

Estudio experimental de las conexiones del sistema sensitivo del trigémino en la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*)

Estudo experimental das conexións do sistema sensitivo do trixémimo no melgacho (*Scyliorhinus canicula*)

Experimental study of the trigeminal sensory system in the Lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*)

**Raquel Suárez Grimalt**

**Trabajo de fin de grado**

**Fecha de defensa: 29 de junio de 2015**

**Dirigido por el Dr. Julián Yáñez Sánchez**



## ÍNDICE

RESUMEN / SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	4
1. La vía sensorial somática y nocicepción	
2. Sistema sensitivo del nervio trigémino	
OBJETIVOS .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
RESULTADOS .....	9
1. Marcaje de nervio trigémino (V)	
2. Marcaje de raíz descendente del trigémino (rdV)	
3. Marcaje de cerebelo: corpus y aurícula cerebelar	
4. Marcaje de techo y núcleo mesencefálico del trigémino (MesV)	
DISCUSIÓN .....	16
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	29
BIBLIOGRAFÍA .....	21
ANEXO: ABREVIATURAS .....	23



## **RESUMEN**

El estudio de las conexiones primarias y secundarias del nervio trigémino (V) en elasmobranchios puede aportar una mayor comprensión de la evolución de la vía sensorial somática cefálica y de la nocicepción en vertebrados. Este estudio experimental tiene como principal objetivo la caracterización de las conexiones primarias del sistema sensitivo del nervio trigémino en *Scyliorhinus canicula* mediante el uso de una carbocianina (Dil) como trazador neuronal. Los resultados obtenidos indican que las células ganglionares del nervio V proyectan a lo que podría corresponderse con núcleo sensitivo del trigémino y envían axones a niveles caudales a través de la raíz descendente del trigémino (rdV). El núcleo mesencefálico del V proyecta al núcleo motor del V y al corpus cerebelar, y también envía axones a regiones caudales por la rdV. Se demuestra la existencia de una subpoblación de neuronas del MesV que proyecta hacia corpus cerebelar y que no envía axones por la rdV. En el presente estudio no se ha podido identificar ningún núcleo asociado al la raíz descendente del trigémino. Por último, se realiza un análisis comparativo ente las conexiones principales del nervio trigémino y del MesV observadas en *Scyliorhinus canicula* y otras especies.

## **SUMMARY**

Since primary and secondary trigeminal projections in elasmobranchs are poorly characterized, more studies are needed for understanding the evolution of cranial sensory innervation and nociception in vertebrates. The aim of this experimental study is to identify the primary connections of the sensory system of the trigeminal nerve (V) in *Scyliorhinus canicula*, by using carbocyanines (Dil) as a neuronal tracer. Our results indicate that the ganglion cells of the V nerve project to a nucleus that may correspond to the sensory trigeminal nucleus, and they also project to caudal levels via the descending trigeminal tract (rdV). The mesencephalic nucleus of the trigeminus (MesV) sends axons to both motor trigeminal nucleus and the corpus cerebelli, and also to caudal levels through the rdV. Our results reveal the existence of a subpopulation of MesV cells sending axons to the corpus cerebelli but not sending to the rdV. No nucleus associated to the descending trigeminal tract could be identified in this study. Comparison between the main projections of the trigeminal nerve and MesV observed in *Scyliorhinus canicula* and other species are made.



## INTRODUCCIÓN

*Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1768) es una especie de elasmobranquio perteneciente a la clase Chondrichthyes, orden Carcharhiniformes y familia Scyliorhinidae. Esta especie de pequeño tamaño (de 30 a 44 cm en ejemplares adultos) se caracteriza por su cuerpo alargado, cabeza plana y hocico redondeado. Es uno de los elasmobranquios más abundantes en el Noroeste del Atlántico y en el Mar Mediterráneo, y se encuentra distribuido en una gran variedad de sustratos. (Ellis et al., 2009).

Los elasmobranquios se separan de los vertebrados hace 400 millones de años, por lo que el estudio de sus sistemas sensitivos es de gran importancia y nos puede aportar una mayor comprensión de la evolución de los vertebrados y de su sistema nervioso.

En relación a esta investigación, el desconocimiento de las conexiones implicadas en la somatosensación y nocicepción hace de *Scyliorhinus canicula* un organismo idóneo para el estudio del sistema sensitivo del trigémino en condriictios. Se trata, además, de una especie muy representativa, ya que es de los miembros más primitivos del superorden *Galeomorpha* al que pertenecen el 73% por cierto de los tiburones actuales (Masseck y Hoffmann, 2008).

Para el desarrollo de este estudio se ha escogido un método de trazado neuronal basado en la aplicación de moléculas fluorescentes liposolubles. Como trazador se han utilizado pequeños cristales de una carbocianina que, una vez disueltos e incorporados a las membranas celulares, se difunde lateralmente a lo largo de ellas extendiéndose por sus prolongaciones, tanto en dirección anterógrada (desde el soma a la periferia) como retrógrada (de la periferia hacia el soma), permitiendo revelar las conexiones de un área o núcleo neuronal. El empleo de esta clase de marcaje es interesante tanto desde un punto de vista práctico, ya que se trata de una técnica sensible, precisa y aplicable *post mortem* sobre tejido previamente fijado, como científico, debido a que existen pocos estudios del nervio trigémino en elasmobranquios basados en este método.

La organización de sistema nervioso central en tiburones sigue el patrón general del resto de vertebrados. Clásicamente, el sistema nervioso central está formado por el encéfalo en su parte más rostral y por la médula espinal, pudiéndose distinguir distintas subunidades anatómicas en ambas regiones. De esta forma, el encéfalo de los vertebrados se divide en el eje longitudinal en prosencéfalo o encéfalo anterior, mesencéfalo o encéfalo medio y rombencéfalo o encéfalo posterior. El prosencéfalo, la parte más rostral, se compone de diencefalo y telencefalo. A continuación se dispone el mesencéfalo, que incluye un techo óptico dorsal y un tegmento ventral. La región más caudal del encéfalo se corresponde con el rombencéfalo, formado por la *medulla oblongata* y por el puente. (Butler y Hodos, 2005).

El nervio trigémino (V) es el nervio craneal más íntimamente asociado al desarrollo de la mandíbula en vertebrados. Éste conecta con el encéfalo como una raíz, en la se distingue una componente sensitiva dorsal y una componente motora ventral. En vertebrados, el sistema sensitivo del trigémino participa en la recepción de la información somatosensorial procedente del rostro y de la cavidad oral, junto con la propioceptiva de los músculos de la mandíbula. (Butler y Hodos, 2005). Desde esta perspectiva, es necesario el estudio detallado de este sistema para la comprensión de las vías de somatosensación cefálica.

En los diferentes apartados de este trabajo, se tratarán los diversos componentes y conexiones primarias del sistema sensitivo del trigémino en *Scyliorhinus canicula*, realizando un análisis comparativo respecto al sistema evidenciado en teleosteos y en otros vertebrados.

## **ANTECEDENTES**

### **1. LA VÍA SENSORIAL SOMÁTICA CEFÁLICA Y NOCICEPCIÓN.**

En vertebrados, se pueden distinguir tres grupos principales de nervios craneales sensitivos encefálicos (Butler y Hodos, 2005):

- Los componentes dorsales de la raíz del nervio trigémino, que reciben información somatosensorial procedente de la cabeza.
- Los nervios placodales ventrolaterales, implicados de la percepción del gusto.
- Los nervios placodales dorsolaterales, que recogen la información procedente de la línea lateral.

El sistema somatosensorial general de los vertebrados se compone de un grupo de ganglios sensitivos localizados en un sistema nervioso periférico. La diversidad neuronal de estos ganglios permite la naturaleza multimodal de la información detectada por el sistema somatosensorial. De esta forma, se distinguen neuronas nociceptivas (encargadas de la recepción de estímulos potencialmente dañinos) y propioceptivas (que detectan señales inocuas que proporcionan información sobre la posición del cuerpo) (Caron et al., 2008).

En la actualidad, existe un debate abierto sobre la nocicepción y la sensación de dolor en peces. Según Zimmerman (1986), para afirmar que un animal experimenta dolor debe demostrarse, en primer lugar, que éste es capaz de percibir estímulos adversos y perjudiciales para sus tejidos, y que experimenta, en consecuencia, cambios fisiológicos y comportamentales de defensa.



Mientras que la nocicepción ha sido evidenciada en diferentes filos como aves y mamíferos, estudios basados en vertebrados menores sugieren una falta de nociceptores y de percepción de estímulos nocivos. Sin embargo, en los últimos años diversos ensayos han evidenciado que los teleósteos son capaces de evitar señales como shocks eléctricos, perdiendo esta capacidad cuando se encuentran bajo efectos de analgésicos (Sneddon et al., 2003). En la misma línea, se ha propuesto que la capacidad de reconocer y reaccionar ante estímulos adversos es una propiedad fundamental en los animales (Chervova y Lapshin, 2011).

Por otra parte, otros autores como Rose (2002) distinguen la nocicepción, entendida como el procesamiento no consciente de los estímulos perjudiciales, de la consciencia del dolor mediada por regiones neocorticales. Los hemisferios cerebrales de los peces presentan un cortex muy simple y que carece de la complejidad estructural, interconectividad masiva y de la extensión de neocortex necesaria para la experiencia consciente del dolor.

En relación a la nocicepción del nervio trigémino, ésta ha sido ampliamente estudiada en vertebrados superiores, mientras que existe un gran desconocimiento sobre su inervación y papel en la recepción de dolor en peces. Ensayos llevados a cabo por Sneddon y colaboradores (2003) demuestran la presencia de fibras A-delta y C en el nervio trigémino de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), también descritas en nociceptores de vertebrados superiores. En este mismo estudio, pudieron observarse dos tipos de receptores inervando el nervio V: receptores unimodales que responden a estímulos mecánicos y receptores bimodales estimulados por señales térmicas y químicas. Se pudo observar que tanto la fisiología como el comportamiento de esta especie se ven afectados ante la exposición a estímulos perjudiciales.

Al contrario que en peces teleósteos, en la actualidad no hay evidencias electrofisiológicas y neuroanatómicas de la existencia de nociceptores en elasmobranchios (Snow et al., 1993), lo que puede significar una divergencia evolutiva entre peces cartilaginosos y teleósteos.

## **2. SISTEMA SENSITIVO DEL NERVIO TRIGÉMINO (V)**

Siguiendo el patrón general de los gnatostomados amniotas, el nervio trigémino en teleósteos inerva la mayor parte de la cabeza a través de tres ramas (Puzdrowski, 1988):

- La rama oftálmica, que inerva la piel de la cabeza, así como las partes no visuales del ojo y las narinas.
- La rama maxilar, que reúne proyecciones en la parte superior de la mandíbula, incluyendo el techo de la cavidad oral, labio superior y dientes superiores.
- La rama mandibular, que manda fibras a estructuras inferiores como el piso de la cavidad oral, la lengua, labio inferior y dientes inferiores.

El ganglio sensorial del trigémino o ganglio de Gasser está formado en teleósteos por células unipolares de gran tamaño. La posición de las neuronas en las zonas superficiales de este ganglio durante el desarrollo temprano se cree responsable de la especificación celular de los diferentes tipos de neuronas sensitivas trigeminales (Caron et al., 2008).

Respecto a la organización celular del sistema sensitivo del trigémino en vertebrados, Puzdrowski (1988) describe un conjunto de núcleos en los que se incluyen el núcleo mesencefálico del V, el núcleo motor y el grupo de núcleos sensitivos localizados en el rombencéfalo.

El núcleo motor del trigémino (Vm) se localiza medialmente a la entrada del nervio en el encéfalo y es el responsable del reflejo que controla el cierre de la mandíbula (Hoffmann, 1999).

Un grupo de células de especial interés de este sistema es el núcleo mesencefálico del V (MesV), una formación de células ganglionares de gran tamaño localizadas en el mesencéfalo y cercanas a la superficie ventricular del techo óptico (Hoffmann, 1999). Estas células se disponen alrededor de la línea media, presentando una forma esférica u ovoide y un citoplasma rico en gránulos de Nissl (Smeets, 1998). La característica inusual de estas neuronas sensitivas primarias es su localización, ya que mientras que todos los nervios craneales no visuales presentan sus cuerpos celulares en el ganglio, fuera del sistema nervioso central, las células del mesencefálico del V se disponen en la parte dorsomedial del mesencéfalo (Butler y Hodos, 2005). Esta localización peculiar puede ser entendida desde un punto de vista ontogénico, ya que durante el desarrollo embrionario las células de este núcleo no migran ventrolateralmente respecto al tubo neural y permanecen en su lugar de formación (Hoffmann, 1999). Los axones de las neuronas del mesV se reúnen al nivel del mesencéfalo formando el tracto mesencefálico del trigémino, un haz que se que se orienta hacia la pared posterior del techo y el velo medular anterior y se dirige hacia el tegmento rombencefálico (Smeets, 1998).

Por otra parte, el grupo de núcleos sensitivos del rombencéfalo implicado en la somatosensación cefálica, está formado por el núcleo sensitivo o principal del nervio trigémino (STN), el núcleo descendente (ndV), el núcleo funicular medial y el núcleo espinal del nervio trigémino. Estos grupos de neuronas son el destino de las fibras aferentes primarias que proporcionan información somatosensorial procedente de la cabeza (Puzdrowski, 1988). Tras entrar en la médula, las fibras aferentes primarias se bifurcan formando un haz de axones dirigido rostromedialmente hacia el núcleo sensitivo, y que gira caudalmente para formar la raíz descendente del nervio trigémino (rdV) (Puzdrowski, 1988).

En elasmobranquios, también se han identificado el núcleo mesencefálico del trigémino, el núcleo sensitivo y el núcleo (de la raíz) descendente como los principales núcleos somatosensoriales relacionados con el nervio trigémino (Nieuwenhuys et al., 1998).

## OBJETIVOS

1. Determinar mediante el uso de carbocianinas (Dil) los componentes y conexiones primarias del sistema sensitivo del nervio trigémino en *Scyliorhinus canicula*, haciendo especial referencia a las conexiones del núcleo mesencefálico del V.
2. Comparar los resultados obtenidos en *Scyliorhinus canicula* con los sistemas evidenciados en condríctios, teleósteos y otros vertebrados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 9 individuos juveniles de Pintarroja, *Scyliorhinus canicula* (Condríctios), de una longitud media de 10 y 11 cm y cedidos por el Acuarium Finisterrae, Museos científicos de A Coruña.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo conforme a las regulaciones de la comunidad europea sobre el cuidado de los animales utilizados con fines científicos (Directiva 86/609/CEE).

En primer lugar, los animales fueron profundamente anestesiados con una solución al 0.1% de sal metanosulfonada de 3-aminobenzoato de etilo (MS-222; Sigma, St. Louis, MO) y perfundidos transcárdialmente con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M a un pH de 7,4 (PB) y suplementado con 1% de ácido etildiaminotetraacético (EDTA, Sigma). En un principio, se seleccionó un tampón suplementado con 1% de urea y 1% de EDTA, pero esta solución llevó a la formación de microcristales esferoidales que afectaron a los encéfalos conservados en el fijador, por lo que esta composición fue rechazada (ver discusión).

Los ejemplares, profundamente anestesiados, fueron transferidos a una placa Petri rellena de elastómero SYLGARD® y fijados con alfileres. Tras realizar una incisión a la altura de las aletas pectorales para exponer el corazón, se inyectó 10-20 ml de fijador en el ventrículo cardíaco mediante una cánula y una jeringuilla acoplada, realizando previamente un corte en la aurícula para permitir la salida de la sangre y del exceso de fijador. A continuación, los encéfalos fueron extraídos cuidadosamente de la cavidad craneal y conservados en fijador en recipientes etiquetados a una temperatura de 4°C. Para revelar conexiones anterógradas y retrógradas de las diferentes áreas encefálicas de interés se realizaron marcajes simples utilizando como trazador la carbocianina Dil (1,1'-dioctadecil-3,3',3'- tetrametilindo perclorato de carbocianina) (Molecular Probes; Invitrogen), llevándose a cabo dos estrategias de marcaje:

1. Para las zonas más superficiales del encéfalo se realizaron marcajes manuales *in toto*. Para ello, se aplicaron pequeños cristales de Dil con la ayuda de una

aguja entomológica, realizando una perforación superficial de la zona o nervio de interés y colocando el cristal de trazador. Se siguió este procedimiento para los marcajes de techo óptico, nervio trigémino, aurícula y corpus cerebelar.

2. Para las regiones internas y menos accesibles como el núcleo mesencefálico y la raíz descendente del V, se incluyó el encéfalo en un bloque de agarosa al 3% en PB y se seccionó transversalmente con un vibratomo hasta la región de interés. Una vez expuesta, se aplicaron cristales de Dil con la ayuda de un alfiler entomológico (000) enmangado. Esta técnica también se llevó a cabo en un segundo marcaje de nervio trigémino.

En ambos procedimientos se fijó el trazador a la zona de aplicación con agarosa en PB al 3% fundida para evitar, tras su solidificación, la dispersión del marcador a zonas adyacentes. A continuación, los encéfalos se devolvieron al fijador y se incubaron durante un periodo de 21 a 90 días en oscuridad, a una temperatura de 37°C para asegurar el transporte del trazador. Los marcajes realizados con Dil están reflejados en la **Tabla 1**.

Ejemplar	Marcaje	Tiempo incubación (días)
Scy1	Techo óptico (TO)	88
Scy2	Aurícula cerebelar	90
Scy3	Nervio trigémino (nV)	90
Scy4	Corpus cerebelar	88
Scy5	Corpus cerebelar	37
Scy6	n. mesencefálico del V (MesV)	21
Scy7	Raíz descendente del V (rdV)	28
Scy8	Raíz descendente del V (rdV)	31
Scy9	Nervio trigémino (nV)	31

**Tabla 1.** Ejemplares utilizados durante el ensayo, áreas del encéfalo marcadas con Dil y tiempo de incubación en días.

Una vez finalizado el período de incubación, los encéfalos marcados *in toto* se incluyeron en bloques de agarosa al 3% en PB. En todos los casos se realizaron secciones transversales de entre 70 y 90  $\mu\text{m}$  de grosor con un vibratomo (Campden Instruments, UK). Las secciones se depositaron sobre portaobjetos gelatinizados, se montaron con una solución de glicerina en PB (1:1), y se examinaron y fotografiaron con una cámara digital (Olympus) acoplada a un fotomicroscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 90i). Para la observación y captación de las imágenes se utilizaron dos combinaciones de filtros : un filtro simple optimizado para Texas Red (Ex. 482-535 nm; Em. 536-540 nm) y un filtro doble GPF-DSrRed (Ex. 450-490/540-570; Em. 500-530 /570-680 nm), ambos adecuados para la observación del Dil.

Por último, a partir de las imágenes procesadas se realizaron perfiles de las secciones seleccionadas y se editaron las imágenes de interés con el programa informático CorelDraw x3.

## RESULTADOS

En este apartado se realizará un análisis de las conexiones, tanto aferentes como eferentes, del sistema sensitivo del nervio trigémino a partir de los resultados obtenidos en los marcajes. En este contexto, se entiende como eferencias aquellas neuronas o vías que transmiten información de salida a otras células, centros o regiones del sistema nervioso central o a estructuras periféricas. Las aferencias, por otra parte, son las neuronas o vías que transmiten información de entrada procedente otras células, centros o regiones del sistema nervioso central o de estructuras periféricas.

### 1. *Marcaje de nervio trigémino (V)*

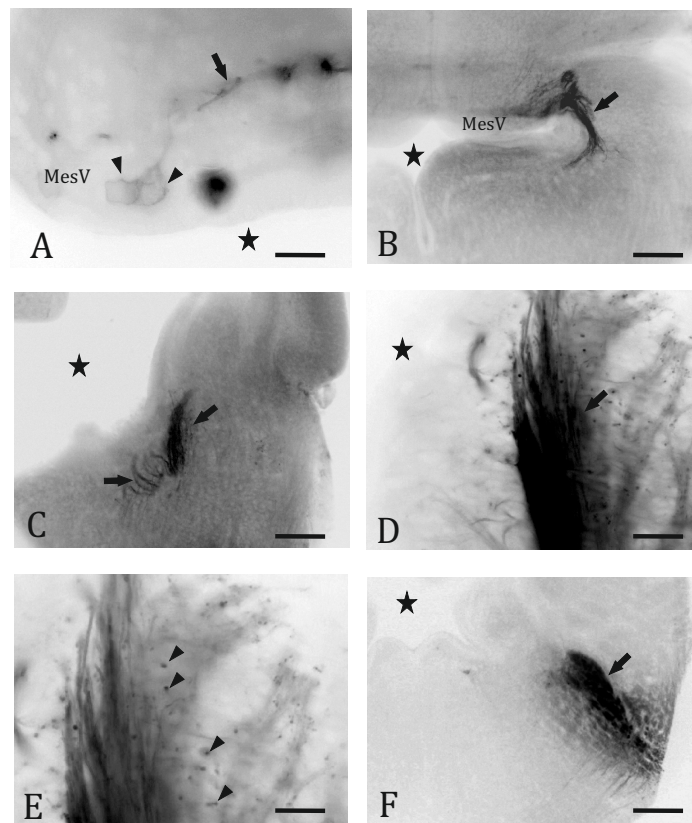
Para revelar las conexiones primarias del nervio trigémino se realizaron dos experimentos con diferentes estrategias de marcaje. En el análisis de los resultados no se han encontrado diferencias en el patrón de conexiones, por lo que ambos marcajes serán considerados de forma conjunta. Los resultados obtenidos están resumidos en las *Figuras 1 y 2*.

Tras la aplicación de Dil en la entrada del nervio trigémino (V), se han observado, al nivel del mesencéfalo, tres células marcadas pertenecientes al núcleo mesencefálico del V (MesV). Los cuerpos celulares de estas neuronas se disponen sobre la superficie ventricular del techo óptico (Figura 2.A), y presentan forma ovalada y un tamaño considerable (25-30  $\mu\text{m}$  de diámetro). Junto a estos somas celulares, se encontraron sus prolongaciones también marcadas, que se reúnen formando el tracto mesencefálico del trigémino en la parte caudal del techo óptico (TO). Tanto las células del núcleo mesencefálico observadas como sus axones se marcaron ipsilateralmente al nervio. De la misma forma, también se marcaron fibras ipsilaterales en las proximidades del núcleo del fascículo longitudinal medial (nflm).

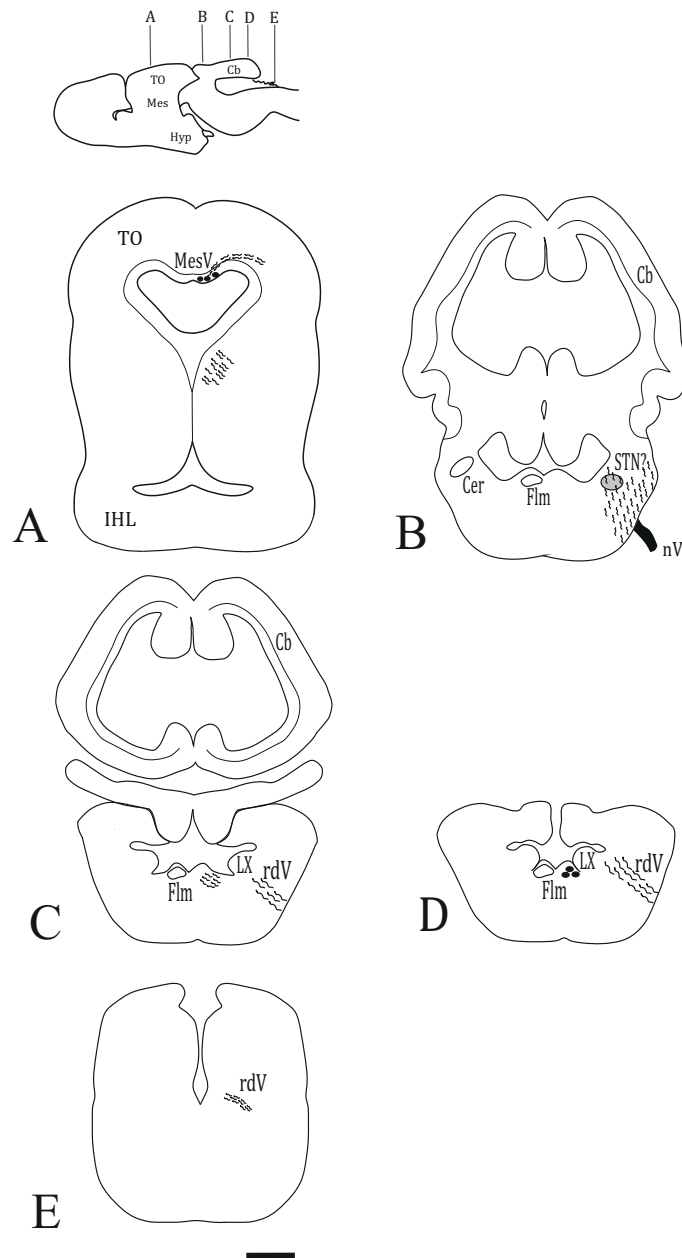
Al nivel de la entrada del nervio trigémino y en la región adyacente al núcleo cerebeloso (Cer), se marca lo que podría corresponder a un campo de terminales nerviosas junto al tracto mesencefálico marcado (Figura 2.B). Por su localización, esta agrupación podría corresponderse con el núcleo sensitivo del trigémino (STN). Por el contrario, no se encontraron terminaciones nerviosas en las inmediaciones de la entrada del nervio V, donde se situaría el núcleo motor del trigémino. Finalmente, la mayoría de los axones del tracto mesencefálico se dirigen a través de la entrada del nervio.

Como era de esperar, el marcaje también reveló células del ganglio de Gasser marcadas de un tamaño considerable (25  $\mu\text{m}$  de diámetro). Hacia niveles caudales desde la entrada del nervio V, pudo observarse la raíz descendente del trigémino (rdV) marcada ocupando una posición ventrolateral como un haz dispuesto oblicuamente (Figura 2.C). Curiosamente, el marcaje también mostró una agrupación de fibras que discurren hacia la zona del fascículo longitudinal medial (flm) y cuyos cuerpos celulares se sitúan a nivel del lóbulo del X (Figura 2.D). Las últimas fibras marcadas de la raíz descendente se han localizado al nivel del núcleo del fascículo longitudinal medial (nflm).

En resumen, la aplicación de Dil en el nervio V reveló células ganglionares sensitivas en el ganglio de Gasser y en el núcleo mesencefálico del V, así como una proyección caudal a lo largo de la raíz descendente del V (rdV) y una posible proyección a lo que podría corresponder con el núcleo sensitivo (STN).



**Figura 1.** Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo de *S. canicula*, en las que se observan fibras y células marcadas tras la aplicación de Dil en el nervio trigémino (V). Las imágenes están ordenadas de rostral a caudal. Las flechas y triángulos señalan células y fibras marcadas, mientras que las estrellas representan ventrículos. **A:** Células del MesV marcadas en la superficie ventricular del techo óptico y sus axones formando el tracto mesencefálico del trigémino. **B:** Tracto mesencefálico del V marcado a nivel del techo óptico. **C:** Tracto mesencefálico del trigémino marcado a nivel del istmo. **D:** Campo de terminaciones nerviosas del tracto mesencefálico del V en la región adyacente al núcleo cerebeloso (Ces). **E:** Detalle de las terminaciones nerviosas (posible STN). **F:** Axones de la raíz descendente del trigémino a un nivel caudal a la entrada del V. La barra de escala es de 50  $\mu\text{m}$  (A, D, E) y 200  $\mu\text{m}$  (B, C, F)



**Figura 2.** Esquemas de las secciones transversales del encéfalo de *S. canicula*, que muestran las fibras y células marcadas tras la aplicación de Dil en el nervio trigémino (V). El nivel aproximado de cada sección se representa en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 500  $\mu$ m.

## 2. Marcaje de raíz descendente del trigémino (rdV)

Para revelar el origen de los axones que viajan a lo largo de la raíz descendente del trigémino, se llevó a cabo el marcaje de este fascículo en dos ejemplares. En ambos experimentos, previamente a la aplicación de Dil se necesitó incluir el encéfalo en un bloque de agarosa y seccionar, de caudal a rostral, hasta niveles intermedios del lóbulo del X. Los resultados obtenidos están representados en las *Figuras 3 y 4*.

Como resultado de la aplicación de la carbocianina, el trazador difundió rostralmente a lo largo de la raíz descendente ipsilateral (Figura 4.B). En las proximidades de la raíz no se observaron campos terminales, por lo que no se pudo precisar la posición exacta del núcleo descendente del V (Vd). Al mismo nivel, se marcaron fibras contralaterales cruzando tímidamente la comisura media hasta la zona octavolateral. Sin embargo, estos axones corresponden muy probablemente a los sistemas comisurales octavolaterales marcados al paso.

Al nivel de la entrada del nervio trigémino, el marcaje reveló células del ganglio de Gasser retrógradamente marcadas. A un nivel más rostral, también se marcaron fibras del tracto mesencefálico ascendiendo dorsalmente y próximas al núcleo cerebeloso (Ces). Éste continúa su trayectoria hacia la superficie ventricular del techo óptico, donde se observaron células retrógradamente marcadas en el núcleo mesencefálico intensamente marcadas.

En conjunto, los resultados de este marcaje confirman que tanto las células del núcleo mesencefálico como las células del ganglio de Gasser envían axones a lo largo de la raíz descendente del V.

### *3. Marcaje de cerebelo: corpus y aurícula cerebelar.*

Para intentar localizar la posición del núcleo sensitivo del trigémino se realizaron marcajes desde dos regiones cerebelares (corpus y aurícula). En ninguno de los dos casos se encontraron células en la región pretrigeminal o trigeminal. El encéfalo marcado en la aurícula se vio afectado por la formación de microcristales esferoidales producto de la incubación en fijador con tampón suplementado por urea y que afectaron gravemente la superficie y el interior del encéfalo (ver discusión). Sin embargo, en el experimento realizado al aplicar la carbocianina en el corpus cerebelar, además de células cerebelopetas en otras regiones encefálicas (oliva inferior, región pretectal,...) ajenas a sistema trigeminal, se observaron, al nivel del mesencéfalo, unas pocas células en el núcleo mesencefálico del V débilmente marcadas. Este resultado sugiere una posible conexión (colateral) de este núcleo con el cerebelo. Por último, más caudalmente, también pudo verse la entrada del nervio trigémino marcada.

### *4. Marcaje de techo y núcleo mesencefálico del trigémino (MesV).*

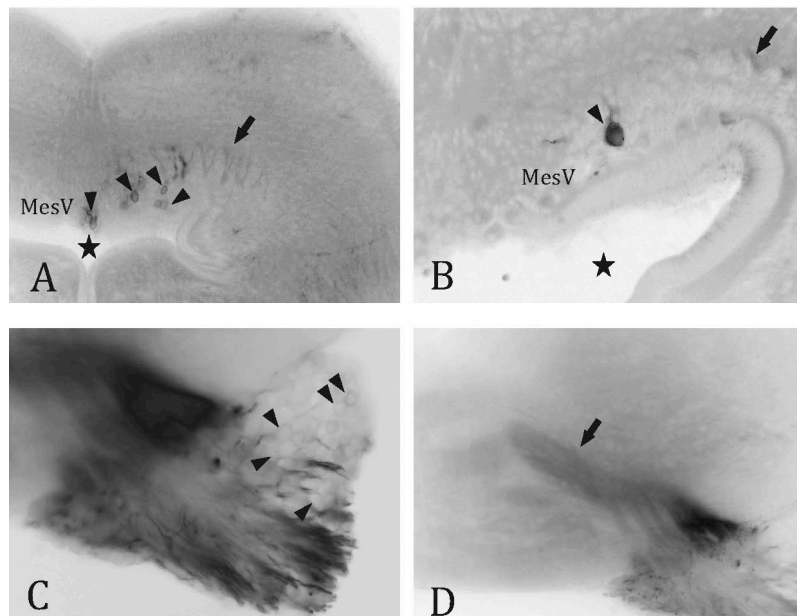
Para el marcaje del MesV, se siguieron dos estrategias experimentales: el marcaje in toto de la región medial del techo óptico y el marcaje de la región periventricular del techo óptico en encéfalo seccionado. Como resultado de la primera estrategia experimental, se observaron las células de este núcleo intensamente marcadas y alineadas sobre la superficie ventricular del techo óptico (Figura 5). Sin embargo, el marcaje no reveló fibras ni terminaciones en otras regiones del encéfalo.

La aplicación bilateral del trazador directamente sobre el núcleo mesencefálico del trigémino expuesto en un encéfalo seccionado, reveló fibras marcadas a ambos lados

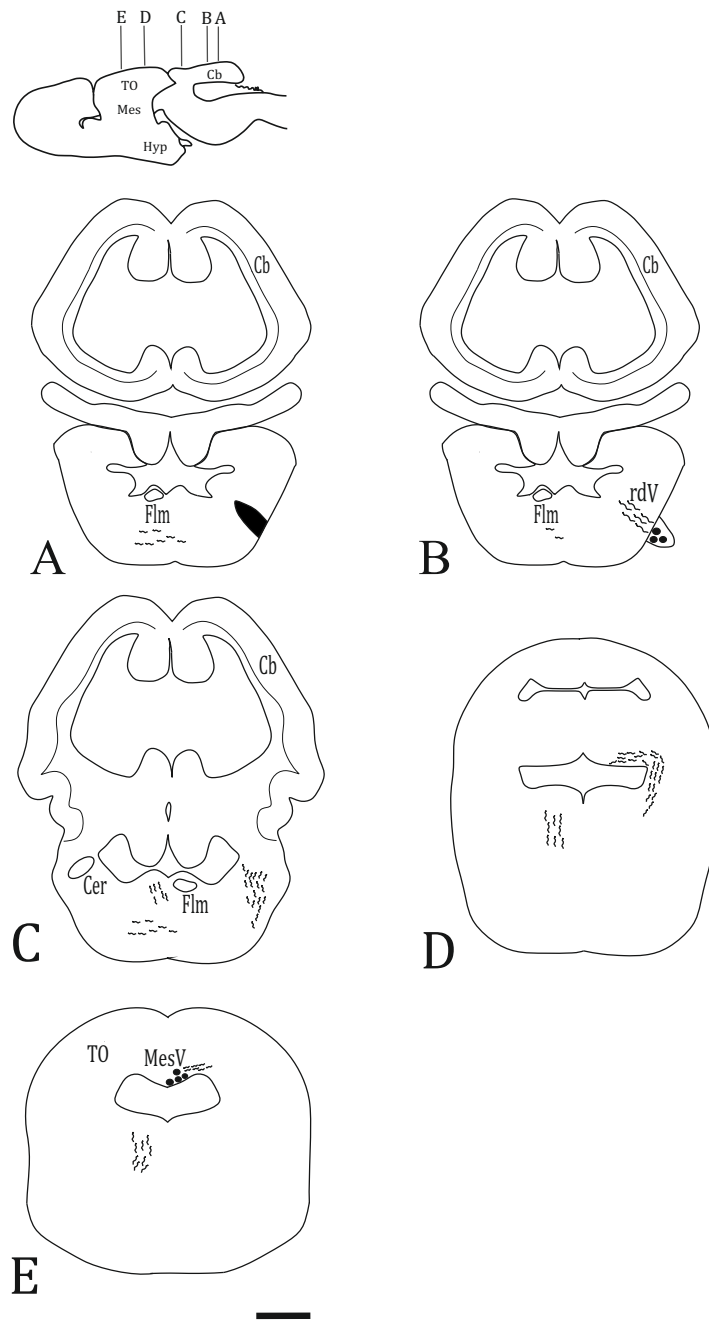


del techo óptico (Figura 6.A), muchas de ellas pertenecientes a otros sistemas en los que está implicado el techo óptico y marcadas al paso. En el istmo, se observaron los axones del tracto mesencefálico del trigémino marcados bilateralmente (Figura 6.B) y un área de terminaciones nerviosas en el margen lateral del mismo. En las proximidades de la entrada del nervio V, se observó asimismo otro campo de terminaciones nerviosas del tracto, situado medialmente a la raíz del nervio (Figura 6.C), y que parece corresponderse con el núcleo motor del trigémino (mV). Caudalmente, también se observó marcada la raíz descendente del trigémino. No se encontraron células ni fibras marcadas en el cerebelo.

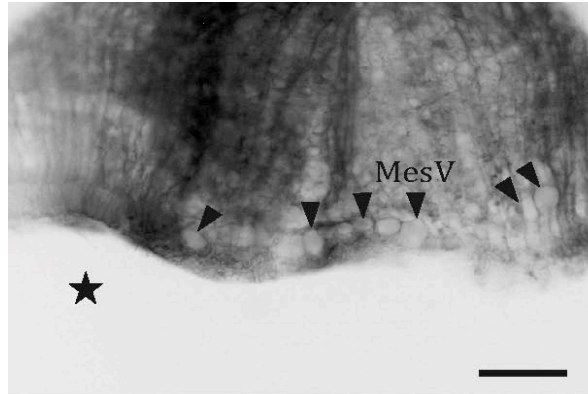
En resumen, el marcaje del núcleo mesencefálico reveló fibras eferentes en la región del núcleo motor del trigémino (mV) y colaterales viajando caudalmente a la raíz descendente del trigémino (rdV).



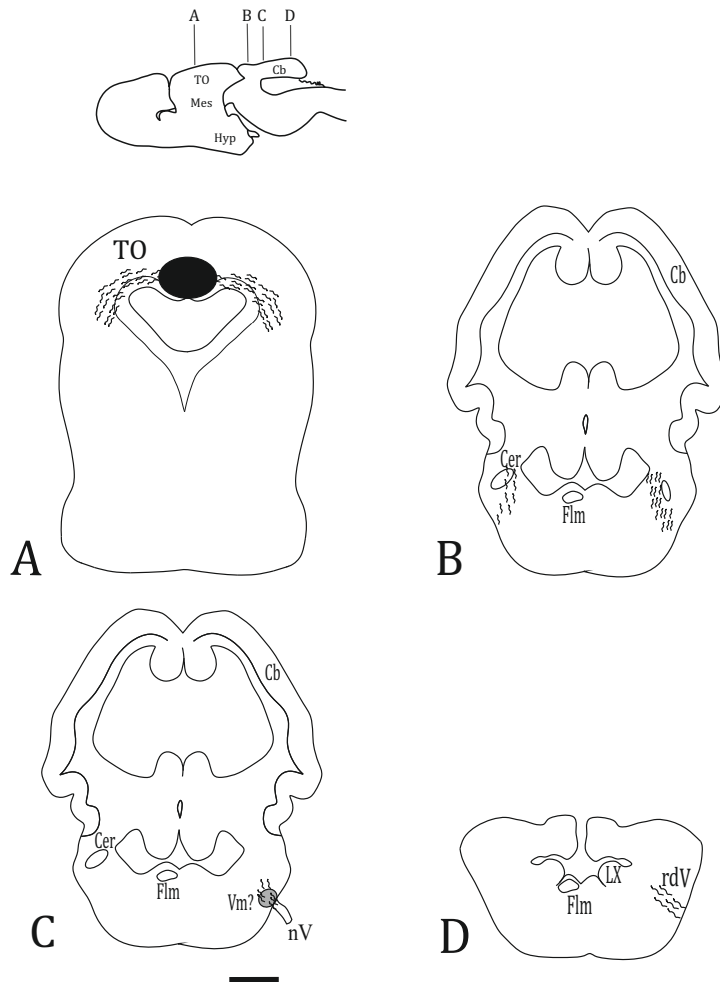
**Figura 3.** Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo de *S. canicula*, en las que se observan fibras y células marcadas tras la aplicación de Dil en la raíz descendente del trigémino (rdV). Las flechas y triángulos señalan células y fibras marcadas, mientras que las estrellas representan el ventrículo. **A:** Células del MesV marcadas en el techo óptico (triángulos) y sus axones formando el tracto mesencefálico (flecha). **B:** Detalle de célula del MesV (triángulo) y su axón (flecha). **C:** Células del ganglio de Gasser marcadas (triángulos) en la entrada del nervio V. **D:** Raíz descendente marcada a nivel del lóbulo del X. La barra de escala es de 200  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B), 100  $\mu\text{m}$  (C), 200  $\mu\text{m}$  (D).



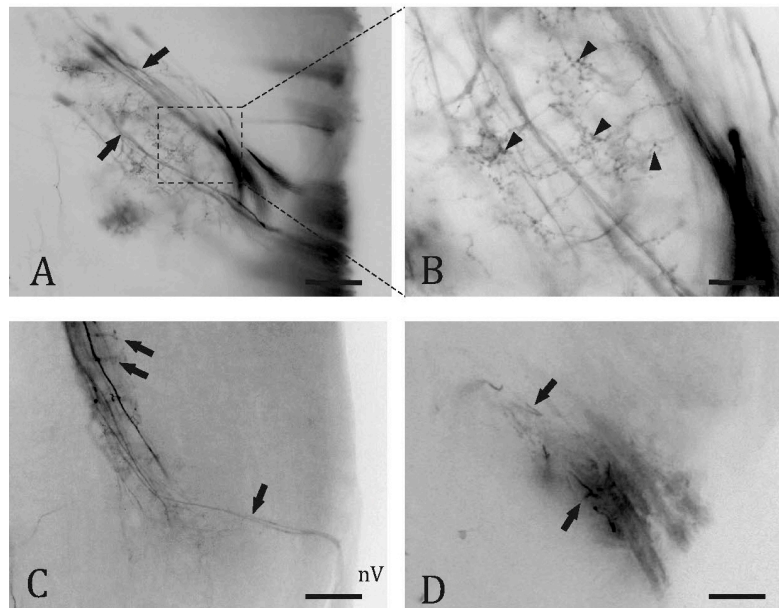
**Figura 4.** Representación de las secciones transversales del encéfalo de *S. canicula*, que muestran las fibras (líneas) y células (círculos) marcadas tras la aplicación de Dil en el la raíz descendiente del trigémino (rdV). El nivel aproximado de cada sección aparece representado en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.** Fotomicrografía de una sección transversal del encéfalo de *S. canicula* tras la aplicación de Dil sobre el techo óptico medial. Los triángulos indican neuronas del n.mesencefálico marcadas a nivel del mesencéfalo, mientras que la estrella representa el ventrículo. La barra de escala es de 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.** Representación de las secciones transversales del encéfalo de *S. canicula*, que muestran las fibras (líneas) y células (círculos) marcadas tras la aplicación de Dil en el MesV (área en negro). El nivel aproximado de cada sección se representa en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7.** Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo de *S. canicula*, en las que se observan fibras marcadas tras la aplicación de Dil en mesV. Las flechas y triángulos señalan células y fibras marcadas, mientras que las estrellas representan los ventrículos. **A:** Campo de terminaciones nerviosas del tracto mesencefálico del trigémino (flechas), a nivel de la entrada del nervio V (posible Vm). **B:** Detalle de las terminaciones nerviosas del tracto mesencefálico del trigémino (triángulos). **C:** Procesos neuronales del núcleo mesencefálico del trigémino (flecha), uno de ellos entrando por la raíz del nervio V. **D:** Fibras de la raíz descendente del trigémino marcadas (flechas) al nivel del lóbulo del X. La barra de escala es de 100  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B y D), 200  $\mu\text{m}$  (C).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se seleccionó el Dil como trazador neuronal por tratarse de un método sensible, preciso y que permite el marcaje de áreas pequeñas y poco accesibles del encéfalo. El uso de esta carbocianina permitió revelar gran parte de las conexiones del sistema sensitivo del nervio trigémino en la pintarroja, sin embargo, hemos encontrado algunos problemas en relación a su uso que deben tenerse en consideración.

En primer lugar, es común que la difusión de Dil se vea afectada por la presencia de estructuras altamente mielinizadas, lo que puede llevar a la no detección de conexiones existentes entre centros (Folgueira et al., 2004). Para minimizar este problema, en nuestro ensayo se han utilizado especímenes juveniles ya que presentan un nivel de mielinización menor de las rutas sensitivas. A pesar de esta precaución, los marcajes de los componentes del sistema sensitivo del trigémino de *S. canicula* mostraron fibras mielínicas intensamente marcadas, lo que dificultó la interpretación de los resultados. De la misma forma, al trabajar con Dil podemos observar conexiones que resulten falsos positivos, debidas principalmente a la difusión del trazador desde el

punto de aplicación a regiones adyacentes del encéfalo y/o al posible marcaje transneuronal entre tractos cercanos al sistema de estudio.

Al inicio de esta investigación, se seleccionó un fijador con un tampón fosfato suplementado con 1% de urea (siguiendo la formulación clásicamente utilizada en estudios en elasmobranquios) y con 1% de EDTA, un agente quelante de calcio cuya función es minimizar o evitar el marcaje transneuronal producto de la posible fusión de membranas en tejido fijado (Hofmann y Bleckmann, 1999). Sin embargo, tras unas semanas de incubación a 37°C, la composición de este fijador llevó a la formación de microcristales esferoidales que afectaron gravemente la superficie y el interior de los encéfalos conservados. Finalmente, pudo comprobarse experimentalmente que estas estructuras cristalinas se formaban en la solución únicamente en presencia de la urea, por lo que esta composición inicial fue rechazada. Por tanto, para el desarrollo de próximos ensayos con metodologías donde se precisa incubaciones a temperaturas medias o elevadas se recomienda el uso de un tampón fosfato sin urea. La ausencia de urea como agente corrector de la osmolaridad parece no afectar la calidad estructural del tejido ni a la efectividad o sensibilidad del método (Yáñez et al., 2011).

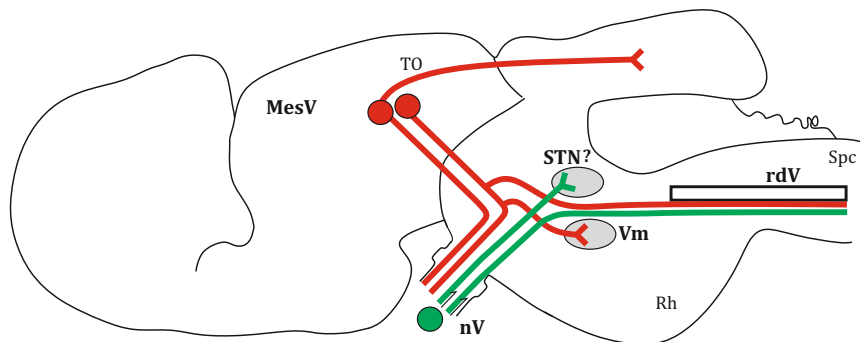
El objetivo principal del presente estudio experimental es determinar los principales componentes y conexiones primarias del sistema sensitivo del trigémino en *Scyliorhinus canicula*. Los resultados obtenidos indican que este sistema está organizado de manera similar al patrón descrito previamente en elasmobranquios (Smeets y Timerick, 1981; Smeets, 1998), peces teleósteos (Puzdrowski, 1998; Xue et al., 2006) y otros vertebrados (Butler y Hodos, 2005) con otros trazadores neurales.

Las conexiones primarias del nervio trigémino se encuentran muy conservadas en vertebrados. Según el patrón general, los axones de las células del ganglio de Gasser conectan principalmente con el núcleo sensitivo del trigémino (STN) y con núcleo descendente del V (ndV) (Butler y Hodos, 2005). Las conexiones principales del nervio trigémino y del núcleo mesencefálico del V evidenciadas en este estudio están representadas en la **Figura 8**. Tras la aplicación del Dil en el nervio V del tiburón pintarroja, se reveló una conexión a lo que podría corresponderse con STN, además de una proyección caudal a lo largo de la raíz descendente del trigémino (rdV). No pudo identificarse el núcleo de la raíz descendente del V. Este núcleo ha sido descrito anteriormente en *Scyliorhinus* y *Raja* como células adyacentes a la raíz descendente del trigémino, a partir estudios experimentales usando como trazador neuronal la peroxidada de rábano (HRP) inyectada in vivo y marcadas retrógradamente desde niveles espinales (Smeets, 1998).

Estudios de marcajes experimentales en la raíz del trigémino en la carpa también describen un sistema fundamentalmente ipsilateral, en el que se revelaron proyecciones al STN, al ndV y al lóbulo facial, además de una proyección bilateral al núcleo funicular medial (Xue et al., 2006). Por otra parte, existen evidencias de que el nervio V en lampreas proyecta directamente al cerebelo, a la zona octavolateral y al núcleo funicular. Este último patrón sugiere que los núcleos de la columna dorsal, la

zona octavolateral y el cerebelo surgen a partir de una única columna sensitiva somática, y que en las lampreas se ha mantenido esta característica primitiva. (Northcutt, 1979).

La raíz descendente del trigémino ha sido estudiada en teleósteos como el carpín dorado (Puzdrowsky, 1988) y el pez guppy (Pombal et al., 1997). En estas especies, la mayoría de los axones que forman este tracto terminan en el núcleo descendente del V (ndV) y en el núcleo funicular medial. En el marcaje de la rdV realizado en *S. canicula* se observaron células tanto del ganglio de Gasser como del MesV retrógradamente marcadas, por lo que pudo verificarse que ambos grupos de neuronas primarias envían axones a lo largo de la rdV. Estos resultados confirman los resultados previos con HRP en el que se describe la existencia de células del MesV que presentan procesos neuronales marcados en el bulbo raquídeo hacia la médula espinal como procesos (de entrada) a través de la entrada del V (Smeets y Timerick, 1981).



**Figura 8.** Representación esquemática de una vista lateral del encéfalo de un ejemplar juvenil de *S. canicula*, en la que se muestran las conexiones del sistema sensitivo del nervio trigémino deducidas en este estudio. En color verde, figuran las conexiones primarias del ganglio sensitivo trigeminal de Gasser, mientras que el color rojo se representan las proyecciones del núcleo mesencefálico del trigémino (MesV). Todas las conexiones representadas son ipsilaterales.

Asimismo, la aplicación de Dil en el nervio V, rdV y corpus cerebeloso reveló cuerpos celulares marcados pertenecientes al MesV en la región adyacente a la comisura y superficie ventricular del techo óptico. Por tanto, la ubicación de este núcleo en *S. canicula* se corresponde a la descrita anteriormente en seláceos (Smeets, 1998) y otros vertebrados no mamíferos (Butler y Hodos, 2005). En teleósteos, los cuerpos celulares del MesV se encuentran en el tegmento mesencefálico (Pombal et al., 1997). La presencia del MesV en peces holocéfalos sugiere que es un rasgo primitivo en peces cartilaginosos, aunque se han encontrado diferencias en su estructura entre diferentes especies de elasmobranquios (Smeets, 1998). Por el contrario, el MesV no ha sido identificado en lampreas, por lo que esta condición parece haber surgido a lo largo de la evolución de los vertebrados mandibulados (Northcutt, 1979). En mamíferos, el MesV está implicado en la recepción de información propioceptiva procedente de la músculos masticatorios, dientes, lengua y músculos intrínsecos

oculares (Pudrowsky, 1988). Su papel en otros vertebrados no ha sido ampliamente estudiado, aunque se han podido identificar ciertas diferencias con respecto a su función en mamíferos. En *Scyliorhinus*, concretamente, se comprobó de forma experimental que las neuronas del MesV no responden a movimientos de la mandíbula, aunque sí son sensibles a estímulos en la periferia de los dientes (Roberts y Witkovsky, 1975).

Los axones de las neuronas del MesV en la pintarroja se reúnen a nivel del mesencéfalo formando el tracto mesencefálico del trigémino, que se orienta hacia la parte posterior del techo óptico y se dirige hacia el tegmento rombencefálico. La presencia de este tracto es una característica muy conservada, ya que ha podido identificarse en toda clase de vertebrados excepto en mixines y lampreas (Butler y Hodos, 2005). En relación a las conexiones primarias del MesV, el marcaje de este núcleo reveló proyecciones del tracto mesencefálico en la región del núcleo motor del trigémino (Vm) y corpus cerebelar, además de la existencia de conexiones colaterales viajando caudalmente a la rdV. Por otra parte, se observaron neuronas del MesV marcadas tras aplicar la carbocianina en el nervio trigémino y en la rdV.

La conexión entre el MesV y el Vm en el tiburón pintarroja ha sido previamente evidenciada mediante estudios electrofisiológicos llevados a cabo por Roberts y Witkovsky (1975). Estos autores observaron que, al estimular la ruta mesencefálica, se producían respuestas electrofisiológicas de las neuronas motoras del Vm. Esto sugiere una proyección directa del MesV al núcleo motor, y constituye un reflejo monosináptico basado en una única sinapsis entre un axón sensitivo (MesV) y una neurona motora (Vm). También se ha identificado esta clase de proyección en mamíferos como la rata y el gato, en los que se han observado que un gran número de fibras del núcleo mesencefálico del V terminan en el núcleo motor (Pombal et al., 1997). Por el contrario, en el pez guppy, un teleósteo, las fibras del MesV no parecen enviar colaterales al Vm, aunque sí pasan por las proximidades de células motoras (Pombal, et al., 1997).

En algunos teleósteos como *Gnathonemus petersii* (Amey-Özel et al., 2015), *Oreochromis niloticus* (Xue et al., 2006) y carpa (Luiten, 1979), se ha descrito que el núcleo motor del trigémino (Vm) también recibe axones procedentes del STN. Dado que en el STN terminan, a su vez, proyecciones de las células del ganglio de Gasser, se trataría por tanto de un circuito reflejo bisináptico, en el que la interneurona se encontraría en el STN. La existencia de esta proyección del STN a Vm no pudo determinarse en *S. canicula*, ya que la efectividad de la metodología usada en este estudio se vería desfavorecida dada la proximidad entre ambos núcleos.

Por otra parte, se ha descrito que ciertas neuronas localizadas en la región del MesV proyectan hacia el corpus del cerebelo en tiburones (Roberts y Witkovsky, 1975). Esta conexión ha sido confirmada recientemente en la pintarroja (Pose-Mendez et al., 2014), mientras que no se ha descrito en las células del MesV de peces teleósteos como el pez guppy (Pombal et al., 1997). En este estudio experimental, el marcaje

realizado en corpus cerebelar mostró que las grandes células retrógradamente marcadas en el techo óptico reciben información que procede de la periferia a través del nervio V, por lo que nuestros resultados confirman que son realmente las células del núcleo mesencefálico las que mandan sus axones al corpus cerebelar. Estos resultados complementan las conexiones indicadas por Smeets (1998), que no pudo confirmar estos proceso neuronales de entrada a través de la raíz del trigémino.

El hecho de que en el marcaje de corpus cerebelar presente células de mesencefálico marcadas pero no fibras de la rdV, nos indica que estas células son, en realidad, una subpoblación de neuronas del MesV que envían axones hacia cerebelo y no mandan hacia la raíz descendente. La existencia de esta subpoblación de células del mesencefálico podría verificarse mediante un marcaje doble.

## CONCLUSIONES

1. El uso de soluciones de incubación a temperaturas medias o elevadas que contengan urea es incompatible con la técnica de marcaje basada en carbocianinas utilizada en este estudio.
2. La organización del sistema sensitivo del nervio trigémino en *Scyliorhinus canicula* es similar al patrón observado en elasmobraquios y otros vertebrados. Todas las conexiones observadas en este sistema son ipsilaterales.
3. El núcleo mesencefálico del nervio trigémino (MesV) proyecta en *Scyliorhinus canicula* a núcleo motor del V y al corpus cerebelar. El MesV también envía fibras colaterales a regiones caudales a través de la raíz descendente del trigémino (rdV). Existe una subpoblación de neuronas del MesV que proyecta a corpus cerebelar y que no envían axones hacia la raíz descendente.

## CONCLUSIONS

1. The tracing technique performed in this study and the incubation in solutions containing urea, at medim or high temperature, can't coexist without conflict.
2. The general organization of the sensory trigeminal system in *S. canicula* is similar to the pattern observed in elasmobranchs and other vertebrates.. All the connections observed in this system were ipsilateral.
3. The mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve (MesV) in *Scyliorhinus canicula* projects to both motor trigeminal nucleus and corpus cerebelli. MesV was also found to send collateral fibers to caudal levels through the descending trigeminal tract (rdV).We Our results reveal the the existence of a subpopulation of MesV cells sending axons to the corpus cerebelli but not sending to the rdV



## BIBLIOGRAFÍA

- Amey-Özel, M., von der Emde, G., Engelmann, J. y Grant, K. (2015). More a finger than a nose: the trigeminal motor and sensory innervation of the schnauzenorgan in the elephant-nose fish *Gnathonemus petersii*. *The Journal of Comparative Neurology*, 523(5), 769-789. doi: 10.1002/cne.23710
- Butler, A. B., Hodos, W. (2005). *Comparative vertebrate neuroanatomy* (2ª ed.). Nueva York: Wiley-Interscience.
- Chervova, L. S. y Lapshin, D. N. (2011). Behavioral control of the efficiency of pharmacological anesthesia in fish. *Journal of Ichthyology*, 51(11), 1126-1132. doi: 10.1134/s0032945211110026
- Ellis, J., Mancusi, C., Serena, F., Haka, F., Guallart, J., Ungaro, N., Coelho, R., Schembri, T. y MacKenzie, K. (2009). *Scyliorhinus canicula*. The IUCN Red List of Threatened Species (Version 2014.3) Disponible en [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Folgueira, M., Anadón, R. y Yáñez, J. (2004). An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I: olfactory bulb and ventral area. *The Journal of Comparative Neurology*, 480, 180-203. doi: 10.1002/cne.20341
- Hofmann, M. H. (1999). Nervous system. En: Hamlett, W.C. (Eds.), *Sharks, Skates and Rays: the biology of elasmobranch fishes* (pp. 273-298). Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- Luiten, P. F. M. (1979). Proprioceptive reflex connections of head musculature and the mesencephalic trigeminal nucleus in the carp. *The Journal of Comparative Neurology*, 183(4), 903-912. doi: 10.1002/cne.901830412
- Masseck, O. A. y Hoffmann, K-P. (2008). Responses to moving visual stimuli in pretectal neurons of the small-spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Journal of Neurophysiology*, 99(1), 200-207. doi: 10.1152/jn.00926.2007
- Northcutt, R. G. (1979). Experimental determination of the primary trigeminal projections in lampreys. *Brain Research*, 163(2), 323-327. doi: 10.1016/0006-8993(79)90360-3
- 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*, 42(2), 111-118. doi: 10.1016/s0361-9230(96)00205-5

Pose-Mendez, S., Candal, E., Adrio, F. y Rodríguez-Moldes, I. (2014). Development of the cerebellar afferent system in the shark *Scyliorhinus canicula*: insights into the basal organization of precerebellar nuclei in gnathostomes. *The Journal of Comparative Neurology*, 522(1), 131-168. doi: 10.1002/cne.23393

Puzdrowski, R. L. (1988). Afferent projections of the trigeminal nerve in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Morphology*, 198(2), 131-147. doi: 10.1002/jmor.1051980202

Roberts, B. L. y Witkovsky, P. (1975). A functional analysis of the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the selachian brain. *Proceedings of the Royal Society of London- B*, 190(1101), 473-495. doi: 10.1098/rspb.1975.0107

Rose, J. D. (2002). The Neurobehavioral Nature of Fishes and the Question of Awareness and Pain. *Reviews in Fisheries Science*, 10(1), 1-38. doi: 10.1080/20026491051668

Smeets, W. J. A. J. (1998). The central nervous system of cartilaginous fishes. En: Nieuwenhuys, R. (Eds.), *The central nervous system of vertebrates* (pp. 552-649). Berlin: Springer. doi: 10.1007/978-3-642-18262-4\_12

Smeets, W. K. A. J. y Timerick, S. J. B. (1981). Cells of origin of pathways descending to the spinal cord in two chondrichthyans, the shark *Scyliorhinus canicula* and the ray *Raja clavata*. *The Journal of Comparative Neurology*, 202(4), 473-491. doi: 10.1002/cne.902020403

Sneddon, L. U. (2003). Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Research*, 972(1-2), 44-52. doi: 10.1016/s0006-8993(03)02483-1

Sneddon, L. U, Braithwaite, V. A. y Gentle, M. J. (2003). Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London- B*, 270(1520), 1115-1121. doi: 10.1098/rspb.2003.2349

Von Bartheld, C. S., Cunningham, D. E. y Rubel, E. W. (1990). Neuronal tracing with Dil: decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38(5), 725-733. doi: 10.1177/38.5.2185313

Xue, H., Yakamoto, N., Yang, C., Kerem, G., Yoshimoto, M., Sawai, N., Ito, H., Ozawa, H. (2006). Projections of the sensory trigeminal nucleus in a percomorph teleost (*Oreochromis niloticus*). *The Journal of Comparative Neurology*, 495(3), 279-298. doi: 10.1002/cne.20865

## ABREVIATURAS

<b>Cb</b>	Cerebelo
<b>Cer</b>	Núcleo cerebeloso
<b>co cb</b>	Corpus cerebelar
<b>flm</b>	Fascículo longitudinal medial
<b>LX</b>	Lóbulo del X
<b>MesV</b>	Núcleo mesencefálico del V
<b>MLF</b>	Fascículo longitudinal medial
<b>nflm</b>	Núcleo del fascículo longitudinal medial
<b>ndV</b>	Núcleo descendente del trigémino
<b>nV</b>	Nervio trigémino
<b>Rh</b>	Romboencéfalo
<b>STN</b>	Núcleo sensitivo del trigémino
<b>TO</b>	Techo óptico