



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular.
Área de Biología Celular

Trabajo Fin de Grado

Estudio del desarrollo y anatomía del toro
longitudinal y estrato marginal del techo
óptico en la larva y adulto del pez cebra
(*Danio rerio*)

María Noelia Ferreño Galmán

Directora: Mónica Folgueira Otero

Julio 2014



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Biología Celular

Estudio del desarrollo y anatomía del toro longitudinal y estrato marginal del techo óptico en la larva y adulto del pez cebra (*Danio rerio*)

Estudo do desenvolvemento e anatomía do toro lonxitudinal e estrato marxinal do teito óptico na larva e xuvenil do peixe cebra (*Danio rerio*)

Study of the development and anatomy of the torus longitudinalis and marginal layer of the optic tectum in larval and juvenile zebrafish (*Danio rerio*)

Trabajo de Fin de Grado que presenta la alumna de Biología María Noelia Ferreño Galmán bajo la dirección de Dña. Mónica Folgueira Otero.

A Coruña, 21 de Julio de 2014.

Fdo. Mónica Folgueira Otero

ÍNDICE

RESUMEN..... 1

INTRODUCCIÓN..... 1

El techo óptico..... 1

El toro longitudinal..... 4

El pez cebra (*Danio rerio*)..... 6

OBJETIVOS..... 9

MATERIALES Y MÉTODOS..... 9

Tinción de Nissl en encéfalos de adulto juvenil de pez cebra..... 9

A. Fijación por perfusión..... 9

B. Postfijación por inmersión..... 10

C. Inclusión en parafina..... 10

D. Seccionado del tejido mediante microtomía..... 11

E. Tinción de cuerpos de Nissl..... 11

Inmunofluorescencia frente al antígeno vesículas sinápticas-2 en secciones de encéfalo de pez cebra..... 11

A. Fijación y seccionado del tejido..... 11

B. Técnica inmunofluorescente..... 11

Inmunofluorescencia frente al antígeno vesículas sinápticas-2 en secciones de larva de pez cebra..... 12

Observación de las preparaciones y edición de las imágenes..... 12

Anexo I..... 12

A. Gelatinización de portas..... 12

B. Preparación de soluciones..... 12

RESULTADOS..... 13

1. Organización anatómica del toro longitudinal y regiones relacionadas en el

encéfalo adulto.....	13
1.A. Organización anatómica rostro-caudal (secciones transversales del encéfalo)..	13
1.B. Organización anatómica dorso-ventral (secciones horizontales del encéfalo)..	17
2. Descripción detallada de la citoarquitectura del toro longitudinal y estrato marginal en el adulto.....	18
3. Organización anatómica del toro longitudinal en estadios larvarios.....	19
DISCUSIÓN.....	19
Consideraciones metodológicas.....	19
Tamaños celulares en el toro longitudinal del pez cebra: implicaciones.....	20
Anatomía y función del toro longitudinal en el pez cebra y otras especies.....	20
Desarrollo del toro longitudinal.....	21
CONCLUSIONES.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	22

RESUMEN

El toro longitudinal es una estructura localizada en el mesencéfalo de peces teleósteos y estrechamente asociada con el techo óptico. Consiste fundamentalmente en una masa de células grano densamente empaquetadas y encajadas justo por debajo de la comisura intertectal. Éstas células envían axones al estrato marginal, la capa más superficial del techo óptico, donde se orientan en paralelo y establecen sinapsis con neuronas piramidales o de tipo I. Debido a sus similitudes con los circuitos del cerebelo, el toro longitudinal- estrato marginal se considera una estructura “cerebellum-like”. Pese a que el pez cebra es un importante sistema modelo para estudios funcionales y de desarrollo, se desconoce la anatomía y función del toro longitudinal tanto en el adulto como en la larva de esta especie. Por tanto, hemos estudiado la organización anatómica del toro longitudinal en el adulto de pez cebra mediante una tinción general de tipo Nissl. Además, hemos utilizado una técnica inmunofluorescente frente a vesículas sinápticas (SV-2) para tratar de delimitar el estrato marginal del techo óptico. Esta misma tinción fue utilizada para determinar el desarrollo del toro longitudinal en la larva de 5 y 10 días post-fertilización. Como resultado, generamos un atlas mostrando la anatomía general del toro longitudinal en el adulto de pez cebra, pudiendo diferenciar dos tipos celulares: células pequeñas (células tipo grano) y células de mayor tamaño. Estos resultados coinciden con estudios anteriores sobre esta estructura en otras especies. Observamos también que, en contraposición a lo que sugerían estudios preliminares, el toro longitudinal parece estar ya presente a los 5 días post-fertilización. Por tanto, se trata de una estructura de desarrollo temprano. En cuanto al estrato marginal, con las técnicas aplicadas no pudimos delimitarlo claramente.

INTRODUCCIÓN

El toro longitudinal (TL) es una estructura localizada en el mesencéfalo, una columna que discurre longitudinalmente entre ambos lóbulos del techo óptico. La anatomía y función del toro longitudinal se desconocen prácticamente por completo. Esto es sorprendente, dada la importancia que ha cobrado el pez cebra como animal modelo en los últimos años.

El techo óptico

El techo óptico, una subdivisión del mesencéfalo, es el centro visual primario de peces teleósteos. En este centro, las aferencias de la retina y de otras modalidades sensoriales (auditivas, somatosensoriales, etc.) se representan de forma topográfica (Calvert *et al.*, 2004). Entre otras funciones, el techo óptico controla los movimientos oculares a través de conexiones con otros centros (Northmore, 1984). Se considera un centro homólogo al colículo superior de mamíferos (Dean *et al.*, 1989).

Esta estructura está presente en todas las especies de peces cartilaginosos y actinopterigios (peces de aletas radiadas), estando desarrollado en diferentes grados (Northmore, 1985). Los conocimientos sobre la función del techo óptico en este grupo deriva casi en su totalidad de un puñado de especies de teleósteos, principalmente perciformes (como el pez sol) o ciprínidos (como la carpa dorada o el pez cebra), con mucha menos información disponible sobre los peces cartilaginosos. En el pez cebra, y en general en los peces teleósteos, el techo es un centro de procesamiento altamente desarrollado, indispensable para la discriminación sensorial y las reacciones rápidas que se requieren para la supervivencia y la reproducción (Northmore, 1985). La importancia del techo en peces

teleosteos puede demostrarse dañándolo: la ablación completa vuelve al animal completamente ciego, además de afectarse su capacidad para navegar por el entorno utilizando sentidos no visuales. Esto parece confirmar la participación del techo en modalidades sensoriales además de la visión, como el procesamiento de información mecanosensorial.

El techo óptico en peces teleosteos aparece como un par de lóbulos redondeados con un amplio ventrículo interno (Figuras 1, 2A). En una vista lateral y ventral se puede observar cómo los nervios ópticos, con aferencias de la retina, se cruzan entre sí y entran en la parte delantera de su lóbulo tectal correspondiente. Por tanto, este simple examen anatómico muestra que la información de cada ojo viaja directamente al lóbulo tectal del lado opuesto. De hecho la gran mayoría de las fibras del nervio óptico, formado por los axones de las células ganglionares de la retina, terminan en el techo óptico, convirtiéndolo por tanto en el centro visual primario del encéfalo (Kinoshita *et al.*, 2006). Los dos lóbulos están conectados en la línea media por la comisura intertectal, mientras que en sus bordes ventrolaterales se fusionan con porciones del mesencéfalo (el tegmento mesencefálico) o el rombencéfalo (Figura 2B). Normalmente, no es posible observar el toro longitudinal en un encéfalo intacto dado que se localiza entre los dos lóbulos tectales, hacia el interior del ventrículo.

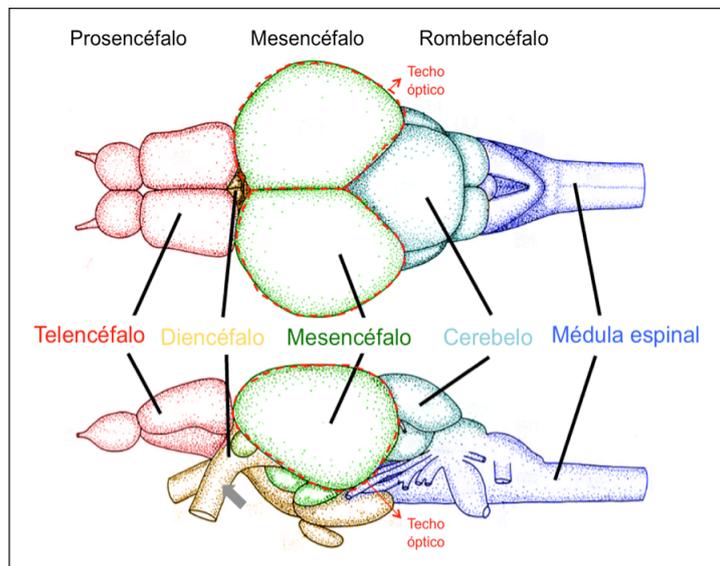


Figura 1. Vista dorsal y lateral de un encéfalo de pez cebra (*Danio rerio*), donde se muestra la morfología del encéfalo y algunas de sus regiones (de rostral a caudal): telencéfalo y diencéfalo (ambas subdivisiones del prosencéfalo), mesencéfalo, cerebelo (porción del rombencéfalo) y médula espinal. Imagen cedida por Dr. Raible y a su vez adaptada de Wullimann *et al.* (1996).

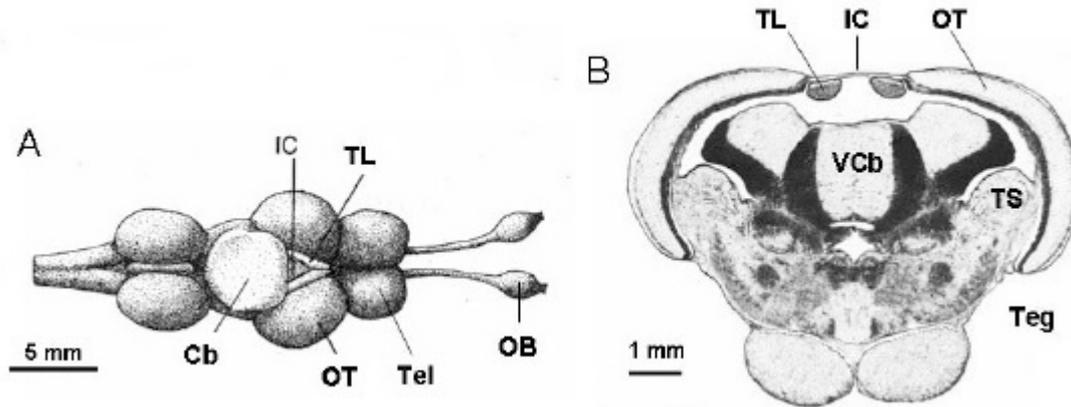


Figura 2. A: Vista dorsal del encéfalo de la carpa dorada donde se puede observar la localización y anatomía del techo óptico en esta especie. B: Sección transversal del encéfalo de carpa dorada donde se observa, entre otros, la inserción del techo óptico ventralmente en el tegumento mesencefálico, así como la localización del toro longitudinal. Abreviaturas: IC (comisura intertectal), OT (techo óptico), Cb (cerebelo), Tel (telencéfalo), OB (bulbo olfativo), Teg (tegumento), TL (toro longitudinal), TS (toro semicircular), VCb (válvula del cerebelo). Imagen tomada de Northmore (1985).

En una sección transversal a nivel del techo óptico se puede observar bajo el microscopio su organización laminar de esta estructura, así como la localización del toro longitudinal. Desde la superficie al interior, las capas del techo óptico son (Northmore, 1985): estrato marginal (SM) estrato óptico (SO), estrato fibroso y gris superficial (SFGS), estrato gris central (SGC), estrato *album* central (SAC) y estrato periventricular (SPV) (un esquema con las capas que componen el techo óptico se muestra en la Figura 3). Funcionalmente se puede distinguir entre las capas superficiales principalmente visuales (incluyendo SM, SO y SFGS) y las capas profundas multimodales y motoras (SGC, SAC y SPV) (Northmore, 1985). Algunas capas contienen muchas fibras (SM, SO, SAC), mientras que otras contienen gran densidad de cuerpos neuronales (SFGS, SGC). La capa más interna (SPV) se compone de cuerpos neuronales densamente empaquetados. Desde el punto de vista morfológico, se han descrito unos 15 tipos diferentes de neuronas en la carpa dorada algunas de los cuales se ilustran en la Figura 2. Entre las conexiones del techo óptico son dominantes las aferencias de la retina, pero también hay conexiones con muchas otras estructuras del encéfalo, como el toro semicircular (procesamiento mecanosensorial y auditivo; Northmore, 1985) y el núcleo del itsmo (Figura 3).

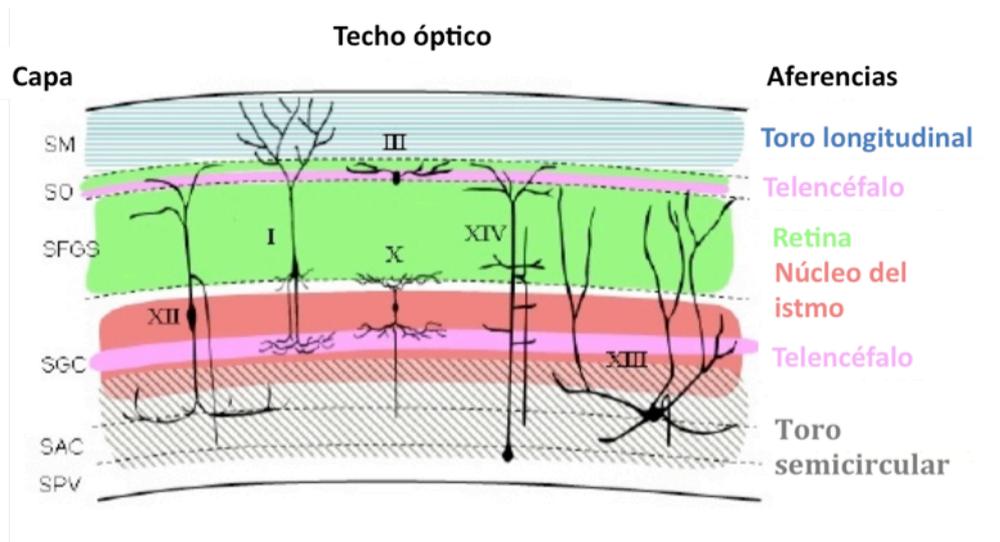


Figura 3. Esquema general que muestra la estructura laminar del techo óptico de teleósteos y algunos tipos celulares representativos. Los números romanos se corresponden con los tipos celulares identificados y descritos por Meek (1983). Las bandas de colores muestran las principales capas de terminación de las aferencias al techo (azul: toro longitudinal). De fuera hacia dentro: SM (*Stratum marginale*), SO (*Stratum opticum*), SFGS (*Stratum fibrosum et griseum superficiale*), SGC (*Stratum griseum centrale*), SAC (*Stratum album centrale*), SPV (*Stratum periventriculare*). Figura tomada de Northmore (1985).

El toro longitudinal

El toro longitudinal (TL) es una estructura exclusiva de peces teleósteos (Northmore, 1985). Consiste en un par de masas alargadas, conectadas a los márgenes mediales del techo y justo por debajo de la comisura intertectal (Figuras 2B, 4). Desde el punto de vista embriológico, parece ser una estructura de aparición tardía que se origina a partir de la línea media dorsal del mesencéfalo (Candal *et al.*, 2005). Estudios anatómicos en diversas especies muestran que el TL se compone de dos divisiones principales, dorsomedial y ventrolateral, que tienen diferente conectividad y función (Meek, 1983). Los estudios electrofisiológicos han confirmado la existencia de un preciso y ordenado bucle entre TL dorsomedial, tectum y viceversa, y también han demostrado que el TL dorsomedial se ocupa de un tipo específico de información visual (Northmore 1985, Xue *et al.*, 2003).

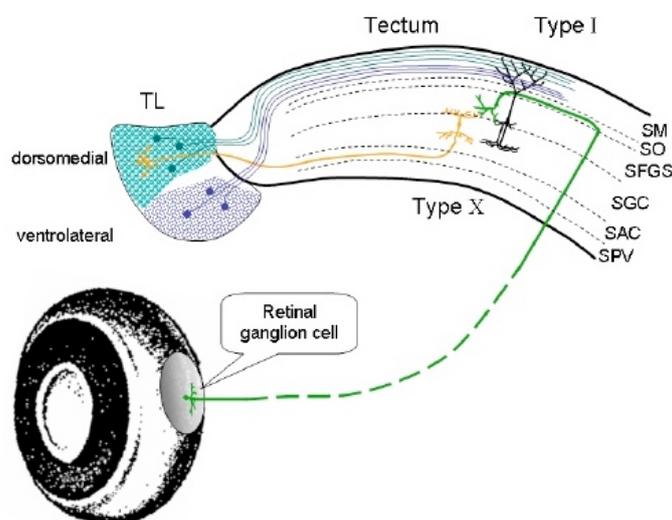


Figura 4. Representación esquemática del circuito techo óptico-toro longitudinal. Se muestra una sección transversal a través de un TL y parte del techo óptico adyacente. Células grano del toro longitudinal (azul) emiten axones que alcanzan el estrato marginal del techo óptico, donde establecen sinapsis con las dendritas de las neuronas de Tipo I o piramidales (negro). En la imagen también se muestran otros aspectos del circuito: una célula ganglionar de la retina emite un axón (verde) que alcanza regiones del techo óptico. Una célula (amarillo) recibe señales visuales y proyecta al toro longitudinal. Imagen tomada de Northmore (1985).

El toro longitudinal está formado por células pequeñas densamente empaquetadas que muestran una morfología de “grano” (Figuras 4, 5) (Sala, 1895; Ramón, 1899; Catois, 1901). Estas células envían gran cantidad de axones finos no mielinizados al estrato marginal, la capa más superficial del techo óptico adyacente, donde se orientan en paralelo (Figuras 4, 5). De esta manera, el estrato marginal del techo óptico está lleno de axones procedentes de las células grano del toro longitudinal (llamados fibras marginales) que establecen contacto sináptico con las dendritas de neuronas de tipo I (Meek y Schellart, 1978) o células piramidales (Ramón, 1899; Vanegas *et al.*, 1974, 1984a) del techo (Figuras 4, 5). Los contactos sinápticos hechos por las fibras marginales pueden superar en número a todas las demás entradas al techo (Northmore, 1984). Las neuronas de tipo I o células piramidales, cuyos somas se localizan en la capa fibrosa y gris superficial, tienen árboles dendríticos extensamente ramificados que reciben sinapsis de las fibras marginales.

El circuito toro longitudinal- techo óptico (células grano-fibras marginales-dendritas de las neuronas tipo I o células piramidales) recuerda mucho ciertos aspectos de los circuitos cerebelosos, donde las células grano emiten axones (fibras paralelas) a la capa molecular, donde establecen sinapsis con dendritas de las células de Purkinje (Figuras 4, 5) (Northmore, 1984, Bell, 2008, Bae *et al.*, 2009). Por esta razón se considera una estructura “cerebellum-like” (“cerebelo-similar”) (Figura 5).

La mayoría vertebrados poseen estructuras que son histológicamente similares al cerebelo, llamadas estructuras “cerebellum-like” (Bell, 2002; Bell *et al.*, 2008; Sawtell y Bell, 2008) o pseudocerebelosas (ver Figura 5). Ejemplos de este tipo de estructuras son el toro longitudinal, como ya mencionamos, y el núcleo medial octavolateral. Como característica común, tanto las estructuras pseudocerebelosas como el cerebelo contienen células principales (células de Purkinje en el cerebelo) que reciben información de las fibras paralelas de las células grano. Además, las estructuras cerebellum-like comparten un perfil de expresión génica con el cerebelo.

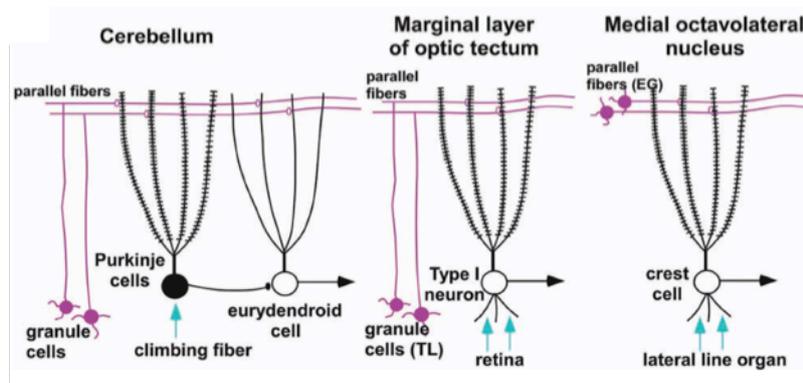


Figura 5. Representación esquemática donde se compara la organización del cerebelo (izquierda) con la de las estructuras “cerebellum-like” (centro y derecha). La figura se modificó a partir de Bae *et al.* (2009).

El papel del circuito toro longitudinal-techo óptico sólo se puede suponer ya que no hay datos conclusivos. Se ha sugerido que puede estar implicado en la coordinación de los movimientos del ojo (Folgueira *et al.*, 2007; Northmore, 1998) y/o en la integración visual dentro de la columna de agua, respondiendo a distintas intensidades de luz (Gibbs y Northmore, 1998). Estudios comparativos indican que el TL está muy desarrollado en las especies que viven en entornos turbulentos. Uno de estos, el pez ardilla, tiene una capa marginal que presenta casi la mitad del espesor del techo. Este animal vive en y alrededor de los arrecifes de coral, moviéndose entre huecos brillantemente iluminados y oscuros en aguas turbias.

El pez cebra

El pez cebra es un pez pequeño y activo, nativo de la India, que suele habitar los ríos de Asia central. Pertenece a la familia de los ciprínidos (Ostariofisios) y está emparentado con las carpas y los barbos. Los ostariofisios son el mayor grupo de teleósteos de agua dulce, los cuales, a su vez, son el conjunto de vertebrados con mayor número de especies (Lauder y Liem, 1983). En una reciente revisión taxonómica (Barman, 1991), todas las especies del género *Brachydanio* han sido reasignadas al género *Danio*; la correcta designación de especie para el pez cebra es, por lo tanto, *Danio* (antes *Brachydanio*) *rerio*.

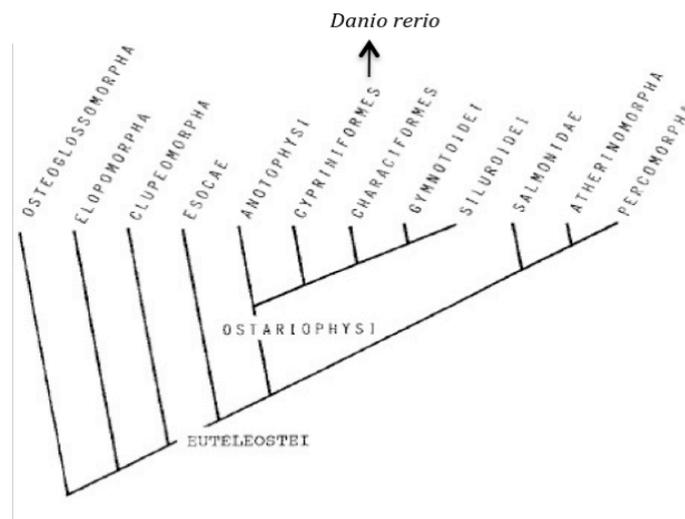


Figura 6. Cladograma que muestra la posición sistemática del pez cebra dentro del grupo de los cipriniformes (Lauder y Liem, 1983). La familia de los ciprínidos forma la más conocida de las seis familias que constituyen el orden de los cipriniformes. Este orden, a su vez, forma parte de los ostariofisios, que se caracterizan por el aparato de huesecillos Weberiano (un dispositivo especializado en la transmisión de sonido).

Danio rerio fue seleccionado entre la gran diversidad de peces existentes en la naturaleza para entrar en el laboratorio. Sin embargo, no hubo necesidad de buscarlo en los ríos, pues, como otras especies del mismo género, es una especie habitual de los acuarios. Es un pez conocido ya que es fácil de mantener, bastante resistente a variaciones de las condiciones del medio y puede convivir con muchas especies. A pesar de su extendido uso en acuarios y laboratorios, se desconocen muchos aspectos del hábitat natural y de la ecología de dicha especie.



Figura 7. Dos individuos adultos de pez cebra, *Danio rerio*.

Es una especie de tamaño pequeño (3 y 5 cm de largo en el adulto) y forma alargada. En los laterales presenta entre 5 y 9 bandas de color azulado que se superponen al color de fondo. Este aspecto rayado le ha merecido el nombre popular de pez cebra (Figura 7). Presentan dimorfismo sexual tanto en el tamaño como en el color. Las hembras suelen ser más grandes que los machos y tienen un color más plateado. El macho, sin embargo, adquiere tonalidades más doradas.

Su hábitat natural son aguas más o menos tranquilas, en ocasiones estancadas, de Asia central, particularmente de la región del Ganges en la India. También se puede encontrar en los ríos de Nepal, Bangladesh, Pakistán y Myanmar. Es un animal omnívoro que se alimenta de larvas de mosquito y de otras especies de insectos (zooplancton) y también de algas microscópicas (fitoplancton). En el acuario, se les mantiene a una temperatura de entre 22 y 30 °C, pH del agua neutro (~7) y de 5º a 10º dGH de dureza.

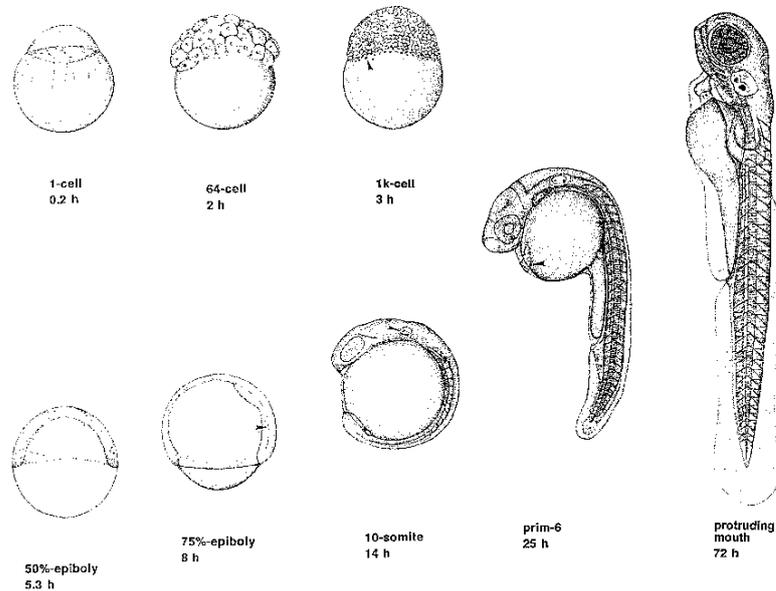


Figura 8. Desarrollo embrionario del pez cebra, *Danio rerio*.

Es una especie ovípara que, en condiciones naturales, desova en los márgenes de los ríos. Los huevos suelen eclosionar tres días a partir de la fertilización y, a los cinco o seis meses, los individuos llegan a la madurez reproductiva. En el laboratorio, las hembras pueden poner entre 200 y 300 huevos. El embrión es transparente y se desarrolla rápidamente (Figura 8), de manera que a las 24 horas el animal ya presenta un encéfalo rudimentario y movimientos espontáneos. Las larvas empiezan a alimentarse independientemente a los cinco

días. En condiciones óptimas, el tiempo de generación, de huevo a huevo, es de tres meses (Figura 7).

Desde su introducción como animal de laboratorio en década de los 90, ha pasado a ser un modelo animal ampliamente utilizado. Es especialmente apreciado por su homología genética con el hombre (compartimos con estos peces más del 80% del genoma) que permite que los resultados obtenidos en estos animales sean potencialmente extrapolables al ser humano. Sus embriones son transparentes y de pequeño tamaño, algo que hace posible observar distintos fenómenos del desarrollo embrionario (normal o patológico) directamente bajo el microscopio. Además tiene una alta capacidad reproductiva (la hembra pone hasta 200 huevos, se reproducen durante todo el año en condiciones de laboratorio), rápido desarrollo [sus órganos se forman en sólo 24 horas post- fertilización (hpf)] (Figura 7) y la cualidad de regenerar órganos parcialmente amputados. Su pequeño tamaño hace fácil su almacenaje, ya que, con sistemas de recirculación y filtrado del agua, caben hasta un centenar de animales en contenedores de un litro de agua.

Este pez también es un importante sistema modelo para estudios genéticos y de desarrollo, sobre todo del sistema nervioso central (SNC) (Kimmel, 1993; Westerfield, 1993). Varios estudios documentan la diferenciación de las primeras neuronas y sus axones pioneros en el encéfalo (Metcalf *et al.*, 1986, 1990; Hanneman *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1990; Chitnis y Kuwada, 1990; Ross *et al.*, 1992) y en la médula espinal del pez cebra (Myers, 1985; Eisen *et al.*, 1986; Mendelson, 1986; Hanneman y Westerfield, 1989; Bernhardt *et al.*, 1990; Kuwada *et al.*, 1990) ya a las 24hpf.. Además, se han descrito en el SNC del pez cebra embrionario diversos patrones de expresión de genes reguladores tempranos (Njolstad *et al.*, 1990; Hatta *et al.*, 1991; Krauss *et al.*, 1991; Molven *et al.*, 1991; Ekker *et al.*, 1992; Oxtoby y Jowett, 1993; Akimenko *et al.*, 1994). Asimismo, la generación a gran escala de peces cebra mutantes ha tenido mucho éxito en los últimos años (Mullins y Nüsslein-Volhard, 1993; Solnica-Krezel *et al.*, 1994) y, por lo tanto, los mutantes para caracteres específicos del SNC ya son objeto de investigación (Karlstrom *et al.*, 1995).

En contraste con el conocimiento más o menos detallado del SNC del embrión y la larva del pez cebra, poco se sabe acerca de la organización del encéfalo del pez cebra adulto. Sin embargo, conocer la neuroanatomía del cerebro del pez cebra adulto es un requisito indispensable para relacionar los estudios de desarrollo y la expresión de genes con la organización del encéfalo adulto. Entre los estudios anatómicos disponibles, cabe destacar un atlas de tinción Nissl del adulto (Wullimann *et al.*, 1996) y un estudio comparativo con la carpa dorada (Rupp *et al.*, 1996). En este último se discute la anatomía del pez cebra en un contexto comparativo, con el fin de proporcionar un marco para futuras investigaciones sobre el encéfalo del pez cebra. En lo que respecta a la conectividad del encéfalo, poco se conoce por el momento. Sin embargo, las conexiones en el encéfalo de otros peces teleósteos estrechamente relacionados, tales como la carpa, están bien investigados (Bartheld *et al.*, 1984; Levine y Dethier, 1985; Puzdrowski, 1987, 1988, 1989; Northcutt y Wullimann, 1988; Kanwal y Finger, 1992; McCormick y Bradford, 1994). Esta información se puede utilizar para realizar evaluaciones funcionales neuroanatómicas comparadas del encéfalo del pez cebra.

En lo que respecta al toro longitudinal del pez cebra, poco se conoce sobre su anatomía y función. Simplemente aparece reseñado en algunos atlas y artículos del adulto (Rupp *et al.*, 1996; Wullimann *et al.*, 1996), donde no se describe en detalle su anatomía. Por su parte, en el embrión o la larva no hemos encontrado reseña alguna a esta estructura. Si bien algunos investigadores han estudiado componentes del techo óptico (Nevin *et al.*, 2008;

Scott y Baier, 2009), ninguno de estos trabajos hace referencia al toro longitudinal. Esto es sorprendente, dado que el pez cebra es un modelo animal ampliamente utilizado para estudios funcionales del techo óptico (Rupp *et al.*, 1996). Estudios preliminares del laboratorio de Biología Celular de la UDC (comunicación personal con Dr. Folgueira) sugieren que el toro longitudinal podría tener un desarrollo tardío, posterior a los 5 días post fertilización.

Consideramos que el desconocimiento que existe en la actualidad sobre la anatomía y desarrollo del toro longitudinal-estrato marginal es una grave carencia para la comunidad científica que trabaja con el pez cebra, dada la importancia de este animal como modelo para estudios funcionales del techo óptico. Por tanto, hemos realizado un estudio que venga a arrojar luz sobre estas estructuras. En este trabajo estudiaremos la estructura y organización del toro longitudinal y estrato marginal del techo óptico en el adulto de pez cebra, para después estudiar su desarrollo en estadios larvarios. Para este fin, utilizaremos tanto una tinción general de tipo Nissl y una técnica de inmunofluorescencia indirecta.

OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente estudio son:

1. Generar un atlas con la anatomía general del TL del pez cebra adulto, desde regiones rostrales a caudales del encéfalo, tanto en secciones transversales como longitudinales.
2. Describir de manera detallada la organización anatómica del TL y del estrato marginal del techo óptico en el adulto y larva de pez cebra.

MATERIAL Y MÉTODOS

En total se utilizaron 3 individuos adultos de pez cebra, dos de los cuales fueron procesados para una tinción general Nissl y uno para técnica inmunofluorescente frente a vesículas sinápticas (SV2). Además, se utilizaron para la misma técnica inmunofluorescente larvas de pez cebra de 5 y 10 días post fertilización (3 individuos para cada estadio).

1. Tinción de Nissl en encéfalos de adulto juvenil de pez cebra

Los pasos generales que hemos seguido para el procesamiento histológico son: la fijación, postfijación, la inclusión, la microtomía y la tinción.

1A. Fijación por perfusión

Se procedió a la fijación del tejido utilizando paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 (anexo I). La finalidad de la fijación es mantener la estructura (y en determinados casos la función) del tejido, lo más parecido posible a su estado *in vivo*. En el presente trabajo se recurrió a fijación química por perfusión mediante paraformaldehído, seguido de postfijación por inmersión. La perfusión consiste en introducir el fijador en el sistema circulatorio antes de que se inicien los fenómenos *post mortem*. De esta manera se logra fijar todas las células de un órgano completo de forma muy rápida y uniforme. Para llevar a cabo el proceso de perfusión, se seleccionaron 2 individuos adultos de pez cebra y se siguió el siguiente procedimiento con cada uno de ellos:

- Introducir al animal en una cubeta con agua del acuario y anestesiarlo con dosis subletales. El anestésico empleado fue la tricaina al 0.01% pH 7.4 (Sigma Aldrich).
- Una vez anestesiado el individuo, se procede a la perfusión. Para ello se abre la cavidad torácica del animal y se introduce una cánula en la aorta a través del ventrículo, lo que nos permitirá introducir las soluciones en la circulación mayor e impulsarlas con la ayuda de la contracción cardíaca y una bomba peristáltica.
- En el momento en el que se inicie la entrada del fijador (paraformaldehído 4%) se realiza una pequeña incisión en el atrio, de modo que así se permita la salida de la sangre y de las propias soluciones una vez recorrido el sistema circulatorio mayor al completo. Al ir penetrando el líquido fijador en todos los tejidos del organismo a través de la vía circulatoria se consigue una fijación rápida y homogénea.
- Se finaliza la fijación cuando se ha introducido paraformaldehído hasta aproximadamente 3 veces el volumen del animal. Una buena señal de fijación es un color claro de las arterias y la rigidez del pez.

2B. Postfijación por inmersión

Tras la perfusión, se secciona la cabeza de los individuos y se continua con la fijación por inmersión en el agente fijador (líquido de Bouin, 24 horas a temperatura ambiente). Durante la postfijación el tejido adquiere la dureza suficiente para, por ejemplo, cortar secciones de la muestra. Tras 24 horas, se realiza la disección de los encéfalos. Después de realizar lavados en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (TF), se pasan los dos encéfalos a alcohol 70% y se guardan en refrigeración hasta su utilización.

3C. Inclusión en parafina

Se procede a infiltrar los encéfalos con parafina, un material que dará la consistencia necesaria al tejido para permitir su seccionado. Para el proceso de inclusión, se siguen los siguientes pasos:

- Deshidratación mediante alcohol etílico, con inmersión de los encéfalos en diluciones de gradación creciente hasta alcanzar alcohol etílico absoluto. Se hicieron varios pasos por cada una de estas concentraciones, para evitar que cada concentración sea diluida por la anterior. La serie empleada fue: Etanol 80 – 96 I – 96 II – 100 I – 100 II – 100 III (30 minutos en cada uno de ellos).
- Aclaramiento, sustituyendo el agente deshidratante, por un disolvente orgánico que tenga la capacidad de mezclarse tanto con el agente deshidratante como con el medio de inclusión (parafina). El agente aclarador fue el xileno(Xileno I – Xileno II, 5 minutos en cada uno).
- Infiltración, sumergiendo los tejidos en parafina (Analema) fundida en estufa a 60°C. Debido al calor, los agentes aclarantes se evaporan y los espacios anteriormente ocupados por ellos lo serán por la parafina.
- Confección de los bloques. Se vierte la parafina dentro un molde y seguidamente se introduce el encéfalo, orientando uno de los encéfalos en sentido horizontal y el

otro en sentido vertical. A continuación, se deja enfriar el bloque a temperatura ambiente para finalmente, desmoldar y obtener el bloque.

1D. Seccionado del tejido mediante microtomía

Se realizaron cortes histológicos (14 μm) utilizando un microtomo de rotación o de tipo Minot, obteniendo secciones transversales de una de las muestras y secciones horizontales de la otra. Los cortes se recogen en portas gelatinizados en nuestro laboratorio (ver anexo I).

1E. Tinción de cuerpos de Nissl

Con los cortes (horizontales y transversales) de los dos cerebros que habían sido fijados previamente en líquido de Bouin, se siguió el siguiente procedimiento:

- Desparafinado en xileno (xileno I, xileno II, xileno III y xileno IV, 5 minutos en cada uno).
- Hidratación en alcoholes etílicos de concentración decreciente (100%, 96%, 80%, 50%; 5 minutos en cada uno) y paso por agua destilada (5 minutos)
- Tinción con solución acuosa filtrada al 1% de Violeta de Cresilo Acetato (Sigma Aldrich) (15 minutos).
- Lavar a chorro con agua destilada.
- Deshidratación con alcohol etílico de concentración creciente (96%, 100%; 5 minutos en cada uno).
- Aclarado en xileno (xileno I y xileno II; 5 minutos en cada uno).
- Montaje utilizando la resina sintética Eukitt (O. Kindler GmbH).
- Secado en estufa (40 °C, 24 horas).

2. Inmunofluorescencia frente al antígeno vesículas sinápticas-2 en secciones de encéfalo de adulto de pez cebra

La inmunofluorescencia consiste en la detección de antígenos de interés mediante la utilización de anticuerpos específicos unidos a una molécula fluorescente (Badía LM *et al.*, 2009).

2A. Fijación y seccionado del tejido

Tras realizar la fijación por perfusión de un individuo de pez cebra siguiendo el mismo protocolo que se indica en el apartado anterior (A. Fijación por perfusión), se postfija la cabeza del individuo en paraformaldehído 4% durante (24 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz). A continuación se transfiere a TF y se mantiene en refrigeración hasta proceder a la disección. Tras crioproteger el tejido en sacarosa (10% 1 hora, 20% 4 horas y 30% 20 horas), se procede a la preparación de los bloques. Para ello, la muestra se embebe en un medio líquido (OPTIMUM CUTTING TEMPERATURE, OCT; Sakura) contenido en moldes y se congela en metilbutano refrigerado con nitrógeno líquido. Utilizando un criostato HM500-M (Microm), se obtienen secciones (12 μm) que se recogen en portas gelatinizados

2B. Técnica inmunofluorescente

El procedimiento aplicado fue el siguiente:

- Lavar en Tampón Fosfato Salino 0,1 M pH 7,4 (TFS).

- Incubar con suero normal de cabra (1:100; Sigma Aldrich) diluido en TFS con Triton al 0,3% (TFS-T; 1 hora en cámara oscura a temperatura ambiente). Este paso tiene la función de bloquear los radicales libres reactivos.
- Incubar con el anticuerpo primario ratón anti- vesículas sinápticas 2 (1:250; Life Technologies) en suero normal de cabra (1:100) en TFS-T (24 horas en cámara oscura a temperatura ambiente).
- Lavar en TFS (3 lavados de 10 minutos cada uno).
- Incubar con el anticuerpo secundario cabra anti anti- ratón Alexa 568 (Invitrogen) en TFS-T con suero normal de cabra (1:100) en TFS-T (una hora a temperatura ambiente).
- Lavar con TFS (3 lavados de 10 minutos cada uno).
- Montar en glicerol al 50% en TF.
- Contraintinción con el colorante para ácidos nucleicos Sytox Orange (S-11368, Life Technologies)

3. Inmunofluorescencia frente al antígeno vesículas sinápticas-2 en secciones de larva de pez cebra

Para realizar la inmunofluorescencia en secciones de larva de pez cebra se siguió un protocolo muy similar al aplicado a los encéfalos adultos. La particularidad fue que no se recurre a fijación por perfusión, de modo que tanto la fijación y postfijación se realizó por inmersión. El resto del protocolo es igual al descrito para los encéfalos del adulto. Se utilizaron 3 larvas de 5 días postfertilización (dpf) y otras tantas de 10 días.

4. Observación de las preparaciones y edición de las imágenes

Las secciones se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i) acoplado a una cámara digital (Olympus, DP71). Para el montaje de las figuras se utilizó el software Microsoft PowerPoint^R.

ANEXO I.

Gelatinización de portas

Para la obtención de portas gelatinizados en los que recoger las secciones obtenidas, se siguió el siguiente protocolo. En un vaso de precipitados, calentamos 1 L de agua destilada hasta 60 °C, sin que llegue a hervir. Añadimos 5 gramos de gelatina y 0,5 gramos de sulfato de Cr y K, manteniendo la mezcla en agitación a 75 °C hasta que no se observen grupos. A continuación, se colocan los portas en las gradillas que se introducen en cubetas con la mezcla anterior. Tras 30 minutos, las cestillas se retiran de las cubetas y se secan en estufa a 37 °C. Este proceso se repite 3 veces.

Preparación de soluciones

- **Paraformaldehído 4% en TF (500ml):** en campana de extracción de gases, calentamos 250 ml de agua destilada hasta 80 °C, para añadir 20 gramos de paraformaldehído. Se agregan unas gotas de hidróxido de sodio 1N hasta que la solución torne transparente. Se deja enfriar la mezcla en la campana y, a continuación, se agrega 250 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.

- **Líquido de Bouin (100ml):** en campana de extracción de gases, mezclamos 75 ml de solución acuosa de ácido pícrico saturado con 25 ml de formalina (formol) y 5 ml de ácido acético glacial.

RESULTADOS

1. Organización anatómica general del toro longitudinal y regiones relacionadas en el encéfalo adulto

Para realizar la descripción anatómica general del toro longitudinal y estrato marginal del techo óptico del encéfalo adulto, recurrimos a una tinción de cuerpos de Nissl. Esta tinción se utiliza para teñir el cuerpo de la célula nerviosa (el núcleo, el nucléolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso o sustancia de Nissl), por lo que es una técnica de tinción general muy útil para la descripción anatómica del encéfalo (Badía LM *et al.*, 2009). La sustancia de Nissl (retículo endoplasmático rugoso) aparece de color morado oscuro debido a la tinción de ARN ribosómico, dando al citoplasma un aspecto moteado.

1. A. Organización anatómica rostro-caudal (secciones transversales):

En regiones rostrales, se observa que el toro longitudinal parece estar inicialmente fusionado a la porción dorsal del diencéfalo, próximo a la comisura posterior (Figuras 9 A, B). Los lóbulos tectales parecen estar aún muy próximos en la línea media, sin separación en la comisura intertectal (Figuras 9A-H).

El toro longitudinal se observa como una estructura ovoide situada en la zona media del encéfalo, entre ambos lóbulos tectales. Se encuentra comprimido en el interior de un ventrículo aún pequeño (Figuras 9A-B) que se irá ampliando hacia regiones caudales. Parece estar unido dorsalmente a la comisura intertectal y los lóbulos tectales, y en su parte inferior a la comisura posterior del diencéfalo. El toro longitudinal se puede distinguir claramente desde regiones rostrales a regiones caudales del encéfalo, debido a su situación y forma características.

El toro longitudinal está formado por células pequeñas (granos) densamente empaquetadas, que le dan un aspecto granular. Los cuerpos de estas células están intensamente teñidos de azul. Los paquetes de células se alternan con zonas claras no teñidas, que presumiblemente se corresponden con zonas de abundancia de fibras nerviosas (axones y/o dendritas).

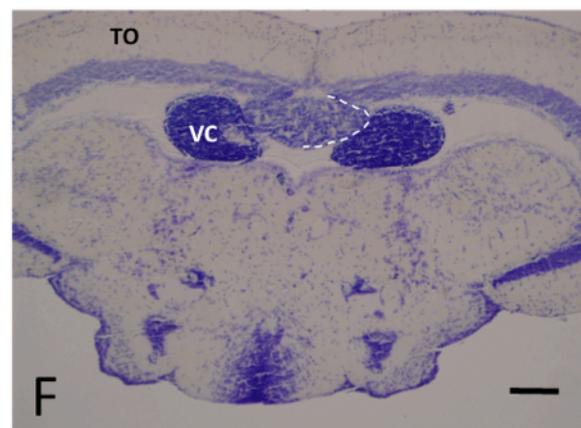
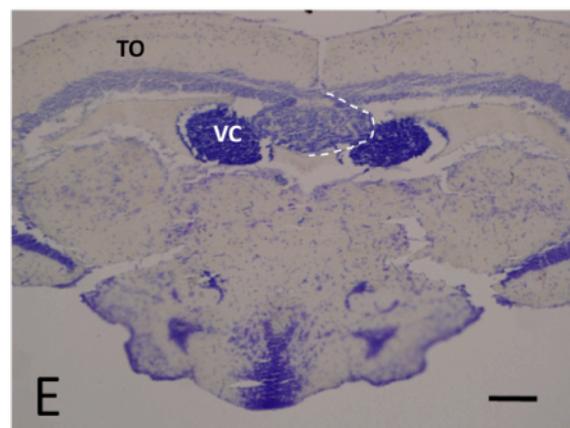
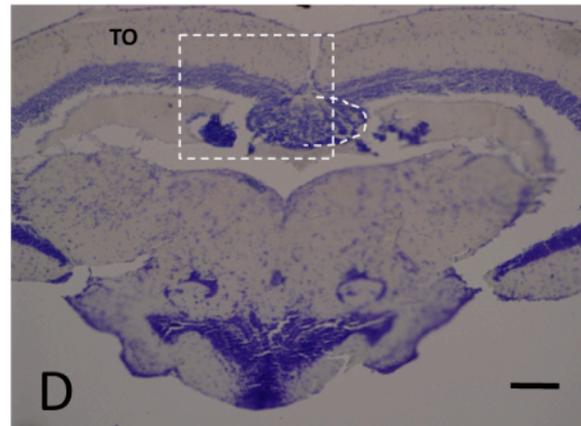
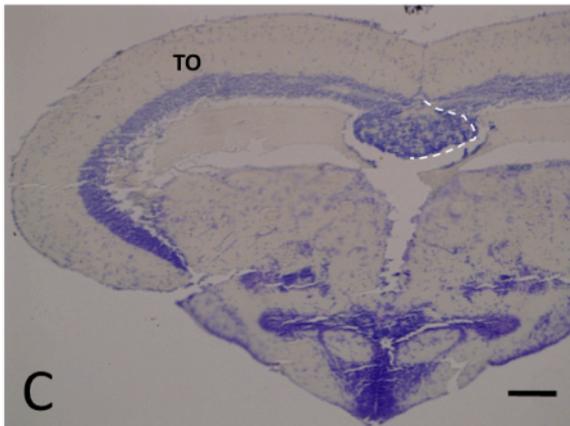
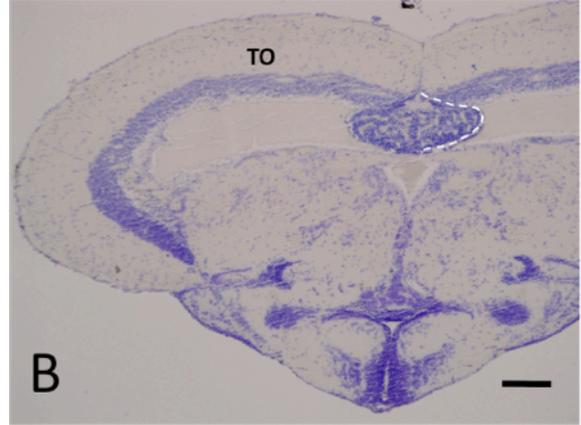
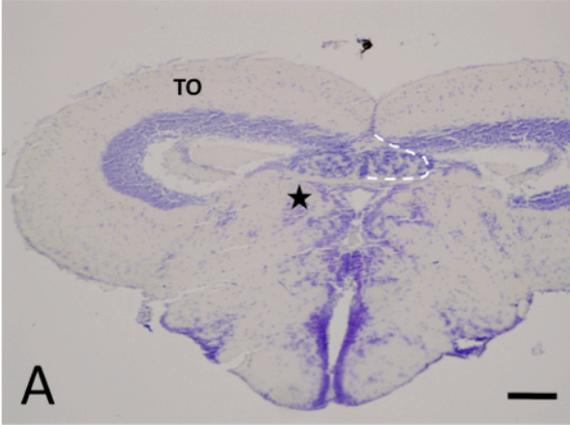
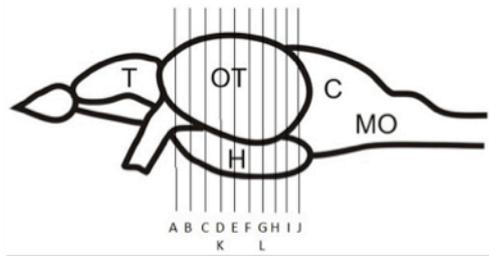
Fuera del toro longitudinal, observamos que la capa más interna de los lóbulos tectales está intensamente teñida. Podemos suponer que se trata del estrato periventricular, ya que se sabe que es una zona compuesta por cuerpos neuronales densamente empaquetados, al igual que el toro longitudinal (Northmore, 1985). Vemos también que en capas más superficiales de los lóbulos tectales aparecen también células teñidas, pero mucho más dispersas (Figura 9). Podría tratarse del estrato gris central y del estrato fibroso y gris superficial, ya que son capas que se caracterizan por presentar cuerpos celulares neuronales, fibras y sinapsis (Figura 9). En otras zonas casi no aparecen cuerpos celulares teñidos, siendo probablemente el estrato álbum central, el estrato óptico y el estrato marginal. Estas zonas se caracterizan por su alta densidad de fibras. Sin embargo, esta zonación de los lóbulos tectales es sólo intuitiva, ya que no están claramente delimitados.

A medida que avanzamos a niveles más caudales en el mesencéfalo, observamos que el toro longitudinal deja de tener una apariencia tan comprimida entre los lóbulos tectales (Figura 9C-D), empezando a agrandarse un poco y adquiriendo una forma un poco más redondeada. Sin embargo, continúa aún unido a la comisura intertectal y a la comisura posterior. El ventrículo mesencefálico es de mayor tamaño en estos niveles, que se va haciendo más grande. Según avanzamos caudalmente, vemos que el toro longitudinal se va separando de las porciones del encéfalo ventrales a él (tegmento mesencefálico).

En regiones caudales, van apareciendo células grano intensamente teñidas a ambos lados del toro longitudinal. Estas células, que tienen una coloración mucho más intensa y los cuerpos celulares parecen mucho más empaquetados que en el toro longitudinal, pertenecen a la válvula cerebelosa. Estas dos masas se van haciendo cada vez más grandes y redondas, siempre adyacentes al toro longitudinal. A partir de aquí y hacia regiones caudales, el ventrículo irá haciéndose más pequeño.

En regiones más caudales, el toro longitudinal irá disminuyendo de nuevo de tamaño y estará cada vez más comprimido hacia la comisura intertectal. A partir de las dos masas de células anteriormente descritas, adyacentes al toro longitudinal, comienza a diferenciarse la válvula del cerebelo. En niveles un poco más caudales (Figura 9I-J) los dos lóbulos tectales se separan, el toro longitudinal comienza a adoptar una forma bilobulada, haciéndose también más pequeño. Cuando se observa una sección completa de la válvula del cerebelo y los lóbulos tectales están aún más separados, el toro longitudinal consiste en dos pequeñas masas celulares, unidas al extremo de cada lóbulo tectal. En este punto, el ventrículo mesencefálico está prácticamente ocupado en su totalidad por la válvula del cerebelo.

A medida que se produce la transición de la válvula cerebelosa al corpus cerebeloso, el toro longitudinal y el techo óptico van desapareciendo (Figura 9I-J).



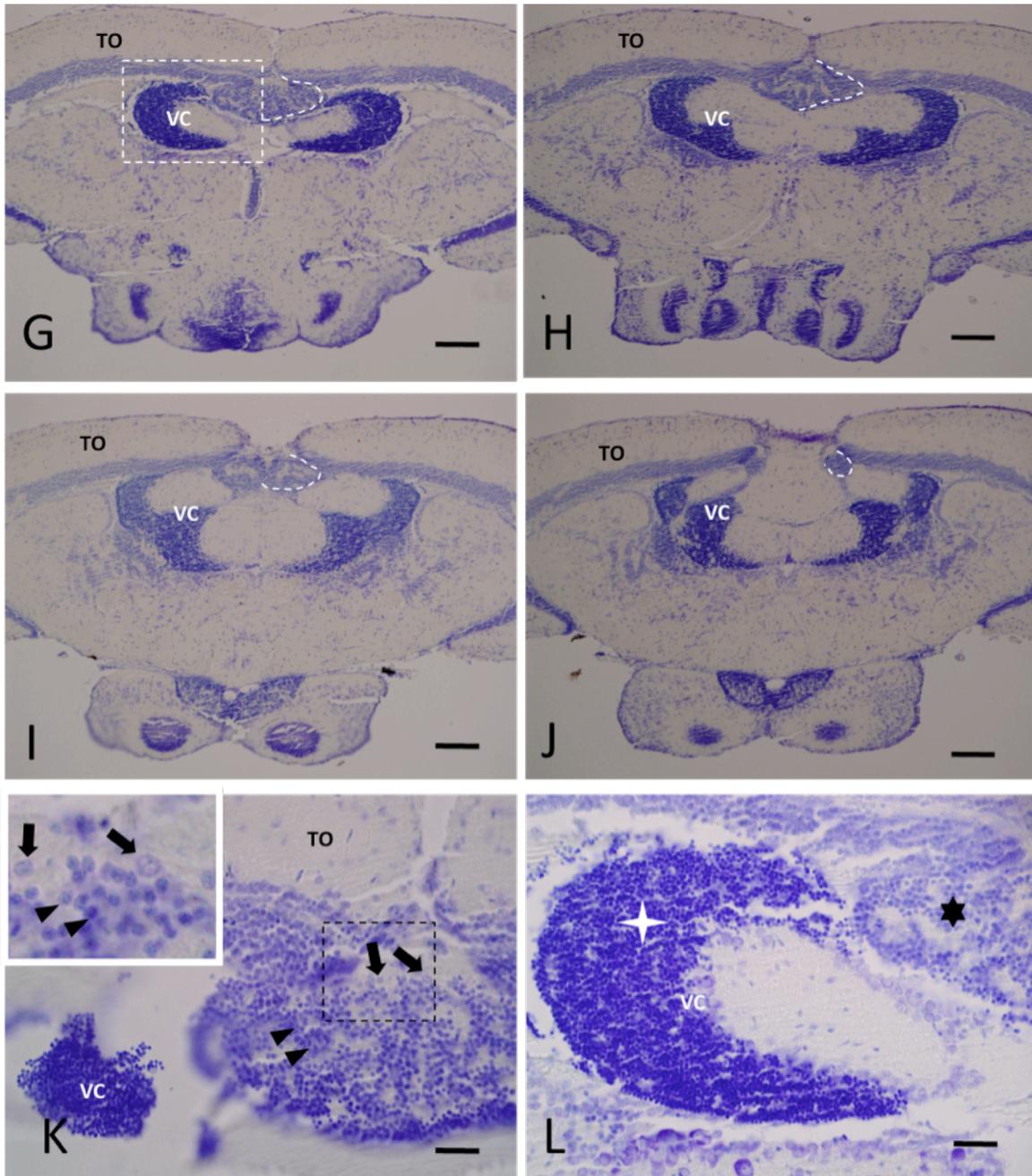


Figura 9. A-J: Fotomicrografías de secciones transversales de encéfalo de pez cebra a los niveles señalados en el esquema general del encéfalo (arriba), mostrando la anatomía general del toro longitudinal y estructuras adyacentes. La mitad derecha del toro longitudinal aparece delimitada por una línea punteada. Asterisco en A señala la región dorsal del diencéfalo. K: Detalle del toro longitudinal, mostrando células grano de pequeño tamaño (cabezas de flecha) y células de mayor tamaño (flechas). Entre las células grano hay zonas de neuropilo no teñidas. En la imagen en el margen superior izquierda se muestra un detalle de la región señalada en K. L: Detalle del toro longitudinal (asterisco) y de la masa celular que posteriormente dará lugar a la válvula cerebelosa (estrella blanca). Secciones desde nivel rostral a nivel caudal. Abreviaturas: OT, techo óptico; VC: válvula cerebelosa. Barra de escala: 120 μ m.

1. B. Organización anatómica dorso-ventral (secciones horizontales del encéfalo):

Si bien la tradición dentro de la neuroanatomía de peces teleósteos es realizar secciones transversales, la mayoría de estudios funcionales se realizan observando el encéfalo en una visión dorsal (Portugues y Engert, 2009). Por esta razón y para familiarizarnos con este tipo de visión del encéfalo, realizamos secciones horizontales del encéfalo adulto.

En niveles más dorsales, el toro longitudinal aparece como una estructura triangular localizada entre los lóbulos tectales y el corpus cerebeloso (Figura 10A). A este nivel, los lóbulos tectales son muy gruesos. Un examen detallado del toro longitudinal vuelve a mostrar la organización anatómica típica, con células grano densamente empaquetadas, entre las que se observan zonas de abundantes fibras o neuropilo (Figura 10A).

Hacia regiones más ventrales, el toro longitudinal adquiere mayor tamaño (Figura 10B). Rostralmente al toro longitudinal, se observa la comisura intertectal. Caudalmente y a este nivel, la válvula cerebelosa presenta gran tamaño. Se puede observar claramente cómo la válvula es una continuación hacia el interior del ventrículo del corpus cerebeloso. Las células grano del toro longitudinal y de la válvula cerebelosa se pueden diferenciar claramente porque se tiñen con distintas intensidades con el violeta de cresilo, como habíamos observado ya en las secciones transversales. En los lóbulos tectales, nuevamente no es posible delimitar de forma clara el estrato marginal.

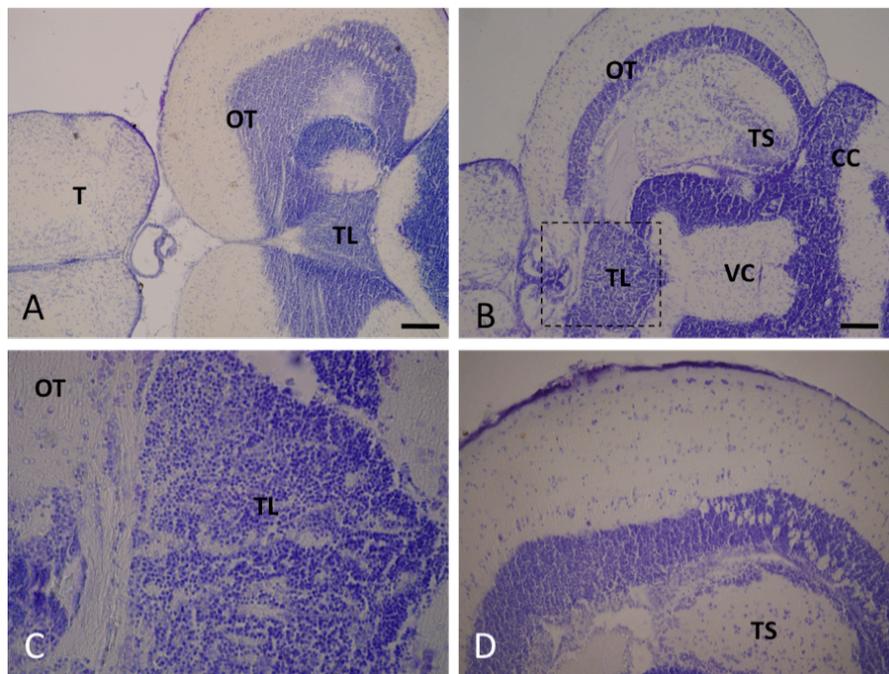
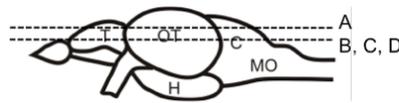


Figura 10. A-B: Microfotografías de secciones longitudinales de encéfalo de pez cebra a los niveles señalados en el esquema, mostrando la anatomía general del toro longitudinal y estructuras adyacentes. C: Detalle del toro longitudinal (de la zona señalada con el recuadro en B), mostrando las células grano densamente empaquetadas y zonas de neuropilo no teñidas. D: Detalle de la organización del techo óptico. Secciones a nivel dorsal (A) y ventral (B). Abreviaturas: CC, corpus cerebeloso; OT, techo óptico; T: telencéfalo; TL, toro longitudinal; TS: toro semicircular; VC, válvula cerebelosa. Barra de escala: 120 μm

2. Descripción detallada de la citoarquitectura del toro longitudinal y estrato marginal en el adulto

En el pez cebra adulto, la tinción de Nissl reveló que el TL consiste en por lo menos dos tipos de neuronas de acuerdo a su tamaño celular. Las más numerosas son pequeñas células o granos densamente empaquetados que se distribuyen por todo el toro longitudinal (Figura 9K). Por otro lado, se observan otras células un poco más grandes (de tamaño medio) (Figura 9K) que se localizan principalmente en las regiones central y dorsomedial del toro. A medida que se avanza hacia niveles medios en el mesencéfalo, parece que estas masas celulares están aún más empaquetadas y que se tiñen más intensamente.

En cuanto a los lóbulos tectales, se observa que la capa más interna posee un gran número de células altamente empaquetadas y muy teñidas en el estrato periventricular. El resto de capas no se diferencian con claridad con esta tinción. Hacia la zona más superficial se observa una capa con abundancia de fibras que podría corresponderse, total o parcialmente, con el estrato marginal. Igualmente esta tinción no nos ha permitido identificar las células piramidales o de tipo I.

Dado que la tinción de Nissl no parece ser suficiente para delimitar de forma clara la estructura laminar típica del techo óptico, decidimos complementar nuestros resultados con una tinción inmunofluorescente dirigida frente a vesículas sinápticas (SV2). Esta técnica es utilizada para la descripción neuroanatómica del encéfalo de la larva (zebrafishbrain.org, University College London). Los resultados obtenidos muestran una amplia distribución de SV2 en el techo óptico del pez cebra (Figura 11D-F), siendo nuevamente difícil delimitar de forma clara el estrato marginal del techo óptico. En lo que se refiere al toro longitudinal, se observa que las zonas de abundantes fibras o neuropilo son inmunoreactivas para SV2 (Figura 11A). La contratación con Sytox Orange permite observar claramente como las regiones de neuropilo se distribuyen entre las células grano.

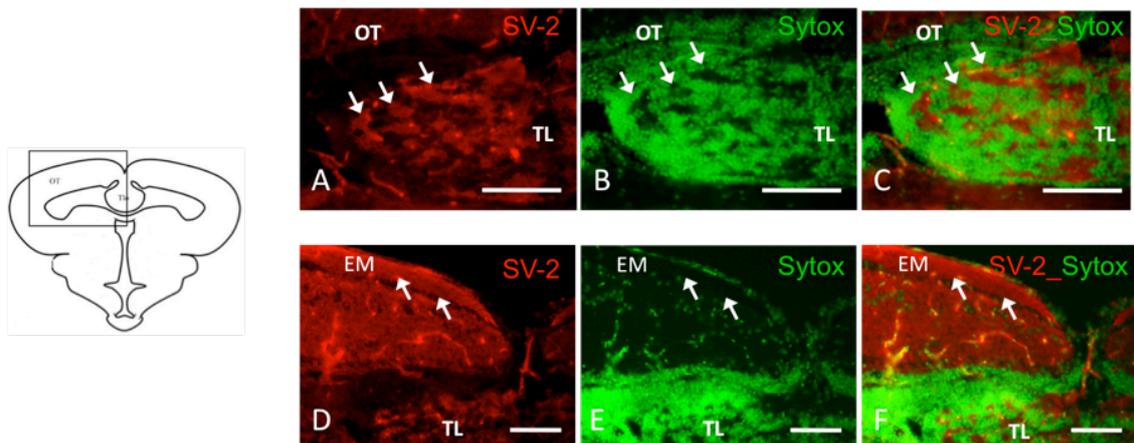


Figura 11: Neuroanatomía general del toro longitudinal (A-C) y techo óptico (D-F). Microfotografías de secciones transversales de encéfalo de pez cebra adulto mostrando inmunoreactividad frente SV2 (A, D) y contratinción con colorante nuclear Sytox Blue (B, D). C-F: doble tinción SV2-Sytox. La zona que se muestra en las imágenes aparece señalada de forma aproximada en el esquema (izquierda). A: Las fibras inmunoreactivas para SV2 aparecen agrupadas formando densos neuropilos (flechas). B: Contratación donde se señala zona de neuropilo no teñida (flechas). C: Las zonas de neuropilo (flechas) se distribuyen entre las células grano. D: La capa de células no inmunoreactivas (flechas) podría marcar el límite inferior del estrato marginal (EM). Abreviaturas: EM, estrato marginal; OT, techo óptico; TL, toro longitudinal. Barra de escala: 50 μ m.

3. Organización anatómica del toro longitudinal en estadios larvarios

En las larvas de 5 dpf, observamos en la zona dorsal del encéfalo, entre los lóbulos tectales, una estructura triangular que identificamos como el toro longitudinal (Figura 12). Se observa que cuenta con dos pequeños neuropilos bilaterales rodeados de cuerpos neuronales. Además, en este estadio ambos lóbulos tectales están muy próximos entre sí y el espacio ventricular es prácticamente inexistente.

Las secciones de larvas de 10 dpf resultaron estar muy rotas, por lo que el mal estado del tejido no permitió extraer ningún tipo de dato sobre la organización del toro longitudinal y estructuras relacionadas.

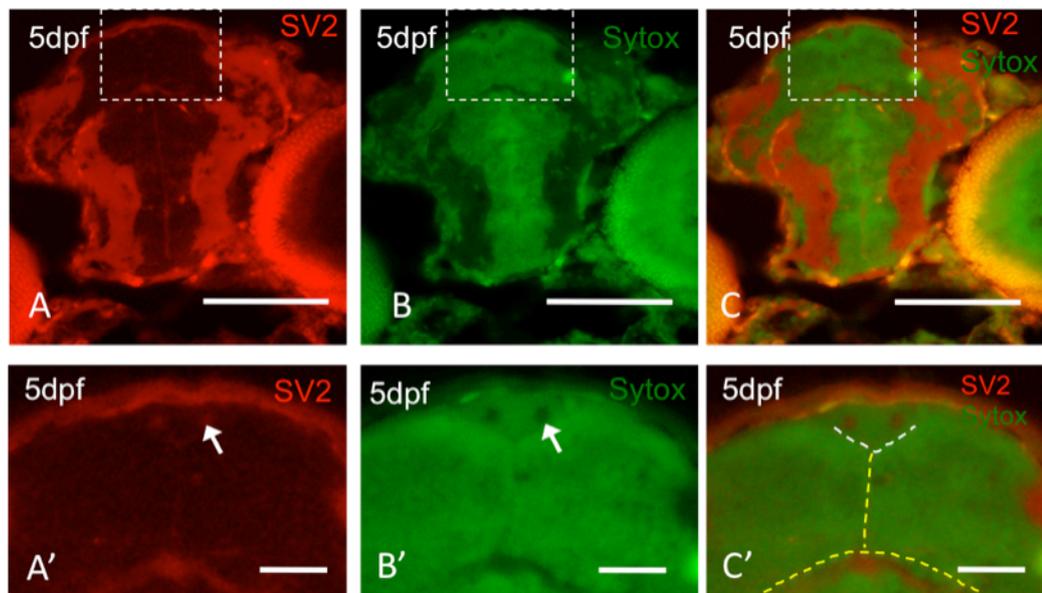


Figura 12: Secciones transversales a nivel del mesencéfalo del embrión del pez cebra a 5 dpf, tras una tinción inmunofluorescente frente a SV2 (A, A') y contrateñidas con Sytox (B, B'). En C-C' se muestra la doble tinción SV2-Sytox. A'-C' son un detalle de la región que se señala en el recuadro de A-C. El toro longitudinal es una estructura triangular (línea blanca en C') mostrando dos pequeños neuropilos bilaterales inmunoreactivos para SV2 (flecha en A') que no se tiñen con el colorante nuclear Sytox (flecha en B'). Las líneas amarillas señalan el ventrículo. Barra de escala: 100 en A-C y 25 μ m en A'-C'.

DISCUSIÓN

Consideraciones metodológicas

Uno de los objetivos de nuestro trabajo era definir la anatomía general del toro longitudinal y estrato marginal, desde una visión estructural general a una descripción anatómica más detallada. Es por esto que decidimos usar una tinción general de tipo Nissl, tiñendo todas las neuronas presentes en el tejido y obteniendo información sobre el tamaño, afinidad tintorial y grado de empaquetamiento de los somas neuronales en las distintas estructuras del sistema nervioso central. A partir de los datos citoarquitectónicos pudimos obtener un atlas citoarquitectónico del toro longitudinal.

Aunque con las tinciones aplicadas podemos tener una visión bastante buena de la anatomía del toro longitudinal y estrato marginal, no podemos delimitar claramente el estrato marginal del techo óptico. Tendríamos que buscar un marcador específico para esa capa en el pez cebra que nos permita delimitarla con más exactitud. En este sentido, Hibi y Shimizu (2012) emplearon una doble tinción con los anticuerpos anti-Parvalbumin7 y anti-Vglut1 en el techo óptico. Paralbumin7 se expresa en las neuronas de tipo I en el estrato fibroso y gris superficial y sus dendritas en el estrato marginal; Vglut1 se detecta en el estrato marginal. En nuestro caso, podríamos utilizar también Vglut1 como marcador para tratar de diferenciar el estrato marginal.

Tamaños celulares en el toro longitudinal del pez cebra: implicaciones

En el pez cebra, hemos observado la presencia de células de pequeño tamaño o células grano que aparecen empaquetadas entre las fibras inmunoreactivas para SV2. Además, detectamos la existencia de células que muestran un tamaño mediano (mayor tamaño que las células grano). Estas células recuerdan a las descritas por Folgueira y colaboradores (2007) en el toro longitudinal de la trucha arcoiris. Mediante distintas técnicas, Folgueira y colaboradores (2007) demostraron la existencia de dos tipos de neuronas: neuronas de tamaño mediano que expresan el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) y pequeñas células granulares GABA-negativas. Las células pequeñas más numerosas y similares a las granulares se distribuían por todo el toro, mientras que las células un poco más grandes se observaron principalmente en las regiones central y dorsal. La tinción de Golgi del TL reveló que las células pequeñas eran esféricas o en forma de pera y presentaban dendritas cortas y finas. Las células más grandes mostraron dendritas más gruesas y un axón corto y profusamente ramificado. Basándonos exclusivamente en tamaños celulares y localización, las células medianas que hemos observado en el pez cebra podrían corresponderse con las descritas en la trucha. En cualquier caso, para poder confirmar esta hipótesis tendríamos que realizar una mayor caracterización morfológica y citoquímica de estas células en el pez cebra. Para ello recurriríamos a una tinción de Golgi y a una inmunocitoquímica con anticuerpos frente GABA (Folgueira *et al.*, 2007).

Anatomía y función del toro longitudinal en el pez cebra y otras especies

Existen en general pocos trabajos en los que se haya estudiado de manera detallada la anatomía del toro longitudinal en peces teleósteos (Northmore, 1985; Folgueira *et al.*, 2007). Ninguno de estos trabajos ha sido realizado en el pez cebra, siendo nuestro estudio el primero en esta especie.

Rupp y colaboradores (1996) realizaron una comparación entre el encéfalo del pez cebra y la carpa dorada (*Carassius auratus*), estando ambas especies filogenéticamente próximas. En este trabajo se identificaron la mayoría de las diferencias a nivel morfológico e histológico en el sistema visual y gustativo. Si bien el pez cebra presenta un sistema gustativo menos especializado que la carpa dorada, el sistema visual parece estar más desarrollado (Rupp *et al.*, 1996). Aunque Rupp y colaboradores (1996) no describen la anatomía del toro longitudinal, podemos realizar ciertas observaciones basadas en la comparación de sus figuras con nuestros resultados. En base a esto, parece que el tamaño absoluto del cerebro del pez cebra es alrededor de tres veces más pequeño que el de la carpa. En cuanto al toro

longitudinal, podemos observar que es claramente más grande en el pez cebra. Teniendo en cuenta que esta especie presenta un sistema visual más amplio que la carpa dorada, podemos presuponer que tiene un papel importante en la percepción visual de esta especie. Sin embargo, los tamaños relativamente diferentes de algunas estructuras del SNC entre las dos especies simplemente podrían reflejar los efectos de la alometría y no tienen por qué ser indicativos de un sistema más o menos especializado.

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos en la trucha arcoiris (Folgueira *et al.*, 2007), vemos que el toro longitudinal presenta bastantes similitudes. En ambos casos se distinguen dos tipos celulares principales, células pequeñas y otras de tamaño mediano. Dado que la trucha arco iris (Salmónidos, *Protacanthopterygii*) está filogenéticamente alejada del pez cebra (Ciprínidos, *Ostariophysean*), la presencia de similitudes parece indicar que el toro longitudinal es una estructura muy conservada. En el trabajo de la trucha arcoiris (Folgueira *et al.*, 2007) se estudiaron también conexiones neuronales, que en nuestro caso no pudimos observar con las técnicas aplicadas. El estudio de las conexiones nos permitiría confirmar el grado de conservación del toro longitudinal a nivel de circuito neuronal.

Desarrollo del toro longitudinal

Hemos observado que partir de 5dpf parece que ya hay un rudimento de toro longitudinal en el pez cebra. Ya hay un pequeño número de neuronas y dos pequeños neuropilos bilaterales. Si bien observaciones preliminares (comunicación personal con Dr. Folgueira) parecían indicar un desarrollo de esta estructura posterior a los 5dpf, nuestros resultados parecen desmentirlo. El estadio larvario en el pez cebra de 5dpf podría ser equivalente a los estadios 31 de la trucha y 40 de medaka (Candal *et al.*, 2005), cuando en estas especies aparece el toro como un engrosamiento del techo óptico.

A partir de 5dpf la larva ya se alimenta por sí sola, por lo que necesita moverse de manera eficiente dentro de la columna de agua. Dado que el toro longitudinal podría estar relacionado con el movimiento dentro de la columna de agua y los movimientos de los ojos (Folgueira *et al.*, 2007; Gibbs y Northmore, 1998, Northmore, 1998), la aparición del toro longitudinal podría tener alguna correlación funcional con el desarrollo de la larva del pez cebra.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del presente trabajo son:

- En el toro longitudinal del pez cebra pudimos diferenciar dos tipos celulares: células grano de pequeño tamaño y células medianas.
- El toro longitudinal ya está presente a los 5dpf, tratándose por tanto una estructura de aparición temprana.

BIBLIOGRAFÍA

- Akimenko MA, Ekker M, Wegner J, Lin W, Westerfield M. 1994. Combinatorial expression of three zebrafish genes related to *distal-less*: part of a homeobox gene code for the head. *J Neurosci* 14:3475-86.
- Badía LM, Ruiz FJE, González AC. 2009. Capítulo 5. Técnicas inmunohistoquímicas (pp 119-148). En: *Técnicas en histología y biología celular*. Elsevier Masson, Barcelona, España.
- Bae YK, Kani S, Shimizu T, Tanabe K, Nojima H, Kimura Y, Higashijima S, Hibi M. 2009. Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Dev Biol* 330:406-26.
- Barman JP. 1991. A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton Buchanan (Pisces, *Cyprinidae*). *Rec Zool Surv India Occas Pap* 137:1-91.
- Bartheld CS von, Meyer DL, Fiebig E, Ebbesson SO. Central connections of the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res* 238:475-87.
- Bell CC. 2002. Evolution of cerebellum-like structures. *Brain Behav Evol* 59:312-26.
- Bell CC, Han V, Sawtell NB. 2008. Cerebellum-like structures and their implications for cerebellar function. *Annu Rev Neurosci* 31:1-24.
- Bernhardt RR, Chitnis AB, Lindamer L, Kuwada JY. 1990. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 302:603-16.
- Calvert GA, Spence C, Stein BE. 2004. *The Handbook of Multisensory Processes*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Candal E, Anadón R, Bourrat F, Rodríguez-Moldes I. 2005. Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): a segmental approach. *Brain Res Dev Brain Res* 160:157-75.
- Catois E. 1901. *Recherches sur l'histologie et l'anatomie microscopique de l'encéphale chez les poissons*. Doctoral Thesis. Faculté des Sciences de Paris. Lille: Imprimeria L. Danel.
- Chitnis AB, Kuwada JY. 1990. Axonogenesis in the brain of zebrafish embryos. *J Neurosci* 10:1892-905.
- Dean P, Redgrave P, Westby GW. 1989. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci* 12:137-47.
- Eisen JS, Myers PZ, Westerfield M. 1986. Pathway selection by growth cones of identified motoneurons in live zebra fish embryos. *Nature* 320:269-71.
- Ekker M, Wegner J, Akimenko MA, Westerfield M. 1992. Coordinate embryonic expression of three zebrafish *engrailed* genes. *Development* 116:1001-10.
- Folgueira M, Sueiro C, Rodríguez-Moldes I, Yáñez J, Anadón R. 2007. Organization of the torus longitudinalis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an immunohistochemical study of the GABAergic system and a Dil tract-tracing study. *J Comp Neurol* 503: 348-70.
- Hanneman E, Trevarrow B, Metcalfe WK, Kimmel CB, Westerfield M. 1988. Segmental pattern of development of the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. *Development* 103:49-58.
- Hanneman E, Westerfield M. 1989. Early expression of acetylcholinesterase activity in functionally distinct neurons of the zebrafish. *J Comp Neurol* 284:350-61.
- Hatta K, Bremiller R, Westerfield M, Kimmel CB. 1991. Diversity of expression of *engrailed*-like antigens in zebrafish. *Development* 112:821-32.
- Hibi M, Shimizu T. 2012. Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol* 72:282-301.
- Ito H, Yamamoto N, Yoshimoto M, Sawai N, Yang CY, Xue HG, Imura K. 2003. Fiber connections of the torus longitudinalis in a teleost: *Cyprinus carpio* re-examined. *J Comp Neurol* 457:202-11.
- Kanwal JS, Finger TE. 1992. Central representation and projections of gustatory systems. In: Hara TJ (ed) *Fish chemoreception*. Chapman & Hall, London, pp 79-102.
- Karlstrom R, Trowe T, Baier H, Klostermann S, Bonhoeffer F. 1995. Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Soc Neurosci Abstr* 21:1511.
- Kimmel CB. 1993. Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annu Rev Neurosci* 16:707-32.
- Kinoshita M, Ito E. 2006. Roles of periventricular neurons in retinotectal transmission in the optic tectum. *Prog Neurobiol* 79:112-21.
- Krauss S, Johansen T, Korzh V, Fjose A. 1991. Expression pattern of zebrafish *pax* genes suggests a role in early brain regionalization. *Nature* 353:267-70.

- Kuwada JY, Bernhardt RR, Nguyen N. 1990. Development of spinal neurons and tracts in the zebrafish embryo. *J Comp Neurol* 302:617-28.
- Lauder GV, Liem KF. 1983. The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull Mus Comp Zool* 150:95-197.
- Levine RL, Dethier S. 1985. The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* 237:427-44.
- McCormick CA, Braford MR Jr. 1994. Organization of inner ear endorgan projections in the goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Behav Evol* 43:189-205.
- Meek J, Schellart NAM. 1978. A Golgi study of the goldfish optic tectum. *J Comp Neurol* 182:89-122.
- Meek J. 1983. Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. *Brain Res* 287:247-97.
- Mendelson B. 1986. Development of reticulospinal neurons of the zebrafish. II. Early axonal outgrowth and cell body position. *J Comp Neurol* 251:172-84.
- Metcalfe WK, Mendelson B, Kimmel CB. 1986. Segmental homologies among reticulospinal neurons in the hindbrain of the zebrafish larva. *J Comp Neurol* 251:147-59.
- Molven A, Njolstad PR, Fjose A. 1991. Genomic structure and restricted neural expression of the zebrafish *wnt-1 (int-1)* gene. *EMBO J* 10:799-807.
- Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. 1993. Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* 3:648-54.
- Myers PZ. 1985. Spinal motoneurons of the larval zebrafish. *J Comp Neurol* 236:555-61.
- Nevin LM, Taylor MR, Baier H. 2008 Hardwiring of fine synaptic layers in the zebrafish visual pathway. *Neural Dev.* 3:36.
- Njolstad PR, Molven A, Apold J, Fjose A. 1990. The zebrafish homeobox gene *hox-2.2*: transcription unit, potential regulatory regions and in situ localization of transcripts. *EMBO J* 9:515-24.
- Northcutt RG, Wullimann MF. 1988. The visual system in teleost fishes: morphological patterns and trends. In: Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavolga wn (eds) *Sensory biology of aquatic animals*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp515-552.
- Northmore DP. 1985. The optic tectum. Department of Psychology, University of Delaware.
- Northmore DP. 1984. Visual and saccadic activity in the goldfish torus longitudinalis. *J Comp Physiol* 155:333-340.
- Northmore DP, Oh DJ. 1998. Axonal conduction velocities of functionally characterized retinal ganglion cells in goldfish. *J Physiol* 506:207-17. Cuál es de 1998. Hay varios.
- Northmore DP, Gibbs MA. 1998. Spectral sensitivity of the goldfish Torus longitudinalis. *Vis Neurosci* 15:859-65.
- Oxtoby E, Jowett T. 1993. Cloning of the zebrafish *krox-20* gene (*krx-20*) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res* 21:1087-95.
- Portugues R, Engert F. 2009. The neural basis of visual behaviors in the larval zebrafish. *Curr Opin Neurobiol*:644-7.
- Puzdrowski RL. 1987. The peripheral distribution and central projections of the sensory rami of the facial nerve in goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 259:382-92.
- Puzdrowski RL. 1988. Afferent projections of the trigeminal nerve in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Morphol* 198:131-47.
- Puzdrowski RL. 1989. Peripheral distribution and central projections of the lateral-line nerves in goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Behav Evol* 34:110-31.
- Ramón P. 1899. El lóbulo óptico de los peces. *Rev Trimestral Micrográf* 4:87-107.
- Ross LS, Parrett T, Easter SS Jr. 1992. Axonogenesis and morphogenesis in the embryonic zebrafish brain. *J Neurosci* 12:467-82.
- Rupp B, Wullimann MF, Reichert H. 1996. The zebrafish brain: a neuroanatomical comparison with the goldfish. *Anat Embryol* 194:187-203.
- Sala L. 1985. Sulla fina struttura del torus longitudinalis nel cervello dei Teleostei. *Boll Soc Medico-chirurgica Pavia*. Cited in Catois (1901).
- Sawtell NB, Bell CC. 2008. Adaptive processing in electrosensory systems: links to cerebellar plasticity and learning. *J Physiol Paris* 102:223-32.
- Scott EK, Baier H. 2009 The cellular architecture of the larval zebrafish tectum, as revealed by gal4 enhancer trap lines. *Front Neural Circuits*. 3:13.

- Solnica-Krezel L, Schier AF, Driever W. 1994. Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* 136:1401-20.
- Vanegas H, Laufer M, Amat J. 1974. The optic tectum of a perciform teleost. I. General configuration and cytoarchitecture. *J Comp Neurol* 154:43-60.
- Vanegas H, Ebbesson SOE, Laufer M. 1984a. Morphological aspects of the teleostean optic tectum. In: Vanegas H, editor. *Comparative neurology of the optic tectum*. New York: Plenum Press. p 39-120.
- Westerfield M. 1993. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of the zebrafish (Brachydanio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene.
- Wilson SW, Ross LS, Parrett T, Easter SS Jr. 1990. The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Development* 108(1):121-45.
- Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. 1996a. *Neuroanatomy of the zebrafish brain: A Topological Atlas*. Birkhäuser Verlag, Boston, Mass.
- Rupp B, Wullimann MF, Reichert H. 1996. The zebrafish brain: a neuroanatomical comparison with the goldfish. *Anat Embryol* 194:187-203.
- Xue HG, Yamamoto N, Yang CY, Kerem G, Yoshimoto M, Imura K, Ito H. 2003. Fiber connections of the torus longitudinalis and optic tectum in holocentrid teleosts. *J Comp Neurol* 462:194-212.