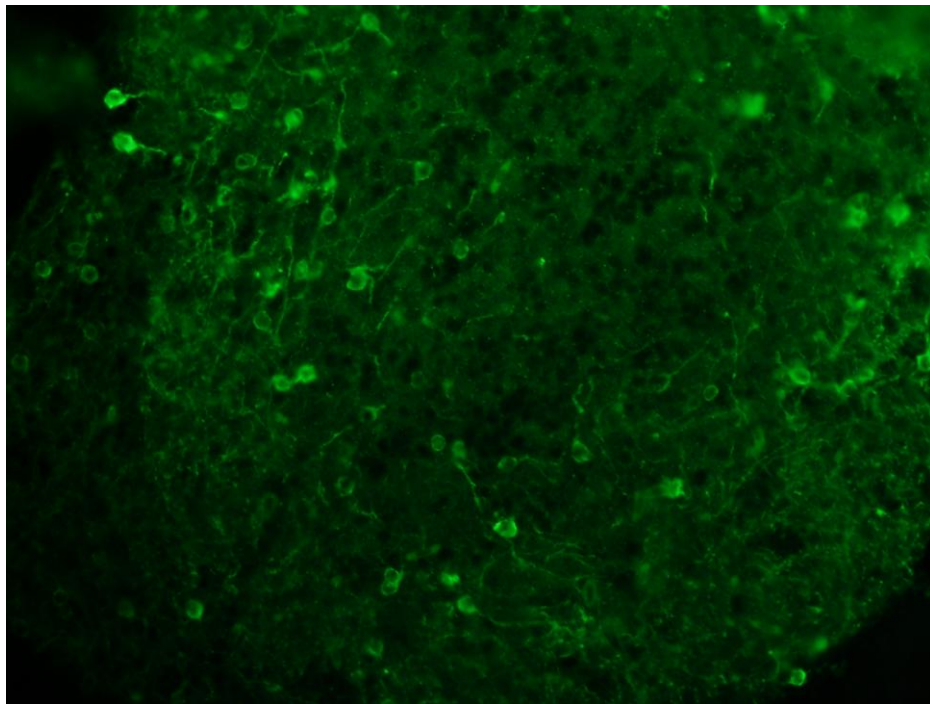




UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Estudio del sistema catecolaminérgico  
en el encéfalo anterior del pez cebra  
adulto (*Danio rerio*)



TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

JOSÉ CALVO FRESCO

Febrero 2016

Directores | Antonio Manuel Castro Castro  
Mónica Folgueira Otero

Estudio del sistema catecolaminérgico  
en el encéfalo anterior del pez cebra  
adulto (*Danio rerio*)

Estudo do sistema catecolaminérxico no  
encéfalo anterior do peixe cebra adulto  
(*Danio rerio*)

Study of the catecholaminergic system  
in the adult zebrafish forebrain (*Danio  
rerio*)

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro

Fdo. Mónica Folgueira Otero

José Calvo Fresco

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	Pág.1
1.1. El pez cebra como modelo de interés biológico.....	Pág.1
1.2. Anatomía del Sistema Nervioso Central (SNC) de peces.....	Pág.3
1.3. Sistema catecolaminérgico.....	Pág.7
<b>2. Objetivos</b> .....	Pág.12
<b>3. Material y métodos</b> .....	Pág.12
3.1. Obtención y procesamiento del material biológico.....	Pág.12
3.2. Técnicas inmunohistoquímicas.....	Pág.13
3.2.1. Doble inmunofluorescencia.....	Pág.14
3.2.2. Prueba de especificidad.....	Pág.15
3.2.3. Inmunohistoquímica con revelado enzimático.....	Pág.15
3.3. Estudio de las conexiones neuronales mediante DiI.....	Pág.16
3.3.1. Aplicación trazador neuronal DiI.....	Pág.16
3.4. Obtención y procesamiento de las imágenes.....	Pág.16
<b>4. Resultados</b> .....	Pág.17
<b>5. Discusión</b> .....	Pág.23
<b>6. Conclusiones</b> .....	Pág.29
<b>7. Bibliografía</b> .....	Pág.29

# 1. Introducción

## 1.1. El pez cebra como modelo de interés biológico

El pez cebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822) pertenece a la familia de los Ciprínidos (superorden Ostariofisios) en la que se incluyen 220 géneros y 2420 especies (Nelson, 2006). Los ostariofisios son el mayor grupo de teleósteos de agua dulce (Lauder y Liem, 1983).

El cuerpo del pez cebra tiene aspecto fusiforme y comprimido lateralmente. Presenta de 5 a 9 bandas laterales azuladas que se extienden hasta el final de los radios de la aleta caudal. Existe dimorfismo sexual aunque en algunos casos es difícil diferenciar entre machos y hembras. En general, las hembras suelen ser más grandes que los machos y tienen un color más plateado. En cambio, el macho suele presentar una coloración un poco más dorada y presenta una forma más esbelta. Se trata de una especie ovípara que se reproduce todo el año. Las larvas suelen alimentarse de forma independiente a partir de los 5 días postfertilización (Spencer *et al.*, 2008) (Figura 1).

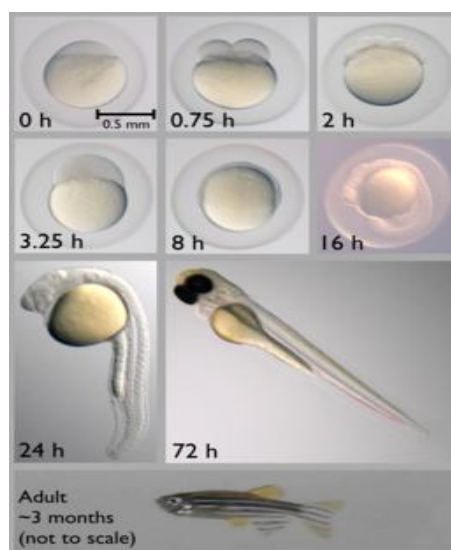


**Figura 1.** Peces cebra: macho (parte superior) y hembra (parte inferior)

<http://www.starallfish.com/Danio-fish-export.asp>

Aunque el pez cebra puede vivir en una pecera como animal doméstico, su hábitat natural son aguas más o menos tranquilas, incluso estancadas (Perry *et al.*, 2010). Su distribución abarca toda Asia central y la India (río Ganges), aunque también en ríos de Pakistán, Bangladesh o Nepal. La alimentación es de tipo omnívora, alimentándose sobre todo de zooplancton (larvas de mosquito aunque también de otras especies) y de fitoplancton (algas microscópicas). En cautividad, suele mantenerse entre 22-30°C de temperatura, una dureza del agua de 5-10° y un pH neutro (entorno a 7). Deben ser alimentados 1 ó 2 veces al día (Westerfield, 2000).

El pez cebra se introdujo por primera vez en el laboratorio en la década de los 1990. Es particularmente útil como organismo modelo para comprender el desarrollo del sistema catecolaminérgico, entre otros muchos estudios. Su tamaño, no más de 5cm de longitud en estado adulto, permite tener muchos ejemplares en una pecera relativamente pequeña con costes de mantenimiento bajos. Las hembras ponen un número bastante elevado de huevos (entre 200-300 huevos en el laboratorio) y estos suelen eclosionar 3 días a partir de la fertilización. Los embriones y larvas se desarrollan rápidamente. Son semitransparentes lo que permite visualizar los procesos de embriogénesis y organogénesis sin provocar su interrupción (Bilotta y Saszik, 2001; Spencer *et al.*, 2008). En este momento el embrión ya presenta movimientos espontáneos y un encéfalo rudimentario. Los individuos llegan a la madurez reproductiva entre los 3 y los 6 meses de vida (Figura 2). Es bastante resistente a variaciones en las condiciones del medio y puede convivir con muchas otras especies. Además, su genoma está casi totalmente secuenciado (Schweitzer *et al.*, 2011). Dado que se trata de un vertebrado, este pez resulta mucho más comparable con los humanos que los modelos invertebrados, lo cual supone una gran ventaja. Al mismo tiempo, es más manejable en cuanto a la manipulación embriológica y genética se refiere que las especies de vertebrados modelos (ratón), en los que los procedimientos resultan más caros y complejos (Spencer *et al.*, 2008). También resulta útil en medicina regenerativa ya que esta especie puede regenerar distintas estructuras como aletas, células fotorreceptoras, corazón o incluso la espina dorsal (Gemberling *et al.*, 2013).

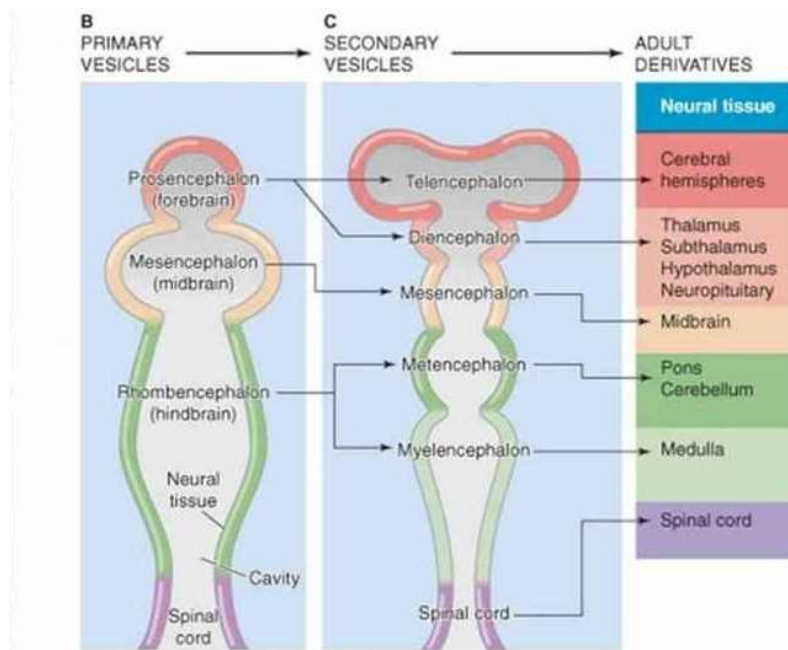


**Figura 2.** Desarrollo pez cebra. Tanto el embrión como la larva son semitransparentes.

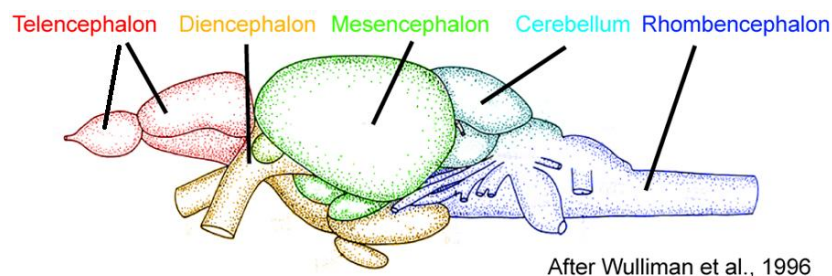
[http://es.reinoanimalia.wikia.com/wiki/Pez\\_Cebra](http://es.reinoanimalia.wikia.com/wiki/Pez_Cebra).

## 1.2. Anatomía del Sistema Nervioso Central (SNC) de peces

En los peces, al igual que en el resto de vertebrados, el SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. Ambos surgen de la diferenciación del tubo neural durante el desarrollo embrionario. El tubo neural, a su vez, se origina por la invaginación de una parte del ectodermo. La regionalización antero-posterior del encéfalo y la médula espinal dará lugar a las siguientes divisiones en el encéfalo temprano (de rostral a caudal): telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo, mielencéfalo y médula espinal (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema representando la regionalización antero-posterior del SNC (Boron y Boulpaep, 2009). Las primeras divisiones del encéfalo dan lugar al prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. En la siguiente división, el encéfalo se subdivide en telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, metencéfalo, mielencéfalo.



**Figura 4.** Esquema encéfalo pez cebra tras la segunda división (Wulliman *et al.*, 1996).

Las 3 divisiones del encéfalo temprano (prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo) del pez cebra darán origen a diversas estructuras al culminar el desarrollo cerebral. Dado que nuestro estudio se llevará a cabo en dichas regiones, éstas se detallarán a continuación destacando las particularidades presentadas por el encéfalo anterior del pez cebra.

## **Telencefalo**

El telencefalo constituye la región más rostral del encéfalo. A su vez, el telencefalo se puede subdividir en bulbos olfativos y lóbulos telencefálicos. La diferenciación más rostral del telencefalo dará lugar a los bulbos olfativos.

### *Bulbos olfativos*

Cada bulbo olfativo está formado por cuatro láminas o capas (de la periferia a la zona más interna): 1) *Capa de fibras olfativas primarias*: situada únicamente en la periferia de la porción rostroventral de los bulbos olfativos. Está formada por los axones de los receptores localizados en los epitelios olfativos. 2) *Capa glomerular (GL)*, donde se establece contacto sináptico entre los axones de las células receptoras y las dendritas de las células mitrales. 3) *Capa celular externa (ECL)*: donde se localizan los somas de las células mitrales y las células yuxtglomerulares (un tipo de interneuronas). 4) *Capa celular interna (ICL)*: la capa más interna y donde se localizan las células grano. Los bulbos olfativos se encuentran interconectados con los lóbulos telencefálicos por medio de las fibras olfativas secundarias laterales y mediales, formados por axones de células mitrales. Estas fibras olfativas secundarias no se aprecian entre la capa celular interna y externa en el caso del pez cebra.

### *Lóbulos telencefálicos*

Los lóbulos telencefálicos se pueden dividir en una porción ventral (V) o subpalio y una porción dorsal (D) o palio. A su vez, estas regiones se pueden subdividir en diversas áreas que se denominan fundamentalmente en base a su situación topográfica en el encéfalo (dorsal, ventral, supracomisural, postcomisural, central, lateral, entopeduncular ventral y lateral) y con respecto a la comisura anterior, la cual conecta ambos lóbulos telencefálicos. Además, en el telencefalo se puede distinguir la comisura anterior, la cual está dividida en parte dorsal (Cantd) y una parte ventral

(Cantv). La parte dorsal, está situada ventralmente al núcleo supracomisural del área ventral telencefálica. Por su parte ventral, limita dorsalmente con la región preóptica.

Las principales subdivisiones del área ventral y dorsal telencefálicas se indican a continuación:

- Área ventral telencefálica (V) o subpalio: formada por una región periventricular y otra región más alejada del ventrículo. A su vez, la región periventricular se puede subdividir en núcleo dorsal (Vd) y ventral (Vv) localizados a nivel rostral, y los núcleos supracomisural (Vs) y postcomisural (Vp) localizados más caudalmente. La región del subpalio que está más alejada del ventrículo está formada por los núcleos central (Vc) y lateral (Vl) a nivel rostral, y los núcleos entopeduncular dorsal y ventral situados a nivel caudal (ENd y ENv, respectivamente). El ENd desaparece más rostralmente, mientras que el ENv se extiende hasta el límite telencéfalo-diencefalo. En algunos teleosteos, fue descrito un núcleo intermedio como una extensión del núcleo postcomisural. En el caso del pez cebra está ausente.

- Área dorsal telencefálica (D) o palio: de la región rostral a la más caudal se distinguen 4 zonas que rodean a la zona central (Dc): medial (Dm), dorsal (Dd), lateral (Dl) y posterior (Dp).

## **Diencefalo**

El diencefalo está limitado rostralmente por el telencéfalo y caudalmente por el mesencéfalo. Está dividido en diferentes regiones: región preóptica, epitálamo, región talámica (tálamo dorsal, tálamo ventral y tubérculo posterior), hipotálamo, sinencéfalo y parte del pretecho (Braford y Northcutt, 1983).

- Región preóptica: está localizada entre el quiasma óptico y la comisura anterior rodeando parte del tercer ventrículo. Se puede dividir en 4 núcleos: núcleo preóptico parvocelular anterior, núcleo preóptico magnocelular (dorsal al anterior y constituida por células neurosecretoras de gran tamaño), el núcleo preóptico parvocelular posterior (caudoventral al núcleo preóptico magnocelular) y el núcleo supraquiasmático (localizado caudoventralmente al núcleo preóptico parvocelular posterior) (Herget *et al.*, 2014).



- Epitálamo: el epitálamo es la región más rostral del diencefalo. Como su nombre indica, se encuentra localizado dorsalmente a la región talámica. En teleósteos, está formado fundamentalmente por la glándula pineal, la glándula parapineal y dos habénulas localizadas cada una a un lado de la línea media.

- Región talámica: se subdivide en tálamo dorsal (TD), tálamo ventral (TV) y tubérculo posterior (TP). El tálamo dorsal está formado por un núcleo anterior y dos núcleos más caudales: el núcleo talámico posterior dorsal (NTPD) y el núcleo talámico posterior central (NTPC). El tálamo ventral está formado por un núcleo intermedio (I), un núcleo ventromedial (VM), un núcleo ventrolateral (VL) y un núcleo rostrolateral (R) (Butler y Saidel, 1991). El tubérculo posterior es una compleja región del tálamo. La zona que rodea al ventrículo está formada por dos núcleos: el núcleo periventricular del tubérculo posterior (NPTP) y el núcleo posterior tuberal (NPT). Ambos núcleos se localizan entre el tálamo ventral y el hipotálamo. Además está formado por una serie de núcleos que se extienden por el diencefalo basal: el núcleo preglomerular y el núcleo glomeruloso (Bradford y Northcutt, 1983).

- Hipotálamo: el hipotálamo del pez cebra, al igual que en otros teleósteos, es el área diencefálica de mayor tamaño. Incluye las zonas ventral, dorsal y caudal del diencefalo. Se puede diferenciar o dividir en tres zonas: zona periventricular, región tuberal medial (anterior y posterior) y los lóbulos inferiores dispuestos en un núcleo central más bien compacto y una región periférica compuesta por células de distribución difusa (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

- Sinencéfalo: está formado por una serie de estructuras localizadas entre el diencefalo dorsal y el mesencéfalo (Bradford y Northcutt, 1983).

- Pretecho: formado por el pretecho periventricular y los pretechos central y superficial. El pretecho central está formado por una serie de células que se sitúa de forma lateral al periventricular. El pretecho superficial formado por pequeñas células, se sitúa cerca del pretecho central. Tanto el pretecho central como el superficial se cree que son de origen mesencefálico (Bradford y Northcutt, 1983).

### 1.3. Sistema catecolaminérgico

Las catecolaminas son un grupo de neurotransmisores formado por la dopamina, noradrenalina y adrenalina. Tienen la estructura distintiva de un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo (grupo catecol), una cadena intermedia y un grupo amino terminal. Se sintetizan en las células cromafines de la médula adrenal (adrenalina, noradrenalina y dopamina), en diferentes áreas del SNC (dopamina, noradrenalina y adrenalina) y en las fibras postganglionales del sistema nervioso simpático (noradrenalina y dopamina) (Molinoff y Axelrod, 1971; Weiner, 1979).

Las catecolaminas se sintetizan a partir del aminoácido tirosina en la ruta de las catecolaminas (Figura 5). La ruta da comienzo con la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), que cataliza la adición de un grupo hidroxilo a la tirosina. De esta manera, se forma la 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). La siguiente reacción está catalizada por la enzima DOPA-descarboxilasa que convierte la L-DOPA en dopamina. Estos dos primeros pasos tienen lugar en el citosol. El paso de dopamina a noradrenalina es llevado a cabo por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa. Ocurre ya en el interior de vesículas sinápticas, una vez que la dopamina entra en dichas vesículas gracias al transportador vesicular de monoaminas (vmat). El último paso es llevado a cabo por la feniletanolamina-N-metiltransferasa, que transfiere un grupo metilo de la S-adenosilmetionina para formar adrenalina (Goldstein y Lieberman, 1992; Nagatsu, 1995; Haavik y Toska, 1998; Hedstrand *et al.*, 2000; Daubner *et al.*, 2012) (Figura 5). La entrada de calcio al interior de la neurona presináptica conlleva el vaciado del contenido de las vesículas a la hendidura sináptica. De esta forma se producirá la transmisión del impulso nervioso (Daubner *et al.*, 2012).

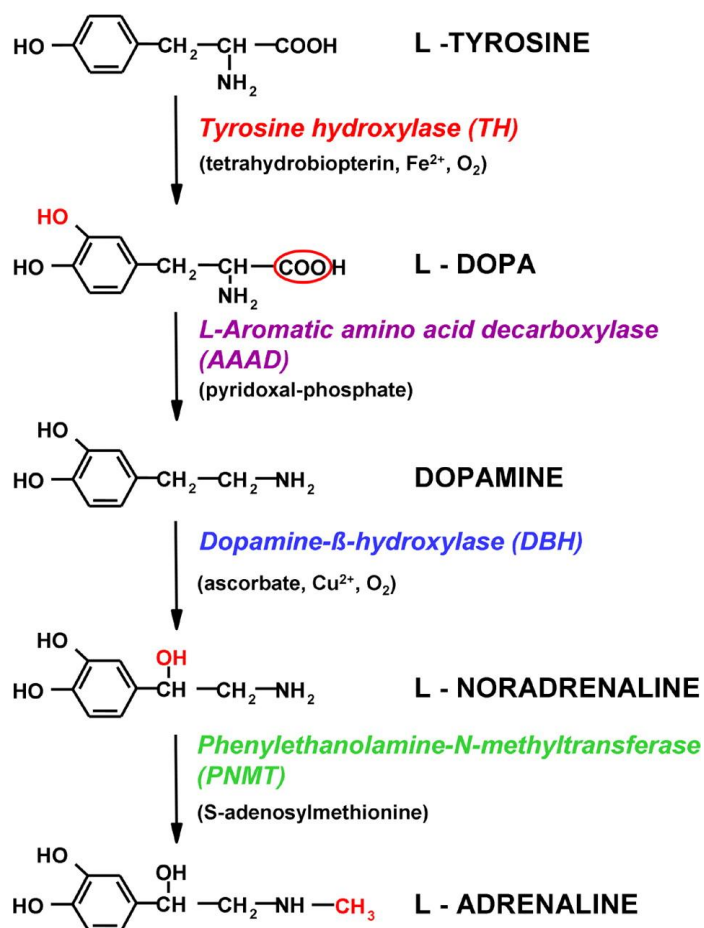


Figura 5. Ruta de síntesis catecolaminas <http://physrev.physiology.org/content/89/2/535>.

### Tirosina hidroxilasa (TH)

La TH del pez cebra tiene una masa atómica de 240 kDa. Está formada por 489 aminoácidos cuya secuencia se muestra a continuación (Figura 6):

```

1 mpnsssstss tksirraase lersdsitsq kfvgrrqsli edarkereaa aaaaaaagls
61 eqivfeesdg kalislfftl rcskspalsr tlkvfetfea kihhletprs rkpkgdledl
121 eyyvqcevhl sdvstlvssl krsaedvktk kevkhfwfpr kiaeldkchh lvtkydpdld
181 qdhpqftdpv yrkrrkmigd iaftyrhgpe iprvdytee igtwrevyst lrdlytthac
241 sehleafrrll ekhcgyspnd ipqledvscf lkertgfqlr pvagllsard flaslafrvf
301 qctqyirhas spmhspepdc vhellghvpi lsdrftaqfs qsiglaslga sdedieklst
361 mywftvefgl ckqggvikay gagllssyge lvhslsdepe rrefdpdiva vqpyqdqtyq
421 pvyfvsesfv dateklrtyv trikrpfsvr fdpytdsiev ldnplkiqkg letikdelki
481 ltdalnvla

```

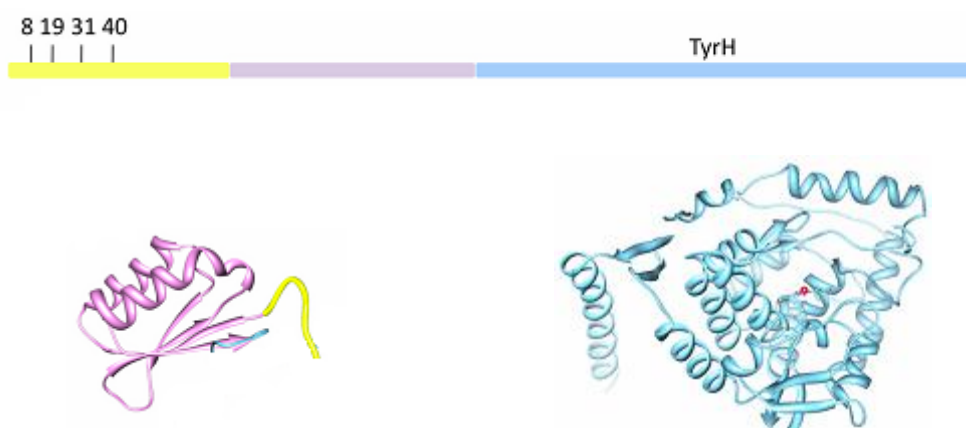
Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la tirosina hidroxilasa

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAI63639.1>.

**Tabla 1.** Códigos aminoácidos de tres y una letras. <http://www.revespcardiol.org/es/introduccion-genetica-su-utilidad-el/articulo/13137262/>.

Alanina	Ala	A	Glutamato	Glu	E	Prolina	Pro	P
Arginina	Arg	R	Glutamina	Gln	Q	Serina	Ser	S
Asparagina	Asn	N	Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Aspartato	Asp	D	Isoleucina	Ile	I	Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C	Leucina	Leu	L	Triptófano	Trp	W
Fenilalanina	Phe	F	Lisina	Lys	K	Valina	Val	V
Glicina	Gly	G	Metionina	Met	M	Codón de parada	Ter	X

Presenta cuatro subunidades idénticas de 60 kDa. Además, tiene forma de tetrámero y una estructura con tres dominios para cada subunidad. El dominio regulador (región amarilla y violeta en Figura 7) amino-terminal comparte cierta homología con otras hidroxilasas. Puede variar en tamaño entre 100-150 aminoácidos. Contiene residuos de serina en diferentes posiciones que serán fosforilados para llevar a cabo la regulación de la enzima (posiciones 8, 19, 31 y 40). El dominio catalítico (región azul en Figura 7) está formado por 330 aminoácidos y el dominio "coiled-coil" en el extremo carboxilo está formado por 20 aminoácidos (Ledley *et al.*, 1985) (Figura 7).



**Figura 7.** En la parte superior se encuentra la estructura en dominios completa de la TH. En la parte inferior izquierda se encuentra el dominio regulador. La región violeta corresponde a la región reguladora homóloga para las tres hidroxilasas. Abajo a la derecha el dominio catalítico (Daubner *et al.*, 2012).

Para el funcionamiento de la TH es necesaria la unión de un átomo de  $Fe^{+2}$  a la región catalítica de la enzima (Hufton *et al.*, 1995; Fitzpatrick *et al.*, 2000). Se expresa en las terminales nerviosas de los sistemas nerviosos central y periférico, así como también en las células cromafines de la médula adrenal (Goldstein *et al.*, 1964; Rush y Geffen, 1980; Stanley, 1997).

La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante en la ruta de síntesis de catecolaminas (Molinoff, 1971). Por esta razón, el estudio de la TH es de gran interés en muchos campos relacionados con la biomedicina.

### **DOPA-descarboxilasa**

La DOPA-descarboxilasa es una enzima de 104 kDa. Es un homodímero constituido cada uno de los cuales por tres dominios diferentes: un pequeño dominio C-terminal, un dominio N-terminal y un largo dominio intermedio. Este último contiene el lugar de unión del fosfato de piridoxal. El sitio activo se encuentra hendido entre las dos subunidades y está formado por diferentes residuos entre los que se incluyen Lys-303, Asp-271, His-192, Thr-82 y Phe-103. Se encuentra ampliamente distribuida por todo el cuerpo, donde se puede hallar tanto en neuronas que contienen catecolaminas como en aquellas que contienen serotonina. Además, puede encontrarse en tejidos no neurales, tales como el riñón o los vasos sanguíneos (Christenson *et al.*, 1972; Ishii *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 2000).

### **Dopamina $\beta$ -hidroxilasa (DBH)**

La dopamina  $\beta$ -hidroxilasa es una enzima formada por 4 subunidades idénticas de 290 kDa. Contiene cobre en su estructura. Es la única enzima implicada en la síntesis de neurotransmisores de pequeño tamaño que se encuentra unida a membranas biológicas. Al igual que la TH se expresa en las terminales nerviosas noradrenérgicas de los sistemas nerviosos central y periférico, así como también en las células cromafines de la médula adrenal (Goldstein *et al.*, 1964; Rush y Geffen, 1980; Stanley *et al.*, 1997).

### **Regulación**

Dado que la TH es la enzima limitante, la regulación de la ruta de catecolaminas está centrada en la regulación de la actividad de esta enzima. Cambios bioquímicos y conformacionales de la TH influirán en su actividad y serán modulados en respuesta a estímulos nerviosos y al estado metabólico de la neurona.

La regulación de la ruta de catecolaminas tiene lugar principalmente por dos mecanismos: fosforilación de serinas e inhibición por otras catecolaminas.

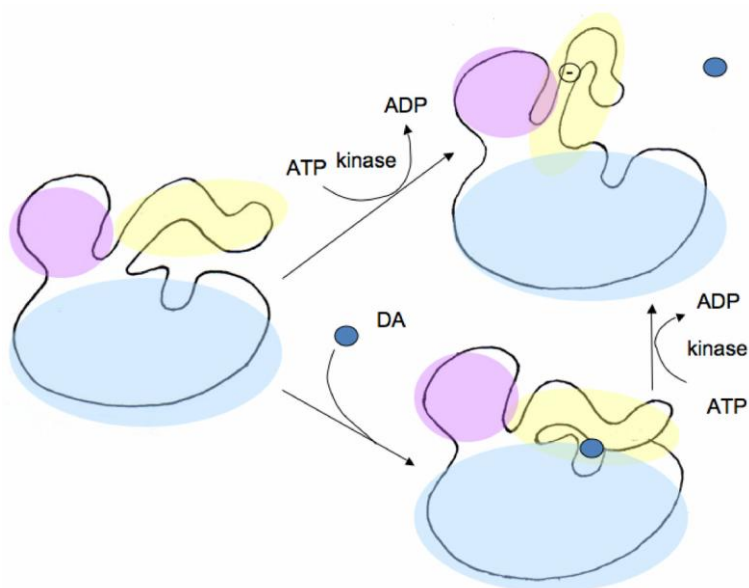
### *Por fosforilación de serinas*

Los residuos de serina (8, 19, 31 y 40) de la región reguladora son fosforilados por una proteína quinasa dependiente de AMPc. Entre las quinasas que llevan a cabo estas fosforilaciones están la PKA, PKC, CaMKII, MAPKAP-K2, ERK1, ERK2, MSK1 y PRAK, entre otras (Fitzpatrick, 2000; Dunkley *et al.*, 2004; Daubner *et al.*, 2012).

La fosforilación provoca un desplazamiento en la región reguladora. Esto permite dejar al descubierto el sitio activo. La desfosforilación llevada a cabo por una fosfatasa inactiva la zona activada (Daubner *et al.*, 2012).

### *Inhibición por otras catecolaminas*

La afinidad de la TH por la dopamina sufre un gran descenso cuando la enzima se encuentra fosforilada (Ramsey y Fitzpatrick, 1998) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de las tres posibles configuraciones del dominio regulador de la TH. La dopamina está representada por un círculo azul oscuro. A la izquierda se encuentra la TH desfosforilada. En la parte inferior derecha la dopamina está unida a la TH. El dominio regulador se encuentra en una conformación más rígida y menos accesible al sustrato. En la imagen superior derecha, la serina 40 fosforilada permite la creación de puentes salinos que dejan expuesto el sitio activo y liberan la dopamina (Daubner *et al.*, 2012).

## 2. Objetivos

En el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- Estudiar la presencia y el patrón de distribución de neuronas y fibras catecolaminérgicas en el encéfalo anterior del pez cebra adulto.
- Comparar los resultados de distribución del sistema catecolaminérgico con los resultados descritos en estudios anteriores en el adulto de pez cebra y en no tetrápodos.
- Comprobar si la distribución de neuronas catecolaminérgicas en el encéfalo anterior del pez cebra adulto es similar o se ha conservado en diferentes grupos de tetrápodos.

## 3. Material y métodos

### 3.1. Obtención y procesamiento del material biológico

Para llevar a cabo el presente estudio se utilizaron 9 individuos adultos de pez cebra salvaje. De estos 9 individuos, 5 fueron utilizados para una técnica inmunofluorescente, 2 para una técnica de revelado enzimático con diaminobencidina (DAB) y otros 2 para la aplicación de un trazador neuronal (DiI). De los 9 individuos, 8 de ellos medían 3 cm de largo y 1 presentaba unas medidas de 2 cm de largo.

Para su procesamiento los individuos fueron anestesiados utilizando como sedante una solución de metanosulfonato de tricaina (MSS, Sigma-Aldrich) al 0,02%.

### Fijación mediante perfusión y postfijación

La fijación es una técnica ampliamente utilizada y cuya función es mantener o preservar la estructura (y en algunos casos la función) de los tejidos del individuo mediante la utilización de un agente fijador. Debe realizarse antes del comienzo de los procesos "post mortem". El fijador empleado en nuestro caso ha sido el paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 (TF). Como método de fijación se ha utilizado la técnica de perfusión transcardíaca que introduce el fijador en el sistema circulatorio del animal para que el fijador llegue a las células del organismo de forma rápida y homogénea. Para ello, una vez anestesiado el animal, se procede a la

apertura de la cavidad torácica. Con ayuda de una cánula conectada a una bomba de perfusión se procede a la introducción de la solución fijadora en el corazón del animal. De esta manera, la solución llegará a todas las células de los tejidos impulsada por la contracción cardíaca. Para que se produzca la salida de la sangre que retorna al corazón se realiza una incisión en el atrio. Cuando el animal adquiere una cierta rigidez y un color claro es la señal de que ha llegado el fijador a las células.

Con la postfijación se completa el proceso de fijación. Para ello se secciona la cabeza y se introduce en paraformaldehído al 4% en TF. Se mantienen en esta solución durante 24h en oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se procede a extraer el encéfalo ayudándonos de un estereomicroscopio (SMZ-U, Nikon).

### **Procesamiento del tejido para la obtención de criosecciones**

Las tinciones inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia y revelado enzimático) se realizaron sobre secciones obtenidas en un criostato. Para ello, en primer lugar se procedió a la crioprotección del tejido, cuya finalidad es evitar la formación de cristales de hielo durante la congelación. Para ello se sumerge el tejido en concentraciones crecientes de sacarosa (sacarosa 10% durante 2 horas; sacarosa 20% durante 2 horas y sacarosa 30% durante 24 horas) en TF.

Para el correcto seccionado de la muestra, se procedió a su introducción en bloques. Para ello, los cerebros se embeben en un medio llamado *OCT (Compound Tissue-Tek; Sakura)* y se congelan en 2-metilbutano enfriado en nitrógeno líquido. Finalmente, se realizaron secciones de 12 $\mu$ m de grosor mediante el empleo de un criostato HM500-M (Microm). Los cortes fueron recogidos en series paralelas sobre portaobjetos previamente gelatinizados.

### **3.2. Técnicas inmunohistoquímicas**

Estas técnicas permiten detectar y localizar moléculas (antígenos) en los tejidos. Para ello, se utilizan anticuerpos primarios con una alta especificidad y afinidad por un determinado antígeno. En el presente trabajo se llevan a cabo dos procedimientos diferentes para la detección de los antígenos de interés: doble inmunofluorescencia y inmunohistoquímica con revelado enzimático. Se trata, en ambos casos, de métodos indirectos ya que la detección y localización se consigue con el empleo de anticuerpos secundarios marcados con una molécula fluorescente o una enzima. Los métodos



indirectos permiten una mayor versatilidad de la técnica y mayor intensidad de señal frente a una misma cantidad de antígeno (Montuenga *et al.*, 2014).

### **3.2.1. Doble inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia consiste en la detección de los antígenos de interés mediante el empleo de anticuerpos específicos unidos a una molécula fluorescente (Badía *et al.*, 2009). En este caso, se utilizó para la detección de la TH en combinación con la DOPA-descarboxilasa y la  $\beta$ -hidroxilasa.

Para la realización de esta técnica, primero las secciones se lavan en una solución de tampón fosfato salino 0,01M pH 7,4 (TFS) durante 5 min. A continuación, se procedió a la incubación de las muestras con borohidruro de sodio 0,1M durante 30 min. El borohidruro de sodio reducirá la autofluorescencia que presentan ciertas moléculas y que podrían enmascarar nuestro resultado. Luego, se llevan a cabo 3 lavados de TFS de 5 min cada uno. Se realiza un último lavado en TFS con Tritón-X100 al 0,01% (TFS-T) durante 5 min. El Tritón-X100 es un detergente que permeabiliza las membranas para que el anticuerpo pueda llegar a antígenos intracelulares. La primera incubación se lleva a cabo con suero normal de cabra (Sigma-Aldrich, G6767, lote 11H280) al 10% en TFS (1 hora en una cámara húmeda). El suero normal de cabra bloqueará las uniones inespecíficas. A continuación se lleva a cabo la incubación con los anticuerpos primarios. Dado que de cada encéfalo se habían realizado dos series paralelas, cada una de dichas series se incubó con una combinación de anticuerpos primarios diferente. Una de ellas fue incubada con anticuerpo de ratón anti-TH (dilución 1:500; Millipore, MAB318, lote NG1899912) y anticuerpo conejo anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (dilución 1:500; Chemicon, AB1585, lote 24020111). La otra serie se incubó con anticuerpo primario de conejo anti-TH (dilución 1:500; Chemicon, AB152, lote LV1375881) y anticuerpo de ratón anti-DOPA-descarboxilasa (dilución 1:500; Sigma-Aldrich, DO180, lote 068K4807). Ambas incubaciones se realizaron en TFS y se mantuvieron durante 20h a temperatura ambiente. Transcurridas las 20h se hicieron 3 lavados con TFS y un cuarto lavado con TFS-T (5 min cada lavado). A continuación, se realiza la incubación con un coctel de anticuerpos secundarios en TFS: anticuerpo cabra anti-ratón unido a la molécula fluorescente Alexa Fluor 568 (dilución 1:500, Invitrogen) y el otro cabra anti-conejo Alexa Fluor 468 (dilución 1:500; Invitrogen). La incubación con dichos anticuerpos secundarios se realiza en oscuridad y a temperatura ambiente

durante 1 hora. Por último, se realizan 3 lavados con TFS (5 min cada uno), se escurre el exceso de TFS y se montan las preparaciones con glicerol al 50% en TF. Las secciones se observan y fotografían en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i) que lleva acoplado una cámara digital (Olympus, DP71).

### **3.2.2. Prueba de especificidad**

Con el fin de comprobar la especificidad de la inmunorreactividad detectada para la TH se realizó una prueba control. El protocolo llevado a cabo es el mismo que el apartado anterior, exceptuando la incubación con el anticuerpo primario.

### **3.2.3. Inmunohistoquímica con revelado enzimático**

Esta técnica se utilizó para la detección de la TH. Para ello, se realiza un primer lavado de las muestras con TFS y posteriormente se incuban en una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% durante 30 min. Tras 3 lavados en TFS (5 min cada uno), se incuban con suero normal de cabra (Sigma-Aldrich, G6767, lote 11H280) al 10% en TFS durante 1 hora. Posteriormente, se procede a la incubación con el anticuerpo primario, que será el mismo usado en el caso anterior para la TH, conejo anti-TH 1:500 (Chemicon, AB152, lote LV1375881) en TFS durante 20 h a temperatura ambiente. Transcurridas 20 h las muestras se lavaron en TFS 5 min cada baño (3 baños). Se hace otro lavado con TFS-T 5 min. A continuación, se incuba con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo biotinilado 1:100 (DakoCytomation, EO432, lote 00034259) en TFS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se realizan otros 3 lavados con TFS (5 min cada uno) y se incuba con estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (DakoCytomation) a una concentración de 25 µg/ml (1h a temperatura ambiente). Transcurrido el periodo de incubación, se hacen otros 3 lavados con TFS (5 min cada uno). Las 3 incubaciones (suero normal de cabra, anticuerpo primario y anticuerpo secundario) fueron realizadas en cámara húmeda. El revelado se realiza con diaminobenzidina al 0,06% con peróxido de hidrógeno al 0,003% en TFS. Una vez que se observa la aparición de un precipitado de color marrón, las secciones se lavan de nuevo con TFS (3 lavados de 5 min cada uno). Luego se deshidratan las muestras mediante baños en soluciones de etanol en concentración creciente (80%, 90% y 100%, 5 min por baño). Finalmente, las secciones se pasan por 4 baños en xileno (5 minutos cada uno), se montan empleando el medio Eukitt y se dejan secar en estufa a 37°C. La

observación de las muestras se llevó a cabo empleando un microscopio de campo claro (Microm).

### **3.3. Estudio de las conexiones neuronales mediante DiI**

En el presente estudio, se utilizó la carbocianina, DiI (Invitrogen, código D-282, lote 7B) para estudiar las conexiones de las habénulas. Un trazador neuronal es una sustancia que nos permite visualizar las conexiones de una neurona o grupo neuronal. Los más utilizados son las carbocianinas y las dextranaminas conjugadas (Honing *et al.*, 1989). El carácter lipofílico de las carbocianinas facilita su inserción en la fracción lipídica de la membrana plasmática. Difunden de forma pasiva a lo largo de la membrana celular. De esta forma, se puede emplear como trazador neuronal tanto anterógrado (soma-axón) como retrógrado (axón-soma). Otra de las grandes ventajas de su utilización es que pueden utilizarse en tejido fijado, es decir, ``post mortem´´. En el caso del DiI, el trazador utilizado en este estudio, su máximo de excitación es 549 nm y su máximo de emisión es 565 nm (naranja-rojo).

#### **3.3.1. Aplicación trazador neuronal DiI**

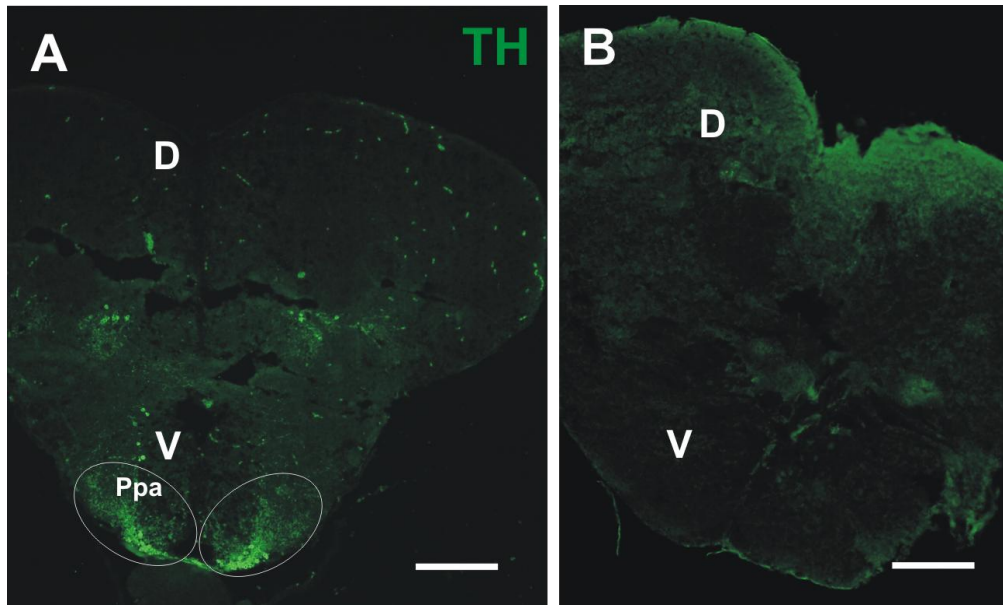
Una vez extraídos los encéfalos de los peces se procedió a la inserción manualmente de un pequeño cristal de DiI en la habénula derecha. Para ello se utiliza un filamento de tungsteno enmangado y un estereomicroscopio (SMZ-U, Nikon). Para poder acceder a la habénula se realizó la extracción de la glándula pineal empleando unas pinzas. Se seca bien la zona en la que se aplicará el trazador para asegurarse de su correcta inserción. Una vez aplicado el trazador, se sella la zona con agarosa. Los encéfalos fueron conservados en el fijador paraformaldehído 4% en una estufa a 37°C. Para el seccionado de la muestra se procedió a la realizar bloques de agarosa al 3%. Los bloques fueron cortados empleando un vibratomo, recogiendo las secciones en portas gelatinizados.

### **3.4. Obtención y procesamiento de las imágenes**

Las muestras fueron observadas con un microscopio de fluorescencia y de campo claro (Nikon Eclipse 90i). Este microscopio lleva acoplada una cámara digital (Olympus DP71) con la que se han obtenido las imágenes. Para el procesamiento y edición de las imágenes se utilizó el programa Corel Draw 12.0. Así mismo, la realización de los esquemas se ha empleado el mismo programa.

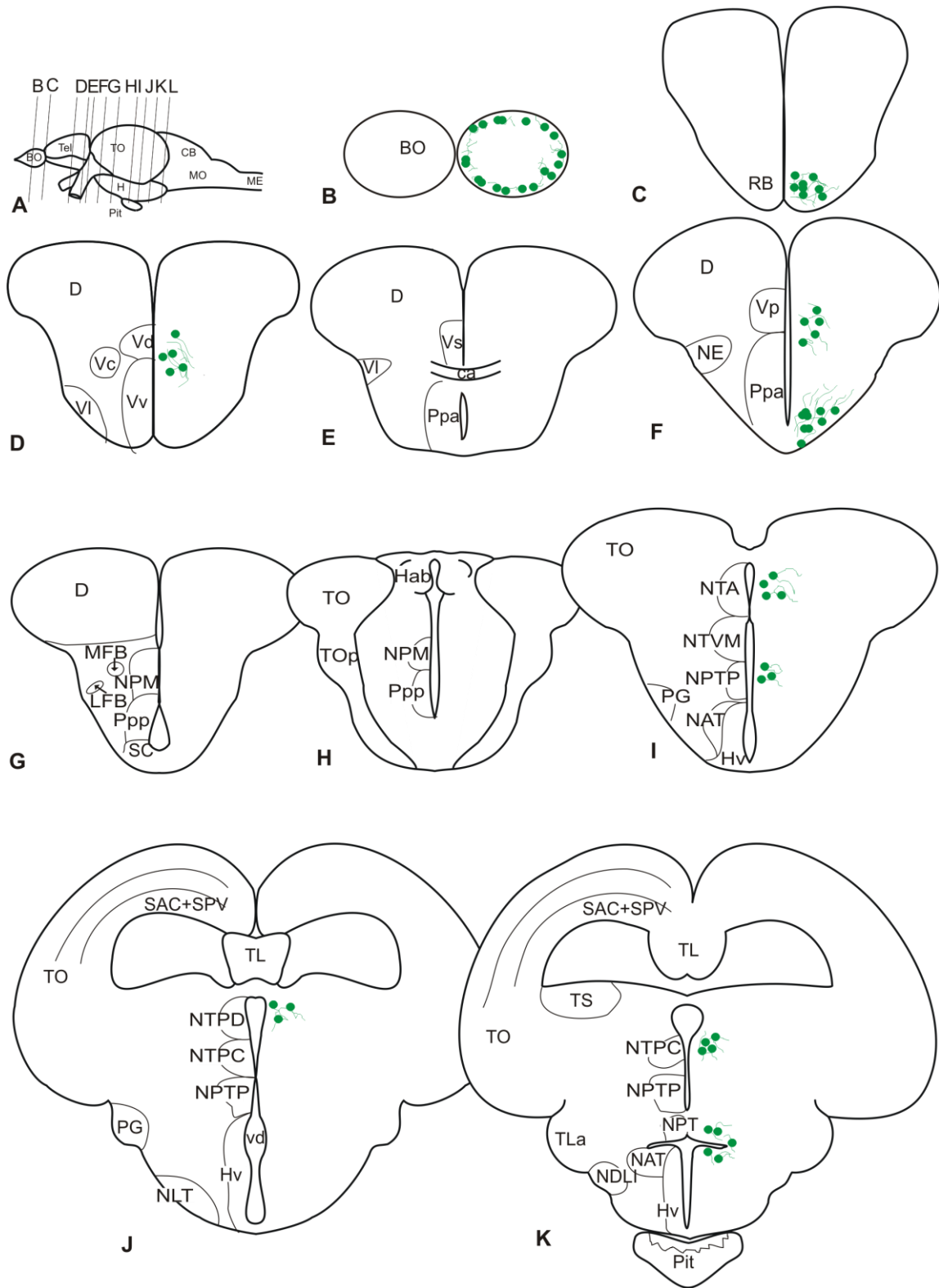
## 4. Resultados

Las pruebas de especificidad, en las que se omitió la incubación con el anticuerpo primario frente a la TH no mostraron inmunorreactividad positiva. Esto indica que la inmunorreactividad observada es específica frente a la TH (Figura 9).



**Figura 9.** Microfotografías de secciones transversales del encéfalo del pez cebra adulto. A: Se observan neuronas TH positivas. B: control, donde no se ha empleado el anticuerpo primario y no hay presencia de células ni fibras TH positivas. Barras de escala: 11  $\mu$ m.

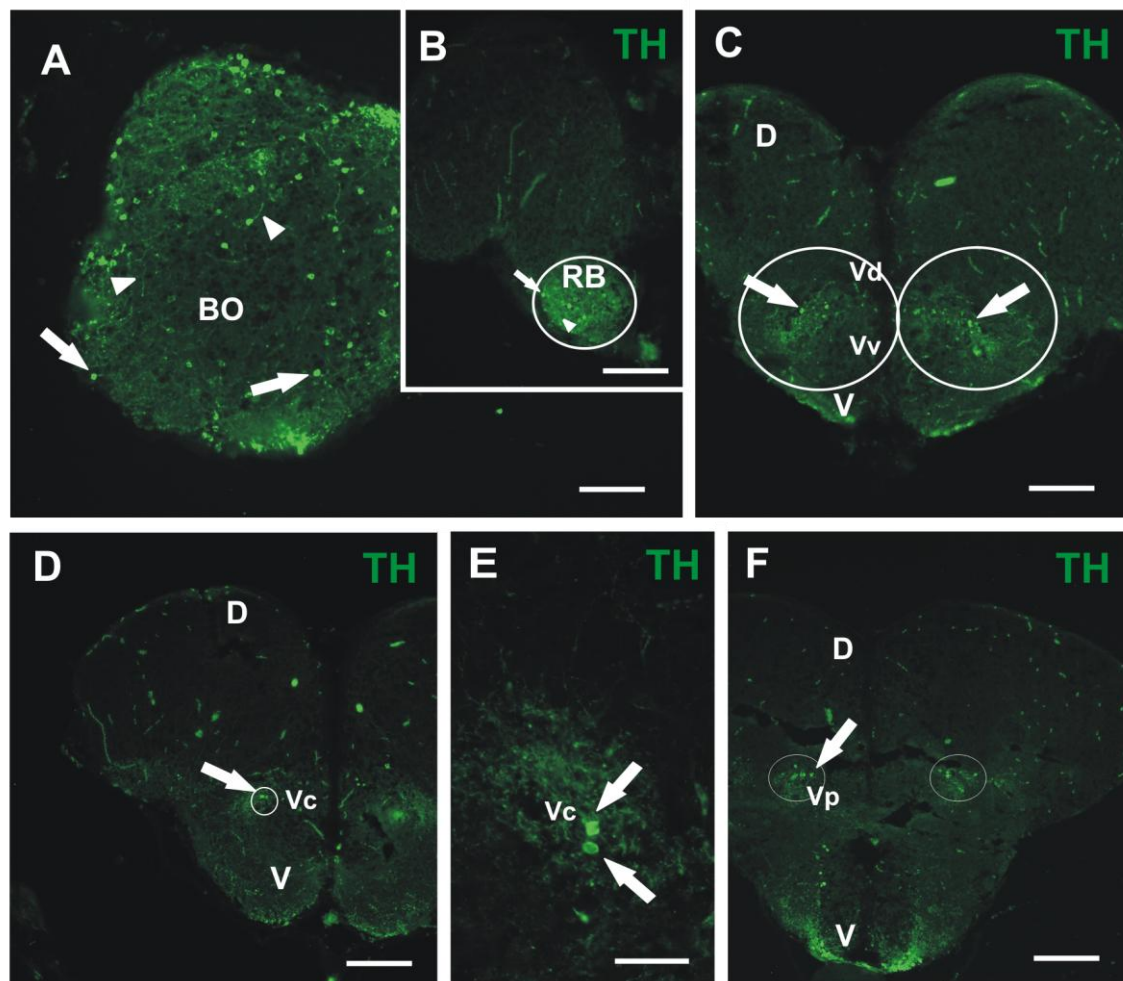
Nuestro estudio está centrado en el encéfalo anterior del pez cebra, es decir, telencéfalo y diencéfalo. La nomenclatura de las diferentes regiones usada en el presente trabajo se basa en la recogida en el atlas del encéfalo del pez cebra de Wullimann *et al.* (1996). Para la detección y estudio de la distribución del sistema de neuronas catecolaminérgicas, se ha empleado dos anticuerpo comerciales que reconocen de forma específica a la enzima TH dando en ambos resultados positivos. En el caso de la DOPA-descarboxilasa y de la  $\beta$ -hidroxilasa no se han obtenido resultados positivos. Por esta razón, a continuación se describen los resultados de la distribución de neuronas y fibras que muestran inmunorreactividad frente a la TH (Figura 10).



**Figura 10.** Representación esquemática de secciones transversales del encéfalo del pez cebrá adulto (*Danio rerio*), mostrando el patrón de distribución de somas de neuronas (puntos gruesos de color verde) y fibras (líneas de color verde) inmunoreactivas a la TH (B-K).

En ambos anticuerpos primarios los resultados han sido positivos para la TH en diferentes regiones del encéfalo anterior del pez cebra adulto. Se han encontrado 11 regiones con presencia de células inmunorreactivas para la TH.

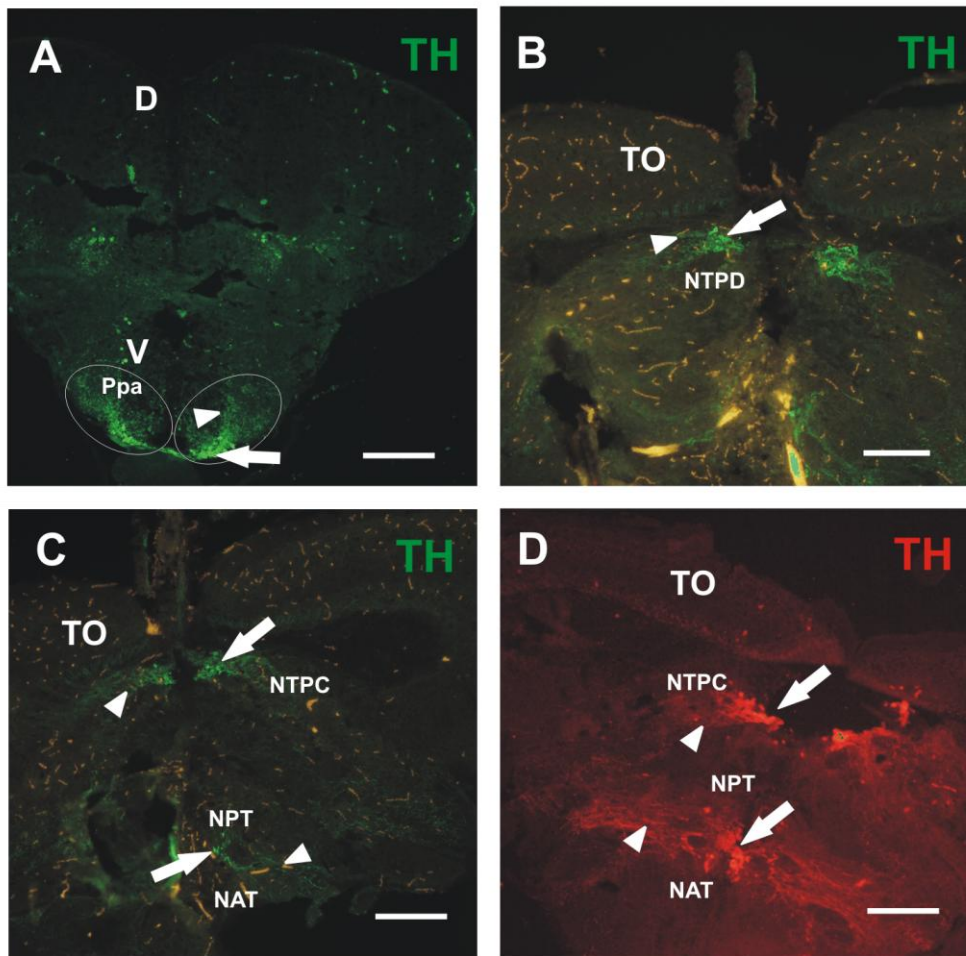
En el telencéfalo, se observan 5 de estas regiones. En la periferia de los bulbos olfativos (capa glomerular y capa celular externa) se puede apreciar con gran intensidad una gran cantidad de células inmunorreactivas para la TH (Figuras 10B y 11A). De la misma manera, se observan en la región retrobulbar (límite con los hemisferios telencefálicos) (Figuras 10C, 11B y 13A). En los hemisferios telencefálicos existen diferentes poblaciones de células que expresan TH con menor intensidad que las encontradas en la periferia de los bulbos. Se localizan en el área ventral telencefálica, en concreto, en los núcleos dorsal (Vd) (Figuras 10D, 11C y 13B), ventral (Vv) (Figuras 10D, 11C y 13B), central (Vc) (Figuras 11D, E y 13E) y postcomisural (Vp) (Figuras 10 F, 11F, 13C y D).



**Figura 11.** Microfotografías de secciones transversales del telencéfalo del pez cebra adulto, desde regiones en sentido rostral-caudal. Se muestran las zonas con células TH positivas (canal verde). Señalados con flechas blancas los somas y con puntas de flecha las fibras. A: células TH inmunorreactivas (TH-ir) en la periferia de los bulbos olfativos (BO). B: región retrobulbar (RB) muestra un grupo de células TH positivas. C: en el área ventral del telencéfalo observamos una población de células entre el núcleo dorsal (Vd) y el núcleo ventral (Vv). D: células positivas en el núcleo central (Vc). E: imagen en más detalle de somas y fibras de neuronas TH positivas (Vc). F: más caudalmente en el área ventral telencefálica encontramos otra población a nivel del núcleo postcomisural (Vp). En este caso es menos notable la presencia de fibras. Barras de escala: 40  $\mu\text{m}$  (A), 90 $\mu\text{m}$  (B), 100  $\mu\text{m}$  (C y F), 290  $\mu\text{m}$  (D), 20 $\mu\text{m}$  (E).

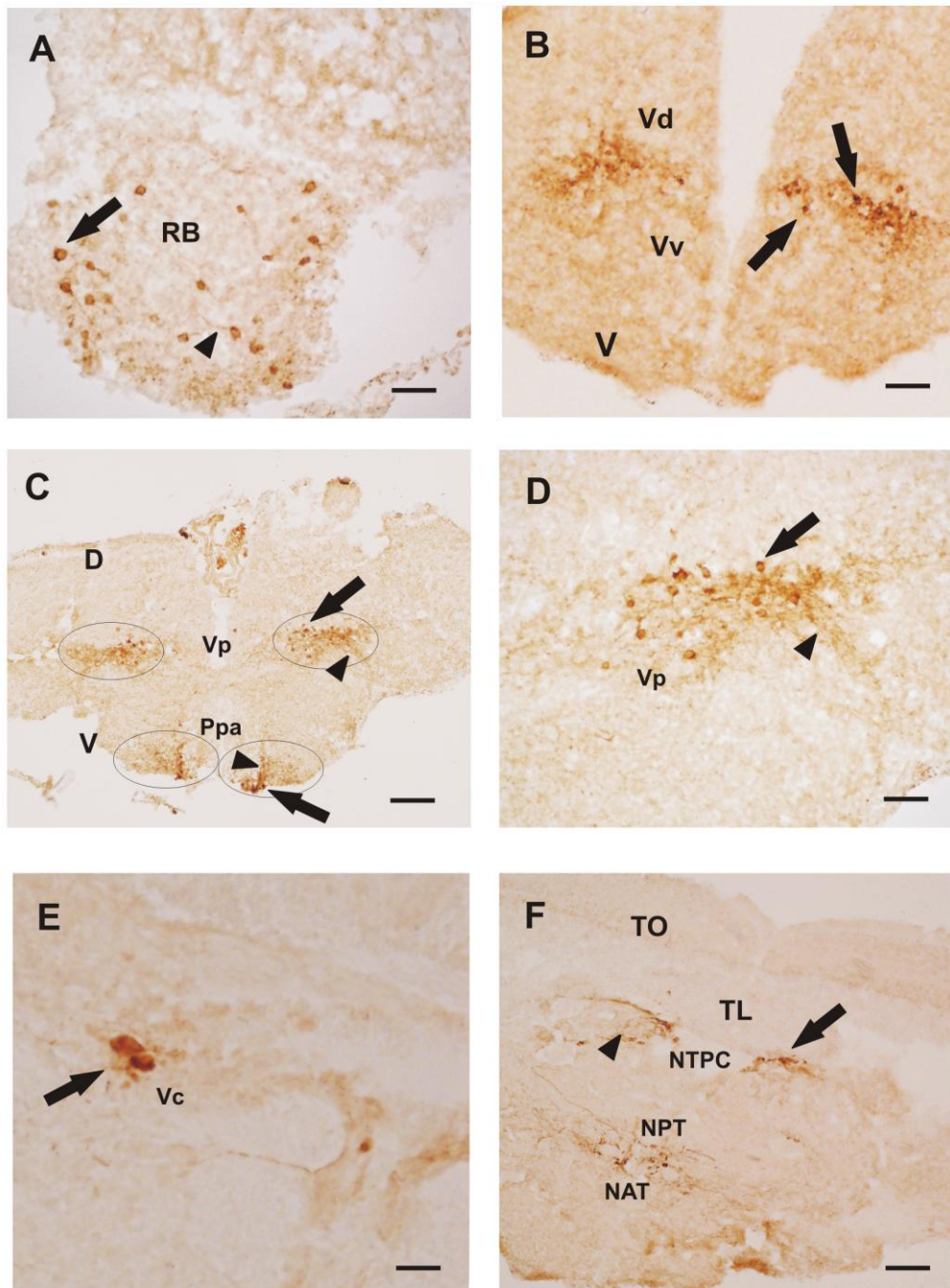
En el diencefalo se encuentran las restantes 6 regiones en las cuales se ha encontrado la presencia de células TH inmunorreactivas. Dentro del área preóptica se observa una de las zonas más intensas. Este grupo de células aparece en el núcleo preóptico parvocelular anterior (Ppa) (Figuras 10F, 12A y 13C). Se encuentra constituida por neuronas intensamente marcadas y muy agrupadas. En el núcleo talámico anterior (NTA) (Figura 10I) aparecen células con inmunoreactividad para la TH. Entre el tálamo ventral y el hipotálamo se observa otra zona inmunorreactiva la cual se corresponde con el núcleo periventricular del tubérculo posterior (NPTP) (Figura 10I). Más caudalmente, en el núcleo talámico posterior dorsal (NTPD) (Figuras 10J y 12B) y en el núcleo talámico posterior central (NTPC) (Figuras 10K, 12C-D y 13F) se encuentran grupos bastante numerosos de somas y fibras ocupando los núcleos casi en su totalidad. En el hipotálamo, se observa otro grupo a nivel de los núcleos anterior tuberal (NAT) y posterior tuberal (NPT) (Figuras 10K, 12C-D y 13F) pero en este caso con menor densidad de células. Se aprecia que las fibras se extienden lateralmente (Figura 12D).





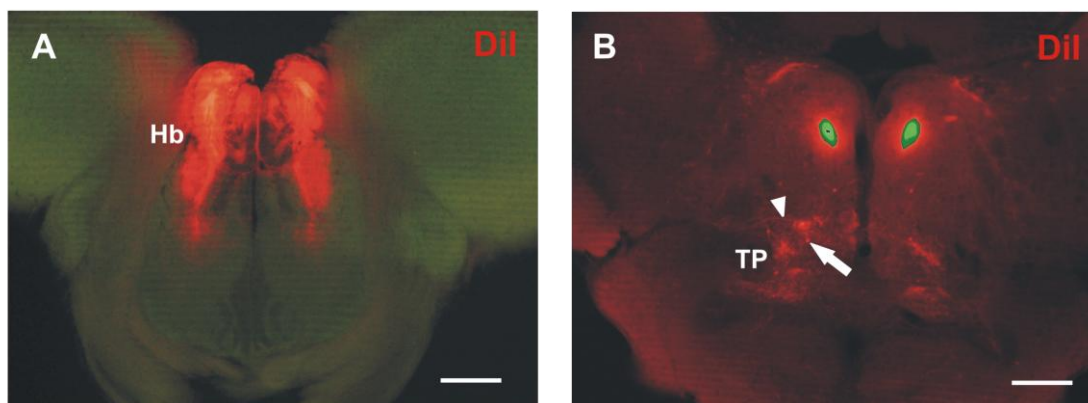
**Figura 12.** Microfotografías con fluorescencia de secciones transversales en sentido rostro-caudal del diencéfalo del pez cebra adulto. Las flechas blancas señalan los somas de neuronas inmunorreactivas para la TH. Las puntas de flecha señalan los axones o fibras de las citadas neuronas. A: células TH-ir en el núcleo preóptico parvocelular anterior (Ppa) del área preóptica. B: zonas positivas para la TH en el núcleo talámico posterior dorsal (NTPD) próximas al toro longitudinal. C: células TH-ir en los núcleos anterior tuberal (NAT), posterior tuberal (NPT) y en el núcleo periventricular del tubérculo posterior (NTPC). Las imágenes B y C están observadas con un filtro de luz para el canal del verde y para el canal del rojo. D: grupo de células inmunorreactivas para la TH en lugares idénticos a la imagen C pero en este caso incubadas con un anticuerpo secundario que emite en el canal del rojo. Barras de escala: 11 $\mu$ m (A), 90  $\mu$ m (B y C), 100  $\mu$ m (D).





**Figura 13.** Microfotografías de secciones transversales del telencéfalo y diencéfalo del pez cebra adulto en sentido rostral-caudal. Se muestran las zonas con células TH positivas marcadas con DAB (color marrón oscuro). Señalados con flechas negras los somas y con puntas de flecha las fibras. A: región retrobulbar (RB) muestra un grupo de células TH positivas. B: en el área ventral del telencéfalo se observa una población entre el núcleo dorsal (Vd) y el núcleo ventral (Vv). C: más caudalmente en el área ventral telencefálica se encuentra otra población a nivel del núcleo postcomisural (Vp) y en el núcleo

preóptico parvocelular anterior (Ppa) del área preóptica. D: en detalle de somas y fibras de neuronas TH positivas en el núcleo postcomisural. E: detalle de somas de neuronas del núcleo central (Vc). F: positividad de las células del núcleo periventricular del tubérculo posterior (NTPC). Positividad también en los núcleos posterior tuberal (NPT) y anterior tuberal (NAT). Barras de escala: 200  $\mu\text{m}$  (A y D), 100  $\mu\text{m}$  (B), 30  $\mu\text{m}$  (C), 290  $\mu\text{m}$  (E), 90 $\mu\text{m}$  (F).



**Figura 14.** Microfotografías de secciones transversales del encéfalo del pez cebra adulto. A: muestra la habénula (Hb) coloreada con el trazador DiI el cual emite en el canal del rojo. B: se observan las neuronas hasta las que ha sido transportado el trazador procedente de las neuronas de la habénula. Se corresponden con neuronas localizadas en el tubérculo posterior (TP). Barras de escala: 110  $\mu\text{m}$  (A), 120  $\mu\text{m}$  (B).

Resultados obtenidos previamente en el laboratorio de Biología Celular mostraron que células situadas en el tubérculo posterior envían axones a la habénula (comunicación personal). Alguna de estas células podría ser catecolaminérgica, dado que se observa inmunorreactividad frente a la TH en esta región. Sin embargo, la aplicación de DiI en la habénula parece descartar esta posibilidad, pues las células marcadas con DiI parecen estar localizadas más laterales en el encéfalo que las TH positivas.

## 5. Discusión

Los anticuerpos primarios empleados en este estudio muestran una gran afinidad por la TH. La prueba control demuestra la ausencia de positividad en las secciones que no hemos incubado con el anticuerpo primario.

Los resultados obtenidos para la expresión de TH han sido positivos en diversas regiones del encéfalo anterior del pez cebra adulto. Además, la ausencia de resultados positivos en nuestro estudio para la expresión de DOPA-descarboxilasa y para la  $\beta$ -hidroxilasa nos indica, según los resultados de Ma (2003), que se trata de neuronas

dopaminérgicas. Por tanto, este tipo de neuronas, utilizan la dopamina como neurotransmisor para llevar a cabo la transmisión del impulso nervioso.

A continuación, se comparan los resultados obtenidos en el presente estudio con los resultados de la expresión de TH obtenidos por otros autores.

### **Expresión de la TH en otros estudios en el pez cebra**

En los bulbos olfativos, se ha observado inmunorreactividad frente a la TH en células localizadas en la capa glomerular y en la capa celular externa de los bulbos olfativos. Estos resultados son similares a los descritos por estudios anteriores (Kaslin y Panula, 2001; Rink y Wullimann, 2001). La capa celular externa de los bulbos olfativos está formada por células mitrales y células yuxtglomerulares o periglomerulares. Fuller *et al.*, (2006) muestran que las células yuxtglomerulares son positivas para la TH. Por tanto, en base a los resultados de Fuller *et al.*, estas células son probablemente células yuxtglomerulares. Estas células, de entre 5-10 $\mu$ m de diámetro, son interneuronas locales que interactúan estrechamente con las dendritas de las células mitrales y con axones provenientes de neuronas del epitelio olfativo.

En los lóbulos telencefálicos, el patrón de distribución de células positivas para la TH en el pez cebra coincide también con lo descrito anteriormente (Kaslin y Panula, 2001; Rink y Wullimann, 2001; Ma, 2003). Sin embargo, Kaslin y Panula (2001) describen grupos de neuronas en el núcleo supracomisural del área ventral telencefálica o Vs, no encontradas en el presente estudio ni en los estudios anteriores por otros autores (Rink y Wullimann, 2001; Ma, 2003).

En el diencéfalo, Kaslin y Panula (2001) describen elementos inmunorreactivos en el núcleo periventricular, no observadas en nuestro estudio. Así mismo, Rink y Wullimann (2001) describen inmunorreactividad para la TH en el hipotálamo dorsal y lateral, no observado en el presente estudio ni en el trabajo de Kaslin y Panula (2001). Además Ma (2003), no localizaron células inmunorreactivas en el PVO intermedio ni en el PVO posterior. En cambio han encontrado en el receso infundibular y en el receso posterior. Cabe destacar que en algunas regiones del encéfalo la nomenclatura varía dependiendo del autor, lo cual dificulta en algunos casos establecer comparaciones entre los diferentes estudios.

El transportador de vesículas vmat2 es el responsable de la recaptación de catecolaminas a la terminal presináptica. Wen *et al.* (2008) crearon un pez cebra transgénico para este transportador, insertando el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) a continuación del gen que codifica para vmat2. De esta manera, la expresión de la GFP coincide con la expresión de vmat2, pudiendo así localizar las neuronas que expresan catecolaminas. Comprobaron que, en el encéfalo anterior, dichas neuronas se localizaban en el telencéfalo, en el órgano paraventricular del tubérculo posterior, en el hipotálamo y en el pretecho. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el presente estudio a excepción del pretecho.

### **Expresión de la TH en no tetrápodos**

Los resultados de la expresión de la TH obtenidos en este estudio para el pez cebra adulto y en los estudios realizados por otros autores son semejantes a los encontrados en otros teleósteos (Hornby *et al.*, 1987; Morita y Finger, 1987; Alonso *et al.*, 1989; Hornby y Piekut, 1990; Sas *et al.*, 1990).

Los lóbulos telencefálicos de teleósteos presentan diferencias en cuanto a la presencia de neuronas en el palio o área dorsal y en el subpalio o área ventral, siendo estas diferencias más importantes para el área dorsal. En la mayoría de los teleósteos, los grupos de células TH positivas de los lóbulos telencefálicos se localizan principalmente en los núcleos Vd y Vv (Hornby *et al.*, 1987; Ekstrom *et al.*, 1986; Manso *et al.*, 1993). Estudios histoquímicos de la TH en los núcleos dorsal y ventral del área ventral telencefálica refuerzan la idea de una homología de estas regiones conservada durante la filogenia de vertebrados.

En el núcleo preóptico parvocelular anterior de teleósteos han aparecido evidencias de neuronas catecolaminérgicas en todos los teleósteos estudiados hasta el momento (Kah *et al.*, 1987; Hornby *et al.*, 1987). En muchos teleósteos también se ha localizado un grupo bastante considerable en el núcleo lateral tuberal. Probablemente, lleguen desde la parte dorsal del núcleo lateral tuberal (Nieuwenhuys, 1998).

La trucha (*Salmo trutta*) y el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) (Ekstrom *et al.*, 1986) no presentan neuronas inmunorreactivas a la TH en la capa glomerular de los bulbos olfativos. En cambio, sí se han asociado este tipo de células con la capa glomerular de los bulbos olfativos en el caso de la anguila (*Anguilla anguilla*) (Roberts

*et al.*, 1989). Desde los bulbos olfativos se extienden caudalmente neuronas TH hasta el núcleo dorsal del área ventral telencefálica (Vd). Este hecho, se ha podido observar en el caso del carpín dorado (*Carassius auratus*) (Hornby y Piekut, 1990). Estas neuronas se corresponden con las encontradas en el núcleo central del área ventral telencefálica de la anguila en la que también se han encontrado en el área dorsal (Roberts *et al.*, 1989; Sas *et al.*, 1990; Reiner y Northcutt, 1992). Dentro de la región preóptica se han localizado en el núcleo preóptico parvocelular y en el núcleo supraquiasmático tanto de la trucha como de la anguila. No se han visto en el caso del pez gato africano (*Clarias gariepinus*) (Corio *et al.*, 1991). En el carpín dorado únicamente se ha localizado un pequeño grupo de células en el núcleo magnocelular (Hornby y Piekut, 1990). En el tálamo se localizaron células inmunorreactivas a la TH en el núcleo del tálamo ventromedial del carpín dorado (Yoshida *et al.*, 1983) y de la anguila (Sas *et al.*, 1990). También han sido observadas con bastante intensidad en el órgano paraventricular de la trucha (Hornby *et al.*, 1987; Manso *et al.*, 1993). Las células TH positivas del núcleo posterior tuberal del hipotálamo son más prominentes en el caso de la trucha que en el pez cebra (según los resultados recogidos en el presente trabajo). En la región pretectal o pretecho solo se han encontrado células dopaminérgicas en la región periventricular del encéfalo en el caso de la trucha (Manso *et al.*, 1993).

En condrósteos se han encontrado tres grupos de células TH positivas en el telencéfalo. Un grupo en los bulbos olfativos y los otros dos en los lóbulos telencefálicos (Adrio *et al.*, 2002). En el caso de los bulbos olfativos se han encontrado en la capa celular interna y en la capa celular externa siendo identificadas como células grano. En la capa glomerular únicamente se han observado fibras. En el telencéfalo encontramos un grupo rostral, en el área retrobulbar y otro situada más caudalmente en el área dorsal telencefálica y con una distribución más dispersa. Ninguno de estos grupos era DBH (Adrio *et al.*, 2002). En el diencéfalo, el área preóptica y el tubérculo posterior son las zonas con mayor densidad de células TH-ir. Dentro del área preóptica se encontraron pequeñas neuronas en el núcleo preóptico parvocelular (siendo especialmente abundantes más dorsalmente en el quiasma óptico) y en el órgano vasculoso de la lámina terminal (sobre todo en la porción ventral). En la región comisural, a ambos lados del ventrículo, se encuentran dos grupos bien diferenciados de neuronas TH positivas. Estas células mostraron unas grandes dendritas ventrolaterales. Algunos autores las consideran dentro del núcleo supraquiasmático (Adrio *et al.*, 2002).

En el tálamo del esturión el núcleo ventromedial talámico contiene células TH positivas. Estas células se continúan hacia el núcleo periventricular del tubérculo posterior. En el tubérculo posterior se han visto 3 grupos de células TH positivas: en el núcleo periventricular, en el núcleo medial, en el núcleo posterior tuberal y en la parte anterior del órgano paraventricular. Las células encontradas en el núcleo periventricular son de tamaño medio y sus dendritas ocupan los territorios más caudales del núcleo. En el núcleo medial del tubérculo posterior las células son de tamaño medio-grande. Las células del núcleo posterior tuberal son de pequeño tamaño. Estas células se entremezclan con las grandes células del núcleo medial. Especialmente las regiones caudales del tubérculo posterior son ricas en fibras TH-ir. También se han observado fibras DBH positivas especialmente en la región ventral (Adrio *et al.*, 2002). Tanto las fibras TH como las DBH son más abundantes en el hipotálamo ventral y menos abundantes en el lateral. En el pretecho aparece un grupo de pequeñas neuronas TH asociado con la comisura posterior (pretecho paracomisural) y un grupo formado por células más pequeñas en el núcleo periventricular (Adrio *et al.*, 2002).

La extensión del sistema catecolaminérgico es mucho menor en elasmobranquios con respecto a teleósteos y condrósteos (Stuesse *et al.*, 1990). Se encontraron numerosas células dopaminérgicas distribuidas en el palio y subpalio (Meredith y Smeets, 1987). Además de núcleos de neuronas catecolaminérgicas en la región preóptica y en la neurohipófisis (Molist *et al.*, 1993). Los elasmobranquios (Stuesse *et al.*, 1990) presentan este tipo de neuronas únicamente en la región supraquiasmática del área preóptica. También están presentes en el tubérculo posterior y en el órgano paraventricular pero únicamente en elasmobranquios adultos. No aparecieron células TH positivas en el pretecho (Smeets y González, 2000).

En ciclóstomos como la lamprea (*Lampetra fluviatilis*), están presentes en el área ventral telencefálica en concreto en el núcleo anterior olfativo y en el núcleo anterior comisural (Yañez, 1992; Pierre *et al.*, 1994). En larvas de lamprea, se han observado en el núcleo periventricular anterior del hipotálamo (Yañez, 1992) células DBH positivas que contienen dopamina (no son TH positivas) cerca del núcleo anterior tuberal.

## **Expresión de la TH en tetrápodos.**

En anfibios, las neuronas inmunorreactivas para la TH han aparecido en zonas internas de los bulbos olfativos. No se han encontrado en el telencéfalo (Franzoni *et al.*, 1986). En la región preóptica están presentes de forma similar al esturión tanto en la región rostral como la caudal incluido el núcleo supraquiasmático (Nagatsu *et al.*, 1982; Gonzalez y Smeets, 2000). También fueron localizadas en el núcleo dorsal infundibular (equivalente al núcleo posterior tuberal) (Nagatsu *et al.*, 1982). Algunos autores encontraron la presencia de neuronas noradrenérgicas en el hipotálamo periventricular de los anuros (ranas y sapos) (Smeets y González, 2000). Han aparecido evidencias de núcleos de neuronas catecolaminérgicas en la neurohipófisis de anfibios (Smeets y González, 2000); Corio *et al.*, 1992) pero en este caso con menor densidad de células. En el pretecho únicamente un pequeño grupo asociado con la comisura posterior (pretecho paracomisural).

En los reptiles, al igual que en los anfibios los bulbos olfativos presentan neuronas TH en zonas internas. El telencéfalo de los reptiles (Smeets y Steinbusch, 1990) también contiene este tipo de células aunque su localización puede variar dependiendo de la especie aunque su mayor presencia es en el palio. También se encuentran en el área preóptica tanto en la región rostral como en la caudal incluido el núcleo supraquiasmático (Smeets, 1994). En el hipotálamo periventricular de reptiles fueron encontradas neuronas noradrenérgicas (Smeets, 1994). En el caso del pretecho se ha localizado un grupo asociado con la comisura posterior (pretecho paracomisural) al igual que en los anfibios (Reiner *et al.*, 1994).

En aves no se han encontrado en los bulbos olfativos ni en los hemisferios telencefálicos. En la región preóptica y en el pretecho coinciden con los grupos de células encontrados en los anfibios y los reptiles (Reiner *et al.*, 1994).

En otras especies de vertebrados como los mamíferos las neuronas TH positivas también han aparecido en zonas más internas de los bulbos olfativos. En el telencéfalo de algunos mamíferos se han encontrado somas pero con poca intensidad y únicamente en el telencéfalo dorsal. En la región preóptica se localizan de forma idéntica a la encontrada en anfibios, reptiles y aves, es decir, tanto en la región rostral como la caudal incluido el núcleo supraquiasmático (Tillet, 1994) (Smeets y González, 2000). En mamíferos (Tillet, 1994) no hay células TH positivas en el pretecho (Smeets y

González, 2000). Las células dopaminérgicas se encuentran en el área retrotuberal, en la sustancia nigra y en el área tegmental ventral (Holzschuh *et al.*, 2001; Kaslin y Panula, 2001; Rink y Wullimann, 2001; McLean y Fetcho, 2004).

Probablemente, la reducción de neuronas catecolaminérgicas en amniotas (reptiles, aves y mamíferos) con respecto a anamniotas (peces y anfibios) haya tenido lugar durante la transición de vertebrados anamniotas a vertebrados amniotas. Esta reducción, puede deberse a la adquisición de una función diferente de dichas regiones.

## 6. Conclusiones

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

- El encéfalo anterior del pez cebra adulto presenta neuronas catecolaminérgicas en grupos dispersos localizadas en diferentes regiones encefálicas: bulbos olfativos; núcleos dorsal, ventral, central y postcomisural de los lóbulos telencefálicos; núcleo preóptico parvocelular del área preóptica; núcleo talámico anterior, núcleo periventricular del tubérculo posterior, núcleo talámico posterior dorsal y posterior central del tálamo y, por último, en los núcleos anterior y posterior tuberal del hipotálamo.
- Se ha observado que el sistema de neuronas que expresan la tirosina hidroxilasa se ha conservado casi en su totalidad en la evolución de diferentes grupos no tetrápodos.
- Al comparar los resultados obtenidos en el pez cebra con estudios realizados en tetrápodos (anfibios, reptiles, aves y mamíferos) observamos que existe una reducción o disminución en cuanto a los grupos de neuronas TH positivas en la región talámica y en el hipotálamo.

## 7. Bibliografía

- Adrio, F., Anadón, R. and Rodríguez-Moldes, I. (2002). Distribution of tyrosine Hydroxylase (TH) and Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase (DBH) Immunoreactivity in the Central Nervous System of Two Chondrosteian Fishes (*Acipenser baeri* and *Huso huso*). *J. Comp. Neurol.* 448:280-297.



- Alonso, J., R., Coveñas, R., Lara, J., Arevalo R., De Leon, M., a Aijon, J. (1989). Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in a subpopulation of granule cells in the olfactory bulbs of teleosts fish. *Brain Behav. Evol.* 34: 318-324.
- Badía, L.M., Ruiz, F.J.E., González, A.C. (2009). Técnicas inmunohistoquímicas. *Técnicas en histología y biología celular*. Elsevier Masson, Barcelona, España. Capítulo 5 p 119-148.
- Bilotta, J., Saszik, S. (2001). The zebrafish as a model visual system. *Int J Devl Neuroscience.* 19(7):621-629.
- Boron, P., Boulpaep, C. (2009). *Medical Physiology*, 2<sup>nd</sup> Edition.
- Braford, M.R., Northcutt, R.G. (1983). Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. In: Davis RE and Northcutt RG (eds): “Fish Neurobiology”, vol. 2, Univ. Michigan Press, Ann Harbor p. 117-133.
- Christenson, J.G., Dairman, W., Udenfriend, S. (1972). On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase (immunological titration-aromatic L-amino acid decarboxylase-serotonin-dopamine-norepinephrine). *Proc Natl Acad Sci USA.* 69(2):343-347.
- Corio, M., Peute J. and Steinbusch H.W.M. (1991). Distribution of serotonin and dopamine immunoreactivity in the brain of the teleost *Clarias gariepinus*. *J. Chem. Neuroanat.* 4: 79-95.
- Daubner, S., Lauriano, C., Haycock, J., Fitzpatrick, P. (2012). Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J Biol Chem.* 267:1263912-646.
- Döskeland, A.P., Flatmark, T. (2002). Ubiquitination of soluble and membrane-bound tyrosine hydroxylase and degradation of the soluble form. *European Journal of Biochemistry.* 269:1561–1569.
- Dunkley, P.R., Bobrovskaya, L., Graham, M.E., Nagy-Felsobuki, E.I., Dickson, P.W. (2004). Tyrosine hydroxylase phosphorylation: Regulation and consequences. *J Neurochem.* 91:1025–1043.
- Ekstrom, P., Reschke M., Steinbush H., Van Veen, T.H. (1986) Distribution of noradrenaline in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L.: an immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 254: 297-313.

- Fitzpatrick, P.F. (2000). The aromatic amino acid hydroxylases. In: Purich, DL., editor. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc; p. 235-294.
- Franzoni, M., Thibault, A., Fasolo, M., Martinoli, F., and Calas, A. (1986). Organization of tyrosine hydroxylase immunopositive neurons in the brain of the crested newt, *Triturus cristatus carnifex*. *J. Comp. Neurol.* 251, 121-134.
- Fuller, C.L., Yettaw, H.K., Byrd, C.A. (2006). Mitral cells in the olfactory bulb of adult zebrafish (*Danio rerio*): morphology and distribution. *J. Comp. Neurol.* 499 218-230.
- Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., Poss, K.D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* 29 p 611-620.
- Goldstein, M., Anagnoste, B., Lauber, E., McKeregham, M.R. (1964). Inhibition of dopamine-beta-hydroxylase by Disulfiram. *Life Sci* 3:763–767.
- Goldstein, M., Lieberman, A., (1992). The role of the regulatory enzymes of catecholamine synthesis in Parkinson's disease. *Neurol.* 42(4) p 8-10.
- Grobecker, H., Saavedra, J.M., McCarty, R., Weise, V.K. Kopin, I.J., (1978). Role of noradrenergic nerves and adrenal medulla during the development of genetic and experimental hypertension in rats. In: Usdin, E.; Kopin, IJ.; Barchas, J., editors. *Catecholamines: Basic and clinical frontiers, proc Int Catecholamine symp. 4*. Pergamon Press; New York: p. 906-908.
- Haavik, J., Toska, K., (1998). Tyrosine Hydroxylase and Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology* 16(3):p.285-309.
- Hedstrand, H., Ekwall, O., Haavik, J., Landgren, E., Betterle, C., Perheentupa, J., Gustafsson, J., Husebye, E., Rorsman, F., Kämpe, O. (2000). Identification of tyrosine hydroxylase as an autoantigen in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (1): 456–61.
- Herget, U., Wolf, A., Wulliman, M.F., Ryu, S. (2014). Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol.* 522:1542-1564.
- Holzschuh, J., Ryu, S., Aberger, F., Driever, W. (2001). Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mech Dev* 101:237–243.

- Honig, M.G., Hume, R.I. (1989). DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends Neuroscience*, 12: 333-41.
- Hornby, P.J., Piekut, D.T., Demski, L. S. (1987). Localization of immunoreactive tyrosine hydroxylase in the goldfish brain. *J. Comp. Neurol.* 261, 1-14.
- Hornby, P.J., Piekut, D.T. (1990). Distribution of catecholaminergic synthesizing enzymes in goldfish brains: presumptive dopamine and norepinephrine neuronal organization. *Brain Behav. Evol.*35, 49-64.
- Hufton, S.E., Jennings, I.G, Cotton, R.G.H. (1995). Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J.* 311:353–366.
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamauchi, T., Fujisawa, H. (1987). Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca<sup>2+</sup>, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Letts.*219:79–82.
- Ishii, S., Mizuguchi, H., Nishino, J., Hayashi, H., Kagamiyama, H. (1996). Functionally important residues of aromatic L-amino acid decarboxylase probed by sequence alignment and site-directed mutagenesis. *J Biochem.* Aug; 120(2):369-76.
- Kah, O., Dulka, J.G., Dubourg, P., Thibault, J., Peter, R.E. (1987). Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45:451-458.
- Kaslin, J., Panula, P. (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 440:342–377.
- Lauder, G.V., Liem, K.F. (1983). The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull Mus Comp Zool* 150:95-197.
- Ma, M. (2003). Catecholaminergic systems in the zebrafish. Organization and projection pattern of dopaminergic neurons in the diencephalon. *J. Comp. Neurol.* 460:13-37.
- Manso, M.J., Becerra, M., Molist, P., Rodriguez-Moldes, I., Anadón, R. (1993). Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnsforsch* 34:239-260.

- McLean, D.L., Fetcho, J.R. (2004). Ontogeny and innervation patterns of dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic neurons in larval zebrafish. *J Comp. Neurol.* 480:38–56.
- Meek, J., Joosten, H.W.J., Steinbusch, H.W.M. (1989). Distribution of dopamine immunoreactivity in the brain of the mormyrid teleost *Gnathonemus petersii*. *J. Comp. Neurol.* 281, 362-383.
- Meek, J., (1994). Catecholamines in the brains of Osteichthyes (bony fishes). In Smeets WJAJ, Reiner A, editors: *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press. p 49-76.
- Meek, J., Nieuwenhuys, R. (1998). Holosteans and teleosts. In: *The central nervous system of vertebrates*, vol 2. Springer. p 759–937.
- Meredith, G.E., Smeets, W.J.A.J. (1987). Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the forebrain and midbrain of *Raja radiata*: evidence for a substantia nigra and ventral tegmental area in cartilaginous fish. *J Comp Neurol* 265:530-548.
- Molinoff, P.B., Axelrod, J. (1971). Biochemistry of catecholamines. *Annual Review of Biochemistry.* 40:465–500.
- Molist, P., Rodríguez–Moldes, I., Anadón, R. (1993). Organization of catecholaminergic systems in the hypothalamus of two elasmobranch species, *Raja undulate* and *Scyliorhinus canicula*. A histofluorescence and immunohistochemical study. *Brain Behav Evol* 41:290-302.
- Montuenga, L., Esteban, F.J., Calvo, A. (2014). *Técnicas en histología y biología celular* 2ª ed. Elsevier Masson. Capítulo 6, Técnicas Inmunohistoquímicas; p. 109-116.
- Morita, Y., Finger, T.E. (1987). Area postrema of the goldfish, *Carassius auratus*: ultrastructure, fiber connections, and immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* 256, 104-116.
- Nagatsu, I., Karaswa, N., Yoshida, M., Kondo, Y., Saito, T., Niimi, H., Nagatsu, T. (1982). Immunocytochemical distribution of amine-containing neurons related to circumventricular organs in the frog brain. *Biomed. Res.* 3,623-636.
- Nagatsu, T. (1995). Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochem.* 30: 15–35.

- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world* 4<sup>th</sup>ed. Hoboken: John Wiley and Sons.
- Nicholson, C. (1998) editors. *The central nervous system of vertebrates*. Volume 2. Springer p. 898-900.
- Nieuwenhuys, R. (1998). Chondrosteans fishes. In Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors: *The central nervous system of vertebrates*, vol 1. Berlin: Springer-Verlag. p 701-757.
- Nieuwenhuys, R., Hans, J., Nicholson, C. (1990). *The Central Nervous System of Vertebrates*. 1:907-909.
- Nieuwenhuys, R., Voogd, J., Van Huijzen, C. (2008). *The human central nervous system*. 4th ed. New York. Springer.
- Pierre, J., Rio, J.P., Mahouche, M., Repérant, J. (1994). Catecholamine systems in the brain of cyclostomes, the lamprey, *Lampetra fluviatilis*. In Smeets WJAJ, Reiner A, editors. *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press. p 7-19.
- Ramsey, A.J., Fitzpatrick, P.F. (1998). Effects of phosphorylation of serine 40 of tyrosine hydroxylase on binding of catecholamines: Evidence for a novel regulatory mechanism. *Biochemistry* 37:8980–8986.
- Reiner, A., Karle, E.J., Anderson, K.D., Medina, L. (1994). Catecholaminergic perikarya and fibers in the avian nervous systems. In Smeets WJAJ, Reiner A, editors. *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press. p 135-181.
- Reiner, A., Northcutt, R. G. (1992). An immunohistochemical study of the telencephalon of the Senegal bichir (*Polypterus senegalus*). *J. Comp. Neurol.* 319, 359-386.
- Rink, E., Wullimann, M.F. (2001). The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889:316–330.
- Roberts, B. L., Meredith, G. E., Maslam, S. (1989). Immunocytochemical analysis of the dopaminergic system in the brain and spinal cord of the European eel, *Anguilla Anguilla*. *Anat. Embryol.* 189, 401-412.
- Rush, R.A., Geffen, L.B. (1980). Dopamine beta-hydroxylase in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 12 (3): 241–77.

- Saraf, A., Oberg, E.A., Strack, S. (2009). Molecular determinants for PP2A substrate specificity: Charged residues mediate dephosphorylation of tyrosine hydroxylase by the PP2A/B' regulatory subunit. *Biochemistry* 49:986–995.
- Sas, E., Maller, L., Tinner, B. (1990). Catecholaminergic systems in the brain of a gymnotiform teleost fish: an immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 29,127-162.
- Schneider, G., Kack, H., Lindqvist, Y. (2000). The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Structure* 8(1):R1-6.
- Schweitzer, J., Lohr, H., Filippi, A., Driever, W. (2011). Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Development Neurobiology* 72, 256-268.
- Smeets, W.J.A.J., González, A. (2000). Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Rev* 33:308-379.
- Smeets, W.J.A.J. (1994). Catecholamine systems in the CNS of reptiles: structure and functional correlations. In Smeets WJAJ, Reiner A, editors. *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press. p 103-133.
- Smeets, W.J.A.J., Steinbusch, H.W.M. (1990). New insights into the reptilian catecholaminergic systems as revealed by antibodies against the transmitters and their synthetic enzymes. *J. Chem. Neuroanat.* 3, 25-43.
- Spencer, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The Behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio Rerio*. *Biological Reviews* 83(1):13-34.
- Stanley, W.C. (1997). Catecholamine modulatory effects of nepicastat (RS-25560-197), a novel, potent and selective inhibitor of dopamine-beta-hydroxylase. *Br J Pharmacol* 121 (8): 1803–9.
- Stuesse, S.L., Cruce, W.L.R., Northcutt, R.G. (1990). Distribution of tyrosine hydroxylase and serotonin immunoreactive cells in the Central Nervous System of the thornback guitarfish, *Platyhinoidis triseriata*. *J Chem Neuroanat* 3:45-58.
- Tillet, Y., (1994). Catecholaminergic neuronal systems in the diencephalon of mammals. In Smeets WJAJ, Reiner A, editors. *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press. p 207-247.

- Weiner, N. (1979). Tyrosine-3-monoxygenase (tyrosine hydroxylase). In: Youdim, MBH editor. Aromatic amino acid hydroxylases and mental disease. John Wiley and Sons, Ltd; New York p. 141-190.
- Wen, Lu., Wei, Wei., Gu, Wenchao., Huang, Peng., Ren, Xi., Zhang, Zheng., Zhu, Zuoyan., Lin, Shuo., Zhang, BO. (2008). Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Develop. Bio.* 314 84-92.
- Westerfield, M. (2000). The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. Eugene, University of Oregon Press.
- Wullimann, M.F., Rupp, B., Reichert, H. (1996). Neuroanatomy of the zebrafish brain: A topological atlas. Basel: Birkhäuser.
- Yañez, J. (1992). Estudio histoquímico e inmunohistoquímico sobre la organización larvaria de algunos sistemas monoaminérgicos y peptidérgicos del encéfalo de la lamprea de mar (*Petromyzon marinus L.*). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Yoshida, M., Nagatsu, I., Kawakami-Kondo, Y., Karasawa, N., Spatz, M., Nagatsu, T. (1983). Monoaminergic neurons in the brain of goldfish as observed by immunohistochemical techniques. *Experientia* 39: 1171-1174.