



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA

Área de Biología Celular

**ESTUDIOS HISTOGENÉTICOS Y NEUROQUÍMICOS EN LA AMÍGDALA  
SUBPALIAL-AMÍGDALA EXTENDIDA DE AVES DURANTE EL  
DESARROLLO**

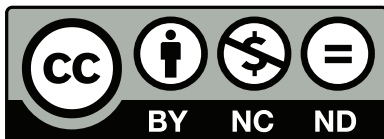
**Daniel Pineda Tenor**



**SPICUM**  
servicio de publicaciones

AUTOR: Daniel Pineda Tenor

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:  
Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización  
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar,  
transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de  
la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA

Área de Biología Celular

Dr. D. Salvador Guirado Hidalgo, Catedrático del Departamento de Biología Celular,  
Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga

y

Dr. D<sup>a</sup> María Ángeles Real Avilés, Profesora Contratada Doctora del Departamento de  
Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Estudios Histogenéticos y Neuroquímicos en la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida de Aves Durante el Desarrollo”** presentada por D. **Daniel Pineda Tenor** ha sido realizada bajo su dirección y supervisión, en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, y que presenta para la obtención del grado de Doctor en Biología.

En Málaga a 29 de Mayo de 2007

Fdo.: Salvador Guirado Hidalgo

Fdo.: María Ángeles Real Avilés



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA

Área de Biología Celular

Dr. D. José Becerra Ratia, Director del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que D. **Daniel Pineda Tenor** ha realizado en los laboratorios de este departamento el trabajo experimental que ha permitido la elaboración de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, expido el presente informe

En Málaga a 29 de Mayo de 2007

Fdo.: José Becerra Ratia

The amygdala is important for emotions,  
emotions are important for learn,  
and learn is important for everythings.

**L. Puelles**

La ciencia será siempre una búsqueda,  
jamás un descubrimiento real.  
Es un viaje, nunca una llegada.

**Karl Popper**

La única posibilidad de descubrir los límites de lo posible  
es aventurarse un poco más allá de ellos,  
hacia lo imposible.

**Arthur C. Clarke**

# Agradecimientos

Heme aquí, sumido en un extraño estado de melancolía, ante un tiempo que termina y un incierto destino aún por precisar. El fin de una era, la esperada conclusión de mi tesis doctoral. Han sido años de esfuerzos y desvelos, de luchas y sacrificios persiguiendo un objetivo difuso en un horizonte perdido que ahora, tan cercano, se torna dulce y calido en el ocaso de sus días.

Salvador, estimado codirector, mi más leal compañero y terrible inquisidor, no puedo sino esbozar una sonrisa cuando miro atrás y recuerdo todos esos momentos compartidos en el seno del laboratorio, esas charlas a media tarde, a caballo entre las posibles homologías del isocórtex de mamíferos y el inconfundible sonido de un inspirado Satriani. Gracias por ser crítico cuando otros complacientes, por ser duro cuando lo merecía y tenderme una mano cuando lo necesitaba. Gracias por ser mi maestro (perdón, **Maestro**, con mayúscula y en negrita) en este arte, y por forjar en mí un carácter investigador.

MariAngels...qué puedo decir, energía pura e ilusión en su tarea de codirección. No se dejen engañar, señores míos, pues bajo la serena belleza de sus facciones se esconde el más grande de los corazones y todo un espíritu luchador. Has sido para mí confidente y amiga, guía de avatares científicos e inspiradora en los momentos de crisis y desilusión. Gracias por compartir conmigo este camino, contigo se queda todo mi cariño y mi admiración.

José Carlos, mi tercer gran formador, siempre dispuesto a desglosar la quintaesencia de la más sutil cuestión. Tú me has enseñado que no existe el tiempo, que no hay lugares inadecuados ni momentos inoportunos cuando la duda asoma en la mente de tu pupilo. Gracias por enseñarme el significado de los términos paciencia y dedicación.

Loreta, que me acogiste en tu laboratorio, allá por las tierras murcianas. Me abriste la mente hacia nuevas perspectivas, nuevas formas de entender la ciencia, y por qué no decirlo, de afrontar los giros del destino. Ha sido todo un honor el haberte conocido. Gracias por tu apoyo y por tu cariño, sinceramente, tienes en mí a un amigo.

Me gustaría tener además una mención especial para dos científicos claves en mi proceso de formación. En primer lugar, gracias, Sr. Luis Puellas, por tu generosidad, por compartir con mis directores y conmigo parte de tu sabiduría y de tu buen hacer. Sin tí esta tesis hubiese sido bien distinta. En segundo lugar, gracias amigo Chelo, heraldo de la profundidad intrínseca de toda existencia y defensor de las causas perdidas. Tu constante aliento y tu ejemplo constituyen una fuente de inspiración para todo aquel que te rodea.

Compañeros todos, miembros de los laboratorios a los que he pertenecido...ojalá pudiese dedicaros a cada uno de vosotros un párrafo donde expresar lo que habéis significado para mí, pero el espacio es breve y vosotros, por suerte para mí, habéis sido un montón. Gracias Luis por esas largas conversaciones cuyos ecos aún resuenan en mis oídos, por ser testigo silencioso de los grandes momentos de mi vida, y por haber estado ahí, lloviera o hiciera frío, siempre que me hizo falta un amigo. Gracias Bea por todos esos instantes compartidos, por ser la incondicional cómplice de grandes sueños y efímeros destinos. Te deseo lo mejor en el nuevo camino que has emprendido. Gracias a ti, Eli, por alegrar cada mañana con tu amplísima sonrisa, y a ti, Juan, por contar siempre conmigo. Gracias a MariCharming, primero alumna, luego amiga, y finalmente compañera de fatigas, por ser un soplo de aire fresco dentro y fuera del laboratorio, tú y yo sabemos que llegarás hasta donde quieras; y gracias a ti, Rocío, mi muy estimada “apañera”, por todo tu aliento, por cada charla, por cada risa, por cada momento. El haberte conocido es una de las mejores cosas que me llevo de este recorrido. Gracias también a vosotros, mis colegas murcianos, por hacerme sentir como en casa esos meses que estuve fuera. Gracias a la siempre ocurrente Luisa, a la incombustible Silvia, al filósofo-científico Antonio, y como no, a mi gran secuaz, compañero infatigable de bodegas y cantinas gran Juanísimo. El solo pensar en vosotros hace que me ponga de lo más sentimental...¡¡Os echo de menos amigos!!

Quiero agradecer también, cómo no, al departamento de Biología Celular, Fisiología y Genética, y muy especialmente a su director, José Becerra, el haber puesto a mi disposición los medios materiales e intelectuales necesarios para llevar a cabo la presente tesis doctoral. Un recuerdo especial para Antonia, siempre muy atenta conmigo, y para Ana, la secretaria más eficiente del mundo. Me alegro muchísimo de que estés de nuevo entre nosotros.

No sé si este es el momento y el lugar, pero no puedo dejar pasar la oportunidad de expresar mi agradecimiento a otras personas que han contribuido de una u otra forma a mi formación. Gracias a Pepe Ferrer, quien en aquellos lejanos tiempos de instituto despertó mi interés por la Biología, y que influyó de forma definitiva en la decisión final de iniciar esta andadura. Gracias a Victoria de Andrés, ahora Mevi, por hacer que me ilusionase con la carrera en mis primeros pasos académicos, hará ya unos nueve años, por su constante aliento y por su estupenda amistad. Gracias a los profesores Ramón Muñoz Chápuli y Jaime Rodríguez, pues aun sin ser conscientes de ello han sido para mí grandes referentes y modelos a seguir, no sólo por su calidad docente, sino también por la serenidad y el honor de la que se impregnan cada una de sus acciones. Gracias a Antonio Alonso, por haber sido un amigo dentro y fuera de las aulas, por sus sabios consejos y por todos esos proyectos inconclusos que quizás algún día se hagan realidad. Gracias a Antonio de Vicente por haber estado ahí y apoyarme en varios momentos de crisis (significó mucho para mí), y finalmente muchas gracias a vosotros, Miguel Ángel y Eduardo, pues fuisteis los primeros en creer en mis posibilidades y en abrirme las puertas de vuestro laboratorio. Vuestra generosidad nunca será olvidada.

Gracias también a todos vosotros, aquellos que con orgullo puedo llamar mis amigos, por vuestra enorme dosis de paciencia y comprensión a lo largo de todo este proyecto, pero sobre todo por las calidas tertulias, las grandes fiestas, los conciertos, los viajes y por todos los inolvidables momentos que juntos hemos compartido.

Por fin ha llegado el momento, familia, de poder agradeceros, aunque sea en unas pocas líneas, todo lo que habéis hecho por mí. A mis hermanos, Roberto, Loli y Salomé, mis más cercanos amigos y confidentes, que siempre habéis apostado por mí en los buenos y los malos momentos. A mis tíos y primos (sois tantos que perdí la cuenta), cariñosos en todo momento, con especial mención a mi tío Tomás, al que juro dedicaría ese Nobel que tan excesivamente optimista siempre espera que consiga. A mis suegros, Miguel y Reme, que me acogieron como un hijo en el seno de su familia, los más interesados en las evoluciones y progresos de esta tesis. A mis cuñadas, Mari Trini y Cristina, transmisoras de energía e ilusión. Y cómo no, a mis padres, los grandes protagonistas de esta historia, gracias a vosotros me he convertido en el hombre que soy hoy día. Siempre habéis estado ahí, alentando mis esperanzas, dándome muchísimo más de lo que sin duda merecía, haciendo que esta vida sea digna de ser vivida. A mi Madre, Lola (creo que es la primera vez que te llamo por tu nombre), de tí heredé la inquietud, el ansia por la sabiduría, por buscar más allá de toda norma establecida. Nuestras sendas son diferentes, pero conducen a un mismo destino. A mi Padre, Antonio, fuerza y orgullo en estado puro, tú me enseñaste a no retroceder jamás por difícil que se tornase el camino, a luchar por lo que es justo, a levantarme cien veces aún antes de haberme caído. Vuestro y no mío es el mérito de lo que aquí veréis escrito.

Gracias a tí, Maria del Mar, por haber sido siempre tú. No puedo recordar qué colores tenía el mundo cuando no estabas conmigo, hace ya más de diez años. No puedo imaginar cómo sería la vida sin tu mirada serena, sin la calidez de tu abrazo, sin la guía de tus pasos. Has sufrido y luchado conmigo, eres dueña de cada instante verdadero, de cada noche de desvelo, de cada sueño, de cada anhelo. Gracias por hacer que todo tenga sentido.



A mis Padres  
A María del Mar





# Índice

# Índice

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.- Introducción General.....	3
2.- Divisiones Histogenéticas del Telencéfalo y su Relación con el Complejo Amigdalino.....	4
3.- Organización Funcional de la Amígdala.....	7
4.- La Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida.....	9
5.- Tipos Neuronales en la Amígdala.....	12
6.- Nomenclatura.....	14
<b>Planteamiento y Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
1.- Obtención y Procesamiento del Material Histológico.....	17
2.- Manipulación de Plásmidos y Síntesis de Sondas para Hibridación <i>in situ</i> .....	18
3.- Técnicas de Hibridación <i>in situ</i> .....	23
4.- Técnicas Inmunohistoquímicas.....	27
5.- Tinciones Generales Tipo Nissl.....	31
6.- Adquisición y Manipulación de Imágenes. Elaboración de Esquemas, Láminas y Textos.....	31
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
1.- Localización Topográfica de la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida.....	33
2.- Descripción Histoquímica e Inmunocitoquímica de la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida.....	38

2.1.- La División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”.....	38
2.2.- La División Medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”.....	49
2.3.- El Corredor nNOS.....	56
2.4.- El Área Subpalial Amigdalina.....	63
2.5.- La Amígdala Hipocampal.....	73
2.6.- El Núcleo Taeniae de la Amígdala.....	82
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>91</b>
1.- Patrones Generales de Expresión de Tbr1, Dlx5, Pax6, Nkx2.1 y Shh en el Complejo de la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida de Aves durante el Desarrollo Temprano.....	92
2.- Patrones Generales de Distribución de GABA, Calbindina, Calretinina, Parvalbúmina y Síntasa del Óxido Nítrico en el Complejo de la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida de Aves durante el Desarrollo.....	95
3.- Definición del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”.....	97
4.- Los Patrones de Expresión de GABA, Calbindina, Calretinina, Sintasa del Óxido Nítrico y del Factor de Transcripción Shh Sugieren una Compartimentalización en la División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”.....	98
5.- La División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” y el Núcleo Accumbens Muestran un Patrón de Expresión Diferencial para GABA, nNOS, Calretinina, Nkx2.1 y Pax6.....	101
6.- La División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” se Halla Estrechamente Relacionada con el Órgano Lateroseptal y Otros Órganos Circunventriculares Telencefálicos.....	103
7.- Los Marcadores Calbindina y el GABA Permiten Establecer los Límites Precisos de la División Medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”.....	106
8.- La División medial y la Región Caudal de la Porción Periférica 2 de la División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” Comparten Características Histoquímicas e Inmunocitoquímicas.....	108

9.- La Inmunorreactividad nNOS, Abundante en la Región Preóptica, está Presente en la División Medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” y Define una Nueva Estructura a la que Denominamos Corredor nNOS.....	110
10.- Las porciones preópticas hipotalámicas de la división medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” y del Corredor nNOS quedan incluidas en bandas paralelas de diferentes características histogenéticas.....	112
11.- El Área Subpalial Amigdalina se Halla Estrechamente Relacionada con el Sistema Estriatopalidal.....	114
12.- El Área Subpalial Amigdalina y la División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” como Estructuras Homólogas a la Amígdala Central Extendida de Mamíferos.....	116
13.- El Núcleo Taeniae de la Amígdala y la Amígdala Hipocampal Constituyen dos Estructuras bien Diferenciadas con Identidad Propia.....	119
14.- La Amígdala Hipocampal y el Núcleo Taeniae de la Amígdala como Derivados de los Palios Medial y Ventral.....	121
15.- La Amígdala Hipocampal como Estructura Homóloga al Área de Transición Amigdal-Hipocampal en Mamíferos.....	123
16.- El Núcleo Taeniae de la Amígdala como parte de la Amígdala Medial Extendida.....	126
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>130</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>134</b>

# Abreviaturas

<b>AA:</b> Arcopallio anterior	<b>Hi:</b> Hipocampo
<b>Ac:</b> Núcleo Accumbens	<b>MD:</b> Mesopallio dorsal
<b>AD:</b> Arcopallio dorsal	<b>ME:</b> Mesopallio
<b>AEP:</b> Área entopeduncular	<b>MV:</b> Mesopallio ventral
<b>AHi:</b> Amígdala hipocámpal	<b>NCA:</b> Núcleo de la comisura anterior
<b>AI:</b> Arcopallio intermedio	<b>NI:</b> Nidopallio
<b>AId:</b> Arcopallio intermedio dorsal	<b>NIC:</b> Nidopallio caudal
<b>AIv:</b> Arcopallio intermedio ventral	<b>NCL:</b> Nidopallio caudolateral
<b>AM:</b> Arcopallio medial	<b>NIF:</b> Nidopallio frontal
<b>AP:</b> Arcopallio posterior	<b>NIP:</b> Núcleo intrapeduncular
<b>APHi:</b> Área parahipocámpal	<b>NPV:</b> Núcleo paraventricular
<b>ASp:</b> Área amigdalina subpallial	<b>OAE:</b> Órgano de la amígdala extendida
<b>ASpL:</b> Área amigdalina subpallial lateral	<b>OLS:</b> Órgano lateroseptal
<b>ASpM:</b> Área amigdalina subpallial medial	<b>OLSl:</b> Órgano lateroseptal lateral
<b>BAS:</b> Núcleo Basalis	<b>OLSm:</b> Órgano lateroseptal medial
<b>BO:</b> Bulbo olfatorio	<b>om:</b> tracto occipitomesencefálico
<b>BST:</b> Bed nucleus de la stria terminalis	<b>OSP:</b> Órgano striatopallidal
<b>BSTL:</b> Bed nucleus de la stria terminalis lateral	<b>OSPd:</b> Órgano striatopallidal, división distal
<b>BSTLmc:</b> BSTL, porción magnocelular	<b>OSPv:</b> Órgano striatopallidal, división ventricular
<b>BSTLp1:</b> BSTL, porción plexiforme 1	<b>OPH:</b> Órgano preoptohipotalámico
<b>BSTLp2:</b> BSTL, porción plexiforme 2	<b>P:</b> Pallio
<b>BSTM:</b> Bed nucleus de la stria terminalis medial	<b>Pa:</b> Pallido
<b>BSTM1:</b> BSTM, división 1	<b>PoA:</b> Núcleo posterior de la amígdala pallial
<b>BSTM2:</b> BSTM, división 2	<b>ROT:</b> Núcleo rotundo
<b>ca:</b> Comisura anterior	<b>SL:</b> Núcleo septolateral
<b>cp:</b> Comisura posterior	<b>SM:</b> Núcleo septomedial
<b>E:</b> Entopallio	<b>Sp:</b> Subpallio
<b>EGL:</b> Eminencia gangliónica lateral	<b>St:</b> Estriado
<b>EGM:</b> Eminencia gangliónica medial	<b>StL:</b> Estriado lateral
<b>ETh:</b> Eminentia thalami	<b>StM:</b> Estriado medial
<b>GP:</b> Globo pálido	<b>SV:</b> Núcleo subventricular
<b>H:</b> Hiperpallio	<b>TnA:</b> Núcleo taeniae de la amígdala
<b>HA:</b> Hiperpallio accesorio	<b>TO:</b> Techo óptico
<b>HD:</b> Hiperpallio dorsal	<b>to:</b> Trácto óptico
<b>HI:</b> Hiperpallio intermedio	<b>tsm:</b> Trácto septomesencefálico
	<b>vl:</b> Ventrículo lateral



# Introducción

# Introducción

## 1.- Introducción General

La amígdala se halla constituida por un conjunto muy heterogéneo de núcleos localizados en su conjunto en la base del telencéfalo caudal. Esta región, componente fundamental del sistema límbico, juega un papel fundamental en el comportamiento emocional del individuo, incluyendo aspectos relacionados con la sexualidad, integración social, motivación, aprendizaje, agresividad y miedo condicionado (Price et al., 1987; Amaral et al., 1992; Davis., 1992; Alheid et al., 1995; Swanson y Petrovich., 1998; Gallagher y Schoenbaum., 1999; LeDoux., 1992, 2000). La funcionalidad y estructuración de este complejo ha sido extensamente estudiada en mamíferos (Holmgren 1925; Alheid et al., 1995; Swanson y Petrovich., 1998; Martínez-García et al., 2006), habiendo sido propuesto un origen histogenético múltiple para los diferentes compartimentos que la constituyen. Así, la amígdala posee por una parte un componente palial, representado por los complejos basolateral y cortical, de características similares a las presentes en la corteza cerebral, destacando una elevada concentración de neuronas de proyección excitadoras, presumiblemente glutamatérgicas (Swanson y Petrovich., 1998), y una intensa expresión en su conjunto del factor de transcripción *Tbr1* (Smith-Fernández., 1998; Puelles et al., 1999, 2000, 2003), implicado en la diferenciación de este tipo neuronal (Hevner et al., 2001). Por otra parte, la amígdala cuenta con derivados subpaliales, que incluyen los complejos centromediales y sus respectivas porciones extendidas, caracterizados por la expresión de factores de transcripción de la familia *Dlx5*, involucrados en la adquisición del fenotipo neuronal GABAérgico (Puelles et al., 2000; Marín y Rubenstein, 2001; Stümer et al., 2002). El establecimiento de posibles regiones homólogas a la amígdala de mamíferos resulta en extremo complicada, dadas las enormes diferencias anatómicas existentes entre el telencéfalo de mamíferos y el resto de grupos vertebrados debidas en gran parte a la reestructuración del prosencéfalo que resulta de la aparición del isocórtex en mamíferos (Aboitiz, 1999; Lanuza et al., 1999; Aboitiz et al., 2002, 2003; Martínez-García et al., 2002). El presente estudio profundiza en el complejo de la amígdala subpalial-amígdala extendida de aves, aportando nuevos datos acerca del origen histogenético de cada uno de sus constituyentes, su desarrollo y caracterización inmunocitoquímica, la definición de los límites precisos de cada complejo y el establecimiento de sus posibles subdivisiones, así como la revisión y propuestas de homologías de estas regiones con la amígdala de mamíferos.



## 2.- Divisiones Histogenéticas del Telencéfalo y su Relación con el Complejo Amígdalino

La organización anatómica presente en el telencéfalo de los diferentes grupos de vertebrados resulta, al menos en apariencia, muy diferente. El estudio comparado del telencéfalo de anfibios, reptiles, aves y mamíferos por un gran número de neuroanatomistas a lo largo del pasado siglo ha conducido a múltiples interpretaciones y propuestas acerca de la homología existente entre los distintos compartimentos telencefálicos (Ariëns-Kappers, 1936; Kuhlenbeck, 1977; Striedter, 1997; Nieuwenhuys et al., 1998). El reciente descubrimiento de genes reguladores del desarrollo con patrones de expresión restringidos a regiones específicas del prosencéfalo embrionario constituye una poderosa herramienta para definir los dominios histogenéticos que integran el telencéfalo, así como para el establecimiento de sus límites precisos y propuesta de posibles homologías entre los distintos grupos de vertebrados (Bulfone et al., 1993; Puelles y Rubenstein, 1993; Rubenstein et al., 1994; Puelles et al., 1999, 2000; Medina y Reiner, 2000; Puelles y Rubenstein, 2003).

A grandes rasgos, desde los pioneros trabajos de Holmgren (1925), el telencéfalo de todos los vertebrados ha sido dividido en dos grandes regiones principales, como son el palio (dorsal) y el subpalio (ventral). Ambas estructuras se hallan conectadas al tallo de la vesícula evaginada telencefálica, donde se continúan con las comisuras telencefálicas, el área preóptica, el área entopeduncular y la *eminencia thalami*, estructuras que constituyen el prosencéfalo anterior no evaginado (denominado por algunos autores “telencéfalo impar”). Las subdivisiones paliales y subpaliales del telencéfalo de aves y mamíferos han sido analizadas en base a los patrones de expresión de los genes *Tbr1*, *Emx1*, *Dlx5*, *Nkx2.1*, *Pax6* y *Shh* entre otros (Esquema 1) (Shimamura et al., 1997; Smith-Fernández et al., 1998; Puelles et al., 1999, 2000; Marín y Rubenstein, 2001; Puelles y Rubenstein, 2003), los cuales codifican para factores de transcripción que desempeñan funciones esenciales en el desarrollo del telencéfalo, tal y como han revelado los análisis de mutantes (Kimura et al., 1996; Anderson et al., 1997; Stoykova et al., 1996; Grindley et al., 1997; Caric et al., 1997).

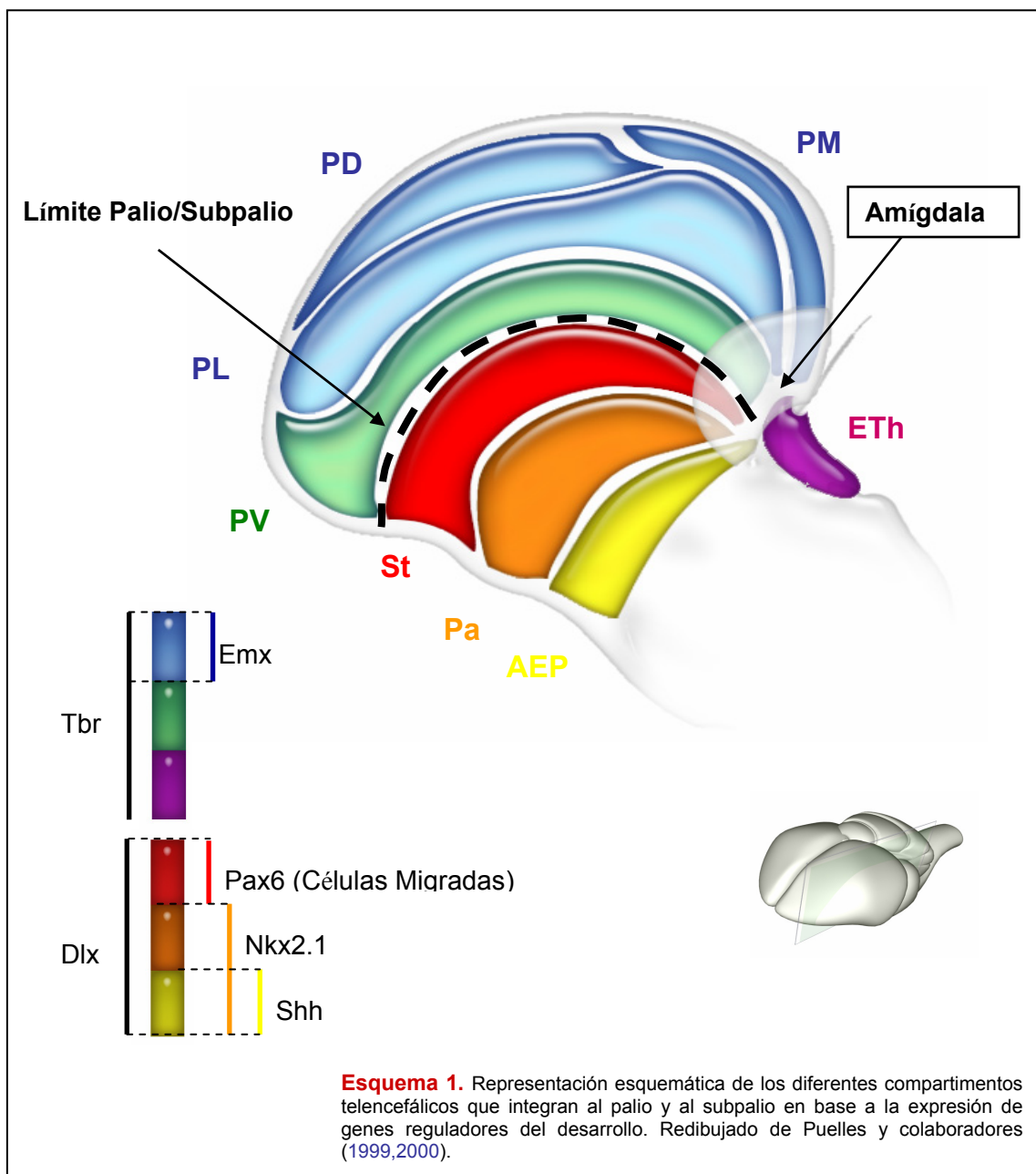
El palio de vertebrados puede ser compartimentalizado, de acuerdo a la topografía y a los patrones de expresión genética, en cuatro territorios histogenéticos bien diferenciados, tales como son el palio medial, dorsal, lateral y ventral (Puelles et al., 1999, 2000; Puelles y Rubenstein, 2003). El dominio medial del palio incluye al hipocampo, área parahipocampal y amígdala hipocampal, mientras que el dominio dorsal se constituye por la corteza general en mamíferos y el Wulst en el telencéfalo de

aves. El palio lateral se halla constituido por una porción superficial, formada por la corteza piriforme u olfativa, y por una región nuclear, integrada en mamíferos por la parte dorsolateral del claustró y la amígdala basolateral, y en aves por el mesopalio y gran parte del arcopalio. Estos dominios expresan en su conjunto los factores de transcripción *Tbr1* y *Emx1*, constituyendo la ausencia de señal para este último marcador una característica diferencial del palio ventral. Este último dominio comprende en mamíferos al claustró ventromedial, a la amígdala lateral y al bulbo olfatorio, núcleo olfatorio anterior y tracto olfatorio lateral. En aves, el palio ventral incluye al nidopalio (bulbo olfatorio, nidopalio caudolateral y caudomedial, entopalio, área L y núcleo basalis), así como al arcopalio medial y al núcleo taeniae de la amígdala (Puelles et al., 2000; Redies et al., 2001; Redies y Puelles., 2001; Puelles y Rubenstein., 2003).

El subpalio de vertebrados ocupa una posición ventral al palio, hallándose rodeado parcialmente por este compartimento. En su conjunto, el área subpalial expresa de forma intensa los genes de la familia *Dlx*, por lo que el límite palial/subpalial puede ser definido en base a los bordes de expresión *Tbr1/Dlx5*. Esta región se halla subdividida en dos complejos bien diferenciados, como son el estriado y el pálido, que se extienden longitudinalmente desde la región septal hasta el complejo amígdalino (Puelles et al., 2000; Puelles y Rubenstein., 2003) El estriado, originado a partir de la eminencia gangliónica lateral, se caracteriza por mostrar una intensa expresión de los genes de la familia *Wnt*, habiendo sido descrita además la presencia de una elevada población de células *Pax6* positivas migradas desde el palio que se disponen de forma especialmente abundante en las regiones estriatales adyacentes al límite palio/subpalio. Este compartimento incluye al estriado medial y lateral (clásicamente definidos en aves como lóbulo paraolfatorio y *paleostriatum augmentatum*), así como al núcleo accumbens y a la región sublenticular que constituye la recientemente descrita área amígdalina subpalial en el telencéfalo de aves (Medina y Reiner., 1995; Puelles et al., 1999, 2000; Garda et al., 2002; Reiner et al., 2004; Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2005) El pálido por su parte, originado a partir de la eminencia gangliónica medial, muestra un fuerte marcaje para el factor de transcripción *Nkx2.1*, y se halla constituido por el globo pálido (denominado clásicamente *paleostriatum primitivum* en aves) y por el tubérculo olfatorio posterior, así como por el complejo del *bed nucleus de la stria terminalis* (Puelles et al., 1999, 2000; Puelles y Rubenstein., 2003).

Los diferentes dominios telencefálicos, tanto paliales y subpaliales, se continúan a través del tallo de la vesícula telencefálica con las estructuras no evaginadas del prosencéfalo rostral. La *eminencia thalami*, de fuerte expresión *Tbr1* y *Pax6*, constituye

una continuación caudal del palio medial, habiéndose postulado como la región de origen del núcleo intersticial de la *stria medullaris* de mamíferos y aves, así como de al menos una parte del núcleo taeniae de la amígdala (Puelles et al., 2000). El complejo del *bed nucleus de la stria terminalis*, de naturaleza eminentemente palidal, posee por su parte una continuación extratelencefálica hacia la región del área entopeduncular/área preóptica, mostrando al igual que estas regiones una fuerte señal para el factor de transcripción Shh y una total ausencia de marcaje para *Nkx2.1* (Shimamura et al., 1997; Marín y Rubenstein, 2002; Puelles y Rubenstein, 2003).

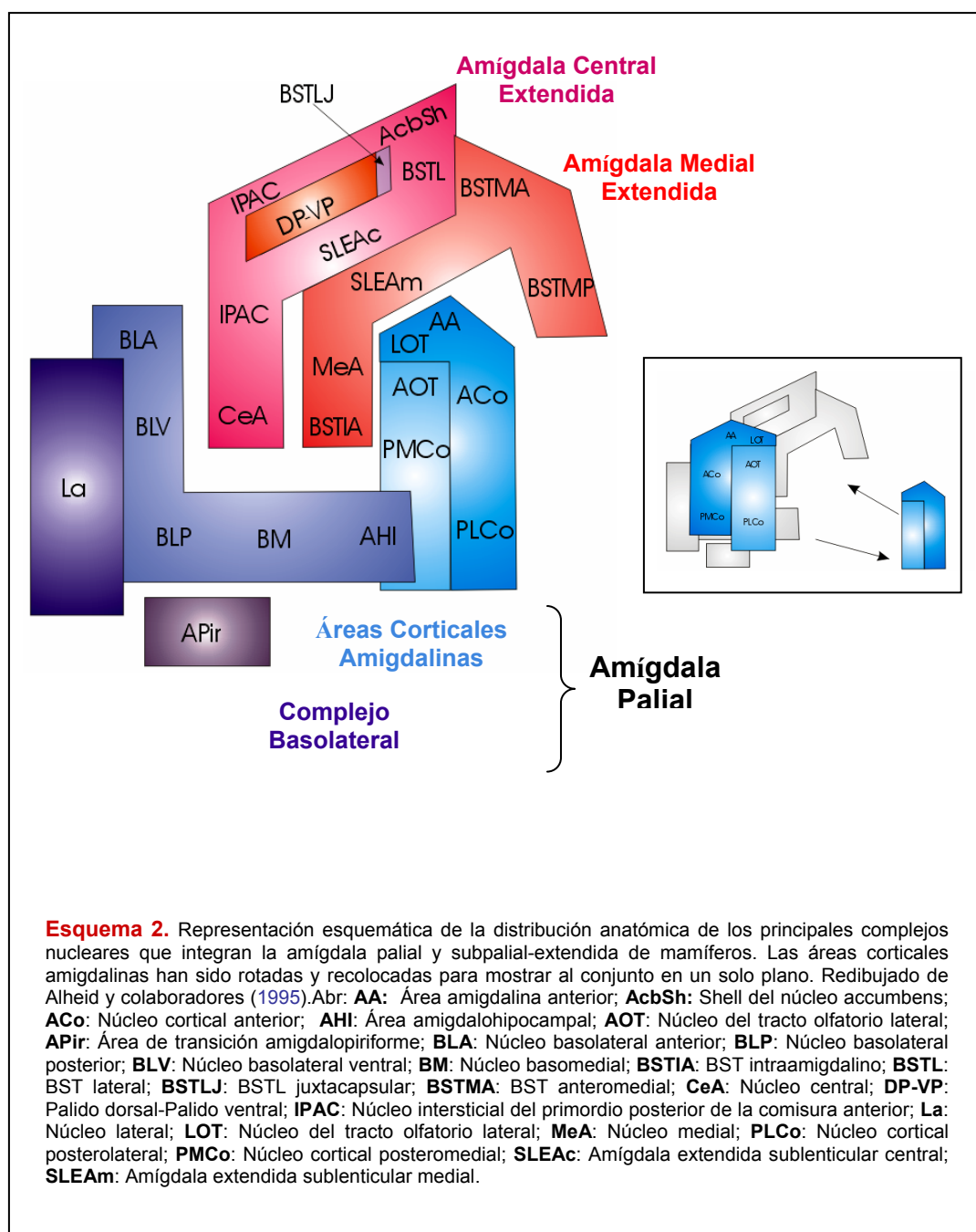


### 3.- Organización Funcional de la Amígdala

El sistema límbico se halla constituido en mamíferos por una serie de estructuras complejas que se disponen a modo de arco en torno a la región talámica, entre las que se incluyen la amígdala, el bulbo olfatorio, el hipocampo, el hipotálamo y el septum. En su conjunto, estas regiones se hallan interconectadas entre sí, jugando un papel esencial en el control del comportamiento emocional, sexual y social, en la regulación autónoma y en el establecimiento de ciertos tipos de memoria (LeDoux, 1992, 2000; Aggleton, 2000; Swanson, 2000; Dolan, 2002; Morgane et al., 2005). El sistema límbico no ha sido definido con precisión en el prosencéfalo de aves, pero en base a criterios topológicos y hodológicos se ha propuesto que debe incluir a la formación hipocampal (hipocampo y área parahipocampal), al área cortical dorsolateral, al complejo amígdalino (núcleo taeniae de la amígdala, núcleo posterior de la amígdala palial y área subpalial amígdalina), al *bed nucleus de la stria terminalis* y la región del septum (Zeier y Karten, 1971; Casini et al., 1986; Veenman et al., 1995; Durstewitz et al., 1999; Atoji y Wild, 2004; Atoji y Wild, 2005; Yamamoto y Reiner, 2005). Las funciones para el sistema límbico de aves se consideran muy similares a las propuestas en el caso de mamíferos, constituyendo la amígdala en ambos casos el principal centro de recepción e integración de información la sensorial y de la regulación de sus respuestas (Bingman et al., 1984; Thompson et al., 1998, Cheng et al., 1999; Absil et al., 2002).

El complejo amígdalino de mamíferos ha sido dividido en cuatro regiones funcionalmente diferentes en base fundamentalmente a sus características de conectividad y distribución de neurotransmisores (Esquema 2). De esta forma, los componentes paliales de la amígdala, tales como son el complejo basolateral y las áreas corticales amígdalinas forman parte de los sistemas cortical frontotemporal (o asociativo) y del sistema olfatorio principal. Estas estructuras reciben aferencias sensoriales talámicas (información visual y auditiva) y del bulbo olfatorio principal (información olfativa), proyectan hacia los componentes subpaliales de la amígdala y hacia el hipotálamo, mostrando además importantes conexiones recíprocas con diferentes áreas de la corteza cerebral y con el hipocampo (Ono et al., 1985; McDonald y Culbertson, 1986; Petrovich et al., 1996; Swanson y Petrovich, 1998; Martínez-García et al., 2002). Se ha postulado que estos componentes amígdalinos se hallen involucrados en el reconocimiento consciente de la emoción y en la toma de decisiones en base al contexto, la experiencia previa y la memoria, así como en el aprendizaje asociativo ante determinados estímulos, tales como el miedo condicionado (Swanson y Petrovich., 1998; Swanson, 2000; Stefanacci y Amaral, 2002; DeGelder, 2005). Por otra parte, el componente subpalial de la amígdala incluye a los complejos central y medial

amigdalinos, relacionados respectivamente con el sistema autonómico y el sistema olfatorio accesorio (o vomeronasal) (Swanson y Petrovich., 1998; Puelles et al., 2000). Estos sistemas se hallan involucrados en las respuestas reflejas relacionadas con los sistemas neuroendocrino y autónomo, esenciales en los comportamientos relacionados con la defensa, la reproducción y la ingestión (Swanson y Petrovich, 1998; Swanson, 2000; DeGelder, 2005).



## 4.- La Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida

Los estudios clásicos realizados por Johnston (1923) en base al desarrollo y la neuroanatomía comparada de la amígdala pusieron de manifiesto la estrecha relación existente entre el núcleo accumbens, el complejo del *bed nucleus* de la *stria terminalis* y los núcleos centrales y mediales de la amígdala. Estudios posteriores basados en técnicas de tipo Golgi, marcadores neuroquímicos y trazado de conexiones han corroborado la existencia de una continuidad anatómica entre los componentes subpaliales de la amígdala (complejo centromedial), el *bed nucleus de la stria terminalis* y las columnas de células que interconectan estas estructuras, dando lugar a una macroestructura funcionalmente relacionada definida por Alheid, DeOlmos y Heimer como amígdala extendida. Estos autores han propuesto además que este complejo se halla subdividido en dos regiones anatómica y funcionalmente bien diferenciadas, que asocian por una parte al núcleo central de la amígdala y a la división lateral del BST y por otra al núcleo medial de la amígdala y a la división medial del BST respectivamente (Alheid y Heimer, 1988, 1995; Swanson y Petrovich, 1998; De Olmos y Heimer, 1999; Swanson, 2000; McDonald, 1983, 2003).

La **Amígdala Extendida Medial** constituye en mamíferos un continuo anatómico entre el complejo medial, las porciones ventromediales de la *substantia innominata* y las divisiones mediales del *bed nucleus de la stria terminalis*. El núcleo medial de la amígdala, así como parte de la división medial del BST forman parte del sistema olfatorio accesorio, recibiendo importantes aferencias procedentes del bulbo olfatorio accesorio (área cortical sensorial primaria que transmite la información feromonal), y en menor medida, del bulbo olfatorio principal. Además, esta región mantiene conexiones recíprocas con la corteza prefrontal medial y la corteza insular agranular (implicadas en el procesamiento de información visceral y gustativa), con el subiculum ventral del hipocampo (relacionado con el establecimiento de la memoria), y con el hipotálamo medial (involucrado en comportamientos defensivos, ingestivos y reproductores), proyectando al mismo tiempo hacia regiones estriatales (núcleo accumbens y amígdala central) y hacia la parte medial del núcleo talámico mediodorsal, el cual contacta a su vez con la corteza prefrontal medial y a la corteza insular agranular regulando el sistema (Ottersen, 1982, Hurley et al., 1991; McDonald et al., 1996; McDonald, 1998, 2003; Alheid et al., 1995; Grove, 1998; DeOlmos y Heimer, 1999; Swanson, 2000).

Se ha propuesto que en aves la amígdala extendida medial se halla constituida por el núcleo taeniae de la amígdala, considerado homólogo al núcleo medial de mamíferos, y por la división medial del *bed nucleus de la stria terminalis* (Esquema 3) (Reiner et al., 2004; Martínez-García et al., 2006). La ausencia de bulbo olfatorio accesorio en aves, representante de las principales aferencias del sistema olfatorio accesorio de mamíferos, implica una profunda reorganización de la amígdala medial extendida en aves, de tal forma que la regulación de los comportamientos reproductivos y defensivos, altamente dependientes de señales olfatorias en mamíferos (Wood, 1997; Wood y Coolen, 1997, Coolen y Wood, 1999; Wood y Swann, 2000), dependerán en mayor medida de las respuestas ante estímulos visuales y auditivos (Balthazart y Ball, 1998; Absil et al., 2002). La homología entre el núcleo taeniae de la amígdala de aves y el núcleo medial de mamíferos constituye sin embargo un tópico actualmente aceptado, en base fundamentalmente a las alteraciones conductuales derivadas de las lesiones realizadas en estas estructuras (modificación de los patrones defensivos, afectivos, reproductivos y de aprendizaje) (Phillips, 1964; Cohen, 1971; Harris y Sachs, 1975; Dafters, 1976; Masco y Carrer, 1980; Phillips y Youngren, 1986; Kondo, 1992; Rajendren y Moss, 1993; Lowndes y Davies, 1994; Kondo y Arai, 1995; Kondo y Yamanouchi, 1995; Thompson et al., 1998; Absil et al., 2002), a la distribución característica de receptores de andrógenos, receptores de estrógenos (alpha y beta) y de aromatasa presentes en el conjunto de la amígdala extendida medial (Watson y Adkins-Regan, 1989; Balthazart et al., 1989, 1992, 1998; Gahr et al., 1993, 1997; Ball et al., 1999; Bernald et al., 1999; Foidart et al., 1999; Absil et al., 2001) y a las similitudes holológicas mostradas por ambas regiones. En este contexto, el núcleo taeniae de la amígdala constituye una de las principales dianas para las proyecciones del bulbo olfatorio (Reiner y Karten, 1985), proyecta hacia el territorio estriatal que comprende al núcleo accumbens y al área amígdalina subpalial (Cheng et al., 1999; Martínez-García et al., 2006), proyecta hacia la región preóptica medial y los núcleos lateral y medial del hipotálamo posterior (Zeier y Karten, 1971; Cheng et al., 1999) y contacta con el sistema septo-hipocampal a través de proyecciones hacia el septum ventrolateral y por medio de conexiones recíprocas con el área parahipocampoal (Canteras et al., 1995; Cheng et al., 1999).

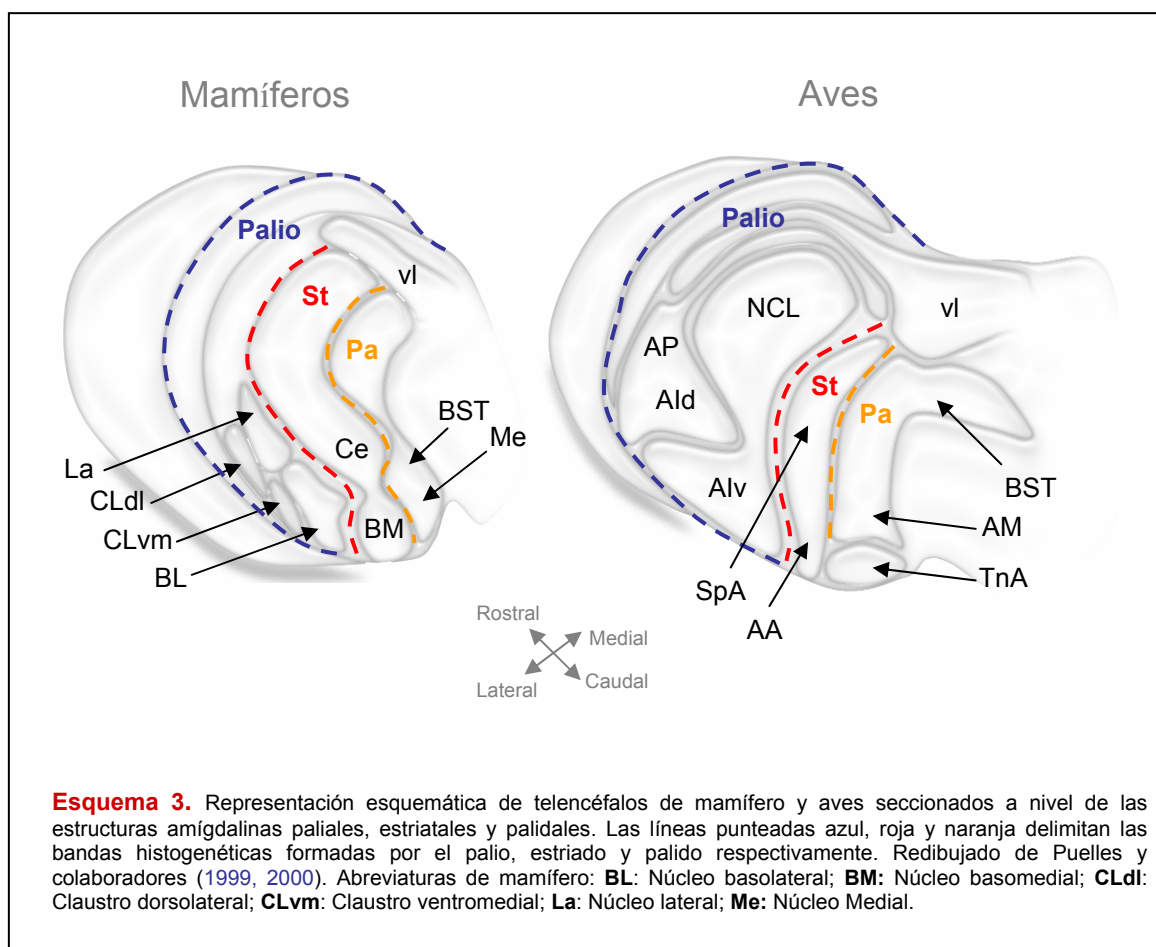
La **Amígdala Extendida Central** constituye en mamíferos un continuo anatómico entre el complejo central, las porciones dorsolaterales de la *substantia innominata*, la parte medial del núcleo intersticial del primordio posterior de la comisura anterior y las divisiones laterales del *bed nucleus de la stria terminalis*. Estas estructuras forman parte del sistema autonómico, recibiendo aferencias desde los sistemas olfatorios accesorio y principal, así como de las regiones amígdalinas

implicadas con estos sistemas (Krettek et al., 1978; Ottersen, 1982; Canteras et al., 1992, 1995; Petrovich et al., 1996; Pitkänen et al., 1997), desde la corteza prefrontal medial, insular agranular y subicular ventral del hipocampo (Ottersen, 1982; Hurley et al., 1991; Canteras et al., 1992; McDonald et al., 1996), desde el núcleo del tracto solitario y núcleo parabraquial (involucrados en la transmisión de información gustativa, visceroceptica y nociceptica) (Ricardo et al., 1978; Bernard et al., 1993), desde el núcleo talámico paraventricular (Moga et al., 1995) y del sistema amígdalino frontotemporal asociativo principalmente a través del núcleo lateral amígdalino, participando de esta forma en la regulación del sistema y la modulación de la respuesta en función del contexto (como por ejemplo el miedo condicionado) (Krettek et al., 1978; Pitkänen et al., 1997). Por otra parte, el núcleo central de la amígdala proyecta a centros del tronco encefálico de control del sistema nervioso autónomo, entre los que se incluyen el núcleo motor dorsal del nervio vago, el núcleo del tracto solitario y el núcleo parabraquial (Hopkins et al., 1978), al área hipotalámica lateral y sustancia gris periacueductal, reguladoras de las respuestas autónomas (Hopkins et al., 1978; Bandler et al., 1994) y a parte del núcleo reticular pontino, implicado probablemente en la modulación de la alerta acústica y otros reflejos (Rosen et al., 1991; Swanson y Petrovich., 1998; Swanson, 2000).

Se ha propuesto que en aves la amígdala extendida central se halla integrada por el área subpalial amígdalina, cuya topología, conectividad y expresión neuroquímica es muy similar a la porción sublenticular de la amígdala extendida central de mamíferos; y por la división lateral del *bed nucleus de la stria terminalis* (Esquema 3) (Reiner et al., 2004; Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; Martínez-García et al., 2006). Así, estas regiones reciben aferencias desde el nidopalio caudolateral, el arcopalio dorsal y parte del arcopalio ventral, consideradas por algunos autores como estructuras homólogas a la amígdala basolateral de mamíferos (Veenman et al., 1997; Kroner y Gunturkun, 1999), junto con proyecciones desde el tálamo, incluyendo a la región periovoidal (Durand et al., 1992) y al tálamo posterior intralaminar (Wild, 1987). Además, las relaciones de conectividad establecidas entre el conjunto BSTL/ASp y las regiones del hipotálamo lateral, sustancia negra, región parabraquial, complejo vago dorsal y núcleo del tracto solitario son muy similares a las descritas en la amígdala central extendida de mamíferos (Berk, 1985, 1987; Wild et al., 1990).

Por otra parte, los datos neuroquímicos también apoyan la propuesta de homología entre el BSTL/ASp de aves y la amígdala extendida central de mamíferos, ambas ricas en neuronas “corticotropin releasing factor” (Richard et al., 2004) y neurotensina positivas (Atoji et al., 1996; Reiner et al., 2004), así como una densa innervación de fibras marcadas para CGRP (Lanuza et al., 2000)





## 5.-Tipos neuronales en la amígdala

La funcionalidad del complejo amigdalino requiere una actividad coordinada por parte de las neuronas de proyección excitadoras que utilizan el glutamato como neurotransmisor (Smith y Paré, 1994; McDonald, 1996; Swanson y Petrovich, 1998) e interneuronas inhibitoras de carácter GABAérgico (McDonald, 1982, 1985; Carlsen, 1988; Millhouse y DeOlmos, 1983). La participación conjunta de ambos tipos neuronales es fundamental para la integración de los diferentes estímulos sensoriales y motores, constituyendo el número y diversidad de las interneuronas GABAérgicas un factor decisivo para la integración de la información y la elaboración de respuestas. Así, las interneuronas GABAérgicas constituyen una población heterogénea de células implicadas en la modulación, mediante sinapsis del tipo inhibitorio, de las neuronas glutamatérgicas de proyección, regulando de esta forma la actividad de los circuitos intrínsecos de la amígdala (Guirado y Dávila, 1999; Freund, 2003; Hestrin y Galateria,

2005). Las diferentes subpoblaciones GABAérgicas presentes en el telencéfalo de vertebrados expresan de forma diferencial diversos tipos de marcadores neuroquímicos, entre los que se encuentran las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina; la sintasa del óxido nítrico (o con actividad NADPH-diaforasa) y diversos neuropéptidos (Gulyás et al., 1991; Dávila et al., 1991, 1993, 1995, 1997, Martínez-Guijarro y Freund, 1992; Valtschanoff et al., 1993; Gabbott y Bacon, 1995; Freund y Buzsáki, 1996; Yan et al., 1996; Kemppainen y Pitkanen, 2000; Guirado et al., 2003). La elevada solubilidad de estas moléculas les permite estar presentes en todo el citosol, aún en las dendritas distales y axones, permitiendo de esta forma el estudio de la morfología celular y de la integración sináptica. Además, la expresión característica restringida a determinadas poblaciones celulares constituye una poderosa herramienta para el establecimiento de límites precisos entre las diferentes regiones nucleares, así como para la definición de subdivisiones morfológicas y funcionales (Braun, 1990; Celio, 1990; Baimbridge et al., 1992; Vincent y Kimura, 1992; Brüning, 1993; Veenman y Reiner, 1994; Cozzi et al., 1997; Dávila et al., 2005; Legáz et al., 2005).

El GABA (ácido gamma-aminobutírico) constituye un derivado del ácido glutámico, obtenido a partir de su descarboxilación por la glutamato-descarboxilasa. Este neurotransmisor juega un papel clave durante el desarrollo, participando en la diferenciación y la sinaptogénesis de las neuronas de proyección, participando además en la modulación de la actividad de multitud de circuitos neurales. El déficit en esta molécula ha sido asociado con alteraciones en el aprendizaje y la memoria (Cremer et al., 1994; Bukalo et al., 2004), incremento de la ansiedad, agresividad e hiperactividad (Stork et al., 1999, 2000), y estados patológicos propios de la esquizofrenia (Williams et al., 2003; Yang et al., 2003; Corfas et al., 2004; Corvin et al., 2004), el Parkinson y la corea de Huntington (Galvan y Wichmann., 2007).

Las proteínas ligadoras de calcio juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las concentraciones óptimas de calcio intracelular, esencial en la regulación de numerosos procesos celulares, incluyendo la regulación de canales iónicos y la liberación de neurotransmisores. La presencia de estas proteínas durante el desarrollo temprano ha sido asociada con procesos de migración celular y el crecimiento de las prolongaciones sinápticas (Enderlin et al., 1987; Hendrickson et al., 1991; Andressen et al., 1993; Komuro y Ralic, 1996), mientras que las alteraciones en los niveles de estas proteínas conducen a disfunciones y muerte celular (Schanne et al., 1979; Farber, 1981; Jancso et al., 1984; Siesjö, 1986; Deshpande et al., 1987; Choi, 1988). Diversos estudios inmunohistoquímicos han demostrado la participación de estas proteínas en neuropatologías tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

(Guentchev et al., 1997), la esquizofrenia (Beasley y Reynolds, 1997), la epilepsia (DeFelipe, 1999), la encefalitis por SIDA (Masliah et al., 1995) y el Alzheimer (Heizmann y Braun, 1992; Leuba et al., 1998).

El óxido nítrico es un neurotransmisor gaseoso esencial en el establecimiento de determinados tipos de sinapsis químicas y en eventos de plasticidad neuronal. Su síntesis, a partir de L-arginina, es catalizada por la sintasa del óxido nítrico en presencia de calcio/calmodulina. La distribución de esta sintasa del óxido nítrico es característica de diferentes regiones cerebrales, hallándose generalmente asociada a interneuronas de carácter GABAérgico (Valtschanoff et al., 1993; Gabbott y Bacon, 1995; Yan et al., 1995, 1997). Esta molécula ha sido asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington o el Parkinson (Norris et al., 1996; Moreno-López y González-Forero, 2006).

## 6.- Nomenclatura

A lo largo de la presente tesis doctoral se ha empleado la nomenclatura actualizada y revisada por el grupo de expertos que integran el *Foro para la Nomenclatura de Aves* (Reiner et al., 2004). La definición de las nuevas subdivisiones y complejos nucleares derivadas del estudio aquí realizado han sido rotuladas de forma coherente con las pautas propuestas por el foro, reflejando en la medida de lo posible la localización (Vg. divisiones periféricas del BSTL), estructura (Vg. corredor nNOS) y posible homología (Vg. amígdala hipocampal) de cada región.

# Planteamiento y Objetivos

Los recientes estudios en base a la expresión de genes implicados en el desarrollo, distribución de marcadores neuroquímicos, conectividad de las diferentes regiones cerebrales y lesiones de áreas localizadas han supuesto un importante avance acerca en la comprensión del complejo de la amígdala subpalial-amígdala extendida en el telencéfalo de aves, habiendo sido propuestos como integrantes de esta macroestructura al núcleo taeniae de la amígdala, al área amigdalina subpalial y al *bed nucleus de la stria terminalis* en su conjunto. Sin embargo, la organización funcional de estas estructuras, los límites y subdivisiones presentes en las mismas y las posibles homologías con relación a otros grupos de vertebrados continúan aún hoy siendo motivo de una fuerte controversia. En este sentido, el presente trabajo pretende avanzar en la resolución de los tópicos anteriormente propuestos mediante la realización de un análisis detallado de los diferentes compartimentos histogénéticos integrados en el complejo amigdalino de aves, así como de la distribución de los distintos tipos celulares implicados en la formación de sus circuitos neuronales en función de la presencia de marcadores tales como el GABA, las proteínas ligadoras de calcio o la enzima de síntesis del óxido nítrico.

## Objetivos

**1.-** Análisis del origen histogénético de los distintos componentes de la amígdala subpalial-amígdala extendida de aves mediante el empleo de genes implicados en el desarrollo, como son el *Tbr1*, *Dlx5*, *Pax6*, *Nkx2.1* y *Shh*.

**2.-** Caracterización, en base a los patrones de expresión diferenciales de GABA, calbindina, calretinina, parvalbúmina y sintasa del óxido nítrico, de las distintas poblaciones neuronales presentes en el complejo amigdalino subpalial-extendido de aves.

**3.-** Profundización en la formación y desarrollo a lo largo de los estadios embrionarios e individuo adulto de los diferentes núcleos que integran la amígdala subpalial-amígdala extendida de aves en función de los cambios de distribución mostrados por los marcadores neuroquímicos propios de las subpoblaciones GABAérgicas.



# **M**aterial & **Métodos**

# Material y Métodos

## 1.- Obtención y Procesamiento del Material Histológico

Durante la realización de la presente tesis doctoral se han utilizado ejemplares de la especie *Gallus gallus domesticus* en distintas fases del desarrollo (comprendidas entre E8 y la eclosión del huevo) así como individuos postnatales y adultos. Los huevos recién fecundados fueron obtenidos a partir de fuentes comerciales e incubados en el laboratorio bajo unas condiciones controladas y constantes de temperatura (37°C), humedad relativa (60%) y volteo automático con ciclos de una hora. El mantenimiento y manipulación de todos los animales se realizó de acuerdo a las leyes de la Unión Europea (86/609/EEC) y del Gobierno Español (Real decreto 223/1998 y más recientemente Real Decreto 1021/2005).

Los embriones fueron extraídos del huevo mediante la práctica de un orificio de aproximadamente 1 cm de diámetro en la parte superior de la cáscara. El estadio de gestación exacto de los embriones extraídos fue corroborado mediante la observación directa de una serie de características anatómicas referenciales propuestas por Hamburger y Hamilton ([Hamburger and Hamilton., 1951](#)). Con anterioridad a cualquier tipo de manipulación se llevó a cabo el anestesiado de los animales, mediante la aplicación de bajas temperaturas en embriones tempranos (E8-E12) y eter dietílico en los estadios intermedios y avanzados del desarrollo (E14 y posteriores), y en individuos postnatales y adultos. Los tejidos de los animales pertenecientes a estadios superiores a 10 días de gestación fueron fijados mediante perfusión vascular. Las soluciones fijadoras utilizadas fueron el paraformaldehído al 4% y el glutaraldehído al 2.5% (esta última empleada tan solo en material destinado a inmunocitoquímica para la detección del GABA), diluidas ambas en tampón fosfato salino (PBS).

Tras la fijación los cerebros fueron quirúrgicamente extraídos del animal, aislados de los tejidos y membranas adyacentes y sometidos a un proceso de postfijación mediante inmersión en la misma solución fijadora usada durante la perfusión. La duración de este proceso osciló entre 12 y 72 horas, dependiendo del tamaño del cerebro, y se realizó en continuo movimiento a una temperatura de 4°C. Para su conservación durante largos periodos de tiempo los cerebros fueron lavados en PBS y posteriormente deshidratados mediante incubaciones sucesivas en etanol de gradación creciente, siendo finalmente almacenados en una solución de etanol 70° a -20°C. Posteriormente, llegado el momento de su uso, los cerebros fueron rehidratados, lavados en PBS, encastrados en agarosa (Sigma) al 4% y cortados mediante un vibratomo

(Leika Mod VT1000M). El grosor escogido fue de 70  $\mu\text{m}$  para aquellas secciones utilizadas en técnicas inmunocitoquímicas y de 120  $\mu\text{m}$  para las usadas en hibridación “in situ”.

Todos los instrumentos (material de disección y de vidrio, cánulas, pipetas, cuchichas, etc), tampones y reactivos utilizados en el procesamiento del material histológico destinado a hibridación “in situ” fueron previamente esterilizados mediante autoclave (30 minutos, 121°C), filtrados (diámetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ) o tratados con RnasaZap (Roche), con objeto de evitar la presencia de RNAsas capaces de degradar las ribosondas empleadas en la técnica.

## 2.- Manipulación de Plásmidos y Síntesis de Sondas para Hibridación In Situ

Las técnicas de hibridación *in situ* utilizadas en esta tesis permitieron detectar la expresión de ARNm en células y tejidos telencefálicos mediante el empleo de ribosondas complementarias marcadas con digoxigenina.

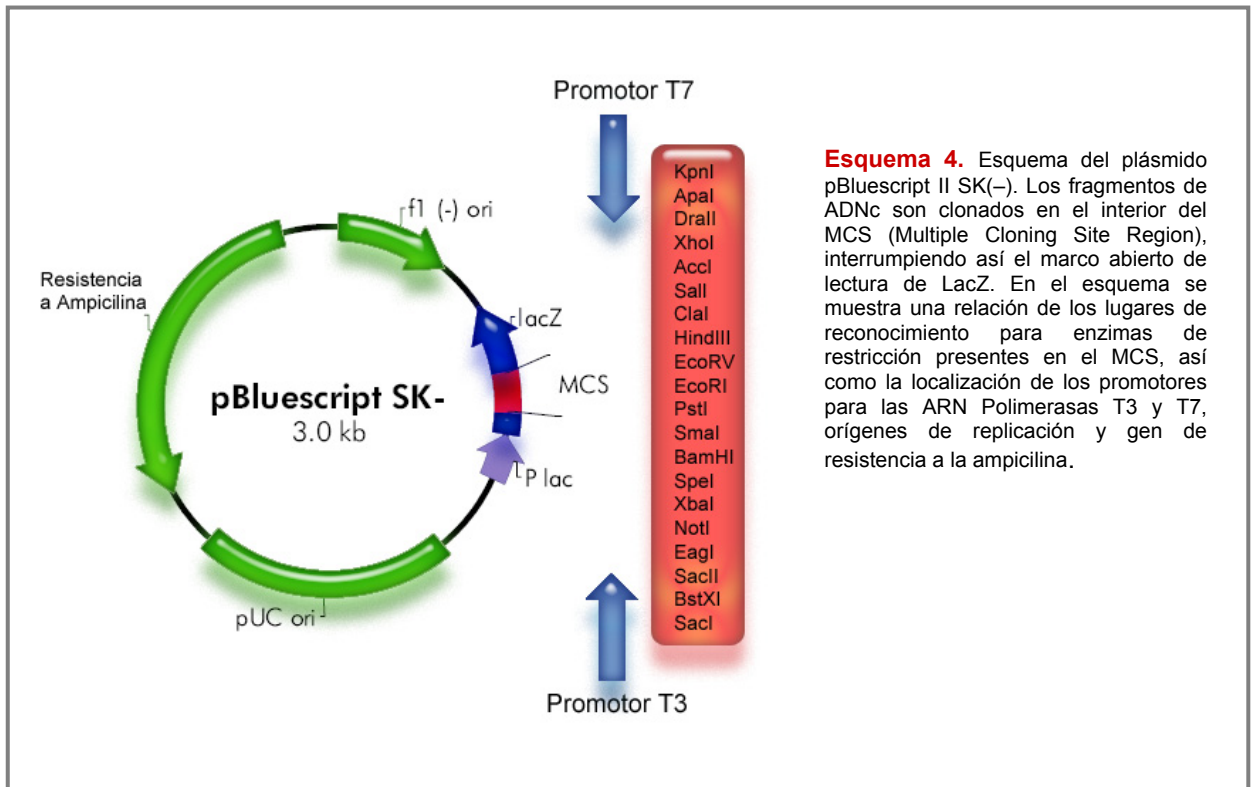
Dichas sondas fueron sintetizadas en el laboratorio mediante transcripción *in vitro* a partir de secuencias de ADNc correspondientes a fragmentos de los genes de interés clonados en un vector plasmídico.

Los plásmidos utilizados constituyen moléculas de ADN de doble cadena capaces de replicarse de forma independiente en el interior de una célula bacteriana y que han sido diseñados con una serie de características útiles para su selección. Así, la incorporación del gen de resistencia a Ampicilina permite seleccionar aquellas bacterias portadoras del plásmido en un medio enriquecido con dicho antibiótico, mientras que la presencia del gen *LacZ*, cuyo marco abierto de lectura es interrumpido por el fragmento de la secuencia del gen clonado, permite discriminar entre aquellas bacterias que incorporaron plásmidos con y sin inserto genético en medios sólidos suplementados con IPTG y X-Gal. Además, estos plásmidos poseen sitios de multiclonage (Multiple Cloning Site Region -MCS- o polylinker) con numerosas secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, así como lugares de unión específicos para ARN polimerasas, lo que posibilita la linealización del plásmido y posterior síntesis de la ribosonda (Esquema 4).

El procesamiento de cada uno de los plásmidos desde el momento de su cesión hasta la obtención de sondas antisentido útiles en el proceso de hibridación engloba una serie de pasos que son resumidos a continuación:

- **Amplificación Plasmídica:** Los plásmidos fueron amplificados mediante su incorporación en bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  en estado de competencia (Library Efficiency DH5alpha Competent cells; Invitrogen; Cat n° 18263-012). Este procedimiento recibe el nombre de **Transformación**, y fue llevado a cabo mediante choque térmico de las células bacterianas a 42°C durante 50 segundos. Posteriormente estas células fueron cultivadas en medio rico Agar Luria-Bertani (LB) a 37°C y agitación horizontal de 250 rpm durante 2 horas. Una vez obtenida una masa crítica celular se procedió a la selección de las bacterias portadoras de plásmido mediante siembra en placas de LB suplementadas con ampicilina (100 mg/ml; Sigma; Cat n°: A-9518), IPTG (100 mg/ml; Quantum Biotechnologies; Cat n°: IPTG02) y X-Gal (50 mg/ml; Promega; Cat n°: V3941), que fueron incubadas 12-13 horas a 37°C. La totalidad de las colonias crecidas en la placa proceden de bacterias que incorporaron el plásmido, ya que no fueron afectadas por la ampicilina. Sin embargo, no todos los plásmidos incorporados por las bacterias poseen el inserto genético. Así, en presencia del inductor IPTG el gen *LacZ* se expresa originando la enzima beta galactosidasa, la cual actúa sobre el X-Gal (análogo estructural de la Lactosa) degradándolo y generando de esta forma un precipitado insoluble que dota de color azul a las colonias. Estas colonias serán pues descartadas en favor de las de color blanco, las cuales proceden de bacterias que incorporaron plásmido circular con inserto, el cual como se comentó con anterioridad se ubica interrumpiendo el marco abierto de lectura del gen *LacZ* e imposibilitando de esta forma la expresión de la beta galactosidasa. De esta forma se seleccionaron colonias de color blanco, homogéneas y preferiblemente aisladas para evitar el efecto satélite (crecimiento de bacterias no resistentes a el antibiótico dentro del halo de inhibición generado por las bacterias resistentes) y se cultivaron en 50 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu$ g/ml) durante 12-13 horas a 37°C y agitación horizontal de 250 rpm.





**Esquema 4.** Esquema del plásmido pBluescript II SK(-). Los fragmentos de ADNc son clonados en el interior del MCS (Multiple Cloning Site Region), interrumpiendo así el marco abierto de lectura de LacZ. En el esquema se muestra una relación de los lugares de reconocimiento para enzimas de restricción presentes en el MCS, así como la localización de los promotores para las ARN Polimerasas T3 y T7, orígenes de replicación y gen de resistencia a la ampicilina.

- Extracción de los Plásmidos Circulares (MIDIPREP):** Una vez que los cultivos en fase exponencial alcanzaron una concentración aproximada de  $3-4 \times 10^9$  cells/ml se procedió a su centrifugación a 6000g durante 15 minutos, con objeto de obtener pellets bacterianos concentrados (peso seco en torno a 150 mg). Estos pellets fueron tratados con kits comerciales (QIAfilter Plasmid Midi Kit. Quiagen. Cat nº 12243) que permitieron mediante procesos de lisis alcalina y resinas de intercambio aniónico el aislamiento del ADN plasmídico y la eliminación de ADN genómico, ARN, proteínas, lípidos y moléculas de bajo peso molecular. Las concentraciones de plásmidos circulares obtenidas ( $0,5-2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) fueron cuantificadas mediante el uso de un espectrofotómetro y la aplicación directa de la ley de Lambert-Beer ( $C_{\mu\text{g}/\text{ml}} = A_{260} \times k$ , siendo el valor de  $k$  para ADN de doble cadena 50). Para determinar la calidad de los plásmidos (descartar posibles contaminaciones con ADN cromosómico, degradación parcial del plásmido, etc) se realizaron además análisis electroforéticos en geles de Agarosa al 1% (Voltage 100V; Intensidad 86mA) (Esquema 5).
- Digestión Enzimática de los Plásmidos Circulares:** Las ARN polimerasas utilizadas durante la síntesis de las ribosondas requieren que las hebras de ADN molde sean lineales, por lo que los plásmidos circulares fueron tratados con enzimas de restricción. Estas enzimas fueron escogidas en función de la posición del inserto genético dentro del polilinker y de la polimerasa a utilizar

durante el proceso de síntesis de la sonda (Tabla 1). Los plásmidos fueron linealizados a partir de mezclas de reacción constituidas por un volumen variable de plásmido circular (que contenga 10 µg), 2 µl de enzima de restricción comercial, 5 µl de tampón 10X específico para cada enzima y H<sub>2</sub>O libre de RNasas y Dnasas (Sigma. Cat n°:W4502) hasta alcanzar un volumen final de 50 µl. Tras 2 horas de incubación a 37°C los plásmidos lineales obtenidos fueron purificados mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitados con un 10% de acetato sódico 5.2M y un 10% de isopropanol. La concentración plasmídica fue cuantificada de la misma forma que en el apartado anterior (0,3-1 µg/µl) y la calidad de los plásmidos (digestiones parciales, presencia de plásmido circular, fragmentos degradados etc) fue determinada mediante análisis en gel de agarosa al 1% (Esquema 5).

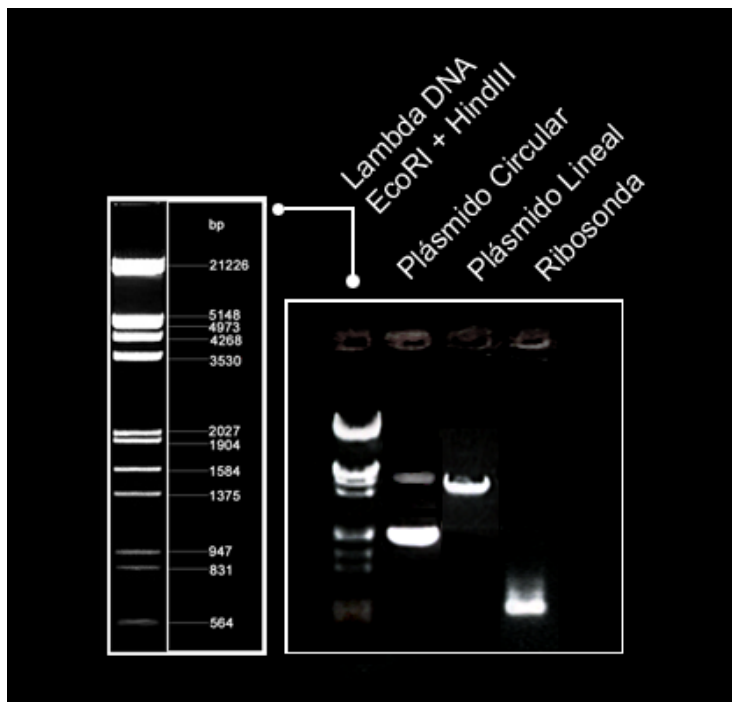
- **Síntesis de Ribosondas:** Las sondas de ARN fueron sintetizadas mediante transcripción *in vitro*, utilizando los plásmidos linealizados previamente como moldes de ADN. La presencia de promotores para distintas polimerasas localizados a ambos lados del polilinker (Esquema 4) permitió que la transcripción del inserto genético fuera realizada en ambos sentidos, obteniéndose así dos tipos de sondas:
  - **Sondas Antisentido:** Poseen una secuencia complementaria a los ARNm a detectar mediante las técnicas de hibridación *in situ*, por lo que son utilizados como marcadores.
  - **Sondas Sentido:** Su secuencia carece de complementariedad con los mensajeros diana, por lo fueron usadas en los controles negativos de la técnica para asegurar la ausencia de uniones inespecíficas.

Para la obtención de cada una de las sondas se preparó una mezcla de reacción consistente en un volumen de plásmido lineal variable (concentración final en torno a 5 µg), 2 µl de una mezcla de ribonucleótidos trifosfato (10mM de ATP, CTP y GTP; 6.5mM de UTP y 3.5mM de digoxigenina-UTP diluidos en 0.1M de Tris-HCl pH 7.5), 1 µl de inhibidor de RNasas (Roche; Cat n°:700025), 2 µl de tampón de transcripción (Roche; suministrado junto a las polimerasas), 2 µl de ARN Polimerasas (Tabla 1) y un volumen variable de H<sub>2</sub>O libre de RNasas hasta alcanzar los 20 µl finales. La mezcla de reacción se incubó durante 3 horas a 37°C, añadiendo 20 minutos antes de la finalización de este periodo 2 µl de la enzima Dnasa I (Roche, Cat.No.776785) para eliminar el plásmido lineal de ADN. Tras comprobar la síntesis en gel de agarosa al 1,5% se

procedió a su purificación mediante un kit comercial (Quick Spin Columns; Roche; Cat n°:1274015). La concentración de sonda obtenida (0,05-0,5 µg/µl) fue determinada mediante el empleo de un espectrofotómetro ( $C_{\mu\text{g/ml}} = A_{260} \times k$ , siendo el valor de  $k$  para ARN de cadena sencilla 40) y su calidad determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Esquema 5).

<i>Gen</i>	<i>Tbr1</i>	<i>Shh</i>	<i>Nkx2.1</i>	<i>Dlx5</i>	<i>Pax6</i>
<b>Laboratorio de Procedencia</b>	J. Rubenstein			P. Gruss	K. Yasuda
<b>Vector</b>	pBluescript SK -				pSP73
<b>Tamaño del Inserto (Kb)</b>	3	1,6	1,5	1,45	1,3
<b>Enzima Restricción Sentido</b>	XhoI	EcoRI	XhoI	XhoI	BamHI
<b>Enzima Restricción Antisent</b>	<b>BamHI</b>	<b>HindIII</b>	<b>BamHI</b>	<b>BamHI</b>	<b>EcoRV</b>
<b>ARN Polimerasa Sentido</b>	T3	T7	T3	T3	SP6
<b>ARN Polimerasa Antisent</b>	<b>T7</b>	<b>T3</b>	<b>T7</b>	<b>T7</b>	<b>T7</b>

**Tabla 1.** Relación de genes estudiados, tamaño de los insertos de ADNc y vectores plasmídicos en los que fueron clonados, enzimas de restricción utilizadas en la linealización de los plásmidos y polimerasas adecuadas para la síntesis de las sondas sentido y antisentido. Los plásmidos fueron cedidos de forma desinteresada por los investigadores responsables de los laboratorios de procedencia gracias a la mediación del Dr. Luis Puelles y de la Dra Loreta Medina. XhoI (Roche, Cat n°:10703770001); BamHI (Roche, Cat n°:10567604001); EcoRI (Roche, Cat n°:10703737001); EcoRV (Roche, Cat n°:10667145001); HindIII (Roche, Cat n°: 10656313001); T3 (Roche, Cat n°: 11031163001); T7 (Roche, Cat n°:10881767001); SP6 (Roche, Cat n°:110810274001).



**Esquema 5.** Fotografía de un gel de agarosa transiluminado con radiación ultravioleta en la que se muestran a modo de ejemplo representativo las bandas electroforéticas correspondientes al plásmido circular, plásmido lineal y ribosonda antisentido del gen *Nkx2.1*. El patrón de pesos moleculares utilizado durante todo el proceso fue el Lambda DNA EcoRI+HindIII (Fermentans; cat. n°:#SM0191). Es frecuente encontrar dos bandas de diferente intensidad y localización al migrar un plásmido circular procedente de una MIDIPREP. Así, la banda mas intensa (posición inferior) corresponde al plásmido circular en su forma superenrollada, mientras que la banda de menor intensidad (posición superior) indica la presencia de plásmido linealizado de forma accidental. Nótese pues la coincidencia entre esta banda y la situada en la calle adyacente, la cual muestra un plásmido linealizado mediante digestión enzimática.

### 3.- Técnicas de Hibridación In Situ

Las técnicas de hibridación *in situ* permiten realizar un análisis espacio-temporal de la expresión genética durante el desarrollo en base a la detección de ARN mensajeros mediante el uso de sondas antisentido marcadas. En el presente estudio se han empleado sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina, molécula acoplada a parte de los UTP utilizados durante la síntesis de la ribosonda (ver apartado anterior) y que puede ser detectada mediante la adición de anticuerpos específicos conjugados con fosfatasa alcalina. A continuación realizaremos una descripción del protocolo utilizado, basado en el original de Shimamura (Shimamura et al., 1994) y modificado con recomendaciones del Nonradioactive In situ Hybridization Application Manual (Roche; Segunda edición de 1996).

La experimentación se realizó mediante incubación de las secciones de tejido en flotación (free-floating), utilizando instrumental, tampones y reactivos libres de RNasas en todos los pasos previos a la adición de las sondas. Las etapas del proceso fueron las siguientes:

- **Tratamiento con Proteinasa K:** Con el objetivo de permeabilizar las membranas celulares los cortes fueron tratados con una solución de Proteinasa K (Roche, Cat.No. 745723) 10 µg/ml diluida en PBT (PBS pH 7.4 0,1M suplementado con un 0,1% de Tween20). Tras 3 minutos de incubación sin agitación se realizaron 2 lavados rápidos de 5 minutos con PBT, en agitación suave y temperatura ambiente.
- **Postfijación:** Durante el proceso de hibridación y en las etapas posteriores el tejido es sometido a temperaturas elevadas y tratamientos continuados con detergentes. Por este motivo, con el objetivo de mantener la integridad de las secciones, se realizó una postfijación en paraformaldehído al 4% - glutaraldehído 0,25% durante 20 minutos a temperatura ambiente y agitación suave.
- **Prehibridación:** Tras realizar 3 lavados abundantes en PBT de 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente y agitación suave, los cortes fueron preincubados en una solución 1:1 de PBT: Tampón de Hibridación (50% Formamida (Ambion; cat n°:9342), 0,75M NaCl, 1X PE (10X: 100mM PIPES pH 6,8 y 1mM EDTA), 100µg/ml tRNA (Sigma; cat n°:R-5636), 0,5mg/ml Heparina (Sigma; cat n°:H-3393), 0,5% CHAPS (Sigma; cat n°:C-3023) y 0,1% Tween 20 (Sigma; cat n°:P-7949)). Posteriormente se llevó a cabo la prehibridación del tejido con tampón de hibridación durante 1 hora a 58°C.

- **Hibridación:** Las secciones fueron incubadas a 58°C durante toda la noche en tampón de hibridación suplementado con 1 µg/ml de ribosonda antisentido, de secuencia complementaria al ARNm a detectar y marcada con digoxigenina (ver apartado *Síntesis de Ribosondas*).
- **Eliminación de Uniones Inespecíficas y Sonda no Hibridada:** Si bien la elevada temperatura a la que se realiza la hibridación dificulta las uniones inespecíficas de la sonda y otros fragmentos de ARN, estos pueden tener lugar en baja proporción. Para eliminar tanto estas uniones inespecíficas como los restos de sonda no hibridada presentes en el tejido los cortes fueron lavados con una serie de tampones que describimos a continuación:
  - Tampón 1 (300mM NaCl, 1XPE y 0,1% Tween20): 2 lavados de 30 minutos a 58°C.
  - Tampón 1,5 (50mM NaCl, 1XPE y 0,1% Tween20): 2 lavados de 30 minutos a 50°C.
  - Tampón Rnasa (10mM PIPES pH7,2; 500mM NaCl y 0,1% Tween 20): Lavado rápido de 5 minutos a 37°C.
  - Tratamiento con Rnasa A 100µgr/ml (Roche; cat. n°:109142) en tampón de Rnasa: Lavado de 1 hora a 37°C.
  - Tampón Rnasa: Lavado rápido de 5 minutos a 37°C.
  - Tampón 2 (50% Formamida, 300mM NaCl, 1X PE y 0,1% Tween 20): 2 lavados de 30 minutos a 50°C.
  - Tampón 3 (50% Formamida, 150mM NaCl, 1X PE y 0,1% Tween20). Lavado de 30 minutos a 50°C.
  - Tampón 4 ( 500mM NaCl, 1X PE y 0,1% Tween20): 2 lavados de 20 minutos a 65°C.
  - MABT 1X (MAB 1X suplementado con 0,1% de Tween20 (MAB 5X: 0,4M ácido maleico y 0,75 m NaCl, pH7.5)): 2 Lavados de 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave.
- **Solución Bloqueante:** Previa adición del anticuerpo los cortes son incubados en una solución de MABT suplementada con un 10% Suero de oveja inactivado (sheep serum, Sigma; cat. n°:S-2263) y con un 2% del agente bloqueante de Boehringer (BBR, Roche; cat. n°:1096176), durante 1 hora a temperatura ambiente. Este paso evita las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo con proteínas propias del tejido.

- **Incubación en Anticuerpo Anti-Digoxigenina:** Los híbridos Ribosonda-ARNm son detectados mediante la adición de un anticuerpo anti-digoxigenina (Roche; cat. n°:109327) conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Las secciones fueron incubadas en una dilución 1:3500 durante toda la noche a 4°C.
- **Eliminación de Uniones Inespecíficas y Exceso de Anticuerpo:** Las bajas temperaturas a las que tiene lugar la adición del anticuerpo y el uso de agentes bloqueantes dificulta la formación de uniones inespecíficas entre la inmunoglobulina y proteínas presentes en el tejido, aunque estas pueden tener lugar en proporciones bajas. Para eliminar estas uniones inespecíficas, así como el excedente de anticuerpo no ligado, se realizaron un mínimo de 8 lavados en MABT 1X, de 30 minutos cada uno y en agitación suave.
- **Revelado de la Hibridación:** Las secciones fueron incubadas en tampón NTMT (100mM Tris pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> y 0,1% Tween20) suplementado con los sustratos de la fosfatasa alcalina, 75mg/ml NBT (Nitro Blue Tetrazolium, Roche; cat. n°:1585029) y 50 mg/ml BCIP (5-Bromo-5-Chloro-3-Indolylphosphate, p-toluidine SALT, Roche; cat. n°:1585002). Los tiempos de incubación fueron variables según el experimento, dependiendo de la calidad de la sonda utilizada y de la abundancia de mensajero presente en el tejido, oscilando así de 12 horas a 4 días. El revelado tuvo lugar a 4°C y en oscuridad, siendo la solución sustrato sustituida un mínimo de 2 veces al día.

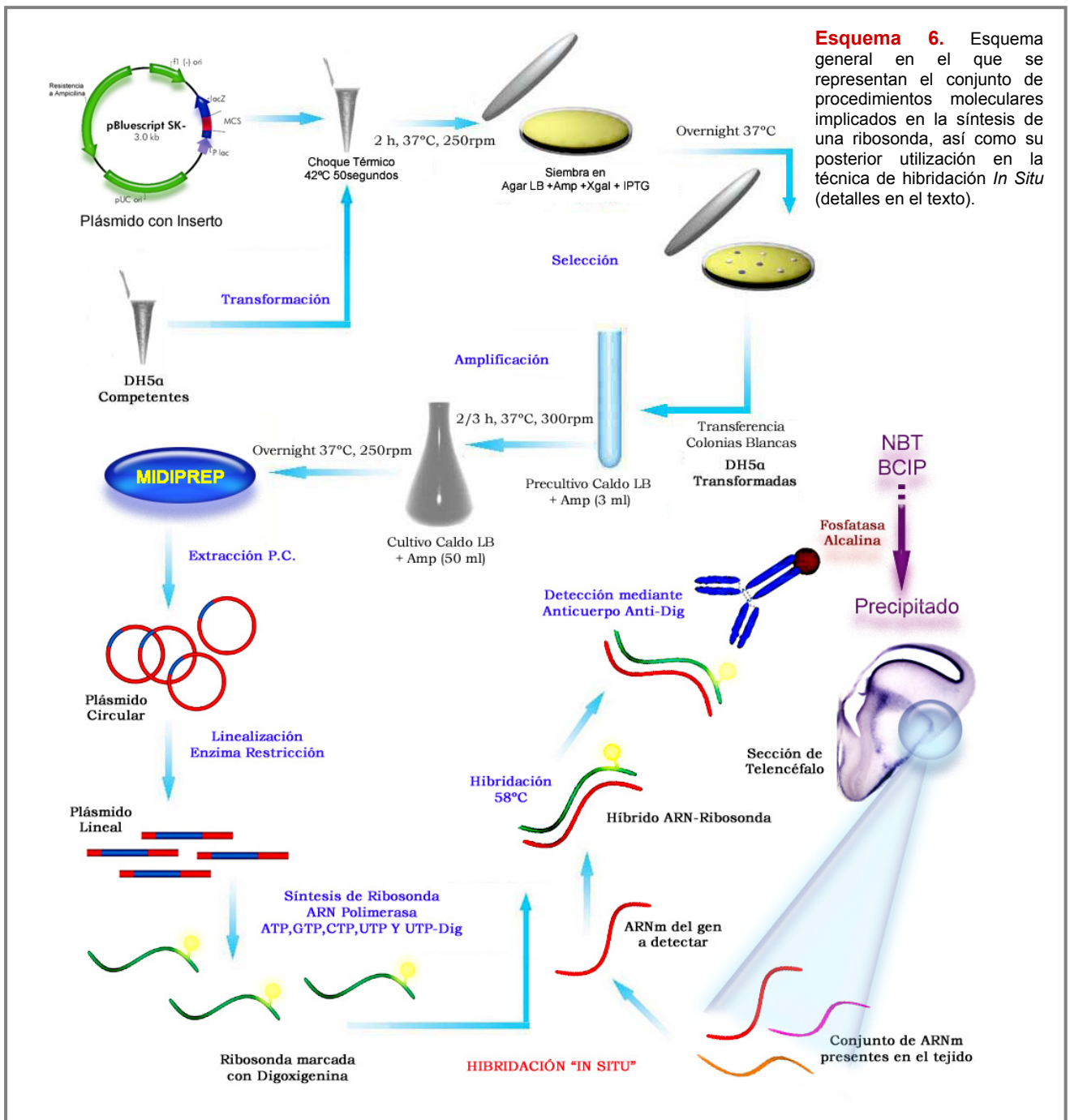
Una vez concluido el revelado la reacción fue interrumpida mediante lavados en PBT-EDTA (1mM), tras lo cual los cortes fueron postfijados en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos y montados utilizando el medio acuoso glicerol gelatin (Sigma; cat. n°:094k6012).

Con el objetivo de garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante las técnicas de hibridación *in situ* se realizaron de forma paralela los siguientes controles:

- **Controles Positivos:** Todas las sondas utilizadas fueron probadas en secciones de tejido con patrones de expresión genético conocido, previamente descrito en las publicaciones de los autores que cedieron desinteresadamente los plásmidos. La concentración y calidad de la sonda, así como los reactivos y protocolos empleados fueron los mismos que para la experimentación rutinaria.

• **Controles Negativos:**

- Utilización durante la fase de hibridación de sondas sentido de secuencia idéntica, y por tanto no complementaria, a la de los ARNm a detectar. La síntesis de estas sondas se realizó según los procedimientos descritos en el apartado 2. La ausencia de marca obtenida permite descartar uniones inespecíficas de los fragmentos de ARN marcados.
- Empleo durante la fase de hibridación de tampón carente de sondas, tanto sentido como antisentido. Este control indica que no existen uniones inespecíficas del anticuerpo anti-digoxigenina.



## 4.- Técnicas Inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la detección de diversos constituyentes celulares tales como proteínas, glucoproteínas, glucolípidos o incluso aminoácidos (acomplejados estos últimos con moléculas portadoras) en base a la alta especificidad existente entre los anticuerpos y las moléculas inmunogénicas contra las cuales han sido desarrollados (antígenos). Mediante este tipo de metodología es posible caracterizar químicamente las células presentes en un tejido en función de la expresión específica de uno o varios marcadores, constituyendo pues una herramienta útil en la identificación de estructuras nucleares, subpoblaciones celulares y tipos neuronales presentes en el telencéfalo.

La experimentación se realizó mediante incubación de los cortes en flotación (free-floating) y agitación suave, siguiendo los pasos que de forma general exponemos a continuación:

- **Inactivación de la Peroxidasa Endógena:** Con objeto de evitar falsos positivos inducidos por la presencia en el tejido de peroxidasa endógena se procedió a su inactivación mediante la incubación de los cortes en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 10% en PBS pH 7.4 0.1M durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación se realizaron 3 lavados de PBS de 10 minutos cada uno.
- **Suero de Preincubación:** Para evitar las uniones que podrían establecerse de forma inespecífica entre las proteínas propias del tejido y el anticuerpo secundario se realizó una incubación en suero de la especie donadora de este segundo anticuerpo, diluido con un 0,3% de Triton X-100 para permeabilizar las membranas y un 0,1% de azida sódica como conservante. El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente.
- **Incubación en Anticuerpo Primario:** El anticuerpo primario es el responsable del reconocimiento específico de la molécula que se pretende detectar. La concentración óptima de cada uno de los anticuerpos primarios utilizados fue determinada mediante diluciones seriadas, siendo seleccionada la máxima dilución en la que el marcaje mantuvo intacta su intensidad. El diluyente de la solución estuvo constituido por PBS pH 7.4 0.1M suplementado con un 5% de suero normal de la especie donadora del anticuerpo secundario, un 0,3% de Triton X-100 y un 0,1% de azida sódica. El tiempo de incubación osciló de 12 a 16 horas (overnight) a temperatura ambiente, transcurrido el cual se procedió al



lavado de los cortes con PBS realizando 3 cambios de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

A continuación se muestra la relación de anticuerpos primarios que han sido utilizados a lo largo de este trabajo:

- **Anti-GABA:** Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo mediante el uso de GABA-BSA como agente inmunógeno. La dilución escogida fue 1:10000 (Sigma; cat. n°: A2052).
  - **Anti-Sintasa del Óxido Nítrico:** Anticuerpo policlonal producido en conejo usando un péptido sintético correspondiente al fragmento C-terminal de nNOS de cerebro de rata (aminoácidos 1409-1429 con el extremo N-terminal unido a lisina) y conjugado a KLH como inmunógeno. La dilución empleada fue 1:4000 (Sigma; cat n°: N7280).
  - **Anti-Calbindina:** Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra la calbindina D-28k recombinante de rata. La dilución utilizada fue 1:2000 (Swant; cat n°: CB-38a).
  - **Anti-Calretinina:** Anticuerpo policlonal producido en conejo mediante inmunización con calretinina recombinante humana. La dilución empleada fue 1:2000 (Swant; cat n°: 7699/4).
  - **Anti-Parvalbúmina:** Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra parvalbúmina muscular de rata. La dilución utilizada fue 1:2000 (Swant; cat n°: PV-28).
- 
- **Incubación en Anticuerpo Secundario Biotinilado:** Este paso tiene como objetivo producir un puente entre el anticuerpo primario unido específicamente al antígeno y el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano. Se utilizó un anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo desarrollado en cabra (Vector Lab; cat n°: BA-1000) diluido 1:500 en PBS pH 7.4 0.1M con un 0,3% de Triton X-100 y un 0,1% de azida sódica. La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual los cortes fueron lavados en PBS durante 3 pasos de 10 minutos a temperatura ambiente.

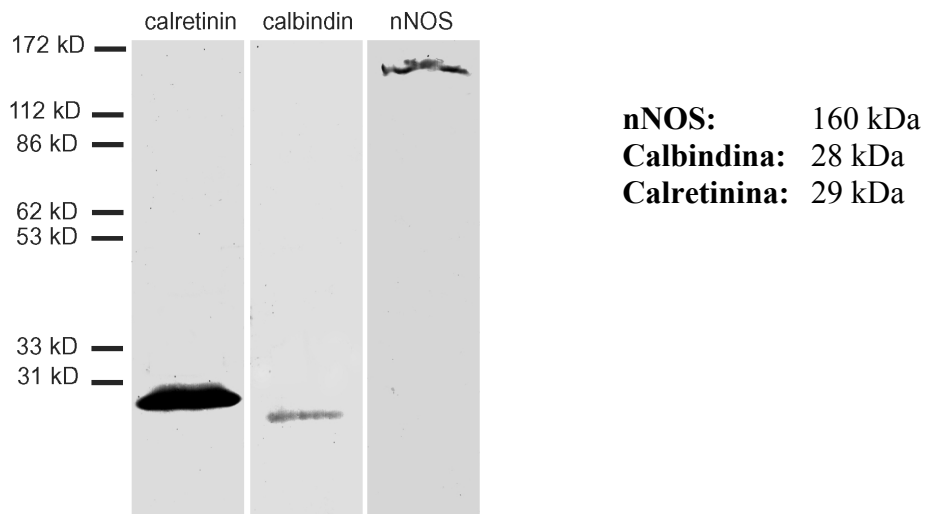
- **Incubación en Complejo Estreptavidina-Peroxidasa de Rábano:** La peroxidasa presente en el complejo (Sigma; cat n°: E-2886) posibilita la detección indirecta del anticuerpo primario unido al antígeno. La dilución empleada fue 1:2000 en PBS pH 7.4 0,1M con 0.2% de Triton X-100, sin azida sódica, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo se realizaron 3 lavados en PBS de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.
- **Revelado de la Inmunocitoquímica:** Los secciones de tejido fueron incubadas en una solución de 3,3'-diaminobenzidina tetraclorohidratada (DAB de Sigma; cat n°:D-5637) al 0,05%, sulfato amónico de níquel al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0.1% en PBS durante un periodo variable que osciló en torno a los 5-20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

Tras el revelado, los cortes fueron lavados en PBS y deshidratados mediante una serie de alcoholes de gradación ascendente (50° 70° 96° y 100°), tras lo cual se aclararon con xileno y montaron utilizando DPX.

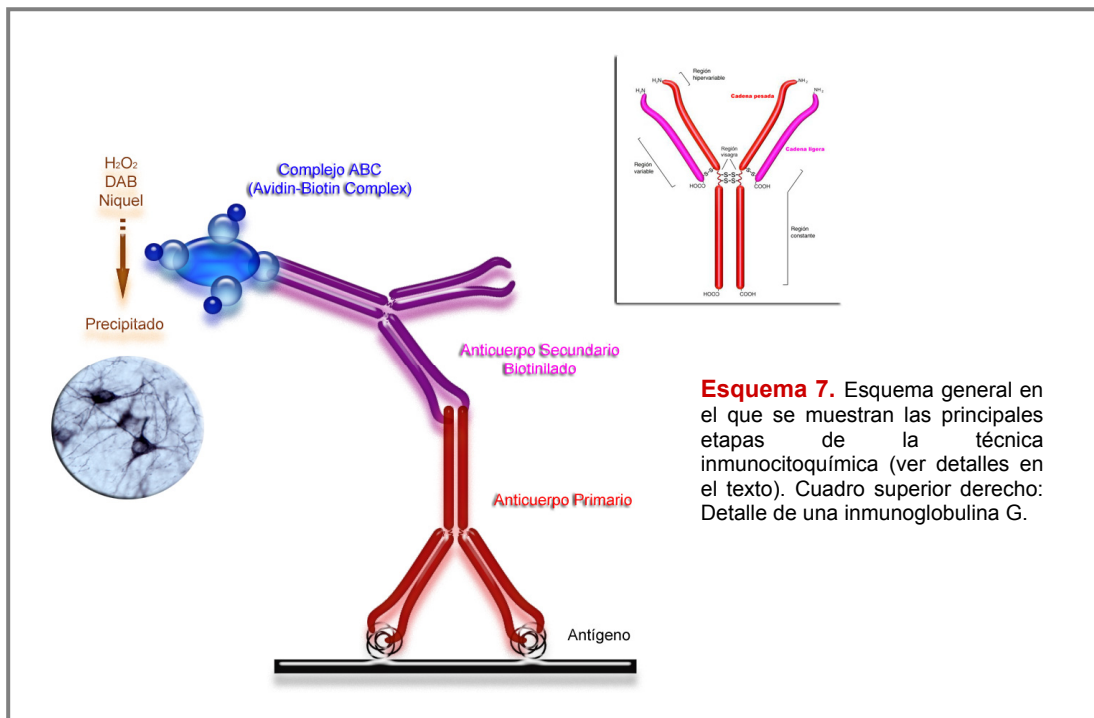
Con el objetivo de garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron una serie de **controles** que exponemos a continuación:

- **Controles Positivos:** Cada uno de los anticuerpos utilizados fue probado sobre aquellas regiones de tejido en las que se tenía certeza de su expresión, ya fuese por referencias bibliográficas o comerciales, utilizando los mismos medios y protocolos que para la experimentación.
- **Controles Negativos:**
  - Las secciones fueron incubadas en anticuerpo primario preabsorbido con el péptido inmunizante, adicionando 1µg de proteína recombinante por mililitro de anticuerpo para las proteínas ligadoras de calcio y 10µg/ml en el caso de nNOS. Este control permite descartar uniones inespecíficas del anticuerpo primario.
  - Sustitución del anticuerpo primario por una solución no inmune tal como el PBS. La ausencia de marcaje indica ausencia de uniones inespecíficas del segundo anticuerpo o del complejo ABC.

- **Análisis mediante Western blot:** Los análisis mediante Western blot demostraron que cada anticuerpo primario reconoce a una única proteína de peso molecular adecuado procedente de extractos de cerebro embrionario de pollo.



**Nota:** El análisis de la parvalbúmina policlonal ha sido realizado por un grupo de investigación externo (Chaudhury et al., 2006).



## 5.- Tinciones Generales de tipo Nissl

Con el objetivo de posibilitar la localización precisa de los marcadores genéticos e histoquímicos se realizaron tinciones con **Azul de Toluidina** en varias secciones telencefálicas representativas de todos los estadios embrionarios, postnatales y adultos estudiados. El carácter basófilo de este colorante le confiere capacidad de unión a los ARN citoplasmáticos contenidos en los poliribosomas de las células nerviosas (gránulos de Nissl), por lo que el conjunto de somas neuronales (pero no sus prolongaciones) adquieren una tonalidad azul intensa. Dicha tinción proporciona así información sobre la morfología, tamaño, grado de empaquetamiento y organización topológica de las células.

La técnica ha sido realizada sobre cortes seriados de 50  $\mu\text{m}$  de grosor montados sobre portaobjetos polilisinados y secados a temperatura ambiente. Los pasos generales se describen a continuación:

- |                              |             |
|------------------------------|-------------|
| • Agua destilada             | 1 minuto    |
| • Azul de toluidina al 0.05% | 3 minutos   |
| • Agua destilada             | 1 minuto    |
| • Etanol 70° + ácido acético | 30 segundos |
| • Etanol 70°                 | 5 minutos   |
| • Etanol 96°                 | 10 minutos  |
| • Etanol 100°                | 10 minutos  |
| • Xileno                     | 10 minutos  |
| • Montaje con DPX            |             |

## 6.- Adquisición y Manipulación de Imágenes. Elaboración de Esquemas, Láminas y Textos

Las imágenes mostradas en la presente tesis doctoral fueron obtenidas en formato digital mediante un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 equipado con una cámara fotográfica digital Nikon DMX1200. Los montajes obtenidos a partir de diferentes fotografías, así como los ajustes realizados en los niveles, brillo y contraste de las imágenes se realizaron con el software Adobe Photoshop Elements 2.0. Los esquemas y dibujos fueron elaborados utilizando como referencia imágenes, atlas y modelos reales mediante el empleo de los programas 3D Studio Max R3 y Adobe Photoshop Elements 2.0. Para la escritura y maquetación del trabajo, así como para el montaje y rotulado de láminas se utilizó la suite OpenOffice 2.0.org.



# Resultados

# Resultados

## 1.- Localización Topográfica de la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida

La presente tesis doctoral tiene como objetivo el estudio de un grupo de núcleos muy heterogéneo que forman parte en su conjunto de la amígdala subpalial-amígdala extendida de aves. Bajo este epígrafe quedan incluidas las divisiones lateral y medial del “bed nucleus de la stria terminalis” (BSTL y BSTM respectivamente), el área amigdalina subpalial (ASp), la amígdala hipocampal (AHi) y el núcleo taeniae de la amígdala (TnA). A lo largo de los siguientes capítulos realizaremos una descripción detallada de cada una de estas estructuras bajo aproximaciones citoarquitectónicas, histogenéticas e inmunocitoquímicas, lo cual nos permitirá definir y caracterizar de forma precisa los límites, las subdivisiones, el origen histogenético y las poblaciones neuronales presentes en cada una de estas regiones. La localización topográfica de los núcleos de la amígdala subpalial extendida, así como parte de sus límites pueden ser apreciados con cierta precisión en los estadios finales del desarrollo y edad adulta mediante el empleo de técnicas de tinción generales del tipo Nissl (Fig. 1).

Así, es posible apreciar cómo la división lateral del “bed nucleus de la stria terminalis” está constituida por un compacto grupo de células adyacentes lateroventralmente a los ventrículos laterales, contactando de forma directa con los órganos circunventriculares. La extensión rostrocaudal de este núcleo a lo largo del telencéfalo es muy amplia, siendo observable desde los niveles rostrales en los que coexiste con el núcleo accumbens hasta los niveles caudales en los que dejan de ser apreciables las fibras telencefálicas del tracto occipitomesencefálico (om). Lateralmente este núcleo se mantiene a lo largo de toda su extensión en contacto con estructuras de naturaleza estriatal, tales como el estriado medial (StM) en niveles rostrales, el área amigdalina subpalial en niveles intermedios y el estriado lateral (StL) en niveles caudales (Fig. 1A-E).

La división medial del “bed nucleus de la stria terminalis” posee dos subdivisiones anatómicas bien diferenciadas. La primera de ellas, a la que denominaremos BSTM1, es observable a nivel de la comisura anterior, y se localiza dorsal a este tracto de fibras, ventromedial al BSTL y ventrolateral a los núcleos septales. El BSTM1 se extiende hacia niveles más caudales, donde coexiste con la segunda división del núcleo, al que llamaremos BSTM2. Tomando como referencia la relación topográfica entre ambas estructuras, el BSTM1 se localiza en posición

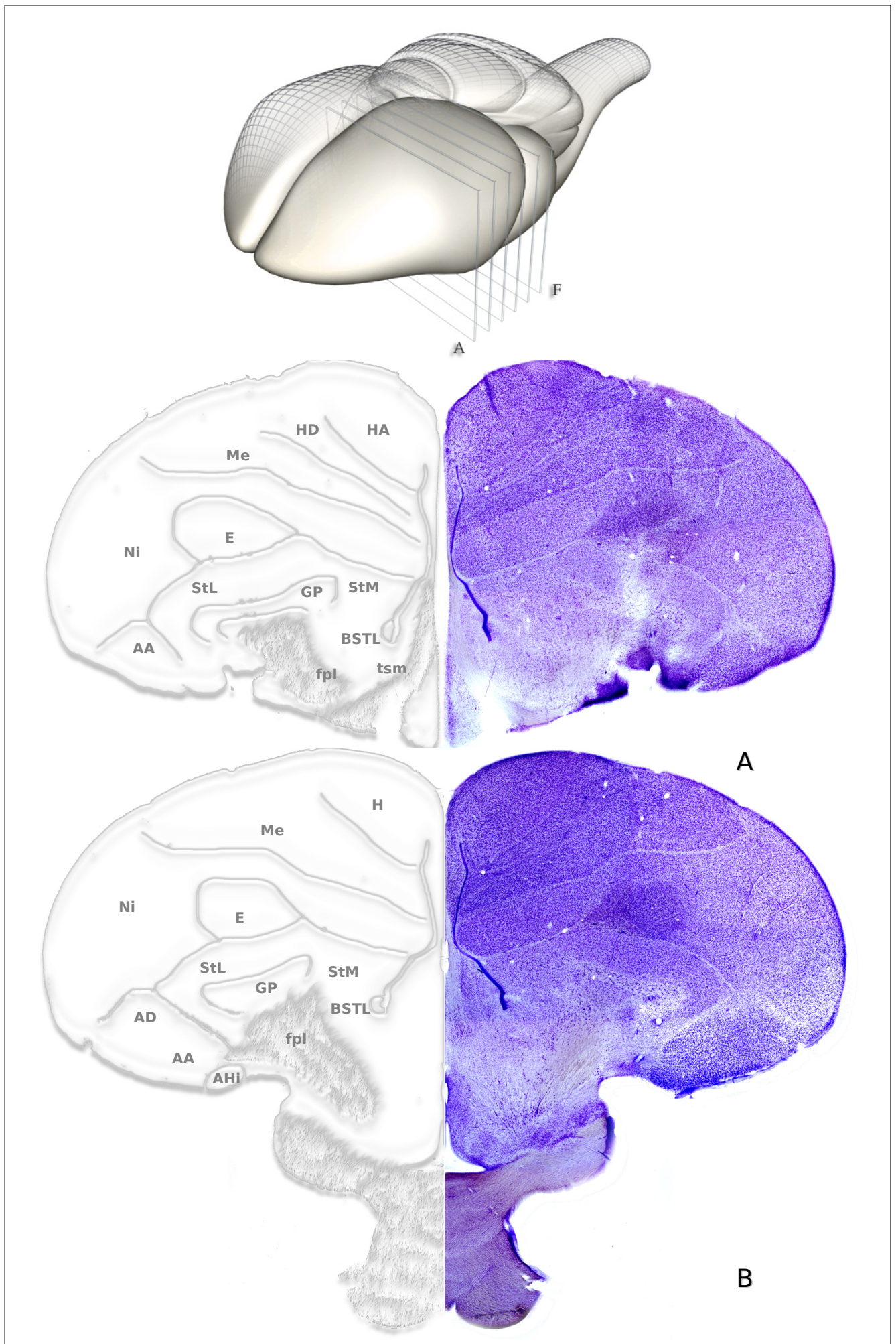
dorsolateral, mientras que el BSTM2 se ubica en posición ventromedial. Ambas estructuras se extienden hacia territorios hipotalámicos, manteniendo en todo momento una posición dorsomedial al tracto occipitomesencefálico, dorsolateral a los núcleos paraventriculares (NPV) y ventral a los núcleos septolateral (SL) y septomedial (SM) (Fig. 1C,D).

El área amigdalina subpalial (ASp) constituye una extensa región presente en los niveles telencefálicos intermedios comprendidos entre la comisura anterior y el tracto occipitomesencefálico. El ASp queda enmarcado rostrocaudalmente entre ambos tractos de fibras, y contacta con un gran número de estructuras de naturaleza subpalial. Así, la mayor parte del núcleo se sitúa en posición ventral al globo pálido (GP), aunque la región dorsolateral contacta directamente con el estriado lateral. El arcopalio medial (AM) es lateral al ASp, mientras que la amígdala hipocampal ocupa una posición ventrolateral con respecto a este núcleo. Por último, el área amigdalina subpalial es medialmente contiguo a la división lateral del “bed nucleus de la stria terminalis” (Fig. 1C-E).

La amígdala hipocampal es un núcleo de gran tamaño localizado en la porción basal del telencéfalo caudal. Se halla constituido por una población de células densamente empaquetadas, característica que permite establecer con claridad los límites entre esta región y las áreas arcopaliales adyacentes. Se ha observado que la amígdala hipocampal es una estructura con entidad propia, diferente al núcleo taeniae de la amígdala, que se halla rodeada parcialmente por el arcopalio medial. Tanto la amígdala hipocampal como el conjunto arcopalial adyacente contribuyen con sus proyecciones a la comisura anterior y al tracto occipitomesencefálico (Fig. 1B-E).

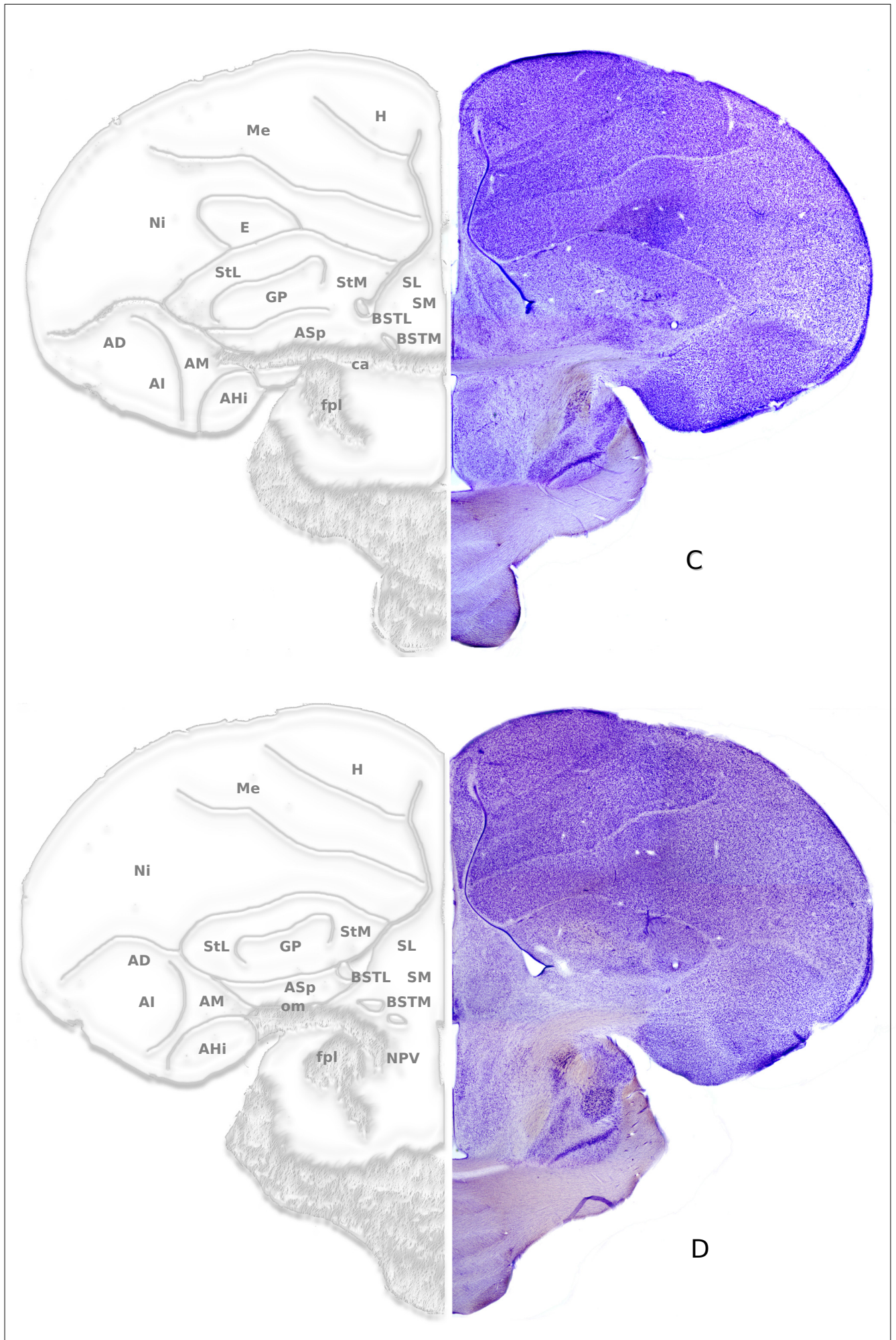
El núcleo taeniae de la amígdala se localiza en el polo caudal del telencéfalo, y muestra ciertos paralelismos citoarquitectónicos con la previamente descrita amígdala hipocampal. Así, al igual que en el caso anterior, el núcleo taeniae presenta un aspecto elíptico, se halla parcialmente rodeado por el arcopalio medial y su población neuronal se compone de un gran número de células densamente empaquetadas. Es característico de este núcleo, sin embargo, la posición subventricular que ocupa a lo largo de toda su extensión, así como su coexistencia, en niveles caudales, con la amígdala posterior (PoA) (Fig. 1F).

**Nota:** Los términos posicionales aquí empleados (dorsal, ventral, lateral, medial, rostral y caudal) serán usados siguiendo criterios exclusivamente topográficos. Así mismo, las secciones telencefálicas representadas responden a un único plano de corte transversal, sin aplicación de ningún tipo de corrección topológica.

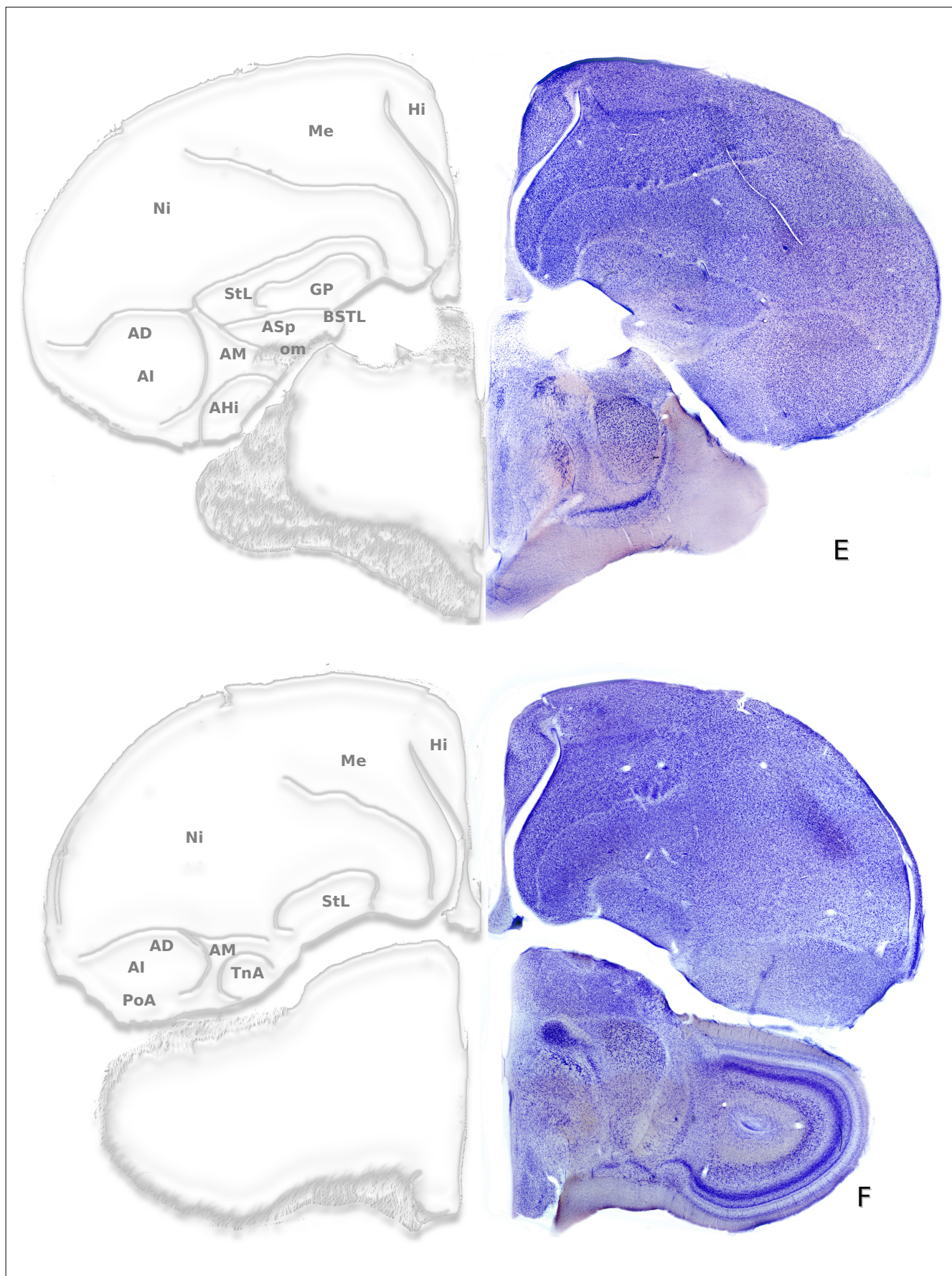


**Figura 1.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo adulto teñidas mediante Azul de Toluidina en las que se muestra parte del recorrido rostrocaudal de la amígdala subpialial-extendida. Cada imagen se acompaña de una representación esquemática especular. Aumentos 10x.





**Figura 1 (continuación).** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo adulto teñidas mediante Azul de Toluidina en las que se muestra parte del recorrido rostrocaudal de la amígdala subpial-extendida. Cada imagen se acompaña de una representación esquemática espejular. Aumentos 10x.



**Figura 1 (continuación).** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo adulto teñidas mediante Azul de Toluidina en las que se muestra parte del recorrido rostrocaudal de la amígdala subpalial-extendida. Cada imagen se acompaña de una representación esquemática especular. Aumentos 10x.

## 2.- Descripción Histoquímica e Inmunocitoquímica de la Amígdala Subpial-Amígdala Extendida

Con el objetivo de definir el origen histogenético de cada uno de los núcleos que componen la denominada amígdala subpial-amígdala extendida hemos realizado un estudio de los patrones de expresión de un conjunto de genes característicos de los principales compartimentos histogenéticos presentes en el telencéfalo de los vertebrados, como son *Tbr1*, *Dlx5*, *Nkx2.1* y *Pax6*. Asimismo, la quimioarquitectura de cada estructura ha sido analizada en base a los patrones de distribución del ácido gamma-aminobutírico, las sintasa del óxido nítrico y las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina. En los siguientes apartados se realizará una descripción detallada de los patrones de expresión de cada uno de los marcadores citados a lo largo del desarrollo del complejo.

### 2.1.- La División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”

En E8 la expresión del factor de transcripción *Dlx5* es muy intensa en la zona subventricular de la región subpial del telencéfalo de pollo, sin apreciarse apenas marcaje en la zona del manto. El área prospectiva de la división lateral del “bed nucleus de la stria terminalis” (BSTL) en los estadios iniciales del desarrollo se halla inmersa en esta región de proliferación activa de células subpiales, dificultando de esta forma la definición precisa de sus límites (Fig. 2A). En estadios posteriores, sin embargo, es posible apreciar un incremento paulatino de la señal *Dlx5* en las zonas del manto subpial, de manera que en E10 el estriado, el globo pálido y parte de las regiones hipotalámicas subcomisurales expresan de forma moderada este gen (Fig. 2C). La intensidad de la señal aumenta ligeramente en estas regiones en E12, pudiendo ser observada además en la región medial del septum (Fig. 2D). El grado de marcaje presente en la zona de proliferación subventricular disminuye en la mayor parte de su extensión de forma inversamente proporcional al estado de maduración telencefálico. Sin embargo, la región coincidente con el área prospectiva del BSTL mantiene un intenso marcaje en todos los estadios analizados, muy superior a la observada en las áreas adyacentes (Fig. 2C', D').

Los patrones de expresión del factor de transcripción *Tbr1* son en general complementarios a los observados en el caso de *Dlx5*. Así, la práctica totalidad del territorio pial, incluyendo manto y zonas subventriculares, se hallan intensamente marcadas (Fig. 2B). El BSTL, así como las regiones subpiales adyacentes, no

muestran expresión alguna para este marcador en ninguno de los estadios estudiados.

Durante el desarrollo temprano, los genes *Nkx2.1*, *Pax6* y *Shh* muestran patrones de expresión diferenciales que combinados cubren la mayor parte del territorio subpialial *Dlx5* positivo. Así, el factor de transcripción *Nkx2.1* se expresa de forma intensa en la zona subventricular de la eminencia gangliónica medial (EGM) y en el área entopeduncular (AEP), observándose además un marcaje moderado en las áreas palidales del subpalo (Fig. 3A). Por otra parte, una fuerte señal para *Pax6* puede ser apreciada en el límite palio-subpalo, así como en una parte importante del territorio estriatal del subpalo. La región subventricular palial, aunque no la subpial, posee en E8 un fuerte marcaje para *Pax6* que disminuye paulatinamente en estadios posteriores (Fig. 3B). Finalmente, el marcaje para el gen *Shh* es muy intenso en los dominios del AEP, contrastando con la ausencia total de expresión en las eminencias gangliónicas lateral y medial así como en toda el área palial (Fig. 3C).

El área prospectiva del BSTL se encuentra por lo tanto inmersa en el territorio *Nkx2.1* positivo, mostrando durante los estadios iniciales del desarrollo una ausencia total de marcaje para *Pax6* (Fig. 3A,B). Cabe destacar que si bien la mayor parte del área prospectiva del BSTL carece de señal para *Shh*, hemos observado un marcaje tenue en la porción más ventral de esta región. (Fig. 3A-C). En este contexto, hemos observado diferencias significativas en cuanto a la distribución de los marcadores inmunocitoquímicos utilizados en el presente estudio. De esta forma, en base a las citadas diferencias, consideraremos a partir de este momento al BSTL como un núcleo de tres compartimentos, a los que denominaremos BSTL magnocelular (BSTLmc), BSTL plexiforme 1 (BSTLp1) y BSTL plexiforme 2 (BSTLp2) (Esquemas Fig. 6). La expresión de *Nkx2.1* es intensa en su conjunto en las 3 subdivisiones propuestas, mientras que la moderada señal *Shh* tan solo ha sido apreciada en el área prospectiva de la porción plexiforme 2 del núcleo.

El BSTL magnocelular ocupa una posición central en el complejo y se halla en contacto directo con el órgano lateroseptal (OLS) y con el órgano estriatopalidal (OSP), adyacentes ambos al ventrículo lateral (VL). La densidad celular presente en esta región es elevada, con somas de gran tamaño y un grado de empaquetamiento celular superior al del resto del complejo (Figs. 4A, 5A). Se caracteriza por presentar una población de células GABAérgicas muy abundante (Figs. 4B, 5B, 6A), así como un neuropilo inmunorreactivo rico en terminales. Esta distribución, observable a partir de los 16 días de incubación, se halla también presente en el resto del BSTL, mostrando sin embargo una concentración menor de células positivas. El marcaje para el GABA del conjunto del BSTL permite definir la relación exacta que este complejo guarda con el ventrículo

lateral, de tal forma que se halla próximo pero no en contacto con él. Ambas estructuras quedan separadas por las delgadas capas celulares que componen los previamente citados órganos subventriculares, los cuales carecen por completo de expresión GABAérgica (Figs. 4B, 5B, 6A). No se ha observado inmunorreactividad para nNOS ni para las proteínas ligadoras de calcio en la porción magnocelular del BSTL durante el conjunto de estadios del desarrollo e individuo adulto (Figs. 4-8).

El BSTLp1 se localiza en una posición lateral (lateroventral a niveles caudales) con respecto al BSTL magnocelular, siendo los límites entre ambas estructuras fácilmente reconocibles mediante tinción tipo Nissl debido a su menor grado de empaquetamiento celular (Figs. 4A, 5A). Como se describió con anterioridad, esta región presenta una población moderada de células GABAérgicas observable en este caso a partir de E14, con un menor número de neuronas que la porción magnocelular (Figs. 4B, 5B, 6A. Comparar Fig. 5B', B'').

Se caracteriza por presentar un neuropilo nNOS positivo rico en fibras y terminales que puede ser apreciado de forma tenue desde E12, y cuya intensidad de marcaje se ve incrementada en los sucesivos estadios hasta alcanzar la estabilidad en E16. Dicho neuropilo permite delimitar de forma precisa el área del BSTLp1 dentro del complejo, ya que contrasta con la ausencia total de expresión nNOS del BSTLmc, y como veremos más adelante, con la mayor intensidad de marcaje para el BSTLp2. En ningún caso se han observado células inmunorreactivas nNOS positivas en esta región (Figs. 4C, 5C, 6B, 7D, 8C).

Los patrones de distribución de la calretinina en el BSTLp1 son similares a los descritos para el nNOS, mostrando un neuropilo abundante de aparición algo más tardía. Así, a partir de E14 observamos fibras y terminales positivos con una distribución e intensidad de señal que permanece estable durante los siguientes estadios del desarrollo, pudiendo apreciarse además con carácter aislado alguna célula positiva (Figs. 4D, 5D, 6D, 7A-B, 8B).

El BSTLp1 muestra una ausencia total de neuropilo calbindina en toda su extensión, pero es posible sin embargo apreciar alguna célula positiva a partir de E12. Estas células poseen un marcaje tenue y no han de ser confundidas con la abundante población de células calbindina positiva intensamente marcadas pertenecientes a la porción distal del órgano estriatopalidal, las cuales migran a partir de la región ventricular del citado órgano ocupando una posición ectópica que incluye parte de los dominios del BSTLp1 (Figs. 4E, 5E, 6C, 7C, 8A-A').

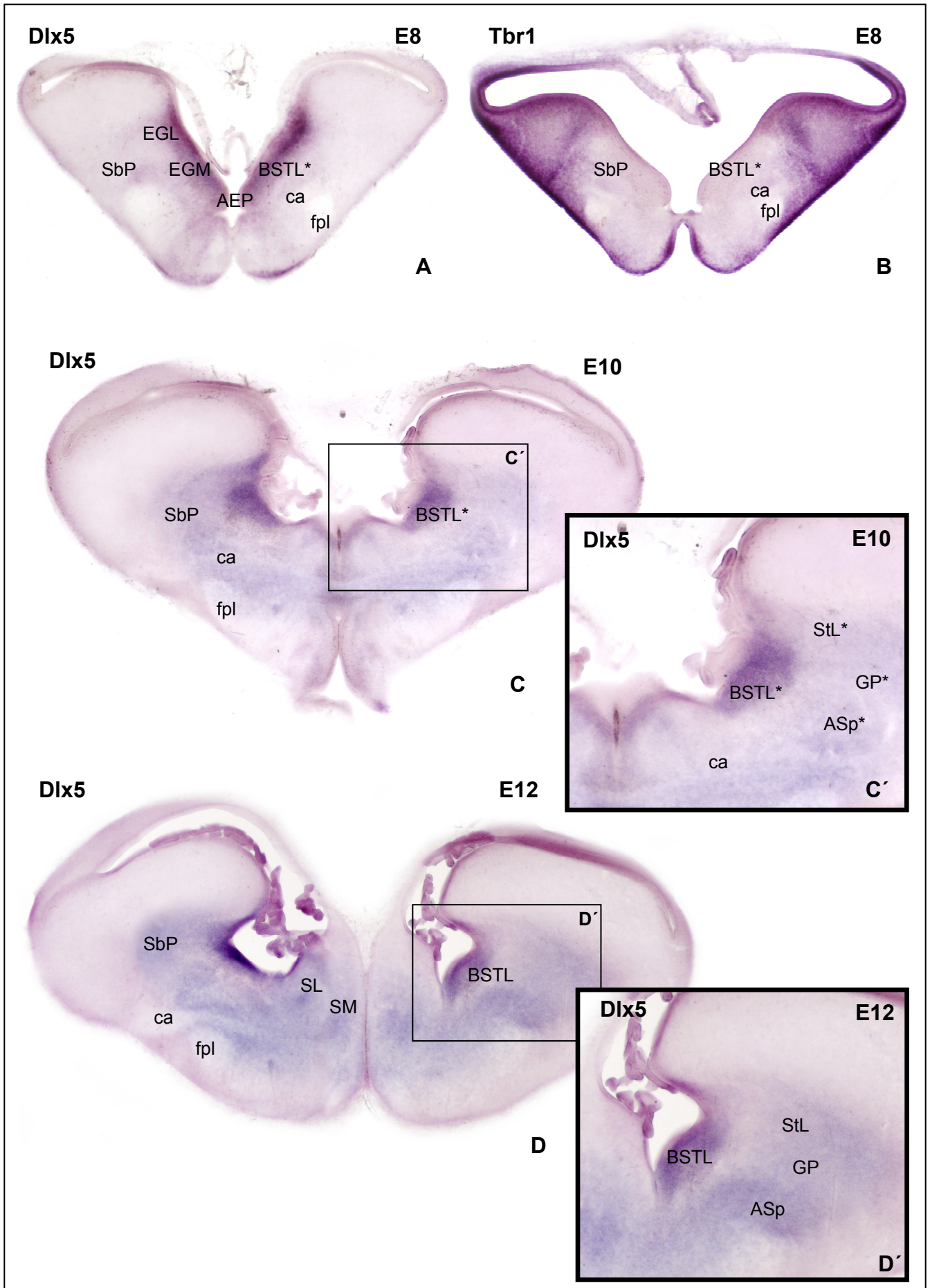
El BSTLp2 es ventral (ventromedial en niveles caudales ) al BSTLp1. Ambas estructuras forman un continuo anatómico que envuelve parcialmente al BST magnocelular, de mayor densidad celular (Figs. 4A, 5A). Al igual que el BSTLp1, el BSTLp2 posee un número moderado de células GABA positivas, de similar intensidad y distribución, pero detectadas en este caso a partir de E12 (Figs. 4B, 5B, 6A).

Los patrones de distribución de nNOS y calretinina, así como su evolución durante el desarrollo son muy similares a los mostrados por el BSTLp1, lo cual permite establecer los límites existentes entre el conjunto BSTLp y BSTmc, carente este último de expresión para ambos marcadores. Sin embargo, la abundancia relativa de fibras y terminales nNOS positivas es significativamente superior en la porción plexiforme 2 del BSTL (Figs. 4C, 5C, 6B, 7D, 8C), habiéndose observado además un mayor número de células calretinina positivas y un neuropilo ligeramente más abundante en esta región (Figs. 4D, 5D, 6D, 7A,B, 8B).

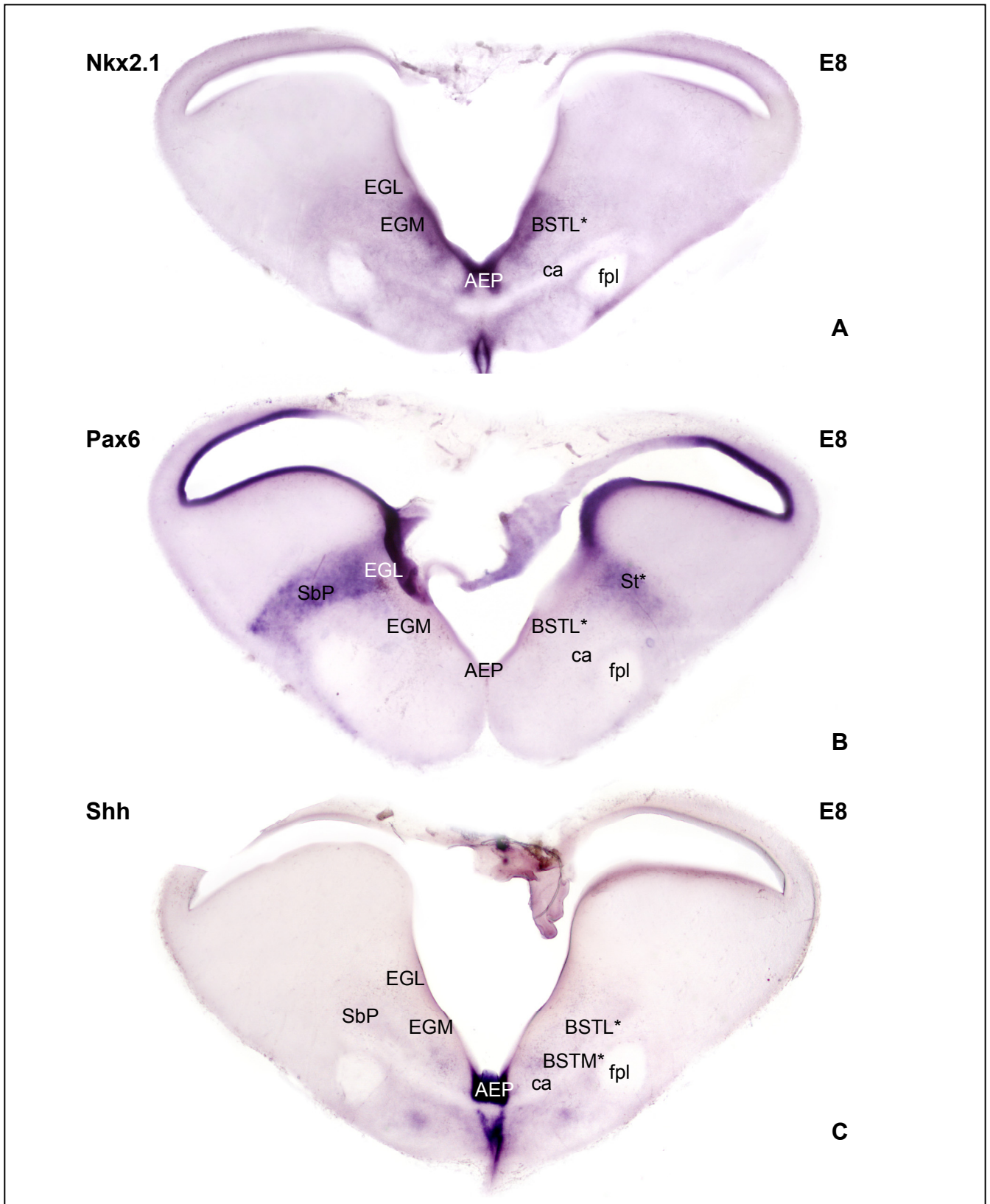
Nótese que el estudio comparado de los marcadores GABA, nNOS y calretinina permite establecer diferencias anatómicas entre el núcleo accumbens y el BSTL, adyacentes ambas estructuras en niveles rostrales. Así, la expresión de GABA muestra un patrón complementario al observado en el BSTL, mostrando en este caso la porción central del núcleo una población no muy abundante de células marcadas, mientras que la parte periférica presenta un gran número de células inmunorreactivas densamente empaquetadas (Fig. 4B). Además, el marcaje nNOS y calretinina en el núcleo accumbens queda reducido en ambos casos a alguna célula aislada, preferentemente en la región periférica, mostrando una carencia total del intenso neuropilo propio del BSTL (Fig. 4C,D).

El BSTLp2 se caracteriza por mostrar una inmunorreactividad para calbindina consistente en una población de células marcadas de forma tenue que se distribuyen a lo largo de toda su extensión. Esta distribución no es sin embargo homogénea, observándose un mayor número de neuronas en las regiones caudales de la subdivisión (Figs. 5C, 6C, 7C, 8A,A'). La distribución que este marcador presenta en el BSTLp2, combinada con los patrones previamente descritos para la calretinina y el nNOS nos permitieron realizar el seguimiento rostrocaudal de esta estructura, observándose a niveles caudales una extensión de la misma hacia la región de la *eminencia thalami*. De esta forma, en aquellos niveles en los que ventrículo lateral ocupa una posición de contacto con el límite telencéfalo-diencefalo rostral, parte del BSTLp2 queda incluida en los dominios superficiales del hipotálamo (Fig. 7).

El BSTL muestra en su conjunto una ausencia total de expresión para la parvalbúmina durante todo el desarrollo embrionario y la etapa adulta (datos no mostrados).

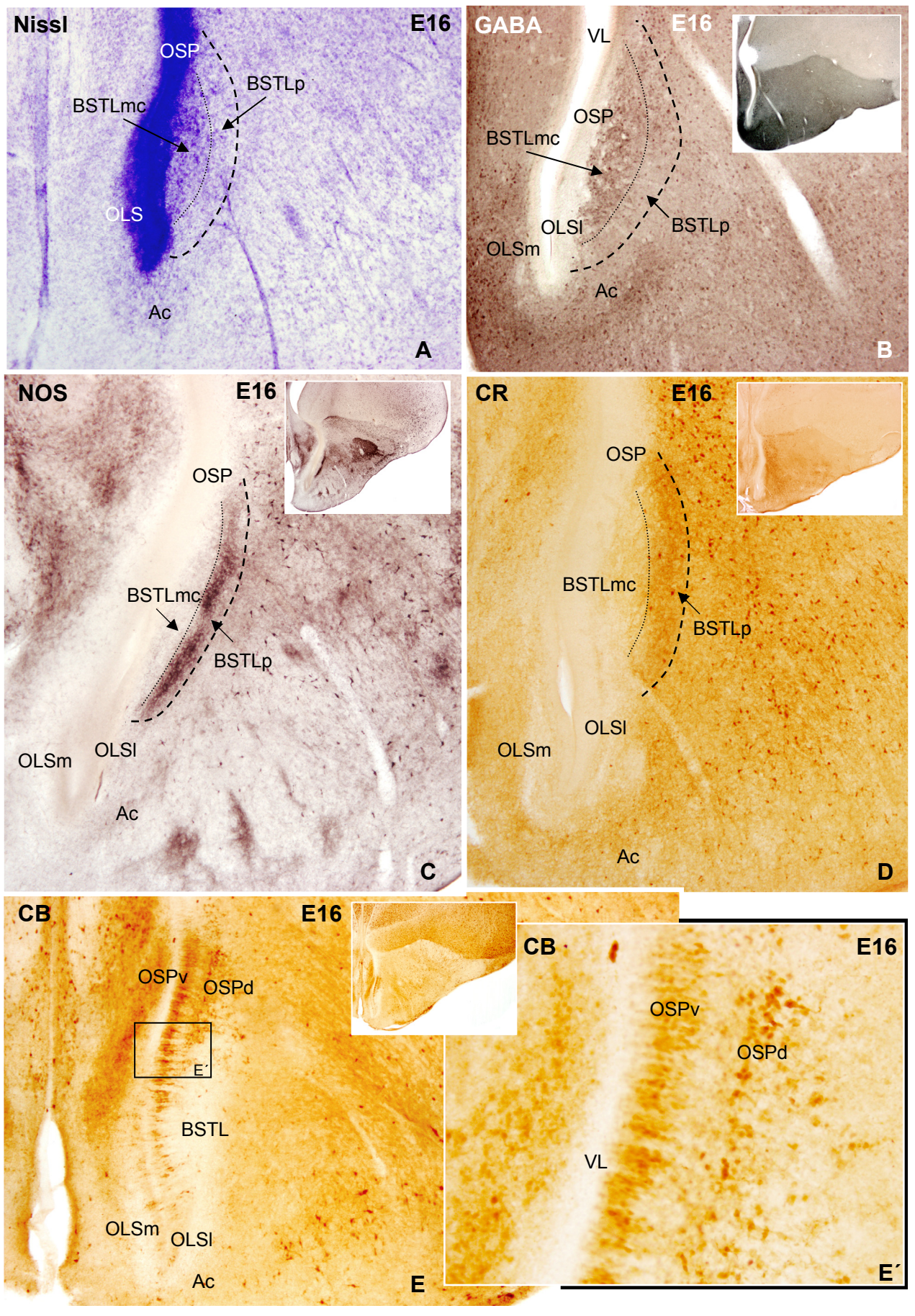


**Figura 2.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E8, E10 y E12; hibridadas para *Dlx5* (A,C,D) y *Tbr1* (B). Las imágenes C' y D' son detalles de las áreas recuadradas en C y D respectivamente. Los asteriscos sobre el nombre de un núcleo denotan que se trata de su área prospectiva. Se observa una intensa marca *Dlx5* (A,C,C',D,D') y una carencia de señal *Tbr1* (B) en el área prospectiva del BSTL durante el desarrollo. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-D=20x; C',D'=40x.

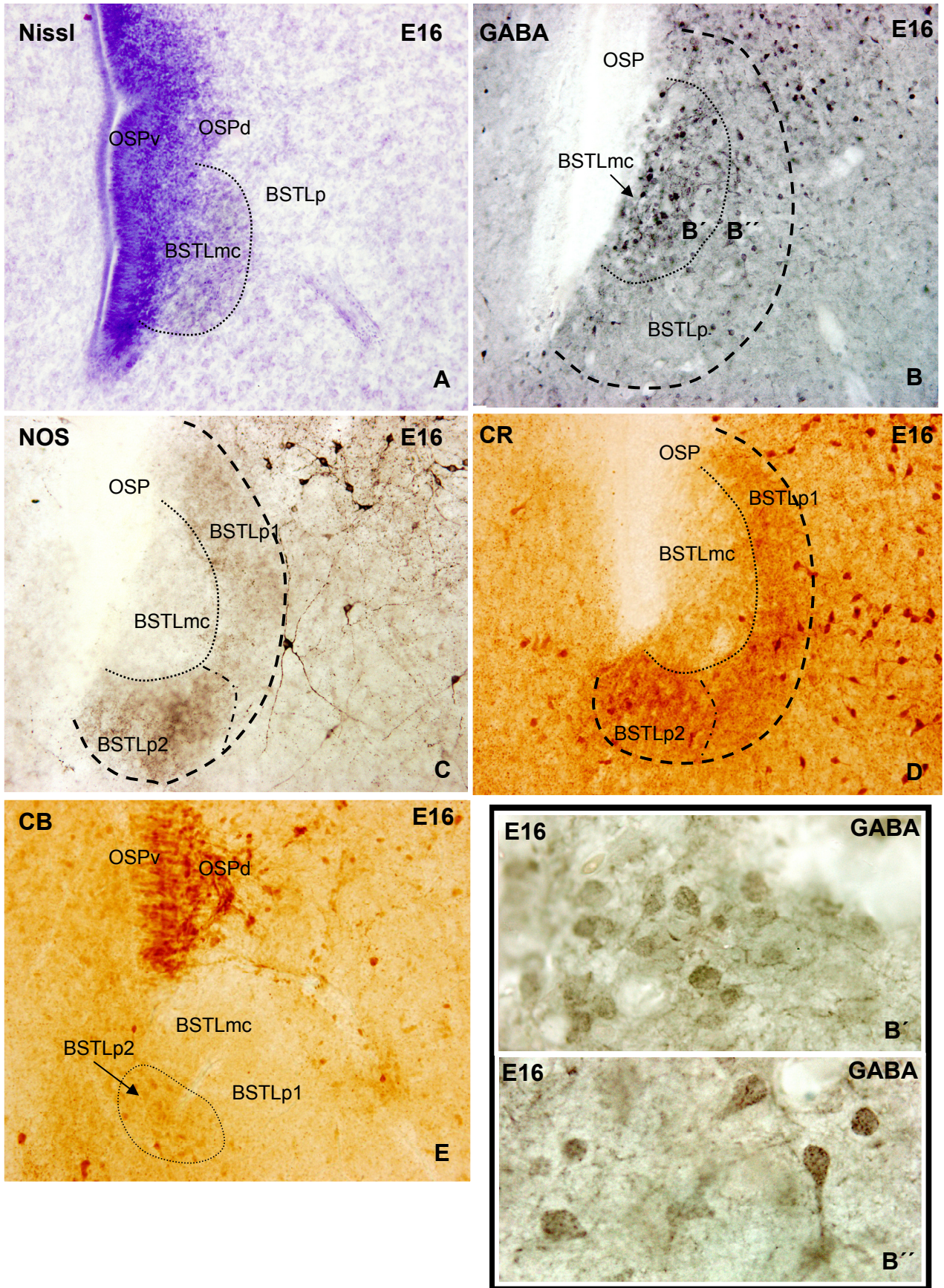


**Figura 3.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E8, hibridadas para *Nkx2.1* (A), *Pax6* (B) y *Shh* (C). Los asteriscos sobre el nombre de un núcleo denotan que se trata de su área prospectiva. Se observa una intensa marca *Nkx2.1* (A) y una carencia de señal *Pax6* (B) y *Ssh* (C) en el área prospectiva del BSTL. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 20x.

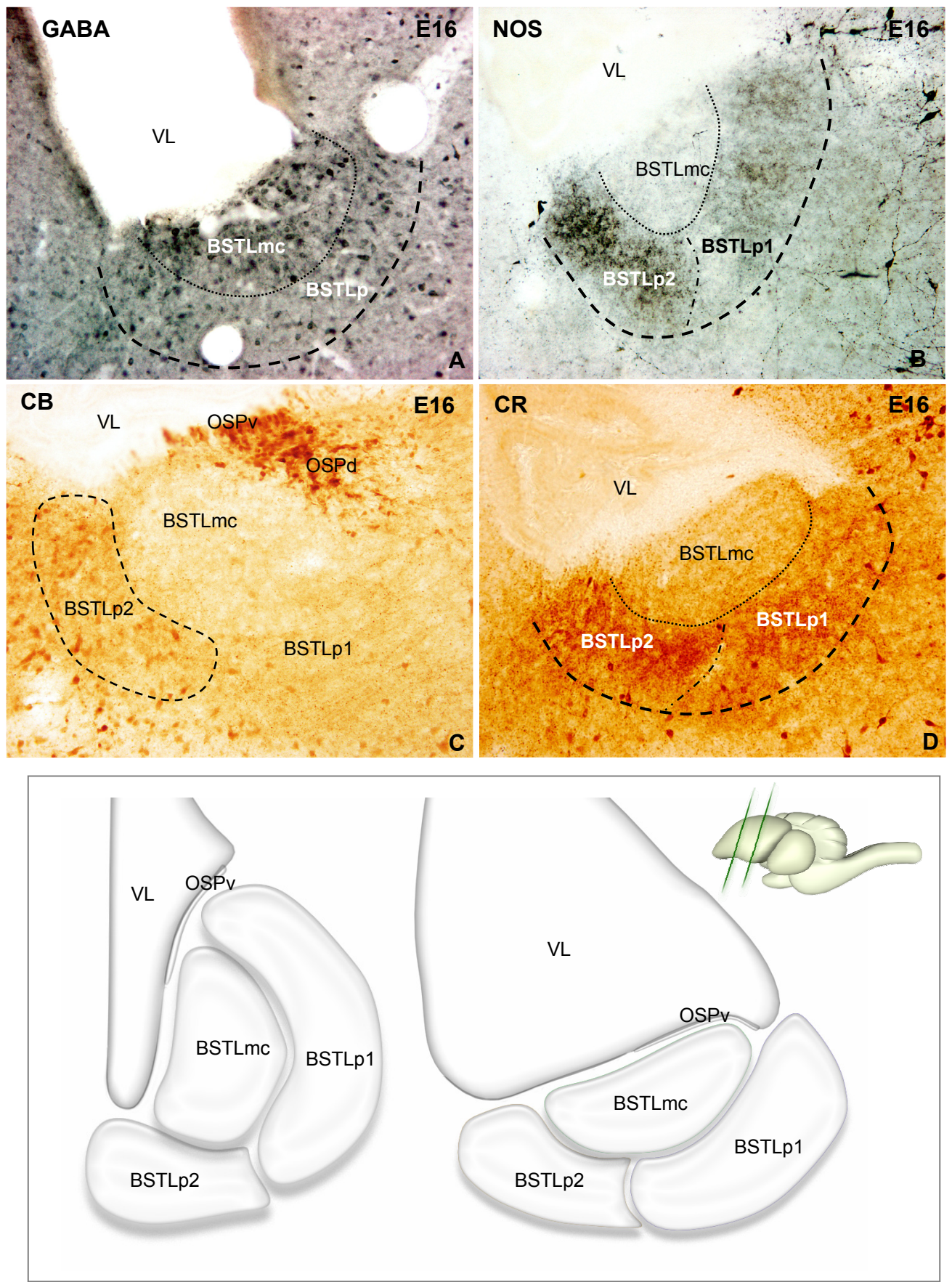




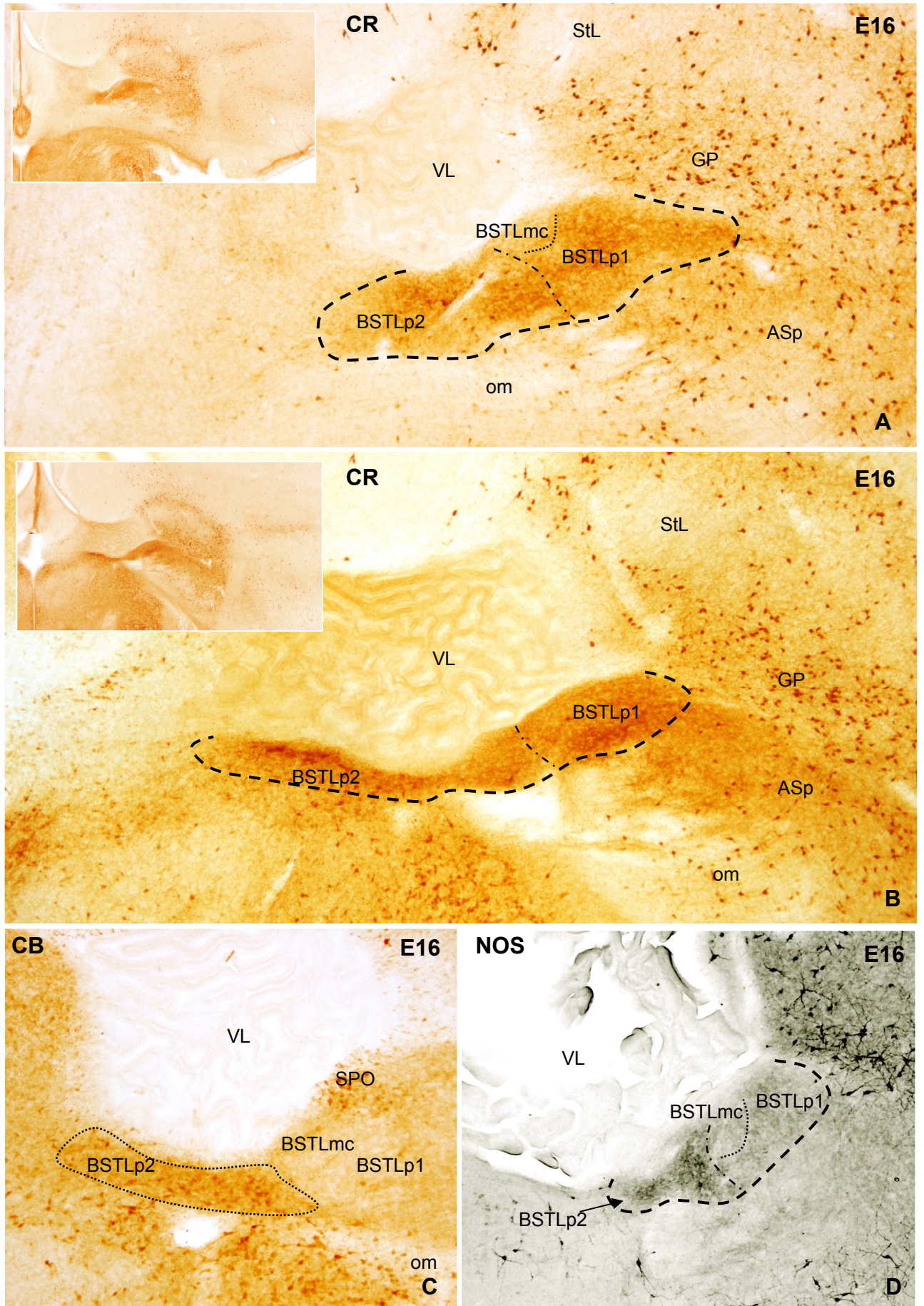
**Figura 4.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en E16, teñidas con Azul de Toluidina (A) e inmunoteñidas para GABA (B), nNOS (C), calretinina (D) y calbindina (E). La imagen E' es un detalle del área recuadrada en E. Se muestran los patrones de expresión diferenciales existentes entre el BSTmc, el BSTLp y estructuras adyacentes, tales como el OSP, el OLS y el Ac. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-E=40x; E'=100x.



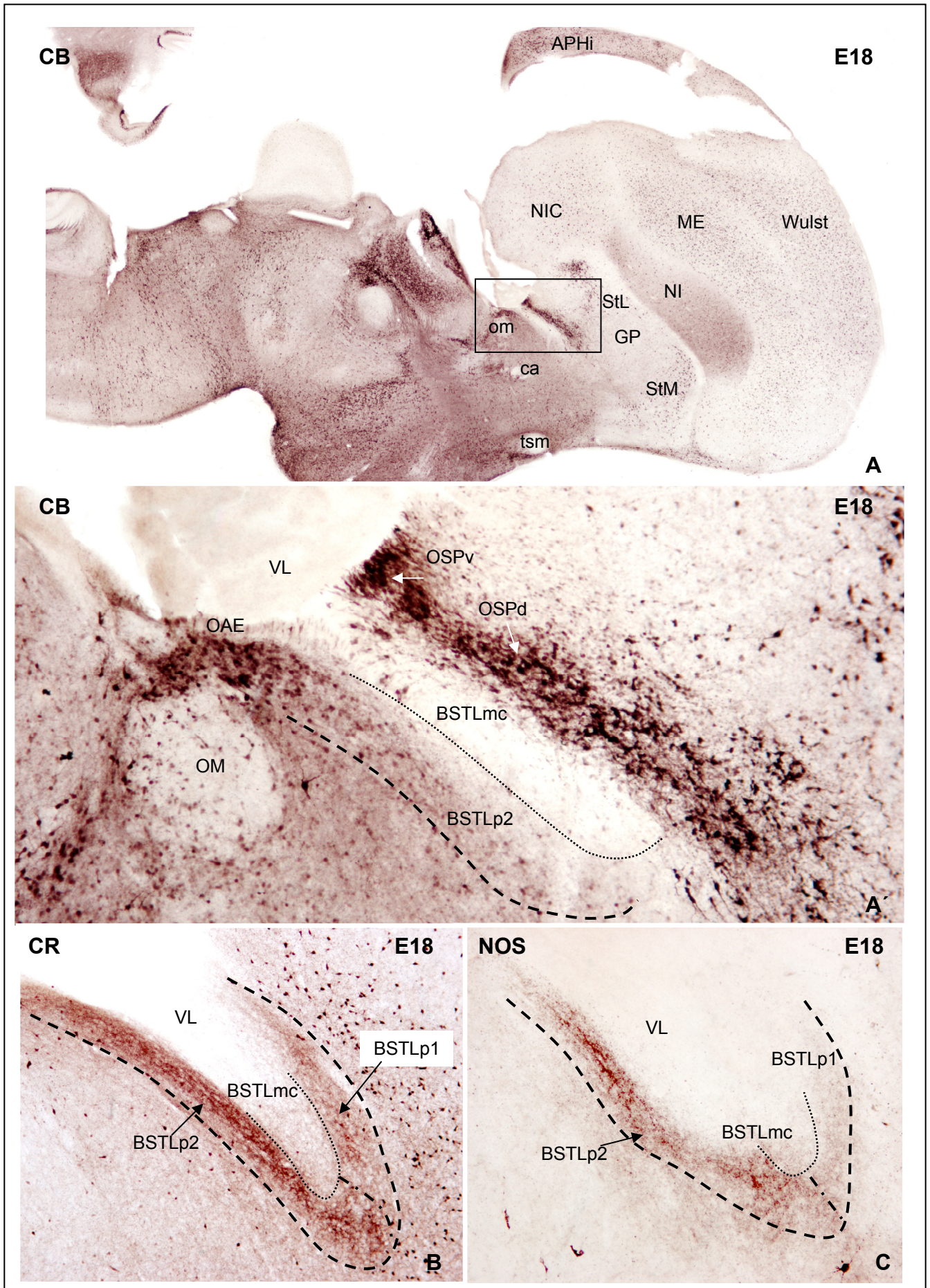
**Figura 5.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en E16, teñidas con técnica tipo Nissl (A) e inmunoteñidas para GABA (B), nNOS (C), calretina (D) y calbindina (E). Las imágenes B' y B'' son detalles de las áreas indicadas en B. Se muestra la compartimentalización del BSTL en 3 subdivisiones: BSTmc, BSTLp1 y BSTLp2 a un nivel telencefálico rostral (nivel A de la Figura1) en base a los patrones diferenciales de expresión para los marcadores descritos. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-E=100x; B',B''=400x.



**Figura 6.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en E16, inmunoteñidas para GABA (A), nNOS (B), calbindina (C) y calretinina (D). Se muestra la compartimentalización del BSTL en 3 subdivisiones: BSTLmc, BSTLp1 y BSTLp2 a un nivel telencefálico intermedio (nivel D de la Figura 1) en base a los patrones diferenciales de expresión para los marcadores descritos, así como una representación esquemática del complejo. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 100x.



**Figura 7.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en E16, inmunoteñidas para calretinina (A,B), calbindina (C), y nNOS (D). Se observa como el BSTLp2 se extiende hacia la región hipotalámica en los niveles más caudales (nivel E de la Figura 1) en base a los patrones diferenciales de expresión para los marcadores descritos. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 40x.



**Figura 8.** Microfotografías de secciones sagitales del telencéfalo de pollo en E18, inmunoteñidas para calbindina (A), calretinina (B), y nNOS (C). La imagen A' es un detalle del área recuadrada en A. Se muestra la compartimentalización del BSTL en 3 subdivisiones: BSTLmc, BSTLp1 y BSTLp2 en base a los patrones diferenciales de expresión para los marcadores descritos. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A=20x; A',B,C=40x.

## 2.2.- La División Medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”

Durante el desarrollo temprano la relativa inmadurez estructural del telencéfalo dificulta la definición precisa de los límites de aquellas estructuras que, como en el caso de la división medial del “bed nucleus de la stria terminalis”, se hallan inmersas en el manto. A partir de E8, sin embargo, es posible definir el área prospectiva de este núcleo, constituida por un agregado celular que se localiza en una posición ventral a la eminencia gangliónica lateral, y lateral al área entopeduncular, muy próxima al área prospectiva del BSTL. Esta región muestra una intensa expresión del factor de transcripción *Dlx5*, similar a la observada en la región subventricular del subpalio y muy superior a las de las áreas adyacentes del manto, la cual permanece estable durante los siguientes estadios del desarrollo (Fig. 9A; 10A).

Los patrones de expresión observados para el gen *Tbr1* son complementarios a los previamente descritos, apreciándose una total ausencia de marcaje tanto en el BSTM como en las regiones subpaliales adyacentes (Fig. 9B).

El gen *Nkx2.1* muestra en E8 un continuo de expresión a lo largo de todo el complejo del BST, incluyendo tanto la división lateral (descrita en el capítulo anterior) como la medial, así como un intenso marcaje en las regiones subcomisurales adyacentes, en la eminencia gangliónica lateral y en el área entopeduncular (Fig. 9C). Por otra parte, la señal del gen *Shh* es también muy intensa en el área entopeduncular, pero el marcaje en las áreas subpaliales adyacentes queda limitado fundamentalmente a la región del BSTM, en la que se aprecia un débil pero perceptible marcaje (Fig. 9E, F). Si bien la intensidad de la señal *Nkx2.1* se mantiene estable durante los siguientes estadios del desarrollo (Fig. 10B), el marcaje para *Shh* deja de ser perceptible a partir de E12 (datos no mostrados).

El marcaje para *Pax6* queda limitado a la porción estriatal del manto subpalial y a la zona subventricular palial, no habiéndose observado en ningún caso señal en la zona del BSTM (Fig. 9D).

La distribución de los diferentes marcadores inmunocitoquímicos estudiados es homogénea para cada una de las divisiones que componen el BSTM, dorsolateral (1) y ventromedial (2), existiendo sin embargo ligeras diferencias entre ambas estructuras. Así, a partir de E12 y durante todo el desarrollo se observa una fuerte inmunorreactividad para el GABA en ambas divisiones, caracterizada por un neuropilo de intensidad moderada y una población de células positivas que poseen sin embargo una mayor abundancia en la porción dorsolateral del núcleo (Figs. 10C; 12A). Se ha

observado que en los niveles caudales ambas divisiones forman un continuo anatómico conectado por medio de una delgada banda celular de similares características a las del resto del complejo. La menor inmunorreactividad para GABA presente en las regiones adyacentes permiten establecer de forma precisa los límites del conjunto (Fig. 12A).

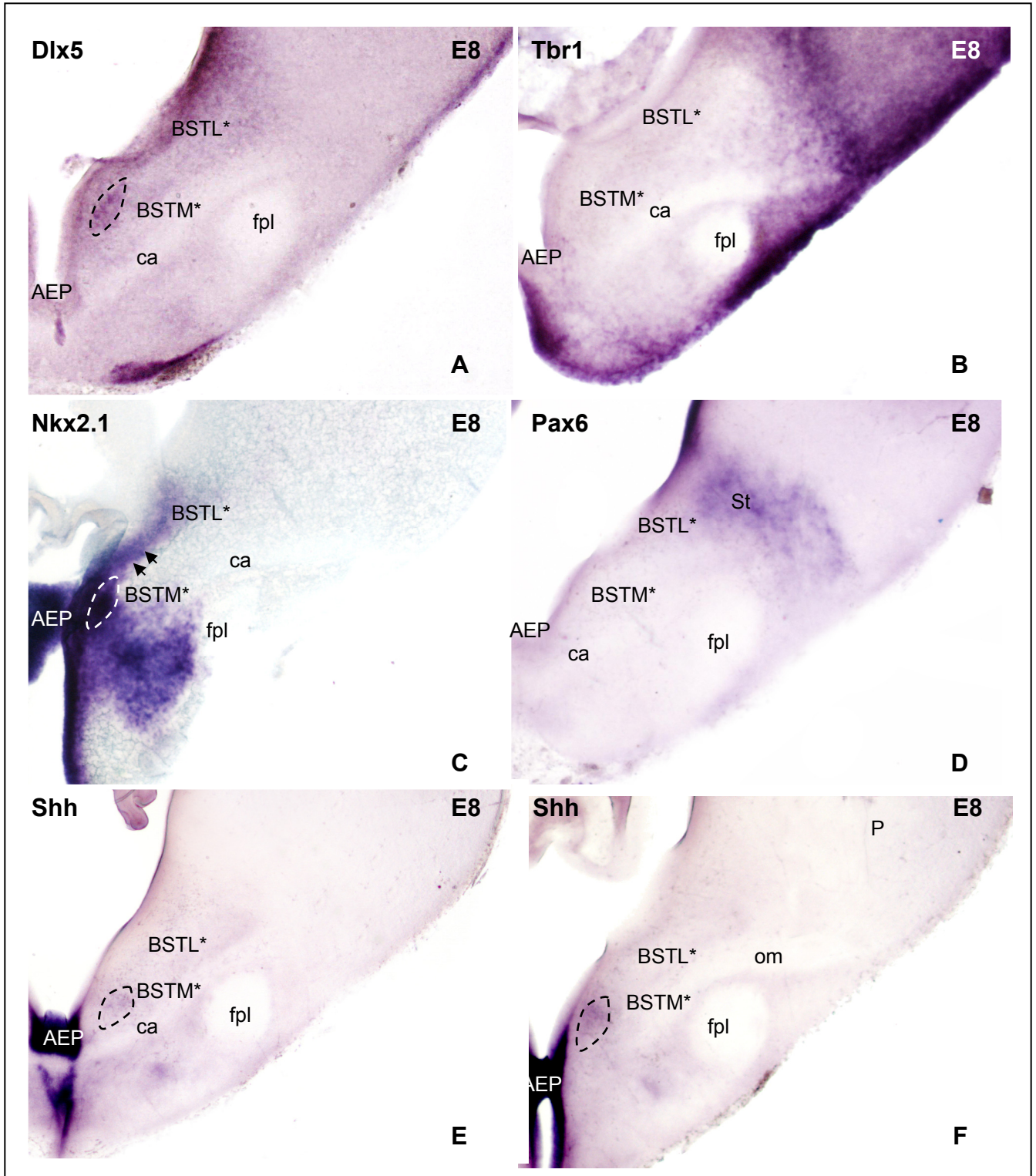
Los patrones de distribución de nNOS son similares a los descritos previamente para el GABA. De esta forma, el BSTM muestra algunas células aisladas nNOS positivas con un débil marcaje somático a partir de E12 (Fig. 10D). La densidad celular de esta población aumenta a lo largo del desarrollo, siendo al igual que en el caso anterior más abundante en la porción dorsolateral, y alcanzando un número de neuronas moderado y estable a partir de E14 (Fig. 11A, A', A'').

Es interesante resaltar el contraste de expresión existente entre el BSTM y la región subyacente, muy pobre en inmunorreactividad para GABA (Fig. 12A) pero con una gran cantidad de células nNOS marcadas intensamente en somas y prolongaciones (Fig. 11A, A', A''). Esta región, a la que denominaremos a partir de ahora *Corredor NOS*, será descrita con detalle en el siguiente capítulo; sin embargo, dada la proximidad y similitud anatómica que este corredor presenta con el BSTM se hace necesaria su mención con objeto de evitar posibles confusiones conceptuales.

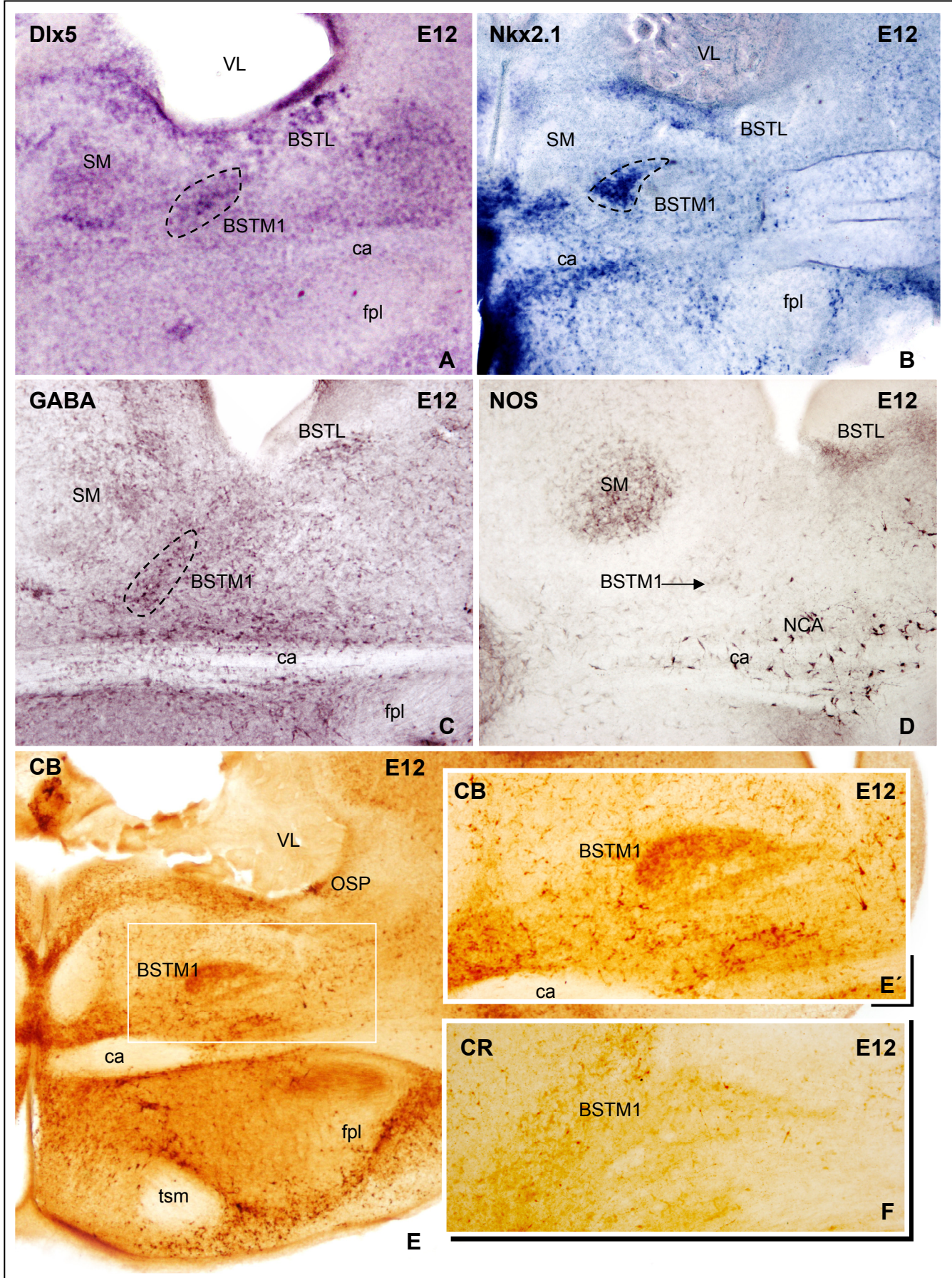
El BSTM se caracteriza por mostrar una intensa inmunorreactividad para calbindina. Este marcaje fue detectado por primera vez en embriones de 10 días, observándose algunas células aisladas en la región del BSTM1 (datos no mostrados). A partir de E12 la expresión de esta proteína ligadora de calcio es muy intensa en todo el BSTM, incrementándose el número de neuronas marcadas y apareciendo al mismo tiempo un neuropilo moderadamente positivo (Fig. 10E, E'). Hemos observado una estabilización en los patrones de expresión para calbindina durante el desarrollo en el rango comprendido entre E14 y P0, apreciándose sin embargo un ligero incremento en el número de neuronas en individuos postnatales (Fig. 12C, C'). Tanto el BSTM1 como el BSTM2 muestran una distribución homogénea de células calbindina intensamente marcadas inmersas en un neuropilo moderado rico en terminales, sin embargo, al contrario de lo que sucedía con la inmunorreactividad para el GABA y el nNOS, la densidad neuronal es ligeramente superior en la porción ventromedial (Figs. 11B; 12B, C). La delgada banda celular que constituye el nexo de unión entre las dos subdivisiones muestra un patrón de expresión diferencial a lo largo de su extensión, mostrando cada extremo una expresión similar a la porción del BSTM con la que contacta de forma directa (Fig. 12B, C').

La expresión de calretinina en el complejo del BSTM es muy escasa, quedando restringida alguna célula aislada de débil marcaje en la porción dorsolateral. Esta señal, presente desde E12 (Fig. 10F) y estable durante el desarrollo a partir de E14, deja de ser observable tras el nacimiento del embrión (datos no mostrados). En ningún caso hemos detectado inmunorreactividad para parvalbúmina en la región del BSTM (datos no mostrados).

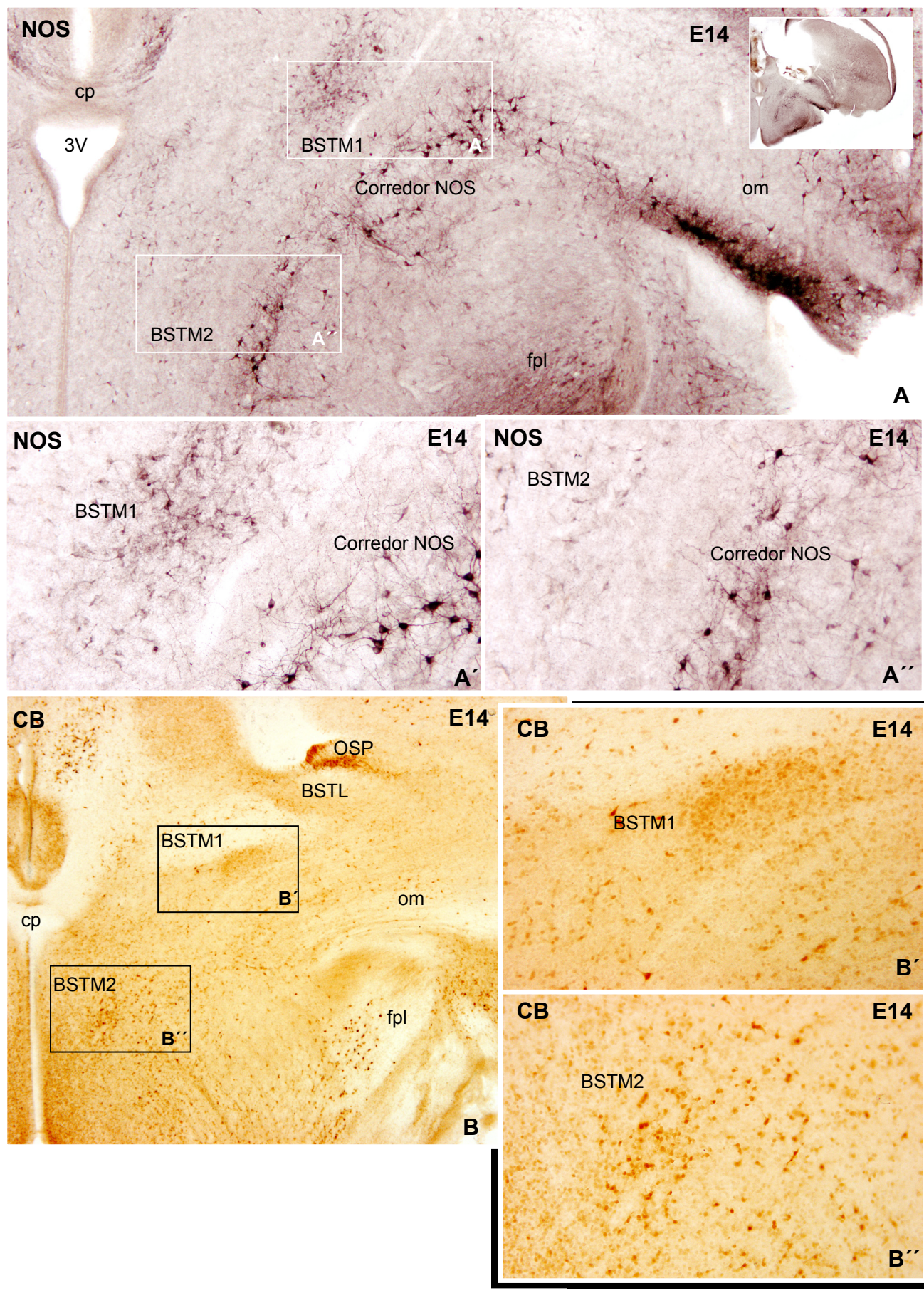




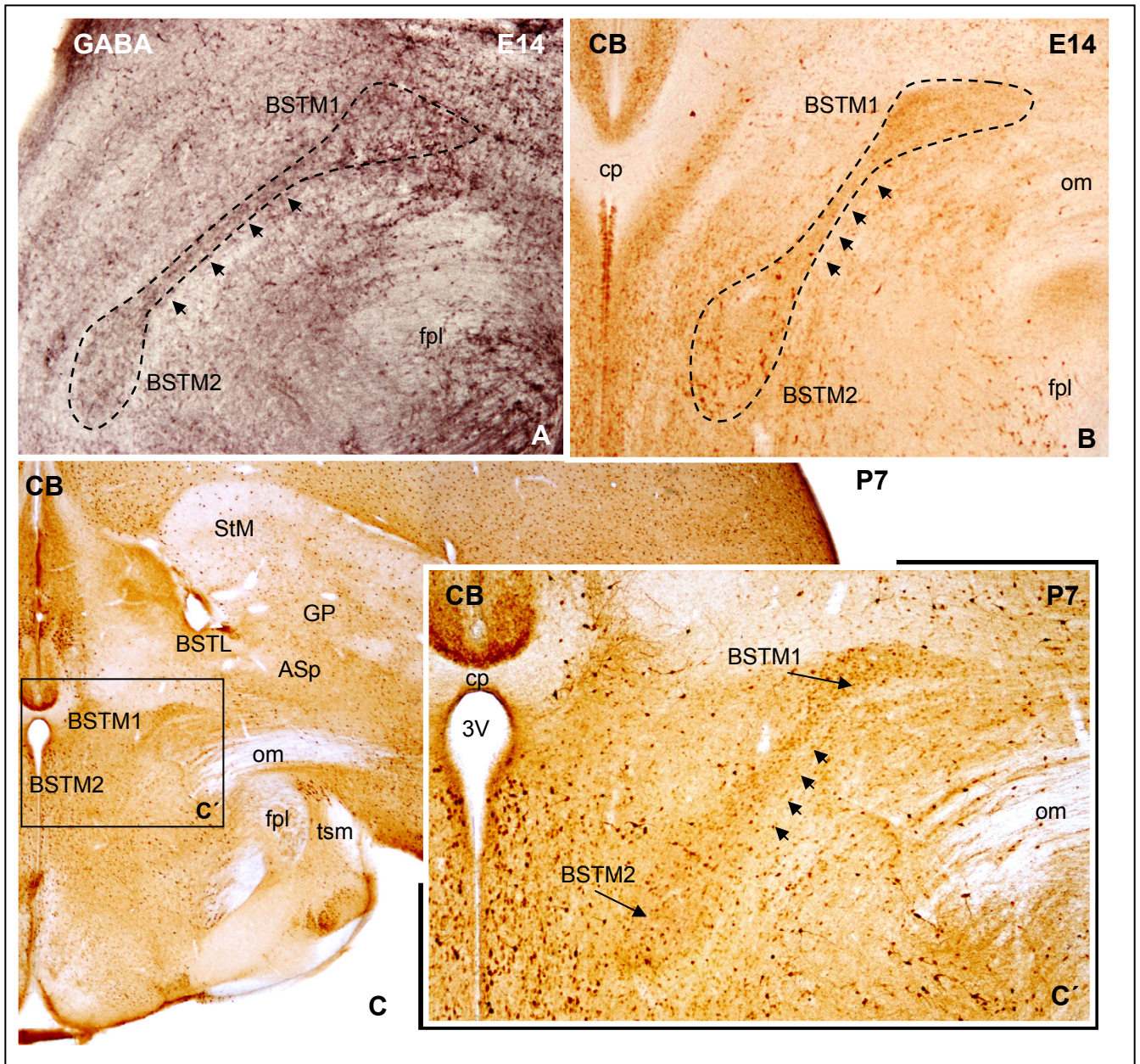
**Figura 9.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E8, hibridadas para *Dlx5* (A), *Tbr1* (B), *Nkx2.1* (C), *Pax6* (D) y *Shh* (E,F). Los asteriscos sobre el nombre de un núcleo denotan que se trata de su área prospectiva. Se observa una intensa marca *Dlx5* (A) y *Nkx2.1* (C) en el área prospectiva del BSTM, así como una señal moderada *Shh* (E,F) en esta región. Las cabezas de flecha señalan el continuo de expresión *Nkx2.1* entre BSTL Y BSTM. No se ha detectado marca *Tbr1* (B) ni *Pax6* (D) en el área prospectiva del BSTM durante el desarrollo. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 40x.



**Figura 10.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E12, hibridadas para *Dlx5* (A) y *Nkx2.1* (B), e inmunoteñidas para GABA (C), nNOS (D), calbindina (E) y calretinina (F). La imagen E' es un detalle del área recuadrada en E. Las imágenes E' y F se corresponden a secciones paralelas. Se observa una intensa señal *Dlx5* (A) y *Nkx2.1* (B) en el BSTM, así como un fuerte marcaje para GABA (C) y calbindina (E,E') en esta región. El BSTM muestra algunas células de carácter tenue nNOS positivas (D), junto con alguna célula aislada inmunoreactiva para calretinina (F). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-E=40x; E',F=100x



**Figura 11.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E14 inmunoteñidas para nNOS (A) y calbindina (B). Las imágenes A', A'' y B', B'' son detalles de las áreas recuadradas en A y B respectivamente. Las imágenes A, A' y A'' muestran un débil marcaje de las células nNOS-ir en el BSTM frente a la fuerte señal observada en las neuronas tipo golgi del corredor nNOS. La intensidad de marcaje y abundancia relativa de las células nNOS-ir es superior en el BSTM1, apreciándose una tendencia complementaria para la distribución de calbindina (B, B', B''). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A=60x; B=40x; A', A'', B', B''=100x



**Figura 12.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E14 y P7 inmunoteñidas para GABA (A) y calbindina (B,C). La imagen C' es un detalle del área recuadrada en C. La distribución de células GABAérgicas es ligeramente superior en el BSTM1 que en el BSTM2 (A), observándose en el caso de la calbindina un patrón complementario (B). Es posible apreciar un incremento en el número de células calbindina positivas en individuos postnatales (B,C,C'). Las cabezas de flecha muestran un delgado corredor de unión entre las dos subdivisiones que componen el BSTM. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B,C'=100x; C=20x.

## 2.3.- El Corredor nNOS

En el capítulo anterior describimos la presencia de un corredor de células adyacente ventrolateralmente al BSTM, al que denominamos *Corredor NOS*, caracterizado por mostrar una inmunorreactividad muy intensa para la sintasa del óxido nítrico. Desde estadios tempranos del desarrollo (E8 y E10) es posible observar algunas células positivas en el área prospectiva de este corredor (datos no mostrados). Sin embargo, es a partir de E12 cuando la población neuronal nNOS que caracteriza al corredor alcanza una cierta estabilidad en cuanto a densidad celular y patrones de distribución, no apreciándose cambios significativos en el desarrollo tardío y las etapas adultas (Figs. 13; 14).

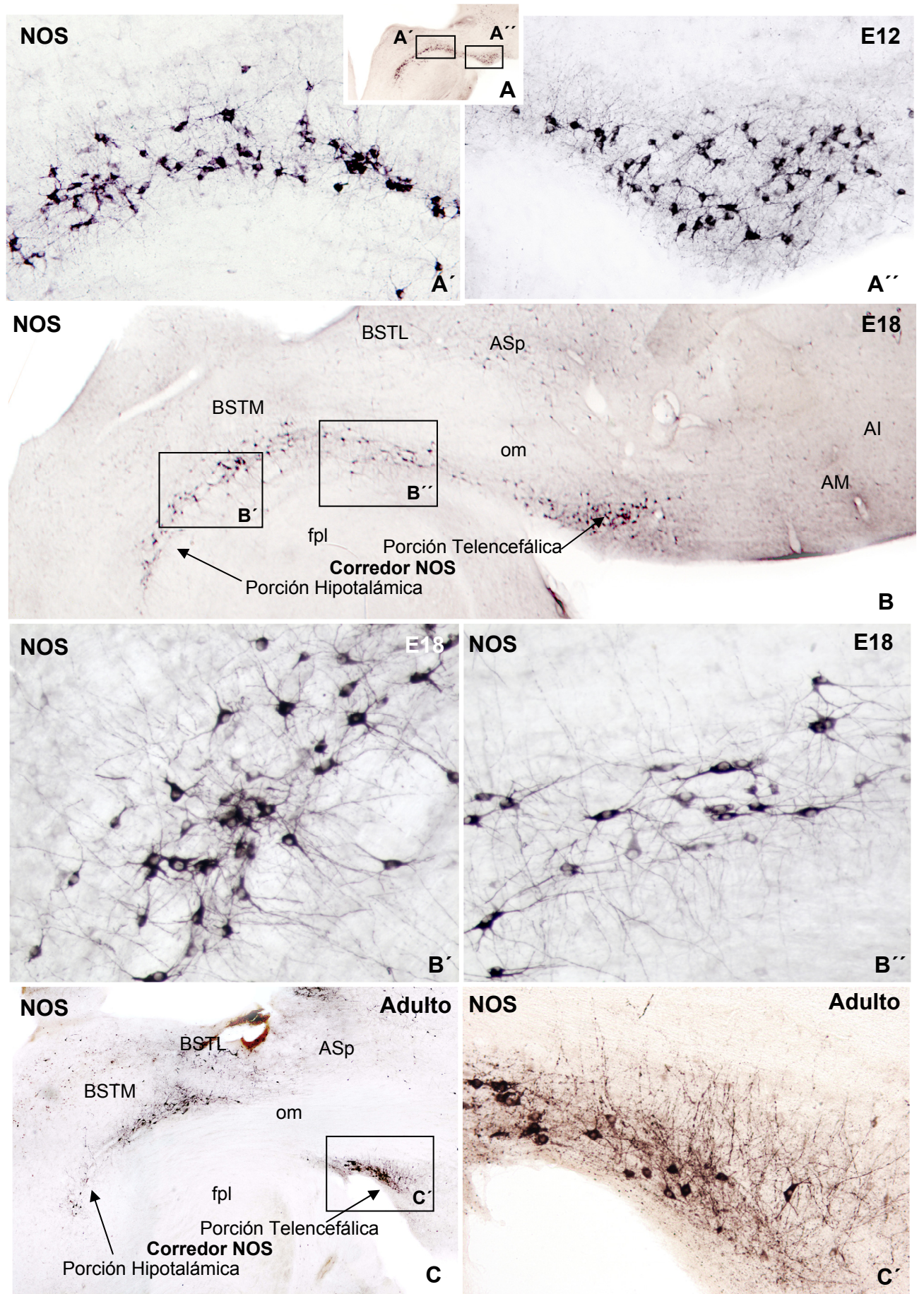
Hemos observado que si bien la mayor parte del corredor se localiza en el hipotálamo la porción más lateral del mismo queda incluida en el territorio telencefálico. Esta porción telencefálica se localiza bajo el tracto occipitomesencefálico, contactando lateralmente con el arcopallio medial y hallándose muy próxima dorsalmente al área subpallial amigdalina (Figs. 13A,B,C; 14A). Está constituida por un conjunto de neuronas multipolares fuertemente inmunorreactivas para nNOS en soma y prolongaciones, pero con un núcleo que carece completamente de marcaje. Se ha observado que en su conjunto las células de la porción telencefálica se hallan inmersas en un abundante neuropilo consistente en fibras varicosas intensamente inmunoteñidas que discurren en su mayoría perpendiculares a la extensión longitudinal del núcleo (Fig 13A'', C'; 14A').

La porción telencefálica del corredor se extiende hacia el hipotálamo dando lugar a una estructura pseudoestratificada de cuatro a seis células de espesor, de características idénticas a las descritas, que se distribuyen formando un arco que rodea parcialmente al fascículo prosencefálico lateral hasta el nivel del núcleo paraventricular (Figs. 13A, B, C; 14C). La disposición perpendicular de las fibras varicosas continua a lo largo de toda la extensión hipotalámica, acompañando en todo momento el giro trazado por el corredor (Figs. 13A', B', B''; 14C') Si bien existe una continuidad entre las dos porciones que componen el corredor, hemos observado un adelgazamiento de la estructura en la zona de transición telencéfalo-hipotalámico, donde el grosor de la estructura queda limitado a una o dos capas de células (Figs. 13A, A'', B, C; 14B, B').

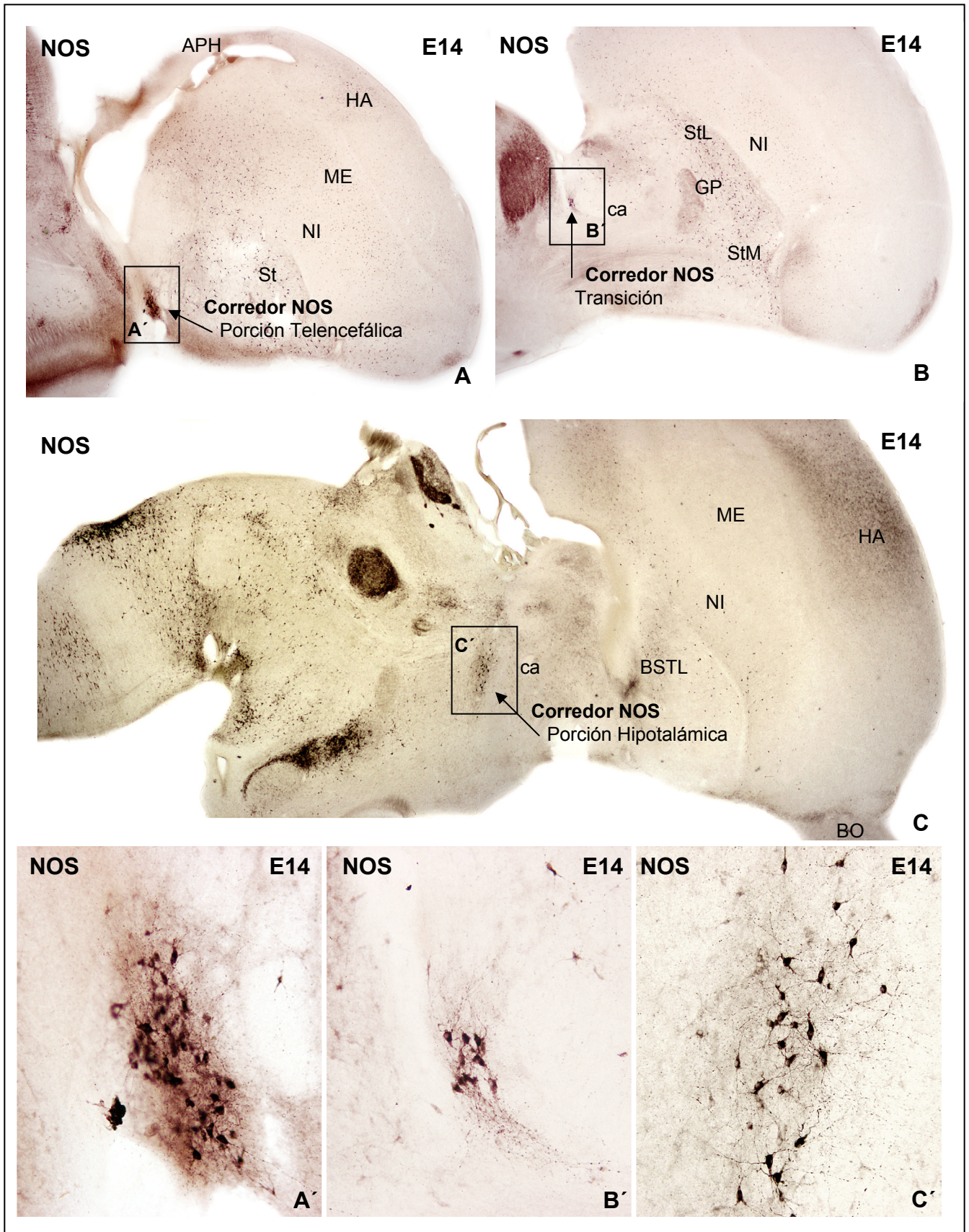
Se ha observado que el *Corredor NOS* posee en su conjunto una elevada inmunorreactividad para la calbindina, caracterizada por una población abundante de células fuertemente marcadas en núcleo y citoplasma perinuclear que se hallan inmersas en un neuropilo de moderada intensidad (Fig. 15A). Por el contrario, la

inmunorreactividad para calretinina se mantiene prácticamente ausente en toda la extensión del corredor (Fig. 15B), mientras que es posible sin embargo apreciar alguna célula aislada de carácter GABAérgico a lo largo de su recorrido (Fig. 15C). Cabe destacar que los patrones de expresión descritos para el corredor coinciden de forma generalizada con los presentes en la mayor parte de las estructuras paliales. De esta forma el Wulst, el mesopalio, el nidopalio, el arcopalio y la adyacente amígdala hipocampal expresan de forma generalizada calbindina (Fig. 15A'), al tiempo que muestran una muy reducida expresión para calretinina y una abundancia relativa de células GABAérgica inferior a la de las regiones subpaliales. Por su parte, la expresión de calbindina en las grandes estructuras subpaliales, tales como el estriado, el globo pálido y el área subpialial amigdalina se reduce a unas pocas células aisladas, mientras que la distribución de neuronas calretinina positivas y GABAérgicas es muy abundante en toda su extensión (Fig. 15B,C). Así, en base a los patrones de distribución combinados de los citados marcadores, hemos observado que en los niveles caudales el subpalio no alcanza la superficie del telencéfalo, de tal forma que la porción telencefálica del *Corredor NOS* se localiza muy próxima al límite palio-subpalio, quedando sin embargo enclavada en el compartimento palial (Fig. 15A', B, C).

Hemos observado en los estadios iniciales del desarrollo que el dominio de expresión del gen *Tbr1* es muy extenso en los niveles caudales del prosencéfalo, apreciándose una intensa señal en todo el compartimento palial, la eminencia thalami y gran parte de la región hipotalámica que rodea al fascículo prosencefálico lateral, incluyendo a la región prospectiva del *corredor nNOS* (Fig. 16A,B). Muy próximo a esta región existe una estrecha banda carente de señal *Tbr1*, la cual muestra sin embargo una marca intensa para el gen *Dlx5* (Fig. 16C). La localización de esta banda *Dlx5* positiva es adyacente, pero no coincidente, con el *Corredor NOS*, pudiendo ser observado un trazado paralelo en ambas estructuras. Cabe destacar además que el BSTM, descrito en el capítulo anterior como una estructura muy próxima al *Corredor nNOS*, forma parte de la banda de expresión *Dlx5*, la cual se extiende a lo largo del hipotálamo hasta alcanzar niveles profundos más allá del límite ventral alcanzado paralelamente por el Corredor NOS (Fig. 17).

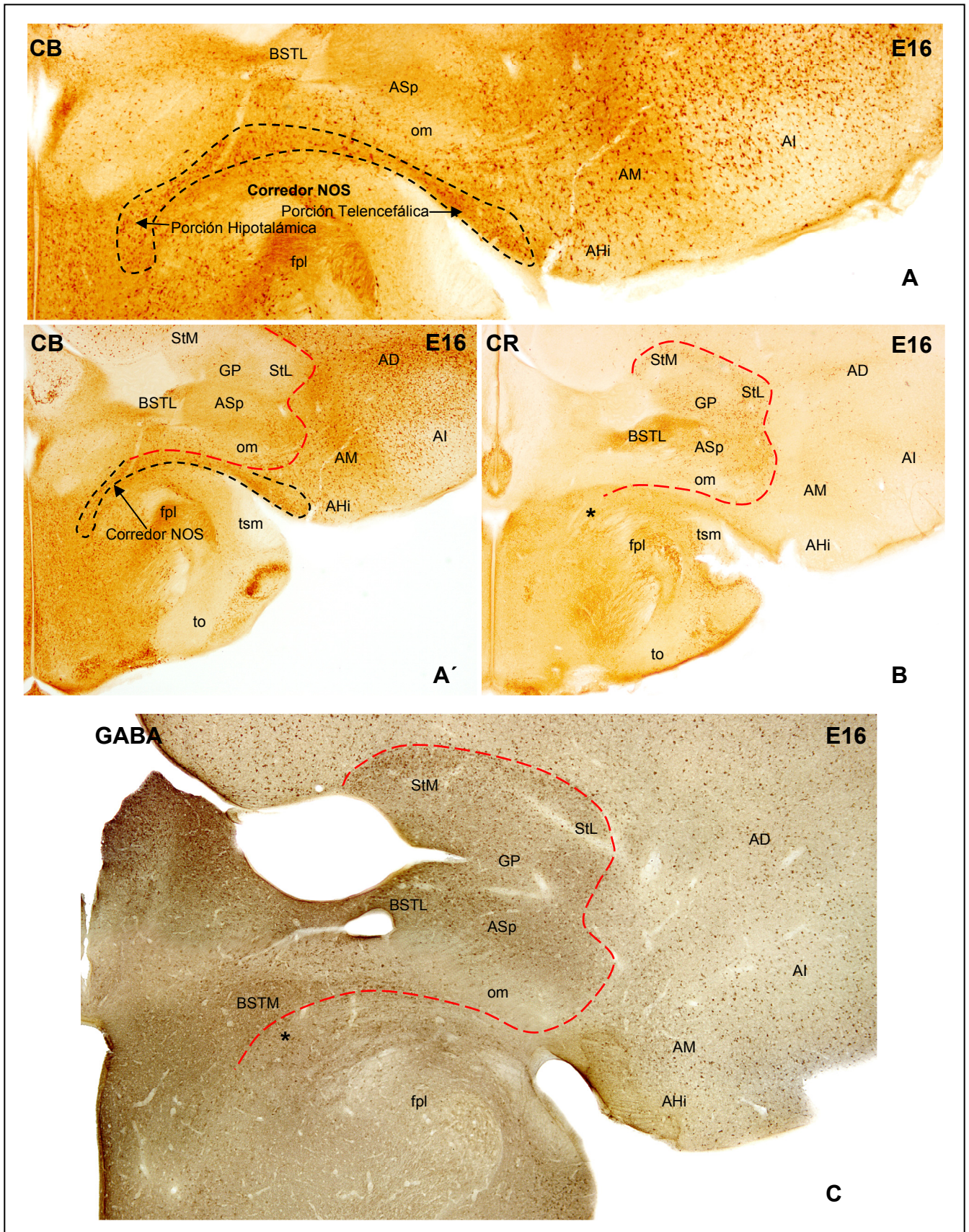


**Figura 13.** Microfotografías de secciones coronales de telencefalo de pollo en E12, E18 y Adulto inmunoteñidas para nNOS. Las imágenes A', A'', B', B'' y C' son detalles de las áreas recuadradas en A, B y C respectivamente. Se muestran las porciones telencefálica e hipotalámica de las que se compone el **Corredor NOS** (B,C). Las neuronas presentan en ambas subdivisiones un intenso marcaje en citoplasma y prolongaciones, pero no en el núcleo. Se observa un neuropilo varicoso fuertemente inmunoteñido que se dispone en su mayoría perpendicular al eje mayor del corredor (A',A'',B',B'',C'). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A=5x; A',A'',C'=200x; B=40x; B',B''=400x; C=10x.

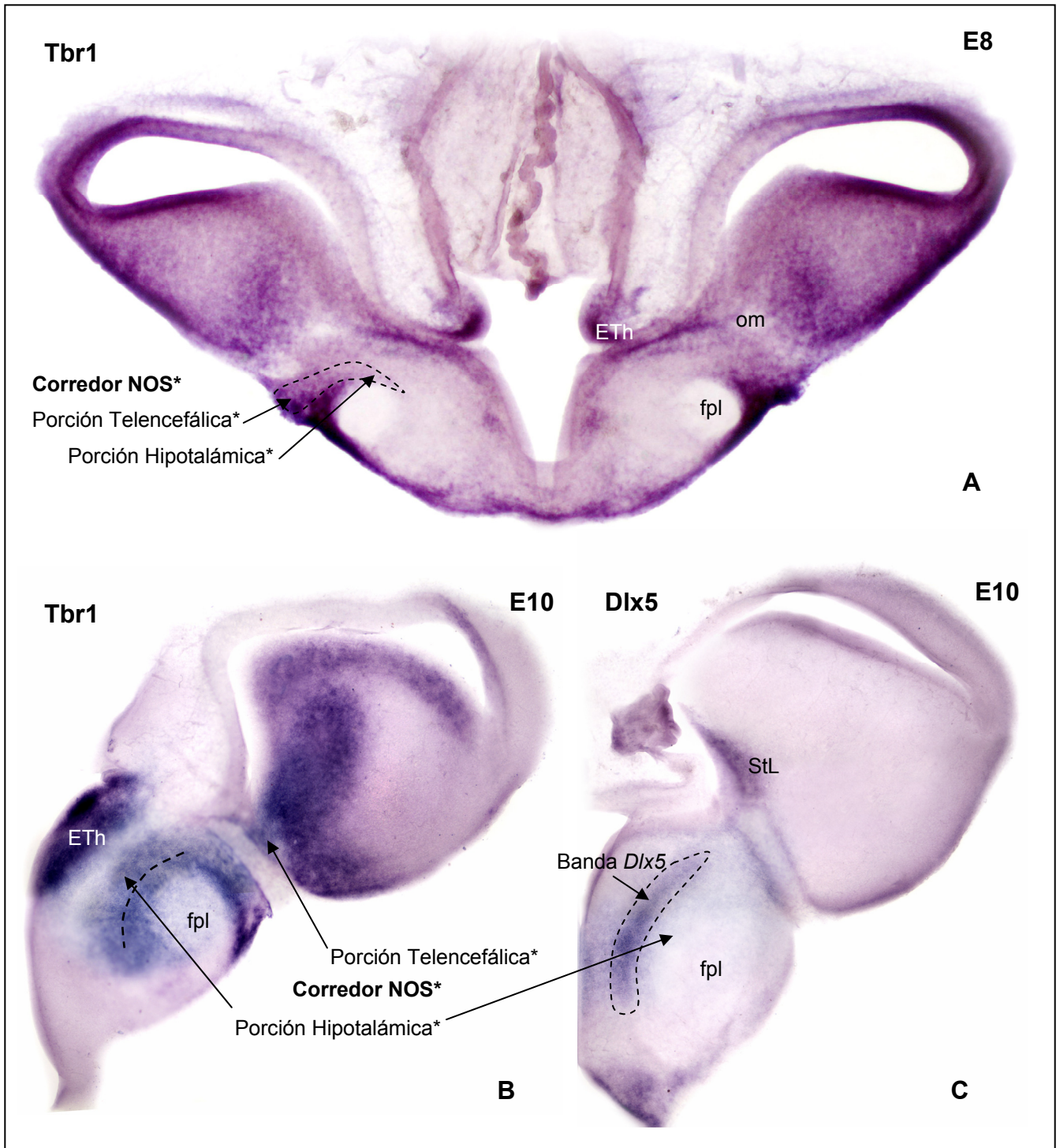


**Figura 14.** Microfotografías de secciones sagitales de telencéfalo de pollo en E14 inmunoteñidas para nNOS. Las imágenes A', B' y C' son detalles de las áreas recuadradas en A, B y C respectivamente. Se muestran las porciones telencefálica (A) e hipotalámica (C) de las que se compone el *Corredor NOS*, así como el punto de transición entre ambas (B). Las neuronas presentan en ambas subdivisiones un intenso marcaje en citoplasma y prolongaciones, pero no en el núcleo. Se observa un neuropilo varicoso fuertemente inmunoteñido que se dispone en su mayoría perpendicular al eje mayor del corredor (A', C'). El punto de transición muestra un menor número de pseudoestratos celulares (B'). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B,C=20x; A',B',C'=200x.

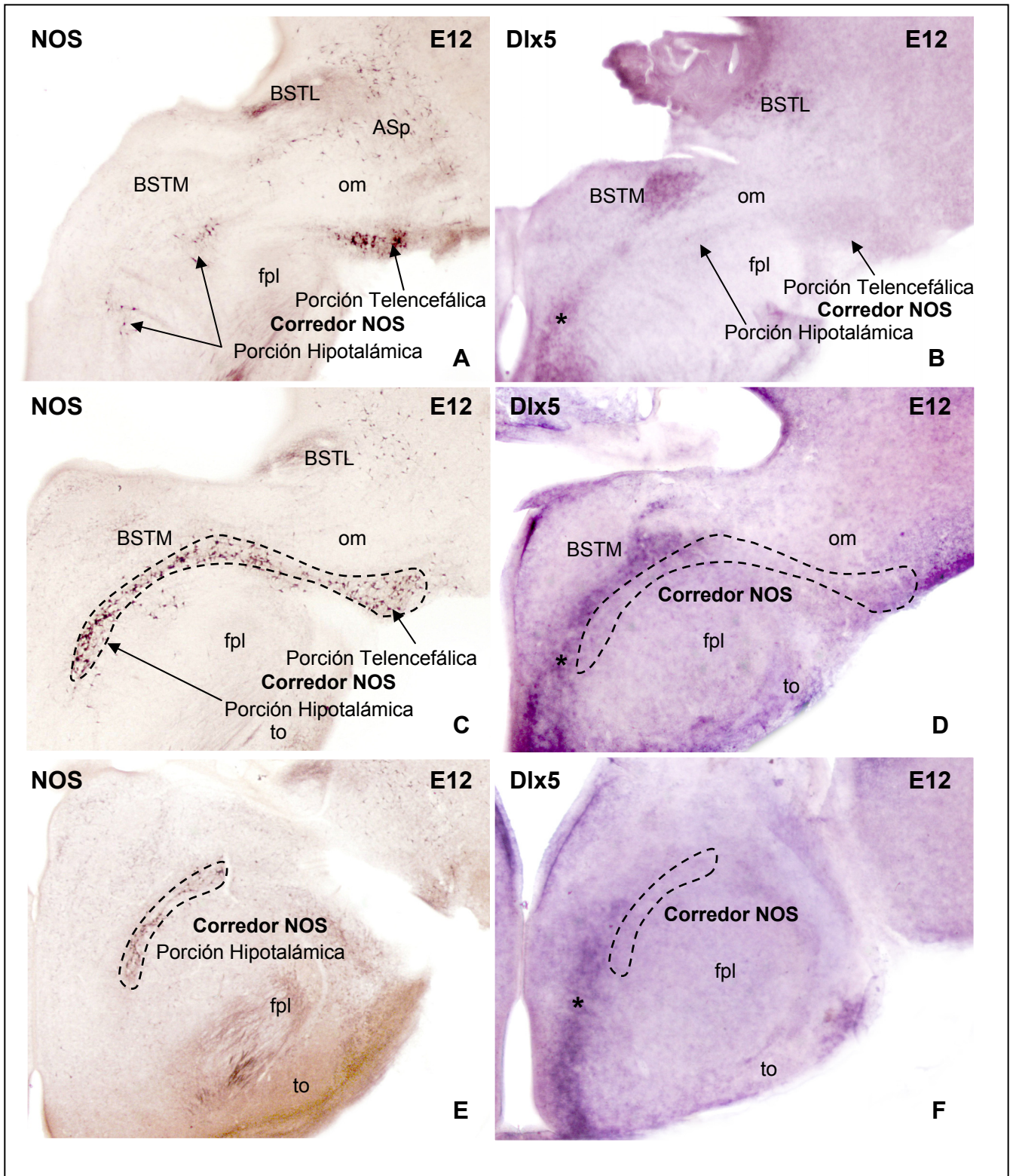




**Figura 15.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E16 inmunotefidas para calbindina (A,A'), calretinina (B) y GABA (C). La línea de puntos roja define el límite palio/subpalio. Los asteriscos indican la posición del *Corredor NOS*. Se observa una fuerte inmunoreactividad para calbindina (A), una carencia de marcaje para la calretinina (B) y algunas células GABAérgicas aisladas (C) distribuidas a lo largo del *Corredor NOS*. Los patrones de distribución del corredor para los marcadores descritos es similar a la observada en el palio (A',B,C). Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A=40x; A',B=20x; C=25x.



**Figura 16.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E8 y E10, hibridadas para *Tbr1* (A,B) y *Dlx5* (C). Los asteriscos sobre el nombre de un núcleo denotan que se trata de su área prospectiva. Se observa una intensa marca *Tbr1* en el *Corredor NOS\**, tanto en su porción telencefálica como en su porción hipotalámica (A,B), así como una ausencia total de marcaje *Dlx5* en esta región. Se ha observado una intensa banda *Dlx5* positiva que discurre paralela a la porción hipotalámica del *Corredor NOS* (C). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 40x.



**Figura 17.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E12 inmunoteñidas para nNOS (A,C,E) e hibridadas para *Dlx5* (B,D,F). Comparativa rostrocaudal entre el *Corredor NOS* y la Banda *Dlx5* positiva, señalada esta última mediante un asterisco. Ambas estructuras son adyacentes y muestran una disposición paralela a nivel del hipotálamo. La banda *Dlx5* positiva incluye al BSTM y se extiende hasta niveles profundos del hipotálamo. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 40x.

## 2.4.- El Área Subpalial Amigdalina

El área subpalial amigdalina (ASp) es una estructura de reciente descripción localizada originalmente en una posición caudal del telencéfalo, ventral al globo pálido y muy próxima al tracto occipitomesencefálico. La expresión del gen *Dlx5* es homogénea a lo largo de toda su extensión, observándose una intensidad de marcaje ligeramente superior a la presente en las áreas subpaliales adyacentes, tales como el estriado y el globo pálido, pero inferior sin embargo a la mostrada por el BSTL (Fig. 18A). La distribución del factor de transcripción *Tbr1* es complementaria a la de *Dlx5*, observándose una total carencia de señal en el conjunto de áreas citadas anteriormente (Fig. 18B).

Hemos observado un continuo de expresión *Pax6* en el estriado lateral y el área subpalial amigdalina, apreciándose en ambas estructuras una señal intensa, aunque ligeramente inferior a la mostrada por el estriado medial. El marcaje *Pax6* presente en el tándem estriado-ASp contrasta con la ausencia total de expresión en el palio, lo cual permite el establecimiento preciso del límite entre este compartimento y el subpalio. De forma similar las estructuras palidales adyacentes, tales como el BSTL y el globo pálido, no muestran señal alguna para este gen (Fig. 18C, D).

No se ha observado señal *Nkx2.1* ni *Shh* en los dominios del área subpalial amigdalina en ninguno de los estadios estudiados (datos no mostrados).

El estudio detallado de las distintas poblaciones neuronales que componen el área amigdalina subpalial nos ha llevado a considerar dos aspectos que complementan la descripción original del núcleo, y cuya exposición se hace necesaria llegados a este punto. Así, en primer lugar, se han observado diferencias significativas en cuanto a la distribución de nuestros marcadores en la porción lateral y medial del núcleo (Figs. 19-22), por lo que a lo largo de la siguiente descripción citaremos al ASpL (área subpalial amigdalina lateral) y al ASpM (área subpalial amigdalina medial) de forma independiente. En segundo lugar, la porción medial del núcleo puede ser reconocida desde niveles telencefálicos rostrales (Fig. 19A, C), ocupando una posición lateral al BSTL, medial al fascículo prosencefálico lateral y ventral al globo pálido. Más caudalmente, a nivel de la comisura anterior (Fig. 19B, D, C), tanto la porción lateral como la medial son claramente reconocibles, habiéndose observado sin embargo un aumento en la superficie de contacto entre ambas estructuras a nivel del tracto occipitomesencefálico (Figs. 20-23), coincidiendo en este punto el área ocupada por el núcleo en la descripción original.

El ASpM muestra desde E12 una fuerte inmunorreactividad para nNOS, consistente en una población de neuronas intensamente inmunoteñidas en soma y prolongaciones, aunque no en el núcleo, inmersas en un neuropilo rico en fibras varicosas (Fig. 20A'). La abundancia relativa de neuronas y neuropilo aumenta paulatinamente hasta E16, momento en el que se alcanza una distribución que se mantiene estable durante el resto del desarrollo. El marcaje nNOS característico en el ASpM permite establecer los límites entre esta región y el globo pálido, adyacente dorsalmente desde los niveles rostrales, el cual muestra una pobre distribución de neuronas inmunorreactivas. De forma similar, el neuropilo nNOS positivo presente en el BSTLp1 y BSTLp2 es más abundante y rico en terminales que el observado en el ASpM, por lo que ambas estructuras pueden ser claramente diferenciadas en base al estudio de este marcador (Figs. 19A, B; 20A, B).

La distribución de células y neuropilo inmunorreactivas presentes en la porción lateral del ASp es muy similar a la descrita previamente para la porción medial a partir de E16 (Figs. 19A, B; 20A, B), observándose sin embargo una abundancia relativa ligeramente superior en la ASpL hasta alcanzar este estadio (datos no mostrados).

Cabe destacar además que el límite ventral de esta región no queda definido por los tractos adyacentes, la comisura anterior en niveles intermedios y el tracto occipitomesencefálico en niveles caudales. La escasa inmunorreactividad presente en las áreas arcopaliales, con una total ausencia de neuropilo teñido y tan solo alguna célula aislada inmunopositiva, permite establecer de forma precisa el límite de la ASpL, que ocupa una posición ventral a la comisura anterior (Fig. 19B) y al tracto occipitomesencefálico rostral (Fig. 20A, A'). La elevada densidad de neuronas nNOS positivas en la porción telencefálica del *corredor NOS*, muy superior a la observada en la ASpL, define el límite ventral de esta estructura bajo el tracto occipitomesencefálico caudal (Fig. 20B, B').

La inmunorreactividad para calretinina es muy elevada a lo largo de toda la extensión del ASp, habiéndose observado sin embargo una mayor densidad celular en la porción lateral del núcleo (Figs. 19C, D; 21A, 22A). Esta diferencia de expresión es mayor en los primeros estadios del desarrollo, de tal forma que en E12 el ASpM muestra tan solo algunas células de carácter aislado frente a una población neuronal moderadamente abundante presente en el ASpL (datos no mostrados). En los siguientes estadios la abundancia relativa de células positivas se ve incrementada de forma desigual en ambas estructuras, alcanzándose una distribución estable en E16. La diferencia en cuanto a densidad neuronal observada entre ambas subdivisiones es sutil pero perceptible a partir de este estadio (Fig. 21A', A'').

Los patrones de distribución de calretinina, al igual que los mostrados por nNOS, permiten establecer de forma clara los límites entre el BSTL, caracterizado por presentar un intenso neuropilo en las subdivisiones 1 y 2 del núcleo, y el ASpM, que muestra una abundante población de células inmunoteñidas en núcleo y citoplasma perinuclear, con un fondo ligeramente marcado en el que no es posible apreciar de forma clara fibras marcadas (Figs. 19C, D; 21A, 22A). Además, la menor abundancia relativa de células marcadas en el estriado permite definir de forma precisa el límite entre esta región y el ASpL subyacente, muy rico en neuronas inmunorreactivas (Figs. 19C, D; 21A, 22A).

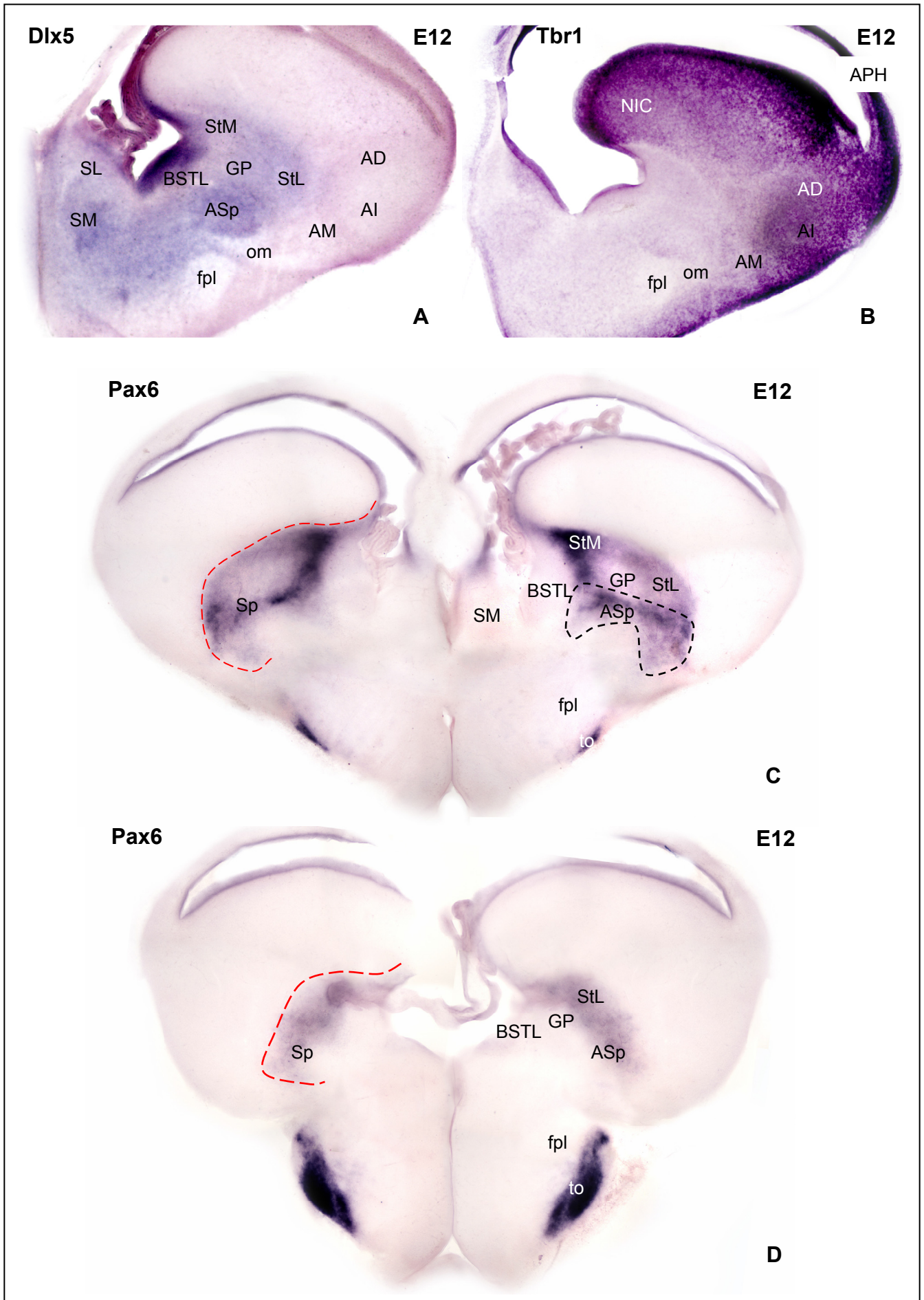
La abundante distribución de calretinina mostrada por el conjunto del subpalio frente a la reducida inmunorreactividad presente en el palio permite establecer el límite entre ambos compartimentos. Las caras lateral y ventral del ASpL se hallan en contacto directo con este límite, el cual alcanza la superficie telencefálica en los niveles intermedios de la comisura anterior y discurre ventral al tracto occipitomesencefálico en niveles más caudales, sin alcanzar en este caso la superficie del telencéfalo. Estas observaciones complementan a las previamente descritas para nNOS, localizando a una pequeña porción del ASpL bajo ambos tractos de fibras (Fig. 23).

Se ha observado un elevado número de células fuertemente inmunorreactivas para calbindina en núcleo y citoplasma perinuclear inmersas en un moderadamente abundante neuropilo teñido en la porción lateral del ASp. Esta distribución contrasta con la escasa densidad neuronal, consistente en algunas células positivas aisladas, presente en la porción medial del núcleo (Figs. 19F; 21B, B', B'', 22B). Este patrón es observable a partir de E14, apreciándose un ligero incremento en el número de neuronas en E16. La distribución alcanzada en este estadio permanece estable durante el resto del desarrollo y en el individuo adulto (datos no mostrados).

Cabe destacar la diferencia de expresión existente entre esta región y el estriado lateral, en el que tan solo se observan algunas células positivas aisladas. Este patrón diferencial permite situar el límite rostral del ASpL a nivel de la comisura anterior, descartando la coexistencia de esta región con el ASpM en los niveles más rostrales del telencéfalo (Fig. 19E, F). Además, si bien el arcopalio medial muestra una intensa inmunorreactividad para la calbindina, los tipos neuronales presentes en esta región difieren de los previamente descritos para el ASpL, observándose en este caso una población de células redondeadas de pequeño tamaño, carentes de marcaje en prolongaciones (Fig. 21B'''). Este hecho permite establecer de forma clara la diferencia entre ambas estructuras en base a las características quimioarquitectónicas de las neuronas calbindina positivas.

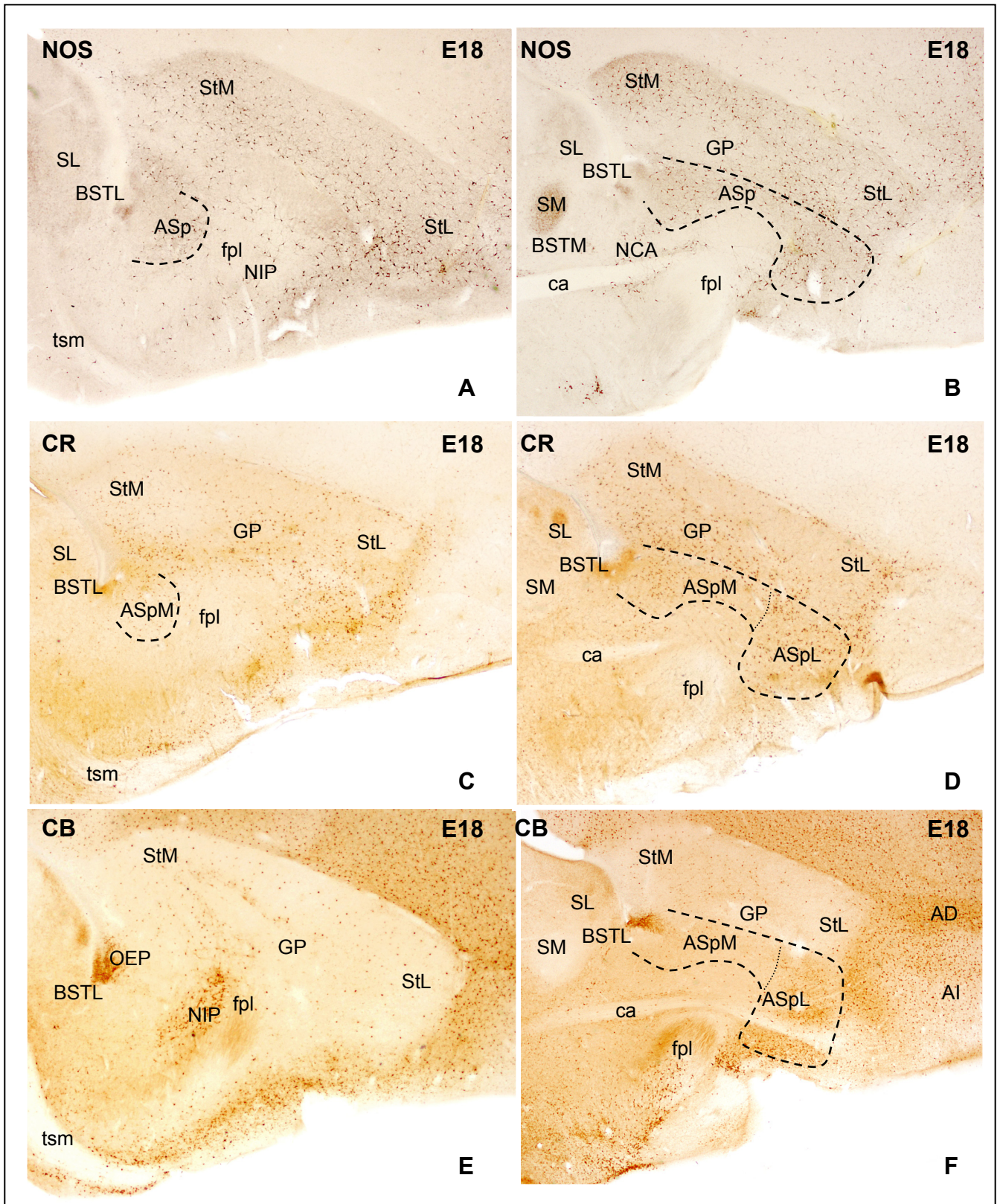
La distribución de células GABAérgicas en el área subpalial amigdalina se muestra ligeramente diferente en las porciones medial y lateral del núcleo, observándose una densidad neuronal algo inferior en esta última división (Fig. 22C, C'). Dichos patrones de distribución son observables desde E12, apreciándose sin embargo un ligero incremento en el número de células hasta E16 (datos no mostrados). La similitud de expresión observada entre el BSTL, el globo pálido y el ASpM dificultan la definición de los límites precisos entre estas estructuras en base a la distribución de células GABAérgicas. Sin embargo, la diferencia de inmunorreactividad entre el palio y el subpalio permite establecer de forma precisa el límite entre el ASpL y el arcopalio adyacente, el cual muestra una menor densidad de células marcadas (Fig. 22C).

No se ha observado inmunorreactividad para la parvalbúmina en el área amigdalina subpalial durante los estadios embrionarios estudiados ni en el individuo adulto (datos no mostrados).

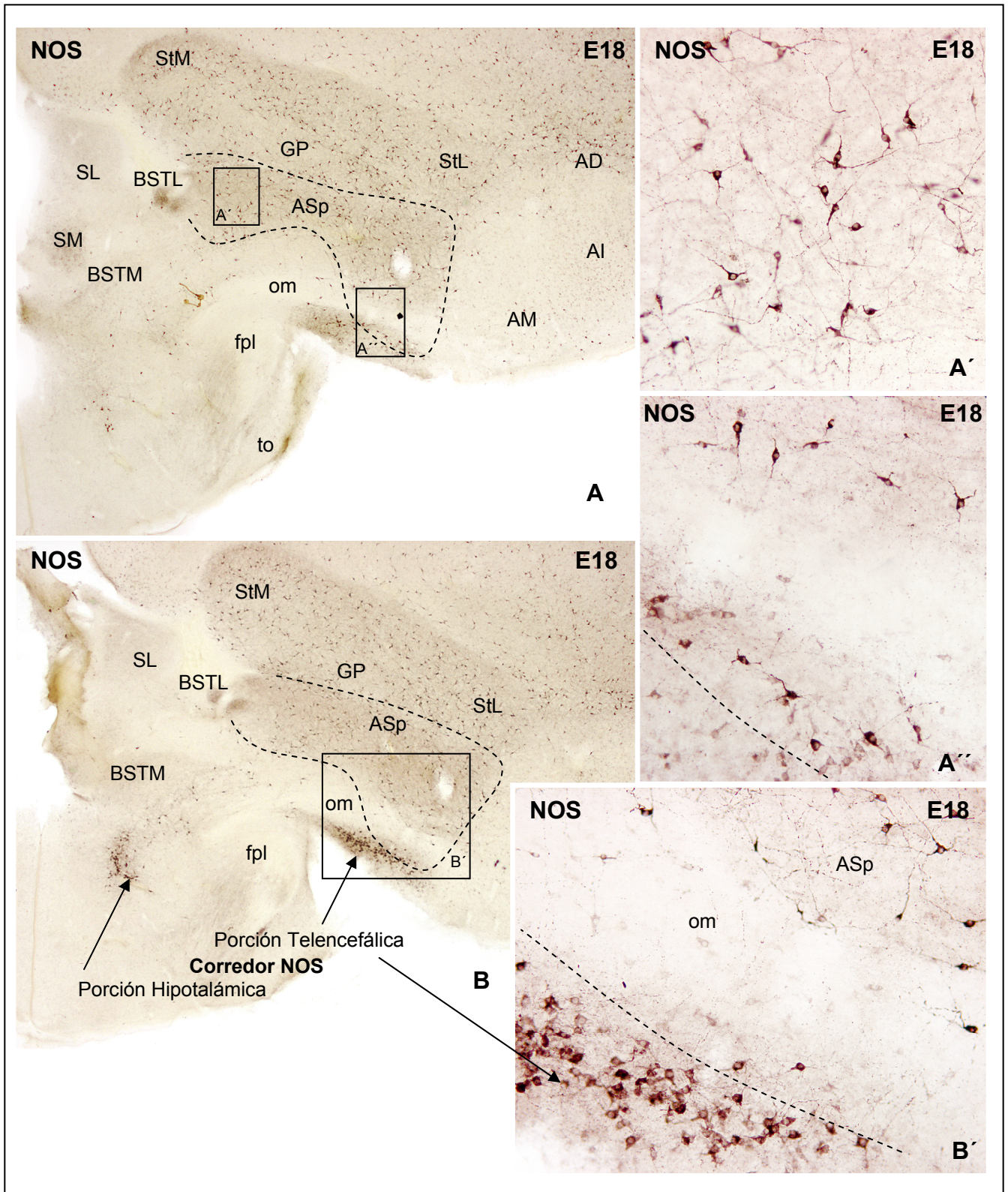


**Figura 18.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E12, hibridadas para *Dlx5* (A), *Tbr1* (B) y *Pax6* (C,D). La línea de puntos roja define el límite palio/subpalio. Se observa una intensa marca *Dlx5* (A) y una carencia de señal *Tbr1* (B) en el área subpalial amigdalina. El gen *Pax6* muestra un continuo de expresión en estriado lateral y área subpalial amigdalina, apreciándose una intensidad de señal algo inferior a la observada en estriado medial (C,D). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 20x.

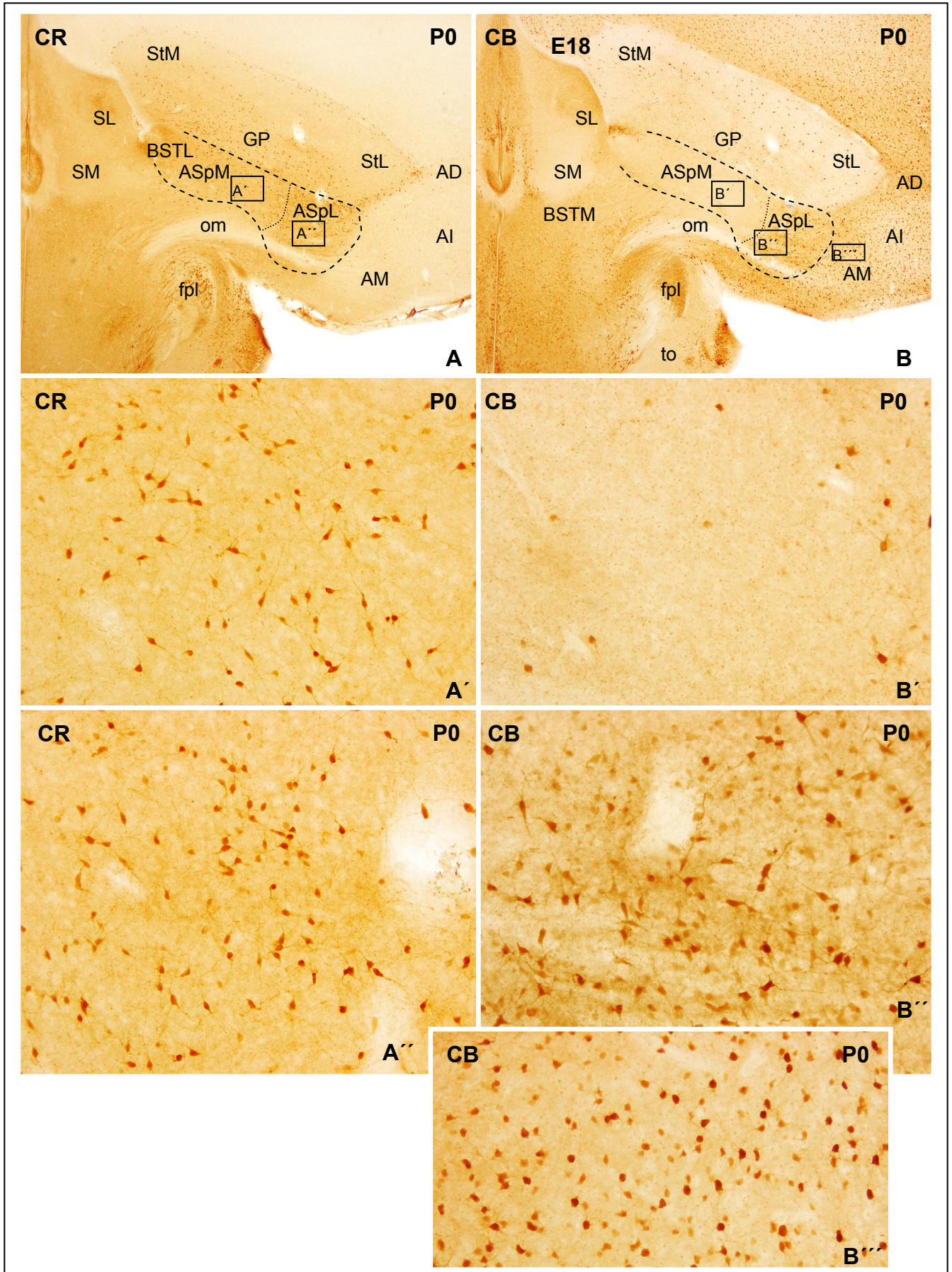




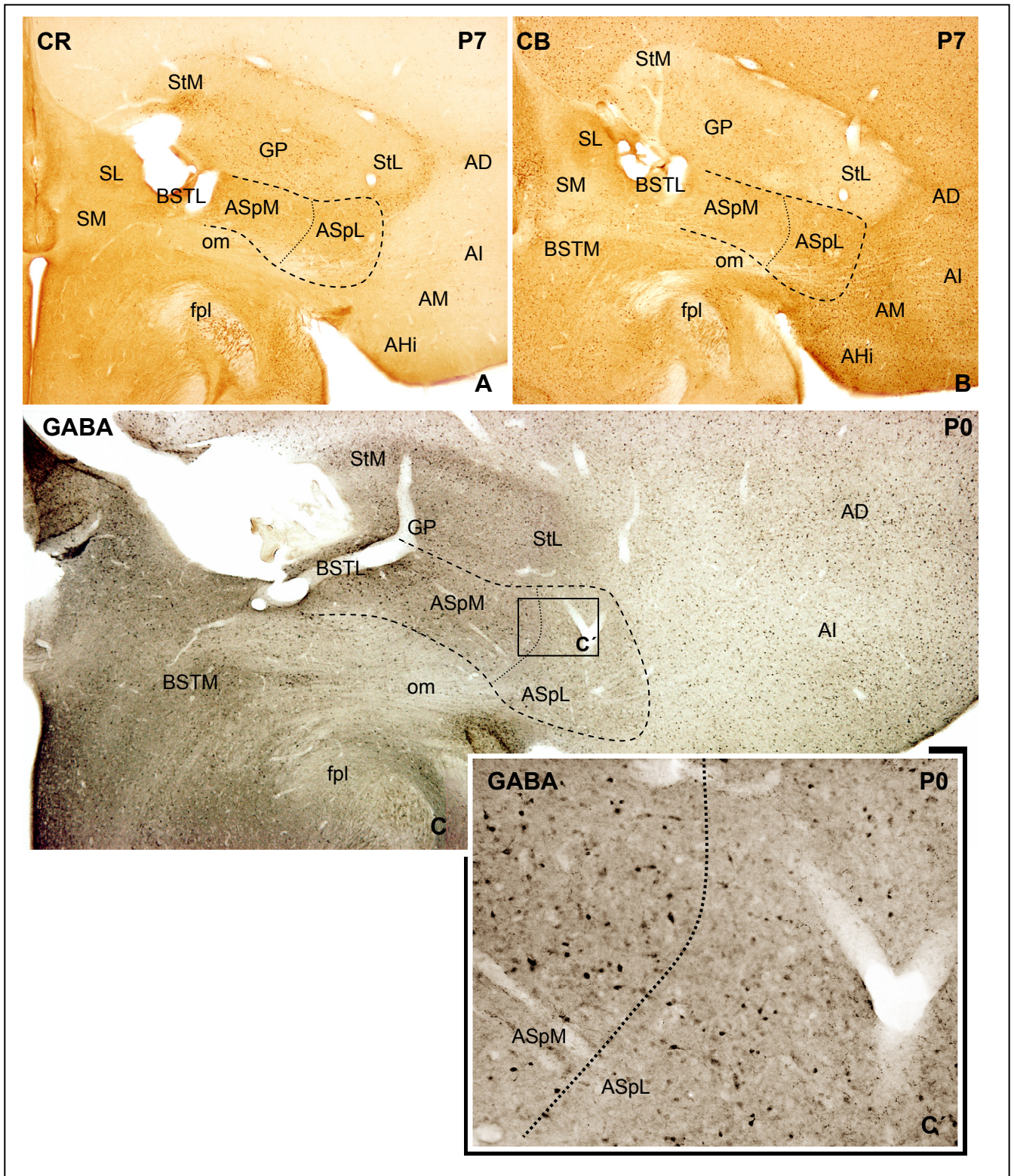
**Figura 19.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en E18 inmunoteñidas para nNOS (A,B), calretinina (C,D) y calbindina (E,F). Se muestra la parte rostral de la porción medial del área subpalial amigdalina, así como las diferencias de expresión que muestra esta región con la porción lateral del núcleo y estructuras adyacentes, tales como el BSTL, el globo pálido, el estriado y el arcolopio. Para mas detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 20x.



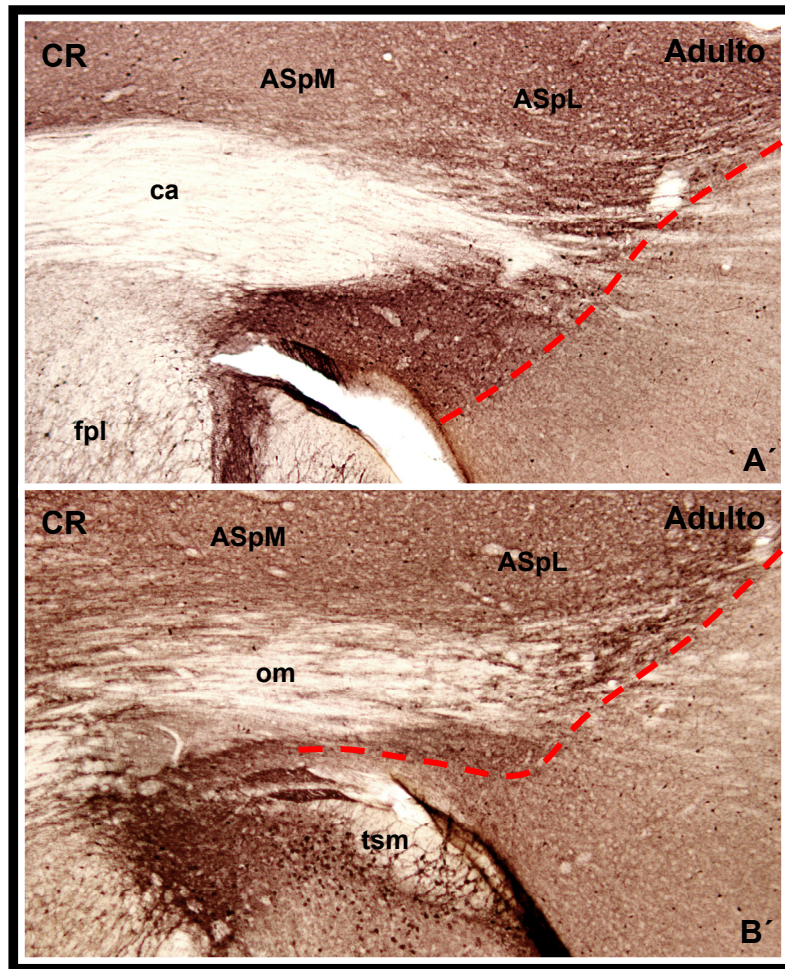
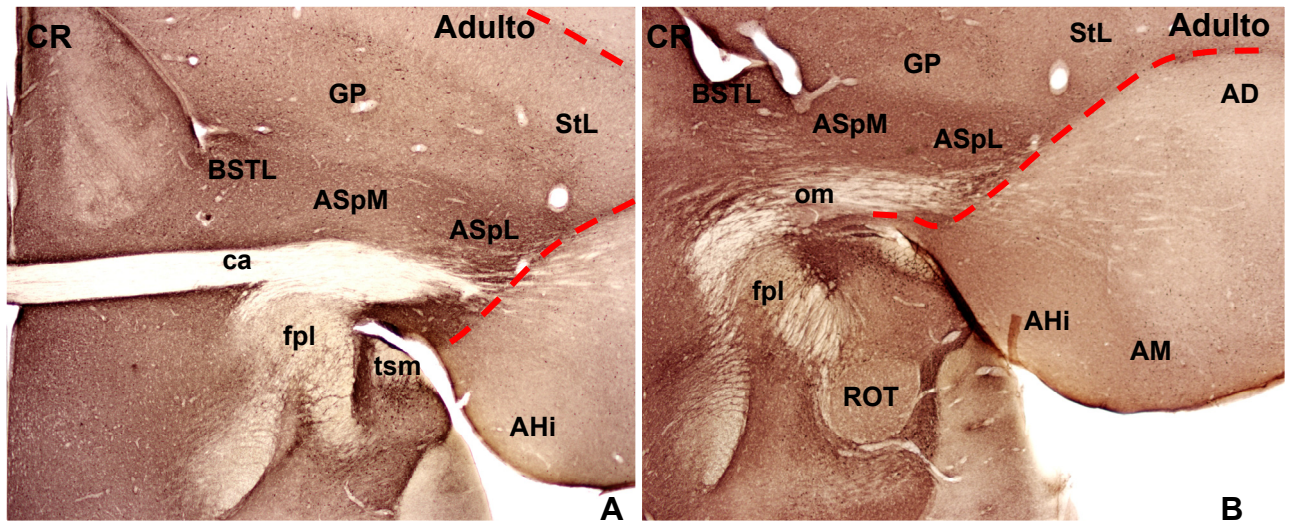
**Figura 20.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en E18 inmunoteñidas para nNOS. Las imágenes A', A'' y B' son detalles de las áreas recuadradas en A, y B respectivamente. Se observa una distribución homogénea de células intensamente inmunoteñidas a lo largo de todo el área subpalial amigdalina (A,A',B). El límite ventral de la porción lateral de esta región se localiza bajo el tracto occipitomesencefálico (Fig. A'', B'). Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; A',A'',B=200x.



**Figura 21.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en P0 inmunoteñidas para calretinina (A,A',A'') y calbindina (B,B',B'',B'''). Las imágenes A', A'', B',B'' y B'''' son detalles de las áreas recuadradas en A, y B respectivamente. El ASPL muestra una distribución de calretinina ligeramente inferior a la presente en el ASPM (A',A''). Se han observado algunas células aisladas calbindina positivas en ASPM (B'). La distribución calbindina en ASPL muestra por el contrario un gran número de neuronas inmunoteñidas en soma y prolongaciones (B''), relativamente similar a las observadas en el arcopalio medial, pero de distintas características inmunocitoquímicas (B'''). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; A',A'',B',B'',B''''=200x.



**Figura 22.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo en Posnatales inmunoteñidas para calretinina (A), calbindina (B) y GABA (C,C'). La imagen C' es un detalle del área recuadrada en C. Se muestra la diferencia de expresión entre el ASpM y ASpL para calretinina (A), calbindina (B) y GABA (C) en niveles caudales del telencéfalo. La porción medial de la amígdala subpalial extendida muestra un número de neuronas GABAérgicas ligeramente superior a la observada en la porción lateral (C'). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; C=40x; C'=200x.



**Figura 23.** Microfotografías de secciones coronales del telencéfalo de pollo adulto inmunoteñidas para calretinina. Las imágenes A' y B' son detalles de las áreas recuadradas en A, y B respectivamente. La línea de puntos roja define el límite pialio/subpialio. Parte del ASpL se localiza bajo la comisura anterior (A,A') y el tracto occipitomesencefálico (B,B'). Los dominios lateroventrales del ASpL contactan parcialmente con el límite pialio/subpialio. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; A',B'=40x.

## 2.5.- La Amígdala Hipocampal

La amígdala hipocampal (AHi) es un núcleo de aspecto esferoidal localizado en la base del telencéfalo caudal, parcialmente rodeado por el arcopallio. Es importante señalar antes de proceder a su caracterización que el territorio ocupado por esta estructura ha sido considerado por muchos autores como una parte del núcleo taeniae de la amígdala (consultar el apartado de discusión). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que ambas estructuras son claramente diferentes y poseen identidad propia, por lo que serán tratadas de forma independiente en éste y en el próximo capítulo.

El área prospectiva de la amígdala hipocampal muestra a partir de E8 un intenso marcaje para *Tbr1*, presente también en las áreas arcopalliales adyacentes, en el área parahipocampal y en el hipocampo. Se ha observado además una delgada banda de tejido *Tbr1* positivo que cruza longitudinalmente la región septal, y que constituye una conexión anatómica entre la amígdala hipocampal y el hipocampo (Fig. 24A, A'). Esta señal *Tbr1* se mantiene estable a lo largo de los siguientes estadios del desarrollo, pudiendo observarse a partir de E12 un marcaje diferencial entre la amígdala hipocampal, fuertemente positiva, y el adyacente arcopallio medial, que muestra una señal algo menos intensa (Fig. 24B).

Tanto la amígdala hipocampal como el arcopallio adyacente muestran en su conjunto una carencia total de expresión *Dlx5* en todos los estadios estudiados (Fig. 24C), así como una ausencia de marca *Nkx2.1* y *Shh* en toda su extensión (datos no mostrados). Se ha observado un intenso marcaje *Pax6* en las áreas estriatales adyacentes al límite pallio/subpallio, el cual se localiza próximo, pero no en contacto, con la amígdala hipocampal (Fig. 24D).

La amígdala hipocampal se caracteriza por mostrar una intensa inmunorreactividad para calbindina, consistente en una población de células de fuerte inmunotinción somática inmersas en un neuropilo poco abundante, en el que se aprecian algunas fibras positivas y un número moderado de terminales sinápticos (Figs. 25A, A''; 26A, A''; 28A, A'; 29A, A'). Dicha distribución es apreciada desde los estadios tempranos del desarrollo, observándose un paulatino incremento en el número de neuronas que componen la población desde E12 hasta la eclosión del huevo (datos no mostrados).

Si bien se ha observado que la expresión de calbindina es como norma general muy abundante a lo largo de todo el palio, los patrones de distribución diferenciales mostrados por este marcador permiten el establecimiento de los límites precisos entre la amígdala hipocampal y las estructuras arcopaliales adyacentes. De esta forma, el arcopallio medial, cuyos dominios rodean parcialmente al AHi, muestra una población de células marcadas de características y abundancia relativa similares a las descritas previamente para la amígdala hipocampal. Sin embargo, esta región presenta un neuropilo intensamente inmunoteñido, rico en fibras y con una mayor abundancia de terminales, lo cual contrasta de forma evidente con el débil fondo presente en el AHi (Figs. 25A,A''; 26A; 27 A, A'; 28 A, A''; 29A).

Hemos observado además que el hipocampo muestra una inmunorreactividad para la calbindina muy similar a la descrita para la amígdala hipocampal, consistente en una población neuronal fuertemente inmunoteñida inmersa en un neuropilo rico en terminales de carácter tenue, claramente diferenciable de la dorsalmente adyacente área parahipocampal, que presenta un mayor número de neuronas marcadas con un neuropilo significativamente más abundante (Fig. 25A, A'). La delgada banda de expresión Tbr1 (Fig. 24A') que constituye un nexo de unión entre la amígdala hipocampal y el hipocampo observada en estadios tempranos está presente también en las etapas avanzadas del desarrollo, mostrando una inmunorreactividad para la calbindina similar a la descrita para estas dos estructuras (Fig. 25A, A').

La inmunorreactividad para nNOS observada en la amígdala hipocampal se caracteriza por una población de células débilmente inmunoteñidas que se distribuyen homogéneamente a lo largo del núcleo, y que son apreciables por primera vez en E18 (Figs. 25B; 26B, B''). Esta región se halla medialmente próxima a la porción telencefálica del *corredor NOS*, el cual muestra una población de células intensamente marcadas inmersas en un abundante neuropilo (Fig. 26B, B'). Es interesante remarcar que ambas estructuras se hallan muy próximas entre sí, aunque separadas por una delgada banda de tejido perteneciente al arcopallio medial, el cual muestra una población de células nNOS similar a la presente en la amígdala hipocampal, aunque algo más abundante y de intensidad ligeramente superior (Figs. 25B, 26B', B''). Dada la similitud de expresión nNOS mostrada por el arcopallio medial y la amígdala hipocampal resulta interesante realizar un estudio comparado de la región en base a la inmunorreactividad nNOS y calbindina, permitiendo la combinación de ambos patrones de distribución definir las estrechas relaciones entre las tres estructuras descritas (Fig. 26A', B', A'', B'').

La amígdala hipocampal muestra una total ausencia de expresión para calretinina a lo largo de toda su extensión, siendo observable una población moderadamente abundante de células positivas en el adyacente arcopalio medial (Figs. 25C; 27B, B'). La distribución diferencial de calbindina, nNOS y calretinina presentes en esta estructura permiten establecer de forma precisa sus límites, así como la relación que guarda con la amígdala hipocampal. Hemos observado que el arcopalio medial no envuelve completamente a la amígdala hipocampal, de tal forma que su porción más caudomedial se localiza próxima, pero no en contacto, con la superficie telencefálica. Es en este punto donde se establece la continuidad anatómica existente entre la amígdala hipocampal y el hipocampo a través del septum (Fig. 25A', B, C).

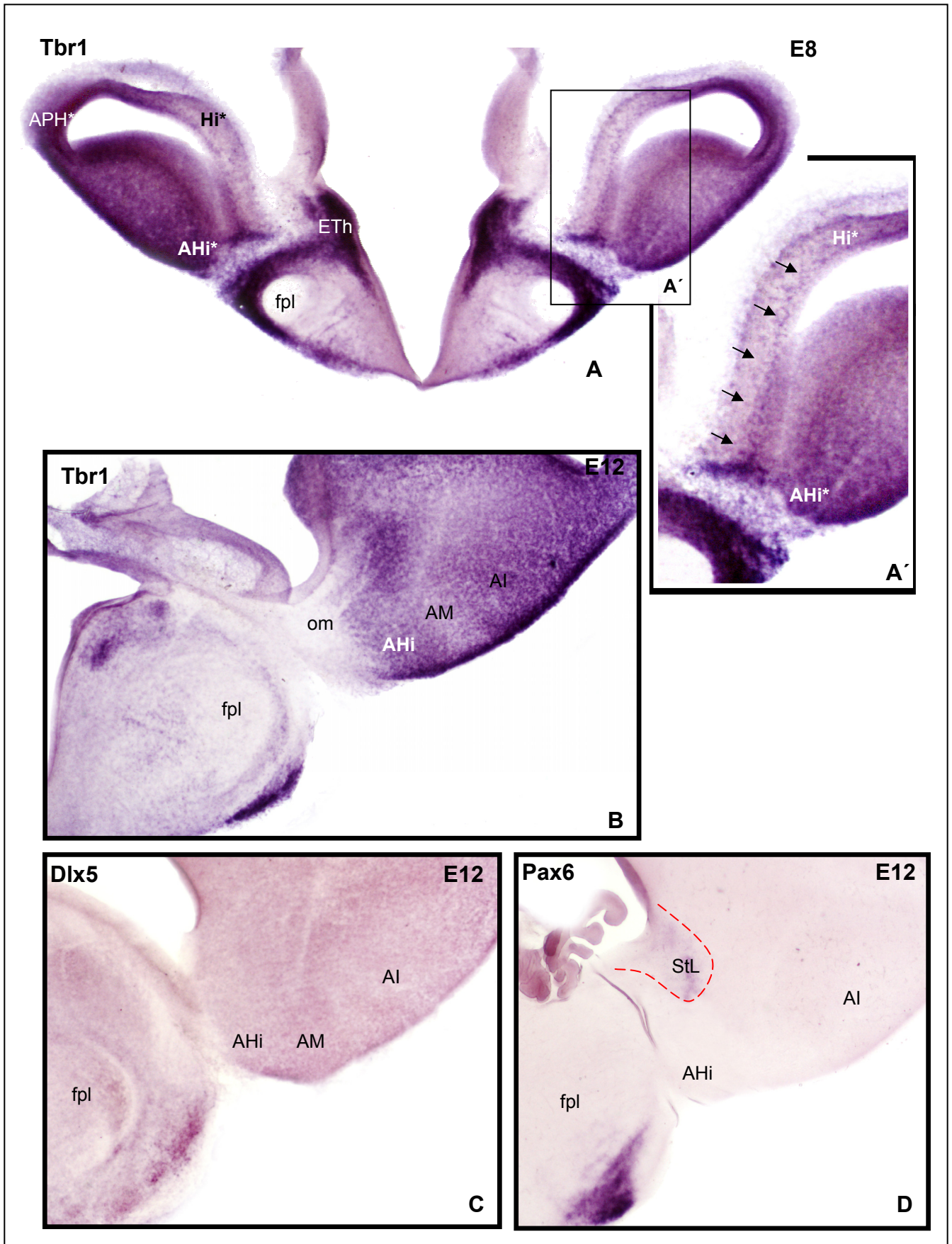
Se han observado ciertas diferencias entre la porción superficial de la amígdala hipocampal y el resto del núcleo en los niveles más caudales de la estructura. Así, la inmunorreactividad para calbindina muestra en la porción superficial una distribución similar a la presente en el arcopalio medial, con mayor número de neuronas positivas y un neuropilo ligeramente más abundante (Fig. 28A, A').

La distribución de neuronas GABAérgicas en la amígdala hipocampal es similar a la observada en el arcopalio medial, representada en ambos casos por un elevado número de células marcadas en soma, y un neuropilo prácticamente inexistente. Este patrón, observable desde los 12 días de incubación, difiere en la porción superficial de la amígdala hipocampal, que muestra una mayor densidad celular y un neuropilo ligeramente inmunorreactivo (Fig. 28B, B').

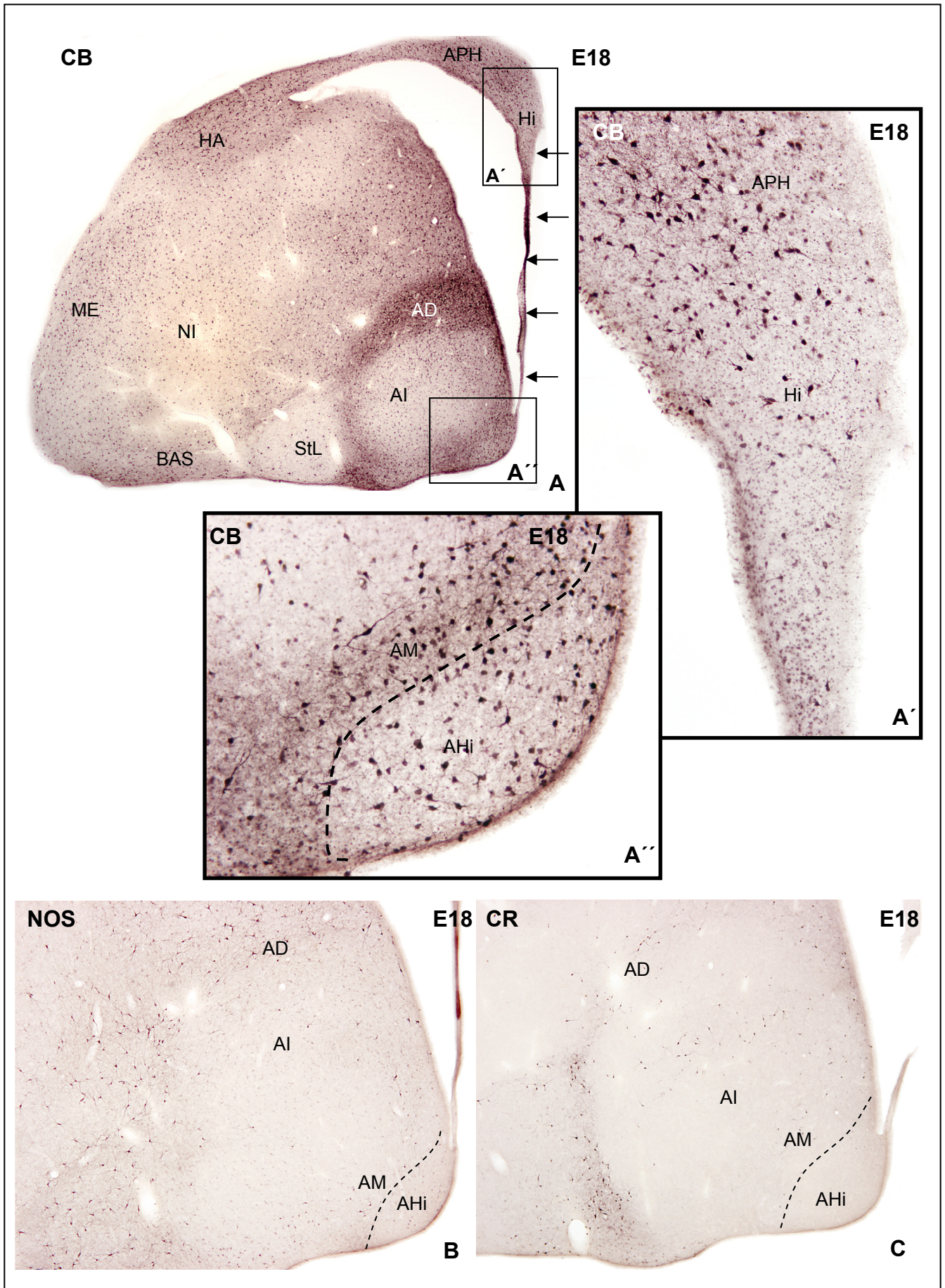
Si bien se observa una total ausencia de inmunorreactividad para la parvalbúmina durante los estadios embrionarios, los individuos adultos muestran una elevada cantidad de haces de fibras positivas que discurren a lo largo de toda la extensión de la amígdala hipocampal. Se ha observado que la densidad de estos paquetes de fibras es superior en la porción superficial del núcleo (Fig. 29B, B').

Las técnicas generales de tinción tipo Nissl muestran que la amígdala hipocampal esta constituida por un compacto grupo de células densamente empaquetadas, claramente diferenciable del adyacente arcopalio medial, constituido por un conjunto celular de distribución laxa. Se ha observado que el grado de empaquetamiento celular presente en la porción superficial de la amígdala hipocampal es superior al mostrado por el resto del núcleo (Fig. 29C, C').

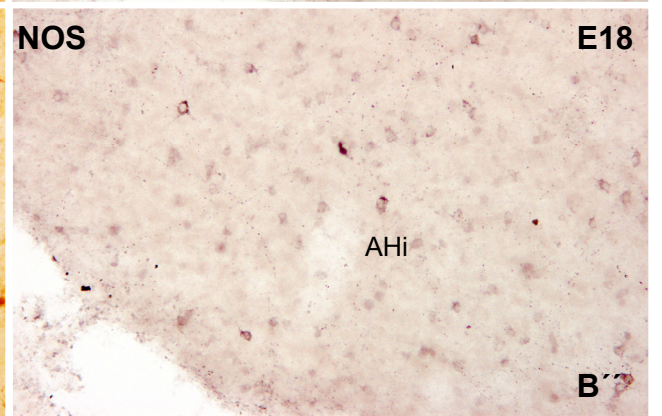
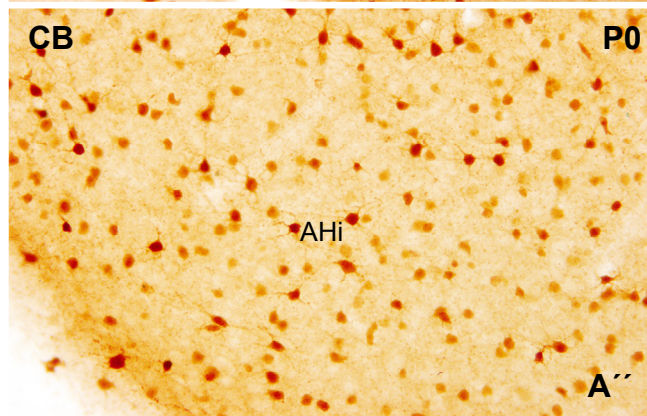
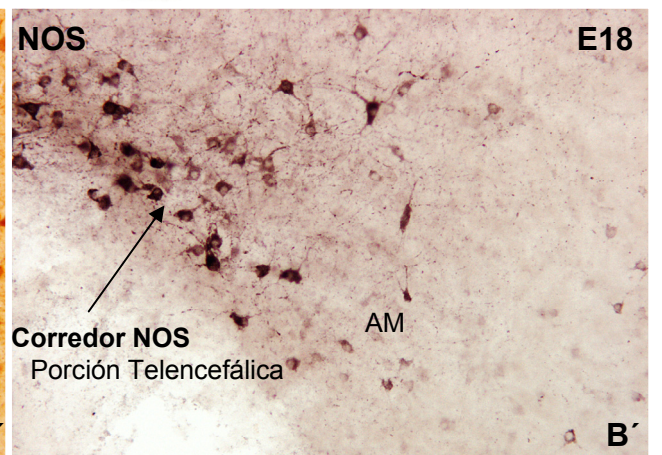
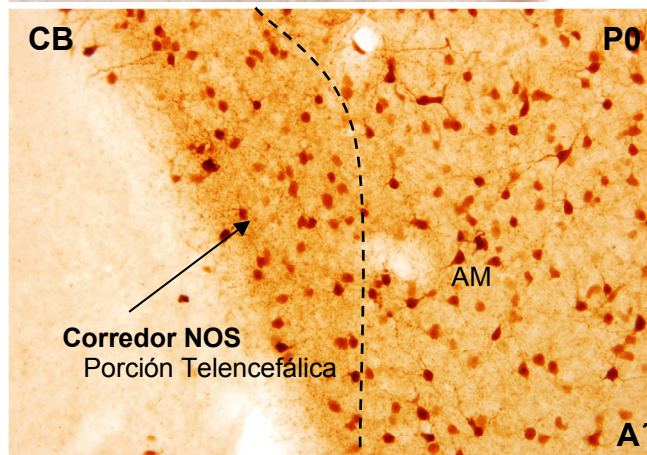
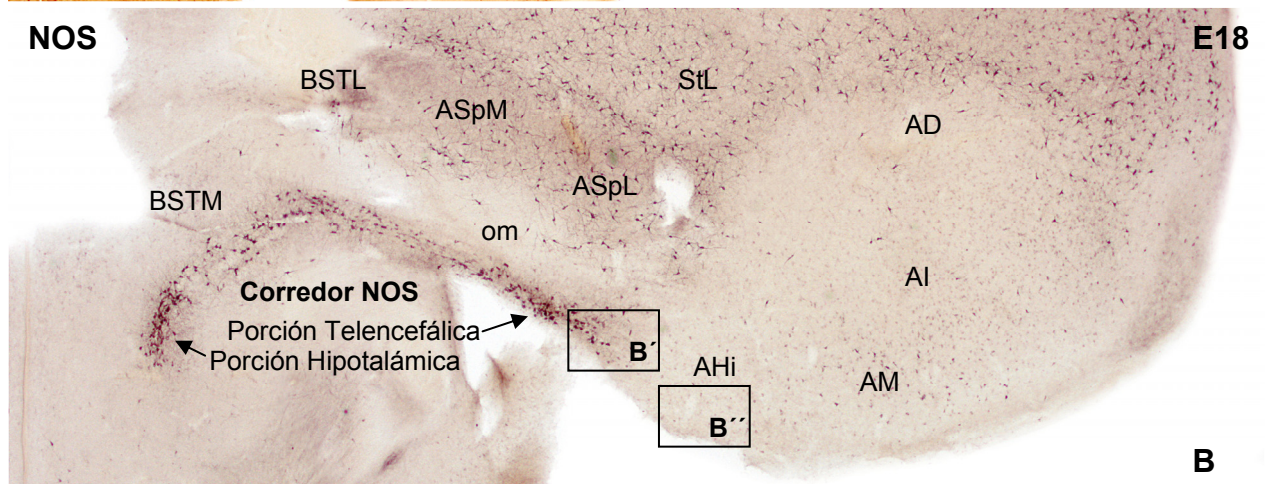
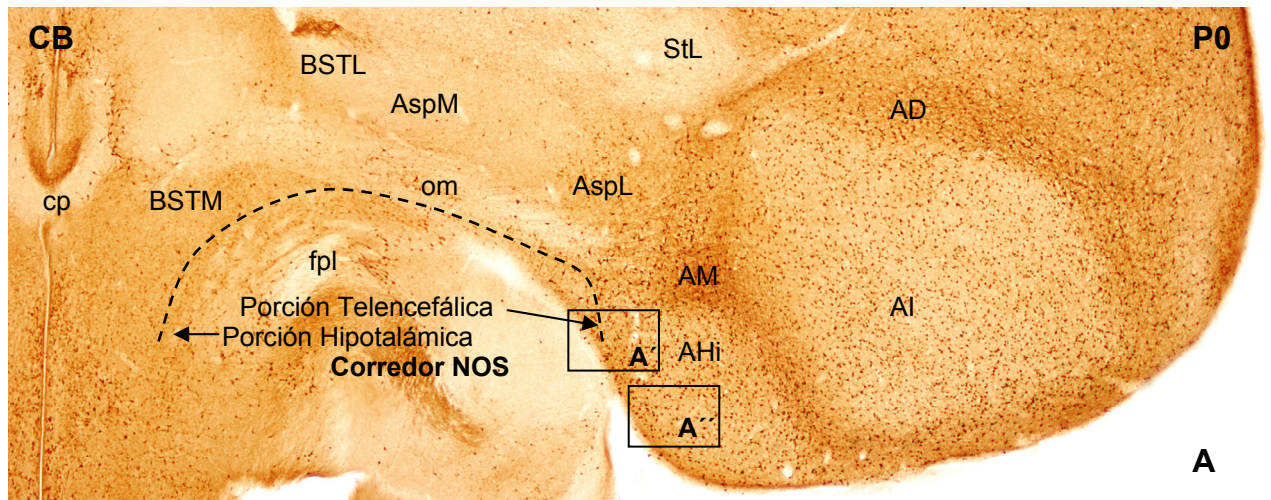




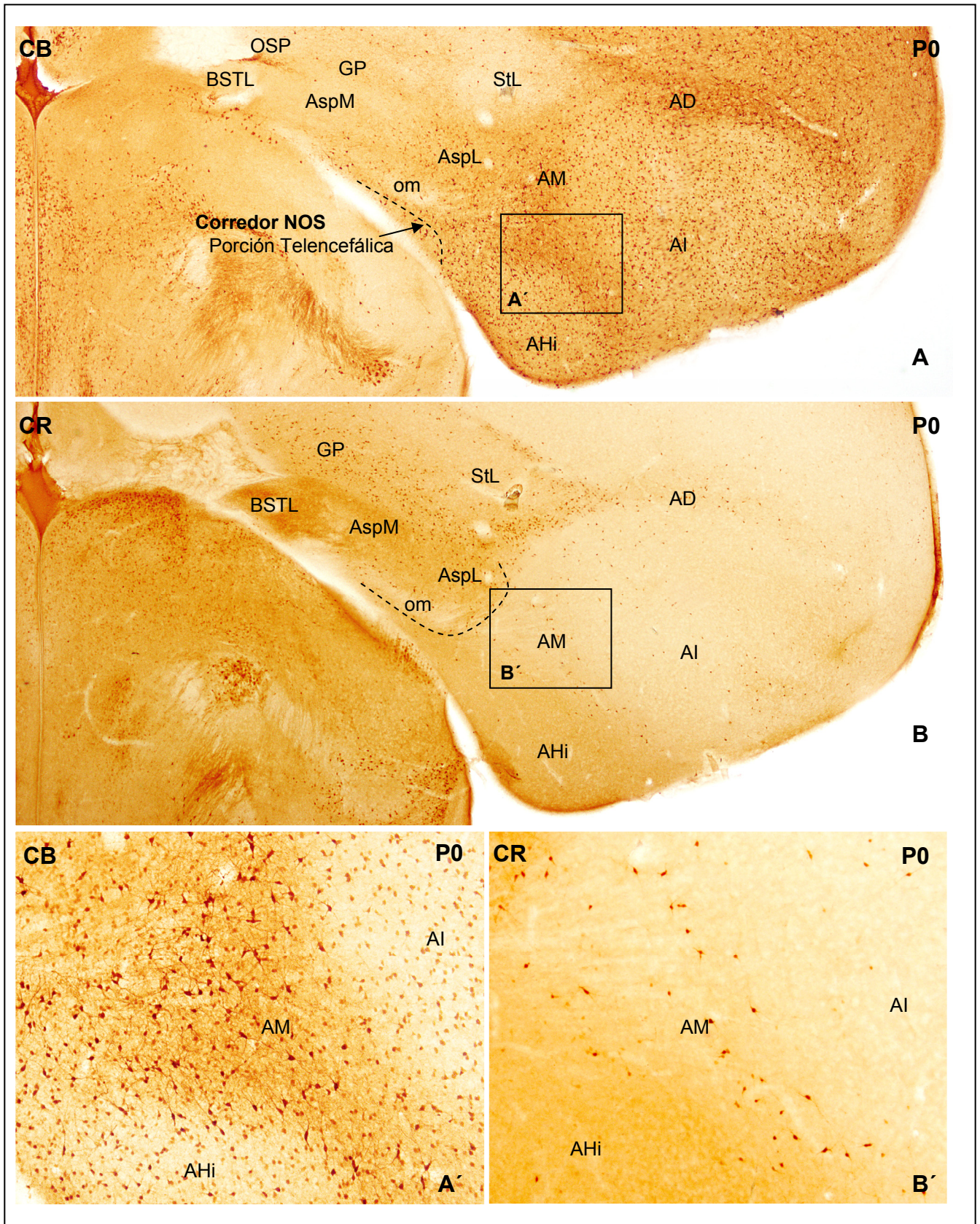
**Figura 24.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E8 y E12, hibridadas para *Tbr1* (A,A',B), *Dlx5* (C) y *Pax6* (D). La imagen A' es un detalle del área recuadrada en A. Los asteriscos sobre el nombre de un núcleo denotan que se trata de su área prospectiva. La línea de puntos roja define el límite palio/subpalio. Se observa un intenso marcaje *Tbr1* en la región de la amígdala hipocampal, así como en el hipocampo. Las cabezas de flecha señalan la conexión anatómica entre ambas estructuras (A,A',B). No se aprecia expresión *Dlx5* ni *Pax6* en la amígdala hipocampal (C,D). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-D=20x; A'=40x.



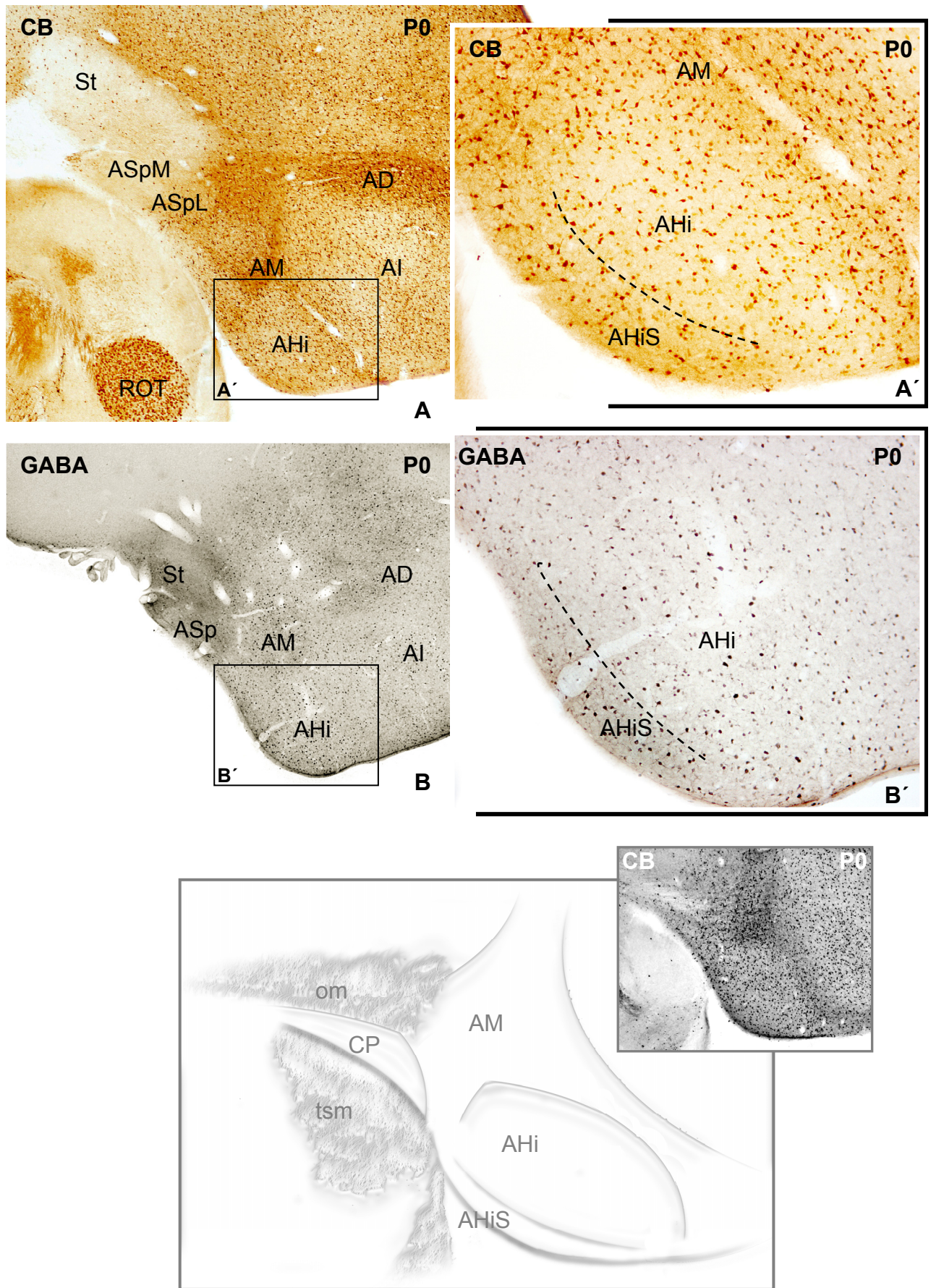
**Figura 25.** Microfotografías de secciones sagitales de telencéfalo de pollo en E18 inmunoteñidas para calbindina (A,A',A''), nNOS (B) y calretinina (C). Las imágenes A' y A'' son detalles de las áreas recuadradas en A. La amígdala hipocámpica muestra un elevado número de células calbindina positivas de similares características a las observadas en el hipocampo (A,A',A''), algunas células nNOS débilmente inmunorreactivas (B) y una ausencia total de expresión calretinina (C). Ambas estructuras se hallan anatómicamente conectadas a través del septum (Puntas de flecha). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A=20x; A',A''=200x; B,C=25x.



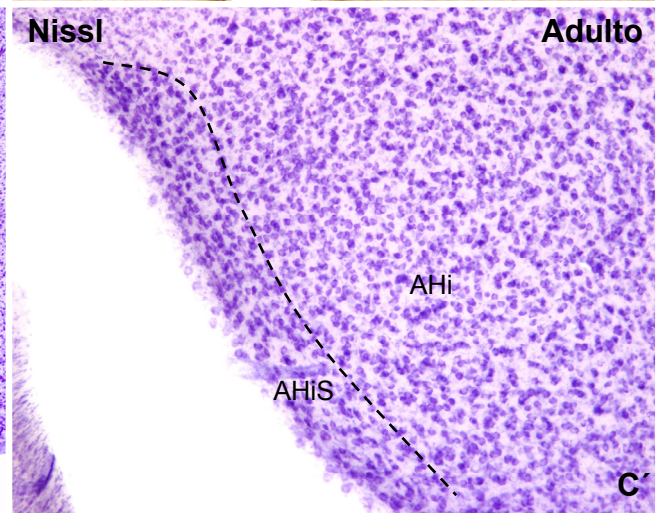
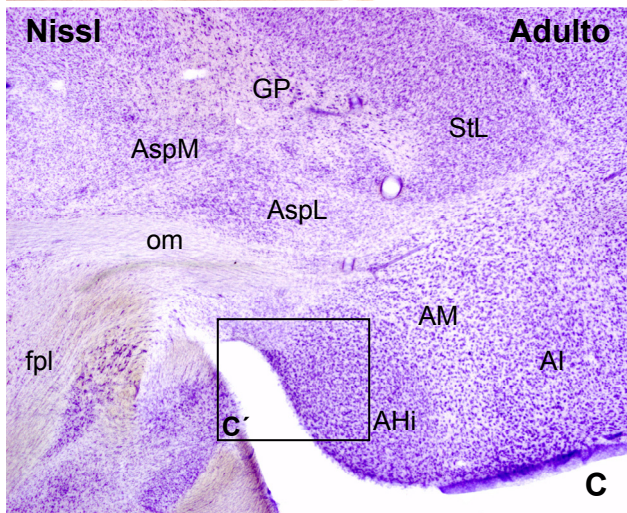
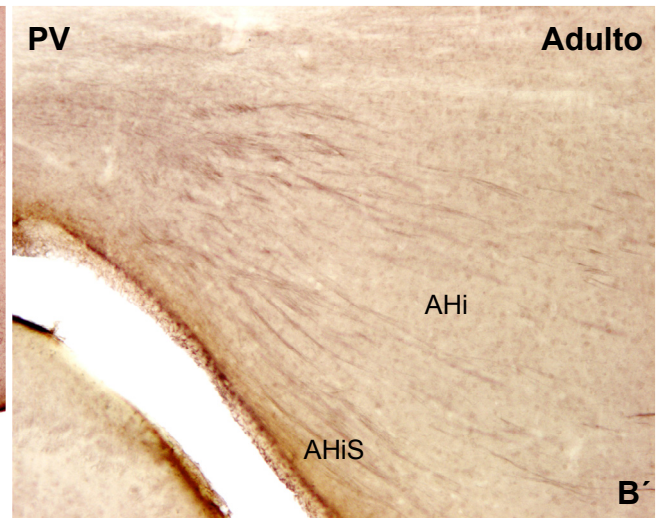
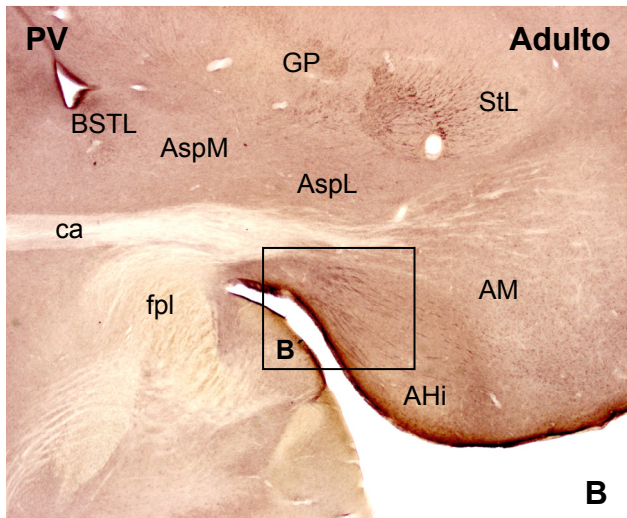
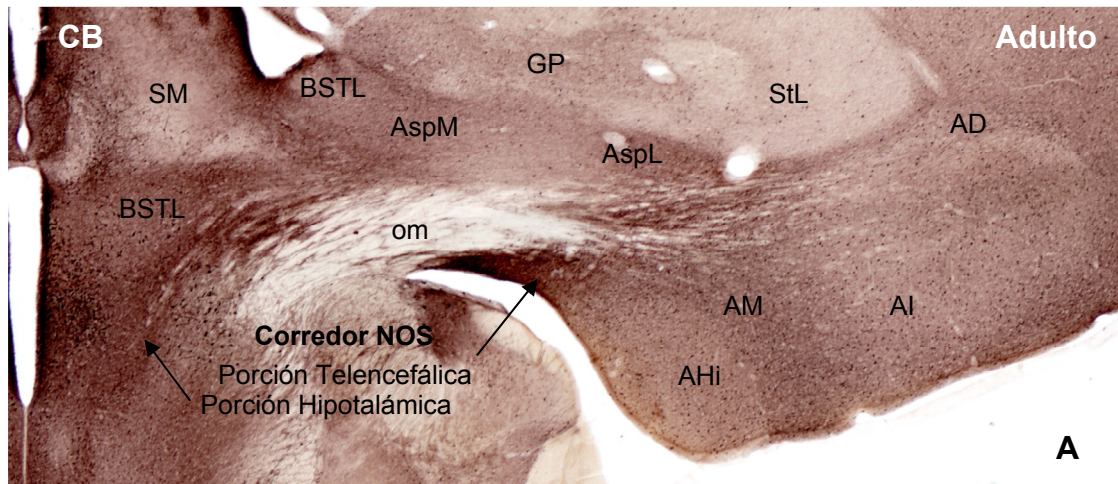
**Figura 26.** Microfotografías de secciones coronales de telencefalo de pollo en E18 y P0 inmunoteñidas para calbindina (A,A',A''), y nNOS (B,B',B''). Las imágenes A', A'', B',B'' son detalles de las áreas recuadradas en A y B respectivamente. Se observan diferencias significativas en los patrones de expresión calbindina y nNOS presentes en la amígdala hipocampal, el arcolpalo medial y la porción telencefálica del *Corredor nNOS*. Para mas detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; A',A'',B',B''=200x.



**Figura 27.** Microfotografías de secciones coronales de telencefalo de pollo en P0 inmunoteñidas para calbindina (A,A'), y calretinina (B,B'). Las imágenes A y B' son detalles de las áreas recuadradas en A y B respectivamente. El arccopallio medial muestra una un gran número de células con inmunorreactividad para calbindina inmersas en un neuropilo rico en fibras y terminales (A,A'), así como algunas células marcadas para la calretinina (B,B'). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; A',B'=100x



**Figura 28.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en P0 inmunoteñidas para calbindina (A,A'), y GABA (B,B'). Las imágenes A'y B' son detalles de las áreas recuadradas en A y B respectivamente. La porción superficial de la amígdala hipocámpal muestra una inmunoreactividad para la calbindina (A,A') y el GABA (B,B') ligeramente superior a la presente en el resto del núcleo. El esquema muestra la subdivisión de la amígdala hipocámpal y su relación con las estructuras adyacentes. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; A',B'=100x.



**Figura 29.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en adulto inmunoteñidas para calbindina (A), y parvalbúmina (B,B') y teñidas mediante técnicas tipo Nissl (C,C'). Las imágenes B' y C' son detalles de las áreas recuadradas en B y C respectivamente. La distribución para calbindina en el individuo adulto es similar a la presente durante los últimos estadios del desarrollo (A). La porción superficial de la amígdala hipocampal muestra una mayor densidad de fibras parvalbúmina positivas (B,B') y mayor grado de empaquetamiento celular (C,C'). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-C=20x; B',C'=100x.

## 2.6.- El Núcleo Taeniae de la Amígdala

El núcleo taeniae de la amígdala (TnA) es una estructura de aspecto ovalado localizada en el polo caudal del telencéfalo. Como adelantamos en el capítulo anterior, gran número de autores han considerado que la amígdala hipocampal constituye una porción rostral del TnA (consultar el apartado de discusión). En base a los patrones de distribución mostrados por los marcadores estudiados hemos considerado que si bien existen ciertos paralelismos quimioarquitectónicos entre ellas, ambas estructuras poseen identidad propia y han de ser consideradas de forma independiente.

En este contexto, hemos observado que el núcleo taeniae de la amígdala muestra una inmunorreactividad para la calbindina caracterizada por una población de células positivas, cuya densidad neuronal aumenta de forma paulatina a lo largo del desarrollo. De esta forma, desde E14 y durante el resto del periodo embrionario, existe una diferencia significativa en cuanto a la distribución de calbindina presente en la amígdala hipocampal y el núcleo taeniae, observándose una densidad neuronal muy inferior en esta última estructura (Figs. 30A, B; 31A, A'). Si bien la coincidencia espacial de ambas estructuras no puede ser apreciada con detalle en secciones de tipo coronal, los planos sagitales permiten observar de forma clara la relación anatómica existente entre la amígdala hipocampal y el núcleo taeniae de la amígdala. Así, el TnA se ubica en una posición dorsocaudal con respecto al AHi, ocupando a diferencia de este último una posición subventricular a lo largo de toda su extensión. Se ha observado que pese a su proximidad, estas estructuras no se hallan en contacto directo, apreciándose entre ambas una delgada banda de tejido perteneciente al arcopallio medial, que muestra un gran número de células inmunorreactivas y un neuropilo positivo abundante (Fig. 30C, D, D'). Cabe destacar que la diferencia de inmunotinción para la calbindina existente entre el núcleo taeniae de la amígdala y la amígdala hipocampal se minimiza tras la eclosión, siendo esta muy sutil en el individuo adulto (Figs. 32B-D; 34B).

La inmunorreactividad para calretinina presente en el núcleo taeniae de la amígdala es muy reducida durante los estadios embrionarios. Sin embargo, a diferencia de la amígdala hipocampal, esta región muestra a partir de E16 algunas células aisladas de carácter tenue (Fig. 31B). La densidad celular de esta población experimenta un ligero aumento durante los siguientes estadios del desarrollo, teniendo lugar un incremento cuantitativamente significativo tras la eclosión del huevo. Así, en las etapas adultas la población de células calretinina es moderadamente abundante, y se halla inmersa en un neuropilo débilmente marcado (Figs. 33A-C; 34C).

Se han observado algunas células aisladas débilmente inmunoteñidas para nNOS en la región del núcleo taeniae de la amígdala a partir de E18 (Fig. 31C), no apreciándose alteraciones en su distribución tras la eclosión del huevo (datos no mostrados).

El núcleo taeniae de la amígdala muestra una distribución homogénea de neuronas GABAérgicas de intenso marcaje somático a partir de los E12. Esta población celular muestra una densidad ligeramente inferior a la presente en el adyacente arcopalio medial (Fig. 31D), no observándose incrementos significativos en cuanto al número neuronal a partir de E16 (datos no mostrados).

Hemos observado que el núcleo taeniae de la amígdala se halla en la región subventricular del telencéfalo, pero separado del ventrículo lateral por una estrecha banda de tejido. A diferencia de la interpretación realizada en el caso de la amígdala hipocampal, y en base a la expresión diferencial de nuestros marcadores, hemos considerado que esta porción superficial no forma parte del núcleo taeniae, apreciándose además significativas diferencias entre esta región y el adyacente arcopalio medial. Consideraremos pues a esta región superficial como una estructura independiente a la que denominaremos a partir de este momento núcleo subventricular.

El núcleo taeniae de la amígdala está constituido por una población celular densamente empaquetada, que contrasta con el menor grado de compactación mostrado por el arcopalio medial adyacente (Figs. 32A; 34A). El núcleo subventricular localizado junto al ventrículo lateral ocupa una posición ventral al núcleo taeniae de la amígdala y al arcopalio medial, evitando que ambas estructuras entren en contacto directo con la superficie ventricular durante toda su extensión. El núcleo subventricular muestra una población celular con somas de pequeño tamaño y con un grado de compactación superior al presente en las estructuras adyacentes (Fig. 32A').

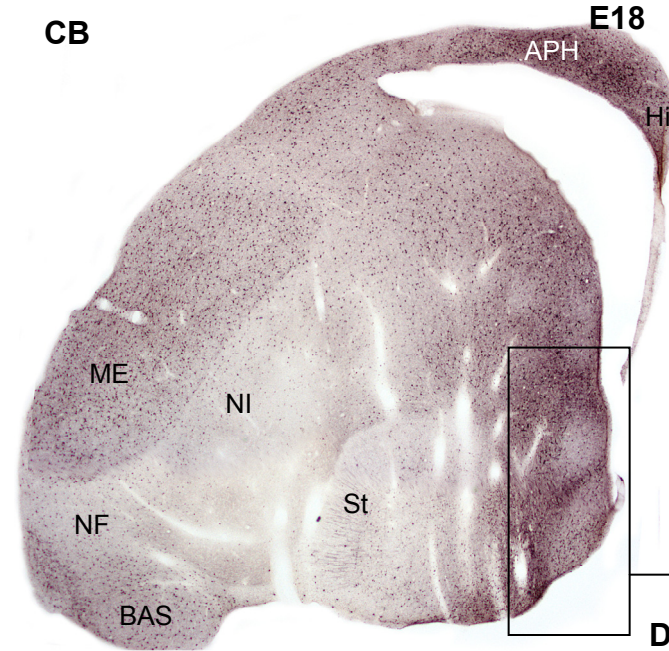
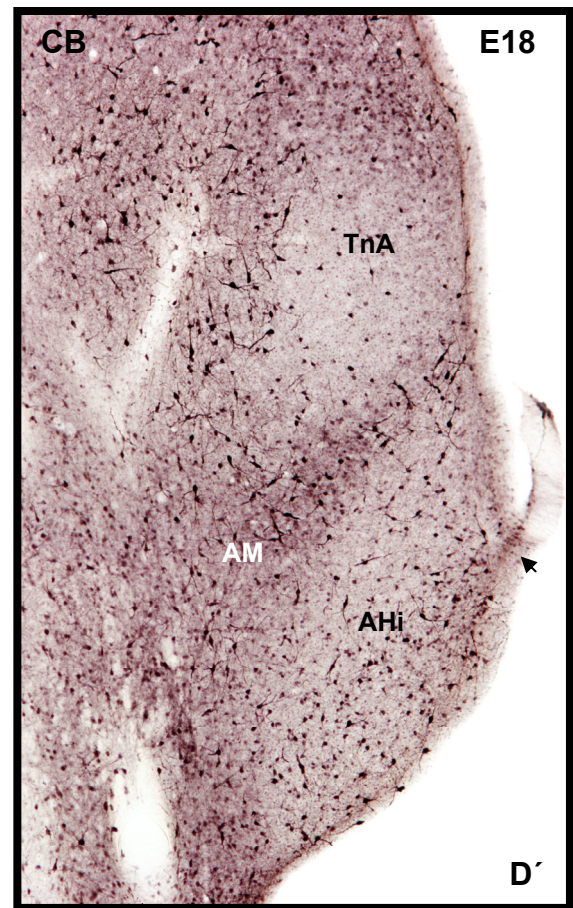
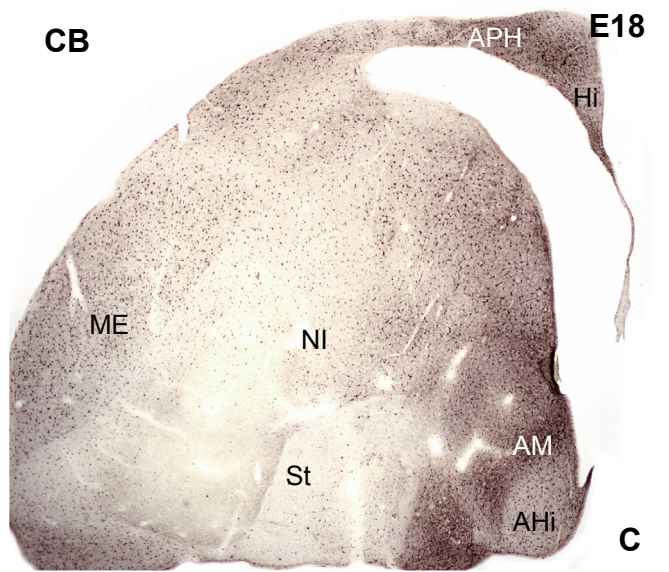
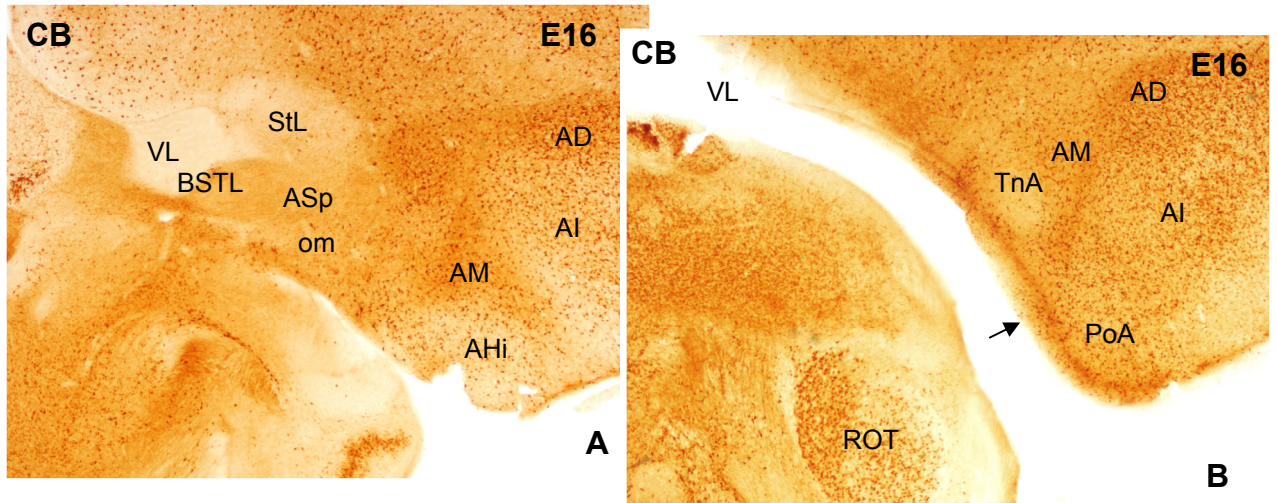
Las características de inmunotinción y densidad celular presente en las tres regiones son muy similares para la inmunorreactividad calbindina, observándose sin embargo un número de neuronas ligeramente superior en el arcopalio medial y el núcleo subventricular (Figs. 32A-D; 34B). La abundancia relativa de fibras y terminales presente en el núcleo taeniae de la amígdala es sin embargo significativamente inferior a la observada en las estructuras adyacentes (Fig. 32C, D). Cabe destacar que si bien no se ha observado un patrón de ordenación en la distribución del neuropilo en el arcopalio medial, la mayor parte de las fibras presentes en el núcleo subventricular discurren paralelas al ventrículo lateral (Fig. 32C, D).



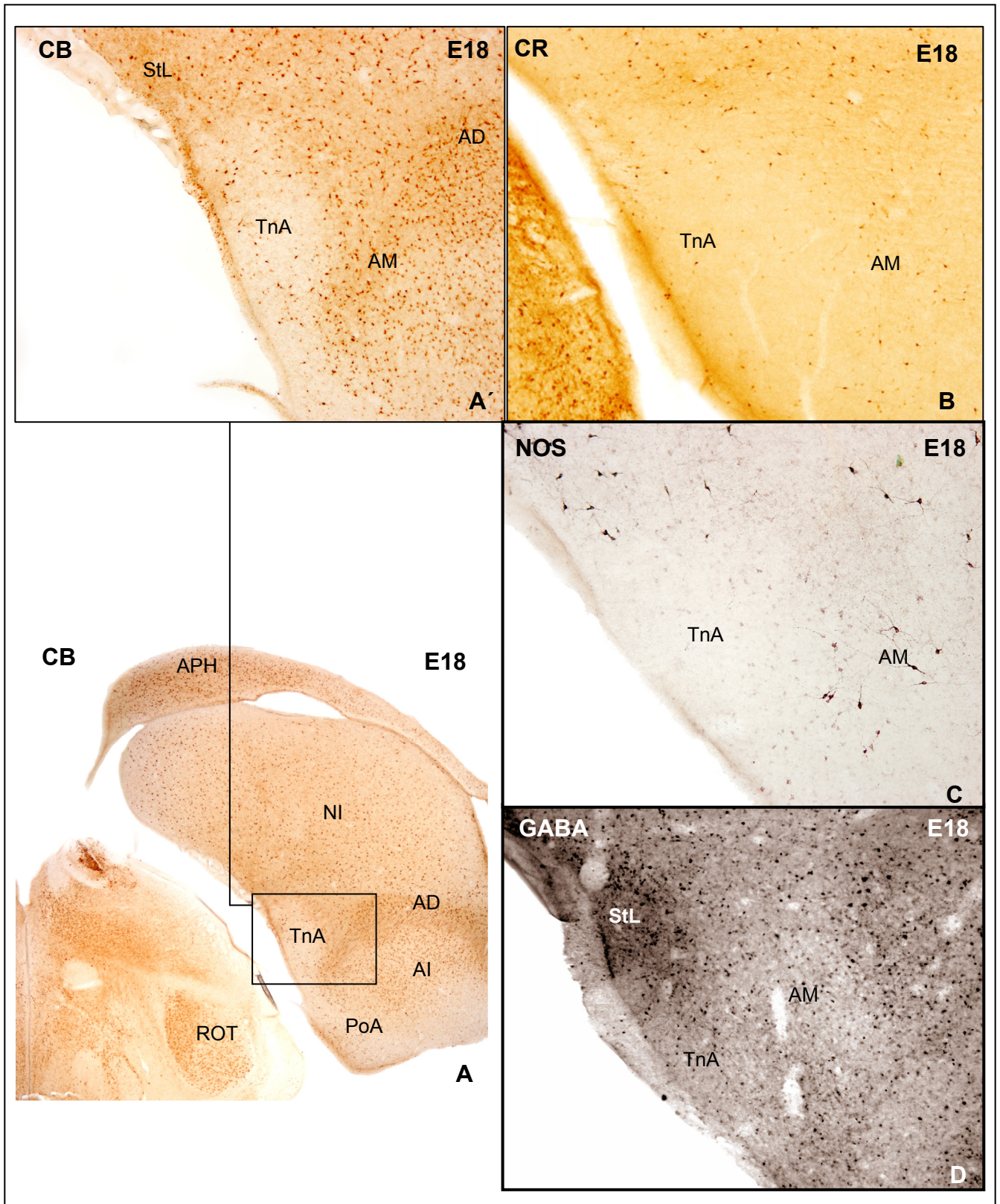
El núcleo taeniae de la amígdala posee un número moderado de neuronas inmunorreactivas para la calretinina, uniformemente distribuidas, que se hallan inmersas en un escaso neuropilo de débil marcaje (Figs. 33A, A'; 34C). La abundancia relativa de esta población celular es significativamente inferior a la observada en el arcopalio medial, el cual muestra además un neuropilo intensamente marcado rico en terminales sinápticos (Fig. 33C). Se ha observado que en este caso el núcleo subventricular muestra tan solo algunas células de carácter aislado a lo largo de toda su extensión, así como un neuropilo escaso de tenue inmunotinción (Fig. 33B).

La inmunorreactividad para parvalbúmina está representada por un conjunto de haces de fibras que discurren en torno al núcleo taeniae de la amígdala, localizados en su mayoría en los territorios del arcopalio medial y del núcleo subventricular. Dichos haces parecen tener su origen en el arcopalio y en el núcleo posterior de la amígdala palial, constituyendo proyecciones que contribuyen al conjunto del tracto occipitomesencefálico (Figs. 33D-F; 34D). Se ha observado que el grado de compactación de estos haces es especialmente alto en la región del núcleo subventricular (Fig. 33E). La elevada inmunorreactividad parvalbúmina presente en estos paquetes de fibras es complementaria a la observada para la calbindina y calretinina, apreciándose en estos casos un conjunto de bandas totalmente inmunonegativas que atraviesan longitudinalmente el polo caudal del telencéfalo (Figs. 32B; 33A; 34B, C).

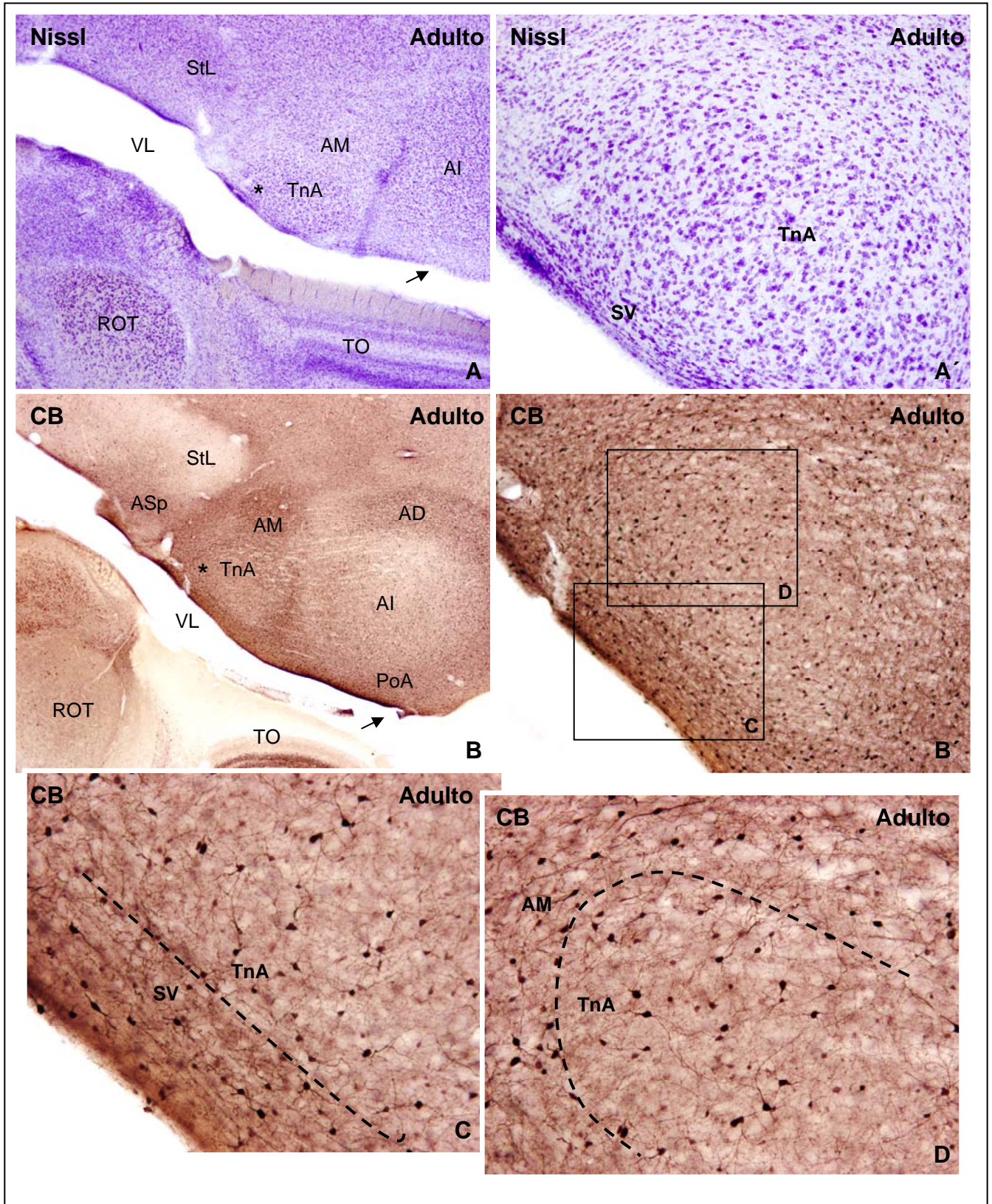
Se ha observado un marcaje generalizado *Tbr1* positivo en el conjunto del telencéfalo caudal en todos los estadios estudiados. Esta señal es especialmente intensa en el núcleo taeniae de la amígdala, el arcopalio intermedio y el núcleo posterior de la amígdala palial, apreciándose un marcaje algo más tenue en el arcopalio medial y el arcopalio dorsal (Fig. 35A). Cabe destacar que este patrón es parcialmente complementario a la distribución que estas regiones muestran para la calbindina (Fig. 35B). No se ha observado marcaje *Dlx5* (Fig. 35C), *Pax6* (Fig. 35D), *Nkx2.1* (Fig. 35E) ni *Shh* (datos no mostrados) en ninguna de las estructuras anteriormente citadas.



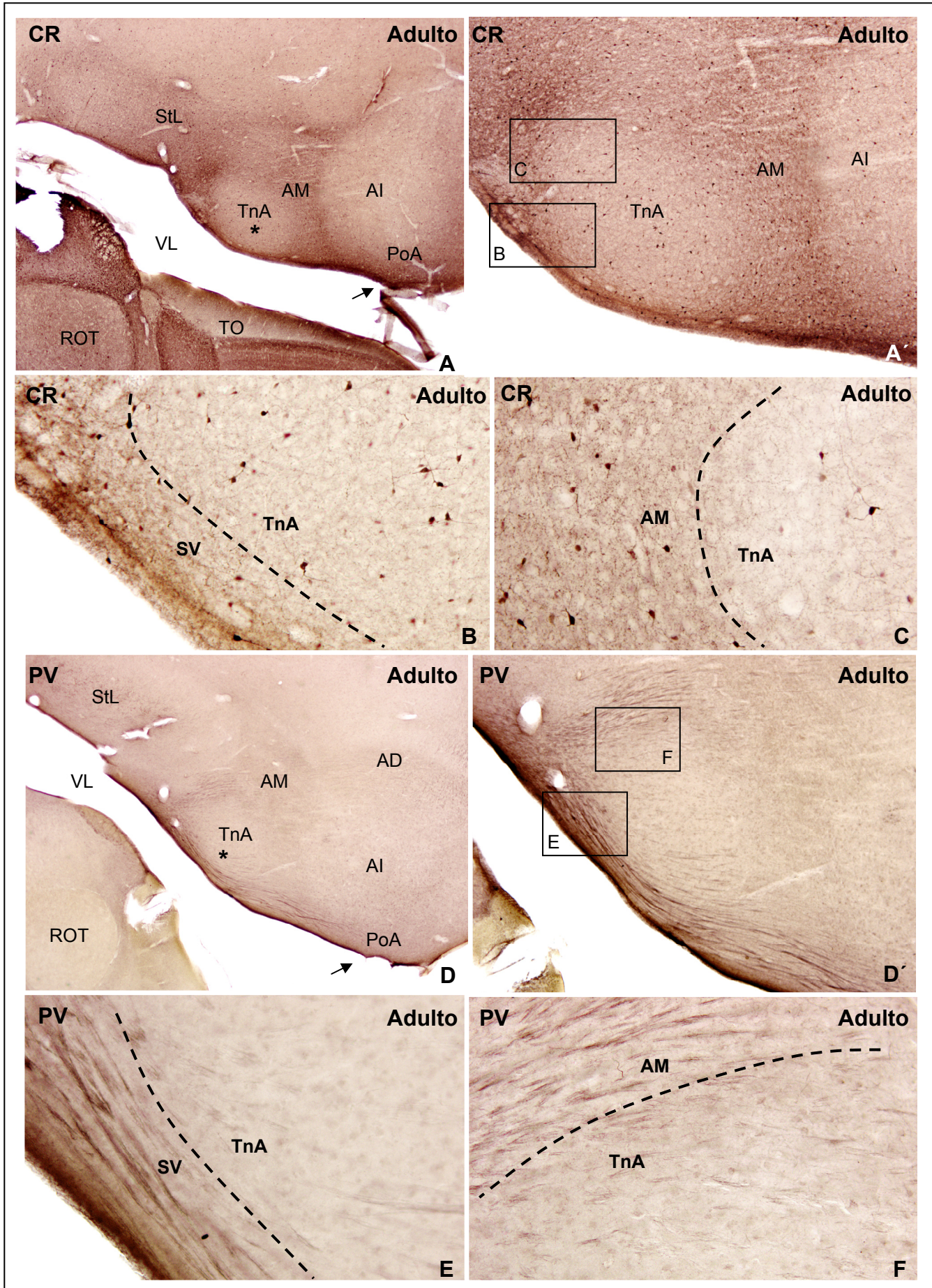
**Figura 30.** Microfotografías de secciones coronales (A,B) y sagitales (C,D,D') de telencéfalo de pollo en E16 y E18 respectivamente inmunotefidas para calbindina. La imagen D' es un detalle del área recuadrada en D. Las cabezas de flecha indican el punto de inserción de la taenia ventricular El núcleo taeniae de la amígdala muestra una menor inmunorreactividad para calbindina que la amígdala hipocampal (A,B). Ambas estructuras se hallan separadas por una delgada banda de tejido perteneciente al arcopalio medial (D,D'). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-D=20x; D'=100x.



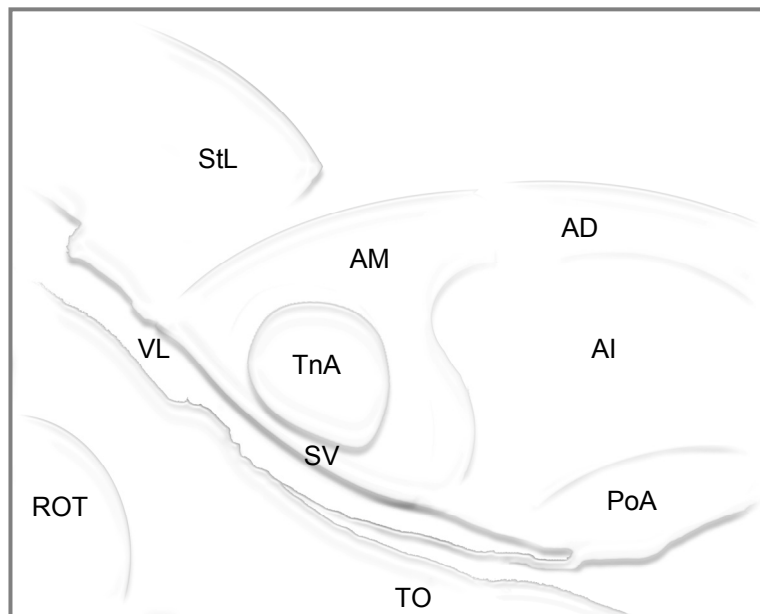
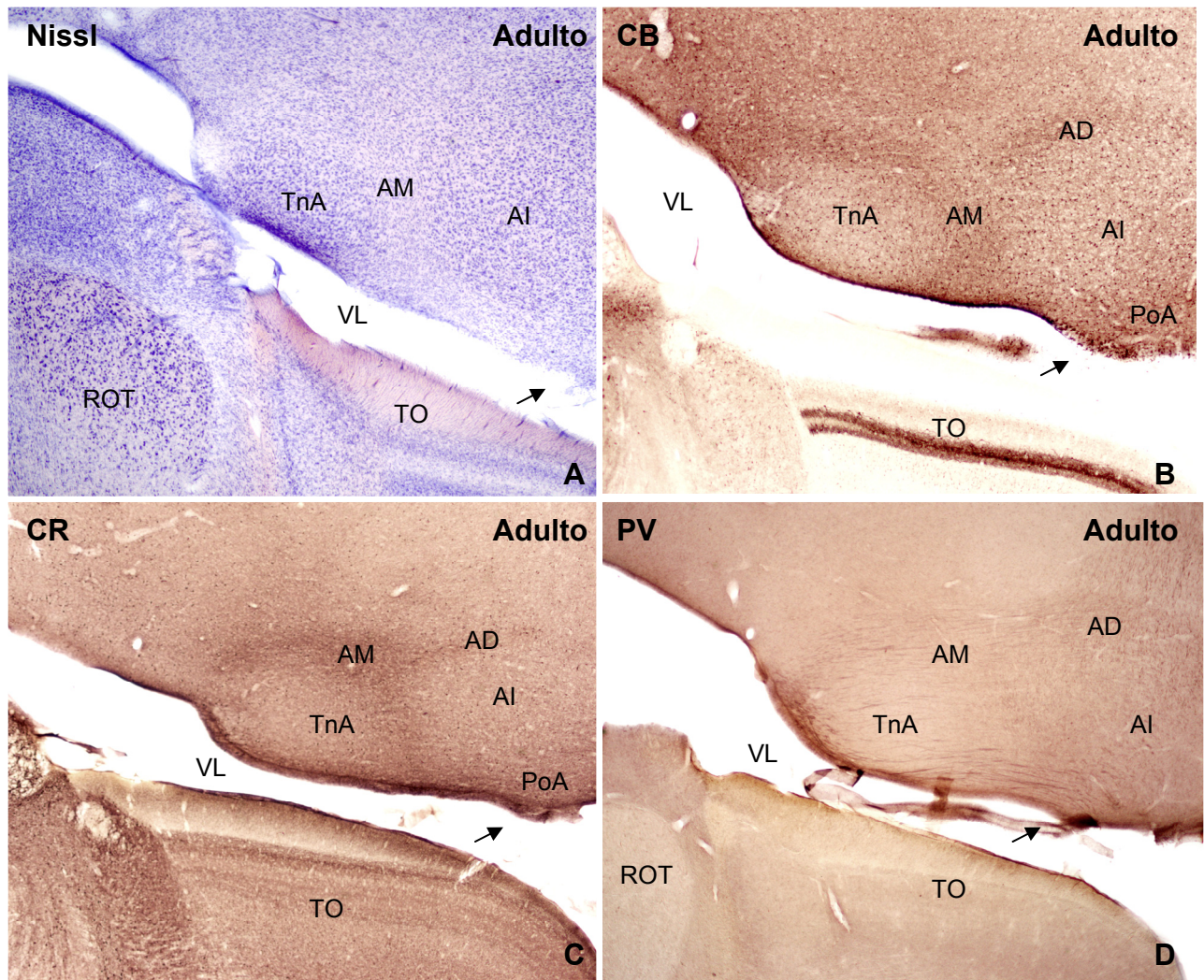
**Figura 31.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E18 inmunoteñidas para calbindina (A,A'), calretinina (B), nNOS (C) y GABA (D). La imagen A' es un detalle del área recuadrada en A. El núcleo taeniae de la amígdala muestra un número moderado de neuronas calbindina positivas (A,A'), algunas células aisladas con inmunorreactividad para calretinina (B), una muy débil distribución nNOS (C) y una abundancia de células GABAérgicas moderada (D). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A=10x; A',B-D=100x.



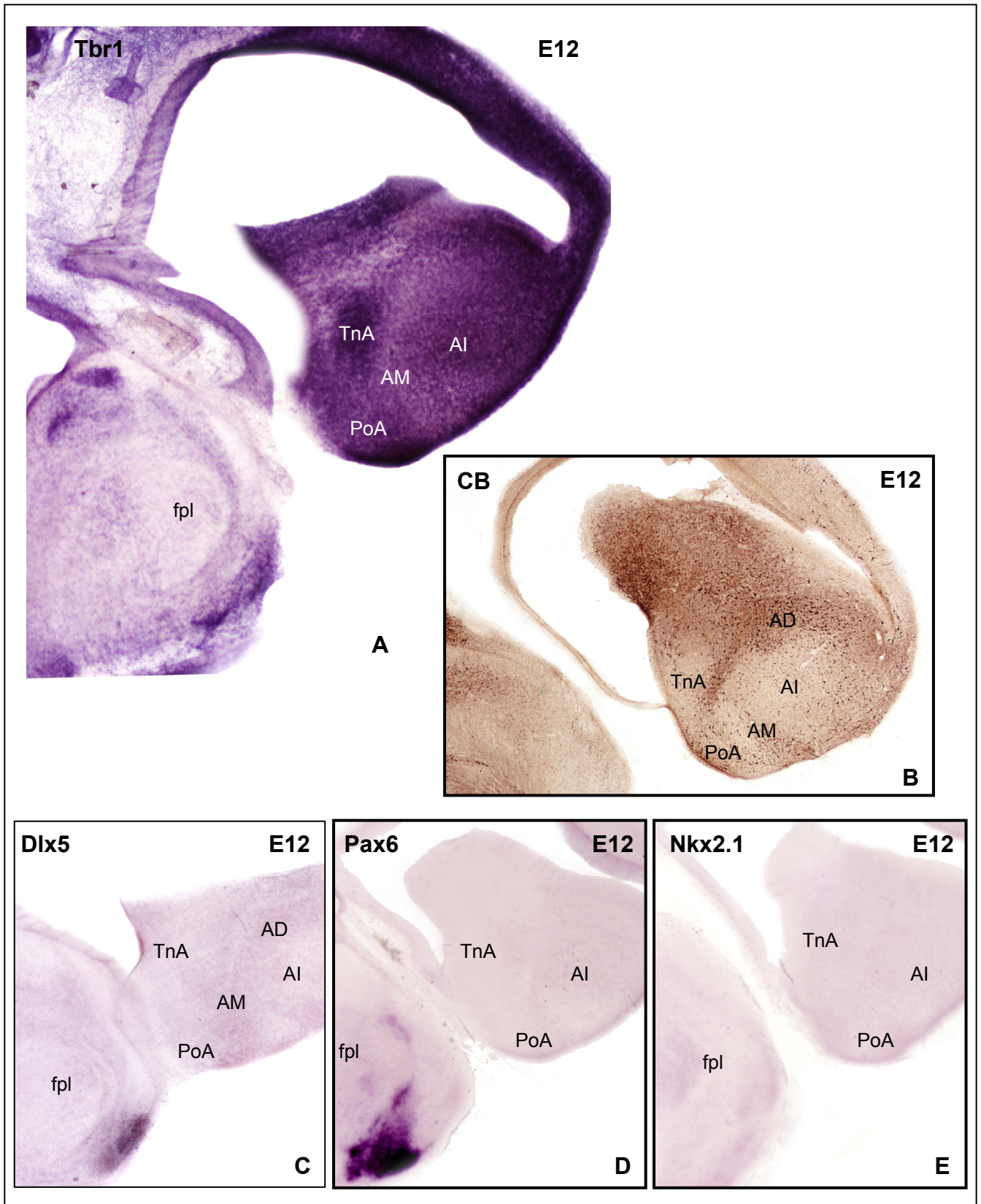
**Figura 32.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en adulto teñidas mediante Azul de Toluidina (A,A') e inmunoteñidas para calbindina (B-D, B'). Las imágenes A' y B' son detalles de las áreas marcadas con un asterisco en A y B respectivamente. Las imágenes C y D son detalles de las áreas recuadradas en B'. Las cabezas de flecha indican el punto de inserción de la taenia ventricular. Se muestran las diferencias en el grado de empaquetamiento celular (A,A') y distribución para calbindina (B-D, B') existentes entre el núcleo taeniae, el arcpalio medial y el núcleo subventricular. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A,B=20x; A',B'=100x; C,D=200x.



**Figura 33.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en adulto inmunotefidas para calretinina (A-C, A') y parvalbúmina (D-F, D'). Las imágenes A y D' son detalles de las áreas marcadas con un asterisco en A y D respectivamente. Las imágenes B, C y E, F son detalles de las áreas recuadradas en A y D respectivamente. Las cabezas de flecha indican el punto de inserción de la taenia ventricular. Se muestran las diferencias de distribución para calretinina (A-C, A') y parvalbúmina (D-F, D') existentes entre el núcleo taeniae, el arcopallio medial y el núcleo subventricular. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A, B=20x; A', B'=100x; C, D=200x.



**Figura 34.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en adulto teñidas mediante Azul de Toluidina (A) e inmunoteñidas para calbindina (B), calretinina (C) y parvalbúmina (D). Las cabezas de flecha indican el punto de inserción de la taenia ventricular. Comparativa del grado de empaquetamiento celular (A) y distribución de los marcadores descritos (B-D) entre el núcleo taeniae, la amígdala hipocámpal y el núcleo subventricular. El esquema muestra los límites que se establecen entre las citadas estructuras. Para más detalles consultar el texto. Ver lista de abreviaturas. Aumentos: 20x.



**Figura 35.** Microfotografías de secciones coronales de telencéfalo de pollo en E12, hibridadas para *Tbr1* (A), *Dlx5* (C), *Pax6* (D), y *Nkx2.1* (E) e inmunoteñidas para calbindina (B). El núcleo taeniae muestra una intensa señal para *Tbr1* (A), así como una total ausencia de expresión *Dlx5* (C), *Pax6* (D) y *Nkx2.1* (E). El marcaje *Tbr1* en las estructuras del telencéfalo caudal es parcialmente complementario al patrón de distribución para calbindina (A,B). Ver lista de abreviaturas. Aumentos: A-B=25x; C-E=20x.



# **D**iscusión



# Discusión

En la presente tesis doctoral se ha realizado un detallado estudio histogenético e inmunocitoquímico de la amígdala subpalial-amígdala extendida en aves durante el desarrollo, con el objetivo de avanzar en la comprensión de aspectos tales como el origen histogenético de cada uno de sus componentes, la definición de los límites exactos de cada estructura, la caracterización de las distintas subdivisiones que componen cada uno de sus núcleos y el establecimiento de las relaciones anatómicas existentes en el complejo.

## 1.- Patrones Generales de Expresión de *Tbr1*, *Dlx5*, *Pax6*, *Nkx2.1* y *Shh* en el Complejo de la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida de Aves durante el Desarrollo Temprano

Se han analizado los patrones de distribución de un conjunto de genes del desarrollo, tales como *Tbr1*, *Dlx5*, *Pax6*, *Nkx2.1* y *Shh*, descritos en la bibliografía como marcadores de expresión muy conservada en el cerebro de todos los vertebrados y esenciales para el correcto desarrollo de los principales compartimentos telencefálicos (Puelles y Rubenstein, 1993, 2003; Puelles et al., 2000; Marín y Rubenstein, 2003). De esta forma, el dominio palial, en el que se incluyen el arcopalio, la amígdala hipocampal, el núcleo taeniae de la amígdala y el núcleo posterior de la amígdala, se caracteriza por expresar el factor de transcripción *Tbr1* (Bulfone et al., 1995; Puelles et al., 2000; Redies y Puelles, 2001), implicado en la diferenciación de las neuronas excitadoras de tipo glutamatérgico (Hevner et al., 2001), mientras que el gen *Dlx5*, involucrado en la adquisición del fenotipo neuronal GABAérgico (Marín y Rubenstein, 2001; Stümer et al., 2002), es característico de la zona proliferativa y del manto del subpalio (Bulfone et al., 1993; Eisenstat et al., 1999; Puelles et al., 2000; Panganiban y Rubenstein, 2002). El límite palio/supbalio puede ser trazado en base a las diferencias de marcaje entre ambos genes, así como en función de la expresión diferencial del factor de transcripción *Pax6*, caracterizado por mostrar una delgada banda intensamente marcada localizada bajo el citado límite que se extiende radialmente hasta la superficie telencefálica (Puelles et al., 2000; Redies y Puelles, 2001). Este gen se halla además presente en la región subventricular del palio, así como en regiones del manto estriatal tales como el estriado, el área amigdalina subpalial y el núcleo accumbens (Smith-Fernández et al., 1998; Puelles et al., 2000). El gen *Nkx2.1* por su parte se expresa intensamente en la eminencia gangliónica medial, el manto palidal, el área

entopeduncular y en las regiones preópticas, mostrando por el contrario una total carencia de señal en el estriado, hecho que permite establecer de forma precisa el límite estriatopalial a lo largo de todo el dominio subpalial (Kimura et al., 1996; Pera y Kessel, 1998; Sussel et al., 1999; Marin et al., 2000; Puelles et al., 2001; Redies y Puelles, 2001). La distribución diferencial de la señal de *Shh*, presente en el área entopeduncular y las regiones preópticas (Shimamura et al., 1997; Marín y Rubenstein, 2002; Puelles y Rubenstein, 2003) permiten acotar límites de estos dominios, pudiendo ser de esta forma definido el pálido en base al estudio comparado de la distribución de estos genes (*Nkx2.1* positivo y *Shh* negativo). Se ha observado que el “bed nucleus de la stria terminalis” expresa a lo largo de toda su extensión el factor de transcripción *Nkx2.1*, apreciándose además una débil marca *Shh* en la porción medial y en parte de la porción lateral del núcleo.

A grandes rasgos, los citados compartimentos se disponen de forma concéntrica en la vesícula telencefálica, de manera que el palio ocupa una posición superficial que rodea parcialmente al subpalio y que se extiende hacia el hipotálamo rostral en los niveles caudales del telencéfalo, (Puelles 2000; Marín y Rubenstein, 2002., Puelles y Rubenstein, 2003) habiéndose observado que una gran parte del *Corredor nNOS* se incluye en este territorio palial extendido. De forma similar, los componentes *Shh* positivos del “bed nucleus de la stria terminalis” forman parte de una banda de tejido subpalial paralela al corredor palial (Puelles et al., 2000) que se extiende medialmente hacia la región hipotalámica (Fig. 36).



**Figura 36.** Representación esquemática de las diferentes estructuras que componen la amígdala subpallial-amígdala extendida de aves en niveles telencefálicos intermedios y caudales. La línea roja representa el límite palio/subpalio. La línea naranja representa el límite estriatopallidal. La línea amarilla representa el límite de expresión estriado/área entopeduncular.

## 2.- Patrones Generales de Distribución de GABA, Calbindina, Calretinina, Parvalbúmina y Sintasa del Óxido Nítrico en el Complejo de la Amígdala Subpalial-Amígdala Extendida de Aves durante el Desarrollo

Nuestros resultados indican que los marcadores GABA, calbindina, calretinina, parvalbúmina y nNOS presentan patrones de expresión diferenciales para cada uno de los núcleos que componen la amígdala subpalial-amígdala extendida de aves durante el desarrollo. Como norma general, se ha observado que el GABA, el nNOS y las proteínas ligadoras de calcio calbindina y calretinina se hallan presentes desde los estadios iniciales o intermedios del desarrollo embrionario, mientras que la distribución de parvalbúmina comienza a ser observable tras la eclosión del huevo. En general, los patrones de distribución para cada marcador, con la excepción de la parvalbúmina, son similares desde los estadios finales del desarrollo hasta el adulto. En este contexto se hace necesario aclarar que si bien no se aprecian diferencias significativas en el número de neuronas positivas presentes en las estructuras estudiadas en individuos adultos, el aumento generalizado en la superficie telencefálica implica una aparente disminución en cuanto a la densidad celular. La presencia de GABA, calbindina, calretinina y nNOS durante el desarrollo temprano y la aparición postnatal de parvalbúmina ha sido descrita previamente por un gran número de autores (Braun, 1990; Puelles et al., 1992; Sánchez et al., 1992; Alcántara et al., 1993, 1996; 1993; Del Río et al., 1994; Meyer et al., 1998; Berdel y Morys, 2000; López y González, 2002; Legaz et al., 2005; Suárez et al., 2005, 2006 ).

Se ha descrito que en los vertebrados la aparición de neuronas de carácter GABAérgico tiene lugar durante etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (Alcántara y Ferrer, 1995; Berger y Álvarez, 1996; Hof et al., 1999; Yoon et al., 2000; Suárez et al., 2006). La distribución de estas neuronas es abundante y homogénea a grandes rasgos en el conjunto del telencéfalo, observándose sin embargo una mayor densidad celular en la región subpalial. La mayoría de las neuronas GABAérgicas presentes en el palio poseen de hecho un origen subpalial, y alcanzan su posición final mediante procesos de migración tangencial durante el desarrollo (Anderson et al., 1997, 2001; Pleasure et al., 2000; Cobos et al., 2001; Marín y Rubenstein, 2001; Tuorto et al., 2003). La modulación de los diferentes circuitos neuronales mediante interneuronas inhibitoras es esencial para la integración de los diferentes estímulos sensoriales y motores, siendo el número y la diversidad de interneuronas que emplean el GABA como neurotransmisor determinante para una correcta funcionalidad de las distintas regiones cerebrales (McDonald, 1982, 1985; Millhouse y DeOlmos, 1983; Guirado y Dávila, 1999; Freund, 2003; Hestrin y Galarreta, 2005). Diversos estudios sugieren que

las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina, así como la sintasa del óxido nítrico, se hallan presentes en distintas subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas, las cuales pueden ser caracterizadas en base a la colocalización de estos marcadores (Gulyás et al., 1991; Dávila et al., 1991, 1993, 1995, 1997, 1999; Martínez-Guijarro y Freund, 1992; Valtschanoff et al., 1993; Gabbott y Bacon, 1995; Freund y Buzsáki, 1996; Guirado et al., 2003; Atoji y Wild, 2005).

Se ha observado que la distribución para calbindina es especialmente abundante en los dominios paliales del telencéfalo (Cobos et al., 2001; Tuerto et al., 2003; Suárez et al., 2006), incluyendo estructuras tales como el arcopalio, el núcleo posterior de la amígdala, la amígdala hipocampal, el *Corredor nNOS* y el núcleo taeniae de la amígdala; habiéndose además observado una intensa inmunorreactividad en determinadas regiones de la amígdala subpallial-amígdala extendida, como son la porción lateral del área amigdalina subpallial y parte del “bed nucleus de la stria terminalis”. De la misma forma, la expresión para calretinina es predominante en las áreas subpalliales, entre las que se incluyen el estriado, el globo pálido, el área amigdalina subpallial y la porción lateral del “bed nucleus de la stria terminalis”; apreciándose sin embargo una pobre aunque significativa distribución en el conjunto del palio (Rogers, 1987; Kemppainen y Pitkänen, 2000; Suárez et al., 2006). Se ha descrito que la presencia de calbindina y calretinina se halla relacionada durante los estadios iniciales del desarrollo en procesos dependientes de calcio, tales como el crecimiento de las prolongaciones celulares, la plasticidad neuronal y los eventos de migración durante el desarrollo (Enderlin et al., 1987; Hendrickson et al., 1991; Andressen et al., 1993; Komuro y Rakic, 1996). La aparición tardía de la parvalbúmina, especialmente representada en la amígdala pallial y amígdala pallial extendida, ha sido relacionada por su parte con la maduración funcional de las neuronas y con la formación de circuitos inhibidores (Seo-Hiraiwa et al., 1995) y con el comienzo de la actividad neuronal dependiente de calcio (Stichel et al., 1987; Seto-Ohshima et al., 1990; Hendrickson et al., 1991; Solbach y Celio, 1991; Sánchez et al., 1992; Alcántara et al., 1993; Hogan y Berman, 1994). Los patrones de distribución para la sintasa del óxido nítrico, incluyendo neuronas y neuropilo, son abundantes desde los estadios iniciales del desarrollo tanto en regiones paliales como subpalliales, habiendo sido descritos dos tipos celulares de aspecto diferente y con distintos niveles de inmunorreactividad nNOS: células intensamente inmunoteñidas de aspecto multipolar y neuronas débilmente marcadas con una tinción somática (Scordalakes et al., 2002; Olmos et al., 2005; Moreno et al., 2005; Usunoff et al., 2006; Bombardi et al., 2006; Suárez et al., 2006). La amígdala subpallial-amígdala extendida muestra en su conjunto una abundante inmunorreactividad para este marcador, siendo sin embargo muy heterogéneas las

características de inmunotinción propias de cada núcleo. Así, el neuropilo nNOS es predominante en la porción lateral del “bed nucleus de la stria terminalis”, mientras que las células multipolares intensamente marcadas son muy abundantes en el área amigdalina subpalial y en el *Corredor nNOS*. La distribución de las células de tenue inmunotinción somática es observada predominantemente en los núcleos paliales de la amígdala, así como en la porción medial del “bed nucleus de la stria terminalis”. Se ha descrito que el óxido nítrico está implicado en los principales procesos histogénéticos durante el desarrollo embrionario, tales como son la proliferación, diferenciación, muerte celular y sinaptogénesis, así como en el establecimiento de circuitos neuronales (Garthwaite, 1991; Edelman y Gally, 1992; Brüning, 1993; Zhang y Snyder, 1995; Yun et al., 1996; Holscher, 1997; Rothe et al., 1998).

### 3.- Definición del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”

El “bed nucleus de la stria terminalis” ha sido descrito en mamíferos como una estructura de carácter límbico estructurada en dos grandes divisiones, una lateral y otra medial (Krettek y Price, 1978; De Olmos et al., 1985), constituidas en ambos casos por un conjunto de subnúcleos bien diferenciados (Del Abril et al., 1987; Moga et al., 1989; Hines et al., 1992). La división lateral de este complejo se caracteriza por mostrar conexiones recíprocas con núcleos relacionados con la regulación central autónoma (Moga et al., 1989), mientras que la división medial participa en circuitos implicados en comportamientos sexuales (Emery y Sachs, 1976; Valcourt y Sachs, 1979; Claro et al., 1995; Aste et al., 1998). En aves se considera que la stria terminalis forma parte del tracto occipitomesencefálico dorsal, habiendo sido descritas aferencias desde el arcopalio posteromedial y el núcleo taeniae hacia una región ventral al septum lateral y al ventrículo lateral (Zeier y Karten, 1971). Estas áreas han sido consideradas por gran cantidad de autores como homólogas al “bed nucleus de la stria terminalis” de mamíferos en base a criterios topográficos, hodológicos e inmunohistoquímicos (Reiner et al., 1983, 1984; Berk, 1985; Aste et al., 1998; Jurkevich et al., 1999), los cuales serán descritos y comparados con nuestros resultados a lo largo de los siguientes apartados.

#### 4.- Los Patrones de Expresión de GABA, Calbindina, Calretinina, Sintasa del Óxido Nítrico y del Factor de Transcripción *Shh* Sugieren una Compartimentalización en la División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”

El foro para la nomenclatura del cerebro de aves ha definido recientemente a la división lateral del “bed nucleus de la stria terminalis” como un pequeño abultamiento localizado en la cara lateral de la porción ventral del ventrículo lateral (Reiner et al., 2004), caracterizado por mostrar una intensa inmunorreatividad para “corticotropin-releasing factor” (Richard et al., 2004) y neurotensina (Reiner y Carraway, 1987; Atoji et al., 1996), pero inmunonegativo para sustancia P (Reiner et al., 1983). Se ha postulado que esta región se halla dividida en dos partes bien diferenciadas, una central, caracterizada por mostrar una elevada densidad celular, y una región plexiforme, con un menor número de neuronas embebidas en un abundante neuropilo (Atoji et al., 1996). La porción central del núcleo, denominada originalmente BST magnocelular, posee una fuerte inmunorreatividad para la vasotocina (Jurkevich et al., 1999), así como un marcaje moderado para el “gastrin-releasing peptide” (Dubbeldam y Boer-Visser, 2000) y la dopamina (Durstewitz et al., 1998; Boer-Visser y Dubbeldam, 2002). La porción plexiforme muestra por su parte un gran número de fibras tiroxina hidroxilasa positivas (Balthazart et al., 1998; Roberts et al., 2002), así como un número moderado de células inmunorreactivas para acetilcolinesterasa (Roberts et al., 2002).

En este contexto, nuestros resultados apoyan la diferenciación entre porción central y plexiforme descrita en la bibliografía, pero sugieren además la existencia de dos regiones bien diferenciadas en esta última porción. Proponemos que la subdivisión central del núcleo, definida originalmente por Jurkevich y colaboradores (1999) como BST magnocelular pase a denominarse BST lateral magnocelular, de tal forma que el nombre refleje la pertenencia de la subdivisión al conjunto del BSTL. Dado que las dos porciones plexiformes modifican su posición relativa a lo largo del eje rostrocaudal, hemos decidido denominarlas BSTL plexiforme 1 y BSTL plexiforme 2. Así, en los niveles rostrales el BSTLp1 ocupa una posición lateral al BSTLmc y dorsal al BSTLp2, observándose un giro paulatino del conjunto hacia los niveles caudales, acompañando la a la base del ventrículo lateral. En estos niveles caudales el BSTLmc ocupa una posición dorsal con respecto a la porción plexiforme, siendo en este caso el BSTLp2 medial al BSTLp1.

Se ha observado que los límites del BSTLmc pueden ser claramente definidos en base a tinciones simples de tipo Nissl, observándose un conjunto de células densamente empaquetadas que contrastan con el menor número de somas presente en la región plexiforme del núcleo. El BSTL muestra en su conjunto una abundante población de células GABAérgicas, apreciándose sin embargo a partir de E16 un mayor número de neuronas marcadas en la porción magnocelular. Parece lógico pensar que esta diferencia de distribución GABAérgica se halla directamente relacionada con la menor abundancia relativa de células que revelan las tinciones tipo Nissls en la región plexiforme del núcleo. Sin embargo, la distribución diferencial de las proteínas ligadoras de calcio sugieren la existencia de al menos 3 poblaciones diferentes de neuronas GABA en el complejo. Numerosos autores han propuesto que la calbindina, la calretinina y la parvalbúmina se hallan asociadas principalmente a células de carácter GABAérgico, y han sido empleadas para marcar selectivamente a diferentes poblaciones de interneuronas GABA positivas (Baimbridge et al., 1982; García Segura et al., 1984; Braun, 1990; Celio, 1990; Rogers et al., 1990; Andressen et al., 1993). La porción magnocelular del BSTL, rica en neuronas GABAérgicas, carece por completo de inmunorreactividad para calbindina, calretinina y parvalbúmina, lo cual define a la primera población. Se ha observado que la porción plexiforme del núcleo posee a partir de E14 algunas células aisladas inmunopositivas para la calretinina, apreciándose una abundancia relativa ligeramente superior en el BSTLp2. Además, se han observado algunas células aisladas marcadas para calbindina en BSTLp1 a partir de E12, así como una gran cantidad de neuronas inmunopositivas para este marcador en el BSTLp2. De esta forma, proponemos la existencia de una segunda población inmunorreactiva para GABA y calbindina, especialmente abundante en BSTLp2, claramente diferenciable de una tercera población inmunorreactiva para GABA y calretinina. El grado de resolución de los experimentos realizados nos permite inferir la existencia de al menos estas tres poblaciones en base a las diferencias significativas de distribución de los marcadores citados. Sin embargo, la ausencia de experimentos de colocalización en este trabajo no nos ha permitido establecer las abundancias relativas de cada una de estas poblaciones en la porción plexiforme del núcleo, descartar la existencia de alguna población positiva para proteínas ligadoras de calcio pero carente de inmunorreactividad para GABA o establecer posibles colocalizaciones de células calbindina y calretinina positivas.

Las porciones plexiformes del BSTL se caracterizan por mostrar un neuropilo intensamente marcado para calretinina y nNOS a lo largo de toda su extensión, que contrasta con la ausencia total de expresión presente en la porción magnocelular del núcleo y con el marcaje principalmente somático que muestra el adyacente estriado lateral y área subpial amigdalina para ambos marcadores. Este neuropilo



característico, muy rico en terminales, define de forma precisa los límites de la porción plexiforme en su conjunto, habiéndose observado sin embargo ciertas diferencias en los patrones de distribución espaciotemporales para el conjunto de marcadores estudiados en las dos subdivisiones que la constituyen. Así, en primer lugar, tanto el neuropilo marcado para calretinina, observable a partir de E14, como el positivo para nNOS, apreciable desde E12, muestran una mayor abundancia relativa e intensidad de inmunotinción en el BSTLp2 durante todo el desarrollo. En segundo lugar, si bien la distribución de células GABAérgicas es muy similar en ambas subdivisiones, la aparición de las primeras células inmunopositivas se observan en el BSTLp2 en embriones de 12 días, siendo observables algo más tardíamente, a partir de E14, en el BSTLp1. En tercer lugar, y aunque escasas en ambas subdivisiones, el número de células inmunorreactivas para la calretinina es ligeramente superior en BSTLp2. En cuarto lugar, la población de células calbindina positivas presente en la porción plexiforme del núcleo desde E12 muestra tan solo algunas células aisladas en BSTLp1, mientras que la densidad neuronal existente en BSTLp2 es muy elevada, de tal forma que la distribución de este marcador, junto a la intensa inmunoreactividad para DARPP-32 descrita en esta región (Roberts et al., 2002), constituyen características diferenciales para el BSTLp2. En quinto y último lugar, hemos observado que si bien la división lateral del “bed nucleus de la stria terminalis” muestra una intensa señal para *Dlx5* y *Nkx2.1* a lo largo de toda su extensión, es posible apreciar una débil marca para *Shh* en la porción plexiforme 2 del núcleo (Bardet et al., 2006). Este hecho sugiere que tanto BSTLmc como BSTLp1 tienen un carácter eminentemente palidal, mientras que el BSTLp2 cuenta además con una población neuronal procedente del área entopeduncular anterior.

Cabe destacar que si bien la aparición de los marcadores inmunocitoquímicos estudiados tiene lugar en diferentes estadios del desarrollo intermedio, se aprecia una estabilización de los patrones de distribución a partir de E16, no observándose diferencias significativas durante el resto del desarrollo ni en el individuo adulto. En ningún caso se ha observado inmunoreactividad para parvalbúmina en ninguna de las subdivisiones del BSTL.

## 5.- La División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” y el Núcleo Accumbens Muestran un Patrón de Expresión Diferencial para GABA, nNOS, Calretinina, Nkx2.1 y Pax6

La región más rostral del BSTL tal y como ha sido descrito en el presente estudio ha sido considerada por un gran número de autores contemporáneos como parte del núcleo accumbens (Durstewitz et al., 1999; Foidart et al., 1999; Roberts et al., 2002), en base a las descripciones originales propuestas por Karten y Hodos en su atlas de cerebro de paloma (Karten y Hodos, 1967). De hecho, ambas estructuras ocupan una posición topográfica similar en la base del ventrículo lateral, hallándose además subdivididas en una porción central y una porción periférica (Reiner et al., 2004). Los marcadores GABA, calretinina y nNOS muestran una distribución característica para el núcleo accumbens y el BSTL, lo cual permite la diferenciación y el establecimiento de los límites precisos entre ambas estructuras. Así, el núcleo accumbens se localiza en los niveles más rostrales del telencéfalo, rodeando parcialmente al polo rostral del BSTL en los niveles de transición entre ambas estructuras. La inmunorreactividad observada para el GABA es complementaria en estas regiones, de tal forma que tanto la porción magnocelular del BSTL como la porción periférica del núcleo accumbens muestran un elevado número de neuronas GABAérgicas densamente agrupadas, mientras que por el contrario la distribución observada en la región plexiforme del BSTL y la porción central del núcleo accumbens muestra una densidad poblacional significativamente inferior. Además, la porción plexiforme del BSTL muestra en su conjunto una elevada inmunorreactividad para calretinina y nNOS, caracterizada por algunas células aisladas inmunopositivas para calretinina y un abundante neuropilo intensamente marcado y rico en terminales para ambos marcadores. El núcleo accumbens muestra por su parte una total ausencia de este característico neuropilo calretinina o nNOS, quedando restringida la expresión para estos marcadores a algunas células aisladas distribuidas principalmente en la región periférica del núcleo.

Los patrones de expresión del factor de transcripción *Dlx5* denotan que tanto el núcleo accumbens como la división lateral del “bed nucleus de la stria terminalis” poseen un origen histogenético subpalial. Sin embargo, el intenso marcaje *Pax6* presente en el núcleo accumbens denota que esta estructura posee un carácter estriatal, a diferencia del BSTL, cuyo marcaje *Nkx2.1* implica una naturaleza palidal (Puelles et al., 2000).

Diversos estudios neuroquímicos y hodológicos realizados en el núcleo accumbens y el BSTL apoyan la localización propuesta para ambas estructuras, así como su homología con los núcleos homónimos de mamíferos y reptiles (Guirado et al., 1999; Reiner et al., 2004). De esta forma, y tomando como referencia la descripción realizada en este trabajo, se ha descrito que el núcleo accumbens muestra tanto en aves como en mamíferos y reptiles una elevada inmunorreactividad para sustancia P y dopamina, así como una ausencia total de expresión para “corticotropin-releasing factor” (Reiner et al., 1984; Reiner, 1987; Anderson y Reiner, 1990; Reiner y Anderson, 1990; Durstewitz et al 1999; Guirado et al., 1999; Roberts et al., 2002; Richards et al., 2004). Además, se han observado conexiones recíprocas entre este núcleo y el área tegmental ventral, así como diversas aferencias procedentes de áreas de carácter límbico, tales como el complejo hipocampal, la amígdala palial y el palio frontal (Brauth et al., 1978; Hoogland y Vermeulen-VanderZee, 1989; González et al., 1990; Reiner et al., 1990, 2004; Pérez-Santana et al., 1997; Guirado et al., 1999; Mezey et al., 2002). Por otra parte, las características inmunocitoquímicas descritas en la bibliografía para la división lateral del BST de mamíferos y de aves son muy similares, observándose en ambos casos una pobre inervación dopaminérgica y un marcaje prácticamente ausente para sustancia P, que contrastan con la abundante distribución de fibras y neuronas neurotensina positivas y la prominente población de neuronas inmunorreactivas para “corticotropin releasing-factor” presentes en esta región (Reiner et al., 1983; Panzica et al., 1986; Reiner and Carrayay, 1987; Medina y Reiner, 1994; Moga et al., 1989; Aste et al., 1995,1998; Richards et al., 2004). De forma similar, los estudios de trazado revelan similitudes en las conexiones de la porción lateral del BST en ambos taxones, incluyendo las conexiones recíprocas entre esta estructura y el núcleo parabraquial (Wild et al., 1990), las proyecciones hacia hipotálamo lateral, sustancia negra y núcleo del tracto solitario y las aferencias desde el tálamo, incluyendo la región periovoidal y el tálamo posterior intralaminar (Wild, 1987; Moga et al., 1989; Durand et al., 1992; Alden et al., 1994; Dong et al., 2001; Dong and Swanson, 2003; Atoji et al., 2006).

## 6.- La División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” se Halla Estrechamente Relacionada con el Órgano Lateroseptal y Otros Órganos Circunventriculares Telencefálicos

Los órganos circunventriculares comparten una serie de características morfológicas y endocrinas que los diferencian del resto de las estructuras que componen el sistema nervioso. Así, las neuronas que componen estos órganos se hallan en contacto con la sangre o el fluido cerebrospinal, participando en la transmisión de respuestas homeostáticas y en el establecimiento de circuitos neurales esenciales (Vigh et al., 2004). El primer órgano circunventricular descrito en aves fue el órgano lateroseptal, localizado en la base del ventrículo lateral y subdividido en dos regiones, una medial, asociada a los núcleos septales, y otra lateral, en íntimo contacto con el núcleo accumbens (Van Tienhoven and Juhász, 1962; Kuenzel and Van Tienhoven, 1982; Kuenzel and Masson, 1988; Kuenzel, 1993; Kuenzel and Blazer, 1994; Kuenzel et al., 1997). La extensión rostrocaudal de este órgano tal y como define Kuenzel en su atlas estereotáxico de pollo (1988) es considerable, abarcando desde el nivel rostral A9.6 hasta el nivel caudal A7.8, de tal forma que durante gran parte de su recorrido el BSTL contacta medialmente con su superficie. Recientes estudios histogenéticos e inmunocitoquímicos realizados por Puelles y colaboradores sugieren sin embargo una reinterpretación de este complejo, postulando que la extensión real de este órgano queda limitada a la porción más rostral del telencéfalo (niveles A10-A9.4), y definiendo al mismo tiempo la continuidad caudal de esta estructura con tres órganos circunventriculares no descritos hasta la fecha, el órgano estriatopalidal, el órgano de la amígdala extendida y el órgano preoptohipotalámico (Bardet et al., 2006).

Conforme a esta nueva reinterpretación, hemos observado que la división lateral del “bed nucleus de la stria terminalis” se halla a lo largo de todo su recorrido rostrocaudal en íntimo contacto con varios de los órganos circunventriculares descritos (Fig. 37). La total ausencia de expresión GABAérgica presente en los órganos circunventriculares contrasta con la abundante distribución que este marcador muestra en el adyacente BSTL, lo cual permite establecer los límites precisos entre ambas estructuras y descartar al mismo tiempo la existencia de un contacto directo del BSTL con el ventrículo lateral.

Se ha observado que en los niveles rostrales del telencéfalo la superficie medial de la porción magnocelular y de la porción plexiforme 2 del BSTL son adyacentes a la división lateral del órgano lateroseptal, mientras que parte de la cara medial del BSTL plexiforme 1 contacta directamente con el órgano estriatopalidal. Ambos órganos

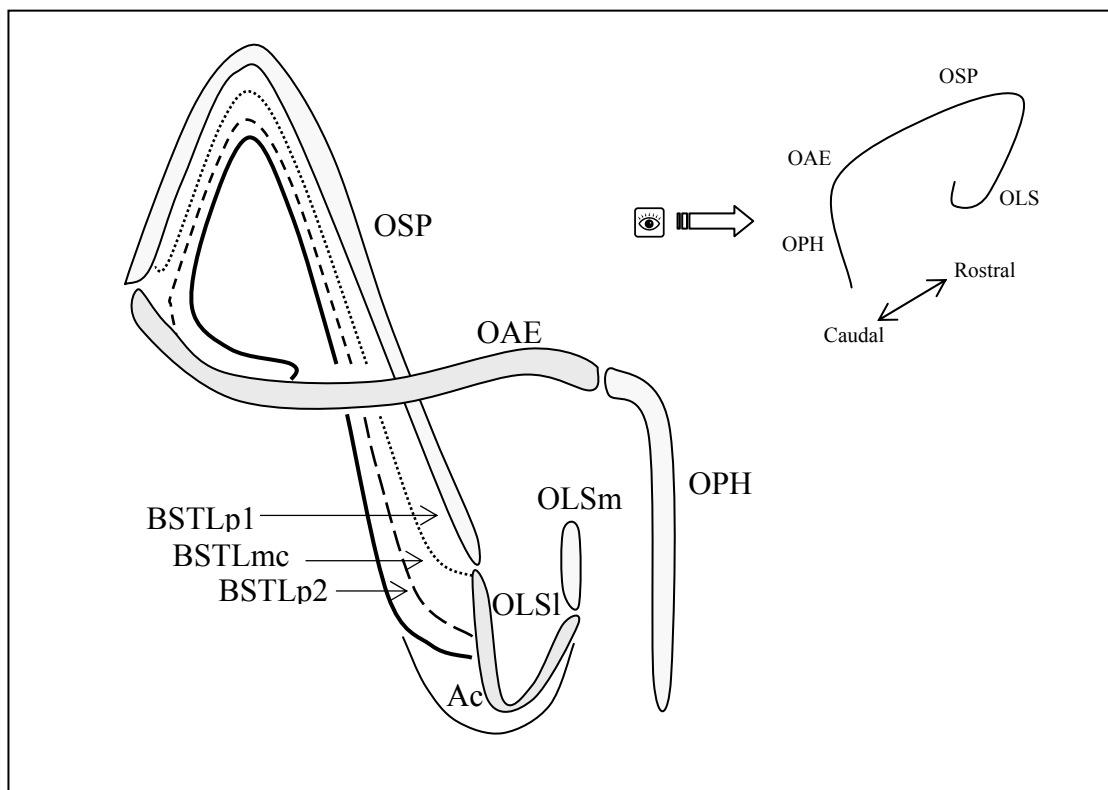
circunventriculares muestran una ausencia casi total de expresión para calretinina y nNOS, presentando por el contrario un intenso marcaje para calbindina. Esta inmunorreactividad para calbindina muestra un patrón de distribución diferencial que si bien nos permite identificar de forma clara a cada uno de los órganos resulta insuficiente para el trazado de un límite exacto entre ambas estructuras.

De esta forma, la porción lateral del órgano lateroseptal presenta una población moderada de células calbindina inmunopositivas que se insertan de forma discontinua en el epéndimo asociado al núcleo accumbens en los niveles más rostrales y a los BSTLmc y BSTLp2 en una posición algo más caudal. El órgano estriatopalidal muestra por su parte una inmunorreactividad para calbindina significativamente superior, representada en primer lugar por una densa banda de células intensamente inmunoteñidas localizadas en la cara lateral del ventrículo, y en segundo lugar por una población de células marcadas ligeramente dispersas que ocupan una posición distal al ventrículo lateral. La primera población descrita forma parte del órgano estriatopalidal proximal, caracterizado por expresar selectivamente la proteína de adhesión BEN (Bardet et al., 2006), y que se halla en contacto directo con el BSTLp1 durante prácticamente toda su extensión rostrocaudal. La población de células distales calbindina positivas son derivados de la región endodimal y alcanzan su posición ectópica mediante migración radial. Este grupo celular es característico del órgano estriatopalidal, no habiendo sido descrito ningún agregado similar en el resto de los órganos circunventriculares (Bardet et al., 2006). Un número abundante de estas células calbindina positivas pertenecientes al órgano estriatopalidal distal se distribuyen de forma no homogénea en la región del BSTLp1, no debiendo ser confundidas en ningún caso con la escasa población de células débilmente inmunorreactivas propias de esta subdivisión.

Se ha observado que en aquellos niveles caudales del telencéfalo en los que la base del ventrículo lateral contacta con el límite telencéfalo-diencéfalo rostral, la porción plexiforme 2 del BSTL se extiende medialmente hacia la *eminencia thalami*. El órgano de la amígdala extendida se caracteriza por mostrar una banda endodimal de células calbindina positivas que se extiende transversalmente a través del polo caudal del ventrículo lateral y que rodea aparentemente la línea ventricular de la amígdala extendida. La inmunorreactividad calbindina mostrada por este órgano es estructural y quimioarquitectónicamente similar a la presente en el órgano preoptohipotalámico, no siendo apreciada en ningún caso la población de células distales calbindina positivas propias del órgano estriatopalidal (Bardet et al., 2006). Nuestras observaciones indican que la porción extendida del BSTLp2 contacta íntimamente con el órgano de la

amígdala extendida en los niveles telencefálicos caudales, pero que se halla topográficamente alejada del órgano preoptohipotalámico. Las diferencias quimioarquitectónicas existentes entre la porción plexiforme 2 del BSTL y el órgano de la amígdala extendida son muy significativas, apreciándose un intenso marcaje para GABA, calretinina, nNOS y DARP-32 (Roberts et al., 2002) en el BSTLp2 que contrasta con la práctica ausencia de marcaje que muestran en su conjunto estos marcadores en la región del órgano circunventricular. Además, si bien ambas estructuras muestran una patente inmunorreactividad para calbindina, tanto la abundancia relativa como la intensidad de marcaje son muy superiores en la población celular del BSTLp2.

Se ha observado que la porción magnocelular del BSTL contacta parcialmente y de forma puntual tanto con el órgano estriatopalidal como con el órgano de la amígdala extendida en los niveles más caudales del telencéfalo. Sin embargo, dada la similar distribución que estas regiones muestran en su conjunto para las proteínas ligadoras de calcio y el nNOS resulta complicado establecer con exactitud las relaciones y límites precisos que se establecen entre ellas en base a nuestros resultados.



**Figura 37.** Representación esquemática en la que se muestra la relación entre los órganos circunventriculares y las diferentes subdivisiones que componen el BSTL. Redibujado de Bardet y colaboradores (2006).

## 7.- Los Marcadores Calbindina y el GABA Permiten Establecer los Límites Precisos de la División Medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis”

La localización exacta de la división medial del “bed nucleus de la stria terminalis” en aves ha sido establecida recientemente en base a la expresión diferencial de los marcadores arginina vasotocina y aromatasa (Aste et al., 1998; Jurkevich et al., 1999), considerados ambos como característicos de la región homóloga de mamíferos (De Vries and Buijs, 1983; Roselli et al., 1985; Van Leuween et al., 1985; Miller et al., 1989; Wang et al., 1993, 1997; Roselli et al., 1997). De esta forma, se ha descrito que la distribución de estos marcadores es muy abundante en una región de elevada densidad celular, claramente reconocible mediante tinciones simples de tipo Nissl, la cual se localiza en una posición dorsal a la comisura anterior y se extiende caudalmente hacia el hipotálamo en la zona de transición subpalio-área preóptica (Aste et al., 1998; Den Boer-Visser, 2002; Jurkevich et al., 2001; Reiner et al., 2004). Topográficamente, la posición ocupada por el BSTM en rata y codorniz muestran relaciones similares con el ventrículo lateral, el área septal y la comisura anterior (De Olmos et al., 1985; Del Abril et al., 1987; Moga et al., 1989; Asil et al., 1998). Esta propuesta de localización y homología del BSTM en aves ha sido respaldada por la comunidad científica en el reciente foro para la nomenclatura del cerebro de aves (Reiner et al., 2004), unificando de esta forma las distintas interpretaciones realizadas para esta región, previamente denominada diencéfalo rostral, paleoestriatum caudal pars ventralis o área septal (Kiss et al., 1987; Voorhuis et al., 1988; Balthazart et al., 1992; Voorhuis and De Kloet, 1992; Foidart et al., 1995). Los experimentos realizados en base a los patrones de expresión de la arginina vasotocina han permitido definir un único BSTM en codorniz (Aste et al., 1998), mientras que en pollo han sido descritos dos subnúcleos denominados BSTM1 y BSTM2 (pars parvocellularis dorsolateralis y pars parvocellularis ventromedialis respectivamente en la descripción original realizada por Jurkevich) (Reiner et al., 2004; Jurkevich et al., 1999).

La inmunorreactividad para aromatasa y arginina vasotocina presentes en la división medial del BST es muy similar a la presente en el núcleo preóptico medial adyacente (Balthazart et al., 1990; Viglietti-Panzica et al., 1994). Dada la proximidad y similitud citoarquitectónica y neuroquímica descrita resulta muy difícil el establecimiento preciso de los límites entre ambas estructuras en base a los marcadores citados (Aste et al., 1998). En este contexto resultan especialmente interesantes los resultados aportados por este trabajo en cuanto a la distribución de los marcadores GABA y calbindina, muy abundantes en la región del BSTM. Así, a partir de los 12 días de incubación y durante el resto del desarrollo se ha observado una fuerte

inmunorreactividad para el GABA en ambas subdivisiones, siendo ésta ligeramente superior en la porción dorsolateral del núcleo. Dicha inmunorreactividad, consistente en una población de células positivas inmersas en un neuropilo moderadamente marcado, es superior a la observada en las áreas inmediatamente adyacentes (siendo mayor el contraste en la porción hipotalámica), lo cual permite definir de forma precisa los límites del conjunto. De forma similar, a partir de E12 se ha observado una intensa inmunorreactividad para calbindina en la región del BSTM, caracterizada por una población neuronal fuertemente positiva inmersa en un neuropilo inmunopositivo de abundancia moderada, la cual ve incrementada su densidad celular a lo largo del desarrollo y en individuos postnatales. En este caso la distribución de calbindina es significativamente superior en la porción ventromedial del núcleo, lo que constituye una característica diferencial de esta región.

Los patrones de expresión combinados para GABA y calbindina apoyan de esta forma la reciente descripción del BSTM en el telencéfalo de aves, y complementan su caracterización en tres aspectos fundamentales. En primer lugar, la mayor distribución que ambos marcadores muestran en los dominios del BSTM permiten definir de forma precisas sus límites, pudiendo ser establecida una clara diferenciación con el núcleo preóptico medial. En segundo lugar, se ha observado una expresión diferencial en cada una de las subunidades que componen el BSTM, no solo para GABA y calbindina, sino también para calretinina y nNOS. Así, el BSTM2 muestra una población de células con inmunorreactividad para la calbinina superior a la presente en el BSTM1, habiéndose observado sin embargo en esta última división una mayor distribución GABAérgica, algunas células aisladas calretinina positivas y una abundancia relativa de nNOS muy elevada (la expresión de este último marcador será descrita con detalle en un apartado posterior). Finalmente, en tercer lugar, se ha observado que BSTM1 y BSTM2 se hallan conectados anatómicamente en posición caudal por medio de una delgada banda celular carente de marcaje para arginina vasotocina y aromatasa (Aste et al., 1998, Jurckevich et al., 1999, 2001; Grossmann et al., 2002), pero claramente reconocible en base a la expresión de GABA y calbindina.



## 8.- La División Medial y la Región Caudal de la Porción Plexiforme 2 de la División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” Comparten Características Histoquímicas e Inmunocitoquímicas

Los diferentes dominios telencefálicos se continúan, a través del tallo de la vesícula telencefálica, con las estructuras no evaginadas del prosencéfalo rostral. La eminencia thalami constituye una continuación caudal del palio medial, y se halla rostralmente limitada en la capa del manto por el fascículo prosencefálico lateral. Parcialmente rodeada por esta región, positiva para *Tbr1* en la mayor parte de su extensión, se encuentran las porciones más caudales del “bed nucleus de la stria terminalis”, entre las que se incluyen la porción plexiforme 2 del BSTL y las subdivisiones dorsolateral y ventromedial del BSTM (Puelles et al., 1999; 2000; 2003). Hemos observado que las áreas prospectivas de estas estructuras muestran en su conjunto una fuerte expresión de *Dlx5* y de *Nkx2.1*, lo cual sugiere la naturaleza fundamentalmente palidal del complejo (Kimura et al., 1996; Pera y Kessel, 1998; Sussel et al., 1999; Marin et al., 2000; Puelles et al., 2001; Redies y Puelles, 2001). Sin embargo, cabe destacar que estas áreas propias del “bed nucleus de la stria terminalis” que se extienden hacia la región preóptica hipotalámica muestran además una señal moderada para el factor de transcripción *Shh*, siendo la intensidad de la marca superior en la división medial del BST. Este hecho denota la presencia de una población de células derivadas de la zona proliferativa del área entopeduncular anterior/área preóptica (Shimamura et al., 1997; Marín y Rubenstein, 2002; Puelles y Rubenstein, 2003), lo que sugiere que las regiones caudales del BST poseen un componente palidal, originado en la eminencia gangliónica medial, y un componente entopeduncular/preóptico. Estos resultados son consistentes con los recientes estudios de distribución de los genes homeobox LIM en el telencéfalo de aves. La expresión de estos genes coincide parcialmente con el marcaje *Nkx2.1*, mostrando sin embargo patrones diferenciales en los dominios palidal, entopeduncular y preóptico. De esta forma se ha descrito una señal especialmente intensa para *Lhx6* en la división lateral del BST, mientras que el marcaje para *Lhx7/8*, prácticamente ausente en el BSTLmc y BSTp1, es muy abundante en la porción plexiforme 2 del BSTL y en las divisiones mediales del BST (Abellán y Medina, 2007).

Es interesante resaltar que las similitudes halladas entre la división medial del BST y la porción plexiforme 2 de la división lateral del BST no se restringen a la combinación de los patrones de expresión genéticos previamente descritos, sino que se han observado además ciertos paralelismos en sus características inmunocitoquímicas, tales como una menor concentración de “corticotropin releasing factor” en la porción

plexiforme 2 del BSTL (Richard et al., 2004), la presencia de algunas células inmunopositivas para DARPP-32 en el BSTM (Roberts et al., 2002) y la similar distribución de calbindina en los BSTM y BSTLp2. En este contexto, hemos observado que las regiones caudales de la división plexiforme 2 del BSTL extendidas hacia el área preóptica hipotalámica muestran una mayor densidad de células calbindina positivas y una menor representación de neuropilo marcado que las regiones rostrales de la subdivisión. Este hecho plantea la posibilidad de que la región a la que denominamos porción plexiforme 2 de la división lateral del BST se halle subdividida en una región rostral y otra caudal, pudiendo ser incluida esta última con efectos de nomenclatura y homologías en el complejo medial del BST.

La estructura del “bed nucleus de la stria terminalis” en mamíferos ha sido ampliamente estudiada, hallándose la división lateral subdividida en un total de seis estructuras (porción capsular dorsal, porción capsular central, porción posterior, porción ventral, porción intermedia y porción yuxtacapsular), y la división medial en 5 regiones (porción anterior, porción ventral, porción posterior medial, porción posterior intermedia, porción posterior lateral), habiendo sido destritos además el BST intraamigdalino, y las subdivisiones medial y central del BST supracapsular (Olmos et al., 1985; Paxinos y Watson, 1986; Moga et al., 1989; Alheid et al., 1998; Paxinos y Franklin, 2001). La enorme complejidad descrita en mamíferos unida a la reciente reinterpretación del BST en aves (Aste et al., 1998; Reiner et al., 2004) dificultan en gran medida la comparación entre ambos grupos, siendo posible en la actualidad postular acerca de la homología de las grandes divisiones (lateral y medial) del BST (como se describió en apartados anteriores). La región caudal de la porción plexiforme 2 de la división lateral del BST descrita originalmente en el presente trabajo ocupa sin embargo una posición topográficamente similar al BSTM posteromedial de mamíferos, adyacente medialmente al ventrículo lateral y con una extensión hacia el hipotálamo preóptico, hallándose además en contacto directo con diversos subnúcleos del BSTL. Las características inmunocitoquímicas y localización de esta región sugieren una posible homología entre ambas estructuras en aves y mamíferos, la cual deberá ser no obstante validada en base a estudios histogenéticos y hodológicos más profundos.

### **9.- La Inmunorreactividad nNOS, Abundante en la Región Preóptica, está Presente en la División Medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” y Define una Nueva Estructura a la que Denominamos *Corredor nNOS***

Numerosos trabajos han identificado a la sintasa del óxido nítrico como un marcador característico del sistema límbico de mamíferos, con una importante representación en la división medial del “bed nucleus de la stria terminalis”. Así, se ha descrito una gran abundancia de NADPH-diaforasa (enzima cuya actividad se asocia al metabolismo del óxido nítrico) y nNOS en el BSTM en la rata (Bredt et al., 1990; Vincent y Kimura, 1992; Rodrigo et al., 1994), el hámster (Hadeishi et al., 1996) y el mono (Brady et al., 1992; Satoh et al., 1995). Estudios realizados en el telencéfalo de aves han revelado la existencia de una población de neuronas inmunopositivas para NADPH-diaforasa en la región posterior de la división medial del BST de codorniz (Panzica et al., 1994). De acuerdo con estos resultados, hemos observado que las porciones 1 y 2 de la división medial del BST en pollo muestran desde E12 un marcaje nNOS representado por una población de células de tinción somática moderada inmersas en un escaso neuropilo positivo. La densidad neuronal de esta población alcanza una cierta estabilidad a partir de E14, siendo observable a partir de este momento una distribución celular abundante en la porción dorsolateral, moderada en la porción ventromedial y algunas neuronas inmunopositivas en la banda de tejido que constituye una conexión anatómica entre ambas estructuras. La inmunorreactividad nNOS en las regiones preópticas circundantes es como norma general reducida, con la excepción de un corredor de células y neuropilo intensamente marcado adyacente ventrolateralmente al BSTM, descrito originalmente en el presente estudio, al que hemos denominado *Corredor NOS*. Dicho corredor es observable desde los estadios iniciales del desarrollo (E8-E10), alcanzando a partir de los 12 días de incubación unas características anatómicas y citoarquitectónicas estables durante el resto del desarrollo y en el individuo adulto. Al igual que la región del BST, el *Corredor NOS* muestra una porción telencefálica de reducido tamaño, la cual se localiza ventral al tracto occipitomesencefálico y es adyacente medialmente al arcopalio medial. Esta región muestra una población de neuronas multipolares de fuerte inmunotinción para nNOS, representada fundamentalmente por un intenso marcaje en citoplasma y prolongaciones celulares, pero con total ausencia de señal en la zona nuclear. Esta porción telencefálica se extiende hacia la región preóptica hipotalámica dando lugar a una banda de 4 a 6 células de espesor, de características idénticas a las previamente descritas, que se distribuyen formando un arco que rodea parcialmente al fascículo prosencefálico lateral hasta el nivel del núcleo paraventricular. Ambas porciones muestran una continuidad anatómica en la zona de transición telencéfalo-hipotálamo, habiéndose observado sin

embargo una reducción en el número células que la componen, así como discontinuidades originadas por el tracto occipitomesencefálico en determinados niveles. En su conjunto, la población neuronal característica del corredor se halla inmersa en un abundante neuropilo intensamente marcado, rico en terminales y fibras varicosas, las cuales discurren en su mayoría perpendiculares a la extensión longitudinal de la estructura.

Si bien no disponemos de datos suficientes como para establecer una estructura homóloga al *Corredor NOS* en mamíferos, nuestros resultados apuntan a que esta región debe ser considerada como amigdalina, en base a su topografía y características inmunocitoquímicas. Así, el *Corredor NOS* se localiza en el polo caudal del telencéfalo de aves, parcialmente rodeado por estructuras propias de la amígdala y amígdala extendida, tales como el arcopallio, el área subpallial amigdalina y el BST, mostrando además una relación con el tracto occipitomesencefálico similar a la existente entre el complejo amigdalino de mamíferos con los tractos amigdalofugales y stria terminalis (Zeier y Karten, 1971; Alheid et al., 1995; Paxinos y Watson, 1986; Swanson et al., 1998; Pikkarainen et al., 1999). La inmunorreactividad para nNOS en el telencéfalo de mamíferos muestra en general una densidad neuronal muy superior en las regiones amigdalinas que en la corteza y los ganglios basales, habiendo sido descrita una abundante distribución de células marcadas en divisiones pertenecientes a la amígdala corticomédial, basolateral, central y medial, además de una fuerte señal en fibras procedentes de las regiones posteriores del BST y de los núcleos mediales hacia la stria terminalis y el tracto amigdalofugal ventral (McDonald et al., 1992; Satoh et al., 1995; Hadeishi et al., 1996). En este contexto, hemos observado que la densidad y citoarquitectura de las neuronas marcadas en el *Corredor nNOS* de aves es similar a la presente en una estrecha banda de tejido incluida en el complejo posteromedial de la amígdala de mamíferos, no habiendo sido descrita en este caso su extensión hipotalámica (Guirado et al., en revisión).

## 10.- Las Porciones Preópticas Hipotalámicas de la División Medial del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” y del Corredor nNOS Quedan Incluidas en Bandas Paralelas de Diferentes Características Histogenéticas

Las comisuras telencefálicas, el área preóptica, el área entopeduncular y la eminentia thalami constituyen las estructuras no evaginadas vinculadas al telencéfalo, constituyendo en su conjunto el denominado telencéfalo impar. En la región del tallo telencefálico los diferentes dominios histogenéticos presentes en la vesícula telencefálica se continúan, a través de estas estructuras, con la región hipotalámica, no existiendo de esta forma un límite definido entre el telencéfalo y el resto del prosencéfalo. (Bulfone et al., 1993; Puelles et al., 2000, 2001; Cobos et al., 2001; Puelles y Rubenstein, 2003). Nuestras observaciones revelan que tanto la porción caudal de la división medial del BST como el *Corredor nNOS* definido en los apartados anteriores se extienden hacia la región preóptica hipotalámica y el núcleo paraventricular respectivamente, quedando sus territorios incluidos en dos bandas paralelas de diferentes características histogenéticas. Así, la expresión de *Dlx5*, presente en las eminencias gangliónicas y en el conjunto del manto subpial se extiende a través del área entopeduncular hacia la región preóptica (Puelles et al., 2000), originando una banda de expresión continua que alcanza niveles profundos hipotalámicos. Esta banda, que coexpresa los factores de transcripción *Nkx2.1* y *Shh*, incluye en su región dorsolateral el territorio de moderada expresión nNOS que delimita a la porción caudal de las subdivisiones 1 y 2 del BSTM. La expresión del gen *Tbr1* por su parte es muy abundante en el conjunto de las regiones subventriculares y del manto pial, habiendo sido descrita una conexión dorsal entre el pialo medial y la *eminentia thalami*. Si bien el manto de la *eminentia thalami* limita rostroventralmente con el fascículo prosencefálico lateral, se ha descrito que algunas células *Tbr1* positivas originadas en esta región migran lateralmente, rodeando parcialmente al fascículo prosencefálico lateral y pudiendo alcanzar los territorios caudales del telencéfalo (Puelles et al., 2000; Marín y Rubenstein, 2003.). Este hecho dificulta en cierta medida la definición del origen histogenético del *Corredor nNOS*, ya que sus dominios, claramente identificables por la característica inmunorreactividad que este marcador presenta a lo largo de toda su extensión, quedan incluidos en una región susceptible de recibir aportaciones de células *Tbr1* positivas tanto del telencéfalo pial como de la *eminentia thalami*. Sin embargo, a la luz de nuestros resultados, y aunque no sea descartable un origen mixto de esta estructura, proponemos que el *Corredor nNOS* posee una naturaleza eminentemente pial. Así, en primer lugar, hemos observado una intensa señal para el factor de transcripción *Pax6* en la región de la *eminentia thalami* (previamente descrita por Puelles et al., 2000), claramente reconocible en zonas circundantes al fascículo

prosencefálico lateral en niveles caudales, pero totalmente ausente en la porción hipotalámica que incluye al *Corredor nNOS*. En segundo lugar, hemos observado una continuidad de expresión de GABA y proteínas ligadoras de calcio entre las estructuras telencefálicas paliales y el *Corredor nNOS*. De esta forma, las porciones hipotalámica y telencefálica del corredor muestran en su conjunto una elevada inmunoreactividad para calbindina, caracterizada por una población de neuronas fuertemente marcadas en núcleo y citoplasma perinuclear inmersas en un neuropilo de intensidad moderada. Esta distribución es muy similar a la observada en la mayor parte del dominio palial, incluyendo a estructuras de carácter amigdalino tales como la amígdala hipocampal, el núcleo taeniae y el arcopallio (Cobos et al., 2001; Tuorto et al., 2003; Suárez et al., 2006). La distribución GABAérgica presente en el telencéfalo de aves muestra importantes diferencias entre los dominios palial y subpalial, habiéndose observado una mayor densidad neuronal y un superior nivel de intensidad de la señal en esta última región. De forma similar, la expresión de calretinina en el conjunto del palio es escasa, habiendo sido descrita sin embargo una distribución muy abundante en la región subpalial (Rogers, 1987; Kemppainen y Pitkänen, 2000; Suárez et al., 2006). El *Corredor nNOS* muestra a lo largo de toda su extensión una población moderadamente abundante de neuronas GABAérgicas, así como alguna célula calretinina positiva con carácter aislado, características ambas típicamente paliales. De esta forma, los patrones de distribución combinados para *Tbr1*, *Pax6*, GABA, calbindina y calretinina sugieren que la región palial envuelve al subpalio en los niveles caudales del telencéfalo (Puelles et al., 2000; Marín y Rubenstein, 2003; Puelles y Rubenstein, 2003), extendiéndose de forma continua una banda de tejido palial hacia el territorio paraventricular a través del telencéfalo impar.

## 11.- El Área Subpalial Amigdalina se Halla Estrechamente Relacionada con el Sistema Estriatopalidal

El área amigdalina subpalial ha sido recientemente descrita por el foro para la nomenclatura del cerebro de aves como una región ventral al globo pálido a nivel del tracto occipitomesencefálico, la cual, en base a criterios neuroquímicos y hodológicos, puede ser considerada homóloga a la porción sublenticular de la amígdala extendida central (Reiner et al., 2004; Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2005) (**nota:** El término sublenticular se refiere a la región ubicada bajo el conjunto estriado/globo pálido, denominado núcleo lenticular en primates debido a su aspecto en forma de lenteja). Esta región fue considerada originalmente como parte del estriado en el atlas de Karten y Hodos (1967), identificada posteriormente como integrante del arcopallio medial por Zeier y Karten (1971) e integrada en el conjunto del arcopallio extendido (posible homólogo a la amígdala extendida de mamíferos) por Roberts y sus colaboradores (2002).

En su conjunto la amígdala extendida ha sido relacionada anatómica y neuroquímicamente con el sistema estriatopalidal en base fundamentalmente a los patrones de distribución de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (glutamic acid decarboxylase - GAD), implicada en la síntesis del neurotransmisor inhibitor GABA. Así, los marcadores GABAérgicos revelan en mamíferos la existencia de una banda intensamente marcada que se extiende de forma continua a través del caudoputamen, la amígdala centromedial y el “bed nucleus de la stria terminalis”, con una densidad neuronal e intensidad de marcaje superior a la de las áreas adyacentes (Karten y Dubbeldam, 1973; Reiner et al., 1982; Veenman y Reiner, 1994; Medina y Reiner, 1997; Swanson y Petrovich, 1998; McDonald., 2003). Estudios recientes han demostrado la existencia de una continuidad similar de GAD65 en el telencéfalo de aves, establecida entre el sistema estriatopalidal, el área subpalial amigdalina y el conjunto del BST (Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2005). Los resultados obtenidos en el presente estudio en base a los patrones de distribución de GABA, *Dlx5*, *Pax6*, y *Nkx2.1* corroboran la continuidad previamente descrita, complementándola además en ciertos aspectos. Así, hemos observado una homogénea distribución de células GABAérgicas en el conjunto del subpalio (Domenici et al., 1988; Müller, 1988; Granda y Crossland, 1989; Shimizu y Karten, 1990; Güntürkün y Karten, 1991; Csillag, 1991; Krebs et al., 1991; Veenman y Reiner, 1994), las cuales se distribuyen de forma continua en estriado, globo pálido, área amigdalina subpalial y BST desde E12. Esta población ve incrementada su densidad neuronal en los siguientes estadios del desarrollo, alcanzando una configuración estable a partir de E16. La similitud de

expresión mostrada por el conjunto dificulta en gran medida la definición de los límites precisos entre las estructuras subpaliales que lo componen, pero permite establecer una clara diferenciación entre el área amigdalina subpalial y el arcopallio medial con el que contacta lateralmente, caracterizado por mostrar una distribución GABAérgica laxa típicamente palial. De forma similar, la expresión del gen *Dlx5*, implicada en la adquisición del fenotipo GABAérgico (Marín y Rubenstein, 2001; Stümer et al., 2002), es muy abundante a lo largo de todo el dominio subpalial (Reiner et al., 1998; Smith-Fernandez et al., 1998; Puelles et al., 2000), apreciándose sin embargo en este caso una intensidad de marcaje ligeramente superior en el área subpalial amigdalina con respecto a las áreas subpaliales adyacentes, tales como el estriado y el globo pálido, pero inferior no obstante a la mostrada por el BSTL. Esta diferencia es sutil pero suficiente para enmarcar los límites de la región dentro del contexto subpalial. Los patrones de expresión combinados de los genes *Pax6* y *Nkx2.1* sugieren que el área amigdalina subpalial posee una naturaleza eminentemente estriatal. De esta forma, hemos observado una intensa señal *Pax6* en el estriado medial, que se continúa con un marcaje moderado en su conjunto en el estriado lateral (Smith-Fernández et al., 1998; Puelles et al., 2000) y el área amigdalina subpalial. No hemos hallado por el contrario señal alguna para este marcador en el globo pálido y el BST, regiones ambas fuertemente positivas para el marcador palidal *Nkx2.1* (Kimura et al., 1996; Pera y Kessel, 1998; Sussel et al., 1999; Marin et al., 2000; Puelles et al., 2001; Redies y Puelles, 2001). Los patrones de distribución observados en el presente trabajo para GABA, *Dlx5* y *Pax6* apoyan pues la existencia de una continuidad histogenética entre el estriado y el área amigdalina subpalial, mientras que el marcaje GABAérgico, *Dlx5*, *Nkx2.1* sugiere una continuidad palidal entre el globo pálido y el BST.



## 12.- El Área Subpalial Amigdalina y la División Lateral del “Bed Nucleus de la Stria Terminalis” como Estructuras Homólogas a la Amígdala Central Extendida de Mamíferos

El término amígdala extendida fue acuñado por Johnston (1923), como la continuidad anatómica existente entre los núcleos centrales y mediales de la amígdala, el “bed nucleus de la stria terminalis” y el núcleo accumbens en el telencéfalo de mamíferos. Numerosos estudios posteriores, basados en técnicas de tipo Golgi, análisis histoquímicos y trazado de conexiones corroboraron la existencia de esta macroestructura, proponiendo además su subdivisión en dos áreas principales anatómica y funcionalmente bien diferenciadas, que asocian por una parte al núcleo central de la amígdala y a la división lateral del BST y por otra al núcleo medial de la amígdala y a la división medial del BST respectivamente (Alheid y Heimer, 1988, 1995; Swanson y Petrovich, 1998; De Olmos y Heimer, 1999; Swanson, 2000; McDonald, 1983, 2003).

El núcleo central de la amígdala extendida de mamíferos puede ser subdividido en dos grandes regiones, una lateral (CL) y otra medial (CM). De la misma forma, el BSTL se halla estructurado en una gran división dorsolateral (BSTdl) y en una división posterior (BSTp) (Alheid et al., 1995; McDonald, 2003). Se ha descrito que CL y CM comparten una serie de características inmunocitoquímicas con los BSTdl y BSTp respectivamente. Así, se han hallado grandes concentraciones de neuronas inmunorreactivas para “corticotropin releasing factor”, neurotensina y encefalina en el conjunto CL/BSTdl, pero no en el CM/BSTp. El marcaje para tiroxina hidroxilasa, característico de la innervación dopaminérgica es muy intenso en CL/BSTdl, mostrando una distribución moderada en CM/BSTp (Alheid et al., 1995).

Nuestros resultados revelan que el área amigdalina subpalial de aves se halla compartimentalizada en dos regiones de diferentes características inmunocitoquímicas, a las que hemos denominado ASp lateral y ASp medial siguiendo un criterio meramente topográfico. Ambas divisiones muestran desde E12 poblaciones de neuronas positivas para nNOS, GABA y calretinina que alcanzan una configuración estable a partir de E16. La población de neuronas inmunorreactivas para nNOS, caracterizadas por mostrar una intensa marca en citoplasma y prolongaciones, pero no en el núcleo, muestra durante los primeros estadios del desarrollo una mayor distribución celular en la división lateral del ASp, patrón que resulta complementario al observado en el caso del marcaje GABAérgico, cuya población neuronal presenta una distribución algo inferior en esta última división durante todo el desarrollo. La inmunoreactividad para calretinina, muy abundante a lo largo de toda la extensión del ASp, presenta por su parte una densidad

celular ligeramente superior en la porción lateral del núcleo. Se ha observado además que la porción lateral del ASp muestra desde E14 un elevado número de neuronas fuertemente inmunorreactivas para la calbindina, inmersas en un abundante neuropilo moderadamente inmunoteñido. Esta distribución contrasta con la escasa densidad neuronal observada en la división medial del núcleo, consistente en algunas células marcadas de carácter aislado. Los patrones de expresión combinados de estos marcadores permiten pues definir los límites precisos del área subpalial amigdalina y sus subdivisiones en base a la comparación con la distribución presente en las estructuras adyacentes. De esta forma, se ha observado que la porción rostral del ASpM puede ser reconocida desde niveles telencefálicos rostrales, ocupando una posición lateral al BSTL, medial al fascículo prosencefálico lateral y ventral al globo pálido. La extensión rostral de la porción lateral del ASp es inferior a la de la división medial, coexistiendo ambas estructuras desde el nivel de la comisura anterior hasta posiciones caudales del telencéfalo. El ASpL ocupa una posición ventral al conjunto estriado/globo pálido, lateral al arcopalio medial y dorsal al *Corredor nNOS*, alcanzando la superficie del telencéfalo en una estrecha franja localizada entre la comisura anterior y el tracto occipitomesencefálico. Las diferencias de expresión existentes entre el área subpalial amigdalina y las estructuras adyacentes han sido descritas de forma detallada en el apartado de *Resultados* de la presente tesis doctoral.

Los primeros datos acerca de la posible identidad de la amígdala central extendida en aves proceden de las conexiones descendentes de los hemisferios cerebrales. Así, se ha demostrado la existencia de proyecciones desde las regiones del telencéfalo basal correspondientes a la división lateral del BST y al área amigdalina subpalial hacia el hipotálamo lateral, la sustancia negra, la región parabraquial, el complejo vago dorsal y el núcleo del tracto solitario (Berk, 1985, 1987), estableciéndose de esta forma circuitos muy similares a los presentes en la amígdala central extendida de mamíferos. La conectividad existente entre el BSTL/ASp y la región parabraquial ha sido estudiada con detalle por Wild y colaboradores (1990), quienes demostraron además en palomas la existencia de proyecciones ascendentes desde esta última región hasta el BSTL/ASp. La reciprocidad en cuanto a la conectividad entre estas estructuras es característica de la amígdala central extendida de mamíferos. Se ha descrito además que, al igual que la amígdala central extendida de mamíferos, tanto el BSTL como la ASp reciben importantes proyecciones desde el tálamo, incluyendo la región periovoidal (Durand et al., 1992) y el tálamo posterior intralaminar (Wild, 1987), así como del nidopalio caudolateral, el arcopalio dorsal y parte del arcopalio ventral, consideradas por algunos autores como estructuras homólogas a la amígdala basolateral de mamíferos (Veeman et al., 1997; Kroner y Gunturkun, 1999).

La existencia de dos regiones bien diferenciadas en el área amigdalina subpalial de aves complementa a la actual interpretación de homología del complejo de la amígdala extendida central de mamíferos (Reiner et al., 2004; Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; Martínez-García et al., 2006). Así, se ha descrito que el conjunto BSTL/ASp muestra una importante población de células “corticotropin releasing factor” positivas (Richard et al., 2004), de neuronas marcadas para la neurotensina (Atoji et al., 1996; Reiner et al., 2004), y para la encefalina (Roberts et al., 2002), así como una intensa invasión de fibras positivas para la tiroxina hidroxilasa (Balthazart et al., 1998). La distribución de estos marcadores es sin embargo desigual a lo largo del complejo, mostrando patrones similares tanto en aves como en mamíferos. Así, las células “corticotropin releasing factor”, neurotensina y encefalina positivas son especialmente abundantes en la división lateral del BST y en el área subpalial amigdalina medial, siendo muy escasas en la división lateral de esta estructura. De forma similar, la presencia de fibras tiroxina hidroxilasa positivas, abundantes a lo largo de todo el complejo, muestran una menor distribución en la división lateral del área amigdalina subpalial y en la porción plexiforme 2 de la división lateral del BST. A la luz de estos resultados proponemos la existencia de una posible homología entre la división lateral de la amígdala central extendida de mamíferos y el BSTL/ASpM de aves, así como de la división medial de la amígdala central extendida de mamíferos y el BSTLp2/ASpL de aves.

Aunque los términos anatómicos empleados en la nomenclatura para aves y mamíferos puedan resultar a priori algo confusos en las relaciones propuestas (comparación de divisiones laterales de mamíferos con divisiones mediales de aves y viceversa), las relaciones topográficas que el conjunto de las estructuras muestran en ambos taxones resultan coherentes. Así, la división medial del área amigdalina subpalial es adyacente y topográficamente superficial a la división lateral del BST, mostrando ambas estructuras una extensión rostral superior a la propuesta por el foro para la nomenclatura del telencéfalo de aves (Reiner et al., 2004; Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2005) y similar a la asociación existente entre la división lateral de la amígdala central extendida de mamíferos (Alheid et al., 1995; Swanson y Petrovich, 1998; Kempainen et al., 2000; Paxinos y Franklin, 2001; McDonald, 2003). La división lateral del área subpalial amigdalina, perceptible desde el nivel de la comisura anterior, muestra una continuidad anatómica con el BSTLp2 observable, al igual que en mamíferos, únicamente en los niveles telencefálicos caudales. La inmunorreactividad para calbindina, escasa en BSTLmc, BSTLp1 y ASpM y muy abundante en la porción caudal del BSTLp2 y en el conjunto del ASpL constituye una útil herramienta para el establecimiento preciso de los límites entre ambos complejos.

### 13.- El Núcleo Taeniae de la Amígdala y la Amígdala Hipocampal Constituyen dos Estructuras bien Diferenciadas con Identidad Propia

El núcleo taeniae de la amígdala constituye una estructura de aspecto ovalado y células densamente empaquetadas localizada en el polo caudal del telencéfalo, parcialmente rodeada por el arcopalio medial y situada, a lo largo de toda su extensión, en una posición subventricular. La definición de esta estructura tuvo su origen a principios del siglo XX, y ha sido objeto de numerosas reinterpretaciones desde su descripción original hasta nuestros días. De esta forma, la localización eminentemente caudal de esta estructura, propuesta por autores clásicos (Edinger et al., 1903; Huber y Crosby, 1929; Ariëns Kappers, 1936) fue redefinida por Karten y Hodos (1967) en su atlas de paloma, proponiendo una extensión rostral hasta posiciones próximas a la comisura anterior. Los trabajos contemporáneos han respetado en su mayoría la topografía propuesta por estos últimos autores (Kuhlenbeck, 1977; Kuenzel y Masson, 1988; Nieuwenhuys, 1998; Reiner et al., 2004), habiendo sido sugerida además una naturaleza amigdalina para esta región en base a criterios neuroquímicos, hodológicos y funcionales (Balthazart et al., 1992, 1998; Cheng et al., 1999; Foidart et al., 1999; Lanuza et al., 2000; Cobos et al., 2001, Absil et al., 2002; Roberts et al., 2002; Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2005).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que esta amplia región rostrocaudal incluye a dos estructuras bien diferenciadas y dotadas de identidad propia, como son el núcleo taeniae de la amígdala, coincidente topográficamente con la descripción clásica del núcleo taeniae, y la amígdala hipocampal, rostralmente adyacente al anterior y localizada ventral al tracto occipitomesencefálico. Las similitudes anatómicas presentes en estas estructuras, ambas de aspecto esférico y tamaño similar, constituidas por poblaciones celulares densamente empaquetadas, rodeadas en su conjunto por el arcopalio medial y continuas a lo largo del eje rostrocaudal en secciones coronales, así como la similitud en los patrones de expresión de un gran número de marcadores neuroquímicos, entre los que se incluyen el GAD65 (Reiner et al., 2004, 2005; Yamamoto et al., 2005; Sun et al., 2005), COUP-TF II y LAMP (Yamamoto et al., 2005), aromatasa (Balthazart et al., 1998, 2002), y receptores de estrógenos (Bernald et al., 1999; Foidart et al. 1999; Camacho-Arrollo et al., 2003; Halldin et al., 2005) explican el tratamiento conjunto que ambas estructuras han recibido en los últimos tiempos. La inmunorreactividad para GABA y proteínas ligadoras de calcio en el núcleo taeniae de la amígdala y en la amígdala hipocampal muestran sin embargo patrones de expresión significativamente diferentes. Así, se ha observado una distribución de neuronas GABAérgicas de intenso marcaje somático,

claramente reconocible desde los 12 días de incubación y de concentración creciente durante los siguientes estadios del desarrollo hasta E16, momento en el que se alcanza la estabilidad. La abundancia relativa de estas células, aunque similar en ambas regiones, es ligeramente superior en los dominios de la amígdala hipocampal a lo largo de toda su extensión. Las regiones paliales caudales del telencéfalo, entre las que se incluyen el arcopalio, la amígdala hipocampal y el núcleo taeniae muestran en su conjunto una elevada inmunorreactividad para la calbindina, habiendo sido observadas sin embargo ciertas diferencias que permiten el establecimiento preciso de los límites entre estas estructuras. Así, la amígdala hipocampal muestra desde E12 un intenso marcaje para la calbindina, caracterizado por una población de células de fuerte inmunotinción somática inmersas en un neuropilo poco abundante. Esta distribución es muy superior a la observada en el adyacente núcleo taeniae de la amígdala, constituida en este caso por un menor número de neuronas marcadas y un escaso neuropilo positivo observables ambos desde E14. La utilidad que este marcador posee en la definición de los límites entre ambas estructuras es especialmente evidente en las secciones sagitales laterales del telencéfalo. En este tipo de cortes es posible apreciar cómo el núcleo taeniae de la amígdala, moderadamente inmunorreactivo para la calbindina, se localiza en una posición dorsocaudal con respecto a la amígdala hipocampal, fuertemente inmunoteñida para este marcador. Pese a su proximidad, ambas estructuras se hallan separadas por una delgada banda de tejido perteneciente al arcopalio medial, claramente reconocible por mostrar un gran número de neuronas calbindina positivas inmersas en un abundante neuropilo fuertemente marcado. Las diferencias de expresión entre estas estructuras, muy evidentes durante el desarrollo intermedio y tardío, se minimizan tras la eclosión, siendo sutiles en los individuos adultos. Por otra parte, el núcleo taeniae de la amígdala muestra algunas células con inmunorreactividad para la calretinina a partir de E16. Esta población experimenta un ligero aumento a lo largo del desarrollo, habiendo sido observado un incremento cuantitativamente significativo tras la eclosión. Así, en las etapas adultas la inmunorreactividad para la calretinina en el núcleo taeniae de la amígdala se caracteriza por una población neuronal moderadamente abundante, inmersa en un neuropilo débilmente marcado, que contrasta con la total carencia de marcaje presente en la amígdala hipocampal. Por último, si bien se ha observado una total ausencia de inmunorreactividad para la parvalbúmina durante los estadios embrionarios del desarrollo, los individuos adultos muestran un gran número de haces de fibras positivas que discurren a lo largo de toda la extensión de la amígdala hipocampal. Estos paquetes de fibras son también apreciables en los niveles telencefálicos caudales, siendo muy abundantes en las regiones circundantes al núcleo taeniae de la amígdala, tales como el arcopalio medial o el núcleo subventricular, pero mostrando una escasa representación en los dominios del taeniae.

#### 14.- La Amígdala Hipocampal y el Núcleo Taeniae de la Amígdala como Derivados de los Palios Medial y Ventral

Hemos observado la presencia a lo largo de todos los estadios analizados un intenso marcaje *Tbr1* en el telencéfalo caudal, incluyendo en su conjunto a las estructuras arcopaliales y al núcleo taeniae. Este marcaje se continua en los niveles rostrales adyacentes con la región de la amígdala hipocampal, la cual se localiza justo bajo el límite palio/subpalio definido por la señal *Dlx5* y *Pax6* (Puelles et al., 2000; Redies y Puelles, 2001; Marín y Rubenstein, 2002., Puelles y Rubenstein, 2003; Medina et al., 2004). Aunque muy próxima al citado límite, esta estructura no contacta con el mismo en ningún punto, hallándose anatómicamente separada de la estriatal área subpalial amigdalina y del *Corredor nNOS* por una delgada banda de tejido palial perteneciente al arcopalio medial. Si bien el intenso marcaje *Tbr1* en el conjunto de la amígdala hipocampal y el núcleo taeniae de la amígdala sugiere un origen palial para ambas estructuras, la topología de ambas regiones, muy próximas al área proliferativa de la *eminencia thalami* en los estadios iniciales del desarrollo, plantean la posibilidad de que parte de la porción lateralmente extendida derivada de la *eminencia thalami*, también fuertemente positiva para *Tbr1*, contribuya a la formación de estas estructuras a través de la región del tallo telencefálico (Puelles et al., 2000).

Diversos autores han propuesto que el núcleo taeniae de la amígdala, incluyendo la región a la que hemos denominado amígdala hipocampal, posee al menos en parte una naturaleza subpalial (Reiner et al., 2004, 2005; Yamamoto et al., 2005; Sun et al., 2005). Dicha afirmación se apoya en la intensa señal que el conjunto de esta región muestra para la descarboxilasa del ácido glutámico 65 (GAD65), molécula implicada en la adquisición del fenotipo GABAérgico y de distribución similar al de los genes de la familia *Dlx*, característicos en ambos casos del telencéfalo subpalial (Reiner et al., 1998; Swanson y Petrovich, 1998; Smith-Fernandez et al., 1998; Puelles et al., 2000; Brox et al., 2003; 2004). Nuestros resultados muestran a partir de E12 la presencia de un gran número de células con inmunorreactividad para el GABA en los dominios de la amígdala hipocampal y del núcleo taeniae de la amígdala, no habiéndose observado sin embargo marca alguna para el gen *Dlx5* en ningún estadio del desarrollo. Este hecho sugiere que las neuronas GABAérgicas originadas en el subpalio alcanzaron su posición final en estas regiones *Tbr1* positivas mediante fenómenos de migración tangencial procedentes seguramente, dada la topografía de esta región, de la zona de proliferación del área entopeduncular (Cobos et al., 2001a, 2001b; Marín y Rubenstein., 2001; Marín et al., 2003).

La aparente contradicción entre nuestros resultados y los previamente descritos por la bibliografía puede ser debida a la diferencia de sensibilidad de las técnicas empleadas, muy superior en los trabajos de detección para el GAD65 (sondas radioactivas marcadas con  $^{35}\text{S}$ ). De esta forma, parece lógico pensar que tanto la amígdala hipocampal como el núcleo taeniae de la amígdala poseen un origen histogenético mixto, que incluye un componente minoritario subpalial GAD65 positivo (no presente en el adyacente arcopalio) y un componente mayoritario *Tbr1* positivo, de naturaleza palial.

La topología de la amígdala hipocampal y del núcleo taeniae de la amígdala sugiere que estas estructuras constituyen derivados de palio medial y palio ventral respectivamente. Los estudios Puelles y colaboradores (1999, 2000, 2003) sugieren que el conjunto del palio se halla compartimentalizado en cuatro dominios histogenéticos claramente diferenciados, como son el palio medial (integrado por los complejos hipocampales y parahipocampales), el palio dorsal (que incluye al Wulst y otras regiones corticales relacionadas), el palio lateral (formado por el mesopalio, regiones corticales olfatorias caudales y parte del arcopalio) y el palio ventral (compuesto por el nidopalio, el bulbo olfatorio, el núcleo olfatorio anterior y las regiones corticales olfatorias rostrales, así como parte del arcopalio). Si bien todas estas áreas muestran un intenso marcaje para el factor de transcripción *Tbr1*, la expresión del gen *Emx1* es característica de los palios medial, dorsal y lateral, no apreciándose marcaje ni en la región de palio ventral ni en la *eminencia thalami*. Las últimas revisiones realizadas sobre este modelo (Puelles y Rubenstein, 2003) proponen la existencia de una convergencia de los palios medial y ventral en los niveles telencefálicos caudobasales, originada como consecuencia de la extensión del palio medial a través de la región del septum. La extrapolación de los resultados obtenidos en el presente estudio al modelo propuesto por Puelles y Rubenstein sugieren que las regiones del hipocampo y de la amígdala hipocampal constituyen un continuo de expresión *Tbr1* y *Emx1*, quedando así esta última estructura incluida dentro del dominio de palio medial. De forma similar, la topología y ausencia de expresión para *Emx1* del conjunto formado por el arcopalio medial y el núcleo taeniae de la amígdala definen a ambas estructuras como derivados de palio ventral. Esta interpretación implica por lo tanto que el contacto establecido entre los dominios medial y ventral del palio a nivel del telencéfalo basal tiene lugar exactamente en la zona límite entre la amígdala hipocampal y el conjunto formado por el arcopalio medial y núcleo taeniae de la amígdala, tal y como fueron definidos en el capítulo anterior (Fig. 38).

## 15.- La Amígdala Hipocampal como Estructura Homóloga al Área de Transición Amígdalo-Hipocampal en Mamíferos

El área de transición amígdalo-hipocampal de mamíferos pertenece al complejo nuclear corticomédial localizado en el polo caudal ventromedial del cuerpo amigdalino, inmediatamente adyacente a la amígdala medial. Esta región, claramente diferenciable de las áreas adyacentes debido a su elevada densidad celular, se halla compartimentalizada en dos regiones principales, una anterolateral (profunda) y otra posteromedial (superficial), mostrando esta última un mayor grado de empaquetamiento neuronal (Krettek, 1978., Carlsen et al., 1988; Alheid et al., 1995). Los estudios en el telencéfalo de aves nos han llevado a proponer como homóloga a esta estructura a un núcleo de gran tamaño y aspecto esférico, localizado en la base del telencéfalo medial en los niveles comprendidos entre la comisura anterior y el tracto occipitomesencefálico, constituido por una población neuronal de elevada densidad y con un grado de empaquetamiento celular muy superior al del adyacente arcopalio medial. Las técnicas de tinción simple de tipo Nissl revelan que la porción más superficial de esta estructura muestra a niveles caudales un nivel de compactación neuronal superior al presente en el resto del núcleo, tal y como sucede en el área de transición amígdalo-hipocampal de mamíferos (Alheid et al., 1995). Esta región, a la que hemos denominado amígdala hipocampal superficial, se caracteriza por presentar una inmunorreactividad para GABA y calbindina superior a la del resto del complejo, tanto en número de neuronas marcadas como en densidad de neuropilo inmunopositivo. De forma similar, los haces de fibras inmunorreactivos para la parvalbúmina presentes en la amígdala hipocampal muestran una mayor densidad en la porción superficial del núcleo.

Como comentamos previamente, se ha observado la existencia de una delgada banda de expresión *Tbr1* que cruza a través de la región más medial del septum y que constituye un nexo de unión anatómica entre la región del hipocampo y la amígdala hipocampal superficial. Esta banda, así como la región del hipocampo, comparten las características inmunocitoquímicas descritas para nuestros marcadores en la región superficial de la amígdala hipocampal, mostrando además un patrón de expresión muy similar para diversos tipos de cadherinas. Las cadherinas constituyen una gran familia de glucoproteínas de membrana que regulan mediante procesos de adhesión celular de carácter homotípico la morfogénesis del telencéfalo de vertebrados, incluyendo eventos tales como la maduración nuclear, la formación de circuitos neurales específicos y la sinaptogénesis (Matsunaga et al., 1988; Bixby y Zhang, 1990; Gänzler y Redies, 1995; Redies et al., 1993, 2001; Redies, 1995, 1997, 2000; Fannon y Colman, 1996; Uchida



et al., 1996; Espeseth et al., 1998; Yoon et al., 2000). La expresión combinada de estas moléculas en el territorio telencefálico suele ser coincidente con regiones relacionadas estructural y/o funcionalmente (Takeichi, 1995; Redies., 1995; Redies et al., 2001; Redies y Puelles, 2001). Así, se ha descrito una intensa expresión de Cad7 en las áreas identificadas en el presente estudio como núcleo taeniae de la amígdala, la amígdala hipocampal y la región del hipocampo, así como en la banda septal que conecta estas últimas estructuras. El marcaje de Cad6b tan solo es observable en el núcleo taeniae de la amígdala, permitiendo su clara delimitación con respecto a la amígdala hipocampal, mientras que el marcaje de Rcad, muy intenso en la región profunda de la amígdala hipocampal, muestra una señal de tenue a moderada en el continuo establecido entre el hipocampo y la porción superficial de la amígdala hipocampal (Redies et al., 2001, 2002; Redies y Puelles, 2001). La distribución diferencial de estas cadherinas refuerza la interpretación de que el núcleo taeniae de la amígdala y la amígdala hipocampal constituyen dos estructuras relacionadas pero independientes, apoyan la compartimentalización de esta última estructura en una región profunda y otra superficial y sugieren que la continuidad entre hipocampo y amígdala hipocampal podría tener un carácter funcional.

El núcleo posterior de la amígdala palial ha sido recientemente definido por el foro para la nomenclatura del cerebro de aves (Reiner et al., 2004). Esta estructura, considerada originalmente como parte del arcopalio ventral (Karten y Hodos, 1967), posee características típicamente amigdalinas (Berk y Hawkin, 1985; Veenman et al., 1995; Davies et al., 1997; Dubbeldam et al., 1997; Lanuza et al., 2000; Roberts et al., 2002), y ha sido propuesta como un posible homólogo al área de transición amígdalo-hipocampal de mamíferos en base a su topografía y características hodológicas (Martínez-García et al., 2006). Así, esta región proyecta hacia el hipotálamo posteromedial, incluyendo los niveles mamilares y premamilares (Zeier y Karten, 1971; Davies et al., 1997; Kroner y Gunturkun, 1999), y recibe aferencias desde el hipotálamo supramamilar y premamilar (Berk y Hawkin, 1985), estableciéndose un circuito similar al presente en mamíferos, en el que existen conexiones recíprocas entre el área de transición amígdalo-hipocampal y los núcleos premamilares. Además, se ha descrito que el núcleo posterior de la amígdala palial de aves, al igual que el área de transición amígdalo-hipocampal de mamíferos, proyecta al hipotálamo preóptico (Absil et al., 2002), y se halla interconectado con el sistema septohipocampal, estableciendo conexiones recíprocas con el área parahipocampal (Casini et al., 1986; Atoji et al., 2002; Atoji y Wild, 2004). Sin embargo, tras una revisión exhaustiva de la bibliografía, hemos podido determinar que la región rostral del núcleo taeniae de la amígdala, redefinida en el presente trabajo como amígdala hipocampal, comparte de forma similar

ciertas características de conectividad con el área de transición amígdalo-hipocampal de mamíferos. De esta forma han sido descritas proyecciones desde la amígdala hipocampal hacia el hipotálamo posteromedial y la región preóptica hipotalámica (Karten y hodos, 1967., Cheng et al., 1987, 1999), así como conexiones recíprocas entre la amígdala hipocampal y las regiones del hipocampo y el área parahipocampal (Casini et al., 1986; Szekely y Krebs, 1996; Cheng et al., 1999). Es interesante resaltar que la conexión entre últimas estructuras tiene lugar a través de la región septal, junto al ventrículo lateral, coincidiendo con la banda de conexión anatómica Tbr1 positiva descrita anteriormente (Cheng et al., 1999).

Las regiones cerebrales implicadas en circuitos reguladores de comportamientos sexuales, tales como el área de transición amígdalo-hipocampal y la amígdala medial de mamíferos se caracterizan por mostrar una abundante expresión de receptores para esteroides sexuales (Simerly et al., 1990; Gibbs, 1996; Mufson et al., 1999; Shughrue et al., 1997, 1998, 2000, 2001; Pérez et al., 2003). Diversos autores han demostrado la existencia de una elevada distribución de receptores de andrógenos (Balthazart et al., 1992; Gahr y Wild, 1997; Bernald et al., 1999), receptores de estrógeno alpha (Bernald et al., 1999; Camacho-Arroyo et al., 2003; Halldin et al., 2005), receptores de estrógeno beta (Bernald et al., 1999; Foidart et al., 1999; Halldin et al., 2005) y aromatasa (una sintetasa de estrógenos) (Balthazart et al., 1998, 2002; Absil et al., 2000) a lo largo de toda la extensión del núcleo taeniae, incluyendo la porción rostral comprendida entre la comisura anterior y el tracto occipitomesencefálico, definida como amígdala hipocampal en el presente trabajo. Por el contrario, la distribución de estos marcadores en el núcleo posterior de la amígdala palial es muy escasa, quedando limitada a algunas células aisladas aromatasa positivas (Metzdorf et al., 1999) y a un marcaje poco abundante para receptores de andrógenos (Balthazart et al., 1992; Gahr y Wild, 1997). Este hecho se considera inconsistente con la hipótesis de homología entre el núcleo posterior de la amígdala palial de aves y el área de transición amígdalo-hipocampal de mamíferos (Martínez-García et al., 2006), mientras que apoyan nuestra propuesta de homología entre esta última estructura y la amígdala hipocampal de aves.

## 16.- El Núcleo Taeniae de la Amígdala como parte de la Amígdala Medial Extendida

El núcleo medial de la amígdala es en mamíferos el principal receptor de las proyecciones procedentes del bulbo olfatorio accesorio, área cortical sensorial primaria implicada en la recepción de la información para las feromonas (Swanson y Petrovich, 1998), constituyendo esta una característica ampliamente utilizada para la comparación de esta región entre los distintos grupos de vertebrados (Bruce y Neary, 1995; Lanuza et al., 1997; Lanuza y Halpern, 1998; Martínez-Marcos et al., 1999; Moreno et al., 2003). La ausencia de sistema vomeronasal en aves repercute directamente en una reducción de las regiones amigdalinas relacionadas con este sistema, ocasionando una profunda reorganización del complejo amigdalino de aves y dificultando de esta forma su comparación con otros grupos (Reiner y Karten, 1985; Striedter, 1997). Sin embargo, la posible homología existente entre el núcleo de la amígdala medial de mamíferos y el núcleo taeniae de la amígdala en aves es un tópico ampliamente aceptado, fundamentado en tres criterios, como son las similitudes hodológicas entre ambas estructuras (con la importante excepción de las aferencias procedentes del bulbo olfatorio accesorio), las alteraciones conductuales tras lesiones en el núcleo taeniae y las características neuroquímicas presentes en esta región.

Así, el núcleo taeniae de la amígdala constituye una importante diana para las proyecciones derivadas del bulbo olfatorio (Reiner y Karten, 1985) similar a las observadas entre el bulbo olfatorio principal y la amígdala medial del mamíferos (Lehman y Winnans, 1982), y contribuye a la división hipotalámica del tracto occipitomesencefálico enviando proyecciones hacia la región preóptica medial, el hipotálamo lateral, el núcleo medial del hipotálamo posterior (considerado homólogo al núcleo ventromedial hipotalámico de mamíferos) y regiones del hipotálamo premamilar (Zeier y Karten, 1971; Thompson et al., 1998; Cheng et al., 1999). Además, se ha descrito que el núcleo taeniae proyecta hacia la región caudal del núcleo accumbens y hacia el conjunto formado por el BSTL y el área subpalial amigdalina, mostrando un patrón muy similar a las conexiones observadas entre las amígdalas extendidas mediales y centrales de mamíferos, así como la existencia de conexiones recíprocas entre el núcleo taeniae de la amígdala y el área parahipocampal, similares a las descritas entre el núcleo medial de la amígdala y la formación hipocampal en mamíferos (Canteras et al., 1995; Cheng et al., 1999).

Las lesiones realizadas en la región del núcleo taeniae de la amígdala tienen como consecuencia una disminución en las respuestas asociadas al miedo (Phillips, 1964; Phillips y Youngren, 1986), una reducción en la capacidad de aprendizaje conductual ante estímulos adversos (Cohen, 1971; Dafters, 1976; Lowndes y Davies, 1994) y alteraciones importantes en el comportamiento afectivo y reproductor, incluyendo la pérdida del apetito sexual y disfunciones en la copulación (Thompson et al., 1998; Absil et al., 2002). Similares efectos implicados en la modulación de comportamientos sociales, tales como respuestas agresivas, afectivas, maternas o sexuales han sido observados en mamíferos con ablación de la amígdala medial (Harris y Sachs, 1975; Masco y Carrer, 1980; Kondo, 1992; Rajendren y Moss, 1993; Kondo y Arai, 1995; Kondo y Yamanouchi, 1995).

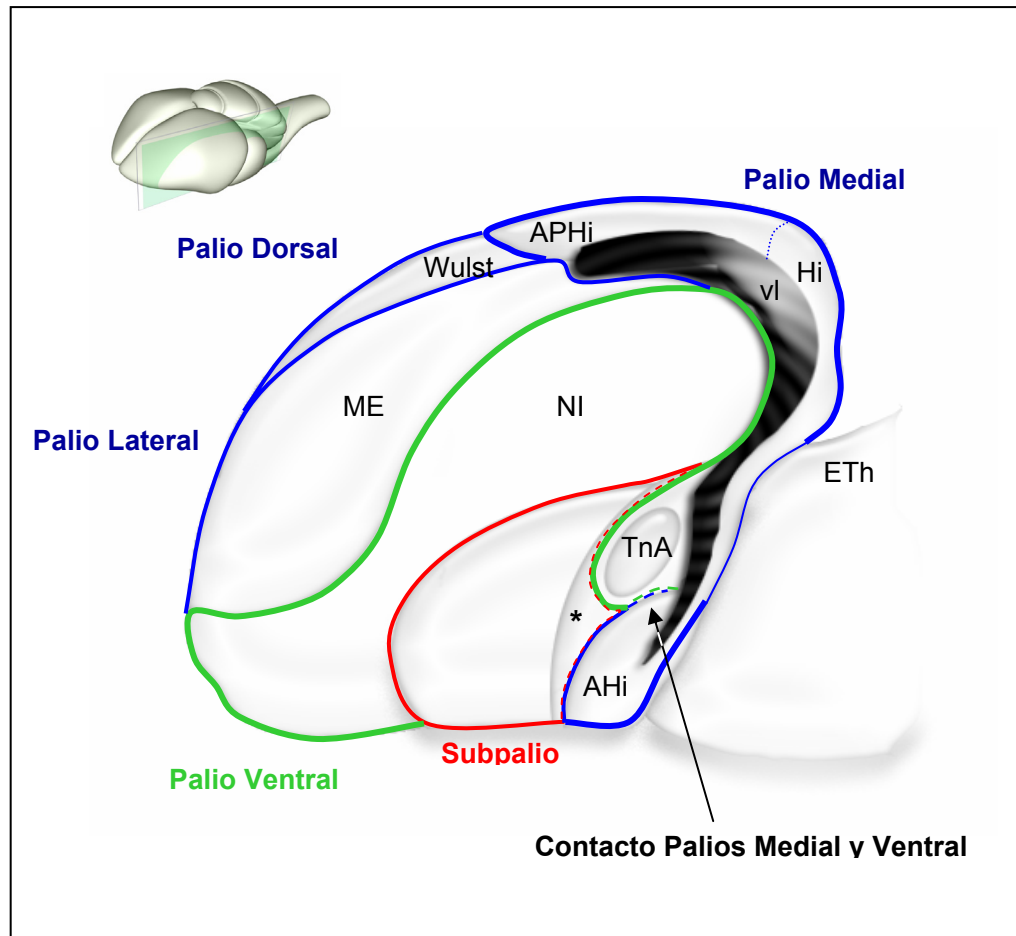
Numerosos estudios han demostrado que los límites del núcleo taeniae de la amígdala pueden ser trazados de forma clara en base a la expresión de receptores de andrógenos, receptores de estrógenos alpha, beta y aromatasa (Watson y Adkins-Regan, 1989; Balthazart et al., 1989, 1992, 1998; Gahr et al., 1993, 1997; Ball et al., 1999; Bernald et al., 1999; Foidart et al., 1999; Absil et al., 2001), los cuales muestran patrones de distribución similares a los observados en la amígdala medial de mamíferos (Word et al., 1992; Kuiper et al., 1998; Shughrue et al., 1997, 2000, 2001; Pérez et al., 2003). La importancia que poseen estas moléculas en la regulación de los comportamientos sexuales en los que se halla implicada la amígdala medial ha sido ampliamente demostrada mediante el implante de esteroides sexuales en esta región, lo cual induce un aumento en la conducta sexual tanto en los machos como en las hembras (Harris y Shachs, 1975; Lehman y Powers, 1980; Masco y Carrer, 1980; Lehman y Winans, 1982; Kondo, 1992; Rajendren y Moss, 1993; Kondo y Arai, 1995; Kondo y Yamanouchi, 1995). Se ha descrito que la distribución de estos receptores sexuales y de la aromatasa es también muy abundante en la división medial del “*bed nucleus de la stria terminalis*” de aves (Halldin et al., 1995; Balthazart et al., 1998; Foidart et al., 1999; Absil et al., 2001), considerada homóloga a la región homónima de mamíferos en base a sus características neuroquímicas (ver apartados anteriores) y su relación con el hipotálamo preóptico y el hipotálamo premamilar (Absil et al., 2002; Berk y Hawkin, 1985). La amígdala medial extendida es considerada, tanto en aves como en mamíferos, como un continuo anatómico compuesto por el núcleo taeniae y la amígdala medial respectivamente y su extensión rostral con las regiones del “*bed nucleus de la stria terminalis*” medial (Alheid y Heimer, 1988, 1995; Pitkänen y Amaral, 1994; Swanson y Petrovich, 1998; De Olmos y Heimer, 1999; Shammah-Lagnado et al., 2000; Swanson, 2000; McDonald, 1983, 2003). Este complejo comparte en su conjunto las características funcionales, hodológicas y neuroquímicas descritas hasta el momento, y

posee una distribución generalizada para GABA, calbindina, calretinina y nNOS muy similares.


Los trabajos de Roberts y colaboradores en el telencéfalo de loros (2002) sugieren la existencia de un complejo homólogo al conjunto de la amígdala extendida de mamíferos, denominado arcopallio extendido, en base fundamentalmente al continuo de expresión de encefalina presente en todo el complejo. Esta amplia estructura incluye las regiones que han sido consideradas en el presente trabajo como la amígdala central extendida y la amígdala medial extendida de aves. La distribución de calbindina descrita por estos autores es especialmente abundante en las regiones correspondientes a la amígdala medial extendida, habiendo sido descrito además un delgado corredor de células positivas que discurre bajo el área subpallial amigdalina y que constituye un nexo de unión entre el núcleo taeniae de la amígdala y la división medial del “bed nucleus de la stria terminalis”. Nuestros resultados corroboran la distribución propuesta para este marcador, y complementan la diferencia de expresión entre las divisiones medial y central de la amígdala extendida en base a GABA, nNOS y calretinina. Así, se ha observado que en su conjunto tanto la división lateral del BST como el área amigdalina subpallial, integrantes del complejo central, muestran una inmunorreactividad superior en su conjunto a la que estos marcadores presentan en el núcleo taeniae de la amígdala y en la división medial del BST. Cabe destacar sin embargo que aquellas regiones que pueden ser consideradas como áreas de transición entre las divisiones central y medial de la amígdala poseen características propias de ambos complejos. Así, la porción más caudal de la división plexiforme 2 del BSTL y la división medial del área subpallial amigdalina muestran las características inmunocitoquímicas propias de la amígdala central extendida, presentando sin embargo al mismo tiempo una distribución para la calbindina muy elevada, similar a la observada en el complejo amigdalino medial (para más datos, consultar apartados anteriores).

Los recientes estudios realizados en base a la expresión de marcadores histogenéticos en el telencéfalo de mamíferos y aves sugieren que tanto la amígdala medial como el núcleo taeniae de la amígdala se incluyen, al menos en parte, dentro de los dominios del pallio (Smith-Fernández et al., 1998; Puelles et al., 1999, 2000; Puelles y Rubenstein, 2003). Este hecho es consistente con la homología propuesta para ambas estructuras en base a las similitudes morfológicas y distribución de marcadores específicos. Sin embargo, el reducido tamaño del bulbo olfatorio en aves, así como la ausencia del órgano vomeronasal y del bulbo olfatorio accesorio implican necesariamente una profunda reorganización del complejo medial (con funcionalidad eminentemente quimiosensitiva) de la amígdala extendida de aves. Así, bajo nuestro

punto de vista el núcleo taeniae de la amígdala podría ser considerado como una estructura homóloga a parte, pero no al conjunto, del complejo medial de mamíferos. Parece lógico pensar que esta región homóloga al núcleo taeniae en mamíferos formase parte los núcleos posteriores de la amígdala medial, localizado en la base del telencéfalo caudal, adyacentes lateralmente al área de transición amigdalohipocámpal y relacionado lateralmente con el tracto óptico.



**Figura 38.** Representación esquemática de una sección sagital de telencéfalo de aves en la que se muestra la continuidad existente entre el hipocampo, la amígdala hipocámpal y el núcleo taeniae de la amígdala. Las líneas azules delimitan los derivados de los palios lateral, dorsal y medial. La línea verde delimita los derivados del palio ventral. La línea roja representa el límite entre palio y subpalio. El asterisco se localiza en el arcopalio medial, que incluye al menos derivados paliales, estriatales y palidales.



# Conclusiones

# Conclusiones

- 1.-** Los patrones de expresión combinados de genes reguladores del desarrollo sugieren que los núcleos integrantes de la amígdala subpalial-amígdala extendida (tal y como ha sido interpretada hasta la fecha), se incluyen en cada caso en los dominios histogenéticos que contribuyen al subpalio, tales como el estriado, pálido, área entopeduncular y área preóptica; y al palio, derivados fundamentalmente de palio medial y palio ventral.
  
- 2.-** Los marcadores neuroquímicos empleados, GABA, proteínas ligadoras de calcio y sintasa del óxido nítrico presentan patrones de expresión espacio-temporales diferenciales en la amígdala subpalial-amígdala extendida durante el desarrollo embrionario e individuo adulto.
  
- 3.-** La distribución diferencial de GABA, calbindina, calretinina y nNOS en la división lateral del *bed nucleus de la stria terminalis* sugiere la compartimentalización de esta estructura en tres regiones bien diferenciadas, a las que hemos denominado BSTL magnocelular, BSTL plexiforme 1 y BSTL plexiforme 2.
  
- 4.-** Los marcadores GABA y calbindina permiten definir de forma precisa los límites de las divisiones medial 1 y medial 2 del *bed nucleus de la stria terminalis*, revelando la existencia de una delgada banda de tejido dispuesta a modo de conexión anatómica entre ambas estructuras.
  
- 5.-** El *bed nucleus de la stria terminalis* muestra en su conjunto un fuerte marcaje para *Dlx5* y *Nkx2.1*, lo cual indica una naturaleza palidal del complejo. La división lateral plexiforme 2, medial 1 y medial 2 del BST presentan además una intensa señal para *Ssh*, lo cual sugiere la integración de derivados procedentes del área entopeduncular/área preóptica en sus dominios.



**6.-** La expresión diferencial de *Ssh*, calbindina y otros marcadores neuroquímicos presentes en la división lateral plexiforme 2 y en las divisiones mediales del *bed nucleus de la stria terminalis*, así como la extensión hacia el área preóptica-hipotalámica mostrada por ambas estructuras en los niveles telencefálicos caudales plantean la posibilidad de que al menos parte del BSTL plexiforme 2 deba ser considerado, a efectos de nomenclatura y homologías, como integrante del complejo medial del BST.

**7.-** La inmunorreactividad característica para nNOS ha permitido definir la existencia de un corredor de células y neuropilo intensamente marcado, ubicado bajo la división medial del *bed nucleus de la stria terminalis* en la región preóptica-hipotalámica. La topología de este *Corredor nNOS*, así como su relación con el tracto occipitomesencefálico y la expresión diferencial mostrada por el gen *Tbr1* y los marcadores nNOS, GABA, calbindina y calretinina sugieren que esta estructura puede formar parte de la amígdala palial de aves.

**8.-** Los límites del área subpalial amigdalina pueden ser trazados de forma clara en base a la distribución característica de los marcadores nNOS y calretinina. La expresión diferencial de estos marcadores indica que esta región se extiende hacia los niveles telencefálicos rostrales, manteniendo en todo momento una íntima relación con la división lateral del *bed nucleus de la stria terminalis*, y sugiere al mismo tiempo la existencia de un contacto con la superficie telencefálica en los niveles inmediatamente rostrales a la comisura anterior.

**9.-** El intenso marcaje para *Dlx5* y *Pax6* presente en el área amigdalina subpalial, junto a la total ausencia de señal *Nkx2.1* en esta región, permiten descartar un origen palial para ambas subdivisiones, medial y lateral. La expresión combinada de estos marcadores sugieren la naturaleza estriatal del conjunto, no pudiendo ser descartada sin embargo la existencia de una contribución entopeduncular y/o preóptica.

**10.-** Los patrones de distribución mostrados por el GABA, la calbindina y la calretinina durante el desarrollo sugieren que el núcleo taeniae de la amígdala y la amígdala hipocampal constituyen dos estructuras independientes, próximas pero no adyacentes, separadas entre sí por el arcopalio medial.

**11.-** La intensa señal *Tbr1* presente en los dominios del núcleo taeniae de la amígdala, el arcopalio medial y la amígdala hipocampal indica que estas estructuras poseen un origen mayoritariamente palial, por lo que no han de ser incluidas bajo el epígrafe de amígdala subpalial-amígdala extendida.

**12.-** La topología de estos núcleos sugiere que tanto el núcleo taeniae de la amígdala como el arcopalio medial se incluyen en el compartimento del palio ventral, mientras que la amígdala hipocampal, el hipocampo y la conexión anatómica entre ambas estructuras pertenecen al dominio de palio medial. La convergencia de los palios ventral y medial en los niveles telencefálicos caudales puede tener lugar por tanto en el límite entre el arcopalio medial y la amígdala hipocampal.



# Bibliografía

# Bibliografía

- Abellán A** and Medina L. 2007. Expression of Lhx6 and Lhx7/8 suggests a pallido-pedunculo-preoptic origin for the lateral and medial parts of the avian bed nucleus of the stria terminalis. 5th European Conference on Comparative Neurobiology, Paris. Abstract.
- Aboitiz F**, Montiel J, and Lopez J. 2002. An hypothesis on the early evolution of the development of the isocortex. *Brain Res Bull* 57:481-483.
- Aboitiz F**, Morales D, and Montiel J. 2003. The evolutionary origin of the mammalian isocortex: towards an integrated developmental and functional approach. *Behav Brain Sci* 26:535-552.
- Aboitiz F**, 1999. Comparative development of the mammalian isocortex and the reptilian dorsal ventricular ridge. Evolutionary considerations. *Cereb Cortex* 9:783-791.
- Absil P**, Baillien M, Ball GF, Panzica GC, and Balthazart J. 2001. The control of preoptic aromatase activity by afferent inputs in Japanese quail. *Brain Res Brain Res Rev* 37:38-58.
- Absil P**, Braquenier JB, Balthazart J, and Ball GF. 2002. Effects of lesions of nucleus taeniae on appetitive and consummatory aspects of male sexual behavior in Japanese quail. *Brain Behav Evol* 60:13-35.
- Absil P**, Papello M, Viglietti-Panzica C, Balthazart J, and Panzica G. 2002. The medial preoptic nucleus receives vasotocinergic inputs in male quail: a tract-tracing and immunocytochemical study. *J Chem Neuroanat* 24:27-39.
- Aggleton JP**, Vann SD, Oswald CJ, and Good M. 2000. Identifying cortical inputs to the rat hippocampus that subserve allocentric spatial processes: a simple problem with a complex answer. *Hippocampus* 10:466-474.
- Alcántara S** and Ferrer I. 1995. Postnatal development of calbindin-D28k immunoreactivity in the cerebral cortex of the cat. *Anat Embryol (Berl)* 192:369-384.
- Alcántara S**, Ferrer I, and Soriano E. 1993. Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 188:63-73.
- Alden M**, Besson JM, and Bernard JF. 1994. Organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the bed nucleus of the stria terminalis and neighboring regions: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 341:289-314.
- Alheid GF** and Heimer L. 1988. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27:1-39.
- Alheid GF**, Beltramino CA, De Olmos JS, Forbes MS, Swanson DJ, and Heimer L. 1998. The neuronal organization of the supracapsular part of the stria terminalis in the rat: the dorsal component of the extended amygdala. *Neuroscience* 84:967-996.
- Alheid GF**, DeOlmos JS, and Beltramino CA. 1995. Amygdala and extended amygdala. The rat nervous system. Second edition. Academic Press.
- Amaral DG**, Price DJ, Pitkanen A, and Carmichael ST. 1992. Anatomical organization of the primate amygdalid complex. *Amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. New York: Wiley-Liss 1-66.

- Anderson KD** and Reiner A. 1990. Distribution and relative abundance of neurons in the pigeon forebrain containing somatostatin, neuropeptide Y, or both. *J Comp Neurol* 299:261-282.
- Anderson KD** and Reiner A. 1990. Extensive co-occurrence of substance P and dynorphin in striatal projection neurons: an evolutionarily conserved feature of basal ganglia organization. *J Comp Neurol* 295:339-369.
- Anderson SA**, Eisenstat DD, Shi L, and Rubenstein JL. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-476.
- Anderson SA**, Marin O, Horn C, Jennings K, and Rubenstein JL. 2001. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.
- Andressen C**, Blumcke I, and Celio MR. 1993. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271:181-208.
- Ariëns-Kappers CU**, Huber GC, and Crosby E. 1936. The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man. New York: Hafner.
- Aste N**, Balthazart J, Absil P, Grossmann R, Mulhbauer E, Viglietti-Panzica C, and Panzica GC. 1998. Anatomical and neurochemical definition of the nucleus of the stria terminalis in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J Comp Neurol* 396:141-157.
- Aste N**, Mulhbauer E, and Grossmann R. 1996. Distribution of AVT gene expressing neurons in the prosencephalon of Japanese quail and chicken. *Cell Tissue Res* 286:365-373.
- Aste N**, Viglietti-Panzica C, Fasolo A, and Panzica GC. 1995. Mapping of neurochemical markers in quail central nervous system: VIP- and SP-like immunoreactivity. *J Chem Neuroanat* 8:87-102.
- Aste N**, Viglietti-Panzica C, Fasolo A, Andreone C, Vaudry H, Pelletier G, and Panzica GC. 1991. Localization of neuropeptide Y-immunoreactive cells and fibres in the brain of the Japanese quail. *Cell Tissue Res* 265:219-230.
- Atoji Y** and Wild JM. 2004. Fiber connections of the hippocampal formation and septum and subdivisions of the hippocampal formation in the pigeon as revealed by tract tracing and kainic acid lesions. *J Comp Neurol* 475:426-461.
- Atoji Y** and Wild JM. 2005. Afferent and efferent connections of the dorsolateral corticoid area and a comparison with connections of the temporo-parieto-occipital area in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 485:165-182.
- Atoji Y** and Wild JM. 2006. Anatomy of the avian hippocampal formation. *Rev Neurosci* 17:3-15.
- Atoji Y**, Saito S, and Wild JM. 2006. Fiber connections of the compact division of the posterior pallial amygdala and lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 499:161-182.
- Atoji Y**, Shibata N, Yamamoto Y, and Suzuki Y. 1996. Distribution of neurotensin-containing neurons in the central nervous system of the pigeon and the chicken. *J Comp Neurol* 375:187-211.
- Atoji Y**, Wild JM, Yamamoto Y, and Suzuki Y. 2002. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 447:177-199.
- Baimbridge KG**, Miller JJ, and Parkes CO. 1982. Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res* 239:519-525.

- Ball GF**, Bernard DJ, Foidart A, Lakaye B, and Balthazart J. 1999. Steroid sensitive sites in the avian brain: does the distribution of the estrogen receptor alpha and beta types provide insight into their function? *Brain Behav Evol* 54:28-40.
- Balthazart J** and Ball GF. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci* 21:243-249.
- Balthazart J** and Ball GF. 1998. The Japanese quail as a model system for the investigation of steroid-catecholamine interactions mediating appetitive and consummatory aspects of male sexual behavior. *Annu Rev Sex Res* 9:96-176.
- Balthazart J** and Surlemont C. 1990. Androgen and estrogen action in the preoptic area and activation of copulatory behavior in quail. *Physiol Behav* 48:599-609.
- Balthazart J**, Absil P, Gerard M, Appeltants D, and Ball GF. 1998. Appetitive and consummatory male sexual behavior in Japanese quail are differentially regulated by subregions of the preoptic medial nucleus. *J Neurosci* 18:6512-6527.
- Balthazart J**, Baillien M, and Ball GF. 2002. Interactions between aromatase (estrogen synthase) and dopamine in the control of male sexual behavior in quail. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132:37-55.
- Balthazart J**, Dupiereux V, Aste N, Viglietti-Panzica C, Barrese M, and Panzica GC. 1994. Afferent and efferent connections of the sexually dimorphic medial preoptic nucleus of the male quail revealed by in vitro transport of Dil. *Cell Tissue Res* 276:455-475.
- Balthazart J**, Foidart A, Baillien M, Harada N, and Ball GF. 1998. Anatomical relationships between aromatase and tyrosine hydroxylase in the quail brain: double-label immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 391:214-226.
- Balthazart J**, Foidart A, Houbart M, Prins GS, and Ball GF. 1998. Distribution of androgen receptor-immunoreactive cells in the quail forebrain and their relationship with aromatase immunoreactivity. *J Neurobiol* 35:323-340.
- Balthazart J**, Foidart A, Surlemont C, Harada N, and Naftolin F. 1992. Neuroanatomical specificity in the autoregulation of aromatase-immunoreactive neurons by androgens and estrogens: an immunocytochemical study. *Brain Res* 574:280-290.
- Balthazart J**, Foidart A, Surlemont C, Vockel A, and Harada N. 1990. Distribution of aromatase in the brain of the Japanese quail, ring dove, and zebra finch: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 301:276-288.
- Balthazart J**, Foidart A, Wilson EM, and Ball GF. 1992. Immunocytochemical localization of androgen receptors in the male songbird and quail brain. *J Comp Neurol* 317:407-420.
- Balthazart J**, Gahr M, and Surlemont C. 1989. Distribution of estrogen receptors in the brain of the Japanese quail: an immunocytochemical study. *Brain Res* 501:205-214.
- Bandler R** and Shipley MT. 1994. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 17:379-389.
- Bardet SM**, Cobos I, Puelles E, Martínez-de-la-Torre M, and Puelles L. 2006. Chicken lateral septal organ and other circumventricular organs form in a striatal subdomain abutting the molecular striatopallidal border. *J Comp Neurol* 499:745-767.
- Beasley CL** and Reynolds GP. 1997. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophr Res* 24:349-355.

- Berger B** and Álvarez C. 1996. Neurochemical development of the hippocampal region in the fetal rhesus monkey, III: calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin with special mention of cajal-retzius cells and the retrosplenial cortex. *J Comp Neurol* 366:674-699.
- Berk ML** and Hawkin RF. 1985. Ascending projections of the mammillary region in the pigeon: emphasis on telencephalic connections. *J Comp Neurol* 239:330-340.
- Berk ML**. 1987. Projections of the lateral hypothalamus and bed nucleus of the stria terminalis to the dorsal vagal complex in the pigeon. *J Comp Neurol* 260:140-156.
- Bernard DJ**, Bentley GE, Balthazart J, Turek FW, and Ball GF. 1999. Androgen receptor, estrogen receptor alpha, and estrogen receptor beta show distinct patterns of expression in forebrain song control nuclei of European starlings. *Endocrinology* 140:4633-4643.
- Bernard DJ**, Casto JM, and Ball GF. 1993. Sexual dimorphism in the volume of song control nuclei in European starlings: assessment by a Nissl stain and autoradiography for muscarinic cholinergic receptors. *J Comp Neurol* 334:559-570.
- Bingman VP**, Bagnoli P, loale P, and Casini G. 1984. Homing behavior of pigeons after telencephalic ablations. *Brain Behav Evol* 24:94-108.
- Bixby JL** and Zhang R. 1990. Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* 110:1253-1260.
- Boer-Visser AM** and Dubbeldam JL. 2002. The distribution of dopamine, substance P, vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y immunoreactivity in the brain of the collared dove, *Streptopelia decaocto*. *J Chem Neuroanat* 23:1-27.
- Bombardi C**, Grandis A, Chiocchetti R, and Lucchi ML. 2006. Distribution of calbindin-D28k, neuronal nitric oxide synthase, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) in the lateral nucleus of the sheep amygdaloid complex. *Anat Embryol (Berl)* 211:707-720.
- Brady DR**, Carey RG, and Mufson EJ. 1992. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) profiles in the amygdala of human and New World monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res* 577:236-248.
- Braun K**, 1990. Calcium-binding proteins in avian and mammalian central nervous system: localization, development and possible functions. *Prog Histochem Cytochem* 21:1-64.
- Brauth SE**, Ferguson JL, and Kitt CA. 1978. Prosencephalic pathways related to the paleostriatum of the pigeon (*Columba livia*). *Brain Res* 147:205-221.
- Bredt DS**, Hwang PM, and Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770.
- Brox A**, Puelles L, Ferreiro B, and Medina L. 2003. Expression of the genes GAD67 and Distal-less-4 in the forebrain of *Xenopus laevis* confirms a common pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 461:370-393.
- Brox A**, Puelles L, Ferreiro B, and Medina L. 2004. Expression of the genes Emx1, Tbr1, and Eomes (Tbr2) in the telencephalon of *Xenopus laevis* confirms the existence of a ventral pallial division in all tetrapods. *J Comp Neurol* 474:562-577.
- Bruce LL** and Neary TJ. 1995. The limbic system of tetrapods: a comparative analysis of cortical and amygdalar populations. *Brain Behav Evol* 46:224-234.

- Bruning G.** 1993. Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. *J Comp Neurol* 334:192-208.
- Bukalo O,** Fentrop N, Lee AY, Salmen B, Law JW, Wotjak CT, Schweizer M, Dityatev A, and Schachner M. 2004. Conditional ablation of the neural cell adhesion molecule reduces precision of spatial learning, long-term potentiation, and depression in the CA1 subfield of mouse hippocampus. *J Neurosci* 24:1565-1577.
- Bulfone A,** Carotenuto P, Faedo A, Aglio V, Garzia L, Bello AM, Basile A, Andre A, Cocchia M, Guardiola O, Ballabio A, Rubenstein JL, and Zollo M. 2005. Telencephalic embryonic subtractive sequences: a unique collection of neurodevelopmental genes. *J Neurosci* 25:7586-7600.
- Bulfone A,** Puelles L, Porteus MH, Frohman MA, Martín GR, and Rubenstein JL. 1993. Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci* 13:3155-3172.
- Bulfone A,** Smiga SM, Shimamura K, Peterson A, Puelles L, and Rubenstein JL. 1995. T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15:63-78.
- Camacho-Arroyo I,** González-Arenas A, González-Aguero G, Guerra-Araiza C, and González-Moran G. 2003. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 136:447-452.
- Canteras NS,** Simerly RB, and Swanson LW. 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360:213-245.
- Caric D,** Gooday D, Hill RE, McConnell SK, and Price DJ. 1997. Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development* 124:5087-5096.
- Carlsen J** and Heimer L. 1988. The basolateral amygdaloid complex as a cortical-like structure. *Brain Res* 441:377-380.
- Carlsen J.** 1988. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostratial projection neurons. *J Comp Neurol* 273:513-526.
- Casini G,** Bingman VP, and Bagnoli P. 1986. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and 3H-proline. *J Comp Neurol* 245:454-470.
- Chaudhury S,** Nag TC, and Wadhwa S. 2006. Prenatal acoustic stimulation influences neuronal size and the expression of calcium-binding proteins (calbindin D-28K and parvalbumin) in chick hippocampus. *J Chem Neuroanat* 32:117-126.
- Cheng M,** Chaiken M, Zuo M, and Miller H. 1999. Nucleus taenia of the amygdala of birds: anatomical and functional studies in ring doves (*Streptopelia risoria*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Brain Behav Evol* 53:243-270.
- Cheng M,** Akesson TR, and de Lanerolle NC. 1987. Retrograde HRP demonstration of afferent projections to the midbrain and nest calls in the ring dove. *Brain Res Bull* 18:45-48.
- Choi DW.** 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.



- Claro F**, Segovia S, Guilamon A, and Del Abril A. 1995. Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. *Brain Res Bull* 36:1-10.
- Cobos I**, Puelles L, and Martínez S. 2001. The avian telencephalic subpallium originates inhibitory neurons that invade tangentially the pallium (dorsal ventricular ridge and cortical areas). *Dev Biol* 239:30-45.
- Cobos I**, Shimamura K, Rubenstein JL, Martínez S, and Puelles L. 2001. Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Dev Biol* 239:46-67.
- Cohen R**. 1971. Differential cerebral processing of noise and verbal stimuli. *Science* 172:599-601.
- Coolen LM** and Wood RI. 1999. Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: redundancy without amplification. *Behav Brain Res* 98:143-153.
- Coolen LM**, Olivier B, Peters HJ, and Veening JG. 1997. Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT. *Physiol Behav* 62:881-891.
- Corfas G**, Roy K, and Buxbaum JD. 2004. Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 7:575-580.
- Corvin AP**, Morris DW, McGhee K, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Clair DS, Waddington JL, and Gill M. 2004. Confirmation and refinement of an 'at-risk' haplotype for schizophrenia suggests the EST cluster, Hs.97362, as a potential susceptibility gene at the Neuregulin-1 locus. *Mol Psychiatry* 9:208-213.
- Cozzi B**, Massa R, and Panzica GC. 1997. The NADPH-diaphorase-containing system in the brain of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Cell Tissue Res* 287:101-112.
- Cremer H**, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, and . 1994. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367:455-459.
- Csillag A**. 1991. Large GABA cells of chick ectostriatum: anatomical evidence suggesting a double GABAergic disinhibitory mechanism. An electron microscopic immunocytochemical study. *J Neurocytol* 20:518-528.
- Dafters RI**. 1976. Effect of medial archistriatal lesions on the conditioned emotional response and on auditory discrimination performance of the pigeon. *Physiol Behav* 17:659-665.
- Davies DC**, Csillag A, Szekely AD, and Kabai P. 1997. Efferent connections of the domestic chick archistriatum: a phaseolus lectin anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 389:679-693.
- Dávila JC**, De la Calle A, Gutiérrez A, Megías M, Andreu MJ, and Guirado S. 1991. Distribution of neuropeptide Y (NPY) in the cerebral cortex of the lizards *Psammotromus algirus* and *Podarcis hispanica*: co-localization of NPY, somatostatin, and GABA. *J Comp Neurol* 308:397-408.
- Dávila JC**, Megías M, Andreu MJ, Real MA, and Guirado S. 1995. NADPH diaphorase-positive neurons in the lizard hippocampus: a distinct subpopulation of GABAergic interneurons. *Hippocampus* 5:60-70.

- Dávila JC**, Megías M, De la Calle A, and Guirado S. 1993. Subpopulations of GABA neurons containing somatostatin, neuropeptide Y, and parvalbumin in the dorsomedial cortex of the lizard *Psammodromus algirus*. *J Comp Neurol* 336:161-173.
- Dávila JC**, Padial J, Andreu MJ, Real MA, and Guirado S. 1997. Calretinin immunoreactivity in the cerebral cortex of the lizard *Psammodromus algirus*: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 382:382-393.
- Dávila JC**, Real MA, Olmos L, Legaz I, Medina L, and Guirado S. 2005. Embryonic and postnatal development of GABA, calbindin, calretinin, and parvalbumin in the mouse claustral complex. *J Comp Neurol* 481:42-57.
- DeGelder B**, Morris JS, and Dolan RJ. 2005. Unconscious fear influences emotional awareness of faces and voices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18682-18687.
- DeVries GJ** and Buijs RM. 1983. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res* 273:307-317.
- DeFelipe J**. 1999. Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122 ( Pt 10):1807-1822.
- Del Abril A**, Segovia S, and Guillamon A. 1987. The bed nucleus of the stria terminalis in the rat: regional sex differences controlled by gonadal steroids early after birth. *Brain Res* 429:295-300.
- Del Rio JA**, de Lecea L, Ferrer I, and Soriano E. 1994. The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 81:247-259.
- DeOlmos JS** and Heimer L. 1999. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 877:1-32.
- DeOlmos JS** and Ingram WR. 1971. An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res* 33:523-529.
- Deshpande JK**, Siesjo BK, and Wieloch T. 1987. Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:89-95.
- Dolan RJ**. 2002. Emotion, cognition, and behavior. *Science* 298:1191-1194.
- Domenici MR**, Berretta N, and Cherubini E. 1998. Two distinct forms of long-term depression coexist at the mossy fiber-CA3 synapse in the hippocampus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8310-8315.
- Dong HW** and Swanson LW. 2003. Projections from the rhomboid nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis: implications for cerebral hemisphere regulation of ingestive behaviors. *J Comp Neurol* 463:434-472.
- Dong HW**, Petrovich GD, and Swanson LW. 2001. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38:192-246.
- Dong HW**, Petrovich GD, Watts AG, and Swanson LW. 2001. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol* 436:430-455.
- Dubbeldam JL** and Boer-Visser AM. 2000. Distribution of gastrin-releasing peptide immunoreactivity in the brain of the collared dove (*Streptopelia decaocto*). *Cell Tissue Res* 300:139-151.

- Dubbeldam JL** and Boer-Visser AM. 2002. The central mesencephalic grey in birds: nucleus intercollicularis and substantia grisea centralis. *Brain Res Bull* 57:349-352.
- Dubbeldam JL** and Visser AM. 1987. The organization of the nucleus basalis-neostriatum complex of the mallard (*Anas platyrhynchos L.*) and its connections with the archistriatum and the paleostriatum complex. *Neuroscience* 21:487-517.
- Dubbeldam JL**, Boer-Visser AM, and Bout RG. 1997. Organization and efferent connections of the archistriatum of the mallard, *Anas platyrhynchos L.*: an anterograde and retrograde tracing study. *J Comp Neurol* 388:632-657.
- Durand SE**, Tepper JM, and Cheng MF. 1992. The shell region of the nucleus ovoidalis: a subdivision of the avian auditory thalamus. *J Comp Neurol* 323:495-518.
- Durstewitz D**, Kroner S, and Güntürkün O. 1999. The dopaminergic innervation of the avian telencephalon. *Prog Neurobiol* 59:161-195.
- Durstewitz D**, Kroner S, Hemmings HC, Jr., and Güntürkün O. 1998. The dopaminergic innervation of the pigeon telencephalon: distribution of DARPP-32 and co-occurrence with glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase. *Neuroscience* 83:763-779.
- Edelman GM** and Gally JA. 1992. Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11651-11652.
- Edinger L**, Wallenberg A, and Holmes GM. 1903. Untersuchungen über die vergleichende Anatomie des Gehirns. 3. Das Vorderhirn der Vögel. *Abhand Senekenberate Gesellsch Frankfurt Am Main.* 20:343-426.
- Eisenstat DD**, Liu JK, Mione M, Zhong W, Yu G, Anderson SA, Ghattas I, Puelles L, and Rubenstein JL. 1999. DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J Comp Neurol* 414:217-237.
- Emery DE** and Sachs BD. 1976. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav* 17:803-806.
- Enderlin S**, Norman AW, and Celio MR. 1987. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 177:15-28.
- Englund C**, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, and Hevner RF. 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25:247-251.
- Espeseth A**, Marnellos G, and Kintner C. 1998. The role of F-cadherin in localizing cells during neural tube formation in *Xenopus* embryos. *Development* 125:301-312.
- Faedo A**, Ficara F, Ghiani M, Aiuti A, Rubenstein JL, and Bulfone A. 2002. Developmental expression of the T-box transcription factor T-bet/Tbx21 during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 116:157-160.
- Faedo A**, Quinn JC, Stoney P, Long JE, Dye C, Zollo M, Rubenstein JL, Price DJ, and Bulfone A. 2004. Identification and characterization of a novel transcript down-regulated in *Dlx1/Dlx2* and up-regulated in *Pax6* mutant telencephalon. *Dev Dyn* 231:614-620.
- Fannon AM** and Colman DR. 1996. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 17:423-434.
- Farber JL**. 1981. The role of calcium in cell death. *Life Sci* 29:1289-1295.

- Foidart A**, Harada N, and Balthazart J. 1995. Aromatase-immunoreactive cells are present in mouse brain areas that are known to express high levels of aromatase activity. *Cell Tissue Res* 280:561-574.
- Foidart A**, Lakaye B, Grisar T, Ball GF, and Balthazart J. 1999. Estrogen receptor-beta in quail: cloning, tissue expression and neuroanatomical distribution. *J Neurobiol* 40:327-342.
- Foidart A**, Reid J, Absil P, Yoshimura N, Harada N, and Balthazart J. 1995. Critical re-examination of the distribution of aromatase-immunoreactive cells in the quail forebrain using antibodies raised against human placental aromatase and against the recombinant quail, mouse or human enzyme. *J Chem Neuroanat* 8:267-282.
- Freund TF** and Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Freund TF**. 2003. Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26:489-495.
- Gabbott PL** and Bacon SJ. 1995. Co-localisation of NADPH diaphorase activity and GABA immunoreactivity in local circuit neurones in the medial prefrontal cortex (mPFC) of the rat. *Brain Res* 699:321-328.
- Gahr M** and Metzdorf R. 1997. Distribution and dynamics in the expression of androgen and estrogen receptors in vocal control systems of songbirds. *Brain Res Bull* 44:509-517.
- Gahr M** and Wild JM. 1997. Localization of androgen receptor mRNA-containing cells in avian respiratory-vocal nuclei: an in situ hybridization study. *J Neurobiol* 33:865-876.
- Gahr M**, Guttinger HR, and Kroodsma DE. 1993. Estrogen receptors in the avian brain: survey reveals general distribution and forebrain areas unique to songbirds. *J Comp Neurol* 327:112-122.
- Gallagher M** and Schoenbaum G. 1999. Functions of the amygdala and related forebrain areas in attention and cognition. *Ann N Y Acad Sci* 877:397-411.
- Galvan A** and Wichmann T. 2007. GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders. *Prog Brain Res* 160:287-312.
- Ganzler SI** and Redies C. 1995. R-cadherin expression during nucleus formation in chicken forebrain neuromeres. *J Neurosci* 15:4157-4172.
- García-Segura LM**, Baetens D, Roth J, Norman AW, and Orci L. 1984. Immunohistochemical mapping of calcium-binding protein immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res* 296:75-86.
- Garda AL**, Puelles L, Rubenstein JL, and Medina L. 2002. Expression patterns of Wnt8b and Wnt7b in the chicken embryonic brain suggest a correlation with forebrain patterning centers and morphogenesis. *Neuroscience* 113:689-698.
- Garthwaite G**, Bartus K, Malcolm D, Goodwin D, Kollb-Sielecka M, Dooldeniya C, and Garthwaite J. 2006. Signaling from blood vessels to CNS axons through nitric oxide. *J Neurosci* 26:7730-7740.
- Gibbs RB**. 1996. Expression of estrogen receptor-like immunoreactivity by different subgroups of basal forebrain cholinergic neurons in gonadectomized male and female rats. *Brain Res* 720:61-68.
- González A**, Russchen FT, and Lohman AH. 1990. Afferent connections of the striatum and the nucleus accumbens in the lizard Gekko gekko. *Brain Behav Evol* 36:39-58.

- Granda RH** and Crossland WJ. 1989. GABA-like immunoreactivity of neurons in the chicken diencephalon and mesencephalon. *J Comp Neurol* 287:455-469.
- Grindley JC**, Hargett LK, Hill RE, Ross A, and Hogan BL. 1997. Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6 Sey-1Neu mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon. *Mech Dev* 64:111-126.
- Grossmann R**, Jurkevich A, and Kohler A. 2002. Sex dimorphism in the avian arginine vasotocin system with special emphasis to the bed nucleus of the stria terminalis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131:833-837.
- Grove AS**. 1998. A piece of my mind. *The X Factor*. *JAMA* 280:1294.
- Guentchev M**, Hainfellner JA, Trabattoni GR, and Budka H. 1997. Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:1119-1124.
- Guirado S**, Dávila JC, Real MA, and Medina L. 1999. Nucleus accumbens in the lizard *Psammotromus algirus*: chemoarchitecture and cortical afferent connections. *J Comp Neurol* 405:15-31.
- Guirado S**, Dávila JC, Real MA, and Medina L. 2000. Light and electron microscopic evidence for projections from the thalamic nucleus rotundus to targets in the basal ganglia, the dorsal ventricular ridge, and the amygdaloid complex in a lizard. *J Comp Neurol* 424:216-232.
- Guirado S**, Martínez-García F, Andreu MJ, and Dávila JC. 1999. Calcium-binding proteins in the dorsal ventricular ridge of the lizard *Psammotromus algirus*. *J Comp Neurol* 405:32-44.
- Guirado S**, Real MA, and Dávila JC. 2005. The ascending tectofugal visual system in amniotes: new insights. *Brain Res Bull* 66:290-296.
- Guirado S**, Real MA, and Dávila JC. 2007. Distinct immunohistochemically-defined areas in the medial amygdala in the developing and adult mouse. En preparación.
- Guirado S**, Real MA, Olmos JL, and Dávila JC. 2003. Distinct types of nitric oxide-producing neurons in the developing and adult mouse claustrum. *J Comp Neurol* 465:431-444.
- Gulyas AI**, Toth K, Danos P, and Freund TF. 1991. Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 312:371-378.
- Güntürkün O** and Karten HJ. 1991. An immunocytochemical analysis of the lateral geniculate complex in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 314:721-749.
- Hadeishi Y** and Wood RI. 1996. Nitric oxide synthase in mating behavior circuitry of male Syrian hamster brain. *J Neurobiol* 30:480-492.
- Halldin K**, Axelsson J, and Brunstrom B. 2005. Effects of endocrine modulators on sexual differentiation and reproductive function in male Japanese quail. *Brain Res Bull* 65:211-218.
- Hamburger V** and Hamilton HL. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195:231-272.
- Harris VS** and Sachs BD. 1975. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Res* 86:514-518.
- Heizmann CW** and Braun K. 1992. Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 15:259-264.

- Hendrickson AE**, Van Brederode JF, Mulligan KA, and Celio MR. 1991. Development of the calcium-binding protein parvalbumin and calbindin in monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 307:626-646.
- Heredia R**, Real MA, Suárez J, Guirado S, and Dávila JC. 2002. A proposed homology between the reptilian dorsomedial thalamic nucleus and the mammalian paraventricular thalamic nucleus. *Brain Res Bull* 57:443-445.
- Hestrin S** and Galarreta M. 2005. Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* 28:304-309.
- Hevner RF**, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, and Rubenstein JL. 2001. *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29:353-366.
- Hof PR**, Glezer II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, and Vogt Weisenhorn DM. 1999. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat* 16:77-116.
- Hogan D** and Berman NE. 1994. The development of parvalbumin and calbindin-D28k immunoreactive interneurons in kitten visual cortical areas. *Brain Res Dev Brain Res* 77:1-21.
- Holmgren N**. 1925. Points of view concerning forebrain morphology in higher vertebrates. *Acta Zool* 413-477.
- Holscher C**. 1997. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 20:298-303.
- Hoogland PV** and Vermeulen-Vanderzee E. 1989. Efferent connections of the dorsal cortex of the lizard *Gekko gecko* studied with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 285:289-303.
- Hopkins DA** and Holstege G. 1978. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res* 32:529-547.
- Huber GC** and Crosby E. 1929. The nuclei and fiber paths of the avian diencephalon, with consideration of telencephalic and certain mesencephalic centers and connections. *J Comp Neurol* 1-225.
- Hurley KM**, Herbert H, Moga MM, and Saper CB. 1991. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:249-276.
- Jancso G**, Karcsu S, Kiraly E, Szebeni A, Toth L, Bacsy E, Joo F, and Parducz A. 1984. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res* 295:211-216.
- Johnston JB**. 1923. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol*.
- Jurkevich A** and Grossmann R. 2003. Vasotocin and reproductive functions of the domestic chicken. *Domest Anim Endocrinol* 25:93-99.
- Jurkevich A**, Barth SW, and Grossmann R. 1997. Sexual dimorphism of arg-vasotocin gene expressing neurons in the telencephalon and dorsal diencephalon of the domestic fowl. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Cell Tissue Res* 287:69-77.

- Jurkevich A**, Barth SW, Aste N, Panzica G, and Grossmann R. 1996. Intracerebral sex differences in the vasotocin system in birds: possible implication in behavioral and autonomic functions. *Horm Behav* 30:673-681.
- Jurkevich A**, Barth SW, Kuenzel WJ, Kohler A, and Grossmann R. 1999. Development of sexually dimorphic vasotocinergic system in the bed nucleus of stria terminalis in chickens. *J Comp Neurol* 408:46-60.
- Jurkevich A**, Grossmann R, Balthazart J, and Viglietti-Panzica C. 2001. Gender-related changes in the avian vasotocin system during ontogeny. *Microsc Res Tech* 55:27-36.
- Jurkevich A**. 2001. Sexual dimorphism in the avian brain - Part I. Introduction. *Microsc Res Tech* 54:325-326.
- Karten HJ** and Dubbeldam JL. 1973. The organization and projections of the paleostriatal complex in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 148:61-89.
- Karten HJ** and Hodos W. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). 1967. Baltimore, MD: Johns Hopkins Press.
- Kempainen S** and Pitkänen A. 2000. Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol* 426:441-467.
- Kerwin J**, Scott M, Sharpe J, Puelles L, Robson SC, Martínez-de-la-Torre M, Ferrán JL, Feng G, Baldock R, Strachan T, Davidson D, and Lindsay S. 2004. 3 dimensional modelling of early human brain development using optical projection tomography. *BMC Neurosci* 5:27.
- Kessel M** and Pera E. 1998. Unexpected requirements for neural induction in the avian embryo. *Trends Genet* 14:169-171.
- Kimura Y**, Matsunami H, and Takeichi M. 1996. Expression of cadherin-11 delineates boundaries, neuromeres, and nuclei in the developing mouse brain. *Dev Dyn* 206:455-462.
- Kiss JZ**, Voorhuis TA, van Eekelen JA, de Kloet ER, and de Wied D. 1987. Organization of vasotocin-immunoreactive cells and fibers in the canary brain. *J Comp Neurol* 263:347-364.
- Komuro H** and Rakic P. 1996. Intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17:275-285.
- Kondo Y** and Arai Y. 1995. Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiol Behav* 57:69-73.
- Kondo Y** and Yamanouchi K. 1995. The possible involvement of the nonstriatal pathway of the amygdala in neural control of sexual behavior in male rats. *Brain Res Bull* 38:37-40.
- Kondo Y**. 1992. Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiol Behav* 51:939-943.
- Krebs JR**, Erichsen JT, and Bingman VP. 1991. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 314:467-477.
- Krettek JE** and Price JL. 1978. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178:255-280.

- Kroner S** and Gunturkun O. 1999. Afferent and efferent connections of the caudolateral neostriatum in the pigeon (*Columba livia*): a retro- and anterograde pathway tracing study. *J Comp Neurol* 407:228-260.
- Kuenzel WJ** and Blahser S. 1994. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing neurons: distribution throughout the brain of the chick (*Gallus domesticus*) with focus upon the lateral septal organ. *Cell Tissue Res* 275:91-107.
- Kuenzel WJ** and Masson M. 1988. A stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Kuenzel WJ** and McMurtry J. 1988. Neuropeptide Y: brain localization and central effects on plasma insulin levels in chicks. *Physiol Behav* 44:669-678.
- Kuenzel WJ** and Van Tienhoven A. 1982. Nomenclature and location of avian hypothalamic nuclei and associated circumventricular organs. *J Comp Neurol* 206:293-313.
- Kuenzel WJ**, Mccune SK, Talbot RT, Sharp PJ, and Hill JM. 1997. Sites of gene expression for vasoactive intestinal polypeptide throughout the brain of the chick (*Gallus domesticus*). *J Comp Neurol* 381:101-118.
- Kuenzel WJ**. 1993. The search for deep encephalic photoreceptors within the avian brain, using gonadal development as a primary indicator. *Poult Sci* 72:959-967.
- Kuhlenbeck H**. 1977. The central nervous system of vertebrates. Vol. 5, I : Derivatives of the prosencephalon : diencephalon and telencephalon. Karger Basel New York.
- Kuiper GG**, Shughrue PJ, Merchenthaler I, and Gustafsson JA. 1998. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19:253-286.
- Lanuz E** and Halpern M. 1998. Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the snake *Thamnophis sirtalis*. *Brain Behav Evol* 51:1-22.
- Lanuz E**, Davies DC, Landete JM, Novejarque A, and Martínez-García F. 2000. Distribution of CGRP-like immunoreactivity in the chick and quail brain. *J Comp Neurol* 421:515-532.
- Lanuz E**, Font C, Martínez-Marcos A, and Martínez-García F. 1997. Amygdalo-hypothalamic projections in the lizard *Podarcis hispanica*: a combined anterograde and retrograde tracing study. *J Comp Neurol* 384:537-555.
- Lanuz E**, Martínez-Marcos A, and Martínez-García F. 1999. What is the amygdala? A comparative approach. *Trends Neurosci* 22:207-208.
- Lanuz E**, Novejarque A, Moncho-Bogani J, Hernández A, and Martínez-García F. 2002. Understanding the basic circuitry of the cerebral hemispheres: the case of lizards and its implications in the evolution of the telencephalon. *Brain Res Bull* 57:471-473.
- Le TN**, Du G, Fonseca M, Zhou QP, Wigle JT, and Eisenstat DD. 2007. DLX homeobox genes promote cortical interneuron migration from the basal forebrain by direct repression of the semaphorin receptor neuropilin-2. *J Biol Chem*.
- LeDoux JE**. 1992. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol* 2:191-197.
- LeDoux JE**. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.



- Legaz I**, García-López M, and Medina L. 2005. Subpallial origin of part of the calbindin-positive neurons of the claustral complex and piriform cortex. *Brain Res Bull* 66:470-474.
- Legaz I**, Olmos L, Real MA, Guirado S, Dávila JC, and Medina L. 2005. Development of neurons and fibers containing calcium binding proteins in the pallial amygdala of mouse, with special emphasis on those of the basolateral amygdalar complex. *J Comp Neurol* 488:492-513.
- Lehman MN** and Winans SS. 1982. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res* 240:27-41.
- Lehman MN**, Winans SS, and Powers JB. 1980. Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science* 210:557-560.
- Leuba G**, Kraftsik R, and Saini K. 1998. Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Exp Neurol* 152:278-291.
- Lopez JM** and González A. 2002. Ontogeny of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase reactivity in the brain of *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 445:59-77.
- Lowndes M** and Davies DC. 1994. The effects of archistriatal lesions on one-trial passive avoidance learning in the chick. *Eur J Neurosci* 6:525-530.
- Marín O** and Rubenstein JL. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-790.
- Marín O** and Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.
- Marín O**, Anderson SA, and Rubenstein JL. 2000. Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20:6063-6076.
- Marín O**, Baker J, Puelles L, and Rubenstein JL. 2002. Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 129:761-773.
- Marín O**, Plump AS, Flames N, Sánchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, and Rubenstein JL. 2003. Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130:1889-1901.
- Marín O**, Smeets WJ, and González A. 1997. Basal ganglia organization in amphibians: development of striatal and nucleus accumbens connections with emphasis on the catecholaminergic inputs. *J Comp Neurol* 383:349-369.
- Marín O**, Smeets WJ, and González A. 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends Neurosci* 21:487-494.
- Martínez S** and Puelles L. 2000. Neurogenetic compartments of the mouse diencephalon and some characteristic gene expression patterns. *Results Probl Cell Differ* 30:91-106.
- Martínez-García F**, Martínez-Marcos A, and Lanuza E. 2002. The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Res Bull* 57:463-469.
- Martínez-García F**, Novejarque A, and Lanuza E. 2006. Evolution of the amygdala in vertebrates. *En Evolution of nervous system Academic Press*.

- Martínez-Guijarro FJ** and Freund TF. 1992. Distribution of GABAergic interneurons immunoreactive for calretinin, calbindin D28K, and parvalbumin in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol* 322:449-460.
- Martínez-Marcos A** and Halpern M. 1999. Differential centrifugal afferents to the anterior and posterior accessory olfactory bulb. *Neuroreport* 10:2011-2015.
- Martínez-Marcos A** and Halpern M. 1999. Differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb to the medial amygdala in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Eur J Neurosci* 11:3789-3799.
- Martínez-Marcos A**, Lanuza E, and Halpern M. 1999. Organization of the ophidian amygdala: chemosensory pathways to the hypothalamus. *J Comp Neurol* 412:51-68.
- Masco DH** and Carrer HF. 1980. Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol Behav* 24:1073-1080.
- Masliah E**, Ge N, Achim CL, and Wiley CA. 1995. Differential vulnerability of calbindin-immunoreactive neurons in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:350-357.
- Matsunaga M**, Hatta K, and Takeichi M. 1988. Role of N-cadherin cell adhesion molecules in the histogenesis of neural retina. *Neuron* 1:289-295.
- McDonald AJ** and Culberson JL. 1986. Efferent projections of the basolateral amygdala in the opossum, *Didelphis virginiana*. *Brain Res Bull* 17:335-350.
- McDonald AJ**. 1982. Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 208:401-418.
- McDonald AJ**. 1983. Neurons of the bed nucleus of the stria terminalis: a golgi study in the rat. *Brain Res Bull* 10:111-120.
- McDonald AJ**. 1985. Immunohistochemical identification of gamma-aminobutyric acid-containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci Lett* 53:203-207.
- McDonald AJ**. 1992. Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res Bull* 28:179-185.
- McDonald AJ**. 2003. Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci* 985:1-21.
- Medina L** and Reiner A. 1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J Comp Neurol* 342:497-537.
- Medina L** and Reiner A. 1995. Neurotransmitter organization and connectivity of the basal ganglia in vertebrates: implications for the evolution of basal ganglia. *Brain Behav Evol* 46:235-258.
- Medina L** and Reiner A. 1997. The efferent projections of the dorsal and ventral pallidal parts of the pigeon basal ganglia, studied with biotinylated dextran amine. *Neuroscience* 81:773-802.
- Medina L** and Reiner A. 2000. Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? *Trends Neurosci* 23:1-12.
- Medina L**, Legaz I, González G, De Castro F, Rubenstein JL, and Puelles L. 2004. Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex. *J Comp Neurol* 474:504-523.

- Metzdorf R**, Gahr M, and Fusani L. 1999. Distribution of aromatase, estrogen receptor, and androgen receptor mRNA in the forebrain of songbirds and nonsongbirds. *J Comp Neurol* 407:115-129.
- Meyer G**, Soria JM, Martínez-Galan JR, Martín-Clemente B, and Fairen A. 1998. Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J Comp Neurol* 397:493-518.
- Mezey S** and Csillag A. 2002. Selective striatal connections of midbrain dopaminergic nuclei in the chick (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res* 308:35-46.
- Miller MA**, Vician L, Clifton DK, and Dorsa DM. 1989. Sex differences in vasopressin neurons in the bed nucleus of the stria terminalis by in situ hybridization. *Peptides* 10:615-619.
- Millhouse OE** and DeOlmos J. 1983. Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience* 10:1269-1300.
- Moga MM**, Saper CB, and Gray TS. 1989. Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 283:315-332.
- Moga MM**, Weis RP, and Moore RY. 1995. Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 359:221-238.
- Moreno N** and González A. 2005. Forebrain projections to the hypothalamus are topographically organized in anurans: conservative traits as compared with amniotes. *Eur J Neurosci* 21:1895-1910.
- Moreno N** and González A. 2006. The common organization of the amygdaloid complex in tetrapods: new concepts based on developmental, hodological and neurochemical data in anuran amphibians. *Prog Neurobiol* 78:61-90.
- Moreno-López B** and González-Forero D. 2006. Nitric oxide and synaptic dynamics in the adult brain: physiopathological aspects. *Rev Neurosci* 17:309-357.
- Morgane PJ**, Galler JR, and Mokler DJ. 2005. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 75:143-160.
- Morys J**, Berdel B, Kowianski P, and Dziewiatkowski J. 1998. The pattern of synaptophysin changes during the maturation of the amygdaloid body and hippocampal hilus in the rat. *Folia Neuropathol* 36:15-23.
- Mufson EJ**, Cai WJ, Jaffar S, Chen E, Stebbins G, Sendera T, and Kordower JH. 1999. Estrogen receptor immunoreactivity within subregions of the rat forebrain: neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase. *Brain Res* 849:253-274.
- Muller CM** and Scheich H. 1988. Contribution of GABAergic inhibition to the response characteristics of auditory units in the avian forebrain. *J Neurophysiol* 59:1673-1689.
- Muller CM**. 1988. Distribution of GABAergic perikarya and terminals in the centers of the higher auditory pathway of the chicken. *Cell Tissue Res* 252:99-106.
- Muller JF**, Mascagni F, and McDonald AJ. 2003. Synaptic connections of distinct interneuronal subpopulations in the rat basolateral amygdalar nucleus. *J Comp Neurol* 456:217-236.
- Nieuwenhuys R**. 1998. *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer, Berlin-Heidelberg.

- Noack H**, Lindenau J, Rothe F, Asayama K, and Wolf G. 1998. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitergic stress. *Glia* 23:285-297.
- Norris PJ**, Waldvogel HJ, Faull RL, Love DR, and Emson PC. 1996. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience* 72:1037-1047.
- Novejarque A**, Lanuza E, and Martínez-García F. 2004. Amygdalostriatal projections in reptiles: a tract-tracing study in the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol* 479:287-308.
- Olmos JL**, Real MA, Medina L, Guirado S, and Dávila JC. 2005. Distribution of nitric oxide-producing neurons in the developing and adult mouse amygdalar basolateral complex. *Brain Res Bull* 66:465-469.
- Ono T** and Nakamura K. 1985. Learning and integration of rewarding and aversive stimuli in the rat lateral hypothalamus. *Brain Res* 346:368-373.
- Ottersen OP**. 1982. Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 205:30-48.
- Panganiban G** and Rubenstein JL. 2002. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 129:4371-4386.
- Panzica GC**, Arévalo R, Sánchez F, Alonso JR, Aste N, Viglietti-Panzica C, Aijon J, and Vázquez R. 1994. Topographical distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the brain of the Japanese quail. *J Comp Neurol* 342:97-114.
- Panzica GC**, Aste N, Viglietti-Panzica C, and Ottinger MA. 1995. Structural sex differences in the brain: influence of gonadal steroids and behavioral correlates. *J Endocrinol Invest* 18:232-252.
- Panzica GC**, Castagna C, Aste N, Viglietti-Panzica C, and Balthazart J. 1996. Testosterone effects on the neuronal ultrastructure in the medial preoptic nucleus of male Japanese quail. *Brain Res Bull* 39:281-292.
- Panzica GC**, Castagna C, Viglietti-Panzica C, Russo C, Tlemcani O, and Balthazart J. 1998. Organizational effects of estrogens on brain vasotocin and sexual behavior in quail. *J Neurobiol* 37:684-699.
- Panzica GC**, Fiori MG, and Viglietti-Panzica C. 1986. Vasotocin fibers in the mesencephalon and pons of the domestic fowl. An immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 68:155-159.
- Panzica GC**, Viglietti-Panzica C, Fasolo A, and Vandesande F. 1986. CRF-like immunoreactive system in the quail brain. *J Hirnforsch* 27:539-547.
- Paxinos G** and Franklin KBJ. 2001. The mouse brain in stereotaxis coordinates. Academic Press.
- Paxinos G** and Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed Academic Press.
- Pera EM** and Kessel M. 1998. Demarcation of ventral territories by the homeobox gene NKX2.1 during early chick development. *Dev Genes Evol* 208:168-171.

- Perez SE**, Chen EY, and Mufson EJ. 2003. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 145:117-139.
- Pérez-Santana L**, Marín O, and Smeets WJ. 1997. Afferent connections of the nucleus accumbens of the snake, *Elaphe guttata*, studied by means of in vitro and in vivo tracing techniques in combination with TH immunohistochemistry. *Neurosci Lett* 225:101-104.
- Petrovich GD**, Risold PY, and Swanson LW. 1996. Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 374:387-420.
- Petrovich GD**, Scicli AP, Thompson RF, and Swanson LW. 2000. Associative fear conditioning of enkephalin mRNA levels in central amygdalar neurons. *Behav Neurosci* 114:681-686.
- Phillips RE** and Youngren OM. 1986. Unilateral kainic acid lesions reveal dominance of right archistriatum in avian fear behavior. *Brain Res* 377:216-220.
- Phillips RE**. 1964. "Wildness" in the mallard duck: effects of brain lesions and stimulation on "escape behavior" and reproduction. *J Comp Neurol* 122:139-155.
- Pikkarainen M**, Rönkkö S, Savander V, Insausti R, and Pitkänen A. 1999. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* 403:229-260.
- Pineda D**, García B, Olmos JL, Dávila JC, Real MA, and Guirado S. 2005. Semaphorin5A expression in the developing chick telencephalon. *Brain Res Bull* 66:436-440.
- Pitkänen A** and Amaral DG. 1994. The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci* 14:2200-2224.
- Pitkänen A**, Jolkkonen E, and Kempainen S. 2000. Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphol (Warsz )* 59:1-23.
- Pitkänen A**, Savander V, and LeDoux JE. 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20:517-523.
- Pleasure SJ**, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marín O, Lowenstein DH, and Rubenstein JL. 2000. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28:727-740.
- Price DJ**, Russchen FT, and Amaral DG. 1987. The limbic region. II. The amygdaloid complex. *Handbook of chemical neuroanatomy Amsterdam Elsevier*.
- Puelles L** and Medina L. 2002. Field homology as a way to reconcile genetic and developmental variability with adult homology. *Brain Res Bull* 57:243-255.
- Puelles L** and Rubenstein JL. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16:472-479.
- Puelles L** and Rubenstein JL. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Puelles L**, Kuwana E, Puelles E, and Rubenstein JL. 1999. Comparison of the mammalian and avian telencephalon from the perspective of gene expression data. *Eur J Morphol* 37:139-150.

- Puelles L**, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, and Rubenstein JL. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424:409-438.
- Puelles L**, Sánchez MP, Spreafico R, and Fairen A. 1992. Prenatal development of calbindin immunoreactivity in the dorsal thalamus of the rat. *Neuroscience* 46:135-147.
- Puelles L**. 1995. A segmental morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav Evol* 46:319-337.
- Puelles L**. 2001. Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res Bull* 55:695-710.
- Puelles L**. 2001. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1583-1598.
- Rajendren G** and Moss RL. 1993. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Res* 617:81-86.
- Real MA**, Dávila JC, and Guirado S. 2003. Expression of calcium-binding proteins in the mouse claustrum. *J Chem Neuroanat* 25:151-160.
- Redies C** and Puelles L. 2001. Modularity in vertebrate brain development and evolution. *Bioessays* 23:1100-1111.
- Redies C** and Takeichi M. 1993. Expression of N-cadherin mRNA during development of the mouse brain. *Dev Dyn* 197:26-39.
- Redies C**, Engelhart K, and Takeichi M. 1993. Differential expression of N- and R-cadherin in functional neuronal systems and other structures of the developing chicken brain. *J Comp Neurol* 333:398-416.
- Redies C**, Kovjanic D, Heyers D, Medina L, Hirano S, Suzuki ST, and Puelles L. 2002. Patch/matrix patterns of gray matter differentiation in the telencephalon of chicken and mouse. *Brain Res Bull* 57:489-493.
- Redies C**, Medina L, and Puelles L. 2001. Cadherin expression by embryonic divisions and derived gray matter structures in the telencephalon of the chicken. *J Comp Neurol* 438:253-285.
- Redies C**. 1995. Cadherin expression in the developing vertebrate CNS: from neuromeres to brain nuclei and neural circuits. *Exp Cell Res* 220:243-256.
- Redies C**. 1997. Cadherins and the formation of neural circuitry in the vertebrate CNS. *Cell Tissue Res* 290:405-413.
- Redies C**. 2000. Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 61:611-648.
- Reiner A** and Anderson KD. 1990. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 15:251-265.
- Reiner A** and Carraway RE. 1987. Immunohistochemical and biochemical studies on Lys8-Asn9-neurotensin8-13 (LANT6)-related peptides in the basal ganglia of pigeons, turtles, and hamsters. *J Comp Neurol* 257:453-476.

- Reiner A** and Karten HJ. 1982. Laminar distribution of the cells of origin of the descending tectofugal pathways in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 204:165-187.
- Reiner A** and Karten HJ. 1985. Comparison of olfactory bulb projections in pigeons and turtles. *Brain Behav Evol* 27:11-27.
- Reiner A**, Davis BM, Brecha NC, and Karten HJ. 1984. The distribution of enkephalinlike immunoreactivity in the telencephalon of the adult and developing domestic chicken. *J Comp Neurol* 228:245-262.
- Reiner A**, Karten HJ, and Solina AR. 1983. Substance P: localization within paleostriatal-tegmental pathways in the pigeon. *Neuroscience* 9:61-85.
- Reiner A**, Medina L, and Veenman CL. 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 28:235-285.
- Reiner A**, Perera M, Paullus R, and Medina L. 1998. Immunohistochemical localization of DARPP32 in striatal projection neurons and striatal interneurons in pigeons. *J Chem Neuroanat* 16:17-33.
- Reiner A**, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M, Ball GF, Durand S, Güntürkün O, Lee DW, Mello CV, Powers A, White SA, Hough G, Kubikova L, Smulders TV, Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang C, and Jarvis ED. 2004. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol* 473:377-414.
- Reiner A**, Yamamoto K, and Karten HJ. 2005. Organization and evolution of the avian forebrain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287:1080-1102.
- Ricardo JA** and Koh ET. 1978. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1-26.
- Richard S**, Martínez-García F, Lanuza E, and Davies DC. 2004. Distribution of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the central nervous system of the domestic chicken and Japanese quail. *J Comp Neurol* 469:559-580.
- Roberts TF**, Hall WS, and Brauth SE. 2002. Organization of the avian basal forebrain: chemical anatomy in the parrot (*Melopsittacus undulatus*). *J Comp Neurol* 454:383-408.
- Rodrigo J**, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martínez-Murillo R, Polak JM, and Moncada S. 1994. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:175-221.
- Rogers JH**. 1987. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol* 105:1343-1353.
- Roselli CE**, Abdelgadir SE, and Resko JA. 1997. Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. *Brain Res Bull* 44:351-357.
- Roselli CE**, Horton LE, and Resko JA. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117:2471-2477.
- Rosen JB**, Hitchcock JM, Sananes CB, Miserendino MJ, and Davis M. 1991. A direct projection from the central nucleus of the amygdala to the acoustic startle pathway: anterograde and retrograde tracing studies. *Behav Neurosci* 105:817-825.

- Rothe F**, Canzler U, and Wolf G. 1998. Subcellular localization of the neuronal isoform of nitric oxide synthase in the rat brain: a critical evaluation. *Neuroscience* 83:259-269.
- Rubenstein JL** and Puelles L. 1994. Homeobox gene expression during development of the vertebrate brain. *Curr Top Dev Biol* 29:1-63.
- Rubenstein JL**, Anderson S, Shi L, Miyashita-Lin E, Bulfone A, and Hevner R. 1999. Genetic control of cortical regionalization and connectivity. *Cereb Cortex* 9:524-532.
- Rubenstein JL**, Martínez S, Shimamura K, and Puelles L. 1994. The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266:578-580.
- Sánchez MP**, Frassoni C, Álvarez-Bolado G, Spreafico R, and Fairen A. 1992. Distribution of calbindin and parvalbumin in the developing somatosensory cortex and its primordium in the rat: an immunocytochemical study. *J Neurocytol* 21:717-736.
- Satoh K**, Arai R, Ikemoto K, Narita M, Nagai T, Ohshima H, and Kitahama K. 1995. Distribution of nitric oxide synthase in the central nervous system of *Macaca fuscata*: subcortical regions. *Neuroscience* 66:685-696.
- Schane FA**, Kane AB, Young EE, and Farber JL. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206:700-702.
- Scordalakes EM**, Shetty SJ, and Rissman EF. 2002. Roles of estrogen receptor alpha and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. *J Comp Neurol* 453:336-344.
- Seo-Hiraiwa ML**, Seto-Ohshima A, and Kato K. 1995. The surface evoked potential and parvalbumin-immunoreactivity in the somatosensory cortex of the developing rat. *Dev Psychobiol* 28:337-351.
- Seto-Ohshima A**, Aoki E, Semba R, Emson PC, and Heizmann CW. 1990. Parvalbumin immunoreactivity in the central auditory system of the gerbil: a developmental study. *Neurosci Lett* 119:60-63.
- Shammah-Lagnado SJ**, Beltramino CA, McDonald AJ, Miselis RR, Yang M, de Olmos J, Heimer L, and Alheid GF. 2000. Supracapsular bed nucleus of the stria terminalis contains central and medial extended amygdala elements: evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *J Comp Neurol* 422:533-555.
- Shimamura K**, Hirano S, McMahon AP, and Takeichi M. 1994. Wnt-1-dependent regulation of local E-cadherin and alpha N-catenin expression in the embryonic mouse brain. *Development* 120:2225-2234.
- Shimamura K**, Martínez S, Puelles L, and Rubenstein JL. 1997. Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains. *Dev Neurosci* 19:88-96.
- Shimizu T** and Karten HJ. 1990. Immunohistochemical analysis of the visual wulst of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 300:346-369.
- Shughrue PJ** and Merchenthaler I. 2000. Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience* 99:605-612.
- Shughrue PJ** and Merchenthaler I. 2001. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 436:64-81.



- Shughrue PJ**, Dellovade TL, and Merchenthaler I. 2002. Estrogen modulates oxytocin gene expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor-beta. *Prog Brain Res* 139:15-29.
- Shughrue PJ**, Lane MV, and Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525.
- Shughrue PJ**, Scrimo PJ, and Merchenthaler I. 1998. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology* 139:5267-5270.
- Siesjo BK**. 1986. Calcium and ischemic brain damage. *Eur Neurol* 25 Suppl 1:45-56.
- Simerly RB**, Chang C, Muramatsu M, and Swanson LW. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 294:76-95.
- Simerly RB**. 1990. Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends Neurosci* 13:104-110.
- Smith Y and Pare D**. 1994. Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 342:232-248.
- Smith-Fernández A**, Pieau C, Reperant J, Boncinelli E, and Wassef M. 1998. Expression of the *Emx-1* and *Dlx-1* homeobox genes define three molecularly distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos: implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes. *Development* 125:2099-2111.
- Solbach S** and Celio MR. 1991. Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 184:103-124.
- Stefanacci L** and Amaral DG. 2002. Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 451:301-323.
- Stichel CC**, Singer W, Heizmann CW, and Norman AW. 1987. Immunohistochemical localization of calcium-binding proteins, parvalbumin and calbindin-D 28k, in the adult and developing visual cortex of cats: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 262:563-577.
- Stork O**, Welzl H, Wolfer D, Schuster T, Mantei N, Stork S, Hoyer D, Lipp H, Obata K, and Schachner M. 2000. Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM) null mutant mice through transgenic expression of NCAM180. *Eur J Neurosci* 12:3291-3306.
- Stork O**, Welzl H, Wotjak CT, Hoyer D, Delling M, Cremer H, and Schachner M. 1999. Anxiety and increased 5-HT1A receptor response in NCAM null mutant mice. *J Neurobiol* 40:343-355.
- Stoykova A**, Gotz M, Gruss P, and Price J. 1997. Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development* 124:3765-3777.
- Striedter GF** and Beydler S. 1997. Distribution of radial glia in the developing telencephalon of chicks. *J Comp Neurol* 387:399-420.
- Striedter GF**. 1997. The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol* 49:179-213.
- Stühmer T**, Anderson SA, Ekker M, and Rubenstein JL. 2002. Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* 129:245-252.

- Suárez J**, Dávila JC, Real MA, and Guirado S. 2005. Distribution of GABA, calbindin and nitric oxide synthase in the developing chick entopallium. *Brain Res Bull* 66:441-444.
- Suárez J**, Dávila JC, Real MA, Guirado S, and Medina L. 2006. Calcium-binding proteins, neuronal nitric oxide synthase, and GABA help to distinguish different pallial areas in the developing and adult chicken. I. Hippocampal formation and hyperpallium. *J Comp Neurol* 497:751-771.
- Sun Z**, Wang HB, Laverghetta A, Yamamoto K, and Reiner A. 2005. The distribution and cellular localization of glutamic acid decarboxylase-65 (GAD65) mRNA in the forebrain and midbrain of domestic chick. *J Chem Neuroanat* 29:265-281.
- Sussel L**, Marín O, Kimura S, and Rubenstein JL. 1999. Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.
- Swanson LW** and Petrovich GD. 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331.
- Swanson LW**. 2000. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res* 886:113-164.
- Swanson LW**. 2000. What is the brain? *Trends Neurosci* 23:519-527.
- Szekely AD** and Krebs JR. 1996. Efferent connectivity of the hippocampal formation of the zebra finch (*Taenopygia guttata*): an anterograde pathway tracing study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 368:198-214.
- Takeichi M**. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619-627.
- Thompson RR**, Goodson JL, Ruscio MG, and Adkins-Regan E. 1998. Role of the archistriatal nucleus taeniae in the sexual behavior of male Japanese quail (*Coturnix japonica*): a comparison of function with the medial nucleus of the amygdala in mammals. *Brain Behav Evol* 51:215-229.
- Tuorto F**, Alifragis P, Failla V, Parnavelas JG, and Gulisano M. 2003. Tangential migration of cells from the basal to the dorsal telencephalic regions in the chick. *Eur J Neurosci* 18:3388-3393.
- Uchida N**, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, and Takeichi M. 1996. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol* 135:767-779.
- Usunoff KG**, Itzev DE, Rolfs A, Schmitt O, and Wree A. 2006. Nitric oxide synthase-containing neurons in the amygdaloid nuclear complex of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 211:721-737.
- Valcourt RJ** and Sachs BD. 1979. Penile reflexes and copulatory behavior in male rats following lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res Bull* 4:131-133.
- Valtschanoff JG**, Weinberg RJ, Kharazia VN, Nakane M, and Schmidt HH. 1993. Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J Comp Neurol* 331:111-121.
- Van Leeuwen FW**, Caffé AR, and De Vries GJ. 1985. Vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: sex differences and the influence of androgens. *Brain Res* 325:391-394.
- Van Tienhoven A** and Juhasz LP. 1962. The chicken telencephalon, diencephalon and mesencephalon in stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol* 118:185-197.

- Veenman CL**, Albin RL, Richfield EK, and Reiner A. 1994. Distributions of GABAA, GABAB, and benzodiazepine receptors in the forebrain and midbrain of pigeons. *J Comp Neurol* 344:161-189.
- Veenman CL**, Medina L, and Reiner A. 1997. Avian homologues of mammalian intralaminar, mediodorsal and midline thalamic nuclei: immunohistochemical and hodological evidence. *Brain Behav Evol* 49:78-98.
- Veenman CL**, Wild JM, and Reiner A. 1995. Organization of the avian "corticoatrial" projection system: a retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons. *J Comp Neurol* 354:87-126.
- Vigh B**, Manzano e Silva MJ, Frank CL, Vincze C, Czirok SJ, Szabo A, Lukats A, and Szel A. 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol Histopathol* 19:607-628.
- Viglietti-Panzica C**, Aste N, Balthazart J, and Panzica GC. 1994. Vasotocinergic innervation of sexually dimorphic medial preoptic nucleus of the male Japanese quail: influence of testosterone. *Brain Res* 657:171-184.
- Vincent SR** and Kimura H. 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-784.
- Voorhuis TA** and de Kloet ER. 1992. Immunoreactive vasotocin in the zebra finch brain (*Taeniopygia guttata*). *Brain Res Dev Brain Res* 69:1-10.
- Voorhuis TA**, Kiss JZ, de Kloet ER, and de Wied D. 1988. Testosterone-sensitive vasotocin-immunoreactive cells and fibers in the canary brain. *Brain Res* 442:139-146.
- Wang Z**, Bullock NA, and De Vries GJ. 1993. Sexual differentiation of vasopressin projections of the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdaloid nucleus in rats. *Endocrinology* 132:2299-2306.
- Wang Z**, Moody K, Newman JD, and Insel TR. 1997. Vasopressin and oxytocin immunoreactive neurons and fibers in the forebrain of male and female common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Synapse* 27:14-25.
- Watson JT** and Adkins-Regan E. 1989. Neuroanatomical localization of sex steroid-concentrating cells in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): autoradiography with [3H]-testosterone, [3H]-estradiol, and [3H]-dihydrotestosterone. *Neuroendocrinology* 49:51-64.
- Wild JM**, Arends JJ, and Zeigler HP. 1990. Projections of the parabrachial nucleus in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 293:499-523.
- Wild JM**. 1987. Thalamic projections to the paleostriatum and neostriatum in the pigeon (*Columba livia*). *Neuroscience* 20:305-327.
- Wild JM**. 1987. The avian somatosensory system: connections of regions of body representation in the forebrain of the pigeon. *Brain Res* 412:205-223.
- Williams NM**, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Zammit S, O'Donovan MC, and Owen MJ. 2003. Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:485-487.
- Wood JM**, Swann PG, and Stavrou EP. 2000. Visual fields in glaucoma: a clinical overview. *Clin Exp Optom* 83:128-135.

- Wood RI** and Coolen LM. 1997. Integration of chemosensory and hormonal cues is essential for sexual behaviour in the male Syrian hamster: role of the medial amygdaloid nucleus. *Neuroscience* 78:1027-1035.
- Yamamoto K**, Sun Z, Wang HB, and Reiner A. 2005. Subpallial amygdala and nucleus taeniae in birds resemble extended amygdala and medial amygdala in mammals in their expression of markers of regional identity. *Brain Res Bull* 66:341-347.
- Yan XX** and Garey LJ. 1997. Morphological diversity of nitric oxide synthesising neurons in mammalian cerebral cortex. *J Hirnforsch* 38:165-172.
- Yan XX**, Garey LJ, and Jen LS. 1996. Prenatal development of NADPH-diaphorase-reactive neurons in human frontal cortex. *Cereb Cortex* 6:737-745.
- Yan YH**, Van Brederode JF, and Hendrickson AE. 1995. Transient co-localization of calretinin, parvalbumin, and calbindin-D28K in developing visual cortex of monkey. *J Neurocytol* 24:825-837.
- Yang JZ**, Si TM, Ruan Y, Ling YS, Han YH, Wang XL, Zhou M, Zhang HY, Kong QM, Liu C, Zhang DR, Yu YQ, Liu SZ, Ju GZ, Shu L, Ma DL, and Zhang D. 2003. Association study of neuregulin 1 gene with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:706-709.
- Yoon MS**, Puelles L, and Redies C. 2000. Formation of cadherin-expressing brain nuclei in diencephalic alar plate divisions. *J Comp Neurol* 427:461-480.
- Yoon MS**, Puelles L, and Redies C. 2000. Formation of cadherin-expressing brain nuclei in diencephalic alar plate divisions. *J Comp Neurol* 421:461-480.
- Yun HY**, Dawson VL, and Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10:291-316.
- Zeier H** and Karten HJ. 1971. The archistriatum of the pigeon: organization of afferent and efferent connections. *Brain Res* 31:313-326.
- Zhang J** and Snyder SH. 1995. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:213-233.

**Daniel Pineda Tenor**  
**2007**