



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS

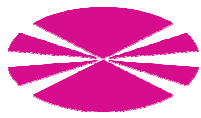
Estudio experimental de las conexiones tectales y cerebelares en el pez cebra (*Danio rerio*)



Ana Quelle Regaldíe

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biología



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LAS CONEXIONES TECTALES Y
CEREBELARES EN EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

ESTUDO EXPERIMENTAL DAS CONEXIÓNS TECTAL E
CEREBELAR NO PEIXE-CEBRA (*Danio rerio*)

EXPERIMENTAL STUDY OF THE TECTAL AND CEREBELLAR
CONNECTIONS IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Ana Quelle Regaldíe

2014

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Danio rerio</i>	1
2. Cerebelo	3
3. Techo óptico	4
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	9
1. Cerebelo	9
2. Techo óptico	23
DISCUSIÓN	27
1. Cerebelo	27
2. Techo óptico	31
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS	32

RESUMEN

En este trabajo de fin de grado se realizó un estudio neuroanatómico en *Danio rerio* con el fin de conocer el circuito implicado en la integración de la información sensorial del techo óptico y del cerebelo mediante la aplicación de los trazadores neuronales Dil y DiO. De este modo se pudieron conocer las aferencias y eferencias del techo óptico y de las distintas partes que componen el cerebelo (válvula del cerebelo, corpus del cerebelo, eminencia granular y lóbulo caudal). Así, se determinaron los diferentes núcleos pretectales que conectan tanto con el cerebelo como con el techo óptico. En el cerebelo, las aferencias rostrales cursan a través del tracto pretecto-cerebelar mientras que la oliva inferior, que supone la aferencia caudal principal, envía numerosas fibras cruzadas hacia la válvula cerebelar y al corpus del cerebelo. Otras aferencias importantes en el cerebelo son el núcleo lateral de la válvula, el núcleo de Edinger-Westphal, el núcleo tegmental dorsal, el núcleo sensitivo del trigémino y el área octavolateral. En cuanto a las eferencias principales, éstas son enviadas a partir del tracto posterior del cerebelo y el *brachium conjunctivum* y se dirigen hacia el toro longitudinal, el área trigeminal, el lóbulo hipotalámico y la formación reticular. En el techo óptico las aferencias circulan principalmente por los tractos ópticos provenientes de la retina. Las aferencias principales se encuentran en el telencéfalo, el tálamo y el núcleo del istmo. Las fibras eferentes se desplazan a lo largo del cerebro mediante el tracto tectobulbar o, al igual que en el cerebelo, utilizan el tracto pretecto-cerebelar. Esto da lugar a eferencias en algunos núcleos pretectales, el lóbulo hipotalámico, el núcleo tegmental dorsal y el toro semicircular. Los resultados obtenidos en el pez cebrá se compararon con los de otras especies, principalmente de ciprínidos, de modo que se demostraron algunas importantes diferencias pero también homologías entre las regiones del techo óptico y del cerebelo.

INTRODUCCIÓN

1. *Danio rerio*

Danio rerio (Fig.1.), es un importante organismo modelo para el estudio de los vertebrados en una gran variedad de disciplinas biológicas debido a que presenta una serie de ventajas, como el desarrollo externo y la transparencia del embrión que permiten estudios de su desarrollo temprano. La alta fecundidad y rápida generación facilitan los análisis genéticos y además son fácilmente mantenidos en acuarios (Dooley & Zon 2000). También puede ser utilizado como modelo en química toxicológica para estudiar efectos toxicológicos (Hill *et al.* 2005) y en estudios sobre la psicología neural y neurobiología buscando comparaciones con humanos u otros vertebrados (Perry *et al.* 2010). Por ello, a lo largo de los últimos años, se han realizado numerosos estudios neuroanatómicos y neuroquímicos en embriones de *Danio rerio*. Sin embargo resulta difícil encontrar información sobre las conexiones neurales en el cerebro del pez cebrá en estadios más avanzados, especialmente en el ejemplar adulto (Wullimann & Mueller 2005).



Fig.1. *Danio rerio* (<http://www.theguardian.com/science/2013/sep/15/zebrafish-human-genes-project>)

Danio rerio (Hamilton 1822) filogenéticamente pertenece a la infraclase de los teleósteos, que comprenden el 99% de las especies de la clase Actinopterygii. El género *Danio* pertenece a la familia *Cyprinidae* que comprende más de 3600 especies entre las que se incluyen la carpa *Cyprinus carpio* o el carpín dorado *Carassius auratus*, dos especies de peces de agua dulce muy utilizadas en estudios neuroanatómicos. Los *Cypriniformes* pertenecen al superorden de los *Ostariophysi* que incluye más de 6000 especies con un gran éxito evolutivo, que conservan algunos de los rasgos ancestrales de los actinopterygios como las branquias funcionales, los órganos de la línea lateral o las aletas mediales que se han perdido o modificado en gran medida en los tetrápodos (Metscher & Ahlberg 1999). La organización del cuerpo del pez cebra también es similar al morfotipo general osteictio y la organización general del sistema nervioso o de los órganos de los sentidos es aquel compartido por la mayoría de los gnatóstomos. (Perry *et al.* 2010).

En cuanto a su organización general del sistema nervioso central (Fig.2.), ésta es similar a la de otros vertebrados y sigue el patrón general de los teleósteos. A lo largo del eje antero-posterior el sistema nervioso central se puede dividir en cuatro partes de las cuales la médula dividida en médula oblongata y médula espinal y protegida por los huesos de la columna vertebral, es la parte más caudal. Es seguida en su parte anterior por el rombencéfalo, la parte más caudal del encéfalo dentro del cráneo. El prosencéfalo es el área más extensa y rostral del cerebro, separado del rombencéfalo por el mesencéfalo. Estas cuatro regiones pueden ser divididas en otras áreas morfológicas y funcionales, el prosencéfalo durante el desarrollo dará lugar a dos vesículas: la más anterior el prosencéfalo secundario y el diencéfalo situado más caudalmente. El techo óptico y el cerebelo surgirán del mesencéfalo y el rombencéfalo respectivamente (Wullimann 1998; Perry *et al.* 2010).

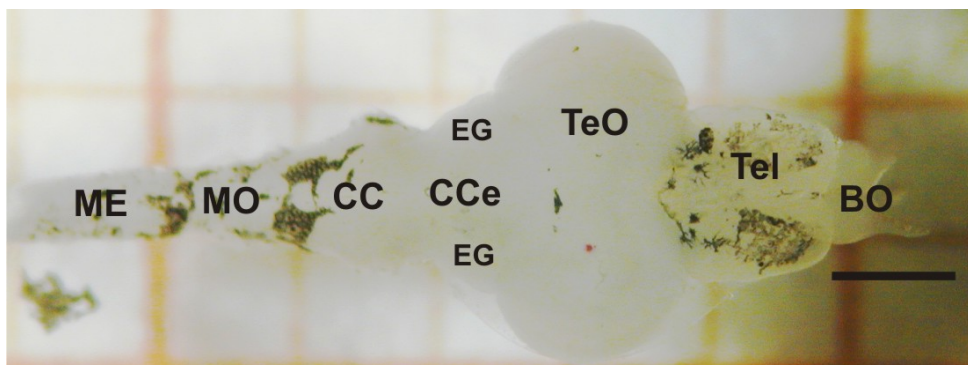


Fig.2. Vista dorsal del encéfalo de *Danio rerio*. La barra de escala es de 1 cm

2. Cerebelo

El cerebelo está implicado en una gran variedad de funciones emocionales y cognitivas (Roberts *et al.* 2002; Rodríguez *et al.* 2005; Ito 2008), siendo esencial para la coordinación y la planificación del movimiento además de para el aprendizaje de las tareas motoras y el almacenamiento de esta información. El cerebelo integra la información sensorial y predictiva, incluyendo la propiocepción y la información motora para obtener el preciso control motor (Bell 2002; Ito 2002, 2006; Bell *et al.* 2008; Bae *et al.* 2009).

En *Danio rerio* al igual que en el resto de teleósteos, el cerebelo es una estructura pronunciada claramente visible en la superficie del cerebro que representa la especialización más rostral de la zona romboencefálica dorsal, surgiendo de la parte rostral de la placa alar (Meek & Nieuwenhuys 1998). Su cerebelo también presenta el típico cortex de tres capas con tipos celulares y circuitos internos comparables con la mayoría de los otros gnatóstomos. Además las conexiones aferentes del cerebelo de *Danio rerio* son similares a las de los tetrápodos, lo que sugiere que el cerebelo pudo haber tenido funciones ancestrales y/o conservadas en todos los gnatóstomos de aprendizaje y coordinación. (Perry *et al.* 2010)

El cerebelo de teleósteos está compuesto por tres partes principales: el lóbulo vestibulolateral que abarca la eminencia granular (EG) y el lóbulo caudal cerebelar (LCa), el corpus del cerebelo (CCe) y la válvula del cerebelo (Va) (Meek 1992; Wullimann *et al.* 1996; Meek & Nieuwenhuys 1998; Miyamura & Nakayasu 2001; Folgueira *et al.* 2006; Bae *et al.* 2009).

La **región caudal del cerebelo** suele ser denominada como el lóbulo vestibulolateral a causa de sus conexiones aferentes y eferentes con la región octavolateral rombencefálica (Bass 1982; Murakami & Morita 1987; Meek & Nieuwenhuys 1998; Folgueira *et al.* 2006). Consiste en dos subdivisiones principales:

- Las eminencias granulares: Son masas de células granulares visibles en la superficie exterior del encéfalo y que dan lugar a las crestas cerebelares (capa de fibras paralelas que se encuentran sobre la región de la línea lateral rombencefálica (Maler 1974; Bass 1982).
- El lóbulo caudal cerebelar: Abarca la parte más caudal de la capa molecular cerebelar localizada entre las eminencias granulares y los grupos de células granulares y de Purkinje asociadas con su capa molecular (Maler 1974; Bass 1982). Se distingue de la parte caudal del corpus por disposiciones diferentes de las células de Purkinje que se encuentran espaciadas en la capa molecular (Bass 1982; Meek 1992; Meek & Nieuwenhuys 1998)

El **corpus del cerebelo** es la parte central del cerebelo de los teleósteos, consistente en una protrusión dorsal del cerebro (Folgueira *et al.* 2006). El corpus del cerebelo de los teleósteos puede ser considerado como un único lóbulo tubular formado por tres capas principales (Meek & Nieuwenhuys 1998):

- Una capa molecular externa: contiene células estrelladas dispersas, las dendritas de las células de Purkinje y otras grandes neuronas del cerebro además de fibras paralelas procedentes de células granulares.
- Una capa gangliolar intermedia: formada por células de Purkinje y neuronas eurydendroides de las cuales surgirán las conexiones cerebelares eferentes (Pouwels 1978a, b; Murakami & Morita 1987).

- Capa profunda granular: formada por células granulares que reciben entradas de fibras musgosas, proyecciones de las células de Purkinje, dendritas de las células eurydendroides y de las células estrelladas (Pouwels 1978a, b; Meek & Nieuwenhuys 1998; Folgueira *et al.* 2006).

Aunque estas tres capas también están presentes en la válvula cerebelar y en el lóbulo caudal, el orden y la disposición de estas capas es, aparentemente, el inverso de aquel descrito anteriormente en el corpus del cerebelo, como resultado de la inversión de la placa cerebelar embrionaria en el ventrículo del mesencéfalo (Meek & Nieuwenhuys 1998).

Una extensión rostral del corpus del cerebelo en el ventrículo mesencefálico forma la **válvula del cerebelo**, que está únicamente presente en los peces actinoptergios (Kappers *et al.* 1936) y se localiza en el ventrículo mesencefálico bajo el techo óptico (Folgueira *et al.* 2006). La válvula cerebelar en ciprínidos es muy larga y plana (Meek 1992) y se divide en dos zonas por una fisura longitudinal: en la válvula lateral y la medial. La válvula lateral se caracteriza por tener una capa de células granulares externa (Wullimann & Northcutt 1988; Lannoo *et al.* 1991; Meek & Nieuwenhuys 1998)

La válvula del cerebelo también posee una peculiar distribución de las células de Purkinje y de las células granulares respecto a la capa molecular. En su mayor parte, las células granulares no están localizadas bajo la capa de células de Purkinje, sino que están situadas lateralmente a la capa molecular dando lugar a fibras paralelas sin ninguna ramificación. En ciprínidos las células de Purkinje de la válvula se encuentran parcialmente dispersas dentro de la capa molecular, al igual que sucede en el lóbulo caudal cerebelar (Meek 1992).

3. Techo óptico

El techo mesencefálico, techo óptico o tectum es una estructura pareada que cubre el ventrículo mesencefálico y que domina tanto el aspecto dorsal como lateral del cerebro de muchos teleósteos. El techo óptico es la principal entrada de las fibras ópticas retinales que proyectan un mapa retinotópico organizado al tectum. Tiene una forma convexa que se aplanan en dirección dorsoventral y que se conecta lateroventralmente con el tegumento mesencefálico y rostroventralmente con la zona unión mesencéfalo-dicencéfalo pretectal (Meek & Nieuwenhuys 1998).

Los límites mediodorsales de las dos mitades tectales están conectados entre sí por medio de la comisura intertectal y con una cresta pareada de células granulares, localizadas ventralmente a esta comisura, denominada toro longitudinal (Meek & Nieuwenhuys 1998).

El techo mesencefálico no solo está envuelto en el procesamiento de la información visual como sugiere su inervación sustancial por las fibras ópticas, sino que también está envuelto en la integración de señales visuales a partir de la información sensorial proveniente de otros sentidos y la coordinación y generación de movimientos dirigidos a un objetivo. Además de tareas de orientación integrada como la identificación y localización de objetos. Por ello puede ser considerado uno de los centros sensitivomotores principales en el sistema nervioso central de teleósteos (Meek & Nieuwenhuys 1998; Wullimann 1998).

El techo óptico está formado por hasta 15 láminas de neuronas y neurópilos que reciben entradas multimodales de varias fuentes que incluyen la retina además de centros visuales adicionales como el

tálamo dorsal y ventral, el pretecho y el núcleo del istmo, pero también de fuentes no visuales como el toro longitudinal o el telencéfalo. Además, el techo óptico presenta una estratificación diferente. En todos los teleósteos se pueden distinguir 7 capas tangenciales principales que se componen de diferentes fibras y células. Desde la piamadre hasta el ventrículo las capas se llaman: (Meek & Nieuwenhuys 1998; Wullimann 1998)

- Extracto fibroso marginal (SM): es la capa más superficial consistente en fibras paralelas amielínicas que se originan a partir del toro longitudinal y que terminan en las dendritas apicales de las neuronas bipolares más profundas.
- Extracto óptico (SO): contiene el grueso de las fibras de la retina que terminan en la capa 5.
- Extracto fibroso y gris superficial (SFGS) que consiste en una gran variedad de elementos neuronales.
- La capa central tectal o el extracto grisáceo central (SGC) puede ser subdividido en la capa 4, la capa interna plexiforme y la capa 3 más profunda que contiene una gran variedad de dendritas axones y cuerpos celulares.
- Extracto álbum central (SAC): contiene el grueso de las fibras tectales eferentes y los somas de las largas células multipolares eferentes.
- La capa más profunda, el extracto periventricular (SPV) contiene neuronas densamente empaquetadas, que tienen sus dendritas y las ramificaciones axonales en las capas tectales más superficiales.

Abreviaturas

BC	<i>Brachium conjunctivum</i>	Dm	Área telencefálica dorsal, zona medial
BO	Bulbo olfatorio	DP	Núcleo talámico dorsal posterior
Cans	Comisura <i>ansulata</i>	Dp	Área telencefálica dorsal, zona posterior
CC	Cresta cerebelar	EG	Eminencia granular
CCe	Corpus del cerebelo	EW	Núcleo de Edinger-Westphal
CCer	Comisura cerebelar	FLL	Fascículo longitudinal lateral
Cgus	Comisura del núcleo gustatorio secundario	FLM	Fascículo longitudinal medial
Chab	Comisura habenuar	FR	Fascículo retroflexo
Chor	Comisura horizontal	FRI	Formación reticular intermedia
CM	Cuerpo mamilar	FRS	Formación reticular superior
CMC	Capa molecular del cerebelo	GC	Gris central
CP	Núcleo talámico central posterior	Hav	Núcleo de la habénula ventral
Cpost	Comisura posterior	I	Núcleo talámico intermedio
Ctec	Comisura tectal	LCa	Lóbulo caudal del cerebelo
Ctub	Comisura del tubérculo posterior	LI	Lóbulo inferior del hipotálamo
Cven	Comisura ventral del rombencéfalo	LVII	Lóbulo facial
Dc	Área telencefálica dorsal, zona central	LX	Lóbulo del vago
Dd	Área telencefálica dorsal, zona dorsal	ME	Médula espinal
DI	Área telencefálica dorsal, zona lateral	MO	Médula oblongada

2014

NALL	Nervios anteriores de la línea lateral	T	Núcleo tangencial
NCP	Núcleo de la comisura posterior	Tel	Telencéfalo
NFLM	Núcleo del fascículo longitudinal medial	TeO	Techo óptico
NGS	Núcleo gustatorio secundario	TL	Toro longitudinal
NI	Núcleo del istmo	TO	Tracto óptico
NIIn	Núcleo interpeduncular	TOC	Tracto olivo-cerebelar
NLV	Núcleo lateral de la válvula	TOM	Tracto olfatorio medial
NmVd	Parte dorsal del núcleo motor del trigémino	TOV	Tracto óptico ventrolateral
NOA	Núcleo octavo anterior	TPC	Tracto pretecto-cerebelar
NOM	Núcleo octavolateral medial	TPp	Tubérculo posterior, núcleo periventricular
NPA	Núcleo pretectal accesorio	TSc	Toro semicircular, núcleo central
NPC	Núcleo pretectal central	TSvl	Toro semicircular núcleo ventrolateral
NTA	Núcleo del tubérculo anterior	TTB	Tracto tectobulbar
NTD	Núcleo tegmental dorsal	TTBc	Tracto tectobulbar cruzado
OI	Oliva inferior	TTBr	Tracto tectobulbar recto
P	Núcleo talámico posterior	TTM	Tracto telencefálico medial
PC	Tracto posterior del cerebelo	Val	Válvula cerebelar lateral
PGL	Núcleo pregglomerular lateral	Vam	Válvula cerebelar medial
PGm	Núcleo pregglomerular medial	VC	Válvula cerebelar
PMs	Núcleo pretectal magnocelular superficial	Vd	Núcleo dorsal del área telencefálica ventral
PO	Núcleo pretectal posterior	VL	Núcleo talámico ventrolateral
PPa	Núcleo preóptico parvocelular anterior	VI	Núcleo lateral del área telencefálica ventral
PPd	Núcleo pretectal periventricular dorsal	VM	Núcleo talámico ventromedial
PPp	Núcleo preóptico parvocelular posterior	Vp	Núcleo postcomisural del área telencefálica ventral
PPs	Núcleo pretectal parvocelular superficial	Vv	Núcleo ventral del área telencefálica ventral
PPv	Núcleo pretectal periventricular ventral	ZGP	Zona gris periventricular del techo óptico
QO	Quiasma óptico		
R	Núcleo rostralateral	III	Nervio oculomotor
RL	Receso lateral del ventrículo diencefálico	VIII	Nervio octavo
SG	Núcleo subglomeruloso	X	Nervio vago

OBJETIVOS

Los objetivos planteados para este Trabajo fin de Grado son:

1. Caracterizar mediante trazadores neuronales la organización de las proyecciones del cerebelo y el techo óptico de pez cebra, de modo que se puedan identificar los diferentes núcleos, tractos y áreas de terminación que están implicados en la integración de la información sensorio-motora de estas dos áreas del encéfalo.
2. Determinar las diferentes vías de integración del cerebelo y del techo óptico distinguiendo sus proyecciones aferentes de las eferentes.
3. Comparar neuroanatómicamente los resultados obtenidos en el pez cebra con aquellos disponibles en otras especies haciendo especial hincapié en aquellos de especies afines como el carpín dorado (*Carassius auratus*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron 8 peces cebra adultos (*Danio rerio*) de ambos sexos de entre 25 y 40 mm de longitud estándar que fueron obtenidos de un proveedor local y mantenidos de forma adecuada en el acuario del laboratorio de Biología Celular. Todos estos procedimientos fueron realizados conforme a las directrices de la comunidad europea sobre el cuidado de los animales y la experimentación.

Estos ejemplares nada más ser extraídos del acuario en el que se encontraban fueron anestesiados por inmersión en una solución del 0,1% de metanosulfonato de triclaína (MS-222; Sigma, St. Louis, MO). A continuación se perfundieron intracardialmente con un fijador de paraformaldehído al 4% con tampón fosfato 0,1M y con un pH de 7,4-7,5 sobre una placa Petri con un polímero sólido transparente (elastómero de silicona, SYLGARD®) bajo un microscopio estereoscópico. Para la perfusión se utilizó una cánula que se insertó transcárdialmente en el ventrículo, se realizó una pequeña incisión a nivel de la aurícula para dejar salir del sistema circulatorio la sangre y el exceso de fijador y se introdujo el fijador con una jeringa de 10ml acoplada a la aguja. Tras la perfusión los encéfalos fueron extraídos de la cavidad craneal (excepto aquellos en los que el área a marcar fuera accesible desde el exterior que se marcaban "in toto") y mantenidos en el mismo fijador durante un periodo de al menos unas 24 horas a una temperatura de 4°C.

Se realizaron marcajes simples y dobles para determinar las proyecciones cerebelares y tectales. Para los marcajes simples se utilizaron pequeños cristales del trazador Dil (perclorato 1,1'- dioctadecil- 3, 3, 3',3'- tetrametilindocarbocianina, Molecular Probes- INVITROGEN) que por su naturaleza lipofílica se inserta en las membranas, transportándose mediante difusión lateral de forma tanto anterógrada como retrógrada y además emite fluorescencia rojizo-anaranjada (con un máximo de emisión de 565nm y un máximo de excitación de 549nm). Los cristales se aplicaron manualmente con una aguja entomológica bajo un microscopio estereoscópico.

Los marcajes fueron realizados en el en el techo óptico (dos ejemplares, uno marcado dorsoventralmente y otro dorsolateralmente), en el corpus cerebelar (un ejemplar), en la eminencia granular (un ejemplar), en el lóbulo caudal del cerebelo (un ejemplar) y en la válvula lateral (un ejemplar). Para realizar este último marcaje fue necesario retirar parte del techo óptico dorsal. El punto de aplicación del cristal se selló con agarosa al 3% fundida para fijar el cristal sobre la estructura de interés y evitar la dispersión del trazador a otras áreas adyacentes. Los encéfalos se mantuvieron en una solución de paraformaldehído y se incubaron durante dos semanas en oscuridad y a una temperatura de 37°C para asegurar el transporte del trazador.

También se realizaron dobles marcajes en dos ejemplares de pez cebra, en uno de ellos se aplicó el trazador Dil en el lado izquierdo del corpus cerebeloso y el trazador DiO (dioctadeciloxacarbocianina perclorato, Molecular Probes-INVITROGEN) en el lado derecho de la válvula lateral. En el otro en cambio se aplicó Dil en el lado derecho de la válvula lateral y DiO en la mitad tectal izquierda hacia su parte dorsomedial. Se utilizó el trazador DiO porque las diferencias con el rango de longitud de onda del Dil (DiO emite dentro de las longitudes de onda del verde con un máximo de emisión de 501nm y un máximo de excitación de 484nm) permiten contrastar fácilmente ambos marcajes. Sin embargo, los marcajes con DiO no funcionaron tan bien como aquellos realizados con Dil, ya que este trazador tiene un rango de difusión mucho menor. Los encéfalos se mantuvieron en una solución de paraformaldehído y se incubaron durante seis días en oscuridad y a una temperatura de 37°C.

Al terminar el periodo de incubación se realizaron fotografías de los encéfalos con una cámara digital (coolpix, NIKON) adaptada a una lupa binocular para dejar constancia del punto exacto de aplicación del trazador (Fig.3.). Los encéfalos se incluyeron en un bloque de agarosa al 3% en PB y se cortaron transversalmente en secciones de entre 70 y 80µm de grosor con un vibratomo (Campden Instruments, UK). Las secciones se depositaron sobre portaobjetos gelatinizados.

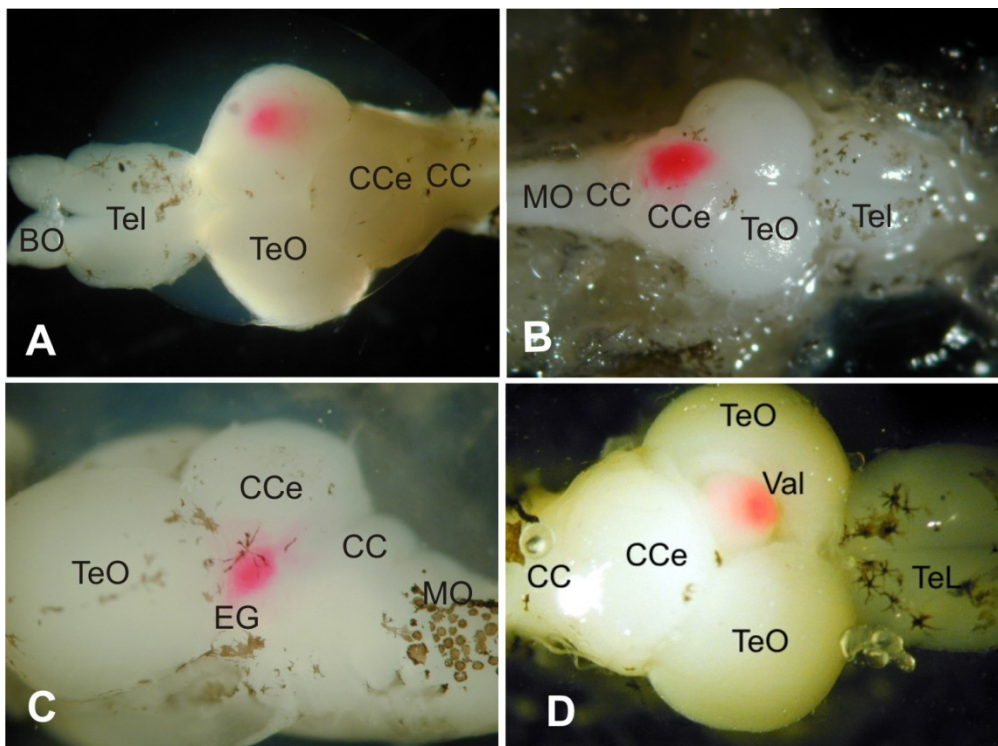


Fig.3. Microfotografías de encéfalos de ejemplares de pez cebra mostrando las regiones del encéfalo desde donde difundieron los cristales de Dil tras dos semanas de incubación **A**: Techo óptico **B**: Corpus del cerebelo **C**: Eminencia granular **D**: Válvula cerebelar (expuesta tras la ablación homolateral del techo óptico).

Finalmente las secciones obtenidas del vibratomo se montaron en portaobjetos gelatinizados con PB: glicerina (1:1), se observaron y se fotografiaron con una cámara (coolpix, NIKON) asociada a un microscopio de fluorescencia equipado con un conjunto de filtros. Para visualizar el Dil se utilizó el filtro optimizado para Texas red cuya longitud de onda es similar a la del Dil (longitud de emisión de 624-40nm y de excitación de 562-40nm) y para ver el DiO fue necesario el filtro optimizado de fluoresceína, FITC (longitud de emisión 536-40nm y de excitación 482-35nm). Los bloques de filtros de doble banda GFP/DS-red (longitud de emisión del GFP de 500-30 y de excitación 450-90; longitud de emisión del DS-red de 570-680 y de excitación 540-70) y FITC/Texas Red fueron utilizados para observar los marcajes dobles. Las fotografías se tomaron en su mayoría con los objetivos x10 y x20 (pero también algunas con los objetivos x4 y x40).

Por último se realizaron los dibujos esquemáticos de las distintas secciones del cerebelo y el techo óptico con el programa CorelDRAW X3 a partir de las fotografías tomadas previamente. Con el mismo CorelDRAW X3 también se realizaron las plantillas de imágenes y se editaron las imágenes (brillo, contraste, perfilado, inversión y conversión a escala de grises).

La nomenclatura de las diferentes áreas y núcleos del cerebro está basada en Wullimann et al. (1996).

RESULTADOS

1. Cerebelo

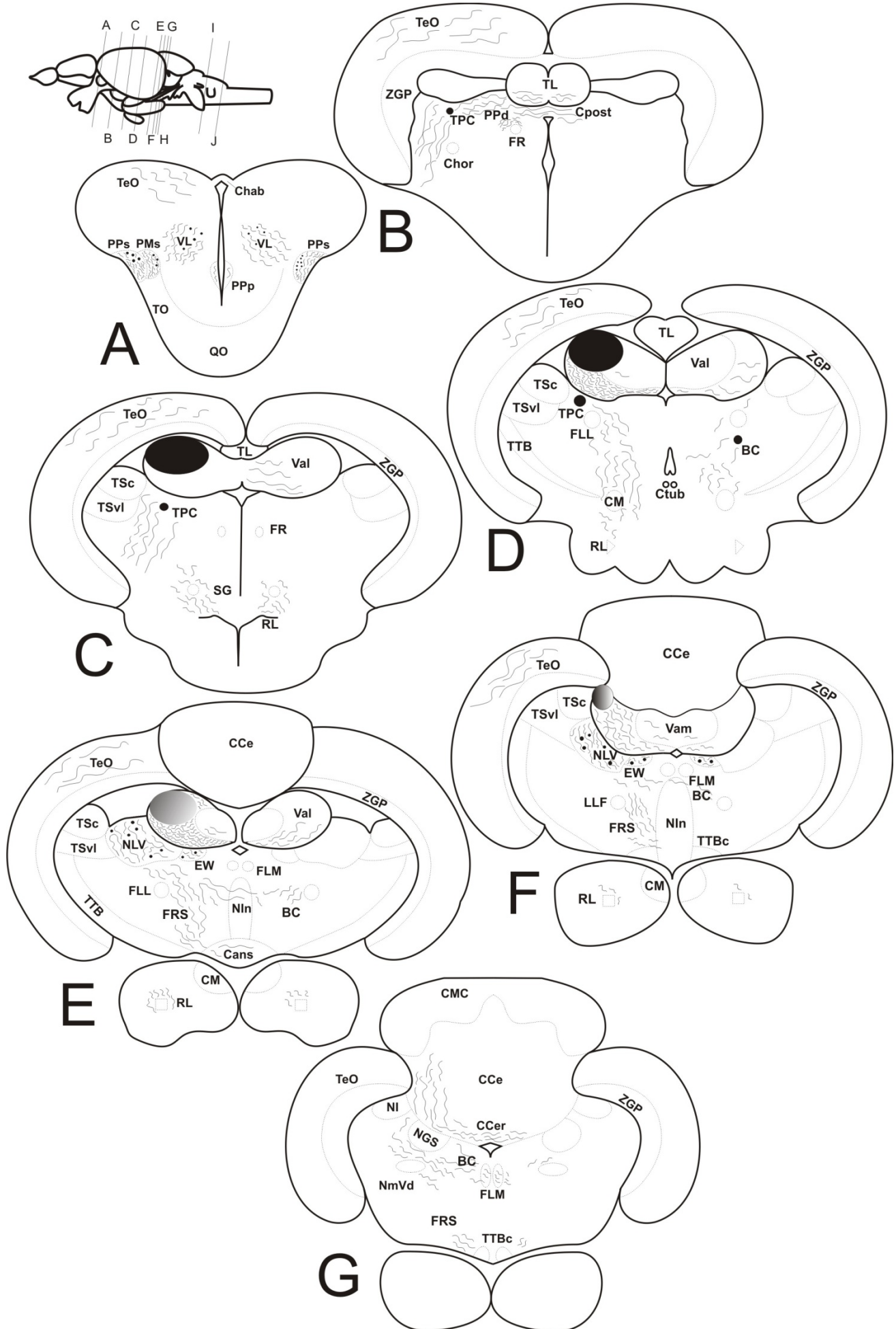
Válvula del cerebelo

Aferencias

La aplicación de Dil y DiO en la válvula lateral rostral del cerebelo produjo la tinción de células a nivel del techo óptico (mesencéfalo), cerebelo (rombencéfalo) y médula oblongada de modo tanto ipsilateral como contralateral (Fig.4. y Fig.5.). Los núcleos pretectales en los que se observaron células marcadas retrógradamente fueron: el núcleo pretectal parvocelular superficial y el núcleo preóptico parvocelular posterior ambos marcados bilateralmente y el núcleo pretectal magnocelular superficial ipsilateral. Además al mismo nivel también se observan células redondeadas y fibras bilaterales en la región del tálamo ventrolateral (Figs.4A, 5 A-B). A nivel rostral del rombencéfalo se pueden observar numerosas células con una forma similar a las granulares en el núcleo lateral de la válvula ipsilateral (Figs. 4E-F, 5 G-H) y en el núcleo de Edinger-Westphal cuyas fibras se cruzan hacia el lado contralateral por la región ventral cercana al nervio oculomotor (Figs. 4E-F, 5 G). También se observaron algunas células en la región trigeminal cerca del núcleo sensitivo del trigémino (Figs. 4H, 5J). Hacia la médula oblongada rostroventral aparecieron numerosas células redondeadas teñidas en la oliva inferior contralateral que envían fibras ascendentes hacia la válvula por medio del tracto olivo-cerebelar (Figs. 4 I-J, 5K-L).

Eferencias

En cuanto a eferencias, la aplicación de Dil y DiO dio lugar al marcaje de numerosas fibras, tanto ipsilaterales como contralaterales. Una gran cantidad de fibras atraviesan el encéfalo por el tracto pretecto-cerebelar desde el núcleo de la válvula lateral hasta el mesencéfalo anterior por su lado ipsilateral (Figs. 4 B-D, 5C) e inervan la región ventral del toro longitudinal pasando por el núcleo pretectal periventricular dorsal y cruzando a través de la comisura posterior (Figs. 4B, 5C-D). Las fibras eferentes de la válvula viajan a través del *brachium conjunctivum* (Figs. 4D-G, 5G) cuyas fibras se emiten por la válvula cerebelar ipsilateral, cruzan por el fascículo longitudinal medial y llegan al tegmento contralateral pasando por el núcleo periventricular del tubérculo posterior antes de terminar en las cercanías del núcleo rojo. Además la válvula del cerebelo envía fibras bilaterales al hipotálamo que se dirigen al receso lateral rodeando el cuerpo mamilar y cruzan hacia el lado contralateral por medio de la comisura *ansulata* (Figs. 4 C-E, 5 E-G). La región trigeminal recibe fibras de la válvula lateral que cruzan hacia la parte caudal del cerebelo cercana al fascículo longitudinal medial alcanzando la región ventral del cerebelo próxima al tracto tectobulbar cruzado (Figs. 4G-H, 5I-J). También se observaron algunas fibras en el núcleo sensitivo del trigémino (4H, 5J) y en la formación reticular superior (Figs. 4E-H, 5J). Por último, la válvula parece enviar fibras al corpus del cerebelo a través del tracto posterior del cerebelo que cruzan hacia el lado contralateral por la comisura cerebelar (Figs. 4G, 5I).



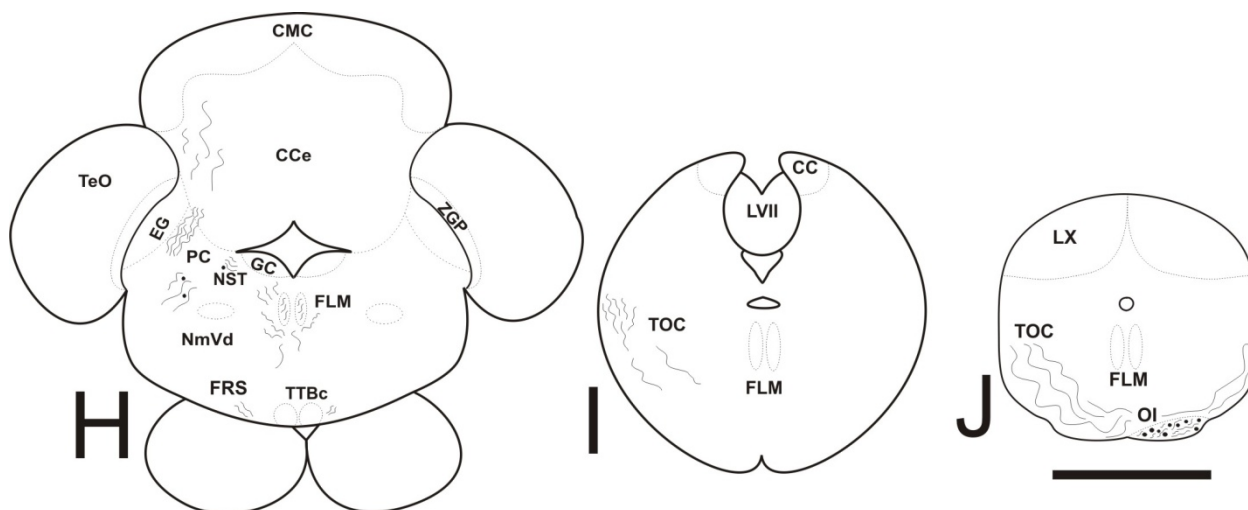
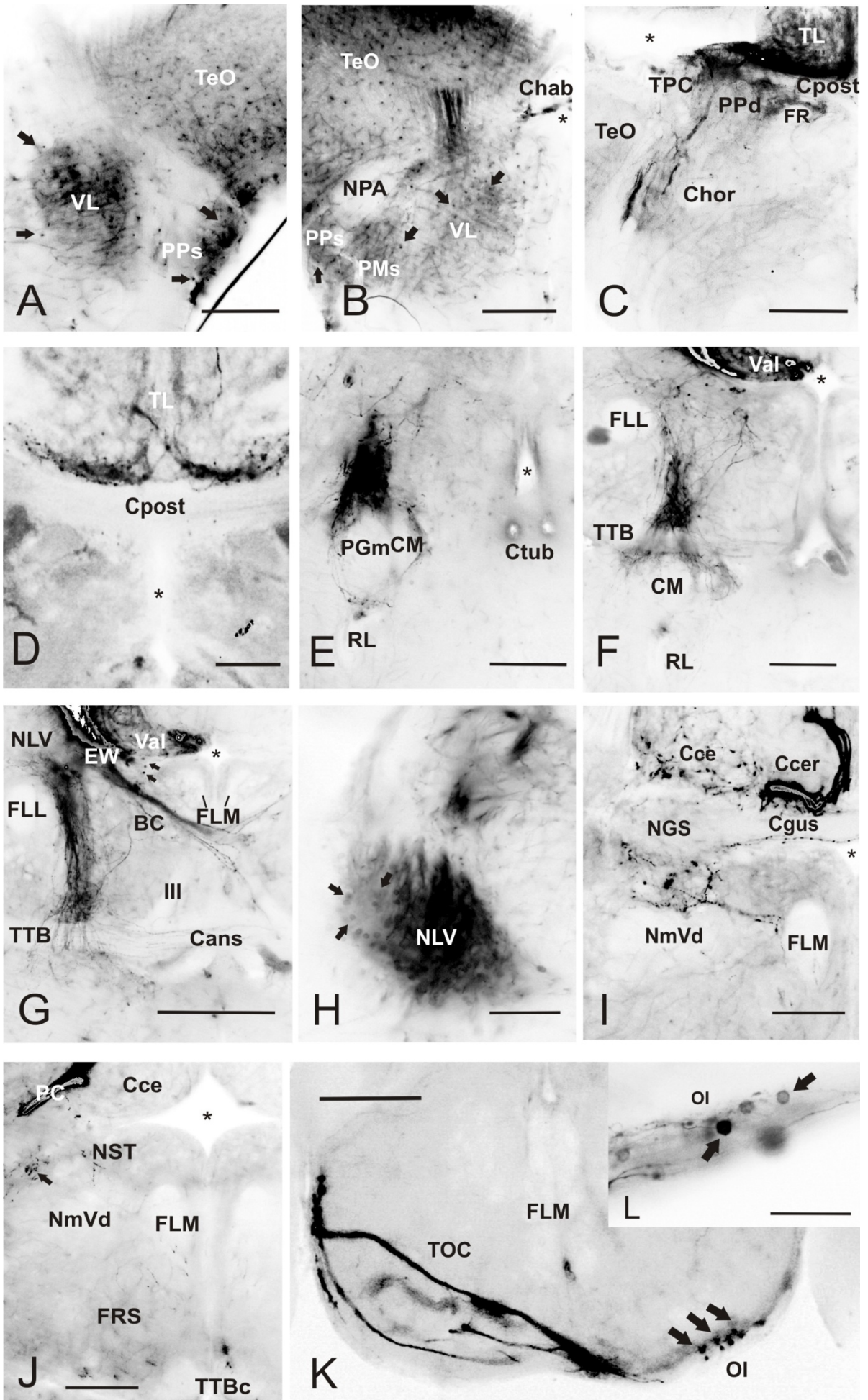


Fig.4. Dibujos esquemáticos de las secciones transversales del encéfalo del pez cebra (A-J) que muestran las células (pequeños círculos sólidos) y las fibras (líneas) tras la aplicación de Dil en la válvula lateral. El área sombreada en C-F muestra el punto de aplicación. Estas imágenes están ordenadas de forma que lo ipsilateral se representa hacia la izquierda y lo contralateral a la derecha. El nivel al que se han realizado las secciones está indicado en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 500 μ m.

Fig.5. Secciones transversales del mesencéfalo (A-F), rombencéfalo (G-J) y médula oblongada (K-L) mostrando las células y fibras marcadas tras la aplicación de Dil a la válvula lateral. Las imágenes están ordenadas de modo que lo ipsilateral queda hacia la izquierda y lo contralateral hacia la derecha. La línea media está representada por los ventrículos que se indican mediante un asterisco. **A:** Células (flechas) y fibras marcadas retrógradamente en el núcleo pretectal parvocelular superficial y en el núcleo talámico ventrolateral. **B:** Células (flechas) y fibras marcadas retrógradamente en el núcleo pretectal parvocelular superficial, en el núcleo pretectal magnocelular superficial y el núcleo talámico ventrolateral, además de algunas fibras marcadas en el techo óptico. **C:** Fibras marcadas anterógradamente en el tracto pretecto-cerebelar, en el núcleo pretectal periventricular dorsal y en el toro longitudinal. **D:** Detalle de fibras en el toro longitudinal. **E:** Fibras en el tracto cerebelo-hipotalámico rodeando al cuerpo mamilar y al núcleo pregglomerular medial. **F:** Tracto cerebelo-hipotalámico y punto de aplicación del trazador neuronal (Dil-DiO) en la válvula lateral. **G:** Válvula lateral emitiendo proyecciones hacia el *brachium conjunctivum*, fibras en el núcleo lateral de la válvula, fibras del tracto cerebelo-hipotalámico cruzando por la comisura *ansulata*, células (flechas) en el núcleo de Edinger-Westphal **H:** Detalle de células (flechas) en el núcleo lateral de la válvula. **I:** Fibras anterógradas en la región trigeminal y en el corpus del cerebelo cruzando por la comisura cerebelar hacia el lado contralateral. **J:** Tracto posterior del cerebelo, fibras anterógradas en la región trigeminal, en la formación reticular superior y en el núcleo sensitivo del trigémino, también algunas células en la región trigeminal (flecha). **K:** Células marcadas retrógradamente en la oliva inferior (flechas) y fibras en el tracto olivo-cerebelar. **L:** Detalle de células (flechas) de la oliva inferior. Las barras de escala son de 200 μ m A-C, E-G, I-K, de 100 μ m en D, H y de 50 μ m en L.



Corpus del cerebelo

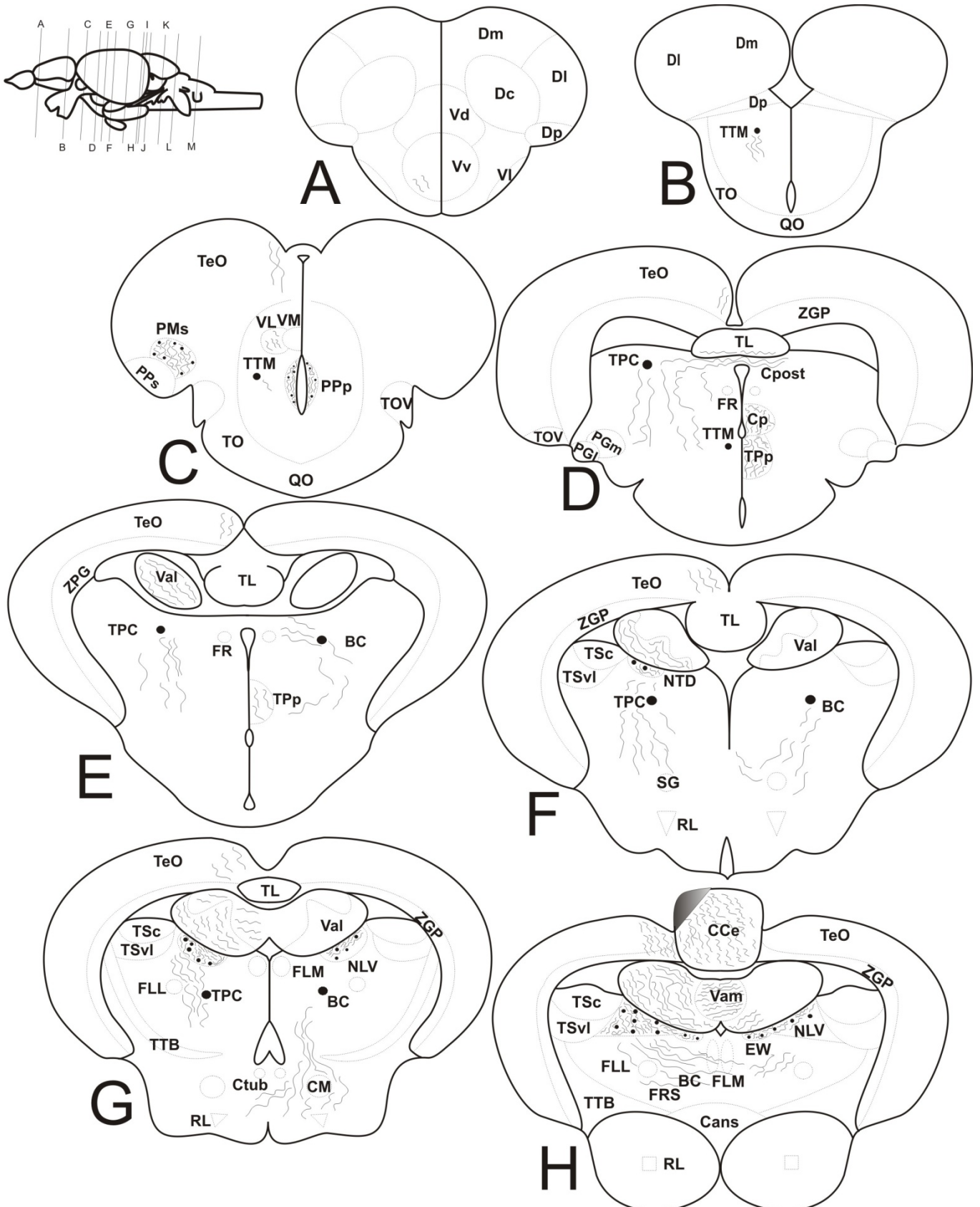
Aferencias

La aplicación de Dil y DiO en el corpus del cerebelo dio lugar a células y fibras marcadas a diferentes niveles rostrocaudales: en el mesencéfalo, rombencéfalo y médula oblongada (Fig.6 y Fig.7) predominantemente ipsilaterales. Al nivel más rostral del mesencéfalo se marcaron las células y fibras del núcleo pretecal magnocelular superficial ipsilateral (Figs. 6C, 7D) y del núcleo preóptico parvocelular posterior bilateral (Fig. 6C). En el mesencéfalo caudal, una importante aferencia al corpus cerebelar es el núcleo lateral de la válvula que presenta células morfológicamente similares a las granulares e intensamente teñidas bilateralmente (Figs. 6G, 6H, 7H, 7J) cuyos axones dorsales al fascículo longitudinal lateral atraviesan desde el lado ipsilateral hacia el contralateral. El núcleo de Edinger-Westphal (Figs. 6H, 7H, 7J) que aparece próximo al núcleo lateral de la válvula, al nivel de la entrada del nervio oculomotor también presenta somas redondeados. Rostralmente al núcleo lateral de la válvula, aparece el núcleo tegmental dorsal (Figs. 6F, 7G) también situado bajo la válvula lateral con algunas células que proyectan hacia el corpus del cerebelo. En el rombencéfalo se pueden observar numerosas células redondeadas en el núcleo sensitivo del trigémino (Figs. 6I-J, 7L-M) que aparece en una posición ventral al corpus del cerebelo, estas se sitúan principalmente en el lado ipsilateral al marcaje con Dil o DiO pero también se observan algunas en el lado contralateral. En el área octavolateral aparecieron algunas células teñidas en una posición dorsal cercana al núcleo octavo anterior ipsilateral (Figs. 6J, 7L). Al igual que en la válvula cerebelar, en la médula oblongada rostroventral se observaron numerosas células redondeadas marcadas retrógradamente en la oliva inferior contralateral (Figs. 6L, 7Ñ-O) que envían fibras ascendentes hacia la válvula por medio del tracto olivo-cerebelar que cruza del lado contralateral al ipsilateral (Figs. 6K-L, 7N-Ñ).

Eferencias

La aplicación de Dil y DiO en el corpus del cerebelo causó la aparición de numerosas fibras teñidas tanto ipsilaterales como contralaterales a distintos niveles del corpus del cerebelo (del telencéfalo a la médula oblongada). La mayor parte de las fibras atraviesan el encéfalo a partir del tracto preteco-cerebelar (Figs. 6D-G, 7D-E, 7G) que transcurre ipsilateralmente entre los núcleos pretecales y el cerebelo, enviando principalmente aferencias al cerebelo. Las fibras viajan por el telencéfalo mediante el tracto telencefálico medial (Figs. 6B, 7B-C, 7E) ipsilateral, inervando el núcleo ventral del área telencefálica ventral (Figs. 6A, 7A). Fibras procedentes del tracto preteco-cerebelar, descendieron por la comisura posterior y entraron en la parte ventral del toro longitudinal rostral (Figs. 6D, 7F). Las fibras eferentes del corpus viajan a través del *brachium conjunctivum* (6E-H, 7I), estas fibras que proceden del corpus del cerebelo ipsilateral, cruzan por el fascículo longitudinal medial y llegan al tegmento contralateral pasando por el núcleo periventricular del tubérculo posterior (Figs. 6D-E, 7E, 7G) antes de terminar en las cercanías del núcleo rojo (núcleo situado en las proximidades del fascículo retroflexo). En el área talámica también aparecieron eferencias en la región del núcleo talámico ventrolateral ipsilateral (Figs. 6C, 7C) y en el núcleo talámico central posterior (Figs. 6D, 7E, 7G). En la parte dorsal del núcleo subglomeruloso las proyecciones del *brachium conjunctivum* se juntan con la proyección del corpus del cerebelo al hipotálamo cuyas fibras al alcanzar una posición más caudal rodean al cuerpo mamilar dirigiéndose hacia el receso lateral (Figs. 6F-G, 7I). Una gran cantidad de células granulares y de células de Purkinje se tiñeron solo por la parte ipsilateral de la válvula (Figs. 6E-H, 7H). En la región rombencéfálica se observa el corpus del cerebelo intensamente teñido de forma ipsilateral, cuyas fibras laterales cruzan a partir de la comisura cerebelar (Figs. 6H-K, 7J-K, 7M) y envían fibras por el tracto posterior del cerebelo (6J, 7L-M). También se observan algunas fibras en la región del fascículo reticular

superior (Figs. 6H-I). El área trigeminal ipsilateral (Figs. 6I-J, 7K-M) recibe fibras del corpus del cerebelo que descienden lateralmente hacia el núcleo gustatorio secundario, alcanzando el fascículo longitudinal medial. El área octavolateral recibe proyecciones descendentes del corpus en el núcleo octavolateral anterior (Figs. 6J, 7L). Por último en otras regiones del cerebelo como la eminencia granular (Fig. 6K) y el lóbulo caudal (Figs. 6K, 7N) también se observan fibras procedentes del cerebelo, posiblemente por transferencia directa desde la región marcada por el trazador.



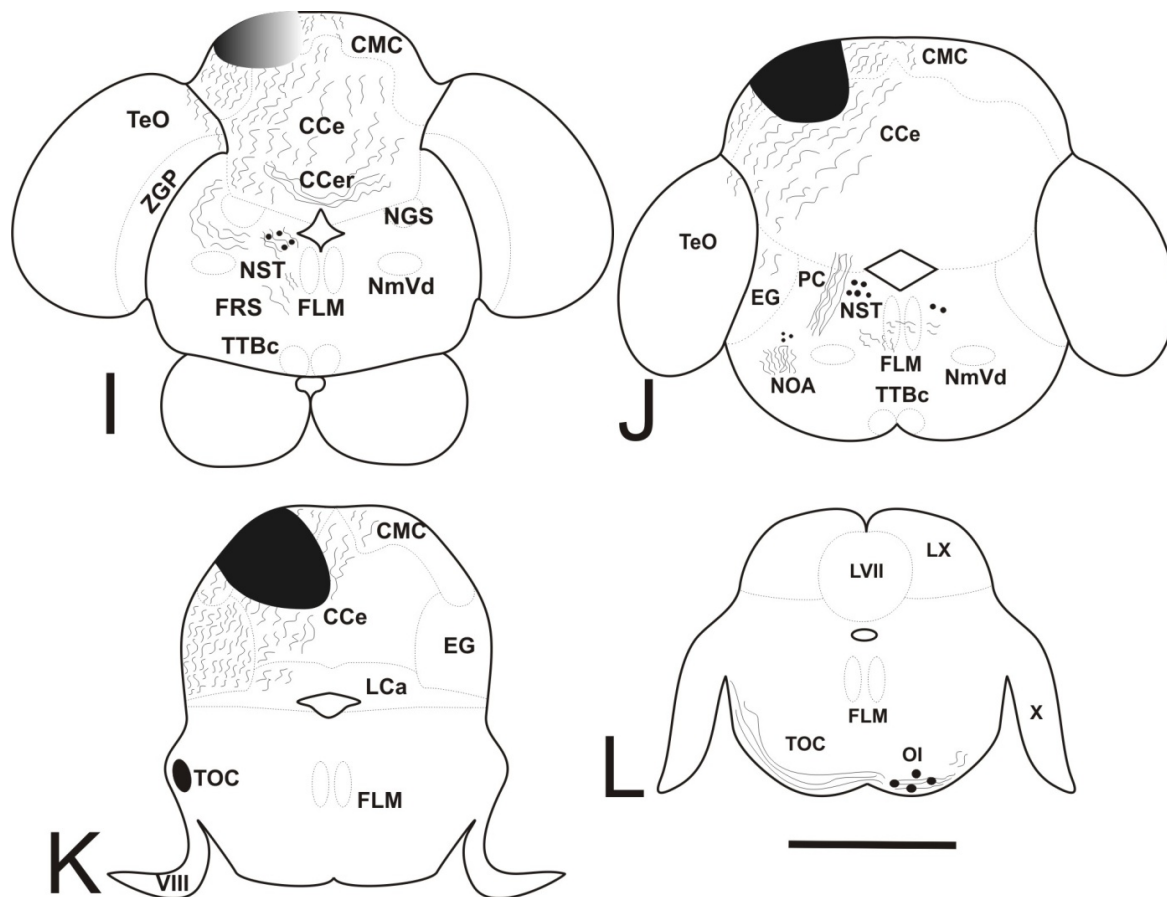
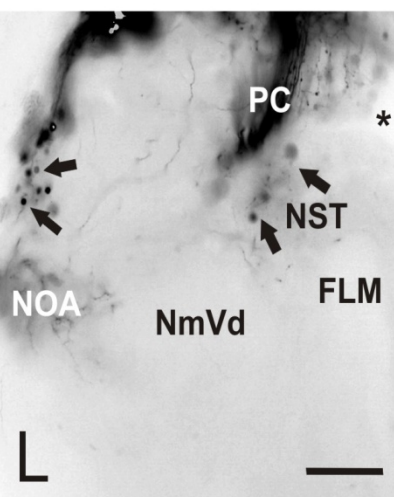
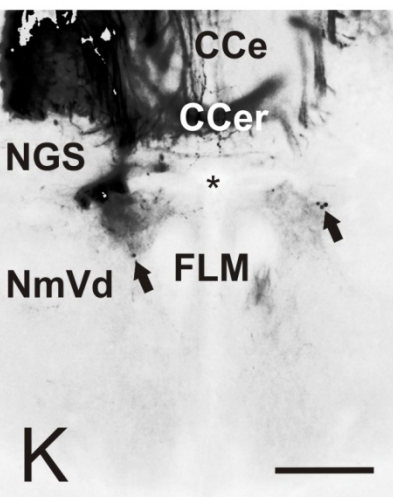
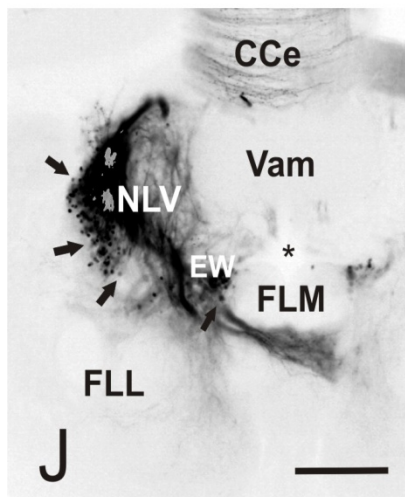
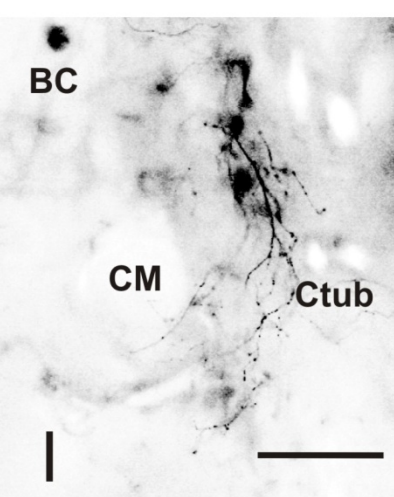
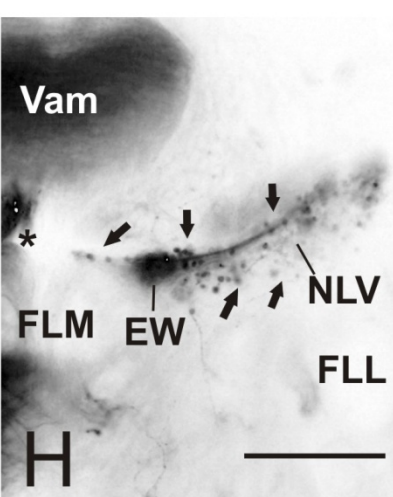
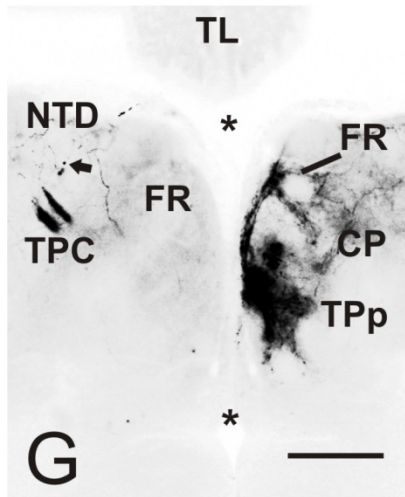
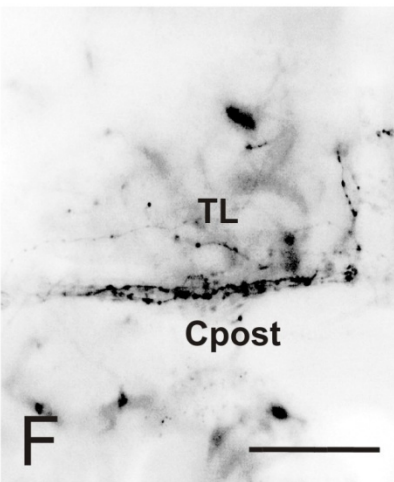
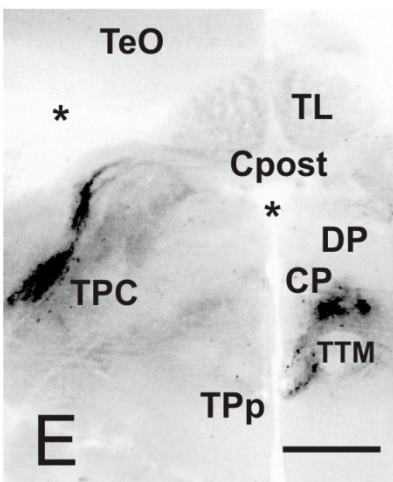
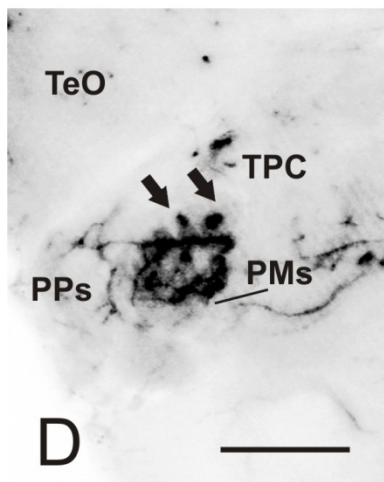
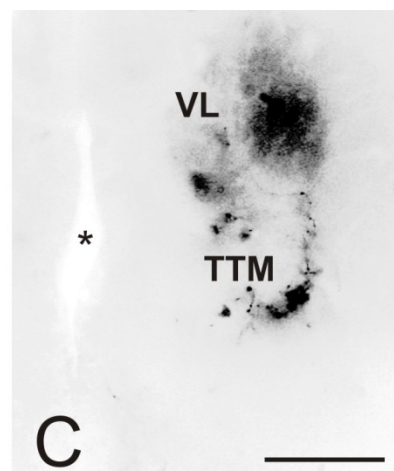
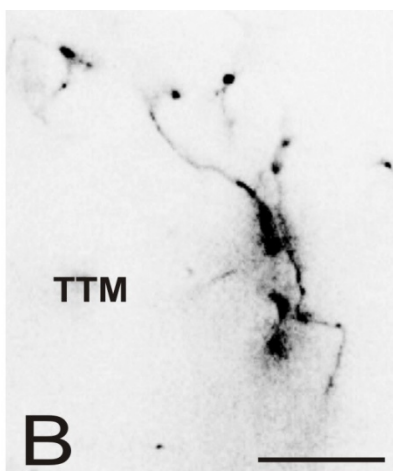
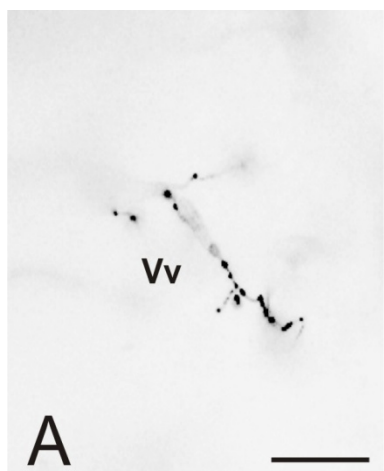


Fig.6. Dibujos esquemáticos de las secciones transversales del encéfalo del pez cebra (A-L) que muestran las células (pequeños círculos sólidos) y las fibras (líneas) tras la aplicación de Dil en el corpus del cerebelo. El área sombreada en H-K muestra el punto de aplicación. Estas imágenes están ordenadas de forma que lo ipsilateral se representa hacia la izquierda y lo contralateral a la derecha. El nivel al que se han realizado las secciones está indicado en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 500µm.



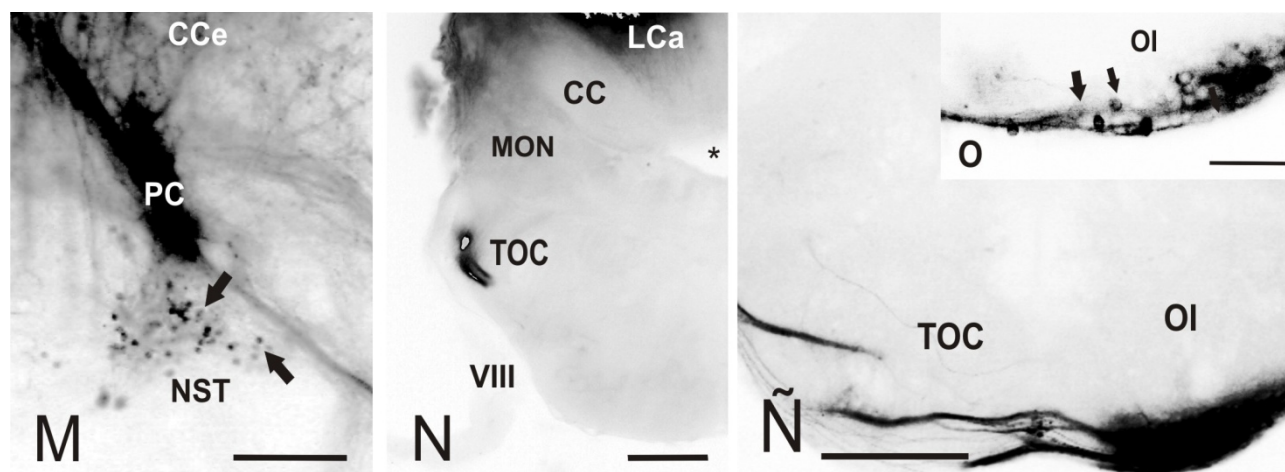


Fig.7. Secciones transversales del telencéfalo (A-C), mesencéfalo (D-I), rombencéfalo (J-N) y médula oblongada (Ñ-O) mostrando las células y fibras marcadas tras la aplicación de Dil al corpus del cerebelo. Las imágenes están ordenadas de tal forma que lo ipsilateral queda hacia la izquierda y lo contralateral hacia la derecha. La línea media está representada por los ventrículos que se indican mediante un asterisco. **A:** Fibras marcadas anterógradamente en el núcleo ventral del área telencefálica ventral. **B:** Fibras cruzando a través del tracto telencefálico medial. **C:** Fibras marcadas anterógradamente en el núcleo talámico ventrolateral y el tracto telencefálico medial. **D:** Células (flechas) y fibras marcadas retrógradamente en el núcleo pretektal magnocelular superficial y en el tracto pretecto-cerebelar. **E:** Fibras cursando a través del tracto pretecto-cerebelar, en el núcleo talámico central posterior y en el núcleo periventricular del tubérculo posterior cruzando por el tracto telencefálico medial. **F:** Fibras marcadas anterógradamente en el toro longitudinal. **G:** Células (flecha) y fibras retrógradas en el núcleo tegmental dorsal, fibras en el tracto pretecto-cerebelar, en el núcleo talámico central posterior y en el núcleo periventricular del tubérculo posterior. **H:** Células (flechas) y fibras retrógradas en el núcleo de la válvula lateral y en el núcleo de Edinger-Westphal (flechas), además de fibras en la válvula cerebelar. **I:** Fibras cursando por el tracto cerebelo-hipotalámico y el *brachium conjunctivum*. **J:** Células (flechas) y fibras en el núcleo lateral de la válvula y en el núcleo de Edinger-Westphal, además de fibras atravesando el corpus del cerebelo. **K:** Punto de aplicación del trazador neuronal (Dil-DiO) en el corpus del cerebelo con fibras que cruzan a través de la comisura cerebelar, además de células (flechas) y fibras en la región trigeminal. **L:** Células (flechas) marcadas retrógradamente en el núcleo sensitivo del trigémino y en la parte dorsal al núcleo octavo anterior en el cual también se observan fibras, además aparecen fibras en el tracto posterior del cerebelo y en la región trigeminal. **M:** Detalle de células (flechas) en el núcleo sensitivo del trigémino y fibras en el corpus del cerebelo y en el tracto posterior del cerebelo. **N:** Fibras retrógradas marcadas en el tracto olivo-cerebelar, así como en el lóbulo caudal del cerebelo. **Ñ:** Células marcadas retrógradamente en la oliva inferior (flechas) y fibras en el tracto olivo-cerebelar. **O:** Detalle de células (flechas) en el tracto olivo-cerebelar. Las barras de escala son de 200µm en E, G, H, J, Ñ; de 100µm en C-D, F, K- N y de 50µm en A, B, I y O.

Eminencia granular

Aferencias

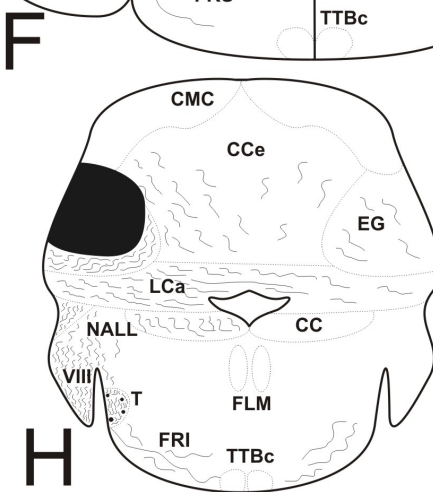
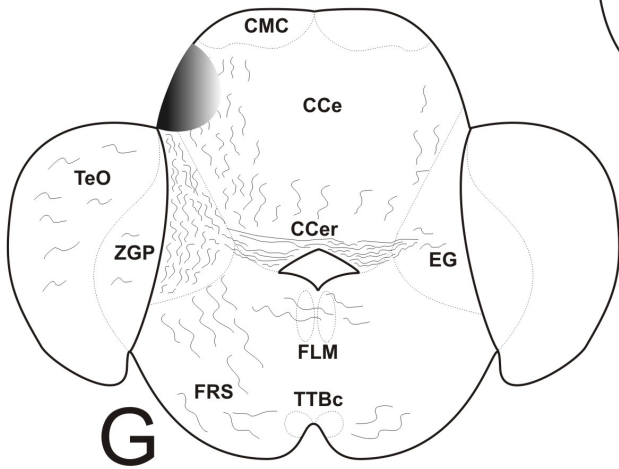
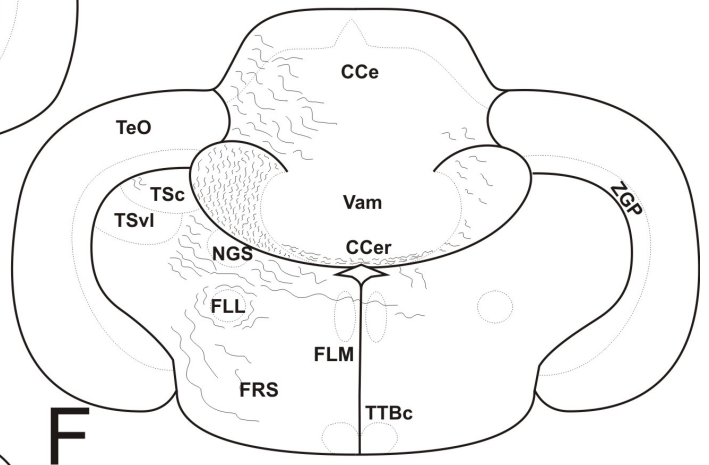
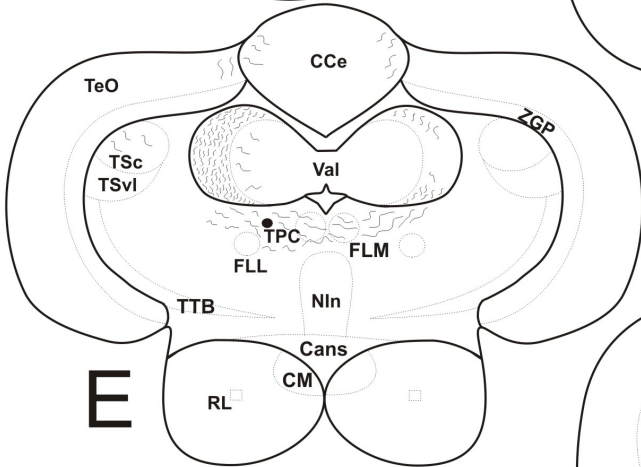
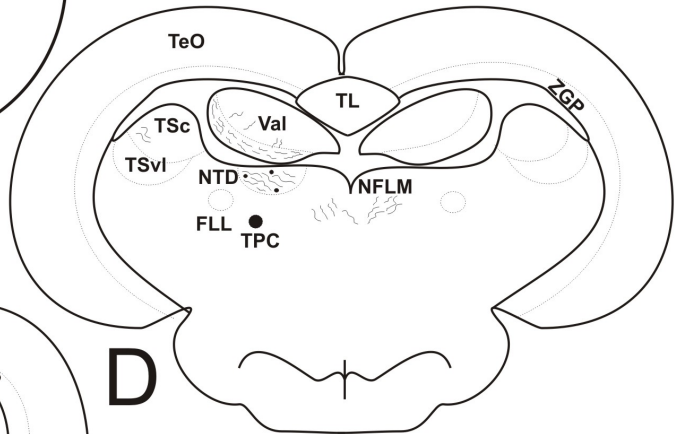
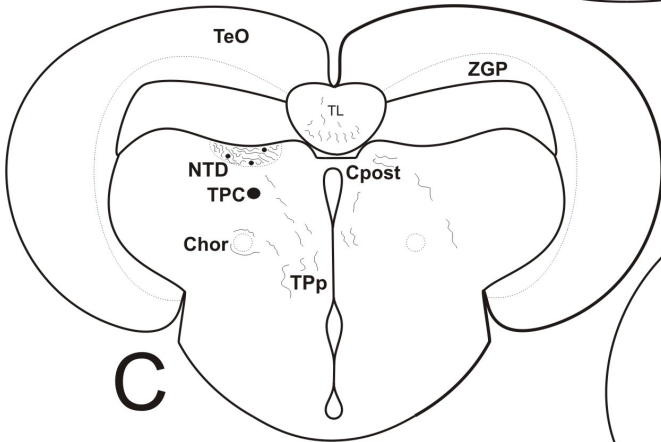
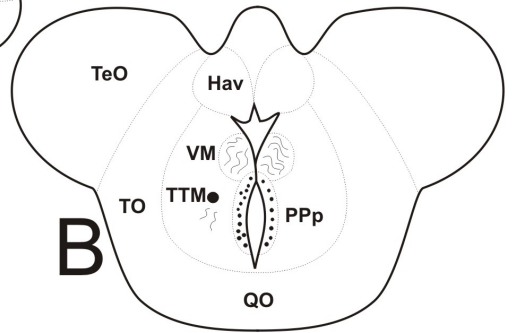
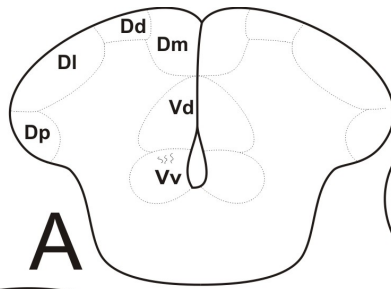
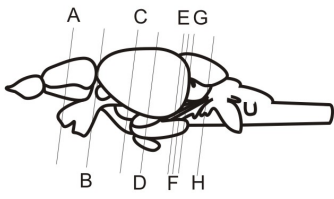
La aplicación de Dil a la eminencia granular dio como resultado el marcaje de células y fibras tanto a nivel del mesencéfalo como del rombencéfalo (Fig. 8 y Fig. 9). Sin embargo el número de núcleos y fibras observados fue mucho menor que el que se observó tras la aplicación de Dil y DiO en la válvula y el corpus del cerebelo. A nivel rostral del mesencéfalo solo se encontraron algunas células en el núcleo preóptico parvocelular posterior (Figs. 8B, 9B), no se encontraron células marcadas en otros núcleos pretektales. En el mesencéfalo medial aparecen algunas células en el núcleo tegmental dorsal que está situado ventralmente al ventrículo tectal y ventralmente a la válvula lateral rostral (Figs. 8C-D, 9D-F) cuyas proyecciones alcanzan el núcleo del fascículo longitudinal medial. Por último en el rombencéfalo caudal se encuentran células emitiendo proyecciones al cerebelo en el área octavolateral, concretamente en el nervio octavo, el núcleo anterior de la línea lateral y el núcleo tangencial (Figs. 8H, 9I).

Eferencias

Tras la aplicación de Dil en la eminencia granular se observaron algunas fibras teñidas principalmente hacia el lado ipsilateral, a distintos niveles (del telencéfalo a la médula oblongada). Al igual que para la válvula y el corpus del cerebelo se observaron fibras descendentes en el tracto pretecto-cerebelar (Figs. 8C-E, 9D-F) que alcanzan la zona ventral rodeando la comisura horizontal y pasando por el núcleo periventricular del tubérculo posterior (Figs. 8C, 9D). Algunas de estas fibras atraviesan la comisura posterior tiñendo fibras ventrales en el toro longitudinal (Fig. 8C). A nivel telencefálico las fibras cursan por el núcleo ventral del área telencefálica ventral (Figs. 8A, 9A), al igual que en el corpus del cerebelo. En el mesencéfalo rostral la región del núcleo del tálamo ventromedial (Figs. 8B, 9B-C) recibe fibras de la eminencia granular. También aparecieron numerosas fibras en la capa granular de la válvula ipsilateral y solo unas pocas en la capa molecular (Figs. 8D-F, 9E-F), estas fibras cruzan por el fascículo longitudinal medial (Figs. 8E, 9F) y marcaron algunas fibras en la válvula contralateral. En el núcleo del fascículo longitudinal medial bilateral (Figs. 8D, 9E) y en el toro semicircular (Figs. 8D-F, 9E) ipsilateral se encontraron algunas fibras eferentes de la eminencia granular. En el rombencéfalo se observan fibras en el corpus del cerebelo ipsilateral (Figs. 8E-H, 9G) que cruzan por la comisura cerebelar hacia el lado contralateral del cerebelo y de la eminencia granular. Otras eferencias aparecieron en la formación reticular superior (Figs. 8F-G, 9G), en la formación reticular intermedia (Figs. 8H, 9I), en el lóbulo caudal y en la cesta cerebelar ipsilateral (Figs. 8H, 9H-I).

Fig.8. Dibujos esquemáticos de las secciones transversales del encéfalo del pez cebra (A-H) que muestran las células (pequeños círculos sólidos) y las fibras (líneas) tras la aplicación de Dil en la eminencia granular. El área sombreada en G-H muestra el punto de aplicación. Estas imágenes están ordenadas de forma que lo ipsilateral se representa hacia la izquierda y lo contralateral a la derecha. El nivel al que se han realizado las secciones está indicado en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 50µm.

2014



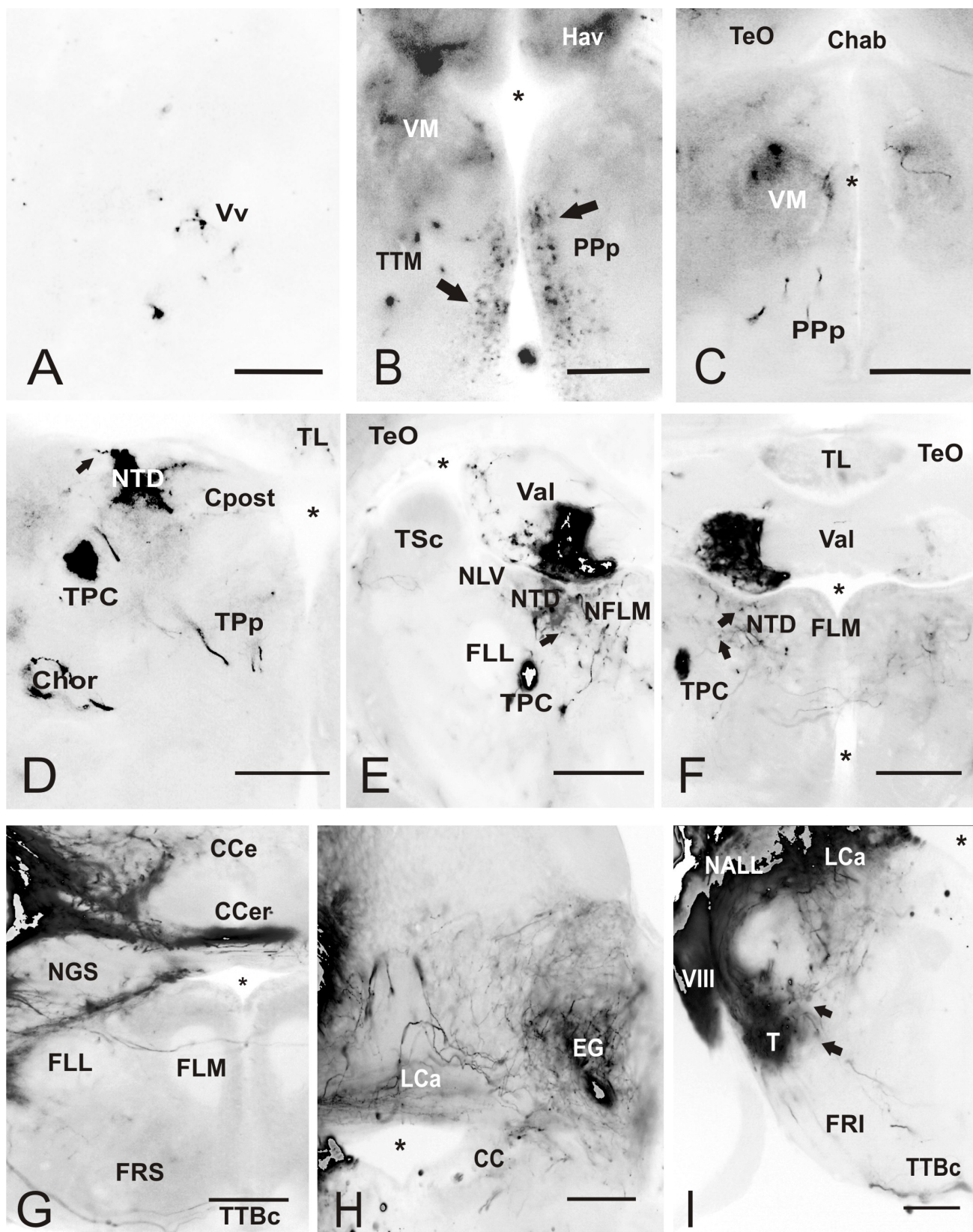


Fig.9. Secciones transversales del telencéfalo (A), mesencéfalo (B-F), rombencéfalo (G-I) mostrando las células y fibras marcadas tras la aplicación de Dil a la eminencia granular. Las imágenes están ordenadas de tal forma que lo ipsilateral queda hacia la izquierda y lo contralateral hacia la derecha. La línea media está representada por los ventrículos que se indican mediante un asterisco. **A:** Fibras marcadas anterógradamente en el núcleo ventral del área telencefálica ventral. **B:** Células (flechas) marcadas retrógradamente en el núcleo preóptico parvocelular posterior, fibras en el núcleo talámico ventromedial y en el tracto telencefálico medial. **C:** Fibras marcadas anterógradamente en el núcleo talámico ventromedial y en el núcleo preóptico parvocelular posterior. **D:** Células (flecha) y sus proyecciones marcadas retrógradamente en el núcleo tegmental dorsal, fibras en el tracto pretecto-cerebelar, en núcleo periventricular del

tubérculo posterior y rodeando a la comisura horizontal. **E:** Fibras y células (flecha) marcadas en el núcleo tegmental dorsal, en el tracto pretecto-cerebelar, en el núcleo central del toro semicircular, en el núcleo del fascículo longitudinal medial y en la válvula lateral. **F:** Células (flechas) marcadas retrógradamente en el núcleo tegmental dorsal, fibras la válvula lateral, en el tracto pretecto-cerebelar y cruzando a través del fascículo longitudinal medial. **G:** Fibras en el corpus del cerebelo, cruzando hacia el lado contralateral por la comisura cerebelar, fibras anterógradas en la región trigeminal atravesando el fascículo longitudinal medial y en la formación reticular superior. **H:** Punto de aplicación del trazador neuronal (Dil) con fibras en la eminencia granular contralateral, el lóbulo caudal del cerebelo y la cresta cerebelar. **I:** Células (flechas) marcadas anterógradamente en el núcleo tangencial, fibras en el lóbulo caudal del cerebelo, en la formación reticular intermedia y cruzando por el nervio octavo y los nervios anteriores de la línea lateral. Las barras de escala son de 200 μ m en B, D- I, de 100 μ m en C y de 50 μ m en A.

Lóbulo caudal del cerebelo

Aferencias.

La aplicación de Dil en el lóbulo caudal resultó en el marcaje de células y fibras en el rombencéfalo (Fig. 10 y Fig. 11). Sin embargo tan solo se observaron células marcadas en el núcleo sensitivo del trigémino cuyos somas presentan formas redondeadas (Figs. 10B-C, 11C) y alguna célula en el núcleo octavo anterior ipsilateral (Figs. 10A, 11A-B)

Eferencias

La aplicación de Dil en el lóbulo caudal permitió distinguir las fibras eferentes ipsilaterales que se dirigen al rombencéfalo y la médula oblongada. A nivel rostral del rombencéfalo se observan fibras marcadas en el núcleo octavo anterior ipsilateral (Figs. 10A, 11A-B). Además aparece marcaje de fibras en la eminencia granular (Figs. 10B-C, 11C) que ascienden hasta el corpus del cerebelo (Figs. 10C) alcanzando su capa molecular, así como en la cresta cerebelar (10D-E) cerca del punto de aplicación del lóbulo caudal (posiblemente por difusión directa del trazador desde la zona marcada).

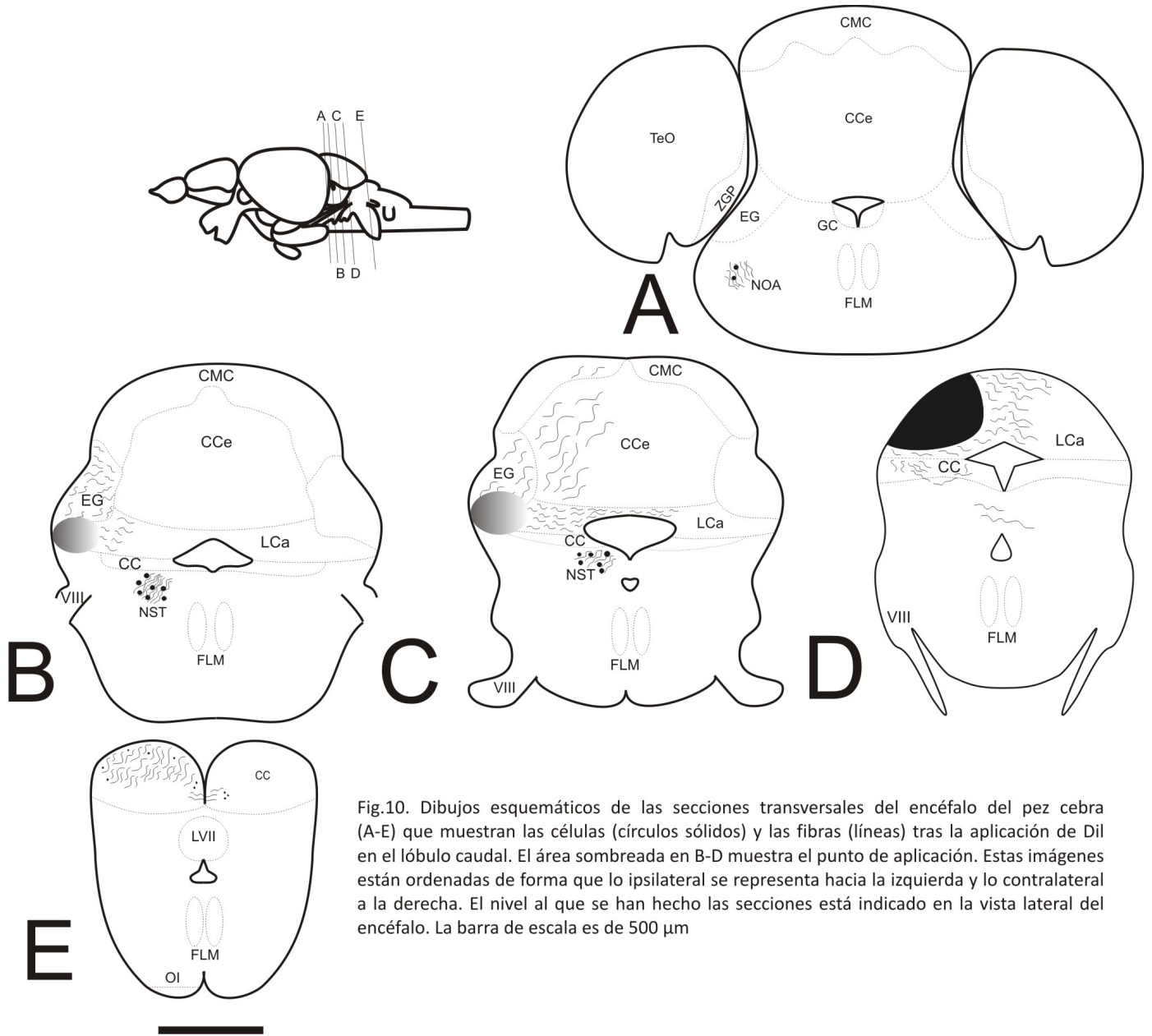


Fig.10. Dibujos esquemáticos de las secciones transversales del encéfalo del pez cebra (A-E) que muestran las células (círculos sólidos) y las fibras (líneas) tras la aplicación de Dil en el lóbulo caudal. El área sombreada en B-D muestra el punto de aplicación. Estas imágenes están ordenadas de forma que lo ipsilateral se representa hacia la izquierda y lo contralateral a la derecha. El nivel al que se han hecho las secciones está indicado en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 500 μ m

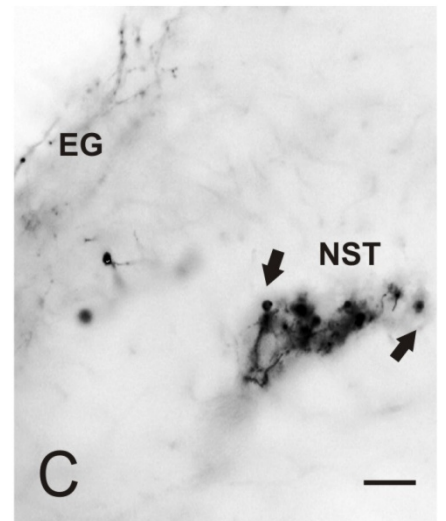
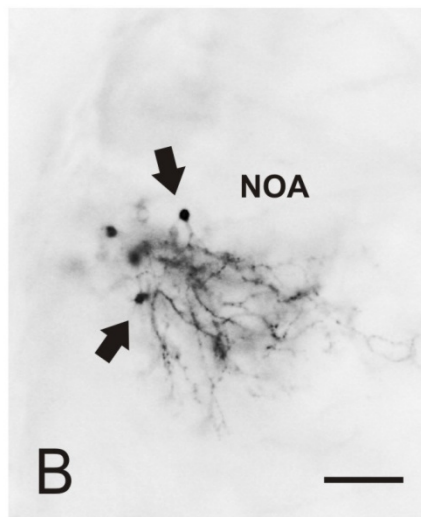
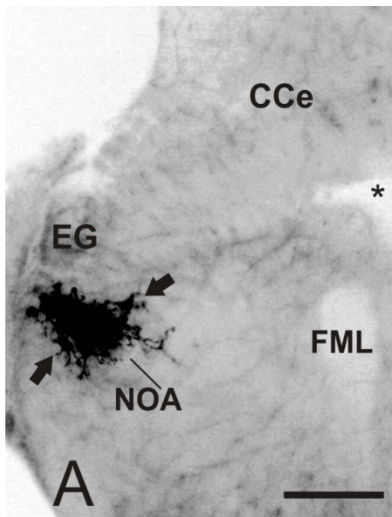


Fig.11. Secciones transversales del rombencéfalo (A-C) mostrando las células y fibras marcadas tras la aplicación de Dil al lóbulo caudal. Las imágenes están ordenadas de forma que lo ipsilateral queda hacia la izquierda y lo contralateral hacia la derecha. La línea media está representada por los ventrículos que se indican mediante un asterisco. **A:** Células (flechas) y fibras marcadas retrógradamente en el núcleo octavo anterior. **B:** Detalle del núcleo octavo anterior con células (flechas) y fibras. **C:** Células retrógradamente marcadas (flechas) en el núcleo sensitivo del trigémino y fibras en la eminencia granular. Las barras de escala son de 200µm en A y de 50µm en B y C.

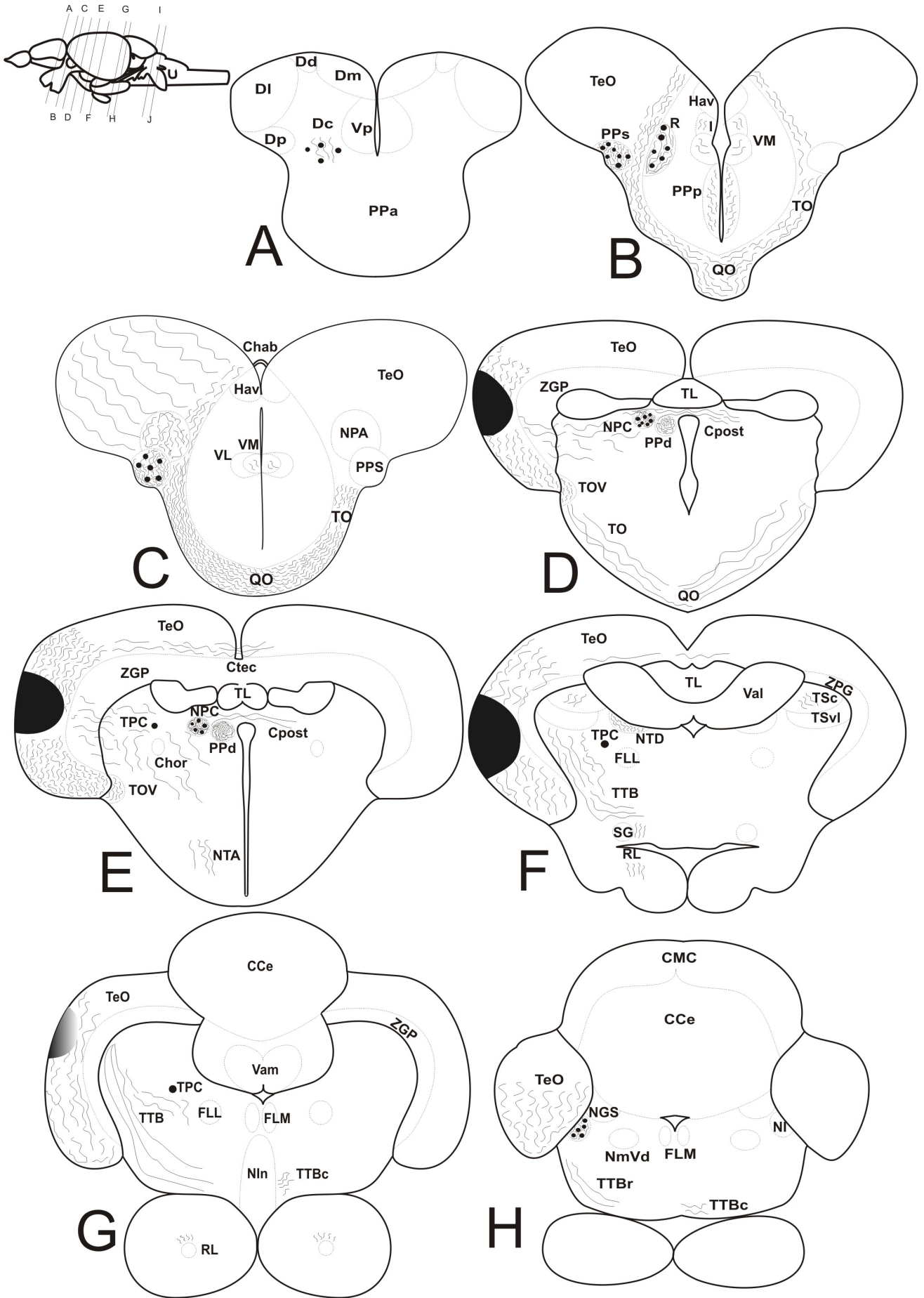
2. Techo óptico

Aferencias

La aplicación de Dil y DiO a diferentes niveles del techo óptico produjo el marcaje de células y fibras a nivel del telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo de modo tanto ipsilateral como contralateral (Fig.12. y Fig.13.) La principal aferencia del techo óptico surge de la retina que proyecta en el techo óptico a través de diversos núcleos pretectales y talámicos como son: el núcleo pretectal parvocelular superficial ipsilateral (Figs. 12B-C, 13B-C) que presenta numerosas células redondeadas teñidas, el núcleo rostralateral ipsilateral (Figs. 12B, 13B), el núcleo preóptico parvocelular posterior bilateral (12B, 13B) y los núcleos talámicos bilaterales ventromedial (Figs. 12B-C, 13B) e intermedio (Figs. 12B, 13B). Las fibras monopolares de la retina alcanzan el techo óptico mediante los tractos ópticos y el quiasma óptico (Figs. 12B-D, 13B-C). Más caudalmente, aparece el núcleo de la comisura posterior (12D-E, 13D), cuyas células proyectan fibras que atraviesan la comisura posterior para alcanzar el lado contralateral. Rostralmente, al nivel del telencéfalo caudal se pueden observar algunas células en la zona central del área telencefálica dorsal por su parte ipsilateral (Figs. 12A, 13A). Por último a nivel rombencefálico se observan algunas células redondeadas en el núcleo del istmo (12H, 13J-K) que emiten proyecciones hacia el techo óptico.

Eferencias

La aplicación de Dil y DiO origina el marcaje de algunas fibras eferentes del techo óptico que son en su mayoría, ipsilaterales. La principal eferencia del techo óptico es el tracto tectobulbar ipsilateral (Figs. 12F-G, 13H, 13J) que aparece hacia la parte más caudal del mesencéfalo y atraviesa la comisura *ansulata* para luego dividirse en el tracto tectobulbar recto (Figs. 12H-I, 13I) que es ipsilateral y el tracto tectobulbar cruzado (Figs. 12H-J, 13I) que aparece por la parte contralateral. También se observó la presencia del tracto pretecto-cerebelar (Figs. 12E-G) que surge del área pretectal en la parte rostral del techo óptico y alcanza una posición cada vez más ventral según se acerca al cerebelo. El techo óptico también envía proyecciones a núcleos pretectales como el núcleo pretectal accesorio (12C, 13E) situado sobre tracto óptico ventrolateral ipsilateral y la parte dorsal del núcleo pretectal periventricular (12D-E, 13D). Además, se observaron fibras ipsilaterales al hipotálamo (Figs. 12E-G, 13F, 13H-I) que en su parte más rostral atraviesan el núcleo del tubérculo anterior ipsilateral (Figs. 12E, 13F) para luego dirigirse caudalmente a la parte dorsal del receso lateral rodeando al núcleo subglomeruloso. Otras proyecciones del techo óptico aparecieron en el rombencéfalo donde se observaron las numerosas fibras que inervan el núcleo tegmental dorsal (Figs. 12F, 13G) y algunas fibras en el toro semicircular (Figs. 12F, 13G) ambas tanto por su parte ipsilateral como contralateral. Además, el techo óptico ipsilateral emite proyecciones hacia el techo óptico contralateral mediante fibras que atraviesan la comisura intertectal (Fig. 12E).



2014

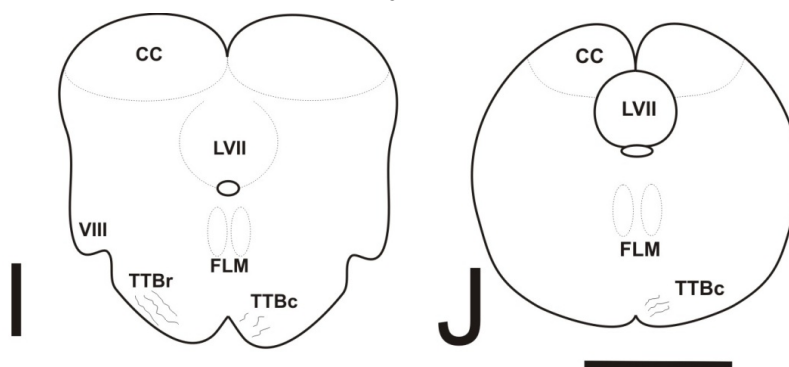
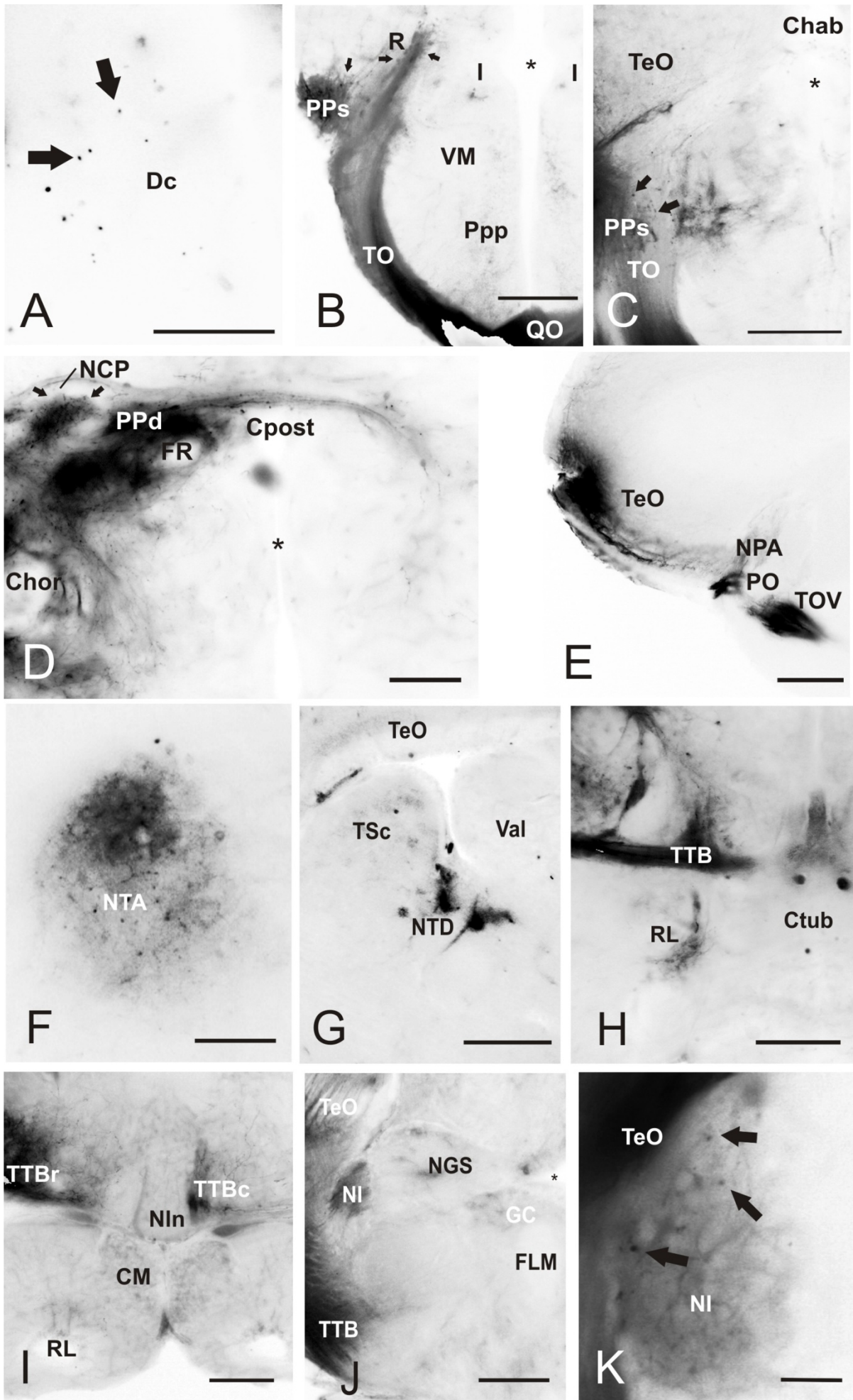


Fig.12. Dibujos esquemáticos de las secciones transversales del encéfalo del pez cebra (A-J) que muestran las células (círculos sólidos) y las fibras (líneas) tras la aplicación de Dil en el techo óptico. El área sombreada en D-G muestra el punto de aplicación. Estas imágenes están ordenadas de forma que lo ipsilateral se representa hacia la izquierda y lo contralateral a la derecha. El nivel al que se han realizado las secciones está indicado en la vista lateral del encéfalo. La barra de escala es de 500 μ m.

Fig.13. Secciones transversales del telencéfalo (A), mesencéfalo (B-I) y rombencéfalo (J-K) mostrando las células y fibras marcadas tras la aplicación de Dil al techo óptico. Las imágenes están ordenadas de forma que lo ipsilateral queda hacia la izquierda y lo contralateral hacia la derecha. La línea media está representada por los ventrículos que se indican mediante un asterisco. **A:** células (flechas) retrógradas en la zona central del área telencefálica dorsal. **B:** Células (flechas) retrógradamente marcadas en el núcleo pretectal parvocelular superficial y el núcleo rostralateral, además de fibras en el núcleo preóptico parvocelular posterior, el núcleo talámico ventromedial, en el núcleo talámico intermedio y cursando por los tractos ópticos y el quiasma óptico. **C:** Células (flechas) retrógradamente marcadas en el núcleo pretectal parvocelular superficial y cruzando por el tracto óptico. **D:** Células (flechas) retrógradamente marcadas en el núcleo de la comisura posterior y fibras en el núcleo pretectal periventricular dorsal además de cursando por la comisura posterior. **E:** Punto de aplicación de Dil en el techo óptico, fibras en el núcleo pretectal accesorio y en el tracto óptico ventrolateral. **F:** Fibras anterógradas en el núcleo del tubérculo anterior. **G:** Fibras anterógradas en el núcleo tegmental dorsal y en el núcleo central del toro semicircular. **H:** Fibras cursando por el tracto tectobulbar y fibras en el lóbulo hipotalámico dorsales al receso lateral. **I:** Fibras atravesando el tracto tectobulbar recto y el tracto tectobulbar cruzado, además de fibras en el lóbulo hipotalámico dorsales al receso lateral. **J:** Fibras retrogradas en el núcleo del istmo y fibras anterógradas en el techo óptico y en el tracto tectobulbar. **K:** Detalle de células (flechas) en el núcleo del istmo. Las barras de escala son de 200 μ m en B, C, E, G-J; de 100 μ m en D, F y de 50 μ m en A, K.

2014



DISCUSIÓN

El uso de carbocianinas como trazadores neuronales permite una gran sensibilidad y mejora de la precisión en el marcaje de las diferentes áreas del encéfalo, tanto si son estructuras muy pequeñas, como si tienen un acceso dificultoso puesto que, tras su aplicación, éstas se insertan en las bicapas lipídicas y son transportadas a partir del movimiento de los lípidos de la membrana de forma anterógrada y retrógrada (Godement *et al.* 1987; Holmqvist *et al.* 1992). Sin embargo, estos trazadores presentan una serie de problemas ya que su difusión, tanto anterógrada como retrógrada a lo largo del encéfalo puede generar confusión a la hora de determinar el origen de las fibras teñidas, sobre todo para distinguir las eferencias. Este problema podría solucionarse parcialmente mediante experimentos recíprocos de aplicación de Dil y DiO en los supuestos destinos de las fibras. Otro problema de las carbocianinas es que, en su área de aplicación, presentan una intensa fluorescencia que puede obstaculizar la visualización de los núcleos y fibras marcados y dar lugar a equívocos ya que, los tractos que pasan cercanos a la región de aplicación pueden resultar marcados por proximidad. Además, si no se realiza una correcta perfusión, las células sanguíneas remanentes pueden presentar fluorescencia y dificultar la distinción de las áreas realmente marcadas. (Folgueira *et al.* 2006) Debido a estos problemas, podría haber sido necesaria la utilización de más ejemplares para alcanzar una mayor certeza sobre los resultados obtenidos.

1. Cerebelo

Válvula del cerebelo

La aplicación de carbocianinas en el válvula del cerebelo requiere la ablación de parte del techo óptico dorsal, por lo que es posible que algunas conexiones fueran resultado de la difusión accidental de trazadores neuronales. Sin embargo en este trabajo no se observan evidencias de que la transferencia accidental se haya podido producir.

Las aferencias observadas en la válvula lateral de *Danio rerio* provienen de los núcleos pretectales: núcleo pretectal magnocelular superficial, núcleo pretectal parvocelular superficial y núcleo preóptico parvocelular posterior; del tálamo ventrolateral, del núcleo lateral de la válvula, del núcleo de Edinger-Westphal, del núcleo sensitivo del trigémino y de la oliva contralateral.

En *Carassius* y *Lepomis* (Wullimann & Northcutt 1989) las principales aferencias a la válvula que se encontraron proceden de núcleos pretectales (núcleo central pretectal, núcleo óptico accesorio dorsal), de los núcleos tegmentales (dorsal y ventral), del núcleo lateral de la válvula, del núcleo sensitivo del trigémino, del núcleo del istmo y de la oliva inferior contralateral. Estos resultados coinciden con los del presente trabajo, exceptuando las aferencias a esos determinados pretectales y al núcleo del istmo. Sin embargo, los propios autores señalaron que las proyecciones a estos pretectales y al núcleo del istmo coinciden con proyecciones conocidas al techo óptico, por lo que estos marcajes podrían ser debidos a una difusión accidental. En la carpa (Ito & Yoshimoto 1990) se encontraron proyecciones similares, además de proyecciones adicionales a la formación reticular inferior.

Otra investigación experimental de las conexiones de *Gnathonemus petersi* (Meek *et al.* 1986) demostró que la válvula medial, recibe aferencias distintas a la válvula lateral procedentes del núcleo lateral de la válvula, del núcleo dorsal tegmental, del núcleo sensitivo del trigémino, del núcleo lateral reticular y de la oliva contralateral

En cuanto a las eferencias, en *Danio rerio* las eferencias principales que observamos fueron: al toro longitudinal, al lóbulo inferior hipotalámico, a la región trigeminal y a la formación reticular superior. En la carpa (Ito & Yoshimoto 1990) se encontraron proyecciones similares al toro longitudinal, al lóbulo inferior hipotalámico, al núcleo posterior de la comisura, al techo óptico, al toro semicircular, al lóbulo facial y a la formación reticular. En *Sebastiscus* (Murakami & Morita 1987) en cambio, se observaron proyecciones al núcleo talámico ventromedial, al núcleo lateral de la válvula, al núcleo oculomotor, al núcleo rojo y a la formación reticular, las cuales no coinciden con las de este trabajo lo que sugiere que es posible que existan diferencias especie específicas entre ciprínidos y percomorfos.

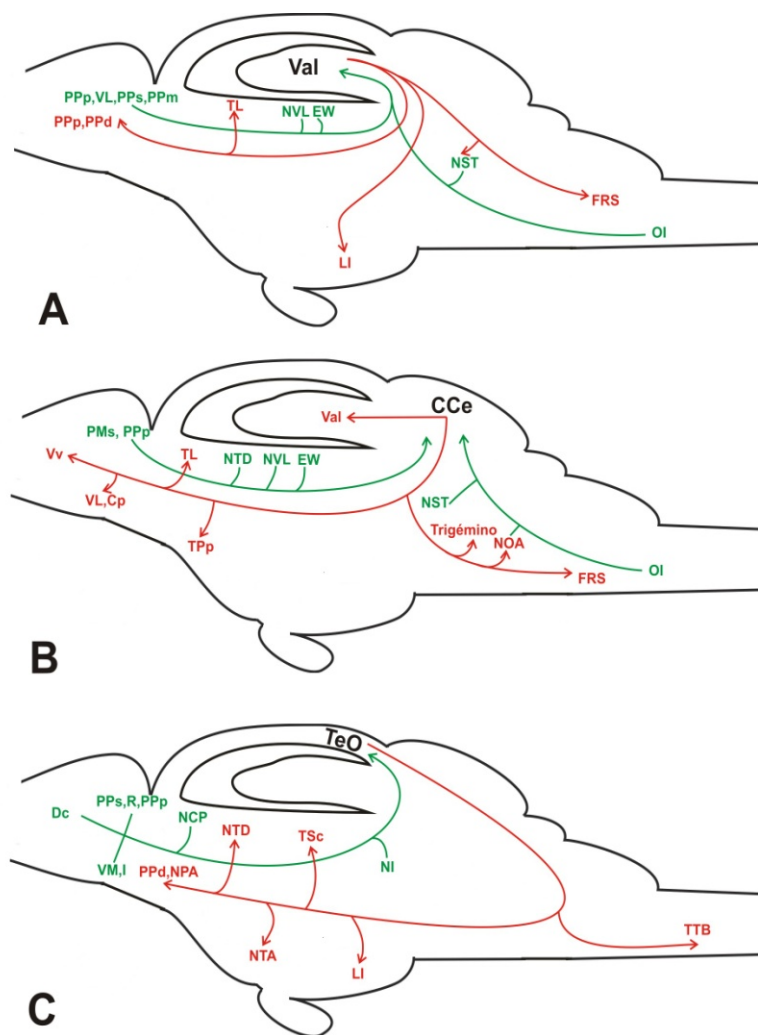


Fig.14. Representación esquemática de una vista lateral del cerebro con el resumen de las principales conexiones aferentes y eferentes de **A:** Válvula cerebelar **B:** Corpus del cerebelo **C:** Techo óptico

Corpus del cerebelo

La aferencia caudal principal del cerebelo en teleósteos es la oliva inferior que proyecta al cerebelo mediante el tracto olivo-cerebelar (Finger 1978; Meek *et al.* 1986; Wullimann & Northcutt 1989; Ito & Yoshimoto 1990; Xue *et al.* 2008; Bae *et al.* 2009) que envía fibras ascendentes a las zonas longitudinales de células de Purkinje en el corpus del cerebelo contralateral que llegan hasta la capa molecular (Xue *et al.* 2008).

La principal proyección al corpus, en cambio es el tracto pretecto-cerebelar (Folgueira *et al.* 2006) que transcurre desde los núcleos pretectales del mesencéfalo rostral recibiendo proyecciones del núcleo de la válvula lateral y posiblemente también del núcleo dorsal tegmental y del núcleo de Edinger Westphal, como hemos demostrado en este trabajo.

En teleósteos no electroreceptivos (Wullimann & Northcutt 1988) se encontraron aferencias en los siguientes núcleos pretectales: el núcleo de la comisura posterior, el núcleo pretectal periventricular dorsal, el núcleo central pretectal, el núcleo dorsal accesorio y el núcleo ventral accesorio. Resultado que no coincide con las aferencias que hemos encontrado en el pez cebra en el núcleo pretectal magnocelular superficial y en el núcleo preóptico parvocelular posterior. En el mesencéfalo los mismos autores citaron al núcleo dorsal tegmental, el núcleo de Edinger-Westphal, el núcleo lateral de la válvula, el núcleo del istmo, el *locus coeruleus* y el núcleo perilemniscal como aferencias. En este trabajo podemos confirmar que las aferencias observadas en *Carassius* y *Lepomis* en el núcleo de la válvula lateral, el núcleo de Edinger-Westphal y en el núcleo dorsal tegmental también existen en *Danio rerio*. A niveles más caudales (Finger 1983; Wullimann & Northcutt 1988) se encontraron células teñidas en el rafe inferior, en la región octavolateral, en la raíz descendente del trigémino, en la formación reticular inferior y la oliva inferior contralateral. Por lo tanto podemos concluir que las aferencias en otros teleósteos son similares a las de *Danio rerio* excepto en los núcleos pretectales y en que el pez cebra no recibe aferencias del núcleo del istmo, el *locus coeruleus*, el núcleo perilemniscal y del rafe inferior.

También se ha demostrado que el núcleo lateral de la válvula, que es exclusivo de actinopterigios, envía proyecciones a las células granulares del corpus y de la válvula del cerebelo, tanto en los teleósteos electroreceptivos como en los teleósteos no electroreceptivos (Meek *et al.* 1986; Wullimann & Northcutt 1989; Ito & Yoshimoto 1990). Además, recibe proyecciones del núcleo pretectal magnocelular superficial y del lóbulo hipotalámico inferior (Ito & Yoshimoto 1990). Eso significa que la proyección observada en el hipotálamo (tracto cerebelo-hipotalámico) podría no terminar en el cerebelo, sino en el núcleo de la válvula lateral (Nieuwenhuys & Pouwels 1983).

En cuanto a las eferencias, al igual que en *Carassius*, en *Danio rerio* se vio que estas transcurrían principalmente a través del *brachium conjunctivum* que se dirige desde el corpus hasta el núcleo rojo en el tegmento mesencefálico y por el tracto posterior del cerebelo alcanza la parte más caudal del encéfalo, terminando en las formaciones reticulares superior e inferior. La presencia de este tracto fue descrito en otras especies (Wullimann & Northcutt 1988; Folgueira *et al.* 2006). Además, en *Carassius* se encontraron fibras en el núcleo oculomotor, en el núcleo del fascículo longitudinal medial, en el núcleo central del toro semicircular, en el núcleo del tálamo ventromedial y ventrolateral y en el toro longitudinal que es inervado por fibras del tracto pretecto-cerebelar por su lado ipsilateral, aunque algunas fibras cruzan la comisura posterior para entrar en el toro contralateral. En pez cebra se observan muchas diferencias con estos resultados puesto que, además de proyecciones al núcleo del tálamo ventrolateral y al toro longitudinal, también se encontraron otras proyecciones al área trigeminal, al área hipotalámica (incluido el núcleo periventricular del tubérculo posterior), a la válvula cerebelar, al núcleo octavo anterior, a la formación reticular superior y una proyección telencefálica al núcleo ventral del área telencefálica ventral que transcurre por el tracto telencefálico medial.

En otras especies como *Sebastiscus* (Murakami & Morita 1987) sí que se encontraron proyecciones al lóbulo inferior del hipotálamo y en *Gnathonemus* (Meek *et al.* 1986) proyecciones al área trigeminal.

Eminencia granular

Tras el marcaje Dil a las eminencia granular tan solo se observaron marcajes retrógrados en el núcleo preóptico parvocelular posterior, en el núcleo tegmental dorsal y en la región octavolateral, concretamente en el nervio octavo, en el núcleo anterior de la línea lateral y en el núcleo tangencial. Al contrario que en la válvula lateral y en el corpus del cerebelo, no aparecieron células teñidas en la oliva inferior ni en el núcleo lateral de la válvula. En la trucha en cambio, el núcleo lateral de la válvula parece representar una importante aferencia (Folgueira *et al.* 2006). En gimnótidos, se encontraron células en el núcleo preeminencial, el núcleo lateral reticular, el núcleo dorsal tegmental, el núcleo del rafe, el *locus coeruleus*, núcleos del área octavolateral y también la oliva inferior (Sas & Maler 1987)

Las eferencias a la línea lateral anterior y al núcleo octavolateral anterior confirman los datos obtenidos en otras investigaciones en otros teleósteos (Lutien 1975; Meek & Nieuwenhuys 1998; Folgueira *et al.* 2006; Straka *et al.* 2006). También se demostró que la aplicación de Dil a la eminencia granular causa la tinción de fibras paralelas que transcurren por la cresta cerebelar y el lóbulo caudal del cerebelo (Bass 1982; Meek & Nieuwenhuys 1998)

La posible transferencia de Dil de la eminencia granular al corpus del cerebelo y a la válvula cerebelar por su posición cercana, no podría descartarse. Por lo cual algunas de las conexiones que se encontraron en este trabajo podrían pertenecer al corpus del cerebelo o a la válvula lateral, eso explicaría las eferencias al núcleo talámico ventromedial, la válvula lateral y el toro longitudinal.

Lóbulo caudal del cerebelo

Determinar las aferencias y eferencias del lóbulo caudal del cerebelo podría ser complicado debido a que su difícil localización hace sencillo errar el punto de marcaje puesto que, en teleósteos no electroreceptivos y en teleósteos pasivamente electroreceptivos el lóbulo caudal abarca la parte más caudal de la capa molecular del cerebelo localizada entre las eminencias granulares y los grupos de células granulares y de purkinje asociadas con esta capa molecular (Maler 1974; Bass 1982; Meek 1992). Por ese motivo los resultados obtenidos podrían pertenecer a la parte caudal del corpus del cerebelo y no al lóbulo caudal, ya que por ejemplo, sí se han observado células en el núcleo sensitivo del trigémino en el corpus del cerebelo (Finger 1983; Wullimann & Northcutt 1988) pero no en el lóbulo caudal. Además del marcaje de fibras en otras áreas como el corpus del cerebelo, la eminencia granular y la cresta cerebelar.

Sin embargo tal y como se espera para el lóbulo vestibulolateral aparecen conexiones con el sistema octavolateral a partir del núcleo octavo anterior (Lutien 1975; Straka *et al.* 2006). Resultados obtenidos por otros autores en *Sebastiscus marmoratus* (Murakami & Morita 1987) demostraron proyecciones a la región del nervio oculomotor, al tálamo ventromedial y al núcleo rojo. En la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) se encontraron aferencias al núcleo lateral de la válvula y al núcleo de la comisura posterior, fibras cursando por el tracto pretecto-cerebelar y por el *brachium conjunctivum* y eferencias al núcleo central pretectal, al núcleo de la comisura posterior, el núcleo ventral tegmental y el núcleo del fascículo longitudinal medial (Folgueira *et al.* 2006). En *Carassius* también se observaron eferencias del lóbulo caudal al núcleo oculomotor (Torres *et al.* 1992).

2. Techo óptico

El techo óptico presenta una gran regionalización en sus conexiones por lo que se producen diferencias en las proyecciones observadas dependiendo del área donde se aplique el marcaje. Estas diferencias pueden ser debidas a cambios en las propiedades funcionales de cada región del techo óptico. (Pérez-Pérez *et al.* 2003). En este trabajo el marcaje fue realizado en el techo óptico dorsoventral, el techo óptico dorsolateral y el techo óptico dorsomedial observándose grandes diferencias en estos resultados ya que por ejemplo, en el techo óptico dorsoventral se observan más núcleos y es el único marcaje donde el trazador neuronal llega a producir marcaje en el telencéfalo (en la zona central del área telencefálica dorsal)

La principal conexión aferente del techo óptico es la retina (Springer & Gaffney 1981) (Prasada Rao & Sharma 1982), no solo en el pez cebra sino que en todos los vertebrados, puesto que es un homólogo al colículo superior de mamíferos.

Una proyección aferente del telencéfalo al techo óptico fue identificada en diferentes especies de peces en la zona central del área telencefálica dorsal (Grover & Sharma 1981; Luiten 1981; Pérez-Pérez *et al.* 2003). Las aferencias en el telencéfalo caudal o mesencéfalo rostral se han encontrado en el núcleo supraquiasmático, en los núcleos preópticos parvocelulares y magnocelulares y en el tálamo. En *Danio rerio* en esta región hemos encontrado las aferencias en el núcleo pretectal parvocelular superficial ipsilateral, el núcleo rostralateral superficial ipsilateral, el núcleo preóptico parvocelular posterior bilateral y el núcleo de la comisura posterior además de en los núcleos talámicos ventrolateral e intermedio. También se encontraron aferencias al toro semicircular (Grover & Sharma 1981; Luiten 1981; Pérez-Pérez *et al.* 2003) que no se han encontrado en el presente estudio donde tan solo se han observado eferencias hacia el toro semicircular.

Otros autores también hacen referencia a proyecciones del toro longitudinal en el techo óptico (Grover & Sharma 1981; Luiten 1981; Pérez-Pérez *et al.* 2003) y a aferencias provenientes de la formación reticular (Pérez-Pérez *et al.* 2003) que no se han encontrado en los casos aquí investigados. Por último, se han encontrado aferencias al núcleo del istmo ipsilaterales (Pérez-Pérez *et al.* 2003), otros autores han descrito proyecciones bilaterales en el istmo (Johnson *et al.* 2013), pero en pez cebra solo hemos observado proyecciones ipsilaterales al núcleo del istmo.

En cuanto a las eferencias del techo óptico, éstas coinciden casi totalmente con las encontradas por otros autores en el carpín dorado (Grover & Sharma 1979; Schmidt 1979) y la carpa común (Luiten 1981), puesto que, se demostraron proyecciones del techo óptico en la mitad contralateral del techo, proyecciones descendentes al núcleo dorsal tegmental ipsilateral, al núcleo del istmo, a la formación reticular y al toro semicircular ipsilateral además de remarcar que la principal eferencia descendente del techo óptico es el tracto tectobulbar. La única diferencia que presenta esta investigación en *Danio rerio* con las eferencias encontradas por estos autores es que además de no observar proyecciones a la formación reticular sí que hemos percibido la aparición de una proyección hipotalámica que cursa por el núcleo del tubérculo anterior ipsilateral para luego dirigirse hacia la zona dorsal del receso lateral. También se encontraron entradas de fibras tectales en diferentes núcleos pretectales (Grover & Sharma 1979; Luiten 1981) de entre los cuales hemos observado aferencias del techo óptico en dos, en el núcleo pretectal accesorio y en el núcleo pretectal periventricular dorsal.

CONCLUSIONES

El análisis e interpretación de los resultados obtenidos ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Las carbocianinas como trazadores neuronales son muy sensibles, sin embargo también pueden requerir, como en el caso de otros trazadores neuronales aplicados extracelularmente marcajes recíprocos y/o ajustar el volumen del trazador aplicado o los tiempos de incubación.
2. Este estudio presenta la organización neuroanatómica de las conexiones aferentes y eferentes de dos áreas del encéfalo (cerebelo y techo óptico) de las cuales casi no existían estudios previos en *Danio rerio*.
3. Existen numerosas homologías entre las conexiones tectales y cerebelares de distintos teleósteos sobre todo entre las especies que pertenecen al mismo grupo taxonómico.
4. La mayor parte de las conexiones observadas tanto en el techo óptico como en el cerebelo presentan dominancia ipsilateral.

REFERENCIAS

- Bae, Y.; 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. *Developmental Biology* 330: 406-426.
- Bell, C. C. (2002) Evolution of cerebellum-like structures. *Brain Behav. Evol.* 59: 312-326.
- Bell, C. C.; Han, V.; Sawtell, N. B. (2008) Cerebellum-like structures and their implications for cerebellar function. *Annu. Rev. Neurosci.* 31: 1-24.
- Bass, A. H. (1982) Evolution of the vestibulolateral lobe of the cerebellum in electroreceptive and non electroreceptive teleosts. *J. Morphol.* 174: 335-348.
- Dooley, K. & Zon, L. I. (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 252-6.
- Finger, T. E. (1978) Cerebellar afferents in teleost catfish (*Ictaluridae*). *J. Comp. Neurol.* 181: 173-182.
- Folgueira, M.; Anadón, R.; Yáñez, J. (2006) Afferent and efferent connections of the cerebellum of a salmonid, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A tract-tracing study. *J. Comp. Neurol.* 497: 542-565
- Godement, P.; Vanselow, J.; Thanos, S.; Bonhoeffer, F. (1987) A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* 101: 697-713.
- Grover, B. G. & Sharma, S. C. (1979) Tectal projections in the goldfish (*Carassius auratus*): a degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 184: 435-488
- Grover, B. G. & Sharma, S. C. (1981) Organization of extrinsic tectal connections in goldfish (*Carassius auratus*): a degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 184: 435-488
- Hamilton, F. (1822) *Account Of The Fishes Found In The River Ganges And Its Branches*. Constable.
- Hill, A. J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R. E. (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences* 86: 6-19.
- Holmqvist, B. I.; Östholm, T.; Ekström, P. (1992) Dil tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in a teleost, the Atlantic salmon. *J. Neurosci. Methods* 42: 45-63.

- Ito, M. (2002) Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 978: 273-288.
- Ito, M. (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog. Neurobiol.* 78: 272-303.
- Ito, M. (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 304-313.
- Ito, H. & Yoshimoto, M. (1990) Cytoarchitecture and fiber connections of the nucleus lateralis valvulae in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Neurol.* 298: 385-399.
- Johnson, N. P.; Schwab, T. F.; Saidel W. M. (2013) Bilateral efferents from nucleus isthmi to the optic tectum in goldfish (*Carassius auratus*) are spatially restricted. *Neurosci. Lett.* 534: 311-315.
- Kappers, A. C. U; Huber G. C.; Crosby, E. C. (1936) The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man. MacMillan.
- Lannoo, M. J.; Ross, L.; Maler, L.; Hawkes, R. (1991) Development of the cerebellum and its extracerebellar Purkinje cell projection in teleost fishes as determined by zebrin II immunocytochemistry. *Prog. Neurobiol.* 37: 329-363.
- Luiten, P. G. M. (1975) The central projections of the trigeminal, facial and anterior lateral line nerves in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Comp. Neurol.* 160: 399-417.
- Luiten, P. G. M. (1981) Afferent and efferent connections of the optic tectum in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Brain Res.* 220: 51-65.
- Maler, L. (1974) The acousticolateral area of bony fishes and its cerebellar relations. *Brain Behav. Evol.* 10: 130-145.
- Meek, J. (1992) Why run parallel fibers parallel? Teleostean Purkinje cells as a possible coincidence detectors in a timing device subserving spatial coding of temporal differences. *Neuroscience* 48: 249-283.
- Meek, J. & Nieuwenhuys, R. (1998) Holosteans and teleosts. In: *The central nervous system of vertebrates*, vol 2. Springer. p 759–937.
- Meek, J.; Nieuwenhuys, R.; Elsevier, D. (1986) Afferent and efferent connections of cerebellar lobe CI of the mormyrid fish *Gnathonemus petersi*: an HRP study. *J. Comp. Neurol.* 245: 319-341
- Metscher, B. D. & Ahlberg, P. E. (1999) Zebrafish in context: Uses of a Laboratory Model in Comparative Studies. *Developmental Biology* 210: 1-14.
- Miyamura, Y.; Nakayasu, H. (2001) Zonal distribution of Purkinje cells in the zebrafish cerebellum: analysis by means of a specific monoclonal antibody. *Cell Tissue Res.* 305: 299-305.
- Murakami, T.; Morita, Y. (1987) Morphology and distribution of the projection neurons in the cerebellum in a teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *J. Comp. Neurol.* 256: 607-623.
- Nieuwenhuys, R. & Pouwels, E. (1983). The brain stem of actinopterygian fishes. *Fish neurobiology*, 1: 25-87.
- Pérez-Pérez, M. P.; Luque, M. A.; Herrero, L.; Nuñez-Abades, P. A.; Torres B. (2003) Afferent connectivity to different functional zones of the optic tectum in goldfish. *Vis. Neurosci.* 20: 397-410.
- Perry, S. F.; Ekker, M.; Farrell, A. P.; Brauner, C. J. (2010) *Fish physiology: Zebrafish*. Academic Press.
- Pouwels, E. (1978)a On the development of the cerebellum of the trout *Salmo gairdneri*. III. Development of neural elements. *Anat. Embryol.* 153: 37-54.
- Pouwels, E. (1978)b On the development of the cerebellum of the trout *Salmo gairdneri*. IV. Development of the pattern of connectivity. *Anat. Embryol.* 153: 55-65.
- Prasada Rao, P. D. & Sharma, S. C. (1982) Retinofugal pathways in juvenile and adult channel catfish, *Ictalurus (Ameiurus) punctatus*: an HRP and autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 210: 37-48.
- Roberts, B. L.; Dean, J. A.; Paul, D. H. (2002) Cerebellar regulation of sensorimotor activity in brown trout. *Brain Behav. Evol.* 60: 241-248.
- Rodríguez, F.; Durán, E.; Gómez, A.; Ocaña, F.; Álvarez, E.; Jiménez-Moya, F.; Broglio, C.; Salas, C. (2005) Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. *Brain Res. Bull.* 66:365-370.
- Sas E. & Maler L. (1987) The organization of afferent input to the caudal lobe of the cerebellum of gymnotid fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Anat. Embryol.* 177: 35-79

- Schmidt, J. T. (1979) The laminar organization of optic nerve fibres in the tectum of goldfish. *Proc. Roy. Soc.* 205: 287-306.
- Springer, A. D. & Gaffney, J. S. (1981) Retinal projections in the goldfish: a study using cobaltous-lysine. *J. Comp. Neurol.* 203: 401-424.
- Straka, H.; Beck, J. C.; Pastor, A. M.; Baker, R. (2006) Morphology and physiology of the cerebellar vestibulolateral lobe pathways linked to oculomotor function in the goldfish. *J. Neurophysiol.* 96: 1963-1980.
- Torres, B.; Pastor, A. M.; Cabrera, B.; Salas, C.; Delgado-García, J. M. (1992) Afferents to the oculomotor nucleus in the goldfish (*Carassius auratus*) as revealed by retrograde labeling with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 324: 449-461.
- Wullimann, M. F. (1998) The central nervous system. En: *Physiology of Fishes* (D.H. Evans. ed), p. 245. CRC Press, Boca Raton.
- Wullimann, M. F. & Mueller, T. (2005) *Atlas of Early Zebrafish Brain Development: A Tool for Molecular Neurogenetics*. Elsevier B. V.
- Wullimann, M. F. & Northcutt, R. G. (1988) Connections of the corpus cerebelli in the green sunfish and the common goldfish: A comparison of perciform and cypriniform teleosts. *Brain Behav. Evol.* 32: 293-316.
- Wullimann, M. F. & Northcutt, R. G. (1989) Afferent connections of the valvula cerebelli in two teleosts, the common goldfish and the green sunfish. *J. Comp. Neurol.* 289: 554-567.
- Wullimann, M. F.; Rupp, B.; Reichert, H. (1996) *Neuroanatomy of the zebrafish brain: A topological atlas*. Basel: Birkhäuser.
- Xue, H-G.; Yang, C-Y.; Yamamoto, N. (2008) Afferent sources to the inferior olive and distribution of the olivocerebellar climbing fibers in cyprinids. *J. Comp. Neurol.* 507: 1409-1427.