



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Estudio experimental de las conexiones neuronales del sistema gustativo en el pez cebra (*Danio rerio*).

Estudo experimental das conexións neuronais do sistema gustativo no peixe cebra (*Danio rerio*).

Experimental study of the connections of the gustatory system in the zebra fish (*Danio rerio*).

Autor: Yara Souto Becerra
Director: Julián Yáñez Sánchez

Trabajo de Fin de Grado 2013-2014

INDICE

Resumen	2
Introducción	2
Objetivos	4
Antecedentes	4
Material y métodos	7
Resultados	9
Discusión	25
Conclusiones	29
Agradecimientos	29
Bibliografía	30
Anexo	32

RESUMEN

En el presente trabajo se pretende esclarecer cuáles son las conexiones principales del sistema gustativo en el pez cebra, *Danio rerio*. Para ello, se utilizó una técnica experimental basada en el marcaje con fluorocromos liposolubles como son las carbocianinas, identificando, así, los centros primarios, secundarios y terciarios de integración gustativa. La información gustativa entra en el encéfalo a través de los nervios VII, IX y X hacia los centros gustativos primarios (lóbulo VII y IX-X), estando algo más desarrollados en *Danio* que en otros teleósteos. Dicha información viaja, así, desde estos centros rostralmente por el SGT hasta alcanzar el SGVN, que, a su vez, posee conexiones recíprocas con centros hipotalámicos como son Tla, DIL y P. Además, también se han visto conexiones con PGI. Por otra parte, caudalmente la información gustativa viaja por el mismo SGT alcanzando el NC rombencefálico, siendo éste un centro de integración de información visceral y gustativa.

INTRODUCCIÓN

Danio rerio es una especie de pez teleósteo perteneciente a la clase Actinopterygii, orden Cypriniforme, familia Cyprinidae, caracterizado por su pequeño tamaño (5 cm como talla máxima) y su forma fusiforme. Además, posee un patrón de bandeo lateral que recuerda a las cebras, animal que le da nombre, y presenta un marcado dimorfismo sexual (las hembras tienen un fondo plateado, mientras que los machos, más pequeños, adquieren tonalidades doradas).

Esta especie es muy importante en investigación, llegando a considerarse como especie modelo junto con otras más clásicas como *Drosophila melanogaster*, o *Caenorhabditis elegans*. Su importancia radica en su pequeño tamaño y su corto ciclo de vida, lo que hace que sea muy fácil su manipulación y obtención de nuevas generaciones (importante para los estudios genéticos de mutaciones), lo que abarata mucho los costes. Además, en estado larvario es transparente, facilitando así los estudios en el campo de la biología del desarrollo. En la actualidad, se utiliza para llevar a cabo estudios referentes a oncogénesis, mutación, regeneración y secuenciación de su genoma (relevante por el hecho de compartir hasta el 80% del mismo con el hombre).

En cuanto a nuestra investigación, *Danio rerio* es un ejemplar idóneo para llevar a cabo la parte experimental, debido, principalmente, al gran desconocimiento de estas conexiones neuronales y al gran impacto que tendría en la ciencia. Sin embargo, también es interesante el empleo del pez cebra debido a su gran proximidad y similitud con otros vertebrados, de modo que la comprensión de la integración de esta información gustativa en *Danio rerio*, permitiría poder comprender mejor la evolución de los mecanismos en especies mucho más próximas e, incluso, en la nuestra propia.

El principal método de estudio de las conexiones neuronales se basa en la utilización de colorantes fluorescentes. Estas sustancias pueden ser fluorocromos de unión a anticuerpos que, al someterlos bajo determinada longitud de onda, emiten una fluorescencia de color que dan contraste a la imagen observada al microscopio. Este tipo de marcaje se basa en la unión de dicho fluorocromo a un anticuerpo característico que, al aplicarlo sobre el individuo, se une con una proteína específica. Así se obtiene una fluorescencia que puede ser observada con el microscopio de fluorescencia.

El método de tinción utilizado en nuestra investigación es mediante el uso de moléculas fluorescentes liposolubles que se introducen en las células neuronales integrándose en la membrana citoplasmática. De este modo, el fluorocromo se va transmitiendo por los axones de las neuronas por difusión lateral, desvelando los diferentes tractos y centros de integración en el encéfalo. Tras la aplicación del trazador y un período de incubación prudencial, el encéfalo es cortado en finas láminas que se colocan sobre un portaobjetos, elaborando de forma correcta las preparaciones para observarlas en el microscopio de fluorescencia. En nuestro trabajo, los colorantes utilizados han sido pequeños cristales de DiI y DiO.

El sistema nervioso central de los vertebrados se origina a partir de tres vesículas primarias, que son: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. A partir del prosencéfalo se van a originar dos grandes estructuras: el prosencéfalo secundario, que da lugar a los hemisferios cerebrales, y el diencéfalo, dividido en pretálamo, tálamo, y pretecho. El mesencéfalo, a su vez, da lugar al techo óptico, mientras que el rombencéfalo se diferencia en cerebelo y bulbo raquídeo. En cuanto a los peces teleósteos adultos, el prosencéfalo secundario (clásicamente denominado telencéfalo) se puede dividir en dos regiones principales: la región dorsal, homóloga al palio de vertebrados terrestres, y la región ventral, homóloga al subpalio (Folgueira *et al.*, 2004).

En *Danio rerio* se puede observar una estructura encefálica en la que destaca, en comparación con otros vertebrados, la hipertrofia de los lóbulos nerviosos del par craneal VII (facial) y IX-X (glosofaríngeo-vagal). El gran desarrollo de estas regiones se relaciona con la integración de las mismas en sus diferentes funciones, de forma que los sistemas quimiosensoriales se ven altamente especializados. Dichos sistemas son los encargados de percibir e integrar información química del medio, función que corresponde a los sistemas gustativo y olfativo. Se sabe, además, que ambos sistemas son capaces de responder a los mismos estímulos químicos, como los aminoácidos (Kanwal y Finger, 1992)

A diferencia del resto de tetrápodos, los peces utilizan este sistema para localizar fuentes químicas en el medio ambiente (Kanwal y Finger, 1992), y, en cuanto a su desarrollo, se sabe que *Danio rerio* ya se distingue de otros peces teleósteos en sus papilas gustativas. Mientras la mayoría de peces posee tan solo dos tipos de papilas (claras, con una única microvellosidad larga; y oscuras, con numerosas microvellosidades cortas), en el pez cebra aparece un tercer tipo: la papila clara con un extremo apical en cepillo. Estas papilas se localizan en los labios, la boca, la cavidad orofaríngea, en los dos pares de barbas, y en las superficies ventral y dorsal de la cabeza. Las primeras en aparecer se localizan en los labios y en los arcos branquiales, mientras que, posteriormente, aparecen en la cavidad orofaríngea y en la boca.

Las papilas se desarrollan a partir de células primordiales, que se encuentran recubiertas de células epiteliales. Así, las primeras en formarse son las papilas oscuras. Cuando éstas ya están formadas, las células claras comienzan a extender su microvellosidad, y, finalmente, en el caso de *Danio rerio*, una vez formados los dos tipos de papilas generales, comienzan a desarrollarse las papilas en cepillo. En el estado de adulto, el pez cebra tiene una proporción de papilas oscuras, claras, y claras en cepillo de 6:3:1 (Hansen *et al.*, 2002).

En referencia a las conexiones neuronales, se sabe que dicho sistema consta de tres centros principales de integración informativa: los centros primarios (formados por los lóbulos VII y X, localizados en la región rombencefálica, y a los que llega información procedente de los correspondientes nervios craneales), los centros secundarios (representado en el istmo por los núcleos gustatorios secundarios (SGN) conectados

mediante una comisura medial (Cgus), y el núcleo visceral secundario (SVN)), y uno o varios centros de integración gustativa terciarios en la región diencefálica. Las diferentes conexiones entre los diversos núcleos, así como la comparación entre el sistema gustativo de *Danio rerio* y otros vertebrados, se tratan en los siguientes apartados de este trabajo.

OBJETIVOS

1. Identificar los principales centros (primarios, secundarios y terciarios) de integración de la información gustativa y visceral mediante el marcaje con neurotrazadores de los lóbulos facial y vagal, y el núcleo gustatorio secundario de *Danio rerio*.
2. Determinar las proyecciones aferentes y eferentes de dichos centros de integración.
3. Comparar los resultados obtenidos en *Danio rerio* con otros correspondientes a especies próximas.

ANTECEDENTES

El sistema gustativo de los peces es sensible a larga distancia, siendo capaz de detectar moléculas solubles que se encuentran en el agua y siéndoles útil tanto para la orientación como para la detección de una fuente de alimento. Además, tanto el sistema gustativo como el olfativo perciben las mismas moléculas químicas disueltas en el agua, produciéndose cierto solapamiento de integración olfativa y gustativa.

En estos peces, el tamaño relativo y la complejidad de los núcleos de procesamiento es variable según la especie. Así, en algunos, como el carpín dorado (*Carassius auratus*), la cavidad oral puede ser dividida en dos regiones: la región anterior y la región posterior. La región oral anterior está formada por un duro paladar superior que forma el techo, y un suelo, que, junto con los labios, actúan como vía de paso de la materia hacia la región posterior. Ésta última, sin embargo, cuenta con el órgano palatal muscular conectado con la parte superior de la boca. Su función principal es la de atrapar las partículas alimentarias contra los arcos branquiales, permitiendo la expulsión de la materia inorgánica (Finger, 2009). Además, en algunos ciprínidos existe también un órgano vomero-palatar localizado en una depresión situada en la bucofaringe, y que es innervado por los nervios VII, IX y X. Dicho órgano está formado por una serie de láminas, presentes en un número muy variable según la especie, y que posee gran cantidad de células mucosas y escasas papilas gustativas, además de algunas fibras musculares en la capa submucosa. La principal función de dicho órgano es la de la formación del bolo alimenticio, permitiendo la mezcla del líquido mucoso con el alimento. Sin embargo, existen otras hipótesis que sugieren que podría tener una función respiratoria e incluso sensorial (Reid, 1982).

Sin embargo, peces como el estudiado en este trabajo, *Danio rerio*, carecen de órgano palatal. Así, estos peces cuentan con una cavidad oral dividida en tres regiones bien diferenciadas: una región externa, una intermedia, y otra interna. La región externa corresponde con los labios, de los cuales, el ventral es mayor que el dorsal. Además, en el límite entre la cara interna del labio inferior y la superficie de contacto existe un tubérculo que penetra en la zona intermedia. La región intermedia está formada por dos valvas en forma de semiluna, de las cuales, la superior es de mayor tamaño que la inferior. Su principal función es la de controlar el flujo de agua durante la respiración. Por último, la región interna se puede dividir en dos paredes: la pared superior, formada por dos segmentos (el rostral con unas crestas paralelas al límite posterior de la valva superior, y el caudal con crestas longitudinales más prominentes), y la pared inferior,

con una protuberancia central cilíndrica, la lengua (el resto de la pared inferior contiene crestas transversales y estructuras en forma de copa) (Abbate *et al.*, 2006).

En cuanto al epitelio que recubre la cavidad oral, se sabe que la parte externa está recubierta con numerosos melanocitos, células mucosas y papilas gustativas, mientras que las regiones intermedia e interna no presentan muchas diferencias, conteniendo microvellosidades entre las células epiteliales, además de células mucosas y papilas gustativas (de los tres tipos anteriormente descritos (Abbate *et al.*, 2006)).

El sistema gustativo se encuentra inervado por tres nervios principales, localizados en la región rombencefálica: el nervio facial (VII), el glossofaríngeo (IX), y el vagal (X). De este modo, los núcleos rombencefálicos se pueden dividir en dos grandes tipos: los núcleos visceromotores, y los núcleos viscerosensoriales. Así, se sabe que el nervio facial transmite información procedente de la superficie extraoral, inervando las barbas en carpas y los labios superiores e inferiores en *Carassius*; el glossofaríngeo, con información procedente de la región anterior de la cavidad oral; y el vagal, con información de la orofaringe, inervando los músculos del órgano palatal. (Kanwal y Finger, 1992).

Estos nervios, al entrar en el encéfalo, forman terminaciones en distintas regiones localizadas a lo largo del rombencéfalo. De este modo, se sabe que el patrón ancestral de conexiones consistía en una única columna sensorial visceral, cuya región más rostral se encontraba inervada por el nervio facial, mientras que la región medial era inervada por el nervio glossofaríngeo, y la más caudal, por el nervio vago. Esta región vagal de la columna no era puramente gustativa, sino que, además, también recibía información visceral (Kanwal y Finger, 1992).

A lo largo de la evolución, diversos grupos de peces han desarrollado su sistema gustativo de diferente forma. Así, los ictalúridos han sufrido una gran hipertrofia del lóbulo facial, desarrollando su sistema extraoral, importante en los procesos de localización de comida. En ellos, dicho lóbulo consiste en una masa doble de células pequeñas, medias y grandes fusionada en la línea media, y sin una organización laminar aparente. Aquí, cada nervio facial proyecta casi de forma exclusiva al lóbulo ipsilateral, aunque también hay pequeñas proyecciones contralaterales y hacia los lóbulos glossofaríngeo y vagal (en ciprínidos, este lóbulo envía proyecciones ascendentes hacia el núcleo gustatorio secundario del istmo, a través de los tractos gustatorios secundarios). Mientras tanto, los ciprínidos han sufrido una gran hipertrofia de los lóbulos vagales, lo que conllevó al desarrollo del sistema intraoral, importante en procesos de selección del alimento (en estos teleosteos, la localización de los alimentos se realiza de un modo visual (y gracias al sistema de la línea lateral), no tanto de modo quimiosensorial) (Kanwal y Finger, 1992). De este modo se sabe que el principal aferente del lóbulo vagal es el nervio vago, aunque también recibe información procedente del núcleo posterior talámico, el núcleo difuso, techo óptico, núcleo motor trigémino, la formación reticular del rombencéfalo y la región superior de la espina dorsal. Dicho lóbulo puede dividirse en dos regiones bien diferenciadas: el núcleo primario sensorial, homólogo al núcleo del tracto solitario de otros vertebrados; y una región de motoneuronas, derivadas del núcleo ambiguo, y que inerva la musculatura de los arcos branquiales (Finger, 2008). A su vez, dicho lóbulo contiene tres láminas principales: una lámina sensorial externa, que consta de dos capas (una de neuronas y otra de neuropilos); una lámina central fibrosa, que recibe la información procedente del nervio vago; y una lámina de motoneuronas profunda, que envía axones hacia la rama motora del nervio vago involucrada en los actos reflejos (Finger, 2008). Al mismo tiempo, proyecciones de estos lóbulos se

dirigen hacia la musculatura del órgano palatal, mientras que otras lo hacen hacia la región ipsilateral del núcleo gustatorio secundario. El lóbulo glossofaríngeo se encuentra localizado en la zona de fusión de los lóbulos facial y vagal, conteniendo neuronas orientadas de manera transversal y longitudinal. Las proyecciones eferentes de dicho lóbulo son muy similares a las descritas para el lóbulo facial en ciprínidos.

El principal núcleo viscerosensorial caudal es el núcleo comisural de Cajal (NC), que cuenta con gran cantidad de proyecciones ipsilaterales, y algunas contralaterales. En ciprínidos, dicho núcleo puede dividirse en una región medial, que recibe información de la raíz celómica del nervio vago, y en una región lateral. Dicho núcleo, además, recibe información de los lóbulos gustatorios y de la formación reticular, mientras que proyecta fibras hacia un núcleo visceral secundario, localizado junto al núcleo gustatorio secundario (Wullimann, 1998).

En peces teleósteos parece existir un patrón topográfico de conexiones primarias en los centros secundarios. Así, las regiones medial, intermedia y lateral del SGN son inervadas por fibras procedentes de los lóbulos facial, glossofaríngeo y vagal, respectivamente (Kato *et al.*, 2012). El SGN, a su vez, tiene proyecciones terciarias con diferentes regiones diencefálicas. Algunas de las fibras procedentes del SGN ascienden hacia la región diencefálica medial, terminando en el núcleo talámico lateral (nLT, con conexiones recíprocas), mientras que otras, descienden hacia el núcleo difuso del lóbulo inferior (DIL) (Kanwal y Finger, 1992). Todas estas conexiones son ipsilaterales. Además, en algunas especies se ha observado que parte de las fibras procedentes del SGN penetran en el núcleo gustatorio terciario (pTGN), además de en el lóbulo inferior hipotalámico (IL). Este pTGN es distinto en ciprínidos y silúridos: los ciprínidos poseen un único pTGN, denominado erróneamente como núcleo glomeruloso (NG), además del toro lateral –que va a recibir proyecciones procedentes de la parte lateral del SGN–, mientras que los silúridos poseen dos pTGN (núcleo del tálamo lateral y el núcleo lobobulbar), (Wullimann, 1998). Además, en algunas especies de teleósteos se han observado conexiones entre el pTGN y algunas regiones del telencéfalo, como serían las conexiones hacia las regiones medial (Dm) y central (Dc) en ictalúridos (Kato *et al.*, 2012).

Así mismo, existen también conexiones recíprocas entre los centros terciarios y los primarios (lóbulos nerviosos). En *Carassius* se ha descrito que el núcleo talámico posterior (P) está conectado recíprocamente con el lóbulo inferior y el toro lateral, mientras que en silúridos existen conexiones directas entre los centros terciarios hacia el telencéfalo. Además, en este último grupo de peces, existen conexiones recíprocas entre ambos pTGN (núcleo del tálamo lateral y núcleo lobobulbar) (Wullimann, 1998).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo esta investigación, se han empleado 10 ejemplares adultos de pez cebra (*Danio rerio*), de entre 4.5 y 5 cm de longitud estándar, obtenidos comercialmente de proveedores. Estos peces fueron anestesiados con metano de triclaína 0.1% (MS-222, Sigma, St. Louis, MO) y perfundidos intracardialmente con solución fijadora fría en un tampón fosfato 0.1M a pH 7.4 (PB), colocándolos sobre una placa de Petri con un polímero sólido transparente (elastómero de silicona, SYLGARD®). Los encéfalos fueron extraídos cuidadosamente del cráneo y conservados en el fijador de paraformaldehído a 4°C en la nevera.

Dos técnicas de marcaje con DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato; DiIC18(3), Molecular Probes-INVITROGEN) y DiO (3,3'-dioctadeciloxacarbocianina perclorato; DiOC18(3)) se han realizado. Para poder realizar el marcaje de regiones superficiales del encéfalo, se han empleado dos modalidades distintas:

1. Para realizar marcajes manuales *in toto*, se ha colocado un pequeño cristal del trazador sobre la punta de una aguja entomológica, aplicando la carbocianina sobre el área de interés (Figura 1B).
2. Para realizar marcajes *in toto* con ayuda de un micromanipulador (Narishige, Japón) se ha procedido como sigue: en primer lugar se disolvió DiI en una gota de DMSO (dimetil sulfóxido, Merck) sobre una lámina de Parafilm, luego se incorporó la concentración saturada de DiI en una micropipeta de vidrio por capilaridad, dejándolo secar y quedando, así, los cristales adheridos a la superficie externa de la micropipeta y en el interior. Por último, se colocó la punta de dicha micropipeta sobre la región de interés, permitiendo que el trazador difundiese en el tejido.

Sin embargo, para poder marcar zonas menos accesibles, se ha introducido previamente el encéfalo en un bloque de agarosa al 3% en PB y se ha seccionado con un Vibratomo hasta la zona de interés. Para poder localizar la zona exacta de marcaje, se ha teñido algún corte con azul de metileno al 0.1%, se ha lavado con PB, y se ha observado con el microscopio. Una vez que se ha localizado, se procede como en la técnica anterior (Figura 1A).

Una vez realizados los marcajes, se han cubierto con agarosa fundida para evitar la dispersión de los microcristales de DiI/DiO, y se han incubado a 37°C en paraformaldehído al 4% durante tiempos variables, mostrados en la **tabla 1**.

Una vez que el transporte del marcador liposoluble ha finalizado, se ha extraído el encéfalo del fijador y se ha introducido en un bloque de agarosa al 3%. A continuación, se ha laminado con el Vibratomo, realizando secciones transversales de entre 70 y 90 µm de espesor que se han ordenado sobre un portaobjetos gelatinizado (opcional) y se han montado con un cubreobjetos en una gota de glicerina-PB 0,2M (1:1) para evitar su deshidratación.

Todas las secciones han sido observadas con un microscopio de fluorescencia Nikon, empleando los siguientes filtros:

1. Texas-Red para los marcajes con DiI: con un rango de excitación entre 562 y 640nm y de emisión de entre 624 y 640nm. Cabe destacar que el máximo de emisión del DiI es de 549nm, y el de emisión, de 565nm, encontrándose este filtro ligeramente desplazado en el espectro.

2. FITC para los marcajes con DiO: con un rango de excitación entre 482 y 535nm y de emisión de entre 536 y 540nm. Cabe destacar que el máximo de excitación del DiO es de 484nm, y el de emisión, de 501nm, siendo este filtro el idóneo para la visualización de los resultados.
3. GFP-DSRed para los marcajes con DiI y DiO: con unos rangos de excitación comprendidos entre los 450-490nm y los 540-570nm y de emisión de entre 500-530nm y 570-680nm.

También se han tomado imágenes digitales de las secciones transversales con una cámara digital Olympus DPX-100. Las imágenes seleccionadas fueron procesadas, montadas y rotuladas con ayuda del programa informático COREL Suite®.

EJEMPLAR	MARCAJE	TIEMPOS DE INCUBACIÓN
Zb1	LX	13 días
Zb2	LVII	13 días
Zb3	SGN hacia caudal	6 días
Zb4	SGN hacia rostral	6 días
Zb7	NC	10 días
Zb8	PGI	14 días
Zb9	PGI	17 días
Zb11	SGN hacia rostral	3 días
Zb12	nVII y nX	3 días
Zb13	SGT rostral (DiI) y SGT caudal (DiO)	6 días
Zb14	SGT rostral	5 días
Zb15	SGT caudal (hacia NC)	½ día

Tabla 1. Número de ejemplares utilizados, regiones marcadas, y tiempos de transporte.

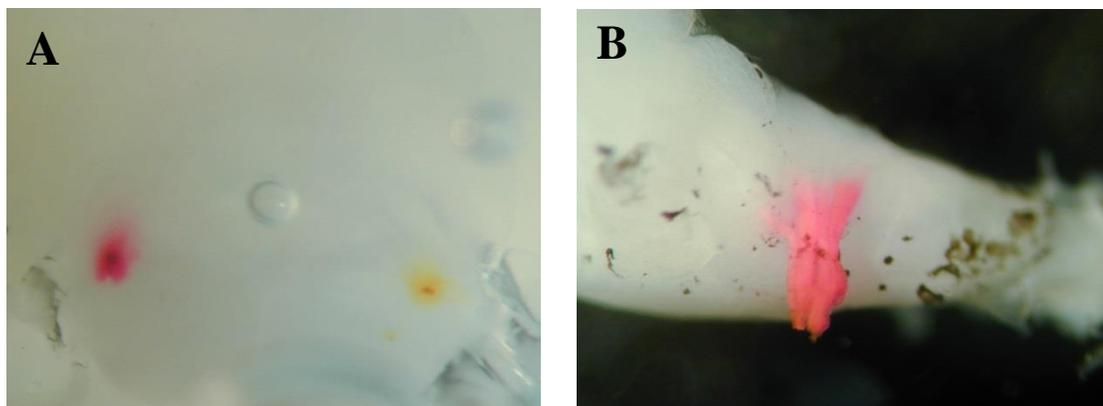


Figura 1. Ejemplo de marcaje. En la figura A se muestra un doble marcaje de SGT con DiI (izquierda) y DiO (derecha) en un encéfalo incluido previamente en un bloque de agarosa; en la figura B se muestra el marcaje realizado con DiI (área roja) en el nervio vago de un encéfalo extraído del cráneo. Ambas fotografías han sido sacadas con una cámara digital (Coolpix950, Nikon) adaptada al estereomicroscopio.

RESULTADOS

1. Nervio X

Al aplicar la carbocianina en el nervio vago (Figura 3A), se han observado al nivel de su entrada, dos raíces principales (Figura 3B): una raíz dorsal, que se dirige hacia el lóbulo del vago, que lleva información sensitiva procedente de diferentes partes del cuerpo hacia el lóbulo (centro primario, integrador de información sensitiva), y otra raíz más medial, con información motora procedente del núcleo motor vagal (nXm), donde se han podido observar células (Figura 2A; Figura 3C). Este núcleo motor, a su vez, puede subdividirse en dos áreas diferenciadas, cuyas funciones todavía no están esclarecidas.

Por otra parte, el lóbulo del VII apareció libre de marcaje (sin fibrillas que penetren en él).

En la región del óbex, pudimos observar el núcleo comisural de Cajal (NC) marcado, además del área postrema, separada del NC por Cinf y rica en vasos sanguíneos (Figura 2B; Figura 3D).

Todas las conexiones aquí observadas han sido ipsilaterales.

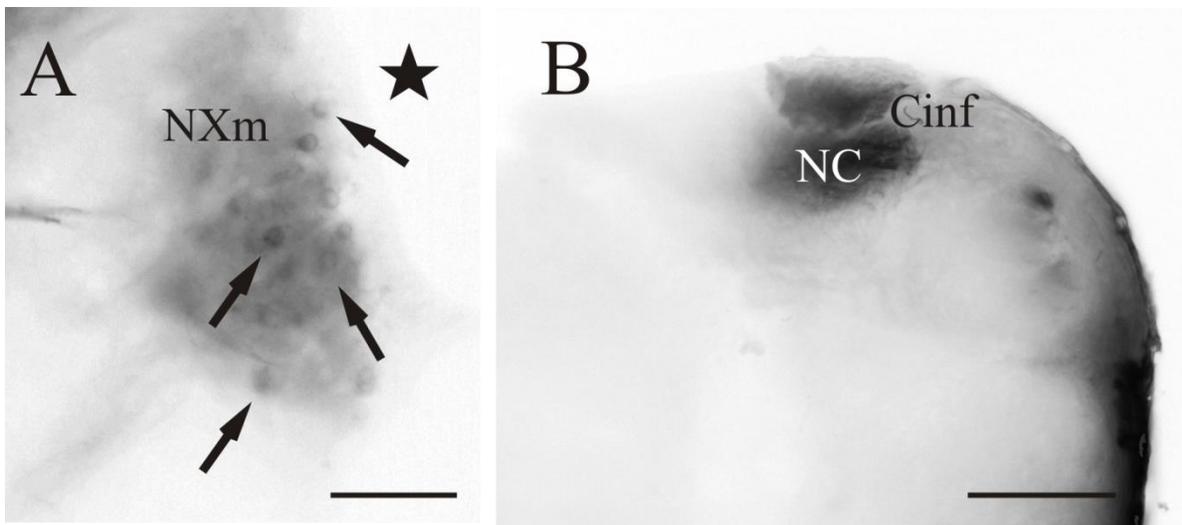


Figura 2. Fotomicrografías de las secciones transversales del encéfalo de *D. rerio* donde se observan células (flechas) y fibras marcadas tras la aplicación de DiI en el nervio vago. En la figura A se muestra un detalle de las células presentes en el núcleo motor del vago (nXm) (el asterisco indica la localización del ventrículo rombencefálico, RV); en la figura B se observan las prolongaciones axónicas presentes en el núcleo comisural de Cajal (NC), separadas del área postrema por la comisura ínfima de Haller (Cinf). Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 50µm (A), 200µm (B).

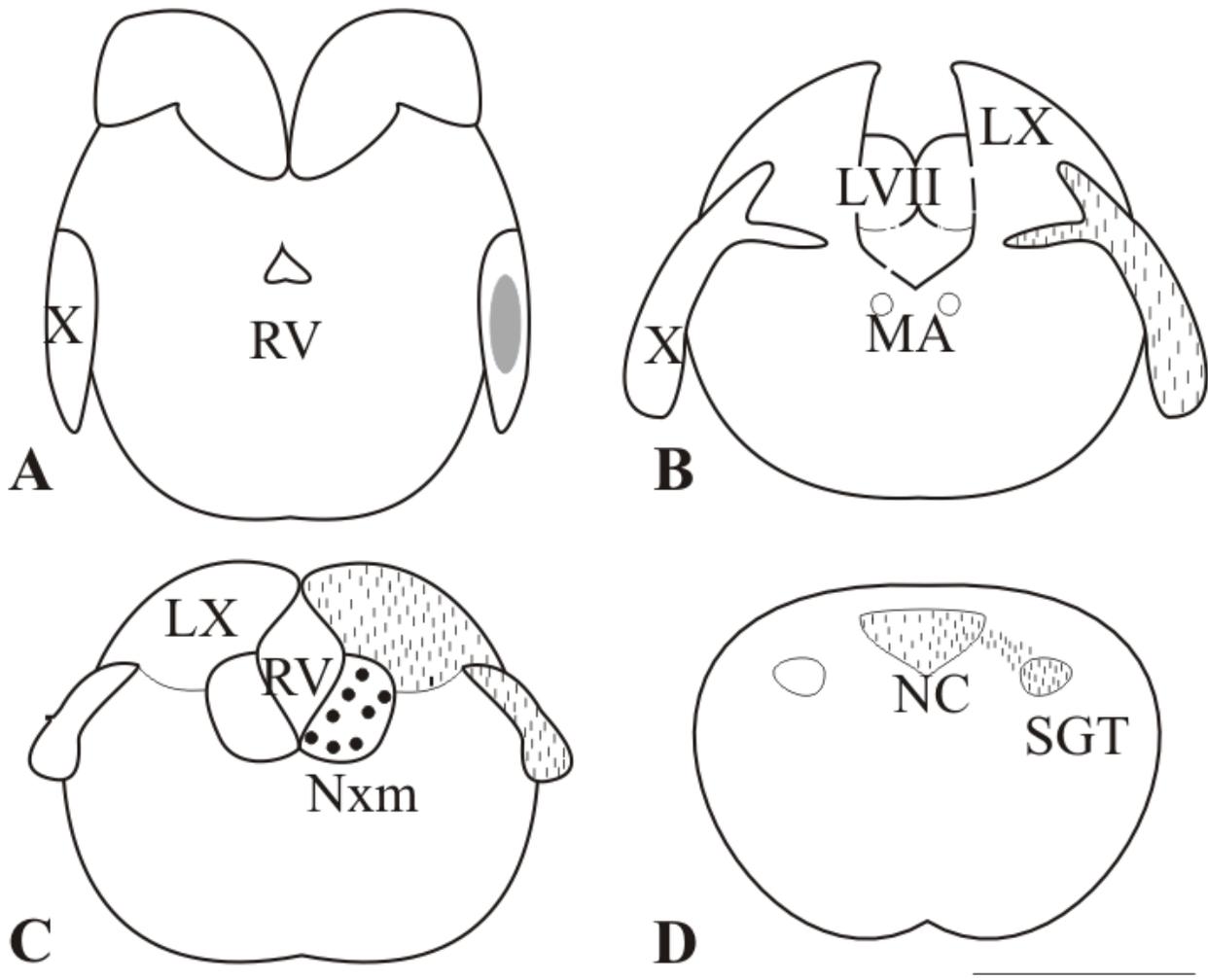


Figura 3. Representación de las células (círculos negros) y fibras (líneas finas) marcadas tras la aplicación de DiI en el nervio vago. La figura A representa la zona de marcaje (sombreado gris); en la figura B se ilustran las dos ramas del nervio vago (la superior sensitiva y la inferior motora); en la figura C se representan las células marcadas localizadas en el núcleo motor del vago (nXm); en la figura D se representan las prolongaciones axónicas que forman el tracto gustatorio secundario (SGT) y que ascienden hasta alcanzar el núcleo comisural de Cajal (NC). Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 500µm.

2. Lóbulo X

Al aplicar DiI en el lóbulo vagal (Figura 6D), se observó que las principales conexiones aferentes del LX son los axones procedentes de las células ganglionarias de la raíz sensitiva del nX, que entra a la altura de su respectivo lóbulo en el rombencéfalo. Dicho nervio presenta, como ya se ha descrito anteriormente, una rama sensitiva que se dirige hacia el lóbulo, y una rama motora, que se dirige hacia el núcleo motor, donde se pudieron observar células procedentes de las neuronas motoras marcadas retrógradamente (Figura 5F; Figura 6D). Además, ambos lóbulos están comunicados, al igual que los LVII, por una zona comisural que forma el Cven, bajo el retículo ventricular (Figura 4A). A través de esta comisura, se han observado también fibras en el LX contralateral al marcaje (Figura 4A; Figura 6D). Además, también se han observado aferencias procedentes del núcleo talámico posterior, donde se observaron células (Figuras 5C; Figura 6A).

En cuanto a los eferentes del LX, fibras procedentes del LX descienden hasta el SGT, que también viaja de forma caudal y rostral (Figura 6C). Caudalmente, el SGT viaja hacia el núcleo comisural de Cajal, en una región cercana a la médula espinal. Sin embargo, hacia una posición más rostral, el SGT avanza hasta alcanzar el SGN ipsilateral, desde donde algunas fibras cruzan la línea media formando la comisura gustativa (Cgus) (Figura 5B; Figura 6B). Bajo el SGN ipsilateral se pudo observar un tracto diferenciado que se corresponde, probablemente, con el tracto visceral secundario (Figura 5E) mencionado en otros trabajos. Además, fibras procedentes del SGN ipsilateral ascienden rostralmente hacia un tracto que envía información hacia el toro lateral, donde se observaron pequeñas fibras (Figura 5D). También se han localizado células marcadas en el LVII adyacente a los LX (Figura 5A).

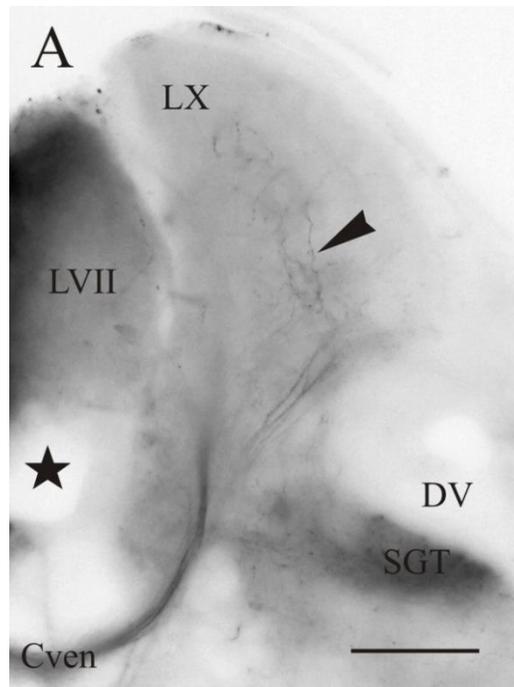


Figura 4. Fotomicrografía de la sección transversal del encéfalo de *D. rerio* donde se observan fibras (punta de flecha) en el lóbulo del vago (LX) contralateral, además de la comisura ventral (Cven) bajo el axón de Mauthner tras la aplicación de DiI en el lóbulo del vago. La estrella representa el ventrículo rombencefálico (RV). Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 200µm.

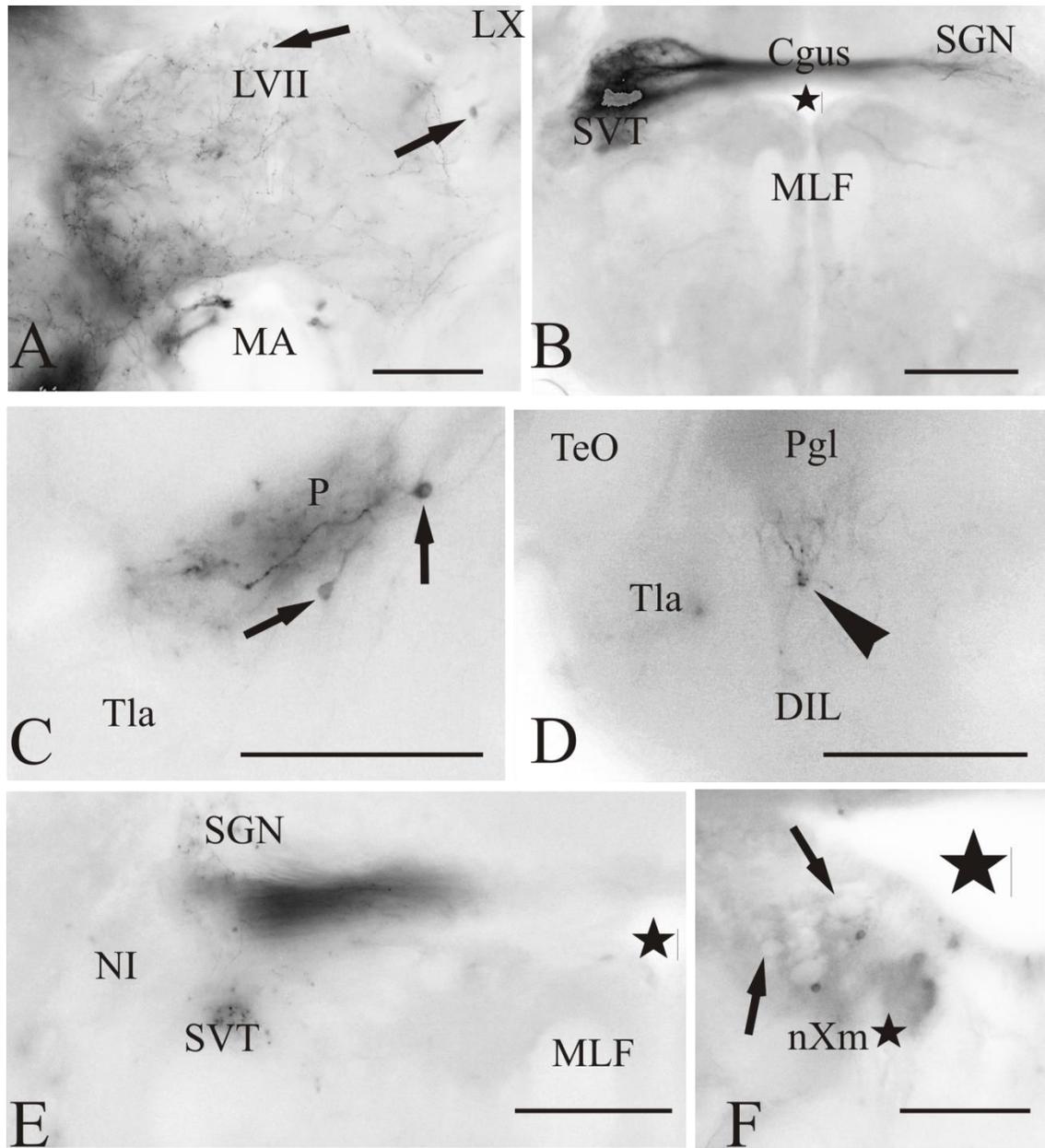


Figura 5. Fotomicrografías de las secciones transversales del encéfalo de *D. rerio* donde se observan células (flechas) y prolongaciones axónicas tras la aplicación de DiI en el lóbulo del vago. En la figura A se observan células en los lóbulos vagales y faciales, a la altura de dichos lóbulos rombencefálicos; en la figura B se observan axones en el núcleo gustatorio secundario (SGN), además de en la comisura gustativa (Cgus) y en el tracto visceral (SVT), en una sección transversal del encéfalo a la altura del istmo; en la figura C se observa el detalle de células (flechas) marcadas en el núcleo talámico posterior (P), en una sección transversal a la altura del hipotálamo más rostral; en la figura D se señalan las fibras (puntas de flechas) marcadas en el límite medial al toro lateral (TLa) y el núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico (DIL); en la figura E se aprecia el detalle del núcleo gustatorio secundario (SGN) bien diferenciado del tracto visceral ventral (SVT), en una sección transversal del encéfalo a la altura del istmo; en la figura F se aprecian células (flechas) en el núcleo motor del vago (nXm), en una sección transversal del encéfalo a la altura del lóbulo del vago rombencefálico. Las estrellas representan el ventrículo rombencefálico (RV). Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 50µm (C), 100µm (F), 200µm (A, B, D, E).

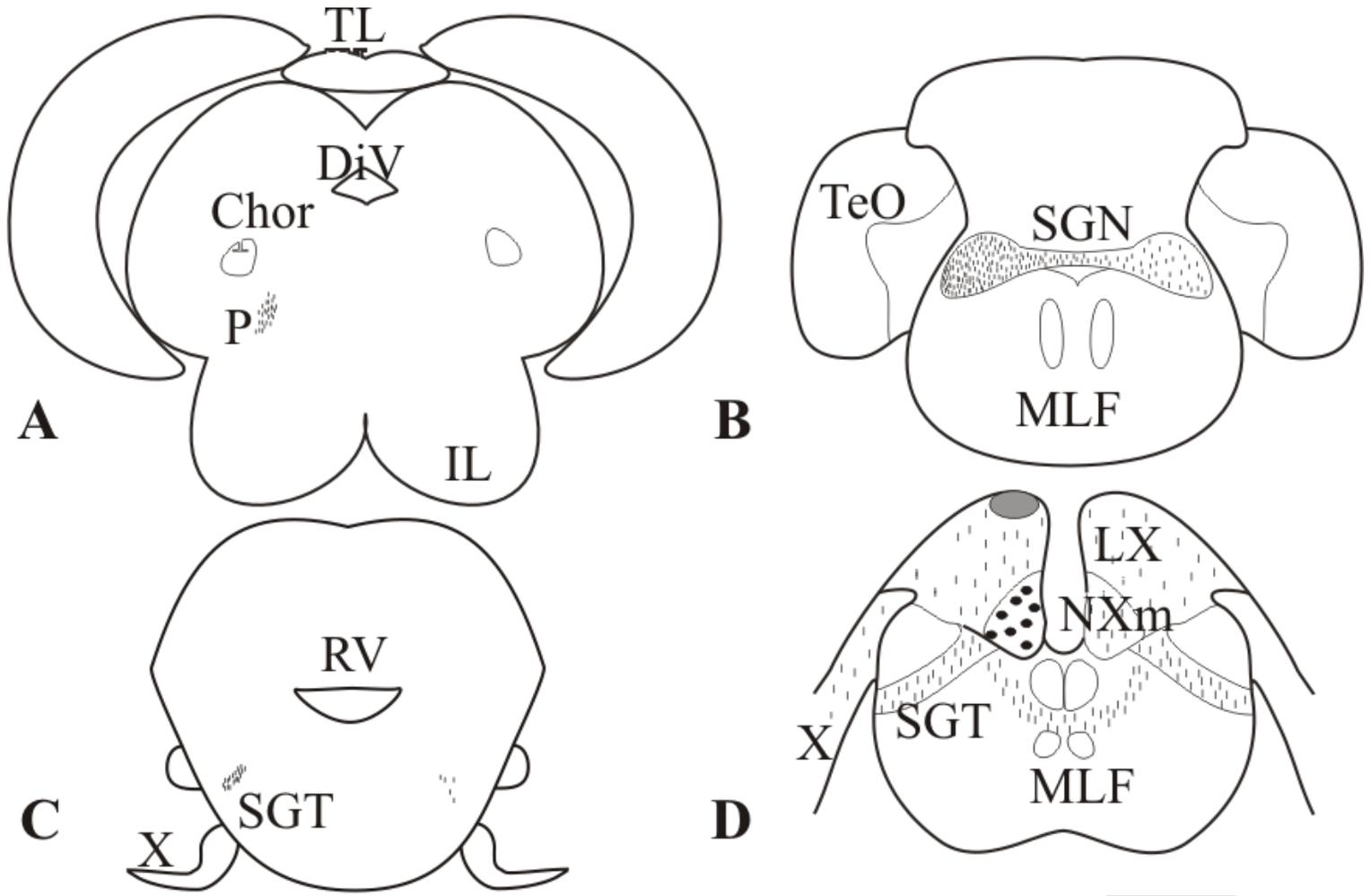


Figura 6. Representación de las células (círculos negros) y fibras (líneas finas) marcadas tras la aplicación de DiI en el lóbulo del vago. La figura A ilustra las fibras localizadas en el núcleo talámico posterior a nivel del hipotálamo; la figura B ilustra el núcleo gustatorio secundario (SGN) ipsilateral con prolongaciones axónicas, que cruzan hacia el otro lado por la comisura gustatoria (Cgus) al nivel del istmo; la figura C refleja la diferencia de intensidad de marcaje entre el tracto gustatorio ipsilateral (izquierda) y el contralateral (derecha); la figura D representa la zona de marcaje (en gris), junto con las células observadas en el núcleo motor del vago (nXm), así como fibras en los lóbulos vagales (LX) ipsi- y contralaterales, en el nervio vago ipsilateral, en los tractos secundarios (SGT) y en la comisura ventral. Abreviatuas: ver anexo. Barra de escala: 500 μ m.

3. Lóbulo VII

Al realizar el experimento de marcaje en LVII a la altura de la entrada del nX (Figura 8D), se han podido observar aferencias y eferencias.

En cuanto a las aferencias, se ha observado que dicho lóbulo recibe fibras primarias procedentes del nervio facial, que entran con el nervio VIII a la altura del istmo cerebelar y, posteriormente, realizan un codo hacia atrás (Figura 8C), de modo que la rama sensitiva del nervio facial viaja hacia una posición más caudal, alcanzando así el lóbulo facial. A la altura de este lóbulo, pudieron verse células marcadas, así como ciertas fibras que cruzan la línea media bajo el retículo ventricular, formando así la comisura ventral (Cven) (Figura 7A). Dicha comisura permite la comunicación e integración de información de ambos hemisferios cerebrales.

En cuanto a las eferencias (o destinos de las células del lóbulo facial), se pudieron ver que fibras procedentes de los lóbulos descienden de forma latero-medial hacia un tracto, el SGT (Figura 7A; Figura 8D). Este tracto, a su vez, viaja de forma caudal y rostral. Hacia una posición caudal, dicho tracto viaja de un modo ventral a la entrada del nervio vago, permitiendo la comunicación entre el tracto y el LX, donde se han observado fibras ipsilaterales (Figura 8E). Finalmente, el tracto continúa caudalmente (Figura 8F), alcanzando el núcleo comisural de Cajal en el óbex, anterior a la médula espinal.

Sin embargo, si seguimos el SGT en dirección rostral desde el lóbulo marcado (Figura 8B), se pudo observar que este viaja de modo bilateral hacia la zona del istmo alcanzando el SGN en el que se observaron una gran densidad de fibras, algunas de ellas cruzando la comisura (Cgus), conectando ambos núcleos de SGN, (figuras 7B y 8A).

Todas las proyecciones observadas fueron bilaterales (excepto en los casos especificados).

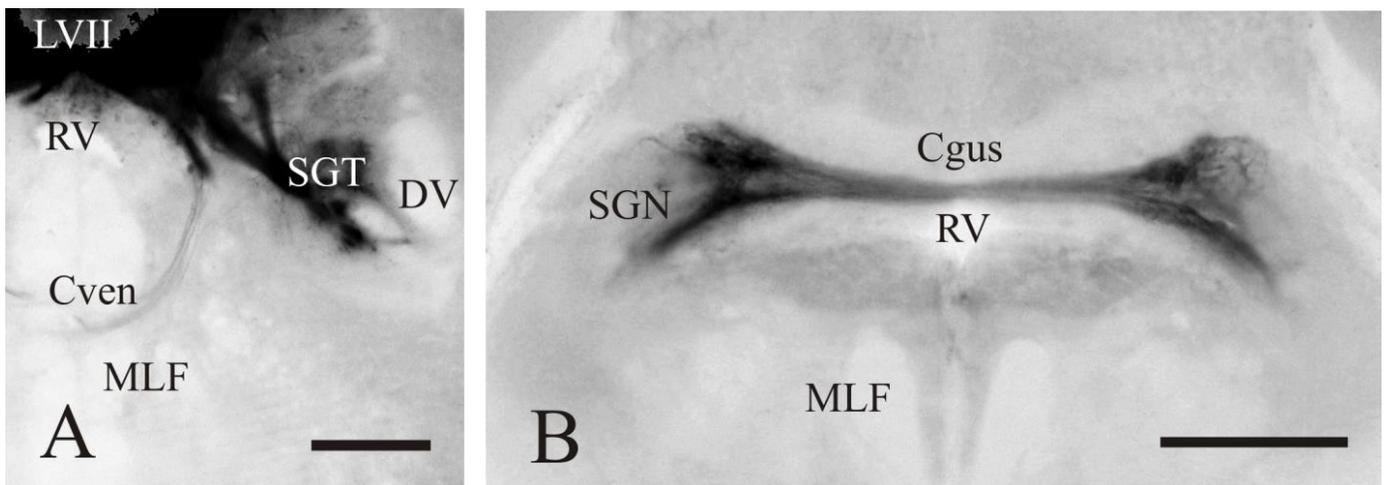


Figura 7. Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo de *D. rerio* donde se observan las proyecciones axónicas marcadas tras la aplicación de DiI en el lóbulo facial. En la figura A se observan fibras que descienden hacia el tracto gustatorio secundario (SGT), además de una tenue comisura ventral que permite la comunicación de ambos lados del lóbulo (Cven) al nivel rombencefálico; en la figura B se observan los dos núcleos gustatorios secundarios (SGN) al nivel del istmo, comunicados mediante la comisura gustativa (Cgus). Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 100µm (A), 200µm (B).

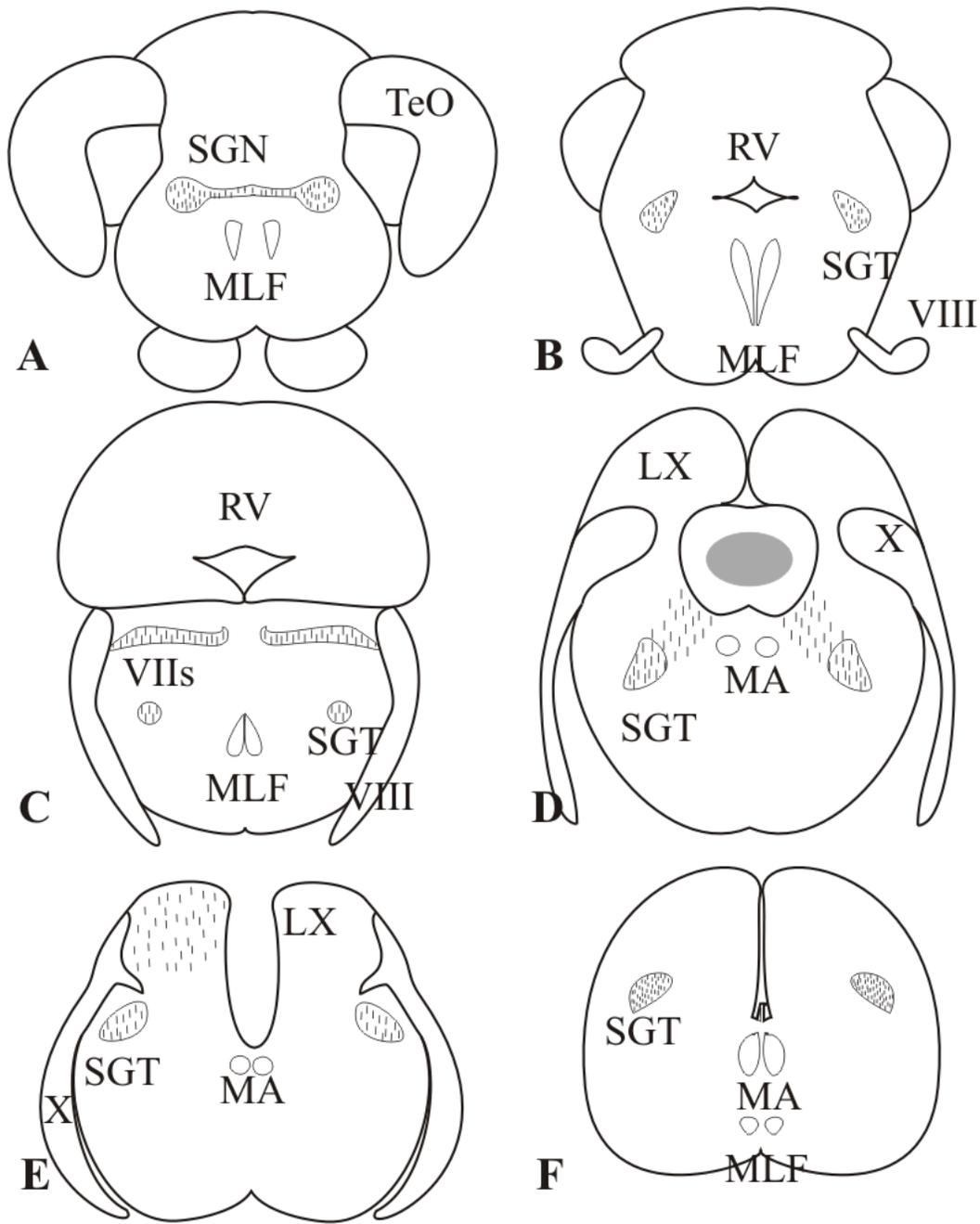


Figura 8. Representación de las células (círculos negros) y fibras (líneas finas) marcadas tras la aplicación de DiI en el lóbulo facial. En la figura A se observan las fibras en ambos núcleos gustatorios secundarios, así como en la comisura a nivel del istmo; la figura B representa ambos tractos gustatorios con prolongaciones axónicas procedentes del lóbulo facial; en la figura C se representan las ramas sensoriales del nervio facial (VIIs) en su entrada en el encéfalo, así como los tractos gustatorios ipsi- y contralateral; en la figura D se muestra la zona de marcaje (en gris), así como las fibras que descienden hacia los tractos gustatorios a nivel del rombencéfalo; en la figura E se observan fibras tanto en el lóbulo del vago como en los tractos gustatorios; en la figura F se observan los tractos aproximándose a la zona del núcleo comisural de Cajal, a nivel del rombencéfalo. Abreviatuas: ver anexo. Barra de escala: 500µm.

4. NC

Tras la aplicación de DiI en el núcleo comisural de Cajal se observó que el principal aferente del NC es el tracto gustatorio secundario de ambos lados del encéfalo. Este tracto está conformado por fibras procedentes tanto del LX como del LVII, donde se pueden observar células marcadas, además de gran densidad de fibras (Figura 9A-B; Figura 10C). Es importante destacar que se observa un mayor número de células en el lóbulo facial que en del vago, con lo que se concluye que la mayor parte de la información que recibe el núcleo comisural de Cajal proviene del lóbulo facial. Al seguir el SGT rostralmente (Figura 10D-E), se observó el SGN marcado, además de finas fibras en la comisura gustativa (Figura 10F).

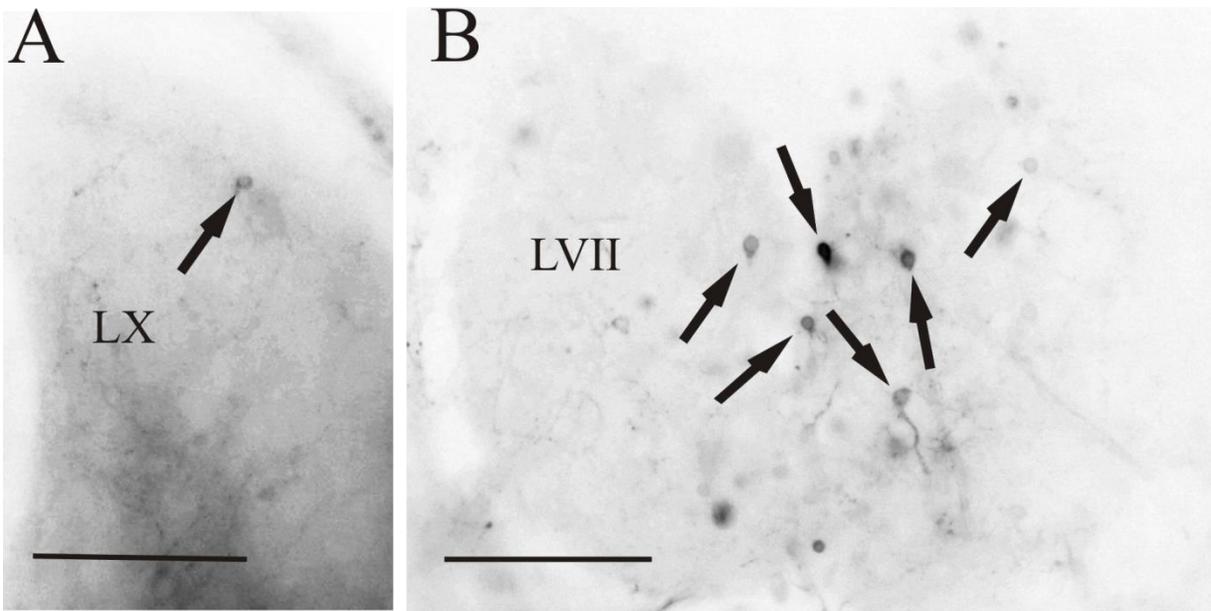


Figura 9. Fotomicrografías de las secciones transversales del encéfalo de *D. rerio* donde se observan células (flechas) y fibras marcadas tras la aplicación de DiI en el núcleo comisural de Cajal. En la figura A se muestran células marcadas (flecha) en el lóbulo del vago (LX) a nivel rombencefálico; en la figura B se aprecian en detalle las células (flechas) marcadas en el lóbulo facial (LVII) a nivel rombencefálico. Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 100 μ m (B), 200 μ m (A).

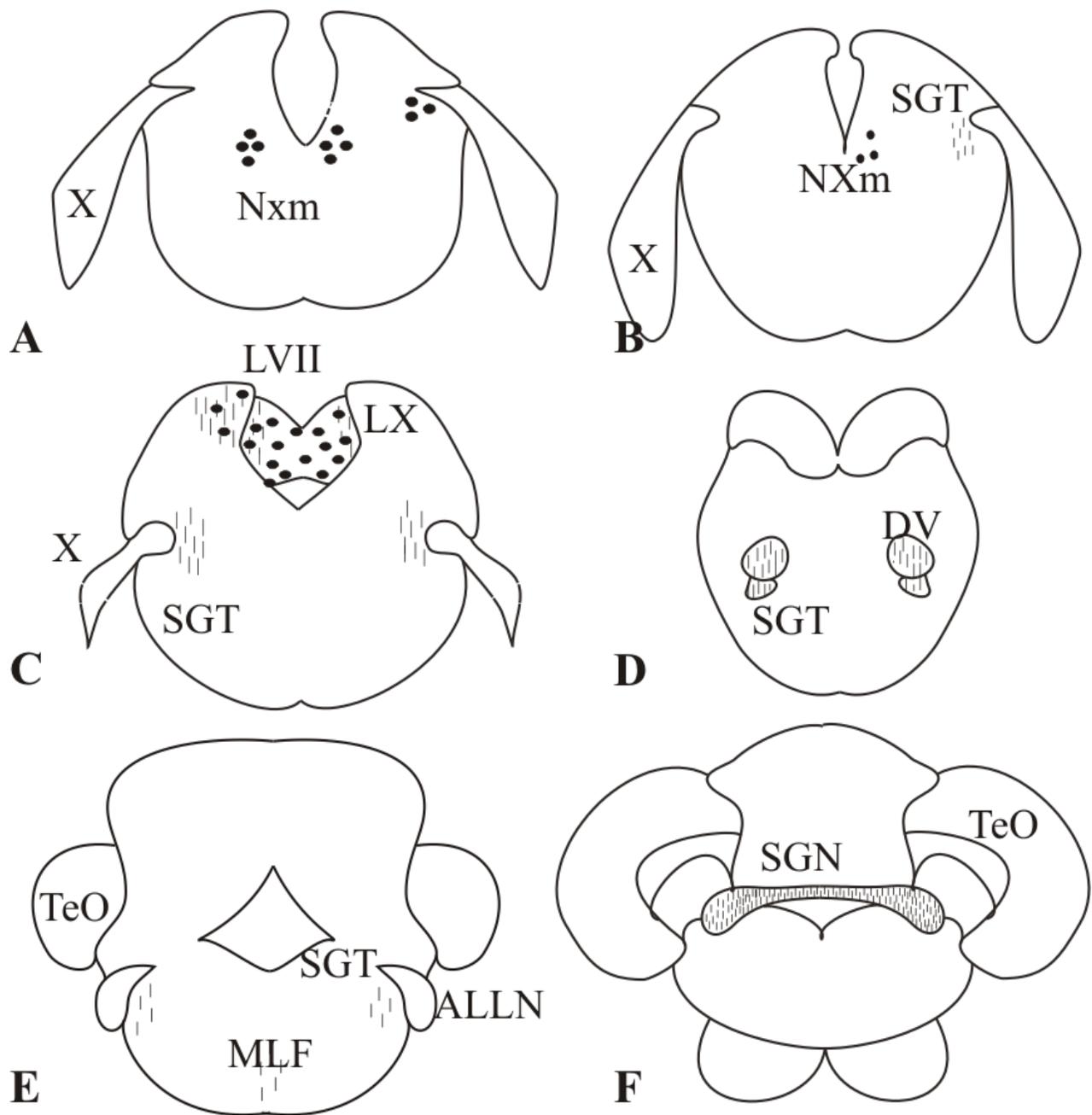


Figura 10. Representación de las células (círculos negros) y fibras (líneas finas) marcadas tras la aplicación de DiI en el núcleo comisural de Cajal. En la figura A se observan células (círculos negros) presentes en los núcleos motores del vago (nXm) de los lados ipsi- y contralateral; en la figura B se observan las células del núcleo motor del vago (nXm) ipsilateral, además de las fibras presentes en el tracto gustatorio (SGT), también ipsilateral; en la figura C se representan células presentes en los lóbulos facial (LVII) y vagal (LX), además de fibras en los tractos ipsi- y contralateral a nivel rombencefálico; en la figura D se muestra los tractos gustatorios (SGT) y las ramas descendentes del trigémino (DV) con finas proyecciones, a nivel rombencefálico; en la figura E se muestran fibras localizadas en las regiones de los tractos gustatorios (SGT) ipsi- y contralateral, además de unas finas fibras en la región del fascículo longitudinal medial (MLF); en la figura F se observan los núcleos gustatorios secundarios (SGN) comunicados mediante la comisura (Cgus) al nivel del istmo. Abreviatuas: ver anexo. Barra de escala: 500µm.

5. SGN

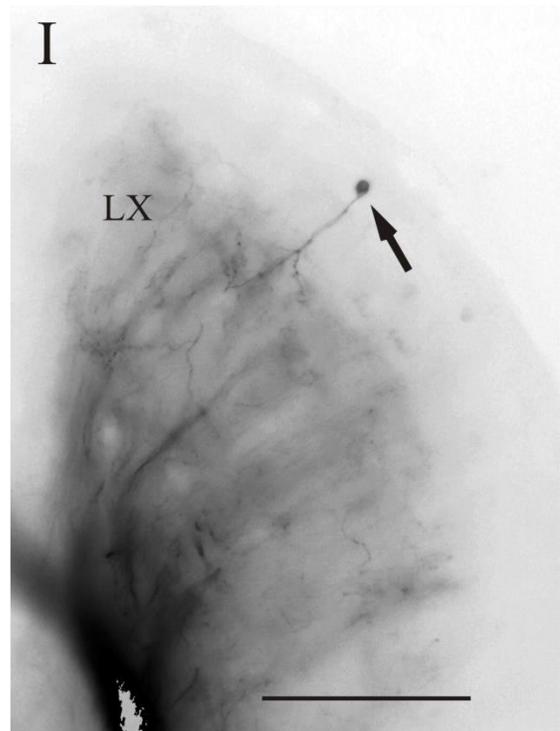
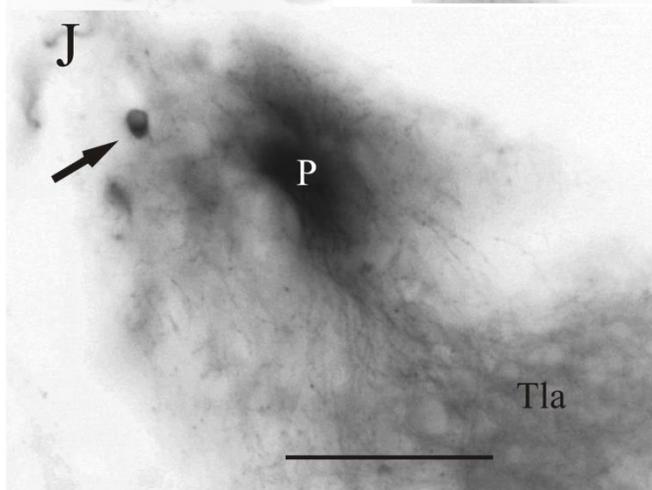
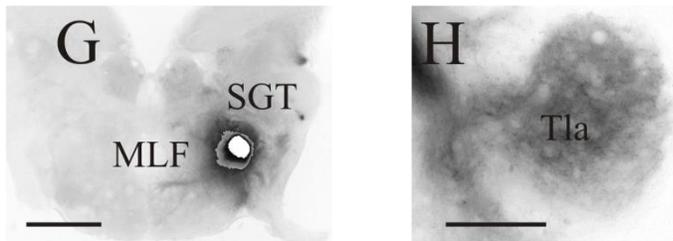
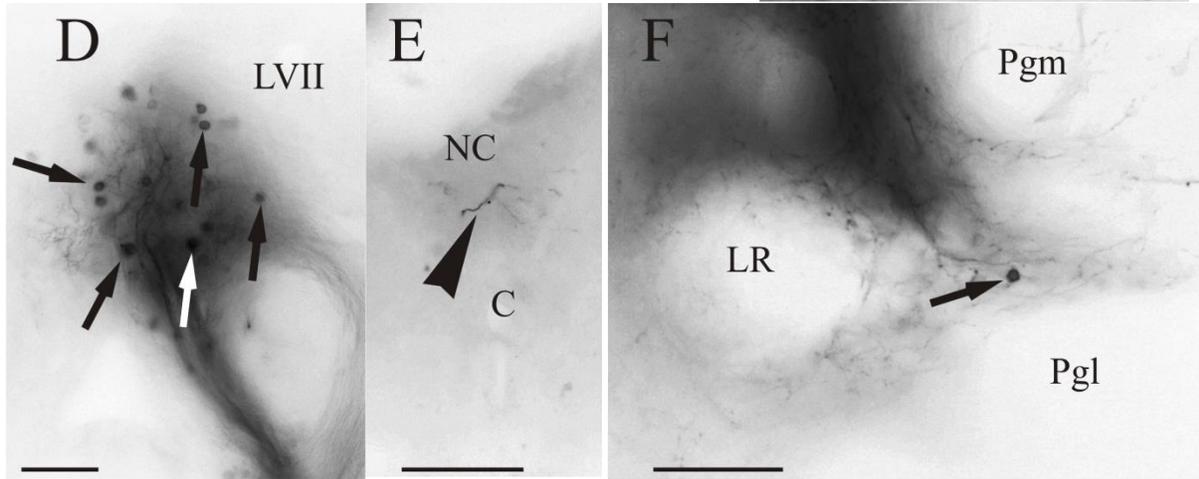
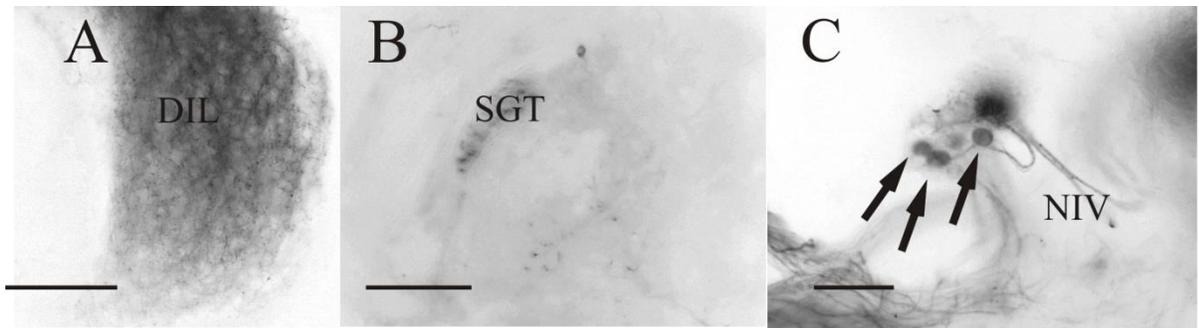
La aplicación de DiI en SGN (Figura 12E) reveló aferencias desde zonas rostrales y caudales. Desde las regiones caudales, el SGN recibe información a través de SGT, conformado por fibras de los lóbulos del vago y facial (anteriormente descrito), donde se pudieron observar células retrógradamente marcadas y fibras ipsilaterales (Figura 11D, 11I; Figura 12F-G). El SGT contralateral también presentó fibras marcadas, siendo ésta proyección mas discreta, indicando que la información gustativa es, en su mayor parte ipsilateral (figura 11B). Además, en el lóbulo facial también se pudieron observar pequeñas fibras marcadas que cruzan la línea media por Cven (Figuras 11G). Caudalmente, se observaron fibras en el SGT a lo largo del rombencéfalo, alcanzando el núcleo comisural de Cajal, donde se observaron algunas fibras dispersas (Figura 11E; Figura 12H).

Sin embargo, caudalmente, las principales eferencias corresponden con el núcleo del receso lateral (ipsilateral) y el núcleo talámico posterior (ipsilateral y contralateral) (Figuras 11F, 11J; Figuras 12A-C).

Por el contrario, y de un modo caudal, los principales eferentes del SGN conforman un pequeño tracto (visto de forma más clara en el lado contralateral), que envía información hacia núcleos hipotalámicos rostrales. Así, numerosas fibras descienden hasta alcanzar el toro lateral y el núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico ipsilateral (Figuras 11A, 11H).

Además, también se han observado células y fibras en el núcleo troquelar contralateral, y en el núcleo de Edinger-Westphal, toro longitudinal y núcleo pretectal posterior ipsilaterales, marcados “al paso” (Figura 11C; Figura 12D).

Figura 11. Fotomicrografías de las secciones transversales del encéfalo de *D. rerio* donde se observan células (flechas) y fibras marcadas tras la aplicación de DiI en SGN. En la figura A se observa el núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico (DIL) repleto de prolongaciones axónicas (nivel del hipotálamo); en la figura B se observa el detalle de fibras en el tracto gustatorio secundario (SGT), procedentes de los lóbulos facial y vagal; en la figura C se muestran las células (flechas) marcadas en el núcleo troquelar (nIV) contralateral a nivel del istmo; en la figura D se aprecian, en detalle, células (flechas) marcadas en el lóbulo facial (LVII) ipsilateral (nivel rombencefálico); en la figura E se observan las fibras (puntas de flechas) localizadas en el núcleo comisural de Cajal (NC), a nivel rombencefálico; en la figura F se detalla la célula (flecha) observada en el núcleo del receso lateral (LR), a un nivel hipotalámico; en la figura G se observa el tracto gustatorio (SGT) con gran cantidad de axones procedentes de los lóbulos facial y vagal, a un nivel cercano al istmo; en la figura H se observa el toro lateral (TLa) ipsilateral repleto de prolongaciones procedentes del SGN, a nivel hipotalámico; en la figura I se aprecia la célula (flecha) marcada en el lóbulo del vago (LX) ipsilateral (nivel rombencefálico); en la figura J se muestra el detalle de la célula (flecha) marcada en el núcleo talámico posterior (P) ipsilateral, a nivel hipotalámico. Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 50µm (C, D), 100µm (A, B, E, F, H, I, J), 200µm (G).



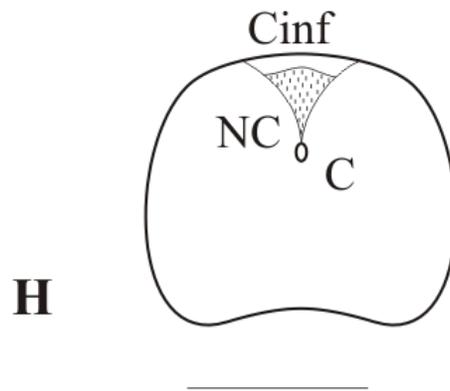
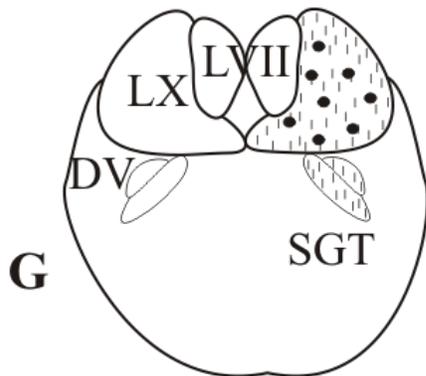
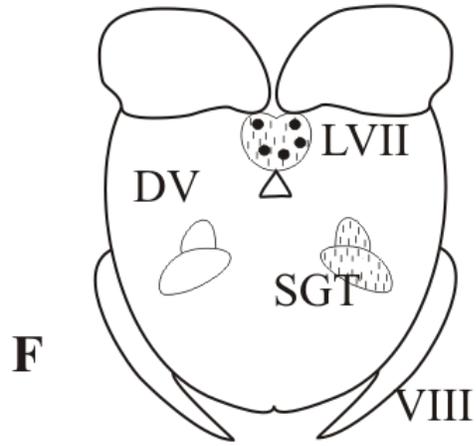
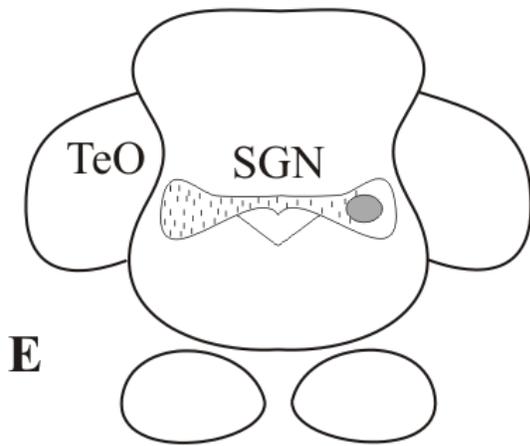
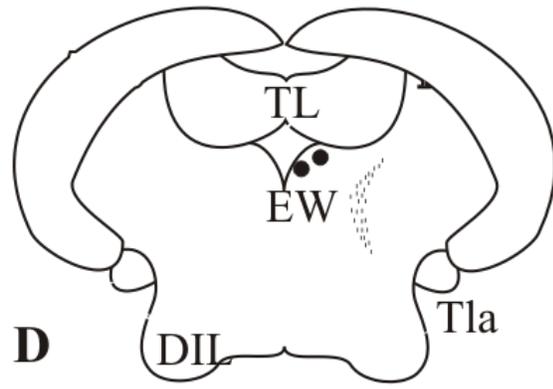
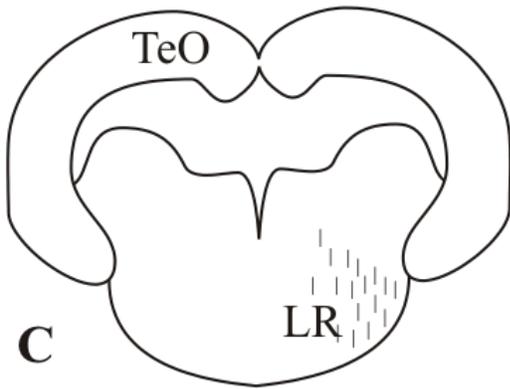
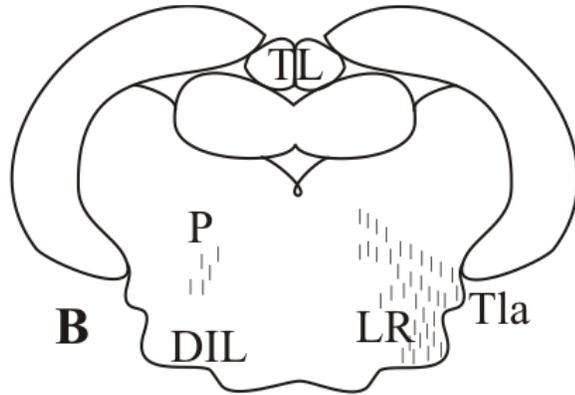
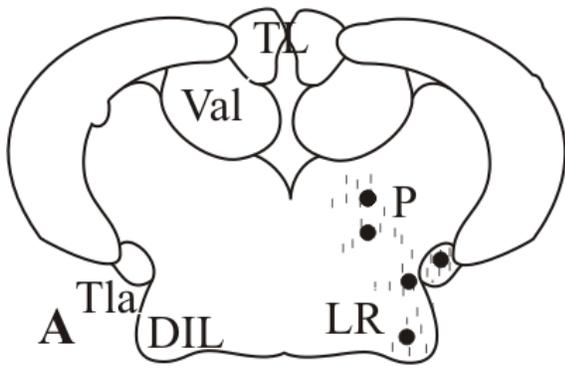


Figura 12. Representación de las células (círculos negros) y fibras (líneas finas) marcadas tras la aplicación de DiI en el SGN. En la figura A se observan células (círculos negros) presentes en el núcleo talámico posterior (P), toro lateral (TLa), núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico (DIL) y en el núcleo del receso lateral (LR) (todos ipsilaterales) al nivel del hipotálamo; en la figura B se observan las fibras localizadas en los mismos núcleos ipsilaterales, además de en el núcleo talámico posterior contralateral; en la figura C se representan fibras localizadas en la zona del receso lateral (LR) ipsilateral; en la figura D se muestra las células localizadas en el núcleo de Edinger-Westphal (EW), además de un pequeño tracto de fibras; en la figura E se muestra la zona de marcaje en el núcleo gustatorio secundario (zona sombreada), además de fibras que alcanzan el núcleo gustatorio secundario (SGN) contralateral en la zona del istmo; en la figura F se observan células presentes en el lóbulo facial (LVII), además de fibras localizadas tanto en el tracto gustatorio (SGT) como en la rama descendente del trigémino (DV) ipsilaterales; en la figura G se observan células presentes en el lóbulo del vago (LX) ipsilateral, además de fibras localizadas en el tracto gustatorio (SGT) y en la rama descendente del trigémino (DV) ipsilaterales; en la figura H se observan fibras en el núcleo comisural de Cajal (NC). Abreviatuas: ver anexo. Barra de escala: 500µm.

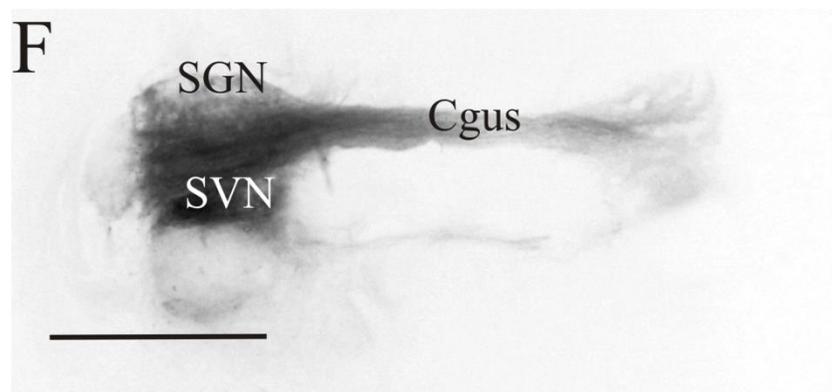
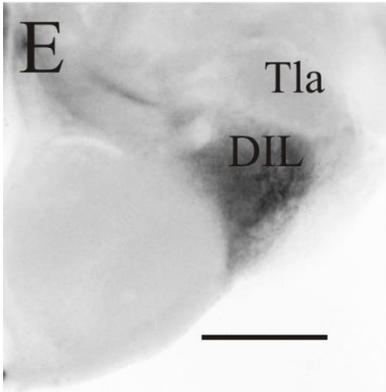
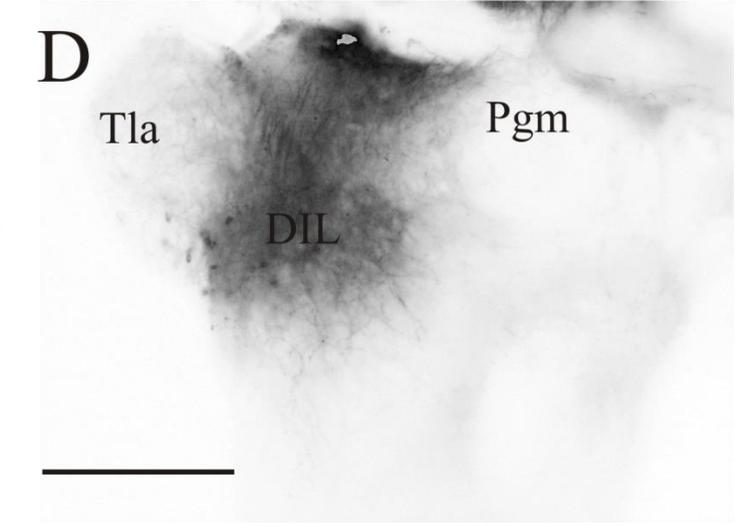
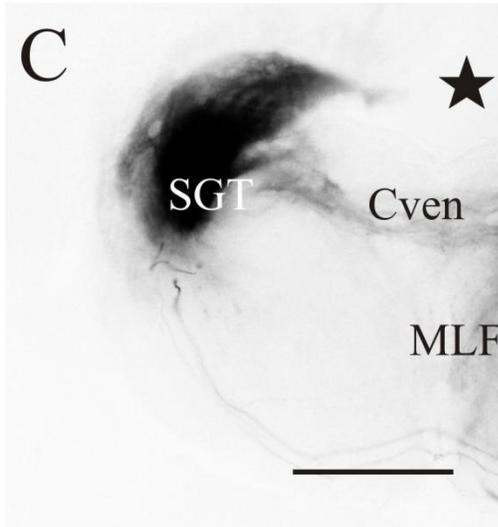
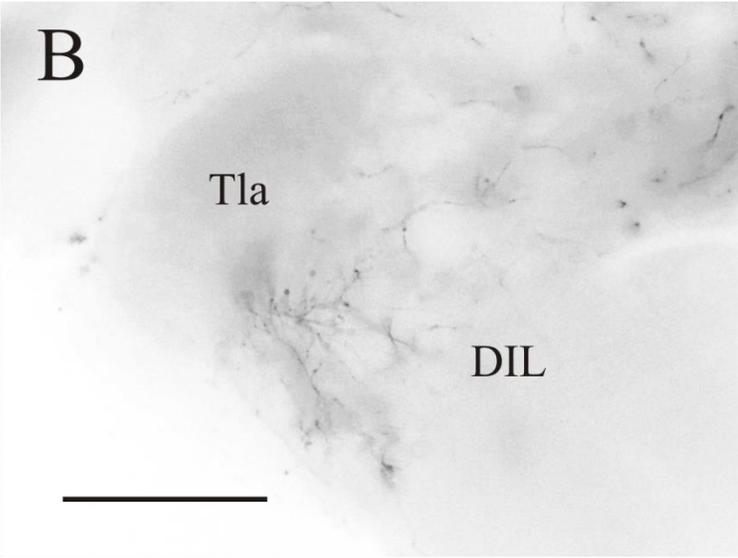
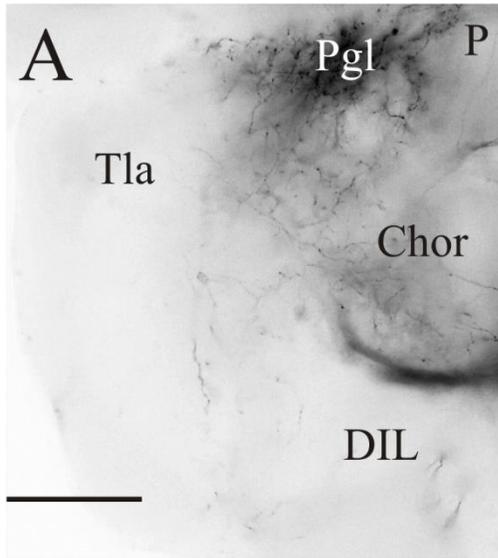
6. SGT

Tras la aplicación de DiI y DiO en SGT a un nivel inmediatamente caudal a SGN (Figura 15D), y hacia una posición rostral se reveló un importante componente contralateral. Esto es debido, en gran medida, al elevado número de fibras que cruzan tanto por Cven (Figura 13C), como por el Cgus (Figura 13F), además de finas fibras que cruzan la línea media a lo largo de varios niveles rostrales del encéfalo.

Al nivel del istmo, se pudieron observar dos zonas bien diferenciadas, correspondientes, posiblemente, con el SGN y un tracto visceral más ventral (Figura 13F; Figura 15C). Rostralmente al SGN, un tracto de fibras asciende ventralmente hacia el hipotálamo (Figura 15B), donde hace conexión con diferentes núcleos. Así, en esta región se pudieron observar gran cantidad de fibras en toro lateral (TLa) y núcleo difuso (DIL), así como células en el límite entre estos dos núcleos (población distinta, y posible nuevo núcleo no descrito) y en los propios toro lateral ipsilateral (Figura 13B; Figura 15A) y núcleo difuso ipsilateral (Figura 13D). Además, del lado ipsilateral, se pudieron ver tanto células en el núcleo talámico posterior como fibras entrando en el núcleo pregglomerular lateral (Figura 13A; Figura 15A).

Cabe destacar que, con el marcaje con DiO, no se han observado en el TLa ipsilateral (Figura 13E), mientras que el marcaje realizado con DiI se caracteriza por una gran densidad de fibras en el TLa ipsilateral. Se han observado también células en el toro longitudinal (TL), que bien podrían corresponder con proyecciones procedentes de regiones adyacentes al SGN, como el núcleo del istmo.

Figura 13. Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo de *D. rerio* donde se observan células y fibras marcadas tras la aplicación de DiI y DiO en los SGT. En la figura A se observan los axones que penetran en el núcleo posterior talámico (P) y en el núcleo pregglomerular lateral (PGl) del lado ipsilateral a la aplicación de DiI, a nivel hipotalámico; en la figura B se muestran fibras en el límite entre el toro lateral (TLa) y el núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico (DIL) del lado ipsilateral a la aplicación del DiI (a nivel de hipotálamo); en la figura C se observan las prolongaciones presentes en el tracto gustatorio (SGT) y en la comisura ventral (Cven) a nivel rombencefálico (la estrella representa el ventrículo rombencefálico, RV); en la figura D se muestran el toro lateral (TLa) y el núcleo difuso (DIL) con fibras procedentes del SGT ipsilateral a la aplicación de DiI a nivel hipotalámico; en la figura E se observan las prolongaciones que penetran en el núcleo difuso (DIL), pero no en el toro lateral (TLa) del lado ipsilateral a la aplicación de DiO, a nivel hipotalámico; la figura F muestra las fibras procedentes del SGT que penetran en el núcleo visceral (lateralmente adyacente a SGT) y en el núcleo gustatorio secundario (SGN) y en la comisura gustatoria (Cgus). Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 50µm (D), 100µm (A, B), 200µm (C, E, F).



7. PGI

El marcaje con DiI de PGI (Figura 16B) mostró, caudalmente, una gran densidad de fibras en las regiones correspondientes con el núcleo preglomerular lateral y medial (Figura 14A; Figura 16A-B), además de en la región denominada como P (núcleo talámico posterior) según Wullimann (1996).

Caudalmente a la región del istmo, fibras procedentes de PGI parecen ascender hacia el SGN ipsilateral, mientras que parte de estas prolongaciones cruzan hacia el SGN contralateral por la comisura gustatoria (Figura 14B; Figura 16C). Sin embargo, este marcaje de SGN es bastante tenue, apareciendo una mayor intensidad de marcaje en SVN (Figura 14B). Fibras del SGN descienden por el SGT, donde desapareció el marcaje (por escaso tiempo de incubación).

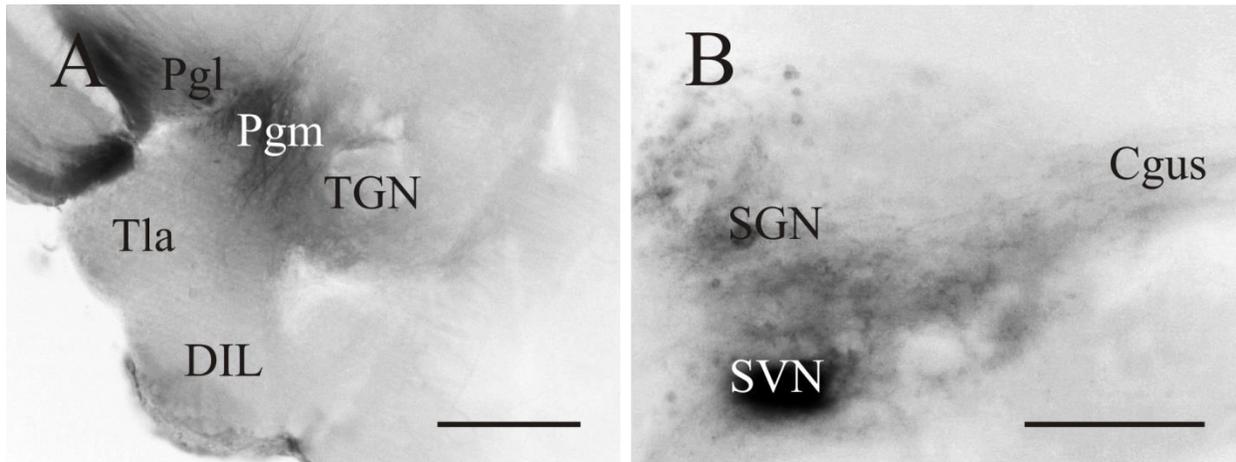


Imagen 14. Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo de *D. rerio* donde se observan prolongaciones axónicas tras la aplicación de DiI en el núcleo preglomerular lateral. La figura A muestra las fibras localizadas en el núcleo preglomerular lateral (PGI) y núcleo preglomerular medial (PGM) a un nivel hipotalámico (posiblemente por difusión de la carbocianina); en la figura B se muestra un detalle del núcleo visceral (SVN), además de fibras que penetran tanto en el núcleo gustatorio secundario (SGN) como en la comisura del gustatorio (Cgus), a nivel del istmo, y de un modo ipsilateral a la aplicación del DiI. Abreviaturas: ver anexo. Barra de escala: 50 μ m (B), 200 μ m (A).

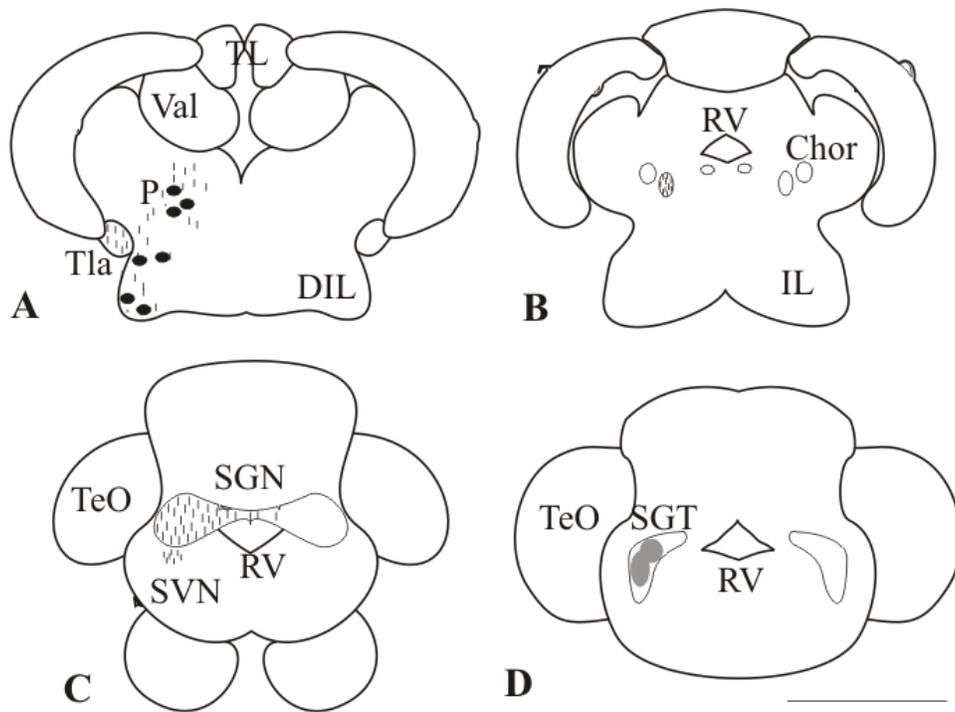


Figura 15. Representación de las células (círculos negros) y fibras (líneas finas) marcadas tras la aplicación de DiI en el SGT. En la figura A se observan células (círculos negros) presentes en el núcleo talámico posterior (P), en el núcleo del receso lateral (LR) y en el núcleo difuso (DIL) al nivel del hipotálamo; en la figura B se observa un pequeño tracto de fibras que comunican el SGN y el SGT con la región rostral del encéfalo de *Danio*; en la figura C se representan fibras localizadas en el núcleo secundario (SGN) y en el núcleo visceral (SVN) ipsilaterales en la región del istmo; en la figura D se muestra la zona de marcaje (en gris) en el tracto gustatorio (SGT) en una zona inmediatamente caudal al istmo. Abreviatuas: ver anexo. Barra de escala: 500µm.

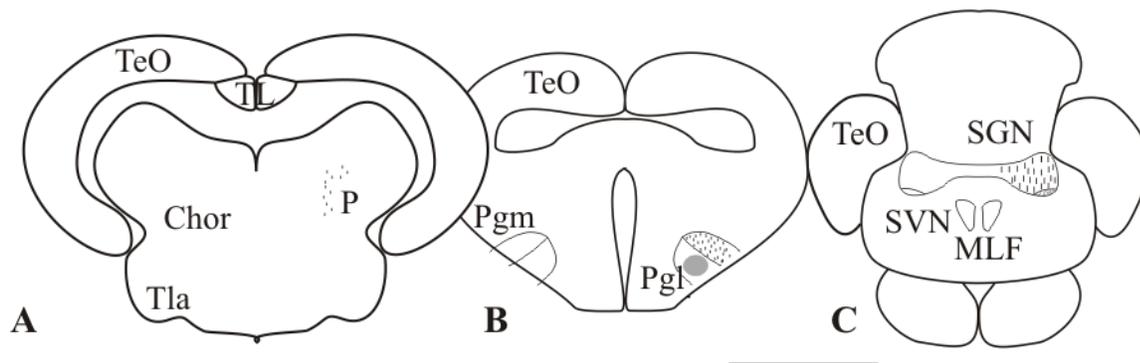


Figura 16. Representación de las fibras (líneas finas) marcadas tras la aplicación de DiI en el núcleo preglomerular lateral. En la figura A se observan fibras en la región del núcleo talámico posterior (P) en el hipotálamo; en la figura B se observa la zona de marcaje (en gris) en el núcleo preglomerular lateral (PGl), además de fibras marcadas en el núcleo preglomerular medial (PGm), ahí localizadas por difusión; en la figura C se representan fibras localizadas en el núcleo gustatorio secundario (SGN) ipsilateral, además de en el núcleo visceral (SVN) del mismo lado, situado ventralmente al primero en la región del istmo. Abreviatuas: ver anexo. Barra de escala: 500µm.

DISCUSIÓN

La información quimiosensorial correspondiente al sistema gustativo entra en el encéfalo del pez cebra, *Danio rerio*, por los nervios facial (par VII craneal), glossofaríngeo (par IX craneal) y vago (par X craneal), que penetran en sus respectivos lóbulos formando los centros primarios, situados en el rombencéfalo (cabe destacar que, a pesar de que el nervio glossofaríngeo no posee un lóbulo propio, envía su información al lóbulo vagal, junto con el nervio vago). De este modo, el nervio vago entra directamente a la altura del lóbulo vagal, localizado en el rombencéfalo, la región más caudal del encéfalo, inmediatamente anterior a la médula espinal. Sin embargo, el nervio facial, a pesar de que también penetra en esta región, lo hace de un modo más rostral a su lóbulo, de forma que, al entrar en el encéfalo, dicho nervio forma un codo y viaja hacia atrás, alcanzando así el lóbulo facial (Wullimann *et al.*, 1996). Ambos lóbulos poseen pequeñas fibras comisurales que atraviesan la línea media del encéfalo, comunicando ambos hemisferios laterales, región conocida como comisura ventral (Cven). Además, se ha visto que el nervio vago está dividido en dos ramas principales: una rama sensitiva, que comunica con el lóbulo vagal ipsilateral, y una rama motora, formada por los axones ipsilaterales procedentes de motoneuronas del núcleo motor del vago, que envían información hacia el exterior. Probablemente, dichas motoneuronas podrían estar relacionadas con respuestas reflejas al igual que sucede en *Carassius*, de modo que se establece un pequeño circuito de tres neuronas: la neurona sensitiva entraría en el lóbulo por el nervio correspondiente, haría sinapsis con una interneurona, y ésta, a su vez, establecería contacto con una motoneurona, que enviaría información eferente hacia el exterior (Finger, 2009). Sin embargo, en otras especies de peces, como en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), los centros de los nervios facial, glossofaríngeo y vagal forman una columna continua, de modo que no pueden diferenciarse núcleos independientes, acercándose, de este modo, al patrón ancestral, donde sólo había un gran centro primario (Folgueira *et al.*, 2003).

Fibras procedentes de los lóbulos mencionados anteriormente conforman el SGT, con dos ramas: una ascendente que recorre el interior del encéfalo por una región ventral-medial hasta alcanzar el núcleo gustatorio secundario en la región del istmo, y otra descendente hacia el rombencéfalo.

El tracto descendente parece establecer conexiones ipsilaterales secundarias con el núcleo comisural de Cajal, situado en una posición más caudal en el encéfalo, donde se observan pequeñas poblaciones de fibras. Así mismo, fibras procedentes tanto del lóbulo del vago como del lóbulo facial parecen enviar información hacia dicho núcleo rombencefálico, siendo mayoritarias las conexiones con el lóbulo facial, como parece confirmar el marcaje del núcleo comisural, en el que se observan un mayor número de células en este lóbulo, con respecto a las que aparecen en el lóbulo vagal. Esto nos lleva a concluir que NC no es tan solo un núcleo visceral, sino que también procesa parte de la información gustativa procedente del lóbulo facial. En caso de que se mantenga la hipótesis de que NC es un núcleo puramente visceral, esto nos llevaría a concluir que el lóbulo facial también recibe información visceral, al igual que ocurre con el lóbulo del vago. Además, también existen conexiones primarias con NC procedentes del nervio vago, recibiendo información visceral de forma directa.

Por otra parte, y con fibras procedentes de los lóbulos VII y X, se forma el SGT ascendente, que comunica de forma ipsilateral con el núcleo gustatorio secundario. Dicho núcleo, presente en ambos hemisferios del istmo, comparte información mediante la comisura gustativa (Cgus). Dicha comisura, a su vez, puede dividirse en dos: una en la región medial y otra en la región ventral.

En marcajes realizados tanto del SGT como de LX y PGI, se ha visto que, de forma ventral a los SGN de ambos lados, existe una región independiente y bien diferenciada, que podría corresponder con un núcleo secundario general visceral (SVN), conectado, posiblemente, con el lóbulo vagal. Estos núcleos han sido observados también en otras especies de ciprínidos, como en el caso de *Carassius* (Kato *et al.*, 2012).

Se sabe que en algunas especies de ciprínidos, como en *Carassius*, existe una regionalización topográfica de SGN, de modo que se distinguen dos circuitos diferentes: un sistema vagal intraoral, y otro facial extraoral. El sistema vagal comienza en LX, que proyecta hacia el núcleo gustatorio secundario lateral, que, a su vez, está conectado con el pTGN rostral. Esta región del pTGN envía información hacia el toro lateral, de modo que este núcleo es de información exclusivamente intraoral. Sin embargo, el sistema facial comienza en LVII, que proyecta en el núcleo gustatorio secundario medial, y este, con el pTGN caudal. Dicha región del pTGN proyecta hacia el lóbulo inferior hipotalámico, de modo que dicho núcleo sólo procesa información gustativa extraoral. Ambos sistemas se intercambian información mediante conexiones recíprocas entre TLa y IL (Rink y Wullimann, 1998; Kato *et al.*, 2012 → sólo regionalización de SGN). Dicha regionalización y segmentación del sistema gustativo en un sistema intraoral y otro extraoral también se supone en *Danio rerio*, como se puede deducir a partir de estudios realizados con catecolaminas (PoKay, 1997), que demuestran que el sistema vagal intraoral presenta terminales positivas para estas sustancias, mientras que el sistema facial extraoral no, apoyando la hipótesis de una diferenciación de sistemas también en el pez cebra, al igual que ocurre en *Carassius*. Además, estudios realizados con colina acetiltransferasa (ChAT) revelan fibras positivas en el núcleo del receso lateral y en el núcleo difuso, mientras que las localizadas en el toro lateral, son negativas (Mueller *et al.*, 2004). Lo mismo parece suceder con la expresión del mRNA GAD67 (enzima de síntesis del neurotransmisor GABA), que es positiva en el DIL pero negativa en el TLa (Mueller y Guo, 2009). Esta heterogeneidad neuroquímica entre el TLa y DIL en *Danio* podría reflejar la segregación en la integración de la información facial (responsable de la integración de la información extraoral) y vagal, (responsable de la integración de la información intraoral) como ocurre en otras especies. La proximidad anatómica de las células mediales al TLa y DIL retrógradamente marcadas desde el SGN serviría de núcleo integrador de ambas modalidades sensoriales que caracteriza al pTGN en otras especies.

Sin embargo, en otras especies como *Hemichromis lifalili*, el intercambio de información facial y vagal se realiza de otro modo. En esta especie, el sistema vagal intraoral comienza en el lóbulo X, que envía proyecciones hacia el SGN caudal y, este, hacia el TGN lateral; el sistema facial extraoral, a su vez, comienza en el lóbulo VII proyectando en el SGN rostral y este al TGN medial. Sin embargo, y de forma única en esta especie, el SGN caudal tiene proyecciones que envían información desde esta región hacia el SGN rostral, de modo que la información vagal y facial se interrelaciona ya en el SGN. A sí mismo, TLa recibe información vagal procedente del TGN lateral (al igual que en *Carassius*, exceptuando la regionalización), mientras que IL recibe información vagal y facial, procedente de todas las regiones de TGN (en contraste con lo visto en *Carassius*) (Ahrens y Wullimann, 2002). Sin embargo, también existen conexiones recíprocas entre TLa y IL. Así, la información facial y vagal puede interrelacionarse en dos lugares diferentes según la especie: en TLa y IL, como ocurre en ciprínidos, o en SGN, como ocurre en *Hemichromis* (cíclidos).

Un nuevo tracto de fibrillas surge del SGN, viajando hacia una localización rostral en el cerebro y comunicando con diferentes núcleos hipotalámicos de forma ipsilateral. Estos núcleos son: el toro lateral (donde se han observado células), núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico (también con células),

núcleo del receso lateral (con células en su contorno), núcleos preglomerulares lateral y medial (donde se han observado fibras), y núcleo pretectal posterior (donde se ha observado una única célula). Esta última conexión no se había observado en ningún otro teleosteo, con excepción de la trucha *O. mykiss*, en la que el SGN comunica con cuatro núcleos diencefálicos: el pTGN que recibe información directamente desde la columna visceral, considerándose así un centro secundario, el núcleo subglomeruloso (SG), el toro longitudinal (TL) y el lóbulo inferior hipotalámico (IL) (Folgueira *et al.*, 2003).

Además, también hemos descrito una población de células localizadas en el límite medial al toro lateral y el núcleo difuso hipotalámico que plantea dudas sobre su posible homólogo en especies próximas. Una de las posibilidades es que dichas células sean completamente distintas a las observadas en los núcleos hipotalámicos sugiriendo la existencia en *Danio rerio* de un nuevo núcleo de integración de información gustatoria no descrito por métodos clásicos (Wullimann *et al.*, 1996) y probablemente, homólogo al pTGN descrito en otras especies como *O. mykiss* (Folgueira *et al.*, 2003) y *Carassius* (Kato *et al.*, 2012).

Al realizar marcajes tanto en SGN como en el SGT, se han observado fibras que penetran en el toro longitudinal (al marcar SGN), así como algunas células (al marcar SGT) de un modo ipsilateral, y en el núcleo del receso lateral. Estos marcajes también parecen ser observados en otras especies de ciprínidos, como *Carassius* (Kato *et al.*, 2012).

Al igual que ocurre en trucha (Folgueira *et al.*, 2003), el SGN no tiene conexiones recíprocas con ninguno de los lóbulos (VII y X), ni tampoco con NC.

El núcleo talámico posterior (P) también envía axones al SGN, tanto de forma ipsilateral como contralateral. Por otra parte, se ha visto que las fibras evitan en todo momento la zona del pTGN descrita en otros trabajos, lo que nos hace pensar que, en realidad, dicho núcleo terciario no existe en *Danio rerio*, y su función sería realizada por otros núcleos hipotalámicos, como podría ser el caso del núcleo talámico posterior (P) al igual que en otros ciprínidos (Kato *et al.*, 2012), o la población celular situada en el margen medial del toro lateral y núcleo difuso aquí descrita. En otras especies, como *Hemichromis lifalili*, se ha visto que P recibe información procedente del SGN, estando conectado de forma recíproca, además, con el TLa y IL (Ahrens y Wullimann, 2002). En ciprínidos, se sabe que P envía información hacia los centros primarios. Además, también se han visto conexiones recíprocas entre TLa y IL (Ahrens y Wullimann, 2002; Kato *et al.*, 2012; Rink y Wullimann, 1998). Sin embargo, en *Danio rerio*, P parece ser una aferencia de SGN, pero con los marcajes realizados no se ha podido demostrar la conexión recíproca entre estos centros. Además, tampoco se han visto las conexiones recíprocas entre TLa y IL.

Por otra parte, se han observado células en el núcleo de Edinger Westphal y en el núcleo troquelar, pero la naturaleza motora de estos núcleos que inervan músculos intra- y extraoculares respectivamente sugiere que su relación con el sistema gustativo sería artefactual.

Además, en la trucha también se han observado conexiones del diencefalo con el telencéfalo, de modo que el pTGN y el SGN envían información hacia la región medial del área dorsal telencefálica (Dm) –al igual que ocurre en goldfish (Kato *et al.*, 2012), y como se ha observado en *Danio rerio* al marcar el SGT- y la parte dorsal de la región ventral del área ventral telencefálica (Vv dorsal). Ésta última envía conexiones recíprocas hacia el SGN (Folgueira *et al.*, 2003).

En cuanto a las conexiones recíprocas, se observó que el SGN recibe información de dos núcleos hipotalámicos: el núcleo posterior pretectal (P) y el receso lateral (LR). Dichas conexiones son corroboradas con marcaje del SGN, donde se han observado células en estos dos núcleos.

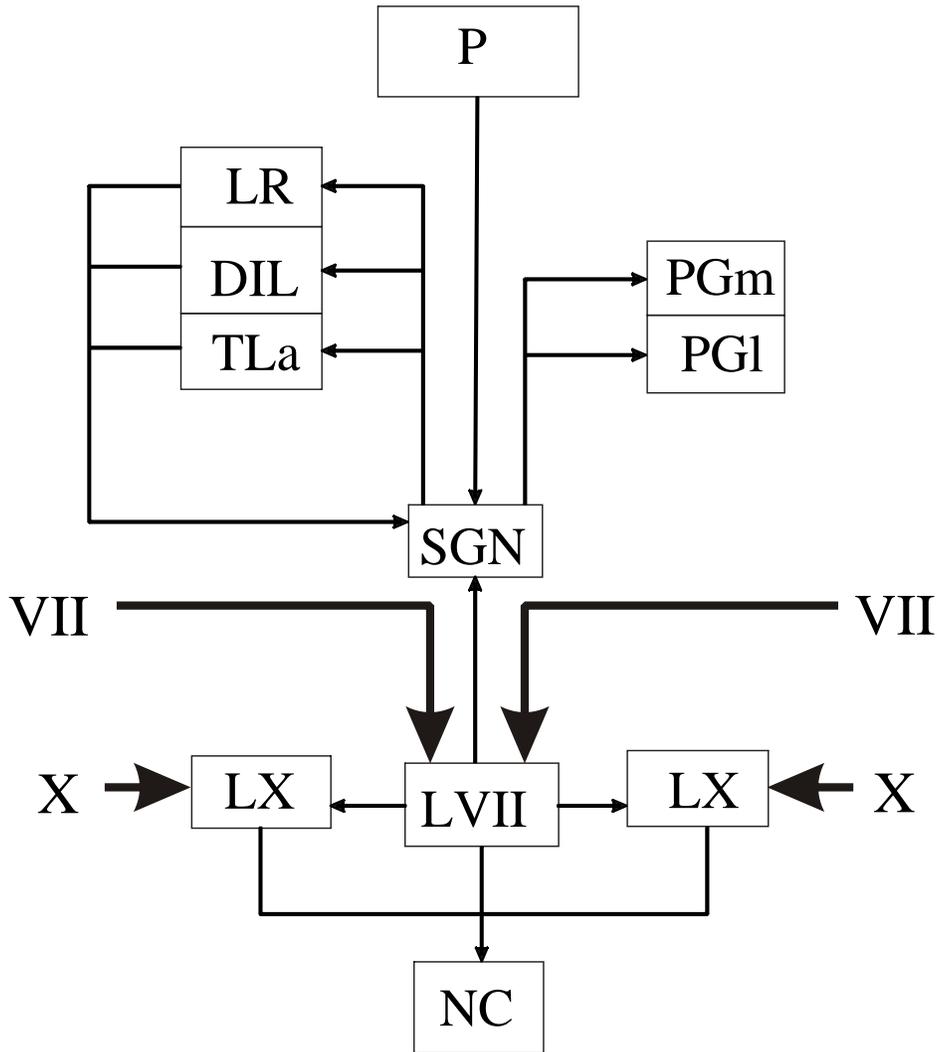


Figura 17. Esquema de las conexiones entre los distintos centros en el sistema gustativo. Las líneas gruesas indican entradas de nervios, mientras que las finas representan proyecciones ascendentes y descendentes.

CONCLUSIONES

1. Los principales centros primarios de integración son los lóbulos vagal y facial; los centros secundarios son los núcleos gustatorios secundarios (conectados mediante la comisura gustatoria); y los centros terciarios en este trabajo descritos son el núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico y el toro lateral.
2. El núcleo gustatorio terciario descrito por Wullimann (1996) no recibe información gustativa y/o visceral.
3. La función del núcleo terciario podría ser asumida por el núcleo talámico posterior (P) y/o por el toro lateral y el núcleo difuso, así como por la población celular intermedia entre estos dos núcleos. De este modo, el encéfalo de *Danio rerio* podría tener dos, o incluso tres centros terciarios de integración, al igual que ocurre en otros teleósteos como los silúridos
4. El núcleo conocido como núcleo comisural de Cajal (NC), considerado un centro visceral, recibiría información no sólo del lóbulo del vago, sino también del facial.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña por dejarme sus instalaciones para realizar este trabajo, además de haberme ofrecido los ejemplares de *Danio rerio* utilizados en los experimentos. Mención especial para Julián Yáñez Sánchez, el director de este proyecto, que ha pasado largas horas conmigo, ayudándome a comprender los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

ABBATE F., GERMANÀ G.P., DE CARLOS F., MONTALBANO G., LAURÀ R., LEVANTI M.B., GERMANÀ A. *The Oral Cavity of the Adult Zebrafish (Danio rerio)*. *Anat. Histol. Embryol.* 35:299-304, 2006.

AHRENS K., WULLIMANN M.F. *Hypothalamic Inferior Lobe and Lateral Torus Connections in a Percomorph Teleost, the Red Cichlid (Hemichromis lifalili)*. *The Journal of Comparative Neurology*, 449:43-64, 2002.

FINGER T.E. *Evolution of Gustatory Reflex Systems in the Brainstems of Fishes*. *Integr Zool.* 4(1):53-63, 2009.

FINGER T.E. *Sorting Food from Stones: The Vagal Taste System in Goldfish, Carassius auratus*. 194(2):135-143, 2008.

FOLGUEIRA M., ANADÓN R., YÁÑEZ, J. *Experimental Study of the Connections of the Gustatory System in the Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Comparative Neurology*, 465:604-619, 2003.

FOLGUEIRA M., ANADÓN R., YÁÑEZ J. *An Experimental Study of the Connections of the Telencephalon in the Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). I: Olfactory Bulb and Ventral Area*. *The Journal of Comparative Neurology*. 480:180-203, 2004.

FRIEDRICH R.W., GENOUD C., WANNER A.A. *Analyzing the Structure and Function of Neuronal Circuits in Zebrafish*. *Frontiers in Neural Circuits*. 7(71):1-8, 2013.

HANSEN A., REUTTER K., ZEISKE E. *Taste bud development in the zebrafish, Danio rerio*. *Developmental Dynamics* 223:483-496, 2002.

KANWAL J.S., FINGER T.E. *Chapter Five: Central Representation and Projections of Gustatory Systems*. En: *Fish Chemoreception*. Chapman & Hall, Cambridge (UK), 1992.

KARDONG. *Vertebrados: Anatomía Comparada, Función, Evolución*. Segunda Edición, McGraw-Hill, Interamericana, 1999.

KATO T., YAMADA Y., YAMAMOTO N. *Ascending Gustatory Pathways to the Telencephalon in Goldfish*. *The Journal of Comparative Neurology*, 520:2475-2499, 2012.

MUELLER T., GUO S. *The Distribution of GAD67-mRNA in the Adult Zebrafish (Teleost) Forebrain Reveals a Prosomeric Pattern and Suggests Previously Unidentified Homologies to Tetrapods*. *The Journal of Comparative Neurology*, 516:553-568, 2009.

MUELLER T., VERNIER P., WULLIMANN M.F. *The Adult Central Nervous Cholinergic System of a Neurogenetic Model Animal, the Zebrafish Danio rerio*. *Brain Research*, 1011:156-169, 2004.

POKAY M.M.A. *Catecholaminergic Systems in the Zebrafish. III. Organization and Projection Pattern of Medullary Dopaminergic and Noradrenergic Neurons*. *The Journal of Comparative Neurology*, 381:411-427, 1997.

REID, G.M. *The Form, Function and Phylogenetic Significance of the Vomero-Palatine Organ in Cyprinid Fishes*. Journal of Natural History, 16:4, 497-510, 1982.

RINK E., WULLIMANN M.F. *Some Forebrain Connections of the Gustatory System in the Goldfish Carassius auratus Visualized by Separate DiI Application to the Hypothalamic Inferior Lobe and the Torus Lateralis*. The Journal of Comparative Neurology, 394:152-170, 1998.

WULLIMANN M. F. *The Central Nervous System*. En: The Physiology of Fishes, Second Edition. CRC Press, New York (USA), 1998.

WULLIMANN M.F, RUPP B., REICHERT H. *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas*. Basel, Birkhäuser Verlag, 1996.

Abreviaturas

ALLN	<i>nervios anteriores de la línea lateral</i>	nIV	<i>núcleo troquelar</i>
C	<i>canal central</i>	nLT	<i>núcleo talámico lateral</i>
Cgus	<i>comisura del SGN</i>	nXm	<i>núcleo motor vagal</i>
Chor	<i>comisura horizontalis</i>	P	<i>núcleo talámico posterior</i>
Cinf	<i>comisura ínfima de Haller</i>	PGl	<i>núcleo preglomerular lateral</i>
Cven	<i>comisura ventral</i>	PGm	<i>núcleo preglomerular medial</i>
D	<i>área telencefálica dorsal</i>	PO	<i>núcleo pretectal posterior</i>
Dc	<i>zona central de D</i>	pTGN	<i>núcleo gustatorio terciario</i>
DIL	<i>núcleo difuso de IL</i>	RV	<i>ventrículo rombencefálico</i>
DiV	<i>ventrículo diencefálico</i>	SG	<i>núcleo subglomeruloso</i>
Dm	<i>zona medial de D</i>	SGN	<i>núcleo gustatorio secundario</i>
Dp	<i>zona posterior de D</i>	SGVN	<i>núcleo gustatorio visceral secundario</i>
DV	<i>rama descendente del trigémino</i>	SGT	<i>tracto gustatorio secundario</i>
EW	<i>núcleo de Edinger-Westphal</i>	SVN	<i>núcleo visceral secundario</i>
H	<i>hipotálamo periventricular</i>	TBS	<i>tracto bulboespinalis</i>
Hd	<i>zona dorsal de H</i>	TeO	<i>techo óptico</i>
IL	<i>lóbulo inferior hipotalámico</i>	TL	<i>toro longitudinal</i>
IX	<i>nervio glossofaríngeo</i>	TLa	<i>toro lateral</i>
IRF	<i>formación reticular inferior</i>	V	<i>área telencefálica</i>
LVII	<i>lóbulo facial</i>	Val	<i>división lateral de la válvula cerebelar</i>
LX	<i>lóbulo vagal</i>	VII	<i>nervio facial</i>
LR	<i>receso lateral</i>	VII _s	<i>rama sensitiva del nervio facial</i>
MA	<i>axon de Mauthner</i>	VIII	<i>nervio octavo</i>
MLF	<i>fascículo longitudinal medial</i>	Vv	<i>núcleo ventral de V</i>
NC	<i>núcleo Comisural de Cajal</i>	Vs	<i>núcleo supracomisural de V</i>
NG	<i>núcleo glomeruloso</i>	X	<i>nervio vago</i>
NI	<i>núcleo del istmo</i>		

