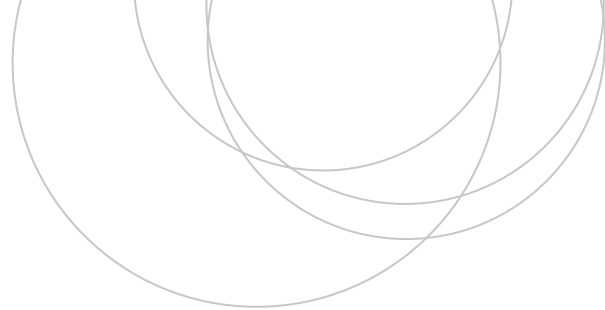




Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Biotecnología

# Evolución del mesencéfalo visual en vertebrados

Egilea/Autor:

Aitor Ordeñana Manso

Zuzendaria/Director:

Fernando García – Moreno

Kozuzendaria/Codirector:

Gorka Elordi Foruria

© 2023, Aitor Ordeñana Manso

Leioa, 2023ko uztailaren 21 a /Leioa, 21 de julio de 2023

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	3
4.2. DATACIÓN CELULAR DE <i>Gallus gallus</i> .....	4
4.3. TRATAMIENTO DE TEJIDO.....	4
4.4. INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA .....	5
4.6. IMAGEN DE FLUORESCENCIA.....	7
4.7. ANÁLISIS DE DATOS DE <i>single sell RNA sequencing</i> (scRNAseq).....	7
4.8. MUESTRAS DE GECKO <i>Paroedura picta</i> .....	8
5. RESULTADOS.....	9
5.1. ESTRATIFICACIÓN Y NEUROGÉNESIS DEL OT EN SAURÓPSIDOS .....	9
6. DISCUSIÓN .....	17
7. CONCLUSIONES.....	18
8. AGRADECIMIENTOS .....	19
9. BIBLIOGRAFÍA.....	19
9.1. ARTÍCULOS .....	19
9.2. PÁGINAS WEB .....	20
10. ANEXO.....	21
10.1. FIGURAS ADICIONALES.....	21
10.2. CÓDIGOS DEL REANÁLISIS DE scRNAseq .....	28

## 1. RESUMEN

El desarrollo del cerebro de los vertebrados empieza en un cerebro muy conservado, similar en todas las especies, y a medida que avanza el desarrollo embrionario, este *precerebro* se diferencia para adaptarse a las necesidades de cada especie. En este proyecto se escogió el techo óptico, también conocido como colículo superior en los mamíferos, para analizar cómo se originan esas diferencias. El techo óptico es una estructura mesencefálica relacionada mayoritariamente con la vía visual, que presenta similitudes entre los saurópsidos, y grandes diferencias con los mamíferos. Se buscaron similitudes y diferencias del desarrollo del techo óptico mediante técnicas de trazado de neurogénesis usando 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) y técnicas inmunohistoquímicas en las especies *Gallus gallus* y *Paroedura picta*. Además, se analizaron datos de scRNAseq en las especies *Pogona vitticeps* y *Mus musculus* para comparar las células del techo óptico a nivel transcriptómico. Los resultados obtenidos muestran signos de similitud entre los techos ópticos de los saurópsidos, y una notable diferencia al compararlos con su región homóloga en los mamíferos.

## 2. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso es el responsable de la mayoría de los comportamientos animales. Es por ello que la comprensión de la evolución y sofisticación de este sistema es una de las mayores preguntas de la biología (Martín-Duran y Hejnl, 2021). La evolución del sistema nervioso ha dado lugar a una alta diversidad entre los sistemas de las especies animales (Martín-Duran y Hejnl, 2021 & Cuaderno de Cultura Científica), dando lugar a lo que hoy en día comprendemos como cerebros.

Se cree que el origen de esa diversidad cerebral en vertebrados comienza en etapas embrionarias tempranas de la neurogénesis, así pues, las especies compartirían una estructura cerebral inicial en el desarrollo de la que más tarde derivaría el cerebro de cada una de ellas. La diversidad, comienza con diferencias en las secreciones de moléculas morfogenéticas que causan divergencias en los patrones de cerebro; aumentando la velocidad mitótica en las diferentes áreas del cerebro, que a su vez impulsa un aumento de diversidad de células progenitoras y la compartimentalización (García-Moreno y Molnár, 2020).

Para analizar estas diferencias en la neurogénesis, y comprender la evolución y diversidad cerebral, la mejor opción es demostrar el destino de las células mediante técnicas de seguimiento (Martín-Durán y Hejnl, 2021) y compararlo entre especies. De esa manera, se describe el desarrollo de cada región cerebral concreta, se encuentran las áreas homólogas y por

tanto comparables, y así se encuentran las diferencias que producen divergencias estructurales y funcionales.

A fin de estudiar y comparar estos caminos de desarrollo, en este proyecto se ha elegido una estructura cerebral concreta llamada techo óptico (OT) o colículo superior (SC), en el caso de los saurópsidos y los mamíferos, respectivamente. El OT o SC es una estructura sensorial mesencefálica bilateral, altamente laminada que recibe información de las células retinales ganglionares contralaterales (Lever, et al., 2014 & Báez, et al., 2003). La función principal del OT/SC es registrar los cambios que suceden en los alrededores del individuo mediante información visual y auditiva mayoritariamente (Isa, et al., 2021). El OT presenta una laminación similar entre los saurópsidos, pero divergente en el caso de los mamíferos, lo que sugiere de la existencia de caminos del desarrollo divergentes (Altman y Bayer, 1981 & Báez, et al., 2003 & LaVail y Cowan, 1971). Además, existe un grupo de marcadores (MEIS2, LHX5 y PROX1 por ejemplo) que podría ser común entre los OT/SC de las especies. Todo ello coloca al OT/SC en un punto intermedio muy interesante para el estudio comparativo: conservado y común en la vía visual de las especies, y divergente en términos de laminación y quizá tipos celulares.

El OT ya ha sido investigado con anterioridad en el pollo (*Gallus gallus*) y la rata (*Rattus norvegicus*). En el pollo, la neurogénesis se puede dividir en 5 pasos (Mey y Thanos, 2000): proliferación de células madre en el neuroepitelio, diferenciación de precursores neuronales intermedios (INP) en neuronas inmaduras, migración radial de las células hijas de las INP a la superficie pial para la formación de axones y dendritas, sinaptogénesis y cambios reversivos incluyendo la muerte celular y la poda de neuritas (Mey y Thanos, 2000). La mitosis celular se da en la zona ventricular (Lever, et al., 2014) durante las edades embrionarias (E) E3 y E6 mayoritariamente, aunque se extiende hasta la edad E12 a un menor nivel (Mey y Thanos, 2000). A la edad E12, todas las capas del OT ya han sido conformadas (Lever, et al., 2014). LaVail y Cowan (1971) establecieron que el OT del pollo se conforma en 3 oleadas de migración celular, la primera entre las edades E3 y E5, conformando las capas interiores del OT, la segunda entre las edades E4 y E7, conformando las capas exteriores del OT, y la tercera, aunque solapada con la segunda, entre las edades E6 y E8, conformando las capas medias del OT. Además, el OT está compuesto por 15 estratos (Lever, et al., 2014) y es una estructura bilateral, ya que el OT se posiciona en ambos laterales del cerebro conteniendo un ventrículo para cada estructura. Ver **Figura adicional 1**.

En el caso de la rata, el SC está compuesto por 7 capas. La producción de neuronas en la capa VII llega a su pico en el día E15, la producción en la capa VI entre los días E15 y E16, mientras que la capa V en el día E16 (Altman y Bayer, 1981). En cambio, la capa III muestra su pico en el día E15, la capa IV en el día E16 y las capas I y II en el día E16, en el caso de la capa II la producción se prolonga hasta el día E18 (Altman y Bayer, 1981). Estas fechas muestran 3 zonas citogenéticas, teniendo la primera de ellas un patrón de neurogénesis de dentro a fuera para las capas V, VI y VII, y las otras dos zonas teniendo patrones de fuera a dentro para las capas III y IV, y las capas I y II (Altman y Bayer, 1981). Además, el SC de rata no es una estructura bilateral, ya que se encuentra en la parte dorsal del mesencéfalo y contiene un único ventrículo.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El desarrollo del cerebro entre diferentes especies de vertebrados comienza en una base única no diferenciada compartida por todas las especies. A medida que el feto del animal se desarrolla, este *precerebro* se diferencia para ajustarse a las singularidades de la especie, manteniendo estructuras conservadas y produciendo otras divergentes entre las especies.

Siguiendo con esta hipótesis del desarrollo y evolución del cerebro embrionario, se cree que el OT es una estructura bastante conservada entre las especies vertebradas, pero que podría albergar diferentes tipos neuronales y circuitos internos. Estas diferencias han de verse reflejadas en caminos del desarrollo diferentes en cada grupo de vertebrados.

Para probar esta hipótesis, en este proyecto se definieron dos objetivos a fin de arrojar algo de luz en la conservación del OT entre los vertebrados: definir y buscar las similitudes y diferencias en el desarrollo neurogénico del OT mediante trazado de datación neuronal y tinciones histológicas; y comparar a nivel celular y transcriptómico muestras de OT en diferentes especies mediante análisis de datos scRNAseq. Se identificarán las similitudes y diferencias de las neuronas del OT respecto a su firma molecular transcriptómica.

### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. ANIMALES**

Todos los experimentos animales fueron aprobados por un comité local de revisión ética, y llevados a cabo bajo las licencias del proyecto cumpliendo con los estándares de la normativa actual de la Unión Europea (Directiva 2010/63/EU) y el Gobierno de España (Decretos Reales 1201/2005 y 53/2013, Ley 32/107). Los huevos de pollo (*Gallus gallus*) fecundados fueron

incubados a 37 °C y 44% de humedad siguiendo el protocolo usado con anterioridad en el laboratorio (Rueda-Alaña y García-Moreno, 2022), momento en que comienza la gestación y considerado día embrionario (E)0.

#### **4.2. DATACIÓN CELULAR DE *Gallus gallus***

En momentos concretos del desarrollo de los pollos, 5-etinil-2'-desoxiuridina o EdU (ThermoFisher Scientific), un reactivo que sirve para marcar la síntesis del DNA *de novo* mediante química de *Click* (ThermoFisher Scientific), fue administrado a los embriones para marcar el nacimiento de las neuronas en el momento de la inyección. Durante el tiempo en que el EdU está disponible para el embrión, los progenitores neurales lo captan durante la fase S de su ciclo celular. Según se dividen los progenitores, van perdiendo su marca de EdU, pues la diluyen entre sus células hijas. Sin embargo, las primeras neuronas generadas tras la inyección heredarán una cantidad inmutable de EdU en sus genomas, ya que al salir de ciclo la neurona, postmitótica, siempre acarreará en su genoma la marca de EdU de su momento de generación.

La administración de EdU fue realizada mediante inyecciones de manera intracardiaca o intraventricular en el mesencéfalo, en el caso de los embriones de 3 a 5 días de incubación, e inyecciones intravenosas en el caso de los embriones de entre 6 y 8 días de incubación. La dosis de EdU administrada, 0.5 µL aproximadamente, fue incrementada en su concentración dependiendo de la edad del embrión: 1 mg/mL para E3; 2.5 mg/mL para E4; 3.125 mg/mL para E5; 3.75 mg/mL para E6; 4.375 mg/mL para E7; y 5 mg/mL para E8. Solo se inyectó cada embrión una vez, dependiendo de la edad embrionaria deseada. Ver **Figura adicional 2**.

A su vez, también se estudió tejido de gecko embrionario (*Paroedura picta*), previamente inyectado de modo equivalente y empleado en el laboratorio para otros proyectos (detalles en Rueda-Alaña y García-Moreno, 2022).

#### **4.3. TRATAMIENTO DE TEJIDO**

Después de 15 días de incubación, tras haber sido anestesiados completamente por hipotermia, los embriones supervivientes fueron perfundidos mediante una solución compuesta de paraformaldehído (PFA) (4%) y buffer de fosfato salino (PBS) (0.1M) pH 7.3 para la fijación de los tejidos. Los cerebros fueron extirpados para incubarlos en la misma solución de fijación durante 4 horas y transferirlos a PBS 1x; después, se seccionaron en dos hemisferios, intentando maximizar la información a obtener de cada embrión exitosamente inyectado y superviviente. Así, se obtuvieron dos hemicerebros para su corte tanto en criostato (Leica CM1950 Cryostat)

como en vibratomo (Leica VT1000S), y se criopreservaron en sus correspondientes soluciones explicadas más adelante. El vibratomo permite realizar los cortes del cerebro más rápido a cambio de un mayor grosor de corte, 60  $\mu\text{m}$ , y permite realizar inmunohistoquímica en flotación, que suele dar buenos resultados. Sin embargo, este grosor de corte conlleva una mayor cantidad de células en diferentes profundidades de la sección lumínica, dificultando la obtención de la fotografía de multifuorescencia, y la inmunohistoquímica en flotación hace que las secciones de tejido sean más quebradizas e incompletas cuando se montan sobre las portas. El criostato permite realizar cortes del tejido más finos, 20  $\mu\text{m}$ , lo cual facilita el enfoque de las futuras imágenes, ya que hay una menor cantidad de células colocadas en diferentes profundidades, pero requiere mucho más tiempo para el corte, dificulta notoriamente el manipulado de las muestras a la hora de colocarlas en la porta, y por norma general no produce inmunohistoquímicas de tan alta calidad.

En el caso de realizar los cortes mediante vibratomo (60  $\mu\text{m}$ ), después de la incubación previa de PFA, los hemisferios se mantuvieron en PBS 1x hasta encapsularlos en un bloque de agar para realizar su corte. En el caso de realizar los cortes mediante criostato (25  $\mu\text{m}$ ), después de la incubación de PFA los hemisferios fueron crioprotegidos para evitar la degradación tisular asociada a la congelación del cerebro. Para ello, se sumergieron los hemisferios en una solución de sucrosa - PBS (15%) hasta perder la flotabilidad, después, se cambió la solución por una de mayor concentración (30%) hasta encapsularlos en un bloque de componente O.C.T.<sup>TM</sup> (Tissue-Tek) a -20 °C para realizar su corte.

#### **4.4. INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA**

El protocolo a seguir fue el estándar que se emplea en el laboratorio para muestras de estas especies (Rueda-Alaña y Garcia-Moreno, 2022). En el caso de las muestras obtenidas mediante criostato, se realizaron los siguientes pasos previos a la tinción.

Las muestras se lavaron durante 5-10 minutos mediante PBS para eliminar restos del medio de inmersión para la congelación (O.C.T.<sup>TM</sup>), después se incubaron durante 30 minutos a 95 °C en citrato de sodio (10 mM, pH 6.0) para desenmascarar los antígenos y se dejaron atemperar durante 10 minutos. A continuación, las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución de tetraborato sódico (100 mM, pH 10) para equilibrar el pH.

Respecto a la tinción, las muestras se lavaron con PBS-Tritón 0.5% (PBS-T 0.5%) durante una hora. Tras los lavados, las muestras fueron preincubadas con una solución bloqueante de suero

normal de cabra (NGS) 5% y albumina de suero bovino (BSA) 3% en PBS-T 0.5% durante 2 horas, para inhibir las uniones inespecíficas de los anticuerpos en el tejido, reduciendo así la señal de ruido de fondo del tejido y los marcajes inespecíficos. Después, se aplicaron los anticuerpos (Ab) primarios por parejas, buscando marcar tipos neuronales concretos del OT: Ab de ratón para MEIS2 (DSHB, PCRP-MEIS2-1A11-s; 1:40), Ab de conejo para PAX6 (GeneTex, GTX113241; 1:500), Ab de ratón para SATB1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-376096, 1:500), Ab de conejo para GABA (GeneTex, GTX125988; 1:500), Ab de conejo para calbindina (CB; Swant, CB D-28k; 1:500), Ab de ratón para LIM/homeobox protein LHX5 (DSHB, PCRP-LHX5-1B7; 1:40), Ab de conejo para PROX1 (DSHB, PCRP-PROX1-1A6-s; 1:500), Ab de conejo para TCF4/TCF7L2 (Cell Signaling Technology, C48H11; 1:500), y Ab de ratón para parvalbumina (PV; Sigma, P3088- .2ml; 1:500). Todos ellos se utilizaron en solución bloqueante, y se incubaron con las secciones a 4 °C durante una noche. Tras la incubación con Ab primarios, se llevaron a cabo limpiezas con PBS-T 0.5% durante una hora. Tras las limpiezas, las muestras se incubaron con las siguientes parejas de Ab secundarios; Alexa 488 Donkey Anti-Rabbit (Invitrogen, 1:500) y Alexa 647 Donkey Anti-Mouse (Invitrogen, 1:500); Alexa 488 Goat Anti-Mouse (Invitrogen, A1101; 1:500) y Alexa 568 Goat Anti-Rabbit (Invitrogen, A11036; 1:500); en solución bloqueante y junto a 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:2000) a temperatura ambiente y por un tiempo de dos horas y cuarto.

#### **4.5. REVELADO DE EdU**

Al finalizar la incubación con Ab secundarios, se revela el EdU en el tejido a fin de encontrar qué células mantienen la marca de EdU. Las muestras se limpiaron con PBS-T 0.5% durante 45 minutos, y se procedió al revelado del EdU mediante la reacción *Click*, que se realiza mediante la incubación de las muestras con una solución compuesta por (para 1ml de reacción): PBS-T 0.5% (888 µL/mL), CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (200 mM) (10 µL/mL), Sulfo-Cy5 (2 µL/mL; Lumiprobe) o Sulfo-Cy3 (2 µL/mL, Lumiprobe) y ácido L-ascórbico 200 mg/mL (100 µL/mL). Tras el revelado, las muestras se volvieron a lavar con PBS-T 0.5% hasta que perdieron el color de fondo que queda impregnado con el revelado.

Al finalizar las tinciones y el revelado de EdU de las muestras, se cubrieron las portas necesarias para la visualización de las mismas. Para ello, las secciones se cubrieron con Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (F4680-25ML, Sigma-Aldrich) antes de cubrirlas con un cubreobjetos. En el caso de las muestras adquiridas mediante cortes de vibratomo, se utilizó un baño de PBS para montar las secciones en flotación sobre las portas.



#### 4.6. IMAGEN DE FLUORESCENCIA

Las muestras de OT fueron visualizadas y fotografiadas mediante el microscopio de epifluorescencia ZEISS Apotome2 (software ZEISS ZEN 3.7), para fotos generales de los OT, y el microscopio de escaneo virtual Panoramic Scanner 2.0.5-MIDI (CaseViewer), para fotos panorámicas de grandes porciones de tejido. Además, las fotos fueron editadas y analizadas mediante los softwares CaseViewer, ZEN Pro, y FiJi (ImageJ). Las fotos fueron ajustadas en brillo y contraste, se solaparon diferentes canales de fluorescencia y se eliminaron los irrelevantes. Siempre se ajustó la imagen por completa y por igual en toda la imagen.

#### 4.7. ANÁLISIS DE DATOS DE *single cell RNA sequencing* (scRNAseq)

La secuenciación de célula única o “*single cell RNA sequencing*”, scRNAseq, es el análisis de la expresión génica de las células individuales. Esta técnica, al realizarla en diferentes especies y edades, permite conocer los tipos celulares del OT/SC y su perfil transcriptómico.

En este proyecto no se ha realizado ningún scRNAseq, pero se han reanalizado datos obtenidos por otros equipos mediante el software R 4.2.2, con la interfaz RStudio, y códigos de Seurat *toolkit* V3, para la comparación de los perfiles transcriptómicos de neuronas del ratón (*Mus musculus*), y del dragón barbudo de Australia (*Pogona vitticeps*), con la intención de examinar la variabilidad debida al tipo celular. Los datos utilizados para el reanálisis de *Pogona* fueron extraídos del artículo “*Molecular diversity and evolution of neuron types in the amniote brain*” de Hain, et al. (2022), datos descargados de NCBI *Sequence Read Archive*, PRJNA812380; y los datos de *Mus musculus* del artículo “*Transcriptomic encoding of sensorimotor transformation in the midbrain*” de Xie, et al. (2021), los datos se descargaron de GEO (*Gene Expression Omnibus*), GSE162404. Los datos de lagarto pertenecen a la *Pogona vitticeps* ya que no existen datos disponibles sobre *Paroedura picta* y la realización de un scRNAseq del OT del gecko estaba por encima de los objetivos del proyecto.

Al analizar los datos de scRNA se siguió el mismo proceso en ambas especies. Primero, se escalaron los genes pertenecientes al ciclo celular, para centrar el análisis en las diferencias transcriptómicas debido a los tipos celulares, y no en base a su ciclo. Después, se empleó el comando *SCTransform()* para realizar la normalización (asignar a los datos el mismo valor biológico), búsqueda de variables distintivas (definir genes importantes para distinguir tipos celulares) y escalado (reducir la confusión causada por los niveles de expresión de los genes, evitando que los valores altos dominen completamente al resto, y corregir el porcentaje de genes mitocondriales y ciclo celular) en un solo comando único.

Tras utilizar *SCTransform()*, se llevó a cabo la reducción de dimensiones lineal mediante el *PCA* (*Principal Component Analysis*); y se identificaron los *cluster* mediante los comandos *FindNeighbors()*, que utiliza las distancias definidas en el *PCA* usando las dimensiones establecidas para identificar las apariencias entre las células, y *FindClusters()*, comando con el que variando la resolución se puede modificar la cantidad de poblaciones identificadas. Después, se realizó un *UMAP* para visualizar los *cluster* y mediante los comandos *FeaturePlot()* se visualizó qué *clusters* pertenecían a los genes empleados por los propios artículos originales de donde se obtuvieron los datos, tanto los genes del artículo de la especie contraria y los genes pertenecientes a los marcadores empleados en el laboratorio. Una vez identificados los *clusters* con sus respectivos genes, se les asignó un tipo celular o una capa del SC, en el caso de *Pogons vitticeps* y *Mus musculus* respectivamente. Al final de cada análisis se guardó el progreso realizado con el comando *saveRDS*.

El análisis de cada especie contiene algunas variaciones. En la *Pogona*, el análisis se comenzó desde un *subset* de neuronas pertenecientes al cerebro medio realizado por el equipo del artículo original. Además, en este caso se realizó una integración en base a la química utilizada en la secuenciación del scRNA junto al *SCTransform*, para unir los *dataset* de las células únicas evitando el *batch effect* causado a la hora de realizar el scRNAseq. Dicho paso se llevó a cabo utilizando los comandos *SplitObject()*, *lapply()*, *SelectIntegrationFeatures()*, *PrepSCTIntegration()*, *lapply()*, *FindIntegrationAnchors()* y *IntegrateData()*. Las dimensiones utilizadas en el PCA fueron 50 y la resolución de la clusterización fue 1.

En el caso del ratón, primero se identificaron los tipos celulares que componen el SC (*ot\_mm\_1*), y después se analizaron las neuronas inhibitoras y activadoras del SC (*ot\_mm\_2*). En el *dataset* *ot\_mm\_1* se llevó a cabo el proceso previamente explicado, con 50 dimensiones en el PCA y una resolución de 0.1 en la clusterización; además, en este *dataset* solamente se usaron los genes descritos por el artículo, y el gen *Spag16* encontrado entre los mejores 25 genes para definir los *clusters*, para identificar las poblaciones descritas por el artículo original. En el *dataset* *ot\_mm\_2* se repitió otra vez el mismo proceso, pero con 50 dimensiones en el PCA y una resolución de 0.5 en la clusterización.

#### **4.8. MUESTRAS DE GECKO *Paroedura picta***

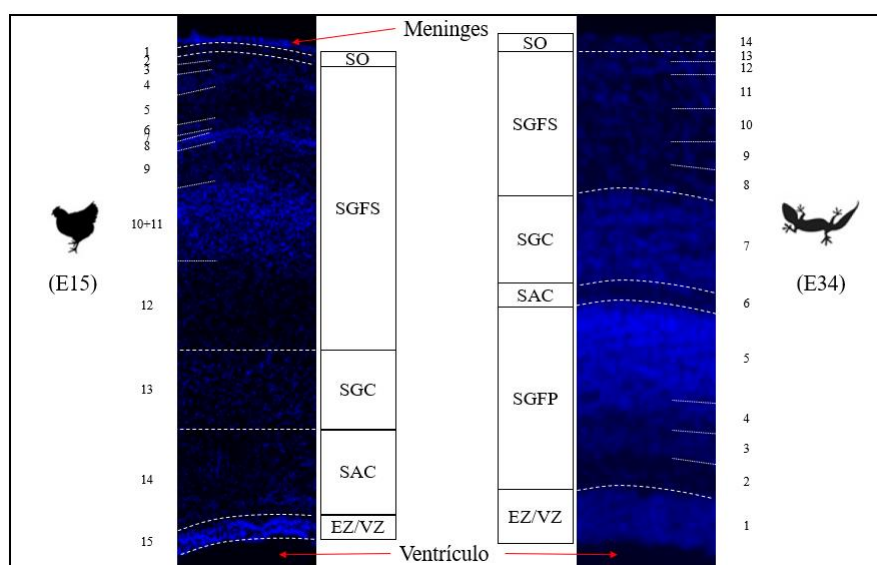
Las muestras de gecko fueron cedidas por el laboratorio de Fernando García-Moreno (García-Moreno y Molnar, 2020 & Rueda-Alaña y García-Moreno, 2022). Los Ab utilizados en esas muestras son los siguientes: Ab de conejo para calbindina (CB; Swant, CB D-28k), Ab de ratón

para SATB2 (abcam, ab51502), Ab de conejo para PAX6 (DSHB, Pax6-s), Ab de ratón para SST (Immunostar, 20067), Ab de conejo para TBR1 (cedido por el Prof. Robert Hevner, UCSD, Estados Unidos), Ab de ratón para parvalbumina (PV; Sigma, P3088- .2ml), Ab de ratón para MEIS2 (DSHB, PCRP-MEIS2-1A11-s), Ab de ratón para LHX5 (DSHB, PCRP-LHX5-1B7), Ab de conejo para GABA (GeneTex, GTX125988), Ab de conejo para PROX1 (DSHB, PCRP-PROX1-1A6-s) y Ab de conejo para TCF4/TCF7L2 (Cell Signaling Technology, C48H11).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ESTRATIFICACIÓN Y NEUROGÉNESIS DEL OT EN SAURÓPSIDOS

En este proyecto se usó una amplia gama de Ab primarios a fin de encontrar los marcadores necesarios para detectar las capas de los OT de diferentes especies. Además, se usaron las anotaciones anatómicas empleadas por LaVail y Cowan (1971) para el caso de *Gallus gallus*, y por Hain, et al. (2022) para el caso de *Paroedura picta*, para la descripción de la estratificación del OT en saurópsidos (**Figura 1** y **Figura 2**). Ha de tenerse en cuenta que la nomenclatura de los estratos empleada para las muestras de *Paroedura picta* estaba inicialmente diseñada para *Pogona vitticeps*, por lo que se usaron las imágenes de Báez, et al. (2003) a modo de referencia para la anotación de las capas del OT. Las imágenes de Báez, et al. (2003) son de *Gallotia galloti*, pero se dieron por válidas ya que las muestras de *Pogona vitticeps* se sitúan entre la imagen 1C y 1D de dicho artículo, y por la similitud entre ambas especies al ser reptiles. Aun así, se podría detectar alguna alteración en los límites de las capas del OT.



**Figura 1: estratificación del OT en saurópsidos con tinción DAPI.** OT de *Gallus gallus* sacrificado a E15 y OT de *Paroedura picta* sacrificado a E34, teñidos con el marcador de contratinción DAPI, que tiñe DNA de modo

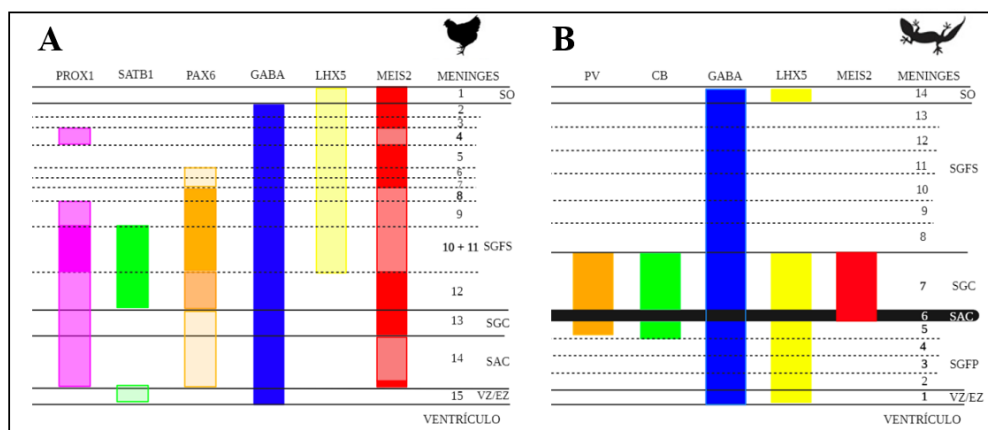
inespecífico y por ello muestra tinción en todos los núcleos. Arriba estaría la parte exterior del techo óptico, representado por “Meninges”, y abajo estaría la parte interior del techo óptico, representado por “Ventrículo”. En las imágenes se delimitan las capas de los OT mediante las abreviaturas SO, SGFS, SGC, *Stratum Album Centrale* (SAC), *Stratum Griseum et Fibrosum Periventriculare* (SGFP) y zona endimial (EZ) o zona ventricular (VZ).

El patrón de las bandas mostradas en tinción DAPI muestra una composición de bandas similar en ambos OT de pollo y gecko (**Figura 1**). Esta composición es difícil de ver claramente, ya que la densidad celular de las bandas y la anchura varía entre las especies, pero, empezando por la capa *Stratum opticum* (SO), en ambas especies podemos observar diferentes estratos de células, con diferentes densidades celulares, hasta llegar a una banda de mayor densidad celular (en la mitad del *Stratum Griseum et Fibrosum Superficiale* (SGFS) del pollo, y la *Stratum Griseum Centrale* (SGC) de gecko). Tras esa ancha banda, se encuentra otra mucho más oscura (lo que implica una menor tinción de núcleos, es decir, una capa fibrosa y compuesta mayoritariamente por axones), otra capa de alta densidad celular, y los últimos estratos de diferentes densidades celulares hasta llegar al ventrículo en ambas especies.

Respecto al pollo, se detectó un marcaje diferencial en base a todos los marcadores testados. Se observó marcaje de PROX1 en los estratos 4, y del 9 al 12 del SGFS, en el estrato 13 del SGC y en el estrato 14 del *Stratum Album Centrale* (SAC); SATB1 en los estratos 10, 11 y 12 del SGFS y en la zona ventricular (VZ) o zona endimial (EZ); PAX6 en los estratos 6 – 12 del SGFS, estrato 13 del SGC y en el estrato 14 del SAC; GABA por todo el OT excepto en la SO; LHX5 en el estrato 1 del SO y en los estratos 2 - 11 del SGFS; y MEIS2 en todos los estratos de todas las capas a excepción de la VZ (**Figura 2A**). Además, los Ab PV, CB y TCF4 no mostraron ningún tipo de marcaje en las muestras. El marcaje de cada marcador no es completamente homogéneo en todas las capas; como se puede ver en la **Figura 2A**, SATB1, PAX6, PROX1 y MEIS2 presentan un gradiente de densidad del marcaje (cantidad de células marcadas en el estrato) desde el color más intenso, mayor densidad, al color más claro, menor densidad.

Respecto al gecko, se detectó marcaje de PV en la SGC y en el estrato 5 de *Stratum Griseum et Fibrosum Periventriculare* (SGFP); CB en la SGC y en el estrato 5 de SGFP; GABA por todos los estratos que conforman el OT, LHX5 en las capas SO, SGC y SGFP; y MEIS2 en las capas SGC y SAC (**Figura 2B**). Además, los Ab SATB2, PAX6, SST, TBR1, TCF4 y PROX1 no mostraron ningún tipo de marcaje en las muestras. Los casos de PROX1, TCF4 y PAX6 son sospechosos, ya que se sabe de su marcaje en el OT de *Paroedura picta*, pero en este proyecto

no se observó marcaje alguno, probablemente porque las muestras cedidas fueron reveladas hace tiempo con Ab que no funcionaron correctamente. Además, en este proyecto solo se ha encontrado marcaje de MEIS2 en dos capas, pero se sabe que el Ab para MEIS2 debería marcar a lo largo del OT. En este caso, el marcaje de los Ab ha sido homogéneo a lo largo de las capas resaltadas.



**Figura 2: marcaje de la estratificación del OT mediante Ab primarios.** (A) Marcaje de PROX1, SATB1, PAX6, GABA, LHX5 y MEIS2 en las capas del OT de pollo, con un gradiente de color que representa una estimación cualitativa de la densidad de células marcadas por dichos marcadores en cada estrato, y en negrita las capas de mayor densidad celular. (B) Marcaje de PV, CB, GABA, LHX5 y MEIS2 en las capas del OT de gecko, y en negrita las capas de mayor densidad celular. Imágenes creadas con BioRender.com. Ver **Figura adicional 3**.

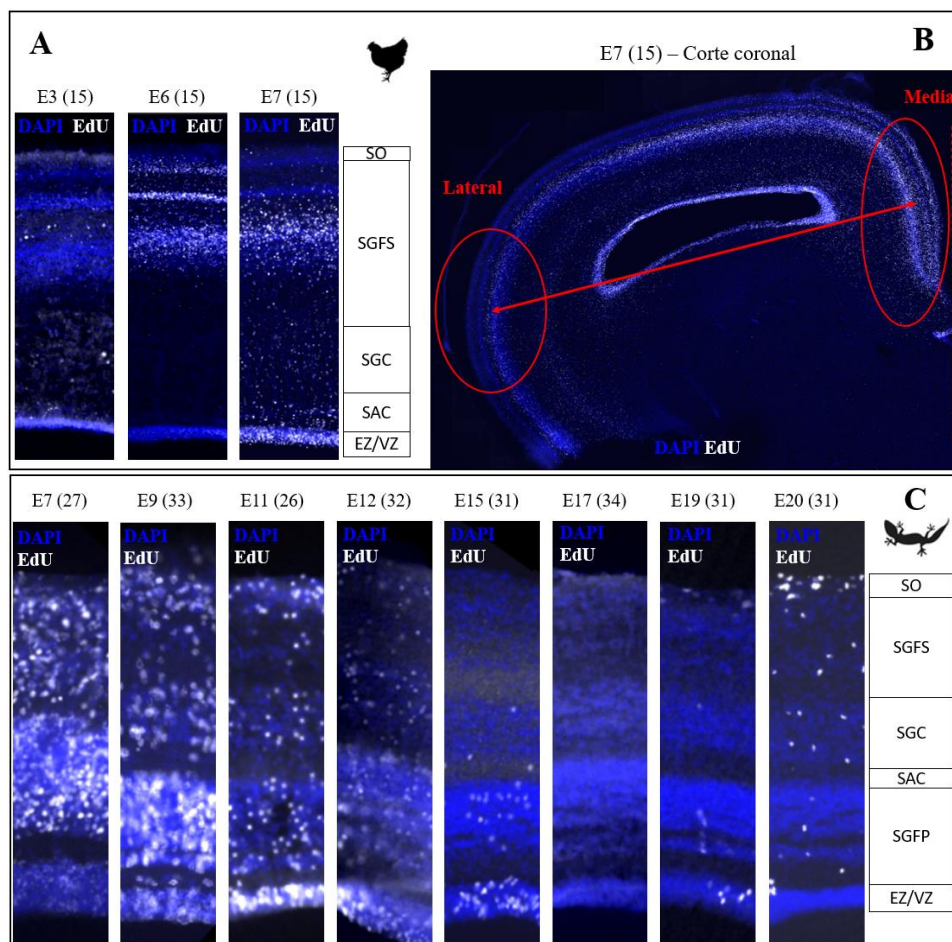
Comparando el pollo y el gecko, es notorio que ambas especies tienen un OT altamente laminado, por las capas mostradas con DAPI y los marcajes de Ab a diferentes alturas (**Figura 1** y **Figura 2**). Ambos OT fueron marcados por LHX5, MEIS2 y GABA, y ninguno mostró marcaje de TCF4 (**Figura 2**). El marcaje de GABA se da por todo el OT en ambas especies, demostrando que las neuronas gabaérgicas no se concentran en una región en específico en el OT. Además, la **Figura 2** indica que las capas de los OT no están compuestas por neuronas únicas en cada capa, ya que el marcaje no es específico a ningún estrato.

Al mismo tiempo que ambos OT muestran indicios de conservación, podemos observar muchos indicios de divergencia. El marcador SATB1 utilizado en pollo no mostró ningún tipo de marcaje en las muestras de gecko, y el marcador CB no mostró ningún tipo de marcaje en las muestras de pollo. Además, el Ab para LHX5 marca distintos estratos en ambas especies (**Figura 2**). Los Ab para PROX1, MEIS2 y PAX6 se han dejado fuera de esta comparación dado que la falta de marcaje en gecko es causada por fallos en la tinción, y no por falta de presencia real en la muestra.

En la **Figura 3** se puede ver cómo las neuronas que conforman los estratos del OT de los saurópsidos se generan según avanza la incubación. En el caso del pollo, a E3 la neurogénesis apenas ha comenzado, ya que el marcaje de EdU es muy escaso (el pixelado blanco de la EZ/VZ y SAC es ruido en la imagen que no se ha podido limpiar sin comprometer los resultados), y las neuronas creadas en esa fecha no conforman ningún estrato, ya que su migración final no destaca en ninguna altura del OT (**Figura 3A**). En cambio, las neuronas creadas a E6 migrarán hasta su posición final en las capas altas, ya que el marcaje de EdU se concentra entre los estratos 4 y 11 (**Figura 3A**). La muestra de E7 es importante ya que la falta de EdU en los estratos más altos del OT indica que las neuronas que conforman esa zona nacieron antes de dicho día de inyección. Además, como el pollo recibió más EdU de lo esperado, se puede apreciar la actividad de síntesis de DNA en la EZ/VZ, demostrando que a E7 aún hay génesis de células nuevas que participarán en la conformación de los estratos bajos del SGFS, y las capas SGC y SAC (**Figura 3A**). Cabe destacar que en E7 también hay un claro gradiente de neurogénesis diferencial medio-lateral en el OT (**Figura 3B**). Empezando por el extremo medial del OT, donde todos los estratos superiores están marcados por EdU, hasta llegar al extremo lateral, donde el marcaje por EdU en los estratos 1-8 es prácticamente inexistente. Esto es un indicativo de que el desarrollo del OT no es homogéneo en el eje anatómico medio-lateral; pero para la simplificación del proyecto, se asumió como tal.

Las edades E4, E5 y E8 darían información, probablemente, acerca de la neurogénesis en las capas profundas. Aun habiéndose inyectado multitud de embriones de dichas edades embrionarias, no se consiguieron muestras por falta de tiempo y por una elevada muerte embrionaria post-inyección.

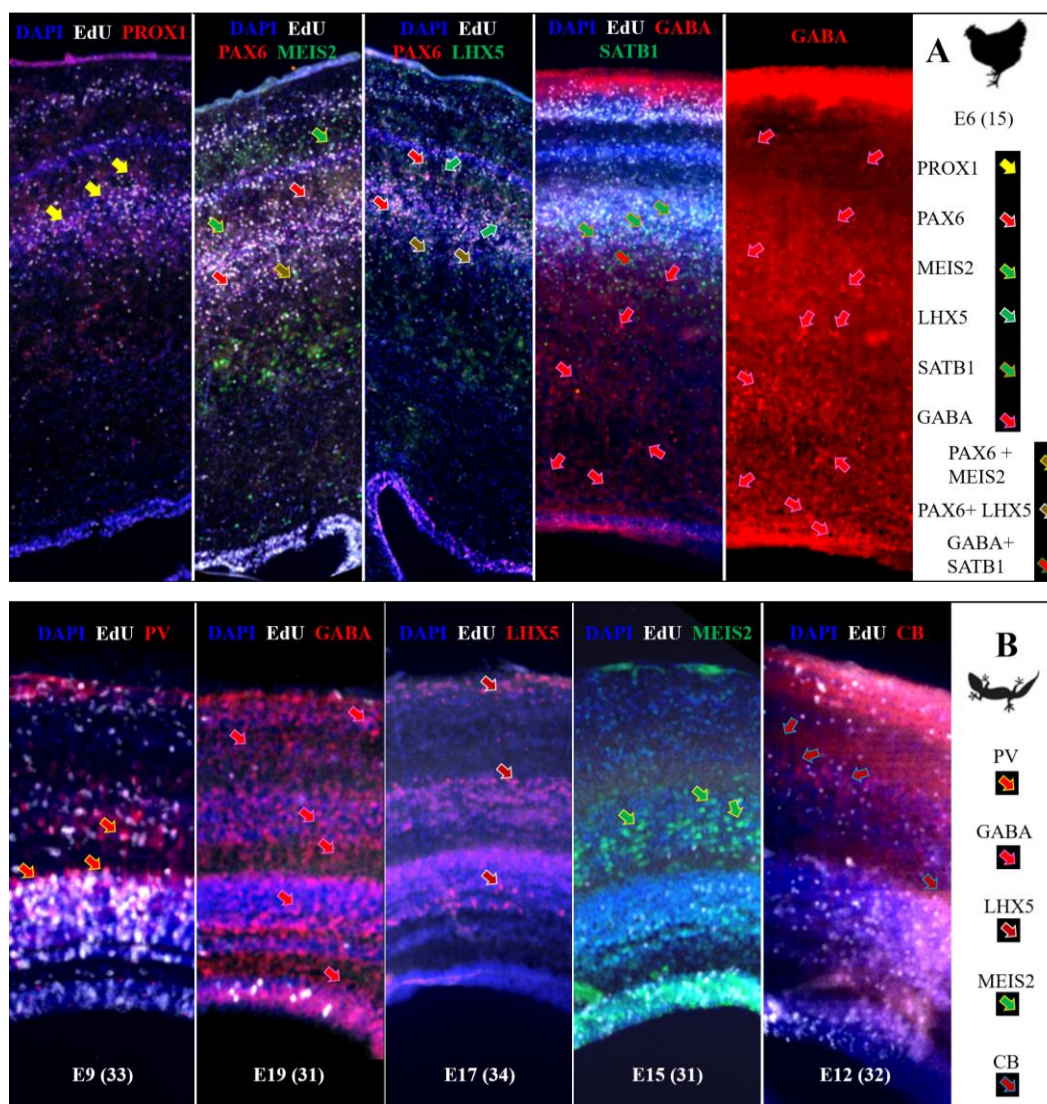
En el caso del gecko, las imágenes mostradas en la **Figura 3C** muestran que la división de las células que conformarán los estratos del OT se da entre los días E7 y E12. Los días E9, E11 y E12, al mostrar marcaje del EdU por todo el OT, por la sobredosis que recibieron los geckos, revelan que no se forma ninguna capa en específico previamente a esos días, pero que sí se da neurogénesis. El marcaje del día E7, que se realizó con una dosis correcta, demuestra que las neuronas generadas en esa fecha tampoco conforman ninguna capa concreta del OT, si no que migrarán por el OT hasta colocarse eventualmente por toda la estructura. El marcaje del E15 solo se distingue en las capas SGC, SAC y SGFP. Ya que el marcaje de EdU también aparece en la VZ, se puede deducir que las células nacidas a partir de E15, aparte de ser muy pocas, se colocan mayoritariamente en capas inferiores. Por tanto, con los experimentos actuales es difícil llegar a concluir si hay un gradiente de generación de las diferentes capas del OT.



**Figura 3: gradiente de neurogénesis en los estratos del OT en *Gallus gallus* y *Paroedura picta*.** (A) Marcaje de EdU sobre DAPI en pollo de 15 días indicando que células nacieron a partir del día de la inyección 3, 6 y 7; capas a la derecha. (B) Diferencia medio-lateral de marcaje EdU en pollo de 15 días inyectado a día 7, corte coronal. (C) Marcaje de EdU sobre DAPI en gecko indicando que células nacieron a partir del día de la inyección y el día de la perfusión entre paréntesis; capas a la derecha.

Comparando las especies *G. gallus* y *P. picta*, como es habitual los progenitores de las células de las capas en ambas especies se colocan en la VZ. Así, se ha observado en ambos casos que si esa capa muestra actividad remanente de síntesis de DNA, el resto de estratos muestran marcaje de EdU. Aun así, cabe destacar que la edad E3 de *Gallus gallus* y la E7 de *Paroedura picta* son equivalentes entre sí, ya que las células que se marcan con EdU no se colocan en una capa del OT en específico, indicando que las células creadas en esas fechas migrarán hasta posicionarse por todo el OT. La **Figura 3** también demuestra que la neurogénesis temporal no se relaciona a estratos únicos, si no por zonas, indicando que la creación de varias capas se da de manera simultánea.

Al visualizar los marcajes descritos al principio de la sección (**Figura 2**) junto con el marcaje de EdU (**Figura 3**), se obtiene un indicativo del momento de la neurogénesis de los diferentes tipos de neuronas, y las posibles diferencias entre ellas (**Figura 4**).



**Figura 4: neurogénesis de los diferentes tipos de neuronas en el OT de pollo y gecko.** (A) Marcaje de PROX1, PAX6, MEIS2, LHX5, GABA, SATB1 y EdU en el OT del pollo. Las flechas indican las células marcadas por Ab y EdU al mismo tiempo, excepto en el caso del marcaje de ambos Ab a la vez y el marcaje de GABA. La nube en el estrato 12 de la tinción de LHX5 es ruido de fondo. La segunda foto de GABA ha sido saturada para percibir la totalidad de la tinción. (B) Marcaje de PV, GABA, LHX5, MEIS2, CB y EdU en el OT del gecko. Las flechas indican células marcadas por los Ab primarios, en el caso de PV las flechas indican células marcadas por Ab y EdU. Amplificaciones en la **Figura adicional 4**.

En la **Figura 4A** se puede observar como a día E6 en pollo se dividen una gran variedad de neuronas, ya que todos los Ab usados marcan células en los estratos 10 y 11 del SGFS, la banda



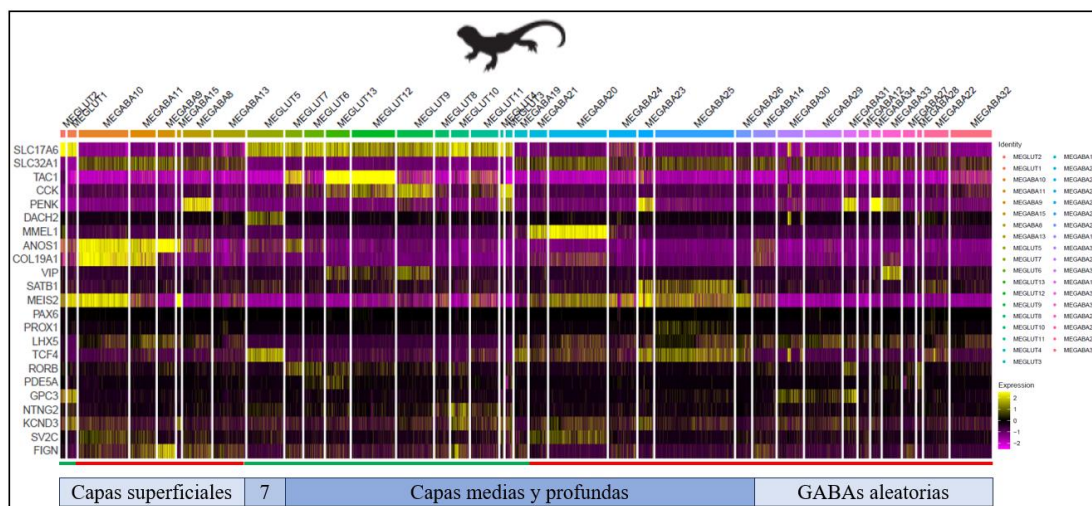
de mayor densidad celular. Se puede observar la tinción conjunta de PAX6 y MEIS2, PAX6 y LHX5, y SATB1 y GABA en las mismas células. Además, se pueden observar dos zonas de marcaje de MEIS2 distintas, ya que las células marcadas en el estrato 12 y en el principio de la capa SGC son notablemente más grandes que las células marcadas en los estratos del 1 al 8. Respecto al marcaje del neurotransmisor GABA, es notorio que las neuronas gabaérgicas se dividen antes del día E6, ya que, como se puede apreciar en las capas inferiores del OT, las células marcadas por el Ab para GABA no están marcadas por EdU. Esta tinción se diferencia de las demás ya que se marca por todo el OT, marcando los neurotransmisores colocados alrededor del núcleo de las neuronas. Este marcaje se aprecia mejor en la figura que solo muestra GABA, ya que fue saturada para demostrar su marcaje en capas superiores (**Figura 4A**). La imagen es la misma empleada en la coexpresión con SATB1.

En gecko (**Figura 4B**) se puede observar como las células divididas a E9 y en días posteriores son las mismas que expresan parvalbumina. En cambio, las células que expresan CB se dividen antes del día E12, ya que en la foto se puede ver como las células que expresan CB, estas células se diferencian por el marcaje de su citoesqueleto mostrando sus protuberancias, no están marcadas con EdU.

## 5.2. ANÁLISIS DE scRNAseq DE *Pogona vitticeps* Y *Mus musculus*

A continuación, se analizarán los datos de scRNAseq de *Pogona vitticeps* y *Mus musculus* y se compararán con los resultados obtenidos en los marcajes por Ab de pollo y gecko.

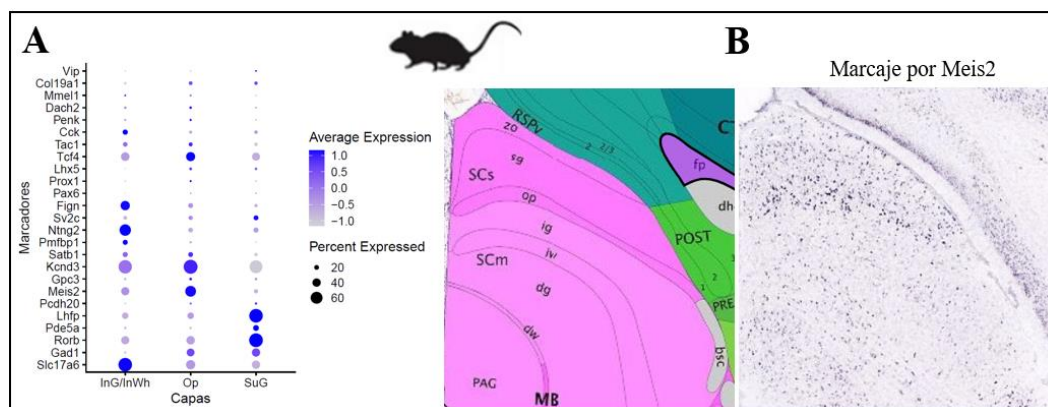
En la **Figura 5** se puede apreciar la alta variedad de tipos celulares en el OT de *Pogona vitticeps*, y la firma transcriptómica de cada capa del OT del reptil. Cabe destacar que los genes para CB, SV2, SST, PV, GABA, PCDH20, LHFP y PMFBP1 no se mostraron en el heatmap (**Figura 5**) ya que no se detectaron en los datos de las células del OT de *Pogona*. Dada la dificultad de identificar capas individuales del OT mediante técnicas inmunohistoquímicas, las capas del OT se englobaron en grupos más grandes siguiendo la nomenclatura utilizada por Hain, et al., (2022). Dichos grupos son las capas superficiales, conformado por SO y SGFS, y las capas medias y profundas, conformado por SGC, SAC y SGFP. Ver **Figura adicional 5** y **6**.



**Figura 5: firma molecular transcriptómica del OT de *Pogona vitticeps*.** Firma molecular transcriptómica de los clusters de OT de *Pogona vitticeps*. Información obtenida de Hain, et al. (2022), genes adquiridos de Hain, et al. (2022), Xie, et al. (2021) y los empleados en las técnicas inmunohistoquímicas, gráfico creado con R software.

De este modo, en la **Figura 5** se puede observar cómo los genes *Slc17a6* (VGLUT, neuronas glutamatérgicas) y *Slc32a1* (VGABA, neuronas gabaérgicas), se expresan por todas las capas del OT. Los genes *Tac1*, *Cck* y *Mmel1* demuestran una expresión localizada en las capas medias y profundas, mientras que *Anos1* y *Coll9a1* demuestran una expresión propia de las capas superficiales, y el gen *Dach2* del estrato 7 del OT. En cambio, los genes *Penk*, y *Vip* muestran una expresión menos específica respecto a las capas. Al tener en cuenta los genes utilizados en pollo, gecko y ratón, se puede observar cómo los genes *Satb1*, *Prox1* y *Ntng2* aparentan tener un mayor nivel de expresión en las capas medias y profundas. Así mismo, el resto de genes parecen expresarse por las diferentes capas de manera parecida, excepto en el caso de *Meis2*, que muestra una clara tendencia a expresarse en capas superficiales.

En la **Figura 6** se puede observar la firma molecular transcriptómica de cada capa del SC de ratón. En este caso, se analizaron los mismos genes que en el análisis de *Pogona*, y respecto a las capas, en este análisis se usó la misma anotación que emplearon Xie, et al. (2021) (**Figura adicional 7 y 8**) en su proyecto para facilitar la asignación de los genes a sus respectivas capas (**Figura 6A**), pero ha de mencionarse que en el caso de *Mus musculus* la estructura del SC cambia radicalmente (**Figura 6B**) y existen más capas que las identificadas por Xie, et al. (2021). Las diferentes densidades celulares que delimitan las capas en otras especies desaparecen, y la nomenclatura se altera por ello obteniendo 7 capas, de la parte superior a la inferior: *zonal layer* (ZO), *superficial gray layer* (SG/SuG), *optic layer* (OP), *intermediate gray layer* (IG), *intermediate white layer* (IW), *deep gray layer* (DG) y *deep white layer* (DW).



**Figura 6: firma molecular transcriptómica del SC de *Mus musculus*.** (A) Firma molecular transcriptómica de las capas de SC de *Mus musculus*. Información obtenida de Xie, et al. (2021), dimplot y heatmap creado con R software. (B) Imagen de marcaje de Meis2 en SC de *Mus musculus* e imagen de atlas, imágenes obtenidas de Allen Brain Atlas.

Respecto a la firma transcriptómica (**Figura 6A**), se puede observar cómo en este caso las neuronas gabaérgicas (detectadas por la expresión de *Gad1*) y las glutamatérgicas (detectadas por la expresión de *Slc17a6*) se siguen repartiendo por todo el SC, aunque hay una mayor concentración de gabaérgicas en las capas intermedias, y una menor expresión de *Gad1* en esas mismas capas. Los genes *Rorb*, *Lhfp*, *Meis2*, *Ntn2* y *Fign* son más específicos para cada capa comparando con los datos de *Pogona* y las micrografías de *Meis2* en pollo y gecko. El gen *Kcnd3* tiene un nivel de expresión muy alto por todo el SC, a diferencia del OT de *Pogona*, en el que apenas se expresaba. En cambio, aunque el gen *Tcf4* mantiene un nivel de expresión mucho más bajo que el de *Kcnd3*, también se expresa por todo el SC, a diferencia del caso en *Pogona*, que se expresaba por todo el OT pero en especial en el estrato 7. El resto de genes analizados de *Pogona*, y los usados en las técnicas inmunohistoquímicas, presentan un nivel de expresión mucho más bajo. Esto, junto con la diferente arquitectura del SC son indicios de divergencia de los mamíferos. Aun así, se pueden encontrar similitudes con los saurópsidos, como la expresión por todo el SC de *Meis2* a diferentes niveles, que se puede observar en la **Figura 4A** y **Figura 5**, y una alta estratificación en el SC, pero en este caso los marcadores delimitan de una manera más clara las capas (**Figura 6A** y **B**) al no expresarse de manera similar en diferentes estratos.

## 6. DISCUSIÓN

La datación de EdU de pollo obtenida concuerda con los resultados obtenidos por Lever, et al. (2014), dado que en la **Figura 3A** se observa como a E6 las neuronas teñidas por EdU se

colocan en capas superiores del OT, apoyando también la segunda oleada de migración presentada por LaVail y Cowan (1971), y todas las capas han sido formadas para el día E15. Además, la presencia de células teñidas por EdU en las capas inferiores del SGFS, y en las capas SGC y SAC de E7 reiteran la tercera oleada de migración descrita por LaVail y Cowan (1971), y las observaciones de neurogénesis a menor nivel a partir de E6 de Mey y Thanos (2000). Cabe destacar que las células de mayor tamaño marcadas con MEIS2 en la **Figura 4** también fueron detectadas por LaVail y Cowan (1971), y que gradientes de marcaje como el detectado en la **Figura 3B** también han sido observados por Kukreja, et al. (2020) mediante marcaje de ácido retinoico.

El orden de neurogénesis y cantidad de capas de la rata descrito por Altman y Bayer (1981) no coincide con lo descrito en pollo por Lever, et al. (2014). Los resultados de rata (**Figura adicional 9**) tampoco coinciden con lo mostrado en este proyecto en pollo y gecko, ya que en la **Figura 3** se demuestra como la neurogénesis en ambas especies se da en la zona ventricular, y las neuronas migran a posiciones superiores, sugiriendo que según avanza el tiempo la neurogénesis se centra en capas superiores.

La técnica empleada en este proyecto, al evitar el uso de elementos radioactivos, es más segura para el ser humano que la empleada por Altman y Bayer (1981); y es más simple, ya que no necesita un tratamiento previo a la visualización. Además, el EdU permite usar técnicas inmunohistoquímicas, pudiendo realizar la datación neuronal e identificar el tipo neuronal al mismo tiempo, marcando factores de transcripción, neurotransmisores y proteínas intracelulares.

Por último, los análisis de los datos de *Pogona vitticeps* y *Mus musculus* son una primera aproximación de la posible aplicación de scRNAseq en los estudios evolutivos; ya que permite comparar las especies entre sí teniendo en cuenta toda la firma transcriptómica de cada célula.

## 7. CONCLUSIONES

El OT o SC muestra signos de conservación considerables entre los saurópsidos. No solo comparten una cantidad de capas muy similar, aunque varíen en sus densidades celulares, si no que comparten una organización similar tanto estructural como neurogénica. El SC de mamífero también comparte similitudes con el OT, que sugieren un nivel de conservación entre las especies; como la alta estratificación, el posicionamiento de neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas por todas las capas del OT/SC, y la presencia de marcadores como MEIS2 por toda la estructura y LHX5 por capas superiores. Al mismo tiempo, el OT/SC muestra signos de

divergencia, como la morfología y número de capas completamente diferente del OT y SC, las diferencias inmunohistoquímicas entre el pollo y el gecko, el cambio radical de la firma transcriptómica entre los saurópsidos y los mamíferos, y la reducción de estratificación en los mamíferos, mostrando una mayor diferencia entre mamíferos y saurópsidos, que entre aves y reptiles.

Sin embargo, a fin de recopilar más información del OT/SC para realizar una comparación entre especies más exhaustiva: habría que probar una batería mayor de Ab primarios, realizar las mismas tinciones en todas las especies, conseguir más datos de scRNAseq y realizar estos análisis en las especies empleadas en las técnicas inmunohistoquímicas, y comparar las relaciones sinápticas entre las neuronas del OT para identificar las posibles funciones de cada capa y los circuitos que se llevan a cabo.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó gracias a las donaciones de muestras de *Paroedura picta* del PhD Fernando García-Moreno, y las enseñanzas sobre el software R de Rodrigo Senovilla.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

### 9.1. ARTÍCULOS

Altman, J., Bayer, S.A. (1981). Time of Origin of Neurons of the Rat Superior Colliculus in relation to Other Components of the Visual and Visuomotor Pathways. *Experimental Brain Research*. 42 (3-4): 424-434.

Báez, J., Monzón-Mayor, M., Yanes, C., Romero-Alemán, M.d.M., Arbelo-Galván, J.F., Puelles, L. (2003). Neuronal differentiation patterns in the optic tectum of the lizard *Gallotia galloti*. *Brain Research*. 975 (1-2):48-65.

García-Moreno, F., Molnár, Z. (2020). Variations of telencephalic development that paved the way for neocortical evolution. *Progress in Neurobiology*. 194: 101865.

Hain, D., Gallego-Flores, T., Klinkmann, M., Macias, A., Ciirdaeva, E., Arends, A., Thum, C., Kretschmer, F., Tosches, M.A., Laurent, G. (2022). Molecular diversity and evolution of neuron types in the amniote brain. *Science*. 377: 1060.

Isa, T., Marquez-Legorreta, E., Grillner, S., Scott, E.K. (2021). The tectum/superior colliculus as the vertebrate solution for spatial sensory integration and action. *Current Biology*. 31 (11): 741-762.

Kukreja, S., Udaykumar, N., Yogesh, B., Sen, J. (2020). Retinoic acid signaling regulates proliferation and lamina formation in the developing chick optic tectum. *Developmental Biology*. 467 (1-2): 95-107.

LaVail, J.H., Cowan, W.M. (1971). The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Research*. 28 (3): 391-419.

Lever, M., Brand-Saberi, B., Theiuss, C. (2014). Neurogenesis, gliogenesis and the developing chicken optic tectum: an immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Brain Structure and Function*. 219 (3): 1009-1024.

Martín-Durán, J.M., Hejnol, A. (2021). A developmental perspective on the evolution of the nervous system. *Developmental Biology*. 475: 181-192.

Mey, J., Thanos, S. (2000). Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews*. 32 (2-3): 343-379.

Rueda-Alaña, E., García-Moreno, F. (2022). Time in Neurogenesis: Conservation of the Developmental Formation of the Cerebellar Circuitry. *Brain, Behavior and Evolution*. 97 (1-2): 33-47.

Xie, Z., Wang, M., Liu, Z., Shang, C., Zhang, C., Sun, L., Gu, H., Ran, G. Pei, Q., Ma, Q., Huang, M., Zhang, J., Lin, R., Zhou, Y., Zhang, J., Zhao, M., Luo, M., Wu, Q., Cao, P., Wang, X. (2021). Transcriptomic encoding of sensorimotor transformation in the midbrain. *eLife*. 10: 69825.

## 9.2. PÁGINAS WEB

Allen Brain Atlas [18/06/2023]: <https://mouse.brain-map.org/>

BrainDevelopmentMaps.org [18/06/2023]:

<https://braindevelopmentmaps.org/home/navigation/> (imágenes en el anexo)

BrainMaps.org [07/07/2023]:

<https://brainmaps.org/index.php?p=speciesdata&species=gallus-gallus> (imágenes en el anexo)

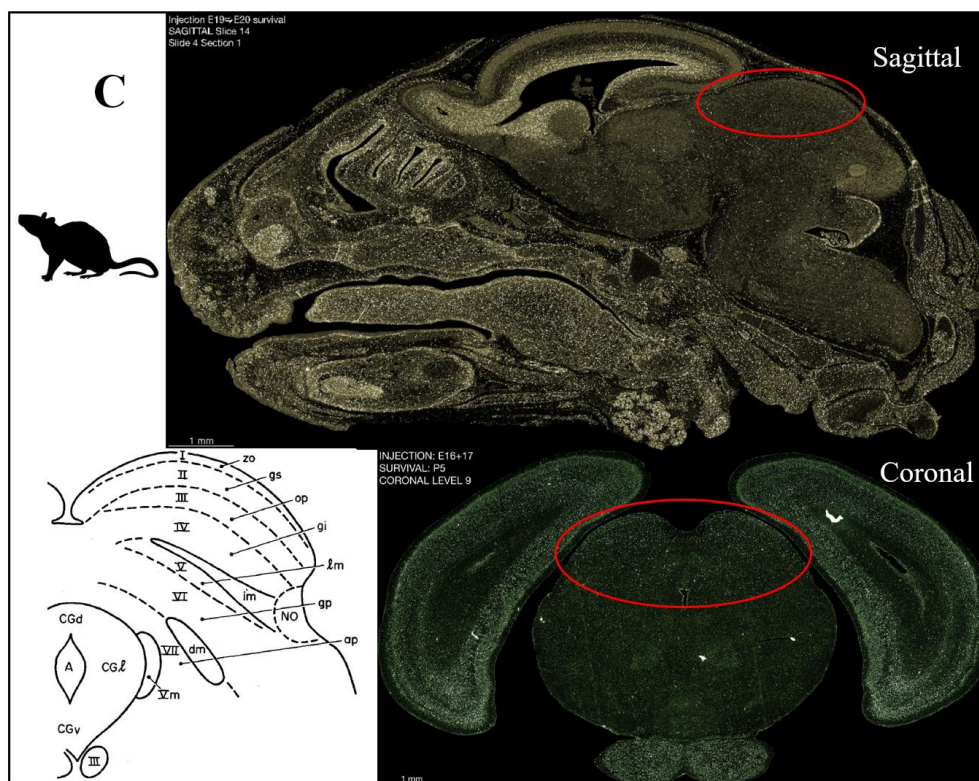
Cuaderno de Cultura Científica [08/07/2023]:

<https://culturacientifica.com/2017/06/20/evolucion-los-sistemas-nerviosos-tamano-encefalico/>

ThermoFisher Scientific. [04/06/2023]:

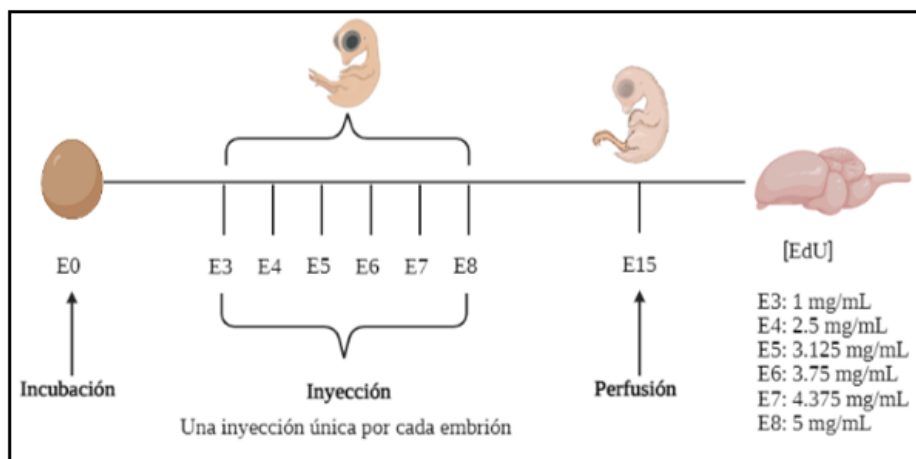
[https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/A10044#:~:text=EdU%20\(5%2Dde%20tini%2D2%2Ddesoxiuridina\)%20puede,una%20azida%20con%20un%20alquino.](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/A10044#:~:text=EdU%20(5%2Dde%20tini%2D2%2Ddesoxiuridina)%20puede,una%20azida%20con%20un%20alquino.)



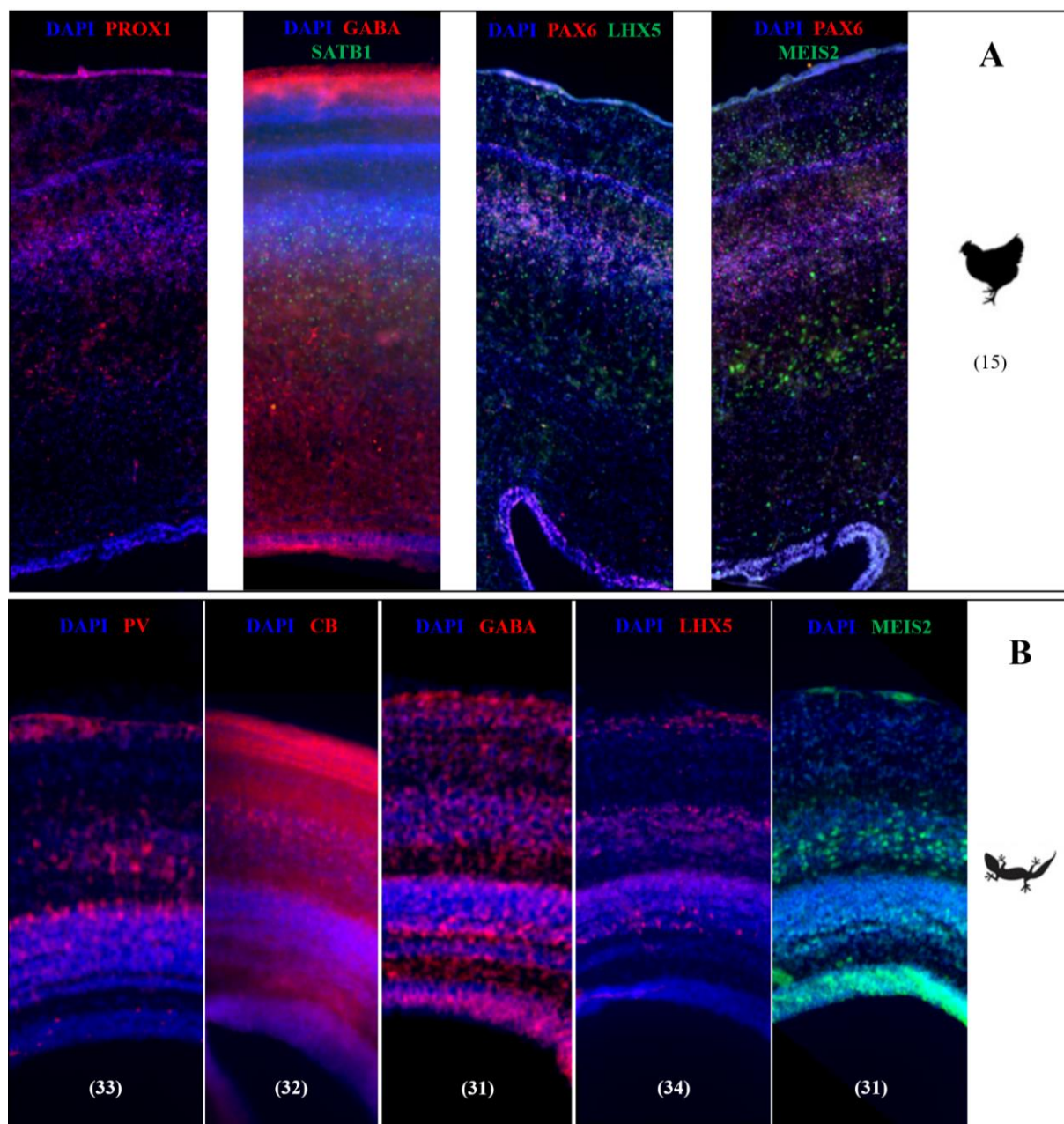


**Figura adicional 1: estratificación y posicionamiento del OT/SC en saurópsidos y mamíferos.** (A) Estratificación del OT de *Gallus gallus* a día de incubación 12, E12, a la izquierda (fluorescencia de DAPI junto a doblecortina, Tuj-1, vimentina y GFAP), y posicionamiento del OT en el cerebro a la derecha, tinción giemsa. Imagen de los estratos del OT obtenida de Lever, et al. (2014), e imágenes del cerebro adquiridas de BrainMaps.org. (B) Estratificación del OT de *Gallotia galloti* a la izquierda, tinción de hematoxilina-eosina, y posicionamiento del OT en el cerebro de *Paroedura picta* a la derecha, tinción Nssil. Imagen de los estratos del OT obtenida de Báez, et al. (2003). (C) Estratificación del SC de *Rattus norvegicus* a la izquierda y posición del SC en el cerebro a la derecha, imágenes de autoradiografía con los colores invertidos. Imagen de los estratos del SC obtenida de Altman y Bayer (1981), e imágenes del cerebro adquiridas de BrainDevelopmentMaps.org.

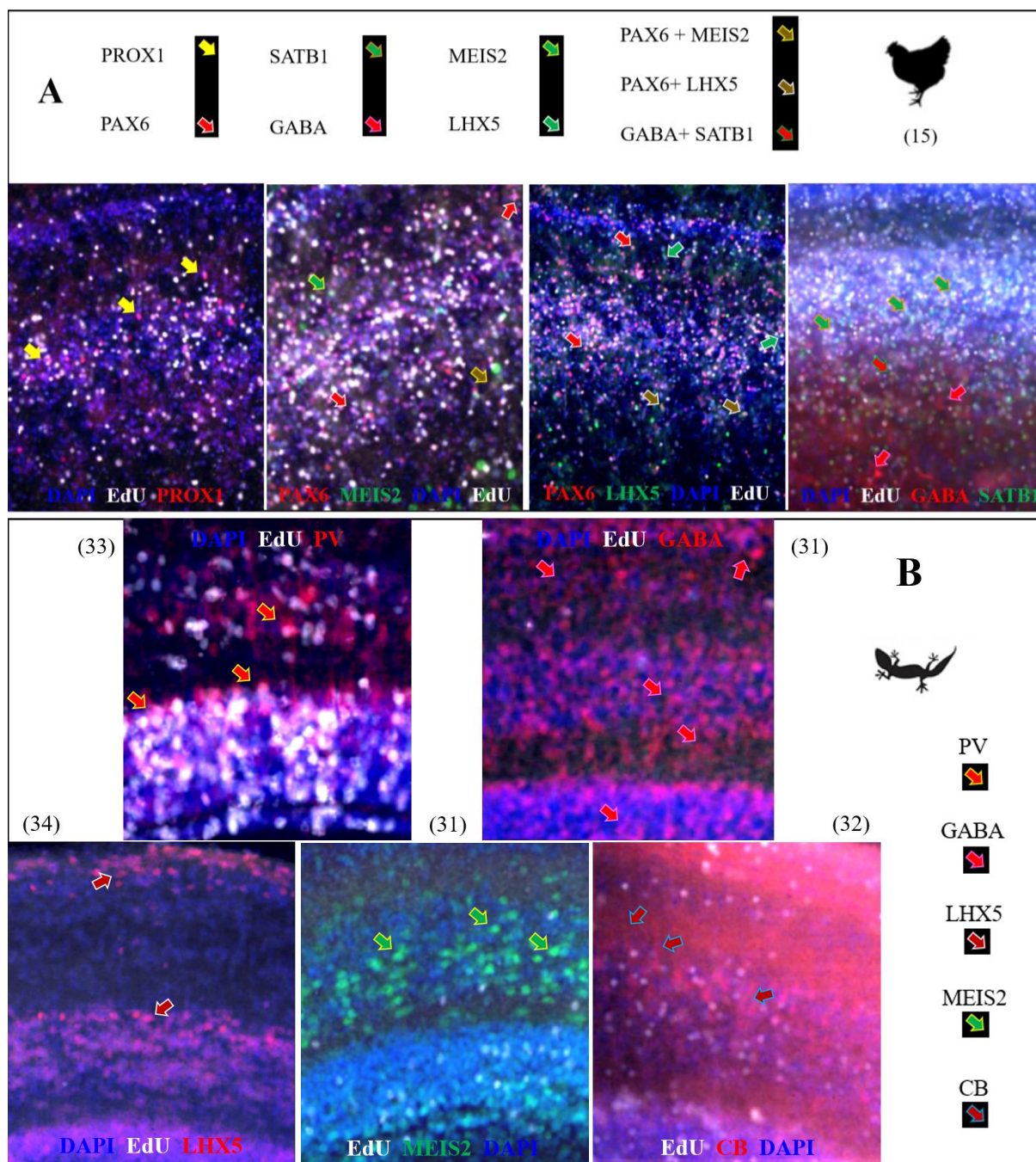




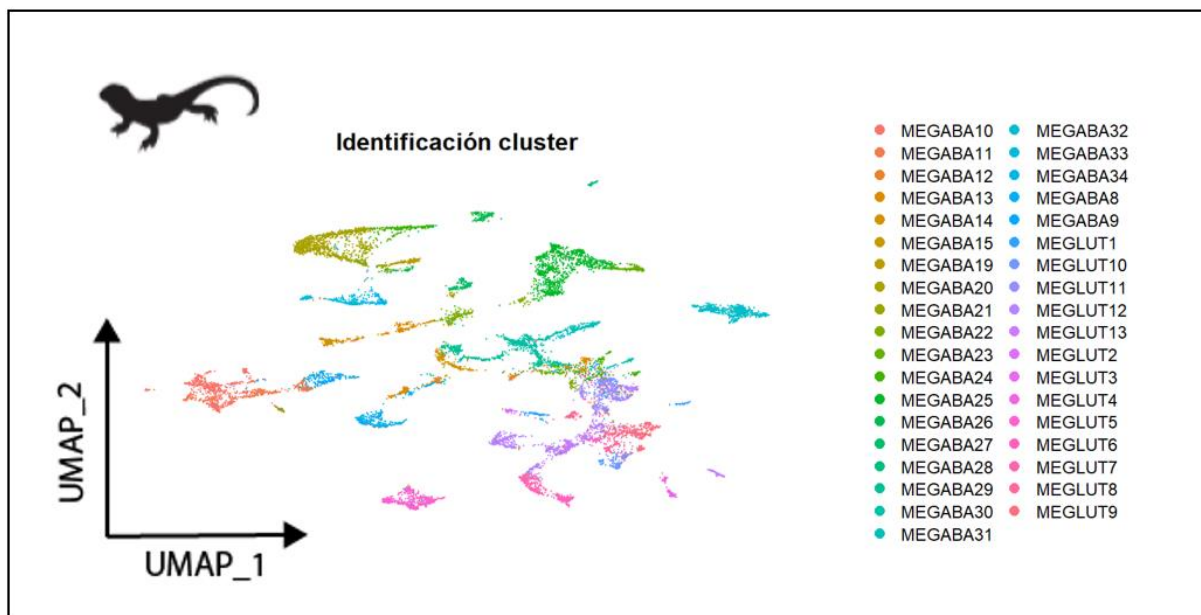
**Figura adicional 2: esquema de las fechas de inyección y perfusión de embriones de *Gallus gallus*.** Los embriones de *Gallus gallus* fueron inyectados a los 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días de incubación (desde el primer día de incubación, E0, los días son enumerados como E3, E4, E5, E6, E7 y E8 respectivamente) con las concentraciones indicadas en la imagen. En el estadio E15, cuando todas las láminas del OT se han generado, se procede a la perfusión de los embriones para la extracción del cerebro. Imagen creada mediante BioRender.com.



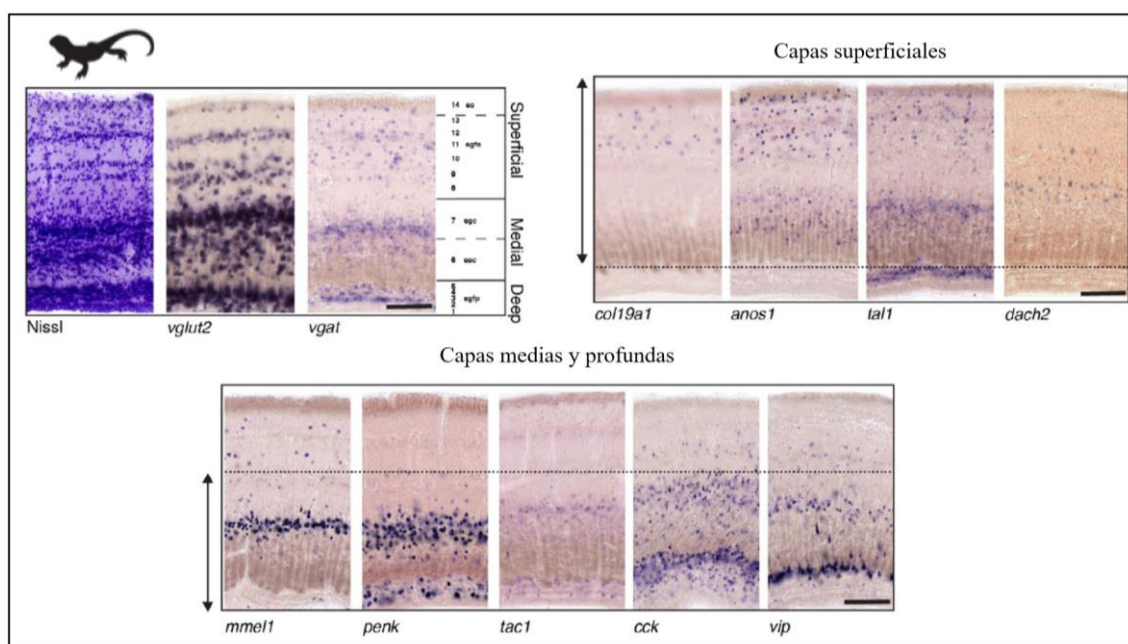
**Figura adicional 3: tinciones por Ab primarios de OT de *Gallus gallus* y *Paroedura picta*.** (A) Tinciones del OT de *Gallus gallus*, sacrificado a día 15 de incubación, mediante DAPI y los Ab primarios para PROX1, GABA, SATB1, PAX6, LHX5 y MEIS2. (B) Tinciones del OT de *Paroedura picta* mediante DAPI y los Ab primarios para PV, CB, GABA, LHX5 y MEIS2. Geckos sacrificados a días 33, 32, 31, 34 y 31 de incubación.



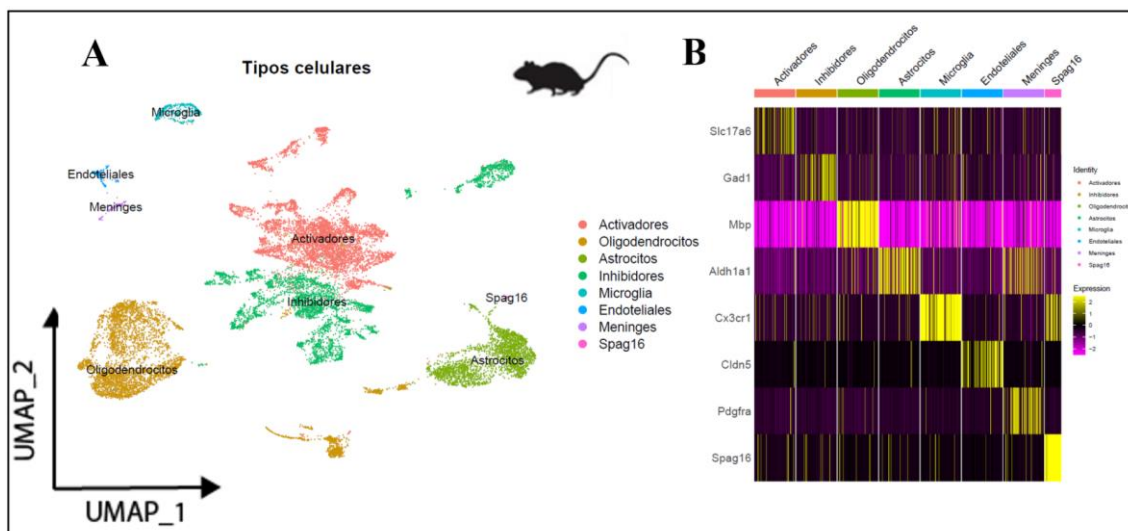
**Figura adicional 4: ampliaciones de tinciones en *Gallus gallus* y *Paroedura picta*.** (A) Marcaje de PROX1, PAX6, MEIS2, LHX5, GABA, SATB1 y EdU en el OT del pollo. Las flechas indican las células marcadas por Ab y EdU al mismo tiempo, excepto en el caso del marcaje de ambos Ab a la vez y el marcaje de GABA. Pollos sacrificados en el día 15 de incubación. (B) Marcaje de PV, GABA, LHX5, MEIS2, CB y EdU en el OT del gecko. Las flechas indican células marcadas por los Ab primarios, en el caso de PV las flechas indican células marcadas por Ab y EdU. Geckos sacrificados en los días de incubación indicados entre paréntesis.



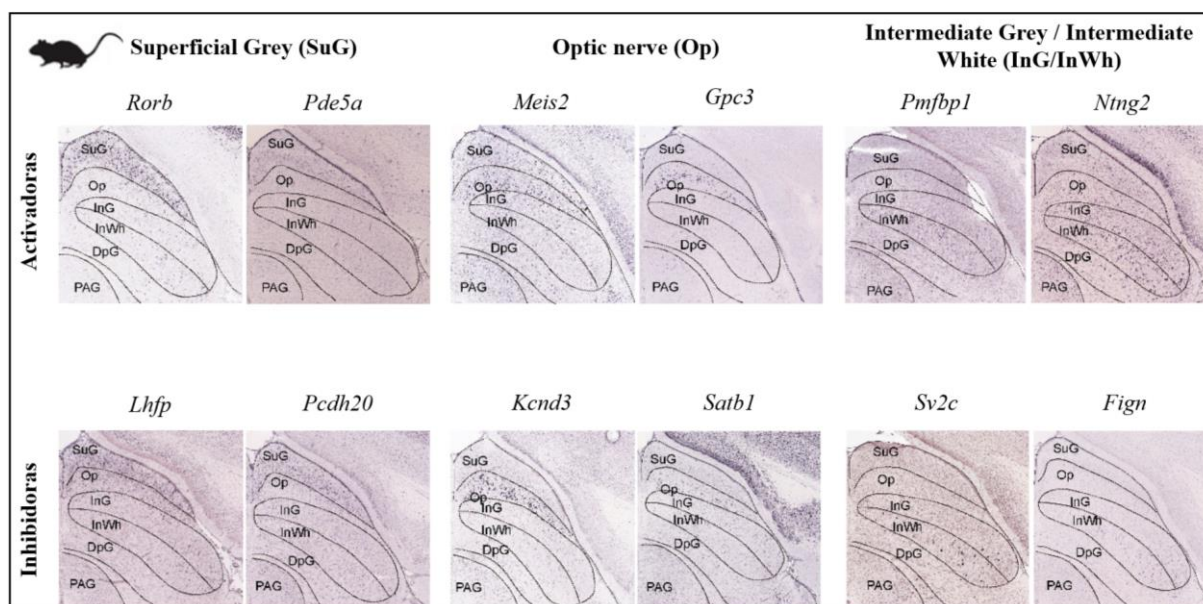
**Figura adicional 5: identificación de tipos celulares del OT de *Pogona vitticeps*.** Identificación de los tipos celulares que conforman el OT de *Pogona vitticeps* usando *clusters* visualizados mediante un *UMAP*. Información obtenida de Hain, et al. (2022). Gráfico creado con R software.



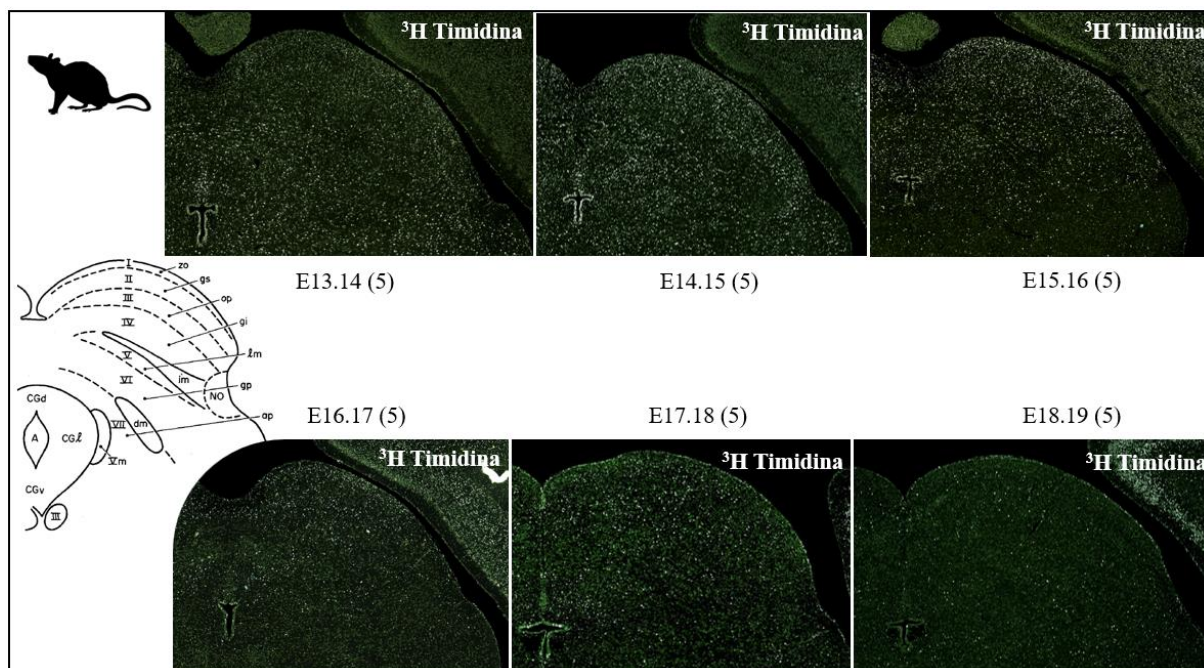
**Figura adicional 6: estratificación del OT de *Pogona vitticeps*.** Tinción Nissl e *in situ* de los genes marcadores *Vglut2*, *Vglat*, *Col19a1*, *Anos1*, *Tal1*, *Dach2*, *Mmel1*, *Penk*, *Tac1*, *Cck* y *Vip* para delimitar los estratos del OT de *Pogona vitticeps*. Imágenes adquiridas de Hain, et al. (2022).



**Figura adicional 7: composición celular del SC de *Mus musculus*.** (A) Gráfico UMAP mostrando los *cluster* de tipos celulares que conforman el SC de *Mus musculus*. (B) Gráfico HeatMap mostrando los genes identificadores de cada *cluster* de célula del SC y su nivel de expresión. La información utilizada en ambos gráficos obtenida de Xie, et al. (2021), gráficos creados con R software.



**Figura adicional 8: estratificación del SC de *Mus musculus*.** Expresión espacial de los genes *Rorb*, *Pde5a*, *Meis2*, *Gpc3*, *Pmfbp1*, *Nting2*, *Lhfp*, *Pcdh20*, *Kcnd3*, *Satb1*, *Sv2c* y *Fign* en el SC de la rata *Mus Musculus*. Imágenes adquiridas de Xie, et al. (2021).



**Figura adicional 9: neurogénesis en el SC de la rata *Rattus norvegicus*.** Pseudoimágenes de autoradiografías de  $^3\text{H}$ -Timidina con el color invertido para asemejarse a una micrografía de fluorescencia. Inyecciones realizadas durante dos días seguidos tras la inseminación de la rata (E\_.) y la cría de rata sacrificada a día 5 después de nacer. Pseudofotos obtenidas de BrainDevelopment.org, y con el color invertido mediante Fiji (ImageJ).

## 10.2. CÓDIGOS DEL REANÁLISIS DE scRNAseq

Link de GitHub para los códigos de Seurat del análisis de los datos de scRNAseq (ot\_pvi\_1 para *Pogona vitticeps* y ot\_mm\_1 para *Mus musculus*):  
[https://github.com/phylobrain/TFG\\_AitorOrde.git](https://github.com/phylobrain/TFG_AitorOrde.git)