



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

La columna longitudinal tectal dorsal: Una segunda columna longitudinal en la región paramediana del techo del mesencéfalo

M.^a Auxiliadora Aparicio Vaquero

Director: Enrique Saldaña Fernández

Salamanca, 2013

Universidad de Salamanca
Departamento de Biología
Celular y Patología



**VNiVERSiDAD
DE SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**La columna longitudinal tectal dorsal:
Una segunda columna longitudinal
en la región paramediana del
techo del mesencéfalo**

M.ª Auxiliadora Aparicio Vaquero

Director: Enrique Saldaña Fernández

Salamanca, 2013



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y

PATOLOGÍA

Avda. Alfonso X, el Sabio, s/n, 37007. Salamanca

Tel.: +34 923 29 45 00, ext. 1881

Fax: +34 923 29 45 49

saldana@usal.es

D. Enrique Saldaña Fernández, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca e investigador del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL),

C E R T I F I C A

Que la Tesis Doctoral titulada “**La columna longitudinal tectal dorsal: Una segunda columna longitudinal en la región paramediana del techo mesencefálico**” ha sido realizada por la Lda. D.^a M.^a Auxiliadora Aparicio Vaquero bajo mi dirección. Este Trabajo es fruto de años de esfuerzos y la consecuencia lógica de la ilusión, la dedicación, la constancia y el buen hacer de la Lda. Aparicio. Se trata de una obra sumamente original que reúne con creces las dosis de calidad y rigor científicos necesarias para que se proceda a su mantenimiento y defensa con el fin de optar al Grado de Doctor.

Lo que firmo en Salamanca a quince de julio de dos mil trece.

Fdo.: Enrique Saldaña Fernández

Este trabajo ha sido posible gracias a dos subvenciones del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyectos BFI2000-1358 y BFU2004-05909), una del Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto BFU2008-04197/BFI), una del Instituto de Salud Carlos III (PI10/01803), dos de la Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León (proyectos SA079/01 y SA007C05), y una de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, así como a una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2002-3330).

AGRADECIMIENTOS

Queridos amigos:

Por fin tenéis en vuestras manos este Trabajo que tanto se ha hecho desear. Siento que con su lectura se cierran varias etapas en mi vida. Echo la vista atrás y compruebo emocionada que no he realizado este camino sola. Tengo mucha suerte de haber podido contar con vuestro acompañamiento en los buenos momentos, con vuestra alegría por mis descubrimientos, que eran también vuestros, y con vuestro sostén y apoyo en las etapas más difíciles y, muy en especial, en la dura recta final.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento más sincero a mi director y maestro, el Prof. Enrique Saldaña. El ha creído en mí en todo momento, en mis posibilidades y en mis ilusiones. Ha tenido mucha paciencia conmigo, sobre todo cuando, por avatares laborales, mi distanciamiento del laboratorio retrasó la culminación de esta Tesis. Realizar una buena investigación y, más aún, un buen trabajo requiere, entre otras aptitudes, de espíritu continuo de superación, de inagotable esfuerzo y de ilusión desbordante. Estos son atributos que intento aplicar cada día con humildad y esfuerzo renovado en mi práctica médica, y puedo decir con orgullo que los he aprendido en mi trayectoria como investigadora junto a mi director. Han sido varios los años dedicados a este Trabajo, en los que he descubierto también que, aunque aparentemente puede ser más importante llegar a tiempo, en el fondo lo esencial es llegar al final con otros, aprendiendo de cada escollo y disfrutando siempre del trabajo juntos, porque sólo así se llega más lejos. ¡Gracias, Enrique!

Me gustaría expresar también mi gratitud a la familia de mi Director: a su esposa, Maylo, de la que destaco su generosidad y paciencia; a Mari y Miguel, por su enorme cariño y su “jaúpa!” diario; y a Carlos, cuya determinación para conseguir sus logros es un gran ejemplo para mí.

Pasé aproximadamente 13 años vinculada al Departamento de Biología Celular y Patología: 5 como alumna interna, 4 como becaria FPU y 4 como residente de Anatomía Patológica. Según las etapas, lo que se aporta, lo que se comparte y las relaciones con compañeros, profesores y adjuntos fueron cambiando. Expreso mi cariño a aquellos que me instaron a trabajar por el bien común, no sólo por la tarea particular; a los que me enseñaron con ilusión y hasta con pasión; a los que contribuyeron a crear una convivencia agradable, y a los que, especialmente en estos últimos tiempos, me han apoyado, han creído y confiado en mí y en este Trabajo. Quiero destacar aquí la ayuda del Dr. Viñuela, que realizó algunos de los

experimentos de inyección en la CLTd durante su etapa doctoral en el Laboratorio, y al Dr. Cervera-Paz, que generosamente compartió con nosotros la colección de secciones de cerebros de mono de Java del Servicio de Otorrinolaringología de la Clínica Universitaria de Navarra.

Un pilar esencial en mi vida, que está presente en todo lo que hago y, cómo no, también en cada página de esta Memoria, es mi familia en la fe: mi Comunidad de Fe y Luz “Abba”, mi grupo de liturgia de la Eucaristía de las 12 de la Purísima y, más recientemente, mi grupo de peregrinación a Israel. Gracias porque, ocurra lo que ocurra, nunca me falta vuestra oración profunda, mimo sincero y fuerte sostén.

Los buenos amigos están especialmente cercanos en los malos ratos y esta Tesis ha tenido unos cuántos. Gabi y Juan (y los chicos), Jesús, Susana, Gema, Pilar, Isabel, Yoli y Rafa: gracias por no dejarme pasar los últimos meses sola, por demostrarre vuestra cariño y empeñaros en tenerme cerca de vosotros. A pesar de la distancia, de las circunstancias, de las dificultades, siempre, ¡siempre! tengo el ánimo, la presencia y la fuerza de mis “amigas históricas” Beatriz, Lorena y Esther: me dais mucho más de aquéllo con lo que yo os puedo corresponder.

He dejado para el final a mi familia aunque deberían haber protagonizado las primeras líneas. Papá y Mamá: reconozco, aprecio y lamento mucho todo lo que habéis tenido que pasar por causa de este Trabajo. Papá: muchas gracias por darme tu bendición, por seguir acompañándome ahora más especialmente y por confiar tanto en mí. ¡Ojalá estés orgulloso! Mamá: sin tu trabajo, esfuerzo y sacrificios diarios, no seríamos nada. Juan: muchas gracias porque tu admiración, consejo, ejemplo y lucha constantes por mí son claves para no rendirme. Abuela: no olvido tu rectitud, sonrisa y la felicidad que anhelabas para mí. Tía Jani: gracias por estar siempre cerca, por tu entrega a los demás y por tu oración constante. Carmen: tu frescura, amistad y apertura me ayudan a sonreír cada día. Por todo esto y mucho más, os digo a vosotros especialmente con emoción y amor que sois lo más importante para mí; os quiero con locura y deseo de corazón ofreceros este Trabajo.

Por último, tú lo sabes todo.... para tí, para tí toda mi música....

**A los que amo tanto y ya no están.
A Papá.**

*“Poner todos los medios
como si todo dependiera de uno,
pero confiando totalmente en Dios,
porque todo depende de Él.”*

(San Ignacio de Loyola)

ÍNDICE

Preámbulo	1
Introducción	5
1 La columna longitudinal tectal (CLT)	7
1.1 Tamaño y posición	7
1.2 Citoarquitectura	10
1.3 Aferencias	13
1.4 Electrofisiología	16
1.5 Anatomía comparada	17
1.6 Función de la CLT	18
2 Dos columnas longitudinales tectales: la columna longitudinal tectal ventral (CLTv) y la columna longitudinal tectal dorsal (CLTd)	18
Capítulo 1. Citoarquitectura de la CLTd de la rata	21
1 Hipótesis	23
2 Objetivos	23
3 Diseño experimental	23
4 Resultados	25
4.1 Tamaño y posición de la CLTd	25
4.2 La CLTd es distinta por su citoarquitectura	31
4.3 La CLTd es distinta por su mieloarquitectura	34
4.4 La CLTd es neuroquímicamente distinta	38
4.5 La CLTd se distingue por la expresión basal de Fos	40
Capítulo 2. Conexiones nerviosas de la CLTd de la rata	43
1 Hipótesis	45
2 Objetivos	45
3 Diseño experimental	45
4 Resultados y discusión	47
4.1 Casos con inyección de BDA en la CLTd	47
4.1.1. Neuronas marcadas retrógradamente	56
4.1.1.1. Neuronas marcadas en la propia CLTd	56
4.1.1.2. Principales fuentes de proyección para la CLTd	56
4.1.1.3. Otras neuronas marcadas retrógradamente	58
4.1.2. Axones marcados	63
4.1.2.1. Destino principal de las proyecciones de la CLTd	64
4.1.2.2. Otros axones marcados	65
4.2 Casos con inyección de FluoroGold en el complejo lateral del tálamo	73
4.3 Resumen de las conexiones de la CLTd	77
Capítulo 3. Neuroanatomía comparada CLTd	79
1 Hipótesis	81
2 Objetivos	81
3 Diseño experimental	81
4 Resultados	82
4.1 Citoarquitectura de la CLTd de otras especies: Variaciones sistemáticas	82
4.2 Citoarquitectura de la CLTd del ratón (<i>Mus musculus</i>)	83
4.3 Citoarquitectura de la CLTd del conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	86
4.4 Citoarquitectura de la CLTd del gato (<i>Felis catus</i>)	90
4.5 Citoarquitectura de la CLTd del mono (<i>Macaca fascicularis</i>)	94
4.6 Citoarquitectura de la CLTd del hombre (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	97

Discusión general	103
1 La CLTd es un núcleo distinto	105
1.1 Diferencias entre la CLTd y la CLTv	107
1.2 Diferencias entre la CLTd y el CS	108
1.3 Tres columnas longitudinales en la región paramediana del techo de los mamíferos	112
2 ¿Cuál es el papel de la CLTd?	113
2.1 La CLTd como una fuente extratalámica de inhibición para el tálamo lateral ..	113
2.2 Significado biológico de la CLTd	114
Conclusiones	117
Materiales y métodos	121
1 Animales experimentales	123
2 Estudio citoarquitectónico	125
2.1 Fijación y tallado de los cerebros	125
2.1.1 Procesamiento de los cerebros de rata, ratón, conejo y gato	125
2.1.2 Procesamiento de los cerebros de mono de Java	127
2.1.3 Procesamiento de los cerebros humanos	128
2.2 Tinción	128
2.2.1 Tinción con violeta de cresilo	128
2.2.2 Tinción con tionina del cerebro del mono	130
2.2.3 Tinción con el método de Giemsa	130
2.2.4 Tinción con azul de toluidina	131
2.2.5 Tinción para fibras mielínicas con tetróxido de osmio	131
3 Hibridación <i>in situ</i>	132
4 Detección inmunocitoquímica de la proteína Fos	133
5 Técnicas de trazado de vías nerviosas	134
5.1 Trazadores	134
5.2 Procedimiento quirúrgico	134
5.3 Procesamiento histológico	135
5.3.1 Fijación, tallado y corte del encéfalo	135
5.3.2 Visualización histoquímica del trazador	136
6 Mapas de referencia	136
7 Técnicas estereológicas	137
8 Morfometría	137
9 Reconstrucción tridimensional	138
J Análisis de los resultados y elaboración de las figuras	139
Bibliografía citada	141
Publicaciones científicas	155
Anexo I	
Saldaña E, Viñuela A, Marshall AF, Fitzpatrick DC, Aparicio MA (2007) The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. <i>The Journal of Neuroscience</i> 27:13108–13116	155
Anexo II	
Aparicio MA , Saldaña E (2009) Tectotectal neurons and projections: a proposal to establish a consistent nomenclature. <i>Anatomical Record (Hoboken)</i> 292:175–177	167

Anexo III

- Aparicio MA**, Viñuela A, Saldaña E (2010)
Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column
in the rat.
Neuroscience 166:653–664 173

Anexo IV

- Viñuela A*, **Aparicio MA***, Berrebi AS, Saldaña E (2011)
Connections of the superior paraolivary nucleus of the Rat: II. Reciprocal
connections with the tectal longitudinal column.
Frontiers in Neuroanatomy 5:1 (doi: 10.3389/fnana.2011.00001) 187

Anexo V

- Aparicio MA**, Saldaña E (2013)
The dorsal tectal longitudinal column (TLCd): a second longitudinal column
in the paramedian region of the midbrain tectum.
Brain Structure and Function (en prensa; doi 10.1007/s00429-013-0522-x) 205

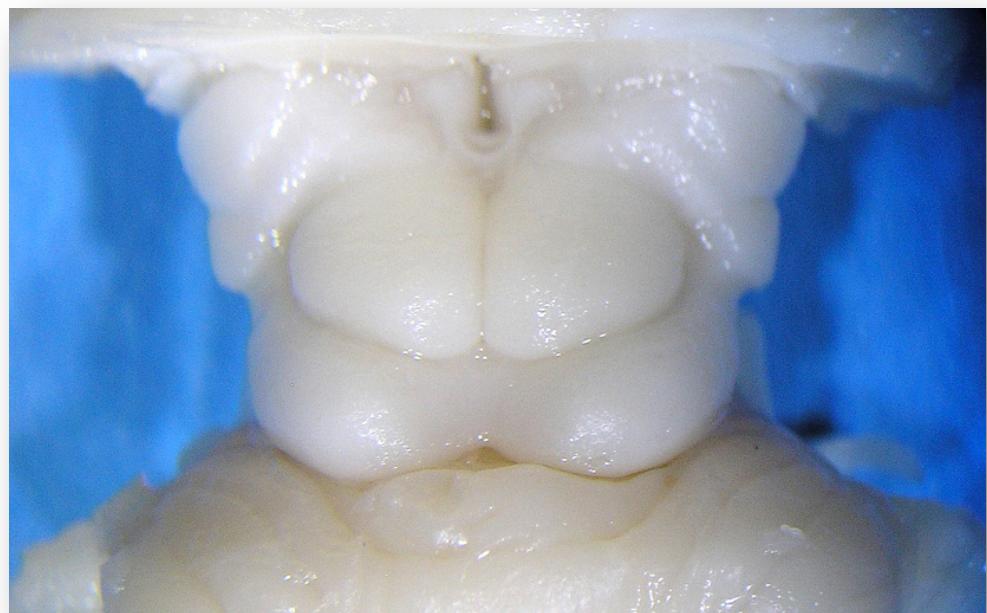
ABREVIATURAS

3v	Tercer ventrículo
5	Núcleo espinal del nervio trigémino
8	Nervio coclear
Ac	Acueducto cerebral o de Silvio
AV	Núcleo anteroventral del tálamo
BCI	Brazo del colículo inferior
bcs	Brazo del colículo superior
BDA	Dextrano biotinado (10,000 Da)
cbl	Cerebelo
CD	Columna dorsal
CDCI	Corteza dorsal del colículo inferior
CECI	Corteza externa del colículo inferior
CgAV	Corteza cingulada anterior ventral
CGL	Cuerpo geniculado lateral del tálamo
CGM	Cuerpo geniculado medial del tálamo
CGMd	Cuerpo geniculado medial del tálamo, división dorsal
CGMm	Cuerpo geniculado medial del tálamo, división medial
CGDL	Cuerpo geniculado dorsolateral del tálamo
CGVL	Cuerpo geniculado ventrolateral del tálamo
CI	Colículo inferior
CL	Núcleo central lateral del tálamo
CLT	Columna longitudinal tectal
CLTd	Columna longitudinal tectal dorsal
CLTv	Columna longitudinal tectal ventral
CnF	Núcleo cuneiforme
CoCI	Comisura del colículo inferior
CoP	Comisura posterior
CoCS	Comisura del colículo superior
COS	Complejo olivar superior
CS	Colículo superior
dCOS	Cinta dorsal del complejo olivar superior
DMSO	Dimetilsulfóxido
EL	Núcleo epilemniscal
FG	Fluorogold
em	Estría medular

flp	Fascículo longitudinal del puente
fre	Fascículo rubroespinal
fm	Fórceps menor
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
Hb	Habénula
I.A.	Interauricular
IL	Corteza infralímbica
LD	Núcleo laterodorsal del tálamo
LIG	Lámina intergeniculada
LiP	Núcleo limitante posterior del tálamo
ll	Lemnisco lateral
lm	Lemnisco medial
LP	Núcleo lateral posterior del tálamo
MePr	Núcleo mesencefálico profundo
NBCI	Núcleo del brazo del colículo inferior
NCCI	Núcleo central del colículo inferior
NCoAV	Núcleo coclear anteroventral
NCoD	Núcleo coclear dorsal
NCoPV	Núcleo coclear posteroventral
NGi	Núcleo reticular gigantocelular
NGiA	Núcleo gigantocelular alfa
NMCT	Núcleo medial del cuerpo trapezoide
NLCT	Núcleo lateral del cuerpo trapezoide
NMgR	Núcleo magno del rafe
NP	Núcleos pontinos
NPGiL	Núcleo paragigantocelular lateral
NPGiLA	Núcleo paragigantocelular lateral, región alfa
NPGiLE	Núcleo paragigantocelular lateral, región externa
NPM	Núcleo pretectal medial
NPP	Núcleo pretectal posterior
NPR	Núcleo pararrubral
NPS	Núcleo parolivar superior
NR	Núcleo rojo
NTO	Núcleo del tracto óptico
NVCT	Núcleo ventral del cuerpo trapezoide

OSL	Oliva superior lateral
OSM	Oliva superior medial
PHA-L	Leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PB	Tampón de fostato sódico
pcm	Pedúnculo cerebeloso medio
PD	Corteza peduncular dorsal
PLm	Región paralemniscal medial
PLr	Región paralemniscal rostral
Po	Núcleo posterior del tálamo
PrL	Corteza perlímbica
PS	Postsubículo
PTA	Núcleo pretectal anterior
PVA	Núcleo periventricular anterior del tálamo
RDG	Corteza retroesplenial disgranular
RE	Núcleo reuniens del tálamo
ReCI	Receso del colículo inferior
RePi	Receso de la glándula pineal
RGa	Corteza retroesplenial granular, región a
RGb	Corteza retroesplenial granular, región b
RGc	Corteza retroesplenial granular, región c
RePi	Receso de la glándula pineal
RT	Núcleo reticular del tálamo
Sag	Núcleo sagulum
SAI	<i>Stratum album intermediale</i> (capa blanca intermedia del colículo superior)
SAP	<i>Stratum album profundum</i> (capa blanca profunda del colículo superior)
SG	Núcleo suprageniculado
SGI	<i>Stratum griseum intermediale</i> (capa gris intermedia del colículo superior)
SGP	<i>Stratum griseum profundum</i> (capa gris profunda del colículo superior)
SGPA	Sustancia gris periacueductal
SGPAdl	Columna dorsolateral de la sustancia gris periacueductal
SGPAdm	Columna dorsomedial de la sustancia gris periacueductal
SGPAL	Columna lateral de la sustancia gris periacueductal
SGPAr	Sustancia gris periacueductal rostral
SIL	Núcleo septal intermediolateral
SO	<i>Stratum opticum</i> (Capa de las fibras del nervio óptico del colículo superior)
SGS	<i>Stratum griseum superficiale</i> (capa gris superficial del colículo superior)

SuB	Núcleo subraquial
SZ	<i>Stratum zonale</i> (capa zonal del colículo superior)
TgDM	Área tegmental dorsomedial
TgMi	Núcleo tegmental microcelular
TgPP	Núcleo tegmental pedúnculopontino
TO	Tracto óptico
TTD	Tenia tectal dorsal
V2MM	Corteza visual secundaria, mediomedial
VGluT1	Transportador vesicular de glutamato de tipo 1
VGluT2	Transportador vesicular de glutamato de tipo 2
VIAAT	Transportador vesicular de amino ácidos inhibidores
VLL	Núcleo ventral del lemnisco lateral
VMH	Núcleo ventromedial del hipotálamo
VPL	Núcleo ventral posterolateral del tálamo
VPM	Núcleo ventral posteromedial del tálamo
WGA-HRP	Aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa
Xi	Núcleo xifoide del tálamo
ZI	Zona incerta
ZId	Zona incerta, división dorsal
ZIv	Zona incerta, división ventral



PREÁMBULO

Hace unos años, nuestro grupo de investigación, dirigido por el Prof. Enrique Saldaña, descubrió un núcleo inédito del cerebro de la rata. Entonces estudiábamos la proyección del colículo inferior al complejo olivar superior. Tras inyectar el trazador retrógrado FluoroGold en éste último, apreciamos un grupo nítido de neuronas marcadas en la comisura del colículo inferior ipsolateralmente a la zona de inyección, situado muy próximo a la línea media e inmediatamente encima de la columna dorsomedial de la sustancia gris periaqueductal. Esta nueva estructura se extendía rostralmente para recorrer longitudinalmente el techo mesencefálico y mantenía su posición a lo largo de todo su eje. Una vez que comprobamos que se trataba de un núcleo cerebral inédito, lo denominamos “columna longitudinal tectal (CLT)”. Durante los últimos años hemos desarrollado un análisis exhaustivo y sistemático de la CLT de los mamíferos, que nos ha llevado a investigar aspectos como su citoarquitectura, sus conexiones, su neuroquímica, su electrofisiología y su anatomía comparada.

Al analizar la citoarquitectura de la CLT de la rata, notamos que inmediatamente encima de ella existe otro territorio de características morfológicas singulares que lo distinguen claramente de la propia CLT, así como de la porción medial del colículo superior, que lo rodea lateral y dorsalmente. Como se irá poniendo de manifiesto a lo largo de esta Memoria, este territorio constituye otra estructura cerebral inédita, para la que proponemos el nombre de “columna longitudinal tectal dorsal (CLTd)”. **Esta Tesis supone la demostración de la existencia de la CLTd como un núcleo cerebral distinto y su caracterización inaugural.**

Estructura de la Memoria de Tesis Doctoral

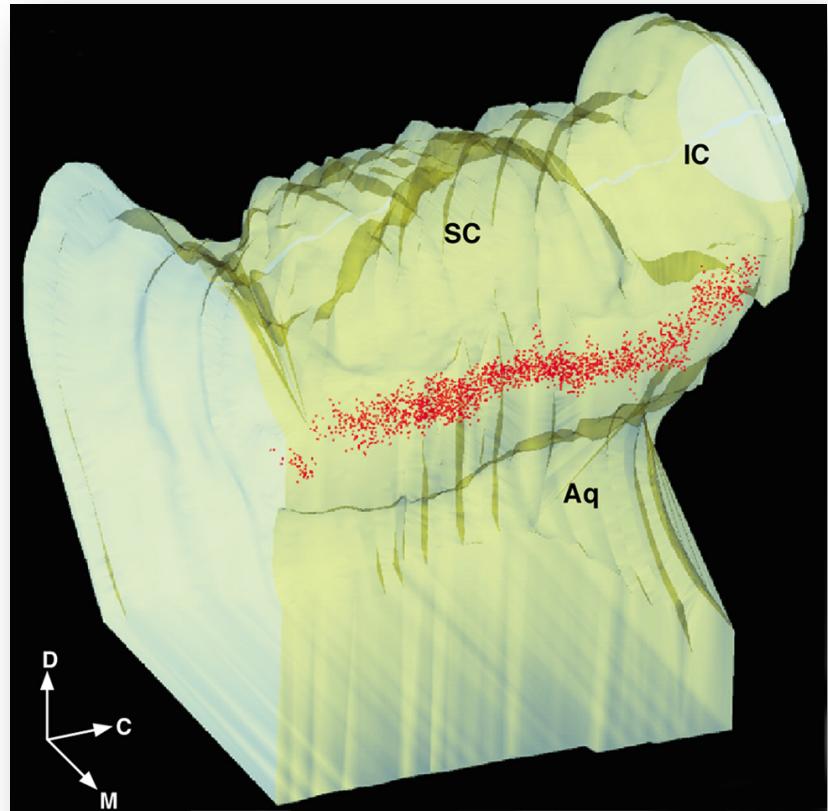
Este Trabajo comienza con una **Introducción** que sitúa al lector en el punto en el que nos encontrábamos cuando descubrimos la CLTd. En ella resumimos los pasos que seguimos para caracterizar la CLT (a la que, como el lector comprobará, pronto empezaremos a denominar en esta Memoria CLT ventral [CLTv]). Tales investigaciones, que adelantaron el descubrimiento de la CLTd y sentaron las bases citoarquitectónicas, hodológicas y de nomenclatura para su estudio, constituyen los cimientos de la presente Tesis y se detallan en nuestros cuatro primeros artículos científicos, recogidos en los **Anexos I-IV**. Estos artículos aparecieron en las revistas *Journal of Neuroscience* (índice de

impacto [i.i.] = 6,908), *Anatomical Record* (i.i. = 1,343), *Neuroscience* (i.i. = 3,112), y *Frontiers in Neuroanatomy* (i.i. = 4,058).

A la Introducción le siguen tres capítulos experimentales, cada uno de ellos dedicado a un gran aspecto de la caracterización de la CLTd: 1) **Citoarquitectura:** describimos con técnicas neurohistológicas la citoarquitectura de la CLTd de la rata y los rasgos citológicos, mieloarquitectónicos y neuroquímicos por los que este núcleo se diferencia de sus estructuras vecinas. 2) **Conexiones nerviosas:** identificamos y analizamos las aferencias y las eferencias de la CLTd de la rata. 3) **Neuroanatomía comparada:** aplicamos los criterios morfológicos derivados del estudio inicial en la rata para reconocer y caracterizar la CLTd de algunas de las más importantes especies de mamíferos utilizadas frecuentemente en investigaciones biomédicas. Los tres capítulos siguen una organización paralela: de manera secuencial, se desgranan la Hipótesis de trabajo, la lista de Objetivos concretos, el Diseño experimental y los Resultados.

Dado que los tres capítulos están sumamente interrelacionados, el escribir una Discusión específica de cada uno de ellos daría lugar a inevitables repeticiones y solapamientos y alargaría innecesariamente esta Memoria. Por ello, los resultados de los tres capítulos se discuten conjuntamente en una **Discusión general**. No obstante, en el capítulo 2 hemos optado por engarzar la descripción de las conexiones nerviosas de la CLTd, que son muy numerosas, con la discusión de aquellas menos relevantes. Con ello hemos eliminado de la Discusión general múltiples detalles que habrían ocasionado roturas en el hilo argumental. Los pormenores sobre los **Materiales y métodos** empleados en nuestros experimentos aparecen recogidos a continuación de las **Conclusiones**.

Los principales resultados y conclusiones del estudio específico de la CLTd se concretan en nuestro quinto artículo científico (**Anexo V**), aceptado el 8 del pasado mes de febrero para su publicación en la revista *Brain Structure and Function* (i.i. = 7,837), que ocupa el 1º puesto entre las 21 publicaciones de la categoría de Anatomía y Morfología de los Journal Citation Reports® (Thompson Reuters). La versión final de este artículo de acceso abierto (doi: 10.1007/s00429-013-0522-x), que puede consultarse a través de PubMed (PMID: 23468089), está pendiente de que se le asignen el volumen y el número definitivos.



INTRODUCCIÓN

Los principios generales de organización del sistema nervioso central de los mamíferos quedaron firmemente establecidos durante la segunda mitad de siglo XIX. En aquella época se puso de manifiesto que el sistema nervioso está formado por un conjunto de núcleos que se caracterizan por su citoarquitectura, conexiones y funciones. Desde entonces el descubrimiento de nuevos núcleos cerebrales ha sido esporádico y con frecuencia fortuito. Tal es el ejemplo de un inesperado hallazgo en la organización del techo del mesencéfalo de los mamíferos. La concepción tradicional de que esta región cerebral estaba formada sobre todo por los colículos superiores (CS) y los colículos inferiores (CI) se ha visto ampliada por el descubrimiento de un nuevo n úcleo llamado “columna longitudinal tectal” (CLT). En el artículo titulado “The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain”, publicado en la revista *Journal of Neuroscience* ([Saldaña y cols. 2007](#); Anexo I), demostramos que la CLT, estructura previamente inédita, difiere de los núcleos que la rodean por su citoarquitectura, conexiones y electrofisiología. Además ilustramos que está presente en una gran variedad de especies de mamíferos, incluido el hombre. Los siguientes párrafos resumen los datos más relevantes sobre la CLT.

1. La columna longitudinal tectal (CLT)

1.1. Tamaño y posición

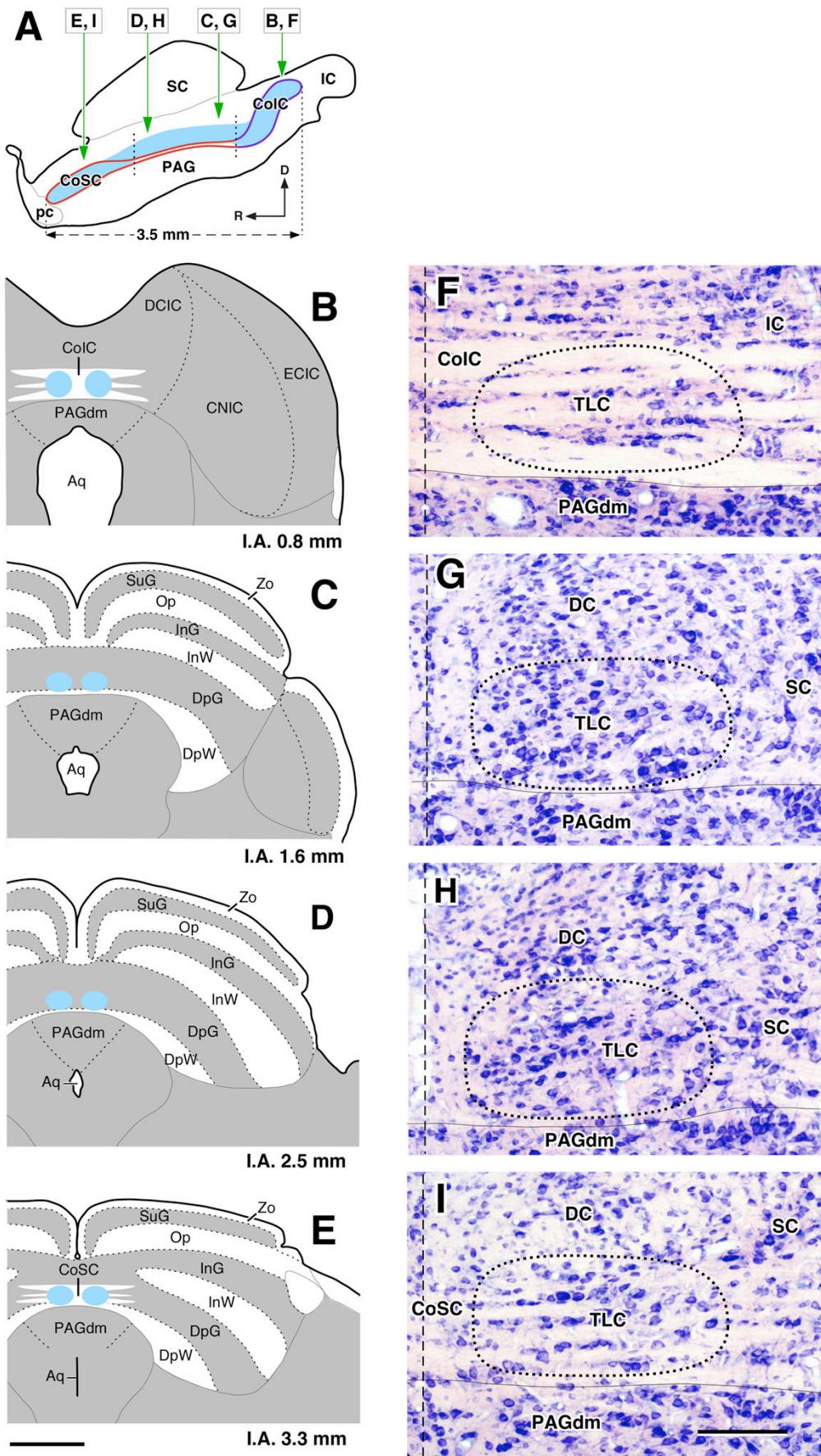
La CLT es un n úcleo largo y delgado que recorre longitudinalmente el techo del mesencéfalo, muy próximo a la l ínea media e inmediatamente encima de la columna dorsomedial de la sustancia gris periacueductal (SGPAdm) (Fig. 1). Ocupa la regi ón que tradicionalmente se ha considerado la parte m ás medial de las capas profundas del CS y la parte m ás medial del CI. Se extiende desde extremo caudal de la comisura del CI (CoCI) hasta el extremo rostral de la comisura del CS (CoCS), sin llegar a penetrar en la comisura posterior. En la rata mide aproximadamente 3,5 mm de largo y su calibre es de unos 250-350 μm . Esta estructura par contiene cerca de 11.500 neuronas en cada lado.

Por su relación con las comisuras tectales, en el núcleo se distinguen tres regiones (Fig. 1). El tercio caudal es atravesado por los fascículos de fibras de la CoCI y en él las neuronas aparecen dispersas entre los haces de axones (Fig. 1B, F). Esto también ocurre en el tercio rostral, que es cruzado por los fascículos de la mitad rostral de la CoCS (Fig. 1E, I). El tercio central no es atravesado por fibras comisurales, sino que descansa sobre los haces de fibras de la mitad caudal de la CoCS, que lo separan de la SGPA y ayudan así a definir el límite ventral de la CLT (Fig. 1C, D, G, H).

Hasta ahora, el procedimiento más eficaz para visualizar la CLT ha consistido en marcar sus neuronas de proyección descendente inyectando un trazador retrógrado en el complejo olivar superior (COS). En tales experimentos se observa en cada sección coronal del techo mesencefálico un grupo nítido de neuronas, aproximadamente circular e ipsolateral a la zona de inyección, que ocupa el ángulo formado por la línea media y el borde superior de la SGPA y cuya posición permanece bastante constante a distintos niveles rostrocaudales (Fig. 2). Esta proyección ayuda a distinguir la CLT de la parte medial del CS, de la parte medial del CI y de la SGPA, carentes de somas marcados.

Figura 1. Tamaño y posición de la CLT de la rata. A. Esquema de una sección parasagital muy medial del techo del mesencéfalo de la rata, que muestra las relaciones entre la CLT (azul), las comisuras tectales y la SGPA (PAG). La líneas verticales discontinuas indican los tercios de la CLT. El tercio caudal es cruzado por la CoCI (línea morada), y el tercio rostral por la parte ensanchada de la CoCS (línea roja). El tercio central se encuentra sobre la estrecha mitad caudal de la CoCS. Las flechas verdes indican el nivel rostrocaudal de las secciones coronales mostradas en B-I. El número situado debajo de cada esquema especifica la distancia en milímetros entre el plano coronal interauricular y el plano coronal mostrado. B-E. Esquemas de cuatro secciones coronales del techo mesencefálico correspondientes al nivel rostral del CI (B) y a los niveles caudal (C), central (D) y rostral (E) del CS. La CLT está representada en azul. Barra de aumento en E, 1mm. F-I. Microfotografías de cuatro secciones coronales de 15 µm de espesor obtenidas tras inclusión en parafina y teñidas con el método de Giemsa. Cada sección ilustra el mismo nivel que el esquema que queda a su izquierda. Debido a los fascículos comisurales que cruzan la CLT, la densidad neuronal es menor en los tercios caudal (F) y rostral (I), que en tercio central (G, H) del núcleo. En las fotografías, la línea vertical discontinua marca la línea media. Barra de aumento en I, 100µm. Figura tomada de [Saldaña y cols. \(2007\)](#) (Anexo I).

>>>



Al ocupar la CLT una posición tan próxima a la línea media, se observa toda su extensión rostrocaudal en unas pocas secciones parasagitales muy mediales (Fig. 3). La CLT posee una forma sigmoidea muy abierta, con una porción central aproximadamente horizontal y las porciones caudal y rostral inclinadas de atrás adelante y de arriba abajo.

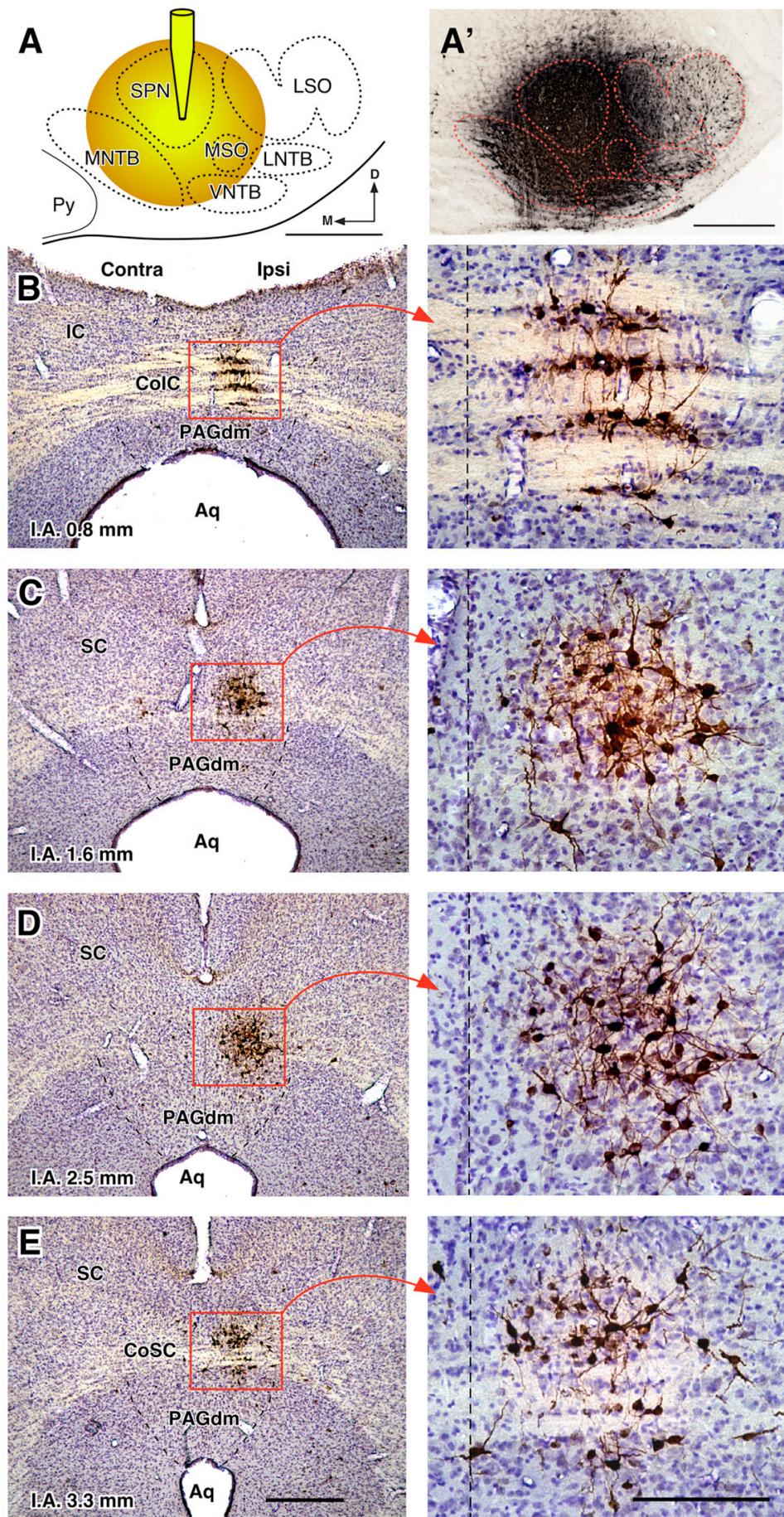
1.2. Citoarquitectura

La CLT destaca de los núcleos que la rodean por su relativa homogeneidad neuronal. Contiene dos tipos neuronales que se entremezclan por todo el núcleo. Las neuronas pequeñas, las más numerosas, poseen soma ovalado y ocupado en su mayor parte por el núcleo celular, por lo que su relación carioplasmática es muy alta (Fig. 4). Su eje mayor, habitualmente paralelo al eje rostrocaudal del núcleo, mide en torno a 16 µm.

El soma de las neuronas medianas es mayor que el de las neuronas pequeñas (diámetro máximo de aproximadamente 25 µm) y posee mayor cantidad de citoplasma. El nacimiento de gruesas dendritas primarias, entre 2 y 4, proporciona al cuerpo neuronal gran variedad de formas, si bien predominan los somas fusiformes y multipolares (Fig. 4).

Si comparamos las neuronas de la CLT con las de los núcleos que la rodean (la SGPA y la parte más medial del CS), observamos que estas últimas estructuras poseen una menor densidad neuronal y sus células nerviosas son más grandes y heterogéneas y se tiñen más fuertemente con violeta de cresilo; además, sus somas poseen orientaciones mucho más variadas (Figs. 1, 4). Las neuronas de la parte más medial del CI presentan una forma más triangular o multipolar que las de la CLT. Ninguna neurona de la CLT posee el soma tan grande como las neuronas grandes de la SGPA, la parte más medial de las capas profundas del CS o la parte más medial del CI.

Figura 2. La CLT se marca tras inyectar un trazador retrógrado en el complejo olivar superior. A, A'. Representación esquemática (A) y microfotografía (A') de una zona de inyección de FluoroGold en el COS de la rata. La zona de inyección incluye la mayor parte de los núcleos del COS y el borde ventral de la formación reticular, pero no afecta a los núcleos pontinos, situados rostralmente, al fascículo piramidal, situado medialmente, ni al núcleo motor del nervio facial, que es más caudal. **B-E.** Pares de microfotografías de cuatro secciones coronales del techo del mesencéfalo del caso cuya inyección se muestra en A'. Las abundantes neuronas marcadas se distribuyen por toda CLT ipsilateral a la zona de inyección, pero no se encuentran ni en los núcleos que la rodean, ni en la CLT contralateral. Barras de aumento: A y A', 0.5 mm; E izquierda, 1 mm; E derecha, 200 µm. Figura tomada de Saldaña y cols. (2007) (Anexo I). >>>



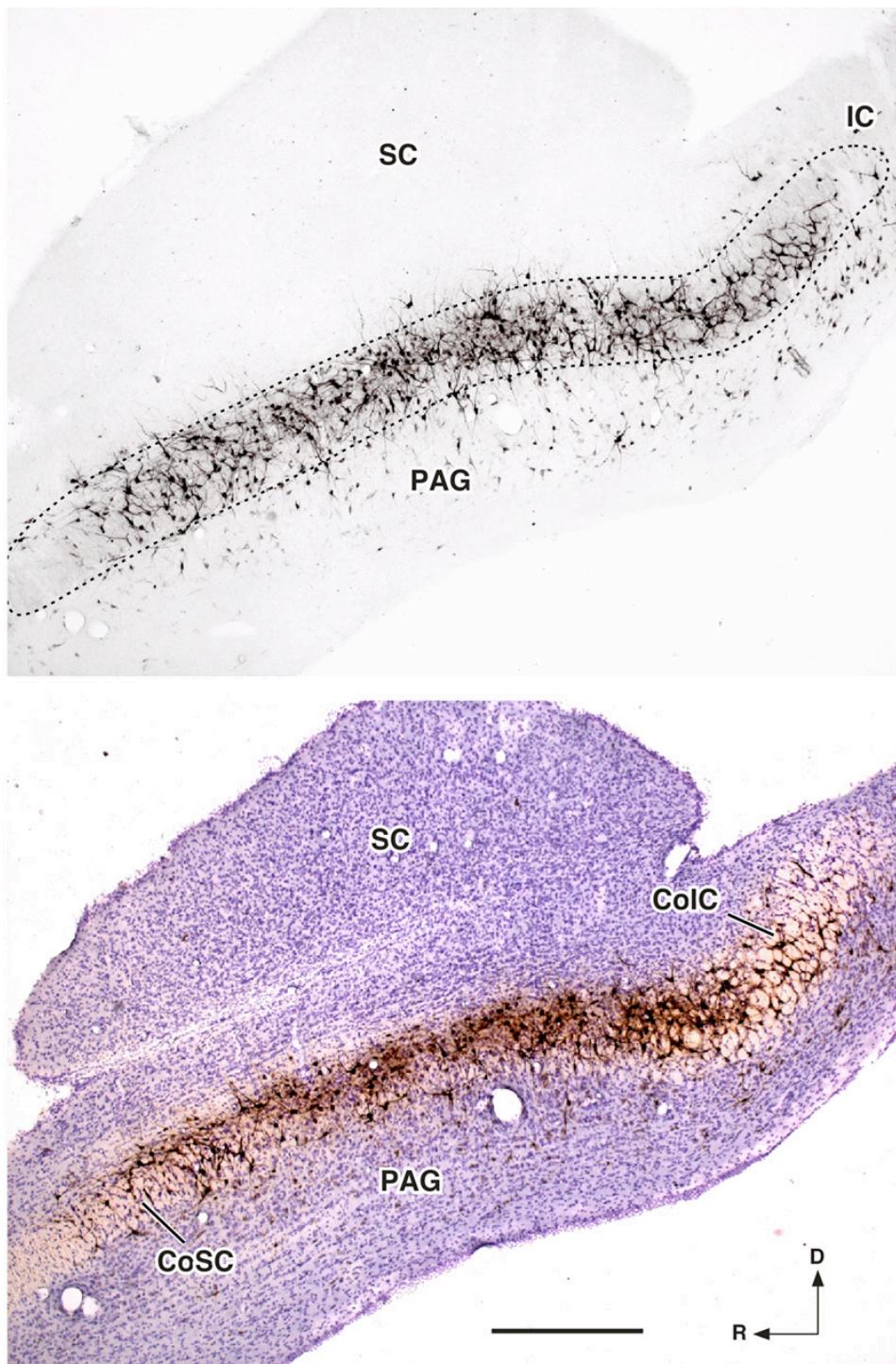


Figura 3. La longitud total de la CLT de la rata se observa en secciones parasagitales. Microfotografías digitales de dos secciones parasagitales adyacentes del techo del mesencéfalo, en un caso en el que se inyectó FluoroGold en el COS ipsolateral. Las neuronas marcadas son visibles a lo largo de toda la extensión rostrocaudal del núcleo. En la sección de arriba el trazador se reveló en color negro con una reacción de peroxidasa intensificada con níquel. La sección inferior está contrastada con el método de Nissl. Barra de aumento, 0,5 mm. Figura tomada de Saldaña y cols. (2007) (Anexo I).

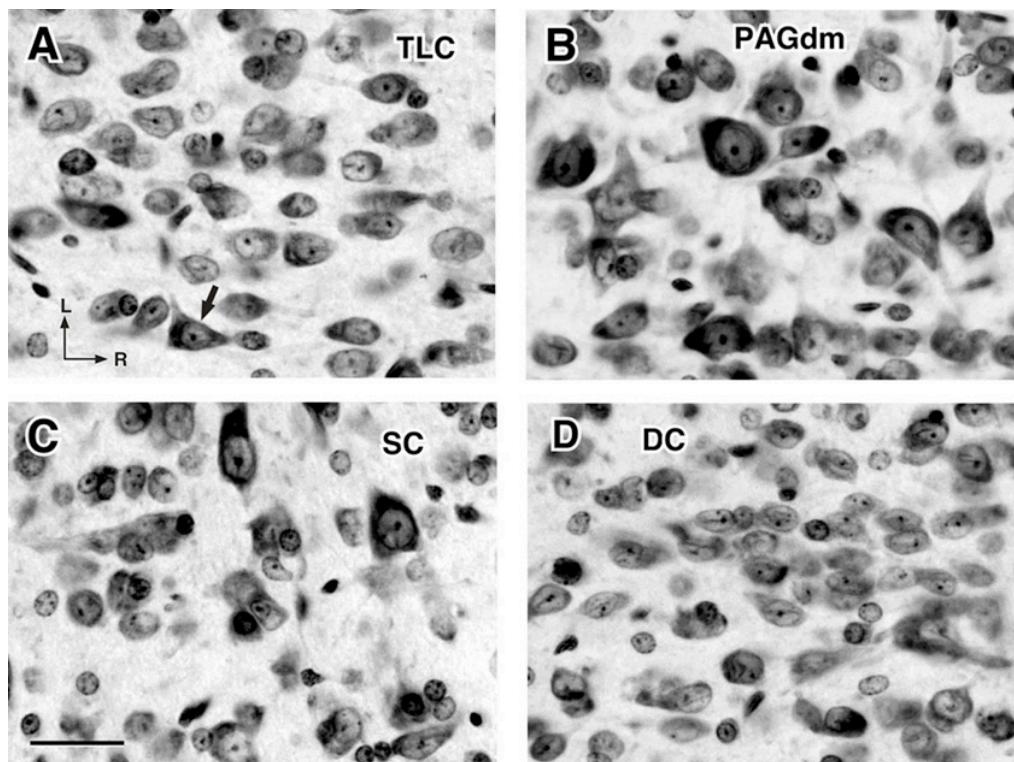


Figura 4. Citoarquitectura de la CLT. Microfotografías de secciones horizontales del techo del mesencéfalo de la rata teñidas con el método de Nissl. Muestran las características citológicas típicas de la CLT (A), SGPAdm (B), CS medial (C) y el territorio situado encima de la CLT, al que en el artículo de Saldaña y cols. (2007) se llamó “columna dorsal” (D). La flecha en A indica una típica neurona mediana. Las cuatro microfotografías proceden del mismo nivel rostrocaudal, correspondiente al tercio central de la CLT. Barra de aumento en C, 25 µm. Figura tomada de Saldaña y cols. (2007) (Anexo I).

1.3. Aferencias

La CLT es inervada por varios núcleos de función auditiva, como el n úcleo parolivar superior del COS (Fig. 5; Saldaña y cols. 2009; Viñuela y cols. 2011 [Anexo IV]), las diversas subdivisiones del CI (Fig. 6; Morest y Oliver, 1984; Saldaña y Merchán, 1992, 2005; Aparicio y cols. 2010 [Anexo III]), el n úcleo del brazo del CI (observaciones no publicadas), y la corteza cerebral auditiva primaria (Saldaña y cols. 1996). Además puede recibir proyecciones de muchas otras estructuras troncoencefálicas y telencefálicas (véanse la figura 4 y la tabla 2 del capítulo 2 de la Tesis Doctoral de Viñuela 2004).

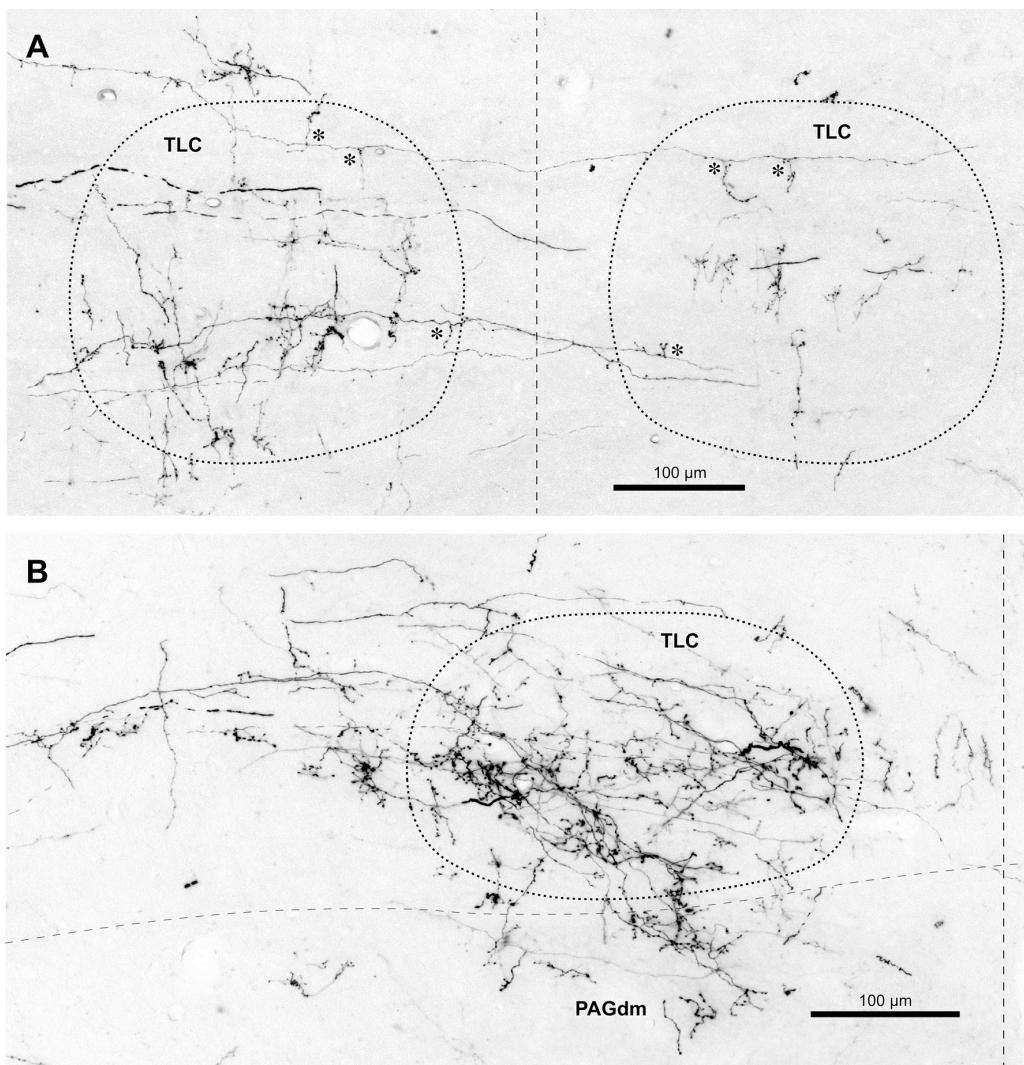
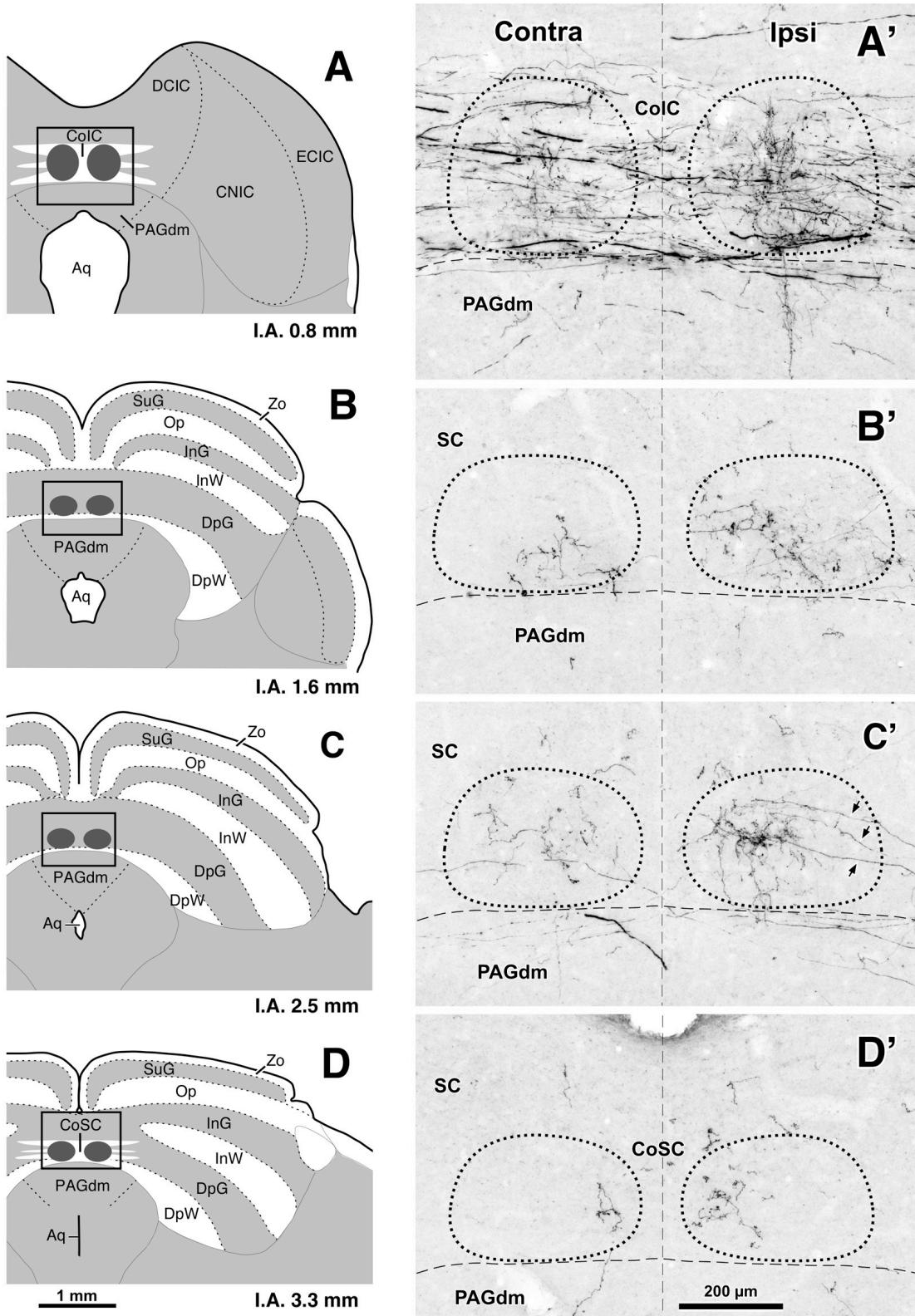


Figura 5. Proyección del núcleo parolivar superior a la CLT de la rata. A . Microfotografía de una sección coronal caudal de la región paramediana del techo mesencefálico de un caso en el que se inyectó el trazador dextrano biotinado (BDA) en el núcleo parolivar superior izquierdo. Varias fibras marcadas emiten colaterales locales (asteriscos) tanto en la CLT ipsolateral, como en la CLT contralateral a la zona de inyección. B. Microfotografía de una sección coronal del tercio central de la CLT de un caso con inyección de BDA en la núcleo parolivar superior ipsolateral. En la CLT las fibras marcadas forman colaterales terminales finas con abundantes engrosamientos de paso y terminales. En ambas fotografías, la CLT se ha delimitado con una línea de puntos, y la línea discontinua vertical indica la línea media. Imagen tomada de [Viñuela y cols. \(2011\)](#) (Anexo IV).

Figura 6. Proyección del CI a la CLT. A-D. Dibujos esquemáticos de 4 secciones coronales ideales del techo mesencefálico correspondientes al nivel rostral del CI (A), y a los niveles caudal (B), central (C) y rostral (D) del CS. La CLT se ha representado en gris oscuro. A'-D'. Microfotografías de secciones coronales de un caso en el que se inyectó el trazador anterógrado leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) en el CI. Cada fotografía ilustra un área equivalente al rectángulo indicado en el esquema de la izquierda. La CLT se ha indicado con la línea de puntos. Imagen tomada de [Aparicio y cols. \(2010\)](#) (Anexo III). >>>



1.4. Electrofisiología

Las neuronas de la CLT responden de forma inequívoca a estímulos sonoros, ya sean éstos tonos puros o ruido blanco, y sus propiedades de respuesta son claramente diferentes de las de las neuronas auditivas del CI o del CS ([Saldaña y cols. 2007 \[Anexo I\]](#); [Marshall y cols. 2008](#)). La mayor parte de las neuronas de la CLT presentan un patrón de respuesta de tipo sostenido, es decir, durante todo el estímulo auditivo muestran niveles de actividad notablemente superiores a la actividad espontánea. Su grado de sintonización a la frecuencia del sonido es variado, como lo demuestra el que las curvas de sintonía de algunas neuronas sean estrechas, mientras que las de otras sean muy anchas (Fig. 7). Por último, las latencias de respuesta de las neuronas de la CLT son relativamente largas, mayores, por ejemplo, que las de las neuronas del CI.

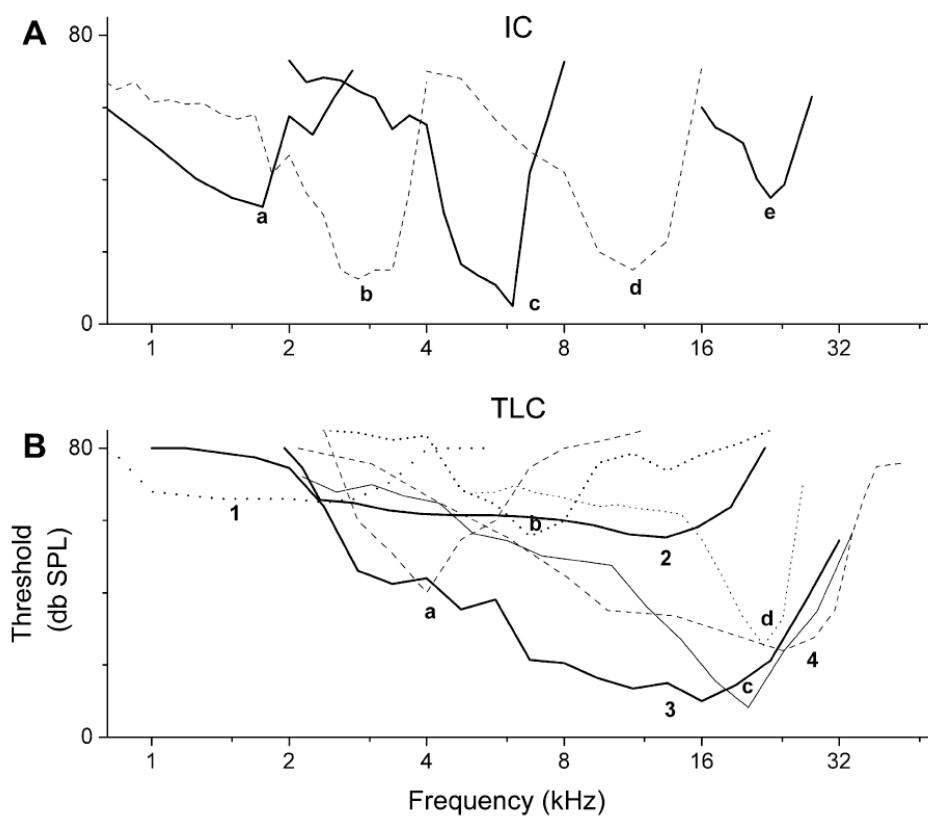


Figura 7. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la CLT de la rata en respuesta al sonido. Las curvas de sintonía de las neuronas de la CLT (B) son más variadas y anchas que las del CI (A), lo que indica que las neuronas de la CLT son menos selectivas a la frecuencia del sonido. Imagen tomada de [Marshall y cols. \(2008\)](#).

1.5. Anatomía comparada

La CLT está presente en todos los mamíferos en los que se ha buscado. Hasta la fecha, se ha identificado en el mesencéfalo de roedores (rata, ratón, hámster, chinchilla, jerbo y cobaya), lagomorfos (conejo), carnívoros (gato y hurón) y primates no humanos (mono de Java –*Macaca fascicularis*–), así como en el hombre ([Saldaña y cols. 2007 \[Anexo I\]](#)). En todos ellos es reconocible por sus características citoarquitectónicas y ocupa una posición similar (Fig. 8).

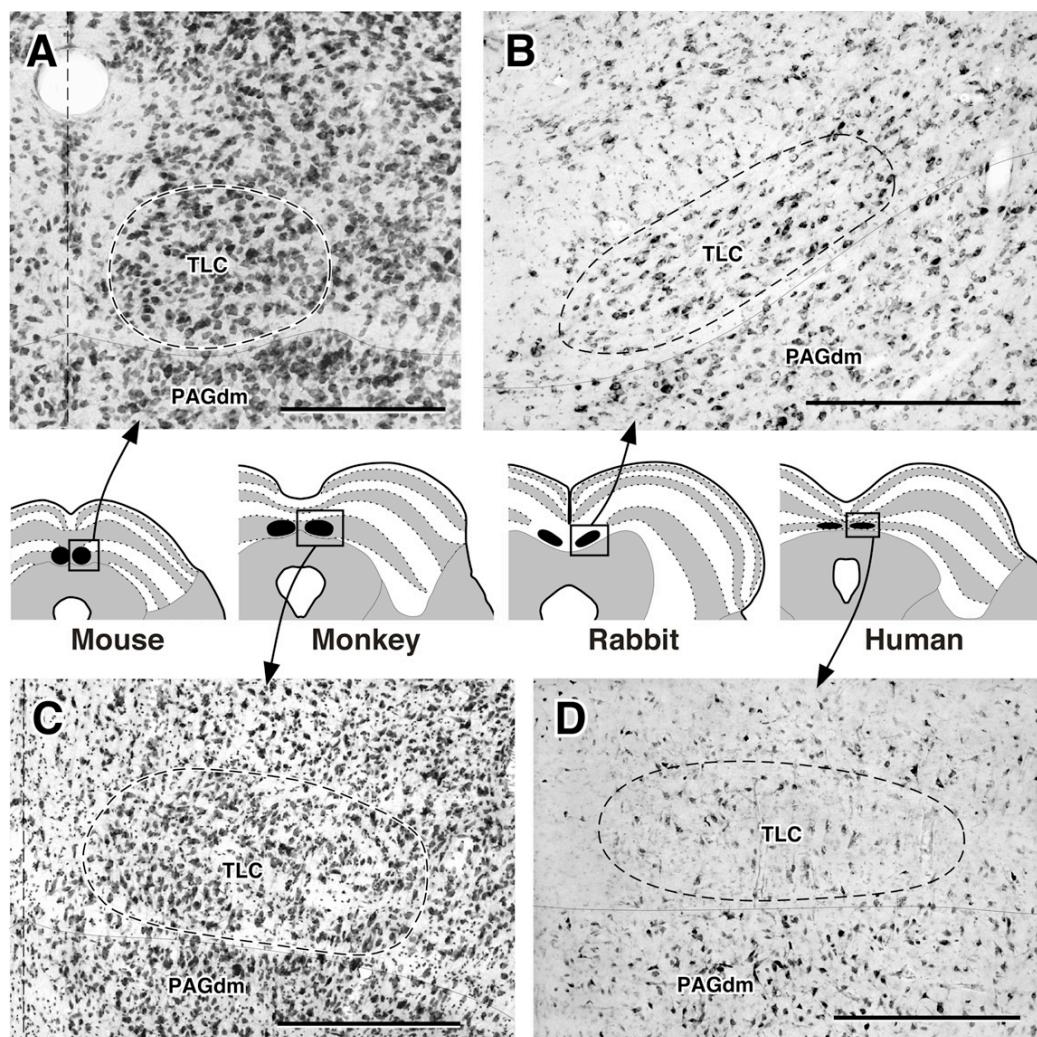


Figura 8. Anatomía comparada de la CLT. Microfotografías digitales de secciones coronales del tercio central de la CLT del ratón (A), el conejo (B), el mono de Java (C) y el hombre (D). Cada fotografía se acompaña de un esquema que muestra la posición de la CLT. A pesar de las diferencias en el tamaño y en la forma del núcleo, su proximidad a la línea media y su posición dorsal a la SGPA son constantes. La barra de aumento en A representa 200 μm , y las barras de B-D, 0,5 mm. Figura tomada de [Saldaña y cols. \(2007\) \(Anexo I\)](#).

1.6. Función de la CLT

Aún no se conoce la función de la CLT. Teniendo en cuenta su relación con núcleos auditivos y sus propiedades electrofisiológicas, sin duda debe de desempeñar algún papel en el procesamiento de la información auditiva. Sin embargo, al estar inervada por centros como el CS, estructura que recibe información visual, táctil y auditiva, o como el núcleo precomisural, al que se le han atribuido funciones sensorimotoras, vegetativas y analgésicas, no puede descartarse que esté implicada también en fenómenos de integración sensorial polimodal.

2. Dos columnas longitudinales tectales: la columna longitudinal tectal ventral (CLTv) y la columna longitudinal tectal dorsal (CLTd)

Al analizar la citoarquitectura de la CLT de la rata, notamos que inmediatamente encima de ella existe otro territorio de características morfológicas singulares, que lo distinguen claramente de la propia CLT, así como de la porción medial del CS —en el que tradicionalmente se ha englobado—, que lo rodea lateral y dorsalmente. Posee una población homogénea de neuronas pequeñas y densamente empaquetadas que parecen constituir otro núcleo inédito y distinto de la CLT. En el artículo de [Saldaña y cols. \(2007\)](#) nos referimos a él como “columna dorsal” (Figs. 1G-I, 4).

Aunque a primera vista la forma y la orientación de las neuronas de la columna dorsal eran similares a las de las neuronas de la CLT, una comparación sistemática entre ambas regiones ([Saldaña y cols. 2007](#)) reveló claras diferencias: 1) Los somas de las neuronas de la columna dorsal son ligeramente menores que los de las neuronas pequeñas de la CLT. 2) La columna dorsal apenas posee neuronas de soma mediano, comparables a las neuronas medianas de la CLT. 3) La densidad neuronal es significativamente mayor en la columna dorsal que en la CLT. 4) La columna dorsal no es atravesada por los fascículos de fibras de la CoCl o de la CoCS. 5) Las neuronas de la columna dorsal no se marcan al inyectar trazadores retrógrados en el COS. Y 6) Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la columna

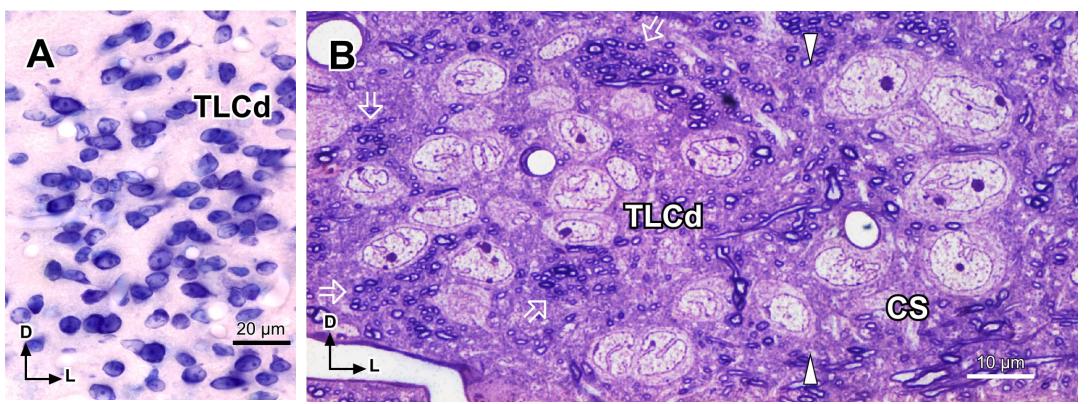
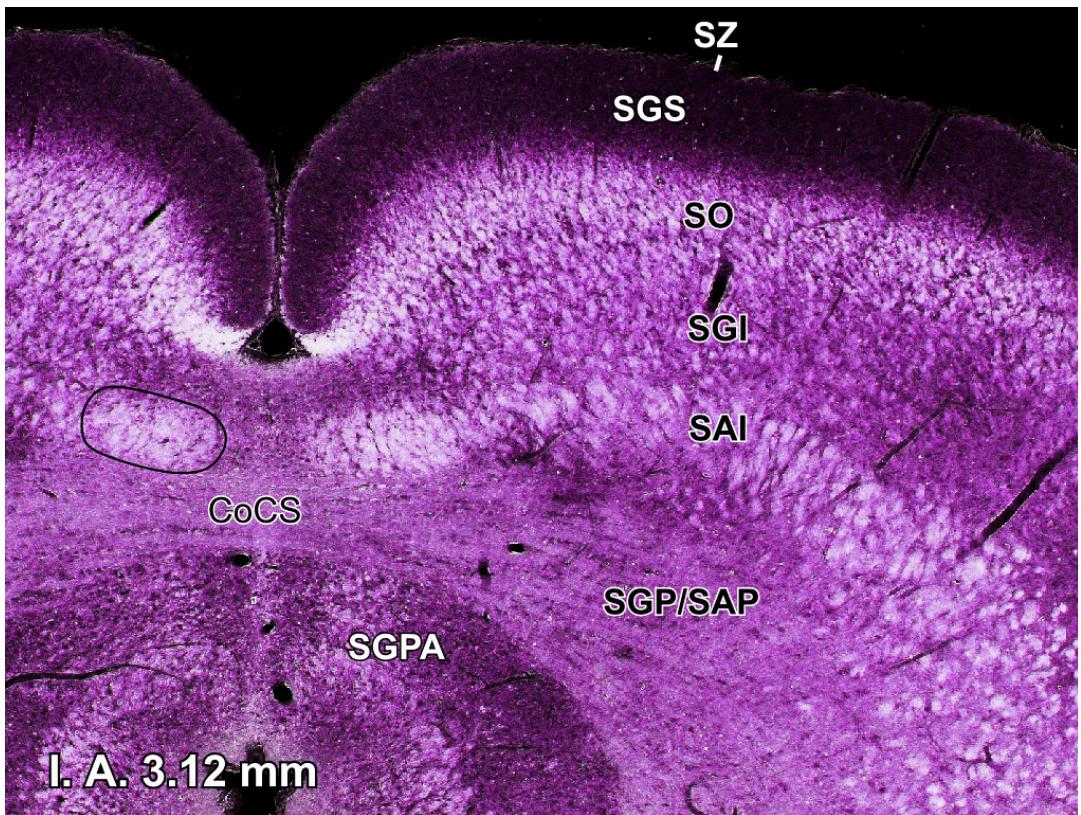
dorsal son diferentes de las de la CLT. Las neuronas de ésta última responden a estímulos auditivos pero son insensibles a la luz, mientras que las neuronas de la columna dorsal no responden ni al sonido, ni a la luz ([Marshall y cols. 2008](#)).

Todos estos datos sugieren que el territorio del mesencéfalo de la rata identificado por Saldaña y cols. (2007) como columna dorsal es un núcleo distinto y previamente desconocido, que difiere de los núcleos que lo rodean por sus características citoarquitectónicas, sus conexiones y su electrofisiología.

Comparando este nuevo núcleo con la CLT, se comprueba que ambos comparten importantes características anatómicas. Los dos poseen forma cilíndrica o columnar y recorren longitudinalmente la mayor parte del techo mesencefálico; de hecho, ambos núcleos están estrechamente apuestos y se disponen paralelos el uno al otro. Por tanto, el nombre con el que habíamos bautizado al primero de ellos (“columna longitudinal tectal”), parece adecuado también para el segundo. Por este motivo, hemos decidido llamar “columna longitudinal tectal ventral (CLTv)” al núcleo previamente descrito por nosotros ([Saldaña y cols. 2007](#)) y “columna longitudinal tectal dorsal (CLTd)” al territorio que está aún por describir y que constituye el tema central de este Trabajo (ver [Aparicio y Saldaña, 2013 \[Anexo V\]](#)).

Nombre antiguo (Saldaña y cols. 2007)	Nuevo nombre (Aparicio y Saldaña 2013)
Columna longitudinal tectal (CLT)	Columna longitudinal tectal ventral (CLTv)
Columna dorsal (CD)	Columna longitudinal tectal dorsal (CLTd)

Tabla 1. Nomenclatura de los núcleos de la región paramediana del techo mesencéfálico. Columna de la izquierda: nombres usados por [Saldaña y cols. \(2007\)](#). Columna de la derecha: nombres adoptados en este Trabajo.



CAPÍTULO 1

CITOARQUITECTURA DE LA CLTD DE LA RATA

1. Hipótesis

La región paramediana del techo mesencefálico de la rata contiene dos núcleos longitudinales: la columna longitudinal tectal ventral (CLTv) y la columna longitudinal tectal dorsal (CLTd). La CLTv corresponde al núcleo descrito en 2007 por Saldaña y cols. (J Neurosci 27:13108-13116), mientras que la CLTd es un núcleo previamente desconocido situado inmediatamente encima de la CLTv y paralelo a ella. **La CLTd difiere de los núcleos que la rodean (la CLTv y el colículo superior [CS]) por sus características citoarquitectónicas, mieloarquitectónicas y neuroquímicas.**

2. Objetivos

1. Definir las características citoarquitectónicas, mieloarquitectónicas y neuroquímicas que distinguen a la CLTd de la rata de los núcleos que la rodean. Dado que las diferencias fundamentales entre la CLTd y la CLTv quedaron establecidas en nuestro trabajo del año 2007 ([Saldaña y cols. 2007](#)), pondremos el énfasis en las diferencias entre la CLTd y el CS.
2. Averiguar si las neuronas de la CLTd de la rata son excitadoras o inhibidoras.

3. Diseño experimental

Para establecer los límites de la CLTd de la rata y distinguirla de los núcleos vecinos, hemos utilizado técnicas neurohistológicas básicas, técnicas de hibridación *in situ* y métodos inmunocitoquímicos.

Empleamos secciones de 40 µm (obtenidas por congelación) o de 8-15 µm (obtenidas tras inclusión en parafina) teñidas con el *método de Giemsa*. Gracias a sus propiedades policromáticas, este método tiñe los somas neuronales con una coloración añil o violeta, claramente discernible de la tinción cerúlea de las células gliales y endoteliales. Este contraste cromático favorece el reconocimiento y delimitación de agrupaciones neuronales.

Estudiamos también secciones similares a las anteriores teñidas con el *método de Nissl*, así como secciones semifinas (1 µm de espesor) obtenidas a partir de bloques incluidos en resina y teñidas con *azul de toluidina*. Estos materiales proporcionaron datos citológicos adicionales.

Para apreciar mejor las relaciones anatómicas de la CLTd, recurrimos a secciones gruesas (60-80 µm) postfijadas con *tetróxido de osmio*. En este material las fibras nerviosas mielínicas, intensamente teñidas en color negro, resaltan sobre un fondo amarillento. Analizamos también *secciones frescas*, no teñidas, en las cuales las fibras mielínicas cortadas perpendicularmente aparecen oscuras sobre un fondo incoloro, y que resultan sumamente útiles para establecer las relaciones entre la CLTd y las comisuras tectales o los fascículos de fibras del CS.¹ Además, realizamos experimentos de trazado de vías nerviosas para marcar simultáneamente los axones que recorren la CLTd y los fascículos de fibras longitudinales de la capa blanca intermedia del CS.

Con el fin de establecer si las neuronas de la CLTd son excitadoras o inhibidoras, aplicamos métodos de *hibridación in situ* para detectar el ARN mensajero responsable de la síntesis de los transportadores vesiculares de glutamato de tipo 1 (VGluT1) o de tipo 2 (VGluT2), aceptados como marcadores de neuronas excitadoras, o del transportador vesicular de los aminoácidos inhibidores GABA y glicina (VIAAT). Dado que el techo mesencefálico carece de neuronas glicinérgicas, la expresión del VIAAT sirve para identificar las neuronas tectales inhibidoras GABAérgicas.

Finalmente, analizamos secciones inmunoteñidas para visualizar la proteína Fos, considerada como un útil marcador de actividad neuronal. Como veremos posteriormente, la *expresión basal de Fos* constituye un criterio valioso para delimitar la CLTd.

¹ Las secciones teñidas con tetróxido de osmio y las secciones frescas resultaron esenciales para poner de manifiesto la organización laminar del CS, estructura compuesta por siete capas alternas de sustancia blanca y de sustancia gris. Fue especialmente útil la identificación inequívoca de una llamativa capa de axones longitudinales que, como se verá más abajo, se relaciona topológicamente con la CLTd. De acuerdo con descripciones previas del CS de la rata (Killackey y Erzurumlu 1981; Huerta y cols. 1983; Chevalier y Deniau 1984; Matsuyama y Kawamura 1985; Redgrave y cols. 1986, 1990; Paxinos y cols. 1999; Paxinos y Watson 2005), consideraremos que esta capa de axones longitudinales es la capa blanca intermedia (o *stratum album intermediale* —SAI—). Sin embargo, otros autores han considerado la capa de fibras longitudinales como una de las subláminas de una enorme capa gris intermedia (*stratum griseum intermediale*) (e.g., Wiener 1986; Bickford y Hall 1989; Helms y cols. 2004; ver May 2006, para más referencias).

Completabamos nuestro estudio con análisis morfométricos y con la ayuda de herramientas informáticas. Utilizamos los *métodos estereológicos* proporcionados por el programa Stereo Investigator (MBF Bioscience), para calcular el número de neuronas de la CLTd. Con los programas Neurolucida y NeuroExplorer (MBF Bioscience) realizamos *reconstrucciones tridimensionales* de la CLTd que nos proporcionaron una visión más completa de la estructura del techo mesencefálico.

4. Resultados

4.1. Tamaño y posición de la CLTd

La CLTd de la rata es un núcleo largo y delgado que recorre longitudinalmente los dos tercios rostrales del techo del mesencéfalo, muy próximo a la línea media y dorsal a la CLTv (Figs. 9-13). Ocupa la región que tradicionalmente se ha considerado la parte más medial de la capa blanca intermedia o *stratum album intermediale* (SAI) del CS (Figs. 10-12). El núcleo comienza aproximadamente a la altura del borde caudal del CS y se extiende rostralmente hasta el nivel del extremo rostral de la CoCS, que viene a coincidir con el extremo caudal de la comisura posterior (Figs. 9, 10).

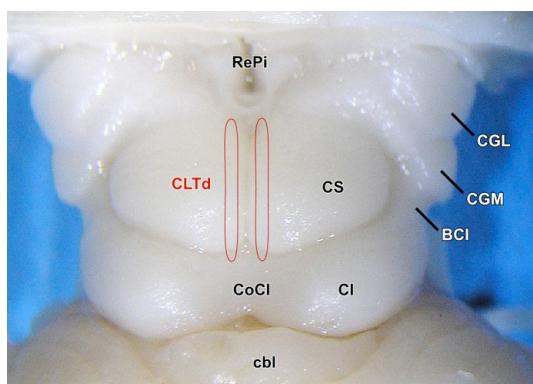


Figura 9: Posición y relaciones anatómicas de la CLTd. Fotografía macroscópica de la superficie dorsal del techo mesencefálico de la rata, en la que pueden apreciarse los dos CI y los dos CS. Los contornos rojos indican de manera esquemática la posición de las CLTd derecha e izquierda.

La CLTd se dispone inmediatamente encima de, y paralela a, los tercios central y rostral de la CLTv, que constituyen el límite ventral de aquélla (Figs. 10-13). Su eje longitudinal está inclinado de arriba abajo y de atrás adelante, de modo que forma un ángulo de aproximadamente 20° con el plano horizontal (Fig. 10). A diferencia de la CLTv, la CLTd no es atravesada por fascículos de la CoCI o la CoCS (Figs. 10, 12). La CLTd está separada de la línea media por una

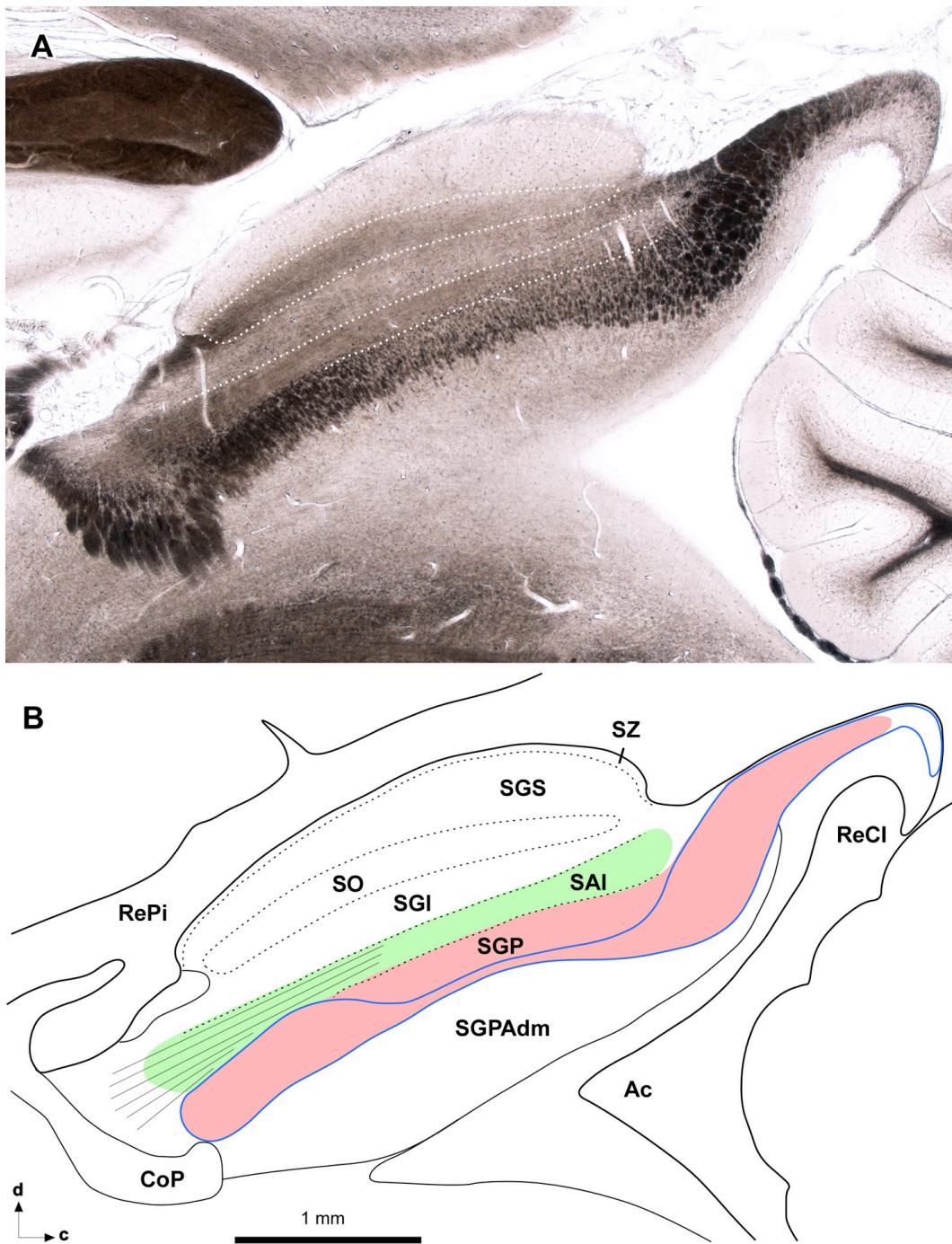


Figura 10: Posición y relaciones anatómicas de la CLTd: Sección parasagital. A . Microfotografía de una sección parasagital muy medial del techo mesencefálico. La sección fue fotografiada en medio acuoso, inmediatamente después de su obtención, sin ningún tipo de procesamiento o aclaramiento. En este material fresco, los fascículos de axones mielinicos cortados transversalmente aparecen oscuros y resaltan sobre un fondo no teñido, lo que facilita la observación de las comisuras tectales. B. Esquema de las estructuras presentes en la sección mostrada en A. El contorno azul delimita el conjunto formado por la CoCl y la CoCS. La CLTd se ha representado en color verde, y la CLTv en color rojo.

estrecha franja de 50 a 100 μm , distancia que se mantiene más o menos constante en la mitad caudal del núcleo y aumenta discretamente en secciones rostrales (Figs. 12, 13B). Lateralmente, la CLTd limita en toda su longitud con el SAI (Figs. 11, 12). La CLTd está cubierta dorsalmente por la porción medial y vertical de las capas superficiales del CS, de las que queda separada por la porción más medial de la capa gris intermedia (Figs. 11, 12). Los extremos caudal y rostral de la CLTd no están cubiertos por el CS, de modo que el borde dorsal de la CLTd se aproxima a la superficie dorsal del techo mesencefálico (Fig. 12A1-A3, D1-D3).

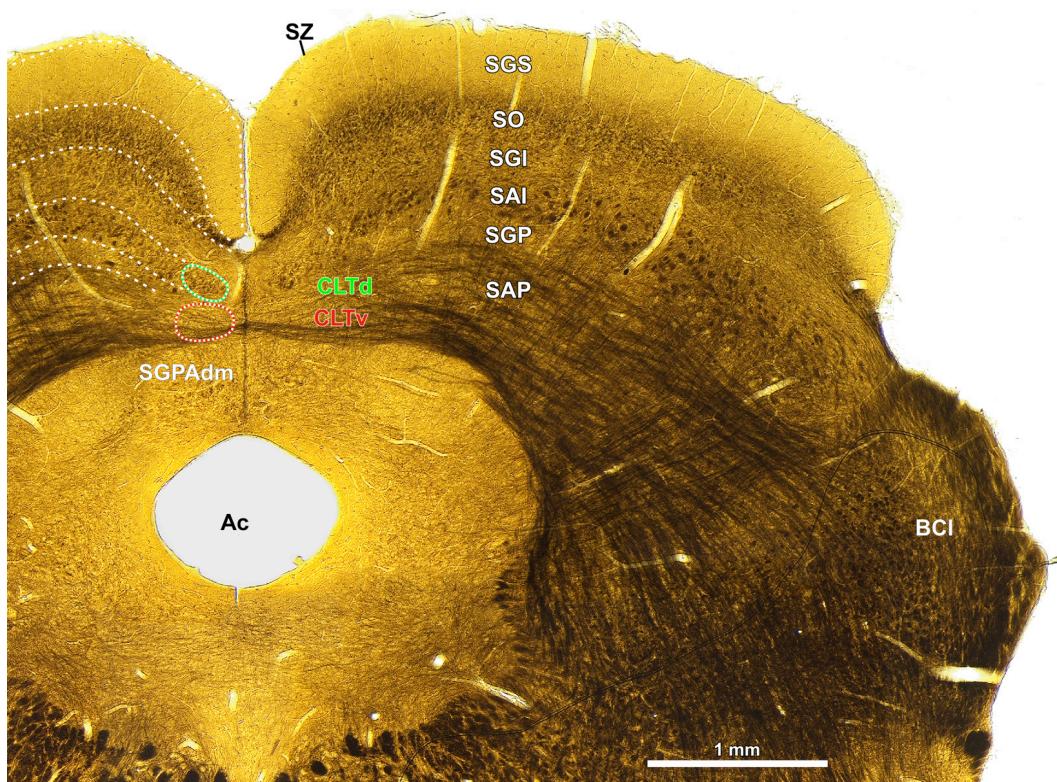


Figura 11: Posición y relaciones anatómicas de la CLTd: Sección coronal. Microfotografía a bajo aumento de una sección coronal gruesa del techo mesencefálico tratada con tetróxido de osmio para teñir de negro las fibras mielínicas. Obsérvese la estructura laminar del CS y cómo la CLTd (delimitada en verde) parece ocupar la porción más medial de la capa blanca intermedia (SAI).

La CLTd mide aproximadamente 3,1 mm de largo. En las secciones coronales caudales, aparece como un pequeño óvalo de unos 150 μm de diámetro dorsoventral y 70-100 μm de anchura (Fig. 12A). Más rostralmente, su sección transversal crece hasta alcanzar los 350 μm y su eje mayor se inclina hasta quedar con una orientación ventromedial-dorsolateral (Fig. 12B-D).

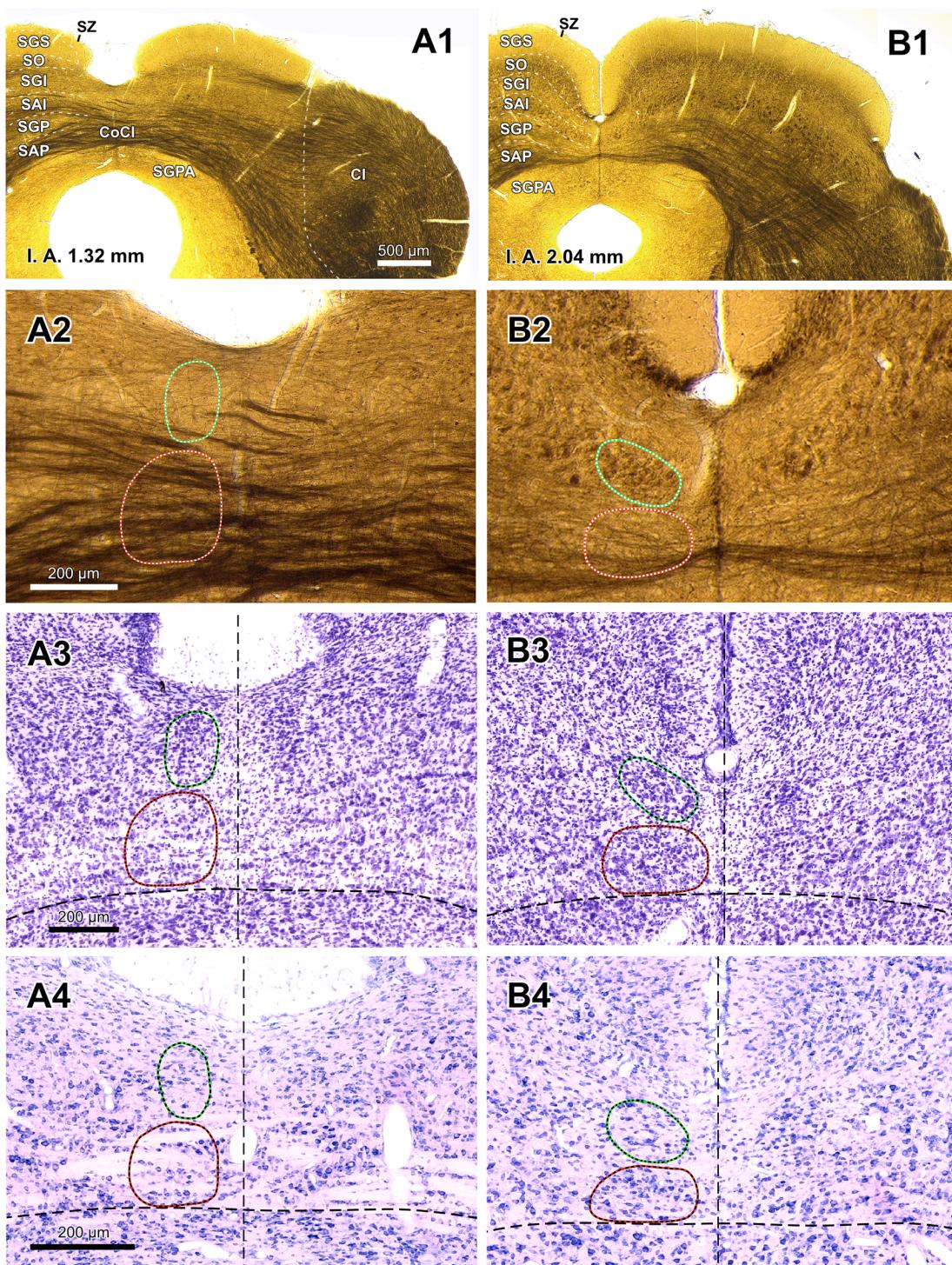


Figura 12: La CLTd en secciones coronales. Conjuntos de secciones que ilustran diferentes niveles rostrocaudales de la CLTd. Cada columna corresponde a un mismo nivel, cuya coordenada relativa al plano interauricular se indica en la fotografía superior. Dentro de cada columna, la imagen superior (fotografías A1-D1) muestra una visión panorámica de una sección de 60 µm teñida con tetróxido de osmio. La segunda imagen (fotografías A2-D2) muestra a mayor aumento la región medial de la misma (continúa en la página siguiente)

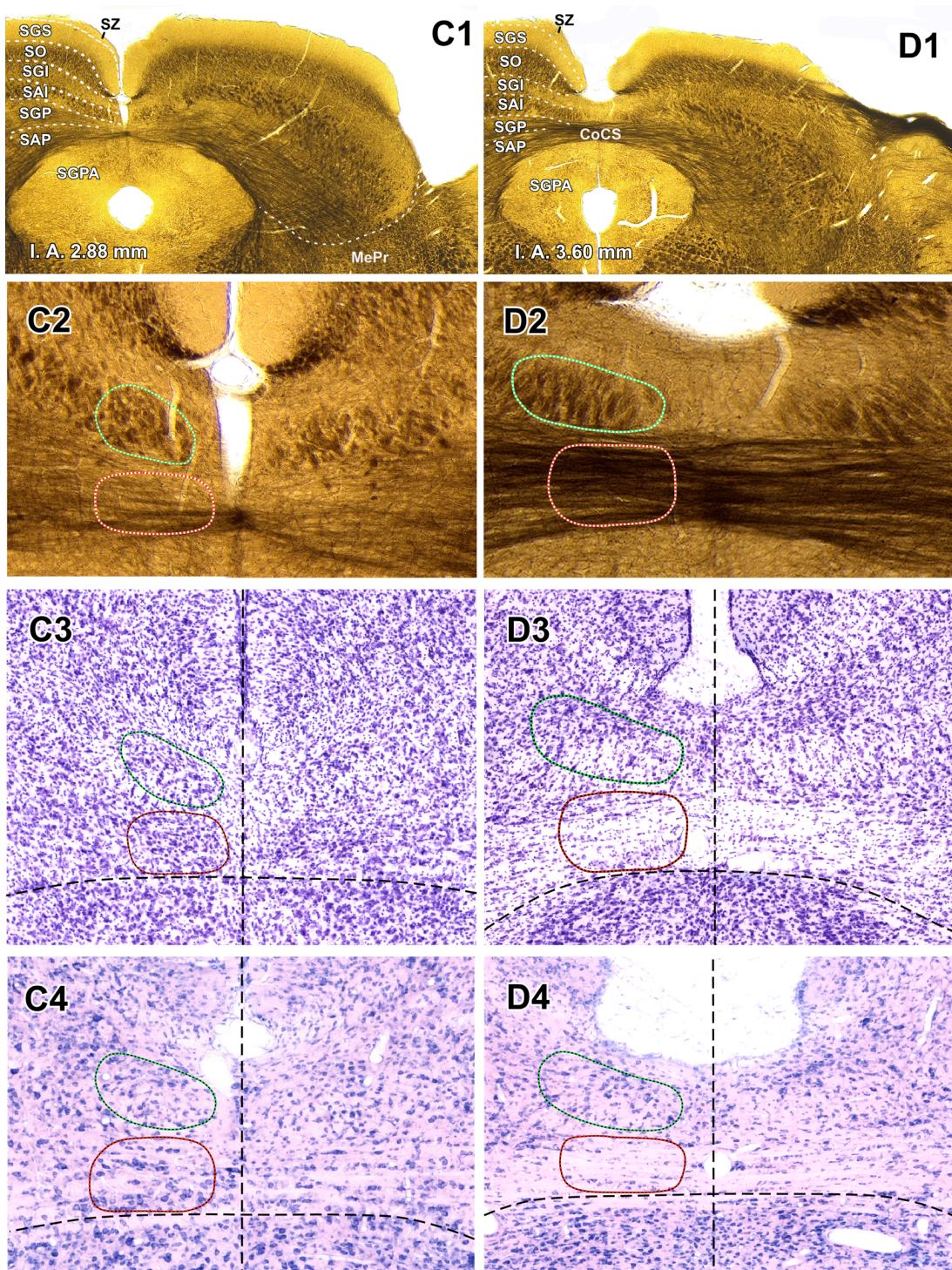


Figura 12 (cont.): ... sección teñida con osmio. La tercera imagen (fotografías A3-D3) ilustra una sección de 40 µm teñida con el método de Nissl (violeta de cresilo), y la cuarta (fotografías A4-D4), una sección de 15 µm teñida con el método de Giemsa. La CLTd y la CLTv aparecen delimitadas, respectivamente, por las líneas de puntos verdes y rojos. Las líneas verticales discontinuas indican la línea media. La barra de aumento de la primera fotografía de cada fila sirve para todas las fotografías de esa misma fila.

El número de neuronas de cada CLTd, calculado estereológicamente, es de aproximadamente 9.600 (media = $9,613,50 \pm 152,95$ d.s., n = 6), y no difiere entre los dos lados (*t*-test, p = 0,650; CLTd izquierda, $9646,66 \pm 213,12$ d.s., n = 3; CLTd derecha, $9,580,33 \pm 98,80$ d.s., n = 3).

La CLTd se relaciona también con un fascículo mal definido de axones longitudinales. Se trata de axones que recorren la mitad o los dos tercios rostrales del núcleo y que parecen entrar o salir de él por su extremo rostral. Por su posición y orientación, este fascículo parece corresponder a la porción más medial de la capa blanca intermedia del CS (Figs. 11, 12). Sin embargo, dado que la composición de este fascículo difiere de la del resto de la capa blanca intermedia (ver más adelante), creemos que se trata de una estructura anatómicamente diferente y le hemos asignado el nombre descriptivo de *fascículo de la CLTd*.

La figura 13 muestra reconstrucciones tridimensionales del techo mesencefálico, elaboradas a partir de secciones coronales gruesas teñidas con el método de Giemsa. En ellas se aprecian nítidamente la posición y dimensiones del núcleo, su carácter columnar, su disposición longitudinal, su proximidad a la línea media y sus relaciones con la CLTv.

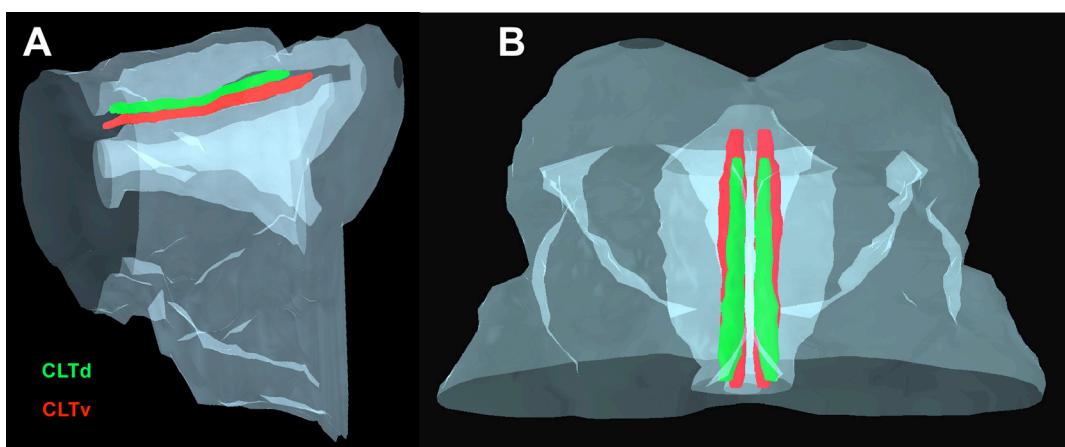


Figura 13. Reconstrucciones tridimensionales del techo mesencefálico visto desde el lado izquierdo del cerebro (A) o desde un punto situado encima y ligeramente rostral (B). La CLTd y la CLTv se han representado en verde y rojo, respectivamente. Obsérvese el estrecho paralelismo entre los dos núcleos y su proximidad al plano mediosagital. Nótese también que, mientras que la CLTv recorre longitudinalmente el CS y parte del CI, la extensión rostrocaudal de la CLTd coincide de manera exacta con la del CS.

4.2. La CLTd es distinta por su citoarquitectura

La CLTd de la rata se caracteriza por su relativa homogeneidad neuronal, que contrasta con la marcada variedad de los tipos neuronales de algunos de sus territorios vecinos (Figs. 14, 15A, B). En la mitad caudal de la CLTd, las neuronas se reparten homogéneamente. En las porciones rostrales, la densidad neuronal disminuye y las neuronas tienden a concentrarse encima del fascículo de la CLTd (ver más abajo), con pocas neuronas intercaladas entre las fibras del fascículo (Fig.12).

Los detalles morfológicos se aprecian especialmente bien en secciones obtenidas tras inclusión en parafina y teñidas con violeta de cresilo o con el método de Giemsa, y también en secciones semifinas obtenidas tras inclusión en resinas y teñidas con azul de toluidina (Figs. 14, 15A, B). La mayor parte de las neuronas del núcleo poseen soma pequeño y alargado en sentido rostrocaudal (Fig. 14B).

En cortes coronales, el soma suele aparecer redondeado o achatado dorsoventralmente (Figs. 14A, 15A, B), con un diámetro máximo de 8-10 µm en secciones de parafina, y de 12 µm en secciones semifinas incluidas en resina. En los cortes parasagitales y horizontales (Fig. 14B) el soma aparece ovalado y su diámetro máximo, paralelo al eje mayor del núcleo, suele medir unos 12 µm.

El núcleo tiende a ocupar la mayor parte del soma, de modo que la relación carioplasmática de las neuronas de la CLTd es muy elevada (Fig. 15A, B). El escaso citoplasma forma alrededor del núcleo un anillo estrecho que se tiñe de modo uniforme. En el contorno del soma, rara vez se insinúan los arranques de los troncos dendríticos primarios y cuando lo hacen, tienden a ser opositopares. El núcleo celular posee de 3 a 5 hendiduras profundas y largas. El evidente nucleolo, de tamaño proporcional al del soma, suele disponerse próximo a la carioteca. Aparte del corpúsculo de Barr, el núcleo no presenta otros elementos tingibles reseñables, con excepción de pequeños y escasos grumos de cromatina intensamente teñidos y adosados a la cara interna de la membrana (Fig. 15B).

Las neuronas de la CLTd son distintas de las de la CLTv. Aquéllas poseen aún menos citoplasma que éstas (Figs. 4, 14A). Esta diferencia de sustancia de Nissl condiciona las propiedades tintoriales. Cuando se examinan a gran aumento las secciones procedentes de bloques incluidos en parafina y teñidas

con violeta de cresilo, las neuronas de la CLTd ofrecen una tinción predominantemente morada, debida al nucleolo y los grumos de cromatina (Fig. 14B); por el contrario, el anillo citoplásmico de las neuronas pequeñas de la CLTv les proporciona una tonalidad más rosada, que enmascara el color

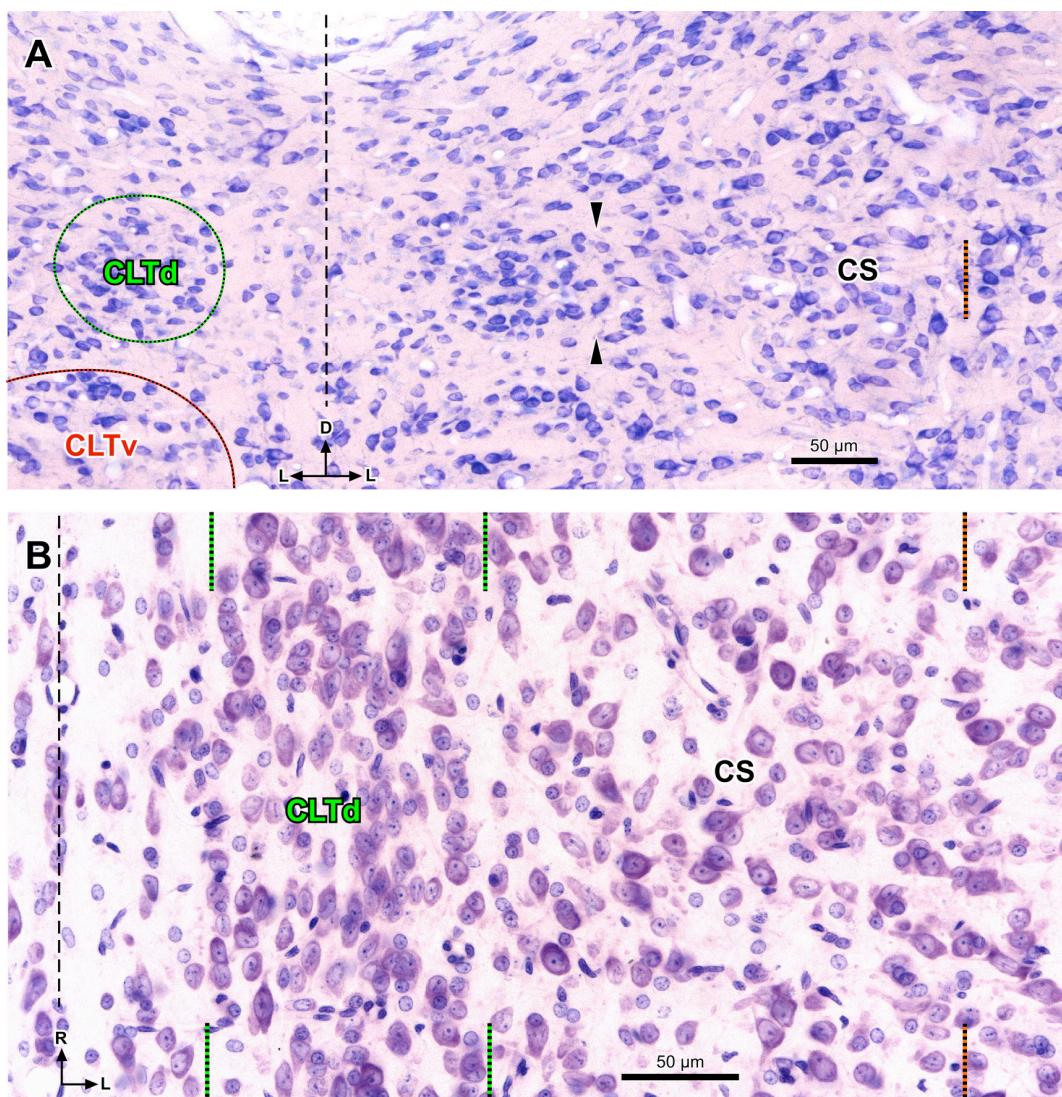


Figura 14. Características citoarquitectónicas básicas de la CLTd. A. Microfotografía de una sección coronal de 15 μm de espesor obtenida tras inclusión en parafina y teñida con el método de Giemsa. En el lado izquierdo, la CLTd se ha delimitado en color verde, y la CLTv en color rojo. Las puntas de flecha negras indican el borde entre la CLTd y el CS. Obsérvense el menor tamaño y la mayor homogeneidad y empaquetamiento de las neuronas de la CLTd comparadas con las de la CLTv y las del CS. La raya negra vertical discontinua indica la línea media. B. Detalle de una sección horizontal de la región paramediana del techo mesencefálico de 15 μm obtenida tras inclusión en parafina y teñida con el método de Nissl. La raya negra vertical discontinua indica la línea media. En este plano de sección, la CLTd, delimitada por las líneas verdes discontinuas, destaca como una columna de neuronas pequeñas, orientadas rostrocaudalmente y densamente empaquetadas, que contrastan claramente con las neuronas del CS, mucho más polimórficas y dispersas. En ambas fotografías, las líneas naranjas indican el borde lateral del área de 200 μm de la que se tomaron las muestras para el análisis del tamaño de los somas y la densidad de las neuronas.

morado de los elementos nucleares (no ilustrado). Estas diferencias cromáticas apenas son perceptibles a menor aumento y tampoco se aprecian en las secciones teñidas con el método de Giemsa. Por último, las hendiduras nucleares de las neuronas de la CLTd son más abundantes y de trayectos más irregulares que las de las neuronas de la CLTv (Fig. 4, 15A, B).

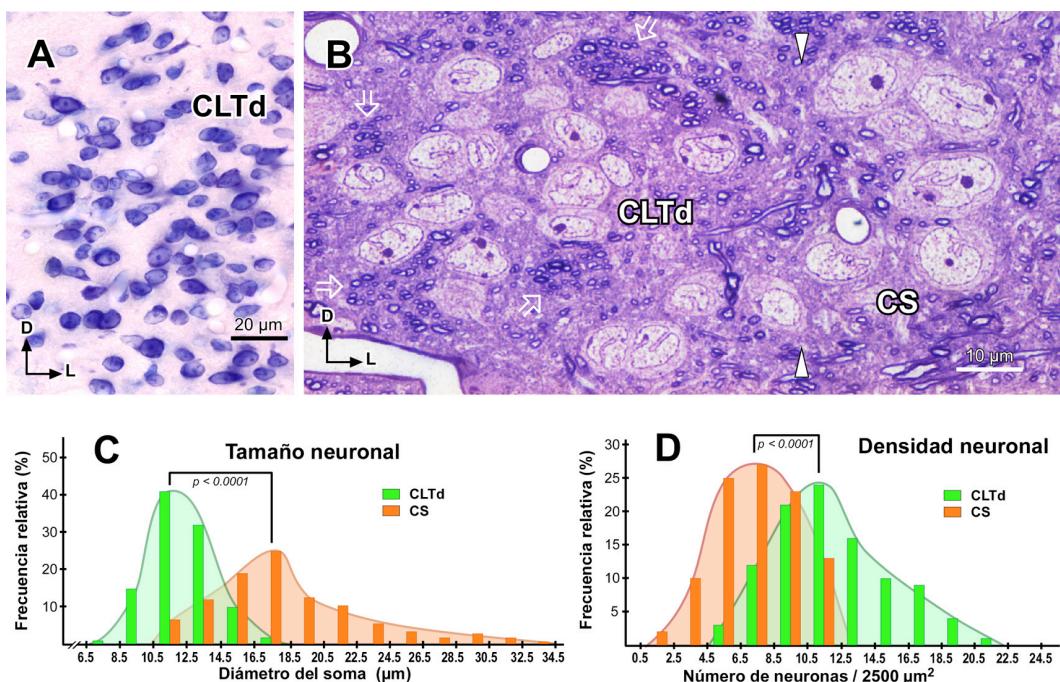


Figura 15. Citoarquitectura básica y morfometría de la CLTd de la rata. A. Detalle de una sección coronal de 15 μm de espesor obtenida tras inclusión en parafina y teñida con el método de Giemsa. Obsérvese la notable homogeneidad de las neuronas y la orientación predominantemente horizontal de sus somas. B. Microfotografía digital a gran aumento de una sección semifina coronal de la zona de transición entre la CLTd y el CS teñida con azul de toluidina. Nótese la evidente diferencia de tamaño entre las neuronas de la CLTd y las neuronas adyacentes del CS, mucho mayores. El borde entre ambos núcleos aparece señalado con las *puntas de flecha blancas*. Las *flechas blancas huecas* señalan algunos haces mal definidos de axones mielínicos delgados integrantes del fascículo de la CLTd. C. Histograma del diámetro máximo del soma de neuronas de la CLTd (verde; valor medio = 12,24 μm ± 1,78 DS; n = 122) y de neuronas de la región adyacente del CS (naranja; valor medio = 18,29 μm ± 4,52 DS; n = 185) medido en secciones semifinas coronales similares a la mostrada en B. Todas las neuronas del CS medidas se encontraban a menos de 200 μm del borde lateral de la CLTd. Nótese que el solapamiento entre las dos poblaciones de neuronas es muy escaso. En general, las neuronas del CS son mayores y más heterogéneas que las de la CLTd. D. Histograma de la densidad neuronal de la CLTd (verde; valor medio = 11,95 ± 3,73 DS; n = 100 áreas cuadradas) y de la región adyacente del CS (naranja; valor medio = 7,43 ± 2,49 DS; n = 100 áreas cuadradas). La densidad neuronal aparece expresada como el número de neuronas presentes en un área cuadrada de 2500 μm² de secciones coronales de 15 μm de espesor obtenidas tras inclusión en parafina y teñidas con el método de Giemsa, similares a la mostrada en la Fig. 14A. Todas las áreas del CS examinadas se encontraban a menos de 200 μm del borde lateral de la CLTd.

Las neuronas de la CLTd difieren de las de la CLTv también cuantitativamente: las neuronas de la CLTd son más pequeñas (*t*-test, $p < 0,0001$; CLTd, $n = 122$; CLTv, $n = 111$) y están más empaquetadas (*t*-test, $p < 0,0001$; CLTd, $n = 100$; CLTv, $n = 100$; n se refiere al número de cuadrículas cuyas neuronas contamos, ver Materiales y Métodos).

La pequeñez, homogeneidad, orientación longitudinal y elevado empaquetamiento de las neuronas de la CLTd permiten también distinguir a este núcleo de la porción más medial del CS (Figs. 1G-I, 4C, D, 14, 15B-D). En la porción más medial del CS predominan las neuronas triangulares y multipolares de orientaciones variadas (Fig. 4C, 14, 15B); además esta región carece de neuronas pequeñas que se puedan confundir con las neuronas de la CLTd. Las neuronas de la CLTd son significativamente menores que las del CS (Fig. 15C; *t*-test, $p < 0,0001$; CLTd, $n = 122$; SC, $n = 185$). Por otra parte, la densidad neuronal del CS muestra grandes variaciones regionales, de modo que el empaquetamiento de las neuronas en la porción medial de las capas intermedias cambia considerablemente de unas secciones a otras, pero siempre es menor que la densidad neuronal de la CLTd (Fig. 15D; *t*-test, $p < 0,0001$; CLTd, $n = 100$; SC, $n = 100$). En muchas secciones, la transición entre la CLTd y el CS se caracteriza por un cambio brusco en el tamaño, la forma, la orientación y el empaquetamiento de las neuronas (Figs. 14, 15B).

4.3. La CLTd es distinta por su mieloarquitectura

La figura 16 muestra microfotografías de tres secciones de 40 μm de espesor, frescas y no teñidas tomadas de distintos niveles rostrocaudales del techo mesencefálico. En este tipo de material, las fibras mielínicas cortadas perpendicularmente son opacas a la luz y aparecen de color marrón oscuro sobre un fondo mucho más claro. Aunque tanto la CLTd como el SAI se caracterizan por la presencia de axones longitudinales cortados de través, los dos núcleos ofrecen un aspecto muy distinto. En secciones caudales, el SAI contiene haces bien definidos de axones mielínicos seccionados, mientras que la CLTd contiene algunas fibras mielínicas cortadas transversalmente que no se agrupan en haces (Fig. 16A, A'). En secciones más rostrales los dos núcleos parecen contener haces cortados perpendicularmente, pero la CLTd aparece

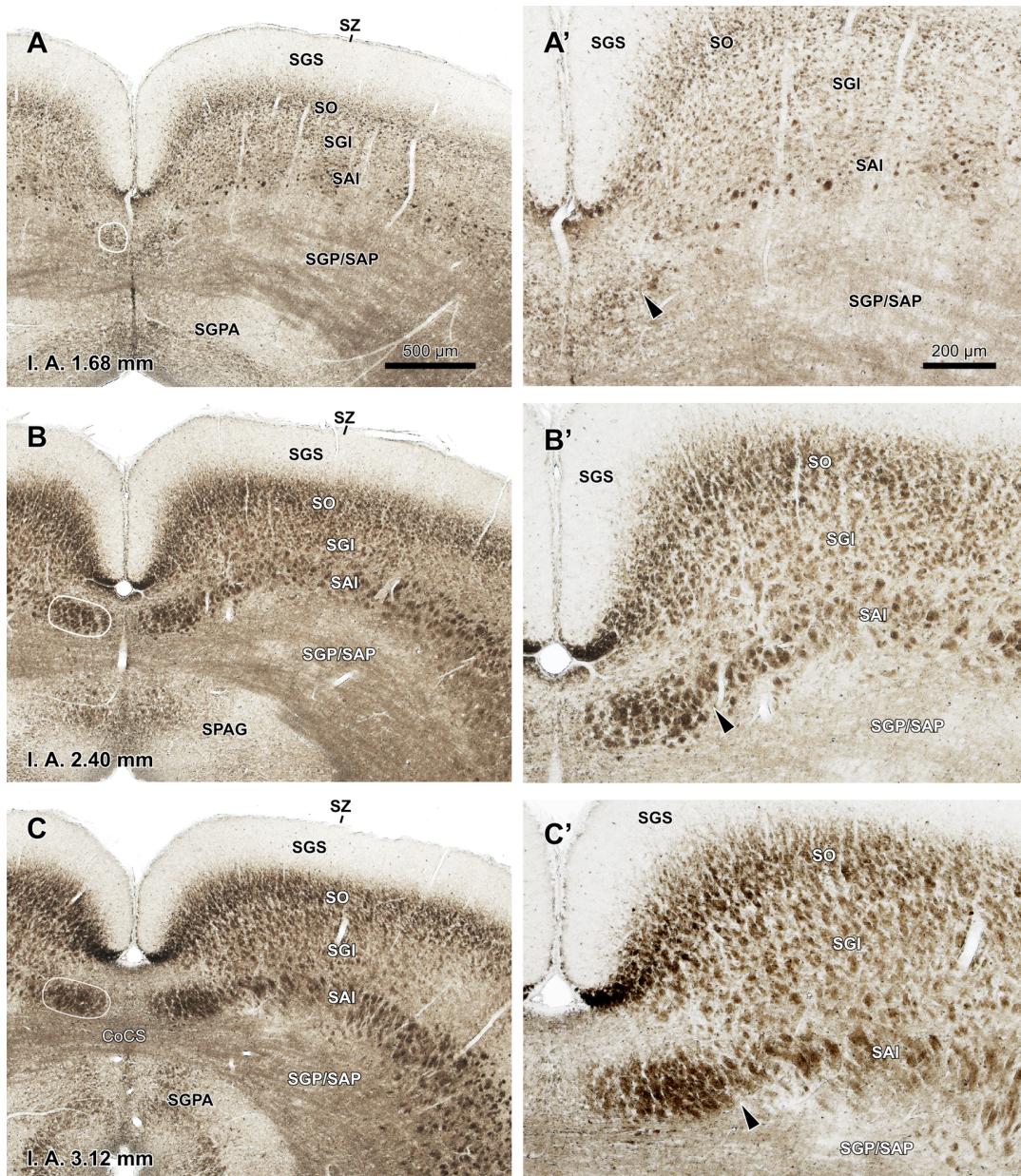


Figura 16. Mieloarquitectura básica de la CLTd de la rata. A-C. Microfotografías de sendas secciones coronales frescas del techo mesencefálico tomadas de tres niveles rostrocaudales diferentes. A la derecha de cada fotografía se encuentra una imagen a mayor aumento de la CLTd y la porción del SAI adyacente a ella (A'-C'). Las fibras mielinicas cortadas de través aparecen oscuras, lo que hace que resalten la CLTd, el SAI y el estrato óptico (SO). En las fotografías A-C se ha delimitado en blanco la CLTd izquierda. Las puntas de flecha negras en A'-C' marcan el límite entre el fascículo de la CLTd y el SAI. A niveles caudales (A, A'), la CLTd contiene fibras individuales claramente distintas de los haces de fibras cortadas del SAI. En secciones centrales (B, B') y rostrales (C, C'), el fascículo de la CLTd aparece como una estructura separada y más oscura compuesta por haces más delgados y juntos que los del SAI. La coordenada interauricular de cada sección se indica en la parte inferior de las fotografías A-C. La barra de aumento de A sirve también para B y C, y la de A' sirve también para B' y C'.

más oscura que el SAI, lo que indica que posee una mayor concentración de axones mielínicos longitudinales (Fig. 16B, B', C, C'). Además, los haces de fibras que recorren la CLTd son más delgados, menos nítidos y se encuentran más juntos que los del SAI. Esta disposición es compatible con la elevada densidad neuronal de la CLTd, que obliga a los axones orientados longitudinalmente a ocupar los estrechos huecos que quedan entre los somas neuronales (Fig. 15B). Por el contrario, los haces de fibras longitudinales del SAI, mucho más gruesos y dispersos, son compatibles con la menor densidad neuronal del CS.

Debido a que las secciones frescas no teñidas proporcionan una resolución muy limitada, inyectamos el trazador neuroanatómico bidireccional dextrano biotinado (BDA) en el polo rostral del CS de la rata (Fig. 17A) para marcar simultáneamente los axones longitudinales que recorren la CLTd y los que recorren el CS. Aprovechamos el hecho de que la mayor parte de los axones longitudinales del SAI entran o salen del CS por su polo rostral, y también la facilidad con la que el BDA es captado por fibras de paso. En una sección coronal del tercio rostrocaudal central del CS (Fig. 17B,C), el SAI destaca por la presencia de haces de fibras marcadas relativamente grandes, bien definidos y claramente separados unos de otros, que no se encuentran en la CLTd. Esta contiene una gran densidad de axones marcados repartidos homogéneamente y que no se agrupan en haces discernibles. Al examinar este caso a gran aumento, se comprueba que la CLTd contiene una mezcla de fibras de paso delgadas y de campos axónicos terminales, mientras que las fibras marcadas en el SAI son predominantemente de paso, poseen grosor variado y forman haces bien definidos.

Todos estos resultados indican que la CLTd contiene abundantes axones que recorren el núcleo longitudinalmente y que parecen entrar o salir de él a través de su polo rostral. Como estos axones difieren de los axones longitudinales del SAI por su calibre y su patrón de agregación, es probable que constituyan conjuntamente una estructura anatómica separada del SAI, a la que, como mencionamos más arriba, nos vamos a referir en esta Memoria como *fascículo de la CLTd* (Fig. 17).

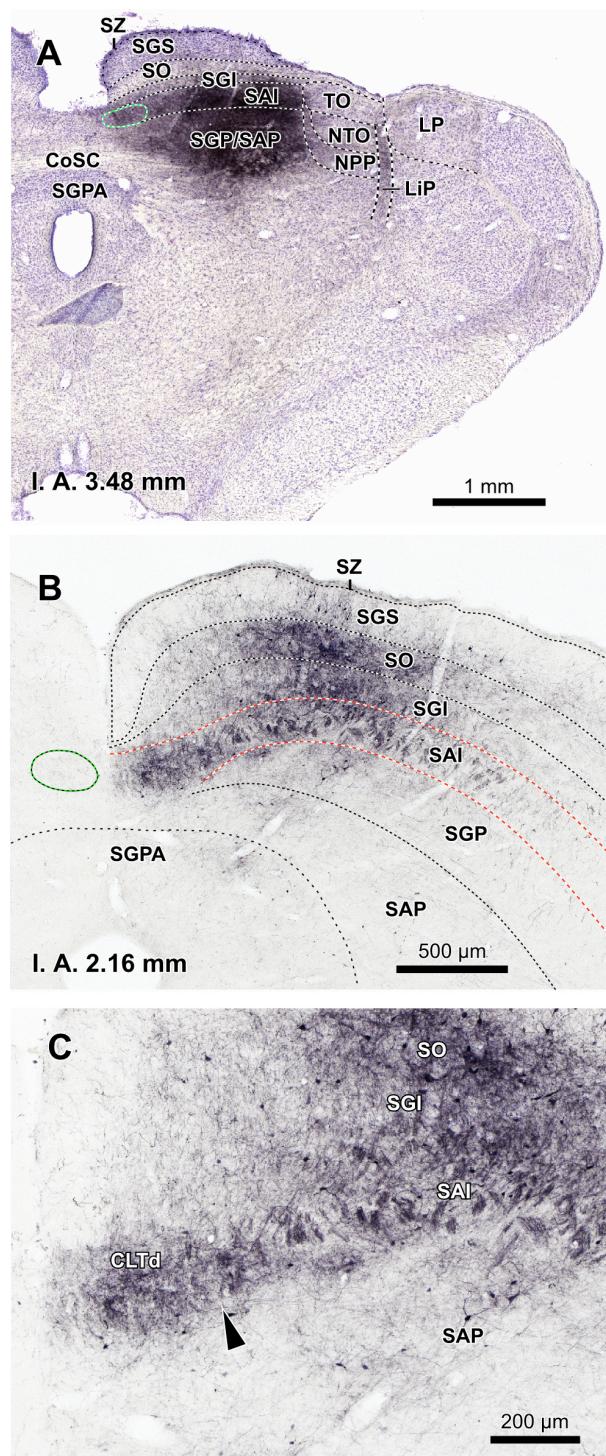


Figura 17. El fascículo de la CLTd difiere de los haces de fibras longitudinales del CS. A. Microfotografía de una sección coronal contrastada con el método de Nissl en la que se aprecia el centro de una gran zona de inyección de BDA en el polo rostral del CS. Caso 12141. B. Sección coronal del tercio rostrocaudal central del CS del mismo caso. En el lado izquierdo, se ha indicado la CLTd en verde. Nótese que el SAI contiene haces de fibras bien definidos, que contrastan con el marcado más homogéneo de la CLTd. C. Detalle de la sección mostrada en B. La punta de flecha negra señala el límite entre el CLTd y el SAI. En la CLTd las fibras marcadas no se agrupan en haces bien definidos. La coordenada interauricular de cada sección se indica en la parte inferior de las fotografías.

4.4. La CLTd es neuroquímicamente distinta

La CLTd de la rata se distingue con nitidez en secciones procesadas con técnicas de hibridación *in situ* para visualizar el ARN mensajero responsable de la síntesis del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT). En todas las secciones que contienen la CLTd, el núcleo resalta debido a la elevada concentración de neuronas marcadas, que contrasta fuertemente con la escasez de neuronas marcadas en la CLTv (Fig. 18A, C-E). De hecho, el VIAAT parece expresarse en la mayoría de las neuronas de la CLTd, si no en todas, lo que sugiere que la CLTd está formada sobre todo por neuronas inhibidoras. La densidad de neuronas marcadas es también mucho mayor en la CLTd que en las regiones del CS próximas a ella. Esta diferencia es particularmente llamativa si se compara la CLTd con el SAI, que es la capa del CS con menor densidad de neuronas marcadas (Fig. 18A, C-E).

Al contrario de lo que sucede con la expresión del VIAAT, en las secciones procesadas para revelar el ARN mensajero responsable de la síntesis del transportador vesicular de glutamato de tipo 2 (VGluT2) la CLTd destaca por la ausencia prácticamente total de neuronas marcadas (Fig. 18B, F-H), que contrasta con la abundancia de neuronas marcadas en la CLTv y en las capas intermedias y profundas del CS. Por lo tanto, la hibridación *in situ* para el VIAAT y la hibridación *in situ* para el VGluT2 ofrecen patrones de tinción complementarios; tomadas conjuntamente, estas dos tinciones refuerzan la identidad de la CLTd como un núcleo distinto.

Por último, en secciones procesadas para revelar el ARN mensajero responsable de la síntesis del transportador vesicular de glutamato de tipo 1 (VGluT1), todos los núcleos tectales (incluidos la CLTd, la CLTv, el CS y el CI) aparecen desprovistos de neuronas marcadas (no ilustrado).

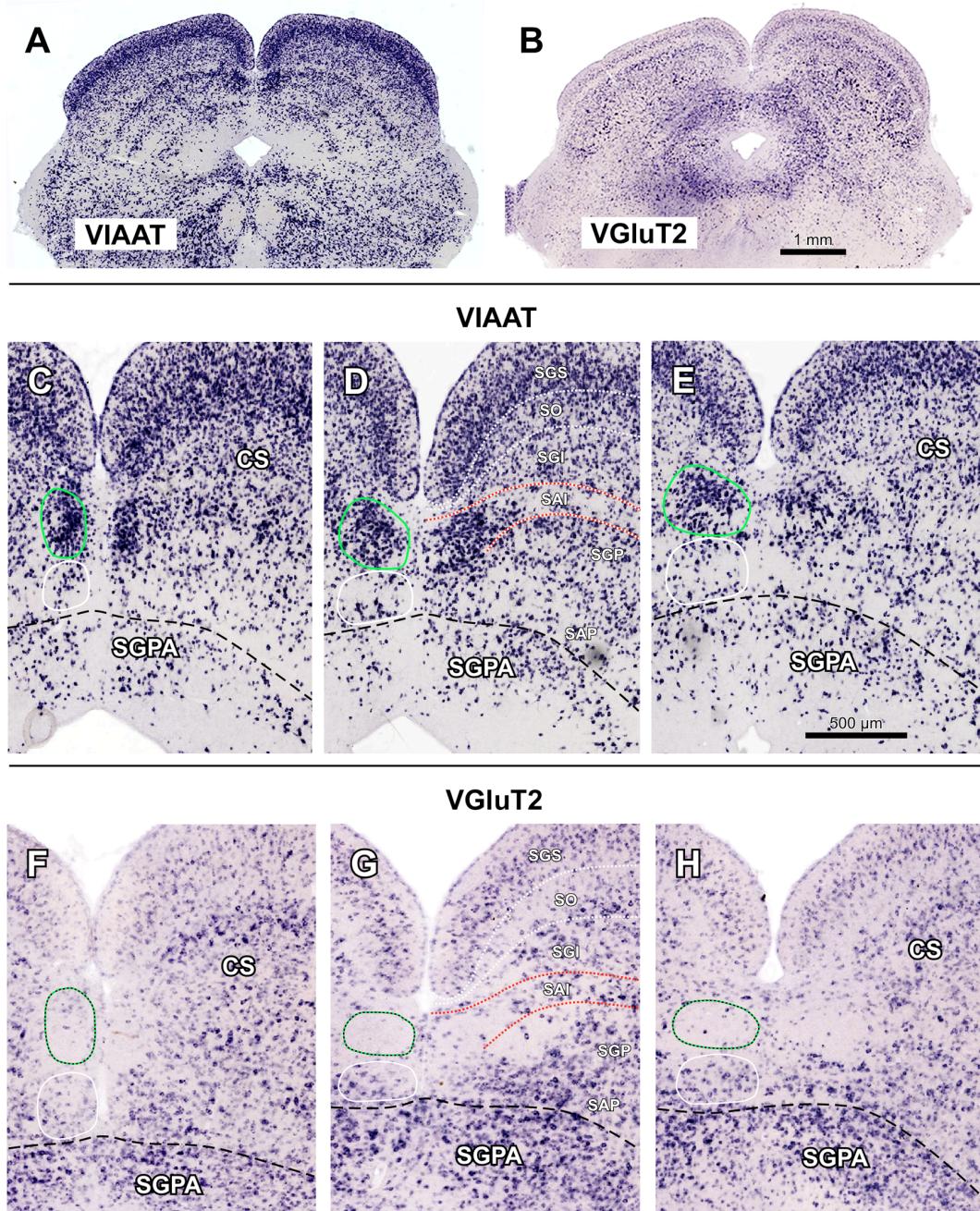


Figura 18. En las neuronas de la CLTd de la rata se expresa el VIAAT, pero no el VGlut2. Secciones coronales del techo mesencefálico de la rata procesadas con técnicas de hibridación *in situ* para visualizar la expresión del VIAAT (A, C-E) o del VGlut2 (B, F-H). A y B muestran imágenes panorámicas de secciones del tercio central de la CLTd. C-H muestran detalles de secciones de las porciones caudal (C, F), central (D, G) y rostral (E-H) del núcleo. En el lado izquierdo, la CLTd se ha delimitado en verde. Obsérvese el patrón complementario de tinción de la CLTd. Además, la intensa tinción de la CLTd para el VIAAT contrasta con la escasa tinción en el SAI. La barra de aumento de B sirve también para A, y la de E sirve también para C-D y F-H.

4.5. La CLTd se distingue por la expresión basal de Fos

Hemos detectado inmunocitoquímicamente la expresión de la proteína Fos en secciones del cerebro de cuatro ratas no estimuladas sensorialmente. Las ratas permanecieron en silencio y en la oscuridad durante 48 horas antes de ser sacrificadas.

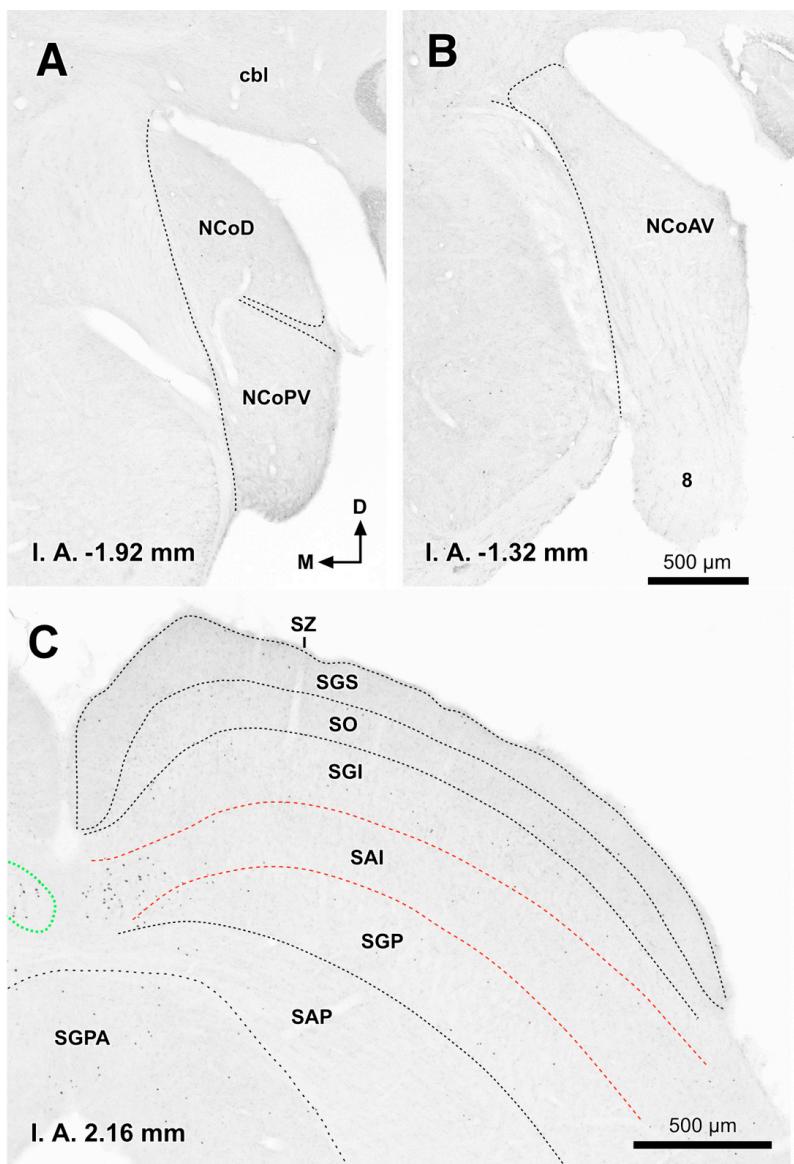


Figura 19. Ausencia de expresión basal de Fos en los núcleos cocleares y en el CS. Secciones coronales inmunoteñidas para visualizar la proteína Fos, procedentes de una rata mantenida en silencio y en la oscuridad durante las 48 horas previas a su sacrificio por perfusión. (A) Sección del núcleo coclear posteroventral (NCoPV) y el núcleo coclear dorsal (NCoD). (B) Sección del núcleo coclear anteroventral (NCoAV) y la raíz del nervio coclear (8). (C) Sección del techo mesencefálico que incluye el CS y la CLTv. Obsérvese la ausencia casi total de neuronas inmunorreactivas en los núcleos cocleares y en el CS. La barra de aumento en B vale también para A.

Todas las subdivisiones del complejo de los núcleos cocleares de ambos lados aparecen prácticamente desprovistas de inmunotinción (Fig. 19A, B). Como es bien sabido que la estimulación acústica induce la expresión en los núcleos cocleares de la proteína Fos o de su ARN mensajero (Ehret y Fischer 1991 [ratón]; Sato y cols. 1992 [rata]; Qian y Jen 1994 [murciélagos marrón, *Eptesicus fuscus*]; Adams 1995 [gato]; Brown y Liu 1995 [ratón]; Friauf 1995 [rata]; Keilmann y Herdegen 1995, 1997 [rata]; Cody y cols. 1996 [cobaya]; Hillman y cols. 1997 [rata]; Carretta y cols. 1999 [rata]; Kandiel y cols. 1999 [rata]; Luo y cols. 1999 [rata]; Saint Marie y cols. 1999 [rata]; Chen y cols. 2000 [rata]; Bahu y cols. 2001 [hámster]; Riera-Sala y cols. 2001 [rata]; Zhang y cols. 2003 [hámster]; Yang y cols. 2005 [rata]; Sun y cols. 2007 [rata]; Lu y cols. 2009 [rata]; Harrison y Negandhi, 2012 [ratón]), la ausencia de inmunotinción en las condiciones basales de nuestros experimentos indica que el aislamiento acústico al que sometimos a las ratas fue eficaz. De modo similar, las capas superficiales del CS, muchas de cuyas neuronas expresan la proteína Fos en respuesta a los estímulos visuales (Craner y cols. 1992 [rata]; Correa-Lacárcel y cols. 2000 [rata]; Nakadate y cols. 2012), aparecen desprovistas de núcleos marcados (Fig. 19C), lo que confirma la eficacia del aislamiento visual.

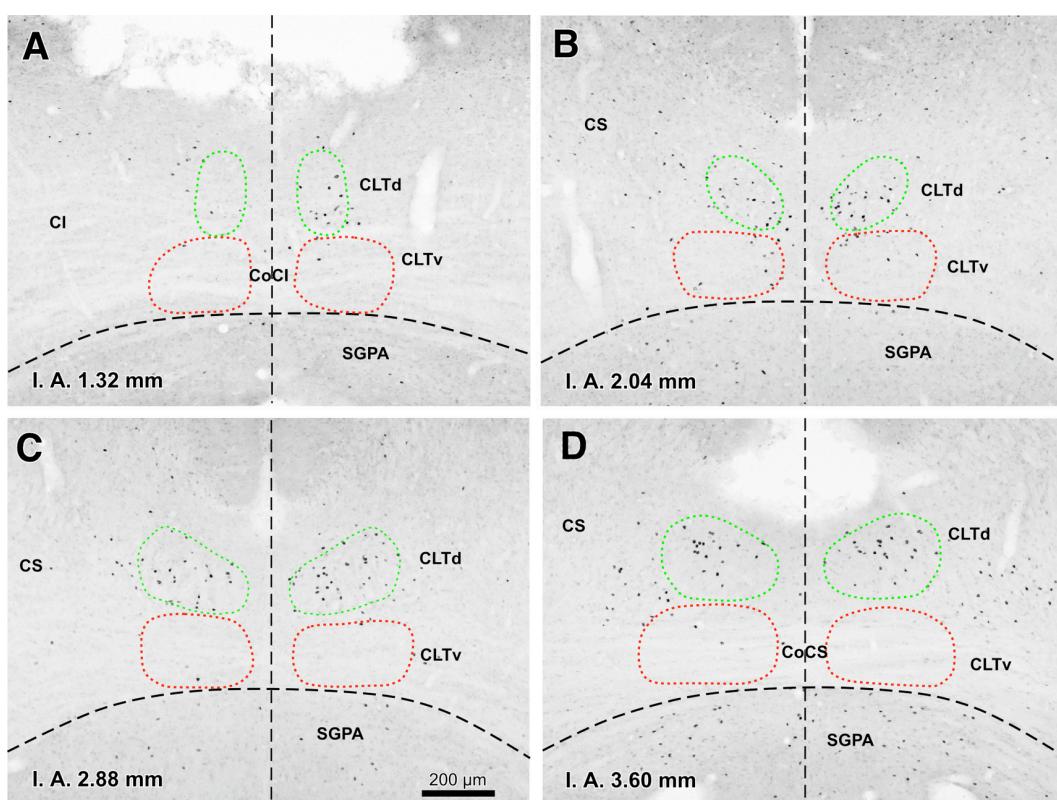


Figura 20. Expresión basal de Fos en la CLTd de la rata. Microfotografías de cuatro secciones coronales del techo mesencefálico del mismo caso ilustrado en la Fig. 19. Obsérvese la abundancia de neuronas marcadas en la CLTd, que contrasta con la ausencia casi total de neuronas marcadas en la CLTv y en el CS.

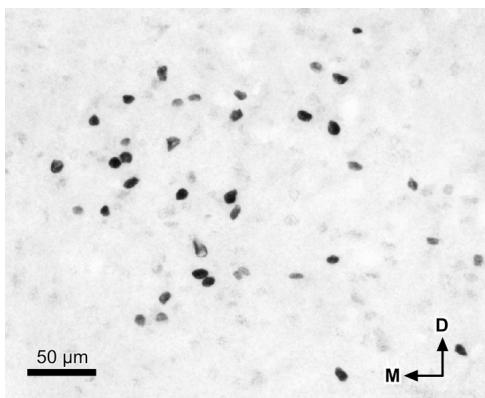
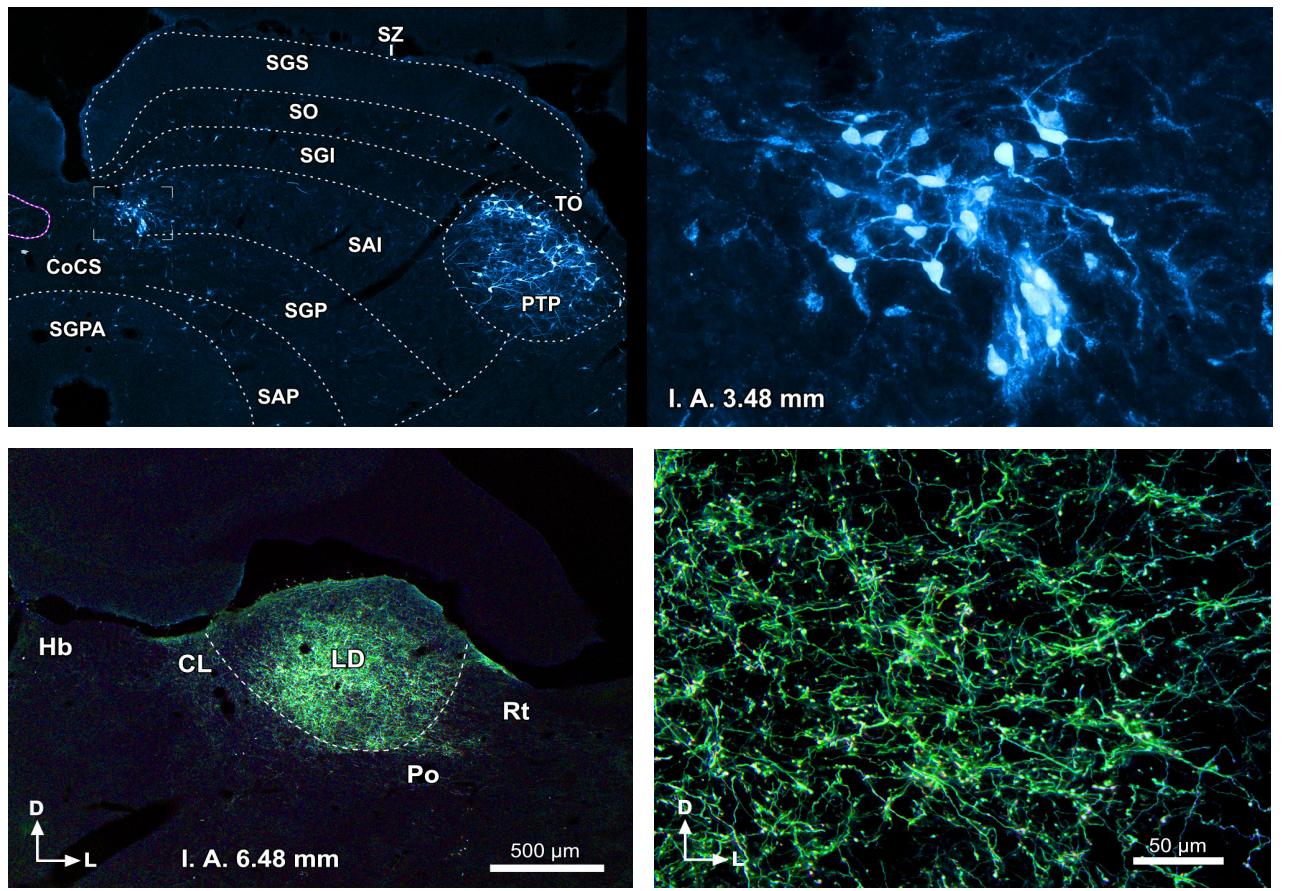


Figura 21. Núcleos de neuronas de la CLTd inmunorreactivos para Fos. Detalle de la CLTd del mismo caso ilustrado en las figuras 19 y 20.

En muchas neuronas de la CLTd se expresa la proteína Fos en condiciones basales, y este hecho permite distinguir a la CLTd de sus núcleos circundantes. La figura 20 muestra una serie de secciones coronales de un caso representativo. Las neuronas inmunorreactivas se reparten de modo bastante uniforme por todo el núcleo. En todas las secciones la CLTd de ambos lados contiene abundantes neuronas inmunorreactivas. Como cabía esperar dada la localización intranuclear de la proteína Fos, la inmunotinción queda limitada a los núcleos de las neuronas (Fig. 21). Aunque en todas las secciones se observan núcleos con distinta intensidad de tinción, predominan siempre los núcleos intensamente teñidos. No obstante, el procedimiento histoquímico utilizado, en el que se reforzó con sales de níquel el revelado del cromógeno, proporcionó una tinción negra en la que hasta los núcleos inmunoteñidos más pálidos contrastan nítidamente sobre un fondo relativamente incoloro. Muchos de los núcleos inmunoteñidos poseen forma ovalada y su eje mayor habitualmente horizontal (Fig. 21). En los núcleos que rodean a la CLTd (CS y CLTv) y en la SGPA, las neuronas inmunoteñidas son muy escasas (Fig. 20).



CAPÍTULO 2

CONEXIONES NERVIOSAS DE LA CLTD DE LA RATA

1. Hipótesis

Como cualquier núcleo cerebral, la CLTd posee **conexiones nerviosas aferentes y eferentes propias y distintas de las de los núcleos que la rodean**. Caracterizando las conexiones de la CLTd, podemos aproximarnos a su función.

2. Objetivos

1. Confirmar la identidad de la CLTd de la rata a través de sus conexiones nerviosas.
2. Identificar las fuentes de proyección a la CLTd.
3. Describir con trazadores anterógrados las proyecciones de la CLTd.
4. Confirmar con trazadores retrógrados las principales proyecciones de la CLTd y utilizar estos datos para mejorar el conocimiento sobre la organización del núcleo.

3. Diseño experimental

Hemos estudiado las conexiones nerviosas de la CLTd de la rata en dos pasos. Primero *inyectamos el trazador neuroanatómico dextrano biotinado (BDA) en la propia CLTd*. Debido al carácter bidireccional de este trazador, estos experimentos revelan tanto las principales fuentes de proyección a la CLTd, como el destino de los axones de sus neuronas. Como describiremos más abajo, el destino fundamental de las eferencias de la CLTd es el complejo lateral del tálamo ipsolateral, que incluye a los núcleos talámicos lateral posterior (LP) y laterodorsal (LD). Una vez identificadas estas proyecciones, en una segunda fase *inyectamos el trazador retrógrado FluoroGold en el complejo lateral del tálamo* para marcar retrógradamente las neuronas de la CLTd y analizar su distribución y sus características morfológicas. Para interpretar la presencia de ciertas neuronas y axones marcados, hemos recurrido también a diversos casos de la histoteca del Laboratorio con inyección de trazadores.

Centro nervioso	Caso 02088		Caso 01101		
	Ipso	Contra	Ipso	Contra	
Núcleo principal del nervio trigémino	—	+	—	+	●
Formación reticular pontina	+	—	+	—	●
Locus cerúleo	+	—	+	—	●
Región paralemniscal medial	+	+	+	+	●
Núcleo cuneiforme	++	++	+	—	●
Sustancia gris periacueductal, dorsomedial	++	+	++	+	●
Sustancia gris periacueductal, dorsolateral	+	+	+	—	●
Sustancia gris periacueductal, lateral	+	+	—	—	●
Colículo inferior, núcleo central	+	—	—	—	●
Colículo inferior, corteza externa	++	+	+	—	●
Colículo inferior, corteza dorsal	++	+	—	—	●
Columna longitudinal tectal ventral	++	—	++	—	●
Núcleo del brazo del colículo inf.	++	+	++	+	●
Colículo superior, <i>stratum zonale</i>	—	—	—	—	●
Colículo superior, <i>stratum griseum superficiale</i>	—	—	—	—	●
Colículo superior, <i>stratum opticum</i>	+	—	—	—	●
Colículo superior, <i>stratum griseum intermediale</i>	+	+	+	—	●
Colículo superior, <i>stratum album intermediale</i>	+	—	+	—	●
Colículo superior, <i>stratum griseum profundum</i>	+	+	+	—	●
Colículo superior, <i>stratum album profundum</i>	+	+	+	—	●
Núcleo pretectal medial	++++	++	++	+	●
Núcleo pretectal posterior	++	+	++	+	●
Núcleo pretectal anterior	+	—	+	—	●
Sustancia gris central rostral (periventricular)	+	+	++	+	●
Cuerpo geniculado ventrolateral (parvicelular)	++	+	+	+	●
Lámina intergeniculada	+	—	+	—	●
Zona incerta	++	+	++	+	●
Núcleo talámico lateral posterior	+	—	—	—	●
Núcleo ventromedial del hipotálamo	+++	++	+++	++	●
Corteza retroesplenial granular, región a	++++	+++	++	+	●
Corteza retroesplenial granular, región b	++++	+++	++	+	●
Corteza retroesplenial granular, región c	++++	+++	++	+	●
Corteza retroesplenial disgranular,	+++	++	++	+	●
Corteza visual secundaria, mediomedial	++++	+++	+++	++	●
Corteza parietal de asociación medial	+++	++	++	+	●
Núcleo septal intermediolateral	+++	++	++	+	●
Corteza cingulada anterior ventral	+++	++	++	+	●
Corteza prelímbica	+++	++	?	?	●
Corteza infralímbica	+++	++	?	?	●
Tenia tectal dorsal	++	—	?	?	●

Tabla 2: Distribución de las neuronas marcadas tras inyección de BDA en la CLTd. Casos 02088 y 01101 (zonas de inyección ilustradas en la Fig. 22). El número de cruces es proporcional al número de neuronas marcadas. En el caso 01101 falta la información sobre las áreas de la corteza prefrontal medial porque no se recogieron las secciones más rostrales del encéfalo. El código de colores de la columna de la derecha indica la probabilidad de que un núcleo inerva a la CLTd: (●), probablemente inerva a la CLTd; (○), no hay datos suficientes para concluir si inerva a la CLTd; (●), es improbable que inerva a la CLTd.

4. Resultados y discusión

4.1. Casos con inyección de BDA en la CLTd

Estos resultados se basan en cinco casos con zonas de inyección únicas y pequeñas (diámetro máximo $\leq 250 \mu\text{m}$) centradas en la CLTd y situadas a distintos niveles rostrocaudales (Fig. 22). Los resultados de los cinco casos son semejantes cualitativamente; no obstante, el número de neuronas y fibras marcadas es mayor en los casos con inyecciones más rostrales.

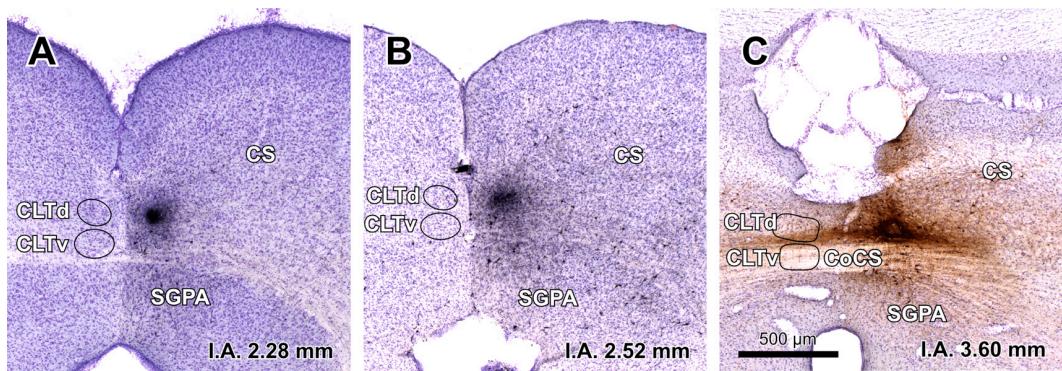


Figura 22. Inyección de BDA en la CLTd: Microfotografías de secciones coronales de tres casos que muestran sendas zonas de inyección centradas en la región central (casos 01101 [A] y 02088 [B]) o en la región rostral (caso 00268 [C]) de la CLTd.

En cada experimento, se encuentran neuronas marcadas en una gran variedad de centros nerviosos repartidos desde el bulbo raquídeo caudal hasta el telencéfalo (Fig. 23; Tabla 2). La mayor parte de las neuronas marcadas muestran un producto de reacción puntiforme limitado al soma y la porción proximal de las dendritas. De modo similar, se hallan abundantes axones marcados en muy diversos centros nerviosos encefálicos (Fig. 23). En las secciones siguientes, describimos primero las características morfológicas y la distribución de las neuronas marcadas, y a continuación los detalles de los axones marcados. En la descripción, hemos establecido una clasificación jerárquica, que agrupa las conexiones en tres categorías. Tanto para las aferencias, como para las eferencias, hemos optado por describir primero las principales conexiones de la CLTd, pero no las discutimos en este Capítulo. Dado que estas conexiones aportan datos esenciales para confirmar la identidad de la CLTd y comenzar a comprender su significado biológico, hemos

considerado pertinente reservarlas para la Discusión General. A una segunda categoría pertenecen los núcleos que sin constituir una fuente clara de proyecciones para la CLTd, o un destino claro de sus axones, contienen en nuestros experimentos un número apreciable de neuronas o axones marcados. Estas conexiones son descritas y discutidas en este Capítulo, para evitar así sobrecargar la Discusión General con datos colaterales. Por último, otros núcleos en los que hallamos apenas unas neuronas o axones marcados aparecen recogidos en la tabla 2 e ilustrados en la figura 23, pero no reciben más atención en el texto.

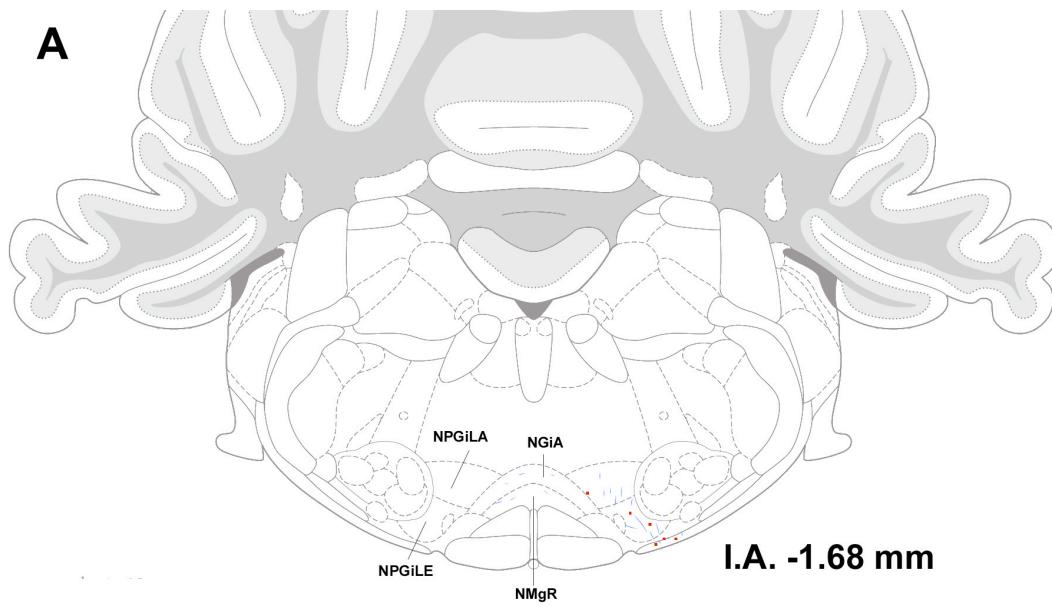


Figura 23. Distribución de las neuronas y axones marcados por una inyección de BDA limitada a la CLTd. Caso 02088, cuya zona de inyección se muestra en la figura 22B. Se han escogido 15 niveles coronales representativos, tomados del atlas del cerebro de la rata publicado por Paxinos y Watson (2005) y ordenados en sentido caudorostral (A-Ñ). El número situado debajo de cada dibujo indica la distancia en milímetros entre el nivel ilustrado y el plano coronal interauricular. La zona de inyección se ha representado en azul en F. En los dibujos, los puntos verdes ilustran somas marcados retrógradamente, las líneas azules representan axones de paso marcados, y la concentración de puntos rojos refleja la densidad de los campos axónicos terminales marcados. Las áreas encuadradas en magenta señalan la posición aproximada de los campos microscópicos cuyas fotografías se muestran en figuras posteriores. El número de color magenta situado junto a cada uno de estos marcos es el mismo que el de la correspondiente figura. Para el significado de las abreviaturas, ver la lista al principio de este Trabajo.

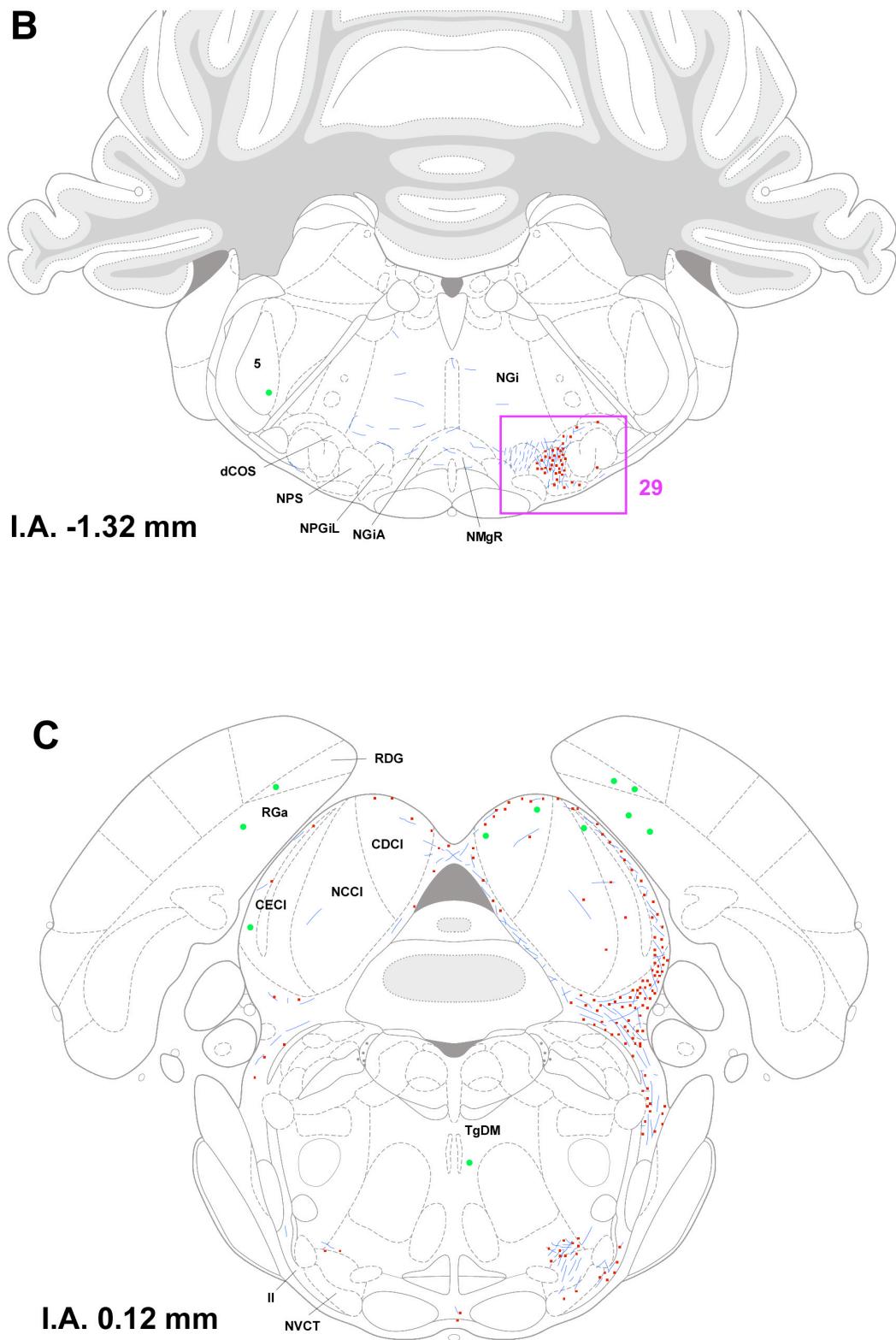


Figura 23 (cont.)

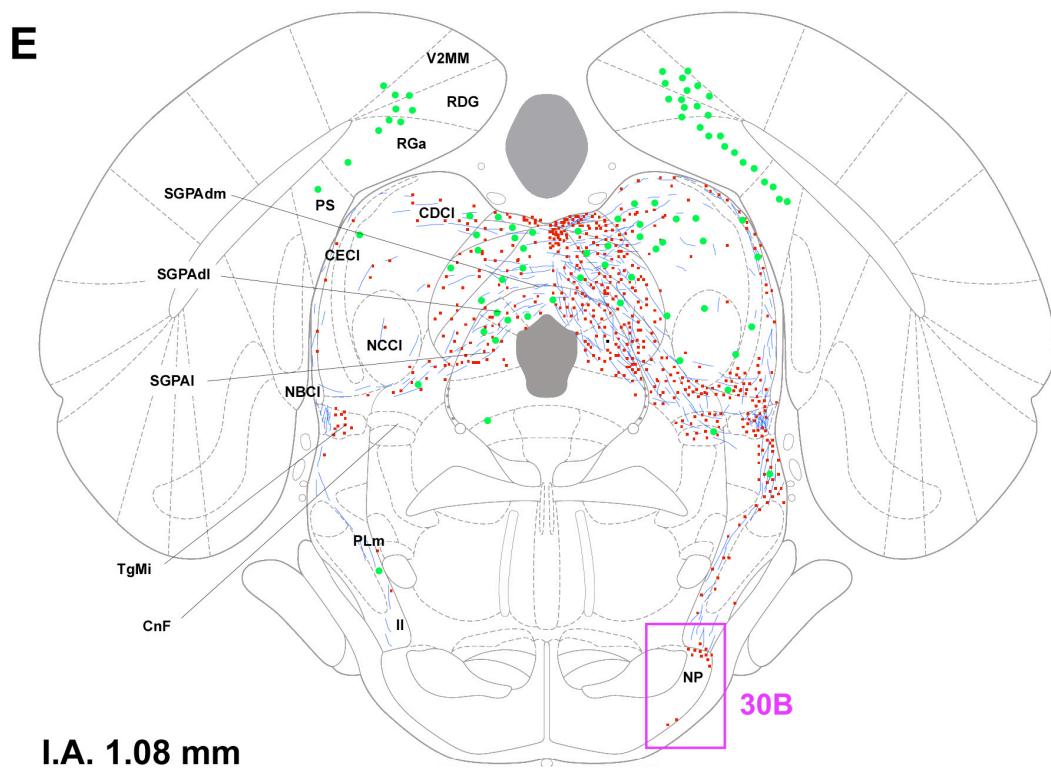
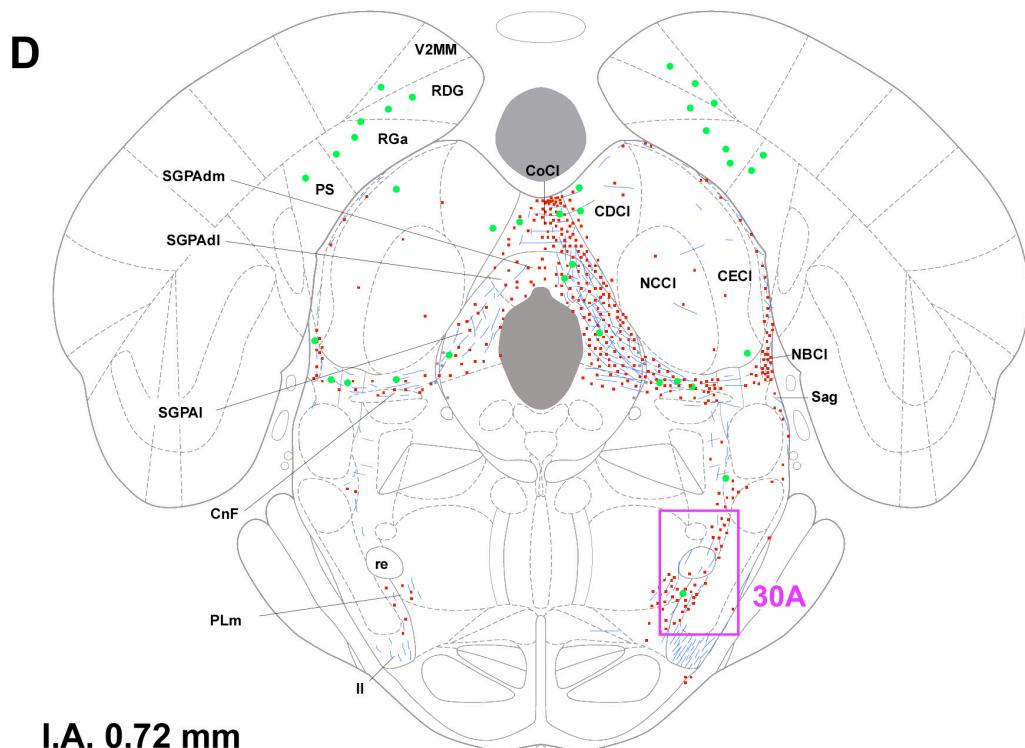


Figura 23 (cont.)

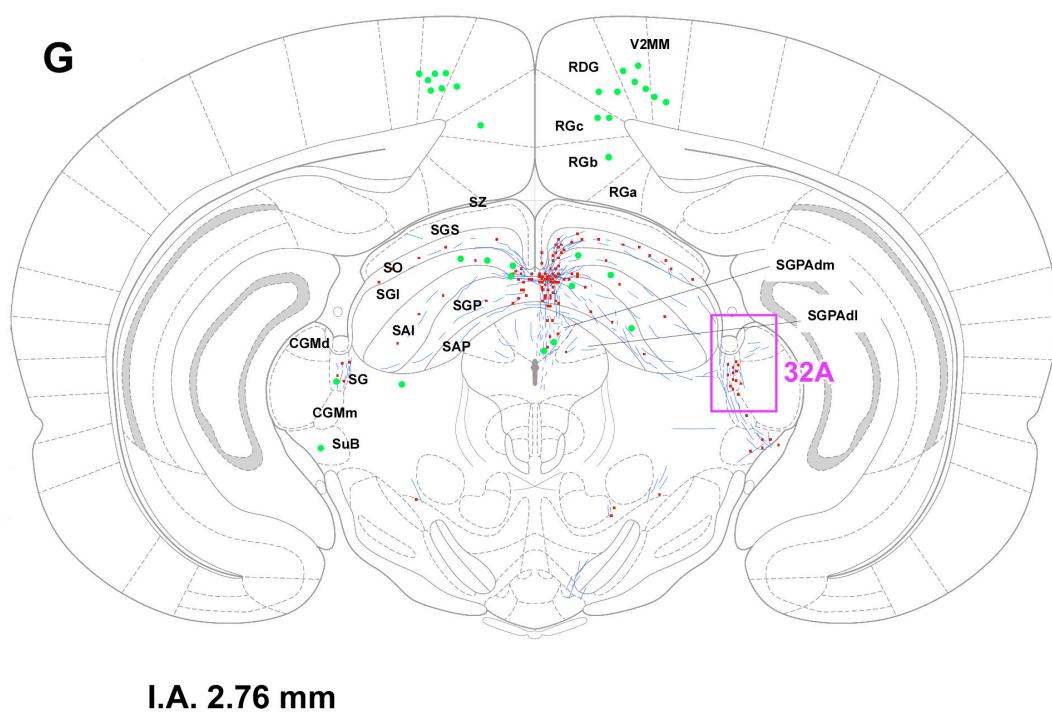
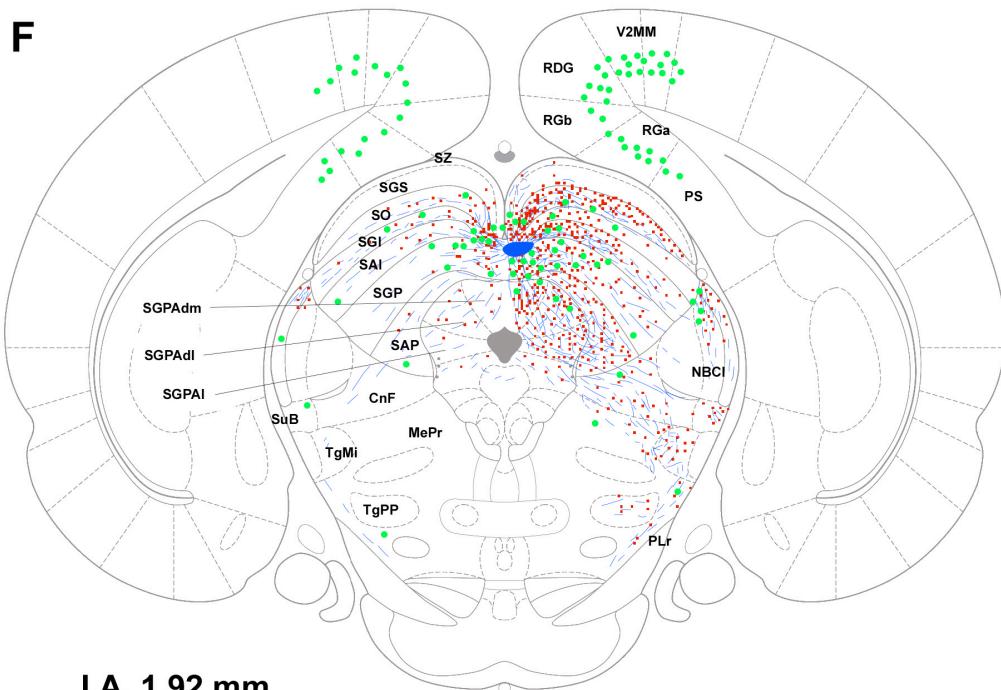


Figura 23 (cont.)

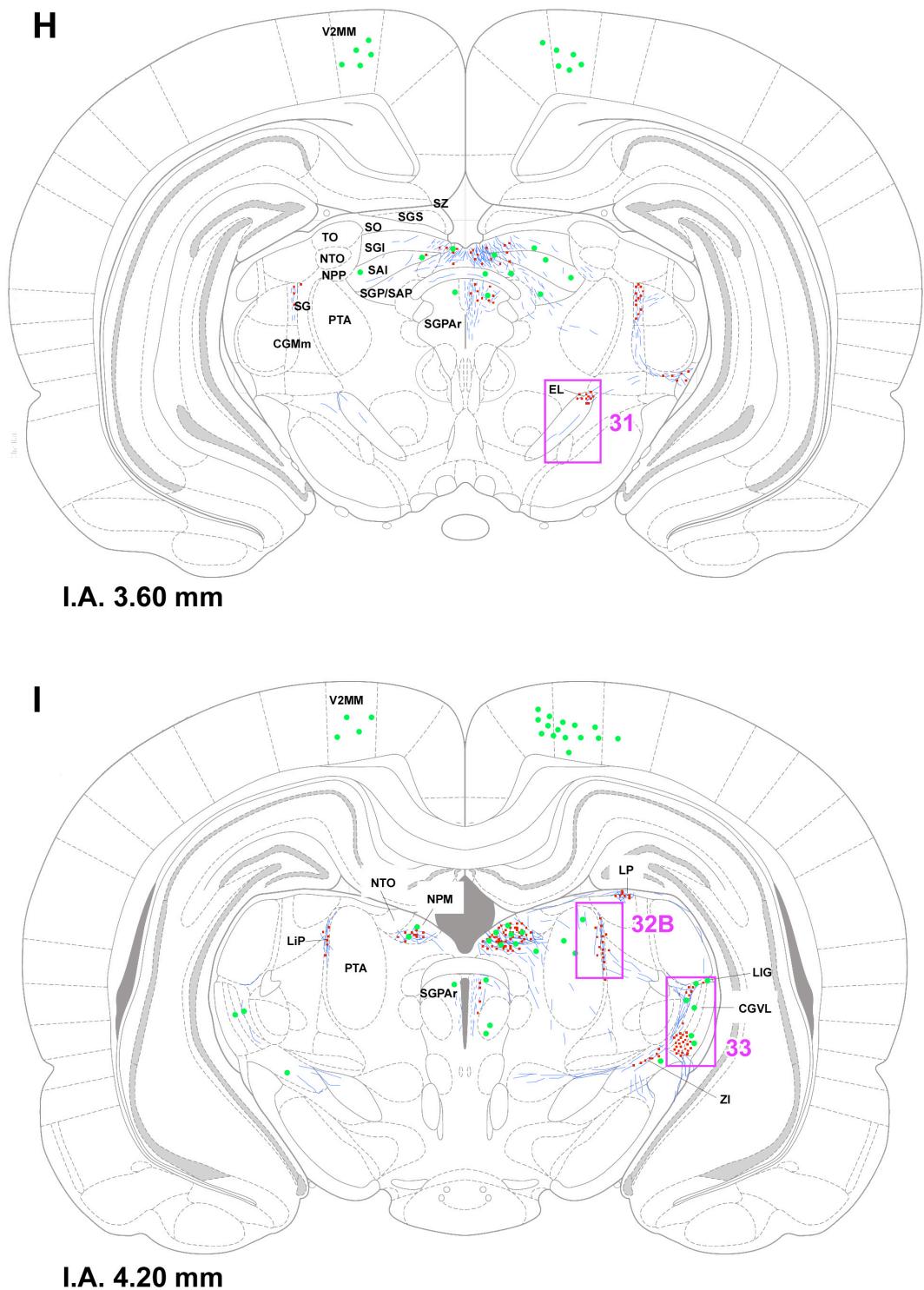


Figura 23 (cont.)

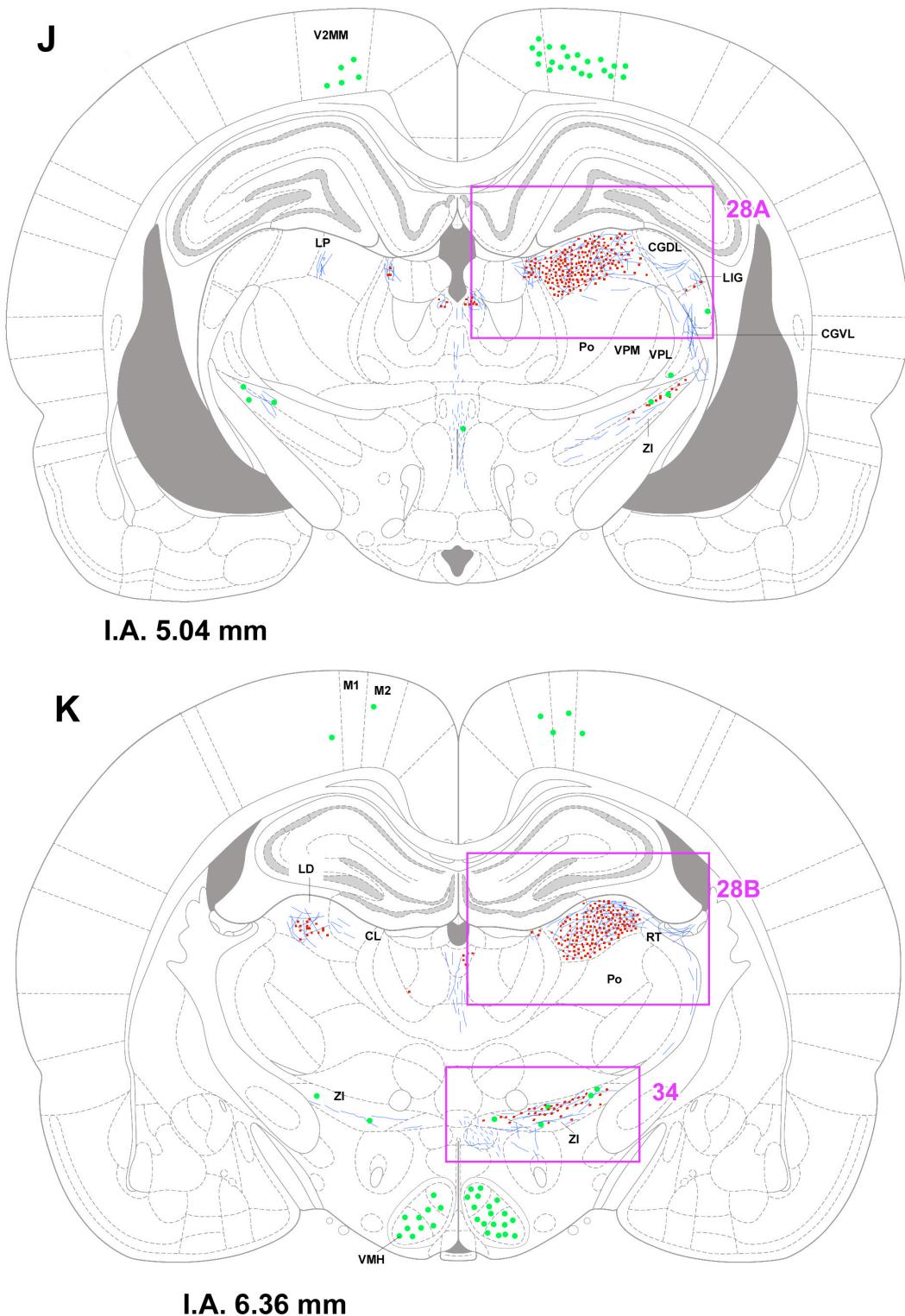
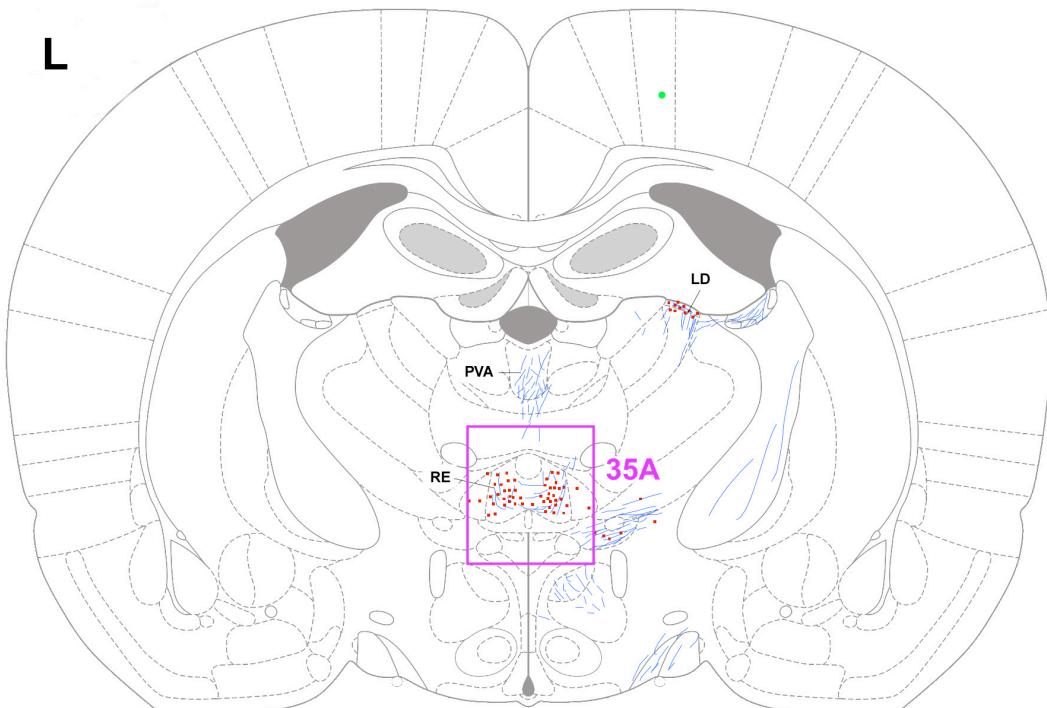
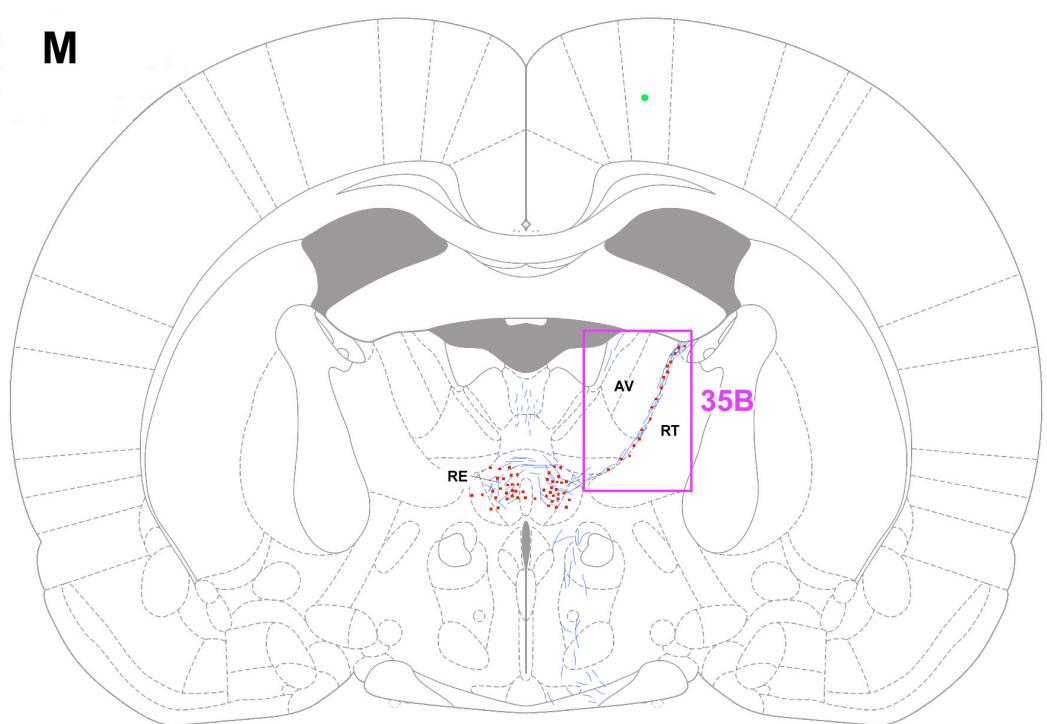


Figura 23 (cont.)

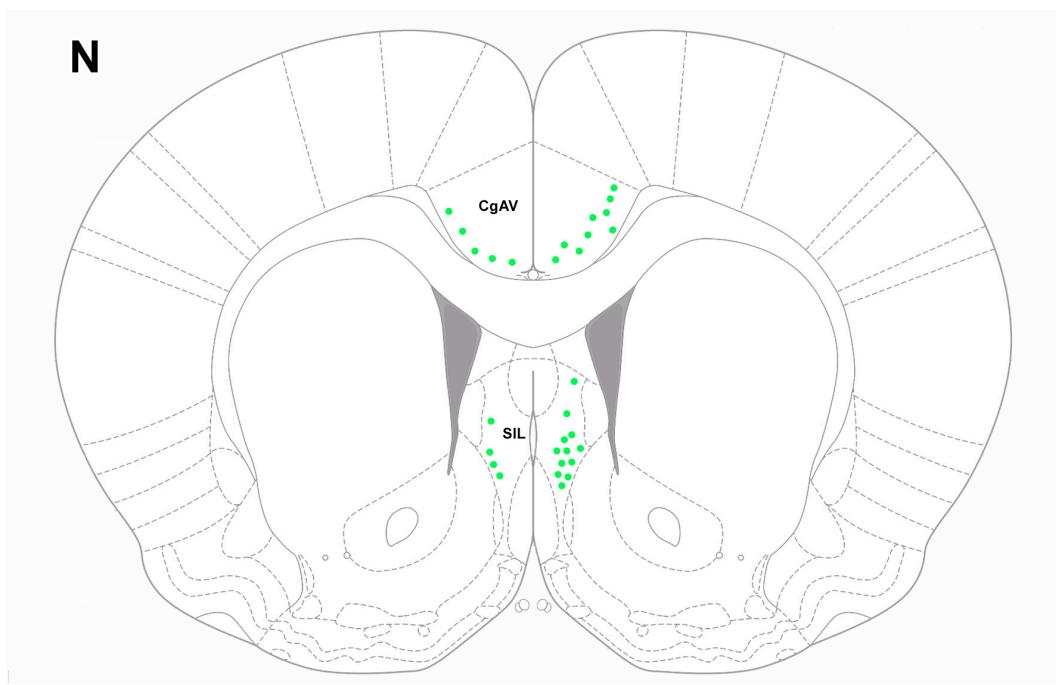


I.A. 7.20 mm

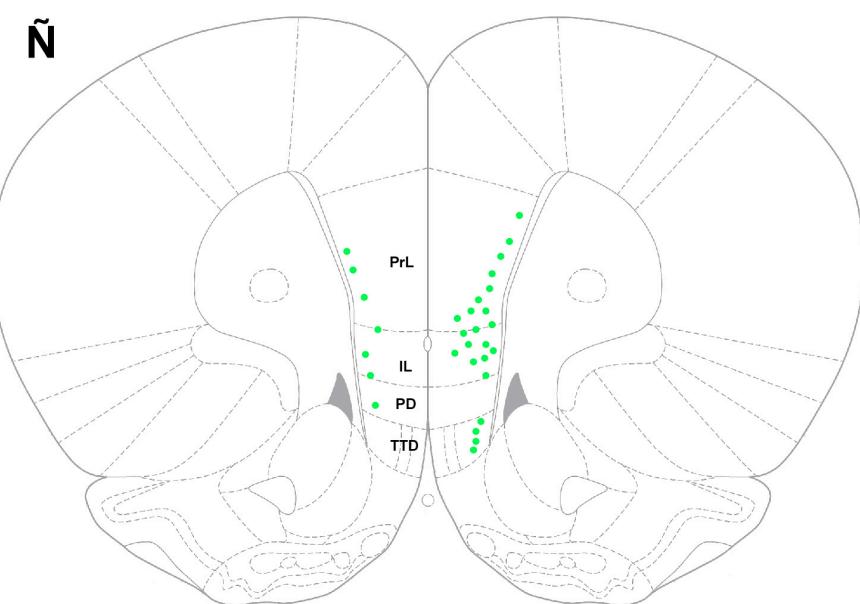


I.A. 7.56 mm

Figura 23 (cont.)



I.A. 10.56 mm



I.A. 11.76 mm

Figura 23 (cont.)

4.1.1. Neuronas marcadas retrógradamente

4.1.1.1. *Neuronas marcadas en la propia CLTd*

En cada uno de los casos, se observan abundantes neuronas marcadas dentro de la propia CLTd. Como cabía esperar, se trata de neuronas muy homogéneas, de soma redondeado y pequeño, si bien sus características morfológicas apenas se aprecian debido a que las neuronas se encuentran embebidas en un denso plexo de axones teñidos (Fig. 24A). Se marcan neuronas en secciones de la CLTd más caudales que la zona de inyección, pero no en las secciones situadas por delante de ella, lo que sugiere que los axones de las neuronas de proyección de la CLTd recorren el núcleo longitudinalmente en sentido rostral y salen de él formando parte del fascículo de la CLTd. Este dato sugiere también que las neuronas de la CLTd pueden ser inervadas por otras neuronas del núcleo situadas más caudalmente, pero no por las situadas más rostralmente.

4.1.1.2. *Principales fuentes de proyección para la CLTd*

En todos los experimentos, la mayor concentración de neuronas marcadas retrógradamente se observa en el núcleo pretectal medial (NPM) y en áreas de la corteza cerebral relacionadas con el sistema visual, fundamentalmente, la corteza visual secundaria mediomedial (V2MM; nomenclatura de Paxinos y Watson 2005) y las cortezas retroespleniales granulares y disgranular (Tabla 2, Figs. 23C-K, 24C,D).

En el NPM ipsolateral a la zona de inyección, las neuronas marcadas se reparten por todo el núcleo. Sus somas, de diámetro relativamente pequeño (10-15 µm) presentan contornos ovalados y poligonales (Fig. 24B). El eje mayor de muchas de estas neuronas adopta una disposición horizontal. El NPM contralateral contiene muy pocas neuronas marcadas (Fig. 23I).

En la corteza cerebral, con independencia del área cortical, las neuronas marcadas muestran las características típicas de neuronas piramidales y se distribuyen casi exclusivamente por la capa V (Fig. 24C, D). En la V2MM, las neuronas se encuentran en ambos lados con un ligero predominio ipsolateral (Fig. 23E-K). En el lado contralateral, se sitúan fundamentalmente en el tercio rostrocaudal central de la V2MM. Sin embargo, ipsolateralmente las neuronas

piramidales de la capa V marcadas se reparten por toda la extensión rostrocaudal de la V2MM e incluso superan su límite rostral, pues muchas se hallan en el área identificada en el atlas de Paxinos y Watson (2005) como corteza de asociación parietal medial.

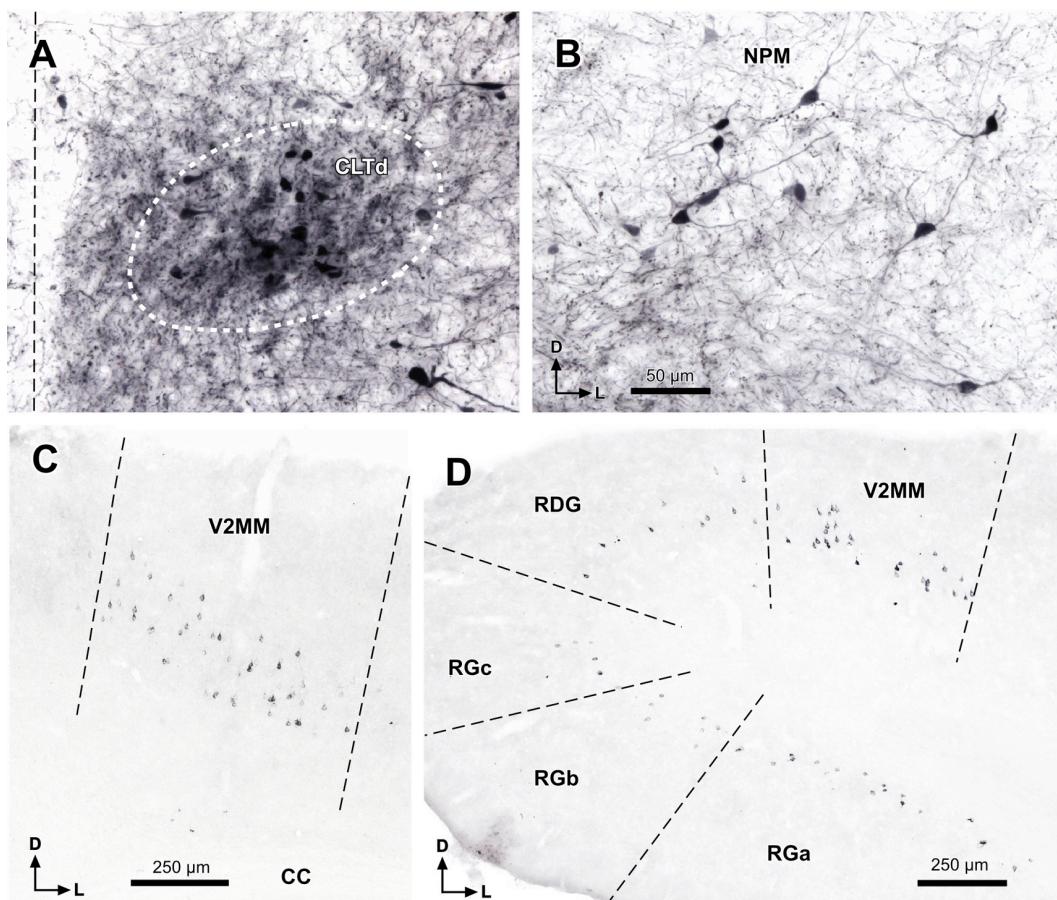


Figura 24. Principales fuentes de proyección para la CLTd: Microfotografías de secciones coronales en las que se aprecian neuronas marcadas retrógradamente en casos con una inyección de BDA centrada en la CLTd. A. Numerosas neuronas marcadas en la propia CLTd en una sección 1280 µm más caudal que la zona de inyección mostrada en la figura 22C (caso 00268). B. Neuronas marcadas en el NPM ipsolateral a la inyección (caso 00268). C. Neuronas piramidales marcadas en una sección de la porción rostral de la V2MM ipsolateral (caso 02088, cuya zona de inyección se muestra en la figura 22B). D. Neuronas piramidales marcadas en una sección coronal caudal que incluye la V2MM y las cortezas retroespleniales ipsolaterales a la inyección (caso 02088). La barra de aumento de B sirve también para A.

En las cortezas retroespleniales, las neuronas marcadas se sitúan sólo en secciones más caudales que el polo rostral del CS (Fig. 23C-G). En el lado ipsolateral, las neuronas son especialmente abundantes en las tres regiones de la corteza retroesplénial granular (regiones a, b y c), y mucho más escasas en

la corteza retroesplénial disgranular (Figs. 23C-G, 24D). En secciones caudales, el conjunto de neuronas marcadas en las cortezas granulares parece extenderse ventrolateralmente hasta introducirse en el postsubículo (Fig. 23C-F). En el lado contralateral hay menos neuronas marcadas, aunque su distribución es similar a la del lado ipsolateral.

4.1.1.3. Otras neuronas marcadas retrógradamente

En nuestros experimentos, encontramos también cantidades apreciables de neuronas en otros territorios encefálicos.

Tronco del encéfalo

En la proximidad de la zona de inyección, hallamos neuronas marcadas en la CLTv y la SGPAdm (Tabla 2, Fig. 23F), situadas inmediatamente debajo, cuya presencia puede probablemente explicarse por la difusión local del trazador y por el hecho de que estos dos núcleos poseen dendritas dirigidas verticalmente y que superan el límite dorsal del núcleo al que pertenecen ([Mantyh 1982](#); [Beitz y Shepard 1985](#); [Herrera y cols. 1988](#); [Saldaña y cols. 2007](#)). También encontramos neuronas en las columnas dorsolateral y lateral de la SGPA, así como en el núcleo cuneiforme (Tabla 2, Fig. 23E, F). Para interpretar esta observación, hemos recurrido a la histoteca de nuestro Laboratorio: en los casos con inyección de BDA o de PHA-L en estas estructuras, no se aprecia una proyección inequívoca a la CLTd, pero sí se ven axones marcados en una estrecha franja vertical muy próxima a la línea media y medial a la CLTv y la CLTd. Aunque desconocemos el destino de estos axones, su proximidad a la CLTd sugiere que pudieron captar el trazador inyectado en ésta.

Se encuentran también neuronas marcadas repartidas por el CI de ambos lados, con cierto predominio ipsolateral (Tabla 2, Fig. 23C-E). Probablemente, este resultado se debe a la difusión del trazador hasta la CLTv, pues nosotros mismos hemos demostrado que todas las divisiones del CI inervan a la CLTv de ambos lados, pero no a la CLTd ([Viñuela y cols. 2011](#); Anexo IV). De modo similar, hallamos neuronas marcadas en el núcleo del brazo del CI (NBCI), concentradas en su porción dorsal (Tabla 2, Fig. 23F). Los casos de nuestro Laboratorio con inyección de BDA en el NBCI demuestran una densa proyección a la CLTv, pero no a la CLTd, de modo que tampoco el NBCI parece contribuir significativamente a la inervación de la CLTd.

Igualmente se observan neuronas en el CS de ambos lados, especialmente en los territorios de las capas intermedias y profundas próximos a la zona de inyección (Tabla 2, Fig. 23F-H). No pensamos, sin embargo, que la presencia de estas neuronas indique una proyección genuina del CS a la CLTd, pues en los casos de nuestra histoteca con inyección de BDA en las capas intermedias o profundas del CS, la CLTd aparece prácticamente desprovista de axones terminales marcados. Lo más probable, por tanto, es que se trate de neuronas comisurales del CS, cuyo axón cruza la línea media muy cerca de la zona de inyección.

Diencéfalo

En el diencéfalo caudal, notamos la presencia de neuronas marcadas en la región profunda o parvicelular del cuerpo geniculado ventrolateral y en menor número en la lámina intergeniculada, siempre en el lado de la zona de inyección (Figs. 23I, 33). Es posible que su presencia se haya debido a que en nuestros experimentos el trazador difundió dorsalmente a lo largo del trayecto de la pipeta, afectando a la porción más medial de las capas superficiales del CS, que son inervadas por el tálamo visual (revisado por [May 2006](#)). Sin embargo, no podemos descartar que algunas de estas neuronas marcadas inerven a la CLTd, pues la inyección de PHA-L en la lámina intergeniculada o en el cuerpo geniculado ventrolateral revela proyecciones de densidad variada a la porción más medial del CS, que podrían incluir a la CLTd ([Moore y cols. 2000 \[rata\]](#), ver sus Figs. 2 y 5; [Morin y Blanchard 2005 \[hámster\]](#), Fig. 2).

En el diencéfalo ventral, se observan abundantes neuronas marcadas en el núcleo ventromedial del hipotálamo (NVMH) de ambos lados, concentradas sobre todo en la división dorsomedial del núcleo (Tabla 2, Figs. 23K, 25). Se trata de neuronas triangulares o multipolares, con marcado puntiforme limitado al soma y los troncos dendríticos proximales. Su presencia fue un tanto inesperada ya que, aunque se ha demostrado repetidamente que la división dorsomedial del NVMH inerva muy densamente a las regiones dorsales de la SGPA de la rata, especialmente en niveles rostrales ([Saper y cols. 1976; Krieger y cols. 1979; Canteras y cols. 1994](#)), ninguno de los estudios anteriores hace pensar que estas proyecciones alcancen significativamente estructuras más dorsales que la SGPA. Nuestros propios experimentos con inyecciones de BDA

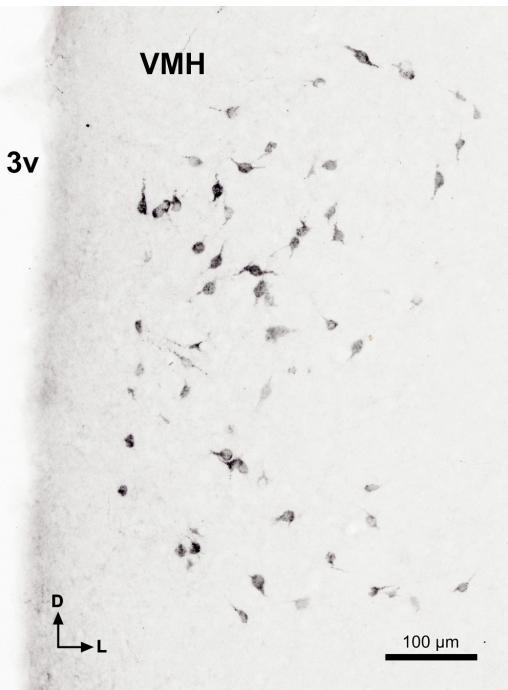


Figura 25. Neuronas marcadas retrógradamente en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH): Microfotografía de una sección coronal que contiene abundantes neuronas marcadas en el VMH ipsolateral a la zona de inyección (caso 02088, cuya zona de inyección se muestra en la figura 22B). Las neuronas se concentran sobre todo en la porción dorsomedial del núcleo.

que afectan al NVMH corroboran la densa proyección a la SGPA_{dm}, pero al mismo tiempo revelan escasos axones marcados que recorren longitudinalmente la porción medial de la CLTd. Esta imagen es compatible con la presencia en la región paramediana del techo mesencefálico de algunos axones del NVMH marcados con PHA-L ([Canteras y cols. 1994](#); ver su Figs. 3T-W, 4N-Q, 5L-O, 6P-Q) o de axones del NVMH que expresan el factor esteroidogénico de tipo I ([Lindberg y cols. 2013](#); ver su Fig. 3L-N). No obstante, en nuestros experimentos con inyección de BDA en el NVMH, la mayor parte de los axones marcados en la CLTd parecen fibras de paso, suficientes para explicar la presencia de las neuronas marcadas en el NVMH. En consecuencia, aunque no podemos descartar que exista un proyección directa del NVMH a la CLTd, ésta ha de ser más bien modesta.

En la zona incerta se marcan algunas neuronas, especialmente en el lado ipsolateral. Estas neuronas se encuentran muy predominantemente en la división dorsal, dentro de la cual no muestran ninguna distribución preferente (Fig. 23K). La presencia de estas neuronas marcadas en la división dorsal fue un tanto inesperada porque aunque es bien sabido que la zona incerta inerva al CS, estas proyecciones terminan sobre todo en la mitad lateral de las capas intermedias y profundas ([Kim y cols. 1992; May y cols. 1997](#)), un territorio muy alejado de nuestras zonas de inyección. Por otra parte, las neuronas incertotectales se sitúan casi exclusivamente en la división ventral del núcleo,

tanto en la rata (Watanabe y Kawana, 1982; Romanowski y cols. 1985; Kim y cols. 1992; Kolmac y cols. 1998; Comoli y cols. 2012), como en el gato (Ficalora y Mize 1989; May y cols. 1997), mientras que en nuestros experimentos se hallan en la división dorsal. Además, la proyección de la zona incerta al CS es topográfica en sentido lateromedial, de modo las neuronas laterales de la división ventral de la ZI inervan a la región medial de las capas intermedias y profundas del CS, y viceversa (Watanabe y Kawana, 1982; Romanowski y cols. 1985; Kim y cols. 1992; Kolmac y cols. 1998; Comoli y cols. 2012), y en nuestros casos se aprecian neuronas sin una distribución lateromedial clara. Todos estos datos sugieren que la división dorsal de la zona incerta es una fuente real de proyecciones para la CLTd, y que esta proyección es distinta de otras proyecciones incertotectales. Para verificar esta hipótesis, hemos recurrido a un caso de nuestro archivo con una inyección de PHA-L en la región medial y rostral de la zona incerta de la rata. Junto a otras proyecciones conocidas de la zona incerta, se marca una franja vertical de axones terminales en la región paramediana del techo mesencefálico, más ancha que la formada por los axones del núcleo cuneiforme o del NVMH descritos más arriba. Este campo terminal, integrado por axones muy sinuosos y orientados verticalmente en secciones coronales, se extiende sin solución de continuidad por la SGPAadm, la CLTv y la CLTd. En consecuencia, esta observación confirma que la CLTd sí recibe proyecciones directas de la zona incerta, y que esta proyección es más densa de lo que el escaso número de neuronas de la zona incerta marcadas por nuestras inyecciones de BDA en la CLTd podía hacer pensar.

Telencéfalo

Además de en la V2MM y las cortezas retroespleniales, en nuestros experimentos se marcan neuronas en el núcleo septal intermediolateral (Figs. 23N, 26A), así como neuronas piramidales en diversas áreas de la corteza prefrontal medial: las áreas cingulada anterior ventral, prelímbica e infralímbica y la tenia tectal dorsal (Tabla 2, Fig. 23N, Ñ; Figs. 26B, 27). Igual que en las otras áreas corticales, la distribución es relativamente simétrica, aunque se marcan más neuronas en el lado ipsolateral. Las proyecciones de la corteza prefrontal medial al CS se han estudiado en diversas especies. Así, se han descrito proyecciones corticotectales de la *corteza prelímbica* (Beckstead 1979 [rata]; Wyss y Sripanidkulchai 1984 [rata]; Room y cols. 1985[gato];

Neafsey y cols. 1986 [rata]; Sesack y cols. 1989 [rata]; Buchanan y cols. 1994 [conejo], de la corteza *infralímbica* (Wyss y Sripanidkulchai 1984 [rata]; Room y cols. 1985 [gato]; Neafsey y cols 1986 [rata]; Buchanan y cols. 1994 [conejo]), de la corteza *cingulada anterior* (Beckstead 1979 [rata]; Wyss y Sripanidkulchai 1984 [rata]; Room y cols. 1985 [gato]; Neafsey y cols. 1986 [rata]; Leichnetz y Gonzalo-Ruiz 1987 [rata]; Sesack y cols. 1989 [rata]; Harting y cols. 1992 [gato]; Buchanan y cols. 1994 [conejo]) y de la *tenia dorsal* (Room y cols. 1985 [gato]). Curiosamente, en el estudio más reciente de las proyecciones de las áreas prelímbica e infralímbica de la rata, llevado a cabo con inyecciones del trazador anterógrado PHA-L, no se observaron proyecciones al CS (Vertes 2004).

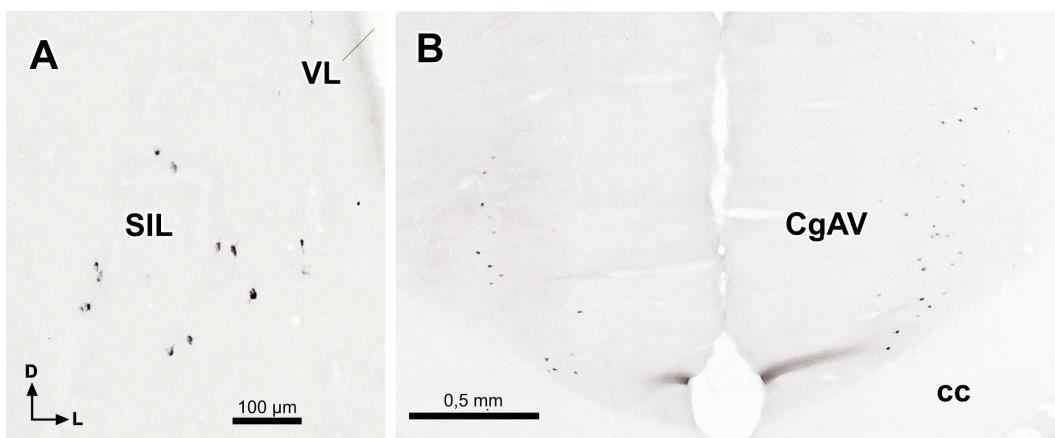


Figura 26. Neuronas marcadas retrógradamente en el complejo septal y en la corteza cingulada anterior: A. Microfotografía de una sección coronal en la que se aprecian neuronas marcadas en el núcleo septal intermediolateral (SIL) ipsolateral a la zona de inyección (caso 02088, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22B). B. Neuronas piramidales marcadas en la corteza cingulada anterior ventral (CgAV) ipsolateral (derecha) y contralateral (izquierda) a la zona de inyección (caso 02088).

Un análisis detallado de las investigaciones llevadas a cabo con trazadores anterógrados muestra axones terminales de neuronas de las diversas áreas de la corteza prefrontal marcados en la CLTd (Beckstead 1979 [rata], ver sus figuras 2, 4 y 5; Segal y cols. 1983 [gato], su figura 5; Wyss y Sripanidkulchai 1984 [rata], su figura 5; Room y cols. 1985 [gato], sus figuras 3K-N, 6J-K; Harting y cols. 1992 [gato], su figura 17). Todos estos datos sugieren que, efectivamente, la CLTd recibe proyecciones directas de la corteza prefrontal medial. Merece la pena destacar además que en algunos experimentos los axones de neuronas prefrontales forman un campo terminal próximo a la línea media y que abarca a la CLTd, la CLTv y la SGPAadm (Room y cols. 1985; Harting y cols. 1992). Retomaremos este último punto en la Discusión general. En cuanto a las

neuronas marcadas en el complejo septal, fue un hallazgo relativamente inesperado, pues no se han descrito proyecciones claras de los núcleos septales al CS o a la SGPA (ver revisión de [Risold y Swanson 1997](#)).

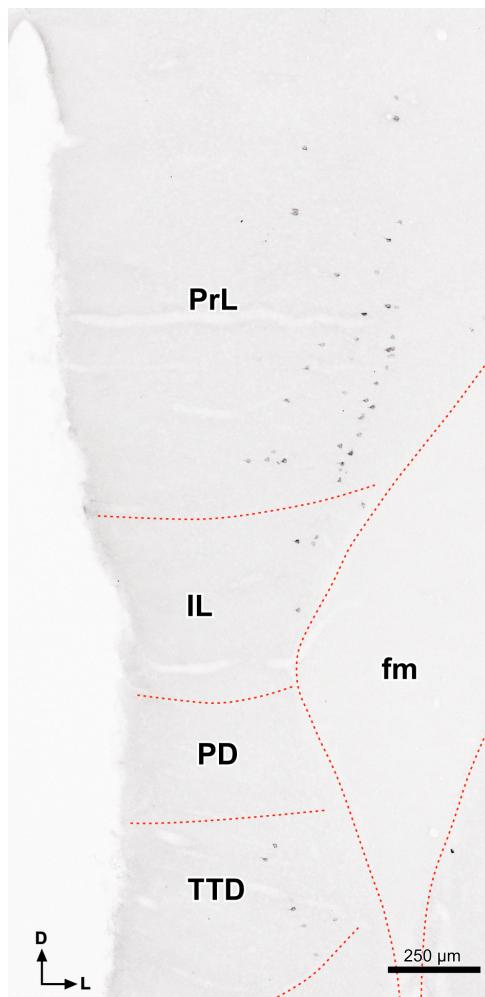


Figura 27. Neuronas marcadas retrógradamente en la corteza prefrontal medial: Microfotografía de una sección coronal de la corteza prefrontal ipsolateral a la zona de inyección en la que se aprecian neuronas piramidales marcadas en las áreas prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) y en la tenia tectal dorsal (TTD), pero no en la corteza peduncular dorsal (PD) (caso 02088, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22B).

4.1.2. Axones marcados

En todos los casos con inyección de BDA limitada a la CLTd, las fibras marcadas abandonan el núcleo rostralmente como parte del fascículo de la CLTd para cruzar el pretecho mesencefálico. No se encuentran haces de axones marcados en las regiones adyacentes del CS, y en particular en el SAI.

4.1.2.1. Destino principal de las proyecciones de la CLTd

En todos los casos la mayor concentración de fibras terminales marcadas se encuentra en el complejo talámico lateral ipsilateral. Estos campos terminales recorren sin interrupción el núcleo lateral posterior (LP), situado caudalmente, y el núcleo laterodorsal (LD), más rostral (Figs. 23J, K, 28). Esta proyección resulta llamativa por dos razones: por su elevada densidad (Fig. 28A, B), que no cabía esperar dada la pequeñez de nuestras zonas de inyección, y por la gran abundancia de engrosamientos de paso y terminales de pequeño calibre, que presumiblemente representan especializaciones sinápticas (Fig. 28C, D). La extensión y la posición de los campos terminales marcados en el LP y el LD varían de unos casos a otros, aunque de momento no hemos podido determinar si estos cambios siguen algún patrón relacionado con la posición exacta de la zona de inyección.

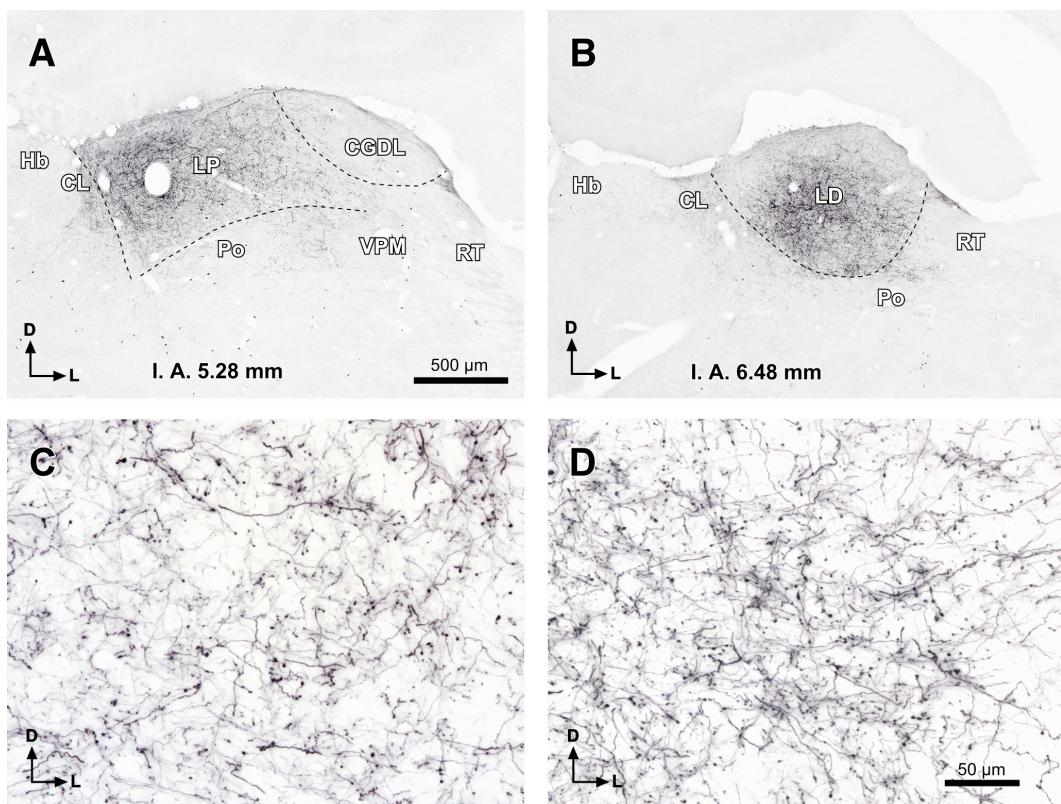


Figura 28. La CLTd envía proyecciones muy densas al complejo lateral del tálamo ipsolateral. Microfotografías de secciones coronales que muestran densos campos terminales de fibras marcadas en el LP (A) y en el LD (B) en un caso con una inyección de BDA centrada en la CLTd ipsolateral (caso 00268, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22C). El nivel rostrocaudal de cada sección se indica en la parte inferior de la fotografía. C, D. Detalles de los campos terminales de las mismas secciones mostradas en A y B, respectivamente. La barra de aumento de A sirve también para B, y la de D sirve también para C. Para otras abreviaturas, ver la lista al principio de este Trabajo.

El complejo lateral del tálamo contralateral recibe una proyección de la CLTd mucho más débil que el ipsolateral (Fig. 23I-K). Contralateralmente, los campos terminales se concentran sobre todo en secciones rostrales (LD).

4.1.2.2. Otros axones marcados

En nuestros experimentos, se aprecian también axones terminales marcados en otros territorios encefálicos.

Tronco del encéfalo

La región más caudal que contiene cantidades reseñables de axones terminales marcados es el complejo olivar superior ipsolateral a la zona de inyección (Figs. 23B, 29). En él, destaca sobre todo la densidad de axones marcados en el núcleo parolivar superior y, en menor medida, en los núcleos ventral y lateral del cuerpo trapezoide y en la cinta dorsal (nomenclatura de [Feliciano y cols. 1995](#)). A pesar de la nitidez de estas proyecciones, lo más probable es que estos axones tectopontinos marcados no pertenezcan a la CLTd, sino a la CLTv, por varios motivos. Cuando se realiza una inyección grande de un trazador retrógrado en el complejo olivar superior, se marcan muchas neuronas en la CLTv, pero prácticamente ninguna en la CLTd ([Faye Lund 1986](#); [Mulders y Robertson 2001](#); [Saldaña y cols., 2007](#)). Esto mismo sucede con las inyecciones de trazadores retrógrados limitadas al núcleo parolivar superior ([Saldaña y cols. 2009](#); [Viñuela y cols. 2011 \[Anexo IV\]](#)). Además, la inyección del virus de la pseudorrabia en la cóclea provoca el marcado transináptico de neuronas de la CLTv ([Brown y cols. 2013](#), ver su figura 10), presumiblemente porque inervan a neuronas olivocleares mediales del núcleo ventral del cuerpo trapezoide de su mismo lado, mientras que no se marcan neuronas en la CLTd. Por otra parte, como acabamos de describir, los axones de las neuronas de la CLTd abandonan el núcleo por su polo rostral y, como veremos más adelante en este mismo Capítulo, la mayor parte de las neuronas de la CLTd se marcan retrógradamente desde el complejo lateral del tálamo, lo que sugiere que se trata de neuronas de proyección ascendente, más que descendente.

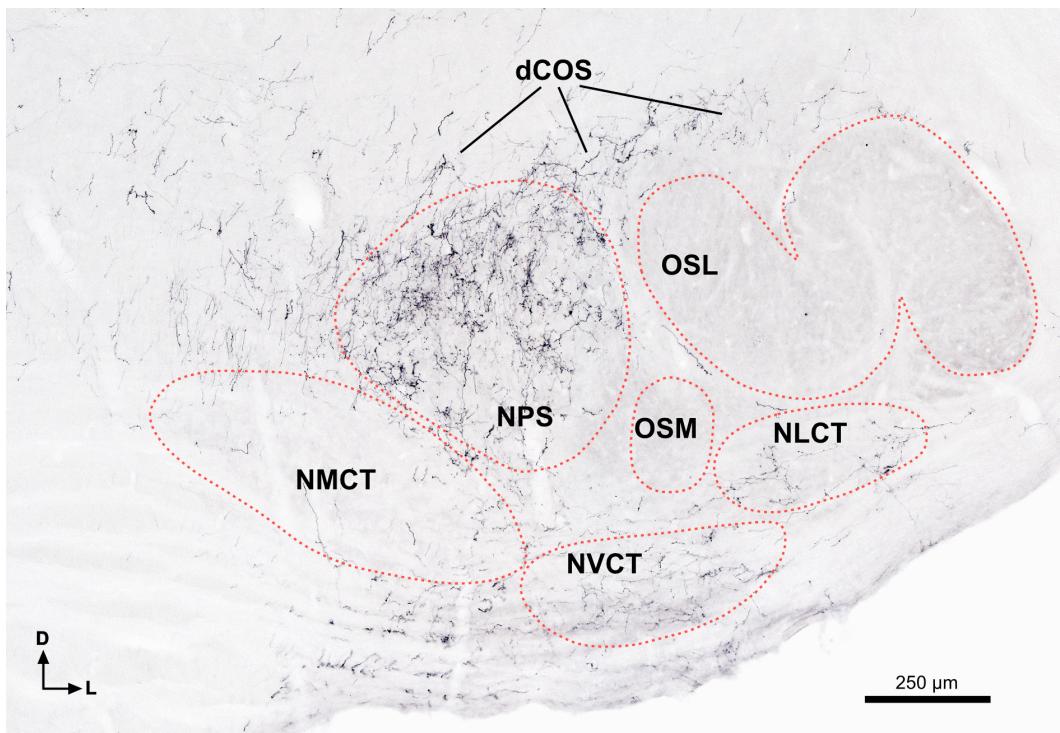


Figura 29. Axones marcados en el complejo olivar superior ipsolateral a una inyección de BDA en la CLTd. Microfotografía de una sección coronal del complejo olivar superior en la que se aprecia un denso campo terminal en el núcleo parolivar superior (NPS), y fibras terminales dispersas en los núcleos ventral y lateral del cuerpo trapezoide (NVCT y NLCT, respectivamente) y en la cinta dorsal del complejo olivar superior (dCOS). Las olivas superiores lateral y medial (OSL y OSM, respectivamente) y el núcleo medial del cuerpo trapezoide (NMCT) carecen de axones terminales marcados. Caso 01101, cuya zona de inyección se muestra en la figura 22A. La posición de este campo microscópico aparece indicada con un marco magenta en la figura 23B.

También se hallan abundantes axones marcados en las regiones paralemniscales medial (Figs. 23D, 30A) y rostral, y en los núcleos pontinos ipsolaterales a la zona de inyección (Figs. 23E, 30B), pero una vez más pensamos que no se trata de proyecciones genuinas de la CLTd. Lo más probable es que los axones de las regiones paralemniscales pertenezcan a neuronas de la CLTv, pues éstas se marcan cuando se inyectan trazadores retrógrados en estructuras adyacentes a las regiones paralemniscales, como la región ventrolateral pontina próxima al grupo de células adrenérgicas A5 (Hayward y Von Reitzenstein, 2002) o el área tegmental ventrolateral (Herbert y cols. 1997). Sin embargo, los axones marcados en los núcleos pontinos pueden tener un origen diferente. Aunque se ha mostrado que con inyecciones grandes de FluoroGold centradas en la región lateral de los núcleos pontinos se marcan algunas neuronas en la CLTv ipsolateral (Campolattaro y cols. 2007; ver su Fig. 7), este resultado puede haberse debido a que el trazador difundió dorsalmente

más allá de los límites de los núcleos pontinos, afectando a la región adyacente al lemnisco lateral, por la que descienden los axones de las neuronas de la CLTv. De hecho, cuando se obtienen zonas de inyección de BDA pequeñas, totalmente limitadas a los núcleos pontinos, las únicas neuronas que se marcan en la región paramediana del techo mesencefálico se sitúan en la SGPAadm (Márquez y Saldaña, observaciones no publicadas). Dada la proximidad, ya comentada, entre la CLTd y la SGPAadm, es razonable pensar que los axones marcados en los núcleos pontinos en los casos con inyección de BDA en la CLTd se han debido en realidad a la captación del trazador por parte de neuronas de la SGPAadm.

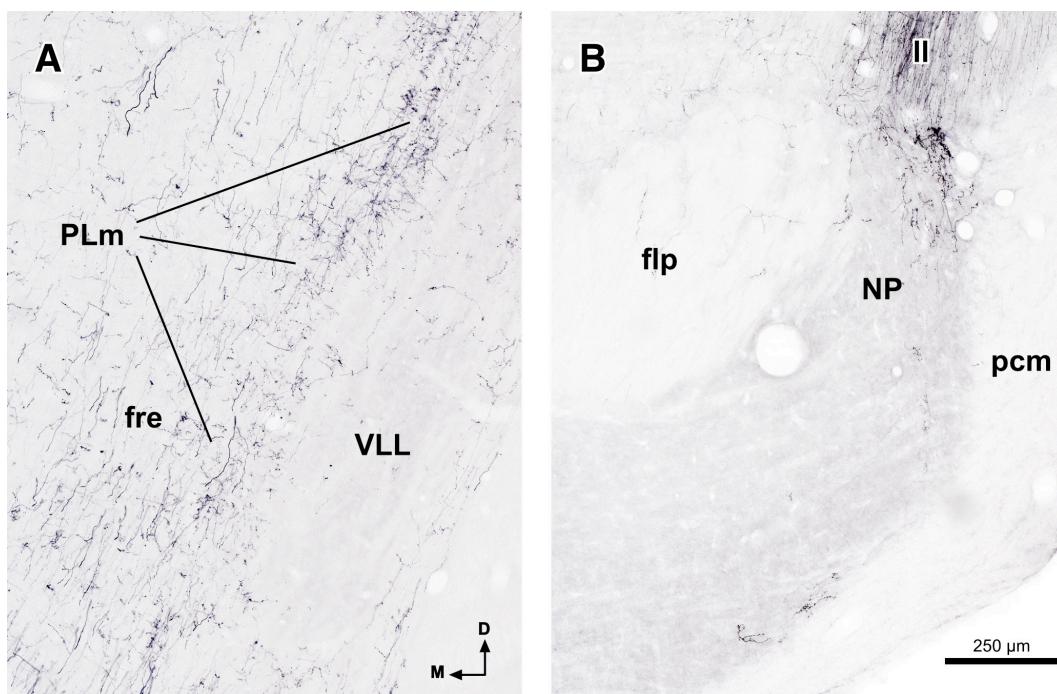


Figura 30. Axones marcados en la región paralemniscal medial y en los núcleos pontinos ipsolaterales a una inyección de BDA en la CLTd. A. Microfotografía de una sección coronal de la región paralemniscal medial (PLm) del caso 01101, cuya zona de inyección se muestra en la figura 22A. Obsérvese que el núcleo ventral del lemnisco lateral (VLL) prácticamente carece de axones terminales marcados. B. Microfotografía de una sección coronal de la región lateral de los núcleos pontinos. Caso 02088, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22B. La barra de aumento de B sirve también para A. La posición del campo microscópico mostrado en A aparece indicada con un marco magenta en la figura 23D, y la del campo microscópico B, en la figura 23E.

En la porción rostral de la calota mesencefálica llama la atención la presencia de un grupo nítido y denso de axones terminales en el “núcleo epilemniscal”, situado inmediatamente encima del lemnisco medial, por fuera del núcleo rojo y por debajo del núcleo pararrubral (Figs. 23H, 31). Se trata de

una estructura prácticamente desconocida, identificada por Paxinos y cols. (1999) por su intensa inmunotinción con el antisuero SMI-32, que reconoce un epítopo no fosforilado de neurofilamentos (ver la Fig. 19 de Paxinos y cols. 1999), y que aparece representado en la plancha nº 82 del atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (2007), pero sobre la cual no existen más datos en la literatura. Aunque Paxinos y cols. (1999) propusieron que se trata de una extensión lateral del núcleo rojo, nuestros resultados sugieren que es un núcleo independiente, pues el núcleo rojo carece de axones marcados. Al mismo tiempo, la densidad de la proyección vista en nuestros experimentos nos induce a pensar que el núcleo epilemniscal sí es inervado por la CLTd, algo que deberá ser confirmado en el futuro. No obstante, dada la naturaleza bidireccional del BDA, no podemos descartar que el núcleo epilemniscal sea inervado también por alguna de las neuronas marcadas retrógradamente en nuestros experimentos.

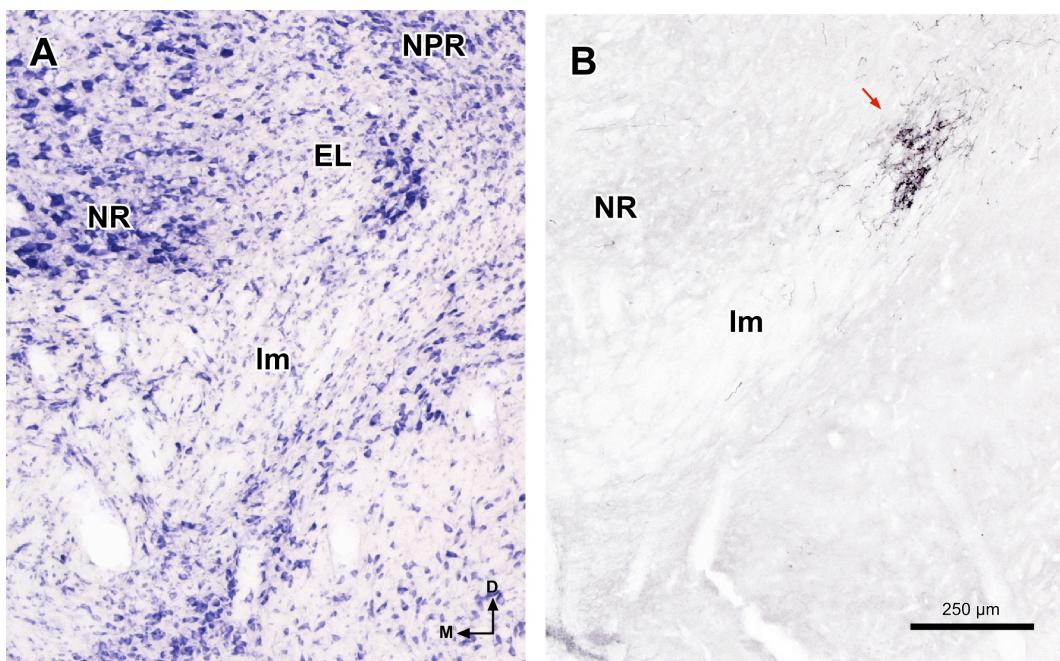


Figura 31. La CLTd inerva al núcleo epilemniscal ipsolateral. A. Microfotografía de una sección coronal de 40 μm de espesor teñida con el método de Giemsa, en la que se aprecia el núcleo epilemniscal (EL), definido como un nítido grupo de neuronas bien teñidas, que se relaciona ventralmente con el lemnisco medial (lm), medialmente con el núcleo rojo (NR), y dorsalmente con el núcleo pararrubral (NPR). B. Microfotografía de una sección coronal del caso 02088, cuya zona de inyección de BDA en la CLTd se muestra en la figura 22B. Los axones marcados forman un denso campo terminal cuya distribución coincide de modo preciso con la de las neuronas del EL (flecha), mientras que las estructuras adyacentes carecen de axones marcados. La posición aproximada del campo microscópico de B aparece indicada con un marco magenta en la figura 23H. La barra de aumento de B sirve también para A.

Diencéfalo

Encontramos cantidades apreciables de axones terminales marcados en otras cuatro estructuras diencefálicas clásicamente asociadas con el sistema visual: el núcleo suprageniculado (Figs. 23G, 32A), el núcleo limitante posterior del tálamo (Figs. 23I, 32B), la región parvicelular del cuerpo geniculado ventrolateral (Figs. 23I, 33) y la lámina intergeniculada (Figs. 23I, 33). Una explicación común a todas estas proyecciones podría ser que el trazador difundió a regiones del CS próximas a la CLTd. Por ejemplo, en nuestros experimentos parte del trazador reflujo por el trayecto de penetración de la pipeta hasta afectar a la porción más medial de la capa gris superficial, que es una importante fuente de proyecciones para el cuerpo geniculado ventrolateral y la lámina intergeniculada (revisado por [May 2006](#)). De modo similar, las capas intermedias del CS son una de las principales fuentes de proyección para el

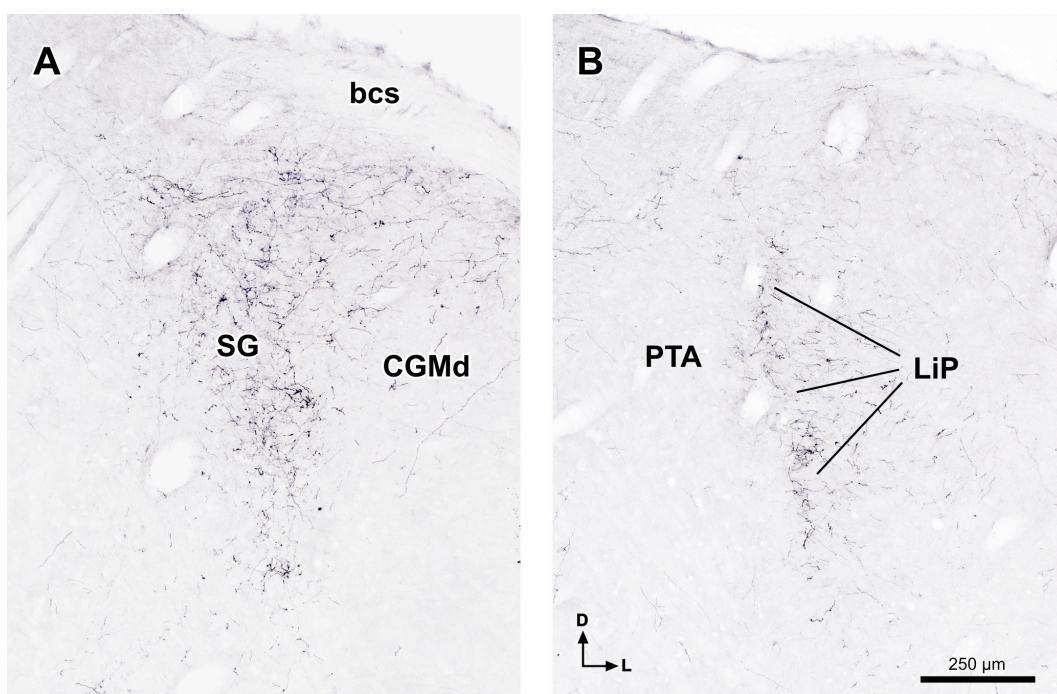


Figura 32. Axones marcados en los núcleos suprageniculado y limitante posterior ipsolaterales a una inyección de BDA en la CLTd: A. Microfotografía de una sección coronal de la región rostral del núcleo suprageniculado (SG), que contiene abundantes axones terminales marcados. La división dorsal del cuerpo geniculado medial (CGMd) prácticamente carece de fibras marcadas. B. Microfotografía de una sección coronal de la región caudal del tálamo, en la que puede apreciarse un estrecho campo terminal dentro del núcleo limitante posterior (LiP). En núcleo pretectal anterior (PTA) está totalmente desprovisto de axones marcados. Ambas fotografías pertenecen al caso 02088, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22B. La barra de aumento de B sirve también para A. La posición del campo microscópico mostrado en A aparece indicada con un marco magenta en la figura 23G, y la del campo microscópico B, en la figura 23I.

núcleo suprageniculado (Katoh y Benedeck 1995) y para el limitante posterior (Linke 1999). Sin embargo, algunos datos de la literatura sugieren que al menos parte de los axones marcados en estos núcleos pertenecen a neuronas de la CLTd. La inyección de aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa (WGA-HRP) en el núcleo suprageniculado marca abundantes neuronas en la porción más medial del CS, incluida la CLTd (Katoh y Benedeck 1995, ver su figura 3). Del mismo modo, se marcan neuronas en una posición compatible con la porción más rostral de la CLTd del hámster cuando se inyecta la subunidad B de la toxina colérica en la lámina intergeniculada (Vrang y cols. 2003). Nuestro archivo de preparaciones incluye casos con inyecciones de FluoroGold centradas bien en el núcleo limitante posterior, bien en el núcleo geniculado ventrolateral. En ambos tipos de casos además de otras neuronas en el CS, se marcan numerosas neuronas en la CLTd ipsolateral. Todos estos datos, unidos a la proyección al complejo lateral del tálamo descrita más arriba, indican que la CLTd es una novedosa fuente de proyecciones para el tálamo visual.

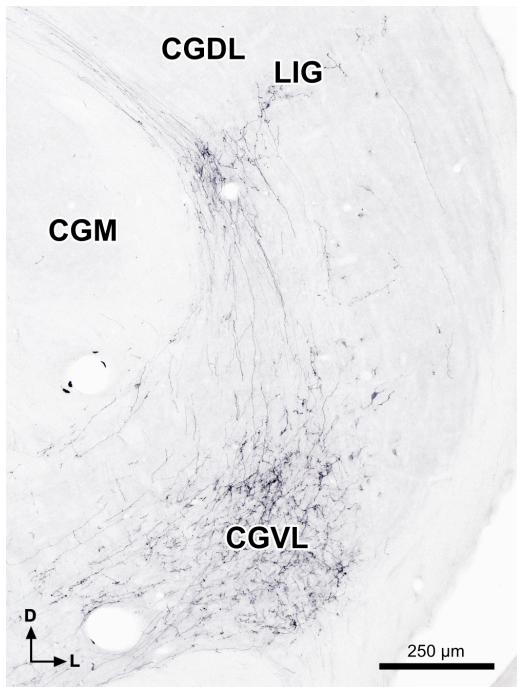


Figura 33. Axones marcados en el cuerpo geniculado ventrolateral ipsolateral: A. Microfotografía de una sección coronal del cuerpo geniculado ventrolateral (CGVL) del caso 02088, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22B. Los campos terminales se concentran en la región ventrolateral del núcleo. Se aprecian también fibras terminales en la lámina intergeniculada (LIG). Pueden verse igualmente algunas neuronas marcadas en el CGVL. La posición de este campo microscópico aparece indicada con un marco magenta en la figura 23I.

En el subtálamo, llama la atención la presencia de axones terminales marcados en la zona incerta de ambos lados, sobre todo del ipsolateral (Figs. 23K, 34). Aunque puede encontrarse alguna fibra terminal en cualquier porción del núcleo, la mayor parte se concentran en la división dorsal, sin una

distribución preferente. La proyección de la CLTd a la zona incerta se parece, por tanto, a la proyección del CS a este núcleo, pues también ésta termina sobre todo en la división dorsal (Kolmac y cols. 1998; Mitrofanis 2005).

Como vimos anteriormente, en nuestros experimentos se marcan también neuronas en la división dorsal de la zona incerta. De hecho, la mayor parte de las neuronas se encuentran embebidas en el plexo de axones terminales marcados, un dato que alumbra la posibilidad de que la CLTd y la división dorsal de la zona incerta estén conectadas recíprocamente.

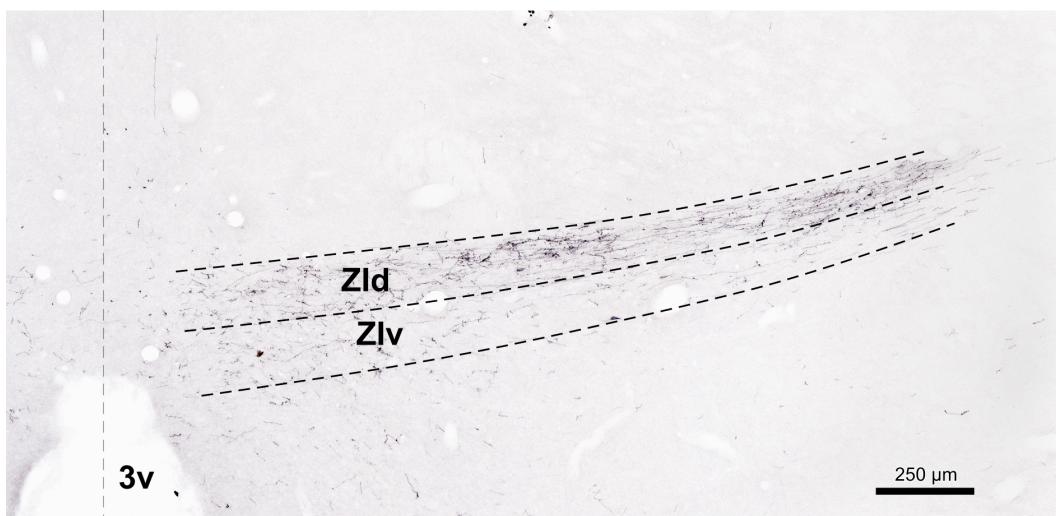


Figura 34. La CLTd inerva a la división dorsal de la zona incerta: Microfotografía de una sección coronal de la zona incerta del caso 02088, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22B. Los campos terminales se concentran en la división dorsal del núcleo (Zld). Entre las fibras terminales se encuentran algunas neuronas marcadas retrogradamente, apenas discernibles a este aumento. La posición de este campo microscópico aparece indicada con un marco magenta en la figura 23K.

La estructura talámica más rostral en la que encontramos campos terminales claramente marcados es el núcleo reuniens (Figs. 23L, M, 35A). A diferencia de las demás proyecciones de la CLTd, ésta es bilateral y muy simétrica. En secciones caudales del núcleo reuniens, los axones forman un único campo terminal centrado en la línea media. En secciones más rostrales, este campo terminal se divide en uno derecho y uno izquierdo que afectan a la porción rostral-lateral del reuniens (Figs. 23J, 35A). Los axones marcados, que no muestran ninguna orientación predominante, suelen ser rectilíneos y poseen abundantes botones de paso y colaterales cortas y sencillas que terminan en un engrosamiento único.

Los axones marcados parecen alcanzar el núcleo reuniens por dos vías. La más elegante es una vía dorsal, integrada por fibras que han pasado previamente por el complejo lateral del tálamo. En las porciones más rostrales del LD, estos axones se concentran en la superficie dorsal del diencéfalo, por donde corren caudorrostralmente. Posteriormente, se incurvan hacia abajo para dirigirse hacia el reuniens con una dirección ventromedial, encajonados entre el núcleo anteroventral y el complejo lateral ventroanterior en niveles caudales, y entre el núcleo anteroventral y el núcleo reticular talámico en niveles más rostrales (Figs. 23M, 35B). Desconocemos la naturaleza de este estrecho pasillo, pero no se trata de una simple ruta de paso, ya que a lo largo de su trayectoria las fibras de nuestros experimentos marcadas en este territorio poseen abundantes varicosidades de paso y botones terminales.

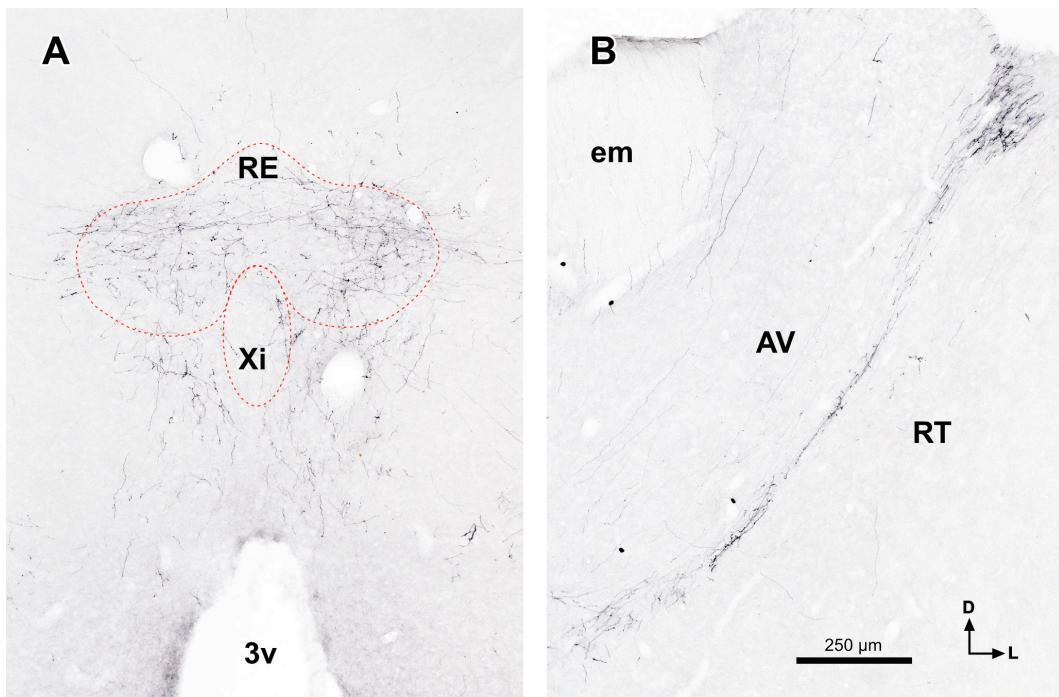


Figura 35. La CLTd inerva a las mitades ipsolateral y contralateral del núcleo reuniens del tálamo: A. Microfotografía de una sección coronal del núcleo reuniens del caso 02088, cuya zona de inyección de BDA se muestra en la figura 22B. Obsérvese que la distribución de los axones terminales de la CLTd es bastante simétrica. B. En esta sección coronal del mismo caso, se observan axones de la CLTd que descienden hacia el núcleo reuniens encajonados entre los núcleos anteroventral y reticular del tálamo. No se trata de axones de paso, pues poseen varicosidades y botones a lo largo de su trayectoria. La posición de estos campos microscópicos aparece indicada con sendos marcos magentas en las figuras 23L y 23M.

La segunda vía por la que los axones marcados alcanzan el núcleo reuniens es una trayectoria ventral, procedente de la porción más rostral de la zona incerta.

Aunque se conoce desde hace tiempo que el núcleo reuniens recibe proyecciones del CS ([Chevalier y Deniau 1984](#); [McKenna y Vertes 2004](#); [Furigo y cols. 2010](#)), no creemos que los axones marcados en nuestros experimentos se hayan debido a la difusión del trazador hacia las regiones adyacentes del CS, porque las neuronas del CS que inervan al reuniens se encuentran sobre todo en la mitad lateral de las capas intermedias y profundas ([Krout y cols. 2001](#)). Además el CS inerva también a otros núcleos talámicos próximos al reuniens, como los núcleos parafascicular, central medial, central lateral, medial ventral y paracentral ([Krout y cols. 2001](#); [Furigo y cols. 2010](#)), que no se marcaron en nuestros experimentos. Por último, en los casos con inyección del trazador retrógrado FluoroGold centrada en distintas porciones del núcleo reuniens, se marcan neuronas en la región paramediana del CS, que presumiblemente pertenecen a la CLTd ([McKenna y Vertes 2004](#); ver sus figuras 2K, 8K-L).

4.2. Casos con inyección de FluoroGold en el complejo lateral del tálamo

Esta descripción se basa en doce casos con inyecciones unilaterales de FG en el complejo lateral del tálamo. Con el fin de maximizar el marcado retrógrado de las neuronas de la CLTd en tres casos realizamos dos inyecciones de FG en el LP y otras dos en el LD; a cada nivel una inyección fue 300 µm más lateral que la otra. Las zonas de inyección resultantes cubren la mayor parte del complejo lateral del tálamo, y apenas afectan a las estructuras vecinas (Fig. 36).

Además del marcado retrógrado esperable en todos los núcleos que se sabe que inervan al complejo lateral del tálamo (ver la revisión de [Groenewegen y Witter 2004](#)), se encuentran numerosas neuronas marcadas en la CLTd ipsolateral a la zona de inyección (Fig. 36). En cada sección las neuronas marcadas se reparten por todo el núcleo, y muestran un amplio rango de intensidades de tinción, desde neuronas con un débil marcado puntiforme limitado al soma, hasta neuronas con un marcado denso difuso que rellena las

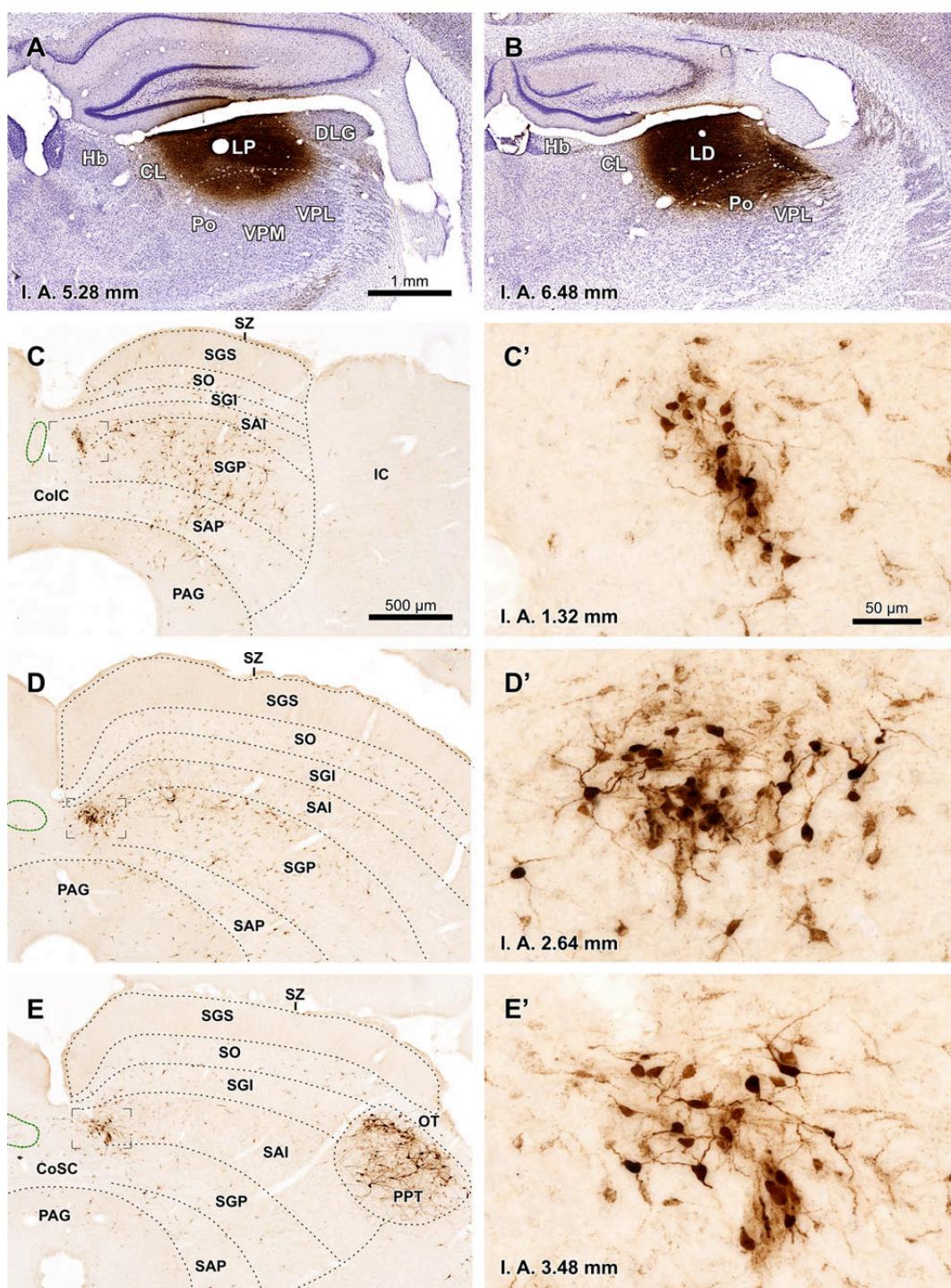


Figura 36. Neuronas de la CLTd marcadas retrógradamente tras una inyección del FluoroGold en el complejo lateral del tálamo. A, B. Microfotografías de secciones coronales contrastadas con el método de Nissl que incluyen el centro de zonas de inyección de FluoroGold en el LP (A) y en el LD (B). C-E. Microfotografías de secciones de tres niveles rostrocaudales del techo mesencefálico del mismo caso. En cada nivel, la CLTd destaca como un punto intensamente teñido cuya densidad de neuronas marcadas supera a la de cualquier región del CS. C'-E'. Detalles de la CLTd tomados de las mismas secciones mostradas en la *columna de la izquierda*. La coordenada interauricular de cada nivel aparece indicada debajo de las fotografías. La barra de aumento de A sirve también para B, la de C sirve también para D y E, y la de C' sirve también D' y E'.

dendritas (Figs. 36C'-E'; 37). En conjunto da la impresión de que la mayor parte de las neuronas están marcadas. Este denso marcado retrógrado permite distinguir inequívocamente a la CLTd del CS y de la CLTv (Fig. 36). La figura 37 ilustra las diferencias en el tamaño y la forma de los somas neuronales y en el patrón de relleno dendrítico de las neuronas de la CLTd comparadas con las del SAI. El análisis morfométrico de las neuronas marcadas demuestra que las neuronas de la CLTd son significativamente menores (Fig. 37B; test de la *t* de Student, $p < 0.0001$; valor medio del diámetro máximo de las neuronas de la CLTd = 10,5 μm , $n = 120$; valor medio del diámetro máximo de las neuronas del CS = 15 μm , $n = 71$). La CLTd contralateral a la inyección contiene muy pocas neuronas marcadas.

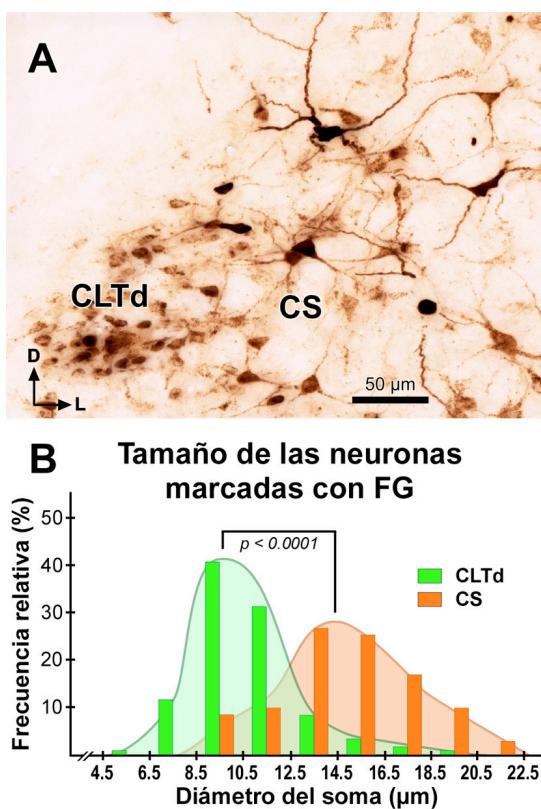


Figura 37. Las neuronas tectotalámicas de la CLTd son distintas de las neuronas tectotalámicas del CS. **A.** Microfotografía a gran aumento de una sección del tercio rostrocaudal central de la CLTd procedente de un caso similar al mostrado en la figura 36. Las neuronas de la CLTd marcadas (mitad izquierda de la fotografía) son pequeñas, están muy juntas, poseen somas redondos u ovalados muy homogéneos y contienen un producto de reacción limitado al soma y, en ocasiones, las porciones más proximales del árbol dendrítico. Por el contrario, las neuronas del CS marcadas poseen somas poligonales mucho mayores y muestran un relleno impresionante de los árboles dendríticos. **B.** Histograma del diámetro máximo del soma de neuronas del mismo caso mostrado en la figura 37 marcadas en la CLTd (en color verde; valor medio = 10,64 $\mu\text{m} \pm 2,24$ d.s.; $n = 120$) y en la región adyacente del CS (en color naranja; valor medio = 14,90 $\mu\text{m} \pm 2,98$ d.s.; $n = 71$). Todas las neuronas del CS medidas se encontraban a menos de 500 μm del borde lateral de la CLTd. Obsérvese que las neuronas marcadas del CS son en general mayores y más heterogéneas que las de la CLTd.

Se ha descrito que las proyecciones del CS al LP y las proyecciones del CS al LD parten de poblaciones neuronales distintas (ver referencias más abajo). Por lo tanto, hemos comparado casos con una única inyección de FG en el LP (Fig. 38) con casos con una única inyección de FG en el LD para investigar si existe alguna diferencia en la morfología y la distribución de las neuronas marcadas en la CLTd. En los casos con inyección en el LP se observan

abundantes neuronas marcadas en el estrato óptico del CS ipsolateral, y muchas menos neuronas en capas más ventrales (Fig. 38A, C), lo que confirma descripciones previas (Donnelly y cols. 1983; Sugita y cols. 1983; Lane y cols. 1993, 1997; Hilbig y cols. 2000; Masterson y cols. 2009). En los casos con inyección en el LD las neuronas marcadas se distribuyen por las capas intermedias y profundas del CS ipsolateral y el estrato óptico aparece prácticamente desprovisto de neuronas marcadas (Fig. 38B, D), lo que coincide con descripciones anteriores (Thompson y Robertson 1987). En ambos tipos de casos, se encuentran abundantes neuronas marcadas por toda la extensión rostrocaudal de la CLTd ipsolateral y muestran similar morfología y distribución (Fig. 38).

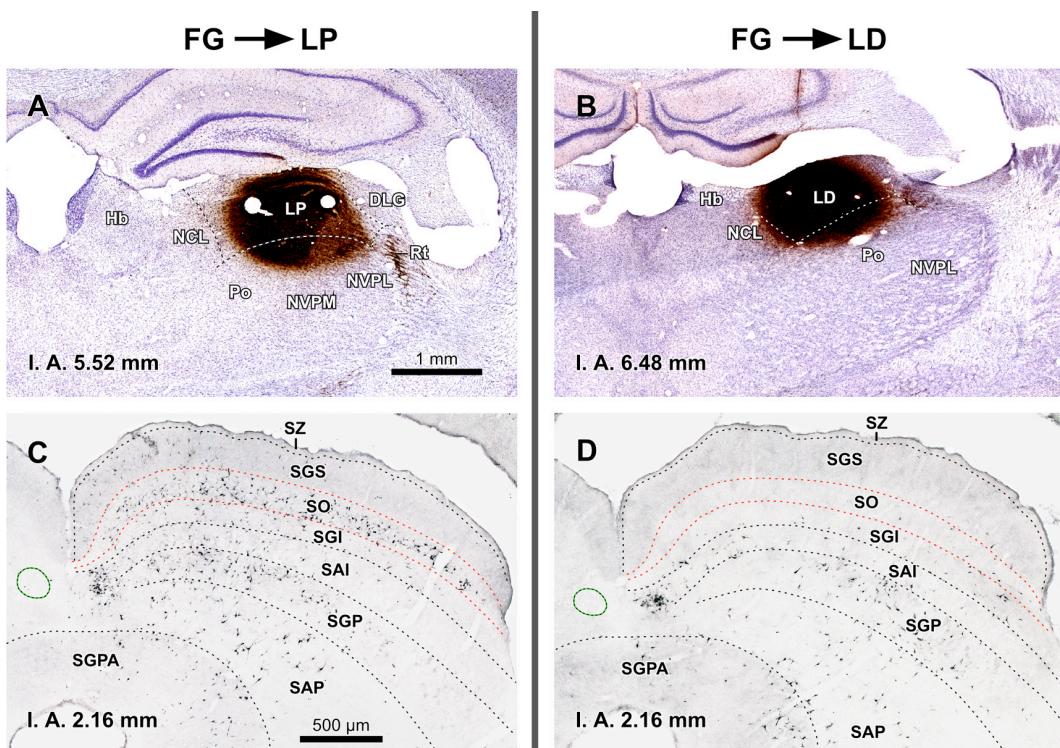
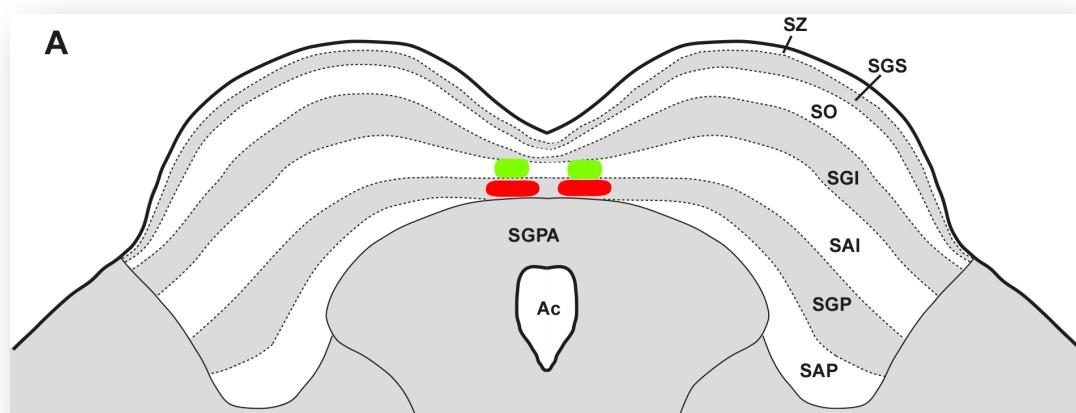
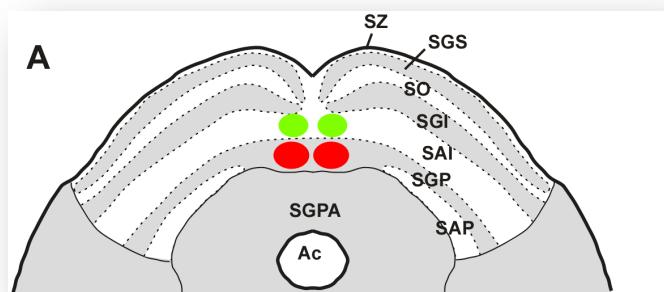


Figura 38. Las neuronas de la CLTd inervan tanto al LP, como al LD. A, B. Microfotografías de secciones coronales contrastadas con el método de Nissl que incluyen el centro de sendas zonas de inyección de FluoroGold en el LP (A; caso 05222) y en el LD (B; caso 05209). C-D. Fotografías de secciones coronales de la mitad ipsolateral del techo mesencefálico de los mismos casos. C. Tras una inyección en el LP, se marcan numerosas neuronas en el estrato óptico del CS (SO), menos neuronas en las capas profundas, y menos aún en las intermedias. Las neuronas marcadas en la capa gris superficial (SGS) se deben a que el trazador difundió hasta la porción más medial del cuerpo geniculado dorsolateral (May 2006). D. En el caso con inyección en el LD, hay neuronas dispersas por las capas profundas del CS y, en menor medida, por las capas intermedias, mientras que las capas superficiales aparecen vacías. En ambos tipos de casos, la concentración de neuronas marcadas en la CLTd supera a la de cualquier otro territorio tectal. La coordenada interauricular de cada nivel se indica debajo de las fotografías. La barra de aumento de A sirve también para B, y la de C sirve también para D.

4.3. Resumen de las conexiones de la CLTd

Nuestros resultados indican que las neuronas de la CLTd de la rata pueden ser inervadas por otras neuronas del propio núcleo situadas más caudalmente. La CLTd recibe sus aferencias principales del núcleo pretectal medial, las cortezas retroespleniales, y la corteza visual secundaria mediomedial. También es inervada por la división dorsal de la zona incerta y por diversas áreas de la corteza prefrontal medial. Es posible además que la CLTd sea blanco de proyecciones de la división parvicelular del cuerpo geniculado ventrolateral y de la lámina intergeniculada. A la vista de estos datos, uno llega a la llamativa conclusión de que la CLTd no recibe aferencias ascendentes, pues toda su información procede de núcleos situados por encima del mesencéfalo.

Por su parte, la CLTd envía información masiva a diversas estructuras del tálamo visual, encabezadas por los núcleos del complejo lateral del tálamo (LP y LD), a los que acompañan el cuerpo geniculado ventrolateral, la lámina intergeniculada, y los núcleos suprageniculado y limitante posterior. Otros destinos de sus axones son la división dorsal de la zona incerta, el núcleo reuniens del tálamo y el enigmático núcleo epilemniscal. Parece, por tanto, que también las proyecciones de la CLTd terminan por encima del mesencéfalo.



CAPÍTULO 3

ANATOMIA COMPARADA DE

LA CLTD

1. Hipótesis

Dado que las características generales de organización del sistema nervioso central son comunes a todos los mamíferos, parece razonable asumir que una estructura del tamaño de la CLTd no sea privativa de la rata. Si, igual que sucede en otros territorios encefálicos, las principales características citoarquitectónicas se mantienen de unas especies a otras, cabe esperar que las neuronas de la CLTd de otros mamíferos guarden semejanza con las de la rata. Por consiguiente, nuestra hipótesis de trabajo es que **la CLTd está presente en el techo mesencefálico de una gran variedad de mamíferos**, y en concreto en el de los mamíferos con mayor interés para las investigaciones biomédicas. Presumimos además que también en estas especies **este núcleo puede ser reconocido y delimitado empleando criterios citoarquitectónicos**.

2. Objetivos

1. Determinar las características citoarquitectónicas y los límites de la CLTd del ratón, el conejo, el gato, el macaco de Java y el hombre.

3. Diseño experimental

La citoarquitectura de la CLTd de la rata ha quedado claramente expuesta en el Capítulo 1 de esta Memoria. Con técnicas neurohistológicas básicas, métodos inmunocitoquímicos y técnicas de hibridación *in situ*, hemos definido las características citoarquitectónicas, mieloarquitectónicas y neuroquímicas que diferencian a la CLTd de los núcleos vecinos. En el presente Capítulo, hemos estudiado la anatomía comparada del núcleo. Para ello, hemos analizado secciones del techo mesencefálico de ratones, conejos, gatos, monos y hombres teñidas con el método de Nissl o con el método de Giemsa y hemos

comparado las características de la CLTd de estas especies con las descritas para la rata. También hemos analizado secciones de la CLTd del ratón procesadas con técnicas de hibridación *in situ* para revelar la expresión de transportadores vesiculares de aminoácidos.

4. Resultados

4.1. Citoarquitectura de la CLTd de otras especies: variaciones sistemáticas

En líneas generales, en las especies estudiadas las características citoarquitectónicas y las relaciones anatómicas de la CLTd son muy semejantes a las observadas en la rata y, como veremos en secciones posteriores, permiten identificar la CLTd con precisión. Así, en todos los animales analizados la CLTd posee una extensión rostrocaudal que coincide aproximadamente con la del CS y está compuesta por neuronas pequeñas y muy homogéneas. A pesar de estas semejanzas, hemos encontrado algunas variaciones sistemáticas, que no afectan sólo a la CLTd, sino que suceden en todo el encéfalo. La primera de ellas se refiere a la *densidad neuronal*, que decrece sensiblemente a medida que se asciende en la escala filogenética. De este modo, el ratón presenta una densidad neuronal notablemente superior a la de la rata. Por el contrario, en los carnívoros y primates las neuronas están mucho más espaciadas y la densidad neuronal es mínima en el hombre.

Al avanzar en la escala filogenética cambia también el *tamaño de las neuronas*. Por lo común, las neuronas de un mismo tipo son mayores y más diferenciadas en las especies más evolucionadas.

La tercera variación sistemática tiene que ver con la *proporción y las relaciones entre neuronas y células gliales*. En general, al avanzar en la escala filogenética aumenta la proporción de células gliales por neurona. Este hecho se refleja en las aposiciones entre células gliales, fundamentalmente oligodendrocitos, y somas neuronales. Así, mientras que en el ratón y la rata es relativamente infrecuente encontrar algún soma neuronal en íntimo contacto

con una célula glial, en el gato y, sobre todo, en los primates, es normal observar somas rodeados por dos, tres o incluso más oligodendrocitos estrechamente apuestos a ellos.

Junto a estas variaciones generales, se aprecian también peculiaridades propias de cada especie. A ellas se dedican las secciones siguientes.

4.2. Citoarquitectura de la CLTd del ratón (*Mus musculus*)

La CLTd del ratón destaca por la pequeñez, la homogeneidad y la extraordinaria densidad de sus neuronas. En secciones coronales, su soma es redondeado u ovalado. Su diámetro máximo oscila entre 10 y 14 µm, con una media de 11,5 µm. Su relación carioplasmática es muy elevada (Fig. 39).

En secciones caudales, la CLTd aparece como un núcleo más o menos

redondeado, de unos 170 µm de diámetro, situado inmediatamente encima de la CLTv y muy próximo a la línea media (Figs. 40A, 41A). En niveles más rostrales, la CLTd se separa ligeramente de la línea media y de la CLTv, de modo que algunas neuronas de la parte más medial del CS se interponen entre ambos núcleos a modo de cuña horizontal (Fig. 40B). En la porción rostral de la CLTd, la mayoría de las neuronas se agrupan encima de los fascículos de la CLTd (Fig. 40B), con una disposición muy similar a la observada en la rata. En esta especie, la CLTd posee una longitud de aproximadamente 1700 µm.

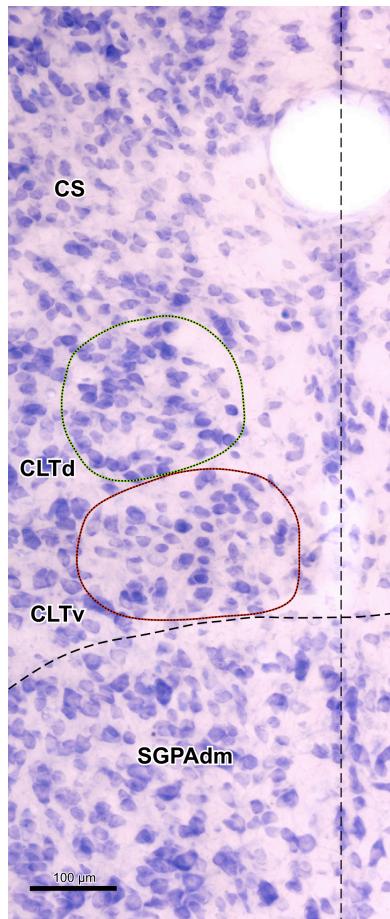


Figura 39. Citoarquitectura de la CLTd del ratón. Microfotografía de la región paramediana del techo mesencefálico de una sección coronal de 40 µm obtenida por congelación y teñida con el método de Giemsa. Nótese la elevada densidad neuronal de todos los núcleos y la homogeneidad de las neuronas de la CLTd.

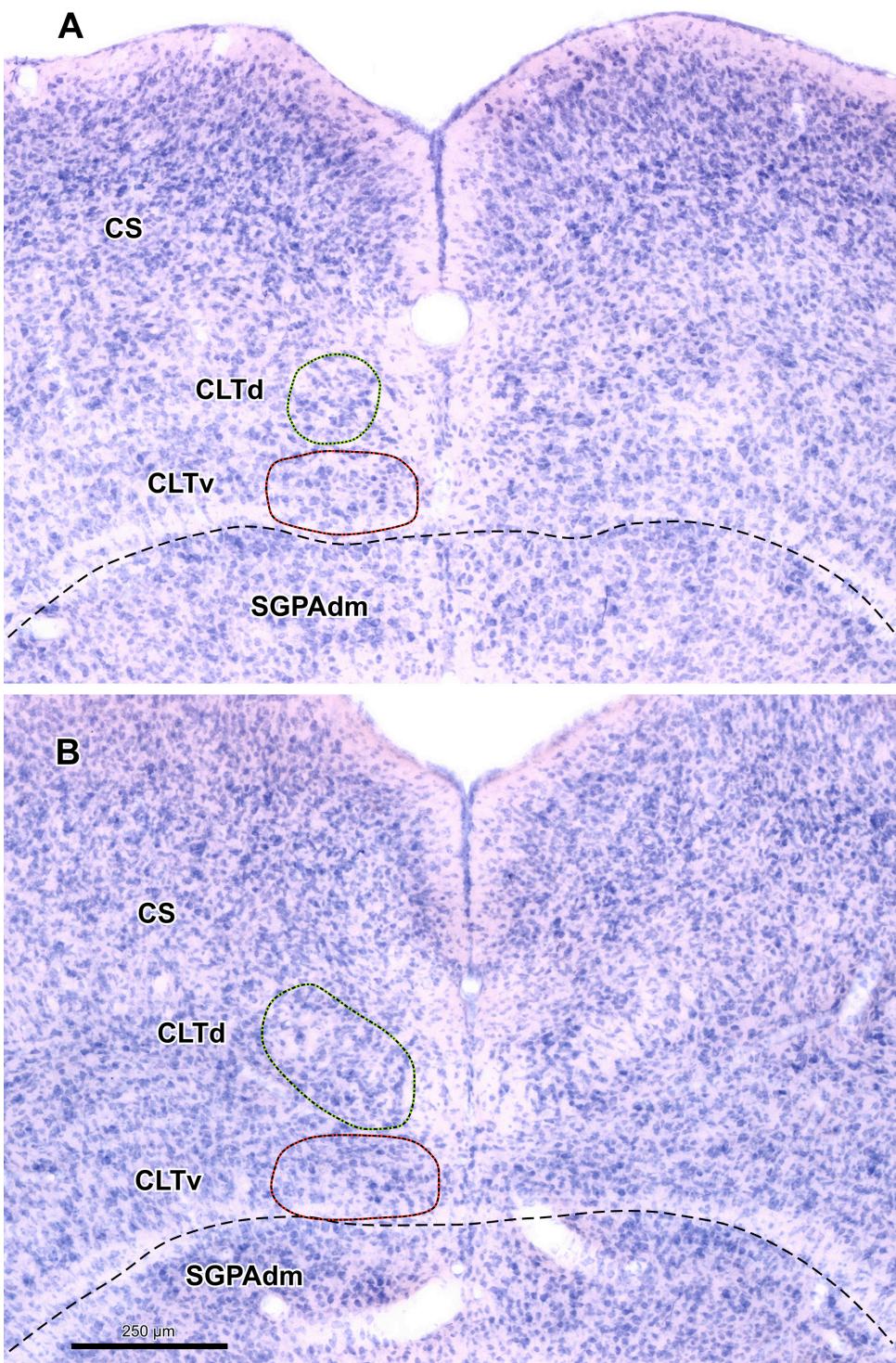


Figura 40. Citoarquitectura de la región tectal paramediana del ratón. Microfotografías de secciones coronales representativas de la porción caudal (A) y rostral (B) de la CLTd del ratón. Obsérvese la elevada densidad neuronal de todos los núcleos tectales en esta especie. Secciones de 40 µm de espesor teñidas con el método de Giemsa. La barra de aumento de B sirve también para A.

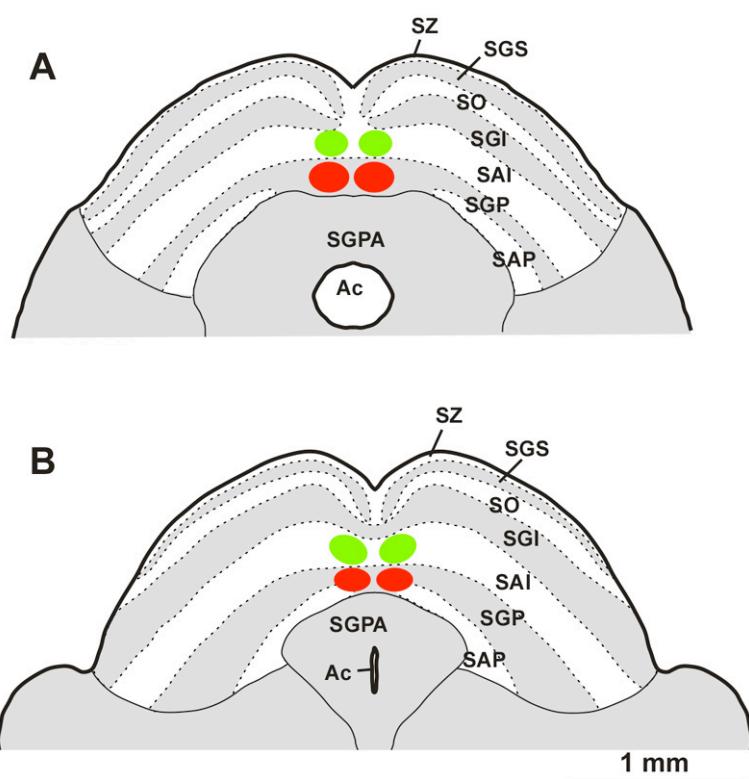
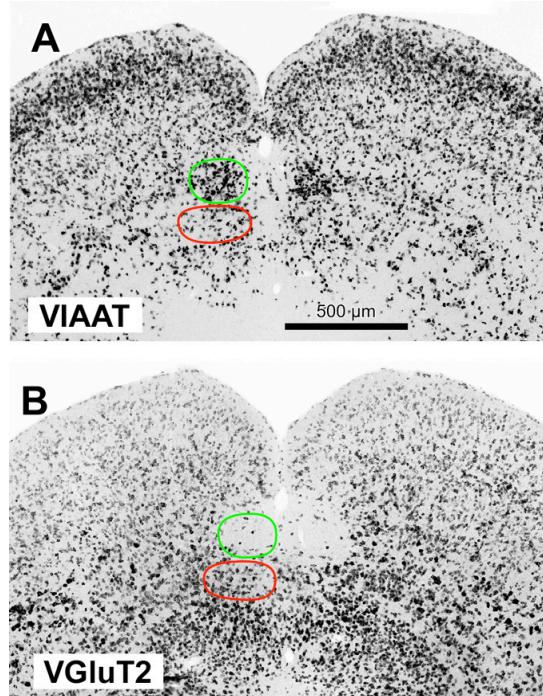


Figura 41. Posición de la CLTd del ratón. Esquemas de sendas secciones caudal (A) y rostral (B) del techo mesencefálico. La CLTd se representa en verde, y la CLTv, en rojo.



En la CLTd del ratón, la expresión del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT; Fig. 42A) y el transportador vesicular de glutamato de tipo 2 (VGlutT2; Fig. 42B) es prácticamente igual a la observada en la rata, y que describimos en el Capítulo 1 (Fig. 18), lo que indica que la inmensa mayoría de las neuronas de la CLTd murina son GABAérgicas.

Figura 42. En las neuronas de la CLTd del ratón se expresa el VIAAT (A), pero no el VGlutT2 (B).

4.3. Citoarquitectura de la CLTd del conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Igual que en los roedores, la CLTd del conejo está integrada casi exclusivamente por neuronas pequeñas (Figs. 43A, 44). En las secciones coronales su soma aparece redondeado u ovalado, con muy escaso citoplasma relegado a la periferia y poco tingible. En el núcleo celular se distinguen algunas escotaduras superficiales y un nucleolo pequeño. En secciones caudales son relativamente frecuentes los contornos neuronales fusiformes, que sugieren la existencia de troncos dendríticos opositopares, mientras que en la mitad rostral predominan los somas redondeados. El diámetro máximo del soma oscila entre 12 y 24 μm , con un valor medio de 16 μm .

En alguna que otra sección se encuentra una o, todo lo más, dos neuronas de mayor tamaño (23-30 μm de diámetro máximo) intercaladas entre las neuronas pequeñas. Se tiñen más intensamente que las pequeñas y el contorno del soma suele ser triangular o poligonal.

Como en los roedores, la distribución de las neuronas dentro del núcleo varía en función del nivel rostrocaudal. En la mitad caudal, las neuronas se reparten de manera bastante uniforme (Fig. 44A). Sin embargo, rostralmente tienden a concentrarse en la porción dorsal, encima, por tanto, del fascículo de la CLTd (Fig. 44B).

La extensión rostrocaudal de la CLTd coincide casi exactamente con la del propio CS. Su longitud es de aproximadamente 5,4 mm. En las secciones más caudales, el núcleo presenta un contorno ovalado de unas 400 μm de anchura y 300 μm de altura (Figs. 44A, 45A). En secciones progresivamente más rostrales, el núcleo se va achatando. Así, hay secciones coronales de la mitad rostral de la CLTd en las que el núcleo llega a medir 700 μm lateromedialmente y 500 μm dorsoventralmente (Figs. 44B, 45B).

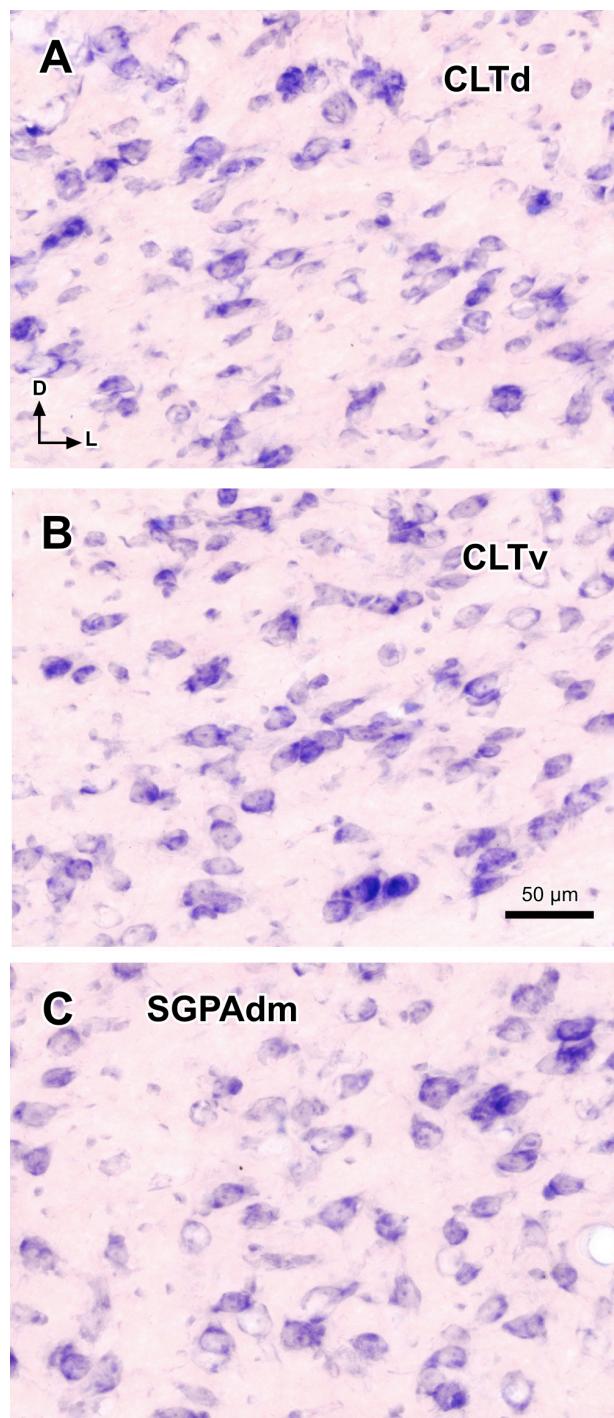


Figura 43. Citoarquitectura de la región paramediana tectal del conejo: Microfotografías de la CLTd (A), la CLTv (B) y la SGPAadm (C) tomadas de una sección coronal del techo mesencefálico de 40 μm obtenida por congelación y teñida con el método de Giemsa. Puede apreciarse la homogeneidad de las neuronas de la CLTd. La barra de aumento de B sirve también para A y para C.

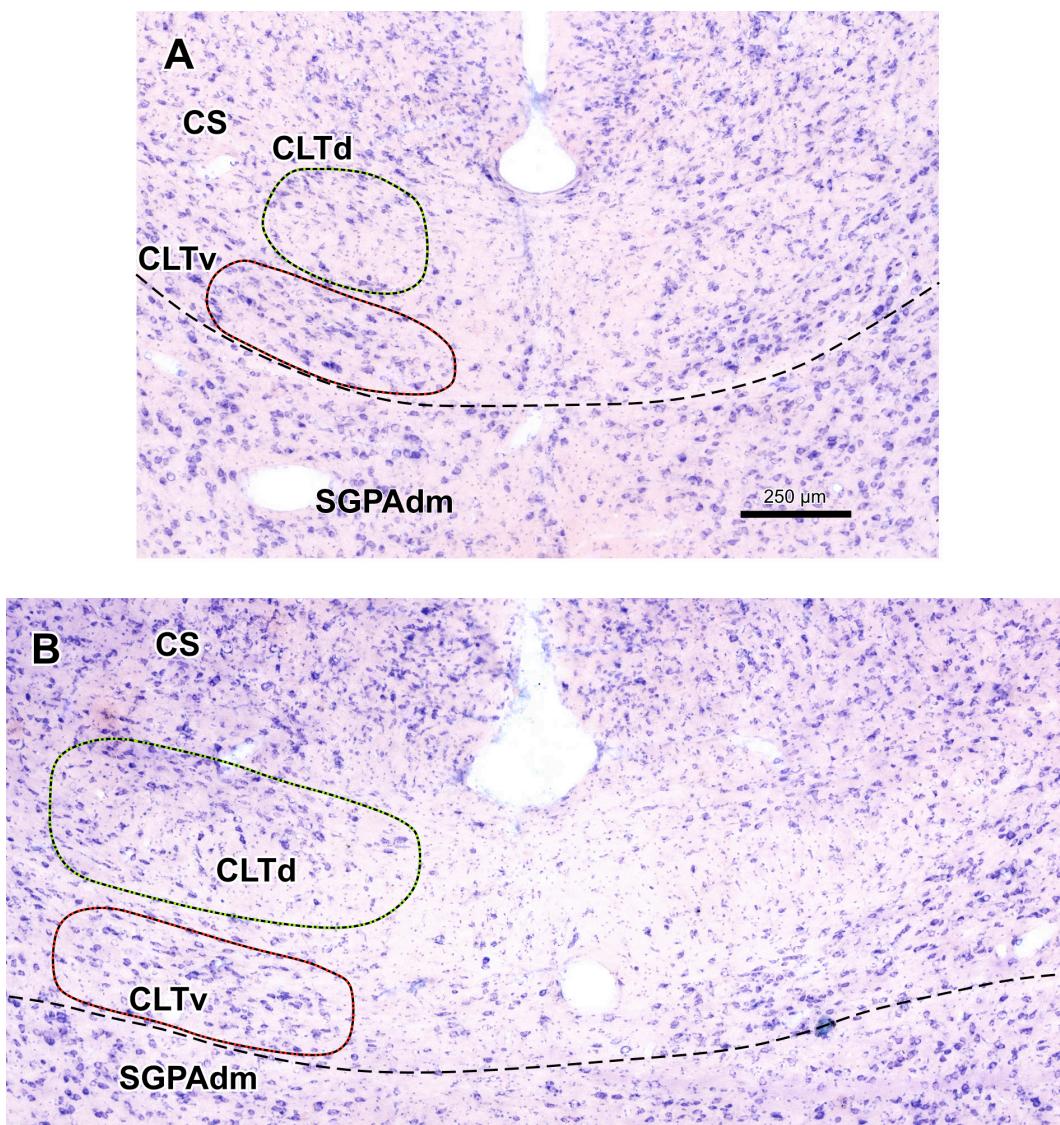


Figura 44. Citoarquitectura de la región tectal paramediana del conejo. Microfotografías de secciones coronales representativas de la porción caudal (A) y rostral (B) de la CLTd del conejo. La CLTd aparece relativamente pequeña en niveles caudales y se ensancha considerablemente en su mitad rostral. Nótese en B que las neuronas de la CLTd se concentran en la mitad dorsal del núcleo, justo encima del fascículo de la CLTd, reconocible por la escasez de neuronas. Secciones de 40 μm de espesor teñidas con el método de Giemsa. La barra de aumento de A sirve también para B.

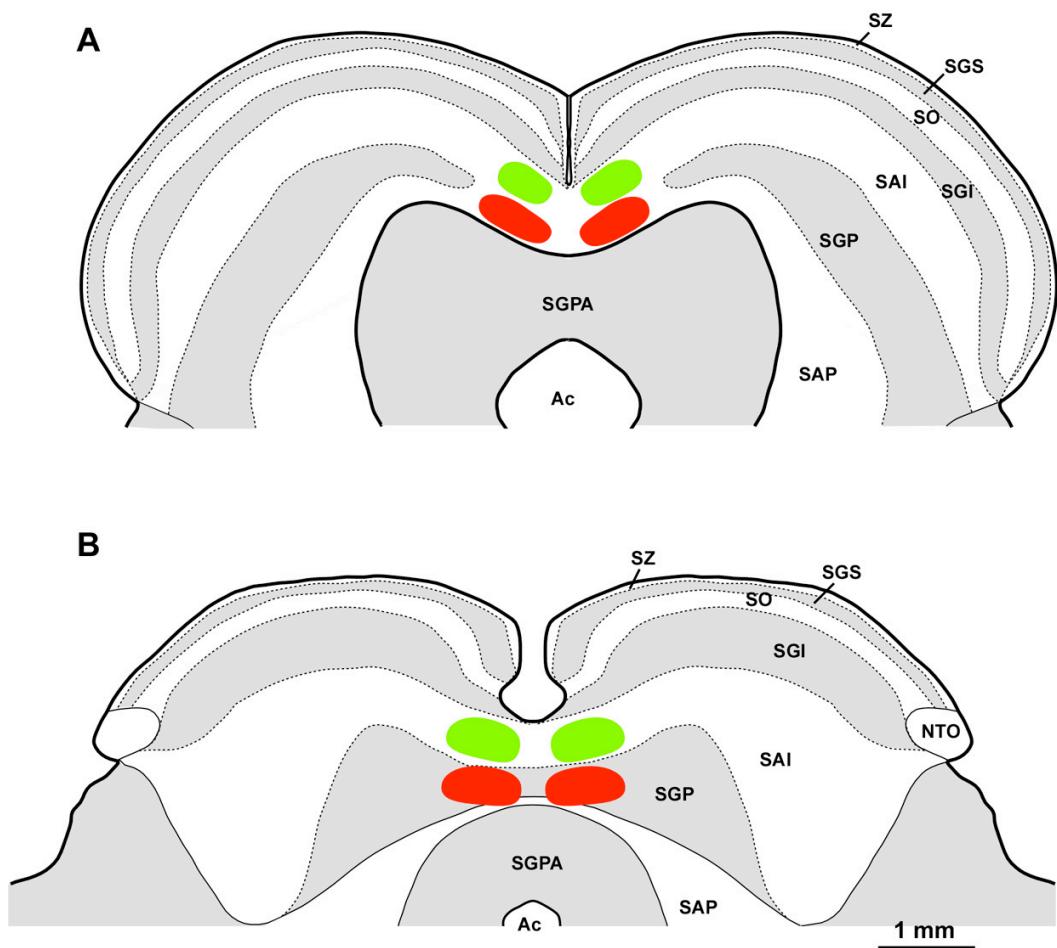


Figura 45. Posición de la CLTd del conejo. Esquemas que muestran la posición de la CLTd (verde) y de la CLTd (rojo) en una sección caudal (A) y una sección rostral (B) del techo mesencefálico del conejo.

4.4. Citoarquitectura de la CLTd del gato (*Felis catus*)

A pesar de que en el gato los tipos neuronales están en general más diferenciados y son mayores que los de los roedores y los lagomorfos, la región paramediana del techo mesencefálico sorprende a primera vista por la aparente similitud en la morfología de los tipos neuronales que la componen (Figs. 46, 47). No obstante, una inspección detallada permite apreciar que, igual que en otras especies, la CLTd felina resalta por la pequeñez de sus neuronas (Fig. 46A), menores que las de los núcleos circundantes (Fig. 46B, C), e incluso menores que las de la CLTd del conejo. Además, las neuronas de la CLTd están más empaquetadas que las de la CLTv. Aunque pueden encontrarse algunas neuronas de soma fusiforme o triangular de hasta 18 µm de diámetro máximo, la gran mayoría de las neuronas de la CLTd son redondeadas u ovaladas (Fig. 46A) y miden apenas 10-13 µm. Con el método de Nissl el soma posee un estrecho anillo de citoplasma de tinción fina y uniforme, ligeramente más intensa que la de las neuronas de la CLTv (no ilustrado). También en secciones teñidas con el método de Giemsa las neuronas de la CLTd son más tingibles que las de la CLTv (Figs. 46, 47).

La CLTd del gato posee una longitud de unos 3,9 mm. A diferencia de lo que sucede en las otras especies analizadas, el límite medial del núcleo se encuentra próximo (unos 150 µm) a la línea media a lo largo de toda la extensión rostrocaudal del núcleo, sin hacerse más lateral, por tanto, en las porciones rostrales (Figs. 47, 48). En las secciones coronales, suele presentar forma aproximadamente circular o ligeramente ovalada, con su eje mayor horizontal, y su calibre, de unas 350-400 µm, es también bastante constante con independencia del nivel rostrocaudal.

La CLTd del gato posee otro rasgo peculiar: en la mitad rostral del núcleo, que está dominada por el fascículo de la CLTd, las neuronas no tienden a concentrarse en la porción dorsal del núcleo, encima del fascículo, sino que se distribuyen de modo bastante homogéneo por todo el núcleo (Fig. 47B).

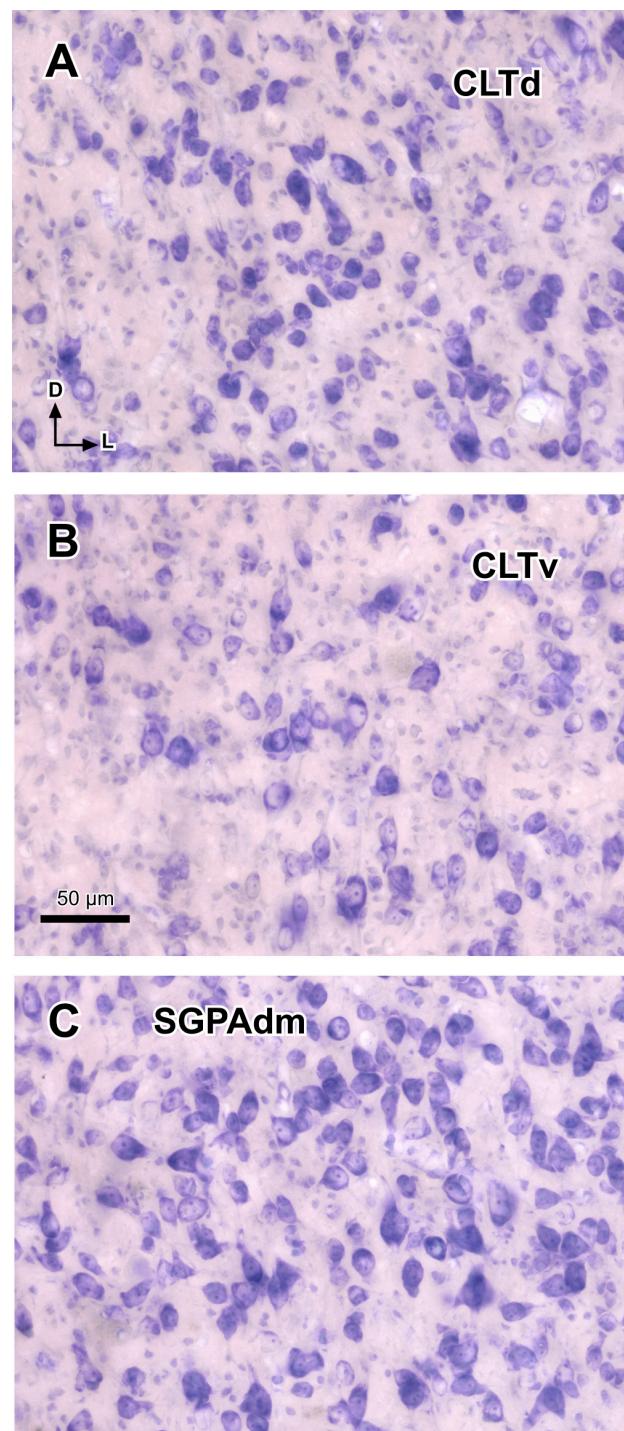


Figura 46. Citoarquitectura de la región paramediana del techo mesencefálico del gato. Microfotografías de la CLTd (A), la CLTv (B) y la SGPAadm (C) tomadas de una sección coronal del techo mesencefálico de 40 μm obtenida por congelación y teñida con el método de Giemsa. Puede apreciarse el menor tamaño y la tinción intensa de las neuronas de la CLTd. La barra de aumento de B sirve también para A y para C.

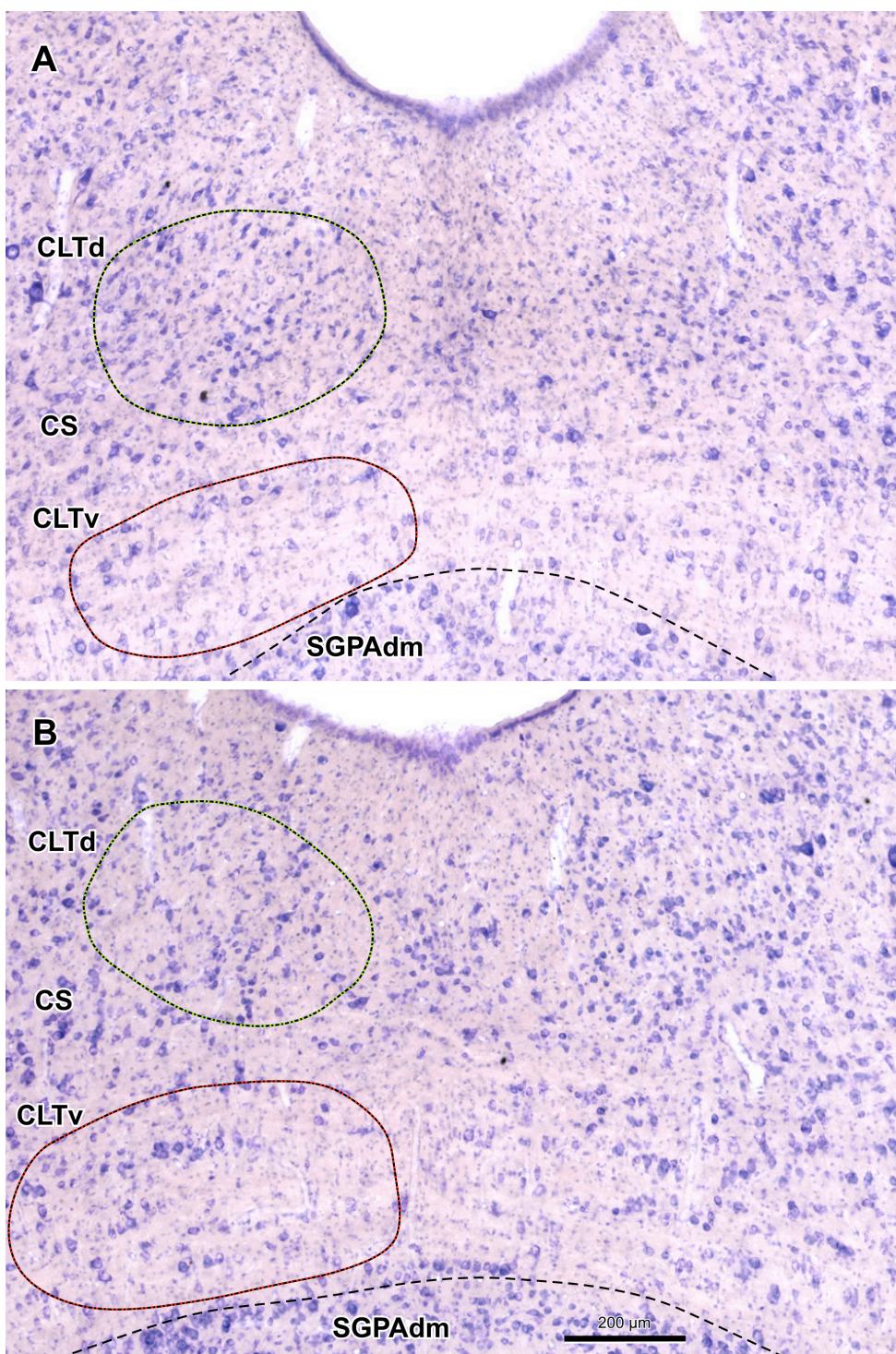


Figura 47. Citoarquitectura de la región tectal paramediana del gato. Microfotografías de secciones coronales representativas de la porción caudal (A) y rostral (B) de la CLTd del gato. El tamaño de la CLTd y la distribución de las neuronas dentro del núcleo son muy similares en ambos niveles. Secciones de 40 μm de espesor teñidas con el método de Giemsa. La barra de aumento de B sirve también para A.

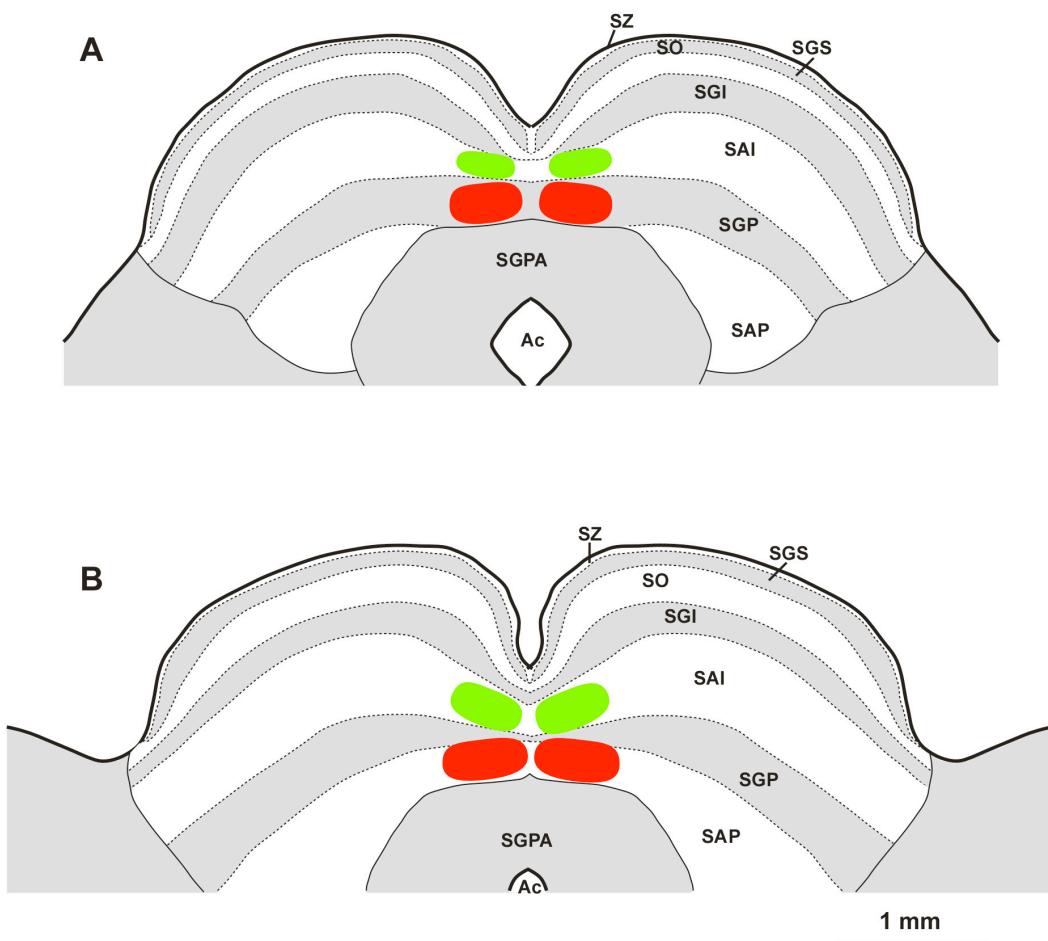


Figura 48. Posición de la CLTd del gato. Esquemas que muestran la posición de la CLTd (verde) y de la CLTd (rojo) en una sección caudal (A) y una sección rostral (B) del techo mesencefálico del gato. La posición y el tamaño de la CLTd apenas varían con el nivel rostrocaudal.

4.5. Citoarquitectura de la CLTd del mono (*Macaca fascicularis*)

Aunque las series de secciones estudiadas abarcaron la mayor parte del techo mesencefálico, ninguna de ellas incluyó la porción más rostral del CS. Los datos que se describen a continuación se refieren, por tanto, a la porción de la CLTd comprendida entre el extremo caudal del núcleo y el comienzo de la CoCS. Si, igual que en las demás especies estudiadas, la extensión rostrocaudal de la CLTd coincide con la del CS, el núcleo puede tener una longitud de unos 5 mm.

En secciones gruesas teñidas con tionina, la CLTd destaca por la pequeñez de sus neuronas (Fig. 49). En secciones coronales, los somas suelen aparecer redondeados o fusiformes (Fig. 49A). Los somas redondeados poseen diámetros de 15-20 µm. Aunque los somas fusiformes son considerablemente más largos (diámetro máximo de hasta 30 µm), su diámetro mínimo suele ser similar al de los somas redondeados, de modo que es posible que la forma del soma obedezca más a su orientación con respecto al plano de corte, que a una diferencia real de tipos neuronales. En las neuronas de contorno redondeado, la mayor parte del soma se encuentra ocupado por un núcleo de posición central, en tanto que en las neuronas fusiformes el citoplasma se acumula en los polos de la célula marcando el arranque de troncos dendríticos primarios más gruesos de lo que cabría esperar a la vista del tamaño del soma. Las hendiduras nucleares son menos abundantes y llamativas que en las neuronas de los roedores.

En secciones coronales caudales, la CLTd presenta un contorno redondeado de unas 350 µm de diámetro y está separada de la línea media por tan solo unas 100-150 µm (Fig. 50A, 51). En secciones progresivamente más rostrales, el núcleo se aparta de la línea media, hasta quedar a 400 µm en las secciones más rostrales de nuestras series. Al mismo tiempo, la sección del núcleo se va agrandando (Fig. 50B). A diferencia de los roedores, a este nivel las neuronas no empiezan a desplazarse hacia la mitad dorsal del núcleo.

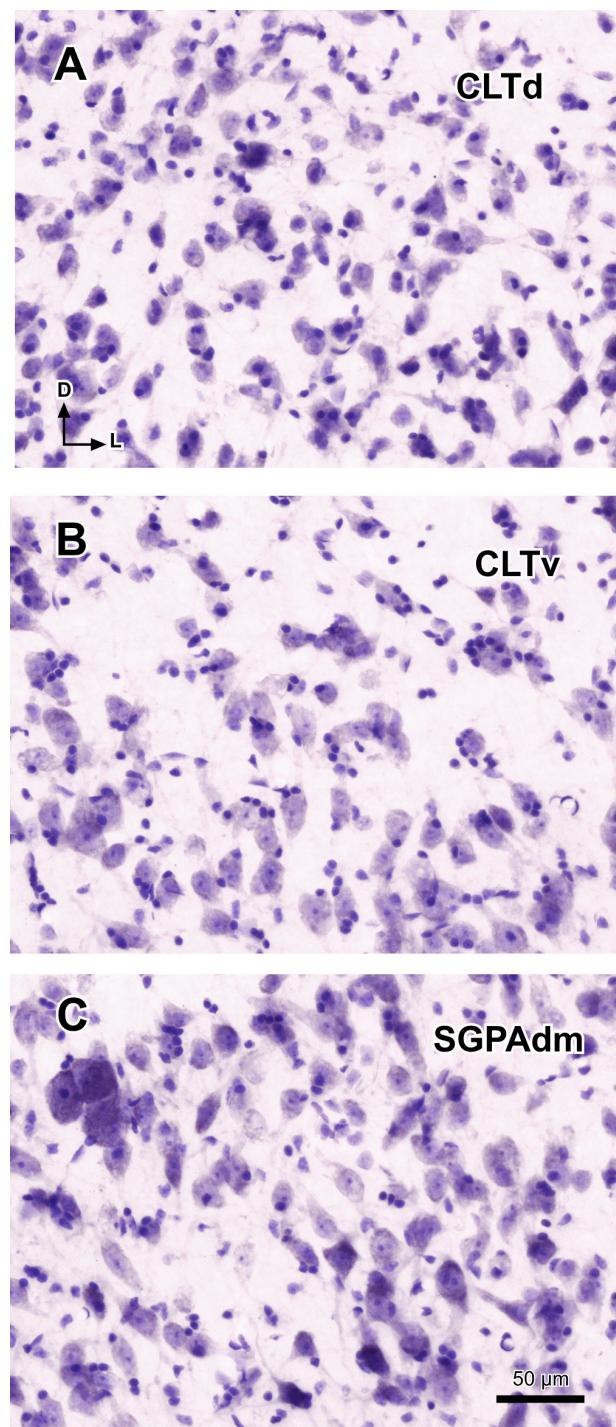


Figura 49. Citoarquitectura de la región paramediana del techo mesencefálico del mono de Java. Microfotografías de la CLTd (A), la CLTv (B) y la SGPAadm (C) tomadas de una sección coronal del techo mesencefálico de 40 μm obtenida por congelación y teñida con tionina. La barra de aumento de C sirve también para A y B.

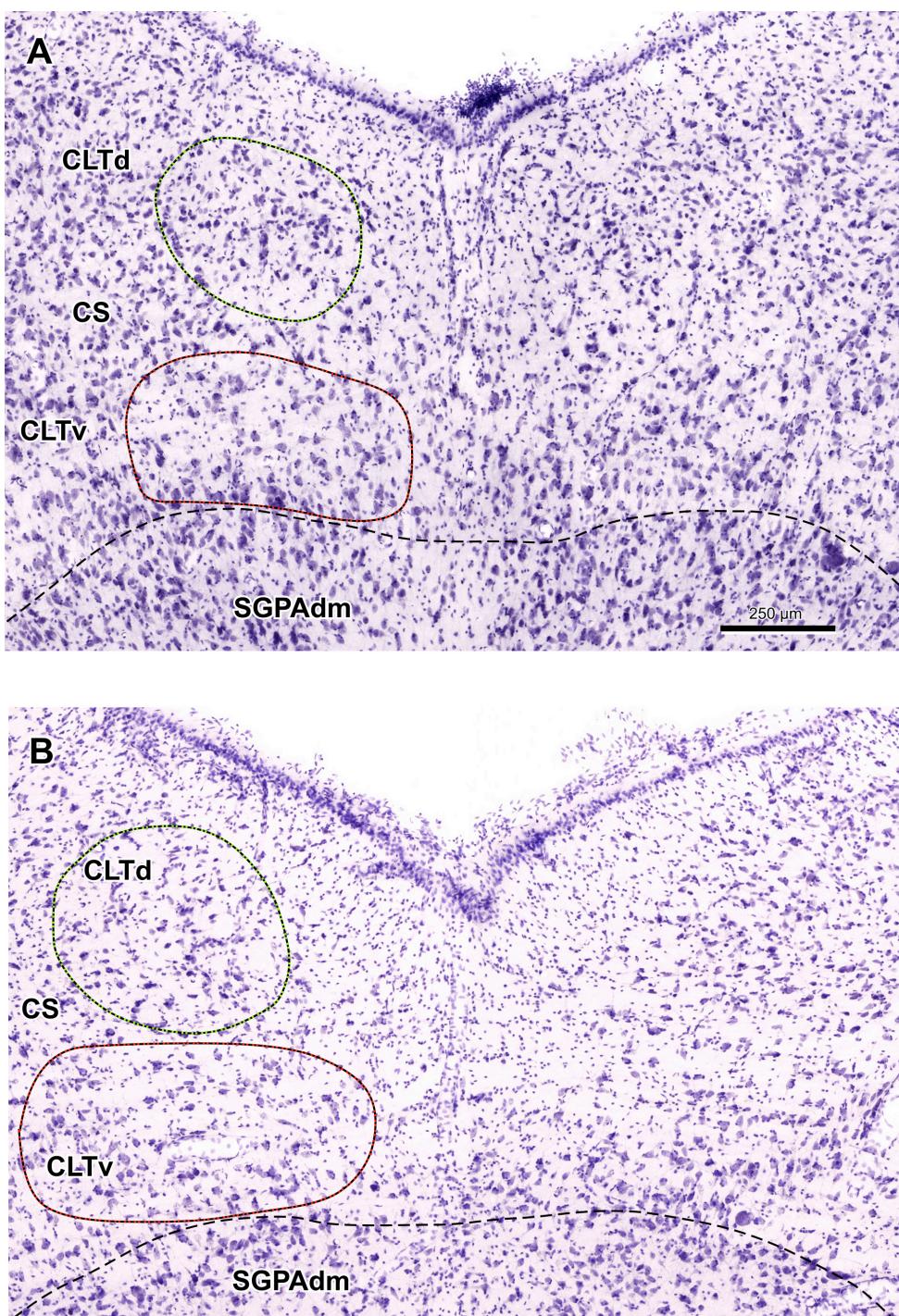


Figura 50. Citoarquitectura de la región tectal paramediana del mono.
Microfotografías de dos secciones coronales representativas de la mitad caudal de la CLTd del mono de Java. Obsérvese que el borde dorsal del núcleo está próximo a la superficie dorsal del mesencéfalo. Secciones de 40 μm de espesor teñidas con tionina. La barra de aumento de A sirve también para B.

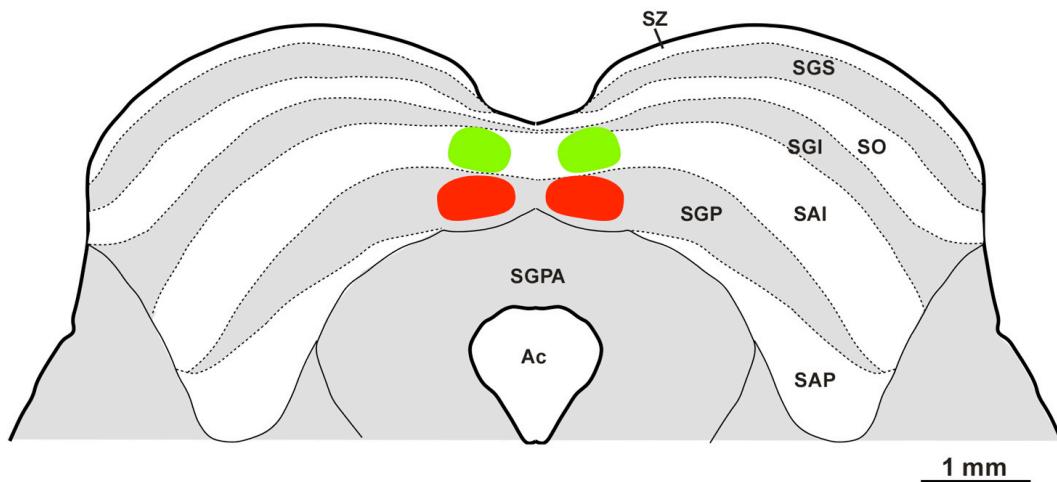


Figura 51. Posición de la CLTd del mono. Esquema que muestra la posición de la CLTd (verde) y de la CLTv (rojo) en una sección de la mitad caudal del CS.

4.6. Citoarquitectura de la CLTd del hombre (*Homo sapiens sapiens*)

También en el techo mesencefálico humano se reconoce citoarquitectónicamente la CLTd. En general, el sistema nervioso central humano se caracteriza por la enorme variedad en la forma y el tamaño de sus neuronas, y por la gran dispersión de éstas. Por esta razón, algunos límites citoarquitectónicos que resultan nítidos en otras especies permanecen más oscuros en el hombre.

Igual que en los otros mamíferos estudiados, la CLTd humana es la única estructura de la región tectal paramediana caracterizada por su población relativamente homogénea de neuronas pequeñas, menores que las de los núcleos circundantes (Fig. 52). En secciones coronales su soma suele aparecer alargado y estrecho y aloja un núcleo igualmente alargado y que lo rellena en su mayor parte. También son frecuentes los somas con forma de triángulo isósceles muy alargado. El diámetro máximo oscila entre 15 y 28 μm , con un valor medio de 21 μm . En secciones teñidas con el método de Giemsa, el citoplasma presenta una textura muy fina, pero resulta llamativo que, a pesar de poseer menos citoplasma, las neuronas de la CLTd se tiñen más intensamente que las de la CLTv. Es frecuente que los polos del soma se continúen con dendritas delgadas, rectilíneas y poco teñidas, pero visibles durante decenas de micrómetros. Las orientaciones de los somas y las dendritas son variadas (Fig. 52A), lo que contrasta con la orientación predominantemente vertical de las neuronas de la CLTv (Fig. 52B).

En las más secciones caudales, la CLTd se encuentra muy próxima a la línea media (100-150 μm) y relativamente separada de la superficie dorsal del mesencéfalo, y posee un contorno ovalado, con un diámetro horizontal de 800 μm y un diámetro vertical de 500 μm (Figs. 53A, 53A). Igual que en la mayoría de las especies estudiadas, en secciones más rostrales el núcleo se separa ligeramente de la línea media y se hace más dorsal (Figs. 53B, 54B). El núcleo en su conjunto tiene una longitud aproximada de 8,5 mm.

Una diferencia notable entre la CLTd humana y la de las otras especies analizadas es que el fascículo de la CLTd resulta menos evidente en el hombre, porque está integrado por axones que no se agrupan en haces nítidos. Además, las neuronas tienden a concentrarse en la mitad ventral del núcleo, por debajo de los axones longitudinales (Fig. 53B).

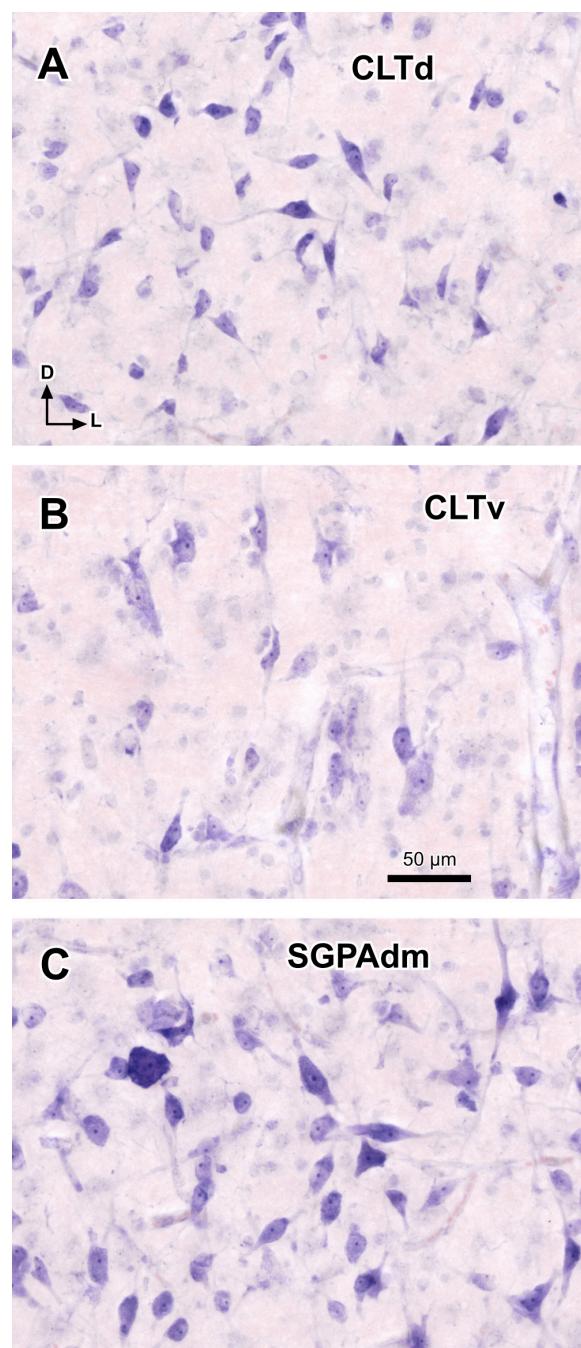


Figura 52. Citoarquitectura de la región paramediana del techo mesencefálico del hombre. Microfotografías de la CLTd (A), la CLTv (B) y la SGPAadm (C) tomadas de una sección coronal del techo mesencefálico de 40 μm obtenida por congelación y teñida con el método de Giemsa. Comparadas con las de la CLTv, las neuronas de la CLTd son menores, están más intensamente teñidas y carece de orientación vertical. La barra de aumento de B sirve también para A y C.

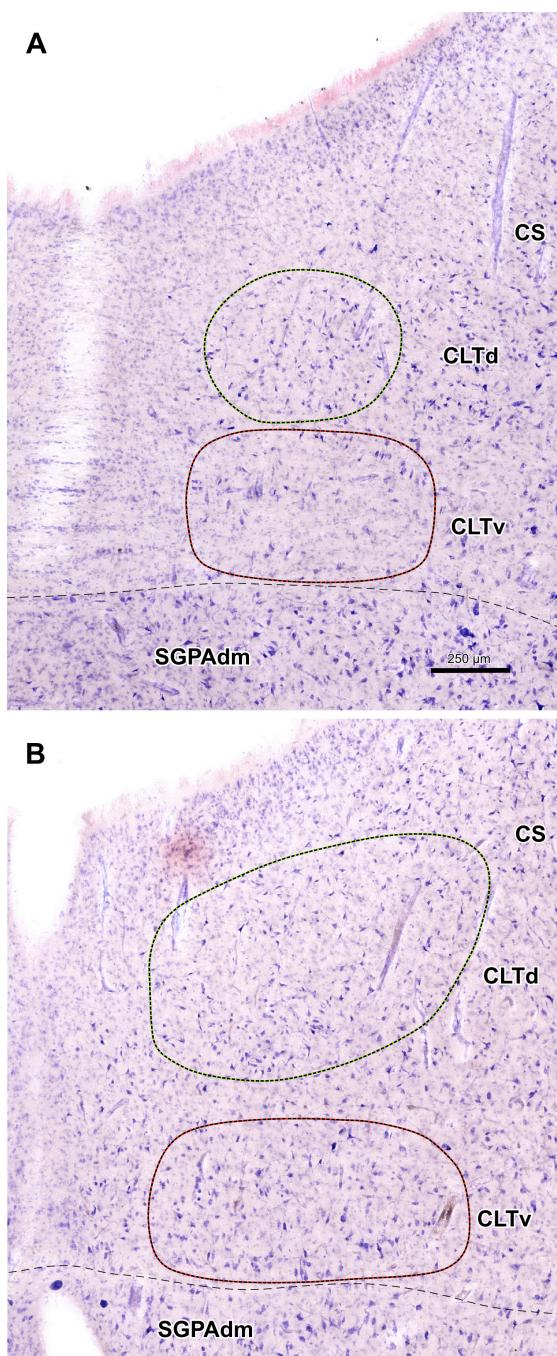


Figura 53. Citoarquitectura de la región paramediana del techo mesencefálico humano. Microfotografías de sendas secciones coronales representativas de las porciones caudal (A) y rostral (B) de la CLTd del hombre. Obsérvese en B que el borde dorsal del núcleo está próximo a la superficie dorsal del mesencéfalo. Secciones de 40 µm de espesor teñidas con el método de Giemsa. La barra de aumento de A sirve también para B.

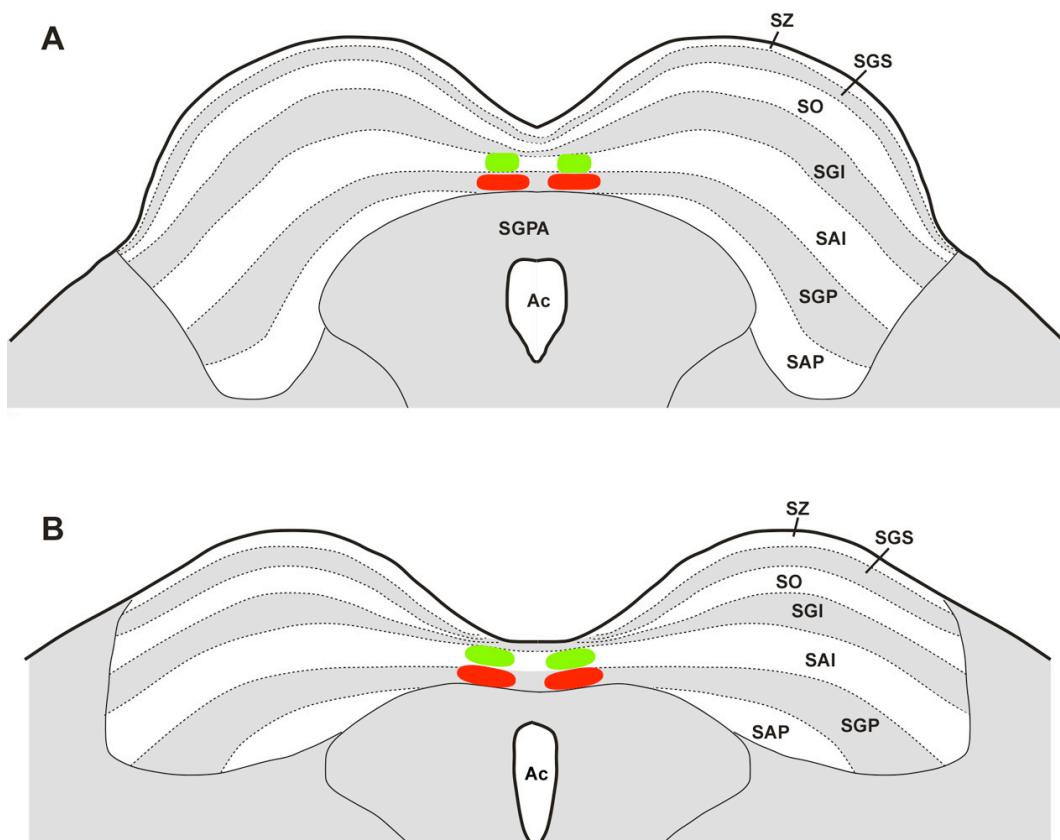
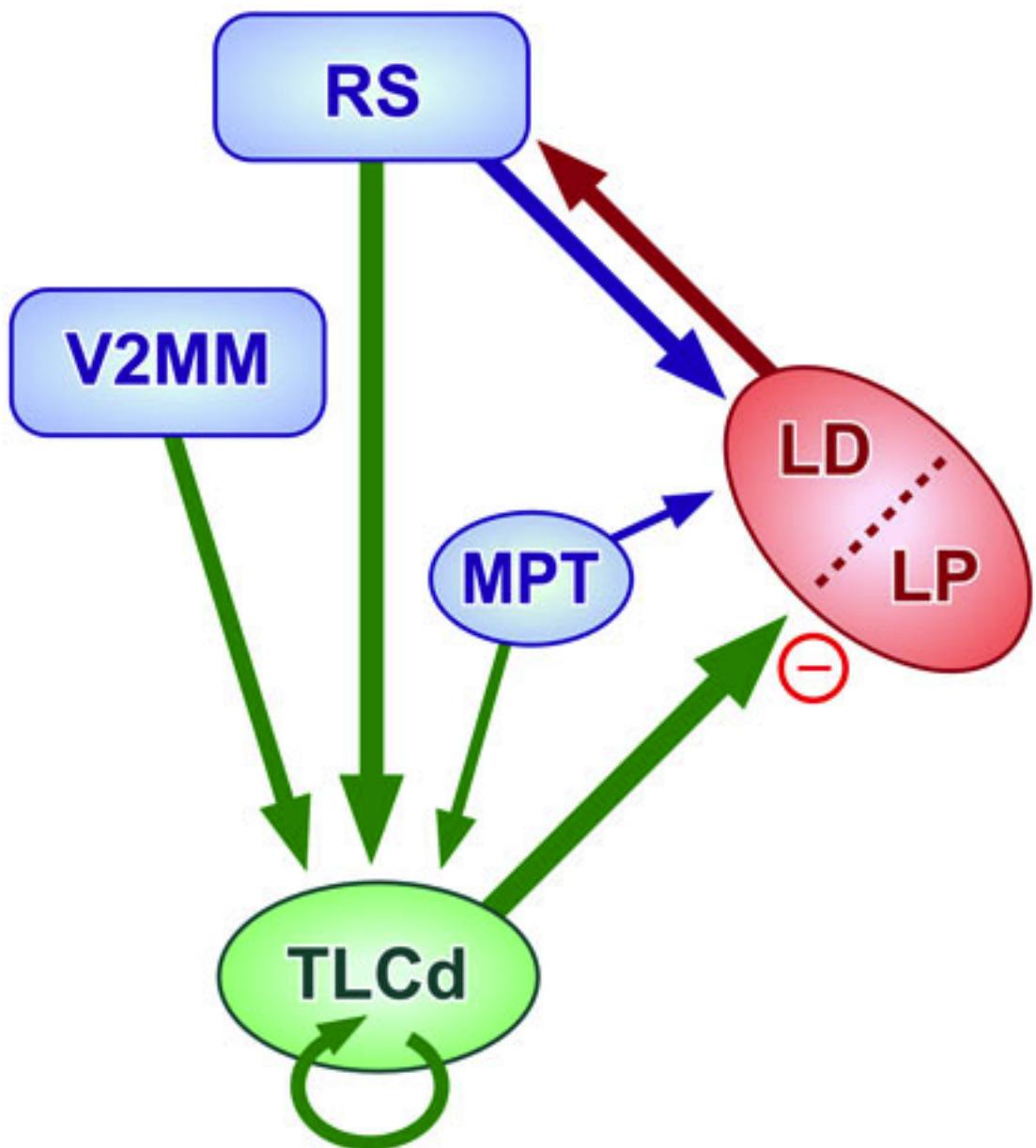


Figura 54. Posición de la CLTd del hombre. Esquemas que muestran la posición de la CLTd (verde) y de la CLTd (rojo) en una sección caudal (A) y una sección rostral (B) del techo mesencefálico humano.



DISCUSIÓN GENERAL

1. La CLTd es un núcleo distinto

Esta Tesis Doctoral representa el estudio sistemático de un núcleo del cerebro de los mamíferos no descrito hasta ahora: la CLTd. Aunque la existencia de la CLTd ya fue advertida durante el estudio de la CLTv, situada inmediatamente debajo de ella ([Saldaña y cols. 2007](#)), en este Trabajo hemos empleado todo un conjunto de técnicas neuroanatómicas para demostrar que la CLTd es, en efecto, un núcleo distinto del cerebro de la rata. A pesar de su aspecto tan estrecho en secciones coronales, el tamaño de esta estructura longitudinal es impresionante, ya que el núcleo recorre toda la longitud rostrocaudal del CS.

Puede parecer sorprendente que un núcleo tan grande como la CLTd haya pasado inadvertido hasta ahora. Son varios los factores que pueden haber contribuido a este hecho. Aunque el borde entre la CLTd y el CS es muy nítido cuando se examina con detenimiento (ver, por ejemplo, en el Capítulo 1 las figuras 14 y 15B), a primera vista parece mal definido, lo cual puede explicar por qué en los escasos trabajos publicados cuyas ilustraciones incluyen la línea media, el territorio ocupado por la CLTd se ha incluido tradicionalmente en la parte más medial del CS (ver, por ejemplo, [Olszewski y Baxter 1954](#); [Berman 1968](#); [Swanson 1999](#); [Hof y cols. 2000](#); [Paxinos y Watson 2005](#)). Por desgracia, la bibliografía arrastra una considerable confusión en todo lo relacionado con la estratificación de la región paramediana del techo mesencefálico y, así, el territorio ocupado por la CLTd se ha asignado de modo nada sistemático a la porción medial de la capa gris intermedia (por ejemplo, [Rieck y cols. 1986](#) [gato]; [Swanson 1999](#) [rata]; [Meredith y cols. 2001](#) [hurón]; [Helms y cols. 2004](#) [rata]; [Bajo y cols. 2010](#) [hurón]), al SAI ([Redgrave y cols. 1986, 1990](#) [rata]; [Rhoades y cols. 1986](#) [hámster]; [Harvey y Worthington 1990](#) [rata]; [Harvey y cols. 2001](#) [rata]; [Krout y cols. 2001](#); [Favaro y cols. 2011](#) [rata]), a ambas capas intermedias ([García del Caño y cols. 2000, 2001](#) [rata]), o a las capas profundas ([Ma y cols. 1990](#) [mono]; [Furigo y cols. 2010](#) [rata]), o incluso se ha colocado fuerza de cualquier capa identificable (por ejemplo, [Huerta y Harting 1984](#) [gato]; [Matsuyama y Kawamura 1985](#) [rata]; [Paxinos y Watson 2005](#) [rata]; [Comoli y cols. 2012](#)). Como se discute más abajo, nuestros datos demuestran inequívocamente que la CLTd se encuentra inmediatamente medial al SAI.

Otra razón por cual la CLTd puede haber pasado inadvertida es que con muchos marcadores neuroquímicos de uso común el núcleo no destaca de su entorno. Por ejemplo, en las secciones del mesencéfalo de rata teñidas para visualizar la parvalbúmina, la calbindina, la calretinina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la proteína de neurofilamentos (SMI-32), la tirosina hidroxilasa, la NADPH diaforasa, la acetilcolinesterasa o la adenosina desaminasa, la CLTd es apenas distinguible ([Miguel-Hidalgo y cols. 1989](#); [Lane y cols. 1993](#); [Paxinos y cols. 1999](#)).

A pesar de lo anterior, pueden hallarse en la literatura artículos que identificaron algunas propiedades importantes de la CLTd, lo que da mayor consistencia a nuestra caracterización. Por ejemplo, [Mugnaini y Oertel \(1985\)](#) describieron un grupo continuo y longitudinal de neuronas fuertemente positivas para la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en la región paramediana del techo del mesencéfalo de la rata, en una ubicación que coincide con la de la CLTd (ver su figura 102); a este grupo lo llamaron tentativamente “área comisuralis colliculi superioris et inferioris”. De forma similar, [Harvey y cols. \(2001\)](#) identificaron en la misma posición un grupo singular de neuronas que expresan el ARNm que codifica la síntesis de la GAD (ver su figura 2D, 3D). Además, cuando se analiza una línea de ratones transgénicos que expresan la proteína fluorescente Venus bajo el control del promotor del VIAAT, se identifica en la ubicación de la CLTd un inconfundible grupo de neuronas brillantemente fluorescentes ([Wang y cols. 2009](#); ver su Fig. 6). Todas estas observaciones, unidas a la expresión de los transportadores vesiculares descrita en esta Memoria, sugieren fuertemente que, tanto en el ratón como en la rata, casi todas, si no todas las neuronas de la CLTd son GABAérgicas. Por último, la CLTd resalta de los núcleos vecinos debido a la presencia de neuronas y fibras inmunorreactivas para leu-encefalina ([Miguel-Hidalgo y cols. 1990](#); ver su Fig. 2B, E), y a los altos niveles de expresión de la subdivisión alfa-7 del receptor nicotínico de la acetilcolina en ratas y ratones tanto embrionarios, como adultos ([Happe y Morley 2004](#); ver su figuras 1, 2.).

La existencia de la CLTd también se ve reforzada por varios estudios anteriores de trazado de vías nerviosas. Realizando inyecciones de BDA en la corteza retroesplenial de la rata, se observó un grupo de fibras terminales en el territorio ocupado por la CLTd tanto en ratas normales ([García del Caño y cols. 2001](#); [Tsumori y cols. 2001](#)), como en ratas a las que previamente se les ha

sometido a la enucleación neonatal ([García del Caño y cols. 2001](#)). Del mismo modo, la inyección de aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa (WGA-HRP) en las áreas visuales secundarias de la corteza de la rata reveló una alta concentración de fibras marcadas en el territorio ocupado por la CLTd ipsolateral ([Harvey y Worthington 1990](#); ver su figura 5A). De manera análoga, los estudios de las eferencias de diversas áreas de la corteza prefrontal medial han mostrado trazado anterógrado en la CLTd de ratas ([Beckstead 1979](#), ver sus figuras 2, 4 y 5; [Wyss y Sripanidkulchai 1984](#), su figura 5) y de gatos ([Segal y cols. 1983](#), su figura 5; [Room y cols. 1985](#), sus figuras 3K-N, 6J-K; [Harting y cols. 1992](#), su figura 17). Además, numerosas neuronas se marcaron en la ubicación de la CLTd ipsolateral cuando se inyectó HRP en el núcleo laterodorsal del tálamo (LD) de la rata ([Thompson y Robertson 1987](#); ver sus figuras 3, 5), al inyectar WGA-HRP conjugada con oro en el núcleo lateral posterior del tálamo (LP) de la rata ([Carstens y cols. 1990](#); su Fig. 6D), y tras las inyecciones de dextrano conjugado con fluoresceína en el núcleo pulvinar del gato ([Baldauf y cols. 2005](#); su figura. 1F), el homólogo felino del LP de los roedores. Todos estos resultados apoyan firmemente las conexiones de la CLTd descritas en esta Tesis y, unidos a nuestro análisis comparativo filogenético, refuerzan la hipótesis de que la CLTd está presente en la mayoría de los mamíferos, si no en todos ellos.

1.1. Diferencias entre la CLTd y la CLTv

A pesar de su estrecha aposición y sus similitudes organizativas, la CLTd y la CLTv difieren en varios aspectos fundamentales. En primer lugar, por sus *relaciones anatómicas*: a diferencia de la CLTd, la CLTv es atravesada por la comisura del CI y la comisura del CS; por el contrario, la CLTd, pero no la CLTv, es surcada por un llamativo fascículo de axones orientados longitudinalmente. En segundo lugar, difieren por su *citoarquitectura*: La CLTd carece en su mayor parte de neuronas grandes comparables a las neuronas medianas de la CLTv y los somas neuronales de la CLTd son significativamente más pequeños y se encuentran más juntos que los de las neuronas pequeñas de la CLTv ([Saldaña y cols. 2007](#)). En tercer lugar, ambos núcleos difieren por su *neuroquímica*: la expresión de los transportadores de aminoácidos vesiculares (Figs. 18, 42) sugiere que todas o casi todas las neuronas de la CLTd son GABAérgicas, mientras que la CLTv puede contener una mezcla de neuronas GABAérgicas y

glutamatérgicas. En cuarto lugar, la CLTd y la CLTv difieren por sus *conexiones*: las proyecciones de la CLTd son exclusivamente ascendentes, en tanto que las de la CLTv son en su mayor parte descendentes. Más específicamente, la CLTd, pero no la CLTv, inerva masivamente al complejo lateral del tálamo (Figs. 23J-K, 28), al tiempo que la CLTv, pero no la CLTd, es inervada por el CI ([Aparicio y cols. 2010](#)) y se conecta recíprocamente con el núcleo parolivar superior ([Viñuela y cols. 2011](#)). Además, mientras que la CLTv se comunica con estructuras auditivas, las conexiones de la CLTd parecen relacionarla con el sistema visual. En quinto lugar, de las dos columnas, sólo la CLTd muestra una *expresión basal de la proteína Fos* (Fig. 20). Este aspecto se desarrolla más ampliamente en el siguiente apartado de la Discusión. Y finalmente, ambos núcleos son diferentes por su *electrofisiología*: las neuronas de la CLTv responden a estímulos acústicos, pero las neuronas de la CLTd no responden al sonido ([Saldaña y cols. 2007; Marshall y cols. 2008](#)).

1.2. Diferencias entre la CLTd y el CS

Quizá la cuestión fundamental para establecer la identidad propia de la CLTd es determinar si representa un núcleo separado o más bien una región más o menos especializada del CS, y en particular una región del SAI, en el que se la ha incluido a menudo. Esto es más que una simple cuestión semántica, ya que el reconocer a la CLTd como un núcleo distinto influirá en las futuras estrategias diseñadas para investigarlo, pues lo más probable es que dos núcleos diferentes posean orígenes ontogenéticos distintos y desempeñen funciones también diferentes.

Nuestros resultados demuestran que la CLTd difiere claramente de las regiones adyacentes del CS por su *citoarquitectura*: las neuronas de la CLTd son muy homogéneas, están orientadas rostrocaudalmente y son significativamente más pequeñas y más empaquetadas que las neuronas vecinas del CS. De hecho, estas diferencias crean el nítido borde entre la CLTd y el CS que se aprecia en muchas secciones (Figs. 14, 15, 37). La CLTd es también diferente del CS por su *mieloarquitectura*: las fibras longitudinales que recorren la CLTd formando el fascículo de la CLTd difieren claramente de los axones longitudinales que recorren el SAI por su grosor y su patrón de agregación en haces (Figs. 16, 17).

Uno de los argumentos más fuertes a favor de la existencia de la CLTd como una entidad separada del CS es la *proporción de neuronas GABAérgicas* que contiene. Según nuestros resultados, tanto en ratas como en ratones, las neuronas de la CLTd son presumiblemente GABAérgicas porque expresan el transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT), mientras que el porcentaje de neuronas del SAI que expresan el VIAAT es muy bajo. En la rata, menos del 5% de las neuronas del SAI son inmunopositivas para GAD, lo que convierte al SAI en la capa del CS con menor proporción de neuronas GABAérgicas ([Mugnaini y Oertel 1985](#); ver sus esquemas A 2.2 a P 0.1). Por el contrario, el 50-90% de las neuronas de la CLTd son inmunopositivas para GAD, una proporción muy superior a la de cualquier región del CS ([Mugnaini y Oertel 1985](#); ver sus esquemas A 2.2 a P 0.5).

También ayuda a delimitar la CLTd la *expresión basal de la proteína Fos*. En las ratas mantenidas en silencio y en la oscuridad, se encuentran niveles de Fos detectables inmunocitoquímicamente en el núcleo de muchas neuronas de la CLTd, pero no en el de las neuronas de la CLTv o el SC. Nuestros datos son compatibles con los de estudios anteriores en los que se analizó la expresión de la proteína Fos en el CS de animales experimentales no sometidos a estimulación sensorial. Aunque, lógicamente, en ninguno de esos estudios se reconoció la CLTd, sus ilustraciones demuestran numerosas neuronas inmunorreactivas en la CLTd de ratas normales ([Wang y cols. 2000](#) [Figs. 2, 3]; [Lu y cols. 2001](#) [Fig. 1A]; [Furigo y cols. 2010](#) [Figs. 1A, 2]; [Shin e Ikemoto 2010](#) [Fig. 5B]; [Favaro y cols. 2011](#) [Fig. 5A]), de ratas distróficas RCS ([Lu y cols. 2001](#) [Fig. 1D] ; [Lu y cols. 2004a](#) [Fig. 4A] y de ratones con degeneración retiniana ([Lu y cols. 2004b](#) [Fig. 3A]).

Desconocemos el significado biológico de la expresión basal de Fos en la CLTd. Sin embargo, esta observación debe ser tenida en cuenta a la hora de interpretar la expresión de Fos en el CS de animales experimentales sometidos a cualquier tipo de manipulación. De hecho, en la literatura se encuentran numerosos ejemplos de estudios experimentales de lo más variado en los que se aprecian neuronas de la CLTd inmunoneñidas. Entre los modelos experimentales aludidos, se incluyen los siguientes llevados a cabo con roedores: inducción eléctrica o farmacológica de crisis convulsivas ([Shehab y cols. 1992](#) [Fig. 4C, F]), estimulación eléctrica del hipotálamo medial ([Sandner y cols. 1993](#) [Fig. 3]), pruebas de discriminación de olores ([Hess y cols. 1995](#) [Fig. 1B, C],

estimulación nociceptiva somática o visceral (Clement y cols. 1996 [Fig. 5]; Telford y cols., 1996 [Figs. 5, 9]; Wang y Redgrave, 1997 [Figs. 3, 4]; Wang y cols., 2000 [Figs. 1, 2, 4, 5]), estímulos luminosos repetidos con diversas frecuencias (Correa-Lacárcel y cols. 2000 [Fig. 4]), inactivación farmacológica de la retina (Lu y cols. 2001 [Fig. 2]), sección del nervio óptico (Lu y cols. 2004a [Fig. 4A]; Lu y cols. 2004b [Fig. 3]), estimulación acústica (Kai y Niki 2002 [Fig. 5]), ejecución de conductas predadoras (Furigo y cols. 2010 [Fig. 1]; Favaro y cols. 2011 [Fig. 5B-D]), afeitado de las vibrissas (Mundiñano y Martínez-Millán 2010 [Fig. 6]), enucleación ocular (Van der Gucht y cols. 2007 [Fig. 10A]; Mundiñano y Martínez-Millán 2010 [Fig. 6]), inyección de picrotoxina en el núcleo supramamilar (Shin e Ikemoto 2010 [Fig. 5B]), o administración sistémica de cocaína (Kaufling y cols. 2009 [Fig. 1]). A partir de ahora, será conveniente analizar en qué medida la presencia de neuronas inmunopositivas en la región paramediana del techo refleja las condiciones concretas de cada experimento, y no la expresión basal de Fos.

La CLTd y el CS difieren también por sus *conexiones*. Como describimos en el capítulo 2, la principal diana de la CLTd es el complejo lateral del tálamo. Dos aspectos de esta proyección son particularmente reseñables: el primero de ellos es su elevada densidad, que no cabía de esperar de un núcleo tan estrecho como la CLTd, especialmente teniendo en cuenta el pequeño tamaño de nuestras zonas de inyección; y el segundo aspecto es el hecho de que la CLTd inerva con densidad similar tanto al LP como al LD. En esto la CLTd se distingue claramente del CS, cuyas proyecciones tectotalámicas inervan densamente al LP, pero no al LD. En nuestros propios experimentos, se marcaron muchas menos neuronas en el CS tras inyecciones de trazadores retrógrados en el LD que en los casos con inyecciones similares centradas en el LP (Fig. 38). Además, nuestros casos no publicados con inyecciones de BDA en las regiones del CS inmediatamente laterales a la CLTd ponen de manifiesto una proyección densa al LP, mientras que la proyección al LD parece muy débil, mucho más débil que la revelada por las inyecciones en la CLTd, que fueron mucho menores.

Otra diferencia entre las proyecciones tectotalámicas de la CLTd y las del CS puede estar relacionada con los neurotransmisores liberados en sus sinapsis. Los botones sinápticos marcados en el LP después de las inyecciones del trazador anterógrado PHA-L en el CS de la rata muestran las características

ultraestructurales que generalmente se asocian con la neurotransmisión excitatoria y son inmunorreactivos para el transportador vesicular de glutamato de tipo 2 (VGluT2), lo que ha llevado a sugerir que el VGluT2 se puede utilizar como un marcador específico de los axones del CS que inervan al LP ([Masterson y cols. 2009](#)). Esto es particularmente significativo dado que, según nuestros datos, tanto las neuronas de la CLTd de la rata como las de la CLTd del ratón carecen de VGluT2 (Figs. 18, 42). Dada la naturaleza probablemente GABAérgica de las neuronas de la CLTd, cabe esperar que sus botones sinápticos en el LP (y en el LD) sean muy diferentes de los botones coliculotalámicos.

Otra diferencia hodológica importante entre la CLTd y el CS es que la CLTd carece de las proyecciones descendentes, predominantemente cruzadas, que van a los centros troncoencefálicos y medulares implicados en el control de movimientos de los ojos, la cabeza, las orejas o el cuerpo, y que son características de las capas intermedias y profundas del CS (revisado por [May 2006](#)). En nuestros casos con inyecciones de BDA en la CLTd, la formación reticular pontina paramediana, que es el destino principal del fascículo predorsal descendente, está prácticamente desprovista de fibras marcadas. Esta observación es consistente con investigaciones previas con experimentos de trazado: la inyección de trazadores retrógrados en las regiones paramedianas de la formación reticular que reciben las proyecciones coliculares marcó abundantes neuronas del CS concentradas en el SAI contralateral, pero siempre a cierta distancia de la línea media, por lo que no se marcaron neuronas de la CLTd (por ejemplo, [Leichnetz y cols. 1989](#) [gato], ver sus figuras 4, 6 y 7; [Redgrave y cols. 1986](#) [rata], su figura 1; [Redgrave y cols. 1990](#) [rata], su figura 1; [Kim y cols. 1992](#) [rata], sus figuras 11 y 12; [May 2006](#) [gato, mono], su figura 13; [Jhou y cols. 2009](#) [rata], su figura 5Q-S; [Kaufling y cols. 2009](#) [rata] sus figuras 7 y 14J).

Todos estos argumentos sugieren que, al igual que la CLTv, la CLTd no es parte del CS. La organización de estas dos columnas paramedianas es claramente diferente de las capas horizontales alternantes de sustancia gris y blanca del CS. Por lo tanto, incluso si se considerara que la CLTd y la CLTv están anatómicamente "dentro" del CS, se debe tener en cuenta que en realidad no son parte del sistema horizontal en capas del CS, ni se ajustan al

patrón de mosaico de parches y módulos verticales de las capas intermedias del CS ([Chevalier y Maná 2000; Harting 2004](#)).

1.3. Tres columnas longitudinales en la región paramediana del techo de los mamíferos

El descubrimiento de la CLTd y la CLTv revela un nivel inesperado de organización longitudinal en la región paramediana del techo mesencefálico de los mamíferos. Esta región parece estar compuesta por tres columnas longitudinales paralelas: la CLTd, la CLTv y la columna dorsomedial de la sustancia gris periacueductal (SGPAdm), ordenadas de dorsal a ventral. Si bien estas tres columnas difieren notablemente en su citoarquitectura, su relación con las comisuras tectales, sus conexiones y sus propiedades electrofisiológicas, pueden estar relacionadas de algún otro modo. Por ejemplo, muchas neuronas de la SGPAdm poseen dendritas que se extienden dorsalmente hasta penetrar en la CLTv ([Mantyh 1982; Beitz y Shepard 1985; Herrera y cols. 1988](#)). De manera similar, las dendritas de muchas neuronas de la CLTv se extienden dorsal o ventralmente más allá de los límites del núcleo, introduciéndose en la CLTd o la SGPAdm ([Herrera y cols. 1988; Saldaña y cols. 2007](#)). Por último, la CLTd contiene neuronas cuyas dendritas entran en la CLTv (nuestras observaciones no publicadas). Esta intrigante disposición suscita preguntas interesantes sobre si las tres columnas están emparentadas ontogenéticamente o comparten información aferente. Esta última posibilidad se ve apoyada por algunos de nuestros datos. Como comentamos en el Capítulo 2, la porción medial de la zona incerta de la rata inerva a la región tectal paramediana formando un campo terminal que se extiende sin solución de continuidad por la CLTd, la CLTv y la SGPAdm. Algo parecido sucede con las proyecciones de las diversas áreas de la corteza prefrontal medial del gato ([Room y cols. 1985, ver su figura 3K-N; Harting y cols. 1992, su figura 17](#)). En este contexto, es razonable plantearse hasta qué punto las tres columnas longitudinales tectales paramedianas participan de manera coordinada en las mismas funciones.

2. ¿Cuál es el papel de la CLTd?

A pesar de la escasa información disponible sobre la CLTd, nuestros resultados proporcionan el marco conceptual idóneo para futuros estudios. El hecho de que la CLTd se encuentre en especies tan diferentes como roedores, lagomorfos, carnívoros y primates sugiere que puede ser común a todos los mamíferos terrestres, o incluso a toda la clase de los mamíferos. La función de la CLTd es, por lo tanto, probablemente compartida por una gran variedad de animales, y se puede extender para incluir vertebrados no mamíferos. Por ejemplo, debido a su ubicación y orientación longitudinal tectal, el prominente torus longitudinalis del cerebro de los peces (por ejemplo, [Folgueira y cols. 2007](#)) se asemeja a las columnas paramedianas del techo de los mamíferos.

2.1. La CLTd como una fuente extratalámica de inhibición para el tálamo lateral

Para empezar a comprender la función de la CLTd, podemos partir del hecho de que sus neuronas son muy probablemente GABAérgicas y envían sus axones al LP y el LD, dos núcleos talámicos de orden superior comúnmente incluidos en el sistema visual. En el LP de la rata, los botones terminales GABAérgicos representan el 10-20% de todos los botones sinápticos ([Çavdar y cols. 2011](#)). La principal fuente de la inervación GABAérgica del tálamo es el núcleo reticular del tálamo (por ejemplo, [Wang y cols 2001](#) [gato]; [Wanaverbecq y cols. 2008](#) [rata]). Las interneuronas GABAérgicas locales es poco probable que representan un porcentaje significativo de los terminales GABAérgicos porque el tálamo de la rata prácticamente carece de neuronas GABAérgicas ([Arcelli y cols. 1997](#)). En los últimos años se han identificado otras fuentes de proyecciones GABAérgicas a núcleos talámicos de orden superior. En la rata, la zona incerta envía proyecciones GABAérgicas muy repartidas por varios núcleos talámicos de orden superior, pero curiosamente esas proyecciones parecen evitar en buena medida al LP y al LD ([Barthó y cols. 2002](#)). Estos dos núcleos sí son inervados por neuronas GABAérgicas del núcleo pretectal anterior ([Bokor y cols. 2005](#); para datos similares en el gato, ver [Baldauf y cols. 2005](#)), cuyos axones forman grandes botones que establecen múltiples sinapsis con sus neuronas postsinápticas ([Bokor y cols 2005](#);

(Wanaverbecq y cols. 2008). Aunque aún no se ha estudiado la ultraestructura de las sinapsis que se establecen entre los botones de los axones de la CLTd y las neuronas del LP y el LD, los datos de nuestros experimentos de trazado sugieren que los botones de la CLTd son más pequeños que los del núcleo pretectal anterior, y pueden parecerse más a los botones de la proyección del núcleo reticular del tálamo, que son también pequeños y establecen una sola sinapsis con sus destinos (Wanaverbecq y cols. 2008). Comparando la proyección GABAérgica talámica del núcleo pretectal anterior con la de la CLTd, se aprecian dos diferencias más: en primer lugar, mientras que no todas las neuronas del núcleo pretectal anterior que inervan al tálamo son GABAérgicas, la CLTd aparentemente consta de una población pura de neuronas GABAérgicas tectotalámicas; y en segundo lugar, el núcleo pretectal anterior parece ejercer un efecto generalizado sobre múltiples núcleos talámicos, mientras que las proyecciones de la CLTd inervan de modo predominante al complejo lateral del tálamo. Por lo tanto, la CLTd puede ser una estructura singular, ya que constituye *el único núcleo conocido hasta ahora compuesto por neuronas GABAérgicas dedicadas a proporcionar una inhibición masiva a núcleos talámicos de orden superior de una modalidad sensorial específica*.

2.2 Significado biológico de la CLTd

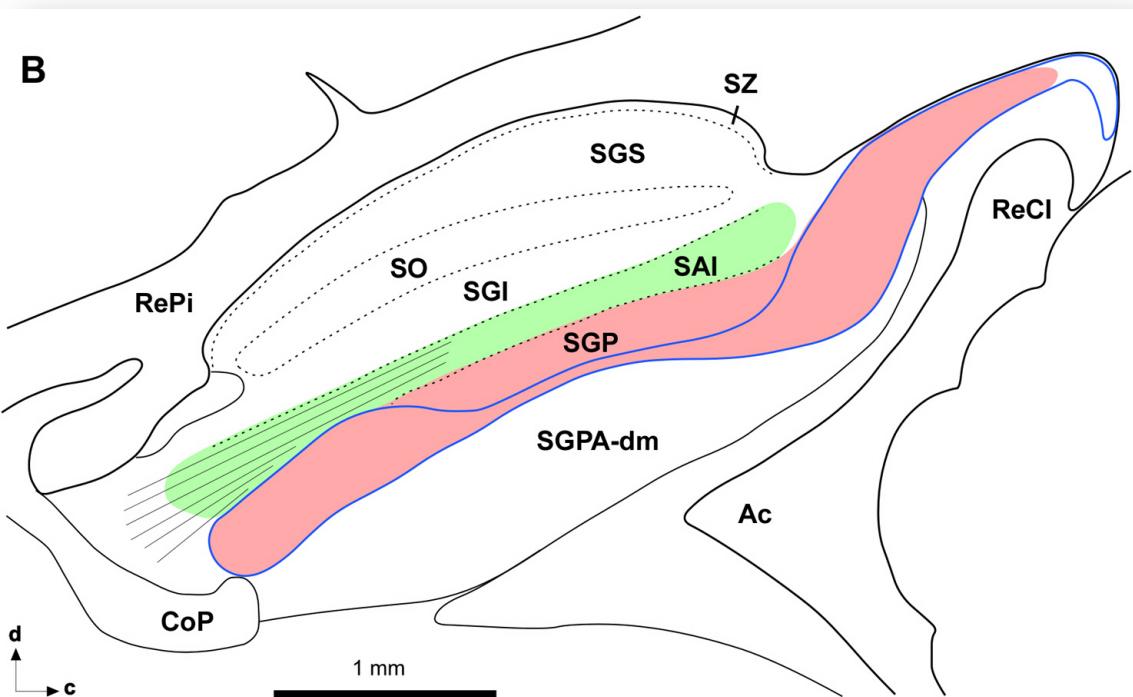
Podemos averiguar más sobre la función de la CLTd teniendo en cuenta sus principales conexiones nerviosas, desveladas en este estudio. En la rata, la CLTd es inervada principalmente por el núcleo pretectal medial (MPT), el área visual secundaria mediomedial (V2MM) y las cortezas retroespleniales, y envía proyecciones densas para el complejo lateral del tálamo (LP y LD). Muchas de estas estructuras están muy interconectadas (por ejemplo, Thompson y Robertson 1987; Shibata 2000; Van Groen y Wyss 2003; Kamishina y cols. 2009). En la rata, las cortezas retroespleniales y el LD contienen neuronas sensibles a la dirección de la cabeza, esenciales para la navegación espacial (ver revisión de Taube 2007), y se ha relacionado a estos núcleos con tareas de aprendizaje y de memoria con un componente visual (Mizumori y cols. 1994; Van Groen y cols. 2002; Vann y cols. 2009; Yoder y cols. 2011). Además, recientemente se ha demostrado que el área V2MM desempeña un papel crítico para la memoria de reconocimiento de objetos (López-Aranda y cols. 2009), y que su desarrollo se ve favorecido por la exposición a imágenes en movimiento (Sun y cols.

2009). Estos datos, unidos a otras proyecciones menores de la CLTd que terminan en el cuerpo geniculado ventrolateral, la lámina intergeniculada y los núcleos suprageniculado y limitante posterior del tálamo, descritas en este Trabajo, sugieren que la función del núcleo está relacionada con el procesamiento de aspectos de los estímulos visuales hasta ahora desconocidos. Curiosamente, en su estudio de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la CLTv, Marshall y cols. (2008) resaltaron que las neuronas de la CLTd no respondieron ni al sonido, ni a la luz. Es posible, sin embargo, que los estímulos visuales utilizados por estos autores (una linterna o un puntero láser estáticos en una cámara de registro insonorizada y a oscuras) fueran inadecuados para desencadenar la actividad de las neuronas de la CLTd. Serán necesarias nuevas investigaciones sistemáticas de las respuestas de las neuronas de la CLTd a estímulos visuales diversos antes de que podamos entender el significado biológico del núcleo. También sería interesante investigar en qué medida la inervación GABAérgicas de la CLTd participa en el procesamiento de la información somatosensorial que llevan a cabo las neuronas del LD (Bezdudnaya y Keller 2008).

La CLTd inerva también al núcleo reuniens del tálamo, que es la principal fuente talámica de inervación para el hipocampo y la formación parahipocampal (Herkenham 1978; Otake y Yamada 1989; Wouterlood y cols. 1990; Wouterlood 1991; Bokor y cols. 2002). El núcleo reuniens recibe a su vez proyecciones masivas de la corteza prefrontal medial (Room y cols. 1985; Sesack y cols. 1989; Takagishi y Chiba 1991; Buchanan y cols. 1994; McKenna y Vertes 2004; Vertes 2004), que, como demuestran nuestros resultados, inerva también a la CLTd. Por lo tanto, la corteza prefrontal puede ejercer su efecto sobre el núcleo reuniens por dos mecanismos: a través de la proyección corticotálmica directa, que es excitadora, y a través de la CLTd, cuyas neuronas inhiben al núcleo reuniens. Risold y Swanson (1995) han demostrado que el núcleo reuniens inerva también al área V2MM, conectada a su vez con el CS, y esto les ha llevado a proponer que el núcleo reuniens influye en los movimientos de orientación de la cabeza y los ojos relacionados con los estímulos olfativos. A la vista de nuestros resultados, será interesante investigar hasta qué punto esta función es mediada por la CLTd, y no por el CS.

La CLTd aparece como un inesperado y prometedor objeto de estudio para futuras investigaciones de la modulación de la actividad tálámica y de la

función visual de los mamíferos. El conocimiento sobre el núcleo es todavía rudimentario, pero con las tecnologías disponibles en la actualidad y las que vayan surgiendo, los neurocientíficos deberíamos ser capaces de lograr en pocos años lo que para otros núcleos del cerebro costó muchas décadas descubrir. Los resultados anatómicos recogidos en esta Tesis deberían servir de ayuda para diseñar nuevas investigaciones.



CONCLUSIONES

PRIMERA

La columna longitudinal tectal dorsal, estructura cerebral previamente desconocida, es un núcleo largo y estrecho, aproximadamente cilíndrico, que recorre longitudinalmente el techo mesencefálico inmediatamente por encima de la columna longitudinal tectal ventral y muy próximo a la línea media. Su extensión rostrocaudal coincide con la del colículo superior.

SEGUNDA

La columna longitudinal tectal dorsal se reconoce por sus características citoarquitectónicas —la pequeñez, la homogeneidad y el elevado empaquetamiento de sus neuronas— en mamíferos tan variados como roedores, lagomorfos, carnívoros y primates, incluido el hombre. Este hecho, unido al considerable tamaño del núcleo en todas las especies estudiadas, sugiere que se trata de una estructura común a la mayoría de los mamíferos, si no a todos ellos, y que podría estar presente incluso en vertebrados inferiores.

TERCERA

Además de por su citoarquitectura, la columna longitudinal tectal dorsal de la rata difiere de las estructuras neurales que la rodean por su mieloarquitectura, por sus propiedades neuroquímicas, por sus conexiones nerviosas y porque en muchas de sus neuronas se expresa la proteína Fos en condiciones basales.

CUARTA

La columna longitudinal tectal dorsal de la rata y el ratón está integrada por una población prácticamente pura de neuronas GABAérgicas y, por tanto, inhibidoras.

QUINTA

La columna longitudinal tectal dorsal de la rata es inervada sobre todo por el núcleo pretectal medial, por el área cortical visual secundaria mediomedial (V2MM) y por las cortezas retroespleniales granulares y disgranular. Recibe también proyecciones de la zona incerta y de diversas áreas de la corteza prefrontal medial.

SEXTA

El destino principal de las proyecciones de la columna longitudinal tectal dorsal es el complejo lateral del tálamo, compuesto por los núcleos lateral posterior y laterodorsal, dos núcleos talámicos de orden superior comúnmente incluidos en el sistema visual. La columna longitudinal tectal dorsal es una estructura singular, ya que constituye el único núcleo conocido hasta ahora compuesto por neuronas GABAérgicas dedicadas a proporcionar una inhibición masiva a núcleos talámicos de orden superior de una modalidad sensorial específica.

SÉPTIMA

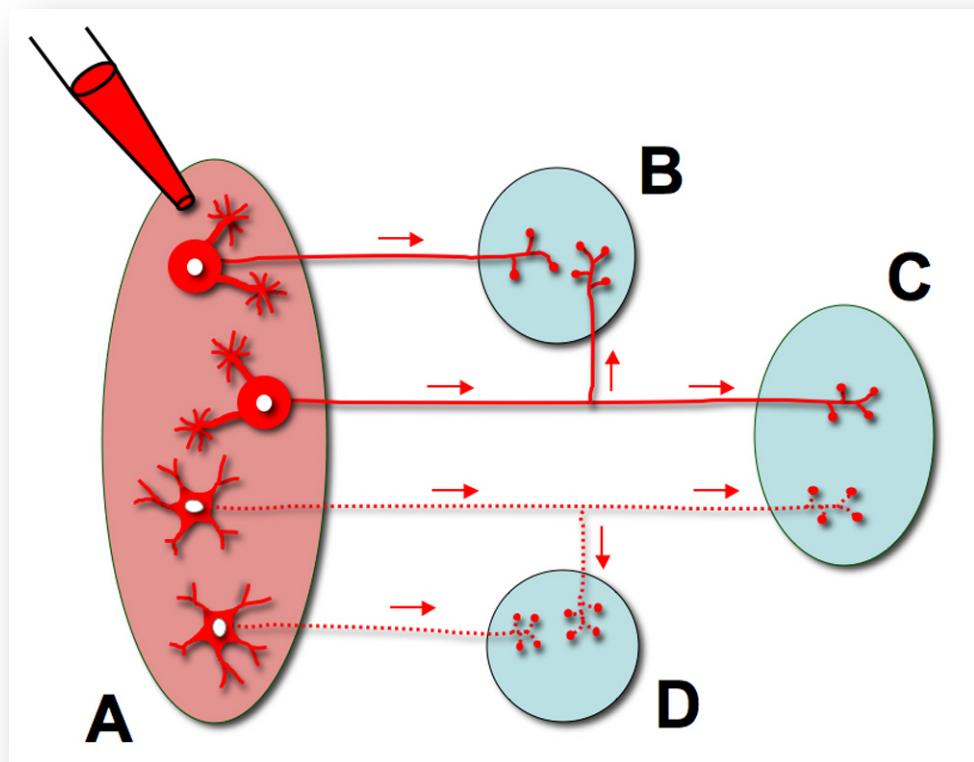
La columna longitudinal tectal dorsal inerva de manera nítida al núcleo epilemniscal, un conjunto de neuronas bien definido y virtualmente desconocido, situado en la calota mesencefálica encima del lemnisco medial y por fuera del núcleo rojo. También inerva al cuerpo geniculado ventrolateral, la lámina intergeniculada y los núcleos suprageniculado, limitante posterior y reuniens del tálamo.

OCTAVA

Muchas de las estructuras que inervan a la columna longitudinal tectal dorsal, o que reciben proyecciones de ella, intervienen en la navegación espacial y en tareas de aprendizaje y memoria con un componente visual, lo que sugiere que la función de nuestro núcleo está relacionada con el procesamiento de aspectos de los estímulos visuales aún no identificados.

NOVENA

La región paramediana del techo mesencefálico de los mamíferos está compuesta por 3 columnas longitudinales paralelas: la columna longitudinal tectal dorsal, la columna longitudinal tectal ventral y la columna dorsomedial de la sustancia gris periacueductal. Aunque cada una de ellas posee características propias, las tres pueden estar relacionadas ontogenéticamente, compartir información aferente y desarrollar funciones coordinadas.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales experimentales

En este Trabajo hemos llevado a cabo una caracterización exhaustiva de la CLTd de la rata (*Rattus norvegicus*). Los ejemplares usados fueron hembras albinas jóvenes (190-250 g) de la cepa Wistar, obtenidas del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. A todos estos animales los tratamos de acuerdo con las normas nacionales e internacionales que regulaban en aquel momento el uso de animales para experimentación y otros fines científicos (Directriz Comunitaria 86/609/CEE, aprobada el 24 de noviembre de 1986, y adecuada a la legislación española a través del RD 1201/2005 de 10 de octubre, publicado en el BOE del 21). En los experimentos, seguimos protocolos previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y extremamos en todo momento el cuidado en su diseño y ejecución con el fin de disminuir el número de animales usados. La Tabla 3 especifica el número de ratas utilizadas para cada una de las técnicas aplicadas.

Para el estudio de la anatomía comparada de la CLTd, empleamos además el encéfalo de dos o más individuos adultos de las siguientes especies: ratón (*Mus musculus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), gato (*Felis catus*), mono de Java (*Macaca fascicularis*) y hombre (*Homo sapiens sapiens*). Los ratones y los conejos los obtuvimos del Servicio de Experimentación Animal, y los gatos, del ya desaparecido Centro de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad de Salamanca. Las series de secciones del mesencéfalo del mono teñidas con tiorina fueron proporcionadas por los Drs. Francisco Javier Cervera-Paz y Manuel Manrique, del Servicio de Otorrinolaringología de la Clínica Universitaria de Navarra. Los mesencéfalos humanos procedieron del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, y llegaron a nosotros a través del banco de cerebros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Se trata de los encéfalos de tres varones que fallecieron a los 40 (caso 04-00029), 61 (caso 04-00001) y 70 (caso 04-00012) años de edad como consecuencia de enfermedades no neurológicas. El paciente 04-00012 falleció por un síndrome mielodisplásico tras un trasplante de médula ósea y el estudio anatopatológico del cerebro reveló lesiones hemorrágicas puntiformes milimétricas, así como pequeñas lesiones amarillentas blandas y de borde hiperémico, que corresponden a focos de infarto cerebral. Aunque estas lesiones se encontraron repartidas por todo el encéfalo, no afectaron a la CLTd ni a sus áreas próximas. No se hallaron lesiones macroscópicas ni microscópicas en el encéfalo de los otros dos pacientes, cuya muerte se debió a un fallo multiorgánico con hemólisis aguda en un caso, y a sepsis micótica generalizada en el otro.

Especie	Técnica aplicada	Nº de casos
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	Nissl: violeta de cresilo (C)	3
	Nissl: violeta de cresilo (P)	2
	Giemsia (C)	3
	Giemsia (P)	2
	Azul de toluidina	2
	Mielina (OsO ₄)	2
	Mielina (secciones frescas)	2
	Hbridación <i>in situ</i> para transportadores vesiculares de aminoácidos	3
	Inmunotinción para la proteína Fos	4
	Inyección de BDA en el CS	6
	Inyección de BDA en la CLTd	7
	Inyección de FluoroGold en el tálamo lateral	15
Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Nissl: violeta de cresilo (C)	4
	Giemsia (C)	1
	Hbridación <i>in situ</i> para transportadores vesiculares de aminoácidos	3
Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Nissl: violeta de cresilo (C)	1
	Giemsia (C)	1
Gato (<i>Felis catus</i>)	Nissl: violeta de cresilo (C)	2
	Giemsia (C)	1
Mono (<i>Macaca fascicularis</i>)	Nissl: tionina (C)	5
Humano (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	Nissl: violeta de cresilo (C)	04178 (04-00001 Hospital)
		04181 (04-00012 Hospital)
	Giemsia (C)	05037 (04-00029 Hospital)

Tabla 3. Casos empleados en nuestro estudio, con indicación del método de tinción aplicado en cada uno de ellos. Se especifica también si las secciones teñidas con los métodos de Nissl y Giemsia se obtuvieron por congelación (C) o tras inclusión en parafina (P).

Los experimentos de hibridación *in situ* para estudiar la expresión de transportadores vesiculares de aminoácidos en el techo mesencefálico de la rata y el ratón fueron llevado a cabo por los Drs. Douglas L. Oliver y Tetsufumi Ito en la Universidad de Connecticut, en Farmington (Connecticut, EE.UU.).

La Tabla 3 refleja el número de especímenes analizados de cada especie y los métodos de tinción con los que se trataron.

2. Estudio citoarquitectónico

2.1. Fijación y tallado de los cerebros

2.1.1. Procesamiento de los cerebros de rata, ratón, conejo y gato

Anestesiamos los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso) administrada por vía intraperitoneal. Una vez que comprobamos por la abolición de los reflejos motores y corneales que los animales estaban profundamente anestesiados, comenzamos la perfusión transcardíaca. Inicialmente lavamos el árbol vascular con una variante de la solución Ringer sin calcio (NaCl al 0,85 %, KCl al 0,025 % y NaHCO₃ al 0,02 %), a 37 °C y cuyo pH se ajustó inmediatamente antes de su uso a 6,9 gaseándolo con una mezcla de CO₂ al 95 % y O₂ al 5 %. A continuación perfundimos el fijador a temperatura ambiente. En los casos en los que el encéfalo iba a ser seccionado por congelación o con el Vibratomo, el fijador consistió en una mezcla de glutaraldehído al 2,5 % y formaldehído al 2 % (preparado a partir de formol comercial al 40 %) en tampón de fosfato sódico (PB) 0,096 M a pH 7,4. Si el encéfalo iba a ser incluido en parafina, el fijador contuvo únicamente formaldehído al 4 % (preparado a partir de formol comercial al 40 %) en suero salino.

Una vez perfundidos los animales, los dejamos en reposo de 4 a 6 h en la nevera antes de disecar los cerebros. Tras ese período extrajimos el cerebro de la cavidad craneana y lo limpiamos cuidadosamente. Para tallar los cerebros de rata y ratón, utilizamos un molde adecuado para esta operación (Activational Systems, Inc., —en la actualidad, Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, Indiana, EE.UU.—). Los cerebros de conejo y de gato se tallaron de modo similar a los anteriores, pero sin molde. La mayor parte de los casos fueron cortados coronalmente, si bien algunos de los encéfalos de rata los seccionamos horizontal o parasagitalmente. A todos los encéfalos que se iban a cortar en el plano coronal les clavamos longitudinalmente una aguja en el lado izquierdo de la calota cerebral, con el fin de poder distinguir los dos lados del encéfalo a la hora de montar las secciones.

Para obtener secciones por congelación, crioprotegimos los cerebros tallados en una solución de sacarosa al 30 % en PB 0,1 M, a 4 °C y bajo agitación suave durante 3-6 días. Posteriormente los cortamos con un microtomo de deslizamiento (modelo HM 400 de Microm, Heidelberg, Alemania) para obtener secciones de 40 µm de grosor. Los cortes de rata y ratón los recogimos en dos series paralelas, y los de gato y conejo, en ocho. A medida que obtuvimos los cortes, los montamos directamente sobre portas tratados con una solución de gelatina y alumbre de cromo.

Tras la fijación por perfusión, los cerebros que iban a ser incluidos en parafina permanecieron en fijador en la nevera durante una noche. Tallamos los encéfalos de la manera adecuada para obtener cortes coronales u horizontales. Después, realizamos la deshidratación de los bloques en un gradiente creciente de etanoles y la inclusión según el protocolo siguiente:

Etanol al 50 %	15 min
Etanol al 70 %	30 min
Etanol al 80 %	30 min
Etanol al 90 %	30 min
Etanol al 100 %	3 x 60 min
Xileno	15 min
Xileno	2 x 5 min
Parafina (60 °C)	12–16 h

Finalmente, preparamos un bloque de parafina orientando el encéfalo según el plano de corte elegido y dejando que se solidificara la parafina a temperatura ambiente. De él obtuvimos cortes seriados del encéfalo de 15 µm de grosor con un microtomo rotatorio automático (modelo HM 350 de Microm). Pasamos los cortes a un baño María con una solución de gelatina y alumbre de cromo a 45-50 °C y los montamos sobre portas gelatinadas.

Una vez disecados y tallados, los encéfalos que iban a ser teñidos con azul de toluidina permanecieron una noche en fijador a 4 °C. Luego se seccionaron en el plano coronal con un Vibratomo (modelo VT 1000S de Leica; Nussloch, Alemania) para obtener cortes de 60 u 80 µm de grosor, que se recogieron en PB 0,1M en tres pocillos colocados sobre un lecho de hielo. Estas secciones fueron postfijadas del siguiente modo (siempre en frío):

Lavado en PB 0,1 M	3 x 10 min
Fijación con OsO ₄ al 1 % en PB 0,1 M	90 min
Lavado en PB 0,1 M	2 x 30 min
Fijación con acetato de uranilo al 1 % en H ₂ O (d) en la oscuridad	1 h
Lavado en H ₂ O (d)	2 x 10 min

A continuación, deshidratamos las secciones postfijadas y las incluimos en resina Durcupan®, (Fluka, Fusch, Suiza) siguiendo este protocolo:

Etanol al 50 %	10 min
Etanol al 70 %	10 min
Etanol al 90 %	10 min
Etanol al 96 %	10 min
Etanol al 100 %	2 x 30 min
Oxido de propileno	2 x 15 min
Oxido de propileno + resina (3:1)	30 min
Oxido de propileno + resina (1:1)	30 min
Oxido de propileno + resina (1:3)	30 min
Resina pura (Durcupan®)	Una noche

La deshidratación tuvo lugar a baja temperatura, y la inclusión a temperatura ambiente. La resina se preparó mezclando sus diferentes componentes según esta proporción: 50 ml de A + 50 ml de B + 0,75 ml de C y 2 ml de D.

Al día siguiente se realizó la inclusión en plano de las secciones. Estas se sacaron de los pocillos que contenían la resina pura, se ordenaron y, prensadas entre dos láminas de plástico Aclar, se introdujeron en una estufa a 60 °C durante 48 h, tiempo suficiente para que polimerizara la resina. De estas secciones incluidas se tallaron fragmentos del techo del mesencéfalo que contenían la CLTd y se reincluyeron en bloques de la misma resina adecuados para ser cortados. Se obtuvieron secciones con un ultramicrotomo (modelo Ultracut UCT de Leica) de 1 µm de espesor, que se recogieron en portas individualmente.

2.1.2. Procesamiento de los cerebros de mono de Java

Se anestesiaron los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico (0,5 g/kg de peso) por vía intraperitoneal. Cuando se comprobó que el animal estaba profundamente anestesiado, se lavó el árbol vascular con una solución salina isotónica seguida de dos soluciones de fijador. La primera contuvo formaldehído al 1 % (preparado a partir de paraformaldehído recién despolimerizado) en PB 0,1 M, a pH 7,4 y a temperatura ambiente, y se perfundió a un ritmo de 200 ml/min durante 2 min. A continuación, se pasó una solución fría de formaldehído al 4 % en el mismo tampón, a razón de 200 ml/min durante 10 min, tras los cuales se disminuyó la velocidad de perfusión a 100 ml/min y se mantuvo así durante 50 min. La perfusión terminó con la administración de una solución de sacarosa al 5 % en el mismo tampón, a un ritmo de 100 ml/min durante 20 min. Después se disecó cuidadosamente el encéfalo, que fue sumergido en una solución crioprotectora de glicerol al 10 % y dimetilsulfóxido (DMSO) al 2 % en PB. Tras 24 horas a 4 °C, se transfirió el

cerebro a una solución tamponada de glicerol al 20 % y DMSO al 2%, en la que permaneció a 4 °C hasta que fue cortado días más tarde.

Como estos encéfalos no fueron procesados para estudiar el techo del mesencéfalo, en ellos se separó el tronco del encéfalo del resto mediante un corte a la altura del CS. En consecuencia, en todas las series analizadas falta la porción rostral del CS y, por lo tanto, buena parte de la porción rostral de la CLTd. De todos los animales se obtuvieron secciones de 60 µm de espesor en el plano coronal. La distancia entre las secciones teñidas con el método de Nissl fue de 240 µm.

2.1.3. Procesamiento de los cerebros humanos

Durante el estudio necrópsico, se trajeron los cerebros de la cavidad craneana y se sumergieron inmediatamente en una solución tamponada de formaldehído al 4 % (preparado a partir de formol comercial al 40 %), en la que permanecieron durante un tiempo mínimo de 4 semanas. Desconocemos el tiempo exacto que transcurrió entre el momento de la muerte y el comienzo de la inmersión en fijador, pero en ningún caso superó las 12 h.

Una vez fijado el encéfalo, tallamos el mesencéfalo y lo transferimos a una solución de sacarosa al 30 % en PB 0,1 M, en la que permaneció a 4 °C y bajo agitación suave durante 15 días. Posteriormente obtuvimos por congelación secciones de 40 µm en un plano perpendicular al eje del mesencéfalo y las recogimos en PB 0,1 M formando 8 series paralelas. Las secciones de dos de estas series se montaron directamente sobre portas gelatinados a medida que se obtuvieron con el microtomo.

2.2. Tinción

2.2.1. Tinción con violeta de cresilo

En nuestros experimentos usamos un protocolo de tinción inspirado en el descrito en la cuarta edición del atlas del cerebro de la rata publicado por Paxinos y Watson (1998). La receta para preparar la solución de colorante al 0,5 % fue la siguiente:

Acetato de violeta de cresilo (producto C1791-5G, Sigma, San Luis, EE.UU.)	2,5 g
Acetato de sodio 1 M (13,6 g de NaC ₂ H ₃ O ₂ ·2H ₂ O en 92 ml H ₂ O)	30 ml
Ácido acético 1 M (28,95 ml de ácido acético glacial en 500 ml H ₂ O)	170 ml
H ₂ O (d)	300 ml

En ocasiones usamos el violeta de cresilo al 0,25 % con resultados similares a los de la solución más concentrada. En todos los casos, tras preparar la solución, la agitamos continuamente durante al menos 7 días y antes de usarla la filtramos con filtros de acetato de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro (con el papel de filtro normal queda retenida una cantidad excesiva de colorante). Para lograr una coloración uniforme de las secciones, la tinción se realizó bajo agitación continua y en una cubeta con un volumen elevado de colorante (como mínimo 500 ml). La tinción se llevó a cabo a temperatura ambiente siguiendo este protocolo:

Xileno	2 x 5 min
Etanol al 100 %	2 x 5 min
Etanol al 90 %	5 min
Etanol al 70 %	5 min
H ₂ O (d)	30 s
Violeta de cresilo (0,5 %)	Tiempo según la especie
H ₂ O (d)	3 min
Etanol al 70 %	3 min
Etanol al 90 % con un 1 % de ácido acético glacial	3 min
Etanol al 95 %	3 min
Etanol al 100 %	3 min
Cloroformo	3 min
Etanol al 100 %	3 min
Xileno	2 x 5 min
Entellan®	

En ocasiones, repetimos el ciclo de diferenciación pasando las secciones del último etanol absoluto al etanol al 90 % con ácido acético.

Desde un principio observamos que, aun cuando hubieran sido procesados de modo similar, los encéfalos de especies distintas presentaban propiedades tintoriales diferentes. Por ello, tuvimos que ajustar los tiempos adecuados para cada especie, que aparecen recogidos en la siguiente tabla.

Especie	Tiempo óptimo de tinción
Rata (congelación)	14–24 min
Rata (parafina)	6–8 min
Ratón	14–20 min
Gato	12 min
Conejo	10–28 min
Hombre	8–12 min

2.2.2. Tinción con tionina del cerebro de mono

La tinción con tionina se realizó a las 24 horas de haber montado las secciones sobre portaobjetos gelatinados. Se realizó con la ayuda de un instrumento de tinción automático VaristainTM XY (Shandon, Cheshire, Inglaterra). El protocolo al que se sometieron las preparaciones fue el siguiente:

Cloroformo y etanol (1:1)	60 min
Etanol al 100 %	2 x 5 min
Etanol al 90 %	5 min
Etanol al 70 %	5 min
H ₂ O (d)	2 x 5 min
Tinción con tionina (1 %)	2 min
H ₂ O (d)	2 x 4 min
Etanol al 70 %	3 min
Etanol al 96 %	3 min
Etanol al 100 %	3 min
Xileno	2 x 5 min
DePeX®	

2.2.3. Tinción con el método de Giemsa

Para esta técnica hemos seguido las indicaciones dadas por [Íñiguez y cols. \(1985\)](#). La receta para preparar el colorante es la siguiente:

Fosfato de potasio dibásico (KH ₂ PO ₄) 0,067 M (9,07 g/l)	90 ml
Giemsa (Sigma-Aldrich, ref. GS-500)	10 ml

El pH de esta solución es de 4,5. No es necesario filtrarla antes de usarla, pero sí conviene emplearla el mismo día que se ha preparado. Seguimos este protocolo:

H ₂ O (d)	10 s
Etanol al 70 %	20 s
H ₂ O (d)	10 s
KH ₂ PO ₄ 0,067 M a 60 °C	5 min
Tinción con Giemsa a 60 °C, en agitación	Tiempo según la especie
KH ₂ PO ₄ 0,067 M	3 x 5 min
Etanol al 70 %	3 min
Etanol al 90 %	3 min
Etanol al 100 %	2 x 5 min
Xileno	2 x 5 min
DePeX®	

El tiempo óptimo de tinción para cada especie, determinado empíricamente fue:

Especie	Tiempo óptimo de tinción
Rata	15 min
Rata (parafina)	90 min
Ratón	13 min
Gato	8 h
Conejo	13 - 18 min
Hombre	24-28 h

Por último, cubrimos las secciones con DePeX® (con Entellan® se desvanecen antes los colores).

2.2.4. Tinción con azul de toluidina

Teñimos las secciones porta por porta con una solución de azul de toluidina al 1 % en tetraborato de sodio al 1 %. Para ello, colocamos los portas sobre una placa caliente (80-90 °C) y dejamos caer una gota de colorante sobre la sección. Transcurrido 1 min, lavamos las secciones con abundante agua corriente. La temperatura con la que obtuvimos una tinción más brillante y una metacromasia más clara fue de 89 °C. Finalmente, dejamos secar las secciones al aire y las cubrimos con DePeX®.

2.2.5. Tinción para fibras mielínicas con tetróxido de osmio

Para obtener una tinción selectiva de las fibras mielínicas, utilizamos secciones de 60-80 µm de espesor obtenidas siguiendo los procedimientos de fijación y corte descritos más arriba para las secciones teñidas con azul de toluidina (sección 2.1.1). La postfijación en tetróxido de osmio y el contraste con acetato de uranilo fueron similares a los ya mencionados, con una excepción notable: añadimos sacarosa al 5% a la solución de tetróxido de osmio. Esta modificación disminuye la tinción de fondo de las secciones, de manera que aumenta el contraste de las fibras teñidas.

Después de la tinción de las secciones flotantes en acetato de uranilo, las deshidratamos con etanol y las aclaramos con xileno manualmente una por una, las colocamos sobre sendos portaobjetos y las cubrimos con Entellan®.

3. Hibridación *in situ*

La descripción de la distribución de los transportadores vesiculares de glutamato (VGluT1 y VGluT2) y del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT) en la región paramediana del techo del mesencéfalo se basó en los mismos casos experimentales utilizados para describir la distribución de estos mismos transportadores vesiculares en las regiones auditivas subcorticales publicado por [Ito y cols. \(2011\)](#). En este apartado resumimos los aspectos fundamentales del método utilizado; los detalles técnicos adicionales pueden consultarse en la publicación original.

Se emplearon ratas Long-Evans y ratones Swiss-Webster que, profundamente anestesiados siguiendo los protocolos adecuados, se perfundieron por vía trascardiaca con una solución de formaldehído al 4% (preparado a partir de paraformaldehído recién despolarizado) en PB 0,1 M. Después de crioprotTEGER los cerebros con dietilpirocarbonato (DEPC) con sacarosa al 30% en PB durante 2 días, se obtuvieron secciones coronales con un microtomo de congelación a 40 µm de espesor en el caso de las ratas, y a 30 µm en el caso de los ratones.

Para la hibridación, se usaron ribosondas sentido y ribosondas antisentido marcadas con digoxigenina y elaboradas a partir del ADNc murino que codifica la síntesis del VGluT1 (núcleotidos 152-1085, número de acceso al GenBank NM_182993.2), del VGluT2 (núcleotidos 848-2044, número de acceso al GenBank NM_080853.2), o del VIAAT (núcleotidos 620-1599, número de acceso al GenBank). En las secciones tratadas con las sondas sentido no se observó tinción alguna. Después de numerosos lavados, las secciones se acetilaron y posteriormente se incubaron durante 1 h en el tampón previo a la hibridación, y luego en las sondas sentido o antisentido, durante 20 h a 70 °C. A continuación, se lavaron nuevamente, se trajeron con ARNasa A, se incubaron en agente bloqueante y por último se incubaron durante toda la noche con la fracción Fab de un anticuerpo de oveja contra digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. Seguidamente, la fosfatasa unida a la sonda se reveló con una reacción histoquímica usando como cromógeno cloruro de azul de nitrotetrazolio y sal fosfatada de toluidina de 5-bromo-4-chloro-3-indoliltoluidina, en presencia de MgCl₂. Para terminar, las secciones se montaron, deshidrataron, aclararon y cubrieron.

4. Detección immunocitoquímica de la proteína Fos

Para estudiar la expresión basal de la proteína Fos, colocamos cada rata individualmente durante 48 horas en una jaula situada en el interior de una cámara anecoica, con acceso ilimitado a comida y agua. La cámara se mantuvo en completa oscuridad y en silencio, de modo que los únicos sonidos percibidos por el animal fueron los generados por él mismo. Tras el período de aislamiento, anestesiamos inmediatamente las ratas con una sobredosis de pentobarbital sódico (120mg/kg) inyectada intraperitonealmente y las perfundimos con suero de lavado y fijador a base de aldehídos, siguiendo los procedimientos descritos más arriba. Con el objeto de minimizar las variaciones en la expresión de Fos debidas al ritmo circadiano, todos los animales del estudio fueron sacrificados entre las 10 de la mañana y las 12 del mediodía.

Tras la disección y crioprotección del cerebro, obtuvimos por congelación secciones de 40 µm, que lavamos abundantemente en tampón Tris-Tx (Tris [Trizma base, Sigma., San Luis, Missouri, EE.UU.; 0,05 M] con un 0,5 % de detergente Tritón X-100 [Merck, Darmstadt, Alemania]). A continuación las incubamos primero durante 24 h en un antisuero políclonal de conejo contra la proteína Fos (antisuero sc-52 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EE.UU.; dilución 1:2500 en Tris-Tx), y después durante 2 h en un antisuero biotinado de cabra contra IgG de conejo (Vector; dilución 1:50 en Tris-Tx). Seguidamente, las incubamos durante 2 h en un complejo de avidina, biotina y peroxidasa (ABC, Vectastain; Vector Labs., Burlingame, California, EE.UU.) preparado en Tris-Tx siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente lavamos las secciones en Tris-Tx y luego en tampón Tris 0,05 M (sin detergente) y revelamos la peroxidasa asociada al trazador mediante una sencilla reacción histoquímica. La mayor parte de las secciones las teñimos durante 5 ó 10 minutos en una solución de diaminobenzidina (DAB) al 0,05%, sulfato de níquel y amonio al 0,4% y H₂O₂ al 0,0005 % en Tris 0,05 M, a pH 8,0 (reacción de DAB-Ni). Este procedimiento genera un producto de reacción de color negro (p. ej., [Saldaña y cols. 2009](#)). En todos los casos, incubamos algunas secciones durante 10-30 min en una solución de DAB al 0,05 % y H₂O₂ al 0,0005 % en Tris 0,05 M a pH 7,6. Este método genera un producto de reacción de color marrón. Por último, montamos, aclaramos y cubrimos las secciones.

5. Técnicas de trazado de vías nerviosas

5.1. Trazadores

Para analizar las conexiones nerviosas de la CLTd, utilizamos dos tipos de trazadores: el trazador bidireccional dextrano biotinado (Lysine-fixable biotinylated dextran –BDA–, peso molecular 10.000 Da; Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE.UU.) al 10 % en agua bidestilada o en PB 0,1M; y el trazador retrógrado FluoroGold (Fluorochrome Inc., Denver, Colorado, EE.UU.), que inyectamos al 4% en suero salino.

5.2. Procedimiento quirúrgico

Antes de la intervención quirúrgica, anestesiamos profundamente los animales con una mezcla de clorhidrato de ketamina (57 mg/kg; Imalgène 1.000; Rhône Mérieux, Lyon, Francia) y clorhidrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiacina (8,6 mg/kg; Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemania). Esta mezcla anestésica la administramos por vía intramuscular, repartiendo la dosis (1ml/kg) entre ambos muslos. Cuando la duración de la intervención quirúrgica lo hizo aconsejable, administramos una pequeña dosis adicional de la misma mezcla. Tras comprobar la abolición del reflejo corneal y otros reflejos motores, colocamos al animal en un aparato estereotáctico (Modelo 900; David Kopf Instruments, Tujunga, California, EE.UU.) de modo que la superficie del cráneo quedó horizontal. Incidimos sagitalmente la piel para exponer y trepanar el cráneo. Tras la craneotomía, abrimos mecánicamente la duramadre salvo en los casos en los que lo desaconsejó la proximidad de algún seno venoso.

A continuación, empleamos técnicas estereotácticas para introducir verticalmente en el cerebro una micropipeta de borosilicato (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Florida, EE.UU.) cargada con el trazador, y cuya punta tenía un diámetro interno de entre 8 y 25 µm. Las coordenadas estereotácticas con las que obtuvimos resultados satisfactorios se señalan en la Tabla 4. En el caso de la CLTd, la trayectoria vertical nos obligó a atravesar el seno venoso sagital con la punta de la micropipeta, un procedimiento que resultó bien tolerado por todos los animales experimentales.

Seguidamente, liberamos el trazador iontoporéticamente, haciendo pasar a través de la micropipeta una corriente continua de 3-5 µA de intensidad, en pulsos de 7 s cada 14 s, durante 5-12 minutos. Para evitar el reflujo del trazador a lo largo del trayecto de penetración, una vez terminada la aplicación de la corriente esperamos de 10 a 15 minutos antes de extraer la

micropipeta. En los casos con inyección de BDA en la CLTd, la extracción de la pipeta provocó una pequeña hemorragia del seno venoso, que contuvimos sin dificultad aplicando localmente una gasa hemostática. Por último, suturamos la herida y devolvimos al animal a su jaula, donde permaneció en condiciones de estabilización adecuadas.

Todas las intervenciones quirúrgicas las llevamos a cabo en condiciones de semiesterilidad y los animales se recuperaron sin necesidad de que les administráramos más fármacos que anestésicos tópicos para la herida quirúrgica.

Núcleo	Rostrocaudal	Lateral	Dorsoventral
CLTd	1,2 mm	0,2 mm	5,7 mm
LD	6,6 mm	2,2 mm	5,7 mm

Tabla 4. Ejemplos de coordenadas estereotácticas con las que obtuvimos resultados satisfactorios. La coordenada rostrocaudal expresa la distancia con respecto al plano coronal interauricular; la lateral, la distancia con respecto al plano mediosagital; y la dorsoventral, la distancia con respecto al plano horizontal interauricular.

5.3. Procesamiento histológico

5.3.1. Fijación, tallado y corte del encéfalo

Tras 7-14 días de supervivencia, anestesiamos cada animal inyectándole intraperitonealmente una sobredosis de pentobarbital sódico (60-120mg/kg) o bien con el mismo procedimiento anestésico usado para inyectar el trazador, y lo profundimos tal como se ha descrito anteriormente. En cada caso, usamos dos fijadores. El primer fijador contuvo formaldehído al 4 % (preparado a partir de paraformaldehído recién despolimerizado) y glutaraldehído al 0,1 % en tampón de fosfato sódico (PB) 0,1 M a pH 7,4. Seguidamente se añadió un segundo fijador, similar al primero pero sin glutaraldehído. Los dos fijadores los usamos a temperatura ambiente.

Tras la perfusión, disecamos, crioprotegimos y cortamos el cerebro según el procedimiento habitual del laboratorio para obtener secciones coronales de 40 µm de espesor, que recogimos de forma alterna en 8 pocillos en tampón Tris (ver más adelante) 0,05 M, a pH 7,4.

5.3.2. Visualización histoquímica del trazador

Para visualizar el trazador BDA, inicialmente lavamos las sección en tampón Tris-Tx y posteriormente las revelamos histoquímicamente con el método ABC, tal como se ha descrito en la sección dedicada a la detección de la proteína Fos (sección 4).

En los casos en los que inyectamos el trazador FluoroGold, comprobamos, con un microscopio de fluorescencia Leica DMRB la localización de la zona de inyección y la presencia de neuronas marcadas retrógradamente. En los casos exitosos, procesamos posteriormente las secciones con un método inmunocitoquímico para obtener una tinción permanente. Para ello, incubamos las secciones en un antisuero primario de conejo contra FluoroGold (Chemicon International, Inc; Temecula, California, EE.UU.; 1:4000), y después en un antisuero secundario biotinado de cabra contra la IgG de conejo (Vector; 1:50). Finalmente, realizamos la incubación con el complejo ABC descrito anteriormente, intensificado o no con sulfato de níquel.

En todos los casos, montamos las secciones sobre portaobjetos con una solución de gelatina, las dejamos secar en una estufa a 35 °C, las deshidratamos con concentraciones crecientes de etanol, las aclaramos con xileno y las cubrimos con Entellan® (Merck). Antes de la deshidratación, contrastamos con una solución de violeta de cresilo al 1 % las secciones de 1 ó 2 pocillos previamente reveladas. Estas secciones las utilizamos como referencia citoarquitectónica.

6. Mapas de referencia

A lo largo de este Trabajo hemos adoptado la nomenclatura del atlas del cerebro de la rata publicado por [Paxinos y Watson \(2005\)](#). Las pocas excepciones a esta norma, aparecen especificadas en los lugares correspondientes.

Para la parcelación del CS hemos utilizado el esquema seguido por la mayoría de los autores, que lo subdivide en siete capas alternantes de sustancia blanca y sustancia gris: capa zonal (*stratum zonale*), capa gris superficial (*stratum griseum superficiale*), capa de las fibras del nervio óptico (*stratum opticum*), capa gris intermedia (*stratum griseum intermediale*), capa blanca intermedia (*stratum album intermediale*), capa gris profunda (*stratum griseum profundus*) y capa blanca profunda (*stratum album profundus*). Para delimitar las capas, recurrimos a las series de secciones de 60-80 µm postfijadas con tetróxido de osmio para teñir las fibras mielínicas. Resultó

especialmente útil identificar de forma inequívoca los fascículos de axones que corren rostrocaudalmente y que aparentemente se relaciona topográficamente con la CLTd (ver Figs. 11, 12, 16, 17). De acuerdo con descripciones previas del CS de la rata realizadas por otros autores (Killackey y Erzurumlu 1981; Huerta y cols. 1983; Redgrave y cols. 1986; Paxinos y cols. 1999; Krout y cols. 2001; Paxinos y Watson 2005), nos referiremos a esta capa rica en fibras longitudinales como capa blanca intermedia del CS. Otros autores, sin embargo, tienden a considerar el estrato de fibras longitudinales de los roedores como una sublámina o nivel dentro de la capa gris intermedia (Wiener 1986; Bickford y Hall 1989; Helms y cols. 2004; ver May 2006, para referencias adicionales).

7. Técnicas estereológicas

Para calcular de manera no sesgada el número de neuronas de la CLTd, seleccionamos tres series de secciones coronales de nuestra colección de cerebros de rata teñidos con el método de Giemsa. Elegimos este método de tinción porque sus propiedades tintoriales resultan particularmente útiles para identificar neuronas tan pequeñas como las de la CLTd, distinguiéndolas de otros tipos celulares presentes en el sistema nervioso central.

La técnica utilizada fue esencialmente idéntica a la empleada anteriormente en nuestro laboratorio para calcular el número de neuronas de los núcleos auditivos subcorticales (Kulesza y cols. 2002) y el número de neuronas de la CLTv (Saldaña y cols. 2007). Con la ayuda del paquete informático Stereo Investigator (MicroBrightField, Inc. –now MBF Bioscience–, Williston, VT) aplicamos el fraccionador óptico, que combina las herramientas del disector óptico con las del fraccionador (Gundersen 1988; Gundersen y cols. 1988). Para minimizar el coeficiente de error, usamos una de cada cuatro secciones y ajustamos los parámetros del fraccionador óptico para que la muestra de neuronas contadas de cada CLTd fuera de al menos 250 neuronas en cada lado. Con estos ajustes muestreamos aproximadamente 15 campos de 400 μm^2 por sección.

8. Morfometría

Para comparar el tamaño de las neuronas de los diferentes núcleos, medimos con la ayuda de un objetivo de inmersión de 100x (N.A. = 1.4) el diámetro máximo de los somas de las neuronas presentes en secciones

coronales semifinas de la región central de la CLTd teñidas con azul de toluidina. En cada sección, medimos todas las neuronas con nucleolo visible situadas en la CLTd, la CLTv y la región más medial del CS. Todas las neuronas del CS medidas estaban situadas a menos de 200 µm del borde lateral de la CLTd.

Aplicamos un procedimiento similar para medir el diámetro máximo del soma de las neuronas de la CLTd y del CS marcadas retrógradamente en los casos con inyección de FluoroGold en el complejo lateral del tálamo. Debido al número relativamente bajo de neuronas marcadas en la región del CS adyacente a la CLTd, medimos las neuronas del CS situadas a menos de 500 µm del borde lateral de la CLTd.

Para comparar la densidad neuronal de la CLTd con la de las estructuras adyacentes, calculamos la densidad relativa en secciones de parafina de 15 µm de espesor de la región central de la CLTd de la rata teñidas con el método de Giemsa. Con el objetivo de inmersión de 100x (N.A. = 1.4), para cada sección, contamos todas las neuronas incluidas en dos cuadrados de 2500 µm² colocados aleatoriamente en cada una de las estructuras analizadas: CLTd, CLTv y CS medial.

Los datos morfométricos los analizamos con el paquete Predictive Analytic Software (PASW) de IBM. Primero aplicamos la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si las poblaciones analizadas seguían una distribución normal. Los valores del diámetro máximo del soma de las neuronas de la CLTd, la CLTv y el CS sí se ajustaron a una distribución normal, y por ello comparamos estos grupos de dos en dos con la prueba de la *t* de Student. Como los valores de la densidad neuronal y los del diámetro máximo de los somas marcados con FluoroGold no se ajustaron a los criterios de normalidad, los comparamos estadísticamente con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

9. Reconstrucción tridimensional

Elaboramos reconstrucciones tridimensionales del techo mesencefálico de una rata cuyas secciones coronales de 40 µm, obtenidas por congelación, se tiñeron con el método de Giemsa. Primero fotografiamos una de cada cuatro secciones usando el objetivo de 10x (A.N. = 0,30) de un microscopio Leica DMRB e imprimimos cada imagen digital muy ampliada. Tras estudiar detenidamente las secciones con el microscopio, trazamos sobre las fotografías impresas el contorno de la CLTd y las estructuras con las que se relaciona. A continuación, dibujamos las mismas secciones con la ayuda del programa Neurolucida (Versión 10; MBF Bioscience), que controla el desplazamiento de la platina del

microscopio Leica DMRB, y acotamos la CLTd y otras estructuras usando como modelo los límites dibujados en las fotografías impresas. En cada dibujo señalamos también los principales vasos sanguíneos y cualesquiera otras referencias útiles para alinear las secciones. Una vez completados los dibujos de la serie, creamos con el programa Neurolucida una primera versión del conjunto de secciones alineadas. A continuación, pulimos esta versión con el programa NeuroExplorer (Versión 3; MBF). Con esta aplicación informática mejoramos la alineación de las secciones, suavizamos sus contornos, asignamos colores a las diferentes estructuras, creamos una imagen sólida de cada elemento y rotamos interactivamente las imágenes.

10. Análisis de los resultados y elaboración de las figuras

Las secciones las estudiamos, dibujamos y fotografiámos con un microscopio Zeiss Axioskop 40 (Oberkochen, Alemania) equipado con lentes objetivo plan semiacromáticas de 2,5x (A.N. = 0,075), 5x (A.N. = 0,15), 10x (A.N. = 0,30), 20x (A.N. = 0,50), 40 x (A.N. = 0,75), y 100x de inmersión en aceite (A.N. = 1,40). Las microfotografías las tomamos con una cámara digital Zeiss AxioCam MRc 5 acoplada al microscopio. A fin de ajustar exclusivamente el brillo, el contraste y el equilibrio de color de las imágenes, tratamos posteriormente cada documento digital con el programa Adobe Photoshop 7 (Adobe, San José, California, EE.UU.) para Macintosh. Por último, nos servimos del programa Canvas 9.0. (ACD Systems of America, Inc., Miami, Florida, EE.UU.) para combinar y maquetar las imágenes en planchas.

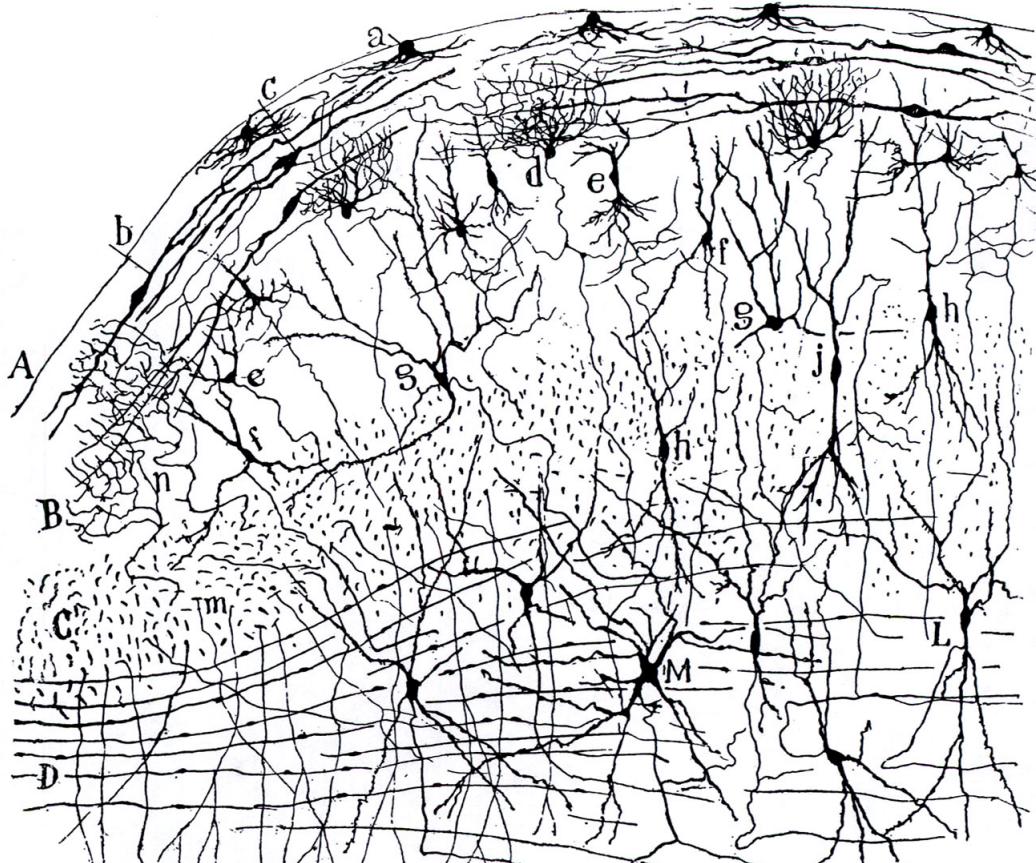


Fig. 461.—Corte transversal del tubérculo cuadrigémino anterior del conejo de ocho días.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adams JC (1995) Sound stimulation induces Fos-related antigens in cells with common morphological properties throughout the auditory brainstem. *J Comp Neurol* 361:645-668.
- Aparicio MA, Saldaña E (2009) Tectotectal neurons and projections: a proposal to establish a consistent nomenclature. *Anat Rec (Hoboken)* 292:175-177.
- Aparicio MA, Saldaña E (2013) The dorsal tectal longitudinal column (TLCd): a second longitudinal column in the paramedian region of the midbrain tectum. *Brain Struct Funct* (en prensa; doi 10.1007/s00429-013-0522-x).
- Aparicio MA, Viñuela A, Saldaña E (2010) Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column in the rat. *Neuroscience* 166:653-664.
- Arcelli P, Frassoni C, Regondi MC, De Biasi S, Spreafico R (1997) GABAergic neurons in mammalian thalamus: A marker of thalamic complexity? *Brain Res Bull* 42:27-37.
- Bahu SJ, Kaltenbach JA, Zhang J, Khariwala SS, Afman CE, Hnatiuk M (2001) Tonotopic mapping of *c-fos* expression in the dorsal cochlear nucleus of the hamster. *Neurosci Res Comm* 29:107-117.
- Bajo VM, Nodal FR, Bizley JK, King AJ (2010) The non-lemniscal auditory cortex in ferrets: convergence of corticotectal inputs in the superior colliculus. *Front Neuroanat* 4:18. doi: 10.3389/fnana.2010.00018.
- Baldauf ZB, Wang S, Chomsung RD, May PJ, Bickford ME. (2005) Ultrastructural analysis of projections to the pulvinar nucleus of the cat. II: Pretectum. *J Comp Neurol* 485:108-126.
- Barthó P, Freund TF, Acsády L (2002) Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *Eur J Neurosci* 16:999-1014.
- Beckstead RM (1979) An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol* 184:43-62.
- Beitz AJ, Shepard RD (1985) The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis. *J Comp Neurol* 237:460-475.
- Berman AL (1968) The brain stem of the cat: A cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates. Madison, WI: University of Wisconsin Press.
- Bezdudnaya T, Keller A (2008) Laterodorsal nucleus of the thalamus: A processor of somatosensory inputs. *J Comp Neurol* 507:1979-1989.
- Bickford ME, Hall WC (1989) Collateral projections of predorsal bundle cells of the superior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 283:86-106.
- Bokor H, Csaki A, Kocsis K, Kiss J (2002) Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur J Neurosci* 16:1227-1239.
- Bokor H, Frère SG, Eyre MD, Slézia A, Ulbert I, Lüthi A, Acsády L (2005) Selective GABAergic control of higher-order thalamic relays. *Neuron* 45:929-940.
- Brown MC, Liu TS (1995) Fos-like immunoreactivity in central auditory neurons of the mouse. *J Comp Neurol* 357:85-97.

- Brown MC, Mukerji S, Drottar M, Windsor AM, Lee DJ (2013) Identification of Inputs to Olivocochlear Neurons Using Transneuronal Labeling with Pseudorabies Virus (PRV). *J Assoc Res Otolaryngol* (en prensa; doi 10.1007/s10162-013-0400-5).
- Buchanan SL, Thompson RH, Maxwell BL, Powell DA (1994) Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. *Exp Brain Res* 100:469-483.
- Campolattaro MM, Halverson HE, Freeman JH (2007) Medial auditory thalamic stimulation as a conditioned stimulus for eyeblink conditioning in rats. *Learn Mem* 14:152-159.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1994) Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348:41-79.
- Carstens E, Leah J, Lechner J, Zimmermann M (1990) Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat. *Neuroscience* 35:609-626.
- Çavdar S, Hacioglu H, Sirvancı S, Keskinöz E, Onat F (2011) Synaptic organization of the rat thalamus: a quantitative study. *Neurol Sci* 32:1047-1056.
- Chen TJ, Chen SS, Hsieh YL (2000) Evaluating the protective role of the olivocochlear bundle against acoustic overexposure in rats by using Fos immunohistochemistry. *J Neurol Sci* 177:104-113.
- Chevalier G, Deniau JM (1984) Spatio-temporal organization of a branched tecto-spinal/tecto-diencephalic neuronal system. *Neuroscience* 12:427-439.
- Chevalier G, Mana S (2000) Honeycomb-like structure of the intermediate layers of the rat superior colliculus, with additional observations in several other mammals: AChE patterning. *J Comp Neurol* 419:137-153.
- Clement CI, Keay KA, Owler BK, Bandler R (1996) Common patterns of increased and decreased fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep somatic and noxious visceral manipulations in the rat. *J Comp Neurol* 366:495-515.
- Cody AR, Wilson W, Leah J (1996) Acoustically activated c-fos expression in auditory nuclei of the anaesthetised guinea pig. *Brain Res* 728:72-78.
- Comoli E, Das Neves Favaro P, Vautrelle N, Leriche M, Overton PG, Redgrave P (2012) Segregated anatomical input to sub-regions of the rodent superior colliculus associated with approach and defense. *Front Neuroanat* 6:9. doi:10.3389/fnana.2012.00009.
- Correa- Lacárcel J, Pujante MJ, Terol FF, Almenar-Garcíaa V, Puchades-Orts A, Ballesta JJ, Lloret J, Robles JA, Sanchez-del-Campo F (2000) Stimulus frequency affects c-fos expression in the rat visual system. *J Chem Neuroanat* 18:135-146.
- Craner SL, Hoffman GE, Lund JS, Humphrey AL, Lund RD (1992) cFos labeling in rat superior colliculus: activation by normal retinal pathways and pathways from intracranial retinal transplants. *Exp Neurol* 117:219-229.
- Donnelly JF, Thompson SM, Robertson RT (1983) Organization of projections from the superior colliculus to the thalamic lateral posterior nucleus in the rat. *Brain Res* 288:315-319.

- Ehret G, Fischer R (1991) Neuronal activity and tonotopy in the auditory system visualized by c-fos gene expression. *Brain Res* 567:350-354.
- Favaro PD, Gouvêa TS, de Oliveira SR, Vautrelle N, Redgrave P, Comoli E (2011) The influence of vibrissal somatosensory processing in rat superior colliculus on prey capture. *Neuroscience* 176:318-327.
- Faye-Lund H (1986) Projection from the inferior colliculus to the superior olfactory complex in the albino rat. *Anat Embryol* 175:35-52.
- Feliciano M, Saldaña E, Mugnaini E (1995) Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemniscal regions, superior olfactory complex and cochlear nuclei. *Aud Neurosci* 1:287-308.
- Folgueira M, Sueiro C, Rodríguez-Moldes I, Yáñez J, Anadón R (2007) Organization of the torus longitudinalis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an immunohistochemical study of the GABAergic system and a Dil tract-tracing study. *J Comp Neurol* 503:348-370.
- Ficalora AS, Mize RR (1989) The neurons of the substantia nigra and zona incerta which project to the cat superior colliculus are GABA immunoreactive: a double-label study using GABA immunocytochemistry and lectin retrograde transport. *Neuroscience* 29:567-581.
- Friauf E (1995) C-fos immunocytochemical evidence for acoustic pathway mapping in rats. *Behav Brain Res* 66:217-224.
- Furigo IC, de Oliveira WF, de Oliveira AR, Comoli E, Baldo MV, Mota-Ortiz SR, Canteras NS (2010) The role of the superior colliculus in predatory hunting. *Neuroscience* 165:1-15.
- García Del Caño G, Gerrikagoitia I, Martínez-Millán L (2000) Morphology and topographical organization of the retrosplenial-collicular connection: a pathway to relay contextual information from the environment to the superior colliculus. *J Comp Neurol* 425:393-408.
- García del Caño G, Gerrikagoitia I, Martínez-Millán L (2001) Plastic response of the retrosplenial-collicular connection after removal of retinal inputs in neonatal rats. An anterograde tracing study. *Exp Brain Res* 138:343-351.
- Groenewegen HJ, Witter MP (2004) Thalamus. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system*, 3rd edn Elsevier, Amsterdam, pp 407-453.
- Gundersen HJG (1988) The nucleator. *J Microsc* 151:3-21.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nu-cleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-881.
- Happe HK, Morley BJ (2004) Distribution and postnatal development of alpha nicotinic acetylcholine receptors in the rodent lower auditory brainstem. *Brain Res Dev Brain Res* 153:29-37.
- Harrison RV, Negandhi J (2012) Resting neural activity patterns in auditory brainstem and midbrain in conductive hearing loss. *Acta Otolaryngol* 132:409-14.
- Harting JK (2004) Puffs and patches: A brief chronological review. In: *The superior colliculus: New approaches for studying sensorimotor integration* (Hall WV, Moschovakis A, eds), pp. 83-105. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Harting JK, Updyke BV, Van Lieshout DP (1992) Corticotectal projections in the cat: anterograde transport studies of twenty-five cortical areas. *J Comp Neurol* 324:379-414.
- Harvey AR, Worthington DR (1990) The projection from different visual cortical areas to the rat superior colliculus. *J Comp Neurol* 298:281-292.
- Harvey AR, Heavens RP, Yellachich LA, Sirinathsinghji DJ (2001) Expression of messenger RNAs for glutamic acid decarboxylase, preprotachykinin, cholecystokinin, somatostatin, proenkephalin and neuropeptide Y in the adult rat superior colliculus. *Neuroscience* 103:443-455.
- Hayward LF, Von Reitzenstein M (2002) c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:1975-1984.
- Helms MC, Ozen G, Hall WC (2004) Organization of the intermediate gray layer of the superior colliculus. I. Intrinsic vertical connections. *J Neurophysiol* 91:1706-1715.
- Herbert H, Klepper A, Ostwald J (1997) Afferent and efferent connections of the ventrolateral tegmental area in the rat. *Anat Embryol* 196:235-259.
- Herkenham M (1978) The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol* 177:589-610.
- Herrera M, Sánchez del Campo F, Ruiz A, Smith Agreda V (1988) Neuronal relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus (nucleus commissuralis) in the cat. A Golgi study. *J Anat* 158:137-145.
- Hess US, Lynch G, Gall CM (1995) Changes in *c-fos* mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: Differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3. *J Neurosci* 15:4786-4795.
- Hilbig H, Bidmon HJ, Ettrich P, Müller (2000) Projection neurons in the superficial layers of the superior colliculus in the rat: a topographic and quantitative morphometric analysis. *Neuroscience* 96:109-119.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000) Comparative Cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/Sv Mouse Brains. Elsevier, Amsterdam.
- Huerta MF, Harting JK (1984) Connectional organization of the superior colliculus. *Trends Neurosci* 8:286-289.
- Huerta MF, Frankfurter A, Harting JK (1983) Studies of the principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat: projections to the superior colliculus, inferior olive, and cerebellum. *J Comp Neurol*. 220:147-167.
- Íñiguez C, Gayoso MJ, Carreres J (1985) A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. *J Neurosci Methods* 13:77-86.
- Ito T, Bishop DC, Oliver DL (2011) Expression of glutamate and inhibitory amino acid vesicular transporters in the rodent auditory brainstem. *J Comp Neurol* 519:316-340.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009) The mesopontinerostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513:566-596.

- Kai N, Niki H (2002) Altered tone-induced Fos expression in the mouse inferior colliculus after early exposure to intense noise. *Neurosci Res* 44:305-313.
- Kamishina H, Conte WL, Patel SS, Tai RJ, Corwin JV, Reep RL (2009) Cortical connections of the rat lateral posterior thalamic nucleus. *Brain Res* 1264:39-56.
- Kandiel A, Chen S, Hillman DE (1999) c-fos gene expression parallels auditory adaptation in the adult rat. *Brain Res* 839:292-297.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513:597-621.
- Killackey HP, Erzurumlu RS (1981) Trigeminal projections to the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 201:221-242.
- Kim U, Gregory E, Hall WC (1992) Pathway from the zona incerta to the superior colliculus in the rat. *J Comp Neuro* 321:555-575.
- Kolmac CI, Power BD, Mitrofanis J (1998) Patterns of connections between zona incerta and brainstem in rats. *J Comp Neurol* 396:544-555.
- Kulesza RJ, Viñuela A, Saldaña E, Berrebi AS (2002) Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. *Hear Res* 168:12-24.
- Krieger MS, Conrad LC, Pfaff DW (1979) An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 183:785-815.
- Krout KE, Loewy AD, Westby GW, Redgrave P (2001) Superior colliculus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 431:198-216.
- Lane RD, Bennett-Clarke CA, Allan DM, Mooney RD (1993) Immunochemical heterogeneity in the tecto-LP pathway of the rat. *J Comp Neurol* 333:210-222.
- Lane RD, Allan DM, Bennett-Clarke CA, Howell DL, Rhoades RW (1997) Projection status of calbindin- and parvalbumin-immunoreactive neurons in the superficial layers of the rat's superior colliculus. *Vis Neurosci* 14:277-286.
- Leichnetz GR, Gonzalo-Ruiz A (1987) Collateralization of frontal eye field (medial precentral/anterior cingulate) neurons projecting to the paraoculomotor region, superior colliculus, and medial pontine reticular formation in the rat: a fluorescent double-labeling study. *Exp Brain Res* 68:355-364.
- Leichnetz GR, Carlton SM, Katayama Y, Gonzalo-Ruiz A, Holstege G, DeSalles AA, Hayes RL (1989) Afferent and efferent connections of the cholinoreceptive medial pontine reticular formation (region of the ventral tegmental nucleus) in the cat. *Brain Res Bull* 22:665-688.
- Lindberg D, Chen P, Li C (2013) Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the

- hypothalamus and hindbrain. *J Comp Neurol* May 21. doi: 10.1002/cne.23338.
- López-Aranda MF, López-Téllez JF, Navarro-Lobato I, Masmudi-Martín M, Gutiérrez A, Khan ZU (2009) Role of layer 6 of V2 visual cortex in object-recognition memory. *Science* 325:87-89 .
- Lu B, Lund RD, Coffey PJ (2001) Basal increase in c-Fos-like expression in superior colliculus of Royal College of Surgeons dystrophic rats can be abolished by intraocular injection of tetrodotoxin. *Neuroscience* 107:109-115.
- Lu HP, Chen ST, Poon PW (2009) Nuclear size of c-Fos expression at the auditory brainstem is related to the time-varying nature of the acoustic stimuli. *Neurosci Lett* 451:139-143. .
- Lu B, Lund RD, Coffey PJ (2001) Basal increase in c-Fos-like expression in superior colliculus of Royal College of Surgeons dystrophic rats can be abolished by intraocular injection of tetrodotoxin. *Neuroscience* 107:109-15.
- Lu B, Coffey P, Wang S, Ferrari R, Lund R (2004a) Abnormal c-fos-like immunoreactivity in the superior colliculus and other subcortical visual centers of pigmented Royal College of Surgeons rats. *J Comp Neurol* 472:100-112.
- Lu B, Coffey P, Lund R (2004b) Increased c-fos-like immunoreactivity in the superior colliculus and lateral geniculate nucleus of the rd mouse. *Brain Res* 1025:220-225.
- Luo y cols. 1999 Luo L, Ryan AF, Saint Marie RL (1999) Cochlear ablation alters acoustically induced c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. *J Comp Neurol* 404(2):271-283.
- Ma TP, Cheng HW, Czech JA, Rafols JA (1990) Intermediate and deep layers of the macaque superior colliculus: a Golgi study. *J Comp Neurol* 295:92-110.
- Mantyh PW (1982) The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. *J Comp Neurol* 204:349-363.
- Marshall AF, Pearson JM, Falk SE, Skaggs JD, Crocker WD, Saldaña E, Fitzpatrick DC (2008) Auditory response properties of neurons in the tectal longitudinal column of the rat. *Hear Res* 244:35-44.
- Masterson SP, Li J, Bickford ME (2009) Synaptic organization of the tectorecipient zone of the rat lateral posterior nucleus. *J Comp Neurol* 515:647-663.
- Matsuyama T, Kawamura S (1985) Cytoarchitectonic coincidence with the discontinuous connectional pattern in the deep layers of the superior colliculus in the rat. *Neurosci Res* 2:335-348.
- May PJ (2006) The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res* 151:321-378.
- May PJ, Sun W, Hall WC (1997) Reciprocal connections between the zona incerta and the pretectum and superior colliculus of the cat. *Neuroscience* 77:1091-1114.

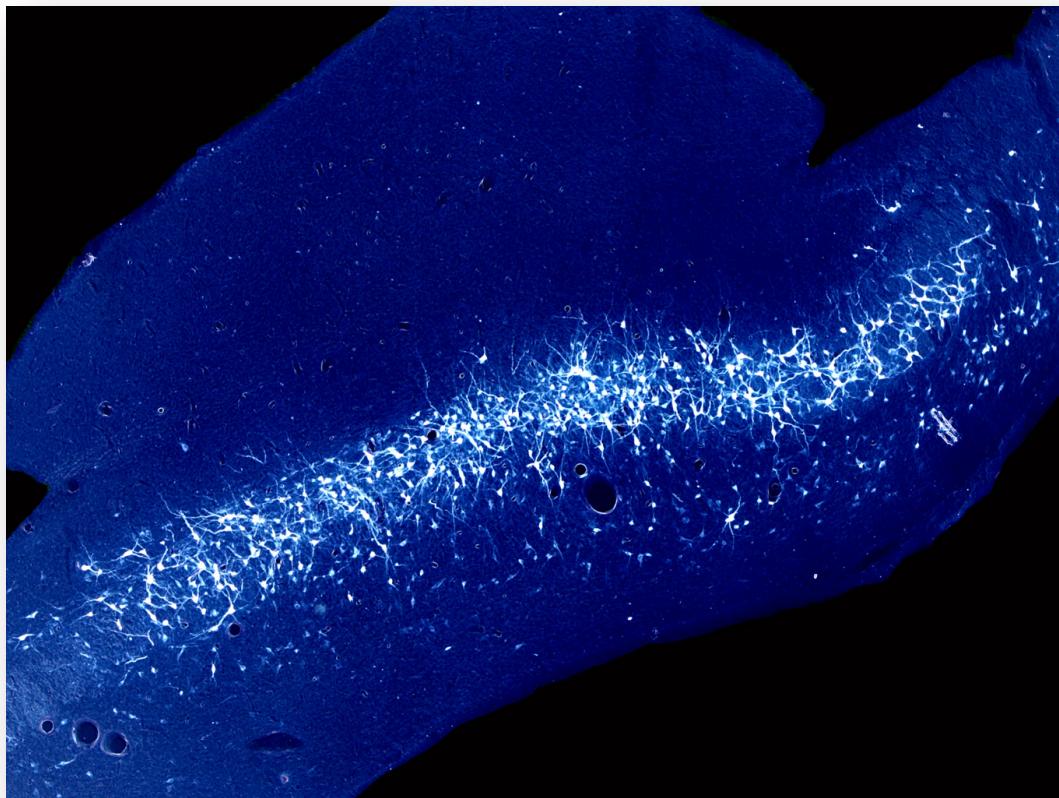
- McKenna JT, Vertes RP. (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol.* 480:115-142.
- Meredith MA, Miller LK, Ramoa AS, Clemo HR, Behan M (2001) Organization of the neurons of origin of the descending pathways from the ferret superior colliculus. *Neurosci Res* 40:301-313.
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Matsutani S, Takatsuji K, Fukui H, Tohyama M (1989) Laminar and segregated distribution of immunoreactivities for some neuropeptides and adenosine deaminase in the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 280:410-423.
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Takatsuji K, Tohyama M (1990) Substance P and enkephalins in the superficial layers of the rat superior colliculus: differential plastic effects of retinal deafferentation. *J Comp Neurol* 299:389-404.
- Mitrofanis J (2005) Some certainty for the "zone of uncertainty"? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience* 130:1-15.
- Mizumori SJ, Miya DY, Ward KE (1994) Reversible inactivation of the lateral dorsal thalamus disrupts hippocampal place representation and impairs spatial learning. *Brain Res* 644:168-174.
- Moore RY, Weis R, Moga MM (2000) Efferent projections of the intergeniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus in the rat. *J Comp Neurol* May 420:398-418.
- Morest DK, Oliver DL (1984) The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: Defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J Comp Neurol* 222:209-236.
- Morin LP, Blanchard JH (2005) Descending projections of the hamster intergeniculate leaflet: relationship to the sleep/arousal and visuomotor systems. *J Comp Neurol* 2005 487:204-16.
- Mugnaini E, Oertel WH (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunocytochemistry. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*, Vol. 4: GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I (Björklund A, Hökfelt T, eds), pp. 436-608. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Mulders WH, Robertson D 2001 Origin of the noradrenergic innervation of the superior olivary complex in the rat. *J Chem Neuroanat* 21:313-322.
- Mundiñano IC, Martínez-Millán L (2010) Somatosensory cross-modal plasticity in the superior colliculus of visually deafferented rats. *Neuroscience* 165:1457-1470. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.041.
- Nakadate K, Imamura K, Watanabe Y (2012) Effects of monocular deprivation on the spatial pattern of visually induced expression of c-Fos protein. *Neuroscience* 202:17-28.
- Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR (1986) The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 396:77-96.

- Ohtake T, Yamada H (1989) Efferent connections of the nucleus reuniens and the rhomboid nucleus in the rat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci Res* 6:556-568.
- Olszewski J, Baxter D (1954) Cytoarchitecture of the human brainstem. Philadelphia, PA: Lippincott.
- Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th edition. San Diego, CA: Elsevier-Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th edition. San Diego, CA: Elsevier-Academic Press.
- Paxinos G, Kus L, Ashwell K, Watson C (1999) Chemoarchitectonic atlas of the rat forebrain. San Diego, CA: Elsevier-Academic Press.
- Qian Y, Jen PH (1994) Fos-like immunoreactivity elicited by sound stimulation in the auditory neurons of the big brown bat *Eptesicus fuscus*. *Brain Res* 664:241-6.
- Redgrave P, Odekunle A, Dean P (1986) Tectal cells of origin of predorsal bundle in rat: location and segregation from ipsilateral descending pathway. *Exp Brain Res* 63:279-293.
- Redgrave P, Dean P, Westby GW (1990) Organization of the crossed tectoreticulo-spinal projection in rat--I. Anatomical evidence for separate output channels to the periabducens area and caudal medulla. *Neuroscience* 37:571-584.
- Rhoades RW, Mooney RD, Szczepanik AM, Klein BG (1986) Structural and functional characteristics of commissural neurons in the superior colliculus of the hamster. *J Comp Neurol* 253:197-215.
- Rieck RW, Huerta MF, Harting JK, Weber JT (1986) Hypothalamic and ventral thalamic projections to the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 243:249-265.
- Riera-Sala C, Molina-Mira A, Marco-Algarra J, Martínez-Soriano F, Olucha FE (2001) Inner ear lesion alters acoustically induced c-Fos expression in the rat auditory rhomboencephalic brainstem. *Hear Res* 162:53-66.
- Risold PY, Swanson LW. 1995. Evidence for a hypothalamothalamocortical circuit mediating pheromonal influences on eye and head movements. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3898-3902.
- Risold PY, Swanson LW 1997 Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Rev* 24:115-195.
- Romanowski CA, Mitchell IJ, Crossman AR (1985) The organisation of the efferent projections of the zona incerta. *J Anat* 143:75-95.
- Room P, Russchen FT, Groenewegen HJ, Lohman AH (1985) Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *J Comp Neurol* 242:40-55.
- Saldaña E, Merchán MA (1992) Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 319:417-437.
- Saldaña E, Merchán MA (2005) Intrinsic and commissural connections of the inferior colliculus. In: *The inferior colliculus* (Winer JA, Schreiner CE, eds), pp. 155-181. New York: Springer.

- Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E (1996) Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 371:15-40.
- Saldaña E, Viñuela A, Marshall AF, Fitzpatrick DC, Aparicio MA (2007) The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. *J Neurosci* 27:13108-13116.
- Saldaña E, Aparicio MA, Fuentes-Santamaría V, Berrebi AS (2009) Connections of the superior paraolivary nucleus of the rat: Projections to the inferior colliculus. *Neuroscience* 163:372-387.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1976) The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 169:409-42.
- Saint Marie RL, Luo L, Ryan AF (1999) Effects of stimulus frequency and intensity on c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. *J Comp Neurol* 1999 404:258-270.
- Sandner G, Oberling P, Silveira MC, Di Scala G, Rocha B, Bagri A, Depoortere R (1993) What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. *Behav Brain Res* 58:9-18.
- Sato K, Houtani T, Ueyama T, Ikeda M, Yamashita T, Kumazawa T, Sugimoto T (1992) Mapping of the cochlear nucleus subregions in the rat with neuronal Fos protein induced by acoustic stimulation with low tones. *Neurosci Lett* 142:48-52.
- Segal RL, Beckstead RM, Kesey K, Edwards SB (1983) The prefrontal corticotectal projection in the cat. *Exp Brain Res* 51:423-432.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213-242.
- Shehab S, Coffey P, Dean P, Redgrave P (1992) Regional expression of fos-like immunoreactivity following seizures induced by pentylenetetrazole and maximal electroshock. *Exp Neurol* 118:261-274.
- Shibata H (2000) Organization of retrosplenial cortical projections to the laterodorsal thalamic nucleus in the rat. *Neurosci Res* 38:303-311.
- Shin R, Ikemoto S (2010) Administration of the GABA_A receptor antagonist picrotoxin into rat supramammillary nucleus induces c-Fos in reward-related brain structures. Supramammillary picrotoxin and c-Fos expression. *BMC Neurosci* 11:101 (doi: 10.1186/1471-2202-11-101).
- Sugita S, Otani K, Tokunaga A, Terasawa K (1983) Laminar origin of the tectothalamic projections in the albino rat. *Neurosci Lett* 43:143-147.
- Sun X, Xia Q, Lai CH, Shum DK, Chan YS, He J (2007) Corticofugal modulation of acoustically induced Fos expression in the rat auditory pathway. *J Comp Neurol* 501:509-525.
- Sun B, Lv B, Dong Q, Wang S, Chai Z (2009) Watching moving images specifically promotes development of medial area of secondary visual cortex in rat. *Dev Neurobiol* 69:558-567.

- Swanson LW (1999) Brain maps: Structure of the rat brain, 2nd edition. New York: Elsevier.
- Takagishi M, Chiba T (1991) Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res* 566:26-39.
- Taube JS (2007) The head direction signal: origins and sensory-motor integration. *Annu Rev Neurosci* 30:181-207.
- Telford S, Wang S, Redgrave P (1996) Analysis of nociceptive neurones in the rat superior colliculus using c-fos immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 375:601-17.
- Thompson SM, Robertson RT (1987) Organization of subcortical pathways for sensory projections to the limbic cortex. II. Afferent projections to the thalamic lateral dorsal nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 265:189-202.
- Tsumori T, Yokota S, Ono K, Yasui Y (2001) Organization of projections from the medial agranular cortex to the superior colliculus in the rat: a study using anterograde and retrograde tracing methods. *Brain Res* 903:168-176.
- Van der Gucht E, Hof PR, Van Brussel L, Burnat K, Arckens L (2007) Neurofilament protein and neuronal activity markers define regional architectonic parcellation in the mouse visual cortex. *Cereb Cortex* 17:2805-19.
- Van Groen T, Wyss JM (2003) Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J Comp Neurol* 463:249-263.
- Van Groen T, Kadish I, Wyss JM (2002) The role of the laterodorsal nucleus of the thalamus in spatial learning and memory in the rat. *Behav Brain Res* 136:329-337.
- Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA (2009) What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci* 10:792-802.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.
- Viñuela A (2004) La columna comisural tectal: un núcleo cerebral inédito. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
- Viñuela A, Aparicio MA, Berrebi AS, Saldaña E (2011) Connections of the superior paraolivary nucleus of the Rat: II. Reciprocal connections with the tectal longitudinal column. *Front Neuroanat* 5:1. doi: 10.3389/fnana.2011.00001.
- Wanaverbecq N, Bodor AL, Bokor H, Slézia A, Lüthi A, Acsády L (2008) Contrasting the functional properties of GABAergic axon terminals with single and multiple synapses in the thalamus. *J Neurosci* 28:11848-11861.
- Wang S, Redgrave P (1997) Microinjections of muscimol into lateral superior colliculus disrupt orienting and oral movements in the formalin model of pain. *Neuroscience* 81:967-88.
- Wang S, Wang H, Niemi-Junkola U, Westby GW, McHaffie JG, Stein BE, Redgrave P (2000) Parallel analyses of nociceptive neurones in rat superior colliculus by using c-fos immunohistochemistry and electrophysiology under different conditions of anaesthesia. *J Comp Neurol* 425:599-615.
- Wang S, Bickford ME, Van Horn SC, Erisir A, Godwin DW, Sherman SM (2001) Synaptic targets of thalamic reticular nucleus terminals in the visual thalamus of the cat. *J Comp Neurol* 440:321-341.

- Wang Y, Kakizaki T, Sakagami H, Saito K, Ebihara S, Kato M, Hirabayashi M, Saito Y, Furuya N, Yanagawa Y (2009) Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus transgenic mouse. *Neuroscience* 164:1031-1043.
- Watanabe K, Kawana E (1982) The cells of origin of the incertofugal projections to the tectum, thalamus, tegmentum and spinal cord in the rat: a study using the autoradiographic and horseradish peroxidase methods. *Neuroscience* 7:2389-2406.
- Wiener SI (1986) Laminar distribution and patchiness of cytochrome oxidase in mouse superior colliculus. *J Comp Neurol* 244:137-148.
- Wouterlood FG (1991) Innervation of entorhinal principal cells by neurons of the nucleus reunions thalami. Anterograde PHA-L tracing combined with retrograde fluorescent tracing and intracellular injection with lucifer yellow in the rat. *Eur J Neurosci* 3:641-647.
- Wouterlood FG, Saldaña E, Witter MP (1990) Projection from the nucleus reunions thalami to the hippocampal region: light and electron microscopio tracing study in the rat with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179-203.
- Wyss JM, Sripanidkulchai K (1984) The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res* 293:1-15.
- Yang Y, Saint Marie RL, Oliver DL (2005) Granule cells in the cochlear nucleus sensitive to sound activation detected by Fos protein expression. *Neuroscience* 136:865-882.
- Yoder RM, Clark BJ, Taube JS (2011) Origins of landmark encoding in the brain. *Trends Neurosci* 34:561-571.
- Zhang JS, Kaltenbach JA, Wang J, Kim SA (2003) Fos-like immunoreactivity in auditory and nonauditory brain structures of hamsters previously exposed to intense sound. *Exp Brain Res* 153:655-660.



ANEXO I

Saldaña E, Viñuela A, Marshall AF, Fitzpatrick DC, Aparicio MA (2007) The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. *J Neurosci* 27:13108-13116.

The TLC: A Novel Auditory Nucleus of the Mammalian Brain

Enrique Saldaña,^{1,2} Antonio Viñuela,^{1,2} Allen F. Marshall,³ Douglas C. Fitzpatrick,³ and M.-Auxiliadora Aparicio^{1,2}

¹Laboratory for the Neurobiology of Hearing, Department of Cell Biology and Pathology, Medical School, University of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain,

²Neuroscience Institute of Castilla y León (INCyL), University of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain, and ³Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina 27599-7070

We have identified a novel nucleus of the mammalian brain and termed it the tectal longitudinal column (TLC). Basic histologic stains, tract-tracing techniques and three-dimensional reconstructions reveal that the rat TLC is a narrow, elongated structure spanning the midbrain tectum longitudinally. This paired nucleus is located close to the midline, immediately dorsal to the periaqueductal gray matter. It occupies what has traditionally been considered the most medial region of the deep superior colliculus and the most medial region of the inferior colliculus. The TLC differs from the neighboring nuclei of the superior and inferior colliculi and the periaqueductal gray by its distinct connections and cytoarchitecture. Extracellular electrophysiological recordings show that TLC neurons respond to auditory stimuli with physiologic properties that differ from those of neurons in the inferior or superior colliculi. We have identified the TLC in rodents, lagomorphs, carnivores, nonhuman primates, and humans, which indicates that the nucleus is conserved across mammals. The discovery of the TLC reveals an unexpected level of longitudinal organization in the mammalian tectum and raises questions as to the participation of this mesencephalic region in essential, yet completely unexplored, aspects of multisensory and/or sensorimotor integration.

Key words: superior colliculus; inferior colliculus; auditory; periaqueductal gray; midbrain tectum; multisensory; sensorimotor; tract-tracing; electrophysiology; 3D reconstruction; rat; human

Introduction

In mammals, the roof of the midbrain (the mesencephalic tectum) consists primarily of the paired superior and inferior colliculi, which are visible on the dorsal surface of the brainstem as four symmetrically arranged bumps, the corpora quadrigemina. The superior colliculus (SC) is a complex, multilayered structure (Huerta and Harting, 1984; May, 2005). Its superficial layers receive visual information, whereas its deep layers receive convergent visual, auditory and somatosensory information, and are involved in the genesis of motor responses, including gaze control and head and pinna postural adjustments (Sparks and Nelson, 1987; King, 2004). The inferior colliculus (IC) occupies a

pivotal position in both ascending and descending auditory pathways (Aitkin, 1986). The left and right SC are interconnected by numerous axons that travel in the rostral half of the commissure of the SC (CoSC) (Edwards, 1977; Olivier et al., 2000); likewise, the left and right IC are interconnected through the commissure of the IC (CoIC) (for review, see Saldaña and Merchán, 2005).

Whereas the main portions of the SC and IC have been extensively analyzed anatomically and functionally (Hall and Moschovakis, 2004; Winer and Schreiner, 2005), our studies focused on a region of the midbrain tectum that has not been analyzed in detail previously, namely the paramedian region that includes the medialmost portions of the deep SC and the IC. Here, we report that this medial territory of the tectum contains a previously unidentified nucleus of the rat's midbrain. We refer to it as the tectal longitudinal column (TLC) because of its shape and position. We provide evidence based on cytoarchitecture, fiber connections and basic electrophysiology that the TLC is a distinct nucleus of the rat brain. Furthermore, we demonstrate that the TLC is present in a large variety of mammals, including humans.

Materials and Methods

Experimental animals. For the neuroanatomical studies, Sprague Dawley rats of either sex (body weight, 190–210 g) were cared for and used in compliance with European Union regulations concerning the use of animals in biomedical research, and the experimental procedures were approved and supervised by the Animal Care and Use Committee of the University of Salamanca. For the surgical procedures, including the transcardial perfusion of fixatives, the animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine HCl (80 mg/kg body weight) and xylazine (6 mg/kg body weight) administered intramuscularly.

The electrophysiological recordings were obtained from Sprague

Received April 26, 2007; revised Oct. 10, 2007; accepted Oct. 11, 2007.

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology Grants BFU2000/1358 and BFU2004-05909 (E.S.), Junta de Castilla y León Grants SA097/01 and SA007C05 (E.S.), National Institutes of Health (NIH) Grant DC04398 (D.C.F.), and the NIH Short Term Research Training Grant and the University of North Carolina Medical Alumni Association Endowment Fund (A.F.M.). A.V. was supported by Predoctoral Fellowship BEFI00/9418 from the Instituto de la Salud Carlos III and M.-A.A. was supported by Predoctoral Fellowship FPU AP2002/3330 from the Spanish Ministry of Education. We thank Albert S. Berrebi, Fernán Jaramillo, Enrico Mugnaini, Kirsten K. Olsen, and Nobuo Sugá for helpful discussions and comments on this manuscript, Manuel S. Malmierca for assistance with the 3D reconstructions, and Enrique A. López-Poveda and Ana Alves-Pinto for assistance with the statistical analysis. The human brainstems were made available by Ángel Santos-Briz and María-Dolores Ludeña, the sections of the crab-eating monkey brainstems by Javier Cervera-Paz and Manuel Manrique, and those of ferret brainstems by Francisco Clascá. E.S. discovered the TLC, designed all morphological experiments, supervised the project, and wrote this manuscript. A.V. did most of the tract-tracing experiments and the 3D reconstructions. A.F.M. and D.C.F. performed the electrophysiological recordings. M.-A.A. studied the comparative anatomy of the TLC and performed the morphometric and stereological analyses.

Correspondence should be addressed to Dr. Enrique Saldaña, Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Departamento de Biología Celular y Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain. E-mail: saldana@usal.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1892-07.2007

Copyright © 2007 Society for Neuroscience 0270-6474/07/2713108-09\$15.00/0

Dawley and Long-Evans rats, and all the experimental procedures conformed to the National Institutes of Health guidelines and protocols approved by the Animal Care and Use Committee of The University of North Carolina. Throughout the recording sessions, the rats were deeply anesthetized with urethane (25% in saline, 1.5 g/kg) administered intraperitoneally.

Human nervous tissue. We examined sections of the brainstem of several adults, both males and females, who died from non-neurological causes, and whose brain was judged normal both macroscopically and microscopically. The time from death to the immersion in fixative (4% formaldehyde prepared from commercial Formalin) was 3–12 h. After several weeks in fixative, the brainstems were blocked, cryoprotected with sucrose, and sectioned on a freezing microtome in a plane transverse to the longitudinal axis of the mesencephalon. All procedures involving human material were approved and supervised by the Bioethics Committee of the Clinical Hospital of the University of Salamanca.

Cytoarchitectural analysis. We studied 40- to 60- μm -thick frozen sections or 15- μm -thick paraffin-embedded sections of the rat, mouse, hamster, gerbil, chinchilla, guinea pig, rabbit, cat and human midbrain tectum stained with either 0.25–1% cresyl violet or with the Giemsa method (Íñiguez et al., 1985). This material was available from the histological collection of the Laboratory for the Neurobiology of Hearing of the University of Salamanca.

We also used semithin sections of the rat TLC stained with toluidine blue. To produce these, rats were deeply anesthetized and perfused with fixative containing 2.5% glutaraldehyde and 2% formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde). Vibratome sections (80 μm thick) were postfixed with 1% OsO₄, stained with uranyl acetate, dehydrated, cleared with propylene oxide and flat-embedded in Epon 812 resin. Fragments of sections containing the TLC were cut out, re-embedded into blank resin blocks, and sectioned with an ultramicrotome at a thickness of 1–2 μm . These semithin sections were finally stained with 1% toluidine blue.

Sections of the brainstem of ferrets and monkeys were obtained from the histological collections of other institutions listed in the acknowledgments. Such sections had been processed by routine neurohistological methods, including Nissl staining with cresyl violet or thionin.

Unbiased stereological estimates of neuron numbers. We selected for study three series of coronal sections from our collection of rat brains stained by the Giemsa method (Íñiguez et al., 1985). We chose Giemsa-stained material because this polychromatic technique provides a clear distinction between purple-stained neurons and light blue-stained glial and endothelial cells. This was particularly useful given the small size of most TLC neurons.

We followed procedures described previously (Kulesza et al., 2002). Stereo Investigator software (MBF Bioscience, Williston, VT) was used to implement the optical fractionator protocol, which encompasses the optical disector and fractionator tools (Gundersen, 1988; Gundersen et al., 1988). To minimize the coefficient of error, we counted from every fourth section and set the parameters of the optical fractionator so that the sample consisted of at least 250 neurons for each TLC. This was achieved by sampling from approximately fifteen 400 μm^2 counting frames per section.

Tract-tracing with FluoroGold. Glass micropipettes loaded with the retrograde tracer FluoroGold (Fluorochrome, Denver, CO; 4% in saline) were stereotactically placed into the superior olfactory complex of deeply anesthetized rats ($n = 11$) and the tracer was delivered iontophoretically by passing a pulsed 5 μA positive direct current (7 s on/7 s off) for 5–15 min. The current was then stopped and the pipette left in place for an additional 15–20 min before withdrawal to prevent leakage of the tracer along the injection tract.

After 5–10 d of survival, the rats were anesthetized deeply and their brains fixed by transcardial perfusion of buffered 4% formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde). The brains were cut coronally ($n = 6$) or parasagittally ($n = 5$) on a freezing microtome at a thickness of 40 μm .

Initially, we assessed the location of the injection site and labeled neurons by inspecting representative fresh sections on a Leica DMRB microscope under epifluorescence illumination. In selected cases the Fluoro-

Gold was rendered permanently visible by immunocytochemistry on free-floating sections, using a rabbit anti-FluoroGold primary antiserum (1:4000; Millipore, Temecula, CA) followed by biotinylated anti-rabbit immunoglobulin G raised in goat (1:50; Vector Laboratories, Burlingame, CA), and then by incubation in the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain; Vector Laboratories) and standard histochemistry for peroxidase, with or without heavy-metal intensification.

Three-dimensional reconstructions. In selected cases, we generated three-dimensional (3D) reconstructions of the location of the TLC neurons labeled with FluoroGold. Every other coronal section was drawn at 25 \times with the aid of a drawing tube attached to a Leica DMRB microscope. Each drawing included: (1) the outline of the section and the midline, (2) the outline of the TLC and adjacent anatomical structures, (3) the location of each labeled TLC neuron, and (4) the location of major blood vessels and other fiduciary marks useful to align the drawings of consecutive sections. The drawings were then aligned and digitized with a GTCO CalComp (Columbia, MD) graphic pad using Microtrace software (Leergaard and Bjaalie, 1995). Three-dimensional images were finally produced with a Silicon Graphics (Sunnyvale, CA) workstation.

Morphometry. For comparison of neuronal size across structures, we used a 100 \times oil-immersion objective (numerical aperture, 1.4) to measure the maximum diameter of the neuronal cell bodies in semithin, coronal sections through the central third of the rat TLC. In each section, we measured all neurons with visible nucleoli located in the TLC, dorsomedial column of the periaqueductal gray matter (PAGdm), medial SC and “dorsal column.” Neurons in the PAGdm were limited to those located within 200 μm of the ventral border of the TLC, and SC neurons to those within 200 μm of the lateral border of the TLC.

For comparison of density across structures, relative neuronal density was determined using 15- μm -thick paraffin-embedded sections of the central third of the rat TLC stained by the Giemsa method. Using a 100 \times oil-immersion objective (numerical aperture, 1.4), for each section we counted the neurons included in two square areas of 2500 μm^2 randomly placed in each one of the structures analyzed: TLC, PAGdm, medial SC, and “dorsal column”. The diameter and packing density of TLC neurons were compared with those of the PAGdm, medial SC and dorsal column using Student’s *t* test for comparisons of two groups.

Electrophysiological recordings. We recorded the activity of single neurons and small clusters of neurons in the TLC of albino Sprague Dawley rats and pigmented Long-Evans rats anesthetized with urethane. Glass-insulated tungsten electrodes (10–20 M Ω impedance at 1 kHz) were inserted into the brain vertically, ~200 μm off the midline, so that they traversed the prominent superior sagittal sinus. This maneuver resulted in hardly any bleeding while the electrode was advanced into the brain or left in place for the recordings, and only moderate bleeding after withdrawal of the electrode. We aimed preferentially at the central rostrocaudal third of the TLC, which is not crossed by fascicles of commissural fibers. In each penetration, we tested for responsiveness to light with a static flashlight or laser pointer in the darkened sound-attenuated chamber, and for responsiveness to sound with a search stimulus consisting of wideband noise at 50–80 dB SPL. Acoustic stimuli were delivered through Beyer DT-48 earphones coupled to hollow sound tubes that matched the diameter of the ear canal, with a cone of hard foam 5 mm from end of the sound tube to form a sealed system. Stimuli at each ear were calibrated in amplitude and phase through a probe tube that ran within the sound tube. The stimuli were generated using System II components from Tucker-Davis Technologies (Alachua, FL), and consisted of wideband noise and tones delivered independently to each ear. In most cases, we confirmed the location of the recording site in the TLC by identifying in histological sections an electrolytic lesion made at the end of the recording session.

Results

Size and position of the rat TLC

The rat TLC is a long and narrow nucleus that spans the midbrain tectum longitudinally, very close to the midline and dorsal to the dorsomedial column of PAGdm (Fig. 1). It extends from the caudal end of the CoIC to the rostral part of the CoSC (Fig. 1A),

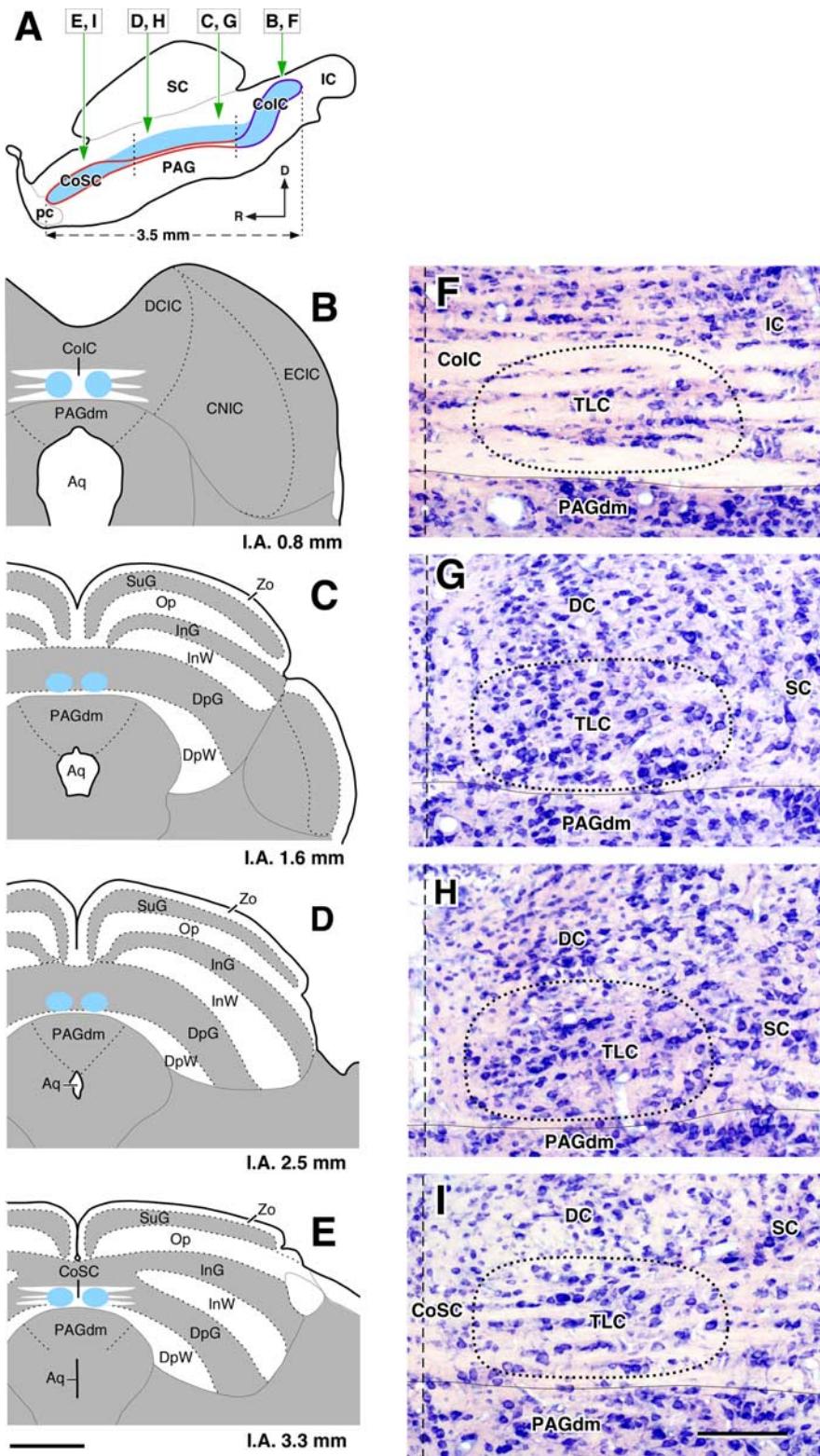


Figure 1. Size and position of the rat TLC. **A**, Schematic drawing of a very medial parasagittal section of the rat midbrain tectum 200 μm lateral to the midsagittal plane, showing the relationships between the TLC (blue), the tectal commissures and the PAG. The vertical dotted lines indicate the limits between the caudal, the central and the rostral TLC. The caudal third of the nucleus is crossed by the CoIC (outlined in violet). The rostral third of the nucleus is traversed by the enlarged, rostral half of the CoSC (outlined in red). The central third of the TLC lies above the narrow, caudal half of the CoSC. The vertical green arrows indicate the rostrocaudal level of the coronal sections shown in **B–I**. **B–E**, Schematic drawings of four idealized coronal sections of the rat midbrain tectum taken at the level of the rostral IC (**B**), and the caudal (**C**), central (**D**) and rostral (**E**) SC. The number at the bottom of each schematic indicates the distance in millimeters between the depicted plane and the interaural coronal plane (I.A.). The TLC has been represented in blue. Scale bar, 1 mm. **F–I**, Digital micrographs of four 15- μm -thick paraffin-embedded coronal sections of the rat TLC stained by the Giemsa method. Each section comes from a level that matches the one depicted in the corresponding

and is slightly tilted from caudal and dorsal to rostral and ventral. Its length is ~ 3.5 mm, and its thickness is $\sim 250 \mu\text{m}$ in the dorsoventral dimension and $350 \mu\text{m}$ in the mediolateral dimension. In parasagittal sections the TLC possesses a quasi-sigmoid shape (Fig. 1A), whereas in coronal sections it appears as a round to oval structure that occupies the angle defined by the midline and the dorsal border of the PAG (Fig. 1B–I). The distance between the medial border of the TLC and the midline (50–100 μm) is remarkably constant throughout the length of the nucleus. The number of TLC neurons on each side is $\sim 11,500$ (mean, $11,523.16 \pm 549.34$ SD, $n = 6$), as estimated using methods of unbiased stereology, and it does not differ between the two sides (t test, $p = 0.662$; left side, $11,315.66 \pm 797.55$ SD, $n = 3$; right side, $11,730.66 \pm 374.26$ SD, $n = 3$).

The TLC is hodologically distinct

The TLC is best revealed by tract-tracing experiments (Faye-Lund, 1986). We injected the sensitive retrograde tracer, FluoroGold, into the superior olive complex of adult rats (Fig. 2A,A'). FluoroGold provides excellent filling of the cell bodies and dendrites of the labeled neurons. In addition to the expected labeling in all nuclei known to innervate the superior olive complex (reviewed by Thompson and Schofield, 2000), abundant neurons were labeled in the TLC ipsilateral to the injection site (Fig. 2B–E). In the caudal and rostral TLC, labeled neurons occupied the spaces between the fascicles of commissural fibers (Fig. 2B,E), whereas in the central TLC the neurons were more closely packed (Fig. 2C,D). This dense retrograde labeling allowed the unequivocal distinction of the TLC from the adjacent medial IC, medial SC and PAGdm (Fig. 2). In the contralateral TLC, labeled neurons were scarce (Fig. 2).

In parasagittal sections, the FluoroGold-labeled TLC neurons formed a long and well defined column that spanned the midbrain tectum longitudi-

scheme on the left. The vertical dashed lines indicate the midline. Because of the commissural fascicles that cross the TLC, the neuronal density is lower in the caudal (**F**) and the rostral (**I**) thirds than in the central third (**G, H**) of the nucleus. Scale bar, 100 μm , uncorrected for shrinkage. CNIC, Central nucleus; DCIC, dorsal cortex; ECIC, external cortex; DpG, deep gray; DpW, deep white; InG, intermediate gray; InW, intermediate white; Op, stratum opticum; SuG, superficial gray; Zo, stratum zonale; Aq, cerebral aqueduct; PAGdm, dorsomedial column of the periaqueductal gray matter; pc, posterior commissure; DC, dorsal column.

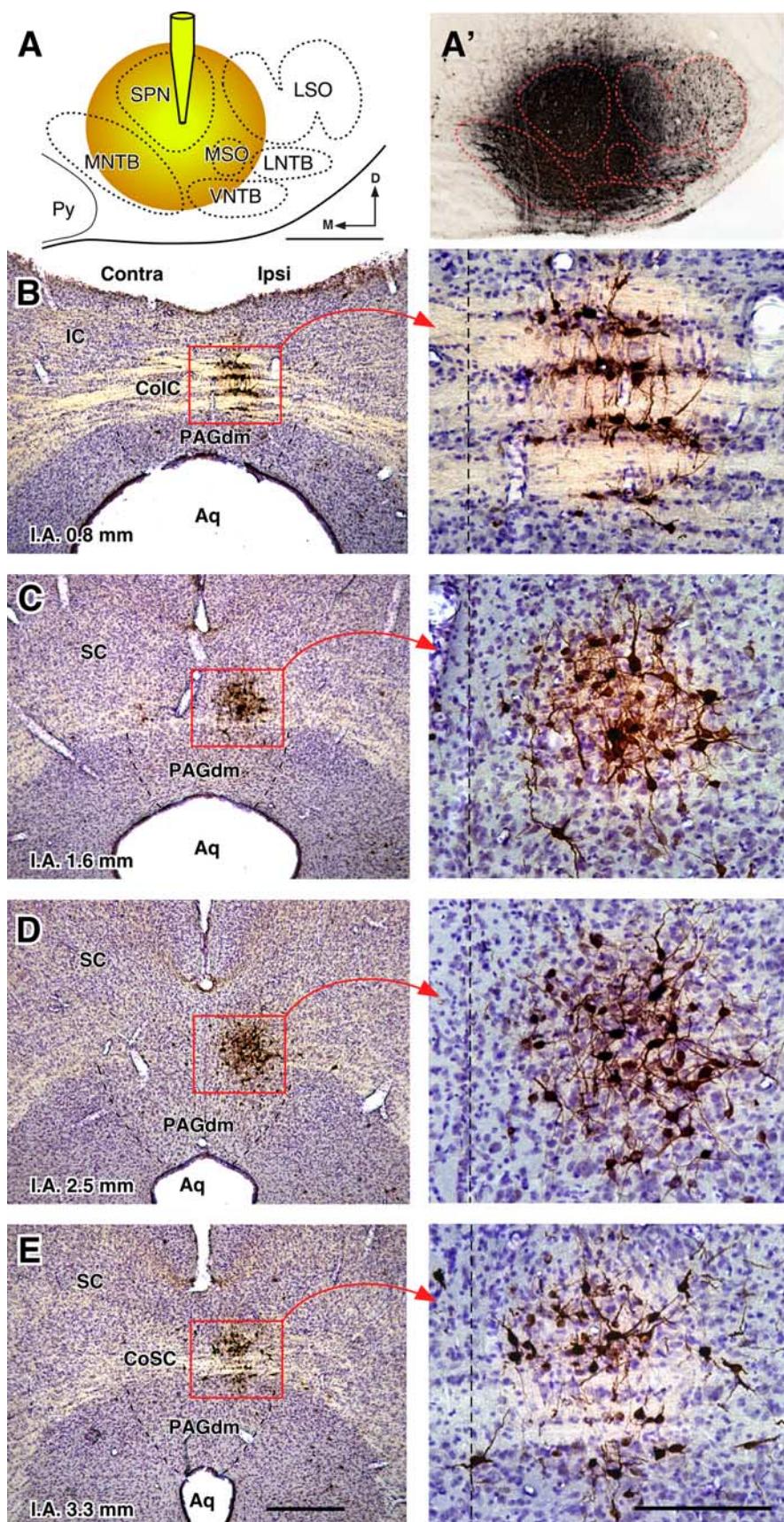


Figure 2. The TLC is labeled following injections of a retrograde tracer into the superior olivary complex. **A, A'**, Schematic drawing (**A**) and digital micrograph (**A'**) of an injection site of FluoroGold into the right superior olivary complex of the rat. The injection site included most superior olivary complex nuclei and the ventral margin of the overlying reticular formation, and spared the rostrally located pontine nuclei, the medially located pyramidal tract and the caudally located facial motor nucleus. **B–E**, Pairs

nally from the CoIC through the CoSC (Fig. 3). No labeled neurons were found in the posterior commissure.

The cylindrical, opened sigmoid shape of the TLC is best appreciated with 3D reconstructions of the position of TLC neurons labeled after injections of FluoroGold restricted to the ipsilateral superior olivary complex (Fig. 4A). The 3D reconstructions also emphasize the remarkable parallelism between the rostrocaudal axis of the TLC and the midline (Fig. 4B).

As shown in Figure 2, **A** and **A'**, our injection sites were relatively large and the tracer spread into various nuclei of the superior olivary complex. Nevertheless, a comparison between cases suggests that a higher number of retrogradely labeled TLC neurons was associated with a larger involvement of the superior paraolivary nucleus within the injection site. Moreover, the fact that numerous TLC neurons were labeled in cases in which the injection site was completely restricted to the superior olivary complex indicates that this labeling was not caused by spread of the tracer outside the complex. Retrogradely labeled neurons were observed in the PAGdm in cases in which the tracer spread into the reticular formation overlying the superior olivary complex.

The TLC is cytoarchitecturally distinct
The identification of the TLC by experimental neuroanatomy engendered the need for a cytoarchitectural study. The caudal third of the TLC is separated from the rest of the IC by a visible gap and is crossed by fascicles of axons of the CoIC (Fig. 1B, F). The central third of the TLC stands out from the neighboring medial SC because of its significantly higher neuronal density (Figs. 1G, H, 5A). It is not crossed by conspicuous commissural fascicles, as it lies immediately above the caudal half of the CoSC. At this level, the thin

of digital micrographs of four coronal sections of the rat brainstem tectum showing TLC neurons retrogradely labeled in the case whose injection site is depicted in **A** and **A'**. The number at the bottom of each left micrograph indicates the distance in millimeters between the depicted plane and the interaural coronal plane (I.A.). In each pair the picture on the right shows at higher magnification the area boxed in red. Note that labeled neurons are abundant and widespread within the right TLC, ipsilateral to the injection site, but are virtually absent in the surrounding nuclei, as well as in the left TLC. The midline is indicated by the vertical dashed line. Scale bars: **A, A'**, 0.5 mm; **E**, left, 1 mm; right, 200 μ m. Aq, Cerebral aqueduct; LNTB, lateral nucleus of the trapezoid body; LSO, lateral superior olive; MNTB, medial nucleus of the trapezoid body; MSO, medial superior olive; Py, pyramidal tract; SPN, superior paraolivary nucleus; VNTB, ventral nucleus of the trapezoid body.

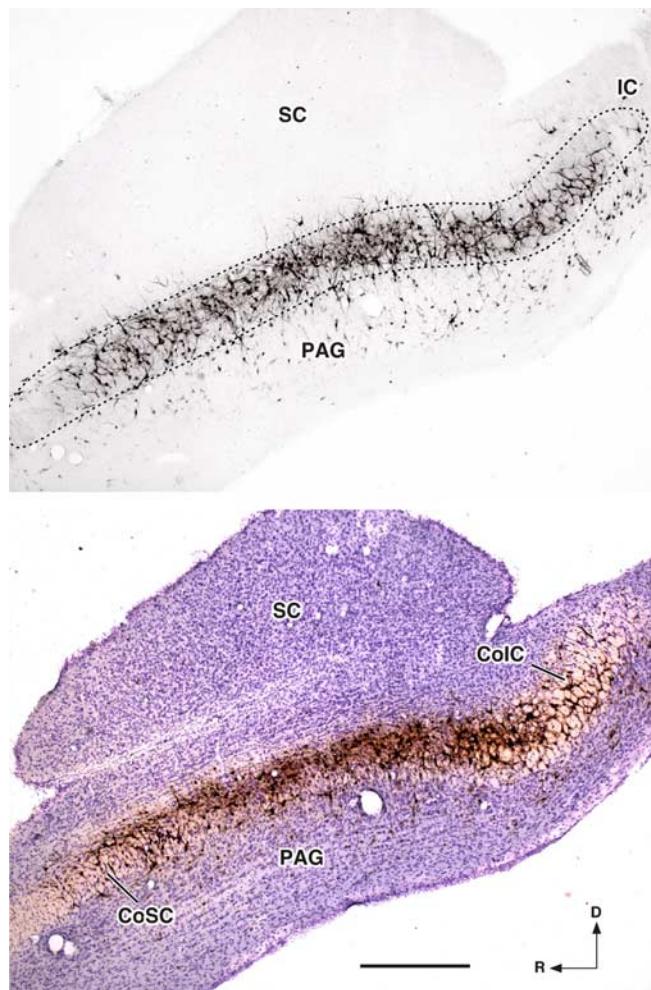


Figure 3. The full length of the rat TLC is revealed in parasagittal sections. Digital photomicrographs of two adjacent parasagittal sections through the medial midbrain tectum from a case in which the retrograde tracer FluoroGold was injected into the ipsilateral superior olive complex. Labeled neurons are visible throughout the rostrocaudal extent of the TLC. In the section at the top, the tracer was detected immunocytochemically and revealed in black with a nickel-enhanced peroxidase reaction. The section at the bottom was subsequently counterstained by the Nissl method. Scale bar, 0.5 mm. R, Rostral; D, dorsal.

fiber fascicles of the CoSC wrap around the PAG dorsally and create a sharp natural border between the TLC and the PAG (Fig. 1C,D,G,H). The rostral third of the TLC is crossed by the enlarged, rostral half of the CoSC (Fig. 1E). Accordingly, in sections through the rostral SC, the TLC neurons are distributed in horizontal rows (Fig. 1I).

The cytoarchitecture of the TLC is distinct from that of the neighboring territories (Fig. 5). TLC neurons are relatively homogeneous. Most of them have small cell bodies, with their main axis oriented rostrocaudally. Consequently, TLC somata appear elongated (average maximum diameter, 16 μm) and are distributed parallel to each other in horizontal sections (Fig. 5A), whereas in coronal sections they tend to be rounded (Fig. 5E) (average maximum diameter, 13 μm). The cell nucleus occupies most of the soma and shows several indentations (Fig. 5E). Scattered throughout the TLC are a few medium-sized neurons (average cell body diameter, 25 μm in horizontal sections and 18 μm in coronal sections), with elongated or triangular cell bodies and more abundant cytoplasm (Fig. 5A, arrow). These features of the TLC contrast with the ventrally adjacent PAGdm, whose neurons

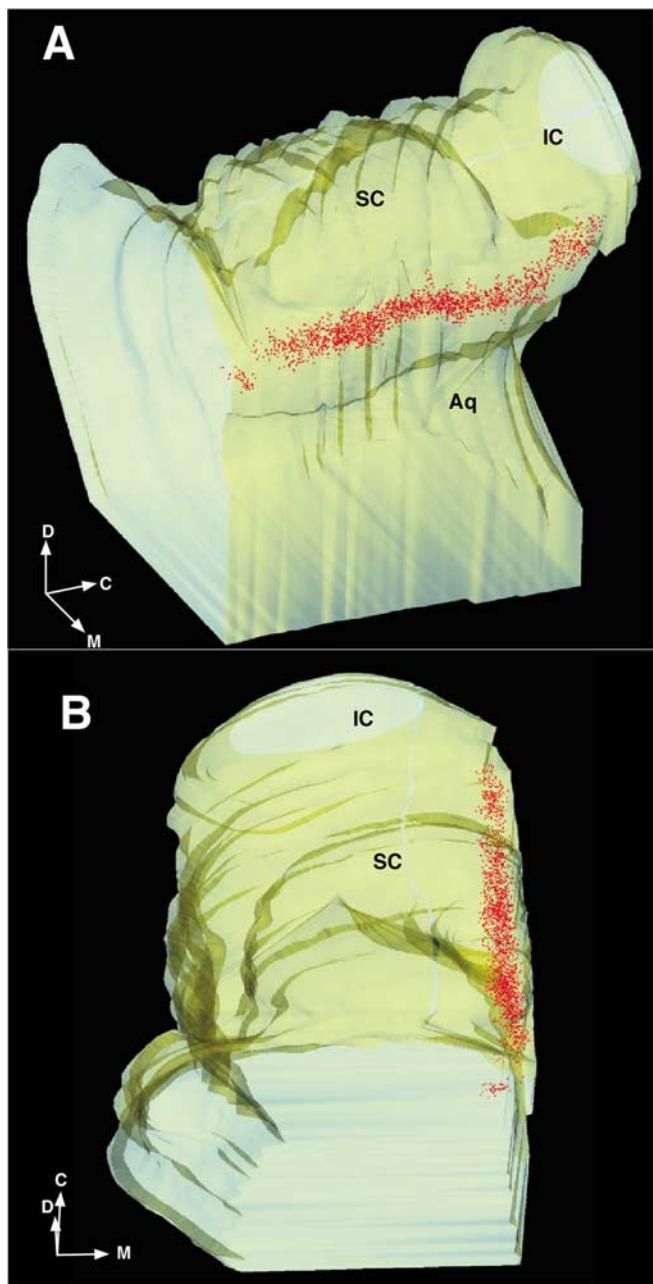


Figure 4. Three-dimensional reconstruction of the rat TLC. Three-dimensional reconstruction of the position of TLC neurons retrogradely labeled after an injection of FluoroGold into the right superior olive complex. To favor the observation of the labeled neurons, the left side of the mesencephalon has been removed and the right side is depicted as a semitransparent, yellow solid structure. Each red dot represents one TLC labeled neuron. To provide a sharper, cleaner image, the 3D reconstruction was based on every other section; therefore, the actual number of labeled neurons was considerably higher than the number of dots. When all of the sections are used for the 3D reconstruction, the seemingly isolated group of neurons in the rostral end of the TLC is clearly identified as part of the nucleus. **A**, View from a point located in the left side and slightly elevated. **B**, View from a point located rostral and dorsal. The vision angle is roughly parallel to the midline and forms a 45° angle with the horizontal plane. Many more neurons were labeled in the central third of the TLC than in the caudal rostral thirds. M, Medial; C, caudal; D, dorsal; Aq, cerebral aqueduct.

show greater heterogeneity, larger average size (t test, $p < 0.0001$; TLC, $n = 132$; PAGdm, $n = 175$), darker Nissl staining, lower packing density (t test, $p < 0.0001$; TLC, $n = 100$; PAGdm, $n = 100$; n here refers to number of squares where cells were counted) (see Materials and Methods) and random orientation of the cell

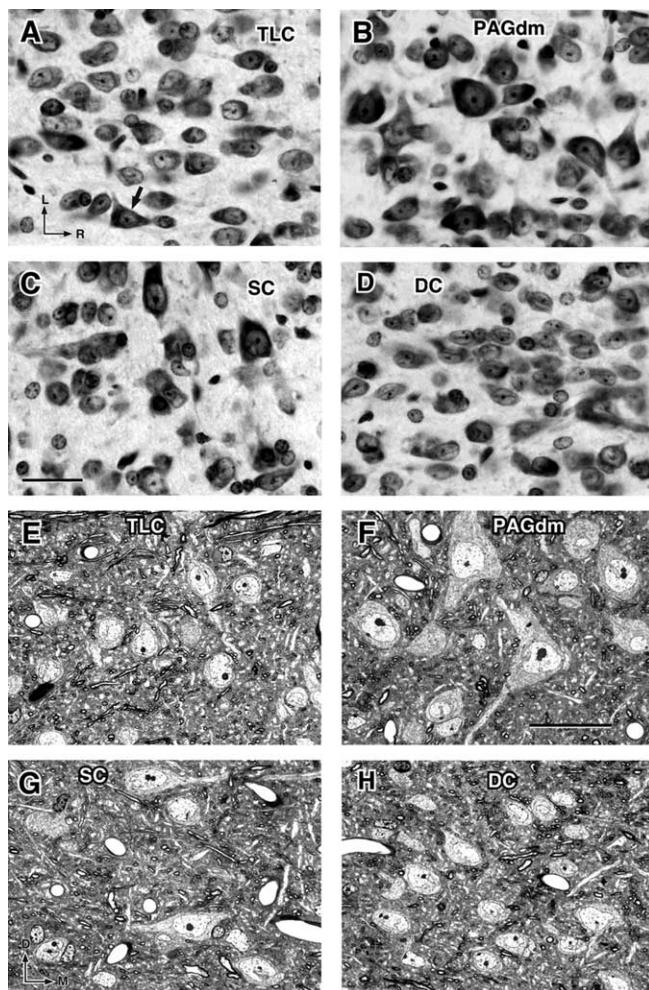


Figure 5. Cytoarchitectural features of the rat TLC. **A–D**, Digital micrographs of 15 μm -thick, paraffin embedded, horizontal sections of the rat midbrain tectum stained by the Nissl method. They illustrate the typical cytoarchitectural features of the TLC (**A**), PAGdm (**B**), medial SC (**C**), and dorsal column (DC) (**D**). The arrow in **A** indicates a typical medium-sized neuron. All four microscopic fields come from a similar rostrocaudal level that corresponds to the central third of the TLC. Scale bar: 25 μm , uncorrected for shrinkage. **E–H**, High-magnification digital micrographs taken from a single semithin, coronal section through the central third of the TLC. They illustrate the typical cytoarchitectural features of the TLC (**E**), PAGdm (**F**), medial SC (**G**), and dorsal column (**H**). Toluidine blue stain. Scale bar, 25 μm .

bodies (Fig. 5*B,F*). TLC neurons also contrast with the laterally adjacent deep SC, whose neurons are also larger (t test, $p < 0.0001$; TLC, $n = 132$; SC, $n = 185$), less densely packed (t test, $p < 0.0001$; TLC, $n = 100$; SC, $n = 100$), and more heterogeneous in size, shape and orientation (Fig. 5*C,G*). No TLC neuron is as large as the large neurons in the PAGdm, the medial deep SC or the medial IC. Notably, IC neurons tend to be more triangular or multipolar than TLC neurons.

Dorsal to the TLC is a distinct territory characterized by a homogeneous population of small neurons whose orientation and cytological features resemble at first glance those of TLC small neurons (Figs. 1*G–I*, 5*D,H*). This dorsal territory may constitute another distinct and previously unnoticed columnar nucleus that parallels the TLC and whose further characterization awaits future studies. We will refer to this neuronal assembly dorsal to the TLC as the dorsal column. The dorsal column can be distinguished from the TLC because: (1) its neuronal somata are slightly, but significantly smaller than those of TLC small neurons (t test, $p < 0.0001$; TLC, $n = 111$; dorsal column, $n = 122$), (2) it

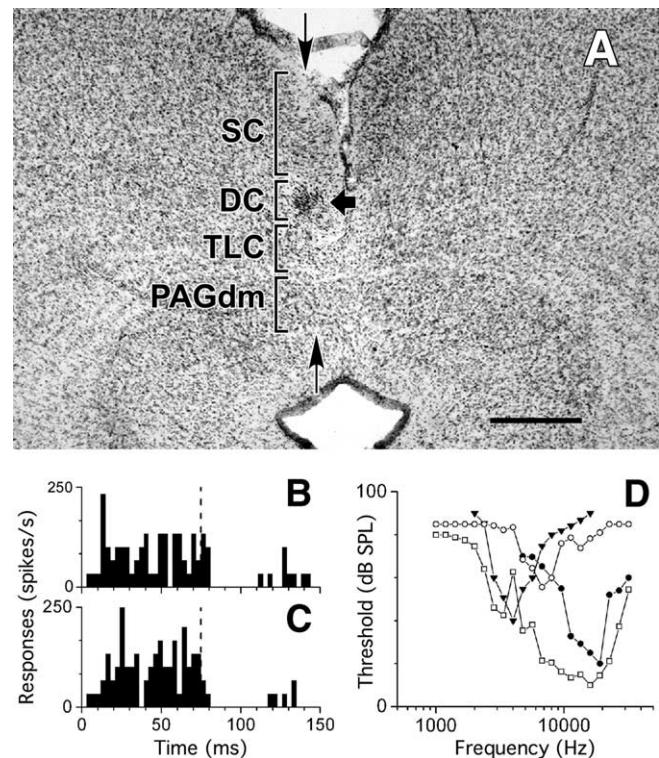


Figure 6. Responses of TLC neurons to acoustic stimuli. **A**, Digital micrograph of a coronal section of the rat midbrain tectum with a visible electrode tract. The dorsal and ventral ends of the tract are indicated by the vertical arrows. As the electrode advanced dorsoventrally, it successively crossed the medial superficial SC, the dorsal column (DC), the TLC, and the PAGdm, whose limits are indicated by brackets. The thick arrow points to an electrolytic lesion made in the DC as the electrode was withdrawn past the auditory responsive TLC. Scale bar, 1 mm. **B**, Poststimulus time histogram of the response of a single neuron to the auditory search stimulus (wideband noise, 0–12000 Hz at 80 dB SPL) applied to both ears. The end of the stimulus period (75 ms) is indicated by the dashed line. **C**, Poststimulus time histogram of the response of the same neuron as in **B** to a tone at best frequency (18.5 kHz at 70 dB SPL) applied to both ears. The end of the stimulus period (75 ms) is indicated by the dashed line. **D**, Representative tuning curves from single neurons in the TLC. A mix of neurons with broad and narrow tuning was seen.

lacks for the most part neurons comparable with TLC medium-sized neurons, (3) its neuronal packing density is significantly higher than that of the TLC (t test, $p < 0.0001$; TLC, $n = 100$; dorsal column, $n = 100$), (4) it is not traversed by fascicles of the CoIC or the CoSC, (5) its neurons are not labeled after injections of FluoroGold into the superior olfactory complex (Fig. 2), and (6) as explained below, its electrophysiological features differ from those of the TLC.

The TLC is electrophysiologically distinct

Because TLC neurons are labeled after injections of retrograde tracers into the superior olfactory complex (Faye-Lund, 1986; present study), the TLC was examined physiologically to determine whether its neurons were responsive to sound. As albino and pigmented rats are known to differ in various aspects of the structure and physiology of their auditory systems (for review, see Grant and Binns, 2003), we recorded from single neurons and small clusters of neurons ($n = 87$) in the TLC of Sprague Dawley and Long–Evans rats, with similar results for both strains. After traversing the cerebral cortex, a typical vertical electrode penetration (Fig. 6*A*) encountered light-sensitive neuronal responses in the SC. No auditory responsiveness was encountered in this extremely medial part of the superficial SC. This light-sensitive region was followed by a 200- to 300- μm -wide gap with no neural

responses to sound or light, which presumably corresponded to the aforementioned dorsal column. The electrode then entered the TLC, marked by a clear and often robust background of auditory responsiveness, and no sensitivity to light. Past the TLC, the electrode entered the PAGdm, where neurons did not respond to acoustic stimuli. Figure 6B shows a representative example of the responses of a single TLC neuron to the auditory search stimulus (wideband noise, 0–12000 Hz), and a comparable response to tones at the unit's best frequency (18.5 kHz) is shown in Figure 6C. These responses were sustained, which was the most common response in TLC neurons. The sharpness of frequency tuning and thresholds varied among TLC neurons, as shown by a few representative tuning curves from single neurons (Fig. 6D). Across neurons, the first spike latencies tended to be long (median of 18.6 ms, semi-interquartile range of 5.97 ms).

These results indicate that TLC neurons are indeed responsive to acoustic stimuli. A comparison with data from the literature reveals that the responses of TLC neurons to sound are different from those of SC neurons. All TLC neurons in our sample responded to sound, but not to static visual stimuli, whereas 21% of the auditory-responsive neurons in the rat SC also respond to static visual stimuli (Gaese and Johnen, 2000). Moreover, the characteristic frequencies of TLC neurons were widely distributed within the hearing range of the animal, and this finding differs from the predominance of neurons with high characteristic frequency in the deep SC of the cat (Wise and Irvine, 1983; Hirsch et al., 1985). Finally, the sustained responses to sound in most TLC neurons are uncommon among auditory-responsive neurons in the cat SC (Hirsch et al., 1985).

The responses of TLC neurons differ also from those of rat IC neurons. First, although our responses were sampled throughout the rostrocaudal extent of the TLC, no tonotopic organization was evident; this observation clearly contrasts with the well known tonotopic map of the IC (Kelly et al., 1991). Moreover, tuning curves and frequency response areas were in general somewhat wider in the TLC than in the IC (Kelly et al., 1991; Hernández et al., 2005), which indicates that TLC neurons are less selective to sound frequency. This is particularly true for neurons sensitive to high frequency sounds, whose outstanding frequency selectivity in the IC (Kelly et al., 1991; Hernández et al., 2005) was not matched by the corresponding neurons in the TLC. Furthermore, sustained responses were more common in the TLC than in the IC. Finally, the median response latencies were considerably longer in the TLC than in the IC (Kelly et al., 1991).

The TLC is present in a large variety of mammals

To determine whether the existence of the TLC is species specific or is evolutionarily conserved, we examined histological sections of the midbrain tectum of various mammalian species frequently

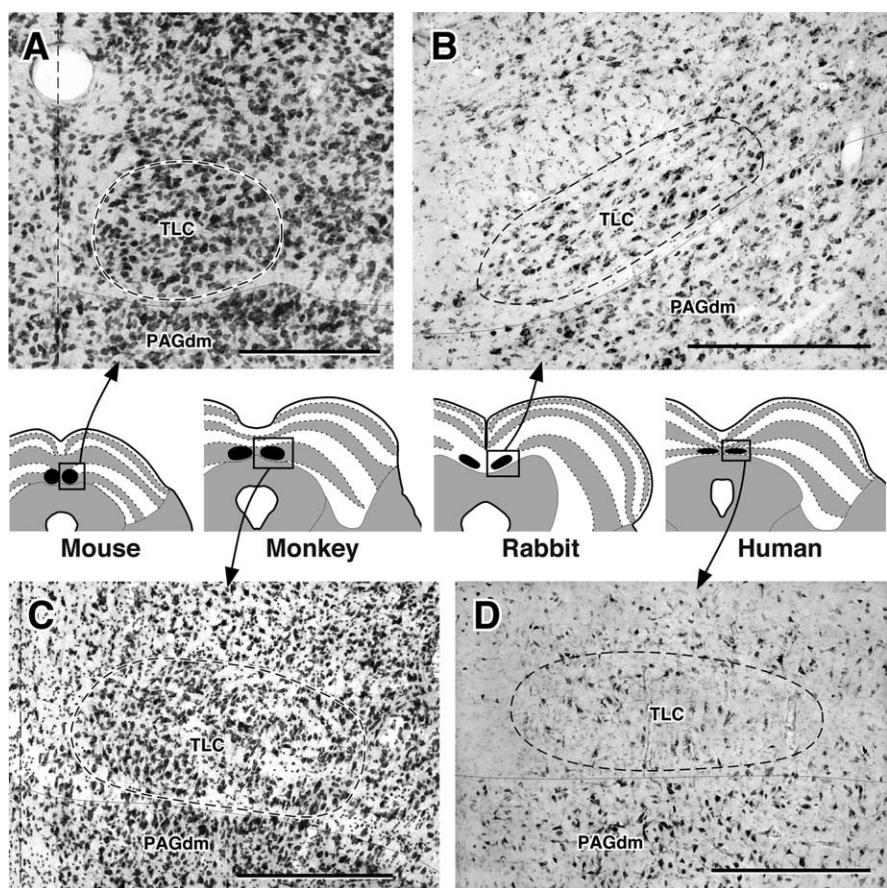


Figure 7. Comparative anatomy of the TLC. **A–D**, Digital micrographs of coronal sections through the central third of the TLC of the mouse (**A**), rabbit (**B**), crab-eating monkey (**C**), and human (**D**). Each micrograph is accompanied by a schematic line drawing that shows the position of the TLC. The TLC has been highlighted with dashed lines in the micrographs, and in black in the schemes. Despite interspecies differences in the size and shape of the nucleus, its proximity to the midline and its position dorsal to the PAG are remarkably constant. Scale bars: **A**, 200 μ m; **B–D**, 0.5 mm.

used as experimental animals, as well as sections of human brain-stems. Without exception, the TLC was readily distinguished from the neighboring nuclei by a host of cytoarchitectural criteria (Nieuwenhuys, 1998), including neuronal density and the shape, size, orientation and staining pattern of its cell bodies. By morphologic criteria, the identification of the TLC in the mesencephalon of *Rattus norvegicus* was extended to mouse (*Mus musculus*), gerbil (*Meriones unguiculatus*), hamster (*Mesocricetus auratus*), chinchilla (*Chinchilla lanigera*), guinea pig (*Cavia porcellus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), cat (*Felis catus*), ferret (*Mustela putorius*), crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*), and human (*Homo sapiens sapiens*). Figure 7 shows representative micrographs of the TLC in some of these species.

Discussion

The TLC: a distinct nucleus of the mammalian brain

Our data derived from studies of fiber connections, cytoarchitecture and electrophysiologic recordings demonstrate that the TLC is a distinct nucleus of the rat brain. It has connections with auditory centers and its neurons are responsive to auditory stimuli. Despite its narrow appearance in coronal sections, the size of this longitudinally oriented structure is impressive: in the rat its length (3.5 mm) represents almost 20% of the entire cerebral length, and the nucleus contains as many neurons, or more, than other auditory centers of the brainstem, including many nuclei of

the superior olfactory complex and lateral lemniscus (Kulesza et al., 2002).

It may seem surprising that a nucleus as large as the TLC has remained unnoticed until now. Several factors, some of them technical, may have contributed to this neglect. First, the midsagittal plane is covered by the superior sagittal sinus, a vessel whose large diameter and abundant blood flow may act as deterrent for numerous experiments. Second, the cytoarchitecture of the TLC, although distinct at close inspection, shares some similarities with the medial border of the SC, which explains why the territory occupied by the rostral two-thirds of the TLC has been traditionally considered the most medial part of the deep SC (Olszewski and Baxter, 1954; Bereman, 1968; Swanson, 1999; Hof et al., 2000; Paxinos and Watson, 2005). Third, with respect to the caudal third of the TLC, located within the IC, previous authors have mentioned a “commissural nucleus” or “interstitial nucleus” between the midline and the medial border of the dorsal cortex of the IC. However, the commissural region identified by these authors includes, but is not limited to, the caudal third of the TLC, and its continuity with the rostral two-thirds of the TLC was not in general noted (Geniec and Morest, 1971; Willard and Ryugo, 1983; Morest and Oliver, 1984; Faye-Lund and Osen, 1985; Herrera et al., 1987, 1988a,b). Finally, another reason that the TLC may have gone unnoticed is that many commonly used neurochemical markers do not highlight the nucleus. For example, in sections of the rat midbrain stained for parvalbumin, calbindin, calretinin, substance P, calcitonin gene-related peptide, neurofilament protein (SMI-32), tyrosine hydroxylase, NADPH-diaphorase, acetylcholinesterase, or adenosine deaminase, the TLC is hardly distinguishable (Miguel-Hidalgo et al., 1989; Paxinos et al., 1999).

Some reports in the literature did identify important features of the TLC, adding strength to its present characterization. After injection of a retrograde tracer in the superior olfactory complex, Faye-Lund (1986) reported “a distinct group of labeled cells in the commissure of the IC, close to the midline on the application side. Rostrally the cell group continued into the medialmost part of the superior colliculus.” Saldaña and Merchán (1992) reported that some of the fibers of the rat IC that traveled in the CoIC gave off collaterals that created two terminal fields, one on each side of the midline, which extended rostrally and reached the level of the SC [Saldaña and Merchán (1992), their Figs. 4A–D, 7A–D]. Shortly thereafter, Saldaña et al. (1996) noticed terminal fields in the same location formed by collaterals of auditory corticocollicular fibers that crossed the CoIC [Saldaña et al. (1996), their Fig. 9B,C]. Furthermore, a continuous pool of neurons expressing high levels of glutamic acid decarboxylase, the synthesizing enzyme for GABA, was reported at the CoIC and the CoSC of the rat (Mugnaini and Oertel, 1985). Together, these findings support a role for the TLC in auditory function and the extent of the TLC described in the present study.

In conclusion, the organization of the TLC is clearly different from the concentric fibrocellular laminas of the IC (Saldaña and Merchán, 2005) and from the alternating horizontal layers of gray and white matter of the SC (May, 2005). It also differs from the mosaic-like pattern of vertical patches and modules found throughout the SC (Chevalier and Mana, 2000; Harting, 2004). Therefore, the discovery of the TLC reveals unexpected levels of longitudinal organization in the mammalian midbrain tectum. Interestingly, the longitudinal axis of the TLC is in register with the axis of the functional columns of

the PAG (Behbehani, 1995; Ruiz-Torner et al., 2001). Although the close apposition between the TLC and the PAGdm (Beitz and Shepard, 1985; Herrera et al., 1988b) raises interesting functional questions, we do not consider the TLC as a dorsal extension of the PAG, because these two structures differ markedly in their cytoarchitecture, relationship with the tectal commissures, connections and electrophysiology.

What is the role of the TLC?

Despite the limited information currently available about the TLC, our results provide a conceptual framework for future studies. The fact that the TLC is found in species as different as rodents, lagomorphs, carnivores and primates suggests that it may be common to all terrestrial mammals, or even to the entire mammalian class. The function of the TLC is, therefore, probably shared by a large variety of animals.

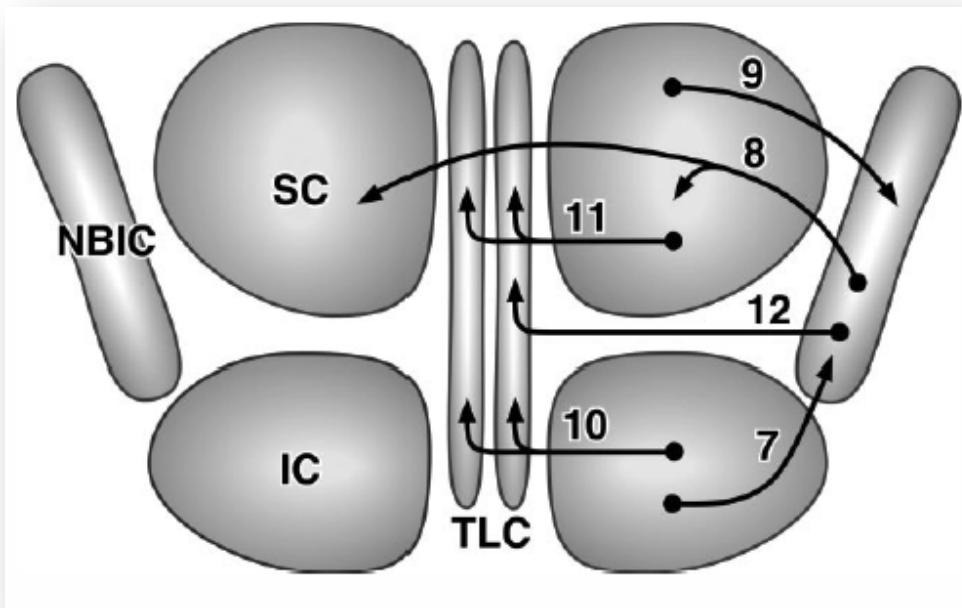
Insight into the biological significance of the TLC can be gained from its physiology and connections. In the rat, the TLC is innervated by the IC (Saldaña and Merchán, 1992) and by the auditory neocortex (Saldaña et al., 1996), and similar connectivity is apparent in the cat (Morest and Oliver, 1984). Moreover, the TLC is crossed by the CoIC, which includes projections from yet additional auditory structures, including the superior paraolivary nucleus, the sagulum and the nuclei of the lateral lemniscus (Saldaña and Merchán, 2005). These putative connections with multiple auditory centers, combined with responsiveness to auditory stimuli demonstrated here, suggest that TLC neurons are involved in the processing of acoustic information. The long latencies with which most TLC neurons respond to sound indicate that the nucleus is probably not part of the core ascending auditory pathway, but likely serves a role in descending auditory pathways. This suggestion is supported by the tract-tracing experiments, which show that TLC neurons project to the ipsilateral superior olfactory complex.

Additional studies are needed to determine whether the TLC is involved in multisensory and/or sensorimotor integration, a role that would be consistent with its tectal location. Previous studies have shown that certain auditory nuclei that were previously considered predominantly unimodal play a role in multisensory processing (Bulkin and Groh, 2006). Moreover, the TLC is crossed by the CoSC, a complex tract that contains axons from over forty tectal and nontectal sources (Huerta and Harting, 1984) and whose contribution to the innervation of the TLC remains unknown. It will be particularly interesting to establish whether TLC neurons receive direct input from commissural SC neurons, most of which participate in the processing of visual information (McIlwain, 1991). The fact that the crossed projections of the SC innervate the most medial regions of the SC (Yamasaki et al., 1984; Rhoades et al., 1986; Behan and Kime, 1996; Chebat et al., 2006) lends support to this possibility. Extending our knowledge of the auditory properties of TLC neurons, determining their responses to light and other sensory modalities, and unraveling the afferent and efferent connections of the nucleus will lead to a much better understanding of its functional significance.

The TLC presents itself as an unexpected and promising focus for future research on mammalian auditory function. Knowledge about the nucleus is still rudimentary but, with currently available technologies, neuroscientists should be able to accomplish in a few years what took many decades to achieve in other nuclei of the brain.

References

- Aitkin L (1986) The auditory midbrain: structure and function in the central auditory pathway. Clifton, NJ: Humana.
- Behan M, Kime NM (1996) Spatial distribution of tectotectal connections in the cat. *Prog Brain Res* 112:131–142.
- Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46:575–605.
- Beitz AJ, Shepard RD (1985) The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis. *J Comp Neurol* 237:460–475.
- Berman AL (1968) The brain stem of the cat: a cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates. Madison, WI: University of Wisconsin.
- Bulkin DA, Groh JM (2006) Seeing sounds: visual and auditory interactions in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 16:415–419.
- Chebat DR, Boire D, Ptito M (2006) Development of the commissure of the superior colliculus in the hamster. *J Comp Neurol* 494:887–902.
- Chevalier G, Mana S (2000) Honeycomb-like structure of the intermediate layers of the rat superior colliculus, with additional observations in several other mammals: AChE patterning. *J Comp Neurol* 419:137–153.
- Edwards SB (1977) The commissural projection of the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 173:23–40.
- Faye-Lund H (1986) Projection from the inferior colliculus to the superior olfactory complex in the albino rat. *Anat Embryol (Berl)* 175:35–52.
- Faye-Lund H, Osen KK (1985) Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol (Berl)* 171:1–20.
- Gaese BH, Johnen A (2000) Coding for auditory space in the superior colliculus of the rat. *Eur J Neurosci* 12:1739–1752.
- Geniec P, Morest DK (1971) The neuronal architecture of the human posterior colliculus. A study with the Golgi method. *Acta Otolaryngol [Suppl]* 295:1–33.
- Grant S, Binns KE (2003) Reduced influence of the ipsilateral ear on spatial tuning of auditory neurons in the albino superior colliculus: a knock-on effect of anomalies of the acoustic chiasm? *Exp Brain Res* 151:478–488.
- Gundersen HJ (1988) The nucleator. *J Microsc* 151:3–21.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857–881.
- Hall WV, Moschovakis A (2004) The superior colliculus: new approaches for studying sensorimotor integration. Boca Raton, FL: CRC.
- Harting JK (2004) Puffs and patches: a brief chronological review. In: *The superior colliculus: new approaches for studying sensorimotor integration* (Hall WV, Moschovakis A, eds), pp 83–105. Boca Raton, FL: CRC.
- Hernández O, Espinosa N, Pérez-González D, Malmierca MS (2005) The inferior colliculus of the rat: a quantitative analysis of monaural frequency response areas. *Neuroscience* 132:203–217.
- Herrera M, Sánchez del Campo F, Smith Agreda V (1987) The commissural nucleus of the inferior colliculus in the rabbit. A morphological study. *J Hirnforsch* 28:671–683.
- Herrera M, Sánchez del Campo F, Puchades Orts A (1988a) Cytoarchitecture and axonal systems in the commissural nucleus of the inferior colliculus in the albino rat. A Golgi study. *J Hirnforsch* 29:165–174.
- Herrera M, Sánchez del Campo F, Ruiz A, Smith Agreda V (1988b) Neural relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus (nucleus commissuralis) in the cat. A Golgi study. *J Anat* 158:137–145.
- Hirsch JA, Chan JC, Yin TCT (1985) Responses of neurons in the cat's superior colliculus to acoustic stimuli. I. Monaural and binaural response properties. *J Neurophysiol* 53:726–745.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000) Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains. Amsterdam: Elsevier.
- Huerta MF, Harting JK (1984) The mammalian superior colliculus: studies of its morphology and connections. In: *Comparative neurology of the optic tectum* (Vanegas H, ed), pp 687–773. New York: Plenum.
- Íñiguez C, Gayoso MJ, Carreres J (1985) A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. *J Neurosci Methods* 13:77–86.
- Kelly JB, Glenn SL, Beaver CJ (1991) Sound frequency and binaural response properties of single neurons in rat inferior colliculus. *Hear Res* 56:273–280.
- King AJ (2004) The superior colliculus. *Curr Biol* 14:R335–R338.
- Kulesza RJ, Viñuela A, Saldaña E, Berrebi AS (2002) Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. *Hear Res* 168:12–24.
- Leergaard TB, Bjaalie JG (1995) Semi-automatic data acquisition for quantitative neuroanatomy. *MicroTrace-computer programme for recording of the spatial distribution of neuronal populations. Neurosci Res* 22:231–243.
- May PJ (2005) The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res* 151:321–378.
- McIlwain JT (1991) Visual input to commissural neurons of the cat's superior colliculus. *Vis Neurosci* 7:389–393.
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Matsutani S, Takatsuji K, Fukui H, Tohyama M (1989) Laminar and segregated distribution of immunoreactivities for some neuropeptides and adenosine deaminase in the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 280:410–423.
- Morest DK, Oliver DL (1984) The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J Comp Neurol* 222:209–236.
- Mugnaini E, Oertel WH (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunocytochemistry. In: *Handbook of chemical neuroanatomy, Vol IV, GABA and neuropeptides in the CNS, Pt I* (Björklund A, Hökfelt T, eds), pp 436–608. Amsterdam: Elsevier.
- Nieuwenhuys R (1998) Structure and organization of centres. In: *The central nervous system of vertebrates* (Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C, eds), pp 113–157. Berlin: Springer.
- Olivier E, Corvisier J, Pauluis Q, Hardy O (2000) Evidence for glutamatergic tectotectal neurons in the cat superior colliculus: a comparison with GABAergic tectotectal neurons. *Eur J Neurosci* 12:2354–2366.
- Olszewski J, Baxter D (1954) *Cytoarchitecture of the human brainstem*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.
- Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Ed 5. San Diego: Elsevier-Academic.
- Paxinos G, Kus L, Ashwell K, Watson C (1999) *Chemoarchitectonic atlas of the rat forebrain*. San Diego: Elsevier-Academic.
- Rhoades RW, Mooney RD, Szczepanik AM, Klein BG (1986) Structural and functional characteristics of commissural neurons in the superior colliculus of the hamster. *J Comp Neurol* 253:197–215.
- Ruiz-Torner A, Olucha-Bordonau F, Valverde-Navarro AA, Martínez-Soriano F (2001) The chemical architecture of the rat's periaqueductal gray based on acetylcholinesterase histochemistry: a quantitative and qualitative study. *J Chem Neuroanat* 21:295–312.
- Saldaña E, Merchán MA (1992) Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 319:417–437.
- Saldaña E, Merchán MA (2005) Intrinsic and commissural connections of the inferior colliculus. In: *The inferior colliculus* (Winer JA, Schreiner CE, eds), pp 155–181. New York: Springer.
- Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E (1996) Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 371:15–40.
- Sparks DL, Nelson IL (1987) Sensory and motor maps in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci* 10:312–317.
- Swanson LW (1999) *Brain maps: structure of the rat brain*, Ed 2. New York: Elsevier.
- Thompson AM, Schofield BR (2000) Afferent projections of the superior olfactory complex. *Microsc Res Tech* 51:330–354.
- Willard FH, Ryugo DK (1983) Anatomy of the central auditory system. In: *The auditory psychobiology of the mouse* (Willot JF, ed), pp 201–304. Springfield, IL: Charles C. Thomas.
- Winer JA, Schreiner CE (2005) *The inferior colliculus*. New York: Springer Science and Business Media.
- Wise LZ, Irvine DR (1983) Auditory response properties of neurons in deep layers of cat superior colliculus. *J Neurophysiol* 49:674–685.
- Yamasaki DS, Krauthamer G, Rhoades RW (1984) Organization of the intercollicular pathway in rat. *Brain Res* 300:368–371.



ANEXO II

Aparicio MA, Saldaña E (2009) Tectotectal neurons and projections: a proposal to establish a consistent nomenclature. *Anat Rec (Hoboken)* 292:175-177.

Tectotectal Neurons and Projections: A Proposal to Establish a Consistent Nomenclature

MARÍA AUXILIADORA APARICIO^{1,2} AND ENRIQUE SALDAÑA^{1,3*}

¹Laboratory for the Neurobiology of Hearing, Neuroscience Institute of Castilla y León (INCYL), University of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

²Department of Pathology, Clinical University Hospital of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

³Department of Cell Biology and Pathology, Medical School, University of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

Two hallmarks of proper scientific language are precision and clarity. While precision requires that scientific terms define accurately what they mean, clarity is achieved only if, in a given context, each term can be applied exclusively to one object or phenomenon. Here we propose a systematic nomenclature for the neural projections established among structures of the mammalian midbrain tectum, a region of the central nervous system that suffers from considerable terminological confusion.

Traditionally, nerve fiber tracts in the central nervous system are named according to their site of origin and their place of destination. For example, corticospinal fibers are those that originate in the cerebral cortex and end in the spinal cord, just as the olivocochlear bundle arises from parent cell bodies located in the superior olive and carries axons to the cochlea. Accordingly, axons that originate in the tectum and end in the tectum are, by definition, *tectotectal*, and *tectotectal neurons* are tectal neurons that innervate other tectal neurons. Indeed, the adjective *tectotectal* has been widely used in the neuroanatomical literature. It is our contention, however, that the term *tectotectal*, which is technically correct, is often scientifically ambiguous, because, as discussed below, tectotectal projections are numerous and varied.

CLASSICAL TECTOTECTAL PROJECTIONS

The mammalian midbrain tectum consists largely of the paired inferior colliculi (IC) and the paired superior colliculi (SC). Therefore, any projection that originates in any of the four colliculi (or *corpora quadrigemina*) and ends in the same or a different colliculus is tectotectal. At first glance, there appear to be six obvious types of tectotectal projections, illustrated schematically in Fig. 1:

- 1) Most, if not all, IC neurons innervate other neurons within the same IC. These *intrinsic axons of the IC* form a system of dense and topographically organized terminal plexuses (Saldaña and Merchán, 2005).
- 2) Many IC neurons send their axons across the commissure of the IC to innervate the contralateral IC. These commissural axons of the IC form terminal

plexuses that mirror those formed by the intrinsic axons of the IC (Saldaña and Merchán, 2005).

- 3) Many SC neurons innervate other neurons within the same SC. Among the abundant and varied *intrinsic projections of the SC*, the projections from the superficial to the deep layers have recently attracted considerable attention, as they seem essential for the integration and alignment of the maps of different sensory modalities within the SC (e.g., King et al., 1998a; Doubell et al., 2003).
- 4) Many SC neurons innervate neurons in the contralateral SC. These *commissural axons of the SC* travel in the enlarged, rostral half of the commissure of the SC to end in areas of the contralateral SC that include, but are not limited to, the area homotopic to the location of their parent cell bodies (Edwards, 1977; Rhoades et al., 1986; Behan and Kime, 1996).
- 5) Some IC neurons send their axons to the ipsilateral SC and, rarely, to the contralateral SC. Although most of the information flow from the IC to the SC seems to require at least one synapse in the nucleus of the brachium of the IC (see below), the SC gets sparse, direct input from neurons in the IC, particularly those located in the so-called rostral pole of the IC (Harting and Van Lieshout, 2000).
- 6) Some SC neurons send their axons to the ipsilateral IC and, rarely, to the contralateral IC (Winer et al., 2002).

OTHER TECTOTECTAL PROJECTIONS

The list of possible tectotectal projections grows considerably if one considers two more tectal nuclei: the nucleus of the brachium of the IC (NBIC) and the

*Correspondence to: Enrique Saldaña, MD, PhD, Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL), Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain. Fax: 34-92-329-4750. E-mail: saldana@usal.es

Received 21 August 2008; Accepted 14 October 2008

DOI 10.1002/ar.20837

Published online 16 December 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

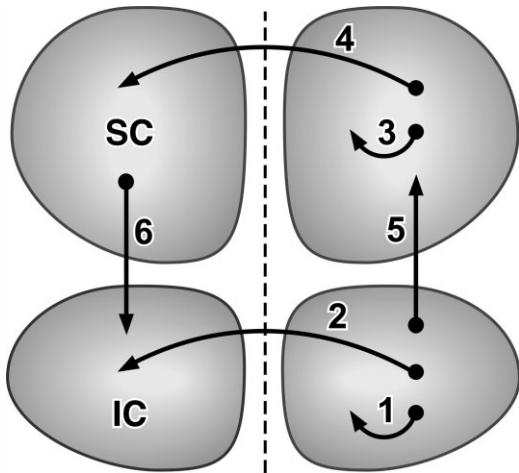


Fig. 1. Classical tectotectal projections involving the IC and/or the SC. The projections have been represented over an idealized, dorsal view of the surface of the *corpora quadrigemina*. The dashed line indicates the midline. Rostral is to the top. 1: Intrinsic projections of the IC. 2: Commissural projections of the IC. 3: Intrinsic projections of the SC. 4: Commissural projections of the SC. 5: Projections from the IC to the ipsilateral SC. For the sake of clarity, the scarce projection to the contralateral SC has not been included in the scheme. 6: Projections from the SC to the ipsilateral IC. For the sake of clarity, the scarce projection to the contralateral IC has not been included in the scheme.

recently discovered tectal longitudinal column (TLC). The tectotectal projections involving the NBIC or the TLC, explained below, are illustrated schematically in Fig. 2:

- 7) The NBIC consists of neurons, interspersed among the fibers of the brachium of the IC, which convey auditory information from the IC to the medial geniculate body of the thalamus. As expected from this location, the NBIC receives dense projections from the ipsilateral IC (Kudo and Niimi, 1980).
- 8) The NBIC innervates densely the ipsilateral and contralateral SC and these projections seem essential for the emergence of a map of auditory space in the intermediate and deep layers of the SC (King et al., 1998b; Nodal et al., 2005).
- 9) The connections between the NBIC and the SC are reciprocal, as the NBIC receives significant, topographically organized input back from the ipsilateral SC (Doubell et al., 2000).
- 10) The TLC is a long, narrow nucleus that spans the mammalian tectum longitudinally. It is situated close to the midline and immediately dorsal to the periaqueductal gray matter (Saldaña et al., 2007), and its neurons are involved in the processing of auditory information (Marshall et al., 2008). The TLC receives projections from the ipsilateral and contralateral IC (Saldaña and Merchán, 1992).
- 11) The TLC also receives direct projections from the ipsilateral and contralateral SC (Rhoades et al., 1986; Chebat et al., 2006).
- 12) Our own unpublished results indicate that the ipsilateral NBIC is a major source of input to the TLC.

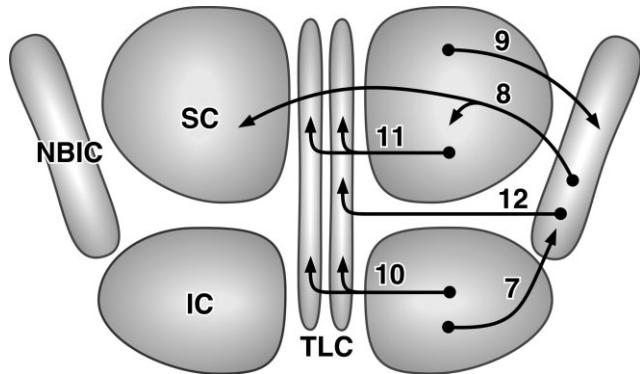


Fig. 2. Tectotectal projections involving the nucleus of the brachium of the IC (NBIC) or the tectal longitudinal column (TLC). The projections have been represented over an idealized, dorsal view of the surface of the midbrain tectum. The midline runs vertically through the middle of the figure. Rostral is to the top. 7: Projections from the IC to the ipsilateral NBIC. 8: Projections from the NBIC to the ipsilateral and contralateral SC. 9: Projections from the SC to the ipsilateral NBIC. 10: Projections from the IC to the ipsilateral and contralateral TLC. 11: Projections from the SC to the ipsilateral and contralateral TLC. 12: Projections from the NBIC to the ipsilateral TLC.

Whether the TLC innervates other tectal nuclei remains unknown.

CONCLUDING REMARKS

Because any of the twelve above-mentioned types of projections could traditionally be referred to as tectotectal, scientific writers cannot assume that readers would unequivocally identify the projection under consideration. The legend of Figs. 1 and 2 and Table 1 include a list of terms that unequivocally designate the projections established among mammalian tectal structures. Table 1 also includes the terms that are a source of ambiguity and should therefore be avoided. For instance, the commissural neurons and the commissural projections of the SC are frequently referred to as "tectotectal" (e.g., Rhoades et al., 1981; Behan and Kime, 1996; Olivier et al., 1998, 2000). Even if this common usage is understood by SC experts, it will certainly lead to confusion among a more general readership. Therefore, we strongly urge future authors to choose their nomenclature precisely and suggest replacing the word tectotectal in this context with the word commissural to describe the projections of SC neurons to the opposite SC (e.g., Tardif and Clarke, 2002). However, the adjective "commissural" must be clearly associated with either the SC or the IC to avoid ambiguity.

Other terms used to refer to the commissural projections and neurons of the SC (or the IC) include "intercollicular" (e.g. Syka et al., 2000; Rushmore and Payne, 2003; Rodger et al., 2005) and "intertectal" (e.g., Waleszczyk et al., 1993; Jhaveri and Hoffman-Kim, 1996). Again, these expressions are by themselves confusing, as they can be indistinctly applied to the commissural projection of the IC or the SC, as well as to the projections from the IC to the SC and vice versa.

A similar line of thought leads us to advise against coining novel terms, such as "colliculobrachial": because

TABLE 1. Proposed nomenclature for mammalian tectotectal projections

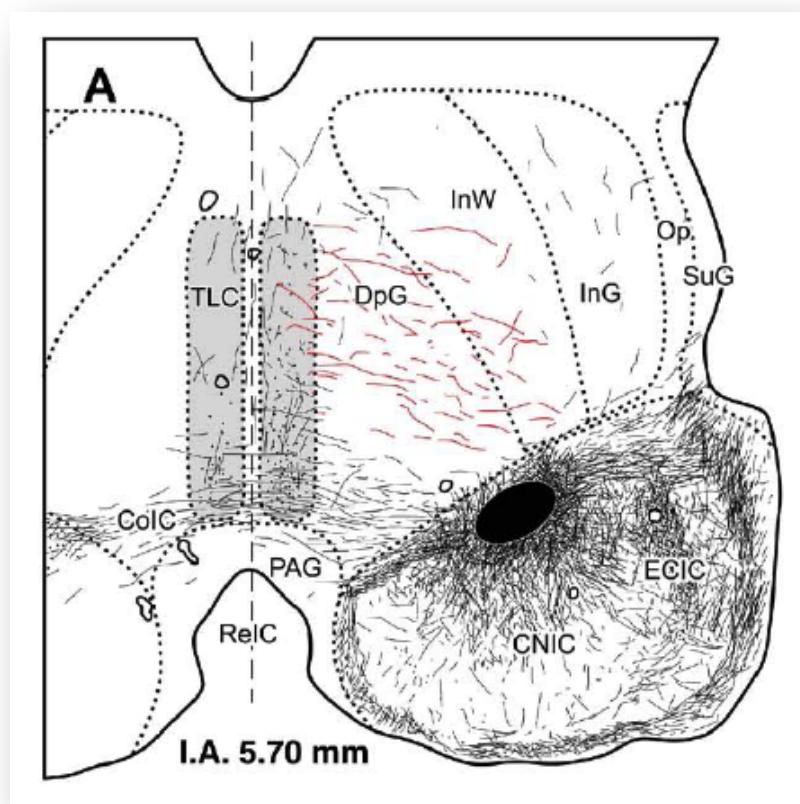
Place of origin	Place of termination	Proposed term	Terms to be avoided
1 IC	The same IC	Intrinsic projections of the IC	Tectotectal
2 IC	Opposite IC	Commissural projections of the IC	Tectotectal, intercollicular, intertectal, colliculo-collicular
3 SC	The same SC	Intrinsic projections of the SC	Tectotectal
4 SC	Opposite SC	Commissural projections of the SC	Tectotectal, intercollicular, intertectal, colliculo-collicular
5 IC	SC	Projections from the IC to the [ipsilateral or contralateral] SC	Tectotectal, intercollicular, intertectal, colliculo-collicular
6 SC	IC	Projections from the SC to the [ipsilateral or contralateral] IC	Tectotectal, intercollicular, intertectal, colliculo-collicular
7 IC	NBIC	Projections from the IC to the NBIC	Tectotectal, colliculo-brachial
8 NBIC	SC	Projections from the NBIC to the [ipsilateral or contralateral] SC	Tectotectal, brachio-collicular
9 SC	NBIC	Projections from the SC to the NBIC	Tectotectal, colliculo-brachial
10 IC	TLC	Projections from the IC to the [ipsilateral or contralateral] TLC	Tectotectal, colliculo-columnar
11 SC	TLC	Projections from the SC to the [ipsilateral or contralateral] TLC	Tectotectal, colliculo-columnar
12 NBIC	TLC	Projections from the NBIC to the TLC	Tectotectal, brachio-columnar

IC, inferior colliculus; NBIC, nucleus of the brachium of the inferior colliculus; SC, superior colliculus; TLC, tectal longitudinal column.

the NBIC receives projections from both the IC and the SC, the word colliculobrachial does not clarify which nucleus gives rise to the projection mentioned.

LITERATURE CITED

- Behan M, Kime NM. 1996. Spatial distribution of tectotectal connections in the cat. *Prog Brain Res* 112:131–142.
- Chebat DR, Boire D, Ptito M. 2006. Development of the commissure of the superior colliculus in the hamster. *J Comp Neurol* 494:887–902.
- Doubell TP, Baron J, Skaliora I, King AJ. 2000. Topographical projection from the superior colliculus to the nucleus of the brachium of the inferior colliculus in the ferret: convergence of visual and auditory information. *Eur J Neurosci* 12:4290–4308.
- Doubell TP, Skaliora I, Baron J, King AJ. 2003. Functional connectivity between the superficial and deeper layers of the superior colliculus: an anatomical substrate for sensorimotor integration. *J Neurosci* 23:6596–6607.
- Edwards SB. 1977. The commissural projection of the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 173:23–40.
- Harting JK, Van Lieshout DP. 2000. Projections from the rostral pole of the inferior colliculus to the cat superior colliculus. *Brain Res* 881:244–247.
- Jhaveri S, Hoffman-Kim D. 1996. Unilateral containment of retinal axons by tectal glia: a possible role for sulfated proteoglycans. *Prog Brain Res* 108:135–148.
- King AJ, Jiang ZD, Moore DR. 1998b. Auditory brainstem projections to the ferret superior colliculus: anatomical contribution to the neural coding of sound azimuth. *J Comp Neurol* 390:342–365.
- King AJ, Schnupp JW, Thompson ID. 1998a. Signals from the superficial layers of the superior colliculus enable the development of the auditory space map in the deeper layers. *J Neurosci* 18:9394–9408.
- Kudo M, Niimi K. 1980. Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study. *J Comp Neurol* 191:545–556.
- Marshall AF, Pearson JM, Falk SE, Skaggs JD, Crocker WD, Saldaña E, Fitzpatrick DC. 2008. Auditory response properties of neurons in the tectal longitudinal column of the rat. *Hear Res* 244:35–44.
- Nodal FR, Doubell TP, Jiang ZD, Thompson ID, King AJ. 2005. Development of the projection from the nucleus of the brachium of the NBIC to the superior colliculus in the ferret. *J Comp Neurol* 485:202–217.
- Olivier E, Corvisier J, Pauluis Q, Hardy O. 2000. Evidence for glutamatergic tectotectal neurons in the cat superior colliculus: a comparison with GABAergic tectotectal neurons. *Eur J Neurosci* 12:2354–2366.
- Olivier E, Porter JD, May PJ. 1998. Comparison of the distribution and somatodendritic morphology of tectotectal neurons in the cat and monkey. *Via Neurosci* 15:903–922.
- Rhoades RW, Fish SE, Voneida TJ. 1981. Anatomical and electrophysiological demonstration of tectotectal pathway in the golden hamster. *Neurosci Lett* 21:255–260.
- Rhoades RW, Mooney RD, Szczepanik AM, Klein BG. 1986. Structural and functional characteristics of commissural neurons in the superior colliculus of the hamster. *J Comp Neurol* 253:197–215.
- Rodger J, Symonds AC, Springbett J, Shen WY, Bartlett CA, Rakoczy PE, Beazley LD, Dunlop SA. 2005. Eph/ephrin expression in the adult rat visual system following localized retinal lesions: localized and transneuronal up-regulation in the retina and superior colliculus. *Eur J Neurosci* 22:1840–1852.
- Rushmore RJ, Payne BR. 2003. Bilateral impact of unilateral visual cortex lesions on the superior colliculus. *Exp Brain Res* 151:542–547.
- Saldaña E, Merchán MA. 1992. Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 319:417–437.
- Saldaña E, Merchán MA. 2005. Intrinsic and commissural connections of the inferior colliculus. In: Winer JA, Schreiner CE, editors. *The inferior colliculus*. New York: Springer. p 155–181.
- Saldaña E, Viñuela A, Marshall AF, Fitzpatrick DC, Aparicio MA. 2007. The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. *J Neurosci* 27:13108–13116.
- Syka J, Popelár J, Kvasnák E, Astl J. 2000. Response properties of neurons in the central nucleus and external and dorsal cortices of the inferior colliculus in guinea pig. *Exp Brain Res* 133:254–266.
- Tardif E, Clarke S. 2002. Commissural connections of human superior colliculus. *Neuroscience* 111:363–372.
- Waleszczyk WJ, Dec K, Hekimian AA. 1993. Influence of the intertectal connection upon visual responses in the cat's superior colliculus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 53:409–414.
- Winer JA, Chernock ML, Larue DT, Cheung SW. 2002. Descending projections to the inferior colliculus from the posterior thalamus and the auditory cortex in rat, cat, and monkey. *Hear Res* 168:181–195.



ANEXO III

Aparicio MA, Viñuela A, Saldaña E (2010) Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column in the rat. *Neuroscience* 166:653-664.

PROJECTIONS FROM THE INFERIOR COLICULUS TO THE TECTAL LONGITUDINAL COLUMN IN THE RAT

M.-A. APARICIO,^{a,b1} A. VIÑUELA^{a,c1,2} AND
E. SALDAÑA^{a,c*}

^aLaboratory for the Neurobiology of Hearing, Neuroscience Institute of Castilla y León (INCYL), University of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

^bDepartment of Pathology, Clinical University Hospital of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

^cDepartment of Cell Biology and Pathology, Medical School, University of Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

Abstract—We have used the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L) to study with albino rats the projections from the inferior colliculus (IC) to the tectal longitudinal column (TLC), a newly discovered nucleus that spans the midbrain tectum longitudinally, on each side of the midbrain, immediately above the periaqueductal gray matter. We studied the projections of the medial IC, which includes the classical central nucleus (CNIC) and the dorsal cortex (DCIC), and those of the lateral IC, equivalent to the classical external cortex (ECIC). Following unilateral injections of PHA-L into the medial IC, numerous terminal fibers are labeled bilaterally in the TLC. The ipsilateral projection is denser and targets the entire nucleus, whereas the contralateral projection targets significantly only the caudal half or two-thirds of the TLC. Fibers from the medial IC reach the TLC by two routes: as collaterals of axons that travel in the commissure of the IC and as collaterals of thick ipsilateral colliculogeniculate axons; the latter travel through the deep superior colliculus on their way to the TLC. Within the TLC, individual IC fibers tend to run longitudinally. The injection of PHA-L into the lateral IC indicates that this subdivision sends a weak, bilateral projection to the TLC whose trajectory, morphology and distribution are similar to those of the projection

¹ These two authors have contributed equally to the work.

² Present address: Unidad de Genética Molecular, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain.

*Correspondence to: E. Saldaña, Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain. Tel: +34-923-294500, x1881; fax: +34-923-294750.

E-mail address: saldana@usal.es (E. Saldaña).

Abbreviations: Aq, cerebral aqueduct; BIC, brachium of the inferior colliculus; CNIC, central nucleus of the inferior colliculus; CoIC, commissure of the inferior colliculus; CoSC, commissure of the superior colliculus; DCIC, dorsal cortex of the inferior colliculus; DpG, deep gray layer of the superior colliculus; DpW, deep white layer of the superior colliculus; ECIC, external cortex of the inferior colliculus; I.A., interaural; IC, inferior colliculus; InG, intermediate gray layer of the superior colliculus; InW, intermediate white layer of the superior colliculus; MGB, medial geniculate body of the thalamus; NBIC, nucleus of the brachium of the inferior colliculus; Op, stratum opticum of the superior colliculus; PAG, periaqueductal gray matter; PAGdm, dorsomedial column of the periaqueductal gray matter; pc, posterior commissure; PHA-L, *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin; ReIC, recess of the inferior colliculus; SC, superior colliculus; SG, suprageniculate nucleus of the thalamus; SuG, superficial gray layer of the superior colliculus; TLC, tectal longitudinal column; Zo, stratum zonale of the superior colliculus.

0306-4522/10 \$ - see front matter © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.074

from the medial IC. These results demonstrate that all subdivisions of the IC send projections to the TLC, suggesting that the IC may be one of the main sources of auditory input to this tectal nucleus. © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: auditory midbrain, commissure of the inferior colliculus, brachium of the inferior colliculus, superior colliculus, *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L), tract-tracing.

The recently discovered tectal longitudinal column (TLC; Saldaña et al., 2007) is a long and narrow structure that spans the mammalian midbrain tectum longitudinally. This paired nucleus is located close to the midline, immediately dorsal to the dorsomedial column of the periaqueductal gray matter (PAGdm) and extends from the caudal end of the commissure of the inferior colliculus (CoIC) to the rostral end of the commissure of the superior colliculus (CoSC). It occupies what has traditionally been considered the most medial region of the deep superior colliculus (SC) and the most medial region of the inferior colliculus (IC). In the rat, the TLC is roughly 3.5 mm long, 250–350 μm in diameter, and contains approximately 11,500 neurons on each side.

The TLC differs cytoarchitecturally from its surrounding nuclei. TLC neurons tend to be smaller, more homogeneous and more densely packed than neurons in the IC, SC, or PAGdm. These morphological features have led to the identification of the TLC in a large variety of mammals, including rodents, lagomorphs, carnivores, non-human primates, and humans (Saldaña et al., 2007).

Most TLC neurons are labeled following injections of retrograde tracers into the ipsilateral superior olfactory complex (Faye-Lund, 1986; Saldaña et al., 2007), an important auditory center of the lower brainstem. This fact suggests an involvement of the TLC in the processing of auditory information. Indeed, electrophysiological recordings in the rat have demonstrated that neurons in the TLC respond to acoustic stimuli with physiological features that differ from those of most auditory-responsive neurons in the IC or the SC (Saldaña et al., 2007; Marshall et al., 2008).

Although the sources of auditory inputs to the TLC have not been described, several clues point to the IC as a likely candidate. First, both the IC and the TLC are tectal structures and tectotectal connections are known to be extensive (Aparicio and Saldaña, 2009). Second, with more than 300,000 neurons in the rat, the IC is the largest auditory center of the brainstem (Kulesza et al., 2002) and is known to be connected with virtually all brainstem, diencephalic and telencephalic auditory centers (Winer and

Schreiner, 2005). Finally, and most important, the caudal third of the TLC is traversed by the CoIC; this thick fiber fascicle contains the axons from one IC that innervate the opposite IC (reviewed by Saldaña and Merchán, 2005). Indeed, using anterograde tracing techniques, Saldaña and Merchán (1992) reported that some fibers of the rat IC that traveled in the CoIC gave off collaterals that created two terminal fields, one on each side of the midline, which extended rostrally and reached the level of the SC (see their Figs. 4A–D and 7A–D); it is now clear that these terminal fields were located in the region of the CoIC occupied by the TLC.

The purpose of this study was to characterize the trajectory, distribution and morphology of the collicular axons that innervate the TLC. To this end, we injected the sensitive anterograde tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L) into the IC of albino rats.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experimental animals and neuroanatomical tracer

Twenty seven female Sprague–Dawley rats (body weight 190–210 g) received unilateral injections of *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) restricted to one subdivision of the IC. Some of these specimens were utilized in earlier studies of neural connections of the IC (Saldaña and Merchán, 1992, 2005; Vetter et al., 1993). The procedures applied to the additional cases were essentially identical to those described in previous papers, to which the reader is referred for technical details of the parameters for injection and chemical visualization of the tracer (Saldaña and Merchán, 1992; Vetter et al., 1993; Feliciano et al., 1995). All animals were cared for and used in compliance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) concerning the use of animals in biomedical research, and the experimental procedures were approved and supervised by the Animal Care and Use Committee of the University of Salamanca.

The tracer was injected as a 2.5% solution in 0.05 M Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4. Twenty one rats received single PHA-L injections. In the other six animals, two or three partly overlapping injections were placed into closely spaced points within IC in an effort to increase the number of labeled collicular fibers.

Prior to surgery, rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine HCl (80 mg/kg body weight) and xylazine (6 mg/kg body weight) administered i.m. and mounted in a stereotaxic frame. We minimized animal suffering during surgery by monitoring the depth of anesthesia often, carefully attending to physiological cues such as rate and depth of respiration and reflex activity. Additional doses of anesthetics were administered as required to maintain deep anesthesia at all times.

Following a craniotomy, the tracer was injected through glass micropipettes (inner tip diameter 15–30 μm) inserted stereotactically into the brain. Once the micropipette was in the desired position, the tracer was delivered by passing a positive pulsed 5–6 μA DC current (duty cycle 7 s on/7 s off; duration 15–30 min) through the micropipette. After suturing the skin, animals were returned to their cages and allowed to recover in standard housing conditions.

Tissue processing

Seven to 14 days after surgery, the animals were deeply anesthetized with an overdose (120 mg/kg body weight, administered i.p.) of sodium pentobarbital. Once the abolition of withdrawal

reflexes was confirmed, the animals were perfused transcardially with 100–150 ml of a calcium-free variant of the Ringer solution saturated with 95% CO₂ and 5% O₂ to pH 6.9 (38 °C), followed immediately by 200–500 ml of 4% formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde) and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB; pH 7.3), and then 300–500 ml of the same fixative without glutaraldehyde (both fixatives at room temperature). Brains were cryoprotected at 4 °C for 60 h in 30% sucrose in saline or PB, and sectioned at 40 μm on a freezing microtome in one of the three cardinal planes. Free-floating sections were collected in eight parallel series in 0.05 M TBS, pH 7.6.

PHA-L was localized immunocytochemically using a primary antibody raised in rabbit (Dako, Carpinteria, CA, USA) or goat (Vector) and visualized with the peroxidase–antiperoxidase (PAP) procedure. TBS containing 0.5% Triton X-100 (TBS-TX; Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used as diluent and rinsing solution. Diaminobenzidine (DAB) or nickel-enhanced DAB (DAB-Ni) was used as the chromogen. The regular DAB reaction was carried out in 0.05 M Tris–HCl, pH 7.6, whereas the DAB-Ni reaction was carried out in 0.05 M Tris–HCl, pH 8.0. For cytoarchitectural reference, every fourth or eighth section was counterstained with Cresyl Violet. All sections were dehydrated, cleared with xylene, and coverslipped with Accu•Mount® (Baxter, McGraw Park, IL, USA) or Entellan (Merck, Darmstad, Germany).

Data analysis

Sections were photographed at high resolution with a Zeiss Axioskop 40 microscope using a Zeiss AxioCam MRc 5 digital camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and plan semi-apochromatic objective lenses 2.5× (NA 0.075), 5× (NA 0.15), 10× (NA 0.30), 20× (NA 0.50) and 40× (NA 0.75). The brightness and contrast of images were adjusted with Adobe Photoshop software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

The camera lucida drawings of Fig. 4 were made with India ink using a Leica DMRB microscope fitted with a drawing tube. The drawings were then scanned at high resolution and each scanned image was imported into a Canvas (ACD Systems of America, Inc., Miami, FL, USA) document. To increase the resolution of the final image, a new layer was created over the scanned image and each line or dot of the original drawing was redrawn digitally using Canvas' freehand drawing tool. This digital procedures allowed us to subsequently adjust the thickness and the color of the lines. The new digital layer, without the underlying scanned drawing, was finally saved as a TIFF file.

A procedure similar to that of Fig. 4 was used to produce the plots showing the distribution of presumed labeled synaptic boutons (Wouterlood and Groenewegen, 1985) in Fig. 6 (panels A2–C2 and A4–C4). To convey a clear impression of synaptic bouton density, each plot was subsequently transferred to a Photoshop document and blurred using a Gaussian filter with a 15 pixel square matrix (Henkel et al., 2003).

The final illustrations were arranged into plates and labeled using Canvas software.

Reference maps

For the parcellation of the IC, we adopted the cytoarchitectural model of Faye-Lund and Osen (1985), with the slight modifications proposed by Saldaña and Merchán (1992). Thus, the IC consists of a central nucleus (CNIC), surrounded dorsally and dorsocaudally by the dorsal cortex (DCIC), and rostrally and laterally by the external cortex (ECIC). In the text, the expression “medial IC” refers to CNIC+DCIC; the term “lateral IC” refers to the lateral part of the ECIC, but does not include the rostral part of the ECIC.

The TLC was delimited on the basis of the cytoarchitectural criteria described by Saldaña et al. (2007).

RESULTS

Projections of the medial IC to the TLC

Injection sites of PHA-L in the CNIC (Fig. 1A) or the DCIC (Fig. 1B) tended to be elongated in the rostrocaudal and dorsoventral dimensions and narrow mediolaterally. The mediolateral diameter of individual injection sites was

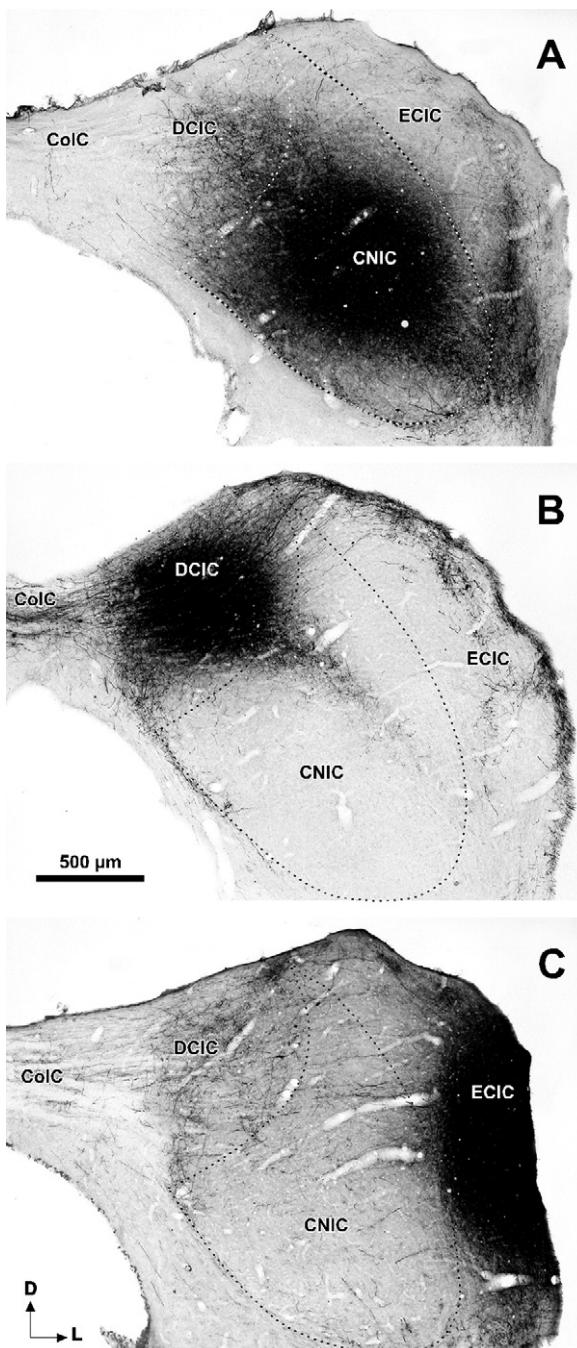


Fig. 1. Low magnification digital photomicrographs of injection sites of PHA-L in the right IC of the rat. Coronal sections. Section (A) Double injection site into the CNIC (medial IC). (B) Single injection site into the DCIC (medial IC). (C) Single injection site into the ECIC (lateral IC). Scale bar in B applies to all three micrographs.

150–500 μm. In all cases, labeled axons created two terminal plexuses in the ipsilateral IC, and another two plexuses in the contralateral IC, which were symmetric to the ipsilateral ones. These intracollicular projections conformed to the known patterns of intrinsic and commissural projections of the rat CNIC (Saldaña and Merchán, 1992) and DCIC (Saldaña and Merchán, 2005) and will not be considered further in this account.

In all cases with injection of PHA-L into the CNIC or the DCIC, labeled axons were observed in the TLC of both sides, and their number varied as a function of the size of the injection site. Fig. 1A shows the right IC from a representative case in which two tracer injections were placed very close together, so that the two injection sites merged into a larger injection site whose mediolateral diameter was 700 μm. The projection to the TLC in this case is depicted in Fig. 2, which shows coronal sections sampled from four different rostrocaudal regions of the nucleus. At caudal levels of the TLC (Fig. 2A') numerous labeled axons were seen crossing the midline in the ColIC and a terminal field was evident within each TLC. These terminal fields were made of thin fibers bearing en passant and terminal swellings and whose orientation was predominantly vertical (Figs. 2A' and 3B). The terminal fields extended rostrally within the TLC and their density decreased progressively at more rostral levels (Figs. 2B'–D', 3A and 4A, B).

The fibers from the medial IC reached the TLC by two different routes (Fig. 4; see also summary diagram in Fig. 8). One route was via the ColIC, where some IC axons gave off one or more thin, rostrally-directed collaterals within the ipsilateral or, less frequently, the contralateral TLC (Figs. 3A, 4A and 6). Occasionally, one single commissural fiber gave rise to collaterals for the TLC on each side.

The second route was followed by collaterals of colliculogeniculate axons, which traversed the deep layers of the SC before entering the ipsilateral TLC. Within the caudal half of the brachium of the IC, some of the thick colliculogeniculate axons gave off a thin collateral (Figs. 3C, 4B–D and 6). Such collaterals ran dorsomedially in the deep layers of the SC (Fig. 4), where they ramified to give rise to small local terminal fields. The axons finally reached the ipsilateral TLC (Figs. 2B' and 4). Upon entering the TLC, the axons from the IC turned caudally or rostrally to span the nucleus longitudinally, or bifurcated into a caudal branch and a rostral branch. We have also seen rare occurrences of axons that run past the ipsilateral TLC to innervate the contralateral TLC or SC (not illustrated).

In general, the projection to the ipsilateral TLC was denser than the crossed projection. Moreover, the medial IC seemed to innervate the entire ipsilateral TLC, but it targeted significantly just the caudal half or two-thirds of the contralateral TLC (Figs. 2 and 4A, B). These observations reflect the fact that the contralateral TLC is innervated almost exclusively by collaterals of commissural axons, whereas the ipsilateral TLC is innervated by collaterals of commissural axons and collaterals of colliculogeniculate axons (Fig. 8).

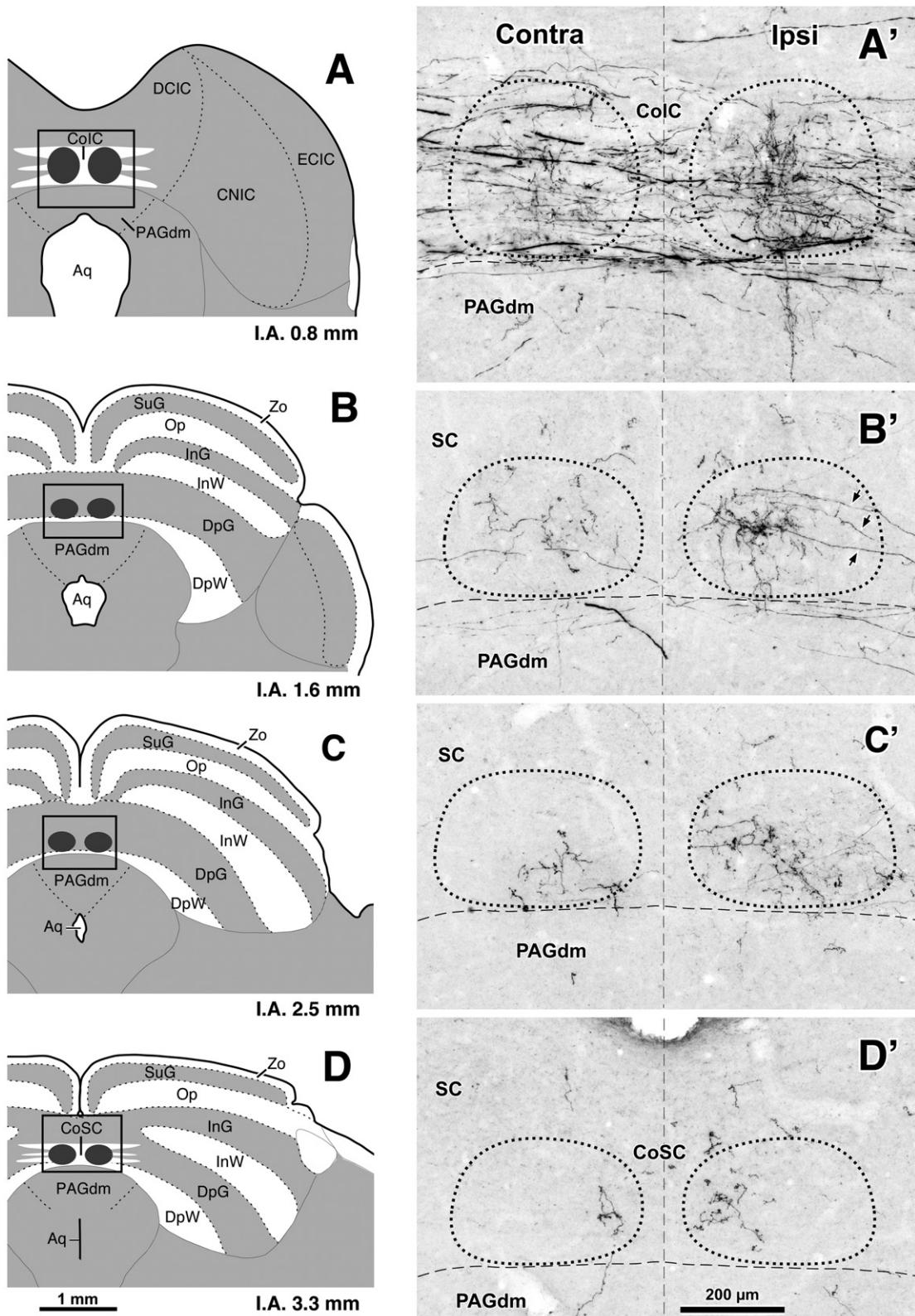


Fig. 2. (A–D) Schematic drawings of four idealized coronal sections of the rat midbrain tectum taken at the level of the rostral IC (A), the caudal SC (B), the central SC (C) and rostral SC (D). The number at the bottom of each schematic indicates the distance in millimeters between the depicted plane and the interaural coronal plane (I.A.). The TLC is represented in dark gray. Scale bar in D applies to all four drawings. (A'–D') Digital micrographs of four coronal sections of the TLC from the case whose injection site is illustrated in Fig. 1A. Each section shows a microscopic field that matches the boxed area in the corresponding drawing on the left. The TLC has been delimited by the dotted lines. The vertical dashed lines indicate the midline. Notice in B' several labeled axons that enter the lateral aspect of the TLC from the deep layers of the SC (small arrows). Scale bar in D' applies to all four micrographs. Abbreviations of SC layers: DpG, deep gray; DpW, deep white; InG, intermediate gray; InW, intermediate white; Op, stratum opticum; SuG, superficial gray; Zo, stratum zonale. Other abbreviations: Aq, cerebral aqueduct; CoIC, commissure of the IC; CoSC, commissure of the SC; PAGdm, dorsomedial column of the periaqueductal gray matter.

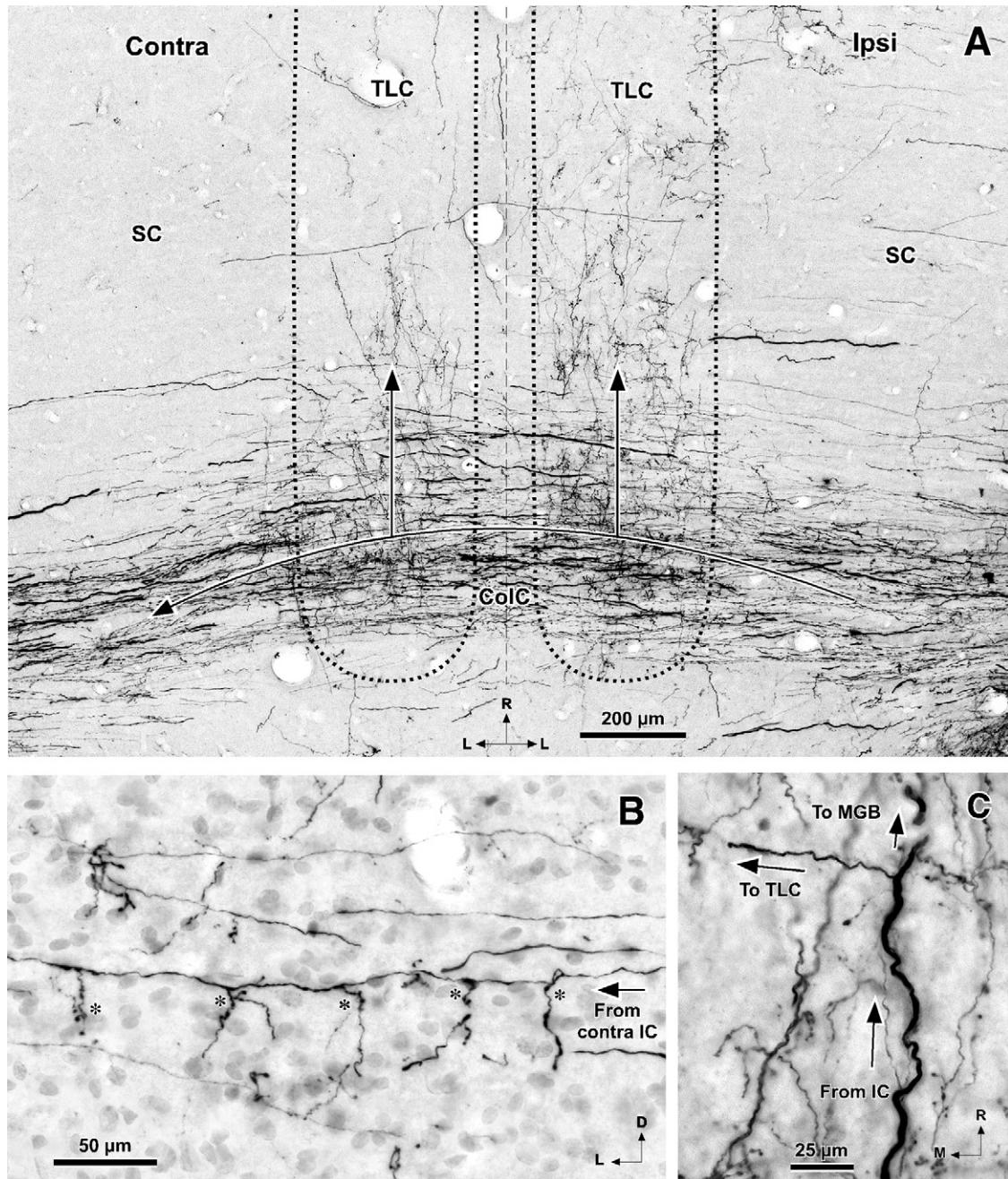


Fig. 3. (A) Photomicrograph of a horizontal section through the ColIC and the caudal third of the TLC after PHA-L was injected into the right IC. The arrows illustrate the trajectory followed by the axons from the right IC, which travel in the ColIC and give off collaterals within the ipsilateral or the contralateral TLC. These collaterals usually run rostrally (upward in the micrograph). The TLC has been delimited by dotted lines. The vertical dashed line indicates the midline. (B) Photomicrograph of a Nissl-counterstained, coronal section through the caudal portion of the left TLC after PHA-L was injected into the right IC. A labeled commissural axon from the contralateral IC gives off five collateral branches within the TLC (asterisks) before proceeding into the left IC. (C) Photomicrograph of a horizontal section of the brachium of the IC. A labeled thick colliculogeniculate axon gives off a thin collateral that runs medially towards the SC on its way to the ipsilateral TLC. Other abbreviations: MGB, medial geniculate body.

The morphology of the axons labeled in the ipsilateral TLC did not differ significantly from that of the axons labeled contralaterally. Most axons spanned the TLC longitudinally, and therefore appeared cross-cut in coronal sections (Fig. 2B'–D'). Sometimes individual axons could be followed for hundreds of microns within a single horizontal section (Fig. 5). Along their course, they emitted short

collaterals whose number and distribution seemed to vary among fibers. Although most of these collaterals were just a few microns long and ended in a single, small terminal bouton ($\sim 1 \mu\text{m}$), longer collaterals bearing various en passant boutons could also be observed. Most IC axons seemed to innervate multiple rostrocaudal portions of the TLC (Fig. 5).

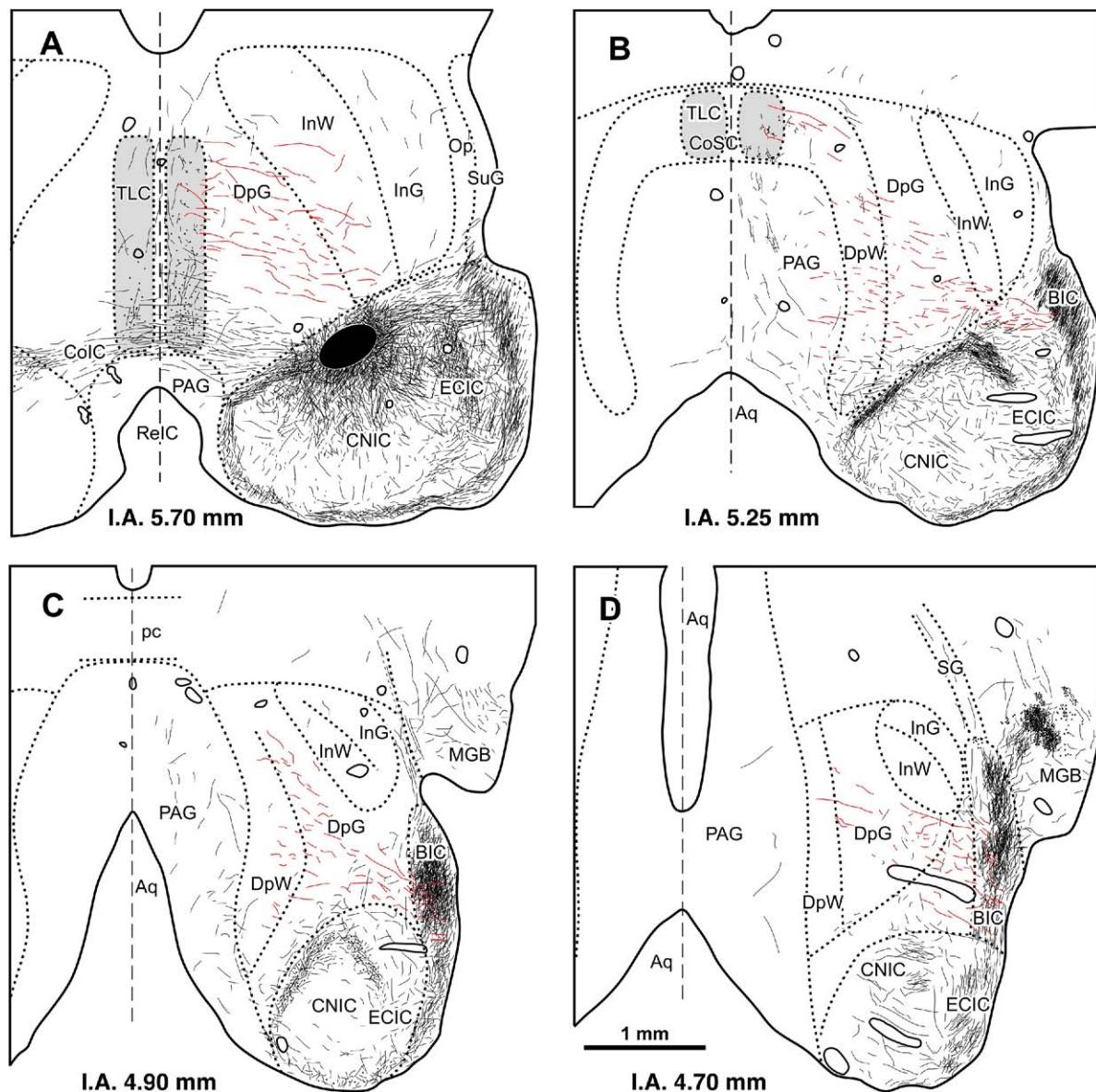


Fig. 4. Camera lucida drawings of horizontal sections of the midbrain tectum illustrating the trajectory and distribution of the axons labeled following a single injection of PHA-L into the medial IC. The center of the injection site is represented by the black oval in A. The sections illustrated pass through the commissure of the IC (ColC) (A), the enlarged, rostral half of the commissure of the SC (CoSC) (B), the posterior commissure (pc) (C), and the cerebral aqueduct (Aq) (D). The number at the bottom of each drawing indicates the distance in millimeters between the depicted plane and the interaural horizontal plane (I.A.). The TLC is represented in light gray in A and B. In each drawing the vertical dashed line indicates the midline. Scale bar in D applies to all four drawings. The collaterals of thick colliculogeniculate axons that travel through the deep SC on their way to the TLC are highlighted in red. Notice that such collaterals arise only in the caudal half of the brachium of the IC (BIC). Abbreviations of SC layers: DpG, deep gray; DpW, deep white; InG, intermediate gray; InW, intermediate white; Op, stratum opticum; SuG, superficial gray. Other abbreviations: MGB, medial geniculate body; PAG, periaqueductal gray matter; RelC, recess of the IC; SG, suprageniculate nucleus of the thalamus. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

Topography of the projection from the medial IC. The rostrocaudal and mediolateral location of the terminal fields within the TLC was similar in all of the cases, regardless of the location of the injection site within the medial IC. Nevertheless, we observed a subtle tendency of the terminal fields to shift their dorsoventral position within the TLC as a function of the position of the injection site along the tonotopic axis of the IC (Fig. 6). Thus, in cases with tracer deposits in the ventromedial (high-characteristic fre-

quency) region of the medial IC, labeled terminal fibers were distributed mostly throughout the ventral half of the TLC; conversely, in cases with injections in the dorsolateral (low-characteristic frequency) region of the medial IC, labeled terminal fibers predominated dorsally within the TLC. This topography was best appreciated in the caudal third of the TLC (Fig. 6, panels A1–A3, B1–B3, C1–C3), which was expected given that the commissural axons of dorsolateral IC neurons travel dorsally within the ColC with

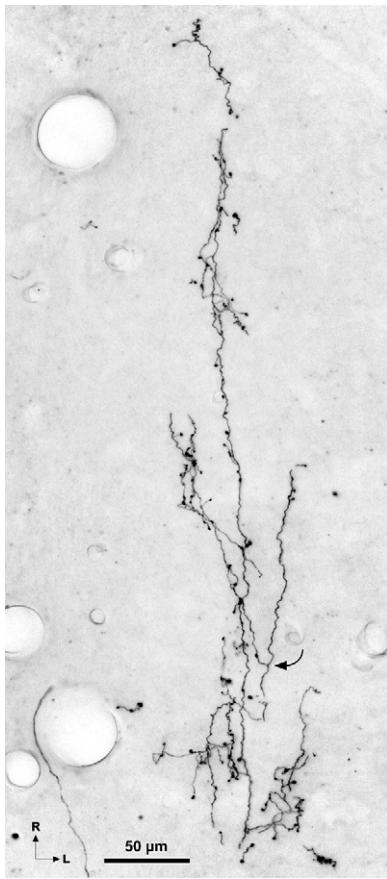


Fig. 5. Photomicrograph of a horizontal section of the right TLC, ipsilateral to an injection of PHA-L into the medial IC. Labeled IC axons span the TLC longitudinally. The curved arrow indicates one point where an axon bifurcates giving rise to two branches that course rostrally.

respect to those of ventromedial IC neurons (Fig. 6, panels A1, B1, C1; see also Saldaña and Merchán, 2005). However, no topographic arrangement in the IC-to-TLC projections was readily evident at more rostral levels (Fig. 6, panels A4–A5, B4–B5, C4–C5). Thus, the topography of the projections to the TLC seemed less well-defined than the topography of other projections of the IC.

Projections of the lateral IC to the TLC

Following injections of PHA-L into the lateral IC (Fig. 1C), terminal labeling was observed in the ipsi- and contralateral DCIC and ECIC, but not in the CNIC of either side, thus confirming previous descriptions (Saldaña and Merchán, 2005). Sparse axonal labeling was seen within the TLC of both sides. As shown in Fig. 7, this projection bears important similarities with the projections from the medial IC: it is bilateral, yet preferentially ipsilateral, and its density decreases rostrally. Moreover, like the projections from the medial IC, the axons from the lateral IC reach the TLC following one of two routes: as collaterals of axons that travel in the CoIC, or as collaterals of colliculogeniculate axons (Fig. 8). However, the number of labeled fibers in the TLC was generally lower in cases with injections in the

lateral IC than in cases with injections in the medial IC (compare Figs. 2 and 7).

We have not found clear indications of a topographic organization in the projections from the lateral IC to the TLC. However, this fact is not definite proof of the lack of topography. Within the lateral IC, isofrequency contours are much closer together than their corresponding contours in the medial IC. Therefore, our tracer injections in the lateral IC likely labeled the projections of populations of neurons with wider ranging characteristic frequencies.

DISCUSSION

Our results demonstrate that all subdivisions of the rat IC innervate the TLC bilaterally. These inputs represent the first characterized projections to the TLC. However, this nucleus, which is traversed by the CoIC and by the CoSC (Saldaña et al., 2007), occupies a privileged position to receive input from a large variety of sources.

Technical considerations

The CoIC contains axons from lower auditory centers, including the superior paraolivary nucleus (SPON; Saldaña et al., 2009), the nucleus sagulum and the intermediate nucleus of the lateral lemniscus (Hutson et al., 1991). In theory, in our experiments some of these axons could have taken up the tracer as they crossed the injection site in the IC on their way to the CoIC. This possibility, however, seems very unlikely because there is wide consensus that when injected iontophoretically with the usual parameters (such as the ones used in our study), PHA-L is taken up by fibers of passage only to a very limited extent, if at all (Lanciego and Wouterlood, 2006; Reiner and Honig, 2006; Sesack et al., 2006). Moreover, even though the rat SPON innervates the rostral third of the contralateral TLC via the CoSC (our unpublished observation), no labeled axons were seen in the CoSC following injections of PHA-L into the IC. These observations argue against the contribution of fibers of passage to the labeling described in the present study.

It also seems very unlikely that some of the terminal fibers labeled in the TLC represent collaterals of axons belonging to neurons in the contralateral IC or the ipsilateral auditory cerebral cortex, which are known to innervate both the injection site and the TLC (Morest and Oliver, 1984; Saldaña and Merchán, 1992, 2005; Saldaña et al., 1996). This collateral labeling would require that the PHA-L, taken up at the injection site by a given axonal branch, be transported retrogradely to a bifurcation in the axon, and then anterogradely into the TLC. Retrograde transport of PHA-L is a rare occurrence, as evidenced by the virtual absence of retrogradely labeled neurons in our experiments. Moreover, the labeling observed in the ipsilateral TLC was always considerably denser than in the contralateral TLC and this asymmetry suggests that the contribution of axonal collaterals from contralateral IC neurons was at best minimal.

In summary, we are confident that the labeling observed in the ipsi- and contralateral TLC following injection of PHA-L

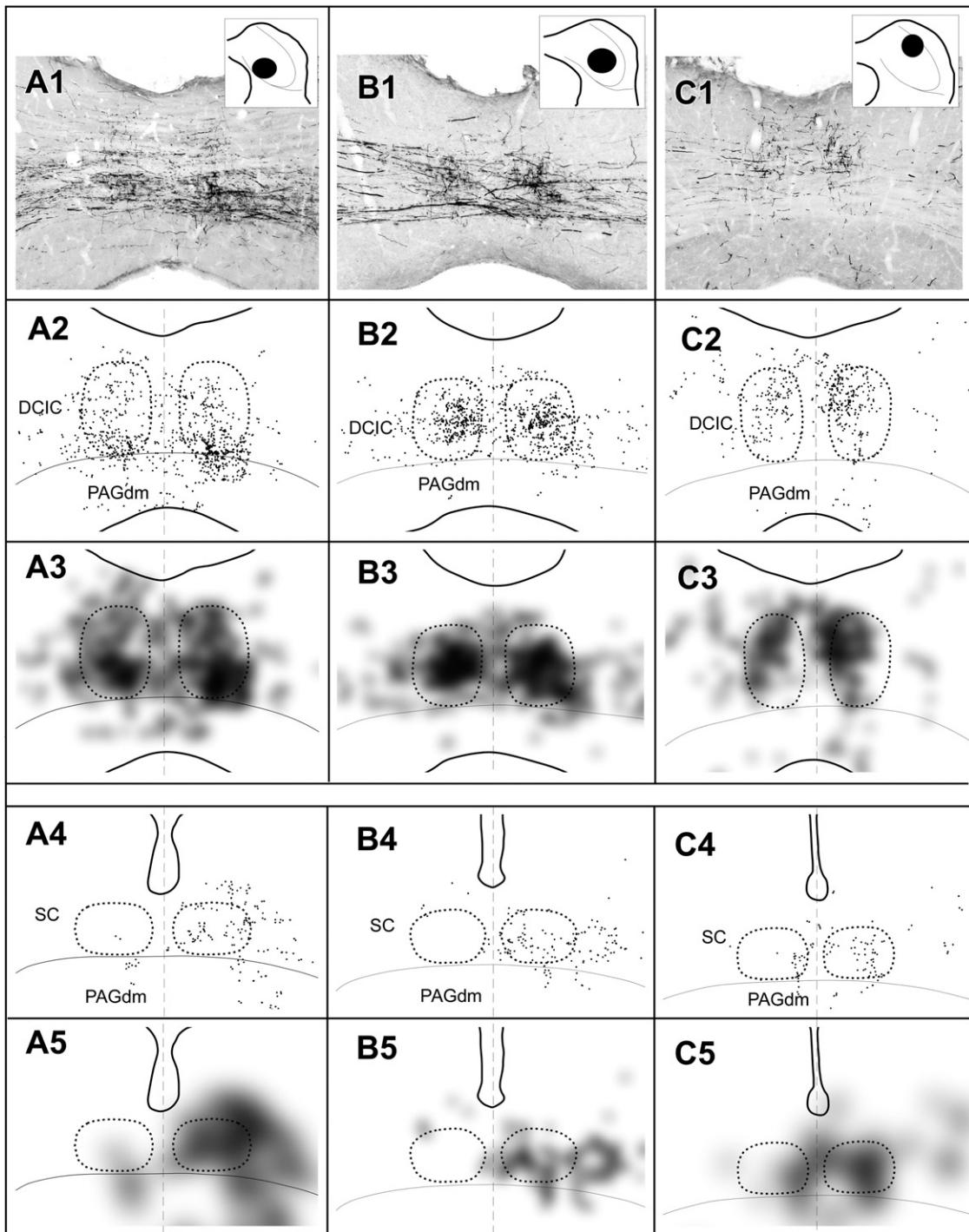


Fig. 6. Topography of the projection from the medial IC to the TLC in three cases, whose injections of PHA-L were located in the ventromedial (left column), central (central column) and dorsolateral (right column) regions of the right IC, respectively. In each column, the image at the top (A1, B1, C1) is a digital photomicrograph of a coronal section through the ColC (caudal third of the TLC). The inset in the upper right corner of each micrograph shows schematically the location of the corresponding injection site. The second row (A2, B2, C2) depicts a plot of the location of all labeled axonal swellings or varicosities (presumed to represent synaptic boutons [e.g., Wouterlood and Groenewegen, 1985]) found in the microscopic field illustrated above. Each dot represents one axonal swelling or varicosity. The third row (A3, B3, C3) shows a blurred image of the plots of the second row, in which the areas with the highest density of presumed synaptic boutons appear darkest. The fourth (A4, B4, C4) and the fifth (A5, B5, C5) rows show plots and blurred images of the distribution of the presumed synaptic boutons in a coronal section through the central rostrocaudal third of the TLC. In all panels, the right and the left TLC are delimited by dotted lines. Notice that the dorsoventral topography observed in caudal sections (A3, B3, C3) becomes virtually lost at more rostral levels (A5, B5, C5).

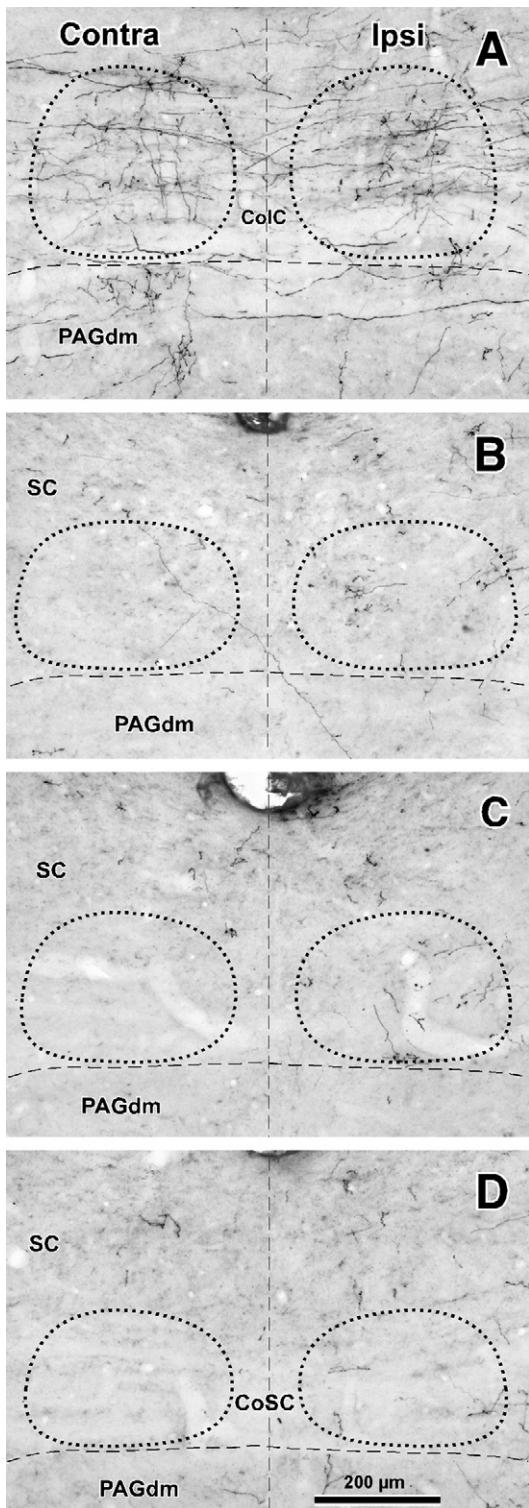


Fig. 7. Photomicrographs of four coronal sections through the TLC from the case whose injection site of PHA-L into the lateral IC (ECIC) is illustrated in Fig. 1C. The sections have been taken from rostrocaudal levels similar to those depicted in Fig. 2. The TLC has been delimited by dotted lines. The vertical dashed lines indicate the midline. Scale bar in (D) applies to all four micrographs. Abbreviations: CoIC, commissure of the IC; CoSC, commissure of the SC; PAGdm, dorsomedial column of the periaqueductal gray matter.

into the IC represents for the most part, if not exclusively, the genuine projection from neurons at the injection site.

The IC as a source of projections to the TLC

The collicular projections to the TLC are probably not unique to the rat because lesions of the cat IC result in preterminal degeneration in the region of the CoIC occupied by the TLC (Morest and Oliver, 1984) and results similar to ours are found following injection of biotinylated dextran amine into the cat IC (Miguel A. Merchán, University of Salamanca, personal communication).

In our cases, the number of axons labeled in the TLC was relatively modest, a finding consistent with the relative paucity of labeled neurons in the IC following injections of retrograde tracers into the TLC (our own unpublished observations). However, given that the IC of the rat contains more than 300,000 neurons (Kulesza et al., 2002) and each injection of PHA-L into the IC can reveal the projections of only a fraction of its neurons, it is safe to assume that only a small portion of the total number of axons involved in the IC-to-TLC projection was labeled in any given case. In our cases, the density of the terminal fields labeled in the TLC was comparable to the density of the IC projections to lower centers, namely the ipsilateral sagulum and ventral nucleus of the trapezoid body, and the cochlear nuclei of both sides (e.g., Caicedo and Herbert, 1993; Saldaña, 1993; Vetter et al., 1993). Despite their seemingly low density, some of these descending projections are capable of exerting a profound influence on the processing of auditory information (Rajan, 1990; Mulders and Robertson, 2000, 2002, 2005, 2006; Ota et al., 2004; Zhang and Dolan, 2006). Therefore, the importance of the projections from the IC to the TLC should not be underestimated.

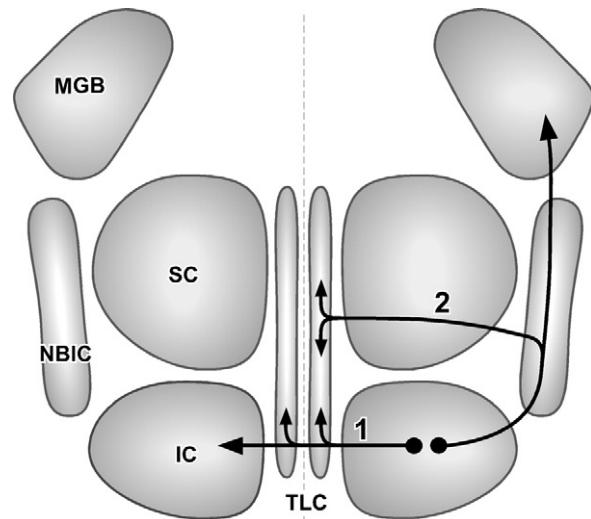


Fig. 8. Schematic representation of the routes followed by IC axons that innervate the TLC. The projections have been superimposed on an idealized, dorsal view of the surface of the midbrain tectum. The dashed line indicates the midline. Rostral is to the top. (1) Collaterals of commissural axons of the IC. (2) Collaterals of colliculogeniculate axons. Abbreviations: MGB, medial geniculate body; NBIC, nucleus of the brachium of the IC.

Neuron types of the IC that innervate the TLC. The fact that the TLC is innervated by both commissural and colliculogeniculate axons suggests that the IC neurons involved in the projection under investigation belong to more than one neuron type (but see González-Hernández et al., 1991, for examples of neurons that innervate both the contralateral IC and the ipsilateral medial geniculate body).

The commissural neurons of the IC are heterogeneous in terms of morphology (Adams, 1980; Schweizer, 1981; Willard and Martin, 1983; Druga and Syka, 1984; Tokunaga et al., 1984; González-Hernández et al., 1986, 1996; Coleman and Clerici, 1987; Moore, 1988; Saint Marie, 1996; Frisina et al., 1998; Saldaña and Merchán, 2005; Malmierca et al., 2009) and neurochemistry (Nakagawa et al., 1995; González-Hernández et al., 1996; Saint Marie, 1996; Hernández et al., 2006). This neurochemical heterogeneity is consistent with the variety of effects observed in electrophysiological investigations. For example, both *in vitro* and *in vivo* experiments have demonstrated that the activity of one IC evokes excitatory responses in some neurons of the contralateral IC, and inhibitory responses in others (Smith, 1992; Chakravarty and Faingold, 1997; Moore et al., 1998; Reetz and Ehret, 1999; Malmierca et al., 2003).

Most auditory tectothalamic neurons are excitatory, but a percentage of them use GABA as neurotransmitter (Winer et al., 1996; Peruzzi et al., 1997; Ito et al., 2009). The GABAergic colliculogeniculate axons are among the thickest axons in the brachium of the IC (Saint Marie et al., 1997); it is probable, therefore, that the projections from the IC to the TLC include a GABAergic component because many of the axons that reach the TLC through the SC are collaterals of very thick colliculogeniculate axons (e.g., Fig. 3C). Electrophysiological studies *in vitro* and *in vivo* have demonstrated that some medial geniculate body neurons are excited, and some others inhibited, by stimulation of the ipsilateral brachium of the IC (Serkov et al., 1979; Hu, 1995; Peruzzi et al., 1997).

The above data combine to suggest that the IC can exert both excitatory and inhibitory effects over TLC neurons. This issue could be resolved by analyzing within the TLC the fine structure of synaptic boutons labeled with anterograde tracers injected into the IC. It would also be informative to determine the extent to which pharmacological manipulations of the IC alter the sound-evoked activity of TLC neurons.

Functional implications

Neurons in the TLC of the rat exhibit a relatively broad range of responses (Marshall et al., 2008), which contrasts with the apparent cytoarchitectural simplicity of the nucleus (Saldaña et al., 2007). The responses of TLC neurons are similar to those of neurons in the IC in some aspects, but clearly different in others. TLC neurons are on average less sharply tuned than IC neurons. Moreover, the TLC lacks a conspicuous tonotopic organization along its longitudinal axis. These observations may be related to the fact that single fibers from the IC extend for long distances in the TLC (Fig. 5) and thus are presumably capable of contacting neurons located at a wide range of rostrocaudal locations.

More than 85% of TLC neurons show sustained responses to sound. In general, these sustained responses are weakly adapting and can last for several seconds (Marshall et al., 2008). This fact, together with the relatively high thresholds, broad tuning, and relative inability of many TLC neurons to follow the envelope of sinusoidally amplitude modulated tones, led Marshall et al. (2008) to suggest that TLC neurons are better suited to processing background sounds, rather than foreground signals.

One marked difference between the TLC and the IC is the considerably longer average response latency in TLC neurons (Marshall et al., 2008). Many TLC neurons start firing action potentials almost 20 ms after the onset of the stimulus, a latency that is even longer than that of many neurons in the primary auditory cortex (Doron et al., 2002).

The sound-driven activity of TLC neurons is also different from that of many auditory responsive neurons of the SC, a tectal center that may be a relevant source of input to the TLC (Yamasaki et al., 1984; Rhoades et al., 1986; Behan and Kime, 1996; Chebat et al., 2006). Compared to the TLC, the SC contains a much higher proportion of high characteristic frequency neurons (Wise and Irvine, 1983; Hirsch et al., 1985) and a much lower proportion of neurons with sustained responses to acoustic stimuli. Moreover, one fifth of the neurons of the SC that respond to sound also respond to light (Gaese and Johnen, 2000), whereas TLC neurons seem to be insensitive to light.

CONCLUSION

The TLC probably receives a large variety of synaptic inputs. While some evoked responses of TLC neurons may reflect the influence of the direct projections from the IC revealed in our study, projections from other hitherto unknown auditory [and non auditory] sources likely exist. The physiological properties of TLC neurons, particularly the very long response latencies, suggest that the TLC is not primarily concerned with the centripetal transmission of auditory information toward the cerebral cortex (Marshall et al., 2008). This and the fact that many TLC neurons innervate the superior olfactory complex (Saldaña et al., 2007) invite speculations on the possible role of the TLC in the modulation of the activity of lower auditory centers.

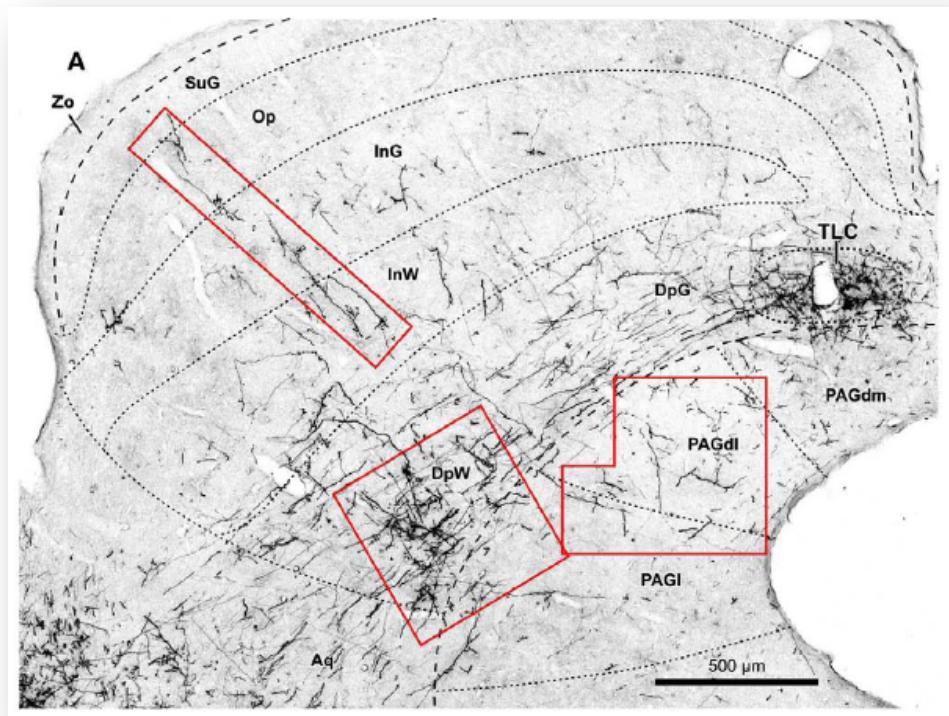
Acknowledgments—We thank Albert S. Berrebi for helpful discussions and comments. This work was supported by the Spanish Ministries of Education and Science and Innovation grants BFU2000/1358, BFU2004-05909 and BFU2008-04197, and by the Junta de Castilla y León grants SA097/01, SA007C05, GR221 and Biomedicina 2009 (to E.S.). M.-A.A. was supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education (FPU AP2002/3330), and A.V. by a predoctoral fellowship from the Instituto de la Salud Carlos III (BEFI 00/9418). E.S. designed and performed the experiments and supervised the project. All three authors analyzed the results, elaborated the illustrations and wrote the manuscript.

REFERENCES

- Adams JC (1980) Crossed and descending projections to the inferior colliculus. *Neurosci Lett* 19:1–5.
- Aparicio MA, Saldaña E (2009) Tectotectal neurons and projections: a proposal to establish a consistent nomenclature. *Anat Rec* 292:175–177.
- Behan M, Kime NM (1996) Spatial distribution of tectotectal connections in the cat. *Prog Brain Res* 112:131–142.
- Caicedo A, Herbert H (1993) Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 328:377–392.
- Chakravarty DN, Faingold CL (1997) Aberrant neuronal responsiveness in the genetically epilepsy-prone rat: acoustic responses and influences of the central nucleus upon the external nucleus of inferior colliculus. *Brain Res* 761:263–270.
- Chebat DR, Boire D, Ptito M (2006) Development of the commissure of the superior colliculus in the hamster. *J Comp Neurol* 494:887–902.
- Coleman JR, Clerici WJ (1987) Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 262:215–226.
- Doron NN, Ledoux JE, Semple MN (2002) Redefining the tonotopic core of rat auditory cortex: physiological evidence for a posterior field. *J Comp Neurol* 453:345–360.
- Druga R, Syka J (1984) Ascending and descending projections to the inferior colliculus in the rat. *Physiol Bohemoslov* 33:31–42.
- Faye-Lund H (1986) Projection from the inferior colliculus to the superior olfactory complex in the albino rat. *Anat Embryol (Berl)* 175:35–52.
- Faye-Lund H, Osen KK (1985) Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol (Berl)* 171:1–20.
- Feliciano M, Saldaña E, Mugnaini E (1995) Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemniscal regions, superior olfactory complex and cochlear nuclei. *Aud Neurosci* 1:287–308.
- Frisina RD, Walton JP, Lynch-Armour MA, Byrd JD (1998) Inputs to a physiologically characterized region of the inferior colliculus of the young adult CBA mouse. *Hear Res* 115:61–81.
- Gaese BH, Johnen A (2000) Coding for auditory space in the superior colliculus of the rat. *Eur J Neurosci* 12:1739–1752.
- González-Hernández TH, Meyer G, Ferres-Torres R (1986) The commissural interconnections of the inferior colliculus in the albino mouse. *Brain Res* 368:268–276.
- González-Hernández TH, Galindo-Mireles D, Castañeyra-Perdomo A, Ferres-Torres R (1991) Divergent projections of projecting neurons of the inferior colliculus to the medial geniculate body and the contralateral inferior colliculus in the rat. *Hear Res* 52:17–21.
- González-Hernández T, Mantolán-Sarmiento B, González-González B, Pérez-González H (1996) Sources of GABAergic input to the inferior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 372:309–326.
- Henkel CK, Fuentes-Santamaría V, Alvarado JC, Brunso-Bechtold JK (2003) Quantitative measurement of afferent layers in the ferret inferior colliculus: DNLL projections to sublayers. *Hear Res* 177:32–42.
- Hernández O, Rees A, Malmierca MS (2006) A GABAergic component in the commissure of the inferior colliculus in rat. *Neuroreport* 17:1611–1614.
- Hirsch JA, Chan JC, Yin TC (1985) Responses of neurons in the cat's superior colliculus to acoustic stimuli. I. Monaural and binaural response properties. *J Neurophysiol* 53:726–745.
- Hu B (1995) Cellular basis of temporal synaptic signalling: an in vitro electrophysiological study in rat auditory thalamus. *J Physiol* 483:167–182.
- Hutson KA, Glendenning KK, Masterton RB (1991) Acoustic chiasm. IV: eight midbrain decussations of the auditory system in the cat. *J Comp Neurol* 312:105–131.
- Ito T, Bishop DC, Oliver DL (2009) Two classes of GABAergic neurons in the inferior colliculus. *J Neurosci* 29:13860–13869.
- Kulesza RJ Jr, Viñuela A, Saldaña E, Berrebi AS (2002) Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. *Hear Res* 168:12–24.
- Lanciego JL, Wouterlood FG (2006) Multiple neuroanatomical tract-tracing: approaches for multiple tract-tracing. In: *Neuroanatomical tract-tracing 3: molecules, neurons, and systems* (Zaborsky L, Wouterlood FG, Lanciego JL, eds), pp 336–365. New York: Springer.
- Malmierca MS, Hernández O, Falconi A, López-Poveda EA, Merchán M, Rees A (2003) The commissure of the inferior colliculus shapes frequency response areas in rat: an *in vivo* study using reversible blockade with microinjection of kynurenic acid. *Exp Brain Res* 153:522–529.
- Malmierca MS, Hernández O, Antunes FM, Rees A (2009) Divergent and point-to-point connections in the commissural pathway between the inferior colliculi. *J Comp Neurol* 514:226–239.
- Marshall AF, Pearson JM, Falk SE, Skaggs JD, Crocker WD, Saldaña E, Fitzpatrick DC (2008) Auditory response properties of neurons in the tectal longitudinal column of the rat. *Hear Res* 244:35–44.
- Moore DR (1988) Auditory brainstem of the ferret: sources of projections to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 269:342–354.
- Moore DR, Kotak VC, Sanes DH (1998) Commissural and lemniscal synaptic input to the gerbil inferior colliculus. *J Neurophysiol* 80:2229–2236.
- Morest DK, Oliver DL (1984) The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J Comp Neurol* 222:209–236.
- Mulders WH, Robertson D (2000) Effects on cochlear responses of activation of descending pathways from the inferior colliculus. *Hear Res* 149:11–23.
- Mulders WH, Robertson D (2002) Inputs from the cochlea and the inferior colliculus converge on olivocochlear neurones. *Hear Res* 167:206–213.
- Mulders WH, Robertson D (2006) Gentamicin abolishes all cochlear effects of electrical stimulation of the inferior colliculus. *Exp Brain Res* 174:35–44.
- Mulders WH, Robertson D (2005) Diverse responses of single auditory afferent fibres to electrical stimulation of the inferior colliculus in guinea-pig. *Exp Brain Res* 160:235–244.
- Nakagawa H, Ikeda M, Houtani T, Ueyama T, Baba K, Kondoh A, Yamamoto T, Yamashita T, Sugimoto T (1995) Immunohistochemical evidence for enkephalin and neuropeptide Y in rat inferior colliculus neurons that provide ascending or commissural fibers. *Brain Res* 690:236–240.
- Ota Y, Oliver DL, Dolan DF (2004) Frequency-specific effects on cochlear responses during activation of the inferior colliculus in the Guinea pig. *J Neurophysiol* 91:2185–2193.
- Peruzzi D, Bartlett E, Smith PH, Oliver DL (1997) A monosynaptic GABAergic input from the inferior colliculus to the medial geniculate body in rat. *J Neurosci* 17:3766–3777.
- Rajan R (1990) Electrical stimulation of the inferior colliculus at low rates protects the cochlea from auditory desensitization. *Brain Res* 506:192–204.
- Reetz G, Ehret G (1999) Inputs from three brainstem sources to identified neurons of the mouse inferior colliculus slice. *Brain Res* 816:527–543.
- Reiner A, Honig M (2006) Dextran amines: versatile tools for anterograde and retrograde studies of nervous system connectivity. In: *Neuroanatomical tract-tracing 3: molecules, neurons, and systems* (Zaborsky L, Wouterlood FG, Lanciego JL, eds), pp 304–335. New York: Springer.
- Rhoades RW, Mooney RD, Szczepanik AM, Klein BG (1986) Structural and functional characteristics of commissural neurons in the superior colliculus of the hamster. *J Comp Neurol* 253:197–215.
- Saint Marie RL (1996) Glutamatergic connections of the auditory midbrain: selective uptake and axonal transport of D-[3H]aspartate. *J Comp Neurol* 373:255–270.

- Saint Marie RL, Stanforth DA, Jubelir EM (1997) Substrate for rapid feedforward inhibition of the auditory forebrain. *Brain Res* 765: 173–176.
- Saldaña E (1993) Descending projections from the inferior colliculus to the cochlear nuclei in mammals. In: *The mammalian cochlear nuclei: organization and function* (Merchán MA, Juiz JM, Godfrey DA, Mugnaini E, eds), pp 153–165. New York: Plenum Publishing Co.
- Saldaña E, Merchán MA (1992) Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 319:417–437.
- Saldaña E, Merchán MA (2005) Intrinsic and commissural connections of the inferior colliculus. In: *The inferior colliculus* (Winer JA, Schreiner CE, eds), pp 155–181. New York: Springer.
- Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E (1996) Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 371:15–40.
- Saldaña E, Viñuela A, Marshall AF, Fitzpatrick DC, Aparicio MA (2007) The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. *J Neurosci* 27:13108–13116.
- Saldaña E, Aparicio MA, Fuentes-Santamaría V, Berrebi AS (2009) Connections of the superior paraolivary nucleus of the rat: projections to the inferior colliculus. *Neuroscience* 163:372–387.
- Schweizer H (1981) The connections of the inferior colliculus and the organization of the brainstem auditory system in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *J Comp Neurol* 201: 25–49.
- Serkov FN, Ianovskii ESh, Tal'nov AN (1979) Electrophysiologic study of conduction of afferent impulses through the medial geniculate body. *Neirofiziologija* 11:515–523.
- Sesack SR, Miner LH, Omelchenko N (2006) Preembedding immunoelectron microscopy: applications for studies of the nervous system. In: *Neuroanatomical tract-tracing 3: molecules, neurons, and systems* (Zaborsky L, Wouterlood FG, Lanciego JL, eds), pp 6–71. New York: Springer.
- Smith PH (1992) Anatomy and physiology of multipolar cells in the rat inferior collicular cortex using the *in vitro* brain slice technique. *J Neurosci* 12:3700–3715.
- Tokunaga A, Sugita S, Otani K (1984) Auditory and non-auditory subcortical afferents to the inferior colliculus in the rat. *J Hirnforsch* 25:461–472.
- Vetter DE, Saldaña E, Mugnaini E (1993) Input form the inferior colliculus to medial olivocochlear neurons in the rat: a double label study with PHA-L and cholera toxin. *Hear Res* 70:173–186.
- Willard FH, Martin GF (1983) The auditory brainstem nuclei and some of their projections to the inferior colliculus in the North American opossum. *Neuroscience* 10:1203–1232.
- Winer JA, Saint Marie RL, Larue DT, Oliver DL (1996) GABAergic feedforward projections from the inferior colliculus to the medial geniculate body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8005–8010.
- Winer JF, Schreiner CE (2005) *The inferior colliculus*. New York: Springer Science+Business Media, Inc.
- Wise LZ, Irvine DR (1983) Auditory response properties of neurons in deep layers of cat superior colliculus. *J Neurophysiol* 49:674–485.
- Yamasaki DS, Krauthamer G, Rhoades RW (1984) Organization of the intercollicular pathway in rat. *Brain Res* 300:368–371.
- Wouterlood FG, Groenewegen HJ (1985) Neuroanatomical tracing by use of *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L): electron microscopy of PHA-L-filled neuronal somata, dendrites, axons and axon terminals. *Brain Res* 326:188–191.
- Zhang W, Dolan DF (2006) Inferior colliculus stimulation causes similar efferent effects on ipsilateral and contralateral cochlear potentials in the guinea pig. *Brain Res* 1081:138–149.

(Accepted 30 December 2009)
 (Available online 6 January 2010)



ANEXO IV

Viñuela A*, Aparicio MA*, Berrebi AS, Saldaña E (2011) Connections of the superior paraolivary nucleus of the Rat: II. Reciprocal connections with the tectal longitudinal column. *Front Neuroanat* 5:1.

* Estos dos autores contribuyeron por igual al estudio.



Connections of the superior paraolivary nucleus of the rat: II. Reciprocal connections with the tectal longitudinal column

Antonio Viñuela^{1,2}, M.-Auxiliadora Aparicio^{1,3}, Albert S. Berrebi⁴ and Enrique Saldaña^{1,2*}

¹ Laboratory for the Neurobiology of Hearing, Neuroscience Institute of Castilla y León, University of Salamanca, Salamanca, Spain

² Department of Cell Biology and Pathology, Medical School, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³ Department of Pathology, Clinical University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁴ Department of Otolaryngology, The Sensory Neuroscience Research Center, West Virginia University School of Medicine, Morgantown, WV, USA

Edited by:

Enrico Mugnaini, Northwestern University, USA

Reviewed by:

Marina Bentivoglio, University of Verona, Italy

Douglas L. Oliver, University of Connecticut Health Center, USA

Donata Oertel, University of Wisconsin, USA

Joe Adams, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, USA

***Correspondence:**

Enrique Saldaña, Laboratory for the Neurobiology of Hearing, Neuroscience Institute of Castilla y León, University of Salamanca, Salamanca 37007, Spain.
e-mail: saldana@usal.es

The superior paraolivary nucleus (SPON), a prominent GABAergic center of the mammalian auditory brainstem, projects to the ipsilateral inferior colliculus (IC) and sends axons through the commissure of the IC (CoIC). Herein we demonstrate that the SPON is reciprocally connected with the recently discovered tectal longitudinal column (TLC). The TLC is a long and narrow structure that spans nearly the entire midbrain tectum longitudinally, immediately above the periaqueductal gray matter (PAG) and very close to the midline. Unilateral injections of biotinylated dextran into the SPON of the rat label abundant terminal fibers in the TLC of both sides, with an ipsilateral predominance. The SPON provides a dense innervation of the entire rostrocaudal extent of the ipsilateral TLC, and a relatively sparser innervation of the caudal and rostral portions of the contralateral TLC. SPON fibers reach the TLC by two routes: as collaterals of axons of the CoIC, and as axons that circumvent the ipsilateral IC before traveling in the deep layers of the superior colliculus (SC). The density of these projections identifies SPON as a significant source of input to the TLC. Other targets of the SPON discovered in this study include the deep layers of the SC and the PAG. The same experiments reveal numerous labeled cell bodies in the TLC, interspersed among the labeled SPON fibers. This observation suggests that the SPON is a significant target of TLC projections. The discovery of novel reciprocal connections between the SPON and the TLC opens unexpected avenues for investigation of sound processing in mammalian brainstem circuits.

Keywords: auditory brainstem, commissure of the inferior colliculus, superior colliculus, periaqueductal gray matter, superior olfactory complex, biotinylated dextran amine, tract-tracing

INTRODUCTION

The tectal longitudinal column (TLC) spans the midbrain tectum longitudinally, immediately above the periaqueductal gray matter (PAG) and very close to the midline. In the rat, the TLC extends approximately 3.5 mm, from the caudal end of the commissure of the inferior colliculus (CoIC) to the rostral end of the commissure of the superior colliculus (CoSC), and occupies what has traditionally been considered the medial-most region of the deep superior colliculus (SC) and the medial-most region of the inferior colliculus (IC). Despite measuring only 250–350 μm in diameter, more than 11,500 neurons are packed within this long and narrow structure (Saldaña et al., 2007).

The caudal and rostral thirds of the TLC are crossed by the CoIC and by the CoSC (Saldaña et al., 2007), respectively, suggesting that these fiber tracts are a preferred pathway of entry for afferent inputs to the TLC. The CoIC contains mostly commissural axons of the IC, as well as axons from other sources or destined for other targets (reviewed by Saldaña and Merchán, 2005). These include axons from various subcollicular auditory nuclei, namely the sagulum and nuclei of the lateral lemniscus (González-Hernández et al., 1987; Henkel and Shneiderman 1988; Hutson et al., 1991; Bajó et al., 1993). Recently, it has been demonstrated that the superior

paraolivary nucleus (SPON), a prominent cell group of the superior olfactory complex (SOC), also projects axons across the CoIC (Saldaña et al., 2009). Thus, we set forth to investigate whether the SPON, which is likely the caudal-most auditory center sending projections across the CoIC, innervates the TLC. We chose to carry out this investigation in rats because the TLC has been best characterized in this species (Saldaña et al., 2007; Marshall et al., 2008; Aparicio et al., 2010); moreover, abundant information is available concerning the structure, connections and physiology of the rat SPON (Kulesza Jr. and Berrebi, 2000; Saldaña and Berrebi, 2000; Kulesza Jr. et al., 2003, 2007; Kadner et al., 2006; Kadner and Berrebi, 2008; Saldaña et al., 2009).

MATERIALS AND METHODS

Thirteen female albino rats (body weight 190–210 g) with clean ear canals and no sign of middle ear infection were used in this study. These specimens were also used for the study of SPON projections to the IC described in a previous article (Saldaña et al., 2009). All animals were cared for and used in compliance with European Union regulations concerning the use of animals in biomedical research, and the experimental procedures were approved and supervised by the Animal Care and Use Committee of the University of Salamanca.

For surgical procedures, including the transcardial perfusion of fixatives, all animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine HCl (80 mg/kg body weight) and xylazine (6 mg/kg body weight) administered intramuscularly. Animal suffering was minimized by monitoring the depth of anesthesia often, carefully attending to physiological cues such as rate and depth of respiration and reflex activity. Supplemental doses of anesthetics were given as needed to maintain deep anesthesia throughout all procedures.

Glass micropipettes loaded with the neuroanatomical tracer biotinylated dextran amine (BDA, 10,000 MW, Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 10% in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) were lowered into the SPON of deeply anesthetized rats using stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 2007). To avoid damage to the prominent transverse sinus, the pipettes were lowered into the brain *via* a dorsocaudal to ventrorostral approach, so that their trajectory formed a 16° angle with the coronal plane. The tracer was delivered by iontophoresis using a pulsed 5 μA DC positive current (7 s on/7 s off) for 5–15 min. The current was then stopped and the pipette left in place for an additional 15–20 min prior to withdrawal in order to minimize leakage of the tracer along the injection tract.

Following 7–10 days survival, the rats were anesthetized deeply and their brains fixed by transcardial perfusion of buffered 4% formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde) and 0.1% glutaraldehyde. After cryoprotection in 30% sucrose in phosphate buffer, the brains were cut coronally on a freezing microtome at a thickness of 40 μm. To visualize the tracer, the sections were first processed by the avidin–biotin–peroxidase complex procedure following the manufacturer's specifications (ABC, Vectastain, Vector Labs, Burlingame, CA, USA), and then by standard histochemistry for peroxidase, with or without heavy-metal intensification (Vetter et al., 1993). For cytoarchitectural reference, every fourth section was counterstained with cresyl violet.

Sections were photographed at high resolution using a Zeiss Axioskop 40 microscope equipped with a Zeiss AxioCam MRc 5 digital camera and 2.5× (NA 0.075), 5× (NA 0.15), 10× (NA 0.30), 20× (NA 0.50), and 40× (NA 0.75) plan semi-apochromatic objective lenses. Image brightness and contrast were adjusted with Adobe Photoshop software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA), and the illustrations were arranged into plates using Canvas software (ACD Systems of America, Inc., Miami, FL, USA).

To generate the drawings of **Figure 2**, the sections were first photographed at high resolution with the 5× objective lens. At this magnification, several micrographs were needed to photograph every section. These photographs were then arranged and fitted using Adobe Photoshop software to create a large mosaic image of the section. The resulting digital image was imported into Canvas software. To increase the resolution of the final image, a new layer was created over the digital image and each labeled fiber contained within the original micrograph was redrawn digitally using Canvas' freehand drawing tool. This digital procedure allowed us to subsequently adjust the thickness of the lines. The new digital layer, without the underlying micrograph, was finally saved as a TIFF file.

A similar procedure was used to produce the plots showing the distribution of presumed labeled synaptic boutons in **Figures 6 and 7**. To convey a clear impression of synaptic bouton density, each plot of **Figure 7** was subsequently transferred to a Photoshop document and blurred using a Gaussian filter with a 20-pixel square matrix.

RESULTS

The present results are based on 13 cases with single injections of BDA into the SPON. In 12 cases, the injection sites were localized within the SPON, without encroaching upon neighboring structures (e.g., **Figure 1A**). In the other case (case 99014), the injection site encroached upon the medial superior olive. The mediolateral diameter of the center of the injection sites ranged from 150 to 380 μm. **Figure 1B** shows schematically the injection site of seven representative cases.

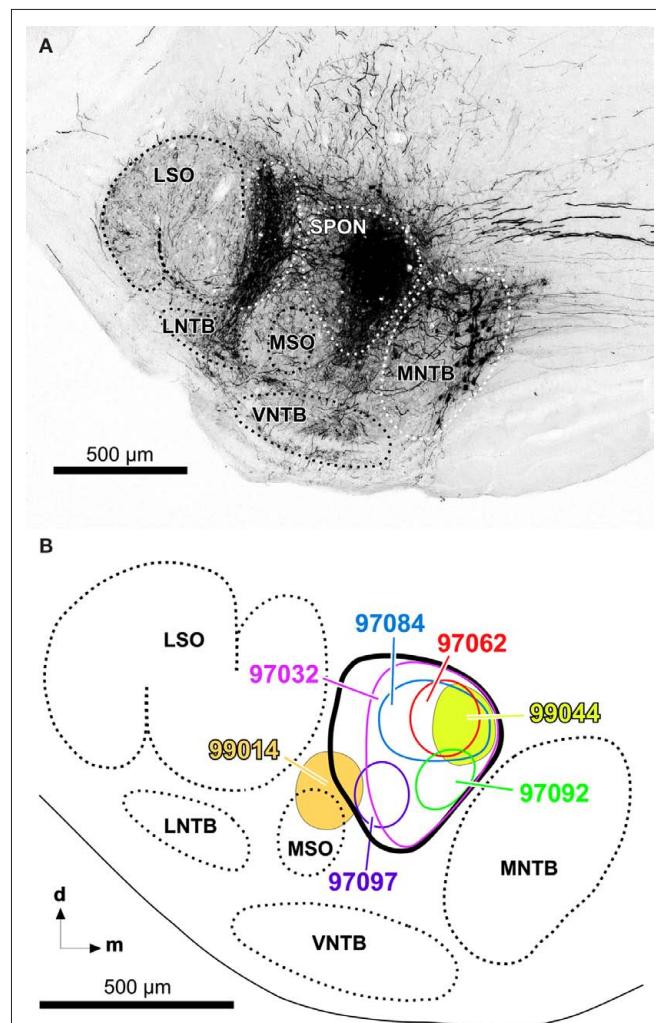


FIGURE 1 | (A) Representative injection site of BDA into the SPON of the rat. Digital photomicrograph of a coronal section through the central rostrocaudal third of the left superior olfactory nucleus (SPON) from a case whose injection site is wholly contained within the limits of the SPON (case 97062). Retrogradely labeled neuronal cell bodies in the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) and their fibers and terminals in the lateral superior olive (LSO) are evident. For more information on the interpretation of the neurons and fibers labeled following injections of BDA into the SPON, see Saldaña et al. (2009). **(B)** Schematic representation of the sizes and locations of the injection sites of various representative cases. Other abbreviations: d, dorsal; LNTB, lateral nucleus of the trapezoid body; m, medial; MSO, medial superior olive; VNTB, ventral nucleus of the trapezoid body.

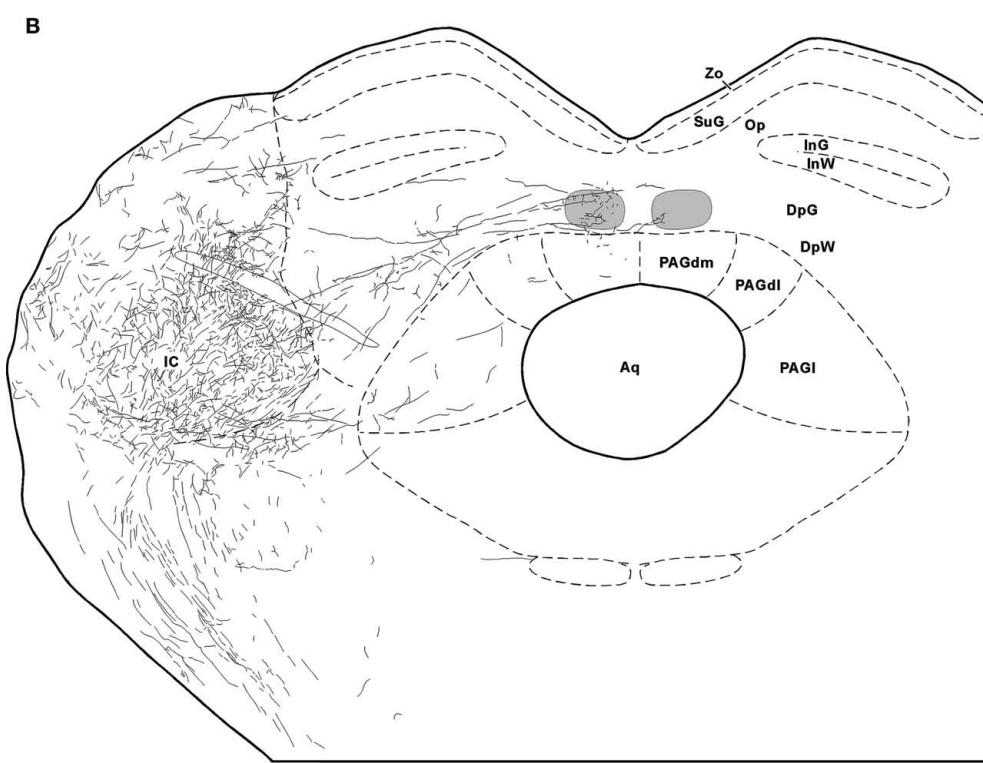
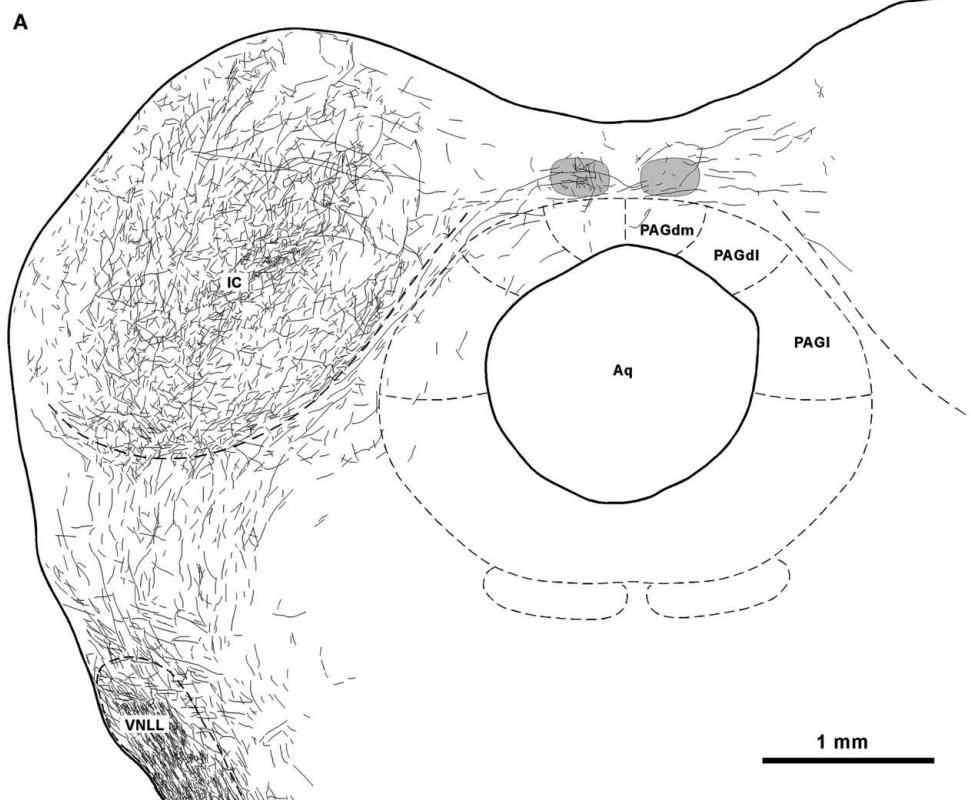


FIGURE 2 | (Continued)

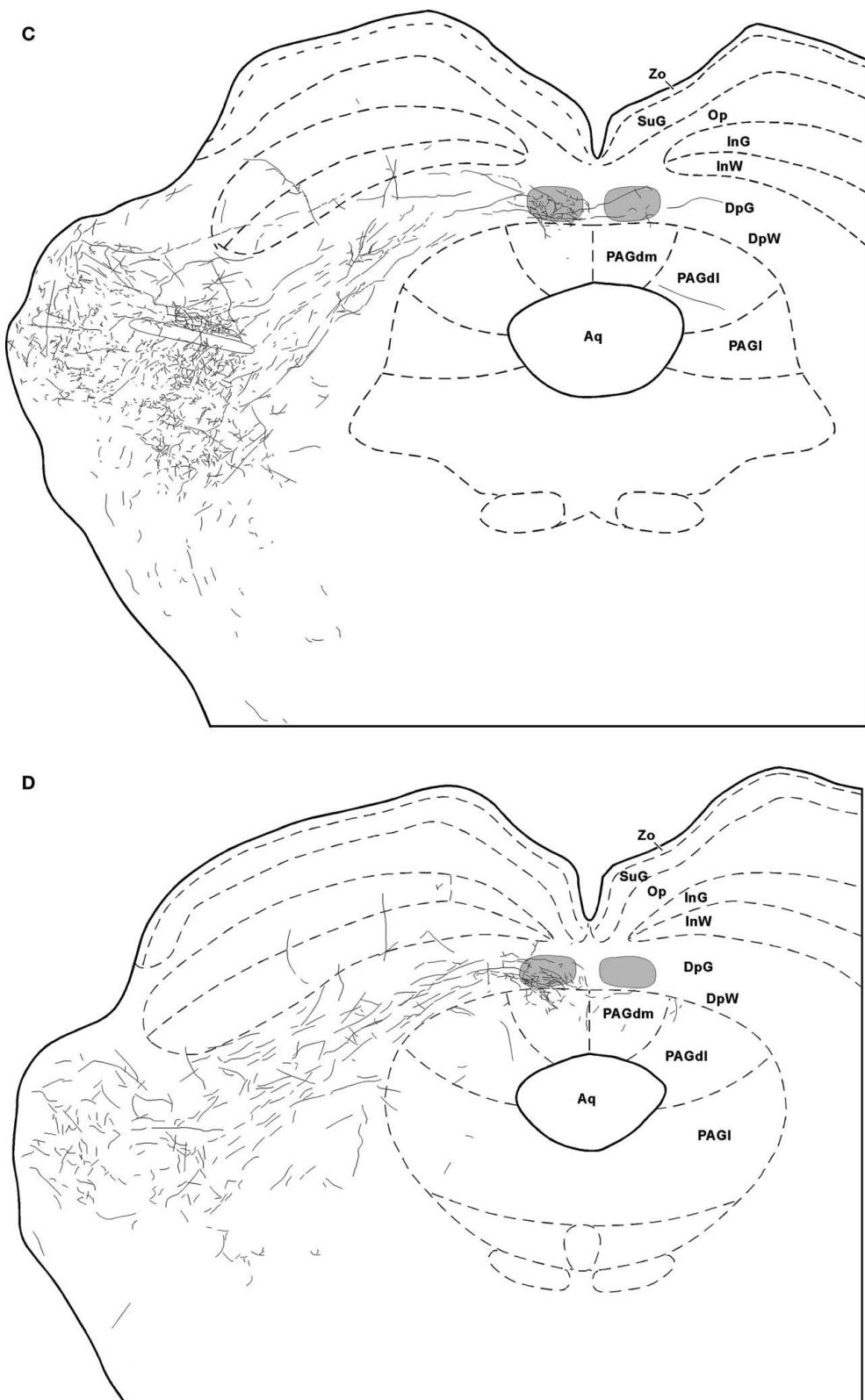


FIGURE 2 | (Continued)

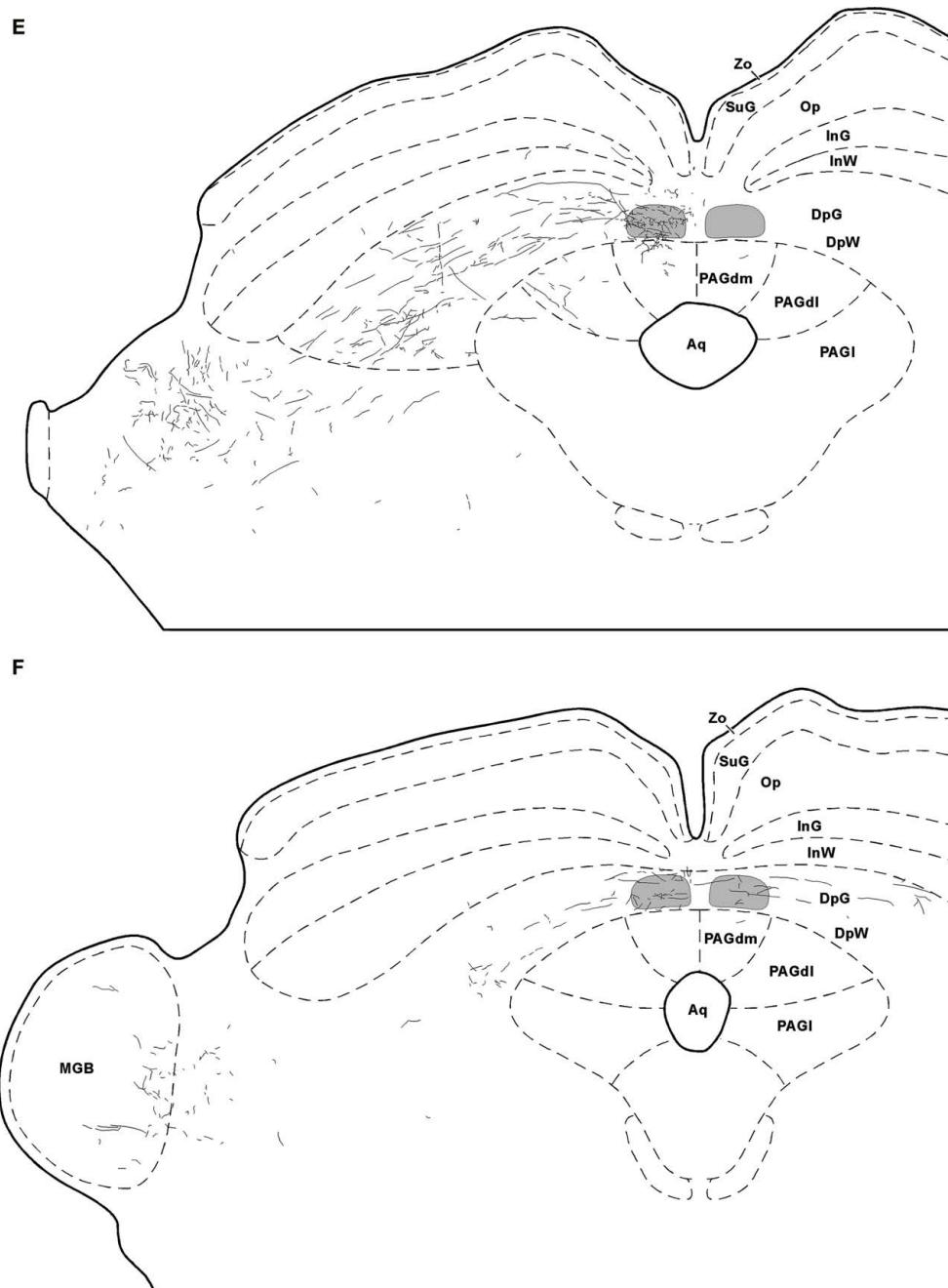


FIGURE 2 | Trajectory and distribution of SPON axons. (A–F) Drawings of coronal sections of the midbrain illustrating axons labeled following a single injection of BDA into the left SPON. Case 97084, whose injection site is depicted in **Figure 1B**. The sections have been ordered from caudal to rostral and illustrate levels similar to those shown in **Figure 3**. The TLC is represented in light gray and the scale bar in **(A)** applies to all six drawings. Abbreviations of SC

layers: DpG, deep gray; DpW, deep white; InG, intermediate gray; InW, intermediate white; Op, stratum opticum; SuG, superficial gray; Zo, stratum zonale. Abbreviations of periaqueductal gray matter (PAG) columns: PAGI, lateral column; PAGdl, dorsolateral column; PAGdm, dorsomedial column. Other abbreviations: Aq, cerebral aqueduct; IC, inferior colliculus; MGB, medial geniculate body; VNLL, ventral nucleus of the lateral lemniscus.

PROJECTION FROM THE SPON TO THE TLC

Labeled SPON axons, easily recognizable by their large caliber ($>1.2 \mu\text{m}$), exit the injection site and travel rostrally, dorsally, and laterally to join the medial-most aspect of the ipsilateral lateral lem-

niscus, through which they ascend toward the midbrain tectum without entering the nuclei of the lateral lemniscus. Most SPON axons then penetrate into the IC, where they create dense terminal fields in all IC subdivisions. Some SPON axons that reach the dorsal cortex

of the IC extend dorsomedially and cross the CoIC, to innervate the dorsal cortex of the contralateral IC. The distribution of labeled fibers in the nuclei of the lateral lemniscus and the IC following injections of BDA into the SPON has been described previously (Saldaña et al., 2009) and will therefore not be considered further in this account.

Those SPON axons destined to innervate the TLC do so by two different routes. The first route is taken by some of the axons traveling in the CoIC (Figures 2A,B, 3A,B, and 4A). These fibers give off one or more collaterals within the ipsilateral TLC and/or,

less frequently, within the contralateral TLC. Occasionally individual labeled SPON fibers give off collaterals to both the ipsilateral and contralateral TLCs (Figure 4A). All of these collaterals are usually thin and tend to run either vertically within the CoIC or rostrally, so that the latter course caudorostrally within the TLC.

The second, more prominent pathway of entry into the TLC is formed by SPON axons that circumvent the ipsilateral IC ventromedially or ventrorostrally to reach the SC. These fibers then run dorsomedially through the deep layers of the SC to reach the

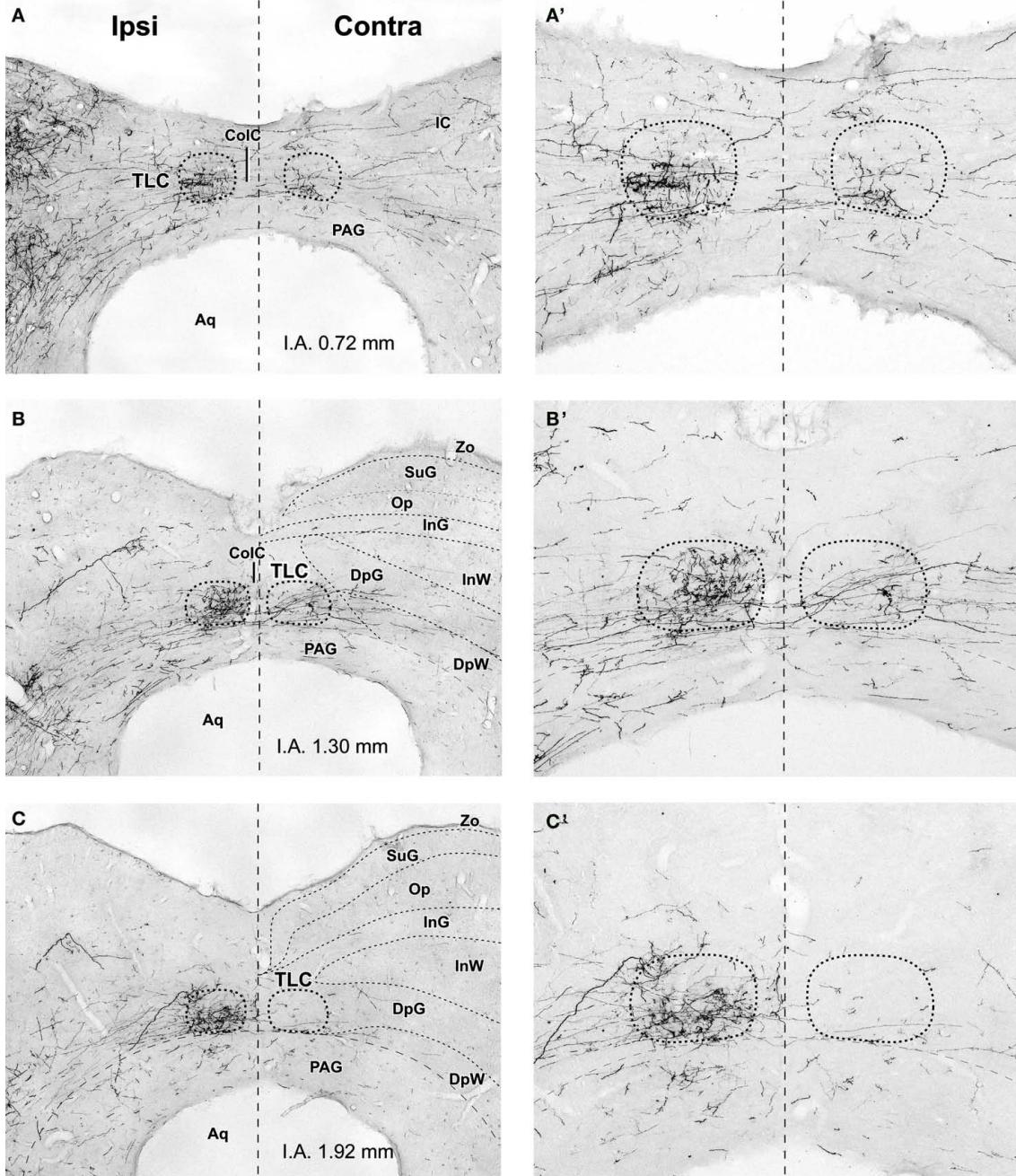


FIGURE 3 | (Continued)

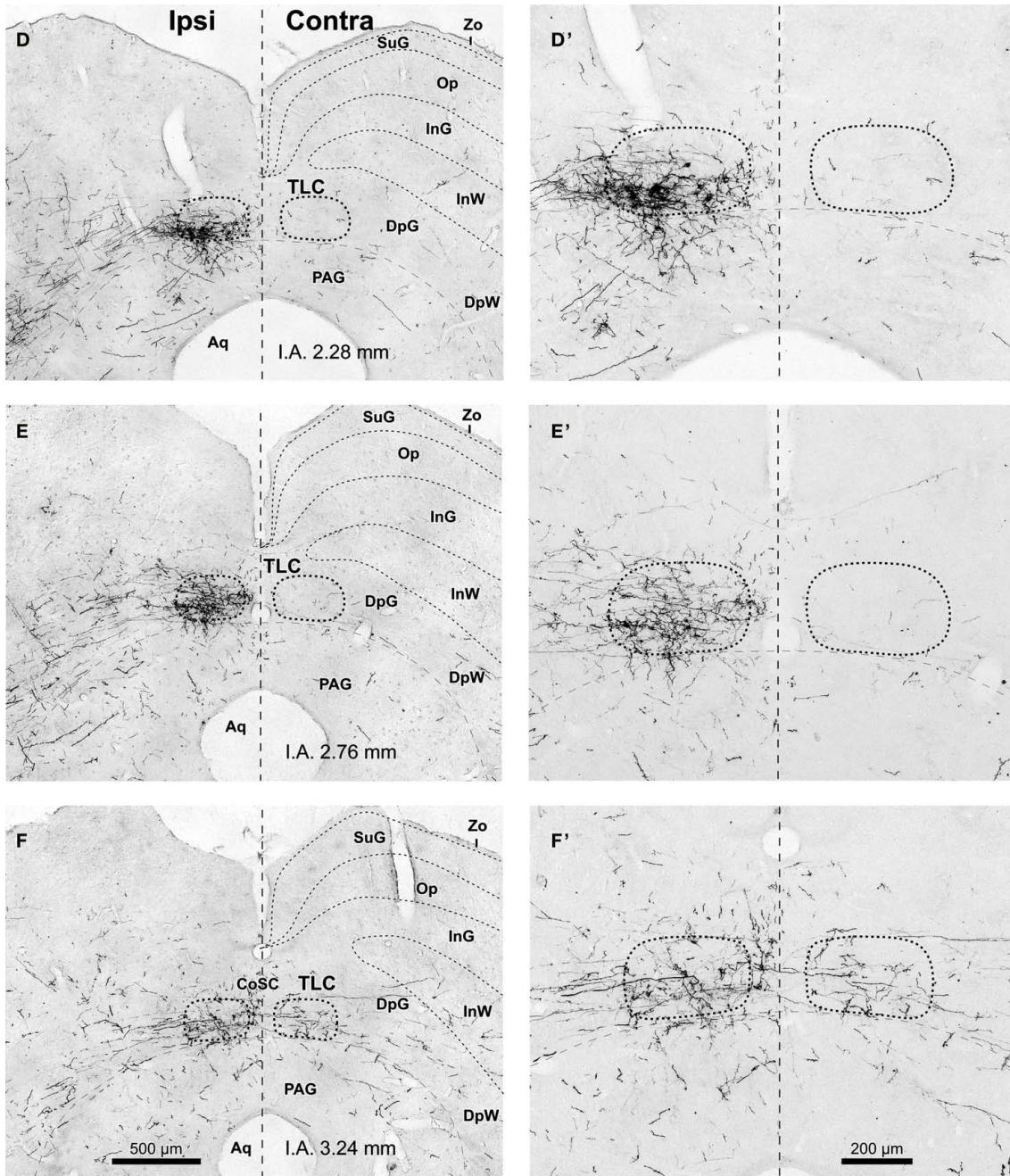


FIGURE 3 | Labeled SPON axons in the TLC. (A–F,A'–F') Digital micrographs of six coronal sections taken from different rostrocaudal levels of the midbrain tectum of case 97084, whose injection site is depicted in **Figure 1B**. Sections have been ordered from caudal to rostral. The number at the bottom of each panel indicates the distance in millimeters between the

depicted plane and the interaural coronal plane (I.A.). Micrographs in the right column show higher magnification views of the corresponding micrograph in the left column. Vertical dashed lines indicate the midline. Scale bars in (F,F') apply to all six micrographs within the corresponding column. Abbreviations of SC layers as in **Figure 2**. Other abbreviations: CoIC, commissure of the IC; CoSC, commissure of the SC; PAG, periaqueductal gray matter.

ipsilateral TLC, which they enter at different rostrocaudal levels (**Figures 2C–F and 3C–F**). Upon entering the TLC by this route, SPON axons usually turn caudally and/or rostrally to span the nucleus longitudinally. Most of these axons seem to end within the ipsilateral TLC. However, some of them, particularly those

traveling in the CoSC, give off collaterals for the ipsilateral TLC before crossing the midline to innervate the contralateral TLC or even proceeding into the contralateral SC (**Figures 2F and 3F**). The two routes taken by SPON axons that innervate the TLC are depicted schematically in **Figure 5**.

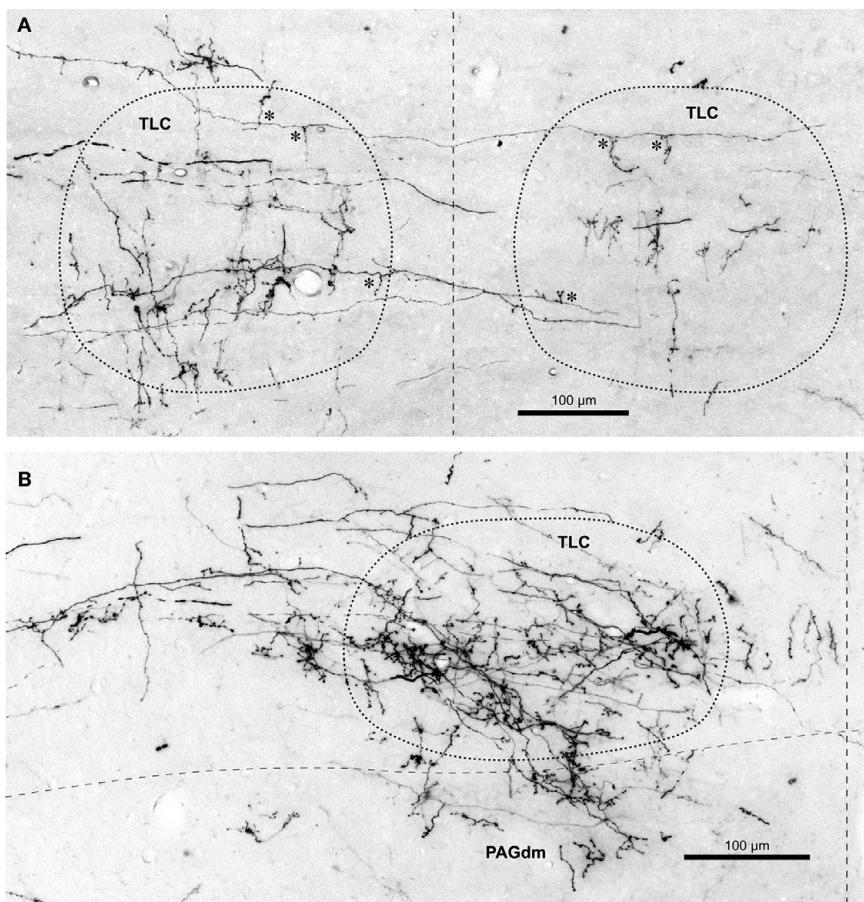


FIGURE 4 | Labeled terminal SPON fibers in the TLC. **(A)** Micrograph of a coronal section through the caudal portion of the left and right TLC after BDA was injected into the left SPON. Case 97097, whose injection site is depicted in **Figure 1B**. Several labeled SPON axons give off collateral branches (asterisks) within the ipsilateral and the contralateral TLC. Note the predominantly vertical orientation of the terminal axonal branches. **(B)** Micrograph of a coronal section

through the central third of the TLC, Case 97084, whose injection site is depicted in **Figure 1B**. Numerous labeled fibers from the ipsilateral SPON enter the TLC from the SC and branch into thin collateral bearing abundant *en passant* and terminal boutons. Note terminal fibers entering the dorsomedial column of the PAG (PAGdm) from the overlying TLC. In both **(A,B)** the TLC has been delimited by dotted lines and the dashed vertical line indicates the midline.

It is evident from these observations that the projections from SPON to the ipsilateral and contralateral TLC are asymmetric. SPON fibers innervate densely the entire rostrocaudal length of the ipsilateral TLC, but only the caudal and rostral ends of the contralateral TLC (**Figures 2 and 3**).

The caudal third of the ipsilateral TLC is innervated preferentially by collaterals of axons that travel in the CoIC (**Figures 2A, B, 3A, B, 4A, and 5**), whereas the central and the rostral thirds of the nucleus are innervated mostly by axons that run through the deep layers of the SC (**Figures 2C–F, 3C–F, 4B, and 5**). The density of terminal SPON fibers is maximal in the central rostrocaudal third and decreases toward the caudal and the rostral ends of the TLC (**Figures 3 and 6**).

The caudal and the rostral portions of the contralateral TLC receive relatively sparse projections from the SPON by way of collaterals of axons that travel in the CoIC (**Figures 3A,B**) and the CoSC (**Figure 3F**), respectively. At every rostrocaudal level, the projection from SPON to the contralateral TLC is considerably less dense than the uncrossed projection (**Figure 6**).

The terminal branches of SPON axons within the TLC are variously oriented, although vertically oriented terminal fibers predominate at caudal levels on both sides (**Figures 3A' and 4A**). Despite these varying orientations, the morphology of SPON axons is essentially similar on the two sides and remains rather constant at all rostrocaudal levels. Many terminal branches give off multiple short collaterals with one to three swellings, whereas others end in beaded branches bearing numerous small (<1.5 μ m) *en passant* swellings and a terminal bouton (**Figure 4B**); all these varicosities and boutons are presumed to represent synaptic specializations.

TOPOGRAPHY OF PROJECTIONS FROM THE SPON TO THE TLC

Despite the fact that the projections from the SPON to the IC are clearly topographic and presumably tonotopic (Saldaña et al., 2009), no topographic organization is readily apparent in the projections from the SPON to the TLC. In all cases, regardless of the location of the injection site within SPON, labeled terminal fibers are widely distributed along the rostrocaudal

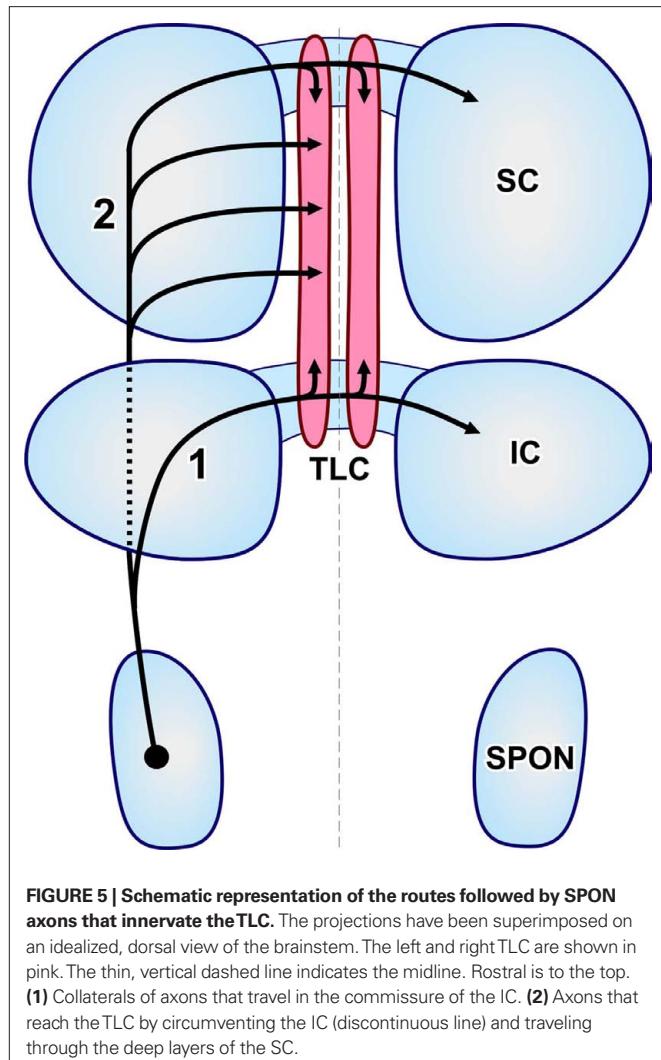


FIGURE 5 | Schematic representation of the routes followed by SPON axons that innervate the TLC. The projections have been superimposed on an idealized, dorsal view of the brainstem. The left and right TLC are shown in pink. The thin, vertical dashed line indicates the midline. Rostral is to the top. (1) Collaterals of axons that travel in the commissure of the IC. (2) Axons that reach the TLC by circumventing the IC (discontinuous line) and traveling through the deep layers of the SC.

and mediolateral axes of the TLC (Figure 3). The distribution of terminal fibers along the dorsoventral axis shows variations among different sections in a given case (for instance, in Figures 3B,E the labeled terminal fibers cover the entire dorsoventral diameter of the TLC, whereas in Figures 3C,D terminal fibers are concentrated in the ventral half of the nucleus; see also Figure 6).

Despite the above considerations, a subtle dorsoventral topography is appreciated at caudal levels. The terminal fields of SPON fibers tend to shift their dorsoventral position within the TLC as a function of the position of the injection site along the tonotopic (i.e., mediolateral) axis of the SPON (Figures 7A1–A3,B1–B3). Thus, in cases with tracer deposits in the medial (high characteristic frequency) region of the SPON, labeled terminal fibers are distributed mostly throughout the ventral half of the TLC; conversely, after injections in more lateral (lower characteristic frequency) regions of the SPON, labeled terminal fibers predominate dorsally within the TLC. This slight topographic tendency observed at caudal levels becomes gradually more difficult to discern rostrally (Figures 7A4,A5,B4,B5).

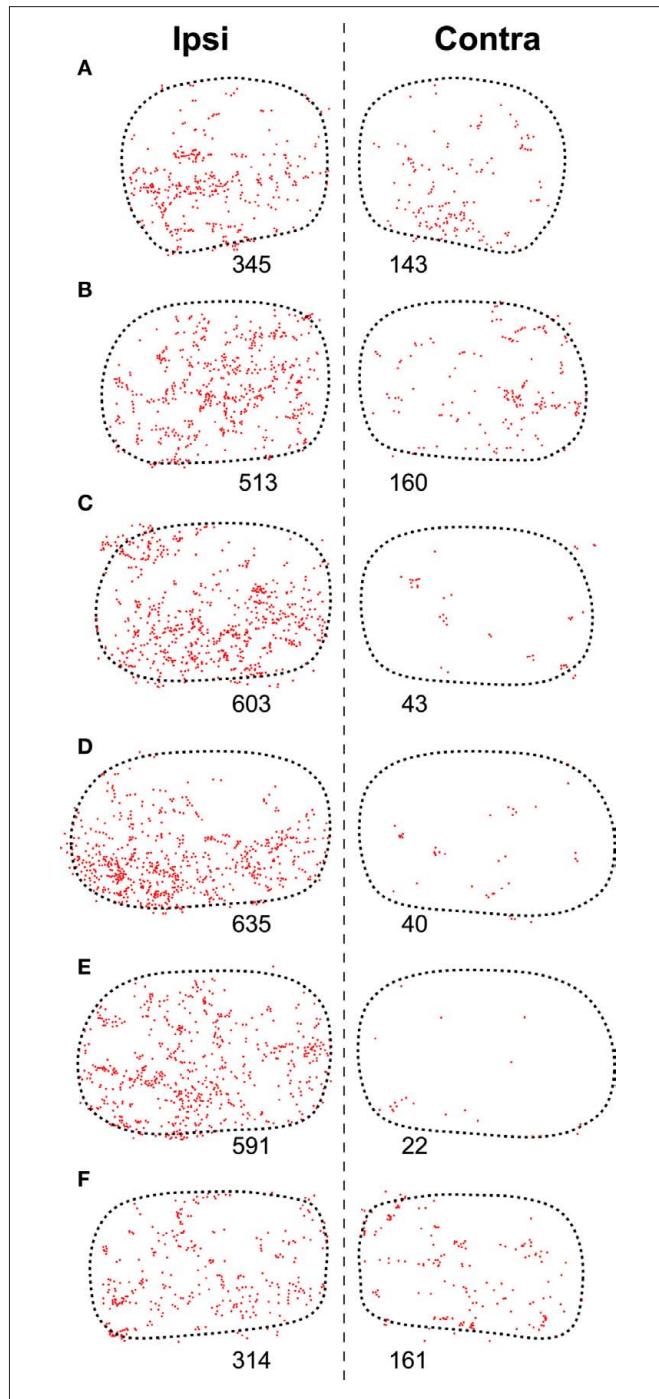


FIGURE 6 | Distribution of presumed synaptic boutons of SPON fibers in the TLC. (A–F) Plots of the location of all swellings and varicosities of SPON fibers labeled in the same sections of the TLC shown in Figure 3 (Case 97084). Each dot represents one presumed bouton. The number below each TLC indicates the number of labeled boutons.

OTHER TARGETS OF SPON PROJECTIONS

Superior paraolivary nucleus neurons send projections to other targets besides the IC and the TLC. For example, even though many SPON axons that circumvent the IC appear to traverse the deep layers of the SC without branching, others give off collaterals that innervate the SC or the PAG (Figures 2, 3, 4B, and 8).

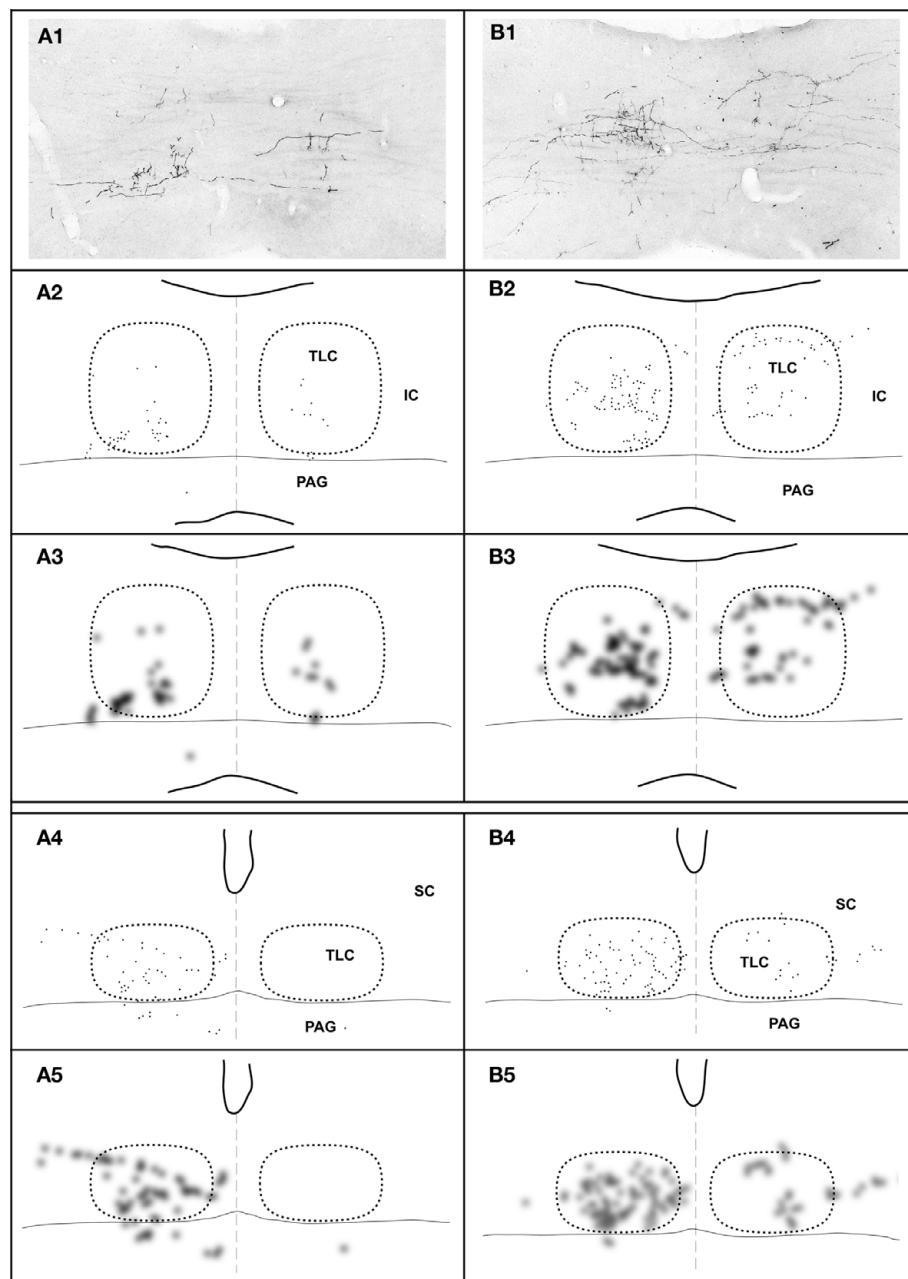


FIGURE 7 | Topography of the projection from the SPON to the TLC in two cases, whose injections of BDA were located in different positions along the mediolateral, tonotopic axis of the SPON. In case 97092 (left column) the injection site was located close to the medial border of the SPON (**Figure 1B**), whereas in case 97097 (right column) it was located in the lateral half of the SPON (**Figure 1B**). In each column, the image at the top (**A1,B1**) is a digital photomicrograph of a coronal section through the commissure of the IC (caudal third of the TLC). The second row (**A2,B2**) depicts a plot of the location of all labeled axonal swellings or varicosities (presumed to represent synaptic

boutons) found in the microscopic field illustrated above. Each dot represents one axonal swelling or varicosity. The third row (**A3,B3**) shows a blurred image of the plots of the second row, in which the areas with the highest density of presumed synaptic boutons appear darkest. The fourth (**A4,B4**) and the fifth (**A5,B5**) rows show plots and blurred images of the distribution of the presumed synaptic boutons in a coronal section through the central rostrocaudal third of the TLC. In all panels, the right and the left TLC are delimited by dotted lines. Notice that the dorsoventral topography observed in caudal sections (**A3–B3**) becomes virtually lost at more rostral levels (**A5–B5**).

In the SC ipsilateral to the injection site, labeled terminal fibers seem to concentrate in the caudal, ventral, and lateral region of the deep layers, not far from the rostral pole of the IC (**Figures 8A,B**). A few labeled collaterals ascend radially toward the intermedi-

ate and superficial layers, where terminal labeling is very sparse (**Figures 8A,C**). Very few labeled fibers are observed in layers of the ipsilateral SC more superficial than the intermediate gray layer (**Figures 2 and 8**).

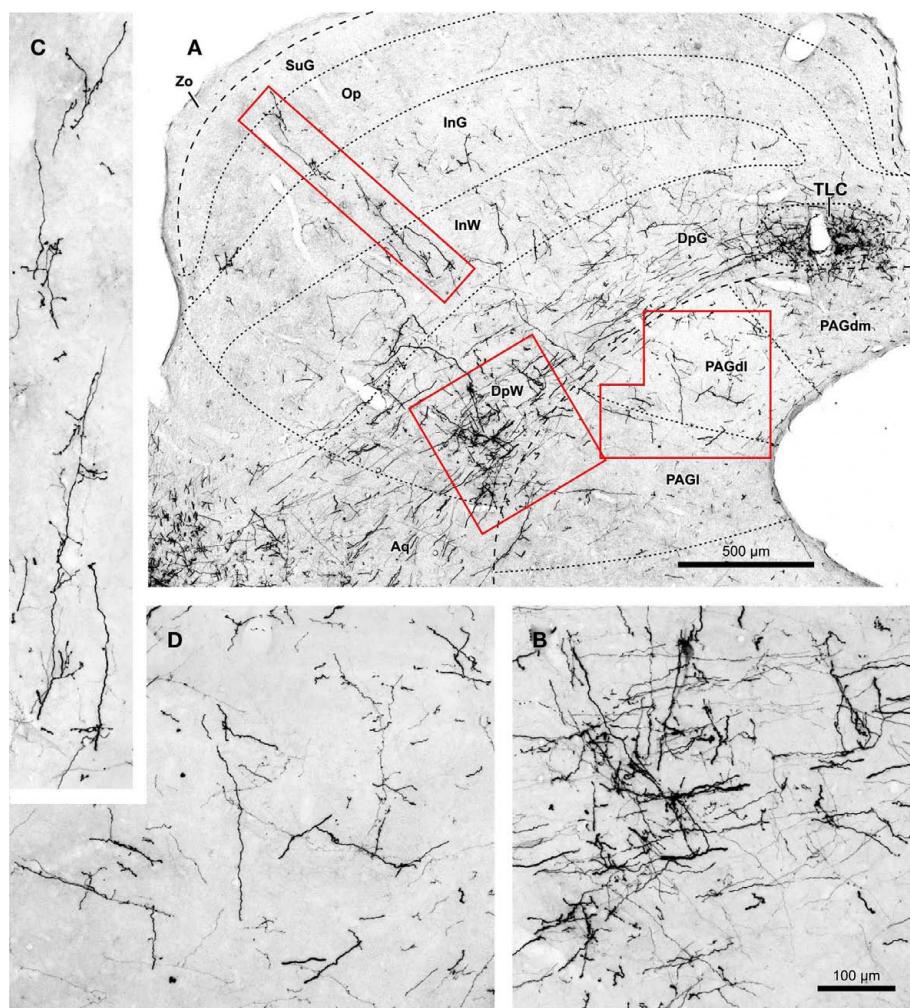


FIGURE 8 | (A) Micrograph of a coronal section of the midbrain tectum from a case that received an injection of BDA confined to the ipsilateral SPON. Case 97084, whose injection site is depicted in **Figure 1B**. The boxed areas are shown at higher magnification in **(B–D)**. **(B)** Terminal labeling in the ventrolateral part of

the deep layers of the SC. **(C)** Labeled fibers that ascend radially toward the superficial layers of the SC. **(D)** Details of terminal fibers in the dorsolateral column of the PAG (PAGdl). Calibration bar in **(B)** applies also to **(C,D)**. Abbreviations of SC layers and PAG columns as in **Figure 2**.

Terminal labeling in the PAG ipsilateral to the injection site is sparse and widely distributed throughout the lateral, dorsolateral, and dorsomedial columns (**Figures 2, 3, and 8A,D**). In all cases, a few labeled fibers enter the dorsomedial column of the PAG from the overlying TLC (**Figure 4B**).

Terminal labeling is observed also in the SC and PAG contralateral to the injection site (**Figures 2 and 3**). These crossed projections are considerably less dense, however, than their ipsilateral counterparts.

Lastly, we also noted labeled terminal axons in the medial geniculate body ipsilateral to the injection site (**Figure 2F**). This novel projection from the SPON will be described in detail in a separate account.

RETROGRADELY LABELED NEURONS IN THE TLC

In most of our cases, retrogradely labeled cell bodies are found in the ipsilateral TLC (**Figure 9**), whereas neurons labeled in the contralateral TLC are very scarce (**Figure 9E**). The number of retrogradely labeled neurons varied from case to case and is

apparently not related to the position of the injection site within the SPON. It is noteworthy that such retrogradely labeled neurons are always located within the territory occupied by SPON labeled terminal fibers (**Figure 9**), suggesting that the SPON and the TLC are reciprocally connected.

Most labeled TLC neurons display a punctate reaction product restricted to the cell body and, sometimes, the proximal dendritic segments; their axons are not labeled (**Figures 9A–E**). In the rare instances of neurons with diffuse labeling whose axons are labeled for hundreds of micrometers, no axonal collaterals are observed within the TLC (**Figure 9F**), suggesting that tectobulbar TLC neurons do not possess local recurrent collaterals.

Whereas close appositions between anterogradely labeled axonal swellings of SPON fibers and labeled cell bodies or dendrites in the TLC are occasionally observed, most axonal swellings are seen at a distance from retrogradely labeled neurons (**Figure 9**). This result suggests that SPON fibers preferentially target TLC neurons that do not innervate the SPON. However, we cannot rule out the

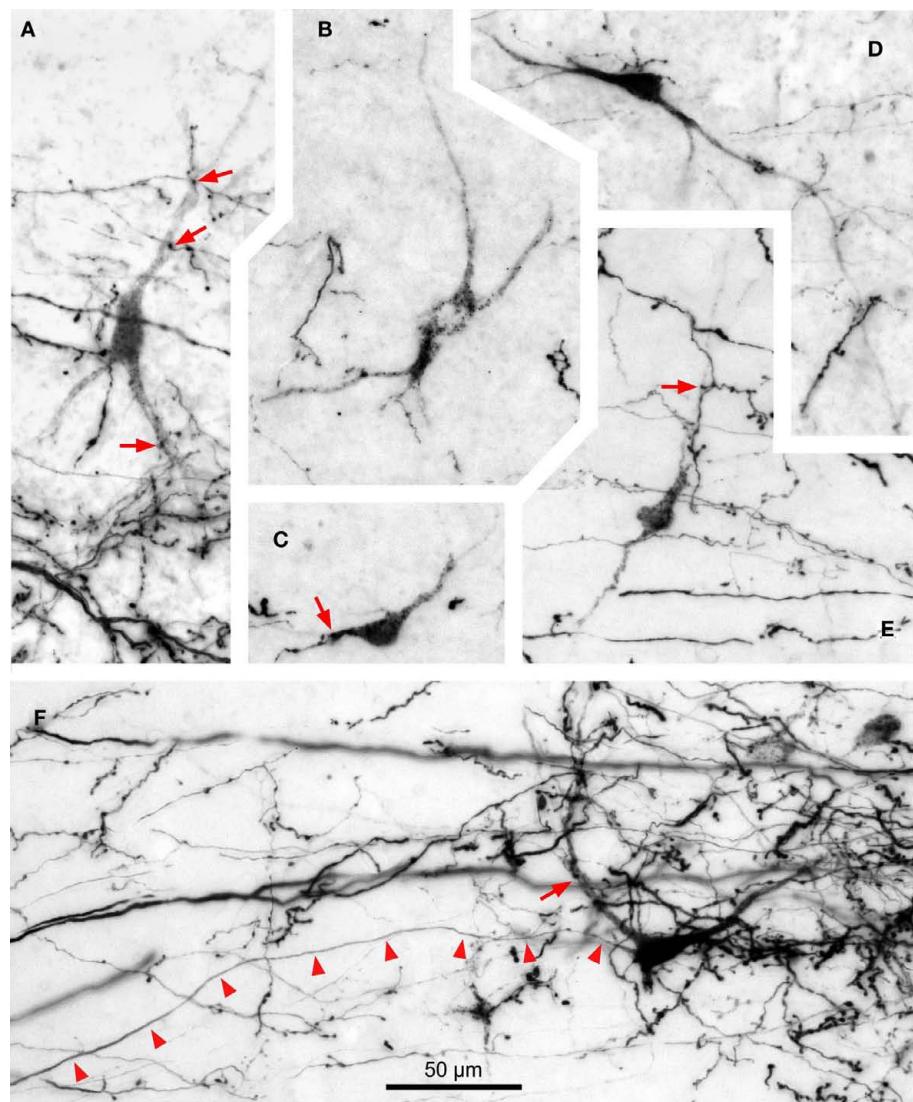


FIGURE 9 | Digital micrographs of TLC neurons retrogradely labeled following an injection of BDA into the SPON. Coronal sections. With the exception of (E), all fields depict labeling in the TLC ipsilateral to the injection site. Note the multipolar morphology of the neurons, which are always intermingled with the terminal fiber fields formed by SPON axons. Red

arrows indicate close appositions between boutons of labeled SPON axons and retrogradely labeled TLC neurons. Arrowheads in (F) point to the unbranched axon of a retrogradely labeled TLC neuron. (A) to (D) are from case 99044, and (E,F) from case 97084. Calibration bar in (F) applies to all micrographs.

possibility that SPON axons also innervate distal-most portions of the dendrites of tectobulbar TLC neurons that remained unlabeled in our experiments.

DISCUSSION

Our experiments have disclosed hitherto unknown projections from the SPON to the TLC of the rat, which constitute a major, novel auditory pathway through the lower brainstem to the midbrain. The SPON targets the entire ipsilateral TLC and, less densely, the caudal and rostral regions of the contralateral TLC. Our study also demonstrates that the SPON and the TLC are reciprocally connected, as the TLC contains abundant neurons that project back to the ipsilateral SPON.

TECHNICAL CONSIDERATIONS

In all our cases with injections of BDA into the SPON, numerous fibers were labeled in both the ipsilateral and contralateral TLC. This tracer is capable of giving rise to so-called collateral transport, whereby it labels anterogradely the collaterals of the axons through which it is transported retrogradely (i.e., Merchán et al., 1994; Warr et al., 1997; Doucet and Ryugo, 2003; Saldaña et al., 2009). Therefore, in principle, axons labeled with BDA may originate from neurons at the injection site (genuine anterograde transport) or may belong to neurons that innervate or cross the injection site (collateral transport). In our cases, numerous neurons were labeled in the ipsilateral medial nucleus of the trapezoid body (MNTB), and to a lesser extent in the contralateral ventral

cochlear nucleus and ipsilateral lateral nucleus of the trapezoid body (see also Saldaña et al., 2009). It is very unlikely, however, that the axons labeled in the TLC originated from these nuclei for two reasons: first, because labeled neurons are never found in any of these brainstem nuclei following deposits of the sensitive retrograde tracer FluoroGold into the paramedian region of the midbrain tectum that include large portions of the TLC within the injection site; and second, because labeled fibers are never found in the TLC following injections of BDA into the MNTB or the cochlear nuclei (unpublished observations).

In many of our cases, numerous neurons were retrogradely labeled within the TLC, but their axons were not visible (**Figure 9**). Moreover, the few retrogradely labeled neurons whose axons were labeled did not give off local collaterals (**Figure 9F**). Furthermore, labeled axons were systematically observed in the contralateral TLC, where retrogradely labeled neurons were extremely scarce. Finally, labeled axons in the TLC were observed in all cases with BDA injection into the SPON, including those that did not exhibit retrogradely labeled TLC neurons. Our interpretation, therefore, is that *all* BDA-labeled fibers in the TLC originate from the SPON.

THE SPON TO TLC PROJECTION

Our results demonstrate that the SPON sends direct projections to the TLC. These projections are predominantly ipsilateral, and seem to be dense. Given that the number of SPON neurons is relatively modest (approximately 2,500 neurons; Kulesza Jr. et al., 2002), the density of the projections revealed in this study indicates that the TLC is a main target of the SPON.

It has been known for decades that the main target of SPON projections is the ipsilateral IC (for references, see Saldaña et al., 2009). Given that virtually all SPON neurons participate in this projection (Saldaña and Berrebi, 2000), it is highly probable that SPON neurons that innervate the TLC also contribute to the innervation of the IC.

Recently, electrophysiological studies have demonstrated that, unlike neurons in the gerbil SPON, which exhibit considerable heterogeneity in their response properties (Behrend et al., 2002; Dehmel et al., 2002), neurons of the rat SPON are remarkably homogeneous. These cells are driven by input from the contralateral ear and strongly suppressed during acoustic stimulation by tonically active glycinergic inhibition that originates in the adjacent MNTB (Banks and Smith, 1992; Sommer et al., 1993; Smith et al., 1998; Kulesza Jr. et al., 2003; Kadner et al., 2006; Kadner and Berrebi, 2008). When the acoustic stimulus is terminated, SPON neurons are released from this inhibition and fire brief trains of discharges which constitute their characteristic offset response (Kulesza Jr. et al., 2003, 2007; Kadner and Berrebi, 2008). Because these offset spikes are triggered by episodes of low stimulus energy, i.e., gaps in ongoing stimuli and the troughs of amplitude modulated tones, Kadner and Berrebi (2008) proposed that the functional relevance of the brainstem MNTB/SPON circuit lies mainly in the encoding of *stimulus discontinuities*. The precisely timed output of the SPON is then relayed to its synaptic targets in the midbrain, including the TLC.

To understand the contribution of SPON projections to TLC function will require knowledge of the neuroactive substances released by SPON axons and the receptors expressed on the membranes of

TLC neurons. Nothing is currently known regarding the latter issue, but several studies indicate that SPON neurons utilize GABA as their neurotransmitter (Mugnaini and Oertel, 1985; González-Hernández et al., 1996; Kulesza Jr. and Berrebi, 2000), so it is reasonable to assume that the projections described in this study are inhibitory. In the only detailed study to record the sound-evoked responses of TLC neurons, Marshall et al. (2008) reported no evidence for tonotopy in the nucleus, relatively broad frequency tuning and very limited sensitivity to amplitude modulation, even within the range of modulation frequencies that trigger highly synchronous action potentials from SPON neurons. Thus, it is difficult at this time to reconcile the physiological response properties of TLC neurons with the precisely timed offset spiking activity of SPON neurons. However, one must keep in mind that TLC neurons integrate their synaptic inputs from multiple sources, only a few of which are identified at this time, namely the auditory cortex (Morest and Oliver, 1984; Saldaña et al., 1996), the IC (Morest and Oliver, 1984; Saldaña and Merchán, 1992, 2005; Aparicio et al., 2010) and the SPON, as shown herein.

PROJECTION FROM THE TLC TO THE SPON

Based on the relatively high response thresholds and broad frequency tuning, as well as long first spike latencies, a prevalence for sustained firing patterns and poor phase-locking of TLC neurons, Marshall et al. (2008) concluded that the nucleus functions mainly in the descending modulation of lower auditory centers. This notion is supported by the fact that a large proportion of TLC neurons are immunolabeled by antisera directed against the inhibitory neurotransmitter GABA (our own unpublished immunohistochemical results) or its synthetic enzyme glutamic acid decarboxylase (Mugnaini and Oertel, 1985).

The present demonstration of TLC neurons retrogradely labeled from SPON injection sites confirms the existence of a descending projection and extends and refines previous studies that reported neurons labeled in the TLC following large deposits of retrograde tracers into the SOC (Faye-Lund, 1986; Mulders and Robertson, 2001; Saldaña et al., 2007). Thus, the SPON becomes the first identified target of TLC neurons.

It is also noteworthy that the TLC is the only documented source of descending inputs to the SPON of the rat, as this nucleus seems to be spared by other descending projections to the SOC (but see Thompson and Thompson, 1993; Coomes and Schofield, 2004, for results in the guinea pig). Indeed, descending IC fibers target preferentially the ventral nucleus of the trapezoid body (Faye-Lund, 1986; Caicedo and Herbert, 1993; Vetter et al., 1993; Mulders and Robertson, 2002). Likewise, the projections from the auditory cerebral cortex to the SOC terminate mainly in the ventral nucleus of the trapezoid body and, to a lesser extent, in the lateral superior olive and the so-called dorsal ribbon of the SOC (Feliciano et al., 1995; Mulders and Robertson, 2000).

CONCLUSION

The present tract-tracing investigation revealed two hitherto unknown connections in the rat auditory system: ascending projections from the SPON to the TLC and descending projections from the TLC to the SPON. Both the TLC and SPON have been identified in postmortem human brainstem (Saldaña et al., 2007; Kulesza Jr., 2008; Kulesza Jr. et al., 2011), leading us to believe that

the circuits discovered in the rat may also be present in humans. In any event, given our current level of understanding of the function of either nucleus, it is not possible at this time to formulate specific testable hypotheses of the biological significance of these reciprocal circuits. Electrophysiological recordings from the TLC while reversibly inactivating the SPON, or *vice versa*, would provide considerable insight into the impact of these reciprocal projections on auditory processing in the brainstem.

AUTHOR CONTRIBUTION

Enrique Saldaña designed the experiments and supervised the project. Antonio Viñuela and M.-Auxiliadora Aparicio performed the experiments and prepared the illustrations. Antonio Viñuela, M.-Auxiliadora Aparicio, Albert S. Berrebi, and Enrique Saldaña

analyzed and interpreted the results. Enrique Saldaña and Albert S. Berrebi wrote the manuscript. Antonio Viñuela and M.-Auxiliadora Aparicio contributed equally to the work.

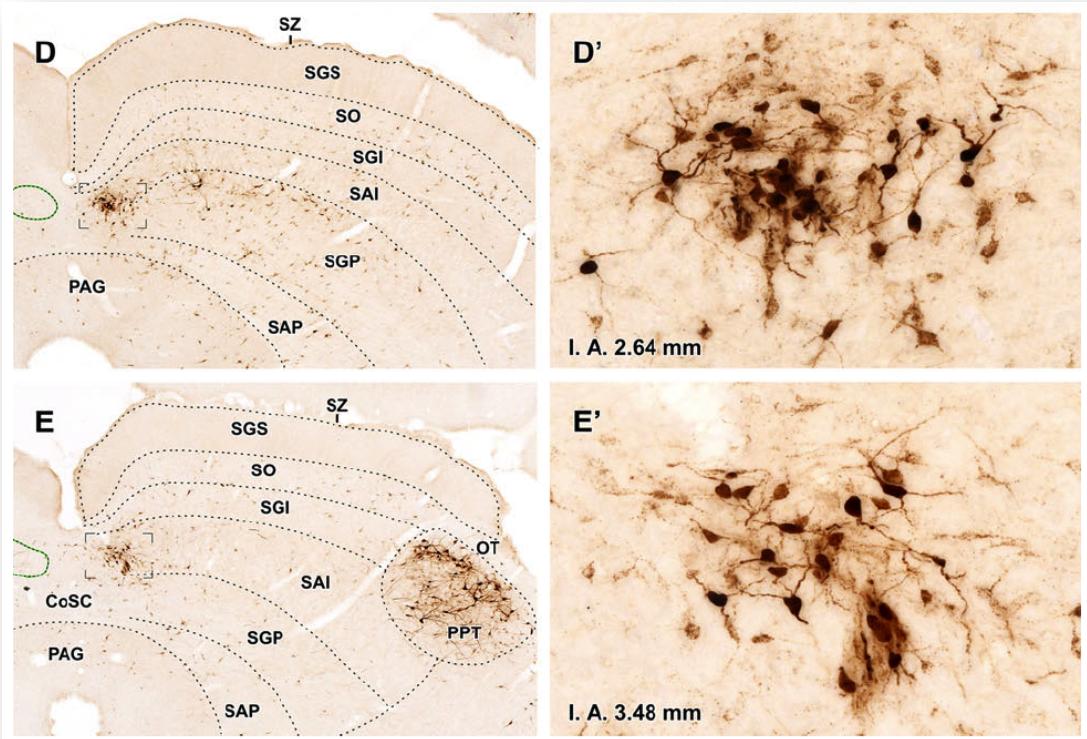
ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Ministries of Education and Science and Innovation grants PB95-1129, BFI2000/1358, BFU2004-05909, and BFU2008-04197 (to Enrique Saldaña), by the Junta de Castilla y León grants SA15/97, SA097/01, SA007C05, GR221, and Biomedicina 2009 (to Enrique Saldaña) and by the National Institute on Deafness and Other Communication Disorders Grant RO1 DC-002266 (to Albert S. Berrebi). The authors are thankful to Dr. Verónica Fuentes-Santamaría, who performed many of the tracing experiments.

REFERENCES

- Aparicio, M. A., Viñuela, A., and Saldaña, E. (2010). Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column in the rat. *Neuroscience* 166, 653–664.
- Bajo, V. M., Merchán, M. A., López, D. E., and Rouiller, E. M. (1993). Neuronal morphology and efferent projections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 334, 241–262.
- Banks, M. I., and Smith, P. H. (1992). Intracellular recordings from neuro-biotin-labeled cells in brain slices of the rat medial nucleus of the trapezoid body. *J. Neurosci.* 12, 2819–2837.
- Behrend, O., Brand, A., Kapfer, C., and Grothe, B. (2002). Auditory response properties in the superior paraolivary nucleus of the gerbil. *J. Neurophysiol.* 87, 2915–2928.
- Caicedo, A., and Herbert, H. (1993). Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 328, 377–392.
- Coomes, D. L., and Schofield, B. R. (2004). Projections from the auditory cortex to the superior olfactory complex in guinea pigs. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2188–2200.
- Dehmel, S., Doerrschmidt, G., and Reubsam, R. (2002). Electrophysiological characterization of neurons in the superior paraolivary nucleus of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Hear. Res.* 172, 18–36.
- Doucet, J. R., and Ryugo, D. K. (2003). Axonal pathways to the lateral superior olive labeled with biotinylated dextran amine injections in the dorsal cochlear nucleus of rats. *J. Comp. Neurol.* 461, 452–465.
- Faye-Lund, H. (1986). Projection from the inferior colliculus to the superior olfactory complex in the albino rat. *Anat. Embryol.* 175, 35–52.
- Feliciano, M., Saldaña, E., and Mugnaini, E. (1995). Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemnisical regions, superior olfactory complex and cochlear nuclei. *Aud. Neurosci.* 1, 287–308.
- González-Hernández, T., Mantolán-Sarmiento, B., González-González, B., and Pérez-González, H. (1996). Sources of GABAergic input to the inferior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 372, 309–326.
- González-Hernández, T. H., Meyer, G., Ferres-Torres, R., Castañeyra-Perdomo, A., and Pérez-Delgado, M. M. (1987). Afferent connections of the inferior colliculus in the albino mouse. *J. Hirnforsch.* 28, 315–323.
- Henkel, C. K., and Shneiderman, A. (1988). Nucleus sagulum: projections of a lateral tegmental area to the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 271, 577–588.
- Hutson, K. A., Glendenning, K. K., and Masterton, R. B. (1991). Acoustic chiasm. IV: eight midbrain decussations of the auditory system in the cat. *J. Comp. Neurol.* 312, 105–131.
- Kadner, A., and Berrebi, A. S. (2008). Encoding of temporal features of auditory stimuli in the medial nucleus of the trapezoid body and superior paraolivary nucleus of the rat. *Neuroscience* 151, 868–877.
- Kadner, A., Kulesza, R. J. Jr., and Berrebi, A. S. (2006). Neurons in the medial nucleus of the trapezoid body and superior paraolivary nucleus of the rat may play a role in sound duration coding. *J. Neurophysiol.* 95, 1499–1508.
- Kulesza, R. J. Jr. (2008). Cytoarchitecture of the human superior olfactory complex: nuclei of the trapezoid body and posterior tier. *Hear. Res.* 241, 52–63.
- Kulesza, R. J. Jr., and Berrebi, A. S. (2000). The superior paraolivary nucleus of the rat is a GABAergic nucleus. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1, 255–269.
- Kulesza, R. J. Jr., Kadner, A., and Berrebi, A. S. (2007). Distinct roles for glycine and GABA in shaping the response properties of neurons in the superior paraolivary nucleus of the rat. *J. Neurophysiol.* 97, 1610–1620.
- Kulesza, R. J. Jr., Lukose, R., and Stevens, L. V. (2011). Malformation of the human superior olive in autistic spectrum disorders. *Brain Res.* 1367, 360–371.
- Kulesza, R. J. Jr., Spirou, G. A., and Berrebi, A. S. (2003). Physiological response properties of neurons in the superior paraolivary nucleus of the rat. *J. Neurophysiol.* 89, 2299–2312.
- Kulesza, R. J. Jr., Viñuela, A., Saldaña, E., and Berrebi, A. S. (2002). Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. *Hear. Res.* 168, 12–24.
- Marshall, A. F., Pearson, J. M., Falk, S. E., Skaggs, J. D., Crocker, W. D., Saldaña, E., and Fitzpatrick, D. C. (2008). Auditory response properties of neurons in the tectal longitudinal column of the rat. *Hear. Res.* 244, 35–44.
- Merchán, M. A., Saldaña, E., and Plaza, I. (1994). Dorsal nucleus of the lateral lemniscus in the rat: concentric organization and tonotopic projection to the inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 371, 15–40.
- Saldaña, E., and Merchán, M. A. (2000). Anisotropic organization of the rat superior paraolivary nucleus. *Anat. Embryol.* 202, 265–279.
- Saldaña, E., Feliciano, M., and Mugnaini, E. (1996). Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J. Comp. Neurol.* 371, 15–40.
- Saldaña, E., and Merchán, M. A. (1992). Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 319, 417–437.
- Saldaña, E., and Merchán, M. A. (2005). “Intrinsic and commissural connections of the inferior colliculus,” in *The Inferior Colliculus*, eds J. A. Winer and C. E. Schreiner (New York: Springer), 155–181.
- Saldaña, E., Viñuela, A., Marshall, A. F., Fitzpatrick, D. C., and Aparicio, M. A. (2007). The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. *J. Neurosci.* 27, 13108–13116.
- Smith, P. H., Joris, P. X., and Yin, T. C. (1998). Anatomy and physiology of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) of the cat. *J. Neurophysiol.* 79, 3127–3142.
- Mulders, W. H., and Robertson, D. (2001). Evidence for direct cortical innervation of medial olivocochlear neurones in rats. *Hear. Res.* 144, 65–72.
- Mulders, W. H., and Robertson, D. (2001). Origin of the noradrenergic innervation of the superior olfactory complex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 446, 313–322.
- Sommer, I., Lingenhohl, K., and Friauf, E. (1993). Principal cells of the rat

- medial nucleus of the trapezoid body: an intracellular *in vivo* study of their physiology and morphology. *Exp. Brain Res.* 95, 223–239.
- Thompson, A. M., and Thompson, G. C. (1993). Relationship of descending inferior colliculus projections to olivocochlear neurons. *J. Comp. Neurol.* 335, 402–312.
- Vetter, D. E., Saldaña, E., and Mugnaini, E. (1993). Input form the inferior colliculus to medial olivocochlear neurons in the rat: a double label study with PHA-L and cholera toxin. *Hear. Res.* 70, 173–186.
- Warr, W. B., Boche, J. B., and Neely, S. T. (1997). Efferent innervation of the inner hair cell region: origins and terminations of two lateral olivocochlear systems. *Hear. Res.* 108, 89–111.
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- nucleus of the rat: II. Reciprocal connections with the tectal longitudinal column.* *Front. Neuroanat.* 5:1. doi: 10.3389/fnana.2011.00001
- Copyright © 2011 Viñuela, Aparicio, Berrebi and Saldaña. This is an open-access article subject to an exclusive license agreement between the authors and Frontiers Media SA, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are credited.



ANEXO V

Aparicio MA, Saldaña E (2013) The dorsal tectal longitudinal column (TLCd): a second longitudinal column in the paramedian region of the midbrain tectum. *Brain Struct Funct* (en prensa)

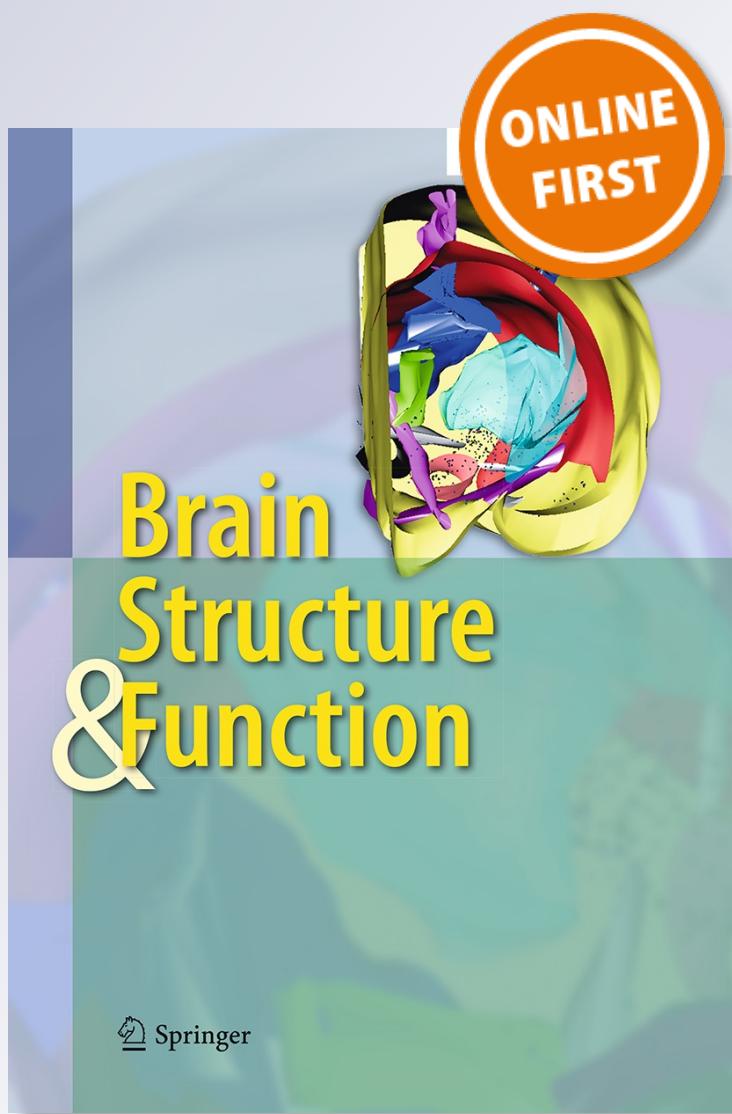
The dorsal tectal longitudinal column (TLCd): a second longitudinal column in the paramedian region of the midbrain tectum

M.-Auxiliadora Aparicio & Enrique Saldaña

Brain Structure and Function

ISSN 1863-2653

Brain Struct Funct
DOI 10.1007/s00429-013-0522-x



 Springer

Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.

The dorsal tectal longitudinal column (TLCd): a second longitudinal column in the paramedian region of the midbrain tectum

M.-Auxiliadora Aparicio · Enrique Saldaña

Received: 13 August 2012 / Accepted: 8 February 2013
© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The tectal longitudinal column (TLC) is a longitudinally oriented, long and narrow nucleus that spans the paramedian region of the midbrain tectum of a large variety of mammals (Saldaña et al. in J Neurosci 27:13108–13116, 2007). Recent analysis of the organization of this region revealed another novel nucleus located immediately dorsal, and parallel, to the TLC. Because the name “tectal longitudinal column” also seems appropriate for this novel nucleus, we suggest the TLC described in 2007 be renamed the “ventral tectal longitudinal column (TLCv)”, and the newly discovered nucleus termed the “dorsal tectal longitudinal column (TLCd)”. This work represents the first characterization of the rat TLCd. A constellation of anatomical techniques was used to demonstrate that the TLCd differs from its surrounding structures (TLCv and superior colliculus) cytoarchitecturally, myeloarchitecturally, neurochemically and hodologically. The distinct expression of vesicular amino acid transporters suggests that TLCd neurons are GABAergic. The TLCd receives major projections from various areas of the cerebral cortex (secondary visual mediomedial area, and granular and dysgranular retrosplenial cortices) and from the medial pretectal nucleus. It densely innervates the

ipsilateral lateral posterior and laterodorsal nuclei of the thalamus. Thus, the TLCd is connected with vision-related neural centers. The TLCd may be unique as it constitutes the only known nucleus made of GABAergic neurons dedicated to providing massive inhibition to higher order thalamic nuclei of a specific sensory modality.

Keywords Superior colliculus · Laterodorsal thalamic nucleus · Lateral posterior thalamic nucleus · Visual cortex · Retrosplenial cortex · GABAergic modulation of the thalamus

Abbreviations

Aq	Cerebral aqueduct
BDA	Biotinylated dextran amine
BIC	Brachium of the inferior colliculus
CL	Centrolateral thalamic nucleus
CoIC	Commissure of the inferior colliculus
CoSC	Commissure of the superior colliculus
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxigenin
DLG	Dorsal lateral geniculate nucleus
DpMe	Deep mesencephalic nucleus
GAD	Glutamic acid decarboxylase
Hb	Habenular complex
IA	Interaural
IC	Inferior colliculus
LD	Laterodorsal nucleus of the thalamus
LP	Lateral posterior nucleus of the thalamus
MPT	Medial pretectal nucleus
OT	Nucleus of the optic tract
PAG	Periaqueductal gray matter
PAGdm	Dorsomedial column of the periaqueductal gray matter
PB	Sodium phosphate buffer

M.-A. Aparicio · E. Saldaña
Department of Cell Biology and Pathology, Medical School,
University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

M.-A. Aparicio · E. Saldaña (✉)
Neurohistology Laboratory, Neuroscience Institute of Castilla y León (INCYL), University of Salamanca, Laboratorio 6,
37007 Salamanca, Spain
e-mail: saldana@usal.es

M.-A. Aparicio · E. Saldaña
Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL),
37007 Salamanca, Spain

pc	Posterior commissure
Po	Posterior thalamic nuclear group
PPT	Posterior pretectal nucleus
ReIC	Recess of the inferior colliculus
RePi	Recess of the pineal gland
RSD	Retrosplenial dysgranular cortex
RSGa	Retrosplenial granular cortex, a region
RSGb	Retrosplenial granular cortex, b region
RSGc	Retrosplenial granular cortex, c region
Rt	Reticular thalamic nucleus
SAI	Intermediate white layer (stratum album intermediale) of the superior colliculus
SAP	Deep white layer (stratum album profundum) of the superior colliculus
SC	Superior colliculus
SGI	Intermediate gray layer (stratum griseum intermediale) of the superior colliculus
SGP	Deep gray layer (stratum griseum profundum) of the superior colliculus
SGS	Superficial gray layer (stratum griseum superficiale) of the superior colliculus
SO	Optic layer (stratum opticum) of the superior colliculus
SZ	Zonal layer (stratum zonale) of the superior colliculus
TLC	Tectal longitudinal column
TLCd	Dorsal tectal longitudinal column
TLCv	Ventral tectal longitudinal column
V2MM	Secondary visual cortex, mediomedial area
VIAAT	Vesicular inhibitory amino acid transporter
VGLUT1	Vesicular glutamate transporter 1
VGLUT2	Vesicular glutamate transporter 2
VPL	Ventral posterolateral thalamic nucleus
VPM	Ventral posteromedial thalamic nucleus
WGA-HRP	Peroxidase-conjugated wheat-germ agglutinin

Introduction

The classical view of the midbrain tectum as being exclusively composed of the inferior and superior colliculi (IC and SC, respectively) is challenged by the recent discovery of the tectal longitudinal column (TLC; Saldaña et al. 2007). The TLC is a large, narrow nucleus that spans the midbrain tectum longitudinally, very close to the midline and immediately dorsal to the dorsomedial column of the periaqueductal gray matter (PAGdm). This novel nucleus occupies what has traditionally been considered the most medial region of the deep SC and the most medial region of the IC. The caudal third of the TLC is traversed by the commissure of the IC, and its rostral third is crossed by the rostral portion of the commissure of the SC.

The TLC differs from surrounding nuclei in terms of cytoarchitecture, neural connections and electrophysiological properties. TLC neurons are more homogeneous and significantly smaller than SC and IC neurons (Saldaña et al. 2007). Most TLC neurons have small cell bodies with their main axis oriented rostrocaudally. Scattered throughout the TLC are a few medium-sized neurons, with elongated or triangular cell bodies and more abundant cytoplasm. These cytoarchitectural features have enabled the identification of the TLC in a large variety of mammalian species (Saldaña et al. 2007). The TLC receives projections from various auditory centers, including the superior paraolivary nucleus (Viñuela et al. 2011), the IC (Morest and Oliver 1984; Saldaña and Merchán 1992, 2005; Aparicio et al. 2010) and the primary auditory neocortex (Saldaña et al. 1996). Moreover, most TLC neurons are labeled following injections of retrograde tracers into the ipsilateral superior paraolivary nucleus (Saldaña et al. 2007; Viñuela et al. 2011). Finally, TLC neurons respond vigorously to acoustic stimuli (pure tones or wideband noise), but their responses differ from those of auditory responsive neurons in the IC or the SC (Marshall et al. 2008).

In our initial analysis of the cytoarchitecture of the TLC (Saldaña et al. 2007), we noticed that the territory immediately dorsal to the TLC is occupied by a distinct group of small neurons that differ from the TLC based on cell morphology, size and packing density, and by the fact that they lack connections with auditory structures and do not respond to acoustic stimuli. This led us to conclude that this dorsal territory, which we tentatively called the “dorsal column”, “may constitute another distinct and previously unnoticed columnar nucleus that parallels the TLC and whose further characterization awaits future studies.”

The main purpose of the current investigation is to verify the hypothesis that the dorsal column noticed in 2007 is a distinct nucleus of the mammalian brain. To this end, we have used a large variety of morphological techniques, including neurohistological stains, morphometry, three-dimensional reconstructions, *in situ* hybridization for vesicular amino acid transporters, and tract-tracing methods to analyze the degree to which the dorsal column differs from its surrounding nuclei (TLC and SC) based on its cytoarchitecture, myeloarchitecture, neurochemistry and neural connections. Because the differences between the dorsal column and the TLC were already established in our original study (Saldaña et al. 2007), this article focuses predominantly on the differences between the dorsal column and the SC, in which it has been traditionally included. As will become evident, our results demonstrate that the dorsal column of the rat differs from both the TLC and the SC and that it is connected with several vision-related centers.

Despite the differences between the TLC and the dorsal column mentioned above, these two nuclei share salient

Table 1 Nomenclature of the longitudinal columns of the paramedian region of the midbrain tectum

Name used by Saldaña et al. (2007)	New name proposed in this article
Tectal longitudinal column (TLC)	Ventral tectal longitudinal column (TLCv)
Dorsal column	Dorsal tectal longitudinal column (TLCd)

morphological and topographical features. They both possess columnar shapes and span longitudinally the paramedian region of the midbrain tectum. Indeed, they are arranged such that one lies on top of the other. Therefore, the name “tectal longitudinal column”, which we coined for the nucleus described in 2007, seems appropriate for this dorsal column, as well. Accordingly, for the sake of consistency, we suggest ascribing the name “ventral tectal longitudinal column (TLCv)” to the nucleus described by Saldaña et al. (2007), and “dorsal tectal longitudinal column (TLCd)” to the nucleus previously referred to as dorsal column (Table 1). This newly proposed nomenclature will be used throughout the article.

Materials and methods

Experimental animals

For the neuroanatomical studies, Sprague–Dawley or Wistar rats of either sex (body weight 190–210 g) were cared for and used in compliance with European Union regulations concerning the use of animals in biomedical research. The experimental procedures were approved and supervised by the Bioethics Committee of the University of Salamanca. For the surgical procedures, including the transcardial perfusion of fixatives, the animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine HCl (80 mg/kg body weight) and xylazine (6 mg/kg body weight) administered intramuscularly.

Cytoarchitectural analysis

We studied 40–60-μm thick frozen sections or 15-μm thick paraffin-embedded sections of the rat midbrain tectum stained with either 0.25–1 % cresyl violet or with the Giemsa method (Íñiguez et al. 1985). This material was available from the histological collection of our laboratory at the University of Salamanca.

We also used semithin sections of the rat TLCd stained with toluidine blue. To produce these, rats were deeply anaesthetized and perfused with fixative containing 2.5 % glutaraldehyde and 2 % formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde). Vibratome sections

(80 μm thick) were postfixed with 1 % osmium tetroxide (OsO_4), stained with uranyl acetate, dehydrated, cleared with propylene oxide and flat-embedded in EPON 812 resin. Samples containing the TLCd were cut from the section, re-embedded onto blank resin blocks and sectioned with an ultramicrotome at a thickness of 0.5–2 μm. These semithin sections were finally stained with 1 % toluidine blue.

Myeloarchitectural analysis

We examined 60-μm thick brainstem sections postfixed with OsO_4 . To produce them, we perfused young adult rats with 2.5 % glutaraldehyde and 2 % formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde), dissected the brains and left them in the same fixative overnight. The brains were sectioned with a Vibratome at a thickness of 60 μm. Sections were postfixed in ice-chilled 1 % OsO_4 and 5 % sucrose in phosphate buffer for about 1 h, dehydrated, cleared with xylene, mounted on slides and coverslipped with Entellan.

We also examined 40-μm thick sections of formaldehyde-fixed brains that were photographed immediately after sectioning unstained and uncleared. For this purpose, we perfused young adult rats with 4 % formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde or from commercial formalin), dissected the brains, cryoprotected them in 30 % sucrose and sectioned them with a freezing microtome. The 40-μm thick sections were allowed to thaw free-floating, transferred to a microscopic slide, coverslipped and photographed unstained in an aqueous medium. The contrast of the micrographs was enhanced uniformly using the Auto Contrast tool of Adobe Photoshop (Adobe, San José, CA, USA) software. For convenience, throughout the article, we will refer to these unprocessed sections as “fresh sections”.

Reference maps

We adopted the well-established parcellation of the mammalian SC, which distinguishes seven alternating layers of white matter and gray matter (reviewed by May 2006). For the delimitation of the layers, we relied on series of thick (60 μm) sections postfixed with OsO_4 to stain myelinated fibers, and on micrographs of 40-μm thick fresh, unstained sections (see above). Of particular interest was the unequivocal identification of a conspicuous layer of rostrocaudally oriented axons, which, as shown below, is topologically related to the TLCd (e.g., Figs. 1a, 2, 5). In agreement with previous descriptions of the rat SC (Killackey and Erzurumlu 1981; Huerta et al. 1983; Chevalier and Deniau 1984; Matsuyama and Kawamura 1985; Redgrave et al. 1986, 1990; Paxinos et al. 1999; Paxinos and Watson 2005), we will refer to this fiber-rich layer as the

intermediate white layer (or stratum album intermediale—SAI). Other authors, however, have considered the layer of longitudinal fibers of rodents as one of the sublaminae or tiers of an enlarged intermediate gray layer (stratum griseum intermediale) (e.g., Wiener 1986; Bickford and Hall 1989; Helms et al. 2004; see May 2006, for additional references).

Unbiased stereological estimates of neuron numbers

We selected for study three series of coronal sections from our collection of rat brains stained by the Giemsa method (Íñiguez et al. 1985). We chose Giemsa-stained material because this polychromatic technique provides a clear distinction between purple-stained neurons and light blue-stained glial and endothelial cells. This was particularly useful given the small size of most TLCd neurons.

For the stereological estimates of neuron numbers, we followed procedures described elsewhere (Kulesza et al. 2002). Stereo Investigator software (MicroBrightField, Inc.—now MBF Bioscience—, Williston, VT, USA) was used to implement the optical fractionator protocol, which encompasses the optical disector and fractionator tools (Gundersen 1988; Gundersen et al. 1988). To minimize the coefficient of error, we counted from every fourth section and set the parameters of the optical fractionator so that the sample consisted of at least 250 neurons for each TLCd. This was achieved by sampling from approximately fifteen 400 μm^2 counting frames per section.

Three-dimensional reconstructions

In selected cases, we generated 3-D reconstructions of the TLCd using Neurolucida (Version 10) and NeuroExplorer (Version 3) software (MBF Bioscience, Williston, VT, USA). The outline of every other Giemsa-stained coronal section viewed with the 5 \times (N.A. = 0.12) objective lens of a Leica DMRB microscope was drawn on the computer screen. We then outlined the TLCd (as well as fiduciary marks used to align the drawings of consecutive sections) using a 20 \times (N.A. = 0.50) objective lens. The sections were aligned with Neurolucida and visualized with NeuroExplorer, rendering visible the surface of the midbrain and the nuclei of interest.

Morphometry

For comparison of neuronal size across structures, we used a plan apochromatic 100 \times oil immersion objective (N.A. = 1.4) to measure the maximum diameter of the neuronal cell bodies in semithin, coronal sections through the rostrocaudal center of the rat TLCd. In each section, we measured all neurons with visible nucleoli located in the TLCd, TLCv, and the region of the SC immediately lateral

to the TLCd. Neurons chosen for measurement in the SC were limited to those located within 200 μm of the lateral border of the TLCd.

A similar procedure was used to measure the maximum diameters of the cell bodies of neurons of the rat TLCd and SC retrogradely labeled following injections of FluoroGold into the lateral complex of the thalamus (see below). Because of the low number of labeled neurons in the region of the SC adjacent to the TLCd, SC neurons chosen for measurement were limited to those located within 500 μm of the lateral border of the TLCd.

The relative neuronal density across structures was determined using 15- μm thick paraffin-embedded coronal sections of the central third of the rat TLCd stained by the Giemsa method. Using a 100 \times oil immersion objective (N.A. = 1.4), we counted in each section the neurons included in two square areas of 2,500 μm^2 randomly placed in each one of the structures analyzed: TLCd, TLCv, and the SC region immediately lateral to the TLCd (within 200 μm of the lateral border of the TLCd).

The morphometric data were analyzed statistically with IBM Predictive Analytics SoftWare (PASW). We first applied the Kolmogorov–Smirnov test to verify whether each set of data followed a normal distribution. The maximum diameter of TLCd, TLCv and SC neurons in non-experimental material was analyzed using Students *t* test for comparisons of two groups, because these values followed normal distributions. The comparisons of neuronal packing density and maximum diameter of FluoroGold labeled neurons were performed with the non-parametric Mann–Whitney test.

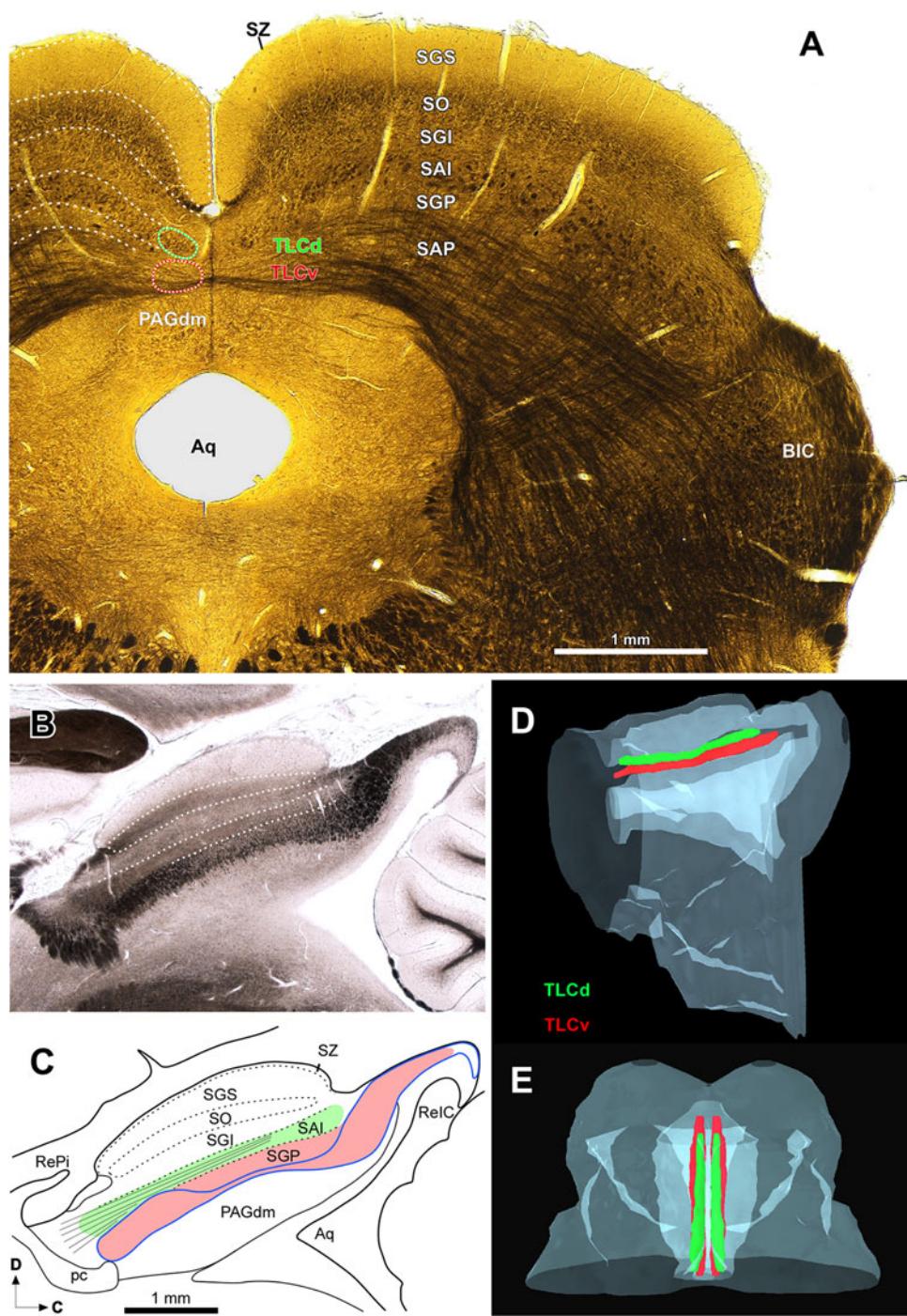
In situ hybridization for vesicular transporters

The description of the distribution of the mRNAs for the vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) and the mRNA for the vesicular inhibitory amino acid transporter (VIAAT) in the paramedian region of the midbrain tectum was based on the same experimental cases used to describe the distribution of these same vesicular transporters in subcortical auditory nuclei (Ito et al. 2011), to which the reader is referred for technical details.

Briefly, deeply anesthetized Long-Evans rats and Swiss-Webster mice were perfused transcardially with 4 % formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde) in 0.1 M phosphate buffer. After cryoprotection in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated 30 % sucrose in PB for 2 days, serial coronal sections were cut at a thickness of 40 μm (for rats) or 30 μm (for mice) with a freezing microtome.

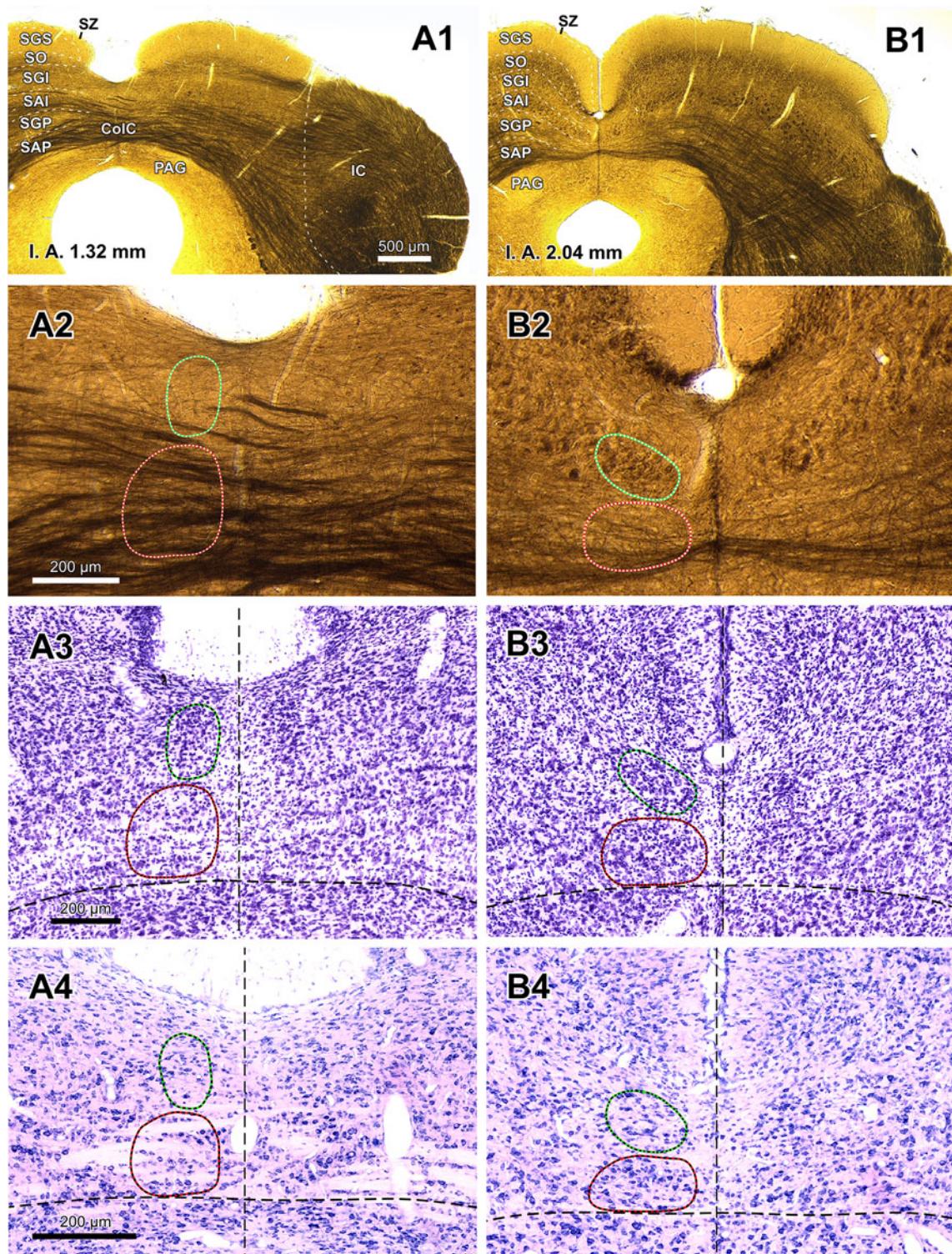
Digoxigenin (DIG)-labeled sense and antisense riboprobes were made from the cDNAs of mouse VGLUT1 (nucleotides of 152–1,085, GenBank accession number NM_182993.2), VGLUT2 (nucleotides of 848–2,044,

Fig. 1 Position and anatomical relationships of the TLCd. **a** Low magnification micrograph of a 60- μm thick coronal section of the rat midbrain tectum postfixed with osmium tetroxide to stain myelinated fibers black. Note the clear stratification of the SC. On the *left side*, the TLCd and TLCv have been outlined in green and red, respectively. The TLCd occupies the medialmost portion of the classical intermediate white layer of the SC (SAI), defined by the conspicuous bundles of cross-cut longitudinally oriented fibers. **b** Micrograph of a fresh, unstained and uncleared parasagittal section of the rat midbrain tectum through the TLCd and TLCv. In this material, cross-cut fiber fascicles appear dark and stand out over a clear background, thus highlighting the tectal commissures. **c** Schematic drawing of the section depicted in **b**. The blue line outlines the continuous fiber fascicle formed by the CoIC and the CoSC. The TLCv has been represented in light red, and the TLCd in green. The lines that span the TLC and fan out in its rostral pole represent the fascicle of the TLCd (see text). Three-dimensional reconstructions of the rat midbrain, seen from the *left side* of the brain (**d**) or from a point located above and slightly rostral (**e**). The TLCd and the TLCv have been represented in green and red, respectively. For abbreviations, see list



GenBank accession number NM_080853.2), and VIAAT (nucleotides of 620–1,599, GenBank accession number NM_031782). Sections reacted with sense riboprobes exhibited no signal at all. After extensive washing and acetylation, the sections were incubated for 1 h in a prehybridization buffer, and then for 20 h at 70 °C with the DIG-labeled sense or antisense RNA probe for VGLUT1, VGLUT2, or VIAAT. The sections were then washed,

treated with RNase A, incubated with blocking reagent, and finally incubated overnight with alkaline phosphatase-conjugated sheep anti-DIG antibody Fab fragment (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The bound phosphatase was visualized by a reaction with nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt in the presence of MgCl₂. Sections were mounted on glass slides, dehydrated, cleared, and coverslipped.



Tract-tracing with BDA

We placed single, unilateral injections of BDA (biotinylated dextran amine, 10,000 MW, Molecular Probes, Eugene, OR; 10 % in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4—PB) into the paramedian region of the midbrain tectum. Under

sterotaxic guidance, thin glass micropipettes (10–20 μm inner diameter at the tip) loaded with the tracer were inserted vertically into the TLCd or the SC of deeply anaesthetized rats, and the tracer was delivered by iontophoresis using a pulsed 5 μA DC positive current (7 s on/7 s off) for 5–15 min. The current was then stopped and the

Fig. 2 The TLCd in coronal sections. Micrographs of coronal sections through various rostrocaudal levels of the rat TLCd. All four micrographs in any given column correspond to the same rostrocaudal level, whose distance with respect to the coronal interaural plane (IA) is indicated in the *upper panel*. In each column, the first panel (**a1** through **d1**) shows a low magnification micrograph of a 60- μm thick coronal section postfixed with osmium tetroxide. The second picture (**a2** through **d2**) shows at higher magnification the paramedian region of the section depicted above. The third micrograph (**a3** through **d3**) illustrates a 40- μm thick, frozen section stained with the Nissl method, and the fourth micrograph (**a4** through **d4**) shows a 15- μm thick, paraffin-embedded section stained with the Giemsa method. The *left* TLCd has been outlined in *green*, and the *left* TLCv in *red*. The *vertical dashed lines* indicate the *midline*. The *calibration bar* in the first micrograph of *each row* applies to all micrographs in the *same row*. *Calibration bars* uncorrected for shrinkage. For abbreviations, see list

pipette left in place for an additional 15–20 min prior to withdrawal, in order to prevent leakage of the tracer along the injection tract.

Following a 7-day survival period, the rats were again anesthetized deeply and their brains fixed by transcardial perfusion of buffered 4 % formaldehyde (prepared from freshly depolymerized paraformaldehyde) and 0.1 % glutaraldehyde. After cryoprotection in 30 % sucrose in PB, the brains were cut coronally on a freezing microtome at a thickness of 40 μm . To visualize the tracer, the sections were first processed by the avidin–biotin–peroxidase complex procedure (ABC, Vectastain, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) following the manufacturer’s specifications, and then by standard histochemistry for peroxidase, with or without heavy-metal intensification (i.e., Saldaña et al. 2009). For cytoarchitectural reference, every fourth section was counterstained with cresyl violet.

Tract-tracing with FluoroGold

Glass micropipettes (20–30 μm inner tip diameter) loaded with the retrograde tracer FluoroGold (FG; Fluorochrome Inc., Denver, CO, USA; 4 % in saline) were stereotactically placed into the lateral complex of the thalamus of deeply anaesthetized rats ($n = 7$). The iontophoretic delivery of the tracer, the survival period, the fixation of the brain by transcardial perfusion, and the sectioning of the brain were as described above.

Initially, we assessed the location of the injection site and labeled neurons by inspecting representative fresh sections on a Leica DMRB microscope under epifluorescence illumination. In selected cases, the FG was rendered permanently visible by immunocytochemistry on free-floating sections, using a rabbit anti-FG primary antiserum (Chemicon International, Inc; Temecula, CA, USA; 1:4,000) followed by biotinylated anti-rabbit immunoglobulin G raised

in goat (Vector Labs., Burlingame, CA, USA; 1:50), and then by incubation in the avidin–biotin–peroxidase complex (Vectastain, Vector Labs.) and standard histochemistry for peroxidase, with or without heavy-metal intensification.

Photography and illustrations

Sections were photographed at high resolution with a Zeiss Axioskop 40 microscope using a Zeiss AxioCam MRc 5 digital camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The brightness and contrast of images were adjusted with Adobe Photoshop software, and the illustrations were arranged into plates using Canvas (ACD Systems of America, Inc., Miami, FL, USA) software.

Results

Size and position of the rat TLCd

The rat TLCd is a long, narrow, longitudinally oriented nucleus that spans the rostral two-thirds of the midbrain tectum, very close to the midline and dorsal to the TLCv (Fig. 1). It occupies what has traditionally been considered the most medial portion of the SAI or intermediate white layer of the SC (Figs. 1a, 2, 5). The caudal end of the TLCd is located approximately at the level of the caudal border of the SC and the nucleus extends rostrally all the way to the level of the rostral end of the commissure of the SC (Fig. 1b, c). The TLCd is located immediately dorsal and parallel to most of the TLCv and so is slightly tilted from caudal and dorsal to rostral and ventral (Figs. 1, 2). Unlike the TLCv, the TLCd is not traversed by the commissure of the IC or the commissure of the SC (Figs. 1, 2). The TLCd is covered dorsally by the medial, vertically oriented portion of the superficial layers of the SC, from which it is clearly separated by the most medial portion of the intermediate gray layer (Figs. 1a, 2).

Three-dimensional reconstructions of the rat midbrain tectum illustrate the position, dimensions, columnar shape, and longitudinal orientation of the TLCd, as well as its relationship with the TLCv (Fig. 1d, e). The TLCd is approximately 3.1 mm in length. In caudal coronal sections, it appears as a vertical ovoid structure, 150 μm high and 70–100 μm wide (Fig. 2a). Its mediolateral diameter increases progressively, to reach 350 μm in the most rostral sections (Fig. 2b–d). The number of TLCd neurons on each side is approximately 9,600 (mean = 9,613.50 \pm 152.95 SD, $n = 6$), as estimated using methods of unbiased stereology, and it does not differ between the two sides (t test, $p = 0.650$; left side $9,646.66 \pm 213.12$ SD, $n = 3$; right side $9,580.33 \pm 98.80$ SD, $n = 3$).

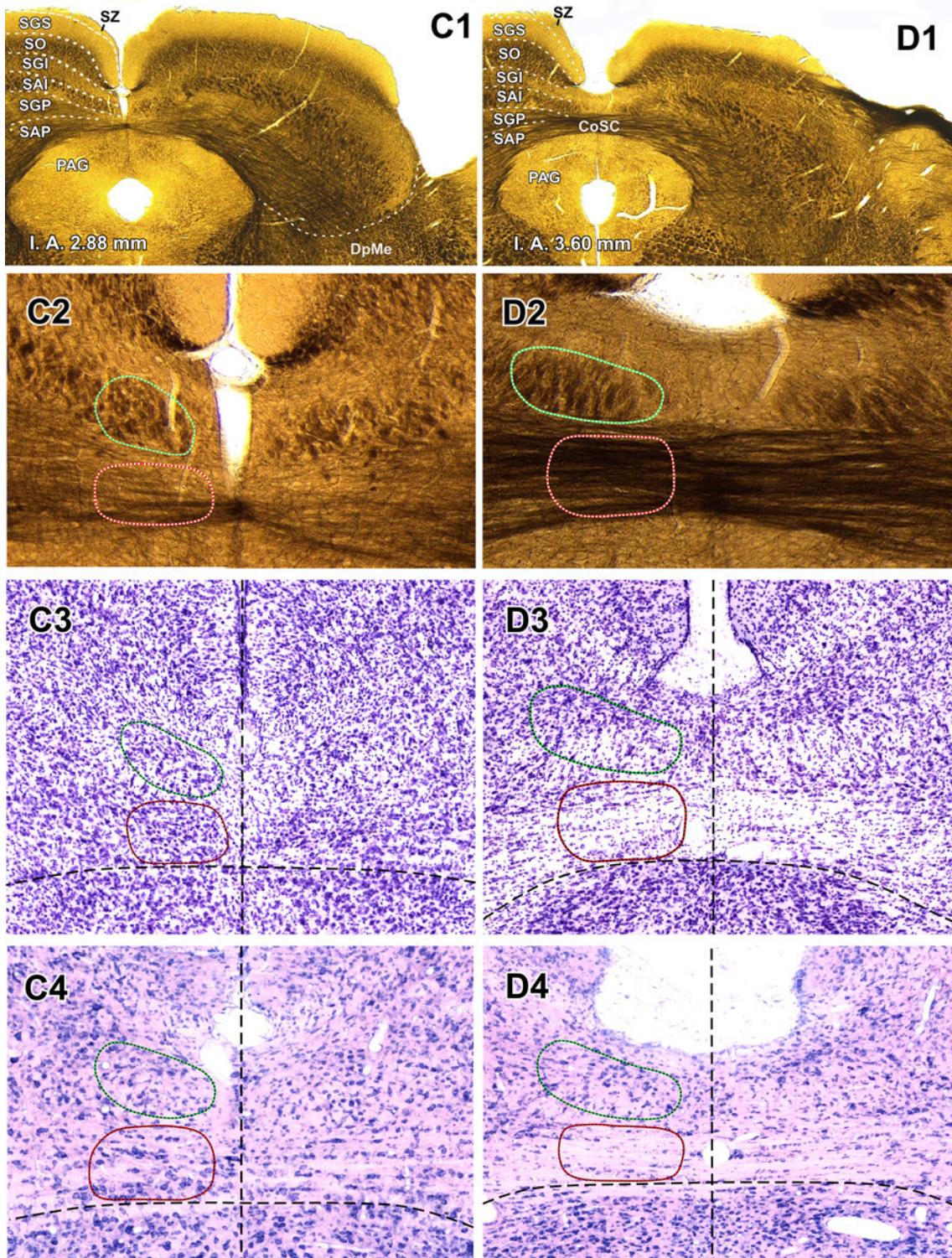


Fig. 2 continued

The TLCd is cytoarchitecturally distinct

Rat TLCd neurons are remarkably homogeneous (Figs. 3, 4). They are distributed uniformly throughout the caudal half of the nucleus (Figs. 2a, b, 3). In the rostral half,

neurons tend to concentrate immediately above the fascicle of the TLCd (see below), with few neurons interspersed among the fibers of the fascicle (Fig. 2c, d).

TLCd neurons have small cell bodies, with their main axis oriented rostrocaudally. Consequently, TLCd somata appear

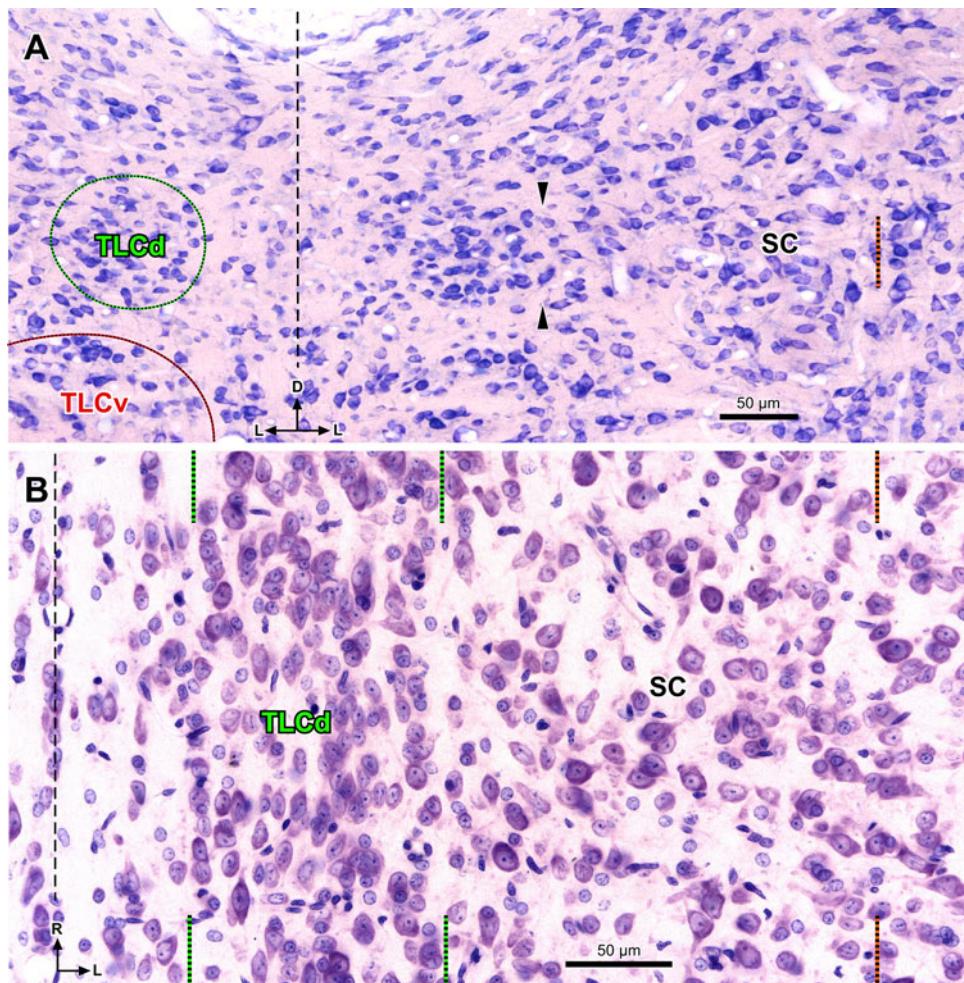


Fig. 3 Basic cytoarchitecture of the rat TLCd. **a** Micrograph of a 15- μm thick, paraffin-embedded coronal section stained with the Giemsa method. On the left side the TLCd has been outlined in green, and the TLCv in red. The black arrowheads indicate the border between the TLCd and the SC. Note the smaller average size and higher homogeneity and cell packing density of TLCd neurons versus TLCv or SC neurons. The vertical dashed black line indicates the midline. **b** Micrograph of a 15- μm thick, paraffin-embedded horizontal section through the TLCd and the medial portion of the SC stained

elongated (average maximum diameter = 12 μm in paraffin-embedded sections) and are distributed parallel to each other in horizontal sections (Fig. 3b), whereas in coronal sections they tend to be rounded or flattened dorsoventrally (Fig. 4a, b) (average maximum diameter = 8–10 μm in paraffin-embedded sections, and 12 μm in resin embedded semithin sections). The nucleus occupies most of the soma and shows several indentations (Figs. 3b, 4a, b). These features of the TLCd contrast with the ventrally adjacent TLCv (Fig. 3a), whose neurons show greater heterogeneity, larger average size (t test, $p < 0.0001$; TLCd, $n = 122$; TLCv, $n = 111$) and lower packing density (t test, $p < 0.0001$; TLCd, $n = 100$; TLCv, $n = 100$; n here refers to number of squares where cells were counted, see Methods). TLCd neurons also contrast

with the Nissl method. The vertical dashed black line indicates the midline. In this plane of section, the TLCd, delimited by the green lines, stands out as a column of small, rostrocaudally oriented and densely packed neurons, which clearly contrast with the much more polymorphic and loosely arranged neurons of the SC. The orange lines of both panels indicate the lateral border of the 200 μm wide area of the SC immediately adjacent to the TLCd, where the samples for the quantitative analysis of neuronal size and packing density were taken from. Calibration bars uncorrected for shrinkage

with the laterally adjacent SC, whose neurons are much larger (t test, $p < 0.0001$; TLCd, $n = 122$; SC, $n = 185$), less densely packed (t test, $p < 0.0001$; TLCd, $n = 100$; SC, $n = 100$) and more heterogeneous in size, shape and orientation (Figs. 3a, b, 4b–d). Indeed, the transition between the TLCd and the SC is characterized by an abrupt change in the size, shape, orientation and packing density of the neurons (Figs. 3a, b, 4b).

The TLCd is myeloarchitecturally distinct

Figure 5 shows micrographs of three 40- μm thick fresh, unstained coronal sections through different rostrocaudal levels of the midbrain tectum (see “Materials and

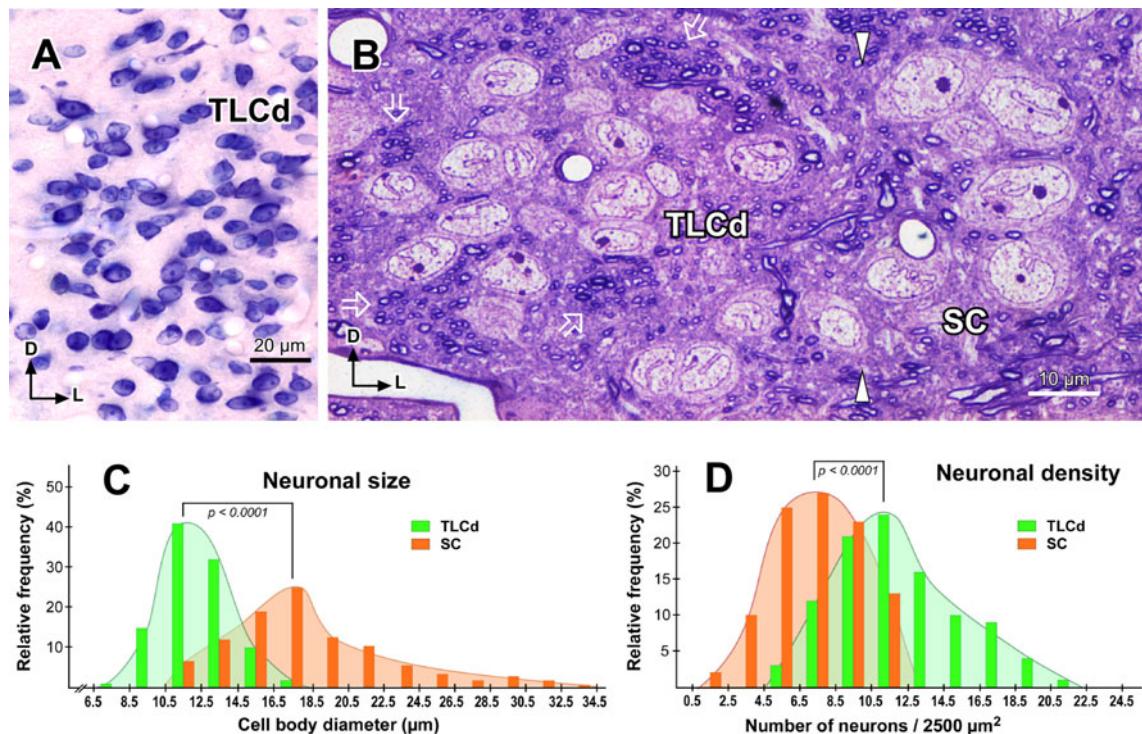


Fig. 4 Basic cytoarchitecture and morphometry of the rat TLCd. **a** Detail of the TLCd in a 15- μm thick, paraffin-embedded coronal section stained with the Giemsa method. Note the remarkable homogeneity and predominantly horizontal orientation of the cell bodies. **b** High magnification, digital micrograph of a toluidine blue-stained semithin coronal section through the area of transition between the TLCd and the SC. The border between the two nuclei is indicated by the white arrowheads. Note the conspicuous difference between TLCd neurons and the much larger, adjacent SC neurons. The white open arrows indicate ill-defined bundles of predominantly thin myelinated axons of the fascicle of the TLCd. Calibration bars uncorrected for shrinkage. **c** Histogram of the maximum diameter of the cell body of neurons in the TLCd (green mean = 12.24 $\mu\text{m} \pm 1.78$ SD; $n = 122$)

and the adjacent SC (orange mean = 18.29 ± 4.52 SD, $n = 185$) measured from semithin coronal sections similar to the one depicted in **b**. Measured SC neurons were limited to those located within 200 μm of the lateral border of the TLCd. Note that there is very little overlap between the two populations. SC neurons are generally larger and more heterogeneous than TLCd neurons. **d** Histogram of the neuronal packing density of the TLCd (green mean = 7.43 ± 3.73 SD; $n = 100$ square areas) and the adjacent SC (orange 7.43 ± 2.49 SD; $n = 100$ square areas). Density is expressed as the number of neurons present in square areas of 2500 μm^2 of 15 μm thick, coronal paraffin-embedded sections stained by the Giemsa method, similar to the one depicted in Fig. 3a. Sample areas from the SC were limited to those located within 200 μm of the lateral border of the TLCd

methods”). In this type of material, cross-cut myelinated fibers are particularly opaque to light and appear dark-brown over a much clearer background. Although both the TLCd and the SAI are characterized by the presence of rostrocaudally oriented, cross-cut bundles of axons, the two nuclei exhibit a very different appearance. In caudal sections, the SAI contains well-defined bundles of cross-cut myelinated axons, whereas the TLCd contains transversally cut fibers that do not aggregate into bundles (Fig. 5a, a'). In more rostral sections, the two nuclei appear to contain bundles of cross-cut fibers, but the TLCd appears darker than the SAI, which indicates that it contains a higher concentration of longitudinally oriented myelinated axons (Fig. 5b, b', c, c'). Moreover, the fiber bundles that span the TLCd are thinner, more densely packed and less sharply defined than those of the SAI. This arrangement is compatible with the dense packing of TLCd cell bodies, which forces the longitudinally

oriented axons to occupy the narrow spaces left among the neurons (Fig. 4b). In contrast, the thicker, better defined and much more scattered bundles of cross-cut axons of the SAI are compatible with its lower neuronal density. Detailed examination of thick sections postfixed with OsO₄ and semithin sections stained with toluidine blue further reveal that the longitudinal axons of the TLCd tend to be predominantly thin, whereas the bundles of the SAI consist of fibers of heterogeneous thickness (not shown).

These results indicate that the TLCd contains abundant axons that span the nucleus longitudinally, and which seem to enter or exit the TLCd through its rostral pole. Because these axons differ from those of the intermediate white layer in their caliber and their pattern of aggregation into bundles, they likely collectively represent an anatomical structure separate from the SAI, which will be referred to as the fascicle of the TLCd (Figs. 1c, 2, 5).

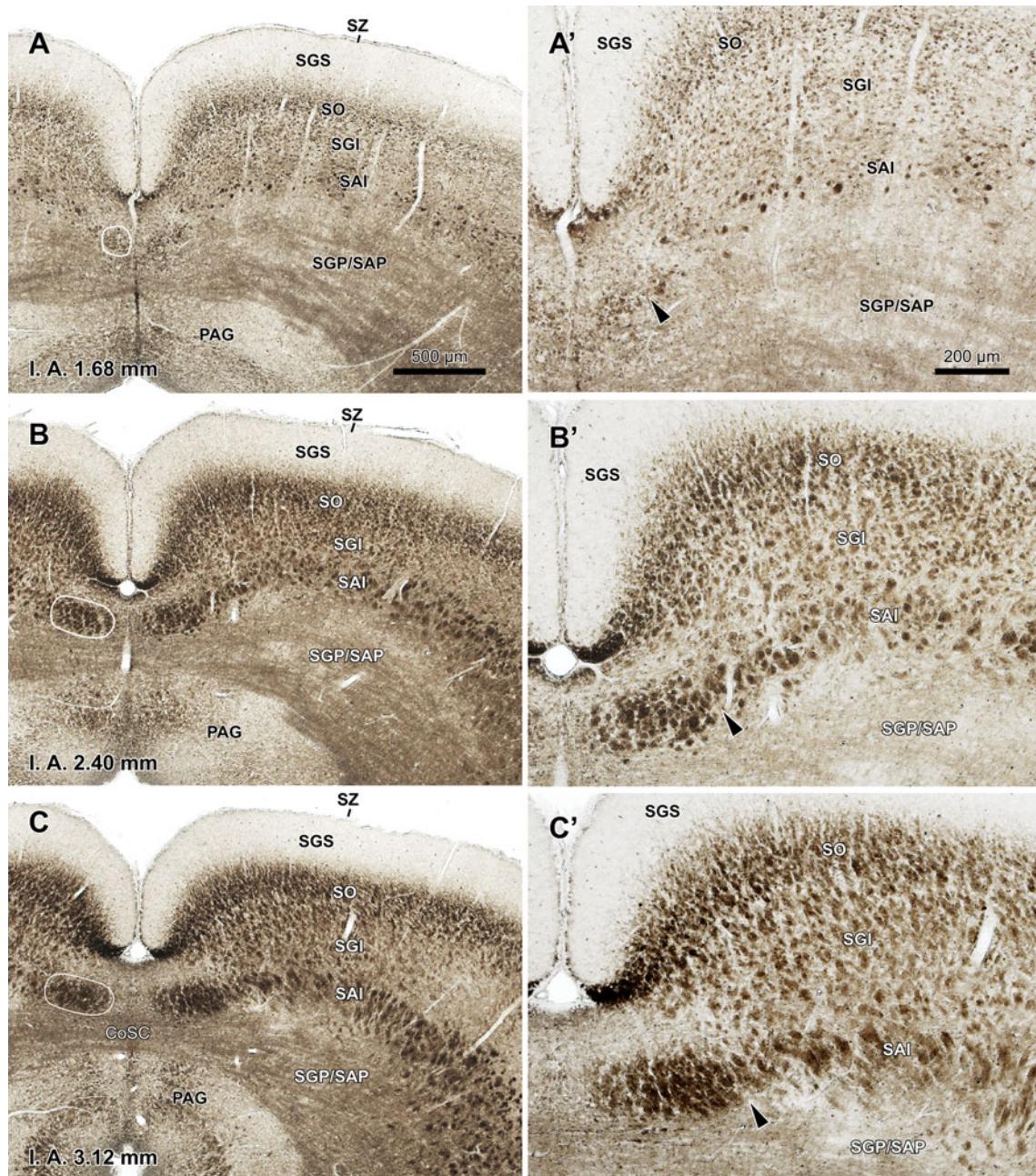


Fig. 5 Basic myeloarchitecture of the rat TLCd. **a–c** Micrographs of fresh unstained and uncleared coronal sections through three rostro-caudal levels of the midbrain tectum. Each micrograph is paired on the right with a higher magnification of the TLC and the adjacent SAI (**a'–c'**). Cross-cut axons appear dark, thus delineating the TLCd, the SAI and the optic layer of the SC (SO). The fascicle of the TLCd has been outlined in white on the left side. The black arrowheads indicate the limit between the fascicle of the TLCd and the SAI. At caudal

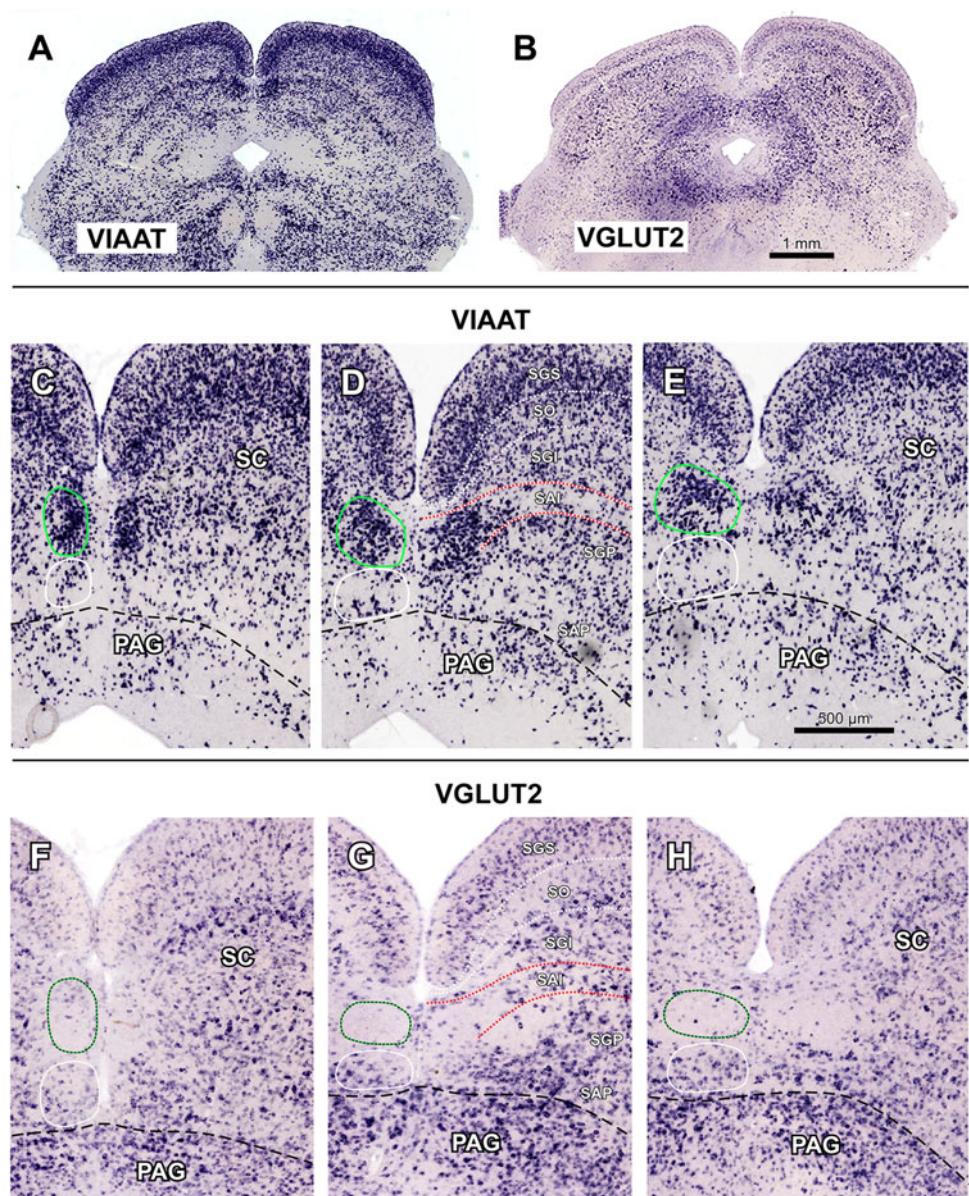
The TLCd is neurochemically distinct

The TLCd of the rat is readily appreciated in sections processed by *in situ* hybridization to reveal the expression of the mRNA for the vesicular inhibitory amino acid transporter (VIAAT). In all sections through the TLCd, the

levels (**a, a'**), the TLCd contains individual axons that are clearly discernible from the bundles of cross-cut fibers of the SAI. At central (**b, b'**) and rostral levels (**c, c'**) the fascicle of the TLCd appears as a distinct darker structure made of cross-cut fiber bundles that are on average thinner and more tightly packed than those of the SAI. The interaural (IA) coordinate of each plane is indicated at the bottom of the micrographs. Calibration bar in **a** applies also to **b, c**. Calibration bar in **a'** applies also to **b', c'**. For abbreviations, see list

nucleus stands out due to the extremely high concentration of labeled cell bodies (Fig. 6a, c–e), which contrasts with the paucity of labeled neurons in the ventrally located TLCv. Indeed, the vast majority of, if not all, TLCd neurons express the VIAAT. The density of labeled neurons is conspicuously higher in the TLCd than in the laterally

Fig. 6 Rat TLCd neurons express the mRNA for VIAAT, but not for VGLUT2. Micrographs of coronal sections of the rat midbrain tectum processed by *in situ* hybridization to visualize the expression of VIAAT (**a**, **c–e**) or VGLUT2 (**b**, **f–h**). **a** and **b** show panoramic views of sections through the central rostrocaudal third of the TLCd. **c–h** show details of sections through the caudal (**c**, **f**), central (**d**, **g**) and rostral (**e**, **h**) portions of the TLCd. On the left side, the TLCd has been outlined in green. Note the complementary pattern of staining in the TLCd with the two markers. The horizontal band in the center of the SC with a higher concentration of neurons labeled for the VIAAT, visible in **a**, **c–e**, corresponds to the upper portion of the deep gray layer (SGP); the SAI stands out due to the paucity of labeled neurons, which strongly contrasts with the abundance of somata in the TLCd. Calibration bar in **b** applies also to **a**. Calibration bar in **e** applies also to remaining panels. Calibration bars uncorrected for shrinkage



located intermediate and deep layers of the SC. This difference is particularly striking when one compares the TLCd with the SAI, which contains a very low concentration of labeled neurons (Fig. 6a, c–e).

Contrary to the expression of VIAAT, in sections processed to visualize the mRNA for the vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2), the TLCd stands out due to the virtual absence of labeled neurons, which contrasts with the abundance of labeled neurons in the TLCv and in the intermediate and deep layers of the SC (Fig. 6b, f–h). Taken together, the expression patterns of VIAAT and VGLUT2 stress the identity of the TLCd as a separate nucleus composed almost exclusively of presumably GABAergic neurons.

In sections processed to visualize the mRNA for the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1), all tectal

nuclei (including the TLCd, TLCv, and SC) are completely devoid of labeling (not shown).

The TLCd is hodologically distinct

To confirm the identity of the TLCd and gain an initial insight into its function, we analyzed the neural connections of the nucleus in two steps. We first injected the sensitive bidirectional tracer BDA into the rat TLCd to unravel the sources of input to the nucleus, and to pinpoint the main targets of its efferent projections. As described below, the main target of the TLCd appears to be the ipsilateral lateral complex of the thalamus, which includes the lateral posterior (LP) and laterodorsal (LD) nuclei. We then injected the tracer FluoroGold (FG) into the lateral thalamic complex to retrogradely label TLCd neurons.

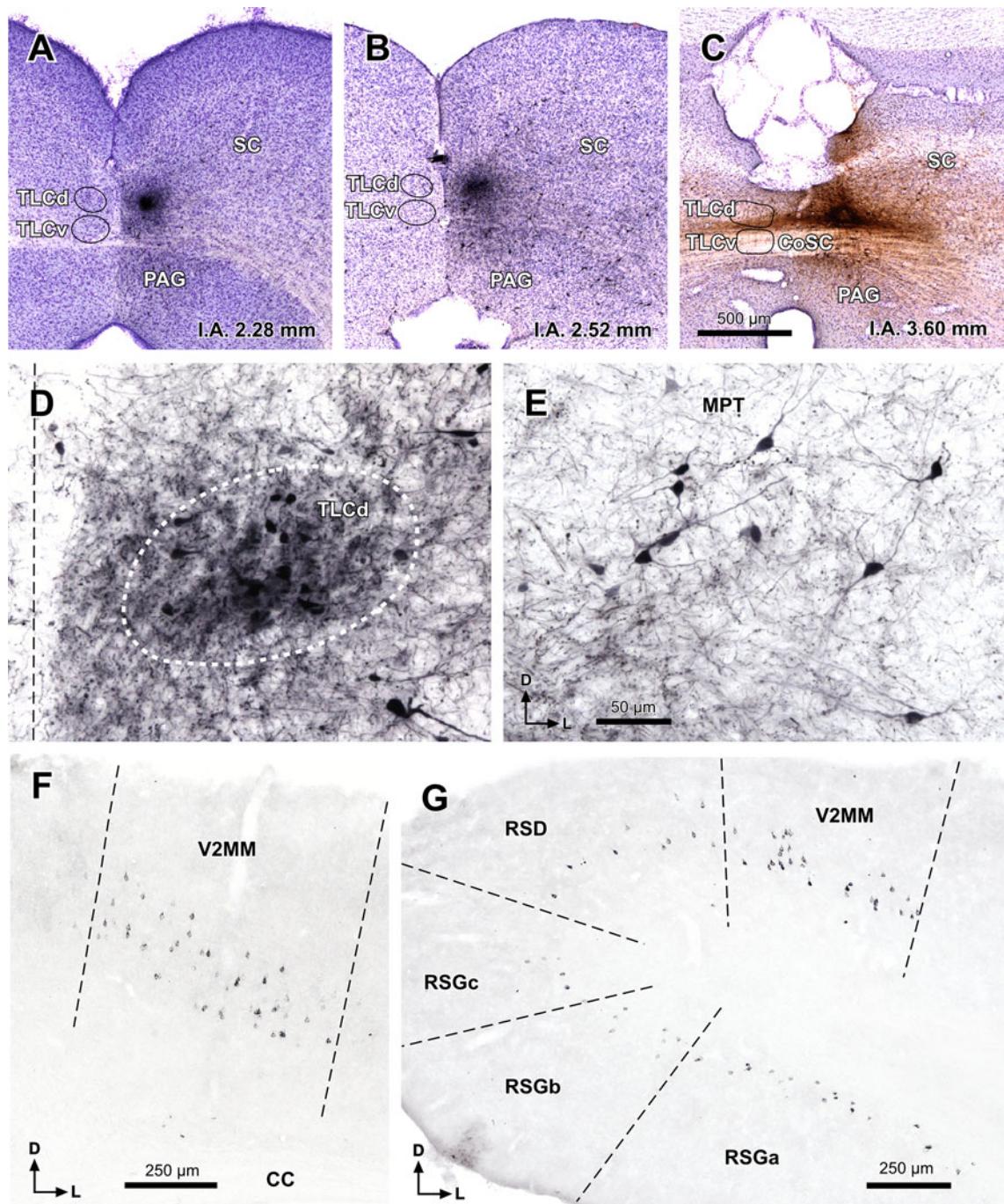


Fig. 7 Main sources of input to the rat TLCd. **a–c** Micrographs of coronal sections through the center of single injection sites of BDA in the central (**a**, case 01101; **b** case 02088) or the rostral (**c** case 00268) rostrocaudal third of the TLCd. **d** Numerous TLCd neurons are retrogradely labeled in a section located 1,280 μm more caudal than the injection site depicted in **c**. **e** Retrogradely labeled neurons in the

ipsilateral MPT (case 00268). **f** Retrogradely labeled neurons in a section through the rostral region of the ipsilateral V2MM (case 02088). **g** Retrogradely labeled neurons in a caudal section through the ipsilateral V2MM and retrosplenial cortices (case 02088). Calibration bar in **c** applies also to **a** and **b**. Calibration bar in **e** applies also to **d**. For abbreviations, see list

Cases with injection of BDA into the TLCd

The following description is based on five cases with small, single injection sites (maximum diameter $\leq 250 \mu\text{m}$) confined to the TLCd and placed at different rostrocaudal levels of the

nucleus (Fig. 7a–c). The results of all cases were qualitatively similar. However, the number of labeled neurons and fibers was higher in the cases with more rostrally located injection sites.

In each case, retrogradely labeled neurons were found within the TLCd at levels more caudal than the injections

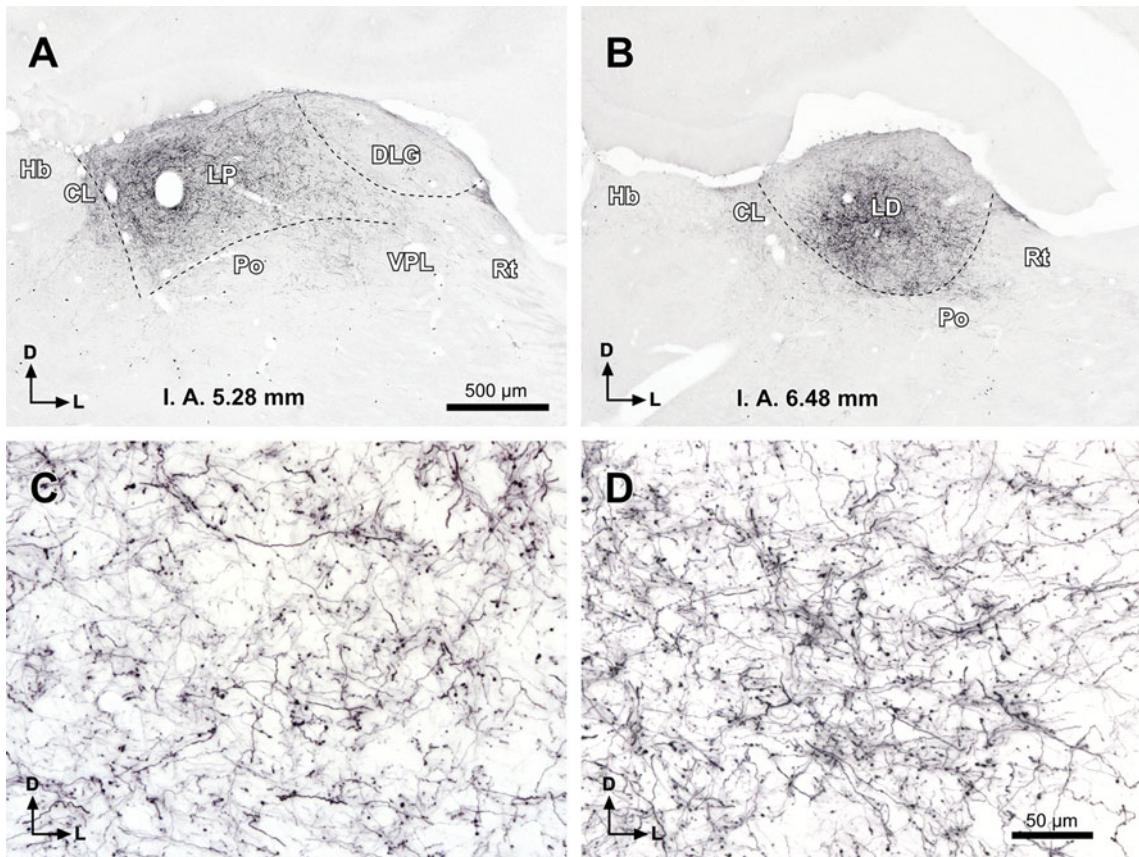


Fig. 8 The TLCd sends dense projections to the ipsilateral lateral complex of the thalamus. Micrographs of coronal sections showing dense terminal fields of fibers labeled in the LP (a) and LD (b) following a single injection of BDA into the ipsilateral TLCd (case 00268; see injection site in Fig. 7c). c, d Details of the terminal

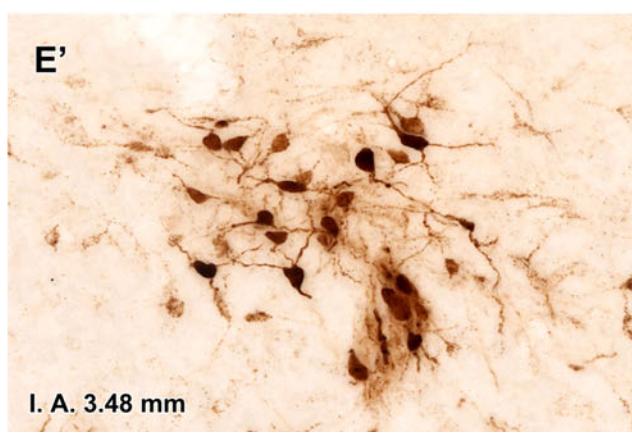
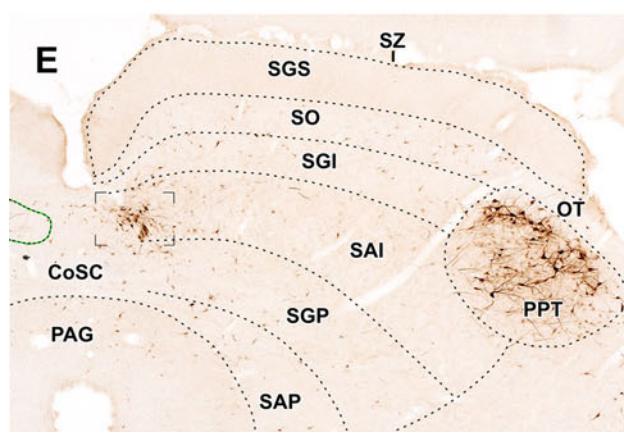
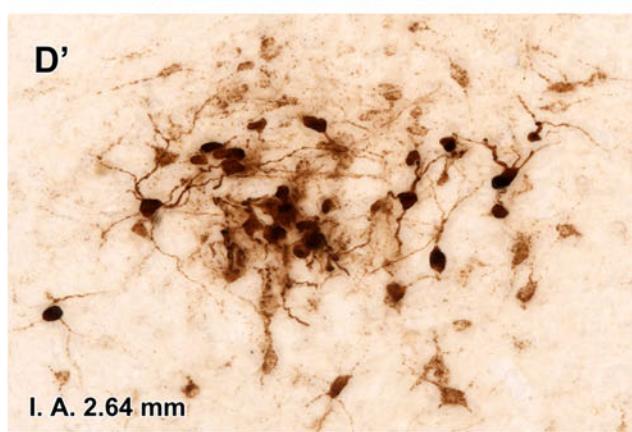
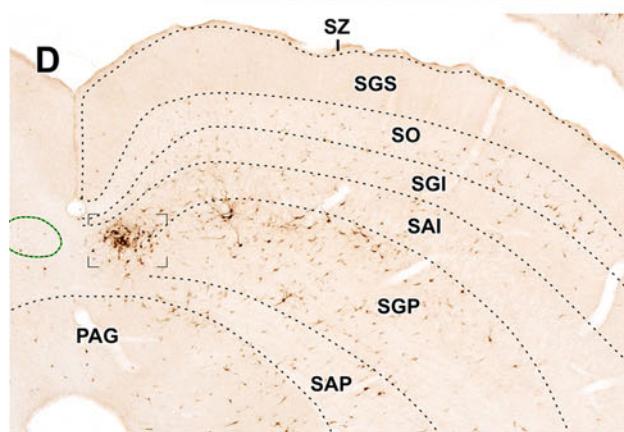
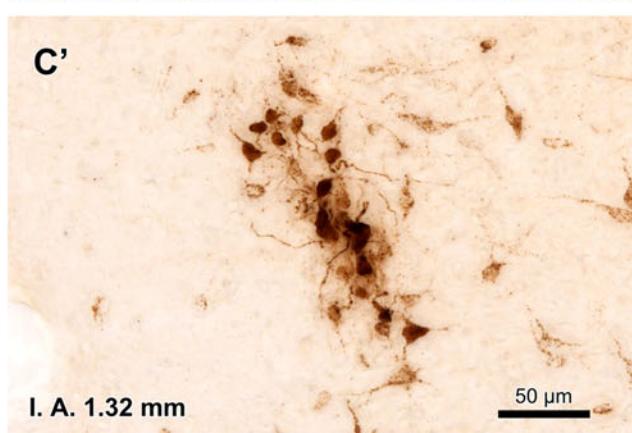
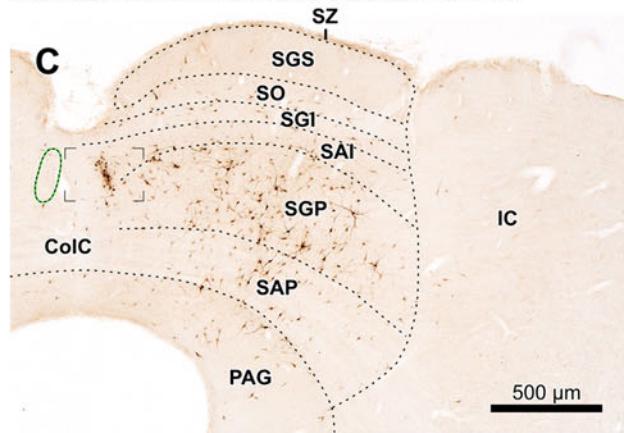
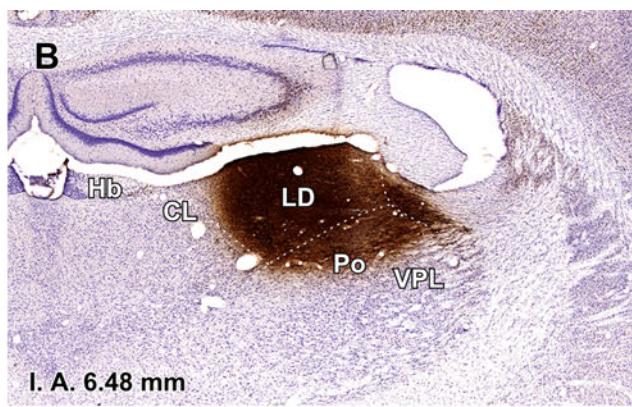
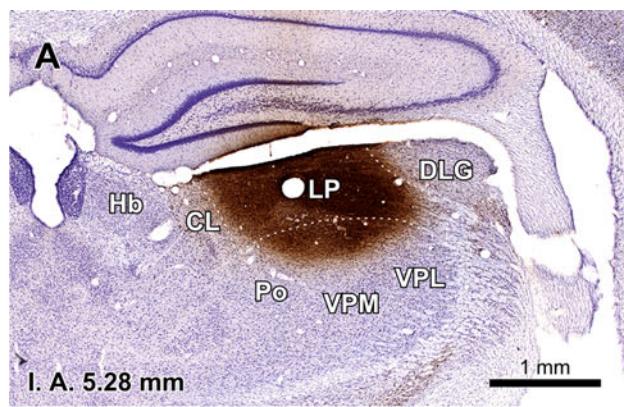
site (Fig. 7d), but not at more rostral levels, which suggests that the axons of TLCd projection neurons span the nucleus longitudinally and exit it rostrally as part of the fascicle of the TLCd. It also suggests that TLCd neurons may be contacted by other TLCd neurons located more caudally, but not the other way around.

In every experiment, BDA-labeled cell bodies were found outside the TLCd in a large variety of neural centers, from the caudal medulla to the telencephalon. Likewise, labeled axons were found in various locations, from the caudal medulla to the rostral thalamus. The detailed analysis of the neural connections of the TLCd exceeds the aims of this article, which is concerned with the identity of the nucleus. For comparison with the projections of the adjacent TLCv and SC, it is noteworthy that TLCd projections are largely ascending and predominantly ipsilateral, and that TLCd axons do not contribute to the predorsal bundle or any of the descending pathways that constitute the main outflow of the intermediate and deep layers of the SC (see “Discussion”). Therefore, we focus below on what appears to be the main sources of input to the TLCd and the main targets of TLCd projections.

fields of TLCd fibers from the sections depicted in a and b, respectively. Calibration bar in a applies also to b. Calibration bar in d applies also to c. Calibration bars uncorrected for shrinkage. For abbreviations, see list

Fig. 9 TLCd neurons are retrogradely labeled following injections of ► FluoroGold into the ipsilateral lateral complex of the thalamus. a, b Micrographs of Nissl-counterstained coronal sections through the center of the injection sites of FluoroGold into LP (a) and LD (b). Case 05239. c–e Micrographs of coronal sections through various rostrocaudal levels of the midbrain tectum of the same case. At each level, the TLCd stands out as a darkly stained spot whose density of labeled neurons surpasses that of any region of the SC. c’–e’ Details of the TLCd in the same sections shown in the left column. The interaural (IA) coordinate of each plane is indicated at the bottom of the micrographs. Calibration bar in a applies also to b. Calibration bar in c applies also to d, e. Calibration bar in c’ applies also to d’, e’. Calibration bars uncorrected for shrinkage. For abbreviations, see list

Numerous labeled neurons were found in the medial pretectal nucleus (MPT) and in vision-related areas of the cerebral cortex [secondary visual mediomedial area (V2MM) and granular and dysgranular retrosplenial cortices] (Fig. 7e–g), suggesting that these neural centers are major sources of input to the TLCd. Most retrogradely labeled neurons displayed a punctate reaction product that filled only the cell body and the proximal portion of the dendrites.



In the MPT ipsilateral to the injection site, labeled neurons were widely distributed throughout the nucleus and possessed small oval or polygonal somata (maximum diameter 10–15 µm) (Fig. 7e). Many neurons had their main axis oriented horizontally. The contralateral MPT contained very few labeled neurons.

In the cerebral cortex, regardless of the area, labeled neurons displayed a typical pyramidal morphology and were systematically located in layer V (Fig. 7f–g). In the V2MM, labeled neurons were found bilaterally, with a clear ipsilateral predominance. On the contralateral side, neurons were found mostly in the rostrocaudal central third of the V2MM. However, ipsilaterally, labeled layer V pyramidal neurons extended throughout the entire rostrocaudal extent of V2MM, and even beyond the rostral limit of V2MM into the cortical area identified in the atlas of Paxinos and Watson (2005) as the medial parietal association cortex.

In the retrosplenial cortices, labeled neurons were found only in sections more caudal than the rostral pole of the SC. Ipsilaterally, neurons were particularly abundant through all three regions of the retrosplenial granular cortex (regions a, b and c), and much scarcer in the retrosplenial dysgranular cortex (Fig. 7g). Contralaterally, labeled neurons were much scarcer and were scattered throughout the same areas.

In all cases with injections of BDA confined to the TLCd, labeled fibers left the nucleus rostrally via the fascicle of the TLCd, to cross the pretectum. No axonal bundles were labeled in the adjacent SAI (Fig. 7a, b). The densest terminal field was found throughout the ipsilateral lateral thalamic complex, spanning without interruption the caudally located LP and the rostrally located LD (Fig. 8). This terminal field was remarkable due to its density, unexpectedly high for such small injection sites, and due to the abundance and relatively small size of en passant and terminal varicosities, presumed to represent synaptic specializations (Fig. 8c, d). The contralateral lateral thalamic complex received a comparatively weak projection, which seemed to concentrate at rostral levels.

Cases with injection of FG into the lateral complex of the thalamus

The present description is based on 12 cases with unilateral deposits of FG into the lateral complex of the thalamus. In an attempt to maximize the labeling of TLCd neurons, in each of three cases we made two caudal injections centered in LP and two rostral injections centered in LD. At each level, one injection was placed 300 µm more lateral than the other. The resulting combined injection site covered most of the lateral complex of the thalamus, encroaching very little upon neighboring structures (e.g., Fig. 9a, b).

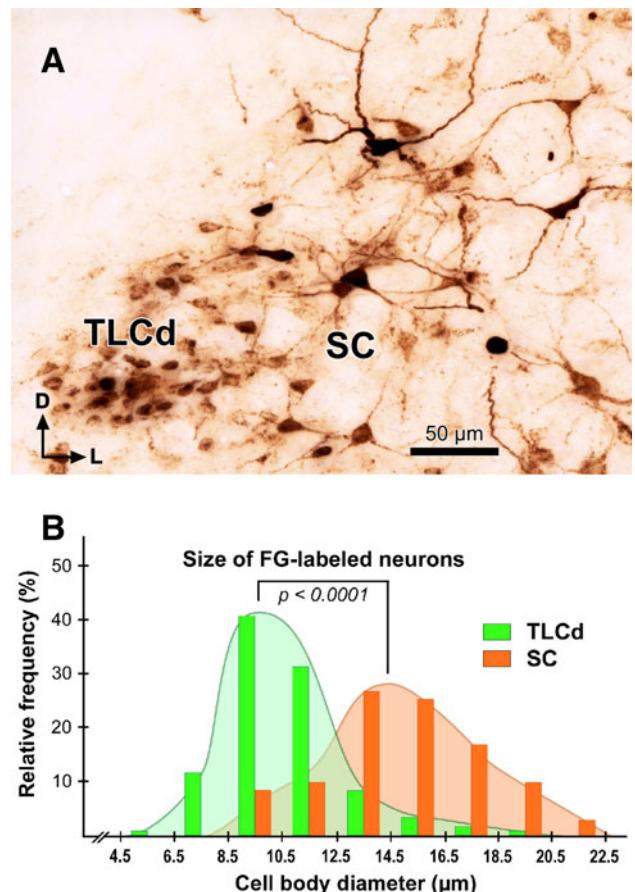


Fig. 10 Comparison between TLCd and SC neurons that innervate the lateral complex of the thalamus. **a** High magnification micrograph of a section through the central rostrocaudal third of the TLCd from a case similar to the one depicted in Fig. 9. Case 05240. Labeled TLCd neurons (left half of the micrograph) are small, tightly packed, possess homogeneous round or oval cell bodies, and display a punctate reaction product limited to the cell body and, in some instances, the most proximal portions of their dendritic trees. In contrast, labeled SC neurons possess much larger, polygonal cell bodies and display an impressive filling of their dendritic trees. *Calibration bar* uncorrected for shrinkage. **b** Histogram of the maximum diameter of the cell body of neurons labeled in the TLCd (green mean = 10.64 µm ± 2.24 SD; $n = 120$) and the adjacent SC (orange mean = 14.90 µm ± 2.98 SD; $n = 71$) measured from the case depicted in Fig. 9. Measured SC neurons were limited to those located within 500 µm of the lateral border of the TLCd. Note that the labeled SC neurons are on average much larger and more heterogeneous than the labeled TLCd neurons

In addition to the expected labeling in all nuclei known to innervate the lateral complex of the thalamus (reviewed by Groenewegen and Witter 2004), abundant neurons were labeled in the TLCd ipsilateral to the injection site (Fig. 9c–e). In every section, labeled neurons were widely distributed throughout the nucleus and displayed a wide range of labeling intensities, from neurons with faint punctate labeling confined to the cell body, to neurons with dense, diffuse labeling that filled the dendrites (Figs. 9c'–e', 10a). Altogether, it seemed that most TLCd neurons

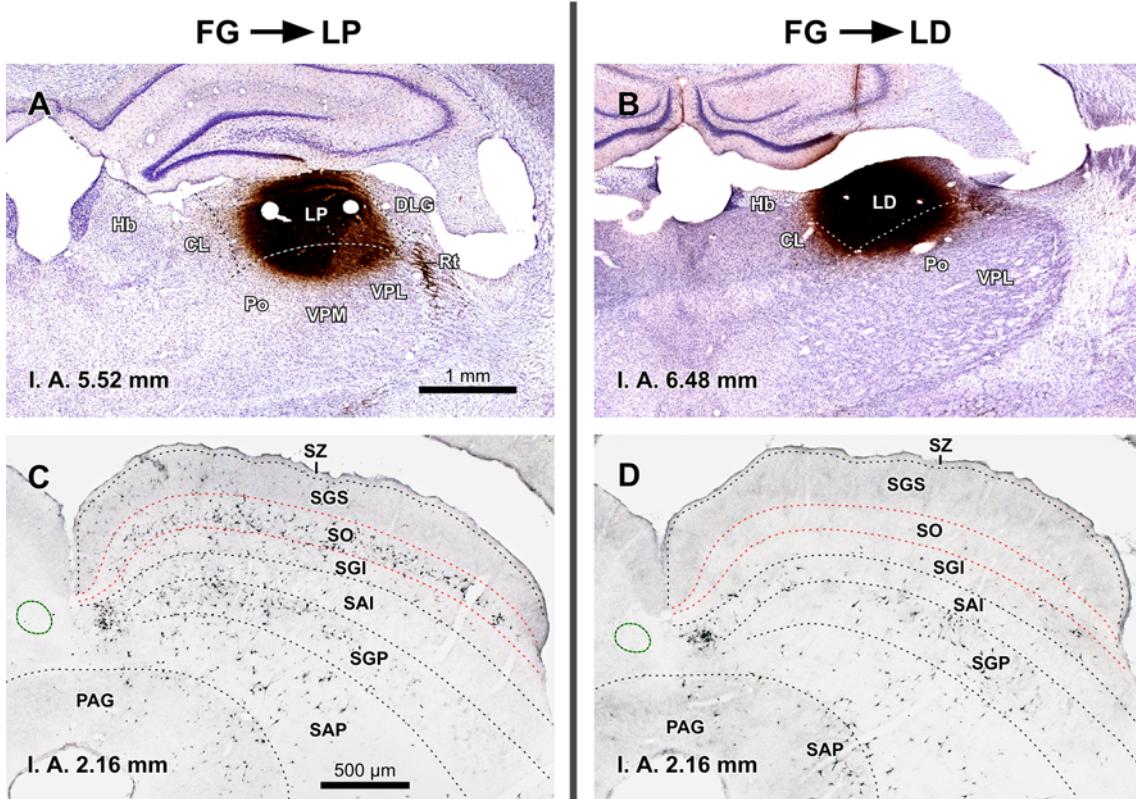


Fig. 11 TLCd neurons innervate both LP and LD. **a, b** Micrographs of Nissl-counterstained coronal sections through the center of a single injection site of FluoroGold into LP (**a** case 05222) or LD (**b** case 05209). **c–d** Micrographs of coronal sections through the ipsilateral half of the midbrain tectum of the same cases. **c** Following injection into LP, numerous neurons are labeled in the optic layer (SO), with fewer neurons labeled in deep layers, and even fewer in the intermediate layers. The neurons labeled in the superficial gray layer (SGS) are the consequence of the spread of the tracer into the most medial portion of the dorsal lateral geniculate nucleus (DLG).

d Following injection into LD, labeled neurons are scattered throughout the deep layers of the SC and, to a lesser extent, in the intermediate layers, whereas the superficial layers are devoid of labeled neurons. In both types of cases, the concentration of neurons labeled in the TLCd surpasses that of any other territory of the tectum. The interaural (IA) coordinate of each plane is indicated at the bottom of the micrographs. Calibration bar in **a** applies also to **b**. Calibration bar in **c** applies also to **d**. Calibration bars uncorrected for shrinkage. For abbreviations, see list

were labeled. This dense retrograde labeling allowed the unequivocal distinction of the TLCd from the adjacent SC and TLCv (Fig. 8c–e). Figure 10a illustrates the differences in the size and shape of the cell bodies and in the pattern of dendritic filling between neurons labeled in the TLCd and those labeled in the adjacent SAI. Morphometric analysis of the labeled neurons demonstrated that TLCd neurons were significantly smaller (Fig. 10b). Only rarely did the TLCd contralateral to the injection site contain labeled neurons.

Projections from the SC to LP and the projections from the SC to LD have been reported to originate in different populations of SC neurons (see references below). Therefore, we compared cases with single injections of FG into LP (Fig. 11a) with cases with single injections into LD (Fig. 11b) to investigate whether there was a difference in the morphology or distribution of the neurons labeled in the TLCd. In cases with injections into LP, there were abundant labeled neurons in the optic layer (stratum opticum) of

the ipsilateral SC, with fewer neurons labeled in more ventral layers (Fig. 11c), thus confirming previous reports (Donnelly et al. 1983; Sugita et al. 1983; Lane et al. 1993, 1997; Hilbig et al. 2000; Masterson et al. 2009). In cases with injections into LD, labeled neurons were scattered throughout the intermediate and deep layers of the ipsilateral SC, and the optic layer was virtually devoid of labeled neurons (Fig. 11d), which is consistent with previous results (Thompson and Robertson 1987). In both types of cases, abundant neurons were labeled throughout the rostrocaudal extent of the ipsilateral TLCd and they showed similar morphology and distribution (Fig. 11c–d).

Summary of results

Our data demonstrate that the TLCd is a distinct nucleus of the mammalian brain. It differs from the surrounding nuclei (TLCv and SC) by its cytoarchitecture, myeloarchitecture, neurochemistry and neural connections. The TLCd of the

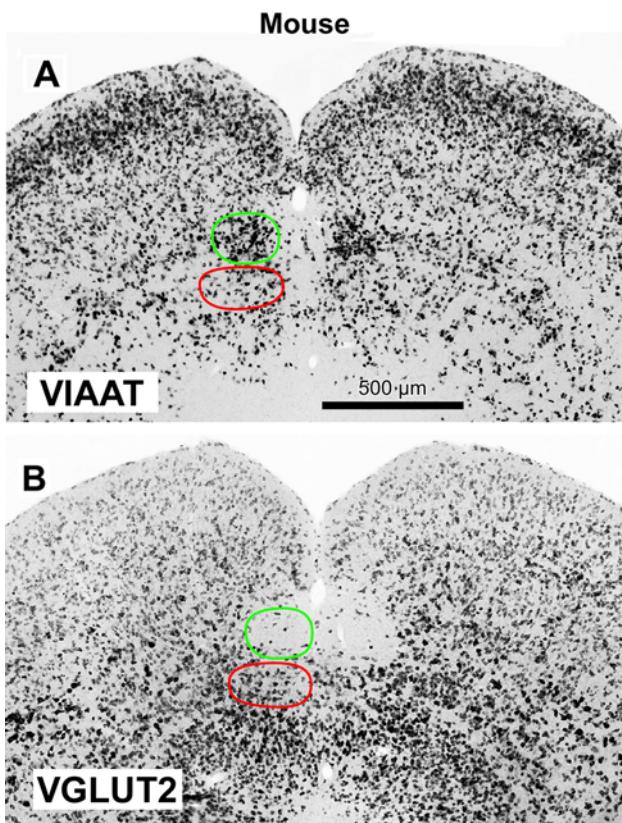


Fig. 12 Mouse TLCd neurons express the mRNA for VIAAT, but not for VGLUT2. Micrographs of coronal sections of the mouse midbrain tectum processed by *in situ* hybridization to visualize the expression of the mRNA for VIAAT (a) or the mRNA for VGLUT2 (b). Like in the rat (Fig. 6), the mouse TLCd stands out due to the very high density of neurons that express the VIAAT and the paucity of neurons that express the VGLUT2. Calibration bar in a applies also to b. Calibration bar uncorrected for shrinkage

rat consists of a homogeneous population of small, presumably GABAergic neurons that receive input from the pretectum and from secondary visual and retrosplenial cortices, and provides the LP and LD with a dense inhibitory projection.

Discussion

The TLCd is a distinct nucleus

The present study represents a systematic investigation of a previously uncharacterized nucleus of the mammalian brain: the TLCd. Although the existence of the TLCd was noted in the course of a methodical investigation of the ventrally adjacent TLCv (Saldaña et al. 2007), herein we employed a constellation of anatomical techniques to demonstrate that the TLCd is indeed a distinct nucleus of the rat brain. Despite its narrow appearance in coronal sections, the size of this longitudinally oriented structure is

impressive, as the nucleus spans the entire rostrocaudal length of the SC.

It may seem surprising that a nucleus as large as the TLCd has remained unnoticed until now. The border between TLCd and the SC, although distinct at close inspection (e.g., Figs. 3, 4), may seem ill-defined at first glance, which explains why, in the relatively scarce published works whose illustrations contain the midline, the territory occupied by the TLCd has been traditionally included in the most medial part of the SC (e.g., Olszewski and Baxter 1954; Berman 1968; Swanson 1999; Hof et al. 2000; Paxinos and Watson 2005). Unfortunately, considerable confusion burdens the literature pertaining to the stratification of the paramedian region of the tectum, and the territory occupied by the TLCd has been non-systematically assigned to the medial portion of the intermediate gray layer (e.g., Rieck et al. 1986 [cat]; Swanson 1999 [rat]; Meredith et al. 2001 [ferret]; Helms et al. 2004 [rat]; Bajo et al. 2010 [ferret]), the SAI (Redgrave et al. 1986, 1990 [rat]; Rhoades et al. 1986 [hamster]; Harvey and Worthington 1990 [rat]; Harvey et al. 2001 [rat]; Favaro et al. 2011 [rat]), both intermediate layers (García del Caño et al. 2000, 2001 [rat]) or the deep layers (Ma et al. 1990 [monkey]; Furigo et al. 2010 [rat]), or even left outside of any identifiable layer (e.g., Huerta and Harting 1984 [cat]; Matsuyama and Kawamura 1985 [rat]; Paxinos and Watson 2005 [rat]; Comoli et al. 2012 [rat]). As discussed below, our data unequivocally demonstrate that the TLCd is located immediately medial to the SAI.

Another reason that the TLCd may have gone unnoticed is that many commonly used neurochemical markers do not highlight the nucleus. For example, in sections of the rat midbrain stained for parvalbumin, calbindin, calretinin, calcitonin gene-related peptide, neurofilament protein (SMI-32), tyrosine hydroxylase, NADPH-diaphorase, acetylcholinesterase or adenosine deaminase, the TLCd is hardly distinguishable (Miguel-Hidalgo et al. 1989; Lane et al. 1993; Paxinos et al. 1999).

Some reports in the literature did identify important features of the TLCd, adding strength to its present characterization. A continuous, longitudinal pool of neurons strongly immunoreactive for glutamic acid decarboxylase (GAD), tentatively called “area commissuralis colliculi superioris et inferioris”, was reported by Mugnaini and Oertel (1985) in the paramedian region of the rat midbrain tectum (see their Fig. 102), in a location consistent with TLCd. Similarly, a distinct cluster of neurons expressing the mRNA for GAD was reported in the same location by Harvey et al. (2001; their Figs. 2D, 3D). Furthermore, an unmistakable cluster of brightly fluorescent neurons was found in the location of the TLCd in a line of transgenic mice expressing the fluorescent protein Venus under the control of the VIAAT promoter (Wang et al. 2009; their

Fig. 6). The latter observation is particularly relevant given that our own material indicates that the pattern of expression of the VIAAT in the tectum of the mouse is virtually identical to that of the rat (compare Figs. 6 and 12). All these data strongly suggest that in both the mouse and the rat most, if not all, TLCd neurons are GABAergic. Finally, the TLCd stands out due to the presence of neurons and fibers immunoreactive for leu-enkephalin (Miguel-Hidalgo et al. 1990; see their Fig. 2B, E), and to the high levels of expression of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in developing and mature rats and mice (Happe and Morley 2004; see their Figs. 1, 2).

The existence of the TLCd is also supported by several previous tract-tracing studies. Following injection of BDA into the retrosplenial cortex of the rat, a distinct cluster of terminal fibers was labeled in the territory occupied by the TLCd in both normal rats (García del Caño et al. 2001; Tsumori et al. 2001) and in rats that previously underwent neonatal enucleation (García del Caño et al. 2001). Likewise, the injection of peroxidase-conjugated wheat-germ agglutinin (WGA-HRP) into secondary visual areas of the rat neocortex resulted in a high concentration of labeled fibers in the territory occupied by the ipsilateral TLCd (Harvey and Worthington 1990; see their Fig. 5A). Moreover, numerous neurons were labeled in the location of the TLCd ipsilateral to injections of HRP into the laterodorsal thalamic nucleus (LD) of the rat (Thompson and Robertson 1987; their Figs. 3, 5), deposits of gold-WGA-HRP which involved the lateral posterior thalamic nucleus (LP) of the rat (Carstens et al. 1990; their Fig. 6D), and injections of fluorescein-conjugated dextran amine in the pulvinar nucleus of the cat (Baldauf et al. 2005; their Fig. 1F), the feline homolog of the rodent LP. All these findings lend firm support to the connections of the TLCd described in the current study and to the hypothesis that it is present not only in rodents, but also in other mammals. Indeed our preliminary observations suggest that the cytoarchitectural criteria that define the TLCd of the rat allow the identification of a comparable nucleus in the paramedian region of the tectum of other mammalian species, including lagomorphs, carnivores, non-human primates and humans.

Differences between the TLCd and the TLCv

Despite their close apposition and their organizational similarities, the TLCd and the TLCv differ in various fundamental aspects. *Anatomically* The TLCv, but not the TLCd, is traversed by the commissure of the IC and the commissure of the SC. Conversely, the TLCd, but not the TLCv, is spanned by a conspicuous fascicle of longitudinally oriented axons. *Cytoarchitecturally* The TLCd lacks for the most part neurons comparable to medium-sized neurons of the TLCv, and TLCd neuronal somata are

significantly smaller and more tightly packed than those of TLCv small neurons (Saldaña et al. 2007). *Neurochemically* The expression of amino acid vesicular transporters (Figs. 6, 12) suggests that most, if not all, TLCd neurons are GABAergic, whereas the TLCv may contain a mixture of GABAergic and glutamatergic neurons. *Hodologically* The projections of the TLCd are predominantly ascending, while those of the TLCv are mostly descending. More specifically, the TLCd, but not the TLCv, innervates the lateral complex of the thalamus (Figs. 8, 9, 10, 11); conversely, the TLCv, but not the TLCd, is innervated by the IC (Aparicio et al. 2010) and is reciprocally connected with the superior paraolivary nucleus (Viñuela et al. 2011). Therefore, while the TLCv is connected with auditory centers, the connections of the TLCd appear to be related to the visual system. And finally, *electrophysiologically* TLCv neurons respond to acoustic stimulation, whereas TLCd neurons do not respond to sound (Saldaña et al. 2007; Marshall et al. 2008).

Differences between the TLCd and the SC

A pivotal question in establishing the identity of the TLCd is to determine whether it represents a separate nucleus or rather a more or less specialized region of the SC, and particularly a region of the SAI, in which it has been often included. This is more than just a semantic issue, as recognizing the TLCd as a distinct nucleus will influence future strategies designed to investigate it because different nuclei may have different ontogenetic origins and subserve different functions.

Our results demonstrate that the TLCd differs conspicuously from the adjacent regions of the SC in terms of *cytoarchitecture*. TLCd neurons are remarkably homogeneous, rostrocaudally oriented, and significantly smaller and more tightly packed than neighboring SC neurons. In fact, these differences give rise to the sharp border between the TLCd and the SC that is readily appreciated in many sections (e.g., Figs. 3, 4). The TLCd also has different *myeloarchitecture*. The longitudinal fibers that span the TLCd and which form the fascicle of the TLCd differ from the longitudinal fibers of the SAI in their thickness and their pattern of aggregation into bundles (Fig. 5).

One of the strongest arguments in favor of the TLCd as a separate entity is the proportion of GABAergic neurons it contains. According to our results, in both rats and mice TLCd neurons are presumably GABAergic because they express the VIAAT, whereas in the SAI the proportion of neurons that express the VIAAT is low. In the rat, fewer than 5 % of neurons in the SAI are GAD-immunopositive, which makes it the SC layer with the lowest concentration of GABAergic neurons (Mugnaini and Oertel 1985; see their schematic drawings A 2.2 through P 0.1). In contrast,

50–90 % of neurons in the TLCd are GAD-immunopositive, a proportion unmatched by any SC region (Mugnaini and Oertel 1985; their schematic drawings A 2.2 through P 0.5).

The TLCd and the SC differ also in their neural connections. As shown by our experiments, the main target of the TLCd is the ipsilateral lateral complex of the thalamus. Two aspects of this projection are particularly noteworthy: first is the very high density of the projection, which one would not expect from a nucleus as narrow as the TLCd, especially considering the small size of our tracer injection sites; and second, the fact that the TLCd innervates with similar density both the LP and the LD. This is clearly different from the tectothalamic projections of the SC, which are known to innervate densely LP, but not LD. In our own experiments, many fewer neurons were labeled in the SC following injections of retrograde tracers in LD than in cases with similar injections centered in LP (Fig. 11). Moreover, our unpublished cases with injections of BDA in regions of the SC lateral to the TLCd reveal a dense projection to LP, whereas the projection to LD appears very weak, much weaker than the one revealed by the much smaller injections into TLCd.

A further difference between the tectothalamic projections of the TLCd and those of the SC may be related to the neurotransmitters released at their synapses. The synaptic boutons labeled in LP following injections of the anterograde tracer PHA-L into the rat SC exhibit ultrastructural features usually associated with excitatory neurotransmission and are immunoreactive for the vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2), which has prompted the suggestion that VGLUT2 may be used as a specific marker for the SC axons that innervate LP (Masterson et al. 2009). This is particularly meaningful given that, according to our data, in both the rat and the mouse TLCd neurons do not express VGLUT2. Given the likely GABAergic nature of TLCd neurons, one would expect its synaptic boutons in LP (and LD) to be very different from colliculothalamic boutons.

Another major hodological difference between the TLCd and the SC is that the TLCd lacks the descending, predominantly crossed projections to brainstem and spinal centers involved in the control of eye, head, pinna or body movements, which are characteristic of the intermediate and deep layers of the SC (reviewed by May 2006). In our cases with injections of BDA into the TLCd, the paramedian pontine reticular formation, which is the main target of the descending predorsal bundle, was virtually devoid of labeled fibers. This observation is consistent with previous tract-tracing investigations: following injections of retrograde tracers into the tecto-recipient zones of the paramedian reticular formation, labeled SC neurons were concentrated in the contralateral SAI, but always at a

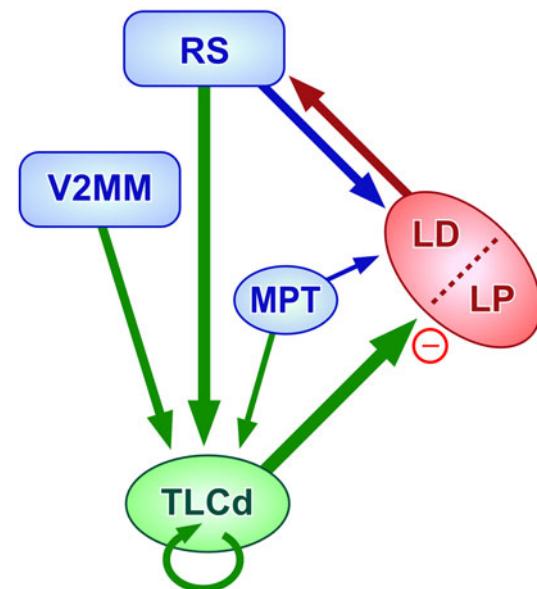


Fig. 13 Schematic diagram of the main neural connections of the rat TLCd. The afferent and efferent connections of the TLCd unraveled in this study have been indicated by green arrows. The thickness of the different arrows roughly corresponds to the density of the projections. Note that the TLCd sends a dense inhibitory projection to LP and LD

distance from the midline, so no labeled neurons were found within the TLCd (e.g., Redgrave et al. 1986 [rat], see their Fig. 1; Redgrave et al. 1990 [rat], their Fig. 1; May 2006 [cat, macaque], his Fig. 13).

All these arguments strongly suggest that, just like the TLCv, the TLCd is not part of the SC. The organization of these two paramedian columns is clearly different from the alternating horizontal layers of gray and white matter of the SC. Therefore, even if the TLCd and the TLCv are anatomically considered “within” the SC, one should keep in mind that they are not actually part of the horizontal layered system of the SC, nor do they fit the mosaic-like pattern of vertical patches and modules found throughout the SC (Chevalier and Mana 2000; Harting 2004).

Three longitudinal columns in the paramedian region of mammalian midbrain tectum

The discovery of the TLCd and the TLCv reveals an unexpected level of longitudinal organization in the paramedian region of mammalian midbrain tectum. This region appears to be composed of three parallel, longitudinal columns: the TLCd, the TLCv, and the dorsomedial column of the periaqueductal gray matter (PAGdm), ordered from dorsal to ventral. While these three columns differ markedly in their cytoarchitecture, relationship with the tectal commissures, connections and electrophysiology, they may be related in other ways. For example, many

PAGdm neurons possess dendrites that extend dorsally to enter the TLCv (Mantyh 1982; Beitz and Shepard 1985; Herrera et al. 1988). Similarly, the dendrites of many TLCv neurons extend dorsally or ventrally beyond the limits of the nucleus into the TLCd or the PAGdm (Herrera et al. 1988; Saldaña et al. 2007). Finally, the TLCd contains neurons whose dendrites make their way down into the TLCv (our unpublished observations). This intriguing arrangement raises interesting questions as to whether the three columns are ontogenetically related, share incoming information and/or participate in coordinated functions.

What is the role of the TLCd?

Despite the limited information currently available about the TLCd, our results provide a conceptual framework for future studies. The findings presented herein, coupled with our unpublished observations that the TLCd is present in species as different as rodents, lagomorphs, carnivores and primates, suggests that it may be common to all terrestrial mammals, or even to the entire mammalian class. The function of the TLCd is, therefore, probably shared by a large variety of animals, and may extend to include non-mammalian vertebrates. For instance, due to its tectal location and longitudinal orientation, the prominent torus longitudinalis of the fish brain (e.g., Folgueira et al. 2007) resembles the paramedian columns of the mammalian tectum.

The TLCd as an extrathalamic source of inhibition to the lateral thalamus

Insight into the function of the TLCd can be gained from the fact that its neurons are most likely GABAergic and send their axons to LP and LD, two higher order thalamic nuclei commonly included as part of the visual system. In the LP of the rat, GABAergic terminals represent 10–20 % of all synaptic boutons (Çavdar et al. 2011). The most conspicuous source of GABAergic innervation of thalamic neurons is the reticular thalamic nucleus (e.g. Wang et al. 2001 [cat]; Wanaverbecq et al. 2008 [rat]). Local thalamic GABAergic interneurons are unlikely to account for a significant percentage of the GABAergic terminals because GABAergic neurons are exceedingly rare in the thalamus of the rat (Arcelli et al. 1997). Other sources of GABAergic projections to higher order thalamic nuclei have been identified in recent years. In the rat, the zona incerta sends widespread GABAergic projections to several higher order thalamic nuclei, but interestingly such inputs seem to spare for the most part LP and LD (Barthó et al. 2002). These two nuclei are, however, innervated by GABAergic neurons of the anterior pretectal nucleus (Bokor et al. 2005; see Baldauf et al. 2005 for related data in the cat) whose

axons form large terminals that establish multiple synapses with their postsynaptic neurons (Bokor et al. 2005; Wanaverbecq et al. 2008). Although the ultrastructure of the synapses between boutons of TLCd axons and LP and LD neurons has not been studied, our tract-tracing data suggest that TLCd boutons are smaller than those of the anterior pretectal nucleus, and may be more similar to the boutons formed by axons of the reticular thalamic nucleus, which are also small and establish one single synapse with their targets (Wanaverbecq et al. 2008). Comparing the GABAergic thalamopetal projection of the anterior pretectal nucleus with that of the TLCd, there are two additional differences: first, while not all the pretectal neurons that innervate the thalamus are GABAergic, the TLCd apparently consists of a pure population of GABAergic tectothalamic neurons; and secondly, the anterior pretectal nucleus seems to exert a widespread effect over multiple thalamic nuclei, whereas the projections of the TLCd innervate very preferentially the lateral complex of the thalamus. Therefore, the TLCd may be unique as it constitutes the only known nucleus composed of GABAergic neurons dedicated to providing massive inhibition to higher order thalamic nuclei of a specific sensory modality.

Biological significance of the TLCd

Further insight into the role of the TLCd can be gained from its main connections, unraveled in this study and summarized in Fig. 13. In the rat, the TLCd is innervated by the medial pretectal nucleus (MPT), the secondary visual mediomedial area (V2MM) and the retrosplenial cortices, and sends dense projections to the lateral complex of the thalamus (LP and LD). Many of these structures are heavily interconnected (e.g., Thompson and Robertson 1987; Shibata 2000; Van Groen and Wyss 2003; Kamishina et al. 2009). In the rat, the retrosplenial cortices and the LD contain head-direction neurons, essential for spatial navigation (reviewed by Taube 2007), and have been implicated in learning and memory tasks with a visual component (Mizumori et al. 1994; Van Groen et al. 2002; Vann et al. 2009; Yoder et al. 2011). Moreover, V2MM has recently been shown to be critical for object-recognition memory (López-Aranda et al. 2009) and its development is promoted by the exposure to moving images (Sun et al. 2009). Therefore, the connections of the TLCd suggest that the function of the nucleus is related to the processing of hitherto unknown aspects of visual stimuli. Interestingly, in their study of the electrophysiological properties of TLCv neurons, Marshall et al. (2008) reported that TLCd neurons were unresponsive to sound or light. It is possible, however, that the visual stimuli used by these authors (a static flashlight or a laser pointer in a darkened sound-attenuated recording chamber) were inadequate to trigger the activity

of TLCd neurons. Systematic investigations of the responses of TLCd neurons to varied visual stimuli will be necessary before the biological meaning of the nucleus can be understood. It would also be interesting to investigate to what extent the GABAergic innervation from the TLCd is involved in the processing of somatosensory information by LD neurons (Bezdudnaya and Keller 2008).

The TLCd represents an unexpected and promising focus for future research on modulation of thalamic activity and mammalian visual function. Knowledge about the nucleus is still rudimentary, but with currently available and newly emerging technologies, neuroscientists should be able to accomplish in a few years what took many decades to achieve in other nuclei of the brain. The anatomical results of the present study should aid in the design of future investigations.

Acknowledgments We thank Dr. Albert S. Berrebi for insightful discussions and comments and for his skillful editing of the manuscript. The authors are thankful to Dr. Antonio Viñuela, who performed many of the experiments involving tracer injections into the TLCd, and to Drs. Douglas L. Oliver and Tetsufumi Ito, who provided the sections showing the expression of the mRNA for glutamate or inhibitory amino acid vesicular transporters. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation grants BFU2004-05909 and BFU2008-04197, by the Junta de Castilla y León grants GR221 and Biomedicina 2009, and by the Instituto de Salud Carlos III grant PI10/01803.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Aparicio MA, Viñuela A, Saldaña E (2010) Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column in the rat. *Neuroscience* 166:653–664
- Arcelli P, Frassoni C, Regondi MC, De Biasi S, Spreafico R (1997) GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity? *Brain Res Bull* 42:27–37
- Bajo VM, Nodal FR, Bizley JK, King AJ (2010) The non-lemniscal auditory cortex in ferrets: convergence of corticotectal inputs in the superior colliculus. *Front Neuroanat* 4:18. doi:[10.3389/fnana.2010.00018](https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00018)
- Baldauf ZB, Wang S, Chomsung RD, May PJ, Bickford ME (2005) Ultrastructural analysis of projections to the pulvinar nucleus of the cat. II: Pretectum. *J Comp Neurol* 485:108–126
- Barthó P, Freund TF, Acsády L (2002) Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *Eur J Neurosci* 16:999–1014
- Beitz AJ, Shepard RD (1985) The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis. *J Comp Neurol* 237:460–475
- Berman AL (1968) The brain stem of the cat: a cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates. University of Wisconsin Press, Madison
- Bezdudnaya T, Keller A (2008) Laterodorsal nucleus of the thalamus: a processor of somatosensory inputs. *J Comp Neurol* 507:1979–1989
- Bickford ME, Hall WC (1989) Collateral projections of predorsal bundle cells of the superior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 283:86–106
- Bokor H, Frère SG, Eyre MD, Slézia A, Ulbert I, Lüthi A, Acsády L (2005) Selective GABAergic control of higher-order thalamic relays. *Neuron* 45:929–940
- Carstens E, Leah J, Lechner J, Zimmermann M (1990) Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat. *Neuroscience* 35:609–626
- Çavdar S, Hacioglu H, Sirvancı S, Keskinöz E, Onat F (2011) Synaptic organization of the rat thalamus: a quantitative study. *Neurol Sci* 32:1047–1056
- Chevalier G, Deniau JM (1984) Spatio-temporal organization of a branched tecto-spinal/tecto-diencephalic neuronal system. *Neuroscience* 12:427–439
- Chevalier G, Mana S (2000) Honeycomb-like structure of the intermediate layers of the rat superior colliculus, with additional observations in several other mammals: AChE patterning. *J Comp Neurol* 419:137–153
- Comoli E, Das Neves Favaro P, Vautrelle N, Leriche M, Overton PG, Redgrave P (2012) Segregated anatomical input to sub-regions of the rodent superior colliculus associated with approach and defense. *Front Neuroanat* 6:9. doi:[10.3389/fnana.2012.00009](https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00009)
- Donnelly JF, Thompson SM, Robertson RT (1983) Organization of projections from the superior colliculus to the thalamic lateral posterior nucleus in the rat. *Brain Res* 288:315–319
- Favaro PD, Gouvêa TS, de Oliveira SR, Vautrelle N, Redgrave P, Comoli E (2011) The influence of vibrissal somatosensory processing in rat superior colliculus on prey capture. *Neuroscience* 176:318–327
- Folgueira M, Sueiro C, Rodríguez-Moldes I, Yáñez J, Anadón R (2007) Organization of the torus longitudinalis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an immunohistochemical study of the GABAergic system and a DiI tract-tracing study. *J Comp Neurol* 503:348–370
- Furigo IC, de Oliveira WF, de Oliveira AR, Comoli E, Baldo MV, Mota-Ortiz SR, Canteras NS (2010) The role of the superior colliculus in predatory hunting. *Neuroscience* 165:1–15
- García Del Caño G, Gerrikagoitia I, Martínez-Millán L (2000) Morphology and topographical organization of the retrosplenial-collicular connection: a pathway to relay contextual information from the environment to the superior colliculus. *J Comp Neurol* 425:393–408
- García del Caño G, Gerrikagoitia I, Martínez-Millán L (2001) Plastic response of the retrosplenial-collicular connection after removal of retinal inputs in neonatal rats. An anterograde tracing study. *Exp Brain Res* 138:343–351
- Groenewegen HJ, Witter MP (2004) Thalamus. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system*, 3rd edn. Elsevier, Amsterdam, pp 407–453
- Gundersen HJG (1988) The nucleator. *J Microsc* 151:3–21
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857–881
- Happe HK, Morley BJ (2004) Distribution and postnatal development of alpha nicotinic acetylcholine receptors in the rodent lower auditory brainstem. *Brain Res Dev Brain Res* 153:29–37
- Harting JK (2004) Puffs and patches: a brief chronological review. In: Hall WV, Moschovakis A (eds) *The superior colliculus: new approaches for studying sensorimotor integration*. CRC Press, Boca Raton, pp 83–105
- Harvey AR, Worthington DR (1990) The projection from different visual cortical areas to the rat superior colliculus. *J Comp Neurol* 298:281–292

- Harvey AR, Heavens RP, Yellachich LA, Sirinathsingji DJ (2001) Expression of messenger RNAs for glutamic acid decarboxylase, preprotachykinin, cholecystokinin, somatostatin, proenkephalin and neuropeptide Y in the adult rat superior colliculus. *Neuroscience* 103:443–455
- Helms MC, Ozen G, Hall WC (2004) Organization of the intermediate gray layer of the superior colliculus. I. Intrinsic vertical connections. *J Neurophysiol* 91:1706–1715
- Herrera M, Sánchez del Campo F, Ruiz A, Smith Agreda V (1988) Neuronal relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus (nucleus commissuralis) in the cat. A Golgi study. *J Anat* 158:137–145
- Hilbig H, Bidmon HJ, Ettrich P, Müller A (2000) Projection neurons in the superficial layers of the superior colliculus in the rat: a topographic and quantitative morphometric analysis. *Neuroscience* 96:109–119
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000) Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains. Elsevier, Amsterdam
- Huerta MF, Harting JK (1984) Connectional organization of the superior colliculus. *Trends Neurosci* 8:286–289
- Huerta MF, Frankfurter A, Harting JK (1983) Studies of the principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat: projections to the superior colliculus, inferior olive, and cerebellum. *J Comp Neurol* 220:147–167
- Íñiguez C, Gayoso MJ, Carreres J (1985) A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. *J Neurosci Methods* 13:77–86
- Ito T, Bishop DC, Oliver DL (2011) Expression of glutamate and inhibitory amino acid vesicular transporters in the rodent auditory brainstem. *J Comp Neurol* 519:316–340
- Kamishina H, Conte WL, Patel SS, Tai RJ, Corwin JV, Reep RL (2009) Cortical connections of the rat lateral posterior thalamic nucleus. *Brain Res* 1264:39–56
- Killackey HP, Erzurumlu RS (1981) Trigeminal projections to the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 201:221–242
- Kulesza RJ, Viñuela A, Saldaña E, Berrebi AS (2002) Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. *Hear Res* 168:12–24
- Lane RD, Bennett-Clarke CA, Allan DM, Mooney RD (1993) Immunochemical heterogeneity in the tecto-LP pathway of the rat. *J Comp Neurol* 333:210–222
- Lane RD, Allan DM, Bennett-Clarke CA, Howell DL, Rhoades RW (1997) Projection status of calbindin- and parvalbumin-immunoreactive neurons in the superficial layers of the rat's superior colliculus. *Vis Neurosci* 14:277–286
- López-Aranda MF, López-Téllez JF, Navarro-Lobato I, Masmudi Martín M, Gutiérrez A, Khan ZU (2009) Role of layer 6 of V2 visual cortex in object-recognition memory. *Science* 325:87–89
- Ma TP, Cheng HW, Czech JA, Rafols JA (1990) Intermediate and deep layers of the macaque superior colliculus: a Golgi study. *J Comp Neurol* 295:92–110
- Mantyh PW (1982) The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. *J Comp Neurol* 204:349–363
- Marshall AF, Pearson JM, Falk SE, Skaggs JD, Crocker WD, Saldaña E, Fitzpatrick DC (2008) Auditory response properties of neurons in the tectal longitudinal column of the rat. *Hear Res* 244:35–44
- Masterson SP, Li J, Bickford ME (2009) Synaptic organization of the tectorecipient zone of the rat lateral posterior nucleus. *J Comp Neurol* 515:647–663
- Matsuyama T, Kawamura S (1985) Cytoarchitectonic coincidence with the discontinuous connectional pattern in the deep layers of the superior colliculus in the rat. *Neurosci Res* 2:335–348
- May PJ (2006) The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res* 151:321–378
- Meredith MA, Miller LK, Ramoa AS, Clemo HR, Behan M (2001) Organization of the neurons of origin of the descending pathways from the ferret superior colliculus. *Neurosci Res* 40:301–313
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Matsutani S, Takatsuji K, Fukui H, Tohyama M (1989) Laminar and segregated distribution of immunoreactivities for some neuropeptides and adenosine deaminase in the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 280:410–423
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Takatsuji K, Tohyama M (1990) Substance P and enkephalins in the superficial layers of the rat superior colliculus: differential plastic effects of retinal deafferentation. *J Comp Neurol* 299:389–404
- Mizumori SJ, Miya DY, Ward KE (1994) Reversible inactivation of the lateral dorsal thalamus disrupts hippocampal place representation and impairs spatial learning. *Brain Res* 644:168–174
- Morest DK, Oliver DL (1984) The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J Comp Neurol* 222:209–236
- Mugnaini E, Oertel WH (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunocytochemistry. In: Björklund A, Hökfelt T (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol 4: GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I. Elsevier, Amsterdam, pp 436–608
- Olszewski J, Baxter D (1954) *Cytoarchitecture of the human brainstem*. Lippincott, Philadelphia
- Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 5th edn. Elsevier-Academic Press, San Diego
- Paxinos G, Kus L, Ashwell K, Watson C (1999) *Chemoarchitectonic atlas of the rat forebrain*. Elsevier-Academic Press, San Diego
- Redgrave P, Odekuunle A, Dean P (1986) Tectal cells of origin of predorsal bundle in rat: location and segregation from ipsilateral descending pathway. *Exp Brain Res* 63:279–293
- Redgrave P, Dean P, Westby GW (1990) Organization of the crossed tecto-reticulo-spinal projection in rat—I. Anatomical evidence for separate output channels to the periabducens area and caudal medulla. *Neuroscience* 37:571–584
- Rhoades RW, Mooney RD, Szczepanik AM, Klein BG (1986) Structural and functional characteristics of commissural neurons in the superior colliculus of the hamster. *J Comp Neurol* 253: 197–215
- Rieck RW, Huerta MF, Harting JK, Weber JT (1986) Hypothalamic and ventral thalamic projections to the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 243:249–265
- Saldaña E, Merchán MA (1992) Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 319:417–437
- Saldaña E, Merchán MA (2005) Intrinsic and commissural connections of the inferior colliculus. In: Winer JA, Schreiner CE (eds) *The inferior colliculus*. Springer, New York, pp 155–181
- Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E (1996) Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 371:15–40
- Saldaña E, Viñuela A, Marshall AF, Fitzpatrick DC, Aparicio MA (2007) The TLC: a novel auditory nucleus of the mammalian brain. *J Neurosci* 27:13108–13116
- Saldaña E, Aparicio MA, Fuentes-Santamaría V, Berrebi AS (2009) Connections of the superior paraolivary nucleus of the rat: projections to the inferior colliculus. *Neuroscience* 163:372–387
- Shibata H (2000) Organization of retrosplenial cortical projections to the laterodorsal thalamic nucleus in the rat. *Neurosci Res* 38: 303–311

- Sugita S, Otani K, Tokunaga A, Terasawa K (1983) Laminar origin of the tecto-thalamic projections in the albino rat. *Neurosci Lett* 43:143–147
- Sun B, Lv B, Dong Q, Wang S, Chai Z (2009) Watching moving images specifically promotes development of medial area of secondary visual cortex in rat. *Dev Neurobiol* 69:558–567
- Swanson LW (1999) Brain maps: structure of the rat brain, 2nd edn. Elsevier, New York
- Taube JS (2007) The head direction signal: origins and sensory-motor integration. *Annu Rev Neurosci* 30:181–207
- Thompson SM, Robertson RT (1987) Organization of subcortical pathways for sensory projections to the limbic cortex. II. Afferent projections to the thalamic lateral dorsal nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 265:189–202
- Tsumori T, Yokota S, Ono K, Yasui Y (2001) Organization of projections from the medial agranular cortex to the superior colliculus in the rat: a study using anterograde and retrograde tracing methods. *Brain Res* 903:168–176
- Van Groen T, Wyss JM (2003) Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J Comp Neurol* 463:249–263
- Van Groen T, Kadish I, Wyss JM (2002) The role of the laterodorsal nucleus of the thalamus in spatial learning and memory in the rat. *Behav Brain Res* 136:329–337
- Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA (2009) What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci* 10:792–802
- Viñuela A, Aparicio MA, Berrebi AS, Saldaña E (2011) Connections of the superior paraolivary nucleus of the Rat: II. Reciprocal connections with the tectal longitudinal column. *Front Neuroanat* 5:1. doi:[10.3389/fnana.2011.00001](https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00001)
- Wanaverbecq N, Bodor AL, Bokor H, Slézia A, Lüthi A, Acsády L (2008) Contrasting the functional properties of GABAergic axon terminals with single and multiple synapses in the thalamus. *J Neurosci* 28:11848–11861
- Wang S, Bickford ME, Van Horn SC, Erisir A, Godwin DW, Sherman SM (2001) Synaptic targets of thalamic reticular nucleus terminals in the visual thalamus of the cat. *J Comp Neurol* 440:321–341
- Wang Y, Kakizaki T, Sakagami H, Saito K, Ebihara S, Kato M, Hirabayashi M, Saito Y, Furuya N, Yanagawa Y (2009) Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus transgenic mouse. *Neuroscience* 164:1031–1043
- Wiener SI (1986) Laminar distribution and patchiness of cytochrome oxidase in mouse superior colliculus. *J Comp Neurol* 244:137–148
- Yoder RM, Clark BJ, Taube JS (2011) Origins of landmark encoding in the brain. *Trends Neurosci* 34:561–571

