

Grao en Bioloxía



-Estudio topográfico de las poblaciones neuronales del telencéfalo del mágil

-Estudo topográfico das poboacións neuronais do telencéfalo do muxo

-Topographic study of neuronal populations in the grey mullet

Alba Rodríguez López

Septiembre, 2017

Directores | **Antonio Manuel Castro Castro**
Ibán Lamas Criado

D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña, y D. Ibán Lamas Criado, Profesor Contratado Interino en el anteriormente citado Departamento,

INFORMAN,

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por Alba Rodríguez López y con título “Estudio topográfico de las poblaciones neuronales del telencéfalo del múgil” ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, autorizamos su envío y presentación al tribunal calificador.

Y, para que así conste, expedimos el presente informe en A Coruña a 8 de septiembre de 2017.

**CASTRO
CASTRO
ANTONIO
MANUEL -
32823383
Z**

Firmado digitalmente por
CASTRO CASTRO ANTONIO
MANUEL - 32823383Z
Nombre de
reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=32823383Z,
sn=CASTRO CASTRO,
givenName=ANTONIO
MANUEL, cn=CASTRO
CASTRO ANTONIO
CASTRO ANTONIO
MANUEL - 32823383Z
Fecha: 2017.09.06 11:01:35
+02'00'

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro

**LAMAS
CRIADO
IBAN - DNI
32688489S**

Firmado digitalmente por
LAMAS CRIADO IBAN - DNI
32688489S
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES, o=UNIVERSIDAD
DE A CORUÑA,
ou=certificado electrónico
de empleado público,
ou=BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR, ou=21092,
serialNumber=32688489S,
sn=LAMAS CRIADO,
givenName=IBAN,
cn=LAMAS CRIADO IBAN -
DNI 32688489S
Fecha: 2017.09.06 11:43:51
+02'00'

Fdo. Ibán Lamas Criado

ÍNDICE

0. <u>RESUMEN</u>	1
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	2
1.1. <u>Bilogía de <i>Chelon labrosus</i></u>	2
1.1.1. <u>Anatomía de <i>Chelon labrosus</i></u>	2
1.1.2. <u>Distribución de <i>Chelon labrosus</i></u>	3
1.1.3. <u>Etología de <i>Chelon labrosus</i></u>	3
1.2. <u>Anatomía del encéfalo de peces</u>	4
1.3. <u>Proteínas Hu</u>	7
2. <u>OBJETIVOS</u>	9
3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	10
3.1. <u>Procesamiento inmunohistoquímico</u>	10
3.2. <u>Procesamiento de las imágenes</u>	11
4. <u>RESULTADOS</u>	12
4.1. <u>Telencéfalo ventral</u>	12
4.2. <u>Telencéfalo dorsal</u>	15
5. <u>DISCUSIÓN</u>	17
5.1. <u>Uso de marcadores neuronales</u>	17
5.2. <u>Estudio topográfico del telencéfalo</u>	17
6. <u>CONCLUSIONES</u>	20
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	22

0. RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio sobre las poblaciones neuronales del telencéfalo del mújil adulto, *Chelon labrosus* (Risso, 1827), pez teleósteo perteneciente a la familia de los mugílidos muy común en la costa de toda España. Para este estudio se emplearon 14 individuos adultos que fueron anestesiados, siendo conformes todos los procedimientos a las líneas de dirección de la Comunidad Europea para el trato de los animales de experimentación. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de proteínas Hu en el cerebro del mújil, permitiendo asimismo localizar distintas poblaciones telencefálicas lo cual, confirma la teoría de la conservación de la secuencia en la familia génica de las proteínas Hu.

Palabras clave: telencéfalo, teleósteo, *Chelon labrosus*, proteínas Hu, anti-Hu.

0. RESUMO

Neste traballo realizouse un estudo sobre as poboacións neuronais do telencéfalo do muxo, *Chelon labrosus* (Risso, 1827), pez teleósteo pertencente á familia dos muxilidos moi común en toda a costa de España. Para iste estudo empregáronse 14 individuos adultos que foron anestesiados, sendo conformes todos os procedementos ás liñas de dirección da Comunidade Europea para o trato dos animais de experimentación. Os resultados obtidos confirmaron a presenza de proteínas Hu no cerebro do muxo, permitindo asimismo localizar distintas poboacións telencefálicas, o cal, confirma a teoría da conservación da secuencia na familia xénica das proteínas Hu.

Palabras clave: telencéfalo, teleósteo, *Chelon labrosus*, proteínas Hu, anti-Hu.

0. ABSTRACT

In this work, a study was carried out in the neuronal populations of the grey mullet telencephalon, *Chelon labrosus* (Risso, 1827), a teleost fish from the mugilidae family very common in all the Spanish coast. For this study 14 adult specimens were anesthetized, keeping the directions lines from the European Community to the animal care. The results obtained demonstrated the presence Hu proteins in the grey mullet brain, allowing also to locate different telencephalic populations, wich, confirm the theory of sequence conservation in the gene family of Hu proteins.

Key words: telencephalon, teleostic, *Chelon labrosus*, Hu proteins, anti-Hu.

1. INTRODUCCIÓN

El mágil, de nombre científico *Chelon labrosus* (Risso, 1827), también llamado lisa negra entre otros, es un pez teleósteo perteneciente a la familia de los mugilidos. Como los demás peces mugiliformes su cuerpo es alargado casi cilíndrico y con la cabeza ancha, anatomía corporal típica de este grupo de peces. En la lista de especies amenazadas aparece como de preocupación menor por lo que está totalmente fuera de peligro.

<i>Taxonomía</i>	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Mugiliformes
Familia	Mugilidae
Género	<i>Chelon</i>
Especie	<i>Chelon labrosus</i>

Tabla 1: Taxonomía del mágil (Nelson, 2006).



Figura 1. A) Fotografía de un ejemplar de *Chelon labrosus*. B) Esquema de las características de *Chelon labrosus*

1.1 Biología de *Chelon labrosus*

1.1.1 Anatomía de *Chelon labrosus*

La especie *Chelon labrosus* tiene un cuerpo alargado y fusiforme, que puede alcanzar hasta 70 cm de longitud (Arias *et al.*, 2013); es de color gris oscuro o azulado en el torso y se vuelve plateado hacia los laterales aclarándose hasta llegar al vientre de color blanco (Figura 1). Todo su cuerpo está cubierto por grandes escamas, la línea lateral no es visible y sobre ella se disponen 45 ó 46 escamas. En sus aletas hay radios o espinas, tiene dos aletas dorsales separadas, la primera con 4 ó 5 radios espinosos y la segunda con 7-10 radios blandos y 1 espinoso, la aleta anal posee 8-11 radios suaves y 3 duros, las aletas pectorales con 16-19 radios están a media altura del cuerpo y son cortas. La cabeza es ancha, grande, dura y levemente hundida en la zona de

los ojos, que carecen de membrana adiposa y sus párpados están poco desarrollados; la boca tiene un labio superior muy desarrollado cubierto por hasta 4 filas de papilas córneas (AsturnaturaDb, 2004-2017), el lacrimal tiene el borde posterior recto. Esta especie se puede confundir con lisa amarilla, *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), una característica a tener en cuenta a la hora de diferenciar estas dos especies es la coloración amarilla de las aletas pelvianas, anal y caudal y la presencia de párpados adiposos en *Mugil cephalus*, mientras que son oscuras en *Chelon labrosus* (FAO, 2017).

1.1.2 Distribución de *Chelon labrosus*

Chelon labrosus es una especie cosmopolita de distribución muy amplia (Figura 2), lo podemos encontrar desde Escandinavia e Islandia a Senegal y Cabo Verde, Mediterráneo y SO del Mar Negro.

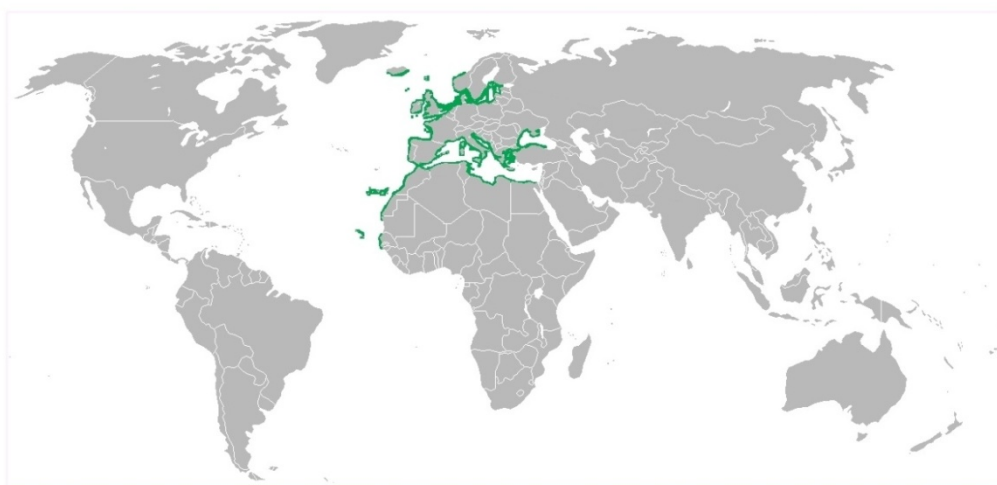


Figura 2. Distribución de *Chelon labrosus*, imagen obtenida de www.fishbase.org

1.1.3 Etología de *Chelon labrosus*

El mújil es un pez catádromo, por lo que habita cerca de la costa adentrándose ocasionalmente en zonas estearinas y de agua dulce; los juveniles se acostumbran rápidamente al cambio de salinidad y pueden verse de forma habitual en zonas de puertos y frente a desagües de aguas impuras, donde se alimentan de las partículas de materia orgánica en suspensión, contribuyendo a paliar la contaminación acuática de este origen (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2017). Los individuos de esta especie pueden llegar a vivir 12 años, las hembras son de mayor tamaño que los machos. Son animales gregarios, forman bancos de una a dos docenas de ejemplares, se encuentran cerca de la superficie sobre fondos arenosos o lodosos con vegetación donde se alimentan durante el día de diatomeas bentónicas, algas epilíticas (crecen sobre superficies rocosas), pequeños invertebrados y detritos que rasca del fondo con su labio superior. Suelen migrar hacia el norte en verano debido al ascenso de las temperaturas, pero la época de reproducción tiene lugar en alta mar en invierno, entre noviembre y abril en la que las hembras realizan puestas de hasta 2 millones de huevos que

se depositan sobre el fondo marino. Los juveniles de 2 cm de longitud aproximadamente se alimentan de zooplancton y volverán cerca de la costa adentrándose en lagunas costeras y estuarios en abril-junio y volverán al mar en verano (Froese et al., 2017). Posteriormente estos juveniles alcanzaran la madurez sexual, en caso de los machos a los dos años y a los tres años en las hembras para seguir así con su ciclo vital.

En referencia a los aspectos de interés humano es una especie que debido a la baja calidad de su alimentación de forma general tiene una carne de bajo nivel por lo que no es muy beneficioso a nivel económico, a pesar de todo si lo encontramos en aguas limpias su sabor sería mucho mejor y sus huevos alcanzan alto valor en mercados extranjeros. También se pueden emplear para la pesca deportiva, el mantenimiento de acuarios públicos, alimento para otros peces, estudios científicos, etc.

1.2 Anatomía del encéfalo de peces

Para poder reconocer todas las estructuras que conforman el encéfalo (Fig. 3) deberemos observar su anatomía desde tres posiciones; ventral, dorsal y lateral (Figs. 4, 5 y 6). El encéfalo de peces teleósteos se puede dividir en 5 regiones diferentes (Fig. 3) el telencéfalo y el diencefalo (que componen el prosencéfalo o encéfalo anterior), el mesencéfalo o cerebro medio, y el metencéfalo y el mielencéfalo (que en conjunto constituyen el rombencéfalo o encéfalo posterior) (Gilbert, 2005). Al conjunto formado por el rombencéfalo y el mesencéfalo también se conoce como tronco encefálico (Nieuwenhuys, 2009).

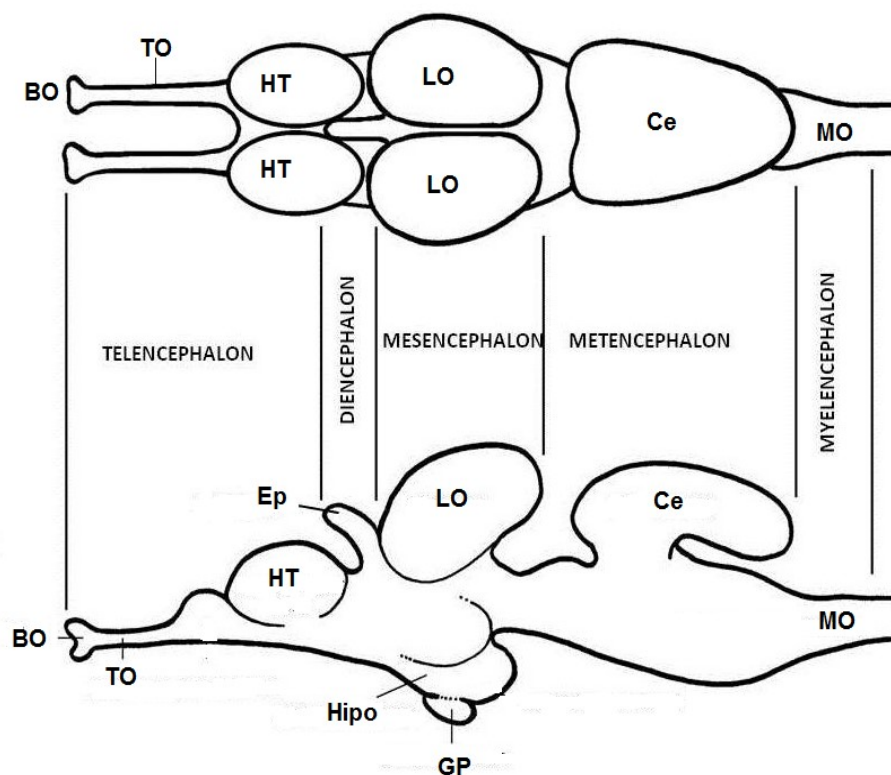


Figura 3. Esquema del encéfalo de teleósteos; Bulbos olfativos (BO), Tractos olfativos (TO), Hemisferios telencefálicos (HT), Corpus cerebelar (Ce), Lóbulos ópticos (LO), Hipotálamo (Hipo), Epífisis (Ep), Glándula pineal (GP), Médula oblonga (MO).

- **Telencéfalo:** región encargada principalmente del procesamiento de la información olfativa; se encuentra formada por los bulbos olfatorios (Figs. 3, 4, 5 y 6) que presentan tres capas dispuestas concéntricamente: la capa celular interna (ICL), capa celular externa (ECL) y la capa glomerular (GL) (Rincon *et al.*, 2016); estos bulbos reciben y procesan señales de las narinas a través de los nervios olfativos (Obando *et al.*, 2013), estando más desarrollados en peces que cazan por el olor como los mixinos, tiburones y peces gato. En teleósteos los bulbos olfatorios pueden ser sésiles, unidos directamente a los hemisferios telencefálicos, como en la trucha y el pez cebrá, o pueden ser pedunculados, unidos a los hemisferios telencefálicos por los tractos olfatorios (Figs. 3, 4, 5 y 6), como en el caso del múgil; la longitud de estos tractos varía dependiendo de la especie de pez. Por último se encuentran, los hemisferios telencefálicos (Figs. 3, 4, 5 y 6) implicados sobre todo en el olfato; a diferencia que la mayoría de vertebrados cuyo telencéfalo se origina por evaginación del tubo neural dando hemisferios telencefálicos tubulares, los actinopterigios poseen un telencéfalo evertido dando lugar a hemisferios telencefálicos macizos (Nieuwenhuys *et al.*, 1998).
- **Diencéfalo:** lleva a cabo funciones relacionadas con el control de la secreción hormonal y la homeostasis. Se divide dorsoventralmente en: epítalamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo (Rodríguez, 2014). En el hipotálamo (Hipo) (Fig. 3) se encuentra la hipófisis o glándula pituitaria (GP) (Fig. 3), una glándula endocrina que segrega hormonas para regular la homeostasis incluyendo las hormonas trópicas que regulan la función de otras glándulas del sistema endocrino, dependiendo en parte del hipotálamo (Fig. 5).
- **Mesencéfalo:** su función es integrar la información visual con las funciones motoras y otros sentidos; está formado por tegmento (ventral) y los dos lóbulos ópticos (LO) (Figs. 3, 4, 5 y 6) de mayor tamaño en especies cuya estrategia de caza se basa en el acecho (Rodríguez, 2014).
- **Metencéfalo:** está constituido por el cerebelo (Ce) (Figs. 3, 4, 5 y 6) que es una estructura monolobular por lo general de gran tamaño y habitualmente la parte más grande del encéfalo (Rodríguez, 2014); controla la natación, el balance, el tono muscular y la orientación espacial al integrar la información procedente de la línea lateral con la del oído interno y los músculos.
- **Mielencéfalo:** parte más posterior del encéfalo; está formado por la médula oblonga (MO) (Figs. 3, 4, 5 y 6) cubierta por el plexo coroideo posterior, en la base de la médula oblongada (MO) están las células de Mauthner (Alfaro *et al.*, 2005), neuronas cuyos axones recorren totalmente la médula espinal y coordinan impulsos del nado, además de controlar las funciones de algunos músculos y órganos del cuerpo y la respiración.

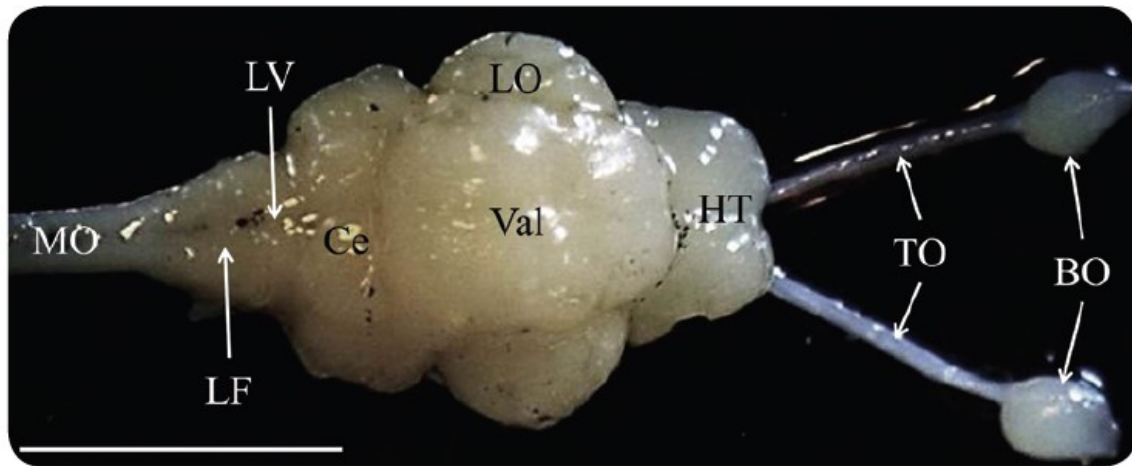


Figura 4. Vista dorsal del encéfalo de *Chelon labrosus*. Bulbos olfativos (BO), Tractus olfativos (TO), Hemisferios telencefálicos (HT), Válvula cerebelar (Val), Corpus cerebelar (Ce), Lóbulos ópticos (LO), Lóbulos vagales (Lv), Lóbulos faciales (LF), Médula oblonga (MO). Barra de escala: 5 mm.

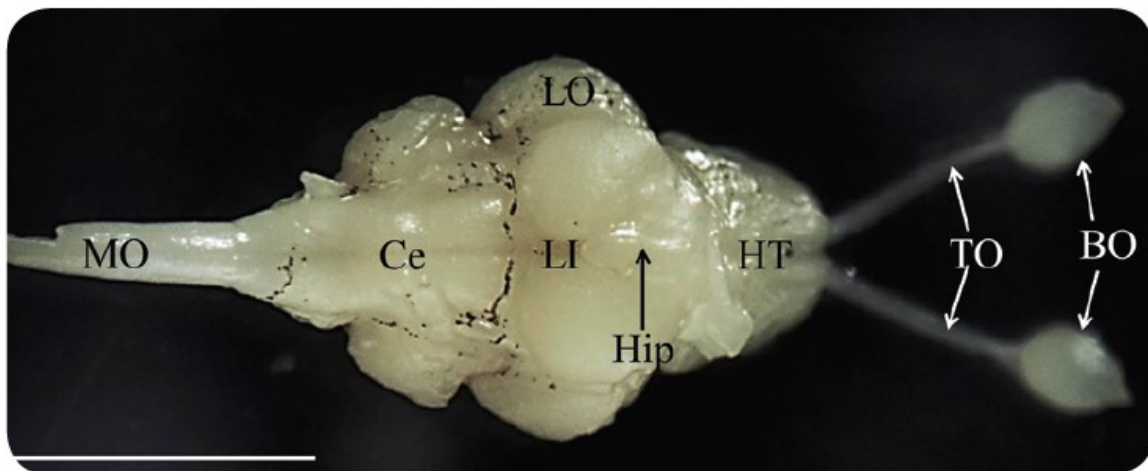


Figura 5. Vista ventral del encéfalo de *Chelon labrosus*. Bulbos olfativos (BO), Tractus olfativos (TO), Hemisferios telencefálicos (HT), Hipófisis (Hip), Lóbulos inferiores (LI), Lóbulos ópticos (LO), Corpus cerebelar (Ce), Médula oblonga (MO). Barra de escala: 5 mm.

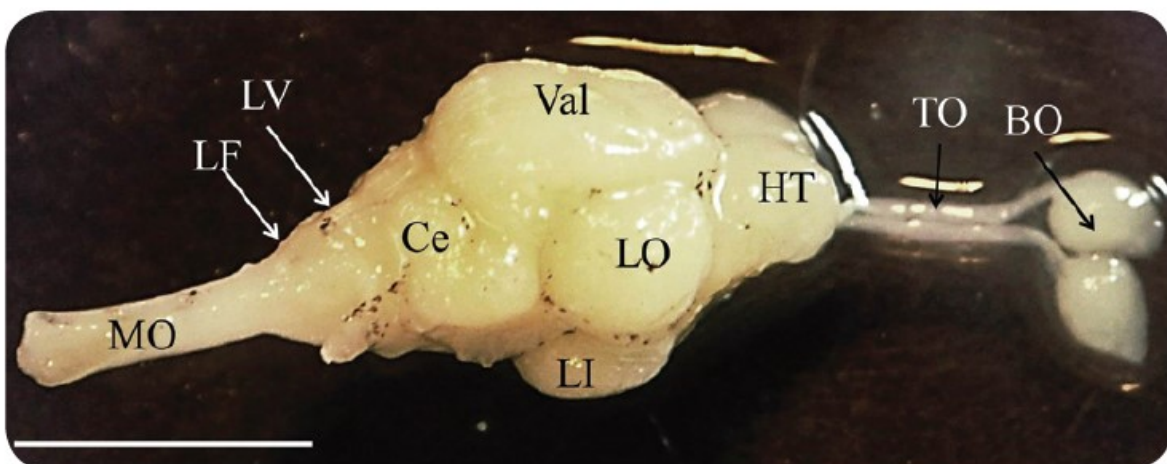


Figura 6. Vista lateral del encéfalo de *Chelon labrosus*. Bulbos olfativos (BO), Tractus olfativos (TO), Hemisferios telencefálicos (HT), Válvula cerebelar (Val), Corpus cerebelar (Ce), Lóbulos ópticos (LO), Lóbulos inferiores (LI), Lóbulos vagales (LV), Lóbulos faciales (LF), Médula oblonga (MO). Barra de escala: 5 mm.

1.3 Proteínas Hu

En vertebrados se pueden distinguir hasta cuatro miembros en la familia de proteínas Hu que al compartir homología con las proteínas ELAV de *Drosophila* a veces se engloban dentro de esa misma familia: HuR se expresa libremente en distintas regiones, HuB, HuC y HuD estas tres últimas se expresan exclusivamente en las neuronas, se les denominan proteínas neuronales Hu (King *et al.*, 1999).

Debido a que estas proteínas están implicadas en varios desórdenes neurológicos es importante conocerlas (Lladó *et al.*, 2004). Se sabe que las proteínas Hu colaboran en muchas funciones biológicas distintas como el desarrollo neuronal, la plasticidad neuronal y la memoria. En el desarrollo neuronal, la sobreexpresión de HuD incrementa la formación de neuritas, y su inhibición resulta en una reducción de neuritas además de estimular el factor de crecimiento de nervios. Así, un ratón deficiente en HuD no presentaría una deformación del cerebro en el adulto, pero sí un deterioro transitorio del desarrollo embrionario de los nervios craneales y las neuroesferas primarias (células progenitoras neuronales) producirán menos neuronas que las de un ratón salvaje (Hinman y Lou, 2008). Respecto a la plasticidad neuronal y la memoria, ratones y ratas que aprendieron paradigmas de discriminación espacial presentan un incremento de la expresión de proteínas Hu en áreas del cerebro asociadas con el aprendizaje espacial, y los ratones deficientes en HuC resultan en un crecimiento espacial deficiente. Asimismo, la sobreexpresión de HuD en las neuronas de ratones transgénicos resulta en un deterioro para la adquisición y almacenaje de memorias.

Sus distintas funciones biológicas son resultado de su capacidad de unirse específicamente al ARNm; son proteínas de unión al ARN clásicas (RBPs), afectando a su expresión. Reconocen y se unen a elementos del ARN ricos en AU (Adenina, Uracilo) y secuencias ricas en U (Uracilo) como por otras secuencias del ARN. Presentan tres sitios de unión al ARN que comparten más del 90% de la secuencia de aminoácidos dentro de los miembros de la familia. La estructura cristalina de HuD RRM1 y RRM2 muestran que forman una hendidura donde el ARN se pliega en láminas- β , de manera similar a otras RBPs.

La función mejor conocida de las proteínas Hu es la regulación de la estabilidad del ARNm (Hinman y Lou, 2008). Este mecanismo se ha caracterizado solamente de forma parcial. Del miembro que más se conoce es HuR y es probable que sea similar a las proteínas neuronales Hu. Uno de los hallazgos más importante fue el descubrimiento de las funciones como factores de procesamiento del ARN. Cuando HuD fue clonado en 1991, se postuló un papel en el procesamiento alternativo del ARN específico de neuronas, basándose en la gran homología entre HuD y las proteínas ELAV y sex-lethal (Sxl) de *Drosophila*. Ambas proteínas de *Drosophila* tienen funciones estabilizadoras como reguladores del procesamiento del ARN. Se ha documentado que esta regulación del ARN al menos en tres niveles de pre-ARNms se realiza al durante la poliadenilación.

Los estudios realizados a lo largo de estos años han expandido el repertorio funcional de las proteínas Hu; mostrando que pueden desarrollar sus funciones tanto en el citoplasma como en el núcleo, y en un futuro ayudará a la total comprensión de las funciones biológicas de estas proteínas.

2. OBJETIVOS

Los teleósteos conforman el grupo de mayor radiación dentro de los vertebrados, con más de 26.840 (Nelson, 2006) especies y un amplio espectro de patrones comportamentales y cerebrales. El estudio del cerebro de los teleósteos ha sido de gran interés, tanto en estudios evolutivos como morfológicos, debido al alto grado de diversidad filogenética y adaptabilidad funcional, acompañada de una elevada variación morfológica. Dado que el mújil, *Chelon labrosus*, es una especie con una distribución muy amplia y que su gran población mundial no se encuentra amenazada es un buen sujeto de estudio para poder realizar diferentes experimentos. Los objetivos de este estudio fueron:

- Estudiar topográficamente las poblaciones neuronales del telencéfalo del mújil adulto, *Chelon labrosus*.
- Comparar la distribución de las poblaciones neuronales del telencéfalo del mújil adulto con diferentes especies, utilizando como marcador neuronal la proteína Hu.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se emplearon 14 individuos adultos de mújil, *Chelon labrosus*, capturados en la zona de As Xubias de la Ría del Burgo (Fig. 7). Tras anestesiarlos se perfundieron a través del cono aórtico con paraformaldehído al 4%. Una vez extraídos de la caja craneana, 8 cerebros fueron incluidos en OCT Compound que se enfrió mediante nitrógeno líquido para más tarde realizar los cortes en el criostato (Microm HM500-MV). Los 6 cerebros restantes se incluyeron en parafina (previa deshidratación en batería de alcoholes de gradación creciente, y baños en xileno) para ser cortados con el micrótopo de rotación. Tras realizar los cortes de 12 μm de espesor, las secciones obtenidas fueron procesadas con técnicas inmunohistoquímicas utilizando el anticuerpo monoclonal anti-proteína neuronal humana (Hu C/D, Molecular Probes) y posteriormente reveladas con métodos de inmunofluorescencia indirecta empleando como fluorocromos la fluoresceína y la rodamina.



Figura 7. Localización de la zona de pesca en As Xubias (A Coruña).

3.1 Procesamiento inmunohistoquímico

Las secciones incluidas en parafina fueron desparafinadas e hidratadas mediante varios baños en xileno y en alcoholes de concentración decreciente. Los cortes incluidos en OCT-Compound fueron sometidos a varios baños con TFS (tampón fosfato salino) 0,01M y un pH de 7,4. A continuación, es necesario desenmascarar el antígeno que puede verse encubierto en el proceso de fijación, para lo cual las secciones se someten a un baño con tampón de citrato sódico 0,01 M pH 6,0 durante 30 min a 95°C. Una vez atemperadas las secciones, se lavan de nuevo con TFS; se incuban con borohidruro de sodio 0,1M durante 30 min para eliminar la posible autofluorescencia de los tejidos o la fluorescencia de fondo. Luego de varios lavados con TFS se incuban con suero normal de cabra diluido en TFS 1/10 durante 1h para bloquear las uniones inespecíficas. Seguidamente los cortes, se incuban con el anticuerpo 1º, anticuerpo monoclonal anti-proteína neuronal humana (Hu C/D, Molecular Probes) diluido en TFS a una concentración de 1/500, durante 20 horas en la cámara húmeda y en oscuridad. Tras varios lavados con TFS se incuban, unos con suero de cabra anti ratón unido a

fluoresceína (Sigma-Aldrich; F2765) y otros con suero de cabra anti conejo ligado a Texas-red (Sigma-Aldrich; T862) diluidos 1/100 en TFS durante 2h. Este proceso se ha de realizar en total oscuridad al igual que los siguientes para no anular la fluorescencia de estos compuestos. Tras varios baños con TFS y una vez secados a temperatura ambiente, las secciones se montan con Mowiol para poder observarlos en el microscopio de fluorescencia.

3.2 Procesamiento de imágenes

Las fotografías de las secciones fueron tomadas con una cámara microscópica digital modelo DP-70 (Olympus, Tokio, Japón) conectada a un microscopio Nikon (Eclipse 90). El ajuste de contraste, brillo e intensidad de las imágenes se realizó mediante Corel Photoshop (Ottawa, Canadá) y los esquemas de los perfiles del cerebro del mújil se obtuvieron a partir de fotografías ya obtenidas.

4. RESULTADOS

En el presente trabajo se ha estudiado la topografía del telencéfalo del múgil adulto mediante técnicas inmunohistoquímicas. El empleo de anticuerpos contra HuC/D permite distinguir agrupaciones neuronales tanto en la parte dorsal como ventral de los hemisferios telencefálicos del múgil. Estudios previos empleando igualmente anticuerpos contra Hu (Blanco *et al.*, 2016), han demostrado la eficacia de esta proteína como marcador neuronal.

El telencéfalo es la parte más rostral del encéfalo, comprende los bulbos olfativos y los lóbulos telencefálicos. En estos se puede distinguir dos regiones principales: un área telencefálica dorsal (palio) y un área telencefálica ventral (subpalio). A diferencia del resto de vertebrados, el telencéfalo dorsal de peces actinopterigios surge durante el desarrollo temprano por un proceso de eversión (consiste en un plegamiento lateral del tubo neural en su región dorsal), dificultándose de este modo el establecimiento de homologías para esta región entre grupos de vertebrados.

4.1 Telencéfalo ventral

En la región subpalial del múgil se identificaron varios núcleos situados periventricularmente, en contacto con el revestimiento endotelial del ventrículo. En la zona más rostral del telencéfalo se localizan: el núcleo dorsal del área ventral telencefálica (Vd) (Figs. 8 y 9), el núcleo ventral del área ventral telencefálica (Vv) (Figs. 8 y 9), y el núcleo lateral del área ventral telencefálica (Vl) (Figs. 8 y 9). A continuación se encuentran: el núcleo central del área ventral telencefálica (Vc) (Figs. 8 y 9) y el núcleo supracomisural del área ventral telencefálica (Vs) situado encima de la comisura anterior (CA) (Figs. 8 y 9). En los cortes más caudales del telencéfalo se distinguen las siguientes agrupaciones neuronales: el núcleo postcomisural del área ventral telencefálica (Vp) (Figs. 8 y 9), el núcleo intermedio (Vi) (Figs. 8 y 9) que junto con el núcleo entopeduncular (E) (Figs. 8 y 9) se ubican hacia la periferia ventrolateral de los hemisferios telencefálicos.

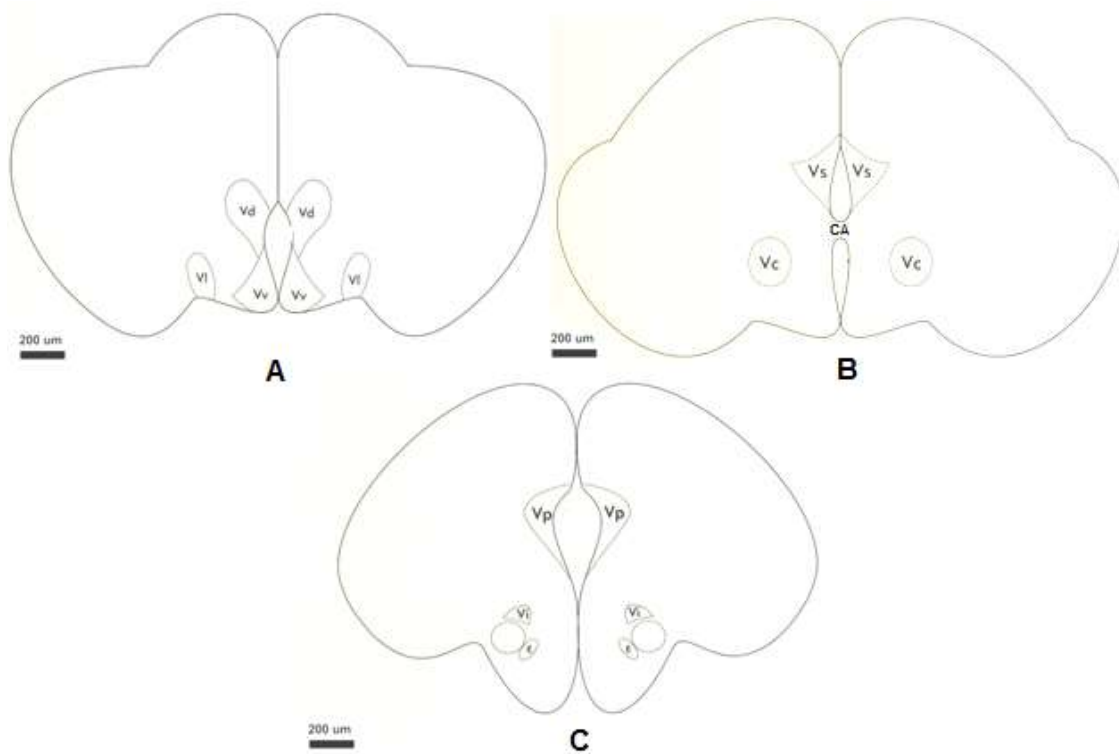


Figura 8. **A.** Núcleo dorsal del área ventral telencefálica (Vd), núcleo ventral del área ventral telencefálica (Vv) y núcleo lateral del área ventral telencefálica (Vl). **B.** Núcleo central del área ventral telencefálica (Vc), núcleo supracomisural del área ventral telencefálica (Vs) y la comisura anterior (CA). **C.** Núcleo postcomisural del área ventral telencefálica (Vp), núcleo intermedio (Vi) y núcleo entopeduncular (E)

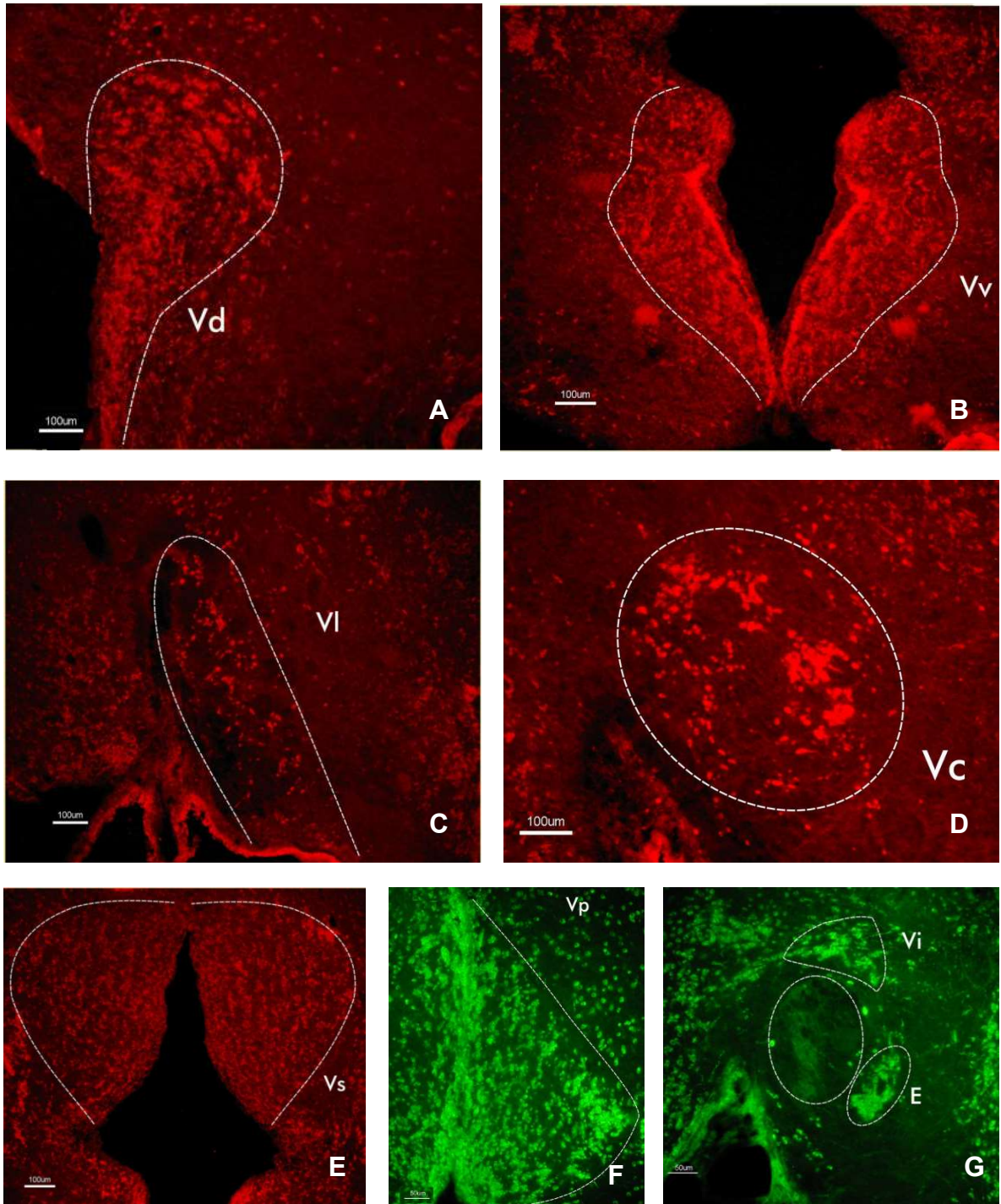


Figura 9. Microfotografías de secciones transversales del telencéfalo ventral (V) de *Chelonia labrosus*. Son visibles los núcleos del telencéfalo ventral (V). **A.** Núcleo dorsal de V (Vd). **B.** Núcleo ventral de V (Vv). **C.** Núcleo lateral de V (VI). **D.** Núcleo central de V (Vc). **E.** Núcleo supra-comisural de V (Vs). **F.** Núcleo post-comisural de V (Vp). **G.** Núcleo intermedio (Vi) y núcleo entopeduncular (E).

4.2 Telencéfalo dorsal

En el telencéfalo dorsal (D) se identificaron siete núcleos: núcleos centrales (Dc 1 y 2) (Figs. 10 y 11), núcleo dorsal de D (Dd) (Figs. 10 y 11), núcleos laterales ventrales (Dlv 1 y 2) (Figs. 10 y 11), núcleo lateral dorsal (Dld) (Fig. 9) núcleos mediales (Dm1, 2 y 3) (Figs. 10 y 11), los núcleos laterales posteriores (Dlp) (Figs. 10 y 11) y por último el núcleo posterior (Dp) (Figs. 10 y 11). La distribución y extensión de estas subdivisiones puede variar entre teleosteos siendo esta la región del encéfalo de teleosteos que muestra mayor variación. Además el hecho de su peculiar ontogenia genera complicaciones en el establecimiento de su homología con otras clases de vertebrados, por lo que es posiblemente la región del encéfalo menos comprendida.

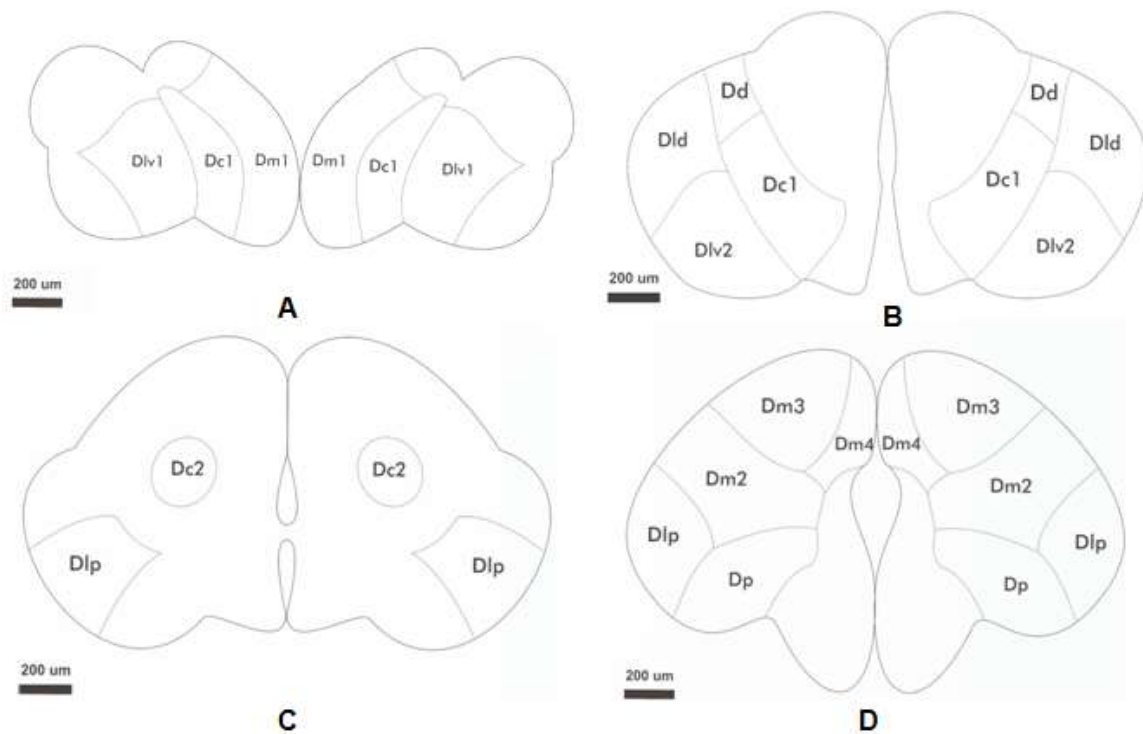


Figura 10. Esquema de los núcleos del telencéfalo dorsal (D). **A.** Núcleos centrales (Dc 1), núcleos mediales (Dm1) y núcleos laterales ventrales (Dlv 1). **B.** Núcleos centrales (Dc 1), núcleo dorsal de D (Dd), núcleo lateral dorsal (Dld) y núcleos laterales ventrales (Dlv 2). **C.** Núcleos centrales (Dc 2) y núcleo lateral posterior (Dlp). **D.** Núcleos mediales (Dm 2, 3 y 4), núcleo lateral posterior (Dlp) y núcleo posterior (Dp).

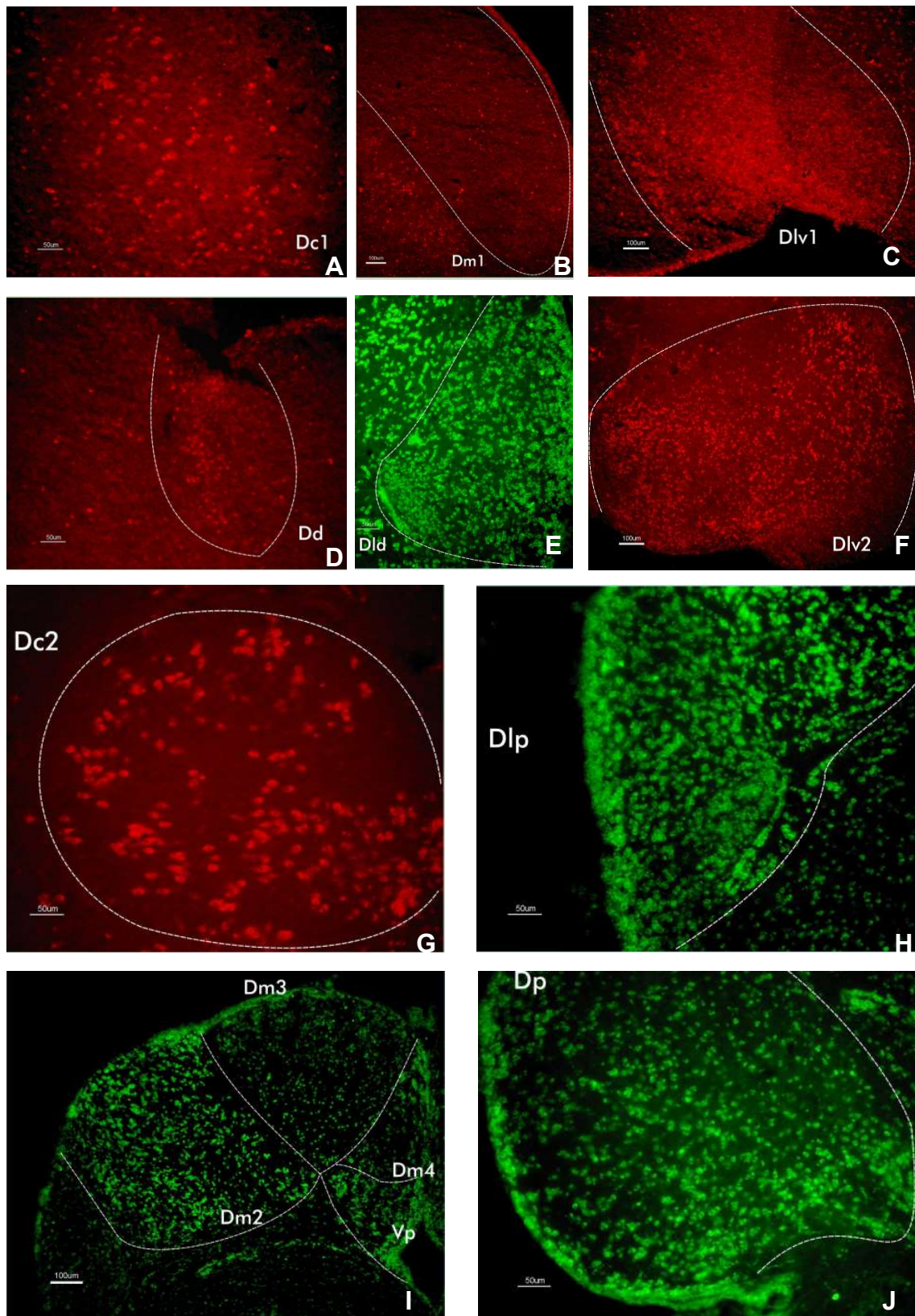


Figura 11. Microfotografías de secciones transversales del telencéfalo dorsal mostrando sus núcleos. **A.** Núcleo central de D (Dc 1) **B.** Núcleo medial de D (Dm1). **C.** Núcleo lateral ventral de D (Dlv1). **D.** Núcleo dorsal de D (Dd). **E.** Núcleo lateral dorsal de D (Dld). **F.** Núcleo lateral ventral de D (Dlv2). **G.** Núcleo central de D (Dc 2). **H.** Núcleo lateral posterior de D (Dlp). **I.** Núcleos mediales de D (Dm 2, 3 y 4). **J.** Núcleo posterior de D (Dp).

5. DISCUSIÓN

5.1 Uso de marcadores neuronales

Para poder comprender el cerebro, tanto su morfología como su funcionamiento son necesarios los marcadores (inmunohistoquímicos) que han emergido como una de las herramientas más valiosas para los neurocientíficos. Su gran utilización como metodología principal de identificación de células neuronales es debida a que es económica, no necesita de mucho equipamiento especializado, emplea reactivos ampliamente disponibles, se pueden utilizar métodos de microscopía de rutina para la recolección de datos, y además, en función del método de visualización, el tejido inmunomarcado puede ser conservado para su posterior referencia (Carrasco *et al.*, 2014). Utilizando anticuerpos contra diferentes componentes celulares, se identifican células que expresan un fenotipo neuronal y, más aún, recolectar información acerca de sus características morfológicas y expresión de proteínas específicas, por tanto cuantos más anticuerpos neuronales se puedan emplear, más información obtendremos a largo plazo. Además, la detección e identificación de anticuerpos ha sido muy útil para la valoración de enfermedades autoinmunes. En esta última década se han detectado también asociados a manifestaciones neurológicas complejas, con o sin presencia de un tumor asociado a autoanticuerpos antineuronales (Carrasco *et al.*, 2014). Como se puede ver en los resultados la prueba inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales anti-Hu C/D derivados del suero proveniente de pacientes con encefalomiелitis paraneoplásica mostró un resultado positivo, lo que demuestra la eficiencia de las proteínas Hu como marcador neuronal en *Chelon labrosus*. También se observa la distribución de las proteínas Hu C/D en el telencéfalo, estas se localizan en pericariones neuronales en las áreas principales, pero no en las células gliales.

Al ser positivo la prueba inmunohistoquímica revela la presencia de proteínas Hu C/D en el cerebro de *Chelon labrosus*, además estas proteínas deben de presentar una estructura similar a las presentes en los humanos, dado que de no ser así no habríamos obtenido un resultado exitoso. Por tanto estos resultados apoyan la idea de la conservación de la secuencia en la familia génica Hu.

5.2 Estudio topográfico del telencéfalo

En el presente trabajo se realizó un estudio topográfico del telencéfalo de *Chelon labrosus*. La zona más rostral del encéfalo es el telencéfalo que comienza con los bulbos olfatorios (BO) de forma ovoide unidos a los hemisferios telencefálicos (HT) a través de los tractos olfativos (TO) que son relativamente largos, parecidos a los de los tractos presentes en especies como *Ariopsis seemanni* (Londoño y Hurtado, 2010). Contrastando, con la longitud inferior que presentan estos tractos en otras especies como *Aphyocharax anisitsi* (Rincon *et al.*, 2016), *Paracheirodon axelrodi* (Obando *et al.*, 2013), el pez cebra *Danio rerio* (Wullimann *et al.*, 1996), *Oryzias latipes* (Anken y Bourrat, 1998, Ishikawa *et al.*, 1999).

Los hemisferios telencefálicos (HT) son pares y ovalados, en ellos se distinguen dos regiones: el área telencefálica dorsal y el área telencefálica ventral, que corresponden respectivamente con el palio y subpalio de otros vertebrados; están localizados tras los tractos olfativos (TO) y rostralmente al lóbulo óptico (LO) el cual se sitúa lateralmente tras los hemisferios telencefálicos (HT) y debajo del techo del cerebelo (Ce) que se encuentra situado caudalmente a los lóbulos ópticos formado por dos lóbulos circulares.

La estructura telencefálica varía entre los distintos grupos y especies tanto de manera exterior como interior. Según el grupo al que pertenezca el telencéfalo de un pez puede presentar diferentes zonas (Vilella, 2017), así en los condriictios se encuentran: palio lateral (Pl), palio dorsal (Pd), palio medial (Pm), núcleo septal (Sc), núcleo amigdalino (nA) y subpaleo ventrolateral (Svl) (Fig.12). Los actinopterigios presentan formaciones paliales (P1P2P3) y los núcleos medial (Vm), lateral (Vl), dorsal (Vd) y ventral (Vv) (Fig. 12). En los teleósteos están presentes en la parte dorsal del telencéfalo: los núcleos mediales (Dm 1, 2, 3 y 4) cuyo número varía en función de la especie, núcleo dorsal (Dd), núcleo dorsolateral (Dld), núcleo lateroventral (Dlv), núcleo central (Dc) y núcleo posterior (Dp). En la zona ventral del telencéfalo: núcleo lateral (Vl), núcleo supracomisural (Vs) y núcleo postcomisural (Vp) (Fig.12).

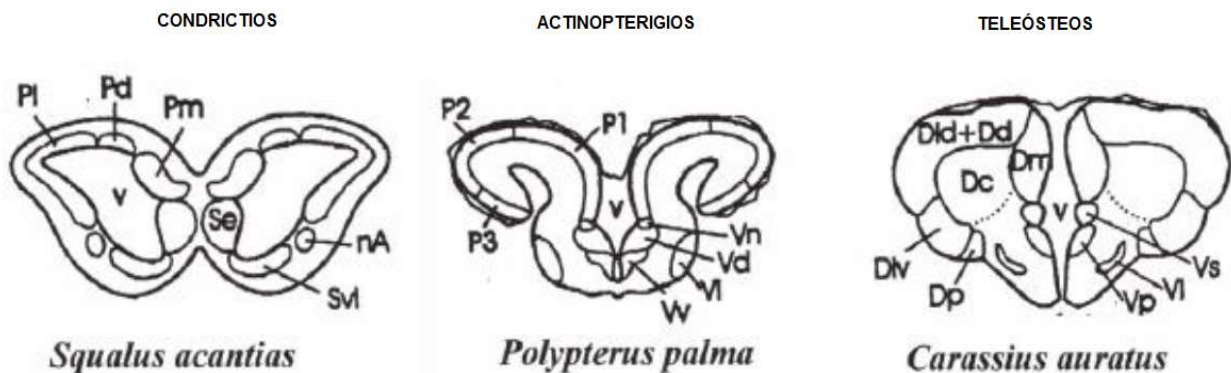


Figura 12. Cortes transversales telencefálicos a nivel de los hemisferios de distintos grupos de peces. **Condrictios:** (Pl) palio lateral, (Pd) palio dorsal, (Pm) palio medial, (Sc) núcleo septal, (nA) núcleo amigdalino, (Svl) subpaleo ventrolateral. **Actinopterigios:** (P1P2P3) formaciones paleales, (Vm), (Vl), (Vd), (Vv) núcleos medial, lateral, dorsal y ventral respectivamente. **Teleósteos:** Dm núcleo medial, (Dld+Dd) núcleo dorsal + núcleo dorsolateral, (Dlv) núcleo lateroventral, (Dc) núcleo central, (Dp) núcleo posterior, todos del área dorsal, (Vl), núcleo lateral, (Vs) núcleo supracomisural y (Vp) núcleo postcomisural, todos del área ventral.

Como se puede ver los núcleos telencefálicos presentes en *Chelon labrosus* concuerdan con los de los peces teleósteos. El núcleo medial (Dm) se subdivide (Dm1, 2, 3 y 4), no todos aparecen en una misma especie, en *Chelon labrosus* están todos mientras que en especies como *Sebastiscus marmoratus* solo hay dos y en *Betta splendens* (Vilella, 2017) o *Macropodus opercularis* presentan tres grupos (Davis et al., 1981). Esta región palial de peces teleósteos se ha propuesto como homóloga de la amígdala de mamíferos.

Lesiones en el Dm, así como la ablación de los lóbulos telencefálicos afectan al procesamiento gustativo en el carpín dorado (Martin *et al.*, 2011), poniendo de manifiesto que el palio dorsomedial de peces teleósteos es un componente esencial del sistema de memoria a la aversión gustativa. Del núcleo medial (Dm) se originan rostromedialmente la mayoría de las fibras del fascículo lateral del telencéfalo que descienden a la pared lateral del área telencefálica ventral formando varios fascículos mal definidos (Davis *et al.*, 1981).

El núcleo central (Dc) también se subdivide, en *Chelon labrosus* solo en dos grupos (Dc 1 y 2), en contraste con la tilapia que tiene hasta 6 o con el *Macropodus opercularis* con hasta cuatro grupos (Dc1, 2, 3 y 4) (Davis *et al.*, 1981), y con la carpa dorada que presenta uno nada más (Vilella, 2017). El núcleo lateral ventral (Dlv) se subdivide, en *Chelon labrosus* solamente aparecen dos (Dlv1 y Dlv2) mientras que en otras especies también puede variar su número. Por último el núcleo entopeduncular (E) suele verse tanto en la zona ventral como en la dorsal si aparece (Vilella, 2017), pero en este caso, en *Chelon labrosus* solo está presente en la zona ventral.

Determinadas núcleos neuronales expresan la calretinina (CR) en teleósteos, como en el múgil, el pez cebra o la trucha, pero difieren según la especie (Castro *et al.*, 2006). Esta es una proteína fijadora de calcio dependiente de la vitamina D, de 29 KDa que pertenece a la familia EF-hand y se caracteriza estructuralmente por la presencia de 6 dominios de unión al calcio. La calretinina se expresa abundantemente en neuronas, incluyendo la retina (que le dio su nombre) y en las neuronas de rutas sensoriales; tiene un papel importante como modulador de la excitabilidad neuronal incluyendo la inducción de la potenciación a largo plazo y puede que juegue un papel importante en la supervivencia de las células nerviosas durante las perturbaciones de la homeostasis del calcio ya que están implicadas en la acumulación intercelular del mismo. Un estudio ha demostrado que la calretinina también es un marcador específico de las neuronas receptoras olfativas y de varias poblaciones neuronales distribuidas a través del telencéfalo y el diencefalo del pez cebra (Castro *et al.*, 2006). Ese trabajo muestra que en el área telencefálica dorsal en el pez cebra la proteína aparece en la zona medial y dorsal del núcleo medial (Dm), en la zona dorsal del núcleo dorsal (Dd) y en el núcleo posterior (Dp); sin embargo la expresión de la calretinina en Dm y Dd no ocurre en el múgil ni en la trucha (Castro *et al.*, 2006). En el subpalio la distribución de las neuronas positivas en calretinina es similar en estas tres especies, sin embargo hay algunas diferencias: en la trucha solo las neuronas de la parte rostral de Vd expresan la calretinina, mientras que en el pez cebra son positivas por toda la extensión rostrocaudal de Vd, y en el múgil también se ha localizado una notable población subpalial de neuronas positivas en calretinina (Castro *et al.*, 2006).

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio experimental llevado a cabo en el mújil son:

- La anatomía del telencéfalo de *Chelon labrosus* responde al esquema general de teleósteos.
- La presencia de proteínas Hu en el cerebro de *Chelon labrosus* que se distribuyen en pericariones neuronales han permitido realizar un estudio topográfico de las principales áreas telencefálicas, confirmando su eficiencia como marcador neuronal en el mújil.

6. CONCLUSIÓNS

As conclusións deste estudo experimental levado a cabo no muxo son:

- A anatomía do encéfalo do *Chelon labrosus* responde o esquema xeral de teleósteos.
- A presenza de proteínas Hu no cerebro de *Chelon labrosus* que se distribúen en pericarions neuronais permitiron realizar un estudo topográfico das principais áreas telencefálicas, confirmando a súa eficiencia como marcador neuronal no muxo.

6. CONCLUSIONS

The conclusions of this experimental study carried out in the grey mullet are:

- The anatomy of the telencephalon of *Chelon labrosus* responds to the general scheme of teleosts.
- The presence of Hu proteins in the brain of *Chelon labrosus* that are distributed in neuronal pericarions have enabled to realice a topographic study of the principals telencephalic areas, confirming their efficiency as a neuronal marker in the grey mullet.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Alfaro V., Blasco J., Carbonell T., Gutiérrez J., Navarro I., Pagés T., Palacios L., palomeque J., Planas J., Riera M., Saiz M., Torrella J.R. y Viscor G. 2005. Fisiología animal. Departamento de Fisiología de la Universidad de Barcelona.
- Anken R, Bourrat F. 1998. Brain Atlas of the Medaka fish *Oryzias latipes*. Paris (Francia): Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). p. 29.
- Arias M., de la Torre M. y Fijo M.I. 2013. Gobierno de España, Ministerio de Economía y Competitividad. Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía. IctiTerm. Disponible en: http://www.ictiTerm.es/nombre_cientifico.php?nc=148
- AsturnaturaDb. 2004-2017. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/especie/chelon-labrosus.html>
- Blanco M., Sánchez A., Delgado M.J. y Valenciano A. 2016. Brain Mapping of Ghrelin O-Acyltransferase in Goldfish (*Carassius Auratus*): Novel Roles for the Ghrelinergic System in Fish. Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University. The anatomical record; 299:748–758
- Carrasco A., Alarcón I., Gonzalez C. y Graus F. 2014. Identificación y utilidad clínica de los anticuerpos antineuronales. Elsevier España, S.L.U.
- Castro A., Becerra M., Manso M.J. y Anadón R. 2006. Calretinin immunoreactivity in the brain of zebrafish, *Danio rerio*: distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. I. Olfactory organ and forebrain. *Comp Neurol* 494(3): 435-459
- Davis E., Chase R., Morris J. y Kaufman B. 1981. Telencephalon of the Teleost *Macropodus*: Experimental Localization of Secondary Olfactory Areas and of Components of the Lateral Forebrain Bundle. *Behavioral and neural biology* 33: 257-279
- Froese R., Capuli E., Garilay G. y Pauly D. Fishbase. 2017. Disponible en: <http://www.fishbase.se/summary/Chelon-labrosus.html>
- Gilbert S.F. 2005. *Biología del Desarrollo*. Panamericana. 882 pp. (371-372).
- Hinman M. N. y Lou H. 2008. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Lige Sci*; 65 (20): 3168-3181
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2017. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/135689/0>
- Ishikawa Y, Yoshimoto M, Ito H. 1999. A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Fish Biology Journal MEDAKA*, 10: 1-26.
- King P.H., Redden D, Palmgren J.S., Nabors L.B., Lennon V.A. 1999. Hu Antigen Specificities of ANNA-I Autoantibodies in Paraneoplastic Neurological Disease. *Journal of Autoimmunity*; 13 (4): 435-443.

- Lladó A, Mannucci P, Carpentier A.F., Paris S., Blanco Y., Saiz A., Delattre J.Y. y Graus F. 2004. Value of Hu antibody determinations in the follow-up of paraneoplastic neurologic syndromes. *Neurology*; 63(10):1947-1949.
- Londoño L, Hurtado H. 2010. Estudio preliminar morfológico y morfométrico del encéfalo del pez tiburoncito *Ariopsis seemanni*, (Pisces: Ariidae). *Universitas.Scientiarum*, 15 (2): 101-109.
- Martín I., Gómez A., Salas C., Puerto A y Rodríguez F. 2011. Dorsomedial pallium lesions impair taste aversion learning in goldfish. 96(2): 297-305
- Nieuwenhuys R., Donkelaar H.J. y Nicholson C. 1998. The central nervous system of vertebrates. Springer. Volumen I, II, III.
- Nieuwenhuys R. 2009. El sistema nervioso central humano. Panamericana. 336 pp. (9-16).
- Nelson J. 2016. Fishes of the world. 4º Edición.
- Obando M., Gómez E., Tovar M., Rincón L., Caldas M. y Hurtado H. 2013. Estudio morfométrico y topográfico del cerebro del pez neón cardenal *Paracheirodon axelrodi* (characiformes: characidae). *Actual Biol* 35 (98): 45-61.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2017. Departamento de Pesca y Agricultura. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mugil_cephalus/esq
- Rincon L., Cavallino L., Alonso F., Lo Nostro F., Pandolfi M. 2016. Morfometría y topología del cerebro del pez tetra cola roja *Aphyocharax anistsi* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE). *Revista Investigación desarrollo pesquero*, Nº 29: 15-32
- Rodríguez T. 2014. Estudio experimental de las conexiones neuronales del sistema sensorial del trigémino en el pez cebrá (*Danio rerio*). Universidad de A Coruña.
- Vilella E. 2017. Neurobiología de peces. Capítulo 11: Telencéfalo. Hipocampo.Hipófisis. Disponible en: <http://neurobiologiadepeces.blogspot.com.es/2017/04/capitulo-11-telencefalo-hipocampo.html>
- Wullimann M, Rupp B, Relchert H. 1996. Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: a topological atlas. Basilea (Suiza).Birkhauser Verlag. p.144