



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudo experimental das conexións neuronais da
área telencefálica dorsal no peixe zebra
(*Danio rerio*)**

Laura Piñeiro Lourés

Trabajo Fin de Máster

Curso 2014/2015

Fecha de entrega: 21/07/2015

Índice

Abreviaturas	1
1.- Introducción	2
2.- Objetivos	7
3.- Material y métodos	
<i>Material biológico</i>	8
<i>Marcaje con carbocianinas</i>	8
<i>Tinción inmunohistoquímica para la calretinina</i>	9
4.- Resultados	
<i>Inmunorreactividad a la Calretinina</i>	12
<i>Marcaje en la zona posterior del área telencefálica dorsal: Dp</i>	14
<i>Marcaje en la zona lateral del área telencefálica dorsal: Dl</i>	18
<i>Marcaje en la zona medial del área telencefálica dorsal: Dm</i>	23
5.-Discusión	
<i>Distribución telencefálica de la Calretinina</i>	32
<i>Conexiones de la zona posterior del telencéfalo dorsal Dp</i>	34
<i>Conexiones de la zona lateral del área telencefálica dorsal Dl</i>	35
<i>inconexiones de la zona lateral del área telencefálica medial Dm</i>	37
6.-Conclusiones	39
7.- Bibliografía	40

Abreviaturas

ATN: núcleo anterior del tálamo	Dp: parte posterior del telencéfalo dorsal	PGl: núcleo preglomerular lateral
BO: bulbo olfativo	ECL: capa celular externa	PGm: núcleo preglomerular medial
Cant: comisura anterior	EG: eminencia granular	Pit: pituitaria
CC: crista cerebral	ENd: núcleo endopeduncular	PP: región preóptica
CCe: cuerpo del cerebelo	Ha: habénula	PPa: área preóptica periventricular anterior
CM: Cuerpo mamilar	I: nervio olfativo	PPp: área preóptica periventricular posterior
Cpop: comisura postóptica	II: nervio óptico	PSp: núcleo pretecal parvocelular superficial
CR-ir: calretinina inmunorreactivas	IL: lóbulo interior hipotalámico	PTN: núcleo tuberal posterior
Ctec: comisura tectal	IV: nervio troclear	SC: núcleo supraquiasmático
D: área telencefálica dorsal	LFB: tracto telencefálico lateral	SR: rafe superior
DAB: diaminobenzidina	LFB: trato telencefálico lateral	Tel: telencéfalo
Dc: parte central del telencéfalo dorsal	LH: lóbulo hipotalámico	TeO: techo óptico
Dd: parte dorsal del telencéfalo dorsal	LOT: tracto lateral olfativo	TeO: techo óptico
Dil: perclorato 1,1' dioctadecil 3,3,3',3' tetrametilcarbocianina	LP: lóbulo posterior	TH: hipotálamo tuberal
DI: parte lateral del telencéfalo dorsal	LVII: lóbulo facial	TLa: toro lateral
DId: zona dorsal de la parte lateral del telencéfalo dorsal	LX: lóbulo vagal	TLa: toro lateral
Dlp: zona ventral de la región postcomisural de la parte lateral del telencéfalo dorsal	LL: nervios de la línea lateral	TPp: núcleo tegmental laterodorsal
Dlv: zona ventral de la región precomisural de la parte lateral del telencéfalo dorsal	MFB: tracto telencefálico medial	V: área telencefálica ventral
Dm: parte dosomedial del telencéfalo dorsal	MO: médula oblongata	V: nervio trigémino
DP: núcleo tálamico dorsal posterior	MOT: tracto medial olfativo	Vd: zona dorsal del área telencefálica ventral
	MS: médula espinal	VII: nervio facial
	NP: núcleos pretecales	VIII: nervio octaval
	OB: bulbo olfativo	VL: núcleo ventrolateral del tálamo ventral
	PB: tampón fosfato salino	VM: núcleo ventromedial del tálamo ventral
	PBS: tampón fosfato salino	Vp: zona posterior del área telencefálica ventral
	PBS-T: PBS Tritón X-100 0,01%	Vv: zona ventral del área telencefálica ventral
	PG: área preglomerular	X: nervio vago
	PG: núcleos del complejo preglomeruloso	
	PGa: núcleo preglomerular anterior	

1.- Introducción

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleósteo perteneciente a la familia Cyprinidae, del Orden Cypriniformes, Clase Actinopterygii. Está considerado como el organismo modelo de vertebrados, especialmente para estudios del desarrollo. Son semitransparentes 24 horas después de la fecundación lo que permite observar fácilmente sus órganos internos. Presentan un pequeño tamaño alcanzando un máximo de 50mm y su coste de mantenimiento es relativamente bajo. Además su capacidad reproductiva es alta y permite realizar experimentos en el plazo de 2-3 meses. Sin embargo; en el campo de la neurociencia, los experimentos realizados en especímenes adultos son escasos.

En el desarrollo del sistema nervioso comienza a apreciarse la segmentación del encéfalo del pez cebra a las 24 horas. Lo primero en aparecer es la placa neural de origen ectodérmico. Mediante el proceso de neurulación se genera el tubo neural que en el extremo anterior se expande diferenciándose las tres vesículas encefálicas primarias que se describen de la más rostral a la más caudal como: prosencéfalo, mesencéfalo y rombocéfalo. Posteriormente se transformaran en cinco vesículas (Wulliman. 1998) como se indica en la Figura 1. El Sistema Nervioso Central de teleósteos queda por tanto constituido como una estructura compleja, en la que pueden diferenciarse seis grandes regiones: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo, mielencéfalo y médula espinal.

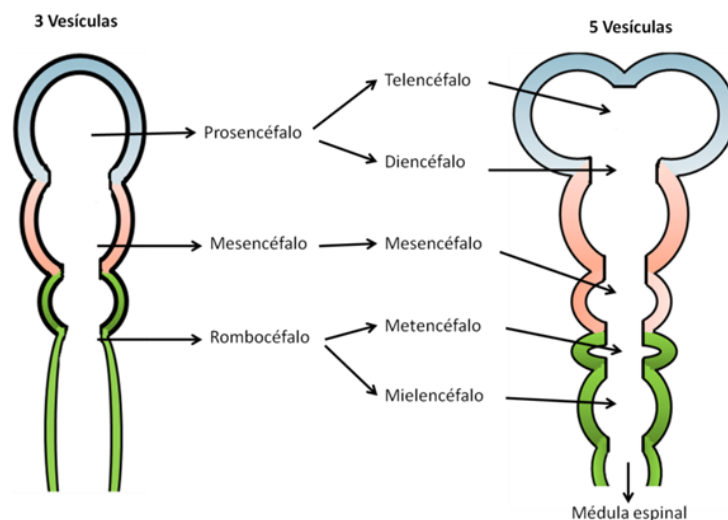


Figura 1. Desarrollo temprano del encéfalo.

Si bien el modelo general de desarrollo del Sistema Nervioso de teleósteos es común al del resto de los vertebrados, algunos de los procesos que acontecen durante el mismo se desarrollan según mecanismos peculiares y diferentes a los observados en otros vertebrados (Porteros Herreros, 1997). Estos mecanismos se producen tanto en los procesos más tempranos del desarrollo como en la morfogénesis tardía del encéfalo. Mientras que en la mayoría de los vertebrados el telencéfalo es producto de un proceso de evaginación del tubo neural, se ha postulado que en los peces teleósteos aparece tras un proceso de eversión (Figura 2). Se han propuesto varios modelos de eversión desde los más simples a los más elaborados (Muller et al., 2011).

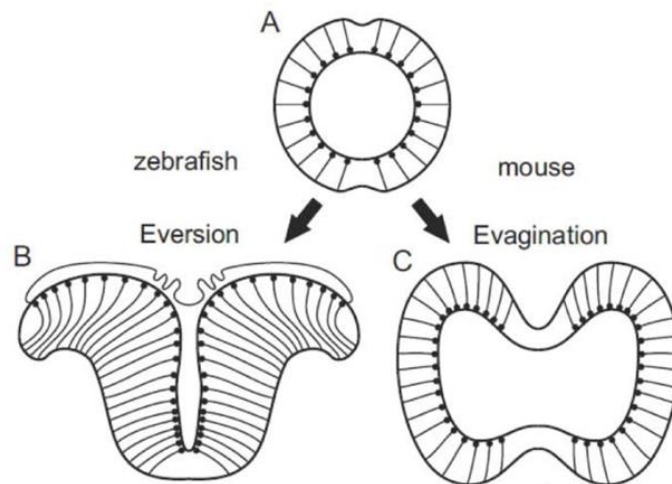


Figura 2. Desarrollo del telencéfalo a partir del tubo neural (A) mediante un proceso de eversión en el pez cebra (B) y evaginación en ratón (C) (Mueller et al; 2011).

Una vez desarrollado, podemos distinguir las siguientes partes en un adulto como se muestran en la figura 3 extraída de Wulliman et al. (1996)

El telencéfalo de los teleósteos está constituido por dos pares de estructuras, los bulbos olfatorios y los hemisferios telencefálicos. El bulbo olfatorio es el primer centro de relevo de la vía olfatoria. Como en todos los vertebrados muestra una estructura laminar y contiene los cuerpos celulares de las células mitrales y granulares, aunque hay también tipos neuronales y conexiones sinápticas no existentes en otros vertebrados (Porteros Herreros, 1997).

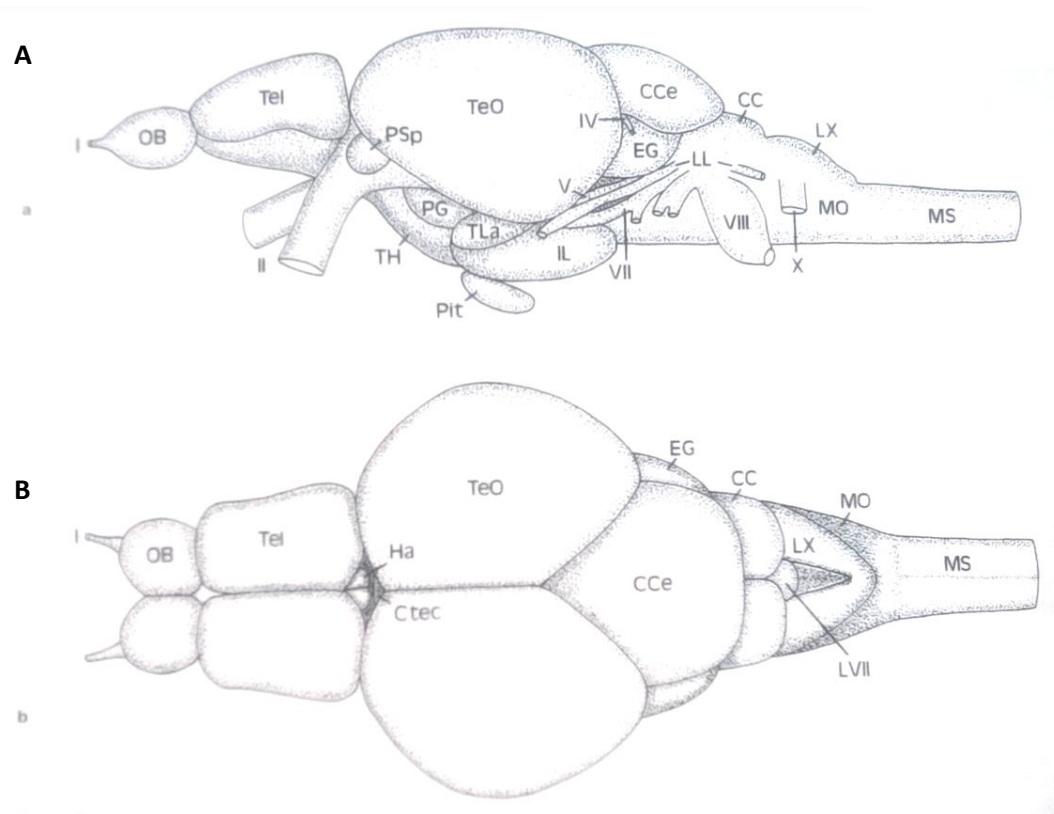


Figura 3. Anatomía del cerebro del pez cebra. A: vista transversal; B: vista dorsal. CC: crista cerebral; CCe: cuerpo del cerebelo; Ctec: comisura tectal; EG: eminencia granular; Ha: habénula; IL: lóbulo interior hipotalámico; LL: nervios de la línea lateral; LVII: lóbulo facial; LX: lóbulo vagal; MO: médula oblongata; MS: médula espinal; OB: bulbo olfativo; PG: área preglomerular; Pit: pituitaria; PSp: núcleo pretectal parvocelular superficial; Tel: telencéfalo; TeO: techo óptico; TH: hipotálamo tuberal; TLa: toro lateral; I: nervio olfativo; II: nervio óptico; IV: nervio troclear; V: nervio trigémino; VII: nervio facial; VIII: nervio octava; X: nervio vago (de Wulliman et al., 1996)

Los hemisferios telencefálicos están separados por el ventrículo central que aparece entre ambos durante el proceso de eversión. Histológicamente podemos distinguir dos regiones en el telencéfalo de teleósteos, que se conocen con los términos de área ventral (V) y área dorsal (D), términos introducidos por Källén (1951). La mayoría de los autores los consideran homólogos al subpalio y al palio de los tetrápodos respectivamente.

A su vez el área dorsal se ha subdividido a su vez en distintas regiones con criterios citoarquitecto-estructurales, neuroquímicos y hodológicos: región central (Dc), región medial (Dm), región lateral (Dl) y región posterior (Dp). La distribución y extensión de

estas subdivisiones puede variar entre teleósteos siendo ésta la región del encéfalo de teleósteos que muestra mayor variación. Además el hecho de su peculiar ontogenia genera complicaciones en el establecimiento de su homología con otras clases de vertebrados, por lo que es posiblemente la región del encéfalo menos comprendida (Folgueira et al., 2012).

En las células nerviosas ocurre un mecanismo de transporte de moléculas a través de los axones que puede producirse desde el soma celular hasta la periferia de los axones (transporte anterógrado) y desde los terminales axonales hasta el soma neuronal (transporte retrógrado). Las técnicas de trazado axonal se basan en este transporte del flujo axoplásmico y permiten aplicar determinadas sustancias denominadas trazadores de forma anterógrada o retrógrada para identificar la proyección axonal ó el soma neuronal respectivamente. (Zorrilla, 2013). Estas proyecciones nos permiten conocer las conexiones entre neuronas y los distintos núcleos.

Entre los distintos tipos de trazadores neuronales se han seleccionado para este estudio principalmente el DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'tetrametilindo perclorato de carbocianina) y en algunos experimentos de doble marcaje el DiO (3,3'-dioctadeciloxa perclorato de carbocianina) (Molecular Probes; Invitrogen), ambas de la familia de las carbocianinas. Las carbocianinas son compuestos lipofílicos fluorescentes, con un alto grado de hidrofobicidad, que se incorporan a la membrana plasmática de las células y en el caso de las neuronas difunden pasivamente a lo largo de sus prolongaciones de forma retrógrada y anterógrada, distribuyéndose tanto en las dendritas como en el axón y somas neuronales.

Su elección se debió a sus propiedades como trazador *post mortem* al poder emplearse sobre el tejido previamente fijado, lo que facilita el marcaje de regiones pequeñas o de difícil acceso y evitando depender de supervivencia del ejemplar a la operación de marcaje *in vivo* o durante el periodo de transporte intracelular del trazador. Como en el caso de las carbocianinas el desplazamiento del trazador es por difusión, en lugar de por transporte activo, para revelar las conexiones neuronales a larga distancia es necesario un periodo de incubación, de varias semanas en el presente estudio, que permita la difusión del trazador por las membranas celulares.

Dadas sus propiedades como fluoróforos emiten fluorescencia a una determinada longitud de onda, al ser estimuladas a otra longitud de onda menor. El DiI presenta una absorción máxima a 549 nm y una emisión máxima a 565 nm mientras que el DiO

presenta su máximo de emisión a 501 nm y su máximo de excitación a 484 nm (ver Web Invitrogen™) (Figura 4). Esto permitió el uso simultáneo en algunos casos de ambos trazadores en un mismo tejido.

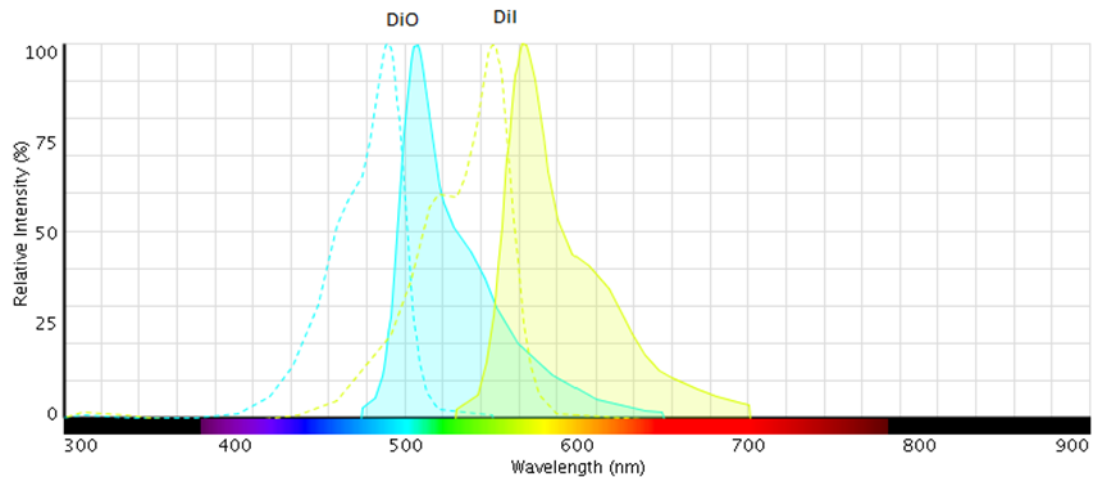


Figura 4. Espectro de absorción (¿curva punteada?) y excitación del DiO (curva azul) y DiI (curva amarilla)

La calretinina (CR) es una proteína citosólica de unión al calcio de 29 kD, abundantemente expresada en las neuronas. Pertenece a la superfamilia de troponina C con seis dominios EF-hand que se unen calcio. Esta proteína desempeña un papel en diversas funciones celulares, incluyendo el mantenimiento de la homeostasis del calcio por el equilibrio de la concentración de calcio intracelular.

La calretinina es empleada como marcador neuronal mediante técnicas inmunohistoquímicas al ser expresada principalmente por distintos grupos de neuronas tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Se ha demostrado su uso como marcador de centros neuronales, vías y subpoblaciones neuronales en el prosencéfalo del pez cebra (Castro et al., 2006).

2.- Objetivos

- 1.- Establecer las subdivisiones en las distintas áreas del telencéfalo dorsal (D) mediante tinción inmunohistoquímica con calretitnina.
- 2.- Conocer la hodología de las distintas áreas del telencéfalo dorsal (D): Dl, Dm y Dp; a través del trazador neurona DiI.

3.- Material y métodos

Material biológico

Se mantuvieron apropiadamente en un acuario 9 especímenes de pez cebra adultos (*Danio rerio*, Ciprinidae) que fueron obtenidos a través de un distribuidor local y mantenidos en un acuario hasta alcanzar una talla estándar (desde el extremo anterior de la cabeza hasta la base de la aleta caudal) superior a 4 cm. Todos los experimentos se realizaron conforme a los protocolos estándar del laboratorio que contemplan las normas de cuidado animal y experimentación de la comunidad europea y aprobados por el Comité ético de experimentación animal de la UDC.

Para la fijación histológica del tejido nervioso los especímenes fueron anestesiados con 0,1% de la sal metanosulfonada del 3 aminobenzoato de etilo (MS-222; Sigma, St. Louis, MO) en agua desclorada del propio acuario. Posteriormente fueron perfundidos transcárdialmente con una solución fría de 4% paraformaldehído en tampón fosfato 0.1M a pH 7.4 (PB) para fijar el tejido. Los encéfalos fueron extraídos cuidadosamente del cráneo y almacenados a 4°C en el mismo medio de fijación hasta su uso.

Marcaje con carbocianinas

La mayor parte de los marcajes se realizaron con el trazador lipofílico perclorato 1,1' dioctadecil 3,3,3',3' tetrametilcarbocianina (DiI, Molecular Probes, Eugene, OR). Dependiendo de la accesibilidad anatómica del lugar de marcaje se realizaron dos procedimientos. Si la región a marcar era superficial y se encontraba en un área accesible del encéfalo, se insertó manualmente un cristal de DiI en su superficie de interés con la ayuda de un alfiler entomológico (minucia) bajo una lupa binocular y la zona se selló con agarosa al 3% en PB.

En zonas internas o menos accesibles el encéfalo fue embebido previamente en un bloque de agarosa y seccionado en un vibratomo (Campden instruments, UK) hasta alcanzar el nivel de interés y acceder al núcleo para su marcaje. La aplicación del DiI se realizó también manualmente y se selló la región con una gota de agarosa líquida al 3% en PB.

En ambos procedimientos, los encéfalos fueron incubados en oscuridad a 37°C en solución fijadora durante un periodo variable dependiendo de las características del marcaje. Transcurrido el periodo de incubación, el encéfalo fue incluido en un medio de 3% de agarosa (procedimiento 1), orientado y seccionado transversalmente en un Vibratomo con un grosor de 70 μm y observados en un fotomicroscopio de fluorescencia dotado de los filtros compatibles (Texas red). En algunos experimentos se realizó un marcaje doble DiI y DiO siguiendo el mismo protocolo descrito y observados en el fotomicroscopio con filtros simples (Texas Red y FITC, respectivamente) o doble (GFP/DSRed)

Tinción inmunohistoquímica para la calretinina

Antes de proceder con la tinción inmunohistoquímica el tejido previamente fijado en paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.1M a pH 7.4 debe estar libre del fijador, haberse congelado, incluido en medio OTC, seccionado y dispuesto ordenadamente en portaobjetos.

Para eliminar el fijador del tejido se realizaron tres lavados de solución PB. A continuación se procedió a la crioprotección del tejido con sacarosa para evitar la posible formación de cristales en las células durante la posterior congelación, actuando así de solución anticongelante. Para ello se procedió a la adicción progresiva de sacarosa al medio PB, incubando el tejido primero en sacarosa al 10% durante una hora, al 20% durante 1-2 horas, y al 30% durante toda la noche.

Posteriormente se introdujo el tejido durante 10 minutos en un medio de OTCTM y sacarosa al 30% en PB en relación 1:1. El tejido se incluyó en un molde con OTCTM después de secarlo parcialmente con papel de filtro, prestando especial atención en que la orientación del encéfalo fuera adecuada para luego proceder al seccionado. Para ello el

medio con el encéfalo deben congelarse previamente para constituir un bloque con la dureza suficiente que permita realizar finas secciones. La congelación se realizó por inmersión del molde en una solución de 2-metilbutanano isopropano (C₅H₁₂) enfriada a su vez en un baño de nitrógeno líquido.

Las secciones transversales del encéfalo fueron realizados en un criostato a -21°C con 12 µm de espesor. las secciones fueron dispuestas sobre portaobjetos gelatinizados y mantenidos a 4°C hasta realizar la tinción inmunohistoquímica.

Para realizar la tinción en primer lugar se elimina el medio OTC™ con dos baños de 10 minutos en agitación en tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7.4. posteriormente se elimina la actividad peroxidasa endógena con un baño de 30 minutos en agitación en H₂O₂ al 3% en PBS y en oscuridad para evitar la foto-oxidación del peróxido de hidrógeno. A continuación se realizan dos lavados de 5 minutos en PBS en agitación para eliminar H₂O₂. Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario las secciones se preincuban en suero de cabra NGS (REF: G6767, Sigma®) en PBS en relación 1:10 durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Previamente el tejido fue bañado en el detergente Tritón X-100 0,01% en PBS (PBS-T) durante 5 minutos en agitación, para permeabilizar las membranas celulares.

Una vez preparado el tejido se incuba con el anticuerpo primario policlonal anti-calretinina de conejo (SWant) diluido en PBS a relación 1:500 durante 20 horas a 4°C en la cámara húmeda. Se dan dos lavados en PBS y otro igual en PBS-T. Después se incuba con el anticuerpo secundario policlonal GAR-biotinilado (DakoCytomation) diluido en PBS a 1:200 durante una hora a temperatura ambiente en la cámara húmeda. Tras dos lavados de PBS en agitación durante 5 minutos y otro de PBS-T, se incuba a temperatura ambiente con Extravidina-Peroxidasa (Sigma) diluido 1:100 en PBS. Finalmente se realizan tres lavados antes de la adición de los reactivos.

Para la reacción se añaden como substrato 0,06% de Diaminobenzidina (DAB, Sigma) y 0,005% de H₂O₂ diluidos en PBS durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se realiza primero incorporando la DAB al PBS y es necesario filtrar la mezcla con papel de filtro para eliminar restos no disueltos de DAB. A continuación se añaden el H₂O₂ a la mezcla en un matraz protegido la luz para evitar su oxidación. El DAB es un producto potencialmente cancerígeno por lo que se debe evitar el contacto a través de guantes y mascarilla, y se inactiva con lejía. Tras el revelado de

los lugares de inmunoreacción se realizan tres lavados en PBS. Finalmente las preparaciones se deshidrataron y montaron con una resina sintética (Eukitt®).

Los controles de especificidad del anticuerpo utilizado (por la técnica de Western) y de la reacción inmunohistoquímica fueron realizados previamente en el laboratorio (Castro y col., 2006).

4.- Resultados

Inmunorreactividad a la Calretinina

En peces cebra adultos se observa una distribución característica de células y fibras calretinina inmunorreactivas (CR-ir) en el area telencefálica dorsal y ventral del telencéfalo. En este estudio se han identificado zonas con diferente grado de inervación de fibras CR-ir así como poblaciones neuronales CR-ir en el telencéfalo dorsal. La distribución general de la calretinina se muestra en la Figura 5(A-L). La regionalización neuroquímica con calretinina del area dorsal del telencéfalo revela una zonación anatómica que complementa y detalla la planteada por Wullimann y col., (1996) basada y criterios topológicos y tinciones generales.

En general, la parte dosomedial del telencéfalo dorsal o palio (Dm) esta inervada por fibras ricas en calretinina excepto en su región más rostral donde podemos distinguir una región químicamente distinta a la que hemos denominado Dm1 (Fig. 5C). Caudalmente a Dm1 aparece una zona rica en fibras CR-ir a la que hemos denominado Dm2 quedando desplazado Dm1 a una zona más dorsal hasta que desaparece (Fig. 5D-F). Al nivel de la comisura anterior se observa una región adyacente de Dm2 y separada de Dd por el surco ipsiloniforme con abundantes fibras y células CR positivas (Fig. 5H-K). A esta zona la hemos denominado Dm4 y alcanza su mayor extensión en la región postcomisural donde va desapareciendo gradualmente hacia zonas más rostrales y caudales. Se encuentra en la región más lateral de Dm. También a nivel comisural empezamos a distinguir dos subzonas en Dm2, una con mayor densidad de fibras CR-ir que ocupa la región ventral y a la que denominamos Dm 3 y otra dorsal con menor densidad de fibras CR-ir a la que continuamos llamado Dm2 (Fig. 5G-L). Así en la región más caudal del telencéfalo domina Dm3 y Dm2 va desapareciendo gradualmente. También se ha observado como Dm recibe gran cantidad de fibras CR-ir en gruesos haces que viajan a través de los tractos telencefálicos mediales y laterales.

Se han podido realizar tres divisiones en la parte lateral del telencéfalo dorsal (DI) que no han sido establecidas por Wullimann y col. (1996). En la zona más caudal de DI se puede distinguir una zona ventral con fibras mucho más ricas en calretinina a la que se ha llamado DIv (Fig. 5C-D), y una zona dorsal de DI con fibras menos marcadas a la que

hemos denominado Dld (Figura 5C-G, I). Dlv desaparece a nivel comisural y en la región postcomisural aparece una nueva zona más rica en fibras CR-ir que Dld en la zona ventral. A esta zona se la ha denominado como Dlp y desaparece en la región caudal (Fig. 5I-K).

Las regiones Dp, Dc y Dl muestran una invasión escasa de calretinina mientras que Dd parece poseer más fibras positivas a la calretinina (Fig. 5G). En el área caudal de Dp se ha observado una población de células CR-ir (Fig. 5K)..

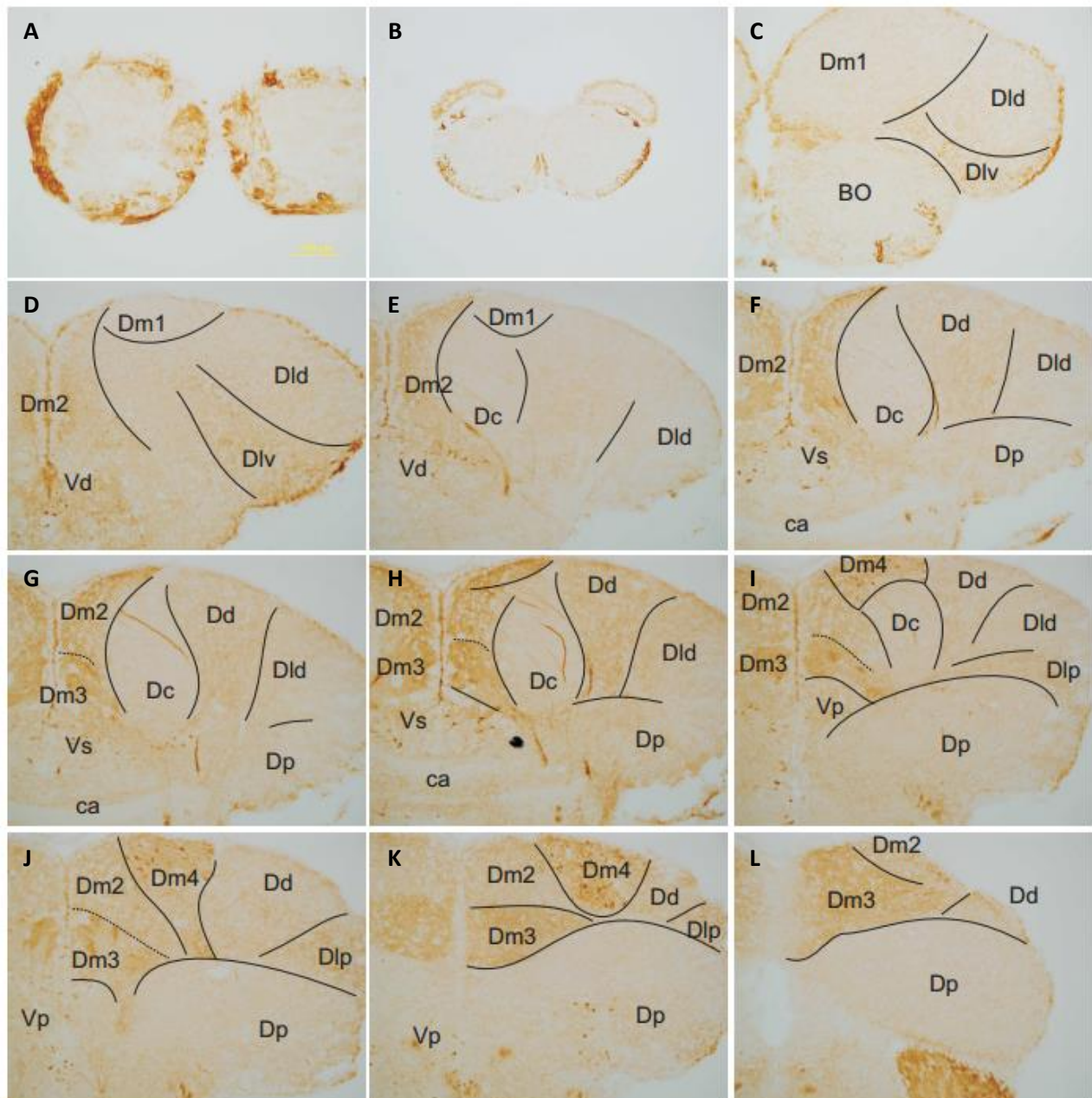


Figura 5. Regionalización neuroquímica con calretinina del área dorsal del telencéfalo.

Marcaje en la zona posterior del área telencefálica dorsal: Dp

Aferencias:

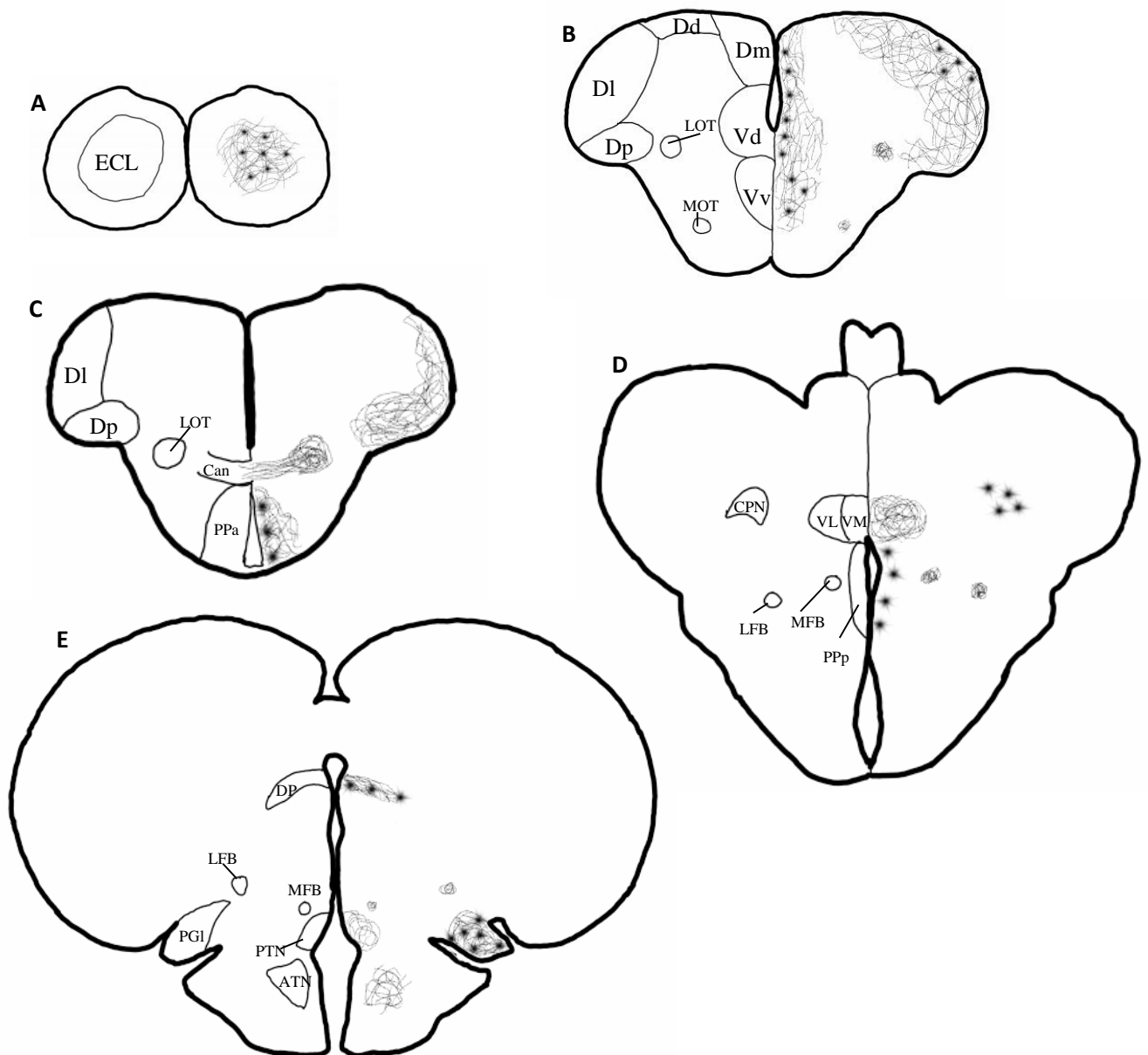
En el bulbo olfativo, concretamente en la región granular o también denominada como capa celular externa (ECL) se han encontrado aferencias bilaterales en células mitrales (Figuras 6A, 7A). En el área telencefálica ventral (V) se han encontrado gran cantidad de células retrógradamente marcadas en Vd ipsilateral periventricular (Figura 6B) y algunas células aferentes bilateralmente distribuidas en Vv (Figs. 6B, 7D). En el área telencefálica dorsal se ha observado únicamente algunas células en Dm ipsilateral en la zona medial que corresponde con la región Dm (Dm-2, *ver calretinina*) y en Dl (Figs. 6B, 7C). A nivel comisural (de la comisura anterior) se observan núcleos en la región más medial del área preóptica periventricular anterior (Ppa) en la zona ipsilateral y contralateral (Figs. 6C, 7E). A nivel postcomisural se observan la continuación de los núcleos en Ppp (Fig. 6D) ipsilaterales. También se observaron algunas células ipsilaterales en el núcleo pretectal CPN (Figura 6D).

Ya en regiones extratelencefálicas, se observan algunas células ipsilateralmente marcadas en el tálamo en DP (núcleo dorsal posterior, Fig. 2E), en el núcleo anterior del tálamo (ATN, Fig. 6E), numerosos núcleos celulares en los núcleos del complejo preglomeruloso PGa y PGI (Figs. 6D-E, 7G), y algunas células en el núcleo lateral de la válvula (NLV, Fig. 6G).

Eferencias:

En el bulbo olfativo se pudieron observar bilateralmente fibras varicosas en ECL (Figs. 6A, 7A). En el área ventral del telencéfalo se marcó el tracto medial olfativo MOT bilateralmente (Figs. 6B, 7B) y el tracto lateral olfativo LOT también de forma bilateral (Figura 6B). En los lóbulos telencefálicos se encontraron fibras ipsilaterales en Vd y algunas en Vv (Figs. 6B y 7B). En el área dorsal del telencéfalo se marcaron bilateralmente fibras en Dl, Dm y Dd (Figs. 6B, 7C). En la región comisural numerosas fibras marcadas cruzan por la comisura anterior (Fig. 7F). También se observaron algunas fibras bilaterales en Ppa (Figs. 6C,7E).

Caudalmente a la comisura anterior se continúa el tracto telencefálico medial MFB marcado bilateralmente e ipsilateralmente el tracto telencefálico lateral LFB (Fig. 6D). Existen fibras ipsilaterales cruzando la habénula (Fig. 6D). A su vez se observaron fibras con varicosidades en los núcleos ventrolateral y ventromedial del tálamo ventral (VL y VM), en el núcleo talámico dorsal posterior DP así como en el núcleo pretectal CPN y en ATN, todos ellos ipsilaterales. Se observan fibras en PGa y PGI (Figs. 6D-E y 7G). Las eferencias mas caudales las encontramos en PTN con numerosas fibras y en TLa muy marcado (Figs. 6F,7H).



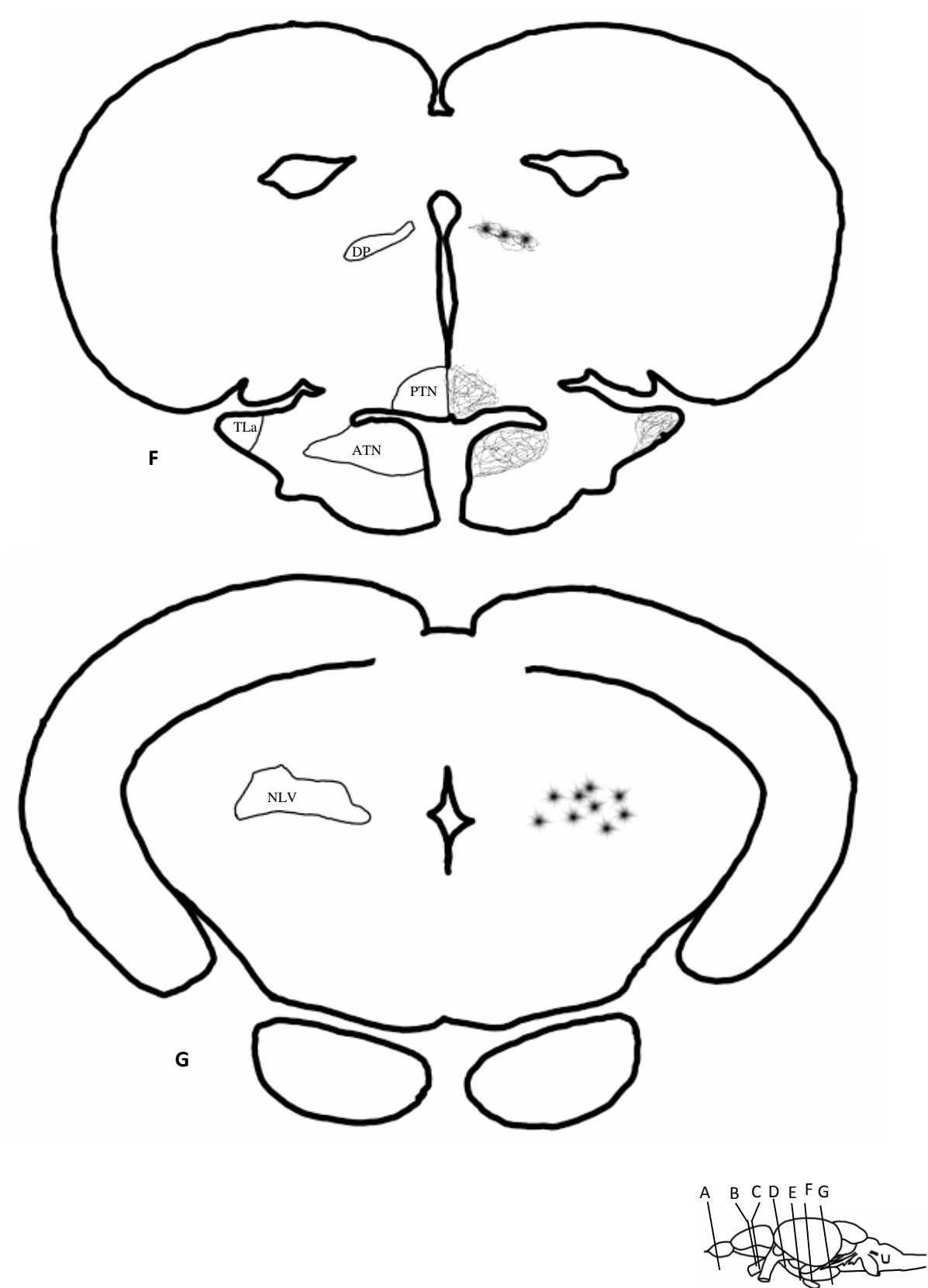


Figura 6. Resultados del marcaje con el trazador neuronal Dil en Dp.

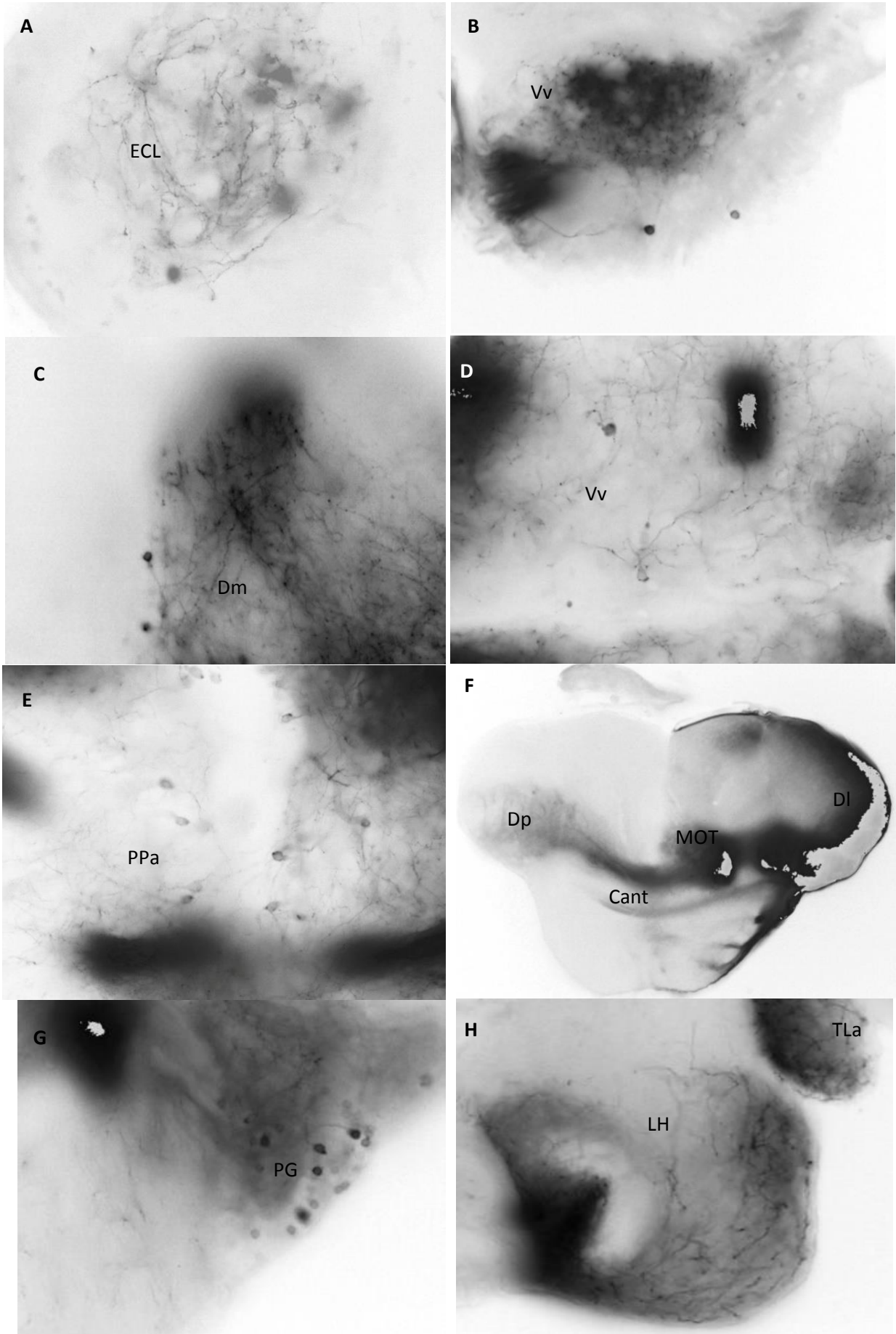


Figura 7. Imágenes del resultado del marcaje en Dp con Dil

Marcaje en la zona lateral del área telencefálica dorsal: DI

Aferencias:

En el bulbo olfativo se han encontrado núcleos marcados bilateralmente y aferencias bilaterales en células mitrales en la región granular o ECL (Figs. 8, 9A),

En el área telencefálica ventral (V) de los lóbulos telencefálicos se han encontrado algunas células ipsilaterales en la zona medial de Vv, siendo más abundantes en las regiones caudales. También se han observado algunas células ipsilaterales en la zona rostral de Vd en la región más anterior (Figs. 8B, 9B). En el área telencefálica dorsal (D) se observaron células contralaterales en DI a nivel precomisural (Fig. 8B)., Al nivel comisural se observaron ocasionalmente células en Dm en su zona más medial correspondiente a Dm-2 (*ver calretinina*) y células marcadas en Dc (Fig. 8B). También se observan núcleos en la parte dorsal del núcleo endopenduncular (END) en la zona ipsilateral (Fig. 8C).

En regiones extratelencefálicas, se observaron células retrógradamente marcadas ipsilateralmente en el tálamo ventral (VL y VM, Figura 8D) y abundantes células tanto en la zona contralateral como ipsilateral en el núcleo preglomerular PGI (Fig. 8D, 9D) y en la periferia de PGM además de numerosas células marcadas bilateralmente en TLa (Fig. 8E). También se observaron bilateralmente algunas células en TPP (Fig. 8D). Ocasionalmente se encontraron núcleos marcados bilateramente en el lóbulo hipotalámico (LH) (Figs. 8F, 9E), y algunas células en la zona ipsilateral en el NLV y en el rafe superior (SR) (Fig. 8G).

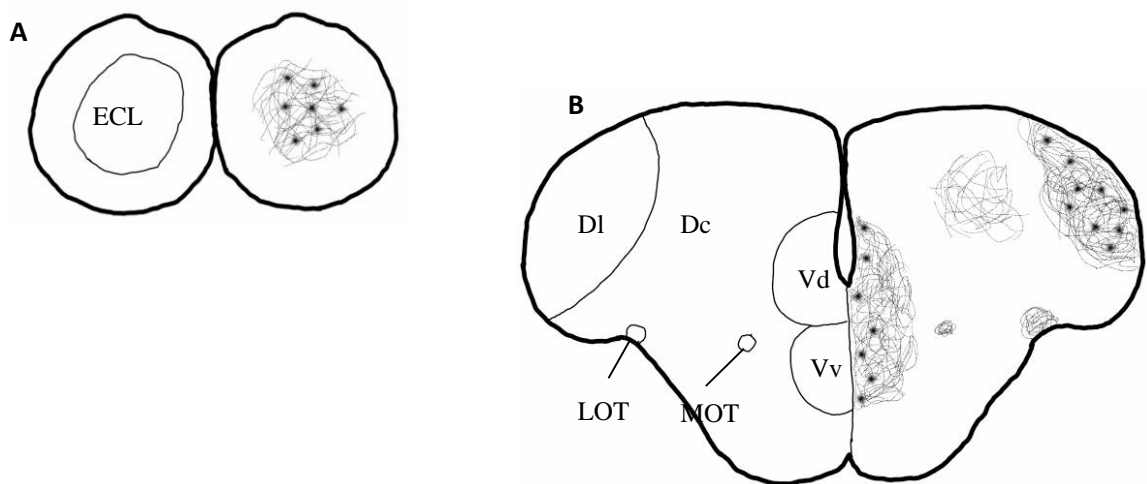
Eferencias

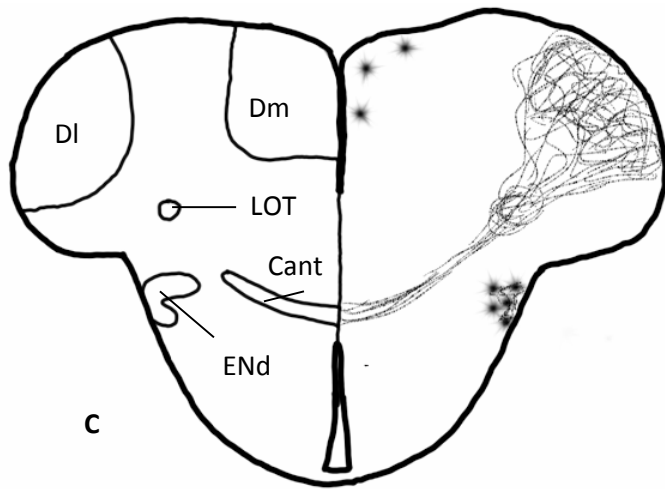
En el bulbo olfativo se pudieron observar algunas fibras que convergen en un tracto en la zona más caudal (Figs. 8, 9A). En el área ventral del telencéfalo se marcó el tracto medial olfativo MOT bilateralmente y el tracto lateral olfativo (LOT) también de forma bilateral. En los núcleos se encontraron fibras bilaterales en Vd y fibras también en Vv (Figs. 8B-C, 9B). En el área dorsal del telencéfalo se aparecían marcadas fibras bilateralmente en DI al nivel precomisural e ipsilateralmente al nivel postcomisural. En

el núcleo Dc existen fibras bilaterales menos abundantes en la zona contralateral en relación con Dl contralateral (Fig. 8B). Estas fibras se dirigen hacia LOT y cruzan la comisura anterior. En la región comisural también se observaron fibras marcadas en la zona ipsilateral en ENd (Figs. 8C, 9C). Caudalmente a la comisura continúa el tracto telencefálico medial MFB marcado en la zona ipsilateral y más débilmente en la mitad contralateral, así como el tracto telencefálico lateral LFB ipsilateral (Fig. 8D). Asimismo se observaron fibras ipsilaterales en la habénula y algunas fibras que cruzan la comisura postóptica (Cpop) (Figs. 8D-E).

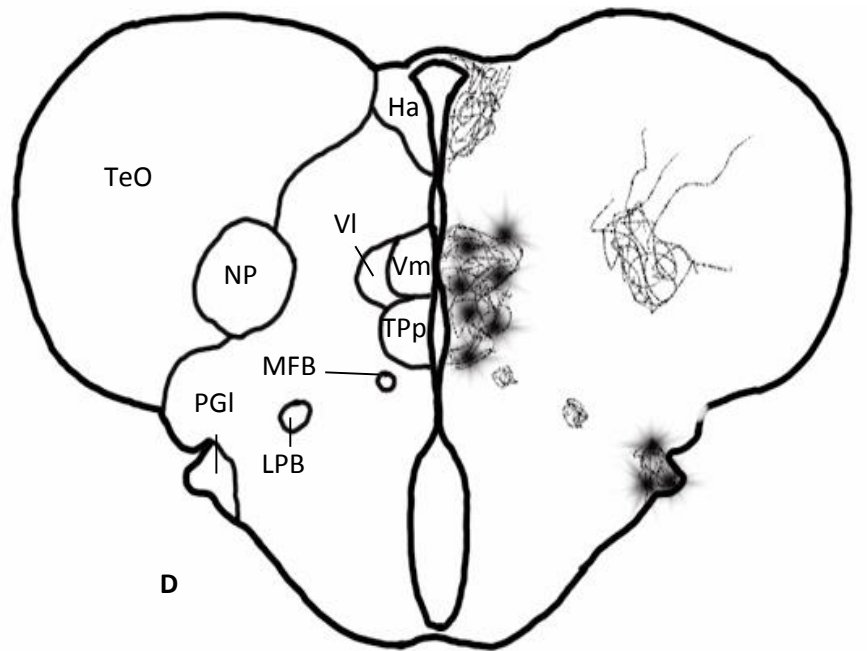
En la región diencefálica se marcaron fibras con varicosidades en los núcleos ventrolateral y ventromedial del tálamo ventral (Fig. 8D). También se encontraron fibras varicosas en los núcleos pretectales y que ascendían al techo óptico TeO (Fig. 8D), todas ellas ipsilaterales. Se observan fibras varicosas tanto en la zona ipsilateral como contralateral en PGI y TLa además de algunas que atraviesan PGm (Figs. 8D-E, 9D). También existen algunas en la parte más anterior de CP y en Tpp, ambas en la zona ipsilateral (Fig. 8D-E). En la región dorsal de PTN convergen los tractos mediales que desembocan en los lóbulos posteriores donde se observan fibras bilateralmente distribuidas (Figs. 8E, 9F). También se encontraron algunas fibras marcadas en los lóbulos hipotalámicos (LH) en las zonas ipsilateral y contralateral y algunas fibras varicosas en el lóbulo hipotalámico posterior (Figs. 8F-G, 9G).

Las eferencias más caudales las encontramos en Nln y terminaciones de fibras en el SR (Figs. 8FG, 9H).

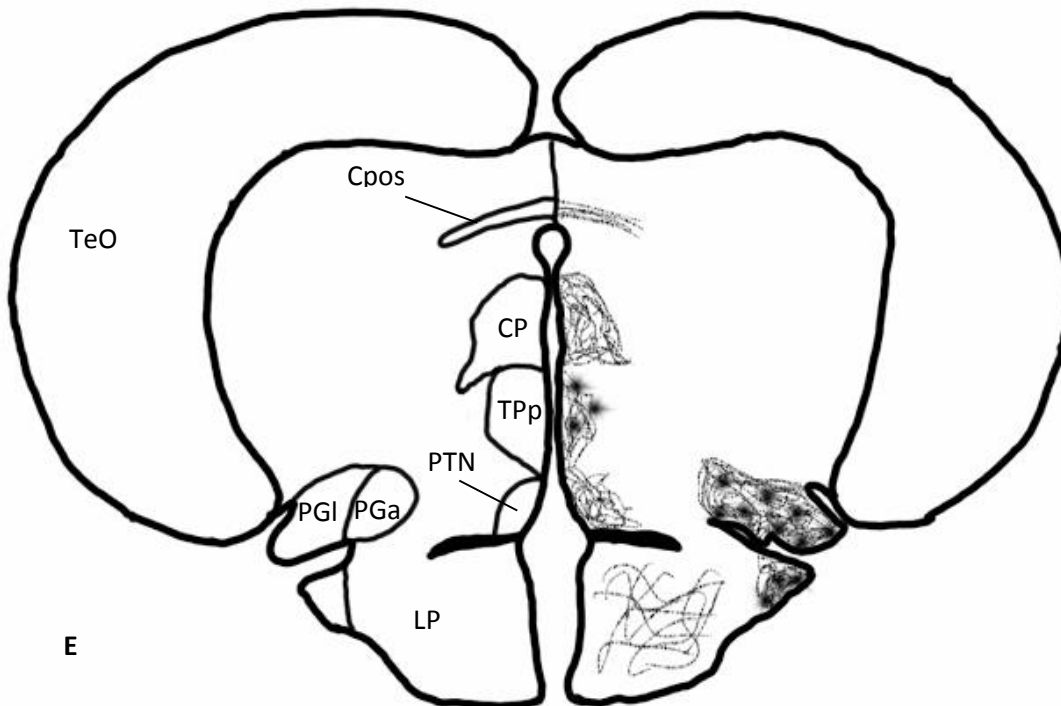




C



D



E

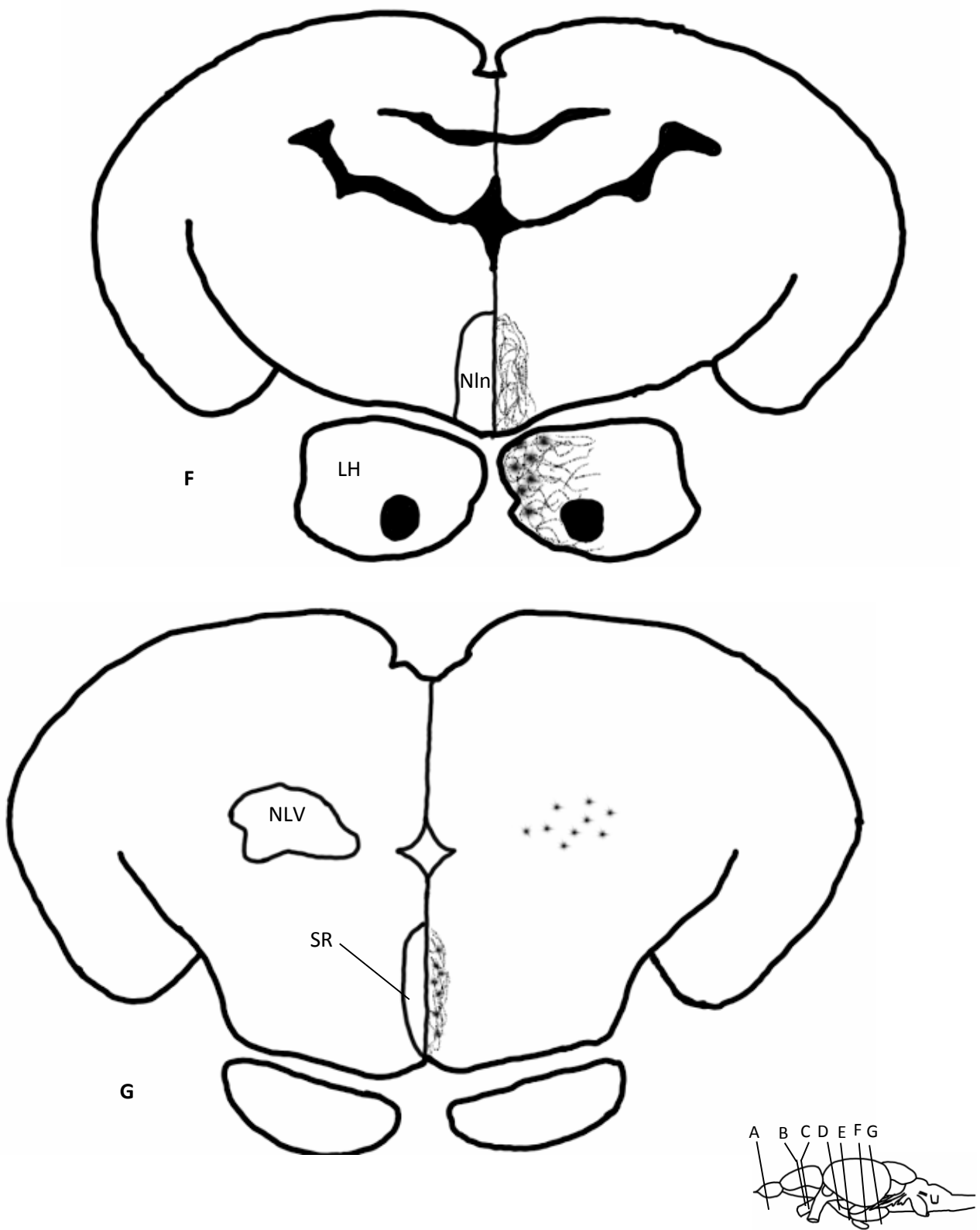


Figura 8. Resultados del marcaje con el trazador neuronal Dil en DI.

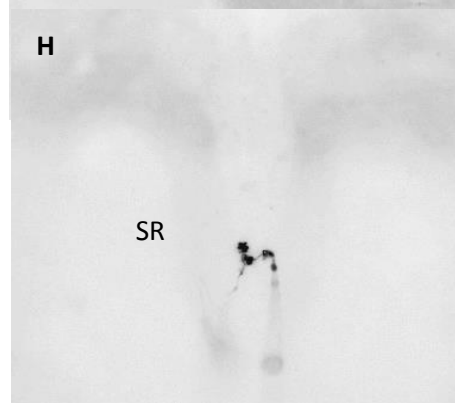
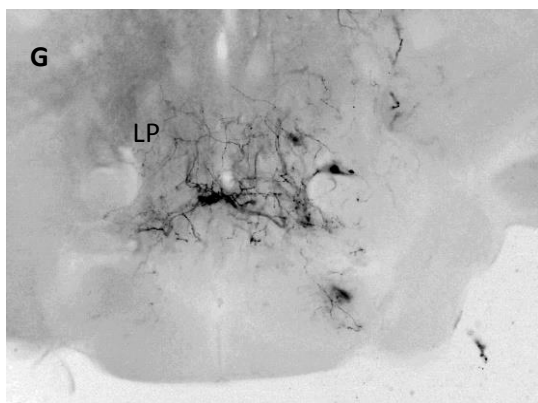
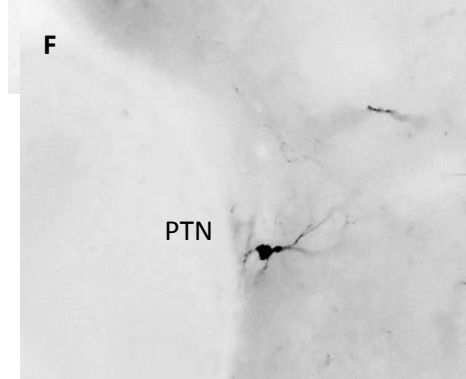
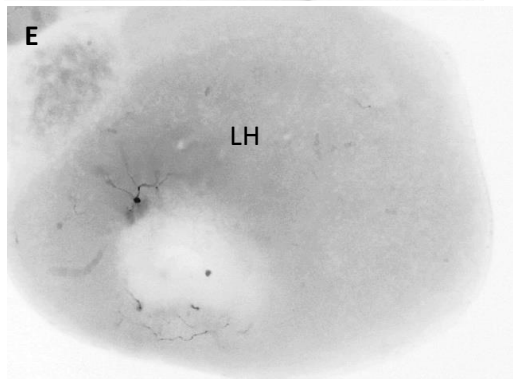
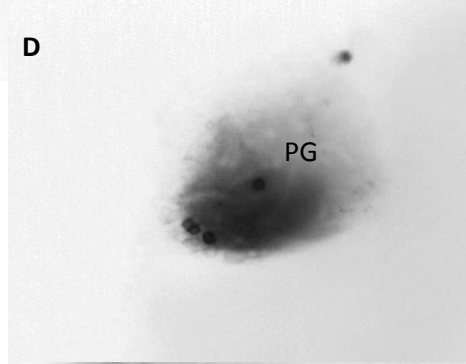
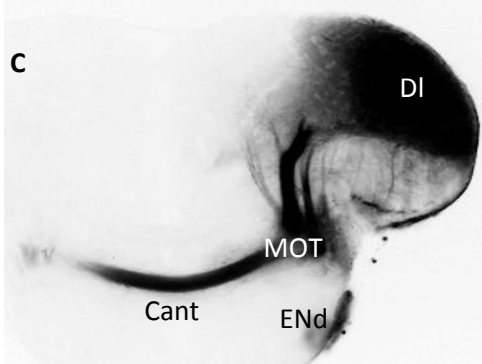
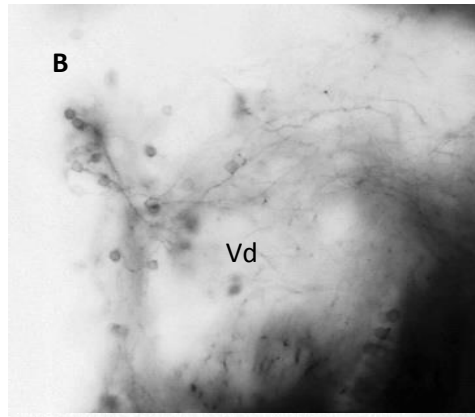
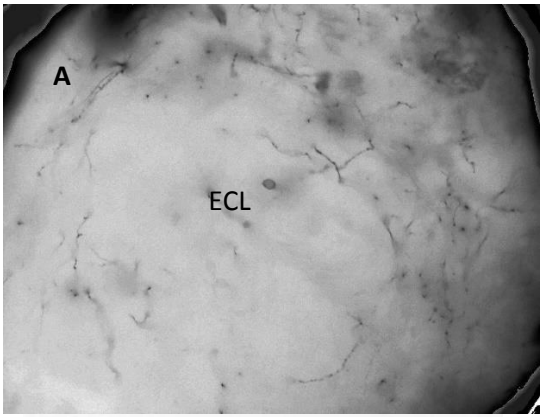


Figura 9. Imágenes del resultado del marcaje con Dil en DI.

Marcaje en la zona medial del área telencefálica dorsal: Dm

Se observaron claras diferencias entre los tres marcajes realizados en tres puntos diferentes a lo largo del eje rostrocaudal (anterior, intermedio y posterior) y que se describen a continuación.

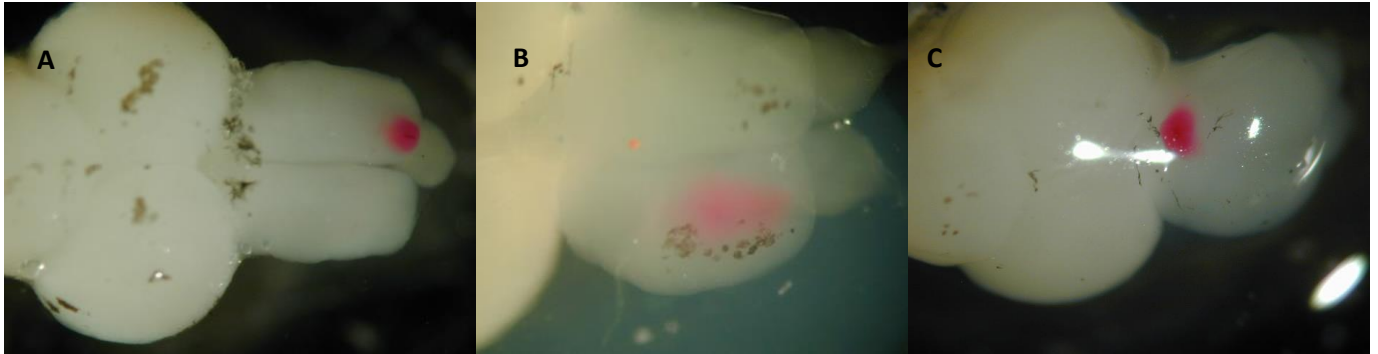


Figura 10. Marcajes realizados en distintas zonas de Dm a lo largo del eje rostro-caudal: Dm rostral (A); Dm (B); Dm caudal (C).

Dm rostral

Esta región concuerda con la definida por la calretinina como Dm1, desplazándose rostral-caudalmente. La principal diferencia es que aparentemente no comunica con el bulbo olfativo y el marcaje es solo ipsilateral. En el distinguimos:

- *Aferencias*: algunas células caudalmente en el límite Dm1-Dl. Ocasionalmente algunas asociadas al tracto telencefálico lateral y en ENd (Figs. 11A, 12C).

- *Eferencias*: En el telencéfalo se observaron fibras en Dm1, en el tracto telencefálico lateral, en ENd y fibras cruzando la comisura anterior. En el diencefalo, se encontraron algunas fibras marcadas en los núcleos del talamo ventral VL y VM, y en los núcleos del complejo preglomeruloso PGa y PGI (Fig 11A-B).

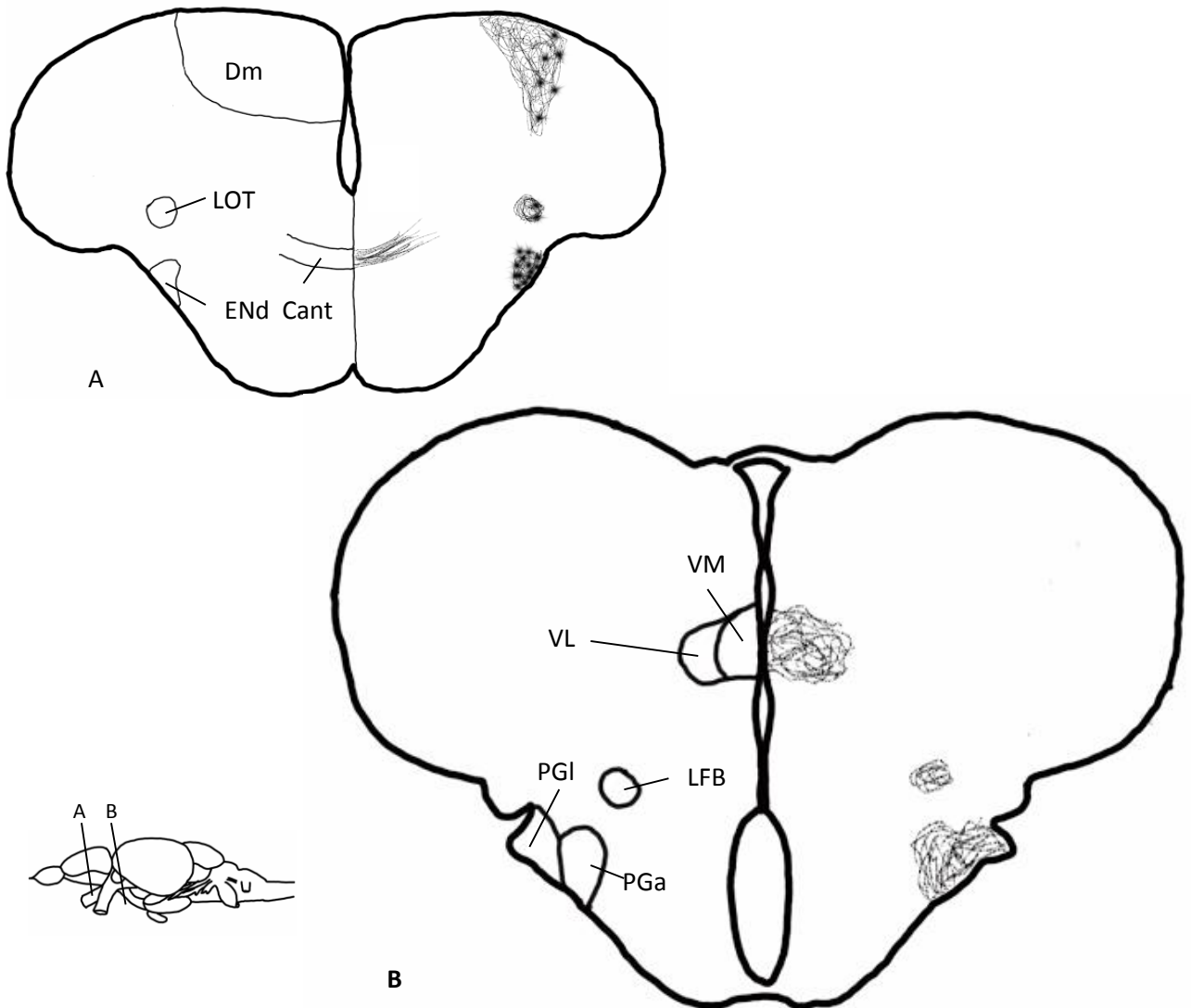


Figura 11. Resultados del marcaje con Dil en Dm rostral

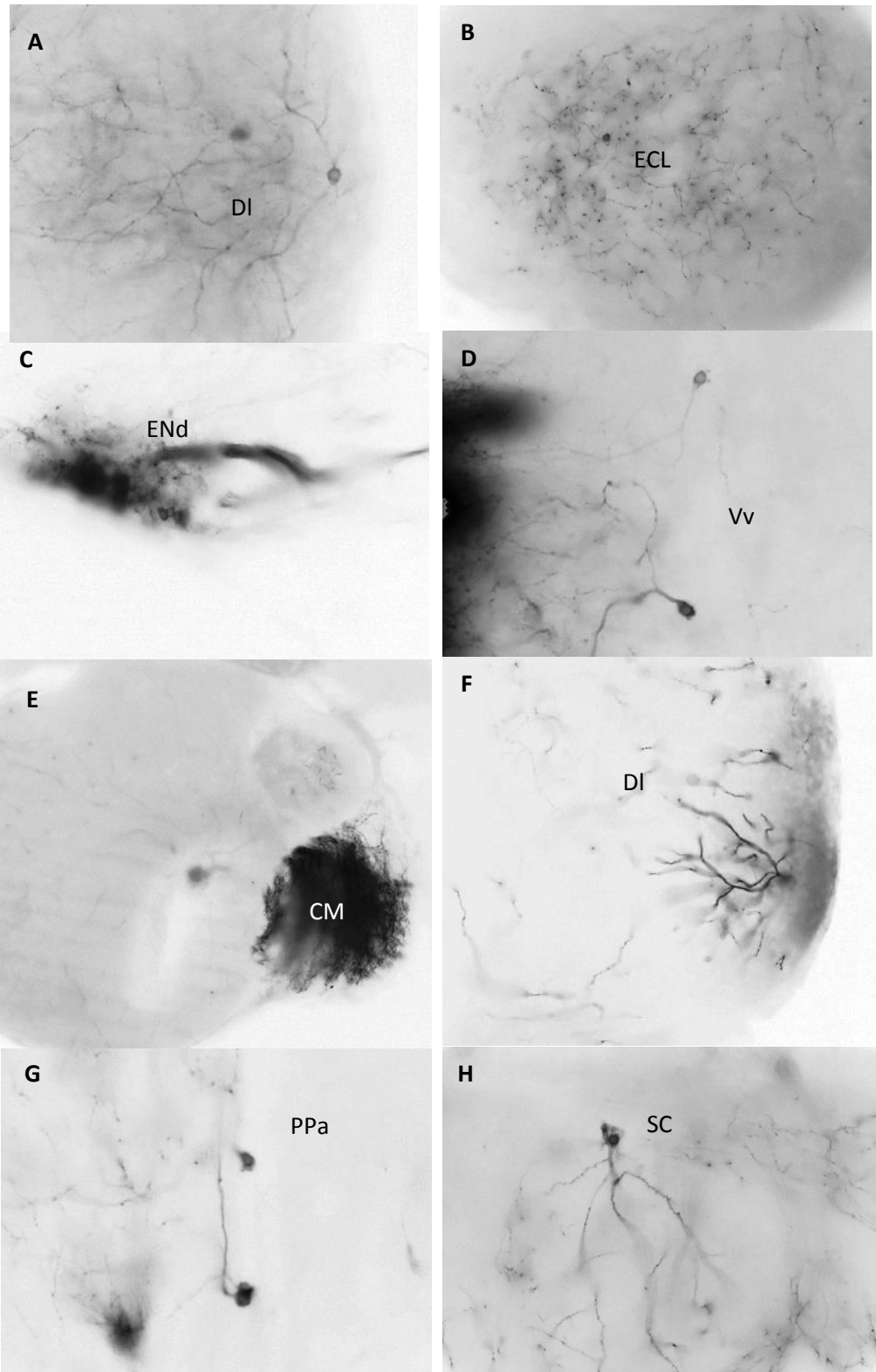


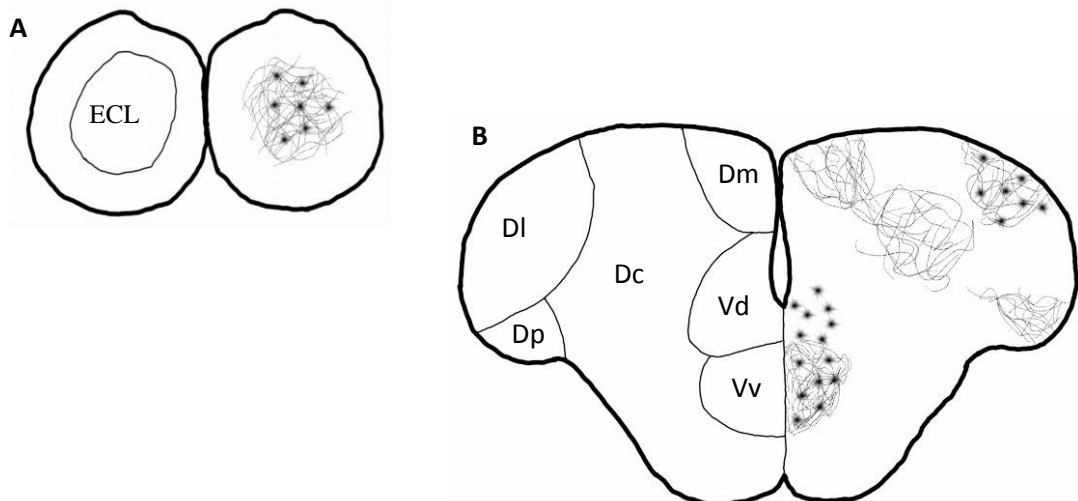
Figura 12. Imágenes del resultado del marcaje en Dm con Dil

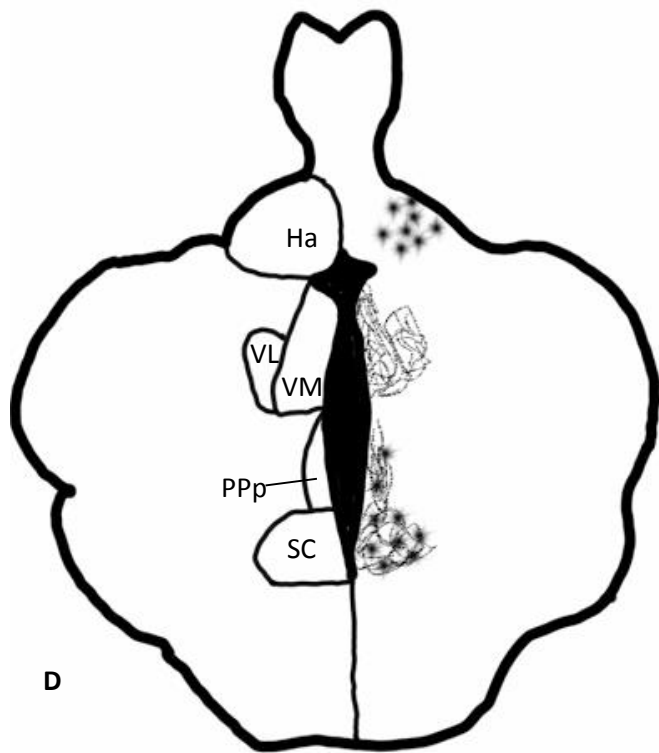
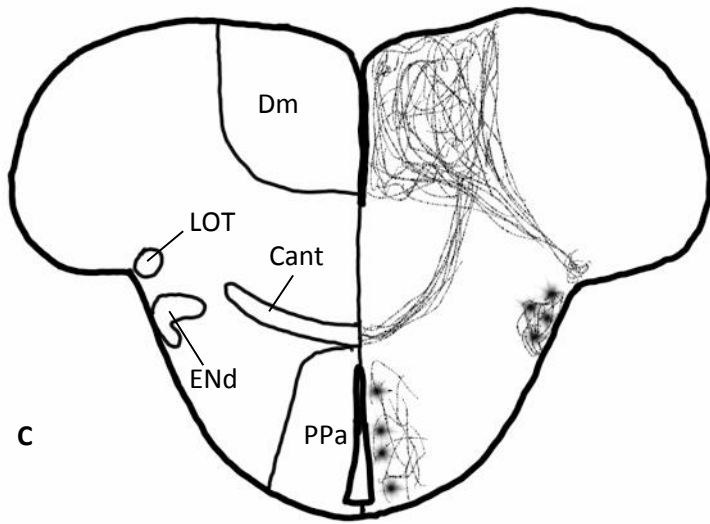
Dm caudal

En la región caudal de Dm no se ha podido confirmar qué zona corresponde a las regiones identificadas por la calretinina. Sin embargo podemos observar una dominancia ipsilateral y una dominancia del hipotálamo rostral. Las observaciones realizadas fueron las siguientes:

- *Aferencias*: En el telencéfalo se observaron marcadas ipsilateralmente células mitrales en la región ECL del bulbo olfativo, y en la región dorsal en Dl y en Vv, y bilateralmente en la región ventral de Vd. Caudalmente aparecieron marcadas algunas células ipsilaterales en Ppa y en el ENd ipsilateral (Figs. 12F-G 13A-C). En el diencefalo caudalmente se observaron numerosas células marcadas en SC (Figura 13D, 12H), y algunas células bilateralmente marcadas en la zona dorsal posterior de la habénula, e ipsilateralmente en la región talámica de DP, PTN alcanzando el lóbulo posterior (Fig. 13D-E).

- *Eferencias*: se encontraron fibras ipsilateralmente marcadas en la capa granular ECL en el bulbo olfativo, en la región telencefálica dorsal fibras en Dm, Dc y en el límite con Dp, y en la región telencefálica ventral algunas fibras en Vv (Fig. 13A-B). Algunas fibras marcadas atravesaban la comisura anterior alcanzando la región preóptica PP (Fig. 13C). En el diencefalo se observaron también fibras marcadas ipsilateralmente en el tálamo ventral con dominancia de fibras en el núcleo medial sobre el lateral. Asimismo se marcaron algunas fibras en la región preglomerular, PTN y en el lóbulo posterior (Fig. 13D-E). Mas caudalmente aparecieron ocasionalmente fibras varicosas en el NLV (Fig. 13F).





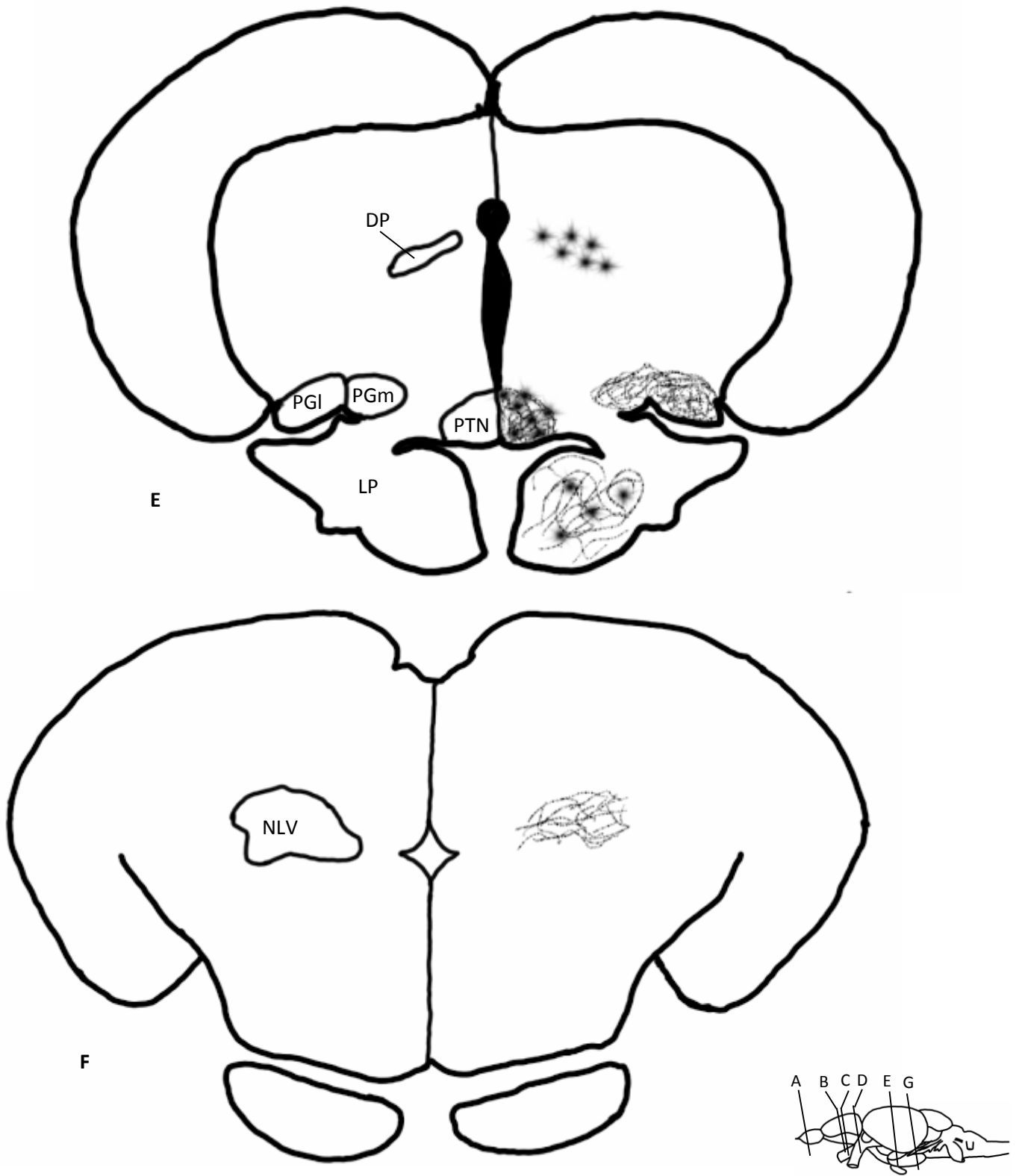
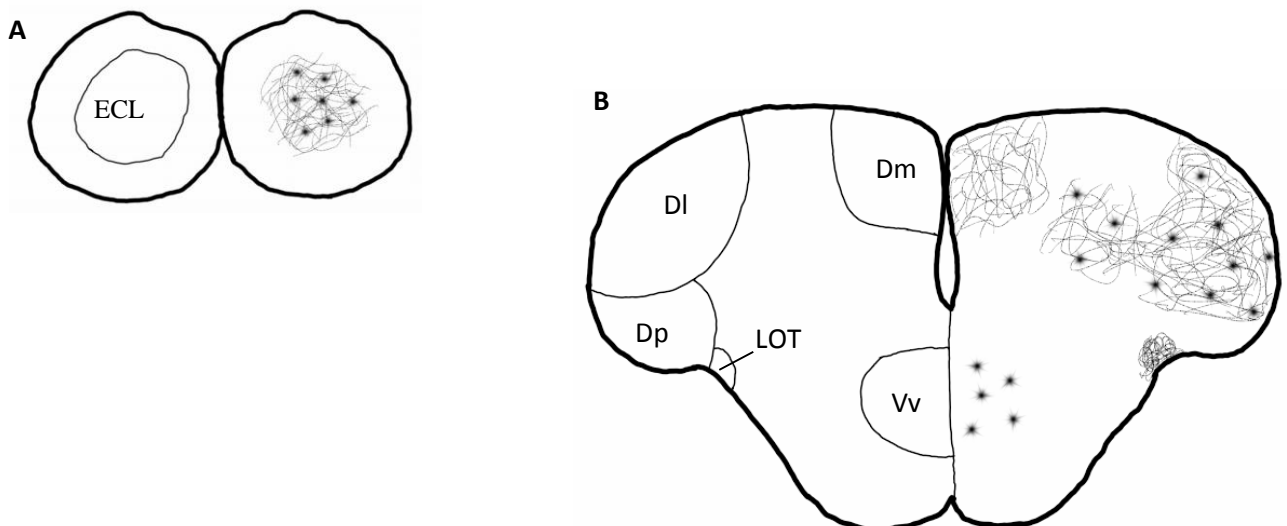
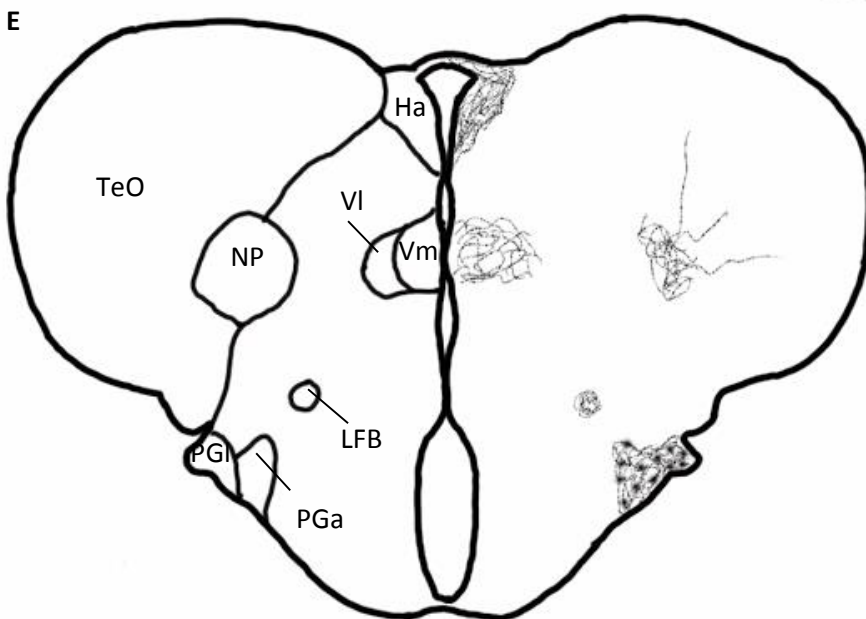
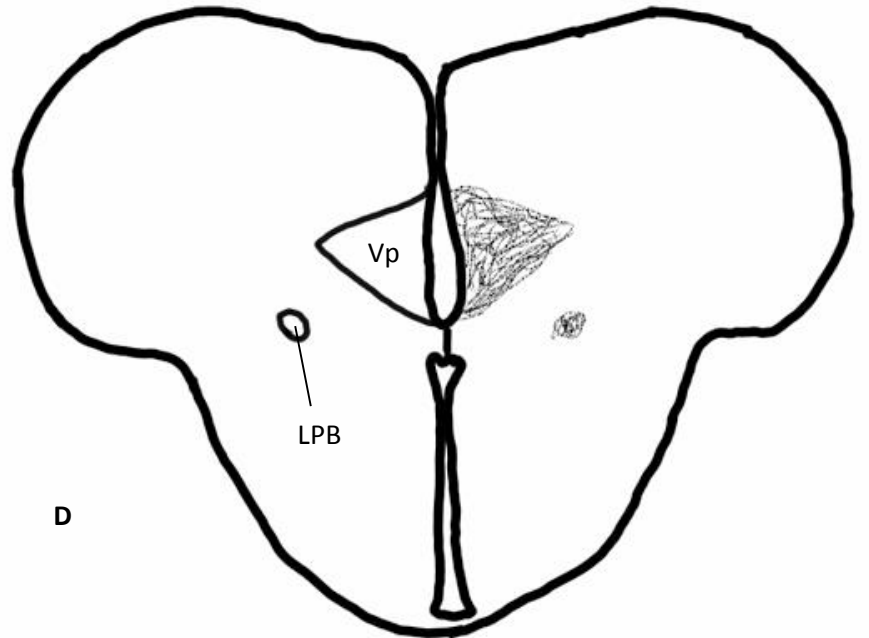
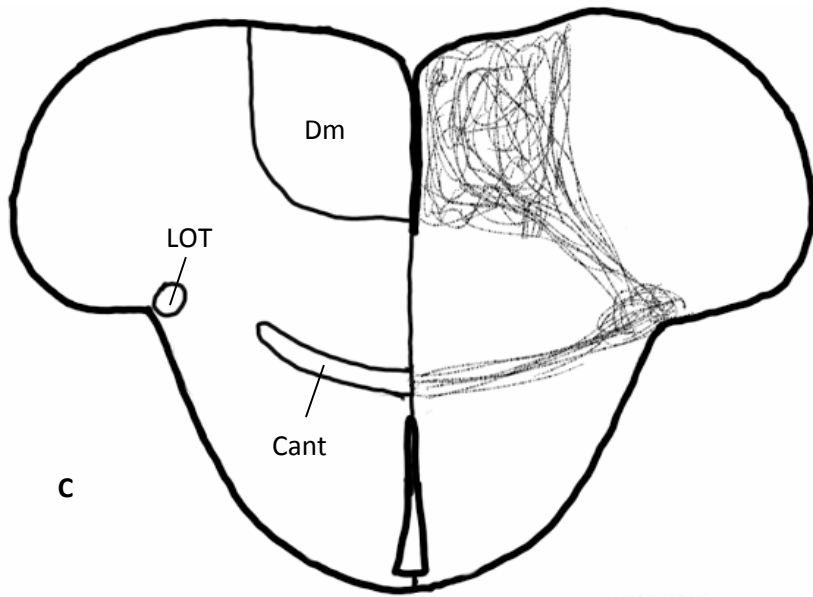


Figura 13. Resultado del marcaje con Dil en Dm caudal

Dm

- *Aferencias:* Se observan ocasionalmente algunas células ipsilaterales en el bulbo olfativo (Figs. 12A-B, 14). En los lóbulos telencefálicos también se encuentran células ipsilateralmente marcadas en DI (Figura, 12A), Dm, y algunas en el límite de Dp con DI a nivel precomisural, y bilaterales en Vv (Figura 14B, 12D). Ipsilateralmente también se encontraron células en los núcleos anterior (PGa) y en la periferia de PGm del complejo preglomeruloso (Figura 14E). Por último se vio alguna célula contralateralmente en el cuerpo mamilar (CM, Figs. 14F, 12E).
- *Eferencias:* Existen numerosas fibras bilaterales en el bulbo olfativo (Figs. 12B, 14A). En los lóbulos telencefálicos se pudieron observar algunas fibras en DI, Dm, Dc, y Dp (Fig. 14B). También se marcó bilateralmente el LOT observándose fibras que cruzan la comisura anterior (Fig. 14B-C). A nivel postcomisural el tracto telencefálico lateral (LFB) continua con axones marcados, y se observan algunas fibras ipsilaterales en Vp (Fig. 14D). Caudalmente en el diencefalo, algunos axones marcados cruzan la habénula y se observan fibras ipsilaterales varicosas en los núcleos pretectales y que ascienden al TeO (Fig. 14E). También se pueden observar ocasionalmente terminales axónicas en el tálamo ventral ipsilateralmente. Asimismo, se observaron numerosas fibras varicosas en PGa ipsilaterales y algunas también contralaterales (Fig. 14E). Finalmente se encontraron abundantes fibras en el CM con dominancia en el lado ipsilateral (Figura 12E-14F,).





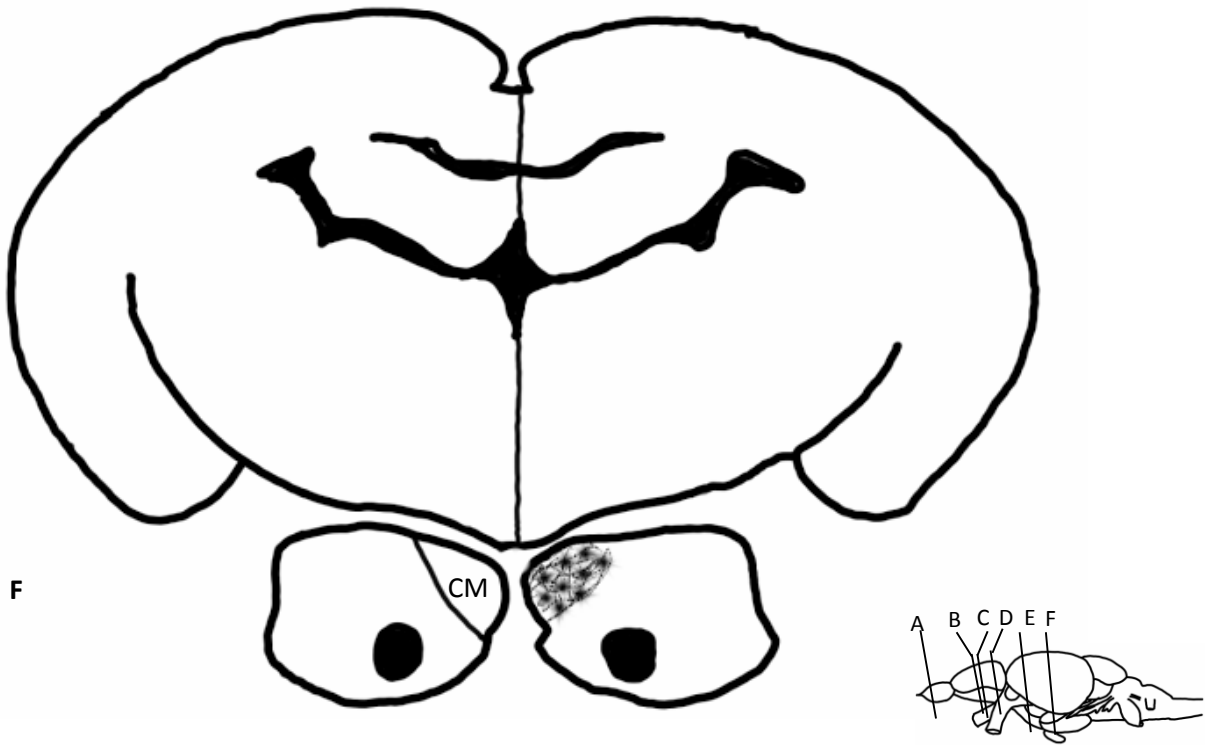


Figura 14. Resultados del marcaje con Dil en Dm

5.-Discusión

Distribución telencefálica de la Calretinina

Las diferencias en la inmunoreactividad frente a la calretinina en los lóbulos telencefálicos del pez cebra revela la existencia de subdivisiones en algunas de las áreas propuestas por Wulliman y col. (1996) basadas en criterios citoarquitectónicos. Subdivisiones de estas áreas paliales se han descrito también en el pez cebra (Castro y col. 2006) y en otros teleósteos (Northcutt y Braford, 1980; Folgueira y col., 2004; Northcutt, 2006).

En el trabajo publicado por Castro y col. (2006) en *Danio* se describe heterogeneidad rostro-caudal y ventro-dorsal en Dm, comparables a las zonas que en éste trabajo se han denominado como Dm1 (rostral), Dm2-3 (medial) y Dm4 (caudal). Esta subdivisión en Dm también ha sido descrita en trucha (Folgueira y col. 2004) en la que las diferencias neuroquímicas en Dm probablemente estén correlacionadas con las diferencias hodológicas entre sus aferencias y eferencias. Sin embargo, Castro y col. (2006) sugieren la existencia de clara diferencia en el patrón de expresión de calretinina entre diferentes especies de teleósteos. En este estudio se describen las aferencias y eferencias de diferentes regiones del telencéfalo dorsal, y en el caso particular de la región medial del telencéfalo (Dm), se ha realizado el marcaje desde regiones anteriores, intermedias y posteriores. Sin embargo, no ha sido posible determinar las conexiones particulares de cada subzona definida por la calretinina. Ello es debido principalmente al pequeño tamaño del telencéfalo de *Danio* en comparación con otras especies de teleósteos estudiadas, lo que imposibilita en numerosos casos la aplicación precisa del trazador restringida específicamente a una única subzona. Una posible solución a esta limitación metodológica podría ser haciendo uso de marcajes recíprocos desde las posibles dianas extratelencefálicas, siempre y cuando estuvieran suficientemente separados entre sí. A pesar de ellos se ha realizado un marcaje desde

Se ha propuesto que las fibras que alcanzan Dm viajan a través de los tractos telencefálicos mediales y laterales desde su origen probable, las células del núcleo preglomeruloso mamilar y también células del subpalio y el palio (Castro y col., 2006).

En el presente trabajo se han confirmado por medio de trazadores neuronales estas conexiones en el pez zebra (*ver conexiones Dm*)

Conexiones de la zona posterior del telencéfalo dorsal (Dp)

La zona posterior del telencéfalo dorsal (Dp) es considerado en teleósteos como una de las áreas implicadas en el procesamiento de información olfativa secundaria.

En el trabajo publicado por Folgueira y col. (2004) realizado en trucha, marcando Dp se describen aferencias y eferencias comunes a los aquí presentados y que extienden estos resultados en Ciprínidos. Así, entre las aferencias comunes podemos hablar de las células mitrales del bulbo olfativo, Vd, Vv, núcleos preópticos, núcleos talámicos posteriores, núcleos del complejo preglomerular y NLV. En trucha, los marcajes recíprocos con DiI en el ATN, en el tálamo, en los núcleos preglomerulosos y NLV, y efectivamente confirman proyecciones en Dp, excepto NLV, por lo que sugieren que este núcleo proyectaría mas bien a áreas adyacentes al propio Dp (Folgueira y col., 2004).

En peces actinoptergios no teleósteos como el condrósteo esturión siberiano *Acipenser baeri*, además del Dp, otras regiones del área telencefálica dorsal como Dm y Dl+Dd reciben también aferencias de células mitrales. Sin embargo los resultados experimentales demostrarían que estas zonas no recibirían fibras olfatorias primarias desde el epitelio olfativo por lo que probablemente representarían un centro olfativo secundario (Huesa y col., 2006).

Las eferencias compartidas por Folgueira y col. (2006) se producen en el bulbo olfativo, Dl, Dm, Vs, los núcleos talámicos, ATN, TLa y PTN. En trabajos previos (Folgueira y col., 2002) se observaron células en Dp marcando TLa con DiI. Sin embargo, al marcar PTN sólo observan una escasa cantidad de células en Dp por lo que esta conexión es interpretada con cautela. En trucha (Folgueira y col., 2006) al igual que en pez cebra las fibras marcadas en Dp cruzan la comisura anterior al lado contralateral hasta Dl a través del tracto olfativo medial. Las fibras que llegan hasta la habénula y cruzan al lado contralateral a través de la comisura habenular, por lo que esta característica también parece ser un carácter compartido por salmónidos y ciprínidos.

En otras especies de ciprínidos (*Carassius*), también se demuestra experimentalmente mediante un marcaje recíproco con BDA en el bulbo olfativo aferencias y eferencias en Dp (Northcutt, 2006).

Conexiones de la zona lateral del área telencefálica dorsal (DI)

La zona lateral del palio (DI) de los teleosteos en general y en pez cebra en particular es considerada una estructura homóloga al hipocampo de los mamíferos (Trotha et al., 2014) involucrado en el procesamiento de la información espacial y la memoria (Rodríguez et al., 2002)

Algunos autores han sido capaces de distinguir dos regiones en DI en otras especies de teleosteos: DI ventral (DI-v) y DI dorsal (DI-d). Sin embargo; en este estudio no se tuvieron en cuenta estas diferencias por las constricciones metodológicas indicadas anteriormente. Castro y col. (2003) distinguen con marcadores inmunohistoquímicos dos zonas en DI en trucha: DI-d y DI-v. Esto concuerda con los resultados de zonación neuroquímica basada en la calretinina obtenidos en nuestro estudio (DI-d, DI-v y DI-p). Sin embargo, en el estudio hodológico de Folgueira y col. 2004 no se observa una diferencia clara entre ambas zonas desde el punto de vista de sus respectivas conexiones neuronales en esa especie y empleando el mismo trazador neuronal, el DiI, lo que podría indicar que ambos componentes podrían estar especializados en los mismos circuitos.

Como ya se mencionó anteriormente, no existen apenas estudios sobre conexiones neuronales en el pez cebra, especialmente en el área telencefálica dorsal. Es por ello que a falta de marcapos recíprocos que confirmen los resultados, es necesario comparar los datos con otras especies tanto teleosteos como no teleosteos. Si comparamos nuestro estudio con teleosteos del mismo superorden que *Danio rerio* (acantopterigios) encontramos ciertas similitudes con los resultados obtenidos en el estudio de Murakami et al (1983) que también describen aferencias en *Sebasticus sp.* en el bulbo olfativo, Dm, Vd y SR; sin embargo sólo encontraron eferencias en el techo óptico. En otros teleosteos de distinto superorden (*Carassius* y en *Oncorhynchus*) también existen similitudes en las conexiones con DI. En *Carassius*, perteneciente al orden de los ciprínidos, se han observado además de las ya citadas, aferencias y eferencias en DI, Dc, la zona ventral del telencéfalo y PGI, y eferencias en la habénula (Northcutt, 2006). Se ha determinado que la proyección a los núcleos preglomerulosos relacionaría esta región telencefálica con la integración de la información auditoria, visual y de la línea lateral. Folgueira y colaboradores. (2004) describen a mayores del complejo preglomeruloso, aferencias desde el tálamo ventral y eferencias en CP y PG en la especie *Oncorhynchus*.

En especies de actinopterigios no teleósteos los datos de las conexiones de DI son muy escasos. En el esturión siberiano (Huesa et al., 2006) se han encontrado grandes similitudes en el marcaje con DiI en Dd+DI. Observaron células mitrales en el bulbo, y células en Dm, Dd+DI, Dc, Vv y en el tálamo ventral. A su vez también se describen fibras en los bulbos, cruzando la comisura anterior, la comisura postóptica, en ciertos núcleos pretectales y en los lóbulos hipotalámicos. Las diferencias entre éstas especies de no teleósteos y *Danio rerio*, han de tomarse con precaución especialmente cuanto más lejana filogenéticamente sea la especie y por ello son necesarios un mayor número de datos y más experimentos recíprocos que verdaderamente confirmen los presentes resultados y que nos ayuden a identificar con mayor claridad las modalidades sensoriales que son integradas y procesadas en telencéfalo dorsal en los teleósteos y su evolución.

Con los datos obtenidos y a falta de un mayor número de experimentos podemos pensar que existen muy probablemente aferencias en el bulbo olfativo, Dm, V y SR; con mayor grado de incertidumbre en DI, en el tálamo ventral, en los núcleos del complejo glomeruloso y quizás en Dc. No existe en la bibliografía datos que nos ayuden a confirmar aferencias en ENd, TLa, TPp, NLV y en los lóbulos hipotalámicos. En cuanto a las eferencias parecen dirigirse al TeO, aunque posiblemente también ocurran en Vd, Dc, Ha, complejos preglomerulosos, CP y lóbulos hipotalámicos. En trucha el principal centro telencefálico que envía axones al techo óptico es el Dc, por lo que habría que realizar marcajes recíprocos para confirmar esta proyección en *Danio* y descartar la posible difusión del trazador desde DI a Dc. Más difíciles de confirmar son las eferencias en el bulbo olfativo y en los núcleos pretectales. En cuanto a las producidas en DI, ENd, tálamo ventral, TLa, TPp y PTN no existe ningún estudio con resultados similares. Esto no quiere decir que tanto las aferencias y eferencias de las cuales no hay datos de marcajes recíprocos en *Danio rerio* y que no se producen en otras especies sean resultados no validos ya que podrían ser conexiones específicas de la especie.

Conexiones de la zona lateral del área telencefálica medial (Dm)

La zona medial del palio (Dm) de pez cebra se considera una estructura homóloga a la amígdala de los mamíferos (Wulliman and Muller, 2004). Los estudios realizados por Trotha et al. (2014) sugieren una función evolutiva conservada de la amígdala en el procesamiento de las emociones positivas y la inducción de la conducta motivada.

Como ya se ha indicado anteriormente serían precisos experimentos recíprocos que confirmen nuestras conexiones y nos permitan comparar los resultados con otras especies de teleósteos de distintos superordenes para establecer los caracteres conservados o derivados.

En estudios realizados en acantopterigios, concretamente en *Sebasticus* (Murakami et al., 1983) encontramos similitudes en aferencias y eferencias con Dm contralateral y PG, con las aferencias desde Dp, Vd, Vp y el área preóptica, y con eferencias desde el techo óptico.

En estudios realizados en otros ciprínidos, también encontramos similitudes. En trucha (Folgueira et al., 2004) observaron conexiones que coinciden con algunos de nuestros resultados. Entre ellos encontraron aferencias en el área dorsal del telencéfalo en Dm y Dp; y en la zona ventral en Vd y Vv, además de en la región preóptica, en SC, en núcleos del complejo preglomeruloso, en el lóbulo posterior y en el cuerpo mamilar. Al igual que en los presentes resultados se observaron las siguientes eferencias: Dm, Dc, Dl, región preoptica, complejos preglomerulosos, PTN, habénula y cuerpo mamilar. En *Carassius*, otro ciprínido, Northcutt (2006) también observó aferencias en el bulbo olfativo, Dm, Dl, en subpalio (V), PPa, SC y en el complejo preglomeruloso; y eferencias en el bulbo olfativo, Dm, Dc, Dl, Vv, Vp, PPa, PG, lóbulos hipotalámicos, la habénula y CM. Yamamoto y Ito (2005) confirmaron a su vez en ciprínidos las proyecciones de núcleos del complejo preglomeruloso al Dm. Estos núcleos reciben información de núcleos involucrados en la audición. Sin embargo, las conexiones en el cuerpo mamilar en ciprínidos no se han confirmado, quizás porque no es una estructura homóloga en otros teleósteos (Northcutt, 2006).

Esta comparación nos permite concluir a falta de experimentos recíprocos en *Danio rerio* que las aferencias más probables son Dm, Dp, Vd, área preóptica y PG, y posiblemente comparando con ciprínidos el bulbo olfativo, Dl, Vv, SC, lóbulo posterior

y el cuerpo mamilar. Sin embargo, no encontramos ningún estudio donde se den aferencias en ENd, DP, la habénula y PTN. En cuanto a las aferencias en acantopterigios se producen en Dm, PG y TeO; y si extendemos el estudio a ciprínidos también encontramos en el bulbo olfativo, DI, Dc, Vv, Vp, región preótica, PTN, la habénula y CM. No se ha encontrado ninguna referencia en la bibliografía que apoye las aferencias en ENd, tálamo ventral, núcleos pretectales y NLV.

Tal y como menciona Northcutt (2006), este estudio coincide con su conclusión al destacar las similitudes que existen en las proyecciones ascendentes en DI y Dm en teleósteos mientras que las proyecciones descendentes muestran mayores diferencias.

Las diferencias que se observan entre los distintos marcajes también puede deberse como se ha mencionado anteriormente a las diferencias entre especies, pero en este caso también a las diferentes subregiones que ha demostrado la calretinina en Dm. Por tanto, experimentos recíprocos futuros pueden aportar más información sobre las diferencias rostro-caudales de las diferentes regiones de Dm.

6.-Conclusiones

1.- La tinción inmunohistoquímica con calretinina permitió realizar subdivisiones en Dm y DI:

- Dm: Dm1, Dm2, Dm3 y Dm4
- DI: Dv, Dld y Dlp

2.- Con ayuda del trazador neuronal DiI se estableció la hodología de las distintas regiones del telencéfalo dorsal: Dp, DI y Dm (Tabla 1).

CONEXIONES TELENCEFÁLICAS DE LA ZONA DORSAL

D_P	Aferencias	BO, Vd, Vv, núcleos preópticos, núcleos talámicos posteriores, PG, NLV, ATN
	Eferencias	BO, DI, Dm, Vs, núcleos talámicos, ATN, TLa, PTN
D_L	Aferencias	BO, Dm, DI, Dc, V, tálamo ventral, PG, SR
	Eferencias	BO, Vd, Dc, Ha, TeO, núcleos pretectales, PG, CP, LH
D_M	Aferencias	BO, Dm, DI, Dp, Vd, Vv, región preóptica, PG, SC, lóbulo posterior, CM
	Eferencias	BO, Dm, DI, Dc, Vv, Vp, región preóptica, PG, TeO, PTN, Ha, CM

Tabla 1. Aferencias y eferencias posibles en Dp, DI y Dm

7.-Bibliografía

Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anaón R. 2003. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467:254-269.

Castro A. 2006. Calretinin Immunoreactivity in the Brain of the Zebrafish, *Danio rerio*: Distribution and Comparison with Some Neuropeptides and Neurotransmitter-Synthesizing Enzymes. I. Olfactory Organ and Forebrain. *J Comp Neurol* 494:435-459.

Fernando, A., & Herrero, P. 1997. Expresión de proteínas ligantes de calcio durante la ontogenia del Sistema Nervioso Central de teleosteos. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.

Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II: Dorsal area and preoptic region. *J Comp Neurol* 480:204-233.

Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2006. Afferent and efferent connections of the cerebellum of a salmonid, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a tract-tracing study. *J Comp Neurol*; 497(4):542-65.

Folgueira M, Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2002. The nucleus subglomerulosus of the trout is a link between chemosensory and visual systems: a Dil study. *Brain Res Bull* 57:427-430.

Folgueira, M., Bayley, P., Navratilova, P., Becker, T. S., Wilson, S. W., Clarke, J. D. 2012. Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Development*, 7(1), 32

Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2006. Topography and connections of the telencephalon in a chondrosteian, *Acipenser baeri*: an experimental study. *J Comp Neurol*. 497(4):519-41.

Källén B. 1951. Some remarks on the ontogeny of the telencephalon in some lower vertebrates. *Acta Anat (Basel)*;11(4):537-48.

Muller T et al. 2011. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain Research* 1381 (2011) 95-105.

Murakami T, Morita Y, Ito H. 1983. Extrinsic and intrinsic fiber connections of the telencephalon in a teleost, *Sebasticus marmoratus*. *J Comp Neurol* 216:115-131.

Northcutt RG, Braford MR. 1980. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of the actinopterygian fishes. In: Ebbsen SOE, editor. *Comparative neurology of the telencephalon*. New York: Plenum Press. p.41-98.

Northcutt RG. 2006. Connections of the Lateral and Medial Divisions of the Goldfish Telencephalic Pallium. *J Comp Neurol* 494:903-943.

Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C. 2002. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull*. 57(3-4):499-503

Wullimann MF, Mueller T. 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behaviour. *J Comp Neurol* 475:143-162.

Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. 1996. *Neuroanatomy of the Zebrafish brain. A topological atlas*. Basel: Birkhäuser.

Wullimann, M. F. (1997). The central nervous system. *The physiology of fishes*, 245-282.

Yamamoto N, Hironobu I. 2005. Fiber Connections of the Anterior Preglomerular Nucleus in Cyprinids with Notes on Telencephalic Connections of the Preglomerular Complex. *J Comp Neurol* 491:212-233.

Zorrilla EP, Koob GF. 2013. Amygdalostriatal projections in the neurocircuitry for motivation: a neuroanatomical thread through the career of Ann Kelley. *Neurosci Biobehav Rev*; 37(9 Pt A):1932-45.