81
PSOBRE	6.95	1.34	4.74	10.20

Tabla 29 – Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Mediana respuesta.

ESTIMULO	TASA DE DISPARO PREDICHA (spikes/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	17.42	2.95	12.44	24.39
G	13.90	2.42	9.82	19.66
M	11.53	2.23	7.85	16.94
PBAJO	3.15	0.84	1.86	5.35
PEC	6.42	1.19	4.44	9.30
PSOBRE	5.62	1.24	3.62	8.73

Tabla 30 – Respuesta media predicha para cada estímulo en el monitor de Mínima respuesta.

Para determinar si las diferencias entre las tasas de disparo son estadísticamente significativas se realizó el test de Tukey con una corrección para el cálculo de 6 estimadores. El perfil de sensibilidad de las BLG1 se muestra en las (FIGURA 37, FIGURA 38 y FIGURA 39).

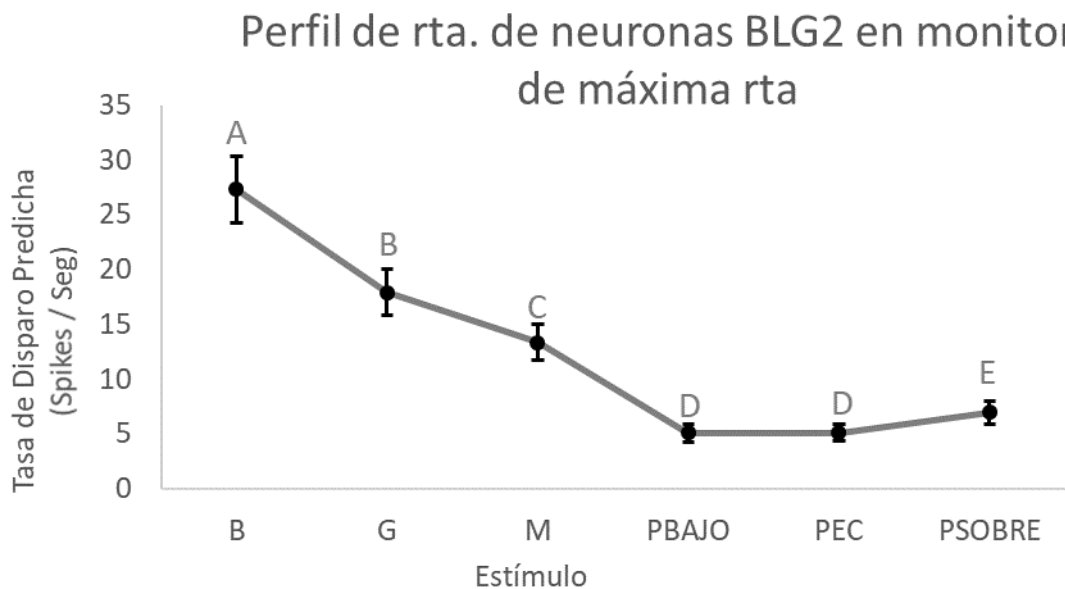


Figura 37 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Máxima respuesta. Cada vértice représenla la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

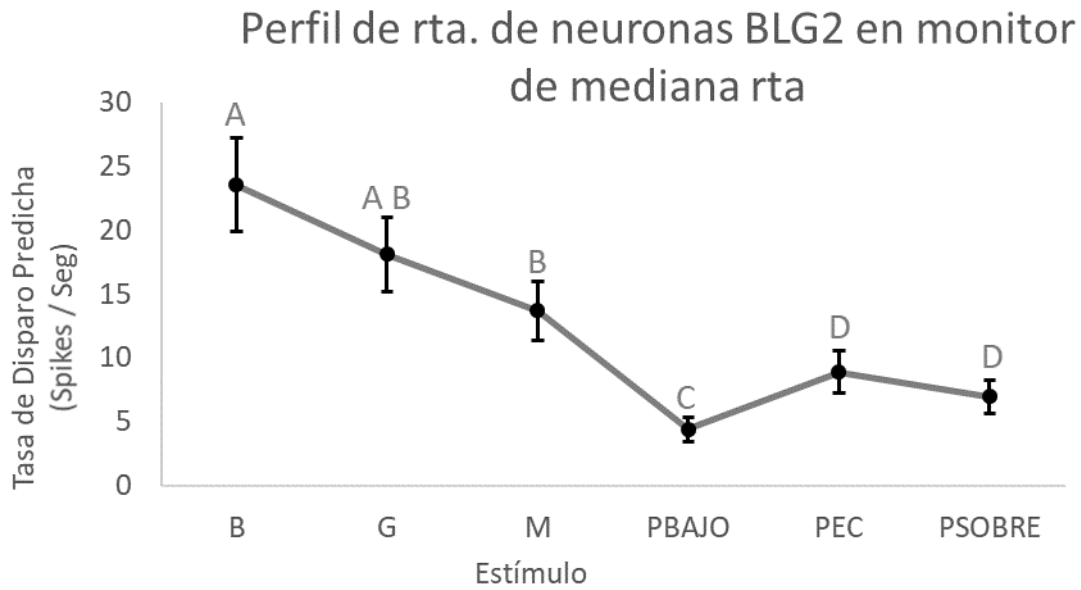


Figura 38 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Mediana respuesta. Cada vértice représenta la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

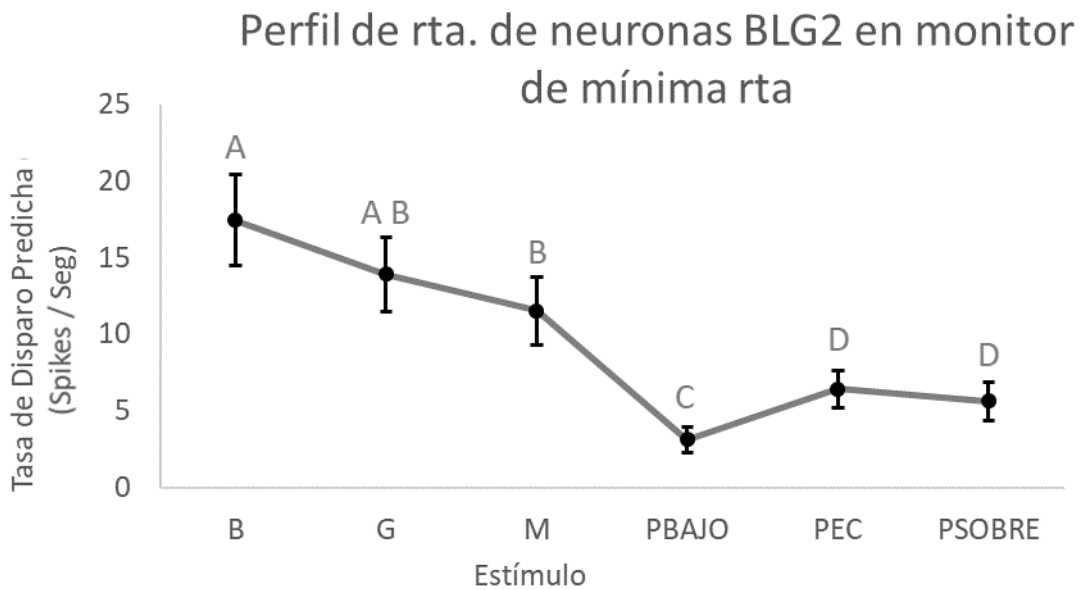


Figura 39 - Sensibilidad al tamaño y elevación del estímulo predicho por el modelo en el monitor de Mínima respuesta. Cada vértice représenta la Media \pm Error estándar de la tasa de disparo predicha para cada estímulo. Los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes

Lo primero que se observa es que, en el área más sensible del CR, la respuesta de las neuronas BLG2 decae gradualmente con el tamaño del objeto en movimiento. El estímulo pequeño sobre el ecuador evoca una respuesta mayor respecto a los otros estímulos pequeños.

En áreas menos sensibles del CR, si bien la respuesta tiende a decaer con el tamaño del objeto, se pierden las diferencias significativas entre las respuestas evocadas por la barra y el cuadrado grande. En el monitor donde se evocan las respuestas más bajas también se pierde la diferencia significativa entre las respuestas evocadas por el cuadrado grande y el mediano. Los cuadrados pequeños siguen evocando las respuestas más bajas.

En cuanto a diferencias entre las respuestas evocadas por los estímulos pequeños, en las zonas menos sensibles del CR el PBAJO evoca respuestas significativamente menores a las evocadas por los otros cuadrados pequeños. El PEC y PSOBRE evocan respuestas de la misma intensidad.

7 Respuesta comportamental del cangrejo *Neohelice granulata* frente a estímulos de distintos tamaños y elevación.

Con el objetivo de caracterizar la respuesta comportamental de *Neohelice granulata* a objetos de distintos tamaños y elevaciones se utilizó un dispositivo de locomoción simulada que denominamos treadmill, como se describe en la sección de materiales y métodos, que permite medir la actividad locomotora del animal mientras se expone a estímulos visuales.

Se emplearon 5 de los estímulos visuales que fueron utilizados en los experimentos de electrofisiología (barra, cuadrado grande, cuadrado mediano, cuadrado pequeño en el ecuador y cuadrado pequeño sobre el ecuador). La respuesta evocada por el cuadrado pequeño bajo el ecuador no fue evaluada por una restricción del dispositivo experimental, que limitaba la visualización de este estímulo por parte del animal. A diferencia de los experimentos electrofisiológicos, en los experimentos comportamentales solamente se utilizó el monitor derecho para estimular al animal. La razón para concentrar el análisis a la respuesta evocada por estímulos visuales ubicado en el polo lateral del animal es doble. Por un lado, el polo lateral del ojo es la región en donde *Neohelice* tiene su máxima agudeza visual (Berón de Astrada et al., 2012). Por otro lado, dado que estos animales corren más velozmente de costado, al ser estimulado desde el lado lateral el cangrejo se encuentra ya en su orientación preferida para escapar corriendo, sin necesidad de realizar intentos de rotación para poner el estímulo en su polo lateral (Medan et al., 2015).

En cada experimento se colocó al animal en el setup y se lo dejó habituar al contexto por 10 minutos. Luego, el estímulo apareció inmóvil en la pantalla durante 15 segundos. La velocidad de exploración fue medida durante los 5 segundos previos al movimiento del estímulo. Pasado los 15 segundos el estímulo comienza su movimiento con el mismo protocolo que en los experimentos de electrofisiología (trayectoria lineal de izquierda a derecha a 18 cm/seg). La velocidad del animal se midió cada 8 milisegundos durante todo el ensayo.

La respuesta comportamental fue monitoreada en tiempo real con una cámara a fin de detectar características cualitativas del comportamiento. En ninguno de los ensayos se

observaron respuestas que representaran intentos de aproximación hacia el estímulo (respuestas de persecución, Gancedo et al., 2020) ni respuestas consistentes en despliegues defensivos con las quelas. Las respuestas que se registraron se trataron de escapes de diversas intensidades (diferencia en velocidades) y algunas respuestas de freezing.

Los cangrejos que freezaron durante todo un ensayo (17 animales) fueron descartados del análisis y no forman parte de los 53 animales considerados.

7.1 Tratamiento de los datos

El dispositivo experimental permite medir la velocidad traslacional del animal cada 8 milisegundos. Esta altísima resolución temporal es importante para medir latencias, dinámicas de giro, etc. (Medan et al., 2015; Scarano & Tomsic, 2014). Sin embargo, en este experimento compararemos la velocidad promedio y la velocidad máxima del animal durante el paso de cada estímulo y durante la exploración previa al movimiento del estímulo, es por esto que hemos promediado la velocidad del animal cada 100 milisegundos para trabajar con una base de datos más amigable (que exige menos tiempo de procesamiento a los softwares estadísticos). Esto genera un perfil levemente suavizado de las velocidades, con la ventaja extra de que disminuye los efectos de las mediciones artefactuales.

En la **FIGURA 40** se muestran los registros de velocidad de un animal durante la presentación de cada estímulo. En esta figura se observa que los estímulos más grandes producen picos de velocidades mayores que los estímulos pequeños.

En la **FIGURA 41** se muestran los datos crudos de los máximos de velocidad registradas por los 53 animales frente a los 5 tipos de estímulos. En dicha figura vemos que los diferentes estímulos parecen evocar diferentes velocidades máximas, por esta razón utilizaremos el pico de velocidad máxima para caracterizar la respuesta comportamental frente a cada estímulo.

Velocidad Traslacional – MD

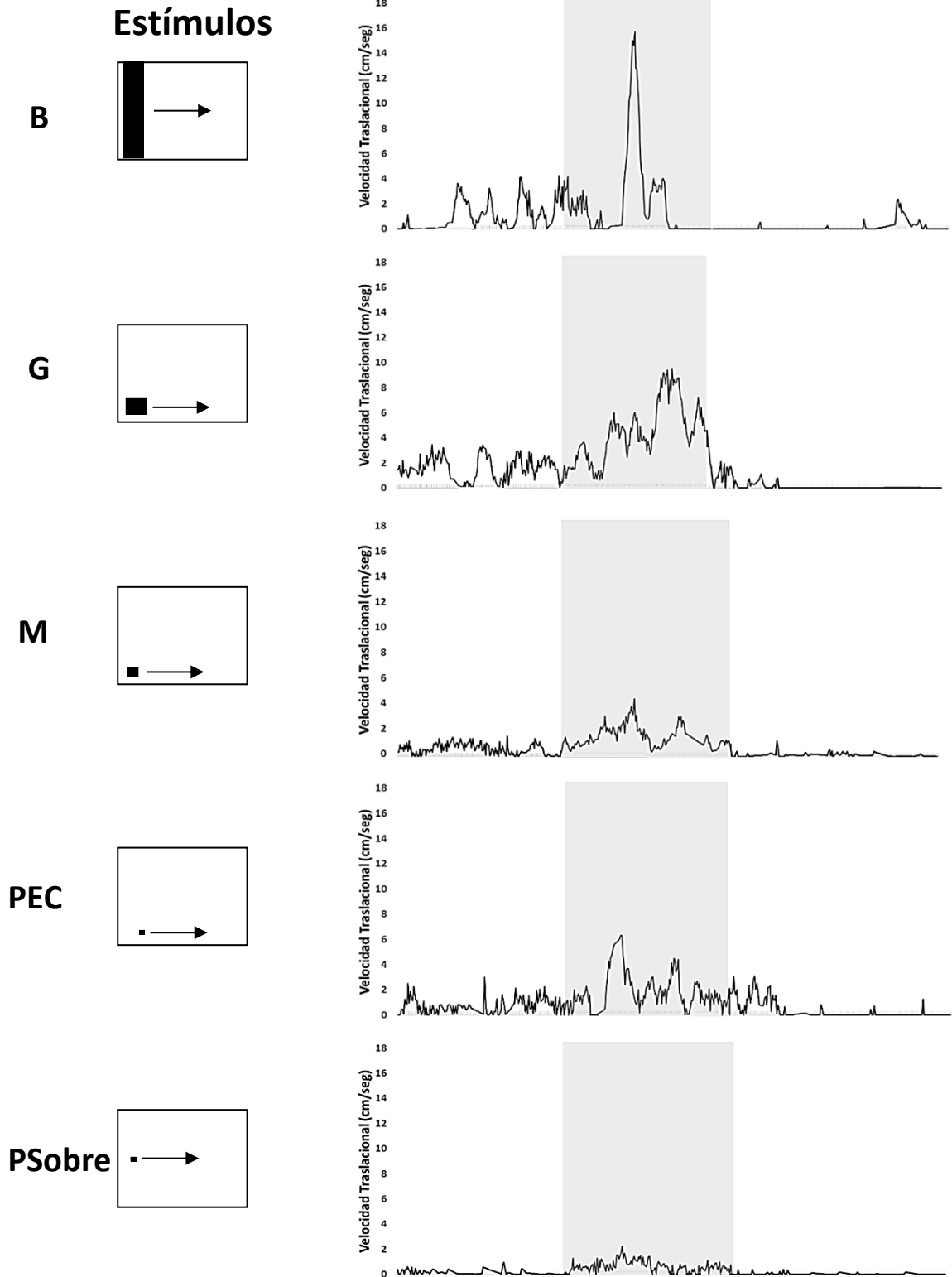


Figura 40 – Ejemplo de la dinámica de la respuesta de escape frente a los diversos estímulos para un dado animal. Las figuras se desplazaron en el monitor derecho en sentido de izquierda a derecha. Las zonas grises del gráfico demarcan el período en que el estímulo estuvo en movimiento.

Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC y PSobre = 1,58 seg.

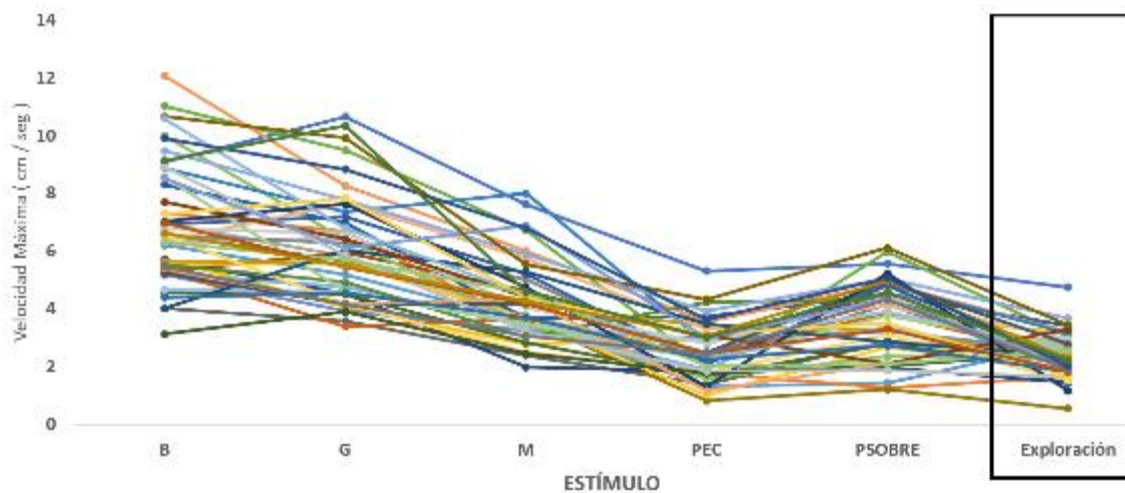


Figura 41 – Velocidad máxima durante el movimiento del estímulo. La velocidad de exploración de cada animal (se muestra en el rectángulo) corresponde a la velocidad máxima alcanzada durante el período exploratorio previo a cada estímulo. Cada línea de color corresponde a un animal.

7.2 Análisis estadístico de los datos

Para evaluar las diferencias en la velocidad máxima de los animales al ser expuestos a los 5 estímulos ya mencionados, se utilizó un modelo lineal mixto general ajustado por el paquete “nlme” (Pinheiro et al., 2013) del programa R. El modelo tiene en cuenta al cangrejo como factor aleatorio, es decir, tiene en cuenta la falta de independencia entre las respuestas medidas en un mismo animal frente a diferentes estímulos. Se evaluó el cumplimiento de los supuestos del modelo mediante los análisis de residuos.

Características del Modelo

- Variable respuesta: Velocidad máxima durante el paso del estímulo.
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Normal.
- Factor aleatorio: ID del cangrejo.
- Covariable: Velocidad máxima durante la exploración (previa al paso de cada estímulo).
- Variable explicativa: Tipo de estímulo. Consta de 5 niveles: Barra, Cuadrado grande, Cuadrado mediano, Cuadrado pequeño en el ecuador y cuadrado pequeño sobre el ecuador.
- Función link del modelo: Identidad.

El análisis de Chi cuadrado de Wald (**TABLA 31**) indica que el efecto de los estímulos en la velocidad de los animales es significativo. Además, se evaluó el efecto de la actividad exploratoria, para evaluar si los animales que exploraban a menor velocidad eran también los que escapaban a menor velocidad. El efecto no fue significativo (p valor =

0.089). La interacción entre el estímulo y la velocidad de exploración resultó no significativa.

Análisis de la devianza (Chi cuadrado de Wald)

	Chisq	GRADOS DE LIBERTAD	Pr (>Chisq)
ESTIMULO	99,62	4	< 2.2e-16 ***
VELOCIDAD DE EXPLORACIÓN	2,87	1	0.08997 .
ESTIMULO:VEL. EXPLORACIÓN	1,24	4	0,87

Tabla 31 – Test de Chi cuadrado de Wald. N=53 animales.

7.3 Perfil de la respuesta comportamental predicha por el modelo

Del modelo se obtiene la velocidad traslacional predicha evocada por cada estímulo. Para evaluar la significancia de las diferencias entre las velocidades de escape se realizó un test de tukey (**TABLA 32** y **TABLA 33**). Las respuestas de escape más claras son evocadas por las imágenes de mayor tamaño, no hay diferencias significativas entre la barra y el cuadrado grande (7.98 cm/s y 7.47 cm/s respectivamente). El cuadrado mediano genera un escape a una velocidad menor (5.13 cm/s) mientras que el cuadrado pequeño en el ecuador no genera una respuesta de escape (2.82 cm/s) ya que no es significativamente diferente de la velocidad máxima alcanzada durante la exploración. El cuadrado pequeño sobre el ecuador tiene una respuesta intermedia entre la evocada por el cuadrado mediano y la evocada por el cuadrado pequeño (3.95 cm/s), siendo significativamente distinta de la velocidad máxima exploratoria. El perfil de la respuesta comportamental se muestra en la **FIGURA 42**.

ESTÍMULO	Velocidad Predicha (cm/seg)	ERROR STD	Int Confianza 95%	
			LIMITE INF	LIMITE SUP
B	7,98	0,58	6,85	9,15
G	7,47	0,53	6,13	8,24
M	5,13	0,55	3,54	5,71
PEC	2,82	0,59	1,52	3,87
PSOBRE	3,95	0,55	3,14	5,32
Exploración	2,03	0,72	1,03	3,21

Tabla 32 - Tabla de velocidades predichas por el modelo con el error estándar y el intervalo de confianza correspondiente a cada estímulo

CONTRASTE	ESTIMADOR	ERROR STD	T RATIO	P VALOR
B / G	0,82	0,57	1,44	0,60
B / M	3,37	0,59	5,68	< 0,0001 ****
B / PEC	5,31	0,65	8,17	< 0,0001 ****
B / PSOBRE	3,77	0,62	6,05	< 0,0001 ****
B / Exploración	4,22	0,58	7,62	< 0,0001 ****
G / M	2,56	0,54	4,75	0,0001 ***
G / PEC	4,49	0,61	7,34	< 0,0001 ****
G / PSOBRE	2,95	0,58	5,14	< 0,0001 ****
G / Exploración	3,68	0,57	6,32	< 0,0001 ****
M / PEC	1,93	0,61	3,18	0,0184 *
M / PSOBRE	0,40	0,57	0,70	0,10
M / Exploración	1,23	0,58	2,82	0,022 *
PEC / PSOBRE	-1,54	0,62	-2,49	0,10
PEC / Exploración	-1,23	0,60	-2,03	0,10
PSOBRE / Exploración	0,41	0,58	0,72	0,10

Codigos de Significancia: 0 '****' - 0.001 '***' - 0.01 '**' - 0.05 '*'

Tabla 33 – Parámetros del Test de Tukey.

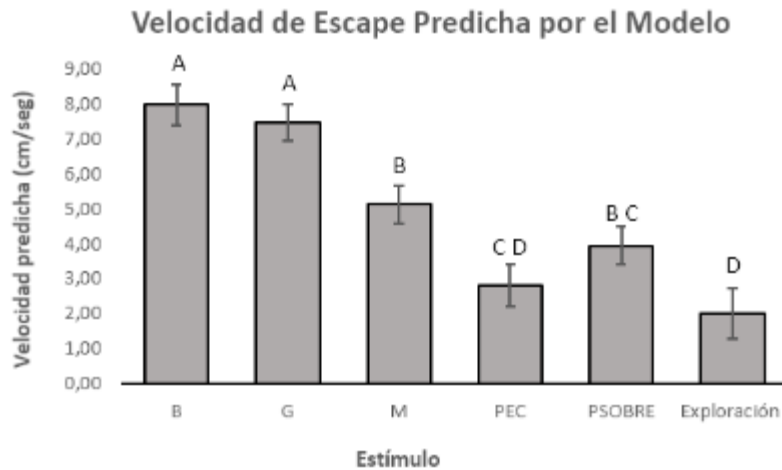


Figura 42 - Perfil de Rta. comportamental de *Neohelice granulata*. Cada barra representa la Media \pm Error estándar de velocidad predicha frente cada estímulo. n=53 animales.

8 Correspondencias entre el comportamiento y la fisiología

Trabajos previos en el laboratorio evidenciaron que las LG intervienen en la respuesta de escape (Oliva et al., 2007; Sztarker & Tomsic, 2008, 2011) y se ha demostrado que estas neuronas son capaces de reflejar cambios en el comportamiento animal relacionados con el aprendizaje y la memoria (Tomsic et al., 2003; Sztarker & Tomsic, 2011).

Se comparó la respuesta comportamental de los animales con el perfil de respuesta de las neuronas LG frente a los mismos estímulos. La correlación se midió mediante el coeficiente de Pearson.

8.1 Respuesta fisiológica de las LG en el monitor derecho

El perfil de respuesta de las LG fue evaluado a partir de los mismos datos utilizados en la sección de electrofisiología, pero esta vez se modeló la respuesta de cada tipo de neurona utilizando únicamente los datos del monitor derecho. No se analizaron las respuestas fisiológicas de cada tipo de LG frente al objeto pequeño que se desplaza bajo el ecuador debido a que no es posible contrastar las respuestas electrofisiológicas con la respuesta comportamental evocada por este estímulo por una restricción del monitor del setup de medición del comportamiento (Ver sección de Materiales y Métodos).

Para cada tipo de LG se utilizó nuevamente un modelo lineal mixto generalizado mediante el paquete “glmmTMB” (Brooks et al., 2017) del programa R. Los supuestos del modelo fueron puestos a prueba mediante un análisis de residuos utilizando el paquete “DHARMA” (Hartig, 2016).

Características de los modelos

- Variable respuesta: Número de spikes durante el paso del estímulo.
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Binomial negativa.
- Factor aleatorio: ID de la neurona.
- Covariable: Frecuencia espontánea previa al paso de cada estímulo (excepto en el modelo de las MLG1, que no presentan actividad espontánea).
- Offset: Tiempo que dura cada estímulo.
- Variable explicativa: Tipo de estímulo. Consta de 6 niveles: Barra, Cuadrado grande, Cuadrado mediano, Cuadrado pequeño en el ecuador y cuadrado pequeño sobre el ecuador.

- Función link del modelo: logística (Los cálculos son realizados en la escala logarítmica).

El perfil de sensibilidad de cada tipo de LG al ser estimuladas en el monitor derecho se muestra en la **FIGURA 43**. En la **FIGURA 44** se muestran ejemplos individuales de la respuesta fisiológica de los 4 tipos de LG a los distintos estímulos en el monitor derecho y la respuesta comportamental a los mismos estímulos.

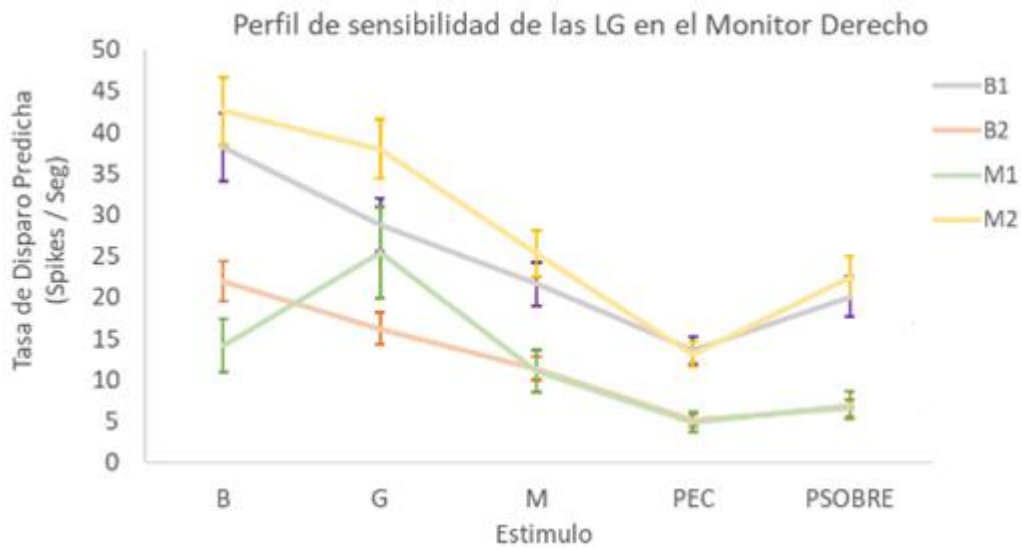


Figura 43 – Tasa de disparo predicha para cada clase de LG tomando solamente los datos registrados al estimular con el monitor derecho. Cada punto corresponde a la media +/- SEM predicha por cada modelo.

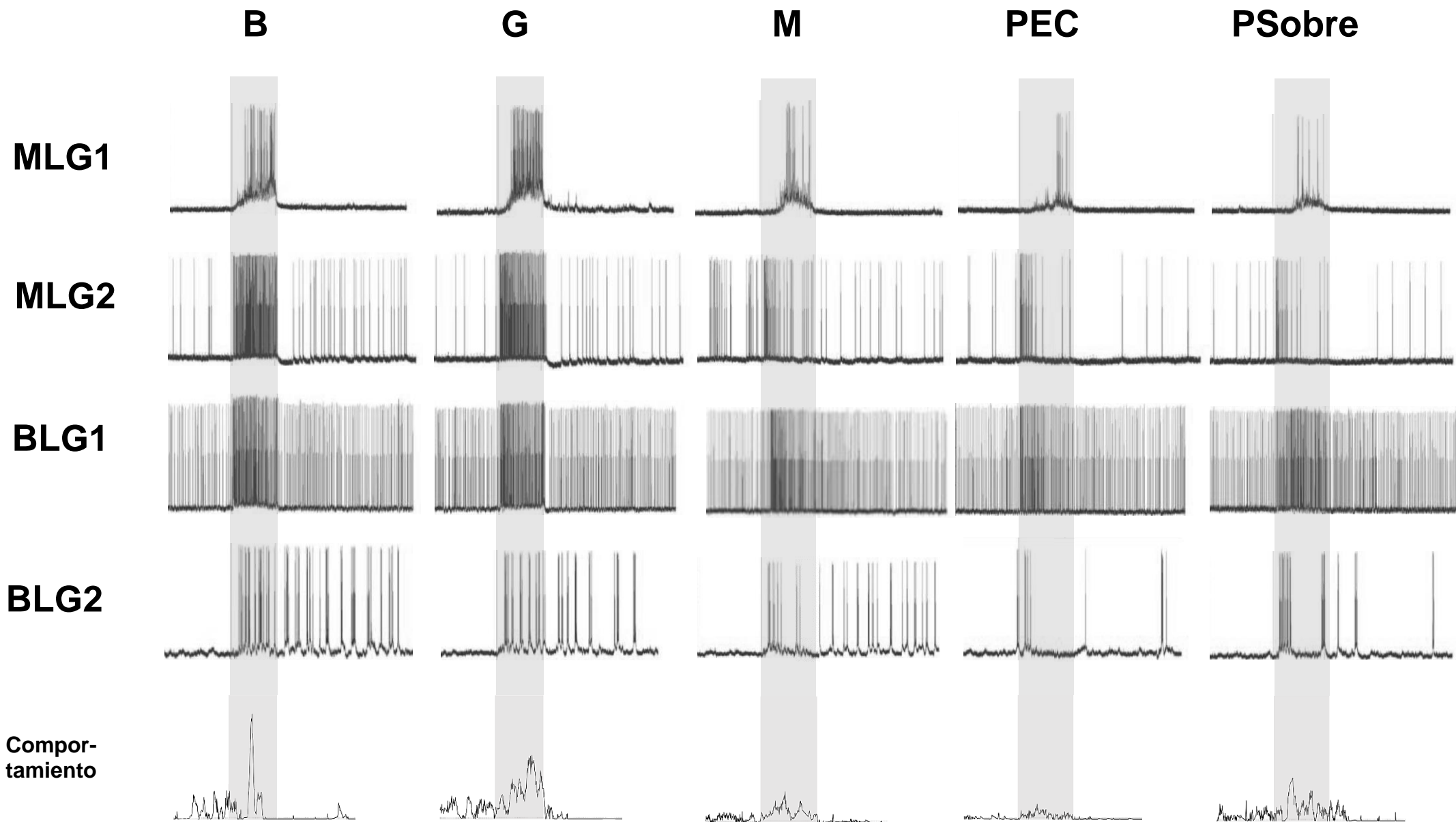


Figura 44 - Esquema de respuesta fisiológica de los 4 tipos de LG evaluados y la respuesta comportamental. El segmento sombreado en celeste corresponde con el movimiento de cada estímulo. Cada fila del esquema corresponde a un cangrejo diferente. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC y PSobre = 1,58 seg.

8.2 Análisis de la correlación

El método de correlación de Pearson se usa como una verificación primaria de la relación entre dos variables. El coeficiente de correlación r es una medida de la fuerza de la relación lineal entre dos variables.

Se comparó la correlación de Pearson entre la frecuencia de disparo predicha de cada tipo de LG y el máximo de velocidad de escape predicha.

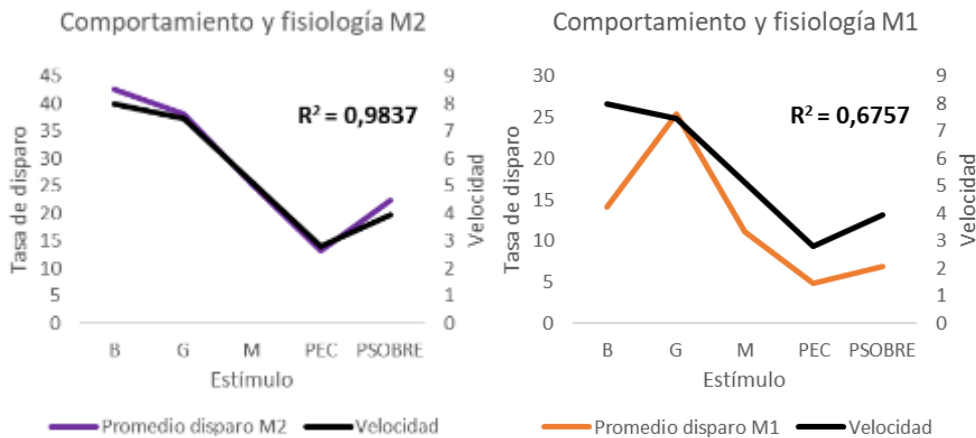
En estudios previos del laboratorio, se ha encontrado una correlación entre la dinámica de aumento en la frecuencia de disparo de las MLG1 y las MLG2 y la dinámica de aumento de la velocidad de escape frente a estímulos de looming (Oliva & Tomsic, 2014; 2016). Sin embargo, se presume que el control visual del comportamiento de escape se realizaría con la participación de otras clases de neuronas LG, aunque se ignora el grado de contribución de cada clase. Por esta razón hemos realizado análisis de correlaciones entre las respuestas comportamentales y las respuestas de las distintas LG con cada una de las combinaciones posibles.

8.3 La actividad de las LG como predictor de la velocidad máxima de escape

En la **TABLA 34** se informa el índice de correlación entre la velocidad máxima de escape y la actividad de cada uno de los distintos tipos de LG y también de cada posible combinación entre las LGs. Como se puede ver, las tasas de disparo de cualquiera de las neuronas LG muestran una buena correlación con la velocidad máxima de escape del animal, observándose un valor de correlación muy alto con la neurona MLG2 (0,98), seguido por los valores de las BLG2 y BLG1, y luego un valor considerablemente más bajo para la MLG1. Cuando se considera la tasa de disparo promediada de 3 o más tipos de LG, se observa que la correlación con la velocidad máxima aumenta, aunque solo ligeramente con respecto a la de las MLG2. De todos modos, la mejora, aunque pequeña, estaría indicando que el conjunto de respuestas de los 4 tipos de neuronas es mejor predictor del comportamiento que cualquiera de las 4 clases de neuronas consideradas individualmente. En la **FIGURA 45** se grafica velocidad y la tasa de disparo de cada LG y la tasa de disparo promediada de los 4 tipos de LG.

Combinación de Rtas Fisiológicas	Correlación (R^2): Rtas Fisiológicas Vs Comportamiento
B1&B2&M1	0,997
B1&B2&M1&M2	0,997
B1&M1&M2	0,991
B2&M1&M2	0,990
B2&M2	0,985
M2	0,983
B1&M1	0,980
B1&B2&M2	0,966
B1&M2	0,962
M1&M2	0,954
B2	0,944
B2&M1	0,942
B1&B2	0,934
B1	0,909
M1	0,675

Tabla 34 - Correlación entre el perfil de máxima velocidad de escape del modelo y el perfil de actividad modelada (tasa de disparo predicha frente a estímulos en el monitor derecho) de cada LG por separado y el promedio de la tasa de disparo de todas las combinaciones posibles.



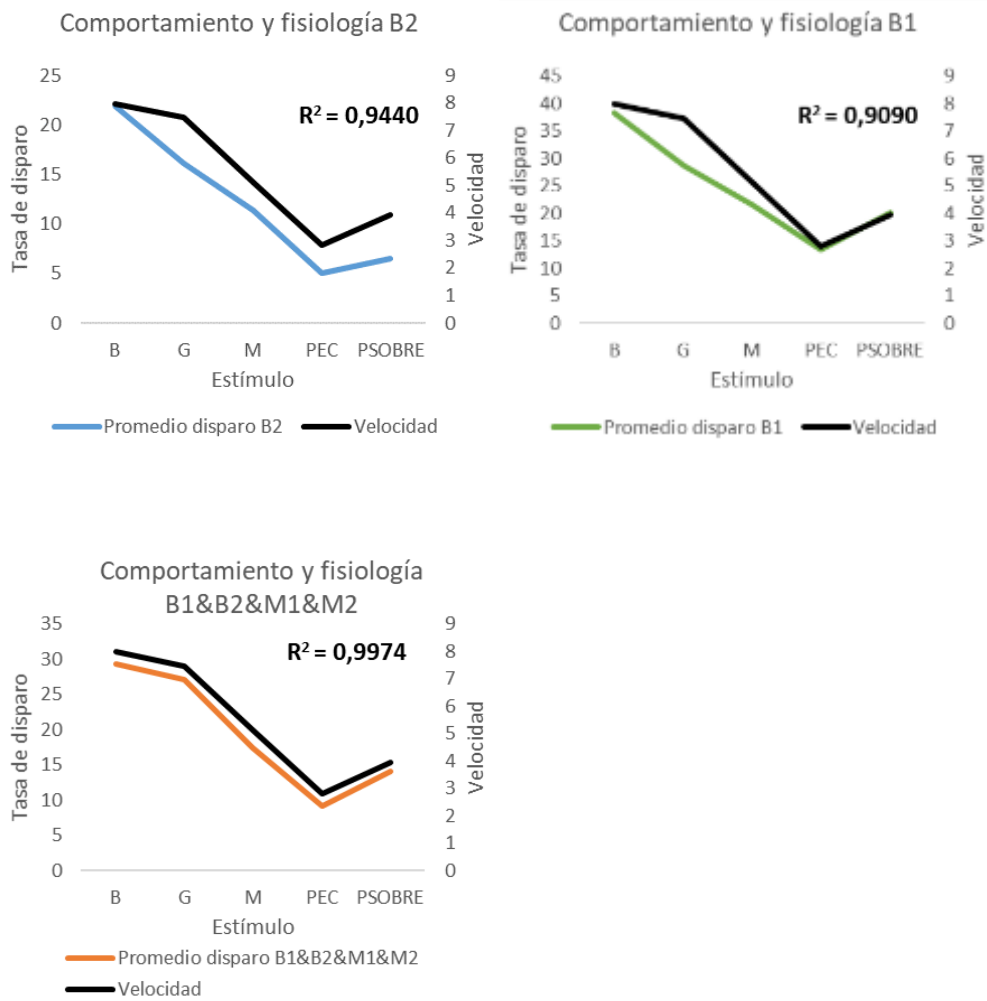


Figura 45 - Correlación entre el perfil de máxima velocidad de escape del modelo y el perfil de actividad modelada (tasa de disparo predicha frente a estímulos en el monitor derecho) de cada LG por separado y el promedio de la tasa de disparo de la actividad promediada de los 4 tipos de LG.

9 Perfil de respuesta electrofisiológica de las neuronas LCDC a estímulos de diferente tamaño y elevación.

9.1 Antecedentes sobre las Neurona Direccionales del Complejo Lobular

Hasta aquí hemos descrito la respuesta a estímulos de diferente tamaño y elevación de los 4 tipos de LG que han sido largamente estudiadas en *Neohelice granulata* y su relación con el comportamiento. Sin embargo, recientemente en nuestro laboratorio se ha identificado un nuevo tipo de neurona (Scarano et al., 2020), las LCDCs (por sus iniciales en inglés de Lobula Complex Directional Cells). Estas neuronas tienen una respuesta altamente selectiva a la dirección y sentido del movimiento. Responden a movimientos en el eje horizontal y no responden a movimientos en el eje vertical. Algunas de estas neuronas tienen una respuesta excitatoria cuando los estímulos se mueven en sentido horario e inhibitoria cuando se mueven en sentido anti horarios y otras responden exactamente al revés.

La evidencia señala que las LCDC podrían conformar dos sistemas de neuronas detectoras de desvío que permiten la fijación y seguimiento visual de objetos en movimiento. Un sistema permitiría fijar objetos en el polo lateral del ojo, posiblemente relacionado al comportamiento de escape y al de persecución de presas. Y otro sistema permitiría fijar objetos en el polo delantero, relacionado con comportamientos de confrontación, cortejo y también con el comportamiento de captura de presas que están cerca (Scarano, 2018).

En los experimentos de Scarano (Scarano, 2018), la respuesta de las LCDC fue evaluada principalmente frente a barras (4 x 21cm) con trayectorias verticales y horizontales en ambos sentidos, estímulos de looming y a estímulos de flujo óptico (patrón de barras horizontales y verticales), por lo tanto, no se ha caracterizado su respuesta frente a objetos de tamaños medianos y pequeños, ni a distintas elevaciones. El objetivo de esta sección es explorar la sensibilidad de estas neuronas al tamaño y la elevación de los estímulos.

9.2 Descripción de la Muestra

Con el objetivo de enfocarnos en el sistema de fijación en el polo lateral del ojo, relacionado al comportamiento de escape y el de persecución de presas, hemos utilizado para este análisis solamente a las LCDC que respondieran claramente con inhibiciones y excitaciones en el monitor derecho. Dado que el estudio que permitió la identificación de las neuronas direccionales ha sido contemporáneo a la etapa experimental de este trabajo de tesis, el tiempo de recabado de datos de las LCDC ha sido menor al de los otros 4 tipos de LGs. Esto ha limitado el tamaño muestral. Por las razones que ya se mencionaron en las secciones anteriores, no todos los tratamientos tienen el mismo n. Sin embargo, al tener en cuenta la población total de datos, todos los estímulos están bien representados. Las barras en sentido preferido y anti preferido están presentes en todos los registros, esto se debe a que, durante los registros cuando se sospechó que una neurona era direccional se evaluó su respuesta frente a una barra con movimiento en dirección horaria y en dirección antihoraria para confirmar el tipo de neurona, los demás estímulos fueron asignados aleatoriamente. En la **TABLA 35** se informa el n por tratamiento.

ESTIMULO	Preferido (+)	Anti-Preferido(-)
B	14	14
G	12	10
M	10	8
PBAJO	9	8
PEC	11	9
PSOBRE	10	8

Tabla 35 – Cantidad de neuronas por tratamiento.

Características de la muestra:

- 14 neuronas con su campo receptivo en el lateral derecho, registradas en 14 animales.
- 5 de las 14 neuronas presentaron respuestas excitatorias frente a movimiento en sentido anti horario e inhibitorias en sentido horario (sentido preferido anti horario)
- 9 de las 14 neuronas presentaron respuestas excitatorias frente a movimientos en sentido horario e inhibitorias en sentido anti horario (sentido preferido horario).

A manera de ejemplo, en la **FIGURA 46** se muestra un registro de una neurona LCDC con sentido preferido horario, frente a los estímulos de distinto tamaño moviéndose en ambas direcciones.

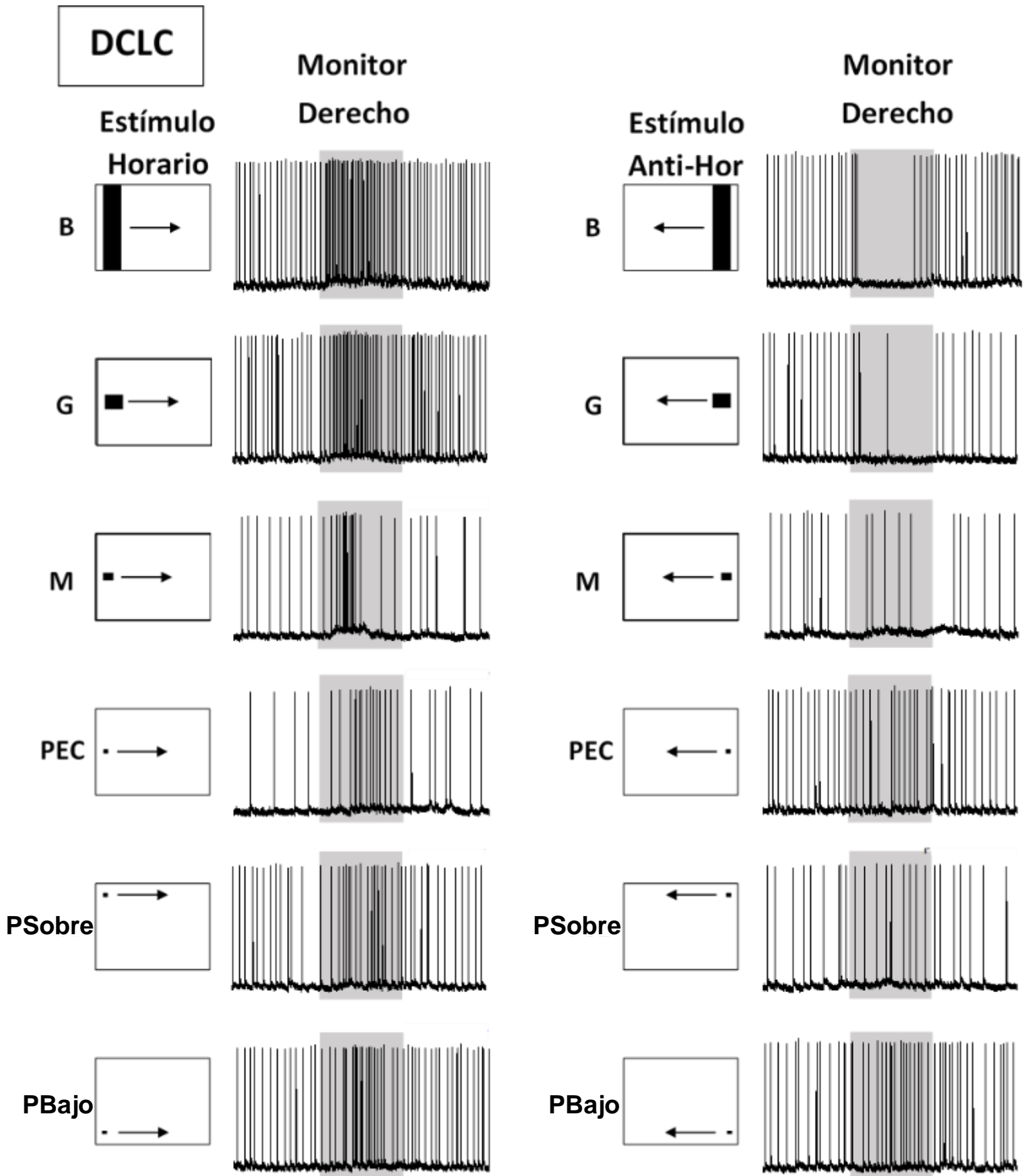


Figura 46 – Registro intracelular de una neurona DCLC con dirección preferida horario. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

En la **FIGURA 47** se muestra la respuesta de cada LCDC (número potenciales de acción durante el paso del estímulo – número de potenciales de acción durante la actividad espontánea previa al paso del estímulo por segundo) frente a estímulos de diversos tamaños en el sentido preferido (+) y anti preferido (-) de cada neurona.

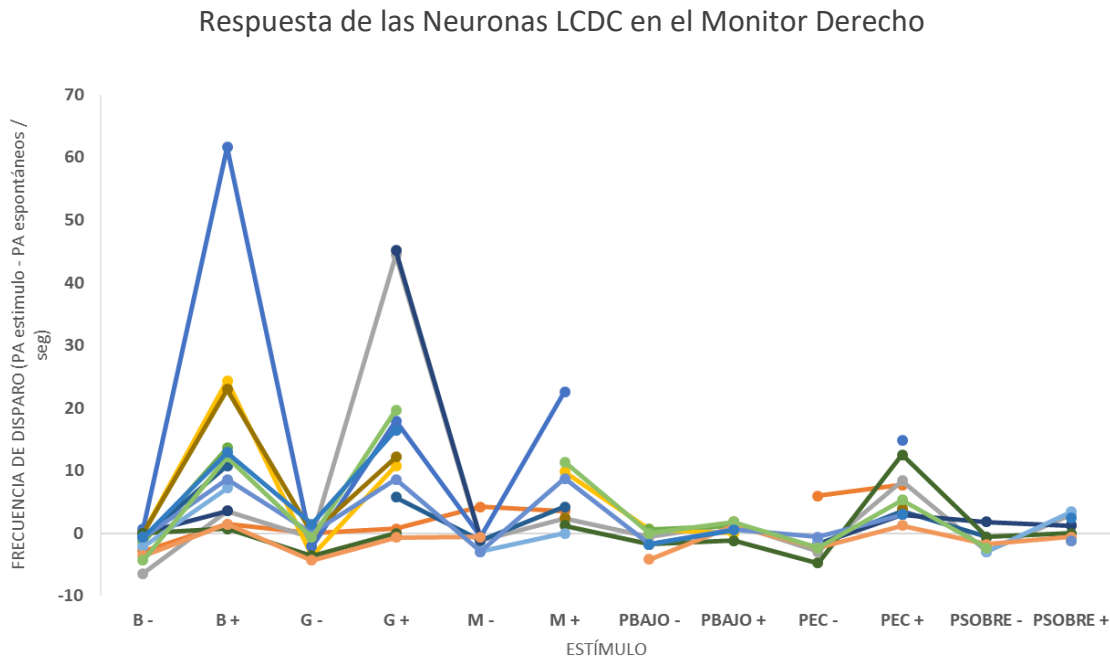


Figura 47 - Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo en cada una de las 14 neuronas direccionales. El gráfico se confeccionó utilizando los datos obtenidos de las respuestas en el monitor derecho. Cada punto equivale a la frecuencia de disparo (spikes/seg.) durante el paso del estímulo menos la frecuencia espontánea calculada previo al paso de cada estímulo. Cada línea de color corresponde a una neurona diferente.

Además del cambio en la tasa de disparo, en la mayoría de las neuronas se observó una disminución del voltaje de membrana evocado por el movimiento de estímulos en el sentido anti preferido. En la **FIGURA 48** se muestra la amplitud del cambio en el potencial de membrana evocado en respuesta a los distintos estímulos moviéndose en el sentido preferido y anti preferido, para medirlo se tomó el menor voltaje medido durante el paso del estímulo y se le restó el mínimo valor de voltaje medido antes del paso del estímulo, durante un lapso de tiempo equivalente.

Cambio en el Potencial Basal de Membrana Evocado por Cada Estímulo

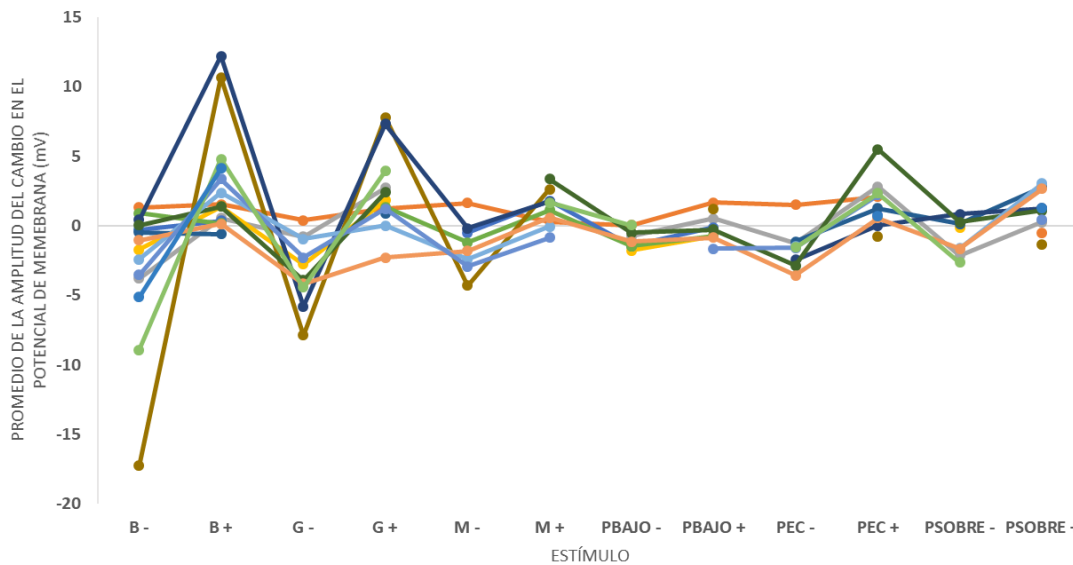


Figura 48 Amplitud del cambio en el potencial de membrana. Para realizar este análisis se promedió el potencial de membrana durante el paso del estímulo y se le restó el promedio del potencial de membrana medido previo al paso del estímulo durante un tiempo equivalente. Los estímulos marcados con el signo “-” se desplazaron en el sentido anti preferido de cada neurona. Los estímulos marcados con el signo “+” se desplazaron en el sentido preferido de cada neurona. $n = 14$ neuronas, 5 neuronas con sentido preferido anti horario y 9 neuronas con sentido preferido horario.

9.3 Análisis estadístico de los datos

Para evaluar las diferencias estadísticas en la tasa de disparo evocada por cada estímulo en cada sentido se aplicó un modelo lineal mixto generalizado mediante la función “glis” del paquete “nlme” (J. Pinheiro & Bates, 2000) del programa R. El modelo tiene en cuenta a la neurona como factor aleatorio, es decir, tiene en cuenta la falta de independencia entre las respuestas medidas en una misma neurona frente a diferentes estímulos. Los supuestos del modelo fueron puestos a prueba mediante un análisis de residuos.

Características del Modelo de Tasa de disparo

- Variable respuesta: Tasa de disparo (Hz)
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Gaussiana.
- Factor aleatorio: ID de la neurona.
- Variable explicativa: Tipo de estímulo. Consta de 12 niveles: Barra en sentido preferido, Barra en sentido anti preferido, Cuadrado grande en sentido preferido, Cuadrado grande en sentido anti preferido, Cuadrado mediano en sentido preferido, Cuadrado mediano en sentido anti preferido, Cuadrado pequeño en el ecuador en sentido preferido, Cuadrado pequeño en el ecuador

en sentido anti preferido, cuadrado pequeño sobre el ecuador en sentido preferido, cuadrado pequeño sobre el ecuador en sentido anti preferido, cuadrado pequeño bajo el ecuador en sentido preferido y cuadrado pequeño bajo el ecuador en sentido anti preferido.

- Función link del modelo: Identidad

Se utilizó el mismo tipo de modelo para evaluar las diferencias estadísticas entre la amplitud del cambio en el potencial de membrana evocado por cada estímulo en cada sentido.

Características del Modelo de Amplitud del Cambio en el Potencial de Membrana

- Variable respuesta: Amplitud máxima del cambio en el potencial de membrana (Promedio del potencial de membrana previo al paso del estímulo – promedio del potencial de membrana durante el paso del estímulo)
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Gaussiana.
- Factor aleatorio: ID de la neurona.
- Variable explicativa: Tipo de estímulo. Consta de 12 niveles: Barra en sentido preferido, Barra en sentido anti preferido, Cuadrado grande en sentido preferido, Cuadrado grande en sentido anti preferido, Cuadrado mediano en sentido preferido, Cuadrado mediano en sentido anti preferido, Cuadrado pequeño en el ecuador en sentido preferido, Cuadrado pequeño en el ecuador en sentido anti preferido, cuadrado pequeño sobre el ecuador en sentido preferido, cuadrado pequeño sobre el ecuador en sentido anti preferido, cuadrado pequeño bajo el ecuador en sentido preferido y cuadrado pequeño bajo el ecuador en sentido anti preferido.
- Función link del modelo: Identidad

Para el modelo de la tasa de disparo se realizó un ANOVA que indicó que hay diferencias significativas entre las respuestas evocadas ($p < 0.0001$). Para identificar cuáles fueron los estímulos que provocaron diferencias entre ambos sentidos de movimiento se realizó el test de Tukey (**FIGURA 49**).

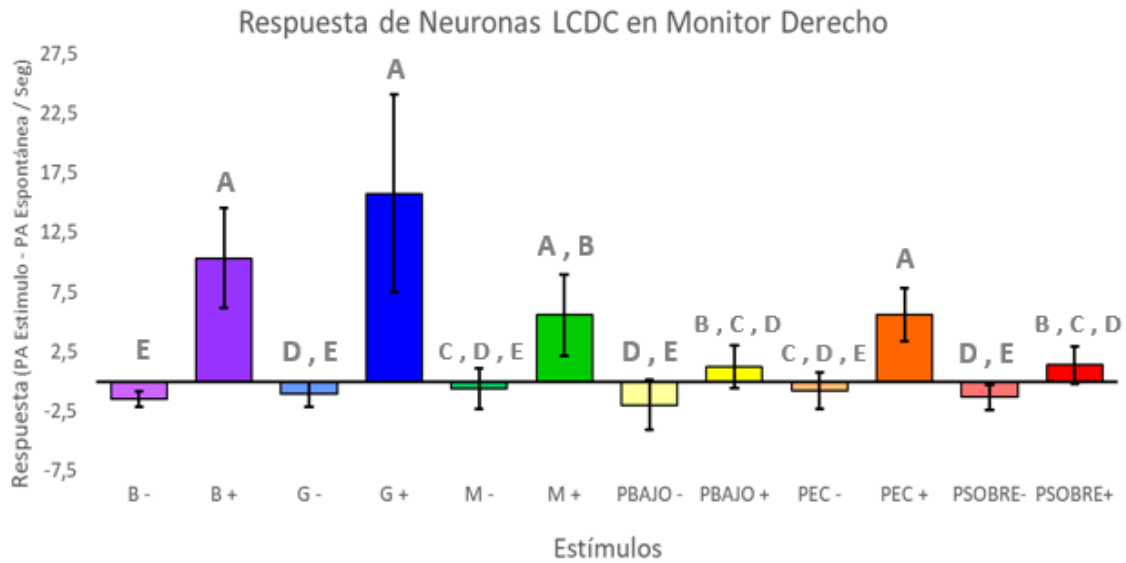


Figura 49 - Modelo Lineal Mixto Generalizado de la Tasa de Disparo. Cada barra corresponde a la frecuencia de disparo media +/- SEM. Los estímulos marcados con el signo "-" se desplazaron en el sentido anti-preferido de cada neurona, Los estímulos marcados con el signo "+" se desplazaron en el sentido preferido de cada neurona. De las 14 neuronas, 5 neuronas presentaron el sentido preferido anti horario y 9 neuronas con sentido preferido horario, el n por tratamiento se indica en la **Tabla 35**. La significancia de las diferencias entre las respuestas evocadas por cada sentido frente a cada estímulo se probaron mediante el test de Tukey (se tomó como diferencia significativa $p < 0.05$), los estímulos que no evocaron respuestas diferentes llevan la misma letra. A excepción de los cuadrados pequeños por arriba y por debajo del ecuador, todas las demás figuras evocaron respuestas significativamente diferentes cuando se desplazaron en el sentido preferido y anti-preferido. En cuanto a las respuestas excitatorias (las que se produjeron cuando los objetos se desplazaron en el sentido preferido), no se encontraron diferencias significativas entre las respuestas a la barra, el cuadrado grande, el mediano y el pequeño en el ecuador.

También se realizó un ANOVA en el modelo de potencial de membrana ($p < 0.0001$.) y un test de Tukey para identificar cuáles fueron los estímulos que provocaron diferencias entre ambos sentidos de movimiento (**FIGURA 50**).

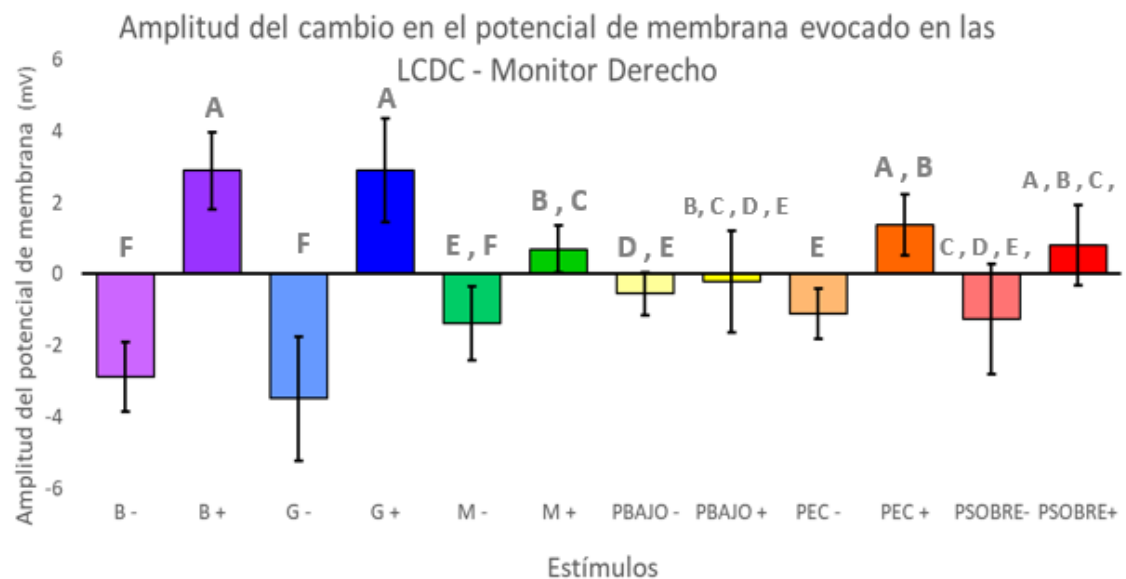


Figura 50 -- Modelo Lineal Mixto Generalizado de la Tasa de Disparo. Cada barra corresponde Amplitud media del cambio en el potencial de membrana frente cada estímulo +/- SEM. Para realizar este análisis se promedió el potencial de membrana durante el paso del estímulo y se le restó el promedio del potencial de membrana medido

previo al paso del estímulo durante un tiempo equivalente. Los estímulos marcados con el signo “-” se desplazaron en el sentido anti preferido de cada neurona, Los estímulos marcados con el signo “+” se desplazaron en el sentido preferido de cada neurona. n = 14 neuronas, 5 neuronas con sentido preferido anti horario y 9 neuronas con sentido preferido horario, el n por tratamiento se informa en la **Tabla 35**. La significancia de las diferencias entre las respuestas evocadas por cada sentido frente a cada estímulo se probaron mediante el test de Tukey (se tomó como diferencia significativa cuando $p < 0.05$), los estímulos que no evocaron respuestas diferentes llevan la misma letra. A excepción de los cuadrados pequeños por arriba y por debajo del ecuador, todas las demás figuras evocaron cambios en el voltaje base de membrana según se desplazaron en el sentido preferido o anti preferido, causando inhibiciones en el sentido anti preferido y despolarizaciones en el sentido preferido. Las inhibiciones más intensas fueron producidas por la barra, el cuadrado grande y el mediano, mientras que las despolarizaciones más intensas fueron producidas por la barra, el cuadrado grande y el cuadrado pequeño en el ecuador.

Estos resultados indican que hay diferencias significativas en la tasa de disparo evocada por el movimiento en sentido preferido y anti preferido para los estímulos de la barra, y los cuadrados grandes y medianos. En cuanto a los objetos pequeños, la única elevación que generó una respuesta apreciable fue aquella que coincide con el nivel del ecuador. Esto proporciona evidencias acerca de que la extensión vertical de CR de las LCDC es muy acotada y su centro se ubica en el ecuador del ojo. Al comparar las respuestas frente a los objetos que se desplazaron en el sentido preferido no hubo diferencias significativas, tampoco hubo diferencias entre las respuestas a los estímulos que se desplazaron en sentido anti preferido.

En cuanto a las diferencias en cambio del potencial de membrana frente a estímulos en el sentido preferido y anti preferido, también se observa que hay diferencias significativas en todos los estímulos que se mueven a la altura del ecuador, mostrando inhibiciones cuando los objetos se desplazaron en el sentido anti preferido.

En resumen, las LCDC presentaron respuestas de marcada direccionalidad frente a objetos de todos los tamaños, siempre que los objetos se desplazaran a la altura del ecuador.

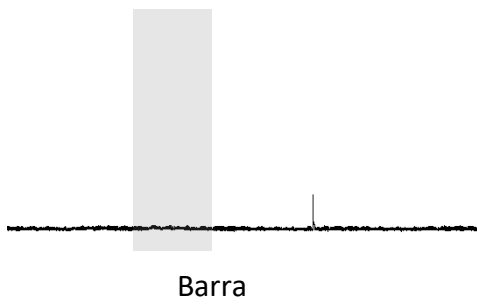
10 Neuronas candidatas a detectoras de movimiento de objetos pequeños

Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis ha sido identificar neuronas que respondan con preferencia al movimiento de estímulos pequeños. Este objetivo no es simple porque los registros intracelulares en el animal prácticamente intacto deben ser realizados a ciegas, es decir sin ver ni elegir a la célula que se impala. Si bien se han registrado en algunas oportunidades neuronas de interés para este objetivo, la frecuencia de estas apariciones ha sido muy baja y no ha permitido hacer una identificación. Sin embargo, describiremos a continuación algunos elementos que son de interés como antecedentes de neuronas que responden preferencialmente frente al movimiento de objetos pequeños. Se trata de 4 neuronas que no parecen pertenecer a una misma clase por presentar diferencias en sus campos receptivos, su actividad espontánea y su respuesta a la elevación del objeto en movimiento.

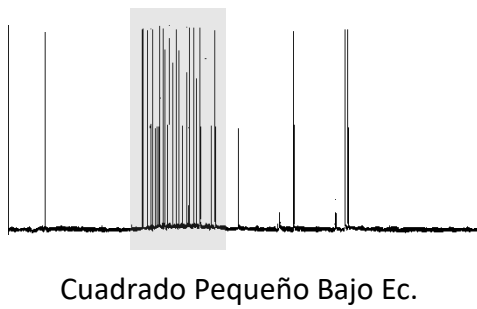
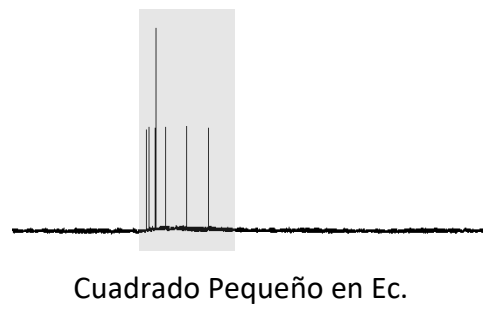
10.1 Neurona que responde preferencialmente al movimiento de objetos pequeños

Al igual que las STMD de insectos (Nordström et al., 2006), esta neurona presenta un CR amplio y respuestas marcadas frente al movimiento de objetos pequeños pero no al de objetos de mayor tamaño. La preferencia por la altura difiere a lo largo del CR. En el monitor izquierdo la respuesta al movimiento de objetos pequeños es débil cuando el objeto pequeño se desplaza en el ecuador y más intensa cuando se desplaza sobre y bajo el mismo. En el monitor frontal la neurona responde marcadamente al movimiento de objetos pequeños que se desplazan en el ecuador y no hay respuesta a los objetos pequeños que se mueven bajo o sobre el mismo. En el monitor derecho responde intensamente a objetos pequeños que se desplazan en y sobre el ecuador. El estímulo de looming evoca distintos patrones de respuesta en distintos monitores. Esto significa que el campo visual no es uniforme. En la **FIGURA 51** se muestran ejemplos de registros intracelulares de esta neurona, y en la **FIGURA 52** se resumen todas las mediciones realizadas en la misma.

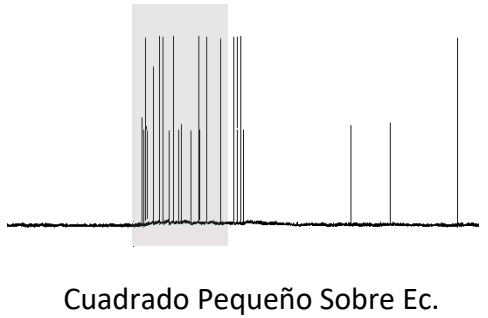
MONITOR IZQUIERDO



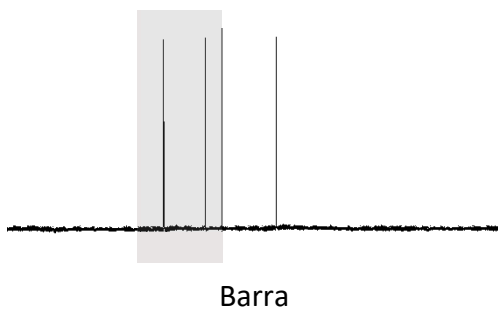
20 mV
1 seg



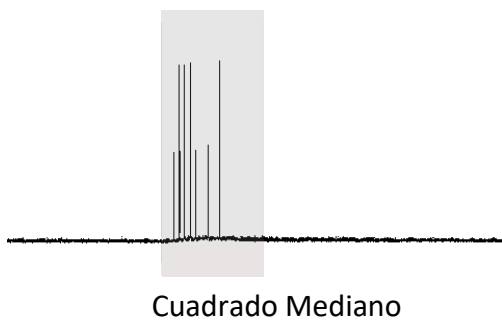
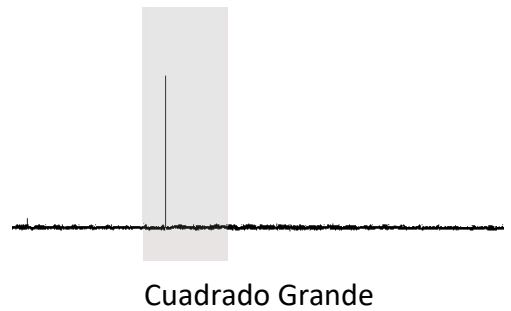
20 mV
1 seg



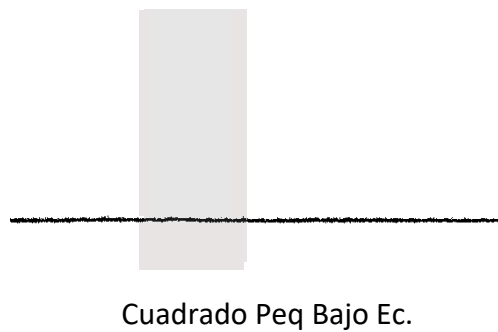
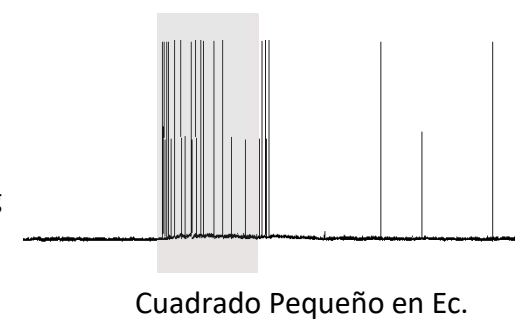
MONITOR FRONTAL



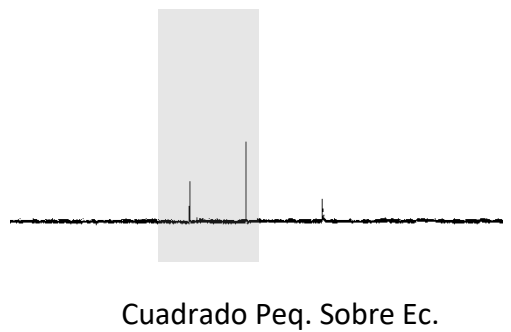
20 mV
1 seg



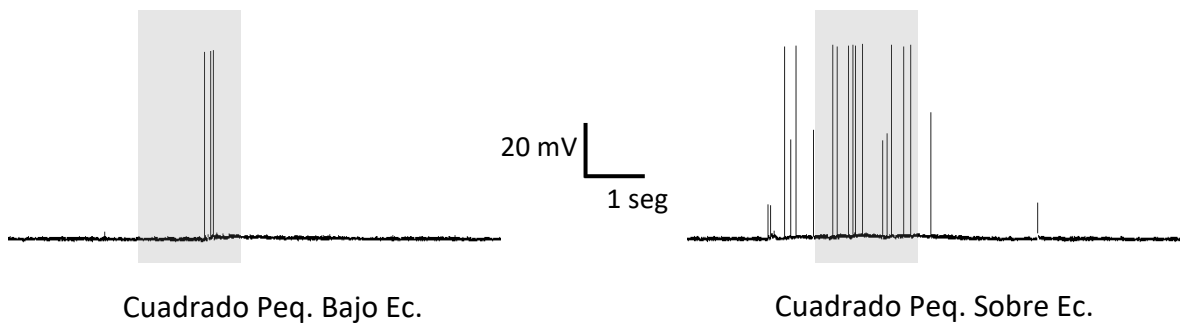
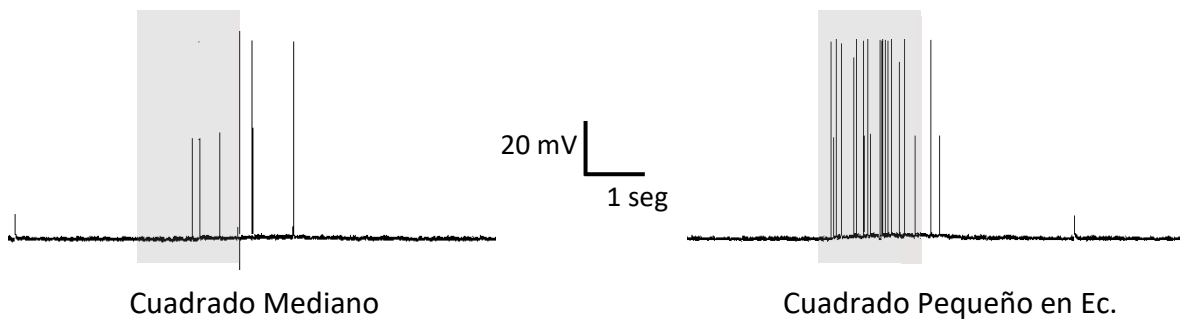
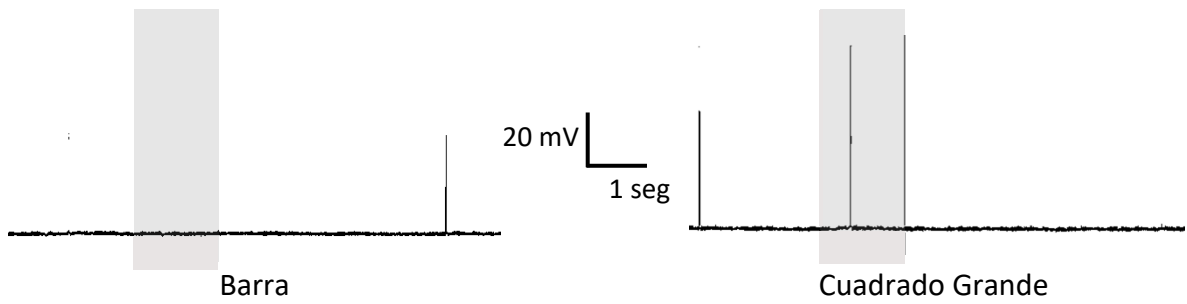
20 mV
1 seg



20 mV
1 seg



MONITOR DERECHO



LOOMING

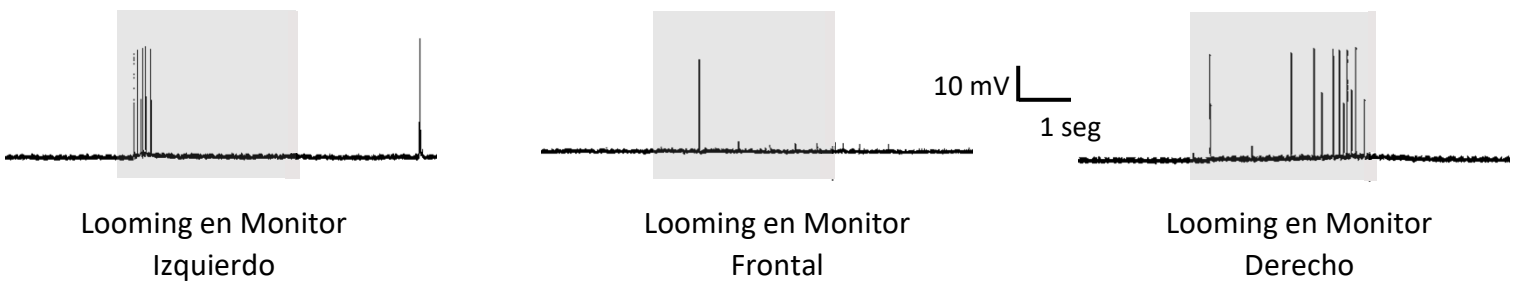


Figura 51 – Registro intracelular de una neurona que responde preferencialmente al movimiento de objetos pequeños. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M =1,50 seg; PEC, PSobre , PBajo = 1,58 seg; y Loom =3,42 seg.

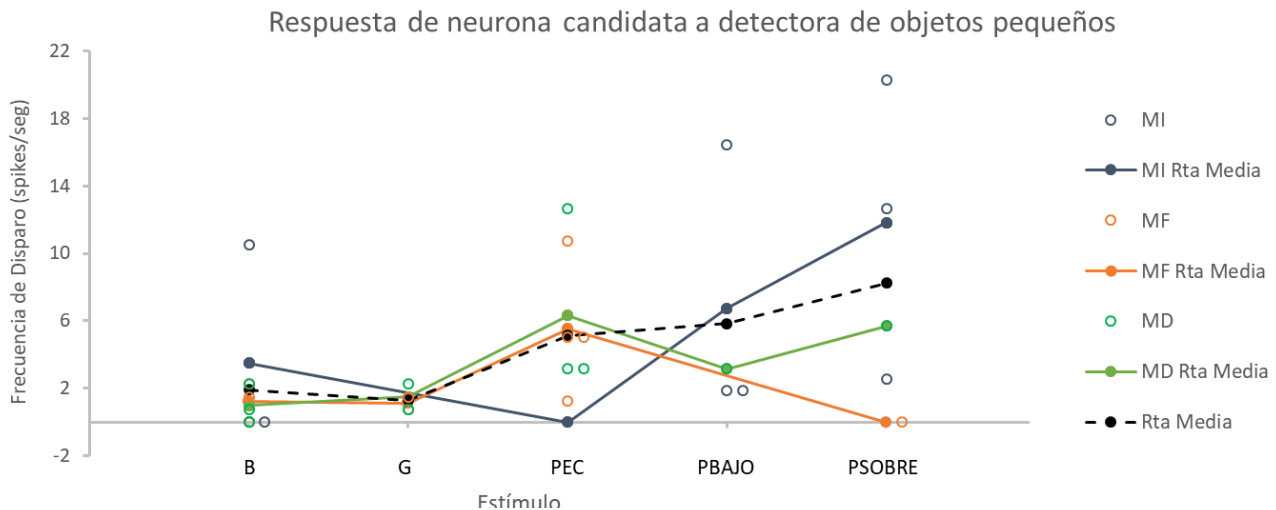
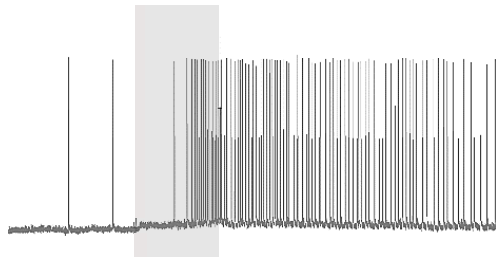


Figura 52 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo. La frecuencia de disparo (spikes/seg. se calculó contando los spikes evocados durante el paso del estímulo y luego restando los spikes espontáneos previos al paso del mismo en un lapso de tiempo equivalente y relativizados a un segundo. Los círculos vacíos corresponden a cada medición; los círculos llenos corresponden a la frecuencia media cuando se obtuvo más de un registro por estímulo y monitor. Las líneas que unen los puntos llenos muestran el perfil de respuesta en cada monitor, mientras que la línea punteada se corresponde al perfil de la neurona en todo su C.R.

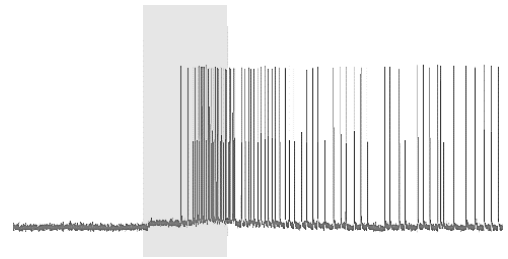
10.2 Neurona con CR excitatorio e inhibitorio y alta respuesta al movimiento de objetos pequeños sobre el ecuador

Esta neurona responde más al movimiento del cuadrado pequeño sobre el ecuador que al movimiento de los estímulos grandes. La respuesta al movimiento horario en el monitor frontal consiste en una disminución de la frecuencia respecto a la actividad espontánea y luego un aumento marcado de la frecuencia de disparo antes de que el estímulo termine, mientras que el monitor derecho la respuesta consiste en un marcado aumento al inicio del movimiento y una inhibición hacia el final. Esto sugiere el CR de esta neurona está circunscripto al sector entre el monitor frontal y el monitor derecho y consta de un área central excitatoria acompañada a ambos lados por áreas inhibitorias. Esto se verifica con las respuestas que se observan a la barra en sentido horario y antihorario en el monitor frontal. En la **FIGURA 53** se muestran ejemplos de registros intracelulares de esta neurona, y en la **FIGURA 54** se resumen todas las mediciones realizadas en la misma.

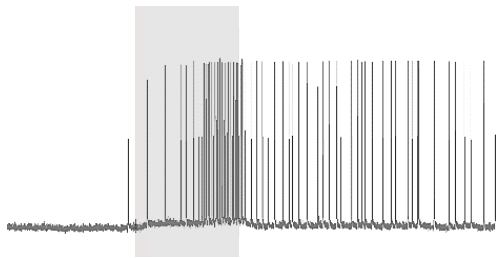
MONITOR FRONTAL



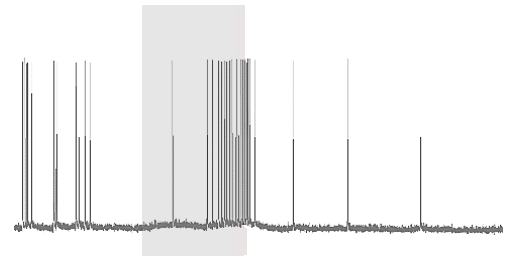
Barra



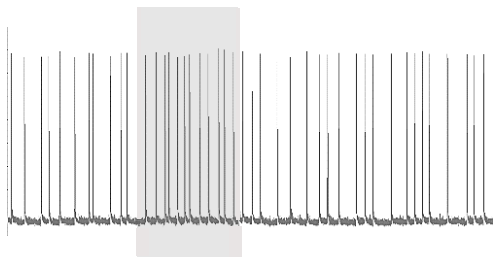
Cuadrado Grande



Cuadrado Mediano



Cuadrado Pequeño en Ec.



Cuadrado Peq. Bajo Ec.



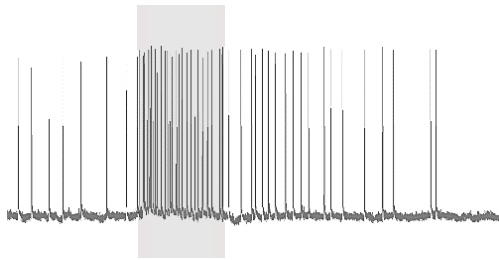
Cuadrado Peq. Sobre Ec.

20 mV
1 seg

20 mV
1 seg

20 mV
1 seg

MONITOR DERECHO

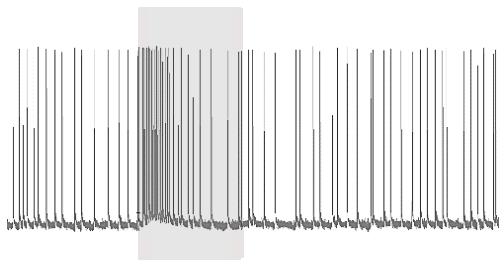


Barra

20 mV
1 seg



Cuadrado Grande

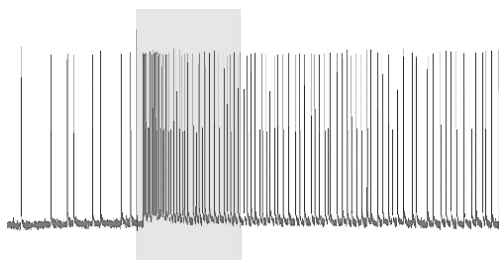


Cuadrado Mediano

20 mV
1 seg

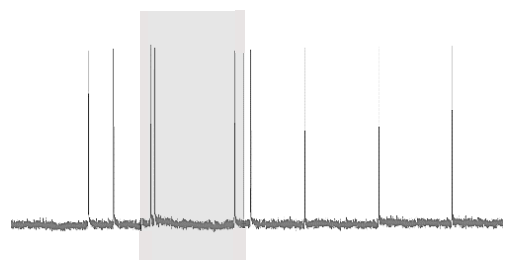


Cuadrado Peq. Sobre Ec.



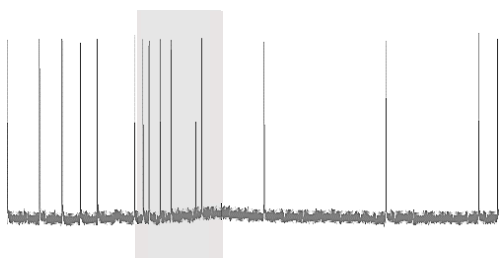
Cuadrado Peq. en Ec.

20 mV
1 seg



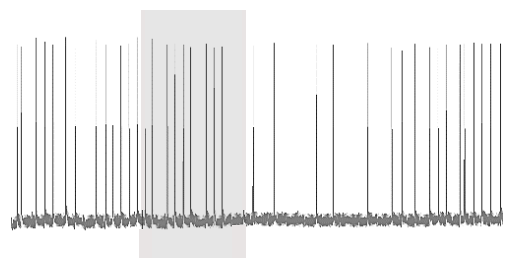
Cuadrado Peq. Bajo Ec.

MONITOR IZQUIERDO



Barra

20 mV
1 seg



Cuadrado Peq. Sobre Ec.

BARRA EN SENTIDO HORARIO Y ANTIHORARIO EN MONITOR FRONTAL Y DERECHO

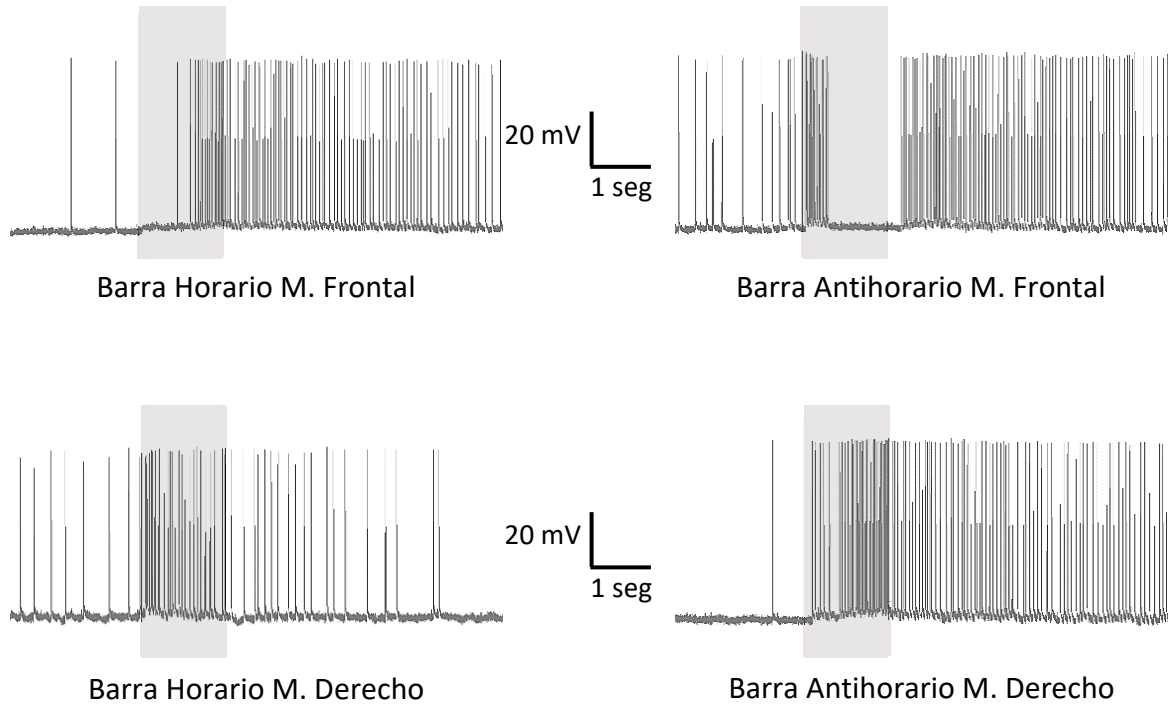


Figura 53 – Registro intracelular de una neurona con CR excitatorio e inhibitorio y alta respuesta al movimiento de objetos pequeños sobre el ecuador. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBAJO = 1,58 seg.

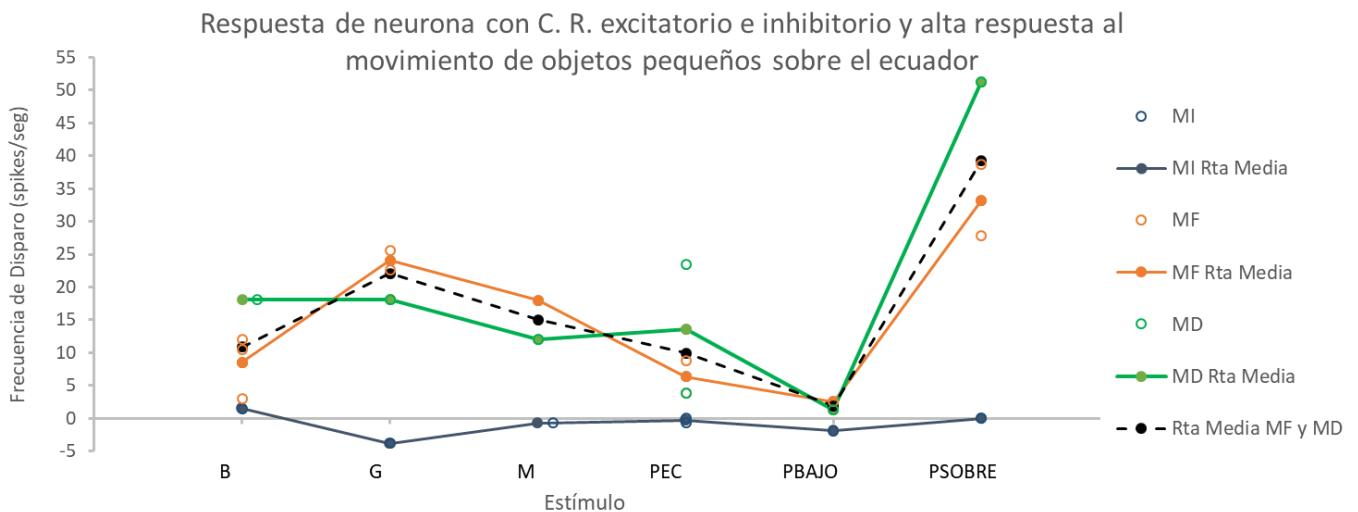
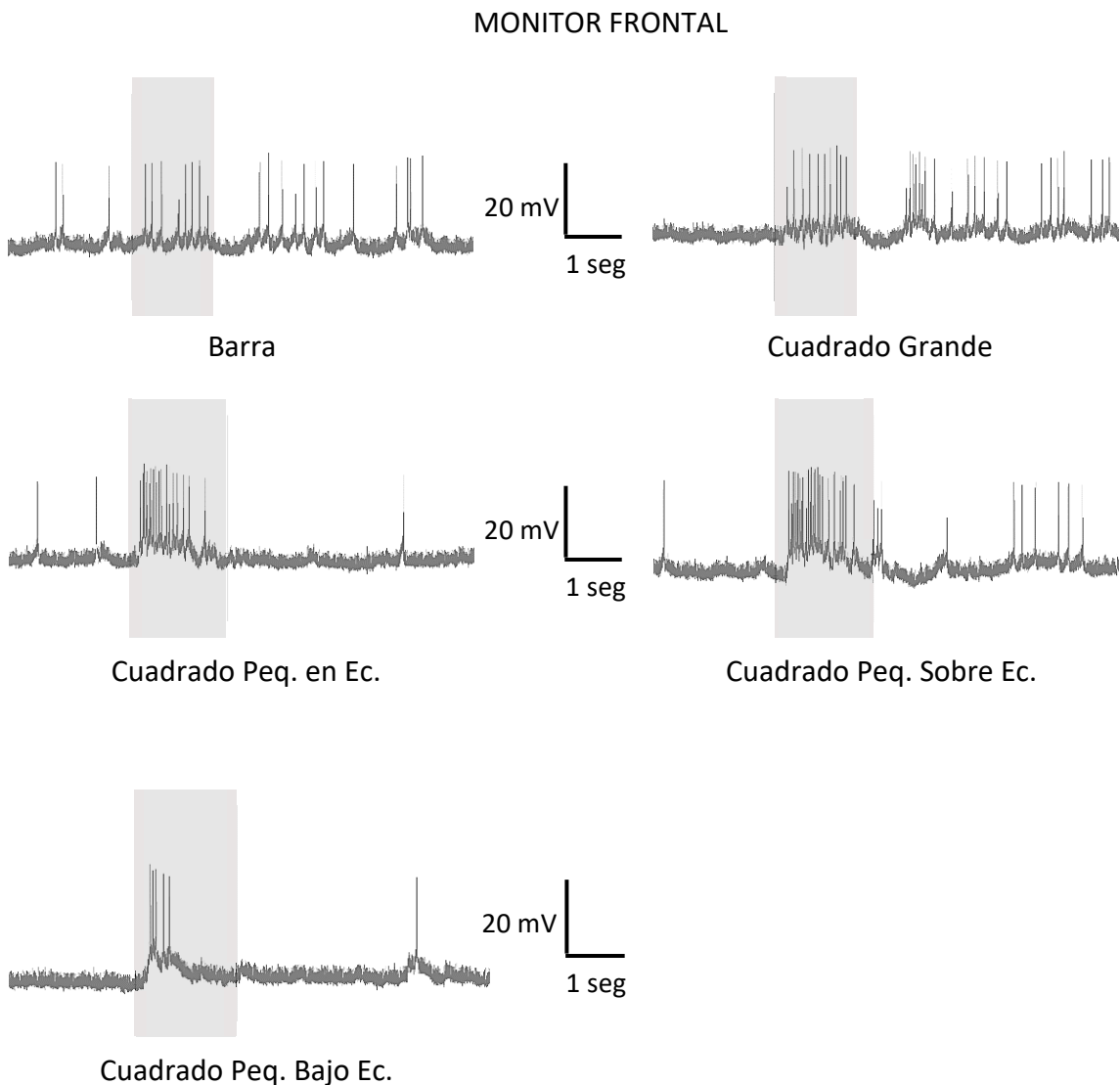


Figura 54 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo. Referencias igual que para la figura 52.

10.3 Neurona con alta respuesta al movimiento de objetos pequeños

Para intentar favorecer la posibilidad de realizar la tinción de esta neurona se decidió acortar el tiempo de evaluación reduciendo la cantidad de estímulos, por esta razón solamente se evaluó la respuesta a los diferentes estímulos en el monitor derecho y en el monitor frontal. Sin embargo, la tinción no fue exitosa. Para determinar si el CR de esta neurona incluía al monitor izquierdo, en dicho monitor solamente se utilizó el estímulo de looming.

Tanto en el monitor frontal como en el derecho el cuadrado pequeño sobre el ecuador evoca las mayores respuestas de esta neurona. Además, en esta parte del CR el cuadrado pequeño en el ecuador también genera una respuesta muy marcada. Esto coincide con que en el monitor derecho durante el estímulo de looming la neurona respondió al principio de la expansión para luego silenciarse hasta el final del estímulo. En la **FIGURA 55** se muestran ejemplos de registros intracelulares de esta neurona, y en la **FIGURA 56** se resumen todas las mediciones realizadas en la misma.



MONITOR DERECHO

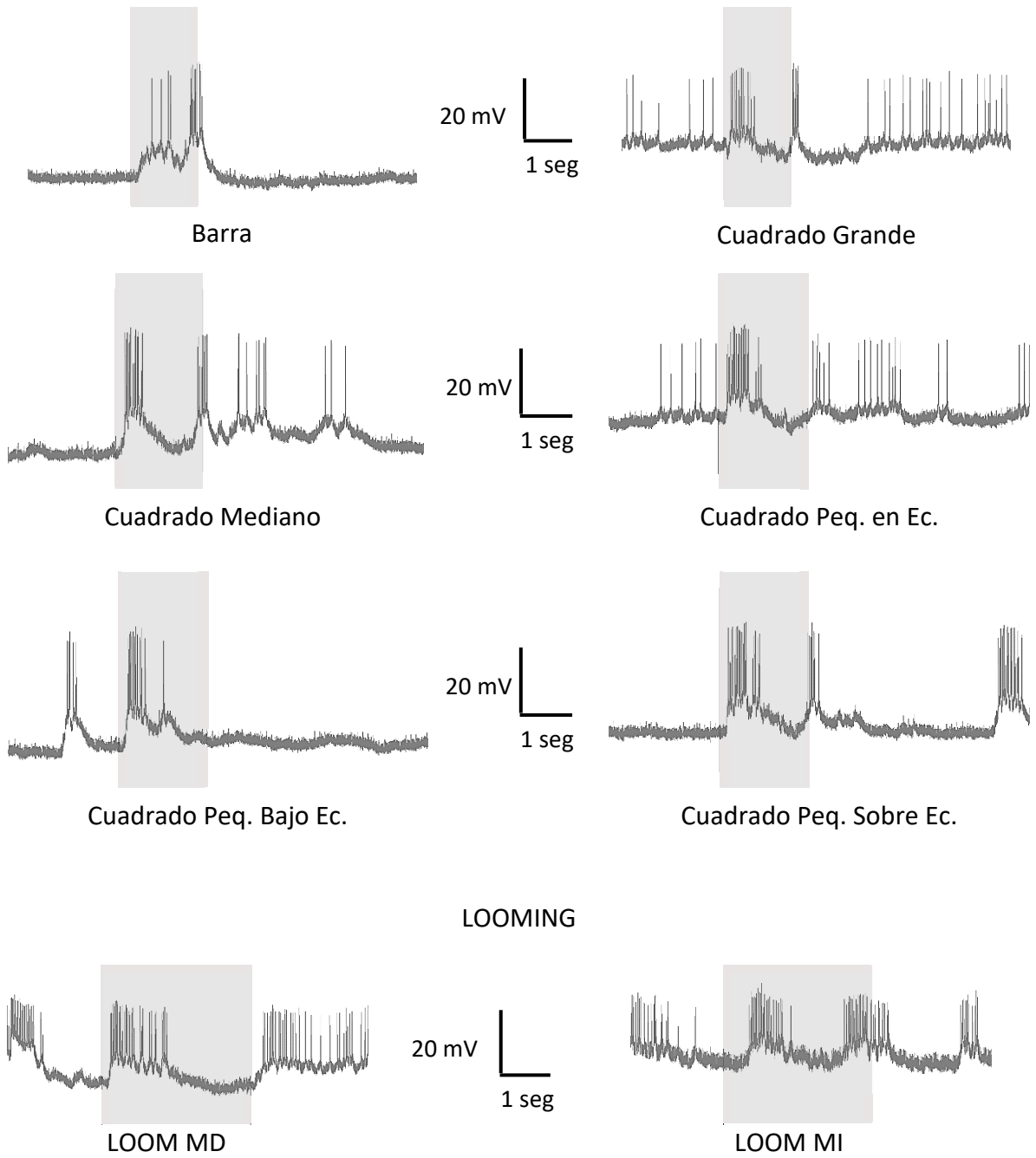


Figura 55 – Registro intracelular de una neurona con alta respuesta al movimiento de objetos pequeños. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre, PBajo = 1,58 seg; y Loom = 3,42 seg.

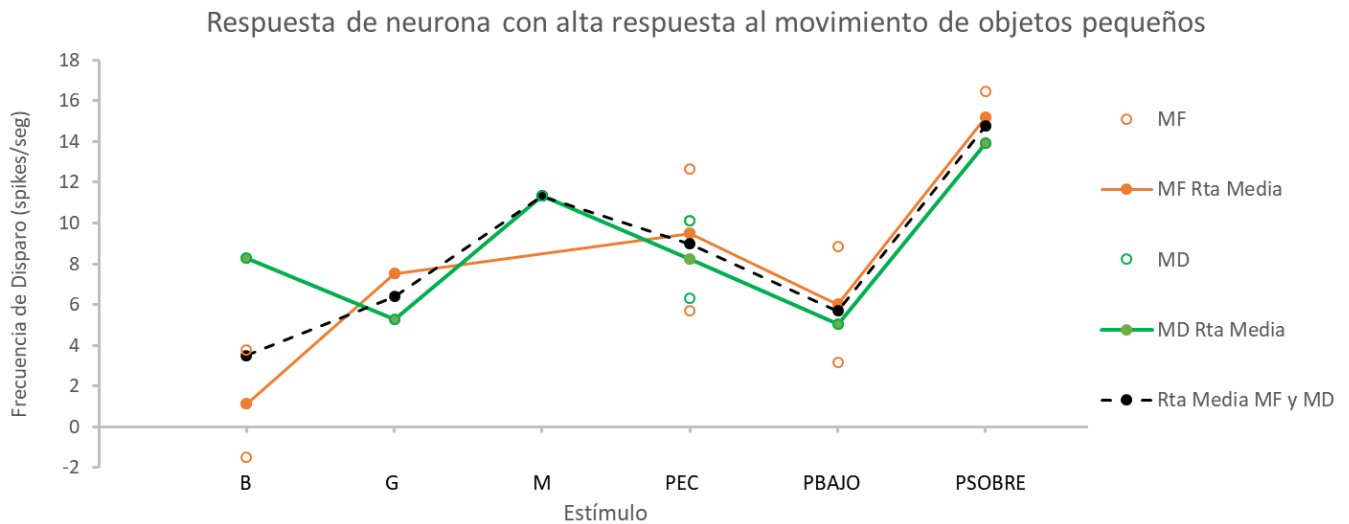
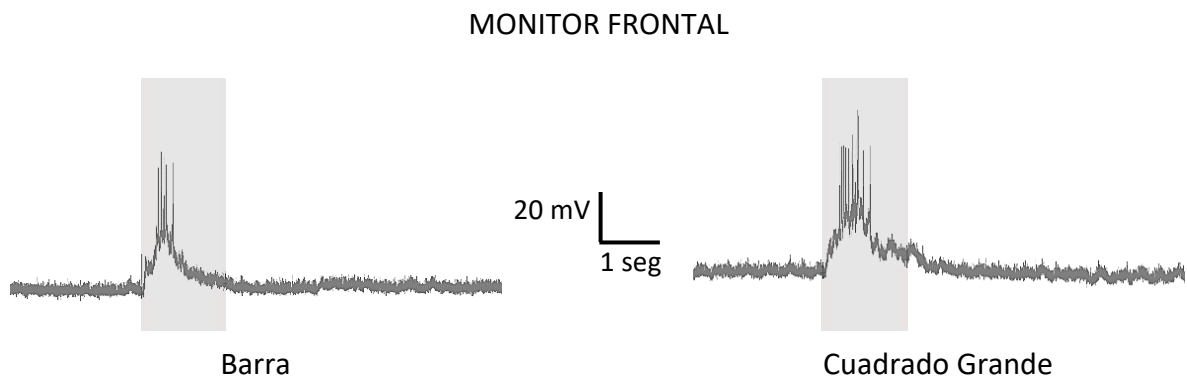


Figura 56 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo. Referencias igual que para la figura 52.

10.4 Neurona con CR acotado y alta respuesta al movimiento de objetos pequeños bajo el ecuador

Esta neurona responde más al movimiento del cuadrado pequeño bajo el ecuador que al movimiento de los estímulos grandes. El cuadrado pequeño sobre el ecuador evocó respuestas débiles. El CR de esta neurona está circunscripto al monitor frontal, el movimiento en el monitor izquierdo y en el derecho no evocó respuestas. Además de tener un CR acotado, tiene en común con las neuronas MLG1 la falta de actividad espontánea. Se diferencia de las MLG1 en la respuesta al looming, ya que la frecuencia de disparo continúa alta luego de la expansión. En la **FIGURA 57** se muestran ejemplos de registros intracelulares de esta neurona, y en la **FIGURA 58** se resumen todas las mediciones realizadas en la misma.



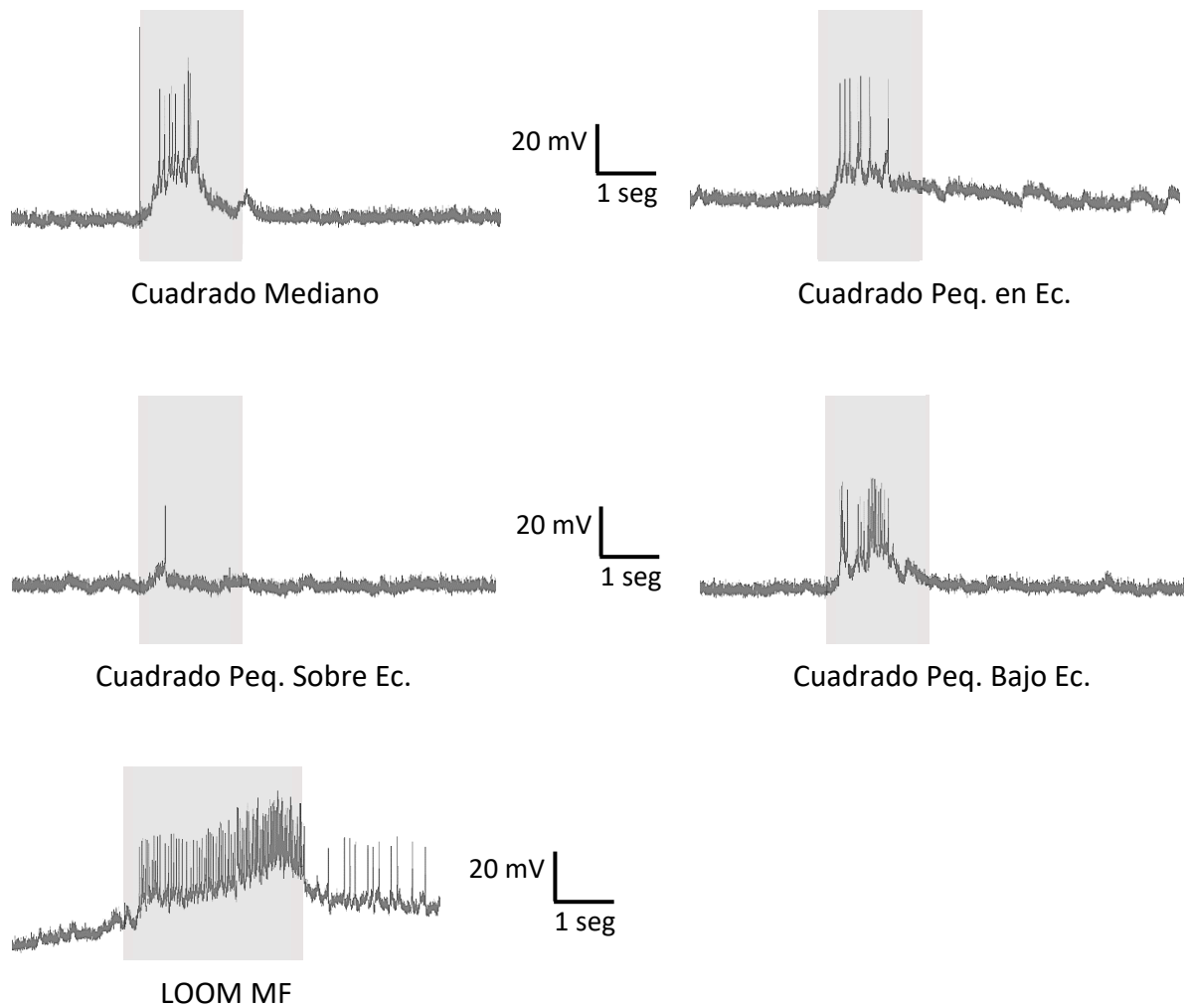


Figura 57 – Registro intracelular de una neurona con C.R acotado y alta respuesta al movimiento de objetos pequeños bajo el ecuador. La zona sombreada corresponde al momento en que el estímulo estuvo en movimiento. Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre, PBAJO = 1,58 seg; y Loom = 3,42 seg.

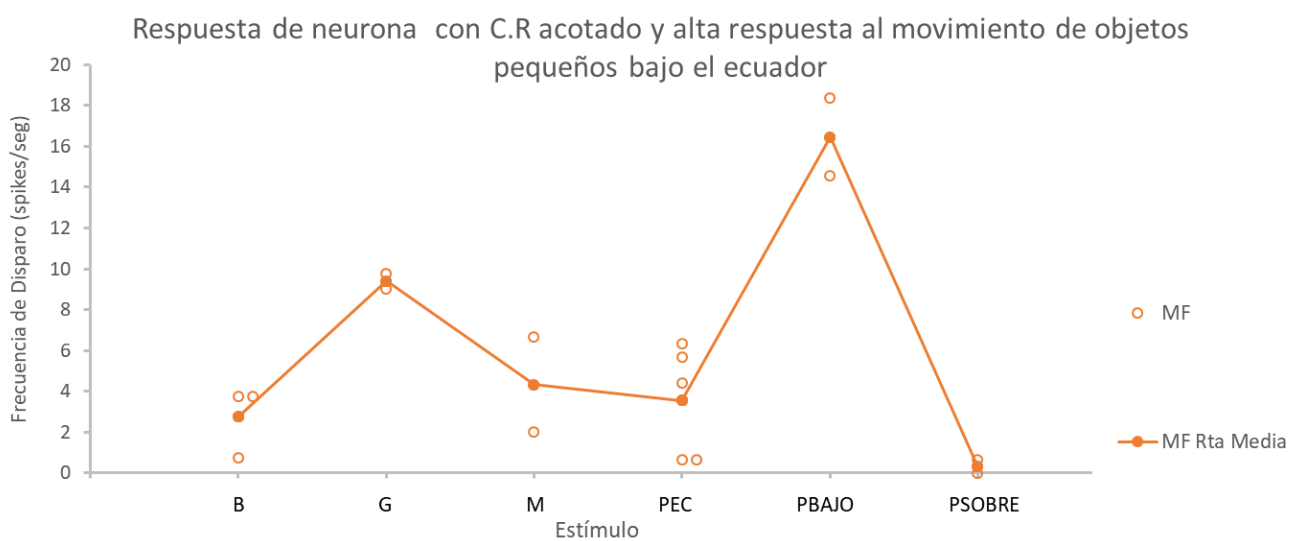


Figura 58 – Frecuencia de disparo evocada por cada estímulo. Referencias igual que para la **Figura 52**.

11 Neuronas no identificadas con respuestas Inhibitorias.

Durante la búsqueda de neuronas que respondan preferencialmente a objetos pequeños se han registrado en más de una oportunidad neuronas con respuestas inhibitorias ante el movimiento de objetos en ambas direcciones, es decir sin preferencia de dirección. Tales neuronas presentan diferencias interesantes en su respuesta frente a estímulos de distinto tamaño. En esta sección evaluaremos las respuestas de dos subtipos de neuronas con respuestas inhibitorias.

11.1 Descripción de la Muestra

Se registraron 18 neuronas de interés en 18 animales distintos. Todas estas neuronas presentan respuestas inhibitorias en todos o en varios de los estímulos y estas inhibiciones no están relacionadas con el sentido del movimiento del estímulo, sino con su tamaño. Si bien no se ha tenido éxito en los intentos de tinciones, debido al entorno celular de las neuronas registradas (registros de neuronas identificadas inmediatamente antes o después), probablemente se trate de neuronas presentes en la lóbula, la baja frecuencia de su aparición podría ser un indicio de que no se trata de neuronas gigantes.

Estas neuronas fueron clasificadas tentativamente en dos grupos en base a las características que se describen a continuación.

Grupo 1: Se trata de una muestra de 5 neuronas. Una de estas neuronas presentó respuestas inhibitorias frente a estímulos solamente en el monitor derecho, mientras que las otras 4 presentaron inhibiciones frente a estímulos solamente en el monitor frontal. Por razones que ya se mencionaron en la sección de las neuronas LG, no todos los tratamientos tienen el mismo n. En la **TABLA 36** se informa el n por tratamiento.

ESTIMULO	n por tratamiento
B	6
G	5
M	4
PBAJO	3
PEC	5
PSOBRE	5

Tabla 36 - Cantidad de neuronas del Grupo 1 por tratamiento en el monitor donde se evocaron respuestas inhibitorias.

- **Características del Grupo 1:**

- Las mayores inhibiciones fueron evocadas por los estímulos grandes o medianos.
- La inhibición se presentó frente a estímulos en un solo monitor. En los demás monitores no hubo respuestas.
- Alta frecuencia espontanea.

Grupo 2: Se trata de una muestra de 13 neuronas. 2 Neuronas presentaron su inhibición máxima en el monitor derecho y 11 neuronas presentaron su máxima inhibición en el monitor frontal. Por razones que ya se mencionaron en la sección de las neuronas LG, no todos los tratamientos tienen el mismo n. En la **TABLA 37** se informa el n por tratamiento.

ESTIMULO	n por tratamiento
B	11
G	10
M	10
PBAJO	9
PEC	13
PSOBRE	10

Tabla 37 – Cantidad de neuronas del Grupo 2 por tratamiento en el monitor donde se evocó la máxima inhibición.

- **Características del Grupo 2:**

- 11 de estas neuronas presentaron respuestas inhibitorias frente a estímulos pequeños y respuestas excitatorias frente a estímulos grandes.
- 2 estas neuronas presentaron respuestas inhibitorias frente a todos los estímulos, siendo mayores las inhibiciones frente a objetos pequeños.
- Campo receptivo amplio, inhibición en todos los monitores.

11.2 Perfil de Rta. De las neuronas del Grupo 1 en el monitor donde hubo respuestas inhibitorias

En la **FIGURA 59** se presenta, a modo de ejemplo, registros de respuestas de una neurona del Grupo1 a los estímulo barra y cuadrado pequeño en el ecuador.

Como se trata de un número reducido de neuronas hicimos una descripción de los datos sin evaluar la significancia estadística. Para esta descripción se tomó solamente al monitor donde se presentaron las respuestas inhibitorias (1 neurona en el monitor

derecho y 4 en el frontal). Para calcular la tasa de disparo se contaron los potenciales de acción (P.A.) durante el paso del estímulo y se restaron los P.A. espontáneos previos al paso del estímulo (contados durante el tiempo equivalente al paso del estímulo). En el gráfico de la FIGURA 60 se muestran los perfiles de cada neurona del Grupo1 y en la FIGURA 61 se observa el perfil de la respuesta promedio de las neuronas del Grupo 1.

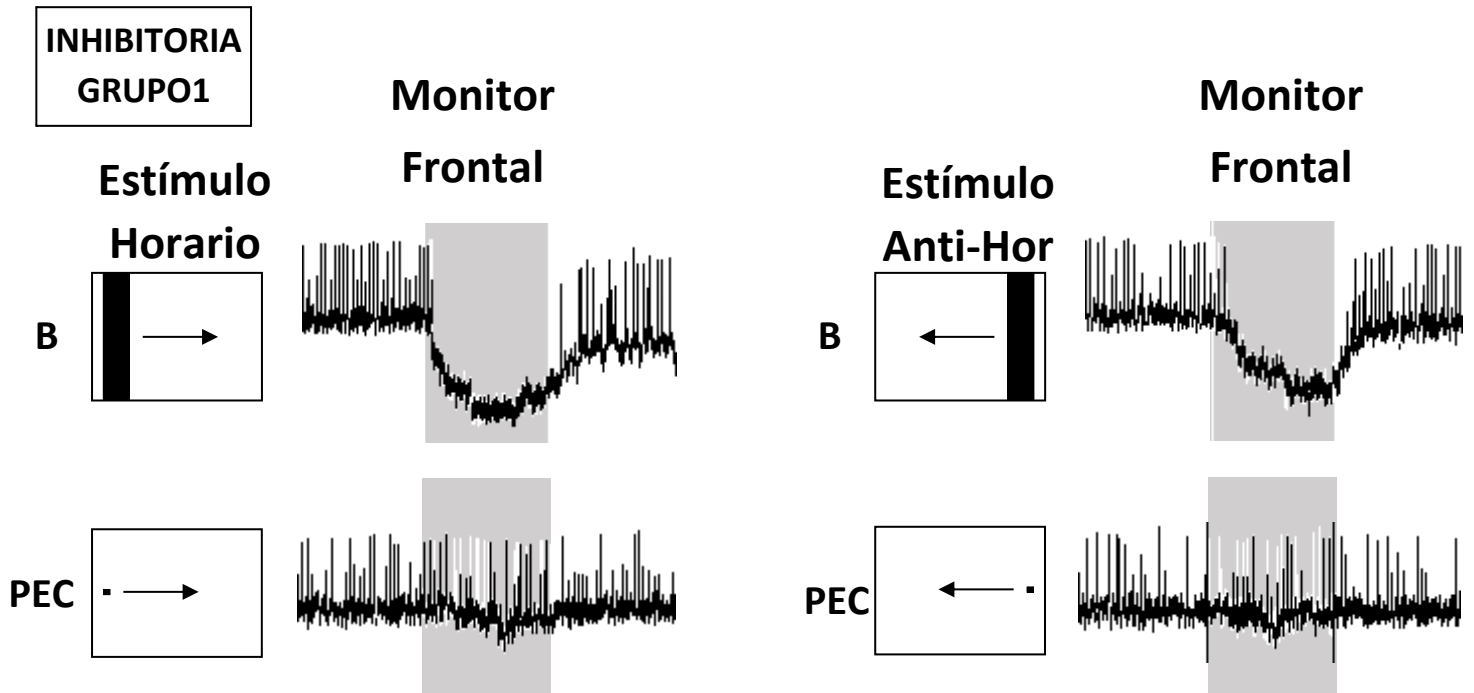


Figura 59 – Registro de una neurona de respuesta inhibitoria del Grupo 1. En todas las neuronas con respuestas inhibitorias se evaluó la respuesta de al menos dos estímulos en ambos sentidos para descartar de que se trate de neuronas direccionales. Duración del movimiento: B = 1,33 seg; PEC = 1,58 seg.

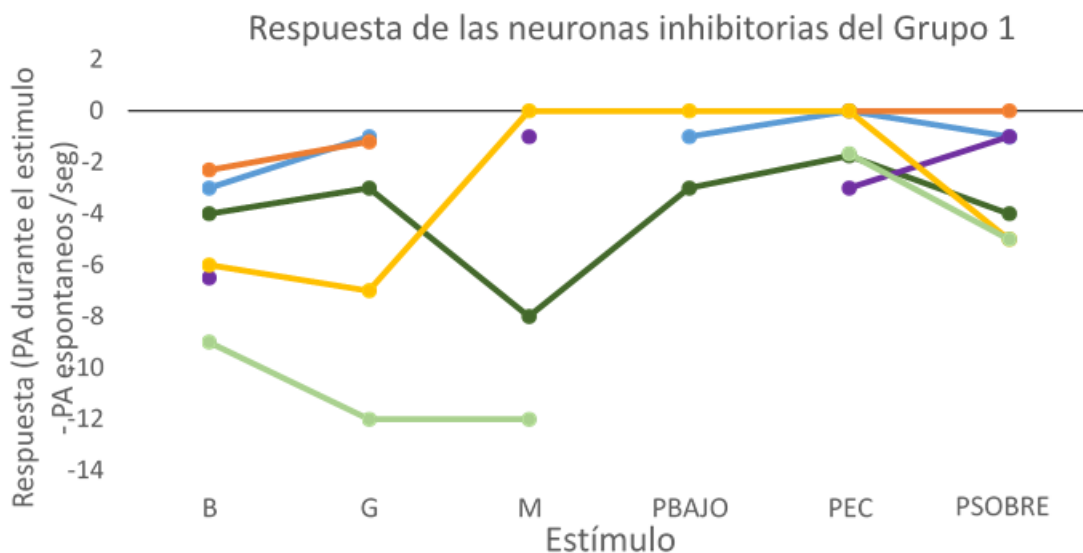


Figura 60 – Respuesta evocada por cada estímulo en cada una de las 6 neuronas inhibitorias del grupo 2. El gráfico se confecciono utilizando los datos registrados en el monitor donde cada neurona presentó respuestas inhibitorias. Cada punto equivale a la frecuencia de disparo (spikes/seg.) durante el paso del estímulo menos la frecuencia espontanea calculada previo al paso de cada estímulo. Cada línea de color corresponde a una neurona diferente.

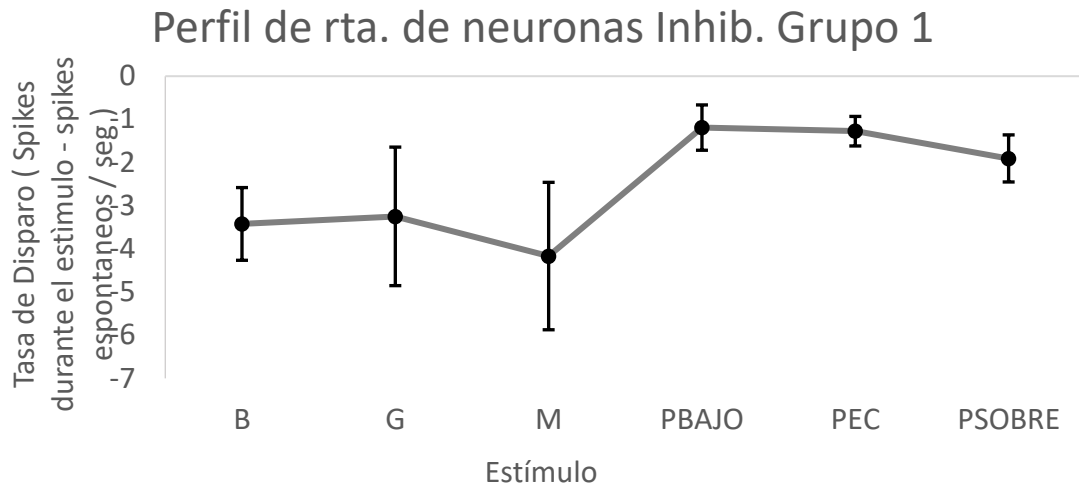


Figura 61 – Tasa de disparo de las neuronas del Grupo 1 en el monitor donde se obtuvieron respuestas inhibitorias. Cada vértice representa la tasa de disparo media +/- SEM. El n por tratamiento se informa en la **Tabla 36**.

11.3 Perfil de Rta. de las neuronas del Grupo 2 en el monitor donde se dio la máxima inhibición

En la **FIGURA 62** se presenta un ejemplo de una neurona del Grupo 2.

Se estudió el perfil de respuesta de estas neuronas tomando solamente al monitor donde se presentaron las mayores inhibiciones. Para calcular la tasa de disparo se contaron los potenciales de acción (P.A.) durante el paso del estímulo, se restaron los P.A. espontáneos previos al paso del estímulo (contados durante el tiempo equivalente al paso del estímulo). En el gráfico de la **FIGURA 63** se muestra el perfil de respuesta de cada neurona y en la **FIGURA 64** se observa el perfil de la respuesta promedio de las neuronas del Grupo 2.

**INHIBITORIA
GRUPO 2**

**Monitor
Derecho**

**Monitor
Derecho**

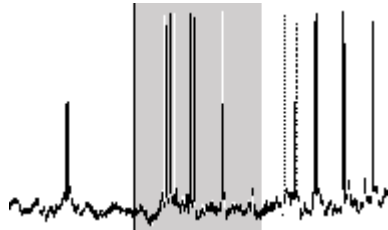
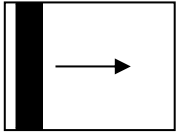
Estímulo

Estímulo

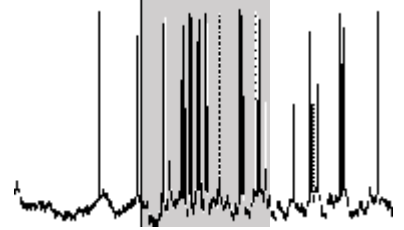
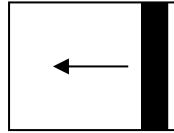
Horario

Anti-Hor

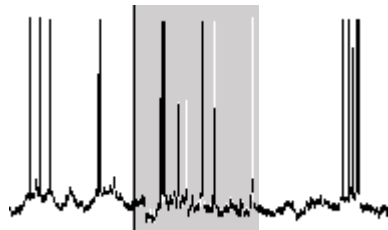
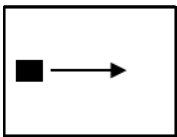
B



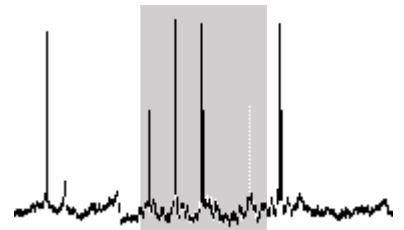
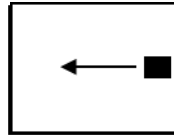
B



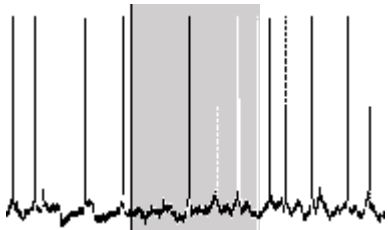
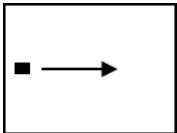
G



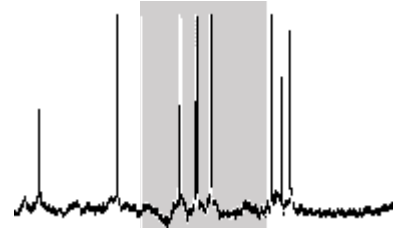
G



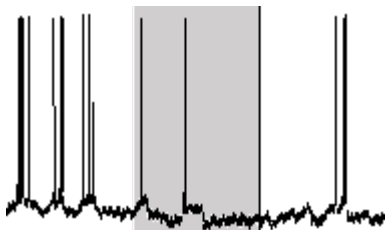
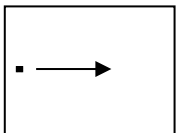
M



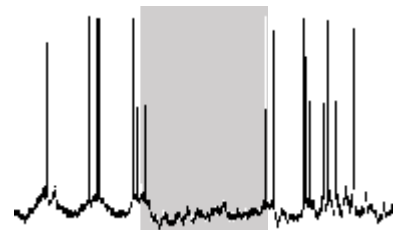
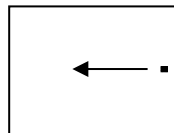
M



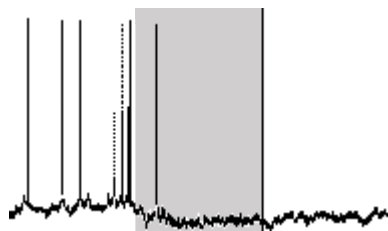
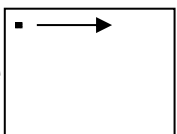
PEC



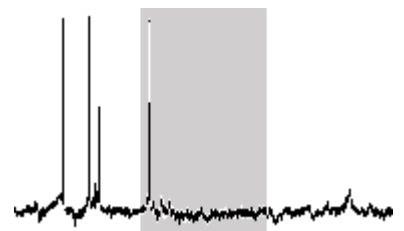
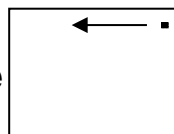
PEC



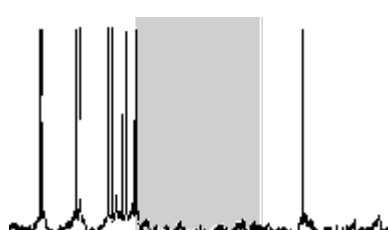
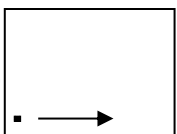
PSobre



PSobre



PBajo



PBajo

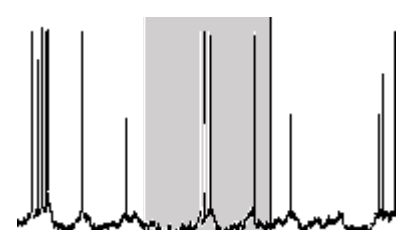
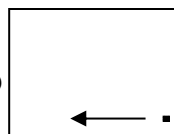


Figura 62 – Registro de una neurona inhibitoria del Grupo 2. En todas las neuronas inhibitorias se evaluó la respuesta de al menos dos estímulos en ambos sentidos para descartar de que se trate de neuronas direccionales.
Duración del movimiento: B y G = 1,33 seg; M = 1,50 seg; PEC, PSobre y PBajo = 1,58 seg.

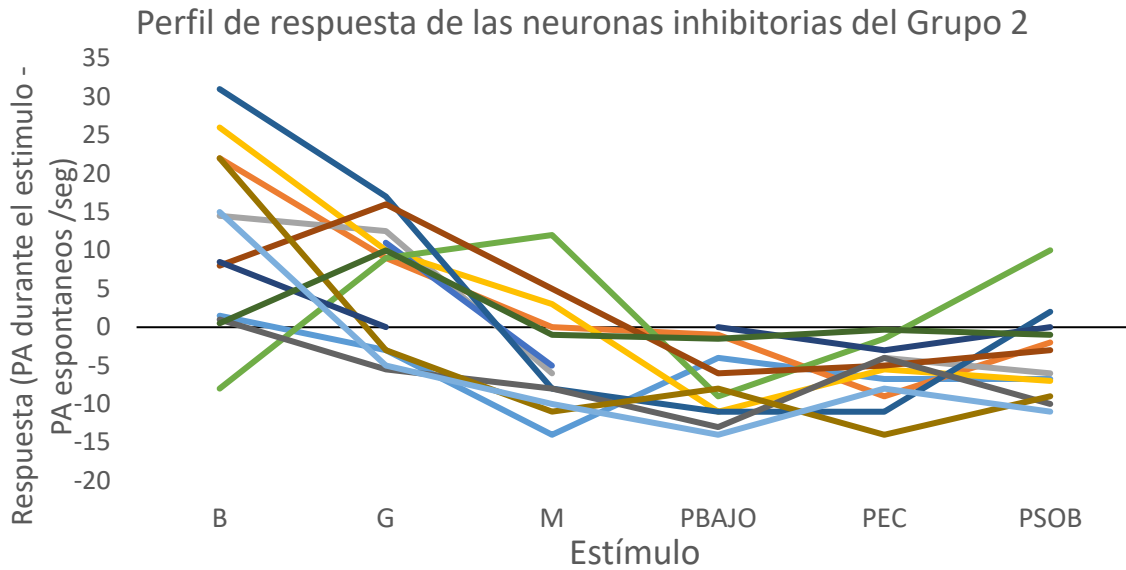


Figura 63 – Respuesta evocada por cada estímulo en cada una de las 13 neuronas inhibitorias del grupo 2. El gráfico se confecciono utilizando los datos registrados en el monitor donde cada neurona presentó respuestas inhibitorias. Cada punto equivale a la frecuencia de disparo (spikes/seg.) durante el paso del estímulo menos la frecuencia espontanea calculada previo al paso de cada estímulo. Cada línea de color corresponde a una neurona diferente.

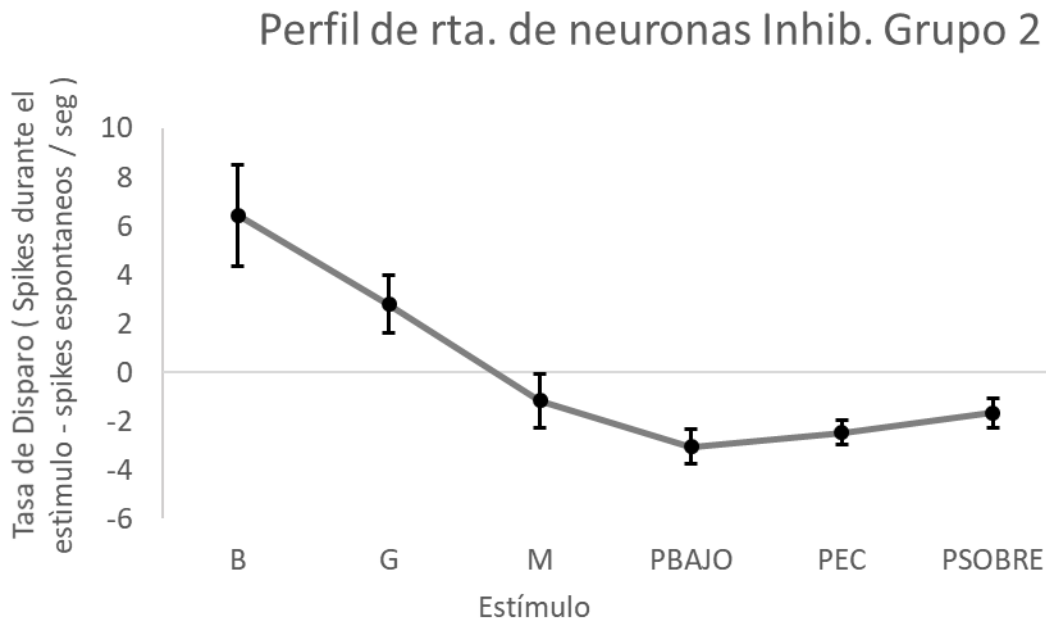


Figura 64 – Respuesta media de las neuronas del Grupo 2 en el monitor donde se evocaron respuestas inhibitorias. Cada vértice representa la tasa de disparo media +/- SEM. El n por tratamiento se informa en la **Tabla 37**.

11.4 Análisis estadístico de los datos de las neuronas del grupo 2

Para evaluar las diferencias estadísticas en la tasa de disparo evocada por cada estímulo en el monitor donde se registró la máxima respuesta inhibitoria se aplicó un modelo lineal mixto generalizado mediante la función “gls” del paquete “nlme” (Pinheiro y Bates, 2000) del programa R. El modelo tiene en cuenta a la neurona como factor

aleatorio, es decir, tiene en cuenta la falta de independencia entre las respuestas medidas en una misma neurona frente a diferentes estímulos. Los supuestos del modelo fueron puestos a prueba mediante un análisis de residuos.

Características del Modelo de Tasa de disparo

- Variable respuesta: Tasa de disparo (Hz)
- Distribución de probabilidad de la población de datos: Gaussiana.
- Factor aleatorio: ID de la neurona.
- Variable explicativa: Tipo de estímulo. Consta de 6 niveles: Barra (B), Cuadrado grande (G), Cuadrado mediano (M), Cuadrado pequeño en el ecuador (PEC), cuadrado pequeño sobre el ecuador (PSOBRE) y cuadrado pequeño bajo el ecuador (PBAJO).
- Función link del modelo: Identidad

El análisis de la varianza indicó que existen diferencias significativas entre las respuestas evocada por los distintos estímulos ($p < 0.0001$). Para evaluar si las respuestas fueron excitatorias se realizó un test de Bonferroni con la hipótesis nula de que la media fue menor a cero y para evaluar cuales respuestas fueron inhibitorias se realizó un segundo test de Bonferroni con la hipótesis nula de que la media fue mayor a cero. En la

FIGURA 65 se muestra la respuesta media predicha por el modelo para cada tipo de estímulo, los asteriscos rojos indican que la media fue significativamente mayor a 0, los asteriscos azules indican que la media fue significativamente menor a cero.

En resumen, la barra provocó una respuesta excitatoria (un aumento en la tasa de disparo), mientras que los 3 estímulos pequeños evocaron respuestas inhibitorias (una disminución en la tasa de disparo). El cuadrado grande y el mediano no evocan respuestas significativas.

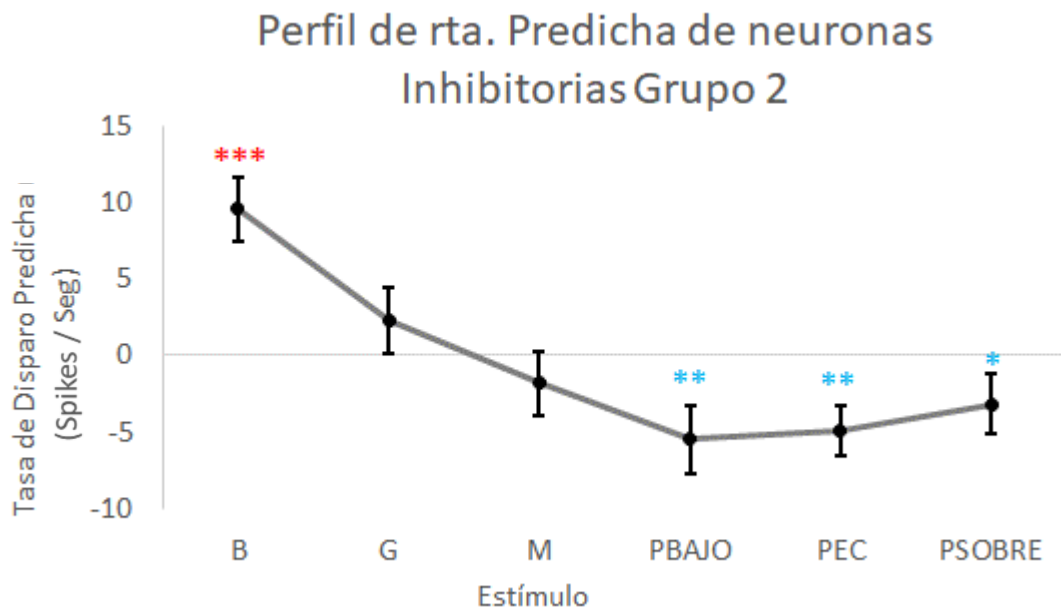


Figura 65 – Análisis estadístico del perfil de respuesta de las neuronas del Grupo 2 en el monitor donde se evocaron las mayores respuestas inhibitorias. Cada vértice representa al estimador del modelo +/- SEM. los asteriscos rojos indican que la media es significativamente mayor a 0, los asteriscos azules indican que la media fue significativamente menor a cero. Se realizó un test de Bonferroni para evaluar si las medias fueron significativamente mayores a cero y un segundo test de Bonferroni para evaluar si las medias fueron menores a cero, ambos test con correcciones para 6 estimadores. El n por tratamiento se informa en la **Tabla 37**.

*** p valor < 0.0001; ** p valor < 0.01; * p valor < 0.05

Recapitulando, en las neuronas del Grupo 1 las respuestas inhibitorias son evocadas por los estímulos grandes y medianos, los estímulos pequeños no evocaron respuestas o evocaron respuestas inhibitorias muy débiles. En las neuronas del Grupo 2 las respuestas inhibitorias son evocadas por los estímulos pequeños, mientras que la barra evoca respuestas excitatorias. En estas neuronas el cuadrado grande y mediano no provocaron respuestas significativas.

SECCIÓN 4: CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN



Sensibilidad de las neuronas LG al tamaño y elevación de objetos en movimiento

Hemos logrado el objetivo de evaluar la respuesta de las 4 clases de neuronas LGs previamente descritas por Medan y col. (2007) y de las LCDC recientemente descritas por Scarano y col. (2020) frente a estímulos de distinto tamaño y elevación, a la vez que también exploramos las respuestas a estos estímulos de neuronas no identificadas previamente.

En el caso de las neuronas del tipo MLG1, que tienen un CR acotado, la sensibilidad al tamaño de cada objeto se estudió en el monitor donde se situaba el CR y en el caso en el que la neurona tuviera su CR abarcando parte de dos monitores, se estudió la respuesta en el monitor donde cada neurona mostró su máxima respuesta. En cambio, las MLG2, BLG1 y BLG2 son neuronas de CR amplio capaces de responder fuertemente al movimiento en cualquiera de los monitores (Izquierdo, derecho o frontal). Por esta razón, en cada uno de estos tipos neuronales agrupamos las respuestas para el monitor donde se obtuvieron las máximas respuestas, para el monitor donde se obtuvieron respuestas intermedias y para el monitor donde se obtuvieron las respuestas más bajas, cabe aclarar que para cada tipo neuronal no todas las neuronas obtuvieron la respuesta máxima en el mismo monitor. Esta manera de agrupar las respuestas en 3 sectores del CR nos permitió investigar la posibilidad de que existieran diferencias en cuanto al perfil de respuesta de cada tipo de neurona según se tratara de áreas centrales del CR (zonas de máxima respuesta) y zonas más periféricas. Lo que observamos en las 4 clases de neuronas LG es que el perfil de respuesta mayormente se conservaba a lo largo de sus CR.

Al comparar las respuestas de los distintos tipos de LG frente al repertorio de estímulos, vemos que en general los estímulos más grandes evocan las respuestas más intensas. El caso de las MLG1 resulta una excepción interesante, estas neuronas responden más al cuadrado grande que a una barra del mismo ancho (esto se discutirá más adelante).

Como ya se mencionó en la sección de introducción, en ambientes planos como las marismas que habita *Neohelice*, la posición en elevación de un objeto en la retina del cangrejo aporta información sobre el significado del estímulo. Los objetos pequeños que

se mueven a nivel o por debajo del horizonte visual suelen no provocar respuestas o evocar respuestas de persecución, mientras que los objetos pequeños elevados sobre el horizonte evocan escapes (Tomsic et al., 2017). Por esta razón es de importancia evaluar la respuesta evocada por el movimiento del objeto pequeño a distintas alturas del campo visual. Las neuronas MLG1 no presentaron diferencias en sus respuestas al movimiento de objetos pequeños que se movían en el horizonte y los que se movían elevados sobre el horizonte, mientras que el objeto que se movía debajo del horizonte no generó respuestas o generó respuestas muy bajas. La falta de respuesta de las neuronas a este último estímulo coincide con la falta de respuesta comportamental que suele mostrar el animal frente a ese tipo de estímulo, aunque también puede deberse a que en nuestro diseño experimental este estímulo se movía al límite del CR de este tipo de neuronas. Como se ha mencionado en la sección introducción, las neuronas de tipo MLG1 forman un arreglo de 16 unidades, cada una con un CR que en el plano horizontal abarca aproximadamente 120° y que con un importante grado de solapamiento en conjunto mapean los casi 360° del campo visual. En el plano vertical el centro de sus campos receptivos se ubica un poco por encima del horizonte, en promedio a una elevación de $5.37^\circ \pm 21.21^\circ$ (Medan et al., 2015), coincidiendo con la banda de máxima resolución vertical descrita en el ojo del cangrejo (Berón de Astrada et al., 2012).

Las neuronas de tipo MLG2, BLG1 y BLG2 tienen respuestas más intensas frente al objeto pequeño sobre el ecuador en comparación con los objetos pequeños que se desplazan a la altura del ecuador y por debajo, además estos tres tipos neuronales son sensibles a estímulos mecanosensoriales en el cuerpo y las patas del animal (Medan et al., 2007). En una posible asociación con esto, resultados recientes de nuestro laboratorio muestran que la respuesta de las neuronas MLG2 y BLG2 a los estímulos visuales es considerablemente más intensa cuando el animal se encuentra caminando que cuando no lo hace (Alejandro Cámara, comunicación personal), lo que indica que son moduladas por la actividad locomotora.

La variedad de las respuestas de escape en el reino animal se refleja en la organización de los circuitos neuronales que subyacen a estos comportamientos. Ante señales de peligro inminente, como las ondas de choque generadas en el agua por el ataque abrupto de un predador que son detectadas a través de mecanosensores, se pueden

desencadenar respuestas extremadamente rápidas y altamente estereotipadas a partir de un solo spike en una neurona comando, por ejemplo, la neurona gigante lateral de crayfish (Edwards et al., 1999) y la célula de Mauthner de los peces (Korn & Faber, 2005). Por otro lado, la visión permite la detección de señales de peligro a distancia, consintiendo mayores tiempos de procesamiento de la información, evaluación, toma de decisión e implementación de la estrategia de evitación. En estos casos, trenes de spikes evocados en conjuntos de neuronas se integran no solo para desencadenar, sino también para dirigir escapes flexibles y regulados (Oliva & Tomsic, 2014, 2016; Santer et al., 2006; Wu et al., 2005). En consecuencia, las respuestas conductuales provocadas por estímulos de peligro visual rara vez comienzan antes de los 100 ms después del inicio del estímulo y, por lo general, su ejecución conlleva tiempo (Preuss et al., 2006). Los cangrejos deben extraer la información visual que les permite distinguir si un objeto en movimiento es una posible presa, un conoespecífico o un depredador peligroso. Además de la forma y el tamaño, la evaluación visual requiere información sobre la dirección y velocidad del movimiento y donde ocurrió con respecto al observador, entre otras características. No es plausible que toda esta información se procese en una sola neurona, ni es probable que el sistema contenga un número ilimitado de neuronas, cada una sintonizada específicamente con un estímulo único. Una forma más parsimoniosa de clasificar el estímulo y traducir la información en respuestas motoras adaptativas sería usar conjuntos de neuronas con diferentes sensibilidades de características, que a través de distintas combinaciones de su activación relativa puedan desencadenar programas motores separados (Ewert, 1987; 1997).

En base a un extenso conjunto de evidencias se ha propuesto que las LG forman parte de un microcircuito de grandes neuronas que opera en la identificación del estímulo, el peligro asociado al mismo, su ubicación en el espacio y la organización de la respuesta comportamental (Tomsic, 2016). Los resultados de esta Tesis muestran que la diferencias en las respuestas de las LG a estímulos de distintos tamaños y elevaciones reflejan con precisión (y por lo tanto permiten predecir), las diferencias de respuesta comportamental a esos estímulos, confirmando la importancia de la participación de estas neuronas en la respuesta de escape a estímulos visuales.

Respuesta comportamental del cangrejo *Neohelice granulata* frente a estímulos de distintos tamaños y elevación

En los experimentos de Gancedo y colaboradores (2020), donde se expuso a *N. granulata* a objetos en movimiento dentro de una arena artificial, se evaluó la respuesta comportamental evocada por objetos de 3 tamaños distintos (esferas de plástico negro de tres diámetros diferentes: pequeña: 1 cm, mediana: 1,8 cm y grande: 3 cm) desplazándose por el suelo a diferentes velocidades. Cuando se enfrentaron al objeto grande, los cangrejos en su mayoría realizaron maniobras de escape. En las pocas ocasiones en las que se observó una respuesta predatoria frente al estímulo grande, el cangrejo se encontraba bastante alejado de dicho estímulo, la persecución inicial se detuvo tempranamente y en ningún caso un cangrejo realizó una captura. Desde la perspectiva del cangrejo, a medida que se acercaba al objeto, la parte superior se elevaba sobre el horizonte. Por lo tanto, el cambio de comportamiento que se produjo durante la aproximación hacia el objeto grande probablemente se debió al cambio aparente en la elevación del estímulo. El objeto más efectivo para evocar persecuciones fue la esfera de tamaño mediano (Gancedo et al. 2020).

En el presente trabajo de Tesis se utilizó un dispositivo de locomoción simulada o treadmill, como se describe en la sección de materiales y métodos, que permite medir la actividad locomotora del animal mientras se lo expone a estímulos visuales. De acuerdo a los antecedentes ya descritos, esperábamos que los estímulos grandes o elevados evocaran respuestas de evitación, mientras que el estímulo pequeño moviéndose sobre el ecuador provocara respuestas de aproximación. A pesar de que el cuadrado pequeño tiene un tamaño similar a la esfera mediana de los experimentos de Gancedo y de que la velocidad de desplazamiento de los cuadrados estuvo en el rango de velocidades en el que se observaron persecuciones de las esferas, en los ensayos de esta Tesis no se observaron intentos de aproximación hacia los estímulos. Las respuestas que se registraron se trataron de escapes de diversas intensidades (diferencia en velocidades) y algunas respuestas de freezing.

Se sabe que la respuesta comportamental de *N. granulata* se ve afectada por el contexto. En experimentos realizados en el treadmill los cangrejos siempre huyen en dirección opuesta al estímulo, mientras que en experimentos de campo los animales son capaces

de correr en dirección al estímulo si su cueva se encuentra en dicha dirección y además los umbrales de respuesta para el escape son significativamente mayores en el laboratorio que en experimentos de campo (Hemmi & Tomsic, 2012). De la misma manera, es esperable encontrar diferencias entre los experimentos de laboratorio llevados a cabo en la arena artificial y en el treadmill. En la arena los cangrejos se mueven libremente dentro de una caja de 65 cm de largo por 45 cm de ancho y 55 cm de alto con un sustrato de barro y arena recolectado en el hábitat natural de estos animales. Por el contrario, en el treadmill los animales están sujetos por un vástago pegado en su parte dorsal que los mantiene fijos sobre la esfera de telgopor, que flota en aire y rota en el lugar como resultado de los movimientos de sus patas. Otra diferencia importante es que el treadmill es un sistema de loop abierto (la posición relativa del estímulo es independiente de los movimientos del animal). Si bien la respuesta predatoria de *Neohelice* es robusta en la arena experimental, no logramos reproducirla en las condiciones del treadmill. Resultados recientes revelaron que la abstinencia de alimento por una semana o más aumenta notablemente la probabilidad de evocar la respuesta de persecución y captura en la arena experimental (Salido y Gancedo, comunicación personal). Futuros experimentos con animales no alimentados permitirán evaluar si el estado de abstinencia favorece la persecución de objetos pequeños en el treadmill.

En definitiva, en las presentes condiciones experimentales las respuestas comportamentales observadas en el treadmill fueron todas de alejamiento del estímulo, es decir, respuestas evasivas. Es de destacar, sin embargo, que la velocidad máxima alcanzada por los cangrejos fue diferente frente a estímulos de distinto tamaño. Las mayores velocidades fueron evocadas por la barra y el cuadrado grande (el promedio de los picos máximos fue de 7.98 cm/s y 7.47 cm/s respectivamente). El cuadrado mediano generó velocidades menores a los estímulos grandes (promedio de 5.13 cm/s). El cuadrado pequeño sobre el ecuador evocó velocidades aún menores (promedio de 3.95 cm/s). Por último, el cuadrado pequeño en el ecuador no generó una respuesta de escape ya que la velocidad máxima no fue significativamente diferente de la velocidad máxima alcanzada durante la exploración.

Como no es posible hacer registros intracelulares mientras el animal se mueve en el treadmill, para poder inferir la influencia de cada tipo de LG sobre la respuesta comportamental hemos comparado la respuesta predicha por los modelos estadísticos de cada tipo de neurona para cada estímulo con el modelo que predice la velocidad máxima evocada por cada estímulo. En estudios pasados se ha tenido un enfoque similar para comparar la velocidad de escape con la dinámica de expansión de estímulos de looming y los cambios en la tasa de disparo de las distintas LG (Oliva & Tomsic, 2014, 2016).

A continuación, discutiremos en detalle las características de la respuesta de cada LG a los estímulos de distinto tamaño comparando su actividad con la respuesta de los animales.

Respuestas fisiológicas de las LG y su influencia en el comportamiento

La actividad de las MLG2 es un buen predictor de la máxima velocidad evocada por cada estímulo

Las neuronas del tipo MLG2 respondieron marcadamente al cuadrado grande y a la barra grande, sin diferencias entre las respuestas a ambos estímulos. La respuesta al cuadrado mediano y al cuadrado pequeño en el ecuador fueron un 55% y un 74% menores, respectivamente, respecto al cuadrado grande. En cuanto a las diferentes elevaciones de los cuadrados pequeños, las MLG2 responden de manera más intensa al cuadrado pequeño sobre el ecuador, la respuesta a este estímulo es igual a la respuesta al cuadrado mediano (**FIGURA 66 – PANEL IZQUIERDO**).

Se ha visto que las neuronas de tipo MLG2 codifican fielmente la velocidad angular de los bordes que se expanden de los estímulos de tipo looming, y que ese parámetro se correlaciona ajustadamente con la velocidad del escape, por lo que se ha propuesto que este tipo de neurona transmite la información que el cangrejo utiliza para ajustar continuamente su velocidad de escape a objetos que se aproximan (Oliva & Tomsic, 2016). Al comparar la velocidad máxima evocada por estímulos traslacionales (que representan objetos que se mueven tangencialmente al animal) de distintos tamaños y

elevaciones, vemos que la tasa de disparo de las neuronas de tipo MLG2 correlaciona muy bien con la velocidad máxima evocado por cada estímulo (**FIGURA 66 – PANEL DERECHO**). Por lo tanto, podemos concluir que la actividad de las neuronas MLG2 refleja ajustadamente la velocidad de escape también frente a estímulos traslacionales.

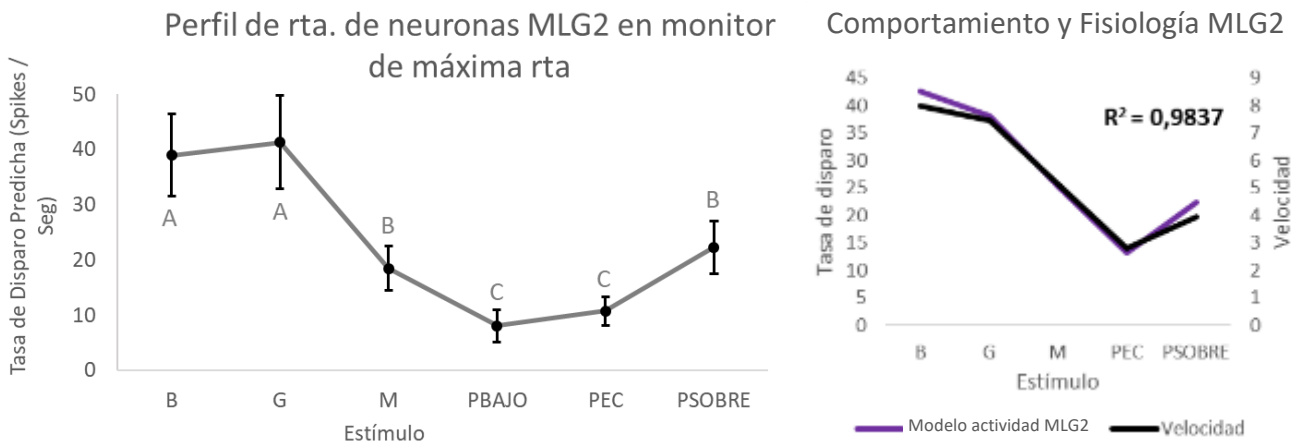


Figura 66 - Panel Izquierdo: perfil modelado de respuestas de las neuronas MLG2 frente a estímulos de distinto tamaño y elevación. **Panel Derecho:** perfil modelado de respuestas de las neuronas MLG2 en el monitor derecho, y velocidad máxima de los animales evocada por cada estímulo en dicho monitor.

El promedio de la tasa de disparo de todos los tipos de LG mejora muy levemente el ajuste al comportamiento que proporcionan las MLG2. De modo tal que las MLG2 por si solas permiten explicar el componente de velocidad que los animales desarrollan ante los distintos estímulos. Como se discute más abajo, aun cuando la actividad de los otros tipos de LG también muestran un buen ajuste al comportamiento, los valores de la correlación entre ambos tipos de respuesta fueron inferiores a los de la MLG2.

Las MLG1 presentan algunas propiedades similares a las neuronas hipercomplejas

En sus estudios clásicos de la corteza visual en gatos, Hubel y Wiesel (Hubel & Wiesel, 1959, 1962) describieron tres clases de neuronas con preferencia a la orientación y dirección de movimiento de barras: células simples, células complejas y células hipercomplejas, los tres tipos difieren en las propiedades de sus CR. La característica fundamental de las células hipercomplejas es una disminución de su respuesta cuando la longitud de la línea o barra que la estimula aumenta por encima de un límite. Investigaciones posteriores demostraron que la característica de atenuar su respuesta a las barras que superan cierta longitud no está exclusivamente asociada a células que presentan características complejas sino también a células simples y se denominó

células de parada final (end-stopped cells) a las neuronas que comparten esta propiedad (Hubel, 1982). El mecanismo clásico propuesto para la parada final consiste en un CR complejo, con un centro excitatorio y áreas inhibitorias terminales.

Se han encontrado interneuronas visuales con propiedades de parada final en la lóbula de varias especies de insectos (Nordström & O'Carroll, 2009). Las células detectoras de movimiento de objetos pequeños descriptas en sírfidos y en libélulas tienen propiedades de parada final. Estas neuronas se destacan por sus respuestas altamente selectivas a objetos pequeños en movimiento (que ocupan $< 3^\circ$ del campo visual), mientras que no responden o se inhiben frente a barras grandes (que ocupan $> 10^\circ$ del campo visual) y a estímulos panorámicos (patrones de barras en movimiento que ocupan todo el campo visual). En ambas especies se han encontrado diferentes tipos de neuronas detectoras de targets pequeños, algunas presentan direccionalidad, otras no, algunas tienen CR amplio y otras CR pequeño.

En *Drosophila* se ha encontrado un tipo de neurona columnar de la lóbula, la LC11, que también presenta parada final. Este tipo de neurona responde marcadamente a objetos de $30^\circ \times 8.8^\circ$, presenta respuestas débiles frente a barras ($30^\circ \times 70^\circ$) y no responde al movimiento del panorama visual. Se ha demostrado que la selectividad al tamaño se pierde en este tipo neuronal cuando se bloquea la inhibición GABAérgica mediante picrotoxina, aumentando la respuesta frente a barras y frente al panorama y además disminuyendo la respuesta frente a objetos de tamaño menores (Keleş & Frye, 2017).

Como ya se mencionó, encontramos que las neuronas de tipo MLG1 responden de manera más intensa al cuadrado grande que a una barra alta del mismo ancho. El perfil de respuesta de las MLG1 del cangrejo frente a objetos de distinto tamaño (**FIGURA 67 – PANEL IZQUIERDO**) aporta la primera evidencia de propiedades hipercomplejas o de parada final en un artrópodo no insecto. Esto nos lleva a preguntarnos si esta propiedad es ubicua en artrópodos. A pesar de que los artrópodos están equipados con ojos de baja resolución y cerebros pequeños, hemos mencionado varios ejemplos de neuronas visuales de la lóbula que demuestran propiedades sofisticadas e incluso similares a las presentes en las neuronas corticales de vertebrados. El procesamiento de la información visual para detectar un estímulo, asignarle valor (apetitivo o aversivo) y comandar la respuesta comportamental adecuada requiere extraer información sobre el movimiento

de los objetos. Estas tareas resultan relevantes para todos los animales móviles, con lo cual es esperable hallar elementos con CR complejos en los circuitos visuales que posibilitan la detección del movimiento en cualquier animal capaz de realizar escapes y persecuciones.

Una característica conocida de las neuronas MLG1 es que frente a un estímulo en expansión (looming) esta neurona se despolariza y su tasa de disparo aumenta a medida que el estímulo se expande hasta que llegar a un pico de actividad (cuando la figura alcanza 35°) y luego la tasa de disparo decae antes de que el estímulo llegue a su tamaño final (Oliva & Tomsic, 2014). Las neuronas MLG2 de *N. granulata* también responden marcadamente al looming, pero a diferencia de las MLG1 su tasa de disparo no decae durante la expansión (Oliva & Tomsic, 2014). El perfil de respuesta frente a estímulos de distinto tamaño demuestra que las MLG2 responden por igual al cuadrado grande y a la barra, mientras que el movimiento de objetos más pequeños evoca respuestas menores. El hecho de que las MLG1 alcancen su tasa de disparo máxima cuando la expansión del objeto alcanza 35°, es decir, antes de que alcance su máxima expansión, es coincidente con las propiedades hipercomplejas de su CR.

En otros animales también se han encontrado neuronas que responden marcadamente a estímulos en expansión, llamadas detectoras de colisiones. Han sido descritas en numerosos taxa, por ejemplo, en langostas (Fotowat & Gabbiani, 2007), *Drosophila* (de Vries & Clandinin, 2012; von Reyn et al., 2014), sírfidos (Nicholas et al., 2020), mantis (Yamawaki & Toh, 2009) y también vertebrados (Aves: Sun & Frost, 1998; Mamíferos: Liu et al., 2011; Ranas: Nakagawa & Hongjian, 2010). A diferencia de las MLG1, la mayoría de las neuronas detectoras de colisiones no responden o tienen respuestas débiles frente a estímulos traslacionales. En el caso de las LGMD de langostas, se sabe que responden de manera menos intensa a los estímulos traslacionales que a los estímulos en expansión. También se ha visto que responden más a barras que a cuadrados (5° x 80° y 10° x 10° respectivamente) (Peron et al., 2009), lo que sugiere que estas neuronas no presentarían propiedades de parada final. Sin embargo, las neuronas detectoras de loomings descritas en sírfidos presentan una selectividad de tamaño bimodal, con un pico de respuesta a las barras de unos pocos grados de altura, similar al ajuste de tamaño de las neuronas TSDN o *target-selective descending neurons*

(alrededor de los 6°), seguido por una caída en respuesta a barras más grandes, y luego una mayor respuesta a barras cuyo largo se acerca a los límites del campo visual (Nicholas et al., 2020). En el cangrejo, las MLG1 forman un ensamble retinotópico que mapea todo el campo visual (Medan et al. 2015), de modo tal que es posible que los mecanismos asociados a la complejidad de sus CR sean diferentes a los de las neuronas detectoras de looming de sírfidos. Sin embargo, es notable la complejidad del CR de ambos tipos de neuronas lobulares capaces de responder tanto al looming como a objetos con movimiento traslacionales.

Se ha propuesto que las MLG1 intervienen en la respuesta de escape de los animales frente a estímulos de looming cumpliendo una doble función. Por un lado, codificando la velocidad de expansión del objeto mientras esta no supera los 35° y, por otro lado, que a través del arreglo de las 16 neuronas MLG1 presentes en cada lóbula el sistema codifica la dirección desde la cual se aproxima el peligro (Medan et al., 2015). Al comparar la respuesta fisiológica de las neuronas MLG1 con el pico de velocidad evocado por estímulos de distinto tamaño, hemos visto que aun cuando existe una correlación, esta no es particularmente alta (**FIGURA 67 – PANEL DERECHO**). Es probable que este tipo de neuronas estén más vinculadas con la codificación del lugar del campo visual en donde se encuentran objetos en movimiento, aportando esta información sobre estímulos tanto aversivos como apetitivos.

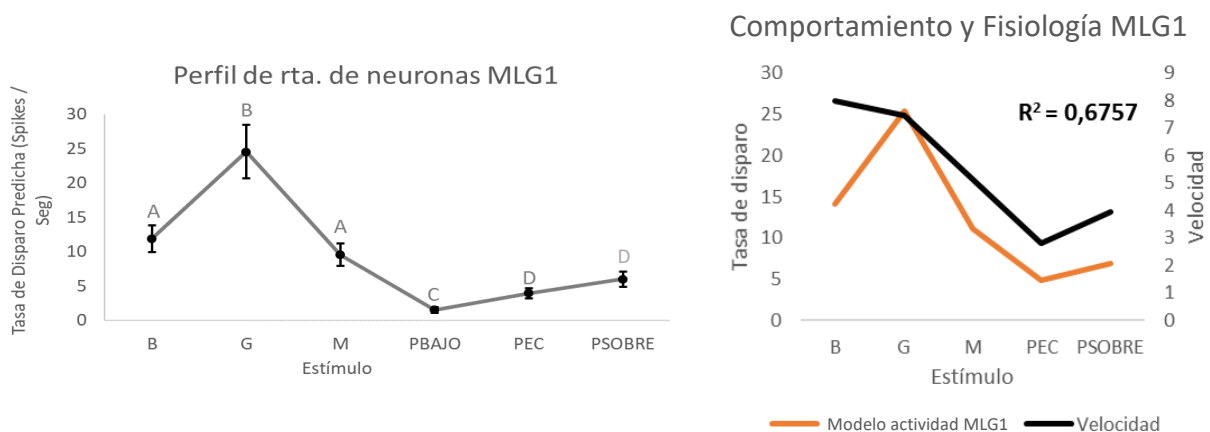


Figura 67 - Panel Izquierdo: perfil modelado de respuestas de las neuronas MLG1 frente a estímulos de distinto tamaño y elevación. **Panel Derecho:** perfil modelado de respuestas de las neuronas MLG1 en el monitor derecho, y velocidad máxima de los animales evocada por cada estímulo en dicho monitor.

La respuesta de las neuronas BLG2 decae gradualmente con el tamaño del estímulo

Las neuronas de tipo BLG2 tienen un campo receptivo amplio. En el área más sensible del CR, la respuesta de las neuronas BLG2 decae gradualmente con el tamaño del objeto en movimiento. Es el único tipo de neurona que presentó diferencias significativas entre todos los estímulos, excepto entre los cuadrados pequeños que se desplazaban en el ecuador y debajo del mismo, el cuadrado pequeño sobre el ecuador presentó diferencias significativas respecto a todos los demás estímulos (**FIGURA 68 – PANEL IZQUIERDO**).

En los experimentos de Oliva y Tomsic se ha visto que el curso temporal de la actividad de las BLG2 frente a estímulos de looming coincide aproximadamente con el momento de un freezing transitorio que se observada en los animales antes de iniciar el escape, sugiriendo un posible papel de este tipo de neurona en dicho comportamiento (Tomsic et al., 2017). En los experimentos de Gancedo y colaboradores (2020), donde se estudió la respuesta de los cangrejos frente a objetos en movimiento en una arena artificial, se vio que estos animales tienen varias respuestas comportamentales que incluyen un momento de freezing. Los cangrejos pueden congelarse y permanecer congelados, congelarse y luego alejarse del objeto o mostrar una reacción defensiva contra él, o congelarse y luego iniciar una persecución. El componente de freezing podría reflejar el tiempo que le toma al animal obtener suficiente información sobre el estímulo para decidir cómo reaccionar.

Si la BLG2 en efecto controla el freezing, ya sea para que el animal pase desapercibido o para que al inmovilizarse pueda estabilizar la imagen del objeto en movimiento y así obtener información más clara (Hemmi & Tomsic, 2012), podría ser que la diferencias en las respuestas de esta neurona a los distintos estímulos se correspondiese con la latencia y/o la duración del freezing. Es decir que los estímulos más intensos induzcan un freezing más rápido y por más tiempo que los menos intensos. Sin embargo, esto podría estar en parte contrarrestado por la acción directa que los otros tipos de LG tienen sobre la respuesta de escape, en particular la MLG2, frente a cada estímulo. La evaluación de esta hipótesis requiere de futuros estudios.

Cuando comparamos la actividad de las BLG2 y los picos de velocidad evocados por cada estímulo vemos que la respuesta fisiológica de las BLG2 decae más gradualmente con el tamaño que con que lo hace la velocidad máxima de escape (**FIGURA 68 – PANEL DERECHO**).

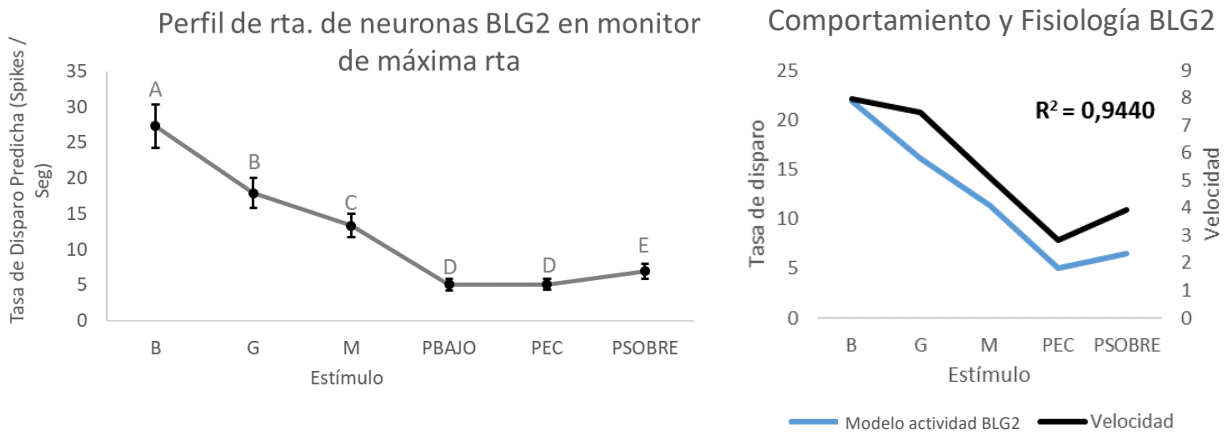


Figura 68 – Panel Izquierdo: perfil modelado de respuestas de las neuronas BLG2 frente a estímulos de distinto tamaño y elevación. **Panel Derecho:** perfil modelado de respuestas de las neuronas BLG2 en el monitor derecho, y velocidad máxima de los animales evocada por cada estímulo en dicho monitor.

Perfil de respuesta de las BLG1

Las neuronas de tipo BLG1 respondieron más intensamente a los objetos grandes, cuadrado grande y barra (sin diferencias significativas entre ellos). La respuesta al cuadrado pequeño que se desplazaba por el ecuador no fue diferente a la evocada por el cuadrado mediano, mientras que los cuadrados pequeños en el ecuador y por debajo del mismo evocaron las respuestas más bajas (**FIGURA 69 – PANEL IZQUIERDO**).

Al comparar la actividad de las BLG1 con la velocidad máxima de escape de los animales vemos que este tipo de neuronas no son las mejores predictoras de las velocidades máximas evocadas por el conjunto de los distintos estímulos (**FIGURA 69 – PANEL DERECHO**).

Cuando se mide la actividad de las BLG1 frente a barras horizontales y cuadrados que se mueven en sentido vertical (Medan et al., 2007), vemos que las neuronas BLG1 parecen tener cierta sensibilidad a la elevación del estímulo. Esto nos llevó a proponer que estos elementos sean potencialmente capaces de codificar la distancia a objetos que se encuentran a nivel del suelo por el método de declinación (Hemmi & Zeil, 2003) o de categorizar un objeto visual por su elevación (Layne et al., 1997). En el desarrollo de esta Tesis hemos visto que las neuronas MLG2, BLG2 y BLG1 presentan tasas de disparo mayores frente al cuadrado pequeño sobre el ecuador que al cuadrado pequeño que se

desplaza en el ecuador. Mientras que las neuronas MLG2 han demostrado ser un buen predictor de la velocidad de escape de los animales, las neuronas BLG2 y BLG1 parecen tener roles diferentes. Para determinar el rol de las neuronas BLG2 en los comportamientos de freezing y el rol de las BLG1 en el cálculo de distancias por declinación o categorización de estímulos por elevación es necesario llevar a cabo más experimentos.

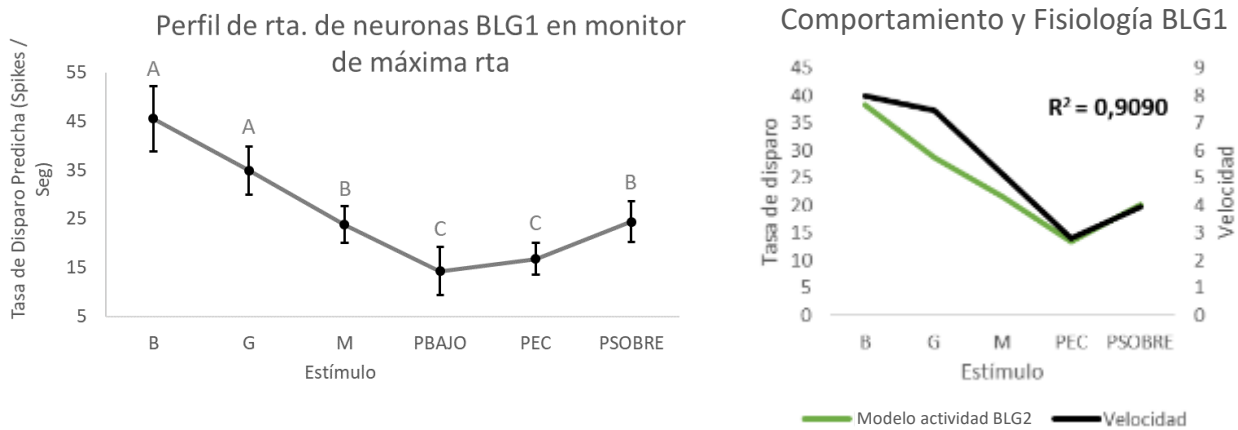


Figura 69 – Panel Izquierdo: perfil modelado de respuestas de las neuronas BLG1 frente a estímulos de distinto tamaño y elevación. **Panel Derecho:** perfil modelado de respuestas de las neuronas BLG1 en el monitor derecho, y velocidad máxima de los animales evocada por cada estímulo en dicho monitor.

Las neuronas direccionales (LCDC) son sensibles a la dirección del movimiento de estímulos de todos los tamaños, siempre que se desplacen del ecuador

Como ya se mencionó, existe evidencia de que las LCDC podrían conformar dos sistemas de neuronas detectoras de desvío que permiten la fijación y seguimiento visual de objetos en movimiento. Un sistema permitiría fijar objetos en el polo lateral del ojo y otro sistema permitiría fijar objetos en el polo delantero (Scarano, 2018). Con el objetivo de enfocarnos en el sistema de fijación en el polo lateral del ojo, relacionado al comportamiento de escape y el de persecución de presas, hemos analizado la respuesta fisiológica de las LCDC a estímulos presentados en el polo lateral del ojo de registro, es decir, en el monitor derecho.

Encontramos diferencias significativas en la tasa de disparo evocada por el movimiento en sentido preferido y anti preferido para los estímulos barra, y cuadrados grandes y medianos. En cuanto a los objetos pequeños, la única elevación que generó una respuesta apreciable fue aquella que coincide con el nivel del ecuador. Esto constituye una evidencia clara acerca de que la extensión vertical de CR de las LCDC es muy acotada y su centro se ubica en el ecuador del ojo, que a su vez el animal mantiene alineado con la línea del horizonte. El resultado apoya la idea de que estas neuronas funcionarían

como elementos de detección de objetos que se mueven sobre el plano azimutal dentro de una región acotada en elevación que comprende unos pocos grados por encima y por debajo de la línea del horizonte. En el mundo plano de estos cangrejos, los objetos en movimiento que predominan en dicha región del espacio visual corresponden a movimientos de los conespecíficos. De este modo, la sensibilidad a movimientos en torno al nivel del horizonte observada aquí para las LCDC constituye, una adaptación más a las varias ya descritas al mundo plano en que habitan estos animales (Scarano et al., 2020; Tomsic et al., 2017). Probablemente estas neuronas sean las responsables de la detección de desvíos que permiten la fijación de objetos en el polo lateral del ojo observada tanto en la respuesta de escape (Oliva et al., 2007) como en la persecución de presas (Gancedo et al., 2020).

La detección de objetos pequeños en *N. granulata*

Unos de los objetivos de esta Tesis fue evaluar si existen neuronas similares a las STMD de odonatos en la lóbula del cangrejo. Este objetivo, que en principio parecía muy factible dada la robusta respuesta de persecución y captura que despliegan los cangrejos ante el movimiento de objetos pequeños (Gancedo et al., 2020), no pudo ser cumplido del modo que se esperaba. Si bien se registraron 4 neuronas que responden con mayor intensidad al movimiento de los objetos pequeños en al menos un monitor, estas no comparten las características de las STMD (Nordström, 2012). Al no contar con varios registros del mismo tipo celular, no podemos hacer demasiadas interpretaciones acerca del papel de estas neuronas en la identificación de objetos en movimiento ni su rol en los circuitos que comandan las respuestas comportamentales de *N. granulata*.

Las neuronas detectoras de objetos pequeños encontradas en libélulas están relacionadas con la detección y persecución de presas. Estos animales, en su etapa adulta, se alimentan de insectos voladores. También se han encontrado en otros insectos voladores neuronas que responden a objetos pequeños que resultan ser relevantes para la búsqueda de parejas para la reproducción (Gilbert & Strausfeld, 1991; Trischler et al., 2007). En cambio *N. granulata* si bien es capaz de cazar cangrejos más pequeños, no depende de la cacería para sobrevivir, estos cangrejos son omnívoros y no es inusual verlos alimentarse de especies vegetales (*Spartina* spp.) y filtrar material orgánico del barro. Al vivir en cangrejales tiene a sus conspecíficos cerca y no precisan de la detección lejana de hembras. Las presiones selectivas para que *N. granulata* desarrolle tipos neuronales específicos para la detección de objetos pequeños es menor

respecto a los insectos voladores en los que se han encontrado neuronas detectoras de movimiento de objetos pequeños. Sin embargo, se ha observado que la respuesta comportamental de *N. granulata* frente a estímulos es influenciada por el tamaño de los objetos en movimiento (Gancedo et al., 2020) y su elevación (Tomsic et al., 2017). Como ya se mencionó, una forma de clasificar un estímulo y traducir la información en respuestas motoras adaptativas sería usar conjuntos de neuronas con diferentes sensibilidades de características, que a través de distintas combinaciones de su activación relativa puedan desencadenar programas motores separados (Ewert 1987, 1997). Tres de los cuatro tipos de LG descritos por Medan Y colaboradores (2007), respondieron con mayor intensidad al cuadrado pequeño sobre el ecuador que al cuadrado pequeño que se desplazaba en la línea del ecuador y además respondieron de manera más intensa frente a estímulos grandes, estas neuronas podrían estar involucradas en la identificación del peligro. En cambio, las neuronas de tipo MLG1, cuyo ensamble está involucrado en identificar en que espacio del campo visual ocurre el movimiento (Medan et al. 2015) no responde de manera diferente frente a estímulos pequeños que se desplazan en el ecuador y a los que se desplazan sobre el mismo. Las neuronas de *Neohelice* que respondieron con preferencia al movimiento de objetos pequeños podrían formar parte, junto con las LG, de los circuitos de toma de decisiones que le asignan un valor (apetitivo o aversivo) a los estímulos visuales.

Existen varios factores que afectan la probabilidad de encontrar un tipo neuronal cuando se realizan registros electrofisiológicos intracelulares en el animal prácticamente intacto. Dos de ellos son el tamaño y el número de elementos. Las LG y LCDC son neuronas con árboles detríticos gigantes y axones relativamente gruesos que resultan fáciles de impalar, en cambio neuronas pequeñas son más difíciles de impalar y si el número de elementos es pequeño la probabilidad de encontrarlas se reduce. Un tercer factor a tener en cuenta es la posibilidad de que los elementos reactivos o que responden al movimiento de objetos pequeños involucrados en la identificación y persecución de presas sean estado – dependientes. Por ejemplo, al estar el cangrejo inmovilizado y sostenido con una pinza, esto podría modular negativamente su respuesta frente a estímulos apetitivos, lo cual dificultaría la identificación de una neurona con estas características en las condiciones del setup de electrofisiología. Como ya se mencionó, 3 de los 4 tipos de LG son sensibles a estímulos mecánicos aplicados en las patas del animal (Medan et al., 2007), lo que indica que estas neuronas reciben un input sensorial y probablemente un feedback de los comportamientos que comandan.

Para determinar qué comportamiento es el más adecuado en un momento dado, el sistema nervioso debe integrar las condiciones externas (p. ej., riesgo de depredación) con los impulsos internos (p. ej., estado de hambre/saciedad), comparando así los costos y beneficios de las diferentes alternativas. Es más probable que un animal hambriento elija una opción de comportamiento que implique riesgos porque el valor que se le da a buscar alimento es mayor que el valor que se le da a otras alternativas, como esconderse. Si el beneficio de encontrar alimento supera el costo estimado de ser atacado por un depredador, la decisión es buscar el alimento. Si el valor asignado a la búsqueda de alimento es bajo porque el animal está saciado, otras opciones de comportamiento se vuelven más valiosas y el resultado del comportamiento se desplazará hacia actividades menos riesgosas (Herberholz & Marquart, 2012). Comprender cómo el estado interno y las entradas sensoriales producen un comportamiento u otro es una pregunta fundamental de las neurociencias (Briggman & Kristan, 2008; Flavell et al., 2013; Kristan, 2008; Palmer & Kristan, 2011; Taghert & Nitabach, 2012). En muchos casos, la elección del comportamiento depende de los cambios en los estados internos que se producen mediante la activación de conjuntos específicos de entradas neuromoduladoras (Friesen & Kristan, 2007; Jing et al., 2007; Wagenaar et al., 2010; J.-S. Wu et al., 2010). En *Drosophila* se han encontrado neuronas que responden preferencialmente al movimiento de objetos pequeños que no responden al movimiento de objetos grandes o del panorama y dicha preferencia es modulada por inhibición GABAérgica (Keleş & Frye, 2017). Es relevante comentar que lo que estos autores definieron como objeto pequeño tenía un tamaño angular considerablemente mayor al de nuestro objeto cuadrado grande. Más aún, si tenemos en cuenta el tamaño de *Drosophila* o el tamaño de su campo visual en comparación con el tamaño del cangrejo o el de su campo visual, en ambas comparaciones resulta que el objeto que para la mosca denominan pequeño tiene un tamaño relativo aún mucho mayor que nuestro cuadrado grande para el cangrejo. Con independencia de esto, los efectos modulatorios observados invitan a pensar que la sensibilidad para la detección de objetos pequeños es modulada por señales relacionadas con el estado interno de los animales. De hecho, experimentos recientes de Salido y Gancedo (comunicación personal) revelaron que la probabilidad de evocar respuestas persecutorias por el

movimiento a nivel del suelo de una dummy pequeña aumenta muy significativamente en animales que fueron privados de alimento durante una semana.

En nuestros experimentos encontramos también neuronas que se inhiben frente al movimiento de objetos. Estas se encuadran en al menos 2 tipos, las que se inhiben frente al movimiento de objetos grandes y no responden al movimiento de objetos pequeños y un segundo tipo que se inhibe frente al desplazamiento de objetos pequeños y no responde o se excita frente al desplazamiento de estímulos grandes. Esto demuestra que el circuito visual de *Neohelice*, encargado de responder al movimiento de objetos es un circuito complejo, que seguramente incluye varios tipos neuronales.

Perspectivas futuras

La ventaja de los registros intracelulares es que se puede medir la actividad de cada neurona por separado, se pueden registrar tanto las respuestas umbrales como las sub umbrales y además las tinciones intracelulares permiten estudiar la morfología de las neuronas. Sin embargo, no todas las neuronas son impalables y además los animales deben estar inmovilizados para lograr registros estables, lo que puede modular la actividad de neuronas centrales. Esto hace necesario complementar estos estudios con otras técnicas. Recientemente en nuestro laboratorio se ha logrado registrar a las LG con multielectrodos extracelulares en el animal inmovilizado (Cámara et al., 2020) y más recientemente se ha conseguido realizar estos registros mientras los animales caminan en el treadmill. El registro simultáneo de la actividad individual de las grandes neuronas del circuito involucrado en las respuestas de escape y persecución del cangrejo mejorará considerablemente nuestro conocimiento sobre las interacciones neuronales y los cálculos que subyacen a la organización de estos comportamientos. Si se logra registrar la actividad de elementos del circuito de *Neohelice* durante persecuciones a objetos en movimiento podremos analizar la actividad de las LG durante este comportamiento y compararlo con la actividad de estas neuronas durante el escape. Además, los registros extracelulares podrían ayudar a identificar características de nuevas neuronas de relevancia en la toma de decisiones frente a objetos en movimiento, conocer estas características podría favorecer su identificación también en registros intracelulares.

Bibliografía



- Adelson, E. H., & Bergen, J. R. (1985). Spatiotemporal energy models for the perception of motion. *Journal of the Optical Society of America A*, 2(2), 284–299.
<https://doi.org/10.1364/JOSAA.2.000284>
- Akaike, H. (1977). On entropy maximization principle. *Application of Statistics*, 27–41.
- Alkaladi, A., How, M. J., & Zeil, J. (2013). Systematic variations in microvilli banding patterns along fiddler crab rhabdoms. *Journal of Comparative Physiology A*, 199(2), 99–113.
<https://doi.org/10.1007/s00359-012-0771-9>
- Angeletti, S., Cervellini, P., & Lescano, L. (2018). Burrowing activity of the *Neohelice granulata* crab (Brachyura, Varunidae) in Southwest Atlantic intertidal area. *Ciencias Marinas*, 44(3), 155–167.
- Angeletti, S., & Cervellini, P. M. (2015). Population structure of the burrowing crab *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae) in a southwestern Atlantic salt marsh. In *Latin american journal of aquatic research* (Vol. 43, pp. 539–547). scielocl.
- Argyros, A. A., Tsakiris, D. P., & Groyer, C. (2004). Biomimetic centering behavior [mobile robots with panoramic sensors]. *IEEE Robotics & Automation Magazine*, 11(4), 21–30.
<https://doi.org/10.1109/MRA.2004.1371612>
- Barnett, P. D., Nordström, K., & O'carroll, D. C. (2007). Retinotopic organization of small-field-target-detecting neurons in the insect visual system. *Current Biology*, 17(7), 569–578.
- Bas, C., Nuñez, J., Spivak, E., & Luppi, T. (2019). Inter-population differences in feeding ecology under nitrogen-limited diets: Field growth and the role of cannibalism in limiting/improving reserve accumulation. *Marine Ecology*, 40(3), e12547.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/maec.12547>
- Bengochea, M., Berón de Astrada, M., Tomsic, D., & Sztarker, J. (2018). A crustacean lobula plate: Morphology, connections, and retinotopic organization. *Journal of Comparative Neurology*, 526(1), 109–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.24322>
- Berón de Astrada, Martín, Bengochea, M., Sztarker, J., Delorenzi, A., & Tomsic, D. (2013). Behaviorally Related Neural Plasticity in the Arthropod Optic Lobes. *Current Biology*, 23(15), 1389–1398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.061>
- Berón De Astrada, M., Medan, V., & Tomsic, D. (2011). How visual space maps in the optic neuropils of a crab. *Journal of Comparative Neurology*, 519(9), 1631–1639.
<https://doi.org/10.1002/cne.22612>

- Berón de Astrada, M, Sztarker, J., & Tomsic, D. (2001). Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings in vivo. *Journal of Comparative Physiology A*, 187(1), 37–44. <https://doi.org/10.1007/s003590000174>
- Berón de Astrada, M, & Tomsic, D. (2002). Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura). *Journal of Comparative Physiology A*, 188(7), 539–551. <https://doi.org/10.1007/s00359-002-0328-4>
- Berón de Astrada, Martín, 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. *Journal of Comparative Physiology A*, 198(3), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s00359-011-0697-7>
- Berón de Astrada, Martín, Tuthill, J. C., & Tomsic, D. (2009). Physiology and morphology of sustaining and dimming neurons of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 195(8), 791–798. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0448-1>
- Bierbower, S. M., Shuranova, Z. P., Viele, K., & Cooper, R. L. (2013). Comparative study of environmental factors influencing motor task learning and memory retention in sighted and blind crayfish. *Brain and Behavior*, 3(1), 4–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/brb3.106>
- Blaustein, D. N., Derby, C. D., Simmons, R. B., & Beall, A. C. (1988). Structure of the brain and medulla terminalis of the spiny lobster *Panulirus argus* and the crayfish *Procambarus clarkii*, with an emphasis on olfactory centers. *Journal of Crustacean Biology*, 8(4), 493–519.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., & White, J.-S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(3), 127–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.008>
- Borst, A. (2014). Neural Circuits for Motion Vision in the Fly. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 79, 131–139. <https://doi.org/10.1101/sqb.2014.79.024695>
- Borst, A., & Haag, J. (2002). Neural networks in the cockpit of the fly. *Journal of Comparative Physiology A*, 188(6), 419–437. <https://doi.org/10.1007/s00359-002-0316-8>
- Borst, A., Haag, J., & Mauss, A. S. (2020). How fly neurons compute the direction of visual

- motion. *Journal of Comparative Physiology A*, 206(2), 109–124.
<https://doi.org/10.1007/s00359-019-01375-9>
- Borst, A., Haag, J., & Reiff, D. F. (2010). Fly Motion Vision. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1), 49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153155>
- Borst, A., & Helmstaedter, M. (2015). Common circuit design in fly and mammalian motion vision. *Nature Neuroscience*, 18. <https://doi.org/10.1038/nn.4050>
- Briggman, K. L., & Kristan, W. B. (2008). Multifunctional Pattern-Generating Circuits. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 271–294.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125552>
- Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Mächler, M., & Bolker, B. M. (2017). Modeling zero-inflated count data with glmmTMB. *BioRxiv*, 132753. <https://doi.org/10.1101/132753>
- Brusca, R. C. & Bursca, G. J. (1990). *Invertebrates* (S. associates Inc (ed.)). Sunderland.
- Wiersma, C.A.G., Roach, J.L.M., Glantz, R.M. (1982). Neural integration in the optic system. In *The biology of the crustacea, vol 4. Neural integration and Behavior*. New York: Academic Press.
- Cajal, S. R., & Sanchez, D. (1915). *Trab. Lab. Invest, biol. I.*
- Cámara, A., Belluscio, M. A., & Tomsic, D. (2020). Multielectrode Recordings From Identified Neurons Involved in Visually Elicited Escape Behavior . In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 14). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2020.592309>
- Clark, D. A., Bursztyn, L., Horowitz, M. A., Schnitzer, M. J., & Clandinin, T. R. (2011). Defining the computational structure of the motion detector in *Drosophila*. *Neuron*, 70(6), 1165–1177.
- Collett, T. S., & Land, M. F. (1978). How hoverflies compute interception courses. *Journal of Comparative Physiology*, 125(3), 191–204. <https://doi.org/10.1007/BF00656597>
- Cronin, T. W., & Forward, R. B. (1988). The visual pigments of crabs. *Journal of Comparative Physiology A*, 162(4), 463–478.
- Cronin, T. W., & Frank, T. M. (1996). A short-wavelength photoreceptor class in a deep-sea shrimp. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1372), 861–865. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0127>

- Cummins, D., & Goldsmith, T. H. (1981). Cellular identification of the violet receptor in the crayfish eye. *Journal of Comparative Physiology*, *142*(2), 199–202.
- Cummins, D. R., Chen, D. M., & Goldsmith, T. H. (1984). Spectral Sensitivity Of The Spiny Lobster, *Panulirus Argus*. *The Biological Bulletin*, *166*(1), 269–276.
<https://doi.org/10.2307/1541448>
- Daleo, P., Ribeiro, P., & Iribarne, O. (2003). The SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* Dana affects the distribution and survival of the fiddler crab *Uca uruguayensis* Nobili. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *291*(2), 255–267.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00140-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00140-0)
- Dana, D. J. (1851). Crustacea Grapsoidea (Cyclometopa, Edwardsii). *Conspectus Crustaceorum quae in Orbis Terraru circumnavigatione, Carolo Wilkes e Classe Reipublicae Foederatae Duce, lexit et descripsit J. D. Dana. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, *5*(10), 247–254. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10029651842/en/>
- Davis, R. L. (2011). Traces of Drosophila Memory. *Neuron*, *70*(1), 8–19.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.012>
- De Agrò, M., Rößler, D. C., Kim, K., & Shamble, P. S. (2021). Perception of biological motion by jumping spiders. *PLoS Biology*, *19*(7), e3001172–e3001172.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001172>
- de Vries, S. E. J., & Clandinin, T. R. (2012). Loom-sensitive neurons link computation to action in the Drosophila visual system. *Current Biology : CB*, *22*(5), 353–362.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.007>
- Diaz Gustavino, J. M. (2020). *Control Direccional del Escape de Neohelice Granulata ante estímulos visuales (Tesis de Grado)*. Universidad de Buenos Aires.
- Edwards, D. H., Heitler, W. J., & Krasne, F. B. (1999). Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends in Neurosciences*, *22*(4), 153–161.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01340-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01340-X)
- Egelhaaf, M. (1985). On the neuronal basis of figure-ground discrimination by relative motion in the visual system of the fly. *Biological Cybernetics*, *52*(2), 123–140.
<https://doi.org/10.1007/BF00364003>
- Egelhaaf, M., Borst, A., & Reichardt, W. (1989). Computational structure of a biological motion-detection system as revealed by local detector analysis in the fly's nervous system.

Journal of the Optical Society of America A, 6(7), 1070–1087.

<https://doi.org/10.1364/JOSAA.6.001070>

- Eisenhardt, D. (2014). “Molecular mechanisms underlying formation of long-term reward memories and extinction memories in the honeybee (*Apis mellifera*)”: Erratum. In *Learning & Memory* (Vol. 21, Issue 11, p. 646). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Escapa, M., Minkoff, D. R., Perillo, G. M. E., & Iribarne, O. (2007). Direct and indirect effects of burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* activities on erosion of southwest Atlantic *Sarcocornia*-dominated marshes. *Limnology and Oceanography*, 52(6), 2340–2349. <https://doi.org/https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.6.2340>
- Ewert, J. P. (1987). Neuroethology of releasing mechanisms: Prey-catching in toads. *Behavioral and Brain Sciences*, 10(3), 337–368. [https://doi.org/DOI: 10.1017/S0140525X00023128](https://doi.org/DOI:10.1017/S0140525X00023128)
- Ewert, J. P. (1997). Neural correlates of key stimulus and releasing mechanism: a case study and two concepts. *Trends Neurosci*, 20, 332–339.
- Flavell, S. W., Pokala, N., Macosko, E. Z., Albrecht, D. R., Larsch, J., & Bargmann, C. I. (2013). Serotonin and the neuropeptide PDF initiate and extend opposing behavioral states in *C. elegans*. *Cell*, 154(5), 1023–1035. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.001>
- Forward, R. B. J., Cronin, T. W., & Douglass, J. K. (2004). The visual pigments of crabs. *Journal of Comparative Physiology A*, 162, 479–490.
- Fotowat, H., & Gabbiani, F. (2007). Relationship between the Phases of Sensory and Motor Activity during a Looming-Evoked Multistage Escape Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 27(37), 10047 LP – 10059. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1515-07.2007>
- Fotowat, H., & Gabbiani, F. (2011). Collision Detection as a Model for Sensory-Motor Integration. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113632>
- Franceschini, N., Pichon, J. M., Blanes, C., Brady, J. M., Barlow, H. B., Frisby, J. P., Horridge, G. A., & Jeeves, M. A. (1992). From insect vision to robot vision. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 337(1281), 283–294. <https://doi.org/10.1098/rstb.1992.0106>
- Freudenthal, R., & Romano, A. (2000). Participation of Rel/NF- κ B transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Research*, 855(2), 274–281.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02358-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02358-6)

Friesen, W. O., & Kristan, W. B. (2007). Leech locomotion: swimming, crawling, and decisions.

Current Opinion in Neurobiology, 17(6), 704–711.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.01.006>

Fu, Q., Sun, X., Liu, T., Hu, C., & Yue, S. (2021). Robustness of Bio-Inspired Visual Systems for Collision Prediction in Critical Robot Traffic . In *Frontiers in Robotics and AI* (Vol. 8).

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/frobt.2021.529872>

Furshpan, E. J., & Potter, D. D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish.

The Journal of Physiology, 145(2), 289–325.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006143>

Gancedo, B., Salido, C., & Tomsic, D. (2020). Visual determinants of prey chasing behavior in a mudflat crab. *The Journal of Experimental Biology*, 223(6), jeb217299.

<https://doi.org/10.1242/jeb.217299>

Geurten, B. R. H., Nordstrom, K., Sprayberry, J. D. H., Bolzon, D. M., & O'Carroll, D. C. (2007).

Neural mechanisms underlying target detection in a dragonfly centrifugal neuron. *Journal of Experimental Biology*, 210(18), 3277–3284.

Gilbert, C., & Strausfeld, N. J. (1991). The functional organization of male-specific visual neurons in flies. *Journal of Comparative Physiology A*, 169(4), 395–411.

<https://doi.org/10.1007/BF00197653>

Glantz, R. M., Miller, C. S., & Wiese, K. (2002). Signal processing in the crayfish optic lobe: contrast, motion and polarization vision. In *The crustacean nervous system* (p. 486).

Springer.

Glantz, R. M., & Bartels, A. (1994). The spatiotemporal transfer function of crayfish lamina monopolar neurons. *Journal of Neurophysiology*, 71(6), 2168–2182.

<https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.6.2168>

Glantz, R. M. (1968). Light adaptation in the photoreceptor of the crayfish, *Procambarus clarki*.

Vision Research, 8(11), 1407–1421. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6989(68)90087-4)

[6989\(68\)90087-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6989(68)90087-4)

Glantz, R. M., Miller, C. S., & Nässel, D. R. (2000). Tachykinin-Related Peptide and GABA-

Mediated Presynaptic Inhibition of Crayfish Photoreceptors. *The Journal of Neuroscience*, 20(5), 1780 LP – 1790. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-05-01780.2000>

- Gronenberg, W., & Strausfeld, N. J. (1991). Descending pathways connecting the male-specific visual system of flies to the neck and flight motor. *Journal of Comparative Physiology A*, *169*(4), 413–426.
- Haag, J., Denk, W., & Borst, A. (2004). Fly motion vision is based on Reichardt detectors regardless of the signal-to-noise ratio. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(46), 16333–16338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407368101>
- Haag, J., Theunissen, F., & Borst, A. (1997). The Intrinsic Electrophysiological Characteristics of Fly Lobula Plate Tangential Cells: II. Active Membrane Properties. *Journal of Computational Neuroscience*, *4*(4), 349–368. <https://doi.org/10.1023/A:1008804117334>
- Haag, J., Vermeulen, A., & Borst, A. (1999). The Intrinsic Electrophysiological Characteristics of Fly Lobula Plate Tangential Cells: III. Visual Response Properties. *Journal of Computational Neuroscience*, *7*(3), 213–234. <https://doi.org/10.1023/A:1008950515719>
- Hafner, G. S. (1973). The neural organization of the lamina ganglionaris in the crayfish: A Golgi and EM study. *Journal of Comparative Neurology*, *152*(3), 255–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.901520304>
- Hafner, G. S. (1974). The ultrastructure of retinula cell endings in the compound eye of the crayfish. *Journal of Neurocytology*, *3*(3), 295–311. <https://doi.org/10.1007/BF01097915>
- Hartbauer, M. (2017). Simplified bionic solutions: a simple bio-inspired vehicle collision detection system. *Bioinspiration & Biomimetics*, *12*(2), 26007. <https://doi.org/10.1088/1748-3190/aa5993>
- Hartig, F. (2016). Package “DHARMA”: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. *An R Package*.
- Hassenstein, B., & Reichardt, W. (1956). Systemtheoretische analyse der zeit-, reihenfolgen- und vorzeichenbewertung bei der bewegungsperzeption des rüsselkäfers chlorophanus. *Zeitschrift Für Naturforschung B*, *11*(9–10), 513–524.
- Hemmi, J. M., & Tomsic, D. (2015). Differences in the escape response of a grapsid crab in the field and in the laboratory. *Journal of Experimental Biology*, *218*(21), 3499–3507. <https://doi.org/10.1242/jeb.129072>
- Hemmi, J. M., & Tomsic, D. (2012). The neuroethology of escape in crabs: from sensory ecology to neurons and back. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(2), 194–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.11.012>

- Hemmi, J. M., & Zeil, J. (2003). Robust judgement of inter-object distance by an arthropod. *Nature*, *421*(6919), 160–163. <https://doi.org/10.1038/nature01247>
- Hennig, P., & Egelhaaf, M. (2012). Neuronal encoding of object and distance information: a model simulation study on naturalistic optic flow processing . In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 6). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2012.00014>
- Hepp, Y., Salles, A., Carbo-Tano, M., Pedreira, M. E., & Freudenthal, R. (2016). Surface expression of NMDA receptor changes during memory consolidation in the crab *Neohelice granulata*. *Learning & Memory* , *23*(8), 427–434. <http://learnmem.cshlp.org/content/23/8/427.abstract>
- Hepp, Y., Tano, M. C., Pedreira, M. E., & Freudenthal, R. A. M. (2013). NMDA-like receptors in the nervous system of the crab *Neohelice granulata*: A neuroanatomical description. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(10), 2279–2297. <https://doi.org/10.1002/cne.23285>
- Herberholz, J., & Marquart, G. (2012). Decision Making and Behavioral Choice during Predator Avoidance . In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 6). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2012.00125>
- Heußlein, E., Patullo, B. W., & Macmillan, D. L. (2010). Robot navigation: implications from search strategies in exploring crayfish. *Robotica*, *28*(3), 465–475. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0263574709005785>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of Physiology*, *148*(3), 574–591. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006308>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology*, *160*(1), 106–154. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>
- Hubel, D. H. (1982). Exploration of the primary visual cortex, 1955–78. *Nature*, *299*(5883), 515–524. <https://doi.org/10.1038/299515a0>
- Jie, Y., Javier, O. H., J., B. N., Yu, L., S., B. G., Jin-bo, H., Tian, L., & Xi-guang, Z. (2016). Fuxianhuiid ventral nerve cord and early nervous system evolution in Panarthropoda. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(11), 2988–2993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522434113>

- Jing, J., Vilim, F. S., Horn, C. C., Alexeeva, V., Hatcher, N. G., Sasaki, K., Yashina, I., Zhurov, Y., Kupfermann, I., Sweedler, J. V., & Weiss, K. R. (2007). From Hunger to Satiety: Reconfiguration of a Feeding Network by *Aplysia*; Neuropeptide Y. *The Journal of Neuroscience*, *27*(13), 3490 LP – 3502.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0334-07.2007>
- Joesch, M., Schnell, B., Raghu, S. V., Reiff, D. F., & Borst, A. (2010). ON and OFF pathways in *Drosophila* motion vision. *Nature*, *468*(7321), 300–304.
<https://doi.org/10.1038/nature09545>
- Kanjhan, R., & Sivyer, B. (2010). Two types of ON direction-selective ganglion cells in rabbit retina. *Neuroscience Letters*, *483*(2), 105–109.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.071>
- Keleş, M. F., & Frye, M. A. (2017). Object-detecting neurons in *Drosophila*. *Current Biology*, *27*(5), 680–687.
- Kim, I. J., Zhang, Y., Yamagata, M., Meister, M., & Sanes, J. R. (2008). Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature*, *452*(7186), 478–482.
- Kleinlogel, S., Marshall, N., Horwood, J., & Land, M. (2003). Neuroarchitecture of the Color and Polarization Vision System of the Stomatopod *Haptosquilla*. *The Journal of Comparative Neurology*, *467*, 326–342. <https://doi.org/10.1002/cne.10922>
- Koenderink, J. J., & van Doorn, A. J. (1987). Representation of local geometry in the visual system. *Biological Cybernetics*, *55*(6), 367–375. <https://doi.org/10.1007/BF00318371>
- Korn, H., & Faber, D. S. (2005). The Mauthner Cell Half a Century Later: A Neurobiological Model for Decision-Making? *Neuron*, *47*(1), 13–28.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.019>
- Kravitz, E. A., Potter, D. D., & Van Gelder, N. M. (1962). Gamma-aminobutyric acid and other blocking substances extracted from crab muscle. *Nature*, *194*(4826), 382–383.
<https://doi.org/10.1038/194382b0>
- Kristan, W. B. (2008). Neuronal Decision-Making Circuits. *Current Biology*, *18*(19), R928–R932.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.081>
- Kuang, S., Shi, J., Wang, Y., & Zhang, T. (2017). Where are you heading? Flexible integration of retinal and extra-retinal cues during self-motion perception. *PsyCh Journal*, *6*(2), 141–152.

- Lancia, J. P., Bas, C., & Spivak, E. (2014). Food manipulation and selection in the omnivorous grapsoid crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Varunidae). *Scientia Marina*, 78(4 SE-Articles), 529–536. <https://doi.org/10.3989/scimar.04036.02B>
- Land, M. F., & Nilsson, D. E. (2012). *Animal Eyes* 2nd ed. *Acta Zoologica*, 94(3), 271 pp. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2012.00570.x>
- Land, M., & Layne, J. (1995). The visual control of behaviour in fiddler crabs. *Journal of Comparative Physiology A*, 177(1), 91–103. <https://doi.org/10.1007/BF00243401>
- Layne, J., Land, M., & Zeil, J. (1997). Fiddler Crabs Use the Visual Horizon to Distinguish Predators from Conspecifics: A Review of the Evidence. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77(1), 43–54. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0025315400033774>
- Liu, Y. J., Wang, Q., & Li, B. (2011). Neuronal Responses to Looming Objects in the Superior Colliculus of the Cat. *Brain, Behavior and Evolution*, 77(3), 193–205. <https://doi.org/10.1159/000327045>
- López-González, E., & Ruiz Soler, M. (2011). Análisis de datos con el Modelo Lineal Generalizado. Una aplicación con R. *Revista Española de Pedagogía*, 248, 59–80.
- Macchiavelli, R. E., & Torres-Saavedra, P. A. (2018). *Modelos Estadísticos Avanzados Aplicados a la Investigación en Salud y Ambiente*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Magani, F., Luppi, T., Nunez, J., & Tomsic, D. (2016). Predation risk modifies behaviour by shaping the response of identified brain neurons. *Journal of Experimental Biology*, 219(8), 1172–1177. <https://doi.org/10.1242/jeb.136903>
- Martin, F. G., & Mote, M. I. (1982). Color receptors in marine crustaceans: A second spectral class of retinular cell in the compound eyes of *Callinectes* and *Carcinus*. *Journal of Comparative Physiology*, 145(4), 549–554.
- Matilla, M. A., & Krell, T. (2017). Chemoreceptor-based signal sensing. *Current Opinion in Biotechnology*, 45, 8–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.021>
- Maus, A. S., Vlasits, A., Borst, A., & Feller, M. (2017). Visual Circuits for Direction Selectivity. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 211–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031335>

- Maza, F. J., Sztarker, J., Shkedy, A., Peszano, V. N., Locatelli, F. F., & Delorenzi, A. (2016). Context-dependent memory traces in the crab's mushroom bodies: Functional support for a common origin of high-order memory centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(49), E7957–E7965.
- 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. *The Journal of Neuroscience*, *35*(17), 6654 LP – 6666. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4667-14.2015>
- Medan, V., Oliva, D., & Tomsic, D. (2007). Characterization of Lobula Giant Neurons Responsive to Visual Stimuli That Elicit Escape Behaviors in the Crab Chasmagnathus. *Journal of Neurophysiology*, *98*(4), 2414–2428. <https://doi.org/10.1152/jn.00803.2007>
- Meier, M., Serbe, E., Maisak, M. S., Haag, J., Dickson, B. J., & Borst, A. (2014). Neural Circuit Components of the Drosophila OFF Motion Vision Pathway. *Current Biology*, *24*(4), 385–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.006>
- Meinertzhagen, I. A. (1993). Chapter 2 The synaptic populations of the fly's optic neuropil and their dynamic regulation: Parallels with the vertebrate retina. *Progress in Retinal Research*, *12*, 13–39. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0278-4327\(93\)90003-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0278-4327(93)90003-C)
- Menzel, R., & Erber, J. (1978). Learning and memory in bees. In *Scientific American* (Vol. 239, Issue 1, pp. 102–110). Scientific American, Inc. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0778-102>
- Monk, T., & Paulin, M. G. (2014). Predation and the Origin of Neurones. *Brain, Behavior and Evolution*, *84*(4), 246–261. <https://doi.org/10.1159/000368177>
- Nakagawa, H., & Hongjian, K. (2010). Collision-Sensitive Neurons in the Optic Tectum of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Journal of Neurophysiology*, *104*(5), 2487–2499. <https://doi.org/10.1152/jn.01055.2009>
- Nässel, D. R. (1975). The Organization of the lamina ganglionaris of the prawn, *Pandalus borealis* (Kröyer). *Cell and Tissue Research*, *163*(4), 445–464. <https://doi.org/10.1007/BF00218491>
- Nässel, D. R. (1977). Types and arrangements of neurons in the crayfish optic lamina. *Cell and Tissue Research*, *179*(1), 45–75. <https://doi.org/10.1007/BF00278462>
- Nicholas, S., Leibbrandt, R., & Nordström, K. (2020). Visual motion sensitivity in descending neurons in the hoverfly. *Journal of Comparative Physiology A*, *206*(2), 149–163.

<https://doi.org/10.1007/s00359-020-01402-0>

Nordström, K. (2012). Neural specializations for small target detection in insects. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(2), 272–278.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.12.013>

Nordström, K., Barnett, P. D., & O’Carroll, D. C. (2006). Insect Detection of Small Targets Moving in Visual Clutter. *PLoS Biology*, 4(3), e54.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040054>

Nordstrom, K., & O’Carroll, D. C. (2006). Small object detection neurons in female hoverflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1591), 1211–1216.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3424>

Nordström, K., & O’Carroll, D. C. (2009). Feature detection and the hypercomplex property in insects. *Trends in Neurosciences*, 32(7), 383–391.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.03.004>

O’Carroll, D. (1993). Feature-detecting neurons in dragonflies. *Nature*, 362(6420), 541–543.

<https://doi.org/10.1038/362541a0>

Olberg, R. M. (1981). Object- and self-movement detectors in the ventral nerve cord of the dragonfly. *Journal of Comparative Physiology*, 141(3), 327–334.

<https://doi.org/10.1007/BF00609935>

Olberg, R. M. (2012). Visual control of prey-capture flight in dragonflies. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(2), 267–271.

Oliva, D., Medan, V., & Tomsic, D. (2007). Escape behavior and neuronal responses to looming stimuli in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda:

Grapsidae). *Journal of Experimental Biology*, 210(5), 865 LP – 880.

<https://doi.org/10.1242/jeb.02707>

Oliva, D., & Tomsic, D. (2014). Computation of object approach by a system of visual motion-sensitive neurons in the crab *Neohelice*. *Journal of Neurophysiology*, 112(6), 1477–1490.

Oliva, D., & Tomsic, D. (2016). Object approach computation by a giant neuron and its relationship with the speed of escape in the crab *Neohelice*. *Journal of Experimental Biology*, 219(21), 3339–3352. <https://doi.org/10.1242/jeb.136820>

Palmer, , & Kristan, W. B. (2011). Contextual modulation of behavioral choice. *Current Opinion*

- in Neurobiology*, 21(4), 520–526.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.05.003>
- Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein Synthesis Subverts Reconsolidation or Extinction Depending on Reminder Duration. *Neuron*, 38(6), 863–869.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00352-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00352-0)
- Peron, S. P., Jones, P. W., & Gabbiani, F. (2009). Precise subcellular input retinotopy and its computational consequences in an identified visual interneuron. *Neuron*, 63(6), 830–842.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.010>
- Pinheiro, J., & Bates, D. (2000). *Linear Mixed-Effects Models: Basic Concepts and Examples BT - Mixed-Effects Models in S and S-PLUS* (J. C. Pinheiro & D. M. Bates (eds.); pp. 3–56). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-22747-4_1
- Pinheiro, J., Bates, D., Debroy, S., & Sarkar, D. (2013). Nlme: nonlinear mixed-effects models. *R Package3*, 1.
- Plotnick, R. E., Dornbos, S. Q., & Chen, J. (2010). Information landscapes and sensory ecology of the Cambrian Radiation. *Paleobiology*, 36(2), 303–317. <https://doi.org/DOI:10.1666/08062.1>
- Preuss, T., Osei-Bonsu, P. E., Weiss, S. A., Wang, C., & Faber, D. S. (2006). Neural Representation of Object Approach in a Decision-Making Motor Circuit. *The Journal of Neuroscience*, 26(13), 3454 LP – 3464. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5259-05.2006>
- Reichardt, W. (1987). Evaluation of optical motion information by movement detectors. *Journal of Comparative Physiology A*, 161(4), 533–547.
<https://doi.org/10.1007/BF00603660>
- Rigosi, E., & O’Carroll, D. C. (2021). Acute Application of Imidacloprid Alters the Sensitivity of Direction Selective Motion Detecting Neurons in an Insect Pollinator . In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.682489>
- Rind, F. C., & Bramwell, D. I. (1996). Neural network based on the input organization of an identified neuron signaling impending collision. *Journal of Neurophysiology*, 75(3), 967–985. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.75.3.967>
- Rodriguez, E. M., & Luppi, T. A. (2020). *Neohelice granulata, a Model Species for Studies on Crustaceans, Volume I: Life History and Ecology*. Cambridge Scholars Publishing.
<https://books.google.com.ar/books?id=lczmDwAAQBAJ>

- Rowell, C. H. F., O'Shea, M., & Williams, J. L. (1977). The neuronal basis of a sensory analyser, the acridid movement detector system. IV. The preference for small field stimuli. *Journal of Experimental Biology*, *68*(1), 157–185.
- Sandeman, D., Henning, M., & Harzsch, S. (2014). Adaptive trends in malacostracan brain form and function related to behavior. *Nervous Systems and Control of Behavior*, 11–45.
- Sandini, G., Santos-Victor, J., Curotto, F., & Garibaldi, S. (1993). Robotic bees. *Proceedings of 1993 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS '93)*, *1*, 629–635 vol.1. <https://doi.org/10.1109/IROS.1993.583180>
- Santer, R. D., Rind, F. C., Stafford, R., & Simmons, P. J. (2006). Role of an Identified Looming-Sensitive Neuron in Triggering a Flying Locust's Escape. *Journal of Neurophysiology*, *95*(6), 3391–3400. <https://doi.org/10.1152/jn.00024.2006>
- Santos-Victor, J., Sandini, G., Curotto, F., & Garibaldi, S. (1993). Divergent stereo for robot navigation: learning from bees. *Proceedings of IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 434–439. <https://doi.org/10.1109/CVPR.1993.341094>
- Scarano, F., Sztarker, J., Medan, V., Berón de Astrada, M., & Tomsic, D. (2018). Binocular Neuronal Processing of Object Motion in an Arthropod. *The Journal of Neuroscience*, *38*(31), 6933–6948. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3641-17.2018>
- Scarano, F., & Tomsic, D. (2014). Escape response of the crab *Neohelice* to computer generated looming and translational visual danger stimuli. *Journal of Physiology-Paris*, *108*(2), 141–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.08.002>
- Scarano, F., Tomsic, D., & Sztarker, J. (2020). Direction Selective Neurons Responsive to Horizontal Motion in a Crab Reflect an Adaptation to Prevailing Movements in Flat Environments. *The Journal of Neuroscience*, *40*(29), 5561 LP – 5571. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0372-20.2020>
- Scarano, M. F. (2018). *Neuronas binoculares y neuronas direccionales de un artrópodo y sus posibles funciones en comportamientos guiados visualmente (Tesis Doctoral)* [Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.]. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6367_Scarano
- Schnell, B., Joesch, M., Forstner, F., Raghu, S. V., Otsuna, H., Ito, K., Borst, A., & Reiff, D. F. (2010). Processing of Horizontal Optic Flow in Three Visual Interneurons of the *Drosophila* Brain. *Journal of Neurophysiology*, *103*(3), 1646–1657.

<https://doi.org/10.1152/jn.00950.2009>

- Shinomiya, K., Karuppudurai, T., Lin, T.-Y., Lu, Z., Lee, C.-H., & Meinertzhagen, I. A. (2014). Candidate neural substrates for off-edge motion detection in *Drosophila*. *Current Biology : CB*, *24*(10), 1062–1070. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.051>
- Silies, M., Gohl, D. M., Fisher, Y. E., Freifeld, L., Clark, D. A., & Clandinin, T. R. (2013). Modular use of peripheral input channels tunes motion-detecting circuitry. *Neuron*, *79*(1), 111–127.
- Smarandache-Wellmann, C. R. (2016). Arthropod neurons and nervous system. *Current Biology*, *26*(20), R960–R965. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.063>
- Smolka, J., & Hemmi, J. M. (2009). Topography of vision and behaviour. *Journal of Experimental Biology*, *212*(21), 3522–3532. <https://doi.org/10.1242/jeb.032359>
- Sobel, E. C. (1990). The locust's use of motion parallax to measure distance. *Journal of Comparative Physiology A*, *167*(5), 579–588. <https://doi.org/10.1007/BF00192653>
- Spivak, E. (1997). Cangrejos estuaries del Atlántico sudoccidental (25°–41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Invest Mar Valparaiso (Chile)*, *25*, 105–120.
- Spivak, E. D. (2010). The crab *Neohelice* (=Chasmagnathus) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*, *64*(3), 149–154. <https://doi.org/10.1007/s10152-010-0198-z>
- Srinivasan, M., Zhang, S., Lehrer, M., & Collett, T. S. (1996). Honeybee navigation en route to the goal: visual flight control and odometry. *The Journal of Experimental Biology*, *199*(1), 237–244.
- Srinivasan, M. V., Lehrer, M., Zhang, S. W., & Horridge, G. A. (1989). How honeybees measure their distance from objects of unknown size. *Journal of Comparative Physiology A*, *165*(5), 605–613. <https://doi.org/10.1007/BF00610992>
- Strausfeld, N.J. (2012). *Arthropod Brains: Evolution, Functional Elegance, and Historical Significance*. Belknap Press.
- Strausfeld, N J, & Nässel, D. R. (1980). Neuroarchitecture of brain regions that subserve the compound eyes of Crustacea and insects. *Handbook of Sensory Physiology*, *VII A*, *6*, 1.
- Strausfeld, Nicholas J. (1991). Structural organization of male-specific visual neurons in calliphorid optic lobes. *Journal of Comparative Physiology A*, *169*(4), 379–393.

<https://doi.org/10.1007/BF00197652>

Strother, J. A., Nern, A., & Reiser, M. B. (2014). Direct observation of ON and OFF pathways in the *Drosophila* visual system. *Current Biology*, *24*(9), 976–983.

Sun, H., & Frost, B. J. (1998). Computation of different optical variables of looming objects in pigeon nucleus rotundus neurons. *Nature Neuroscience*, *1*(4), 296–303.

<https://doi.org/10.1038/1110>

Sztarker, J. (2006). *Organización neuroanatómica y funcional de neuronas involucradas en diferentes aspectos del aprendizaje visual de Chasmagnathus*. (Tesis Doctoral) [Universidad de Buenos Aires]. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3910_Sztarker

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*. *The Journal of Comparative Neurology*, *513*(2), 129–150.

<https://doi.org/10.1002/cne.21942>

Sztarker, J., Strausfeld, N. J., & Tomsic, D. (2005). Organization of optic lobes that support motion detection in a semiterrestrial crab. *Journal of Comparative Neurology*, *493*(3), 396–411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.20755>

Sztarker, J., & Tomsic, D. (2004). Binocular visual integration in the crustacean nervous system. *Journal of Comparative Physiology A*, *190*(11), 951–962. <https://doi.org/10.1007/s00359-004-0551-2>

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. *Journal of Comparative Physiology A*, *194*(6), 587–596.

<https://doi.org/10.1007/s00359-008-0333-3>

Sztarker, J., & Tomsic, D. (2011). Brain modularity in arthropods: individual neurons that support “what” but not “where” memories. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(22), 8175–8180.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6029-10.2011>

Sztarker, J., & Tomsic, D. (2014). Neural organization of the second optic neuropil, the medulla, in the highly visual semiterrestrial crab *Neohelice granulata*. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(14), 3177–3193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.23589>

Taghert, P. H., & Nitabach, M. N. (2012). Peptide neuromodulation in invertebrate model

- systems. *Neuron*, 76(1), 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.035>
- Takemura, S., Bharioke, A., Lu, Z., Nern, A., Vitaladevuni, S., Rivlin, P. K., Katz, W. T., Olbris, D. J., Plaza, S. M., Winston, P., Zhao, T., Horne, J. A., Fetter, R. D., Takemura, S., Blazek, K., Chang, L.-A., Ogundeyi, O., Saunders, M. A., Shapiro, V., ... Chklovskii, D. B. (2013). A visual motion detection circuit suggested by *Drosophila* connectomics. *Nature*, 500(7461), 175–181. <https://doi.org/10.1038/nature12450>
- Theobald, J. C., Greiner, B., Wcislo, W. T., & Warrant, E. J. (2006). Visual summation in night-flying sweat bees: A theoretical study. *Vision Research*, 46(14), 2298–2309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.visres.2006.01.002>
- Tomsic, D. (2016). Visual motion processing subserving behavior in crabs. *Current Opinion in Neurobiology*, 41, 113–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.09.003>
- Tomsic, D., Berón de Astrada, M., & Sztarker, J. (2003). Identification of Individual Neurons Reflecting Short- and Long-Term Visual Memory in an Arthropod. *The Journal of Neuroscience*, 23(24), 8539 LP – 8546. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-24-08539.2003>
- Tomsic, D., & Maldonado, H. (2014). Neurobiology of Learning and Memory of Crustaceans. In C. Derby & M. Thiel (Eds.), *Crustacean Nervous Systems and their Control of Behavior (third volume of a ten-volume set on The Natural History of Crustaceans)* (pp. 509–534). Oxford University Press.
- Tomsic, Daniel, & Romano, A. (2013). Chapter 26 - A Multidisciplinary Approach to Learning and Memory in the Crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*. In R. Menzel & P. R. B. T.-H. of B. N. Benjamin (Eds.), *Invertebrate Learning and Memory* (Vol. 22, pp. 337–355). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415823-8.00026-5>
- Tomsic, Daniel, & Sztarker, J. (2019). *Crustacean Visual Circuits Underlying Behavior*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.210>
- Tomsic, Daniel, Sztarker, J., Berón de Astrada, M., Oliva, D., & Lanza, E. (2017). The predator and prey behaviors of crabs: from ecology to neural adaptations. *The Journal of Experimental Biology*, 220(13), 2318–2327. <https://doi.org/10.1242/jeb.143222>
- Trischler, C., Boeddeker, N., & Egelhaaf, M. (2007). Characterisation of a blowfly male-specific neuron using behaviourally generated visual stimuli. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(5), 559–572. <https://doi.org/10.1007/s00359-007-0212-3>

- Volz, S. G., Basil, J., & Grasso, F. W. (2012). *Crayfish Inspired Representation of Space via Haptic Memory in a Simulated Robotic Agent BT - Biomimetic and Biohybrid Systems* (T. J. Prescott, N. F. Lepora, A. Mura, & P. F. M. J. Verschure (eds.); pp. 286–297). Springer Berlin Heidelberg.
- von Reyn, C. R., Breads, P., Peek, M. Y., Zheng, G. Z., Williamson, W. R., Yee, A. L., Leonardo, A., & Card, G. M. (2014). A spike-timing mechanism for action selection. *Nature Neuroscience*, *17*(7), 962–970. <https://doi.org/10.1038/nn.3741>
- Wachenfeld, A., & Hausen, K. (1994). The role of male-specific visual interneurons in the mating behavior of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Meig.). *Göttingen Neurobiology Report*, *440*.
- Wagenaar, D. A., Hamilton, M. S., Huang, T., Kristan, W. B., & French, K. A. (2010). A hormone-activated central pattern generator for courtship. *Current Biology : CB*, *20*(6), 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.027>
- Wang-Bennett, L. T., Pfeiffer, C., Arnold, J., & Glantz, R. M. (1989). Acetylcholine in the crayfish optic lobe: concentration profile and cellular localization. *The Journal of Neuroscience*, *9*(6), 1864 LP – 1871. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-06-01864.1989>
- Wiederman, S. D., Shoemaker, P. A., & O'Carroll, D. C. (2008). A Model for the Detection of Moving Targets in Visual Clutter Inspired by Insect Physiology. *PLOS ONE*, *3*(7), e2784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002784>
- Wiederman, S. D., Shoemaker, P. A., & O'Carroll, D. C. (2013). Correlation between OFF and ON channels underlies dark target selectivity in an insect visual system. *Journal of Neuroscience*, *33*(32), 13225–13232.
- Wiederman, S., & O'Carroll, D. (2011). Discrimination of Features in Natural Scenes by a Dragonfly Neuron. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*, 7141–7144. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0970-11.2011>
- Wilson, E. O. (1988). *The current state of biological diversity. Biodiversity*. (E. O. Wilson (ed.)). National Academic Press.
- Wolff, G. H., & Strausfeld, N. J. (2015). Genealogical correspondence of mushroom bodies across invertebrate phyla. *Current Biology*, *25*(1), 38–44.
- Wu, J. S., Vilim, F. S., Hatcher, N. G., Due, M. R., Sweedler, J. V., Weiss, K. R., & Jing, J. (2010). Composite Modulatory Feedforward Loop Contributes to the Establishment of a Network

- State. *Journal of Neurophysiology*, 103(4), 2174–2184.
<https://doi.org/10.1152/jn.01054.2009>
- Wu, L. Q., Niu, Y.-Q., Yang, J., & Wang, S.-R. (2005). Tectal neurons signal impending collision of looming objects in the pigeon. *European Journal of Neuroscience*, 22(9), 2325–2331.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04397.x>
- Wu, M., Nern, A., Williamson, W. R., Morimoto, M. M., Reiser, M. B., Card, G. M., & Rubin, G. M. (2016). Visual projection neurons in the *Drosophila* lobula link feature detection to distinct behavioral programs. *ELife*, 5, e21022. <https://doi.org/10.7554/eLife.21022>
- Yamawaki, Y., & Toh, Y. (2009). Responses of descending neurons to looming stimuli in the praying mantis *Tenodera aridifolia*. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(3), 253–264. <https://doi.org/10.1007/s00359-008-0403-6>
- Zar, J. H. (2007). *Biostatistical Analysis (5th Edition)*. Prentice-Hall, Inc.
- Zeil, J., & Al-Mutairi, M. (1996). The variation of resolution and of ommatidial dimensions in the compound eyes of the fiddler crab *Uca lactea annulipes* (Ocypodidae, Brachyura, Decapoda). *The Journal of Experimental Biology*, 199(7), 1569 LP – 1577.
<http://jeb.biologists.org/content/199/7/1569.abstract>
- Zeil, J., & Hemmi, J. (2006). The visual ecology of fiddler crabs. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 192, 1–25.
<https://doi.org/10.1007/s00359-005-0048-7>
- Zeil, J., & Hemmi, J. (2019). *Crabs and Their Visual World* (Second E. Choe (ed.); pp. 201–212). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90101-8>
- Zhu, Y. (2013). The *Drosophila* visual system: From neural circuits to behavior. *Cell Adhesion & Migration*, 7(4), 333–344. <https://doi.org/10.4161/cam.25521>