



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LAS  
CONEXIONES NEURONALES DEL  
SISTEMA SENSORIAL DEL TRIGÉMINO  
EN EL PEZ ZEBRA (*Danio rerio*)**

Trabajo de Fin de Grado presentado por

**ÁNGELA RODRÍGUEZ TRILLO**

Septiembre 2014

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN/ ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.- El Sistema nervioso central .....	3
2.- Mecanismos y vías de la somatosensación cefálica.....	5
3.- Sistema sensorial del trigémino: antecedentes.....	7
4.- Características del pez zebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	8
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>11</b>
1.- Proyecciones primarias sensoriales del trigémino .....	11
2.- Proyecciones secundarias sensoriales del trigémino .....	13
3.- Marcajes recíprocos .....	16
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>23</b>
<b>ANEXO: LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>25</b>

# RESUMEN

El sistema sensorial del trigémino transmite información somatosensorial principalmente recogida por receptores presentes en la cabeza. Los receptores somatosensoriales reconocen una amplia gama de estímulos, tales como productos químicos nocivos, presión y temperatura. El objetivo del presente estudio es conocer las conexiones primarias y secundarias del sistema sensorial del trigémino en un teleósteo, el pez zebra (*Danio rerio*). Para ello se emplearon carbocianinas (DiI, DiO) como trazadores que revelan las conexiones neuronales por difusión tanto anterógrada como retrógrada a lo largo de la célula. En el pez zebra el nervio trigémino se relaciona con estructuras encefálicas como el núcleo sensitivo del trigémino (STN) y la raíz descendente del trigémino, que constituyen las conexiones primarias del sistema sensorial del trigémino, el núcleo mesencefálico y el núcleo motor del trigémino. A su vez el STN proyecta bilateralmente al lóbulo caudal del cerebelo (Lca), área octavolateral, con los que está recíprocamente conectado, cresta cerebelosa (CC) y al núcleo motor del trigémino (MTN) e ipsilateralmente a la raíz descendente. Estas conexiones son similares a las documentadas en otros ciprínidos así como en otros vertebrados, por lo tanto el sistema de integración rombencefálica de la información somatosensorial está conservado en vertebrados.

# ABSTRACT

The trigeminal sensory system transmits information primarily gathered by head's somatosensory receptors. The somatosensory receptors recognize a wide range of stimuli, such as nocuous chemicals, pressure and temperature. The aim of this study is to determine the primary and secondary connections of the trigeminal sensory system in a teleost, the zebrafish (*Danio rerio*). Carbocyanines (DiI, DiO) used as tracers reveal neural connections by diffusion along the cell both anterograde and retrograde. The zebrafish's trigeminal nerve is related to brain structures such as the sensory trigeminal nucleus (STN) and the descending trigeminal root constituting primary connections of the sensory system, and the mesencephalic trigeminal and trigeminal motor nuclei. The STN projects bilaterally to the caudal lobe of the cerebellum (Lca), the octavolateral area, with which is reciprocally connected, the crista cerebellaris (CC) and the trigeminal motor nucleus (MTN), and ipsilaterally to the descending trigeminal root. These connections are similar to those documented in other cyprinids and vertebrates, therefore the rombencephalic integration system of the somatosensory system is conserved in vertebrates.

# INTRODUCCIÓN

## 1.- Sistema nervioso central

El sistema nervioso central está formado por el encéfalo, que es la parte más rostral, y la médula espinal. Clásicamente el encéfalo de los vertebrados se divide en cinco partes que, de rostral a caudal son el telencéfalo y diencefalo (representando en conjunto el prosencéfalo o encéfalo anterior), el mesencéfalo o encéfalo medio y el metencéfalo (incluyendo el cerebelo y protuberancia anular) y el mielencéfalo (que en conjunto constituyen el rombencéfalo o encéfalo posterior). Al conjunto formado por el rombencéfalo y el mesencéfalo también se conoce como tronco encefálico (Nieuwenhuys, 2009).

En la parte frontal del encéfalo se encuentran los bulbos olfativos, un par de estructuras que reciben y procesan señales de las narinas a través de dos nervios olfativos. Los lóbulos olfativos están más desarrollados en peces que cazan principalmente por el olor, como los mixinos, tiburones y peces gato. Tras los lóbulos olfativos se encuentran los lóbulos telencefálicos, estructura bilobular que en los peces concierne sobre todo al olfato (Nieuwenhuys et al, 1998).

Conectando el encéfalo anterior al encéfalo medio o mesencéfalo se encuentra el diencefalo. El diencefalo realiza varias funciones asociadas con el control de la secreción hormonal y la homeostasis. Clásicamente el diencefalo se divide dorsoventralmente en epítalamo (complejo pineal y habénulas), tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo. El órgano pineal realiza diferentes funciones, incluida la percepción de luz, el mantenimiento del ritmo cardíaco y el control de los cambios de pigmentación.

El encéfalo medio o mesencéfalo contiene los dos lóbulos ópticos. Estos lóbulos son de mayor tamaño en especies cuya estrategia de caza se basa en el acecho, como la trucha arcoíris y los cíclidos.

El rombencéfalo o encéfalo posterior se encuentra entre la médula espinal y el mesencéfalo. Está constituido por el metencéfalo, implicado en la natación y el equilibrio, y por el mielencéfalo, que es la parte más posterior del encéfalo y controla las funciones de algunos músculos y órganos del cuerpo y de la respiración. El cerebelo, localizado en el metencéfalo, es una estructura monolobular por lo general de gran tamaño y habitualmente la parte más grande del encéfalo.

Anatómicamente el rombencéfalo se divide durante la ontogenia en segmentos transversales llamados rombómeros. Actualmente se considera que hay 11 rombómeros (rh), siendo rh11 el más caudal y el rh1 el más rostral, precedido de un segmento ístmico o rh0 que limita con el mesencéfalo o encéfalo medio. La región que abarca desde el rh11 hasta el rombómero rh4 se denomina bulbo raquídeo o mielencéfalo. En la región que va desde el rh3 hasta el rh1 se encuentra ventralmente la parte del rombencéfalo denominada puente o zona pontina y dorsalmente en el rombómero 1 (rh1) se localiza el cerebelo, formando todo ello lo que se denomina metencéfalo.

Se considera al rombencéfalo como una parte primitiva del sistema nervioso central, es decir, es la región del encéfalo que más se parece cuando se comparan especies muy separadas filogenéticamente, como peces o anfibios con mamíferos. Podríamos decir que se desarrolla tempranamente en la evolución sin sufrir modificaciones sustanciales a lo largo de la filogenia. Este conservadurismo evolutivo quizá tenga que ver con su

importante papel en el mantenimiento de funciones comunes vegetativas y vitales para la supervivencia de cualquier vertebrado como la respiración, la presión sanguínea o el ritmo cardiaco. Los diferentes compartimentos del rombencéfalo están especializados en diferentes funciones. El rombencéfalo es también un centro importante de relevo o estación intermediaria de información que se origina en las zonas del encéfalo más rostrales y llega a la médula espinal o a algunos músculos del cuerpo. Así, numerosos axones se agrupan formando nervios, denominados nervios craneales que permiten la entrada de información desde el sistema nervioso periférico hacia el interior del encéfalo (nervios sensitivos) y la salida de información desde el encéfalo a distintos receptores periféricos (nervios motores). Algunos nervios craneales permiten tanto la entrada como la salida de información del encéfalo, denominándose nervios mixtos.

En peces hay 10 pares de nervios craneales (10 nervios a cada lado del encéfalo) (Fig. 1) que se nombran con números romanos, de rostral a caudal. Cada uno de ellos está especializado en inervar determinadas estructuras corporales (Wullimann, 1998).

**Nervio I u olfatorio:** nervio sensitivo que da origen al sentido del olfato.

**Nervio II u óptico:** nervio sensitivo que permite la visión.

**Nervio III o motor ocular:** nervio motor cuyas fibras vegetativas inervan la musculatura intrínseca del ojo.

**Nervio IV o troclear:** nervio motor que inerva únicamente el músculo oblicuo mayor del ojo.

**Nervio V o trigémino:** nervio mixto que recibe la sensibilidad de los tegumentos de los dos tercios anteriores del cráneo, de la totalidad de la cara, narinas, orbital y cavidad bucal. A su vez es el nervio motor de los músculos masticadores, entre otros.

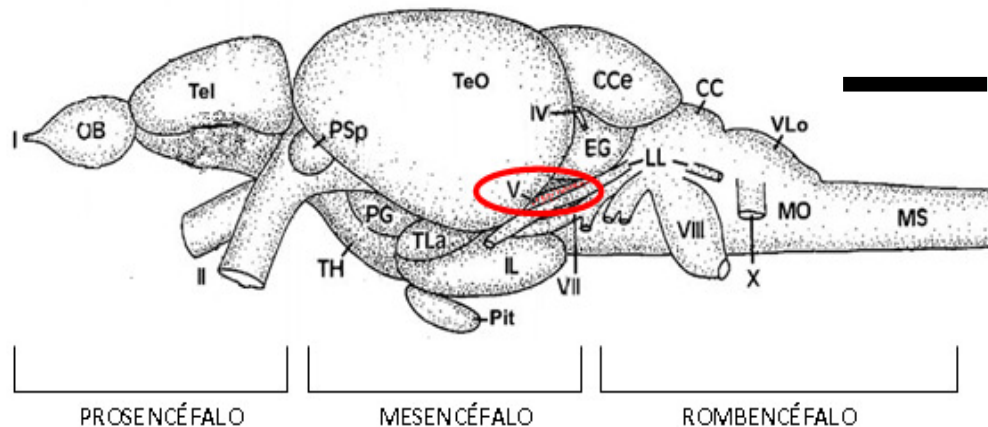
**Nervio VI o abducens o motor ocular externo:** nervio exclusivamente motor, destinado al músculo del recto interno del ojo.

**Nervio VII o facial:** nervio mixto que inerva parte de la cabeza.

**Nervio VIII o auditivo:** nervio sensitivo que se relaciona con la audición y el equilibrio.

**Nervio IX o glossofaríngeo:** nervio mixto relacionado con el sentido del gusto.

**Nervio X o vago:** nervio mixto implicado en funciones tales como la circulación, respiración y digestión.



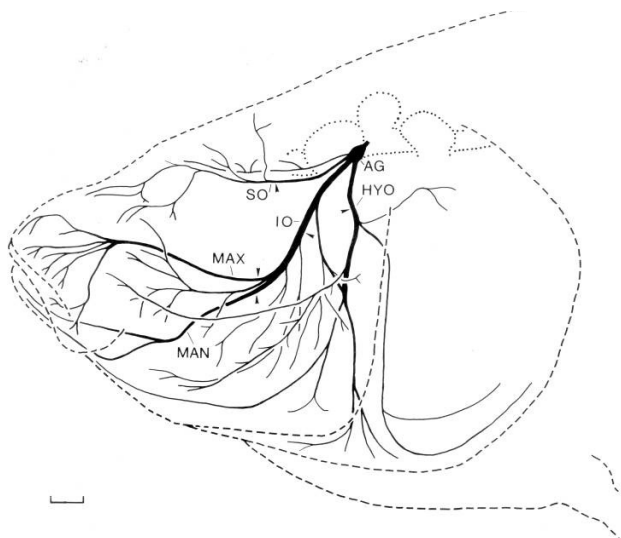
**Figura 1.** Vista lateral del encéfalo de pez zebra (*Danio rerio*). En un círculo rojo aparece el nervio V o trigémino que es centro de este estudio. Abreviaturas de la figura: CC, cresta cerebelar; CCe, cuerpo del cerebelo; EG, eminencia granular; IL, lóbulo inferior; LL, nervios línea lateral; MO, médula oblongada; MS, médula espinal; PG, región pregglomerular; Pit, pituitaria; PSp, núcleo pretektal parvocelular superficial; OB, bulbo olfatorio; Tel, telencéfalo; TeO, techo óptico; TH, hipotálamo tuberal; TLa, toro lateral; VLo, lóbulo vago;; I-X (nervios craneales: I, nervio olfatorio; II, nervio óptico; III, nervio oculomotor; IV, nervio troclear; V, nervio trigémino; VI, nervio motor ocular externo (no representado en la figura); VII, nervio facial; VIII, nervio auditivo; IX, nervio glossofaríngeo; X, nervio vago). Imagen tomada de Rink, 2004. Barra de escala= 1 mm.

## 2.- Mecanismos y vías de la somatosensación cefálica

El sistema somatosensorial de vertebrados consiste en un conjunto de ganglios sensoriales situados en el sistema nervioso periférico (Puzdrowski, 1988). El ganglio sensorial del trigémino (denominado Gasser o semilunar) inerva la mayor parte de la cabeza, diferenciándose tres ramas periféricas (Fig. 2):

- La rama supraorbital cuyas fibras trigeminales representan la rama oftálmica del nervio trigémino, las cuales reúnen proyecciones de la región dorsal orbital y de las narinas.
- La rama infraorbital cuyas fibras representan la rama maxilar y la rama mandibular. La rama maxilar distribuye fibras sensoriales al techo anterior de la boca, al labio dorsal y a la región rostral del ojo y la rama mandibular distribuye fibras motores trigeminales a varios componentes del músculo aductor de la mandíbula, así como fibras sensoriales al piso de la boca, al labio inferior y a la región rostral de la mejilla.
- La rama hiomandibular que distribuye fibras al opérculo, la región angular y a ciertas regiones de la mejilla.

En el ciprínido carpín dorado (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758), al igual que en muchos vertebrados, durante la embriogénesis el ganglio del nervio trigémino se fusiona con el ganglio del nervio de la línea lateral anterior y del nervio facial formando un complejo ganglionar denominado ganglio anterior.



**Figura 2.** Vista lateral de la cabeza de *Carassius auratus* ilustrando la distribución de las ramas supraorbital (SO), infraorbital (IO), con la rama maxilar (MAX) y mandibular (MAN) y la rama hiomandibular (HYO) en la cabeza, así como la posición del ganglio anterior (AG). La línea exterior del encéfalo está indicada por puntos; la línea exterior del cuerpo está indicada por guiones. Imagen tomada de Puzdrowski, 1988. Barra de escala = 1mm.

Al igual que en otros vertebrados, el ganglio sensitivo del trigémino en el pez zebra se forma a cada lado de la cabeza, entre el ojo y el oído. Las primeras neuronas sensoriales del trigémino nacen en torno a las 11 horas post fecundación y rápidamente se ensamblan en un ganglio. Después de las 24 horas post fecundación, el ganglio media en la respuesta a estímulos mecánicos y químicos irritantes, lo que resulta en un comportamiento de escape estereotipado (repetitivo) (Caron et al, 2008).

Los receptores somatosensoriales reconocen una amplia gama de estímulos, tales como productos químicos nocivos, presión y temperatura. La naturaleza multimodal de la información detectada por el sistema somatosensorial se refleja en la diversidad neuronal del ganglio sensorial. Se pueden distinguir dos principales subpoblaciones de neuronas

somatosensoriales: las neuronas propioceptivas que traducen estímulos inocuos como un destello luminoso, mientras que las neuronas nociceptivas detectan estímulos potencialmente dañinos.

La señal de alarma, que generalmente es desagradable, es lo que conocemos como dolor. La definición del dolor, dada por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP en inglés): “Es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con daño real o potencial de los tejidos”. El proceso por el cual los individuos perciben el dolor se llama nocicepción (noxa=daño). Los estímulos que producen daño, se conocen como estímulos nocivos o nociceptivos y se deben diferenciar de los estímulos que producen dolor (estímulos dolorosos). Los receptores sensoriales que se encargan de percibir los estímulos nocivos se llaman nociceptores.

En un estudio realizado a la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) (Sneddon, 2003) se determinó qué tipos de receptores somatosensoriales están presentes en la cabeza de este pez teleosteo. Se encontraron cinco tipos de receptores diferentes:

- Receptores de adaptación rápida que responden a una estimulación mecánica.
- Receptores de adaptación lenta que responden a estímulos mecánicos.
- Nociceptores polimodales que responden a estimulación nociva mecánica, térmica y química.
- Nociceptores mecanotermiales que responden a estímulos mecánicos y calor nocivo.
- Receptores mecanoquímicos sensibles a la estimulación mecánica y química.

Los mecanorreceptores y los termorreceptores pueden ser terminaciones nerviosas libres o receptores encapsulados (como corpúsculos de Paccini o Ruffini o los discos de Merkel), y se caracterizan por tener un umbral bajo de estimulación, es decir, que requieren de estímulos poco intensos para activarse. Los nociceptores propiamente dichos, requieren de estímulos de mayor intensidad para poder activarse. Se conocen comúnmente como terminaciones nerviosas libres.

La transmisión de los impulsos que se originan en los nociceptores (impulsos nociceptivos o aferencias nociceptivas) se realiza por fibras conocidas como fibras aferentes primarias, cuyos cuerpos celulares o somas corresponden a neuronas del ganglio del trigémino (ganglio de Gasser). Los impulsos llegan al tronco encefálico por el componente sensitivo de la raíz del nervio trigémino. Estas fibras aferentes primarias pueden ser de dos tipos: fibras nerviosas pequeñas mielínicas, conocidas como A $\delta$  y fibras más pequeñas no mielínicas, fibras C. (Sneddon, 2004).

El sistema nociceptor de los vertebrados amniotas (reptiles, aves y mamíferos) está bien estudiado, con una gran cantidad de información acerca de las propiedades nociceptivas, afectación del sistema nervioso central y las respuestas in vivo a una experiencia nociva. Sin embargo, se sabe relativamente poco acerca de la nocicepción en los vertebrados anamniotas (peces y anfibios).

En la actualidad existe un debate abierto acerca de si los peces son capaces de experimentar dolor, siendo considerado éste como una experiencia sensorial y emocional desagradable, importante en el ámbito de la pesca deportiva y el bienestar de los peces. Según ciertos autores, encabezados por Sneddon, la presencia de nociceptores, del sistema trigémino y de áreas de procesamiento de la información determinan la capacidad de sentir dolor por parte de los peces. Además de estos argumentos, Sneddon ha llevado a cabo una serie de experimentos en la trucha arcoiris (Sneddon, 2003) donde expone a este pez a agentes nocivos como son el veneno de abeja, solución de ácido acético y solución

salina, inyectándolas en la región oral. La respuesta de la trucha arcoiris fue alejarse del agente agresivo y rascarse la boca contra la grava de la pecera, considerando esta respuesta como una sensación de dolor por parte del pez. Sin embargo para otros autores, como Rose, la consideración de que los peces son capaces de experimentar dolor es erróneo además de un pensamiento antropomórfico, basándose en tres argumentos (Rose, 2002):

1. Las respuestas de comportamiento a los estímulos nocivos son independientes de la experiencia psicológica del dolor.
2. La conciencia del dolor en los seres humanos depende de las funciones de regiones específicas de la corteza cerebral.
3. Los peces carecen de estas regiones encefálicas o cualquier equivalente funcional, por lo que es insostenible que puedan experimentar dolor.

Rose establece que el dolor tiene un aspecto senso-perceptual y un aspecto sentimental-emocional. La parte perceptual nos dice que hemos sido heridos, al igual que la primera sensación cuando te golpeas el pulgar con un martillo. La parte sentimental- emocional es independiente, ya que es el sufrimiento que sigue después de que primero nos demos cuenta de golpear el pulgar. En contraste con el dolor, la nocicepción es el procesamiento no consciente de estímulos nocivos (Rose, 2007). Por eso reacciones de protección a los estímulos nocivos son características universales de la vida animal. Estas reacciones ocurren en las formas de vida más simples, como las amebas, que no tienen sistema nervioso, pero se alejará de sustancias químicas potencialmente nocivas o ante estímulos mecánicos. Muchos invertebrados, como las estrellas de mar, no tienen encéfalo, sólo receptores sensoriales conectados a través de un anillo nervioso a células contráctiles que causan movimientos en respuesta a estímulos nocivos. Así, las reacciones de protección no requieren un complejo sistema nervioso y ocurre en animales que son incapaces de percepción consciente.

### **3.- Sistema sensorial del trigémino: antecedentes**

El sistema sensitivo del trigémino consta del ganglio trigeminal (ganglio de Gasser) en el que se encuentra la primera neurona de la vía somatosensorial. Estas neuronas son monopolares, y sus axones se bifurcan. Mientras que sus prolongaciones periféricas viajan por una de las tres ramas periféricas del trigémino (oftálmica, maxilar y mandibular) hasta los distintos receptores, las prolongaciones proximales viajan centralmente hasta hacer contacto con el núcleo sensitivo o principal del trigémino, constituyendo el nervio trigémino o V que es un nervio mixto localizado en el rombencéfalo. Como nervio mixto que es el nervio V o trigémino posee una raíz motora ventral y una raíz sensitiva dorsal (Puzdrowski, 1988), siendo su componente sensitivo considerablemente mayor. En el núcleo sensitivo o principal del trigémino se encuentra la segunda neurona de la vía de integración somatosensorial. A partir del nervio, ya dentro del tronco encefálico, el sistema trigeminal sensitivo se bifurca en un tracto descendente, que constituye la raíz descendente del trigémino, y un tracto ascendente que transporta información somatosensorial principalmente al núcleo sensitivo del trigémino.

Un componente característico del sistema somatosensorial es el núcleo mesencefálico del trigémino que no recibe aferencias del ganglio sensitivo, ya que sus neuronas son equivalentes al mismo. Las prolongaciones periféricas de estas neuronas abandonan el tronco encefálico a través del nervio del trigémino y se integran a las tres ramas periféricas, terminando en receptores propioceptivos de estructuras de la cabeza. Estas neuronas representan la una excepción en el sistema nervioso, dado que, son neuronas



sensitivas primarias (relacionadas con receptores) localizadas internamente (Escobar et al., 2006).

El sistema sensorial del trigémino ha sido analizado en estudios previos en otros vertebrados, como en mamíferos (Capra et al, 1992), reptiles (Bangma et al, 1982), aves (Arens et al., 1989), anfibios (González et al, 1988) y en otras especies de peces teleósteos: por ejemplo en carpa (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) (Xue et al., 2006 b), en tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) (Xue et al., 2006 a) y en el carpín dorado (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) (Puzdrowski, 1988), entre otros. La mayor parte de estos estudios se basan en el empleo de trazadores neuronales de primera generación (HRP, WGA...) mientras que los trazadores empleados en este trabajo se conocen como trazadores neuronales de segunda generación (dextranaminas, carbocianinas o (neuro)biotina). Las ventajas de las carbocianinas frente a otros trazadores es que revelan conexiones neuronales anterógradas y retrógradas simultáneamente, se aplican postmortem y son más precisos. Los trabajos llevados a cabo en el estudio del sistema trigémino son pocos y mayoritariamente de los años 80.

#### **4.- Características del pez zebra (*Danio rerio*)**

El pez zebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822) es un pez teleósteo perteneciente a la familia Cyprinidae, del Orden Cypriniformes. Este orden pertenece a la clase Actinopterygii que se caracteriza por poseer aletas radiadas y mandíbulas articuladas (Lauder, 1983).

Este ciprínido está emparentado con las carpas y los barbos, siendo originario del sudeste asiático. Son peces alargados, fusiformes, con una única aleta dorsal, boca dirigida hacia arriba y un par de finas barbillas. Presentan dimorfismo sexual tanto en el tamaño como en el color. Las hembras suelen ser más grandes que los machos y tiene un color de fondo plateado. El macho, sin embargo, adquiere tonalidades más doradas. Sobre los flancos y longitudinalmente se presentan de 5 a 9 bandas de color azul oscuro que comienzan detrás del opérculo y llegan hasta el final de la aleta caudal, dándole un aspecto similar al dibujo de las cebras, del que toma el nombre. Alcanza 50 mm como talla máxima.

El pez zebra es un modelo ideal para estudios de neurobiología del desarrollo, así como de otros campos de la biomedicina. Posee unas características que ofrecen una serie de ventajas, como son: su pequeño tamaño facilita su estabulación y proporciona costes de mantenimiento bajos; las hembras ponen un número muy elevado de huevos; los embriones se desarrollan rápidamente y son semitransparentes hasta las 24 horas post fecundación; y además su genoma está casi totalmente secuenciado (Gilbert, 2005).

# OBJETIVOS

Dado las escasas referencias bibliográficas junto con la diversidad del sistema somatosensorial estudiados en otras especies, los objetivos de este trabajo son:

1. Conocer las conexiones encefálicas, tanto primarias como secundarias, del sistema sensorial del trigémino en el pez zebra.
2. Determinar experimentalmente la situación exacta del núcleo sensitivo del trigémino en el pez zebra, anteriormente basado en criterios topográficos a partir de tinciones generales.

# MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 11 ejemplares adultos de pez zebra, *Danio rerio* (Cypriniforme; Teleosteo) con una longitud estándar corporal que varía entre 31 y 45 mm, obtenidos comercialmente de proveedores especializados. Los animales se anestesiaron profundamente con 0.1% de sal metanosulfonada (o mexilada) del 3-aminobenzoato de etilo (MS-222; Sigma, St. Louis, MO) y fueron perfundidos transcárdialmente con paraformaldehído (Sigma) al 4% en tampón fosfato al 0.1M a pH 7,4 (PB). Para realizar la perfusión se fija al animal sobre una placa de Petri recubierta del polímero o elastómero de silicona (Sylgard®) y sujeto con alfileres entomológicos. Tras realizar una incisión ventralmente a la altura de las aletas pectorales, dejando expuesto el corazón, se introduce el fijador a través de una cánula con ayuda de una jeringuilla y se corta la aurícula para facilitar la salida de la sangre y el exceso de fijador. El propio fijador expulsa la sangre de los vasos sanguíneos, al mismo tiempo que fija los tejidos. Se almacenaron los ejemplares a 4°C en el mismo fijador hasta su uso. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las regulaciones y las leyes de la Unión Europea (86/609/CEE) y de España (Real Decreto 1201/2005) para el cuidado y manejo de animales en la investigación.

Como trazadores se utilizan compuestos fluorescentes lipofílicos cuyo elemento común es la carbocianina (Honig et al., 1989), concretamente el DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindo perclorato de carbocianina) y el DiO (3,3'-dioctadeciloxa perclorato de carbocianina) (Molecular Probes; Invitrogen). Se trata de moléculas que presentan un alto grado de hidrofobicidad, lo que facilita su inserción en la fracción lipídica de la membrana plasmática, donde difunden libremente. Este carácter ha permitido que su empleo se extienda a las técnicas de marcaje de las vías nerviosas, es decir, se emplea como trazador neuronal tanto anterógrado (desde el soma neuronal hasta los axones) como retrógrado (desde los axones al soma neuronal). La principal ventaja de estos compuestos es que pueden usarse para marcar neuronas y sus prolongaciones en tejido que ha sido fijado previamente (trazador post mortem). El DiI presenta su máximo de excitación a 549 nm y su máximo de emisión a 565 nm mientras que el DiO presente su máximo de excitación a 484 nm y su máximo de emisión a 501 nm (ver Web Invitrogen™).

Los trazadores se aplicaron mediante dos procedimientos diferentes. Por un lado, se extrae cuidadosamente el encéfalo del cráneo y se inserta manualmente un pequeño cristal de DiI y/o DiO en la zona de interés bajo un estereomicroscopio (SMZ-U, Nikon) con ayuda de un alfiler entomológico muy fino (minucia) o un filamento de tungsteno afilado electrolíticamente; este procedimiento se llevó a cabo cuando la zona de aplicación es accesible desde el exterior, tales como el marcaje del nervio V o trigémino (2 casos), de la cresta cerebelar (1 caso), del toro semicircular (2 casos) y el lóbulo caudal (1 caso). En los

marcajes del toro semicircular fue necesario retirar la parte caudal del techo óptico. Por otro lado, para facilitar su accesibilidad, cuando la zona de aplicación no es alcanzable desde el exterior o se encuentra situada profundamente, el encéfalo se retiró cuidadosamente del cráneo y se incluyó previamente en un bloque de agarosa al 3% con PB (Agarose Type I Standard, PanReac), se seccionó con un vibratomo (Campden Instruments, UK) hasta la zona de aplicación del trazador. Cada sección se observó al microscopio óptico con el fin de determinar el nivel adecuado para la inyección. El uso de este procedimiento se aplicó en áreas como el núcleo sensitivo del trigémino (2 casos), el núcleo lateral de la válvula (1 caso), el núcleo ventral del tálamo (2 casos), el núcleo medial octavolateral (1 caso) y la raíz descendente del trigémino (1 caso).

En ambos procedimientos la zona de aplicación del trazador fue sellada con agarosa y los encéfalos permanecieron en el fijador dentro de una estufa de incubación a 37°C en absoluta oscuridad, durante un tiempo variable en función del marcaje. Para evaluar la extensión de la zona de inyección y documentar la calidad del marcaje, los encéfalos se observaron 24 horas después de la aplicación del trazador en un estereomicroscopio dotado de cámara fotográfica (Coolpix 950, Nikon).

Tras el período de incubación, se realizaron secciones transversales de entre 70 y 80  $\mu\text{m}$  de espesor en el vibratomo, las cuales se ordenaron sobre portaobjetos gelatinizados. Las secciones fueron montadas con PB 0,2M y glicerina (1:1) y examinadas en un fotomicroscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 90i) equipado con los siguientes filtros:

- **FITC** (isotiocianato de fluoresceína): cuyo rango de excitación es entre 562 y 564 nm y el de su emisión entre 624 y 640 nm.
- **Tx Red** (rojo texas): cuyo intervalo de excitación es entre 482 y 535 nm y el de emisión entre 536 y 540 nm.
- **GFP/DS RED** (proteína fluorescente verde/ proteína fluorescente roja): cuyos rangos de excitación son 450-490 nm y 540-570 nm y sus intervalos de emisión 500-530 nm y 570-680 nm.
- **F-T** (fluoresceína/ rojo texas): cuyos rangos de excitación son 490-505 nm 560-580 nm y sus rangos de emisión 515-545 nm/600-650 nm.

Los dos últimos filtros son dobles, lo que permite observar marcajes dobles con DiI y DiO simultáneamente. Cada sección fue fotografiada con una cámara digital (DP-71, Olympus) incorporada al fotomicroscopio de epifluorencia y las imágenes digitalizadas son transmitidas al Software Olympus DP Controller instalado en un ordenador.

Las fotomicrografías monocromáticas fueron convertidas a escala de gris, invertidas y se ajustaron el brillo y el contraste con el programa informático Corel Photo-Paint (Ottawa, Canadá). Se realizaron perfiles de las imágenes seleccionadas y se realizó la edición de las imágenes con ayuda del programa informático CorelDraw Graphics Suite (Ottawa, Canadá). La nomenclatura utilizada en este trabajo, salvo que se indique lo contrario, corresponde a Wullimann (1996).

# RESULTADOS

En la descripción de los resultados se consideran referencias a todas las vías o neuronas que transmitan información (de salida) a otras estructuras del sistema nervioso central o a receptores periféricos mientras que por referencias se entiende toda vía o neurona que transporta información (de entrada) de receptores periféricos al sistema nervioso central o entre determinadas estructuras dentro del sistema nervioso central. Así al realizar un marcaje en una determinada estructura del SNC consideramos referencias a los campos terminales de axones que se observa en otras regiones y referencias a células, cuyos somas se marcan retrógadamente, que se observan en otros centros diana.

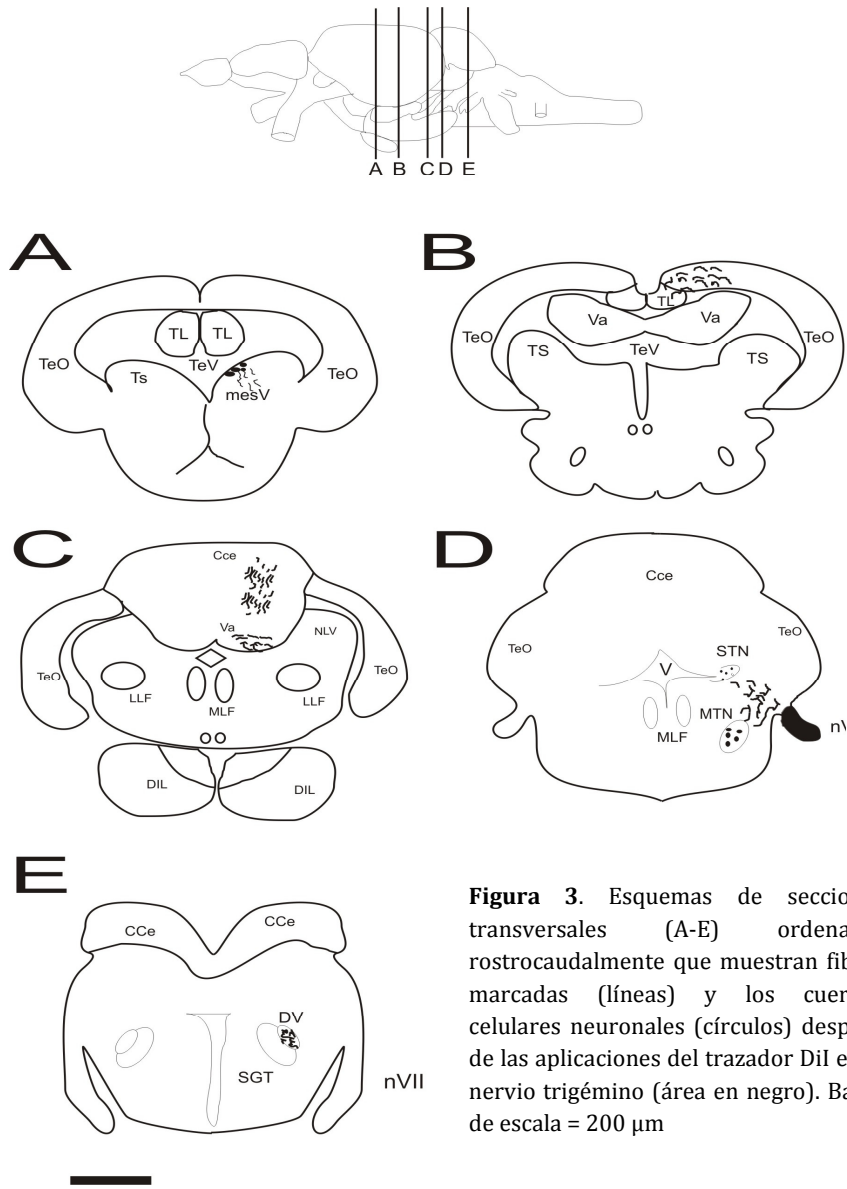
## 1.- Proyecciones primarias del nervio trigémino

### ❖ Aplicación de DiI en el nervio trigémino

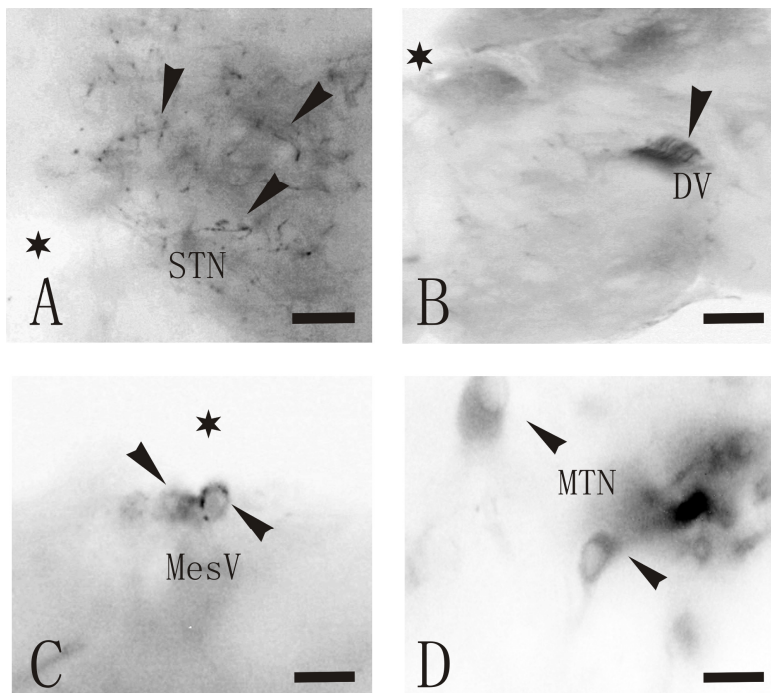
Se realizaron dos experimentos para este marcaje. En el primer caso se utilizó un ejemplar de 45 mm longitud estándar y se marcó la raíz del nervio y su ganglio con DiI, dejando actuar al trazador durante un mes. En el segundo caso también se marcó la raíz del nervio y su ganglio con DiI pero el tiempo de incubación fue de 13 días y el ejemplar de pez zebra empleado tenía una longitud estándar de 34 mm. La duración de este segundo marcaje es menor ya que en la primera ocasión observamos que la difusión fue muy grande debido a que estuvo demasiado tiempo transportando y por tanto se marcaron estructuras al paso que no corresponden con el sistema somatosensorial (ver discusión).

Los resultados del primer experimento de marcaje revelaron fibras en la válvula cerebelar, en el techo óptico, en el núcleo preglomerular medial y lateral, en el toro longitudinal (aunque estas tres últimas estructuras podrían estar marcadas al paso) (Fig. 3B, C) y justo delante de la entrada del nervio encontramos un núcleo, próximo al ventrículo, de fibras que constituyen el aquí definitivo núcleo sensitivo del trigémino (Fig. 3D y 4A). Estas conexiones son ipsilaterales al nervio. Asimismo se observó un gran tracto de fibras cerebelares (Fig. 3C). Tras la entrada del nervio trigémino, se observaron caudal e ipsilateralmente fibras marcadas en la raíz descendente del trigémino (Fig. 3E y 4B). Además, se observaron células marcadas en lo que constituye el núcleo mesencefálico del trigémino ipsilateralmente al nervio marcado (Fig. 3A y 4C). Estas células son de gran tamaño (entre 10-50  $\mu\text{m}$ ) y forma ovalada. Dorsalmente a la entrada del nervio observaríamos un núcleo de células de gran tamaño que corresponden con el núcleo motor del trigémino (Fig. 3D y 4D). Estas conexiones también son ipsilaterales al nervio.

Los resultados del segundo experimento de marcaje fueron los siguientes. En este caso, y como consecuencia de la disminución del tiempo de incubación, el marcaje es más discreto estando marcada la raíz descendente del trigémino (Fig. 3E y 4B), más débilmente por lo que podemos observar como discurren por ella las fibras paralelamente, y a nivel del nervio observamos que todo el marcaje se quedó en las vainas de mielina que recubren los axones antes de entrar en el encéfalo por lo que solo pudimos seguir un tracto marcado que se dirige hasta el ventrículo pero sin llegar a distinguir con claridad las terminaciones sobre el núcleo sensitivo del trigémino y un tracto de fibras que se dirige caudalmente que correspondería con el que núcleo motor del trigémino. Rostralmente no se llegó a ver el núcleo mesencefálico trigeminal ya que el transporte necesitaría más tiempo para poder ver estas células. Todas las estructuras marcadas son ipsilaterales por lo que no observamos ninguna proyección contralateral.



**Figura 3.** Esquemas de secciones transversales (A-E) ordenadas rostrocaudalmente que muestran fibras marcadas (líneas) y los cuerpos celulares neuronales (círculos) después de las aplicaciones del trazador DiI en el nervio trigémino (área en negro). Barra de escala = 200  $\mu$ m



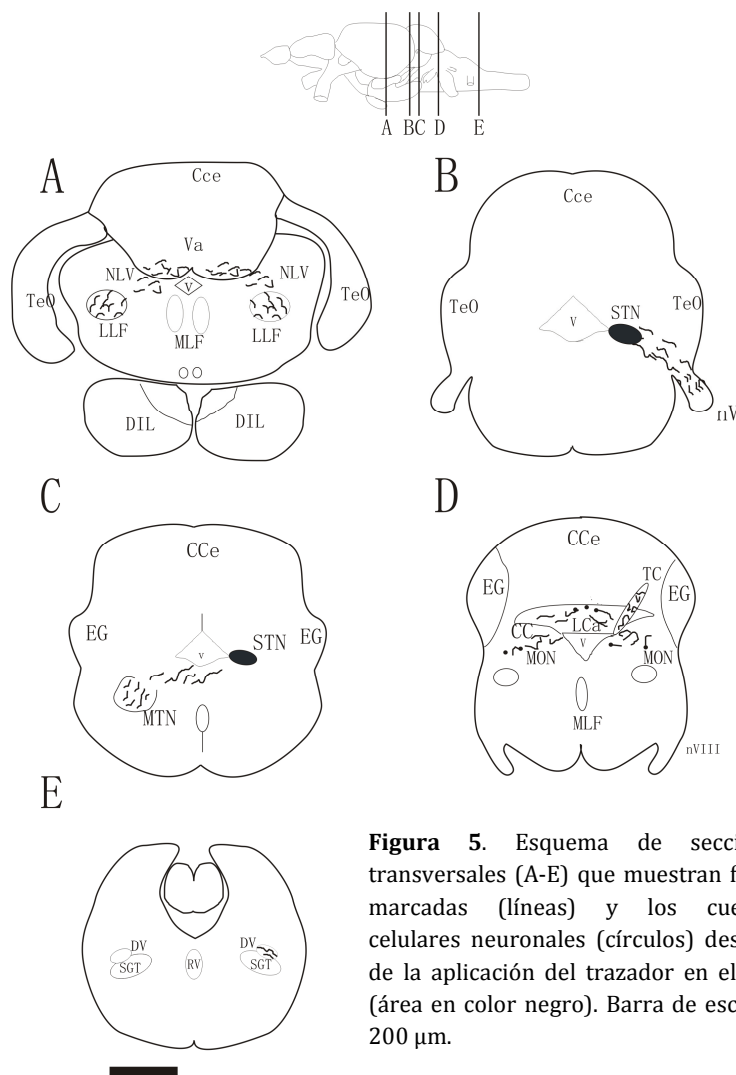
**Figura 4.** Fotomicrográficas de secciones transversales mostrando el marcaje resultado de la aplicación de DiI en el nV. A: fibras marcadas del STN. B: fibras marcadas en la raíz descendente del trigémino (DV). C: células del núcleo mesencefálico del trigémino (MesV). D: células del núcleo motor del trigémino (MTN). Las flechas indican fibras o cuerpos neuronales marcados y las estrellas indican ventrículos. Barra de escala: 50  $\mu$ m (A); 125  $\mu$ m (B,C); 200  $\mu$ m (D).

## 2.- Proyecciones secundarias sensoriales del trigémino

### ❖ Aplicación de trazador en el STN

Para marcar el STN fue preciso incluir el encéfalo en un bloque de agarosa al 3%, procedente de un ejemplar de 31 mm de longitud estándar. En este caso se secciona desde la región caudal por lo que sólo podremos analizar las proyecciones rostrales del STN. Realizamos un marcaje doble, depositando un cristal de DiI en el lado derecho y un cristal de DiO en el lado izquierdo, incubando el encéfalo durante 5 días. Los resultados obtenidos de este experimento fueron los siguientes: como eferencias se observaron axones marcados por la parte dorsal del nervio trigémino (Fig. 5B), en el lemnisco lateral, muy pocas fibras en el núcleo lateral de la válvula y en la parte basal de la capa granular de la válvula se observaron terminales de axones (Fig. 5A y 6A), ipsilateralmente tanto con DiI como con DiO. Al nivel de los lemniscos laterales parece que hay un cruce de fibras en ambos sentidos. Asimismo, se observaron fibras con DiO cruzando al nivel del fascículo longitudinal medial.

Para estudiar las conexiones caudales del STN se repitió el procedimiento descrito anteriormente pero a diferencia del caso anterior el seccionado de aproximación al núcleo se realizó desde niveles rostrales. El cristal de DiI se insertó sobre la superficie expuesta del núcleo. La longitud estándar del ejemplar empleado fue de 33 mm. El tiempo de



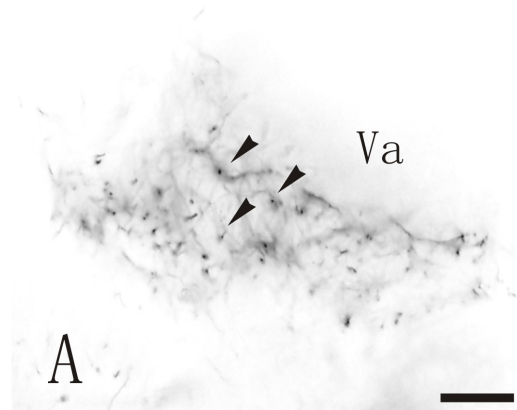
**Figura 5.** Esquema de secciones transversales (A-E) que muestran fibras marcadas (líneas) y los cuerpos celulares neuronales (círculos) después de la aplicación del trazador en el STN (área en color negro). Barra de escala = 200 µm.

incubación fue de 5 días.

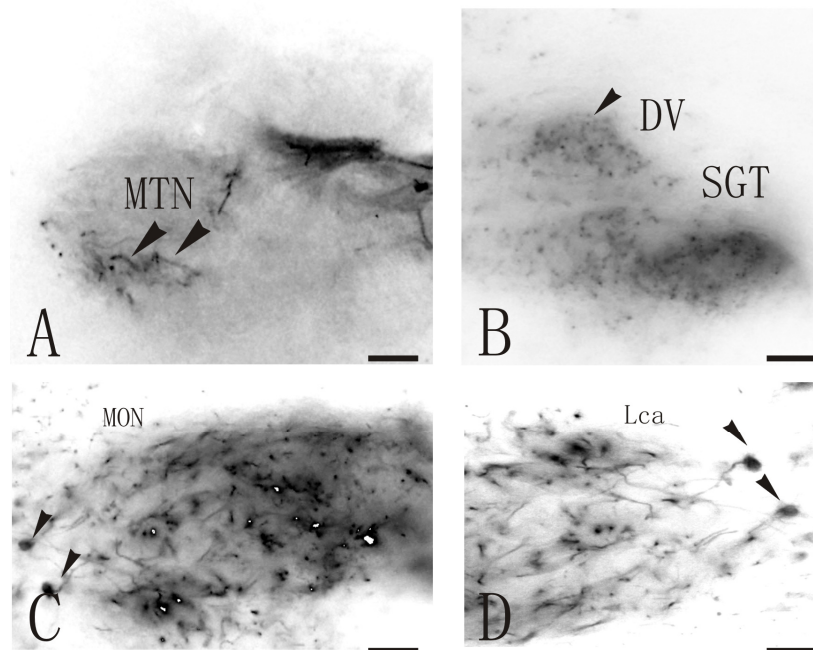
En cuanto a las eferencias se observaron fibras en la raíz del nervio trigémino ipsilateralmente (Fig. 5B), axones cruzando al lado contralateral concentrándose en el núcleo motor del trigémino contralateral (Fig. 5C y 7A). Un gran tracto comunica con el cerebelo. Existen fibras tanto ipsi como contralateralmente en el lóbulo caudal y en la parte medial de la cresta cerebelar (Fig. 5D). El núcleo medial octavolateral (MON) presentó fibras marcadas ipsi y contralateralmente (Fig. 5D),

mientras que raíz descendente del trigémino, que termina en el núcleo funicular medial, presenta fibras ipsilaterales a la vez que también se marca al paso el tracto gustatorio secundario debido a su proximidad con esta (Fig. 5E y 7B).

Como aferencias se observaron bilateralmente cuerpos celulares marcados en el MON (Fig. 5D y 7C) y en la parte basal del lóbulo caudal (Fig. 5D y 7D).



**Figura 6.** Fotomicrografía de sección transversal mostrando el marcaje resultado de la aplicación de DiI en el STN rostral. A: Las flechas indican los puntos terminales de los axones en la válvula cerebelar. Barra de escala: 50  $\mu$ m.



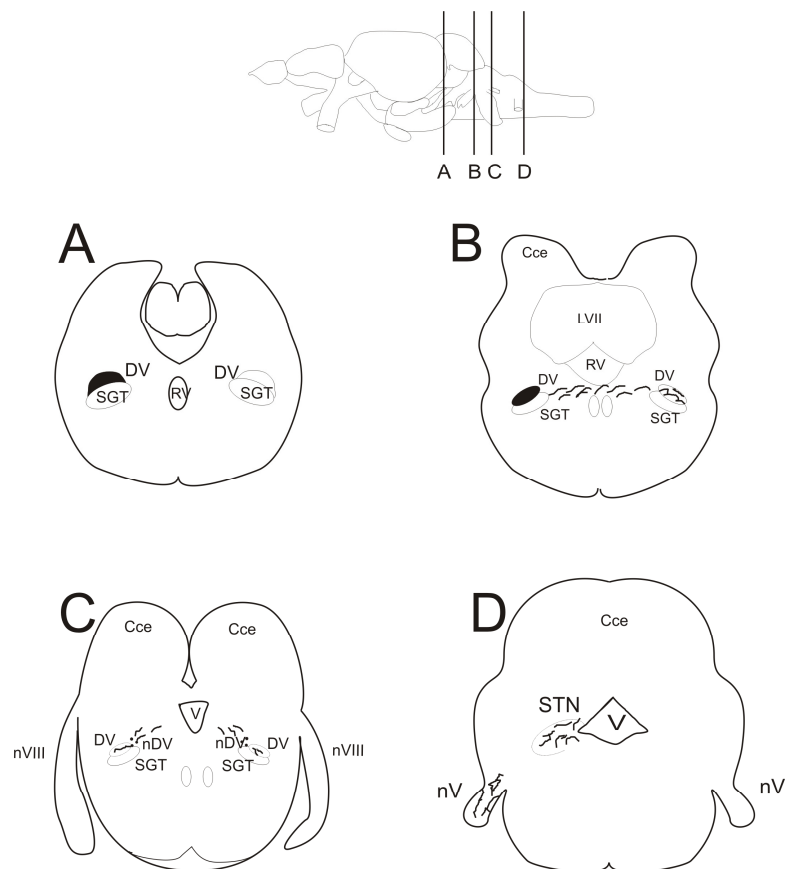
**Figura 7.** Fotomicrografías de secciones transversales mostrando el marcaje resultado de la aplicación de DiI en el STN caudal. A: Flechas indicando fibras en el núcleo motor del trigémino contralateral (MTN). B: En esta imagen se observa la raíz descendente del trigémino (DV) marcada y el tracto gustatorio secundario (SGT) marcado al paso. C: Las flechas indican dos células marcadas observadas en el MON. D: Las flechas indican dos cuerpos celulares en el lóbulo caudal (Lca). Barra de escala: 100  $\mu$ m (A); 200  $\mu$ m (B); 50  $\mu$ m (C); 25  $\mu$ m (D).

### ❖ Aplicación de trazador en la raíz descendente del trigémino

Para este experimento de marcaje incluimos al encéfalo en un bloque de agarosa al 3%. Seccionando desde la región caudal colocamos en la raíz descendente un cristal de DiI en la derecha y un cristal de DiO en la izquierda. La longitud estándar del pez zebra utilizado es de 45 mm y el tiempo de incubación fue de 9 días.

Como referencias fueron vistas fibras que cruzan por sistemas comisurales y comunican ambas raíces, observándose así marcada la raíz descendente del lado contralateral con DiI (Fig 8A y B). Un tracto de fibras ascendió hacia el ventrículo a medida que nos acercamos a la raíz del nervio que termina en un núcleo de fibras cerca del ventrículo y justo delante de la entrada del nervio, pudiendo ser el STN. El nervio apareció muy marcado por fibras (Fig 8D).

En cuanto a las aferencias se observaron células en el lóbulo facial (LVII) y en núcleo motor vagal (NXm) pero estas células se marcaron a través del tracto gustatorio secundario que acompaña a la raíz descendente y en consecuencia también adquirió trazador. Se observan células acompañando a la raíz descendente que constituirían el núcleo de la raíz descendente del trigémino, tanto ipsi- como contralateralmente (Fig. 8C). La raíz descendente no sigue ningún curso rostral a la entrada del nervio trigémino.



**Figura 8.** Esquema de secciones transversales (A-D) que muestran fibras marcadas (líneas) y los cuerpos celulares de las neuronas (círculos) después de la aplicación del trazador DiI en la raíz descendente del trigémino (área en negro). Las secciones se disponen de caudal a rostral. Barra de escala = 200 µm.



### 3.- Marcajes recíprocos

El objetivo de estos marcajes es confirmar las proyecciones eferentes resultado de los marcajes del STN. La aplicación de trazador en las posibles dianas (del STN) revelaría la posición de los somas neuronales de los que proceden estas terminaciones axónicas (STN en este caso).

#### ❖ Aplicación de DiI en la cresta cerebelar (CC)

Para el marcaje de la cresta cerebelar se utilizó un espécimen de pez zebra con una longitud estándar de 33 mm en el que se colocó un cristal de DiI en la cresta cerebelar del lado derecho. El transporte del trazador se dejó durante 5 días. Bajo el fotomicroscopio de epifluorescencia se ve que el cristal está bien posicionado sobre la cresta cerebelar aunque el lóbulo caudal, que se encuentra justo al lado, pudo incorporar un poco de trazador.

Las eferencias observadas fueron un tracto de fibras en el fascículo longitudinal lateral, tanto ipsilateral como contralateral. Desde el STN ipsilateral cruzan fibras al lado contrario dirigiéndose hacia el STN contralateral. Aparecen marcados los lemniscos laterales de ambos lados. Como aferencias se observaron numerosas células en la eminencia granular ipsilateral, así como en el núcleo sensitivo del trigémino (Fig. 9A), ipsi- y contralateralmente.

#### ❖ Aplicación de DiI y DiO en el toro semicircular (TS)

Este experimento de marcaje se repitió en dos ocasiones. En el primero se utilizó un ejemplar de 45 mm, colocando un cristal de DiI en el TS lateral y un cristal de DiO en el TS medial y dejándolos transportar durante 4 días. El segundo experimento se dejó durante 3 días, con DiI en el TS medial y con DiO en el TS lateral (al contrario que en el primer experimento) en un ejemplar de pez zebra de 34 mm. Para depositar los cristales en el toro semicircular fue necesario incluir al encéfalo en un bloque de agarosa al 3%.

Los resultados del primer experimento fueron los siguientes: como eferencias se observó marcado el tracto lateral prosencefálico que manda fibras al núcleo ventrolateral del tálamo. Se observan fibras en el núcleo pretectal periventricular, fibras cruzando al lado contrario en la comisura posterior, en el fascículo lateral longitudinal, hay un núcleo de fibras a la entrada del nervio V y cerca del ventrículo que podrían ser el STN (Fig. 9B) y otro inferior que podría ser el núcleo motor del trigémino (lo observamos con el DiI ya que el marcaje de DiO es muy leve y no transportó tan lejos). En cuanto a las aferencias se observaron células en el núcleo ventrolateral del tálamo y en el núcleo pretectal periventricular. La raíz descendente del trigémino aparece libre de marcaje. En este experimento de marcaje el DiI se colocó muy lateralmente y parte del techo óptico transportó algo del marcaje por lo que vemos muchas partes del encéfalo marcadas procedentes de esta zona.

Los resultados del segundo experimento fueron los siguientes: se observaron fibras en la comisura posterior, en el núcleo ventrolateral del tálamo, al nivel de la entrada del nervio trigémino se observaron fibras cerca del ventrículo, constituyendo el STN (Fig. 9B), un acúmulo de fibras debajo del STN que constituye el núcleo motor del trigémino.

#### ❖ Aplicación de DiI en el núcleo medial octavolateral (MON)

En este caso se colocó un cristal de DiI en el MON de un encéfalo procedente de ejemplar de pez zebra de 33mm de longitud estándar, previamente incluido en un bloque de agarosa al 3% y seccionado transversalmente hasta la zona de interés.

Como eferencias se observó en la cresta cerebelar la arborización de las dendritas procedentes de las células del MON. Se observaron fibras cruzando al MON del lado contralateral, fibras en el lemnisco lateral ipsi-contralateral, terminando este marcaje a nivel interpeduncular. En cuanto a las aferencias se observaron células marcadas en la eminencia granular bilateralmente, con clara dominancia ipsilateral. A la entrada del nervio del trigémino se observó un pequeño núcleo de células a ambos lados, constituyendo el STN (Fig. 9C).

#### ❖ Aplicación de DiI en el núcleo lateral de la válvula (NLV) y DiO en el núcleo oculomotor (NIII)

En este experimento se realizó un marcaje doble, depositando un cristal de DiI en el NLV y un cristal de DiO en el NIII, en el encéfalo de un ejemplar de pez zebra de 31 mm de longitud estándar, incluido previamente en un bloque de agarosa al 3%. Como eferencias aparecen numerosas fibras en el cerebelo y como aferencias existen cuerpos neuronales en el núcleo motor del trigémino. El DiO marcó principalmente las vainas de mielina de los tractos del fascículo medial.

#### ❖ Aplicación de trazador en el núcleo ventral del tálamo (VM)

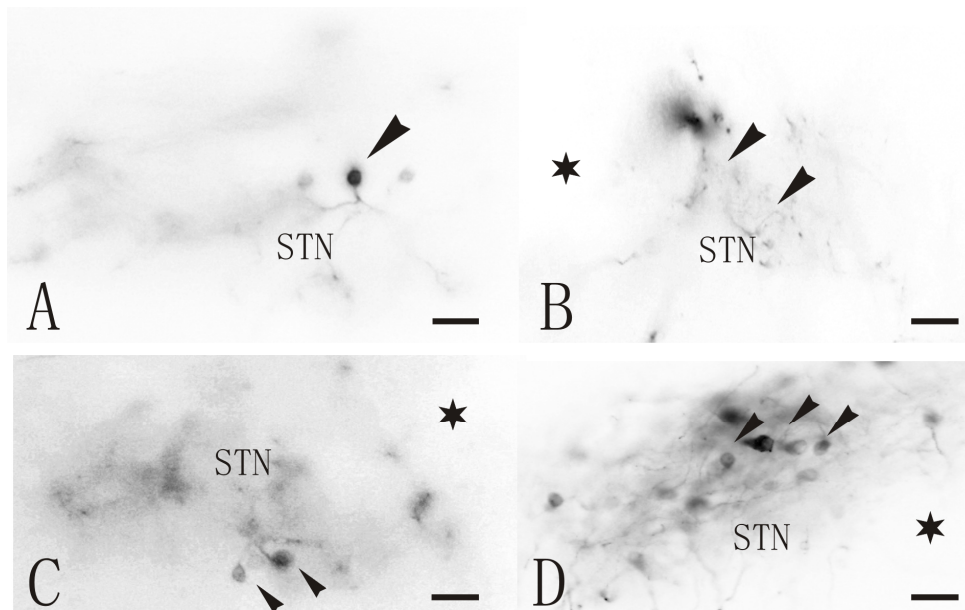
Este experimento de marcaje se repitió en dos ocasiones. Para el primer experimento utilizamos el encéfalo de un pez zebra de 34 mm, en el previamente se había marcado el nervio trigémino. Se depositó un cristal de DiI a la derecha y un cristal de DiO a la izquierda en el núcleo ventral del tálamo, previa inclusión del encéfalo en un bloque de agarosa al 3%. El tiempo de incubación fue de 5 días. Para el segundo experimento de marcaje se depositó un cristal de DiI en el núcleo ventral del tálamo del encéfalo de un pez zebra de 33 mm e incubó durante 4 días.

Los resultados del primer experimento fueron los siguientes: como eferencias se observaron fibras llegando al núcleo ventral del tálamo contralateral, fibras paralelas en el techo óptico, en la comisura habenular y en la parte basal del toro semicircular. En cuanto a las aferencias se observaron levemente marcadas las células del núcleo mesencefálico del trigémino ipsilateral.

Los resultados del segundo experimento de marcaje revelaron como eferencias el toro semicircular y la comisura ventromedial. En este caso no se observaron marcadas las células del núcleo mesencefálico del trigémino.

#### ❖ Aplicación de carbocianina en del lóbulo caudal cerebelar (Lca)

Este experimento se realizó a la vez que el segundo experimento de marcaje del núcleo talámico ventral y se depositó un cristal de DiO en el lado izquierdo. Los resultados observados fueron los siguientes: como eferencias se observó marcado el tracto cerebelar, la eminencia granular y un tracto de fibras a la entrada del nervio trigémino, todo ipsilateral. En cuanto a aferencias se observaron células marcadas en el corpus cerebelar y células en el STN, ipsilateral (Fig. 9D).

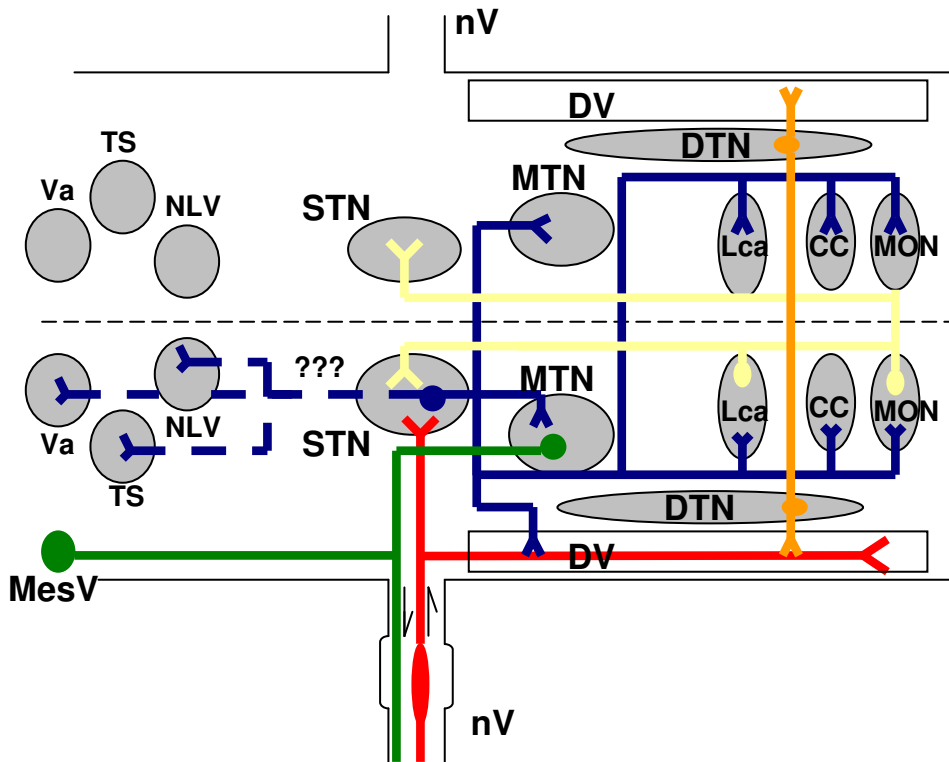


**Figura 9.** Fotomicrográficas de secciones transversales mostrando el resultado observado en el STN procedente del marcaje de distintas proyecciones recíprocas. A: Flecha indicando una célula marcada en el núcleo sensitivo del trigémino (STN) procedente de la aplicación de DiI en la cresta cerebelar (CC). B: En esta imagen se observan fibras débilmente marcadas en el STN procedentes de la aplicación de DiI en el toro semicircular (TS). C: Las flechas indican dos células marcadas del STN al aplicar el trazador DiI en el MON. D: Las flechas indican cuerpos neuronales en el STN tras la aplicación del trazador DiO en el lóbulo caudal (Lca). Barra de escala: 50µm (A, C y D); 100 µm (B).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio experimental se pretende establecer las conexiones primarias y secundarias del sistema sensorial del trigémino representadas en la Figura 10. Como conexiones primarias del sistema sensorial del trigémino, el nervio trigémino comunica con estructuras encefálicas como el núcleo sensitivo del trigémino y la raíz descendente del trigémino y recibe eferencias del núcleo mesencefálico del trigémino y núcleo motor del trigémino. Estas conexiones fueron reportadas anteriormente en otros ciprínidos como son la carpa (Xue et al., 2006b) y el carpín dorado (Puzdrowski, 1988) y en tilapia (Teleósteo percomorfo) (Xue et al., 2006a) así como en otros vertebrados como anfibios, reptiles y mamíferos (González et al., 1988; Bangma et al., 1982; Capra et al., 1992, respectivamente). Las eferencias observadas en el techo óptico, en el núcleo preglomerular medial y lateral, en el toro longitudinal y en la válvula cerebelar no fueron reportadas anteriormente como conexiones primarias del nervio trigémino por lo que se considera que el marcaje de estas estructuras es producto de la gran difusión por un elevado tiempo de transporte del trazador. Además se han observado varios marcajes, pertenecientes al Departamento de Biología Celular y Molecular, realizados en el techo óptico y no se observa ninguna comunicación entre esta región y el sistema sensorial del trigémino.

El núcleo mesencefálico es estudiado en Guppy (*Lebistes reticulatus* Peters, 1859, Teleósteo) (Pombal et al., 1997). Las neuronas que constituyen este núcleo son células sensoriales primarias, con un proceso sensorial periférico, enviando fibras a las ramas



**Figura 10.** Esquema resumen de las proyecciones primarias y secundarias del sistema sensorial del trigémino en el pez zebra. En rojo se representan las conexiones primarias del nervio del trigémino, en donde se puede ver que el nV envía información periférica al STN y a la DV. En verde las proyecciones del núcleo mesencefálico del trigémino y del MTN que envía información del sistema nervioso central a receptores periféricos a través del nV. En azul se observan las proyecciones secundarias del STN a los distintos sitios diana: al MTN, Lca, CC y MON bilateral y a la raíz descendente ipsilateral. Como posibles sitios diana del STN se representan el TS, Va y NLV conectados con el STN mediante una línea discontinua. En amarillo se representan las aferencias del STN procedentes del Lca y el MON. En naranja se representan las conexiones entre ambos tractos descendentes del trigémino (DV). La línea discontinua señala la línea media del encéfalo, separando el lado ipsilateral (lado inferior) del contralateral (lado superior). Ver lista de abreviaturas (Anexo).

periféricas del nervio trigémino. Está ausente en Agnatos, aunque se ha sugerido que las células dorsales de la médula oblongada de las lampreas son estructuras homólogas. En vertebrados no mamíferos se localizan normalmente en el techo óptico, mientras que en los teleosteos se encuentran en la región dorsal del tegmento mesencefálico. Llevan información propioceptiva de los músculos de la mandíbula, la pulpa del diente, tejido peridontal y, posiblemente, los músculos extraoculares, y en la mayoría de los vertebrados juega un papel importante en la masticación y el cierre reflejo de la mandíbula, a través de sus proyecciones a las motoneuronas del núcleo motor del trigémino, conexión no reportada en este trabajo al no ser objeto del mismo. En Guppy se marcan de 1 a 13 neuronas mesencefálicas mientras que en el pez zebra solo hemos encontrado entre 4 y 5 neuronas en el núcleo mesencefálico, al igual que en el carpín dorado (Puzdrowski, 1988). Por lo que parece que el número de células del núcleo mesencefálico del trigémino ha disminuido drásticamente en las líneas de los teleosteos superiores.

La raíz descendente del trigémino aparece marcada tanto al introducir el trazador en el nervio del trigémino como en el núcleo sensorial del trigémino. Asimismo, al introducir el trazador Dil en la raíz descendente del trigémino se observan fibras y terminales axónicas en el nervio trigémino y en el STN, respectivamente, pudiendo confirmar que la raíz descendente recibe información del nervio V y del STN. La raíz descendente del trigémino

es un tracto descendente que comienza a la entrada del nervio trigémino hasta el núcleo funicular medial acompañado de un núcleo de células, denominado núcleo de la raíz descendente, que abarca desde la entrada del nervio VIII o auditivo al nervio X o vago. Ambas raíces descendentes están comunicadas con tractos contralaterales, apareciendo fibras en la raíz contralateral y cuerpos neuronales en el núcleo de la raíz descendente del trigémino del lado opuesto al marcaje. La aplicación del trazador en la raíz descendente del trigémino fue posterior al nervio X, por lo que no se aplicó trazador en el núcleo de la raíz descendente. Esto implica que la raíz descendente y su núcleo acompañante están comunicados (por esa razón observamos neuronas marcadas en el DTN ipsilateral). Con los resultados obtenidos no se puede determinar si las proyecciones observadas en la raíz contralateral proceden de las fibras de la raíz descendente o de las neuronas de su núcleo acompañante. En mamíferos la raíz descendente recibe aportes de fibras de los ganglios del nervio facial (VII), nervio glossofaríngeo (IX) y del nervio vago (X) (Capra et al, 1992), hecho que no se ha confirmado en el pez zebra (resultados presentes) o en otras especies de teleosteos. Según Pombal et al., 1997 las neuronas del núcleo mesencefálico del pez guppy proyectan a la médula espinal a través de la raíz descendente del trigémino, aunque su objetivo es desconocido. En el presente estudio del pez zebra se observa que la raíz descendente no cursa rostralmente a la entrada del nervio trigémino, ni se encontraron marcadas las neuronas del MesV.

El STN en *Danio rerio* es un núcleo de pequeño tamaño constituido por pequeños cuerpos neuronales (5-10  $\mu\text{m}$ ) situado frente a la entrada del nervio trigémino y ventralmente próximo al ventrículo. Esta posición difiere de la reportada por autores anteriores en el pez zebra (Wullimann, 1996) cuya posición se documenta como más dorsal y alejada del ventrículo. El STN envía eferencias ipsilaterales a la raíz descendente, bilaterales al lóbulo caudal, a la cresta cerebelar, al MON y al núcleo motor del trigémino. Seguramente también envíe axones al MTN ipsilateral pero la proximidad de este núcleo con el STN marcado impide diferenciar estas fibras por la excesiva intensidad del punto de marcaje. En cuanto a las aferencias, el STN recibe información del nervio trigémino, del MON y del lóbulo caudal. Todas estas conexiones constituyen las proyecciones secundarias del sistema sensorial del trigémino.

Para confirmar las proyecciones secundarias del componente sensorial del trigémino se llevaron a cabo una serie de marcajes recíprocos en los posibles sitios diana del STN. Uno de los marcajes recíprocos se llevó a cabo en el lóbulo caudal del cerebelo. El lóbulo caudal es una región del cerebelo situado lateralmente al surco posterior lateral. Se compone de tres masas granulares: la parte lateral posterior de la eminencia granular, una zona de transición T y la parte medial posterior de la eminencia granular asociada a sus capas moleculares (Sas, 1987). Se observaron tanto eferencias como aferencias entre el STN y el Lca bilateralmente. En otras palabras, el STN recibe y envía información al Lca. Esta proyección recíproca no fue reportada anteriormente por otros autores pero se confirma en el pez zebra al aparecer tanto la proyección secundaria desde el STN marcado como en el marcaje recíproco desde el Lca.

Marcando la cresta cerebelar, que es una región del cerebelo dorsal al lóbulo caudal, se observan células en el STN marcadas bilateralmente, por lo que se confirma la proyección secundaria en la que el STN envía información a la cresta cerebelar. Esta proyección tampoco fue reportada anteriormente. Las conexiones entre el MON y el STN fueron anteriormente documentadas en el carpín dorado (McCormick et al., 1996). Según McCormick (1996) el STN recibe eferencias del MON pero en este estudio sobre el pez zebra se han descrito tanto eferencias como aferencias entre el MON y el STN. El núcleo octavolateral medial es el núcleo sensorial rombencefálico de primer orden del sistema de la línea lateral que se encuentra en la mayoría de los vertebrados anamniotas de vida acuática (New et al., 1996).

Otro marcaje recíproco se llevó a cabo en el NLV y en el NIII, dado que habían sido reportados anteriormente como posibles dianas del STN, en tilapia y carpa (Xue et al., 2006 a,b). El núcleo lateral de la válvula es un núcleo precerebelar a través del cual se ha determinado la existencia de una vía indirecta entre el STN y el cerebelo en tilapia (Xue et al., 2005). Xue y colaboradores (2005) observaron marcados cuerpos neuronales en el STN y DTN bilateralmente al marcar la parte rostromedial del NLV mientras que si marcaban la parte caudal o lateral del NLV no se observan estas conexiones con el STN ni con el DTN. El NLV es el principal origen de aferencias del cerebelo y está conectado con el cuerpo y con la válvula cerebelar. La válvula cerebelar es una subdivisión del cerebelo que forma una protuberancia rostral que se extiende por debajo del techo óptico y del ventrículo mesencefálico. Se encuentra exclusivamente en peces con aletas radiadas (Actinopterygii) (Wullimann et al., 1989). Según Wullimann y colaboradores (1989), en el carpín dorado se ha documentado conexiones entre la parte medial de la válvula cerebelar y el STN, observándose neuronas en el STN al marcar la válvula cerebelar. Además también se documentó en este mismo artículo la aferencia entre la parte medial de la válvula cerebelar y el NLV. En el presente estudio a pesar de encontrar un pequeño conjunto de fibras en el NLV al marcar el STN, esta proyección no se confirma con el marcaje recíproco del NLV. Puede ser que el marcaje del NLV no fuese correcto (no afectando el trazador en la parte rostromedial de la misma) o que realmente no existe ninguna conexión entre estas dos regiones en el pez zebra. En cuanto al NIII, en el presente estudio no se ha observado ninguna proyección con el sistema somatosensorial del trigémico aunque ha sido documentado anteriormente en tilapia (Xue et al., 2006 a).

El toro semicircular es una estructura del encéfalo medio presente en vertebrados no mamíferos homóloga al colículo inferior de mamíferos. En peces es un centro de integración de la información mecanosensorial y electrosensorial procedente del sistema de la línea lateral y auditivo. La aplicación de trazador en el toro semicircular revela un pequeño grupo de fibras a la entrada del nervio V en lo que podría constituir el STN. Sin embargo, en el marcaje llevado a cabo en el STN no se observan conexiones con el TS aunque éstas han sido descritas previamente en tilapia y en carpa (Xue et al., 2006 a, b). El núcleo ventral del tálamo también ha sido documentado como sitio diana del STN (Xue et al., 2006a, b) pero en el presente estudio no se ha observado dicha proyección.

Las conexiones primarias y secundarias del sistema sensorial del trigémico documentadas en el presente estudio en el pez zebra no difieren mucho de lo publicado anteriormente en otros ciprínidos ni en reptiles (Bangma et al., 1982) y anfibios (González et al., 1988), aunque se encuentran mayores similitudes con sistema somatosensorial de anfibios. Las principales diferencias con reptiles radican en un tracto ascendente que comunica el STN con el núcleo talámico (subdivisión del complejo ventral talámico) y una proyección indirecta a la capa central gris del techo óptico. Además en reptiles se puede observar una proyección directa entre la raíz descendente del trigémico y la capa central gris del techo y al complejo nuclear del tálamo dorsal y pretectal. Mientras que en anfibios se observa que la DV recibe un pequeño aporte de fibras del nervio facial y vago. A partir del STN de anfibios existe una proyección ascendente al núcleo lateral del TS y al núcleo tegmental así como una proyección descendente que comunica con el cerebelo (esta proyección descendente también se corroboró en este estudio). Esto sugiere una estructura del sistema somatosensorial muy conservada en los vertebrados (Nieuwenhuys et al., 1998).

No se observa ningún centro de integración somatosensorial telencefálica que pueda tener una función similar a la corteza cerebral de mamíferos. De todos modos no se puede extraer la conclusión de que los peces no sienten dolor procedente de receptores craneales, pues quizás no se han descrito las conexiones de los centros secundarios con suficiente precisión. Lo que sí parece es que la información se integra mayoritariamente en centros del rombencéfalo y hay poca evidencia confirmada en este estudio de centros

mesencefálicos o diencefálicos de relevo (centros terciarios) de la información somatosensorial hacia el telencéfalo (tálamo ventral, toro semicircular, núcleo lateral de la válvula) lo que sugiere que de existir sería bastante discreta desde el punto de vista neuroanatómico, a diferencia de lo descrito en tilapia (percomorfo), un teleosteo avanzado (Xue et al., 2006 a). De ser éste el caso, sería preciso un mayor número de experimentos para confirmar la existencia de estas vías ascendentes en *Danio rerio*.

## CONCLUSIONES

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

1.- Los centros primarios de integración sensorial del trigémino son el núcleo sensitivo del trigémino y la raíz descendente del trigémino. Todas estas proyecciones primarias son ipsilaterales.

2.- Se ha precisado la posición del STN, situado frente a la entrada del nervio V y próximo al ventrículo, difiriendo con la posición sugerida anteriormente.

3.- El STN del pez zebra envía ipsilateralmente axones a la raíz descendente del trigémino, y bilateralmente al MTN, al Lca, CC y MON. A su vez, el STN recibe aferencias ipsilaterales del Lca y MON.

4.- La raíz descendente del trigémino está acompañada por el núcleo de la raíz descendente, que se extiende desde el nivel de entrada del nervio VIII al del nervio X. dicho núcleo y la raíz descendente están recíprocamente conectados.

## CONCLUSIONS

1.-The primary centers of sensory integration of the trigeminus are the sensory trigeminal nucleus and the descending trigeminal root. All these primary projections are ipsilateral.

2.-It has been specified the exact position of the STN, opposite the entrance to the V nerve and near the ventricle, differing from that previously suggested.

3.-Zebrafish STN sends axons to the ipsilateral descending trigeminal root, and bilaterally to MTN, the LCa, CC and MON. In turn, the STN receives input from the ipsilateral LCa and MON.

4.-The descending trigeminal root is accompanied by an associated nucleus extending from the entrance level of nerve VIII to X. This nucleus and the descending root are reciprocally connected.

# BIBLIOGRAFÍA

- ARENDS J.J.A. Y ZEIGLER H.P (1989). Cerebellar connections of the trigeminal system in the pigeon (*Columba livia*). Brain Research, 487: 69-78.
- BANGMA G.C. Y TEN DONKELAAR H.J (1982). Afferent connections of the cerebellum in various types of reptiles. The Journal of Comparative Neurology, 207:255-273.
- CARON S.J.C., D, PROBER, MARGARET CHOY Y ALEXANDER F. SCHIER (2008). In vivo birthdating by BAPTISM reveals that trigeminal sensory neuron diversity depends on early neurogenesis. Development, 135: 3259-3269.
- CAPRA N.F. Y DESSEM D. (1992). Central Connections of Trigeminal Primary Afferent Neurons: Topographical and Functional Considerations. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 4(1): 1-52.
- ESCOBAR M.I. Y PIMIENTA H.J. (2006). Sistema nervioso. Programa Editorial Universidad del Valle. 421 pp. (20-21).
- GILBERT S.F (2005). Biología del Desarrollo. Panamericana. 882 pp. (371-372).
- GONZÁLEZ A., MUÑOZ M. (1988). Central distribution of the efferent cells and the primary afferent fibers of the trigeminal nerve in *Pleurodeles waltlii* (Amphibia, Urodela). The Journal of Comparative Neurology, 270:517-527.
- HONIG M.G. Y HUME R.I. (1989). Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. Trends Neuroscience, 12: 333-41.
- LAUDER G.V. Y LIEM K.F. (1983). The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. Bull. Mus. Comp. Zoo., 150 (3): 95-197.
- MCCORMICK C.A. Y HERNÁNDEZ DV. (1996). Connections of octaval and lateral line nuclei of the medulla in the Goldfish, including the cytoarchitecture of the secondary octaval population in Goldfish and Catfish. Brain, Behavior and Evolution, 47: 113-137.
- NEW J.G., COOMBS S., MCCORMICK CA. Y OSHEL PE. (1996). Cytoarchitecture of the medial octavolateralis nucleus in the goldfish, *Carassius auratus*. The Journal of Comparative Neurology, 366 (3): 534-46.
- NIEUWENHUYNS R., DONKELAAR H.J. Y NICHOLSON C. (1998). The central nervous system of vertebrates. Springer. Volumen I, II, III.
- NIEUWENTHUYNS R. (2009). El sistema nervioso central humano. Panamericana. 336 pp. (9-16).
- POMBAL M. A., ALVAREZ-OTERO R., RODICIO M.C. Y ANADON R. (1997). A tract-tracing study of the central projections of the mesencephalic nucleus of the trigeminus in the Guppy (*Lebistes reticulatus*, Teleostei), with some observations on the descending trigeminal tract. Brain Research Bulletin, Vol 42 (2): 111-118.



- PUZDROWSKI R.L. (1988). Afferent projections of the trigeminal nerve in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal Morphological*, 198:131–147.
- RINK E., WULLIMANN M.F. (2004). Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Research*, 1011: 206– 220.
- ROSE J.D. (2002). The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Rev Fish Science*, 10:1–38.
- ROSE J.D. (2007). Anthropomorphism and ‘mental welfare’ of fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol. 75: 139–154.
- SAS E. Y MALER L. (1987). The organization of afferent input to the caudal lobe of the cerebellum of the gymnotid fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Anatomy and Embryology*, 177: 55-79.
- SNEDDON, L.U. (2003). Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Research*, 972: 44–52.
- SNEDDON, L.U. (2004). Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Reviews*, 46: 123 – 130.
- WULLIMANN, M.F. (1998). The Central Nervous System. *The Physiology of Fishes*. 245 pp.
- WULLIMANN M.F. Y NORTHCUTT G.R. (1989). Afferent connections of the valvula cerebelli in two teleosts, the common Goldfish and the Green Sunfish. *The Journal of Comparative Neurology*, 289: 554-567.
- WULLIMANN M.F., RUPP B. Y REICHERT H. (1996). *Neuroanatomy of the zebrafish brain a topological atlas*. Birkhäuser Verlag, 144 pp.
- XUE H.G., YANG C-Y., YAMAMOTO N., ITO H., ITO H. Y OZAWA H. (2005). An indirect trigeminocerebellar pathway through the nucleus lateralis valvula in a perciform teleost, *Oreochromis niloticus*. *Neuroscience Letters*, 390: 104-108.
- XUE H.G., NAOYUKI Y., YANG C-Y, KEREM G., YOSHIMOTO M., SAWAI N., ITO H. Y OZAWA H. (2006a). Projections of the sensory trigeminal nucleus in a percomorph teleost, *Tilapia (Oreochromis niloticus)*. *The Journal of Comparative Neurology*, 495:279–298.
- XUE H.G., YANG C-Y., ITO H., YAMAMOTO N. Y OZAWA H. (2006b). Primary and secondary sensory trigeminal projections in a cyprinid teleost, *Carp (Cyprinus carpio)*. *The Journal of Comparative Neurology*, 499:626–644.

## ANEXO: Listado de abreviaturas

AG	Ganglio anterior	nV	Nervio trigémino
CC	Cresta cerebelar	nVII	Nervio facial
CCe	Cuerpo cerebelar	nVIII	Nervio auditivo
DIL	Núcleo difuso del lóbulo inferior	OB	Bulbo olfatorio
DTN	Núcleo descendente del trigémino	PG	Región preglomerular
DV	Raíz descendente del trigémino	PGM	Núcleo preglomerular medial
EG	Eminencia granular	Pit	Pituitaria
HYO	Rama hiomandibular	PSp	Núcleo pretectal superficial parvocelular
IL	Lóbulo inferior	RV	Ventrículo rombencefálico
Lca	Lóbulo caudal cerebelar	SGT	Tracto secundario gustatorio
LL	Lemnisco lateral	SO	Rama supraorbital
LLF	Fascículo longitudinal lateral	STN	Núcleo sensitivo trigémino
LVII	Lóbulo del Facial	Tel	Telencéfalo
MAN	Rama mandibular	TeO	Techo óptico
MAX	Rama maxilar	TeV	Ventrículo tectal
MesV	Núcleo mesencefálico del V	TH	Hipotálamo tuberal
MFN	Núcleo funicular medial	TL	Toro longitudinal
MLF	Fascículo longitudinal medial	TLa	Toro lateral
MO	Médula oblongada	TS	Toro semicircular
MON	Núcleo octavolateral medial	V	Ventrículo
MS	Médula espinal	Va	Válvula cerebelar
MTN	Núcleo motor trigémino	VLo	Lóbulo del Vago
NIII	Núcleo oculomotor	VM	Núcleo ventral del tálamo
NLV	Núcleo lateral de la válvula		