



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Biología Celular

**Estudio de las Conexiones Telencefálicas
en la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, Teleostei),
con Especial Referencia a los Sistemas Quimiosensoriales.**

Mónica Folgueira Otero

A Coruña, Mayo 2005



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Biología Celular

Dr. D. JULIÁN YÁÑEZ SÁNCHEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

INFORMA

Que la presente memoria titulada “**Estudio de de las conexiones telencefálicas en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, Teleostei), con especial referencia a los sistema quimiosensoriales**” presentada por Dña. **Mónica Folgueira Otero**, ha sido realizada bajo mi dirección. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizo su presentación para optar al Grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo la presente en A Coruña a veinticuatro de Mayo del 2005.

Fdo. Julián Yáñez Sánchez

A mis padres

A mis abuelos

A Migue

Indice

INDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
Los sistemas quimiosensoriales	
El telencéfalo de los teleósteos	
Notas sobre la neuroanatomía del encéfalo de vertebrados amniotas	
La trucha arco iris como especie objeto de un estudio neuroanatómico comparado	
Los trazadores neuronales como herramientas para estudios hodológicos	
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
Marcaje neuronal con carbocianinas	
Técnicas de tinción histológica complementarias	
Procesamiento de las imágenes y edición de los esquemas	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Capítulo 1. Estudio de la citoarquitectura de las áreas telencefálicas y área preóptica de juveniles de la trucha arco iris	49
Capítulo 2. Estudio experimental de las conexiones del sistema gustativo en la trucha arco iris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	61
<i>Experimental study of the connections of the gustatory system in the rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>.</i>	
Capítulo 3. Estudio experimental de las conexiones del telencéfalo de la trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>). I. Bulbo olfatorio y área ventral	79
<i>An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (<i>O. mykiss</i>). I. Olfactory bulb and ventral area.</i>	
Capítulo 4. Estudio experimental de las conexiones del telencéfalo de la trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>). II. Área dorsal y región preóptica	105
<i>An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (<i>O. mykiss</i>). II. Dorsal area and preoptic region.</i>	

Capítulo 5. El núcleo subglomeruloso de la trucha como nexa entre los sistemas quimosensoriales y el sistema visual: un estudio con DiI	137
<i>The nucleus subglomerulosus of the trout is a link between chemosensory and visual systems: a DiI study.</i>	
Capítulo 6. Estudio experimental de las conexiones de los núcleos preglomerulosos y el cuerpo mamar de la trucha arco iris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	143
<i>Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>.</i>	
Capítulo 7. Resumen de los resultados y discusión general	151
Revisión de las áreas telencefálicas en la trucha arco iris sobre la base de su citoarquitectura, hodología y neuroquímica	
Los sistemas sensoriales y su relación con el telencéfalo	
Análisis neuroanatómico comparado del telencéfalo de la trucha arco iris	
5. CONCLUSIONES	175
6. AGRADECIMIENTOS	179

Introducción general

Los sistemas quimiosensoriales

El telencéfalo de los teleósteos

Notas sobre la neuroanatomía del encéfalo de vertebrados amniotas

La trucha arco iris como especie objeto de un estudio neuroanatómico comparado

Los trazadores neuronales como herramientas para estudios hodológicos

LOS SISTEMAS QUIMIOSENSORIALES

Los sistemas quimiosensoriales son aquellos capaces de ser estimulados por ciertas clases de sustancias químicas disueltas, para lo que presentan células especializadas denominadas **quimiorreceptores**. Dentro de este tipo de sistemas se incluyen el sistema olfativo y el sistema gustativo. Dado que ciertas áreas telencefálicas están encargadas del procesamiento de información quimiosensorial, las conexiones dentro de ambos sistemas y su relación con el telencéfalo serán estudiadas con detalle dentro del presente estudio, las características principales de estos sistemas se tratarán dentro de este capítulo.

En algunos casos es difícil diferenciar si la percepción de una sustancia química se realiza gracias al sistema olfativo o gustativo, y no sólo en el pez, sino que esto también ocurre en los mamíferos, donde a veces las sensaciones que consideramos gustativas son en realidad olfatorias. En peces, ambos sistemas trabajan de forma complementaria y pueden ser utilizados para extraer información similar del medio acuático. Para este fin, el sistema olfativo utiliza la cavidad nasal con su epitelio olfativo, mientras que el sistema gustativo utiliza las papilas gustativas.

En tetrápodos y en peces, tanto el sistema olfativo como el sistema gustativo detectan sustancias químicas en medio acuoso (Hara, 1993), por lo que los sistemas quimiosensoriales no se distinguen por el medio a través del cual llega el estímulo, sino por la estructura e inervación de los receptores. Esta distinción se refleja en el comportamiento mediado por cada sistema (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

SISTEMA OLFATIVO DE TELEÓSTEOS

El sistema olfativo parece que está implicado en la búsqueda de comida (Bateson, 1890; Stabell, 1992; Kanwal y Finger, 1992), en los comportamientos de escape (von Frisch, 1938; Pfeiffer, 1982; Hara, 1993) y migratorios (Karlson y Lüscher, 1959a,b) y en la comunicación interespecífica mediante feromonas (Karlson y Lüscher, 1959a,b; Pfeiffer, 1982; Fujita et al., 1991). El comportamiento migratorio ha sido ampliamente estudiado en salmónidos (Cooper y Hirsch, 1982; Hara, 1993; Jarrard, 1997), donde se observó que peces ciegos alcanzaban el arroyo de freza tan bien como los peces control, por lo que parece que la visión no juega un papel esencial en este comportamiento (Hara, 1993).

Receptores olfativos

El medio externo entra en la cavidad nasal del pez a través de unos orificios denominados narinias, de forma que dicho medio que lleva sustancias químicas disueltas entra en contacto con los receptores olfativos. Dado que en peces la cavidad nasal no se comunica con la cavidad bucal, éstos poseen una narina anterior por la que penetra el agua y otra posterior por la que se produce su salida (Zeiske et al., 1992; Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Las células receptoras se localizan en el epitelio olfativo, que se encuentra plegado formando la roseta olfativa (Fig.1A), de manera que ese plegamiento del epitelio aumenta la superficie y permite que haya una gran cantidad de receptores en un pequeño espacio. Las neuronas receptoras son células bipolares de al menos dos tipos, microvellosas y ciliadas (Fig.1B) (Muller y Marc, 1984; Eller et al., 1985). Sus prolongaciones especializadas para la detección de estímulos químicos están orientadas hacia el exterior del epitelio, mientras que los axones se disponen en sentido opuesto y se reúnen formando el nervio olfativo (Evans et al., 1982; Meek y Nieuwenhuys, 1998). Estos axones constituyen las proyecciones olfativas primarias que se dirigen directamente a los glomérulos del bulbo olfativo (Cajal, 1911; Evans et al., 1982; Zeiske et al., 1992; Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Bulbo olfatorio

Dentro del bulbo olfatorio, las fibras olfativas primarias establecen contacto sináptico con las células mitrales (Fig.2). Las múltiples ramificaciones tanto del axón de la célula receptora como de la dendrita de la célula mitral forman una compleja esfera denominada glomérulo, de manera similar a la unión de dos manos con los dedos algo flexionados y entrelazados (Butler y Hodson, 1996b). En el bulbo olfatorio también están presentes las células grano (Fig.2) que influyen en el procesamiento de información olfativa en el bulbo (Satou, 1992).

Los salmónidos presentan bulbos olfatorios sésiles, pegados al área ventral telencefálica y conectados con el epitelio olfativo mediante largos nervios olfatorios. Otras especies de teleósteos, como *Carassius*, *Ictalurus* y *Gnathonemus*, presentan los bulbos olfatorios pedunculados, pegados al epitelio olfativo y que proyectan al resto del encéfalo a través de

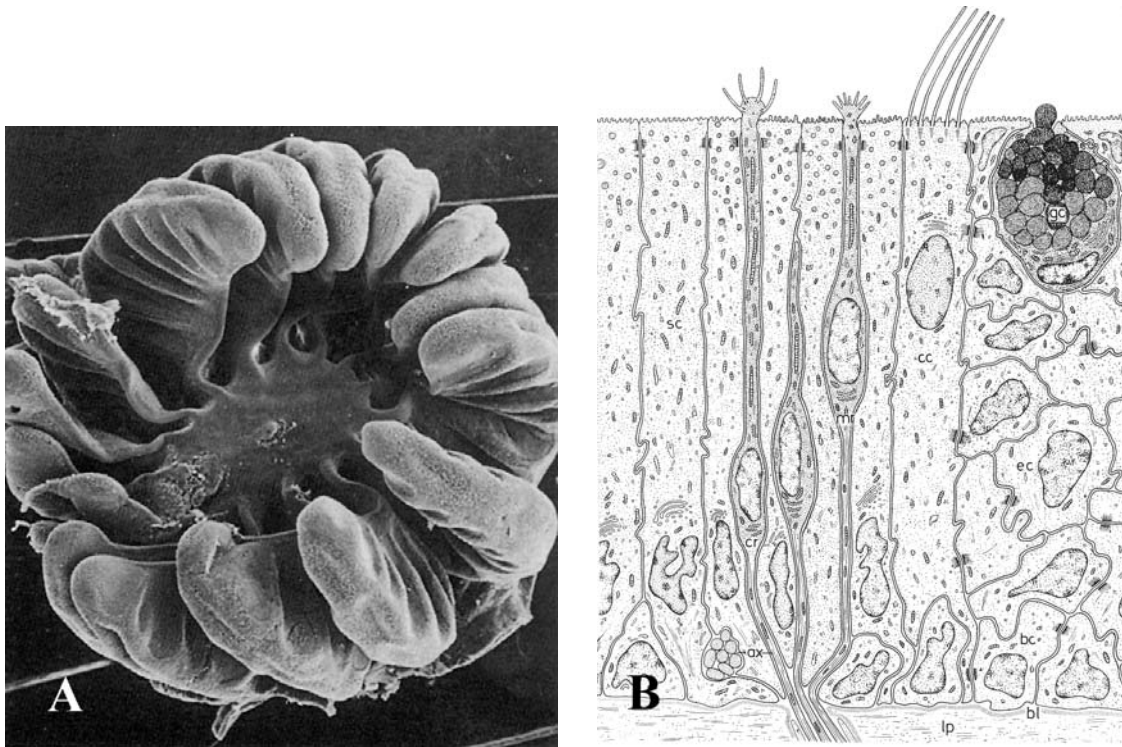


Fig.1: **A)** Roseta olfativa de una trucha formada por el plegamiento del epitelio olfativo (Imagen tomada de Farbman, 1992). **B)** Diagrama simplificado del epitelio olfativo de teleósteos, mostrando células receptoras y no receptoras. Abreviaturas: ax: axón; bc: célula basal; bl: lámina basal; cc: célula ciliada no sensorial; cr: célula receptora ciliada; ec: célula epitelial; gc: célula secretora “goblet”; lp: lámina propia; mr: célula receptora microvellosa; sc: célula de soporte. (Imagen tomada de Zeiske et al., 1992).

largos tractos olfatorios formados por fibras olfativas primarias y secundarias (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

El bulbo olfatorio de teleósteos parece que tiene una organización similar a la de otros vertebrados (Oka et al., 1982) y comprende las siguientes capas (Fig.2) (Finger, 1988; Farbman, 1992; Satou, 1992; Meek y Nieuwenhuys, 1998):

- Capa externa de aferentes olfativos primarios (ONL);

- Capa glomerular (GL), donde se establece el contacto sináptico entre el axón de las células receptoras primarias y las dendritas de las células mitrales;

- Capa de células mitrales o capa celular externa (MCL), donde en teleósteos además de las células mitrales hay otro tipo celular, las células borladas o “ruffed cells” (Kosaka y Hama, 1979; Finger, 1988). Este último tipo celular debe su nombre a la presencia de gran cantidad de colaterales cortos en la porción inicial de su axón. Son neuronas inusuales, en el sentido de que sus dendritas rodean a las dendritas de las células mitrales como procesos gliales más que estableciendo ningún tipo de sinapsis (Kosaka y Hama, 1979; 1980, 1981; Kosaka, 1980), mientras los pequeños colaterales de su axón establecen sinapsis recíprocas con células grano (Kosaka, 1980; Kosaka y Hama, 1981).

- Capa de células grano o capa celular interna (ICL), donde se sitúan las células grano, que presentan procesos dendríticos basales cortos y apicales largos, que establecen contactos pre- y postsinápticos (Meek y Nieuwenhuys, 1998). Los procesos dendríticos apicales

contactan con dendritas de células mitrales y con los colaterales de células borladas, mientras que los procesos basales contactan con fibras ascendentes telencefálicas y diencefálicas y con células mitrales. Parece que su papel principal es la integración de información olfativa dentro del bulbo (Satou, 1992).

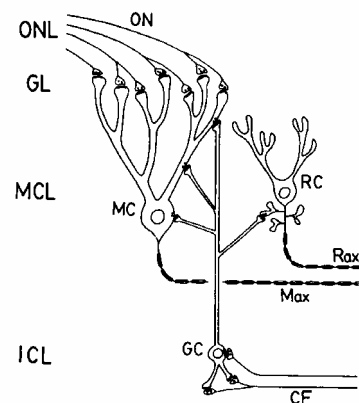


Fig.2. Diagrama esquemático de la organización sináptica del bulbo olfatorio de teleósteos. Abreviaturas: CF: fibra centrifuga; GC: célula grano; GL: capa glomerular; ICL: capa celular interna; Max: axón célula mitral; MC: célula mitral; MCL: capa de células mitrales; ON: nervio olfatorio; ONL: capa nervio olfatorio; Rax: axón de “célula ruffed”; RC: “célula ruffed”. (Reproducido de Satou, 1992).

En tetrápodos, se puede diferenciar un bulbo olfativo principal, donde terminan las fibras del nervio olfatorio, y un bulbo olfativo accesorio, al que llegan los axones de

células bipolares localizadas en el **órgano vomeronasal** o de **Jacobson** a través del **nervio vomeronasal**. En peces teleosteos, los dos tipos de células receptoras olfativas, ciliadas y microvellosas (Muller y Marc, 1984; Eller et al., 1985), parecen presentar conexiones topográficamente diferentes al bulbo olfativo y podrían considerarse como el equivalente al bulbo olfativo principal y accesorio respectivamente (Morita y Finger, 1998), aunque la cuestión parece no estar clara por el momento.

Nervio terminal

El nervio terminal (Pinkus, 1984; Finger, 1988) es un nervio craneal que discurre junto al nervio olfatorio. En la trucha, las células del ganglio del nervio terminal se localizan en la región ventral del bulbo olfatorio. Estas células ganglionares presentan una dendrita periférica que a veces alcanza la mucosa olfativa y un axón central que siempre proyecta más allá del bulbo olfatorio al telencéfalo ventral, región preóptica, retina contralateral o techo óptico (Levine y Dethier, 1985; Finger, 1988; Satou, 1992). Debido a sus conexiones, dentro del grupo de los teleosteos, al ganglio del nervio terminal también se le denomina **núcleo olfatorretinal** (Münz et al., 1982). El significado funcional del nervio terminal no está totalmente claro, aunque existen hipótesis que mantienen que está implicado en la detección de feromonas y que media en el comportamiento sexual (liberación de esperma...) (Wullimann, 1998). También se le asignó un papel neuromodulador, regulando la excitabilidad neuronal de los lugares a los que proyecta (Butler y Hodos, 1996b). Weiss y Meyer (1988) consideran que debe estar implicado en el aumento de la sensibilidad de la retina a estímulos sexuales relevantes, dado que la estimulación del olfato provoca cambios en el electroretinograma (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Los cuerpos celulares de las neuronas ganglionares del nervio terminal y sus fibras contienen la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH, también llamada hormona liberadora de gonadotropinas: GnHR) (Farbman, 1992; Meek y Nieuwenhuys, 1998). Fue ésta una de las razones que llevó a considerar que el nervio terminal está implicado en el comportamiento sexual. Además este sistema presenta inmunorreactividad al péptido cardioexcitatorio (FMRF) y a la sustancia P (Becerra et al., 1994; Anadón et al., 1995; Huesa, 1999; Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Existen numerosos trabajos previos que estudiaron las proyecciones olfativas primarias y secundarias en el encéfalo de salmónidos (Nieuwenhuys, 1963; Northcutt y Davis, 1983; Bazer et al., 1987; Riddle y Oakley, 1992; Becerra et al., 1994; Anadón et al., 1995; Matz, 1995). Sin embargo, llevamos a cabo de nuevo el estudio de las conexiones del epitelio y bulbo olfativo de la trucha arco iris para definir los núcleos implicados en el procesamiento de esta categoría sensorial de manera precisa en nuestro material, juveniles de trucha arco iris, llevando a cabo una revisión de los datos ya existentes y sirviéndonos estos nuevos resultados como referencia para continuar con el estudio hodológico del telencéfalo.

SISTEMA GUSTATIVO DE TELEÓSTEOS

El sistema gustativo cumple una función de reconocimiento y defensa del organismo ya que realiza una selección de las sustancias que se van a ingerir, rechazando aquellas que son nocivas (Atema, 1971; Guirao, 1980; Finger, 1981). También se ha apuntado la posibilidad de que en varias especies este sistema sirva para la orientación y/o navegación hacia una fuente de alimentación (Kanwal y Finger, 1992). En los vertebrados acuáticos el sistema gustativo, además de responder a los compuestos químicos a los que responde en vertebrados terrestres (azúcares, sales, ácidos y alcaloides), responde a un amplio rango de aminoácidos (Marui y Caprio, 1992). Parece que en peces, como ocurre en otros vertebrados, sensaciones que son producidas por irritantes químicos son detectadas por receptores polimodales situados en la cabeza y dicha sensación nociceptiva es transmitida por fibras del nervio trigémino (Sneddon, 2003; Sneddon et al., 2003). Sin embargo, este sentido de nocicepción a través del nervio trigémino no ha sido considerado en nuestro estudio.

Receptores gustativos

En peces, las células receptoras gustativas no sólo están localizadas en la boca y en la orofaringe sino también externamente sobre toda la superficie del cuerpo. Aparecen agrupadas dentro de unas estructuras denominadas **papilas gustativas** (Fig. 3A, B), cada una de las cuales está formada por varias células receptoras y células de sostén, distribuidas como los gajos de una naranja.

Las células receptoras emiten un cilio hacia una pequeña depresión o cavidad donde entra la solución que lleva las sustancias químicas disueltas (Fig. 3A, B). Cada receptor gustativo está inervado por una fibra nerviosa no mielinizada, que se cubre de una vaina de mielina al salir de la papila gustativa (Guirao, 1980; Finger, 1983; Reutter, 1992). Ésta es una clara diferencia entre los receptores olfativos y los gustativos, ya que en el sistema olfativo son los propios receptores los que emiten el axón que termina en los glomérulos del bulbo olfativo. Sin embargo, las células receptoras gustativas carecen de axón, por lo que establecen sinapsis con fibras nerviosas que se originan en células localizadas en ganglios de nervios craneales (Finger, 1983; Kanwal y Finger, 1992). Los nervios que inervan las papilas gustativas son el **facial (VII)**, **glossofaríngeo (IX)** y **vago (X)** (Herrick, 1901; Landacre, 1910; Finger, 1983), que terminan a nivel rombencefálico en los **lóbulos facial, glossofaríngeo y vago** respectivamente (Herrick, 1905; Finger, 1983). Mientras que en la mayoría de los peces incluyendo a la trucha, no hay un límite claro entre los lóbulos gustativos, en peces con un sistema gustativo muy especializado dichos lóbulos están muy hipertrofiados (Finger, 1983; Finger, 1988; Kanwal y Finger, 1992; Wullimann, 1998) y se delimitan con mucha mayor facilidad (ver la figura 4 para una comparación de la distinta hipertrofia de los centros gustativos primarios de ictalúridos, ciprínidos y salmónidos).

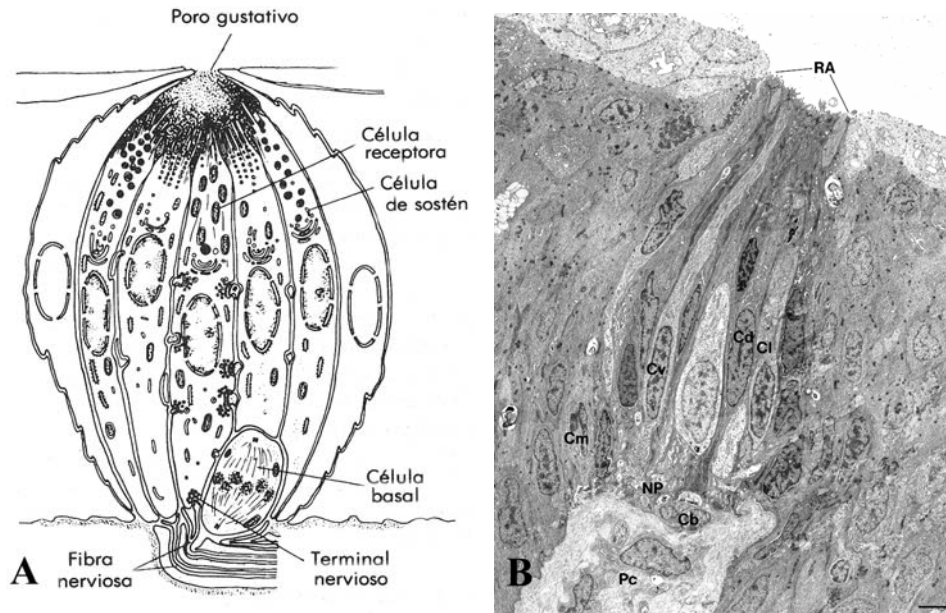


Fig. 3. A: Dibujo esquemático mostrando las características fundamentales de una papila gustativa de mamífero. Nótese que las fibras nerviosas establecen sinápsis basalmente con las células receptoras (Tomado de Geneser, 1990). **B:** Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de una papila gustativa del epitelio labial del teleosteo *Astyanax*. Abreviaturas: *Cb*: células basales; *Cd*: célula oscura, *Cl*: célula clara; *Cm*: células marginales del epitelio no especializado; *Cv*: célula con vesículas densas; *NP*: plexo de fibras nerviosas; *Pc*: papila dérmica; *RA*: área receptora. (Tomada de Boudriot y Reutter, 2001).

Parece que el sistema gustativo es divisible, tanto en peces como en un amplio rango de vertebrados y desde un punto de vista anatómico y fisiológico, en a) el sistema gustativo externo, para aquellas papilas gustativas inervadas por el nervio facial y situadas en la porción más externa de la cavidad oral o en la superficie corporal y b) el sistema gustativo interno u orofaríngeo, para aquellas papilas gustativas situadas más profundamente en la cavidad oral (Morita y Finger, 1985).

Especializaciones del sistema gustativo

El sistema gustativo externo detecta las sustancias comestibles en el medio, dando una representación muy precisa de la localización de dichas sustancias. De esta manera, el pez puede realizar una primera selección del alimento que va a introducir en su boca, muestreando el medio externo en busca de sustancias comestibles. Algunos peces presentan esta porción del sistema gustativo muy desarrollada, como ocurre en el pez gato (*Ictalurus*, Fam. Ictalúridos, O. Siluriformes), el cual debe su nombre a la presencia de unos apéndices faciales cubiertos de papilas gustativas denominados barbillones y que además cuenta con una gran cantidad de papilas gustativas en su superficie corporal externa (Finger, 1976; Finger, 1983; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y Caprio, 1993). Esta especialización del sistema gustativo externo hace que el lóbulo facial esté también muy desarrollado en los ictalúridos (Finger, 1983; Lamb y Caprio, 1993; Kanwal y Finger, 1992; Wullimann, 1998). El lóbulo facial en este grupo es de gran tamaño (Fig.4A) y está organizado en columnas longitudinales que reciben información segregada de receptores gustativos

localizados en porciones discretas del cuerpo, por lo que existe una representación somatotópica de la superficie externa del cuerpo en el lóbulo facial (Beidenbach, 1973; Finger, 1976).

El sistema gustativo interno u orofaríngeo tiene una función discriminatoria, permitiendo la ingestión selectiva del alimento una vez que este ya ha entrado en la boca. Por tanto, la fase de búsqueda de comida en el medio externo estará mediada principalmente por el sistema visual y el sistema de la línea lateral, mientras que la detección e ingestión del alimento es posterior a la adquisición oral de una partícula alimenticia en potencia (Kanwal y Finger, 1992). Este sistema está muy desarrollado en los ciprínidos (O. Cipriniformes) que poseen en su cavidad oral el denominado **órgano palatal**. Dicho órgano consiste en una placa dorsal cubierta de papilas gustativas y una especialización muscular ventral. Este órgano es capaz de recoger partículas de comida que están recubriendo grava mediante una interacción sensorimotora muy sofisticada (Meek y Nieuwenhuys, 1998). Además el órgano palatal se usa para que el pez tenga continuamente constancia de la composición del agua que fluye desde la cavidad oral a las branquias. El lóbulo vago es el principal responsable del procesamiento y relevo de toda esta información gustativa, por lo que en ciprínidos este centro está muy hipertrofiado (Fig.4B), presentando una estructura laminada (Mayser, 1881; Haller, 1897; Herrick, 1905; Finger, 1983) y una organización topográfica (Kanwal y Finger, 1992; Meek y Nieuwenhuys, 1998; Rink y Wullimann, 1998).

En la trucha, al igual que en otros peces, los centros gustativos primarios no están especialmente

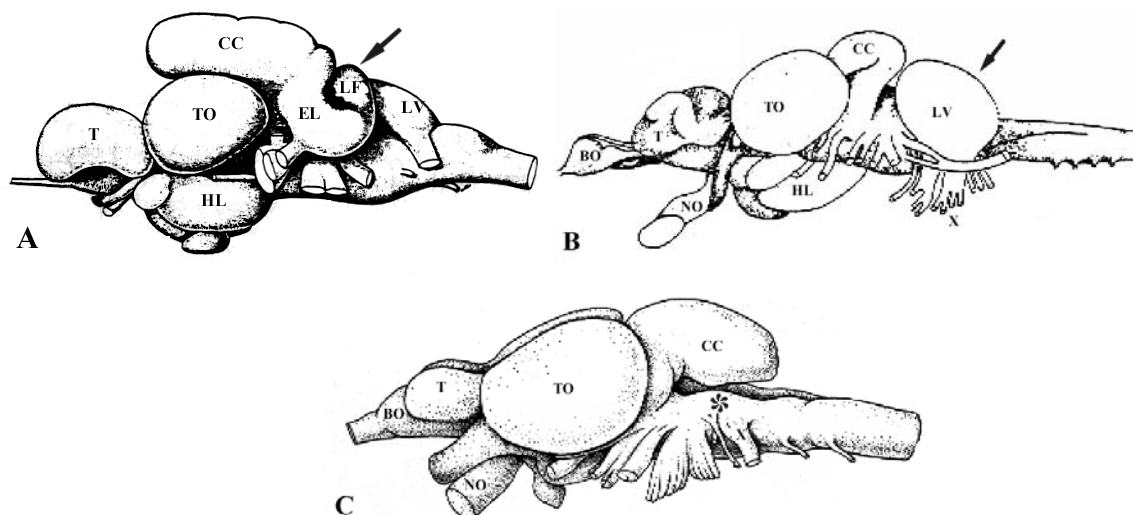


Fig.4. Visión lateral de los encéfalos de pez gato (A), carpín dorado (B) y trucha (C) donde se puede observar la hipertrofia del lóbulo facial (flecha) en el pez gato y del lóbulo vago (flecha) en el carpín. Compárese con la escasa diferenciación de la columna viscerosensorial de la trucha (asterisco). (Imágenes: A y B tomadas de Kanwal y Finger, 1992; C tomada de Northcutt y Davis, 1980). BO: bulbo olfatorio; CC: cuerpo del cerebelo; EL: lóbulo electrosensorial de la línea lateral; HL: lóbulo inferior hipotalámico; NO: nervio óptico; T: telencéfalo; TO: techo óptico; X: nervio vago.

desarrollados, por lo que no se puede hablar de lóbulos en sentido estricto, sino que los núcleos sensitivos del VII, IX y X se disponen como una única columna longitudinal de células denominada columna viscerosensorial (Fernández y Anadón, 1978; Díaz-Regueira y Anadón, 1992) (Fig.4C). Dado que en trucha no hay un especial desarrollo de una u otra porción del sistema gustativo, su comportamiento en la búsqueda e ingestión de alimento no se inclinará hacia un patrón tan claro como en ciprínidos e ictalúridos.

La mayoría de los estudios sobre las conexiones del sistema gustativo se han realizado dentro de los grupos de los ictalúridos y ciprínidos. Poco se conocía sobre las conexiones gustativas en salmónidos, habiéndose determinado únicamente algunas de las conexiones de centros gustativos diencefálicos (Pérez et al., 2000) con regiones caudales. En nuestro trabajo, gracias a un estudio minucioso del sistema gustativo en la trucha,

definiremos el sistema con detalle y determinaremos las áreas telencefálicas de procesamiento de información gustativa.

El establecimiento de las áreas telencefálicas implicadas en el procesamiento de las distintas categorías sensoriales, no sólo gustativa y olfativa, sino mecanosensorial, etc. es fundamental para caracterizar de forma precisa estos sistemas y conocer el papel que juega el telencéfalo como centro de integración sensorial superior y en la determinación de patrones de comportamiento, así como la relación entre las distintas modalidades sensoriales. De igual modo, conocer la naturaleza de la información sensorial procesada en cada área telencefálica constituye un punto central para caracterizar las distintas áreas telencefálicas y poder establecer homologías con centros superiores de amniotas. En este sentido ha ido encaminado nuestro estudio.

EL TELENCEFALO DE LOS TELEÓSTEOS

El telencéfalo es la región más rostral del encéfalo que agrupa a los bulbos olfativos y a los lóbulos telencefálicos (Fig. 5). El telencéfalo de los peces teleósteos muestra una serie de características en común con el telencéfalo de otros vertebrados, pero además presenta una serie de particularidades que lo diferencian del telencéfalo de otros grupos. Algunas de estas características serán comentadas en los sucesivos apartados, prestando una mayor atención a aquellas que revisten especial interés en nuestro estudio.

MODELOS DE ORGANIZACIÓN DEL ENCÉFALO

Existen dos modelos completamente diferentes en sus tesis que tratan de explicar la organización del encéfalo (ver Nieuwenhuys, 1998 para una revisión detallada): el **modelo His-Herrick**, que propone la existencia de columnas longitudinales o un esquema de organización dorsoventral (His, 1888, 1893; Strong, 1895; Herrick, 1899), y el **modelo neuromérico o segmental** (Orr, 1887; von Kupffer, 1906; Bergqvist, 1932; Bergqvist y Källén, 1954).

Según el **modelo His-Herrick** (His, 1888, 1893; Strong, 1895; Herrick, 1899) durante el desarrollo, el extremo anterior del tubo neural se pliega ventralmente formando una inflexión y caudalmente aparece un estrechamiento. Se establece así una división en tres vesículas principales, que son de rostral a caudal: **prosencefalo** o **cerebro anterior**, **mesencefalo** o **cerebro medio** y **rombencéfalo** o **cerebro posterior**. El cerebro posterior y la médula espinal estarían divididos

por el surco limitante de His (His, 1893) en una placa alar y una placa basal, la primera eminentemente sensitiva y la segunda fundamentalmente motora. Según este modelo, en el cerebro posterior y en la médula espinal habría cuatro columnas longitudinales dispuestas dorsoventralmente: somatosensorial, viscerosensorial, visceromotora y somatomotora. Estas columnas se corresponderían con regiones con una especialización funcional y que vendrían anatómicamente delimitadas por 3 surcos (*sulcus intermedius dorsalis*, *sulcus limitans* y *sulcus intermedius ventralis*).

La controversia entre los defensores de este modelo surge sobre la división columnar en regiones rostrales al rombencéfalo y en la existencia o no de una continuación rostral del *sulcus limitans*. Mientras el modelo His (1888, 1893) mantiene que el *sulcus limitans* se puede seguir hasta niveles preópticos y por tanto el prosencefalo estaría formado por una placa alar y una placa basal, según Herrick (1899, 1948) en el prosencefalo o cerebro anterior, el diencefalo estaría constituido por cuatro zonas longitudinales (epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo) mientras que el telencéfalo consistiría en una zona palial y otra subpalial, cada una de estas regiones delimitadas por surcos. Por tanto, el modelo His-Herrick presenta grandes inconvenientes: para poder explicar de forma satisfactoria la organización del prosencefalo, mesencefalo y rombencéfalo, el modelo necesita que las columnas longitudinales varíen según la zona y que estén delimitadas por surcos diferentes; no ofrece una

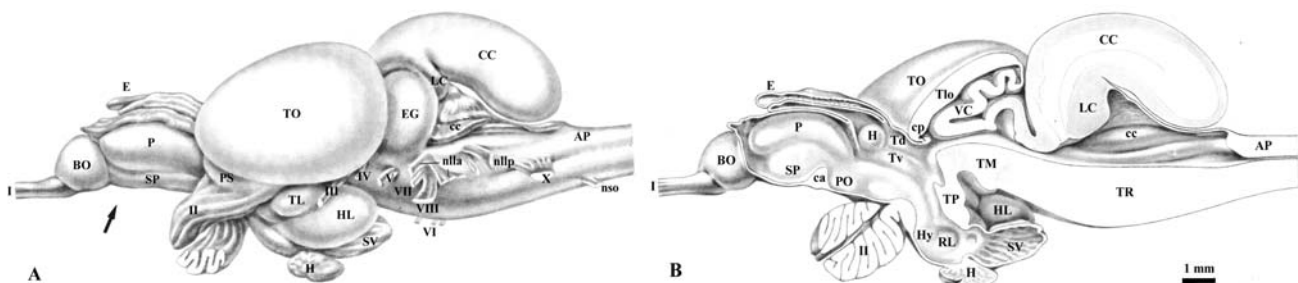


Fig. 5. Encéfalo de trucha arco iris en visión lateral (A) y en sección longitudinal a través de la línea media sagital (B) donde se puede observar la posición que ocupa el telencéfalo (flecha en A). Abreviaturas: AP: área postrema; ca: comisura anterior; cc: cresta cerebelosa; CC: cuerpo cerebeloso; cp: comisura posterior; E: epífisis (órgano pineal); EG: eminencia granular; H: habénula; H: hipófisis; HL: lóbulo inferior hipotalámico; Hy: hipotálamo; LC: lóbulo caudal del cerebelo; P: palio o telencéfalo dorsal; PO: área preóptica; PS: pretecho superficial; RL: receso lateral; SP: subpalio o telencéfalo ventral; SV: saco vasculoso; Td: tálamo dorsal; TL: toro lateral; Tlo: toro longitudinal; TM: tegmento mesencefálico; TO: techo óptico; TP: tubérculo posterior; TR: tegmento rombencéfálico; Tv: tálamo ventral; VC: válvula cerebelosa; I: nervio olfativo; II: nervio óptico; III: nervio oculomotor; IV: nervio troclear; V: nervio trigémino; VI: nervio abducente; VII: nervio facial; VIII: nervio octavo; nlla: nervio anterior de la línea lateral; nllp: nervio posterior de la línea lateral; IX: nervio glosofaríngeo; X: nervio vago; Nso: nervios espino-occipitales. (Figuras tomadas de Meek y Nieuwenhuys, 1998).

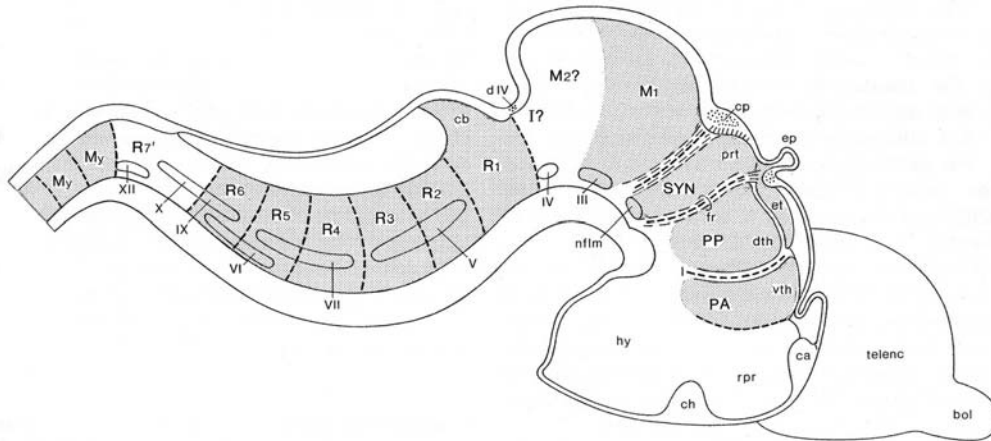


Fig. 6. Dibujo esquemático mostrando los neurómeros en el encéfalo de vertebrados, las regiones donde los neurómeros se reconocen con facilidad aparecen sombreadas. Abreviaturas: *bol*: bulbo olfatorio; *ca*: comisura anterior; *cb*: cerebelo; *ch*: quiasma óptico; *cp*: comisura posterior; *dth*: tálamo dorsal; *ep*: epífisis; *et*: epitálamo; *fr*: fascículo retroflexo; *hy*: hipotálamo; *I*: neurómero(s) isthmicos; *M1*, *2*: mesómeros; *my*: mielómeros; *nflm*: núcleo del fascículo longitudinal medial; *PA*: parencéfalo anterior; *PP*: parencéfalo posterior; *prt*: área pretecal; *R1-6*: rombómeros; *R7'*: rombómero modificado según Vaage (1969); *SYN*: sinencéfalo; *telenc*: telencéfalo; *vt*: velo transverso; *III-XII*, núcleos de nervios craneales motores (Tomado de Nieuwenhuys, 1998).

explicación para la diferenciación regional bajo un punto de vista ontogénico y en la mayoría de los casos los surcos ventriculares no coinciden con los límites anatómicos de los núcleos del encéfalo (Northcutt, 1995).

Según el modelo neuomérico o segmental (Orr, 1887; von Kupffer, 1906; Bergqvist, 1932; Bergqvist y Källén, 1954) el encéfalo estaría formado por una serie de segmentos denominados neurómeros (Fig. 6), que consistirían en centros de proliferación y migración celular determinados genéticamente, cuyos límites delimitan linajes celulares (Fraser et al., 1990; Figdor y Stern, 1993; Neyt et al., 1997) pero facilitan el crecimiento axonal (Northcutt, 1995; Nieuwenhuys, 1998). De esta manera, el rombencéfalo estaría formado por rombómeros, que serían de seis a nueve según las especies estudiadas (siete en pollo y primates: Vaage, 1969; Gribnau y Geijsberst, 1985; Lumsden y Keynes, 1989; O'Rahilly et al., 1989; nueve en pez cebra: Hannemann et al., 1988; Kuhlenbeck, 1973; Gilland y Baker, 1993; ver Nieuwenhuys, 1998) y que se reconocerían fácilmente en estadios tempranos del desarrollo. El mesencéfalo a su vez estaría constituido por dos mesómeros (Fig. 6), mientras que no existe consenso acerca del número de prosómeros que constituirían el prosencéfalo. Autores posteriores a von Kupffer (1906) confirmaron algunos de los aspectos adelantados por él y modificaron algunos otros (Vaage, 1969; Kuhlenbeck, 1973; Puelles et al., 1987; Bulfone et al., 1993; Figdor y Stern, 1993; Puelles y Rubenstein,

1993, 2003), de forma que, en resumen, hablan de un prosencéfalo primario, dividido en tres prosómeros (sinencéfalo, parencéfalo posterior y parencéfalo anterior) y un prosencéfalo secundario (Fig. 6). El sinencéfalo daría lugar al pretecho, mientras que el parencéfalo anterior y posterior formarían el diencéfalo. En el prosencéfalo secundario se incluirían las regiones conocidas clásicamente como telencéfalo, área preóptica e hipotálamo (Northcutt, 1995).

El número de prosómeros que constituyen el prosencéfalo secundario, telencéfalo, área preóptica e hipotálamo, ha estado también sujeto a controversia (Bergqvist y Källén, 1954; Vaage, 1969; Puelles et al., 1987; Bulfone et al., 1993; Puelles y Rubenstein, 1993, 2003). Si bien en un principio se consideró que estaba constituido por 3 prosómeros (Puelles y Rubenstein, 1993), actualmente parece que se trata de un segmento complejo no subdividido en prosómeros y que exhibe una serie de singularidades dentro del modelo de organización encefálica propuesto (Larsen et al., 2001; Puelles y Rubenstein, 2003). Según el modelo de Puelles y Rubenstein (1993), además de las divisiones transversales en prosómeros, el prosencéfalo está además organizado en dominios longitudinales paralelos al eje longitudinal del tubo neural (Puelles y Rubenstein, 1993, 2003). Wullimann y colaboradores (Wullimann y Puelles, 1999; Wullimann y Mueller, 2004) tratan de extender el modelo neuomérico a peces (Fig. 7), encontrando el mismo número de prosómeros que los descritos por

Fig. 7. (Página siguiente). Representación de la visión sagital de un encéfalo de pez cebra donde se designan las zonas de proliferación neuronal determinadas con anticuerpos dirigidos contra la PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Wullimann y Puelles, 1999; Wullimann y Mueller, 2004) e interpretado según el modelo de segmentación de Puelles y Rubenstein (1993). Las zonas coinciden con la predicción de tres prosómeros rostrales al mesencéfalo [pretecal (P1); dorsal talámico (P2) y ventral talámico (P3)], mientras que parece que la zona del prosencéfalo secundario presenta una regionalización más compleja (Wullimann y Mueller, 2004). La línea de puntos indica la inflexión del prosencéfalo con respecto al resto del encéfalo (Wullimann y Puelles, 1999; Wullimann y Mueller, 2004). Abreviaturas: *ac*: comisura anterior; *Ce*: cerebelo; *DT*: tálamo dorsal; *Hr*, *Hi*, *Hc*: hipotálamo rostral, intermedio y caudal; *mv*, *md*: zonas de proliferación tectal medioventral y mediodorsal; *N*: área del núcleo del fascículo longitudinal medial; *OB*, bulbo olfatorio; *P*: palio; *PO*: preóptico; *PTd*, *PTv*: tubérculo posterior dorsal y ventral; *ptm*: membrana tectal posterior; *rct*: engrosamiento cerebelar rostral; *Rho-AP*: placa alar de proliferación del rombencéfalo; *RL*: proliferación rombomérica; *Sd*: subpalio dorsal; *Sv*: subpalio ventral; *T*: tegmento; *VT*: tálamo ventral. (Imagen tomada de Wullimann y Mueller, 2004).

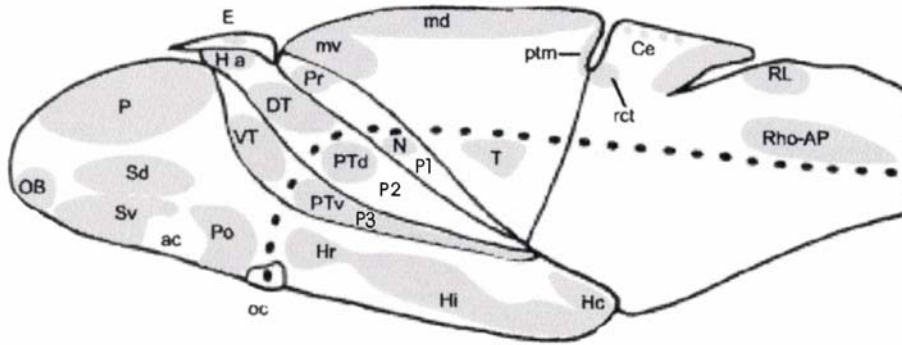


Figura 7

Puelles y Rubenstein en la modificación más reciente de su modelo (Puelles y Rubenstein, 2003): tres prosómeros que constituirían el prosencéfalo primario y parece que un único prosómero, con una regionalización más compleja que en el resto de prosómeros, formaría el prosencéfalo secundario (Wullmann y Mueller, 2004) (Fig.7). La escasez de datos sobre la organización neuromérica del encéfalo de peces teleosteos, nos ha llevado a seguir el modelo clásico de His-Herrick anteriormente descrito en la descripción de los resultados obtenidos en nuestro estudio.

EL PROCESO DE EVERSIÓN Y SUS CONSECUENCIAS

Entre las estructuras que constituyen el encéfalo de los teleosteos, el telencéfalo es la región más conflictiva desde el punto de vista neuroanatómico comparado. El telencéfalo es la parte más rostral del encéfalo, comprendiendo los bulbos olfatorios y los lóbulos telencefálicos. Estos últimos se pueden dividir a su vez en telencéfalo dorsal y telencéfalo ventral. Durante el desarrollo temprano, el telencéfalo dorsal de los actinopterigios surge por un proceso de eversión (Wilder, 1875; Gage, 1893; Studnicka, 1896; Nieuwenhuys, 1962, 1963) que consiste en el plegamiento lateral del tubo neural en su región dorsal. Esto resulta en dos hemisferios telencefálicos sólidos, cubiertos por una membrana endodimaria unida a los márgenes dorsolaterales de los hemisferios, presentando una zona

ventricular localizada superficialmente (Fig.8). El grado de eversión varía entre los distintos linajes de actinopterigios, siendo uno de los factores que contribuye a la enorme diversidad anatómica y morfológica del telencéfalo entre los distintos grupos (ver Nieuwenhuys, 1963). Así, por ejemplo, el telencéfalo de salmónidos es poco evertido, en contraposición al de otros grupos como ostarifisios, percomorfos, etc. donde su telencéfalo dorsal está mucho más plegado dorsolateralmente.

El proceso de eversión es muy distinto al proceso que da lugar al telencéfalo de la mayoría de los vertebrados, que consiste en una inversión a la que sigue una evaginación (Fig.8). El modelo de desarrollo por eversión propuesto en peces teleosteos, reestructura la organización anatómica y funcional del telencéfalo dorsal. Si aceptamos la teoría de eversión simple anteriormente propuesta, cabría esperar que las regiones homólogas en teleosteos al hipocampo, al córtex general y al palio piriforme de amniotas ocuparían regiones exactamente opuestas a la encontrada en telencefalos originados por inversión y posterior evaginación, donde el hipocampo es dorsomedial y el palio piriforme lateral (Fig.8). Pero esto se complica por el hecho de que, si bien la teoría de la eversión como explicación del desarrollo del telencéfalo de teleosteos ha sido aceptada mayoritariamente por la comunidad científica, hay algunos autores que dan ciertos matices a dicha teoría. Nieuwenhuys (1963) acepta la "teoría de la eversión",

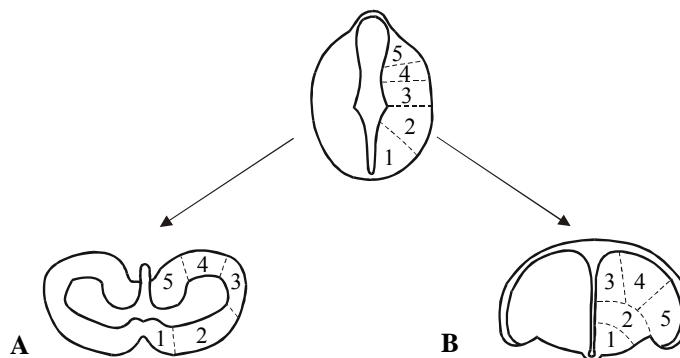


Fig.8. Representación esquemática de la topología aproximada de las principales subdivisiones de un telencéfalo embrionario tras el proceso de evaginación (A) y supuesta situación de dichas áreas tras el proceso de eversión simple (B). 1.- Región septal, 2.- estriado, 3.- palio piriforme, 4.- palio general, 5.- hipocampo (Reproducido de Schroeder, 1980).

pero pone en duda si es posible hacer comparaciones detalladas y establecer homología entre regiones telencefálicas de cerebros evertidos y evaginados, ya que considera que el telencéfalo dorsal de teleosteos es el resultado de un proceso de diferenciación exclusivo dentro de este grupo, por lo que los núcleos celulares de su telencéfalo han evolucionado de forma independiente. Northcutt y Braford (1980) proponen que el telencéfalo de los teleosteos es el resultado de un proceso de eversión al que le sigue una reorganización que consiste en la migración de grupos celulares. En contraposición a estos autores, Butler (2000) apoya la “teoría de la eversión simple” basándose en el estudio de la organización de los vasos sanguíneos en un pez teleosteo (*Astronotus ocellatus*) y de la observación detallada de la hendidura que presentan ciertos teleosteos en el telencéfalo dorsal.

En el telencéfalo de teleosteos no sólo está sujeto a controversia el proceso de eversión, sino también el límite palio-subpalio. Aunque se acepta que el telencéfalo ventral de teleosteos sería el correspondiente al subpalio de amniotas y el telencéfalo dorsal lo sería del palio, la posición del límite palio-subpalio ha sido y sigue siendo una cuestión conflictiva (Nieuwenhuys, 1959, 1963; Northcutt y Braford, 1980; Schroeder, 1980; Northcutt y Davis, 1983; Braford, 1995; Meek y Nieuwenhuys, 1998; Wullmann y Rink, 2002; Wullmann y Mueller, 2004). Estudios recientes sobre la expresión de genes del desarrollo que parecen diferenciar palio y subpalio (ej. subpalio: *Dlx2*, *Lhx7*; palio: *Pax*, *Emx*; Puelles et al., 2000; Bachy et al., 2002; González et al., 2002; Hauptmann et al., 2002; Alunni et al., 2004) parecen mostrar que existe un patrón conservado de distribución de la expresión de dichos genes incluso en peces. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos realizan su análisis en estadios muy tempranos del desarrollo y en muchos casos estudiando más si la expresión de los genes

se ajusta al patrón observado en otros grupos de vertebrados que tratando de adscribir regiones anatómicas del adulto a una u otra división telencefálica. Esta falta de correlación entre los estudios de expresión de marcadores genéticos y la neuroanatomía del adulto hacen que áreas que debido a su posición topológica podrían pertenecer al palio o al subpalio continúen teniendo aún su identidad poco definida. El subpalio de todas las clases de vertebrados estudiadas es muy rico en neuronas gabaérgicas (Medina et al., 1994; Fode et al., 1999; Meléndez-Ferro, 2001; Meléndez-Ferro et al., 2002). En este sentido los datos de distribución en la trucha del ARNm de la enzima ácido glutámico descarboxilasa mostraron que aparece densamente localizado en las regiones ventrales del telencéfalo Vv y Vd (Anglade et al., 1999), por lo que parece que el límite palio/subpalio se localizaría entre Vd, que pertenecería al subpalio, y Dm, que pertenecería a su vez al palio (Fig. 9).

Tratar de establecer homología detalladas entre los distintos núcleos del palio y subpalio de teleosteos con las correspondientes estructuras en amniotas es complejo y parece que utilizar únicamente el criterio de situación topológica en el encéfalo no es suficiente. Son necesarios datos de expresión génica y desarrollo, datos hodológicos y la caracterización neuroquímica de las distintas áreas para que las homología establecidas estén suficientemente apoyadas. En este sentido, aunque cada vez son mayores los datos disponibles, parecen no ser aún suficientes. Además la comparación de las observaciones entre las distintas especies de actinopterigios es ya de por sí difícil debido a las grandes diferencias antes mencionadas en la anatomía del telencéfalo, derivada de los distintos grados de eversión, de especializaciones del encéfalo, etc. y se complica aún más cuando la comparación se realiza con amniotas.

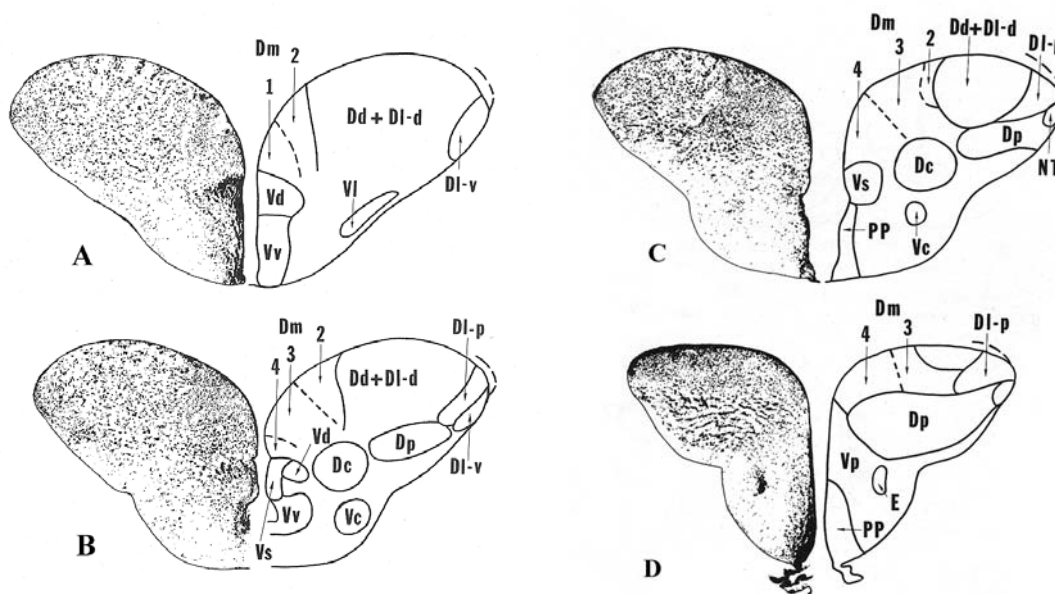


Fig.9. Representación de secciones transversales a distintos niveles rostrocaudales del telencéfalo (B: a nivel de la comisura anterior, D: a nivel del núcleo preóptico) de *Salmo*, mostrando las principales áreas identificadas por Northcutt y Braford (1980). (Tomada de Northcutt y Braford, 1980).

Debido a la enorme dificultad a la hora de establecer homologías, tradicionalmente la terminología utilizada para referirse a las distintas áreas del telencéfalo de actinopterigios evita ciertos términos que podrían implicar homologías, sustituyéndolos por otros más topológicos y descriptivos. La primera nomenclatura con estas características y que se sigue utilizando en la actualidad fue la introducida por Nieuwenhuys (1963), aunque posteriormente se realizaron modificaciones de la misma (Northcutt y Braford, 1980; Northcutt y Davis 1983; Meek y Nieuwenhuys, 1998). En la trucha arco iris y según Northcutt y Braford (1980), rostralmente a la comisura anterior, el área ventral se divide en núcleo dorsal, ventral y lateral (Vd, Vv y Vl) (Fig. 9A,B) y caudalmente se localizan el núcleo supracomisural (Vs) y otro postcomisural (Vp) (Fig. 9C,D). A su vez el área dorsal se divide en la zona medial (Dm), dorsal (Dd), lateral (Dl), central (Dc) y posterior (Dp) (Fig. 9A-D). En Dm se diferencian además 4 subdivisiones (Dm1, Dm2, Dm3, Dm4), mientras que a su vez en Dl se distinguen 3 partes (dorsal, ventral y posterior). En el presente estudio, salvo que se indique lo contrario, utilizaremos la terminología de Nieuwenhuys (1963) y Northcutt y Braford (1980).

Exceptuando la información olfativa que en todos los vertebrados alcanza directamente el telencéfalo a través de las proyecciones de los receptores olfativos, el tálamo es el principal centro de relevo de información sensorial al telencéfalo en la mayoría de los vertebrados. Sin embargo, en los peces teleósteos el principal centro de relevo de información sensorial (no olfativa) al telencéfalo es el tubérculo posterior y, en especial, el complejo preglomeruloso. Debido a esta característica diferencial dentro del grupo de los teleósteos, el tubérculo posterior será brevemente postriormente.

La caracterización neuroquímica del telencéfalo de actinopterigios es cada vez más amplia, sobre todo dentro del grupo de los salmónidos (van den Dungen, 1982; Frankenhuis-van den Heuvel et al., 1984; Ekström y Ebbesson, 1989; Vecino et al., 1989, 1995; Östholm et al., 1990; Holmqvist y Ekström, 1991; Bolliet y Ali, 1992; Ekström y Vanecek, 1992; García-Fernández et al., 1992; Manso et al., 1993; Schober et al., 1993; Anglade et al., 1994, 1999; Bailhache et al., 1994; Cuadrado et al., 1994; Holmqvist et al., 1994; Matz y Takahasi, 1994; Anzelius et al., 1995; Becerra et al., 1995; Amano et al., 1998; Teitsma et al., 1998; Castro et al., 1999, 2001, 2003; Pérez et al., 2000; Díaz et al., 2001; Anadón et al., 2002; Vetillard et al., 2002; Rodríguez et al., 2003; Vacher et al., 2003). Sin embargo, los datos sobre las conexiones telencefálicas, cuestión fundamental en el marco de una neuroanatomía comparada, son escasos y fragmentarios, sin existir un estudio completo sobre las conexiones de las todas las áreas telencefálicas (revisadas en Nieuwenhuys y Meek, 1990; Meek y Nieuwenhuys, 1998; Wullimann, 1998). Los primeros trabajos describían al telencéfalo como un centro que procesaba únicamente información olfativa (Ariens Kappers et al., 1936, Herrick, 1948), sin embargo estudios posteriores demostraron que sólo ciertas áreas telencefálicas estaban

implicadas en el procesamiento de información olfativa (Nieuwenhuys, 1963). A la vista de la eminente necesidad de datos precisos sobre conexiones telencefálicas, uno de los objetivos del presente estudio fue la de cubrir esa carencia realizando la caracterización hodológica de las distintas áreas telencefálicas de un pez teleósteo, la trucha arco iris.

EL TUBÉRCULO POSTERIOR: PRINCIPAL CENTRO DIENCEFÁLICO DE RELEVO DE INFORMACIÓN SENSORIAL AL TELENCÉFALO

El tubérculo posterior de teleósteos es una estructura muy desarrollada que se localiza en la transición entre el diencefalo y mesencefalo, formado tanto por núcleos migrados como no migrados (Braford y Northcutt, 1983; Meek y Nieuwenhuys, 1998) y siendo considerado un centro de relevo de información sensorial de diversas categorías (gustativa, acústico-lateral, mecanosensorial) al telencéfalo (Meek y Nieuwenhuys, 1998). Entre los núcleos migrados del tubérculo posterior, han sido clave en nuestro estudio el núcleo gustatorio terciario, el complejo preglomeruloso y el núcleo subglomeruloso, por lo que serán descritos someramente dentro del presente apartado. Estos centros juegan un papel clave en el relevo de información sensorial al telencéfalo, de forma que parece que sustituyen en gran medida en esta función al tálamo dorsal, que es el principal centro de relevo de información sensorial al palio de amniotas. Parece que la presencia de ambas vías ascendentes sensoriales al telencéfalo de teleósteos podría representar el patrón ancestral en vertebrados (Wullimann et al., 1998; Wulliman y Mueller, 2004). Cabe destacar que el complejo preglomeruloso y el núcleo subglomeruloso son centros exclusivos de peces teleósteos, e incluso parece que el núcleo subglomeruloso sólo aparece en ciertos grupos de teleósteos.

El **núcleo gustatorio terciario** de la trucha es un centro con forma triangular que se sitúa dorsalmente al núcleo del receso lateral hipotalámico y medialmente al toro lateral y núcleo difuso. Parece estar implicado en el procesamiento de información gustativa (Pérez et al., 2000), pero sus conexiones están poco estudiadas. Aparte de sus claras diferencias hodológicas, las células que constituyen este núcleo prácticamente no presentan diferencias citoarquitectónicas y neuroquímicas claras con las que se localizan adyacentes en el toro lateral y núcleo difuso.

El **complejo preglomeruloso** es una región migrada del tubérculo posterior que parece estar implicada en el procesamiento de información mecanosensorial y acústico-lateral (Murakami et al., 1986a,b; Wullimann y Northcutt, 1990; Striedter, 1991, 1992). Las proyecciones eferentes al telencéfalo en peces teleósteos provienen mayoritariamente del complejo preglomeruloso, más que de regiones talámicas como ocurre en otros vertebrados. La nomenclatura, los límites citoarquitectónicos y las subdivisiones del complejo preglomeruloso varían según los autores y la especie que se considere (Meek y Nieuwenhuys, 1998). En la trucha arco iris (*Protacanthopterygii*) consiste en una columna continua que rostralmente se localiza lateralmente en el encéfalo y

que se va haciendo cada vez más medial hacia regiones caudales. La parte más rostral del complejo se denomina **núcleo preglomeruloso anterior** mientras que cuando éste se hace medial se denomina **núcleo preglomeruloso medial**, que se corresponde al núcleo pseudoglomeruloso de Holmgren (1920). Finalmente se localiza en la línea media del encéfalo, constituyendo el **cuerpo mamilar**. Existían datos sobre las conexiones de las regiones rostralaterales de este complejo (Murakami et al., 1986a,b; Wullimann y Northcutt, 1990; Striedter, 1991, 1992), pero no se había llevado a cabo el estudio de estas regiones en salmónidos. Así mismo, los datos acerca de las conexiones del cuerpo mamilar se limitaban a cipriniformes (Yoshimoto e Ito, 1993; Ito et al., 1997) y

perciformes (Yoshimoto et al., 1998; Sawai et al., 2000)

El **núcleo subglomeruloso** (SG) fue descrito por primera vez, utilizando ya esta nomenclatura, por Holmgren en 1920. Es un núcleo con forma de U asociado a la pared dorsal del receso hipotalámico lateral que consiste en una capa de cuerpos neuronales piriformes que rodean a un neuropilo central. En la trucha, este núcleo aparece pronto en el desarrollo (Corujo y Anadón, 1990), observándose el primordio del SG lateralmente en embriones de 9 mm. A pesar de ser un núcleo diencefálico muy aparente, apenas existían datos sobre las conexiones de este núcleo, lo que nos llevo a estudiar sus conexiones y sus relaciones con el telencéfalo.

NOTAS SOBRE LA NEUROANATOMIA DEL TELENCEFALO DE VERTEBRADOS AMNIOTAS

El telencéfalo es la parte más rostral del encéfalo y está implicada en toda una serie de funciones superiores como son procesos de integración sensorial, control motor, elaboración de diversos comportamientos, aprendizaje, memoria, etc.

El establecimiento de homologías entre regiones del telencéfalo de peces teleósteos con las correspondientes regiones del telencéfalo de vertebrados amniotas y de otros amniotas viene siendo un claro objetivo en los estudios de neuroanatomía comparada. Sin embargo, las posibles homologías siguen siendo por el momento un tema sujeto a controversia: ¿Poseen los peces teleósteos un área telencefálica homóloga al complejo estriado de vertebrados amniotas? ¿Y un área homóloga a la amígdala? Sin duda, es necesario disponer de unas nociones básicas sobre el papel que juegan diversos centros que parecen ser clave en el telencéfalo de amniotas, su localización en el telencéfalo y sus conexiones con otras áreas encefálicas, antes de realizar cualquier comparación con áreas del telencéfalo de teleósteos. En este sentido, y dado su interés para la posterior discusión de nuestros resultados, cabe destacar a los ganglios basales y el sistema límbico, que serán brevemente tratados a continuación.

LOS GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales son un grupo de centros que juegan un papel clave en funciones motoras, en particular en el fraguado, comienzo y ejecución del movimiento (Albin et al., 1989). Además actualmente está generalmente aceptado que los ganglios basales están implicados en varias funciones no motoras, incluidas aquellas relacionadas con comportamientos motivados e incentivados (Marín et al., 1997a). Todas estas funciones se llevan a cabo a través de cuatro circuitos que implican a los gánglios basales:

somatomotor, oculomotor, asociativo o cognitivo y límbico (Mink, 2003). La eferencia de los ganglios basales es inhibitoria, lo que significa que un aumento en las señales que salen de los ganglios basales resulta en una reducción en la actividad de sus regiones diana (Mink, 2003). Varios estudios han revelado la existencia de numerosas similitudes en la organización de los ganglios basales de reptiles, aves y mamíferos (Medina y Reiner, 1995; Marín et al., 1998), pero la posible extensión o no de estos resultados al grupo de peces actinopterigios es aún un tema por resolver.

El término ganglios basales se refiere al conjunto de globo pálido y complejo estriado, agrupando este último al núcleo caudado y putamen. A veces se habla de un complejo estriado-palidal, que agruparía a estos núcleos. El término ganglios basales con frecuencia agrupa también a la *substantia nigra* (SN), al área tegmental ventral (VT) y al núcleo subtalámico (STN), debido a su relación anatómica y funcional con el estriado. Así mismo, se incluye dentro de los ganglios basales al núcleo *accumbens* y a ciertas regiones del tubérculo olfativo, pudiendo constituir estas dos regiones una porción ventral del estriado según datos estructurales, histoquímicos y hodológicos (Voogd et al., 1998).

- *El tubérculo olfativo* se localiza inmediatamente detrás del núcleo olfativo anterior y cubre superficialmente la cabeza del núcleo caudado y el núcleo *accumbens*. Esta región recibe proyecciones directas desde bulbo olfativo (Voogd et al., 1998).

- *El núcleo accumbens* de mamíferos se sitúa rostroventralmente al estriado y está considerado como un centro de integración sensorimotora que ejerce su influencia en comportamientos sujetos a emociones, por lo que está muy implicado en las dependencias a drogas (Carelli, 2004; Di Chiara et al., 2004; Nestler, 2004).

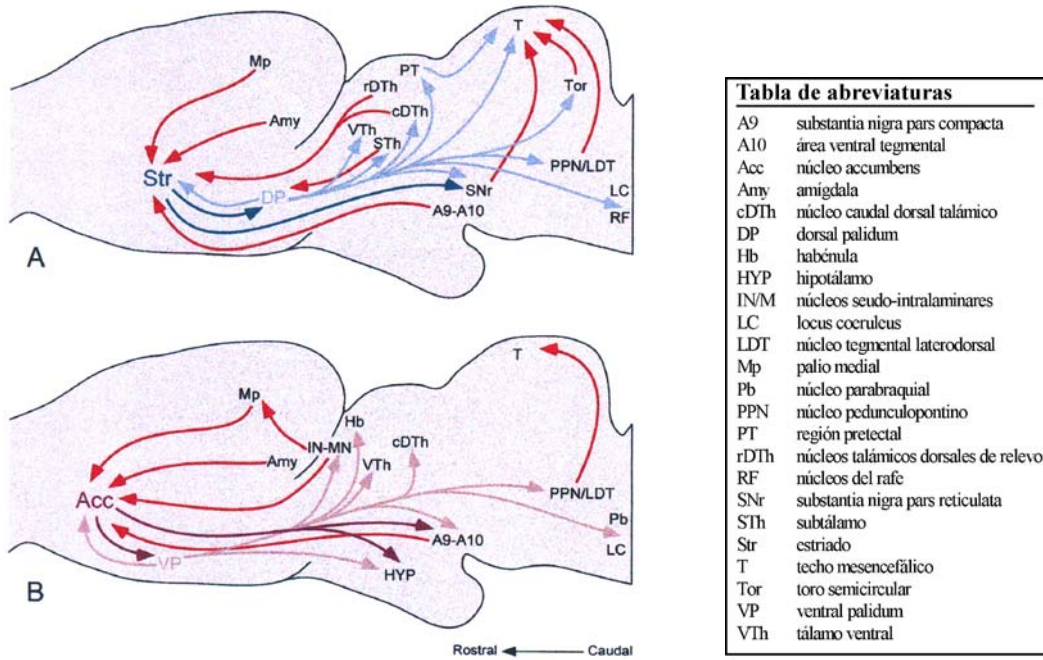


Fig. 10. Representación esquemática de las conexiones de los ganglios basales, estriado (A) y accumbens (B), en tetrápodos ancestrales. Para abreviaturas, ver la tabla a la izquierda de los esquemas. (Tomado de Marín et al., 1998).

- El complejo estriado es la estructura a la que llegan la mayoría de las proyecciones aferentes desde diversas regiones del encéfalo (Figs.10,11). El estriado de mamíferos se caracteriza por presentar alrededor de 90-95% de neuronas inmunoreactivas para el ácido γ -aminobutírico (GABA) y adicionalmente para la sustancia P o la encefalina (Endepols et al., 2004) (Fig.11). Recibe información glutamatérgica del cortex (o pallium), del tálamo y de neuronas dopaminérgicas del complejo área tegmental ventral- *substantia nigra*

(Figs.10,11), siendo esta inervación dopaminérgica al estriado una de las características más conservadas de la organización de los ganglios basales (Parent, 1986; González y Smeets, 1994). Clásicamente estas proyecciones se describían formando parte de dos sistemas diferentes: a) el sistema mesolímbico o la parte ventral del sistema mesostriatal, cuyas fibras se originan en células del área tegmental ventral y que proyectan al núcleo *accumbens*, tubérculo olfatorio, núcleo del lecho de la estria terminal, septo y amígdala; B) el sistema nigrostriatal o parte dorsal del sistema mesostriatal, que está compuesto de células de la *substantia nigra* que inervan el caudado/putamen (Björklund y Lindvall, 1984; Fuxe et al., 1985; Parent, 1986; Marín et al., 1997b).

- El globo pálido se localiza medial al putamen y rostral al hipotálamo, siendo el principal responsable de las eferencias desde los ganglios basales (junto con la *substantia nigra*, si incluimos a esta última en el grupo de los ganglios basales) mediante una eferencia inhibitoria gabaérgica que alcanza el tálamo, el tallo cerebral y la médula espinal (Fig.11). Por otro lado, las principales aferencias al globo pálido provienen del complejo estriado y del núcleo subtalámico (Fig.11). La

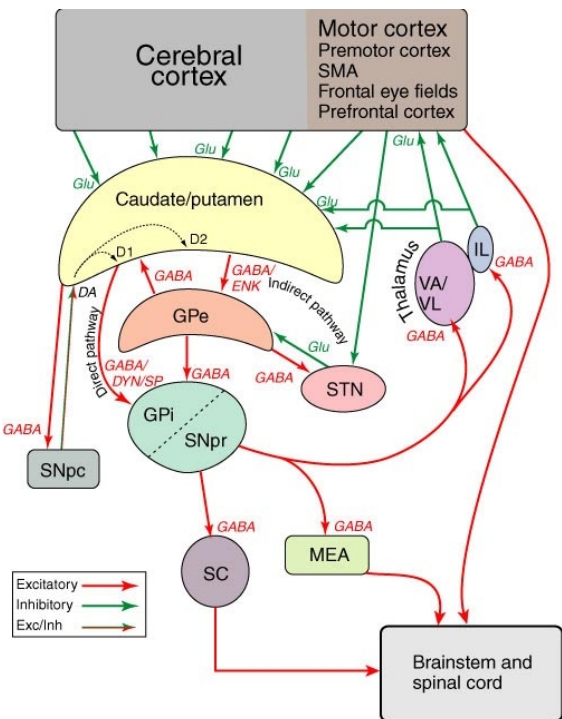


Fig. 11. Representación esquemática de los circuitos que implican a los ganglios basales. Las conexiones excitatorias se indican en líneas verdes, inhibitorias en rojo y la proyección dopaminérgica con carácter modulador se representa con una línea roja y verde. Abreviaturas: *GPe*, segmento externo del globo pálido; *GPi*, segmento interno del globo pálido; *IL*, núcleo talámico intralaminar; *MD*, núcleo talámico mediadorsal; *MEA*, área extrapiramidal del cerebro medio; *SC*, colículo superior; *SNpc*, *substantia nigra pars compacta*; *SNpr*, *substantia nigra pars reticulata*; *STN*, núcleo subtalámico; *VA*, núcleo talámico ventral anterior; *VL*, núcleo talámico ventral lateral; *DA*, dopamina (con los subtipos de receptor D1 y D2); *Dyn*, dinorfina; *Enk*, encefalina; *GABA*, ácido γ -aminobutírico; *Glu*, glutamato; *SP*, sustancia P. (Tomado de Mink, 2003).

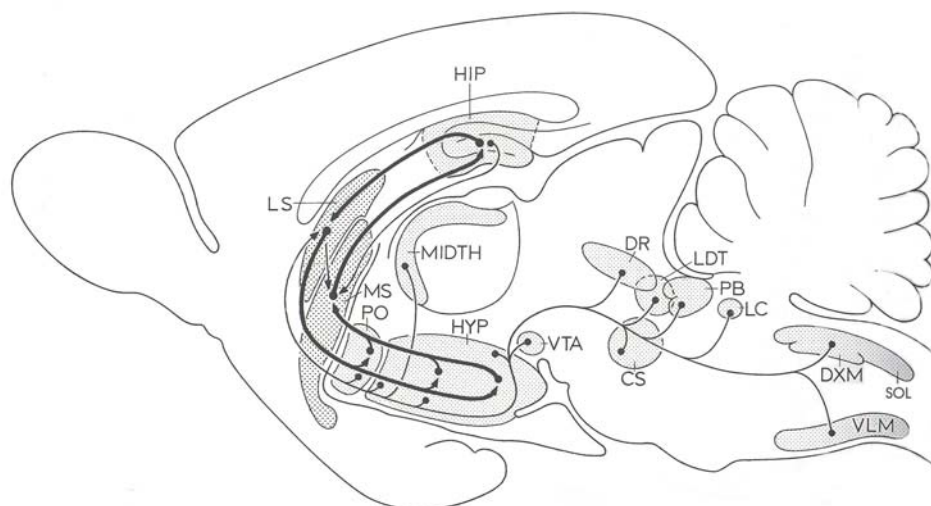


Fig. 12. Principales conexiones de la región septal de mamíferos. Abreviaturas: CS: núcleo central superior; DR: núcleo dorsal del rafe; DXM: núcleo motor dorsal del vago; HIP: hipocampo; HYP: hipotálamo; LC: locus coeruleus; LDT: núcleo tegmental laterodorsal; LS: septo lateral; MIDTH: núcleos talámicos mediales; MS: septo medial; PB: núcleos parabraquiales; PO: región preóptica; SOL: núcleo del tracto solitario; VTA: área ventral tegmental (Tomado de Voogd et al., 1998).

proyección desde el estriado se caracteriza por ser inhibitoria y utilizar GABA, sustancia P y dinorfina, mientras que la proyección desde el núcleo subtalámico es excitatoria y utiliza como neurotransmisor al glutamato (Fig.11).

- El complejo área ventral tegmental/ substantia nigra es el principal responsable de la proyección dopaminérgica ascendente al estriado (Fig.11). Esta es una característica muy conservada en la organización de los ganglios basales (Parent, 1986; González y Smeets, 1994), ya que incluso en anfibios se observaron grupos neuronales separados, uno de ellos localizado en el cerebro medio y otro de ellos en el diencefalo (tubérculo posterior), que proyectan al estriado (sistema mesostriatal) y al núcleo *accumbens* (sistema mesolímbico) (Marín et al., 1997b, 1998). Este hecho ha llevado a analizar de nuevo los sistemas dopaminérgicos en peces bajo un nuevo punto de vista, tratando de encontrar el equivalente a este sistema dopaminérgico ascendente a niveles telencefálicos (Rink y Wullmann, 2001, 2002).

EL SISTEMA LÍMBICO

Diversos estudios de comportamiento realizados en mamíferos han puesto de manifiesto que el sistema límbico está implicado en funciones superiores como motivación, memoria, aprendizaje, emociones, comportamiento sexual, y en varias funciones integrativas necesarias para generar las respuestas apropiadas a los estímulos. Los principales componentes telencefálicos del sistema límbico son el hipocampo y estructuras paliales relacionadas, los núcleos septales y la amígdala, pero hay otras estructuras del encéfalo que también se consideran parte del sistema límbico, como el epitálamo, el tálamo dorsal y el hipotálamo. Además, el sistema límbico también interactúa con otros sistemas, como con el sistema olfativo, áreas paliales dorsales y con el estriado.

- El área septal o septo del telencefalo de tetrápodos es una estructura citoarquitectónicamente compleja que ocupa una posición estratégica en el sistema límbico de vertebrados terrestres (Swanson, 1983; Font et al., 1998; Sánchez-Camacho et al., 2003). En mamíferos, parece que los núcleos septales están implicados en varias funciones (Gray y McNaughton, 1983; Chozick, 1985) como en determinados patrones de comportamiento (agresivos, defensivos, sexuales, etc.), motivación, aprendizaje, así como en la regulación de los sistemas autónomo y endocrino (Risold y Swanson, 1997a,b; Endepols et al., 2005). El área septal está compuesta por varios núcleos pobremente delimitados que son atravesados por tractos de fibras (Font et al., 1997). Presenta conexiones recíprocas con regiones límbicas telencefálicas y diencefálicas, y en menor medida con regiones mesencefálicas, tallo cerebral y medula espinal (Sánchez-Camacho et al., 2003; Voogd et al., 1998) (Fig.12).

- El complejo amígdaloide o amígdala parece estar implicado en emociones conscientes e inconscientes, procesando aferencias sensoriales simples y determinando el valor emocional de esas aferencias. En la mayoría de los mamíferos el complejo amígdaloide se localiza entre el tubérculo olfativo y el hipocampo de vertebrados e incluye tanto componentes paliales como subpaliales. La amígdala palial estaría formada por derivados paliales laterales y ventrales, mientras que derivados del estriado y del globo pálido constituyen la amígdala subpalial (Striedter, 1997; Swanson y Petrovich, 1998; Puelles et al., 2000; Puelles y Rubenstein, 2003). Humphrey (1936) introdujo una subdivisión del complejo amígdaloide en dos grupos, corticomediales (núcleos cortical, central y medial) y basolaterales (núcleos basales y laterales), cuyas conexiones aparecen representadas en la figura 13, pero esta clasificación se ha visto sujeta a sucesivas

modificaciones (Stephan y Andy, 1977; Stephan et al., 1987; ver Voogd et al., 1998).

Si atendemos a sus conexiones, el heterogéneo complejo amigdalóide se puede dividir en (Voogd et al., 1998):

- un complejo basolateral, que está directamente conectado con estructuras corticales;
- una amígdala olfativa, inervada por el bulbo olfativo;
- una amígdala vomeronasal, que está inervada por el bulbo olfativo accesorio cuando está presente;
- un grupo centromedial, que se caracteriza por un sistema de vías muy organizadas que alcanzan varias regiones hipotalámicas y del tallo cerebral.

El concepto de *amígdala extendida* (Alheid y Heimer, 1988) ha sido introducido para referirse a una región que incluye la amígdala centromedial (núcleos central y medial de la amígdala cortical) y varios núcleos del

telencéfalo basal (núcleo del lecho de la estria terminal, etc.) que se caracterizan por presentar unas características neuroquímicas y hodológicas similares.

- *El hipocampo o formación hipocámpal*, al menos en mamíferos, juega un papel muy importante en la memoria a corto plazo y por tanto es una pieza clave para el almacenaje de acontecimientos nuevos como memoria a largo plazo. El hipocampo o formación hipocámpal es una gran estructura curvada y localizada medialmente en los hemisferios telencefálicos, en la que se pueden diferenciar tres estructuras dispuestas longitudinalmente: la circunvolución dentada, el Asta de Ammon y el *subiculum* (Voogd et al., 1998). A su vez, la principal banda de fibras eferentes del hipocampo se denomina *fornix* (Martin, 1989), y alcanzan los núcleos septales, el hipotálamo, el tálamo, amplias regiones de la corteza cerebral y la formación reticular del mesencéfalo.

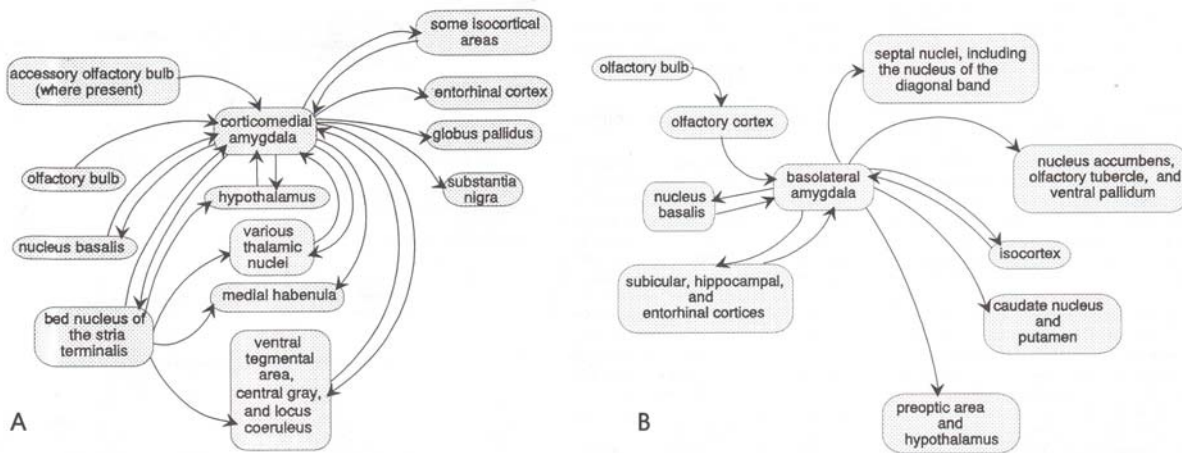


Fig. 13. Diagramas que representan las conexiones de la amígdala cortical (A) y lateral (B) de vertebrados superiores (Butler y Hodos, 1996c)

**LA TRUCHA ARCO IRIS COMO ESPECIE OBJETO DE
UN ESTUDIO NEUROANATÓMICO COMPARADO**

Para el presente estudio se utilizaron individuos juveniles de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (*Salmo gairdneri* Richardson, *Salmo irideus* Gibbons), (Fig.14) especie que pertenece a la Familia **Salmonidae**, Orden **Salmoniformes**, Superorden **Protacanthopterygii**, Subdivisión **Euteleostei**, División **Teleostei**, Subclase **Neopterygii**, Clase **Actinopterygii**, Superclase **Gnathostomata** de la clasificación de Nelson (1994) (Fig.15).

Dentro de los peces mandibulados ó **Gnatóstomos**, la clase **Actinopterygios** se caracteriza por presentar radios espinosos en las aletas y agrupa a dos subclases: los **Condrósteos** y los **Neopterygios**. La subclase **Condrósteos**, que incluye a los esturiones, concentra a los peces más primitivos dentro del grupo de los actinopterygios, presentando un aspecto que recuerda a los escaulos y un esqueleto casi totalmente cartilaginoso (Nelson, 1994). Por su parte, dentro de los **Neopterygios** encontramos el extenso grupo de los **Teleósteos**, quienes constituyen una radiación evolutiva extraordinariamente amplia y diversificada, con alrededor de 20.000 especies (Butler y Hodos, 1996a; Nadal, 2001) distribuidas por una inmensa variedad de ambientes y nichos ecológicos. Como características diferenciales de los teleósteos, cumple decir que presentan un esqueleto totalmente osificado, radios en las aletas, branquias protegidas por opérculo (agallas) y un cuerpo recubierto de escamas, por lo general, delgadas e imbricadas. Los teleósteos agrupan cuatro grandes radiaciones, tres de ellas más primitivas, los **Osteoglosomorpha**, **Elopomorpha**, **Clupeomorpha**, y los más recientemente diversificados **Euteleostei**. Estos últimos comprenden 9 grandes grupos, de los cuales los **Ostariophysii**, los **Protacanthopterygii** y los **Acanthopterygii** son los de mayor interés dentro de este estudio. Los **Ostariophysios** incluyen los cipriniformes o carpas y los siluriformes o peces gato, que se caracterizan por presentar un sistema gustativo muy especializado. Por su parte los **Acanthopterygii** son la radiación de teleósteos más moderna, incluyendo a mugilimorfos y percomorfos entre otros (Nelson, 1994).

Dentro de los protacanthopterygios, los **Salmoniformes** presentan como características del grupo una aleta adiposa dorsal, sin radios de sostén visibles, y una línea lateral aparente (Bruno y Maugeri, 1995).

Los **Salmónidos** son peces que aparecieron tempranamente dentro del grupo de los euteleosteos (Nadal, 2001), como evidencian ciertas características anatómicas, y se considera un buen representante del ancestro que dio origen a los teleósteos (Pérez et al., 2000). Esto los hace interesantes para un estudio neuroanatómico desde un punto de vista comparado.

Los salmónidos se reproducen en aguas dulces, donde algunos viven de forma regular, mientras que otros son migratorios anádromos, ascendiendo trechos considerables de los ríos antes de la freza e incluso volviendo a los cursos de agua en los que nacieron, que recuerdan y reconocen quimiosensorialmente, fundamentalmente a través del sistema olfativo. Se alimentan de invertebrados acuáticos y de organismos terrestres, principalmente insectos, que flotan río abajo en la superficie del agua, así como de organismos que constituyen el bentos móvil (Frost y Brown, 1967; Gerking, 1994). Parece que estos organismos atraen la atención de la trucha fundamentalmente a través del sistema visual (Valentinic y Caprio, 1997), por lo que parece un sistema clave para la actividad predatoria en la trucha. Sin embargo, los salmónidos no presentan grandes especializaciones sensoriales para realizar sus funciones básicas, ni siquiera del sistema visual y olfativo.

Por tanto el estudio comparado con otros grupos que presentan sistemas sensoriales más especializados permitiría discernir los caracteres derivados debido a



Fig. 14. Anatomía externa de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), donde se aprecia la característica banda de color púrpureo que recorre los flancos y las motas de color negro que se distribuyen preferentemente en las zonas dorsales del cuerpo.

la especialización del sistema. Estas características del grupo de los salmónidos, sus relaciones filogenéticas y su carácter sensorial generalista, junto con el hecho de que abundan los estudios citoarquitectónicos y neuroquímicos

en especies de salmónidos, nos llevó a la utilización de un representante del grupo, la trucha arco iris (Fig.14), para realizar nuestro estudio hodológico y citoarquitectónico.

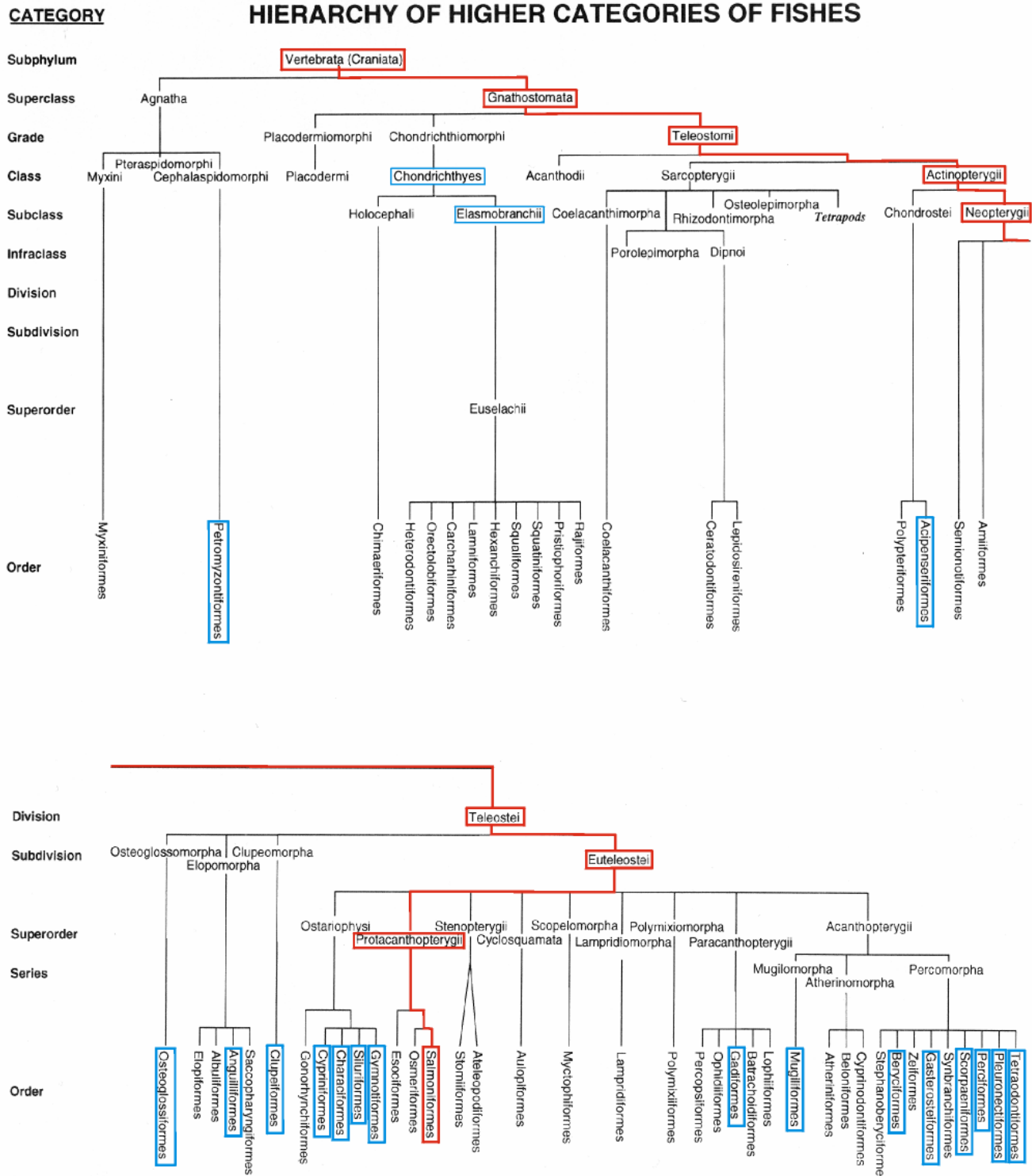


Fig. 15. Diagrama de las relaciones filogenéticas de los principales órdenes de peces según la clasificación de Nelson (1994). En rojo se representa la línea evolutiva de los salmónidos. Los recuadros en azul indican los principales órdenes de las especies que se mencionarán en el presente estudio.

LOS TRAZADORES NEURONALES COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIOS HODOLÓGICOS

Los estudios sobre conexiones neuronales se iniciaron a finales del siglo XIX con el análisis de la degeneración anterógrada y retrógrada que tenía lugar tras provocar una lesión experimental en un centro nervioso. Las alteraciones degenerativas del soma de las neuronas y en las fibras nerviosas de proyección se detectan mediante impregnación argéntica (ten Donkelaar y Nicholson, 1998; Vercelli et al., 2000).

Las limitaciones inherentes a las técnicas de degeneración fueron solventadas con la introducción de las técnicas basadas en el transporte neuronal. Tras la inyección local en la región del encéfalo que se pretende caracterizar hodológicamente, el trazador es captado por las células y transportado anterógrada y/o retrógradamente según el trazador de que se trate. El trazador utilizado puede ser un enzima (ej. peroxidasa de rábano), un fluoróforo, un colorante o una neurotoxina.

Los trazadores mayoritariamente utilizados hasta el momento para estudios neuranatómicos en peces han sido la peroxidasa de rábano (HRP), las carbocianinas, las dextranaminas y la biocitina. Es importante tener en cuenta las particularidades de cada trazador a la hora de interpretar los datos obtenidos y de compararlos con resultados obtenidos utilizando otro trazador diferente. Por ejemplo, algunos trazadores funcionan bien tanto para marcaje anterógrado como retrógrado, mientras que otros tienen preferencia por uno de los dos sentidos de transporte (ver tabla 1).

La *peroxidasa de rábano (HRP)* es un enzima perteneciente al grupo de las oxidoreductasas, responsables de la oxidación de diversas sustancias en presencia de peróxido de hidrógeno. A veces se utiliza conjugada con aglutinina de germen de trigo (Wheat Germ Agglutinin, WGA-HRP; Oztas, 2003). La enzima penetra en la neurona mediante un proceso de endocitosis y es transportada activamente en el interior de lisosomas preferentemente en sentido retrógrado (Tabla 1) y posteriormente es detectada por aplicación de un agente cromógeno (ej. diaminobenzidina) que es oxidado por la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno (Oztas, 2003).

Los *dextranos* son polisacáridos hidrofílicos que se transportan de forma activa por las células, por lo que sólo pueden utilizarse en tejido vivo (Haugland, 1996). Se usan como trazadores neuronales en forma de conjugados con una gran variedad de moléculas fluorescentes [ej. fluoresceína (FDA), rodamina (RDA) y Texas Red (TRDA)] o en su forma biotinilada (BDA). Los dextranos que se utilizan como trazadores tienen un peso molecular de hasta 70.000 daltons, aunque son más

utilizados los de 1500 a 3000 daltons, ya que se transportan más rápido y permiten un mayor acceso a procesos celulares periféricos (Haugland, 1996; Reiner et al., 2000; Vercelli et al., 2000). Se pueden utilizar como trazadores anterógrados o retrógrados dependiendo del método de estudio y del tipo de estudio utilizado (Vercelli et al., 2000). En el caso de la BDA, su forma de menor peso molecular (3000 daltons) parece que se transporta preferentemente en sentido retrógrado, mientras que la de mayor peso molecular (10.000 daltons) parece que se transporta principalmente en sentido anterógrado (Reiner et al., 2000) si bien puede también producir algo de marcaje retrógrado. Esto no tiene porque trasladarse de forma exacta a las dextranaminas fluorescentes, así por ejemplo hay dos variedades de dextranos conjugados con rodamina de 70 kd y 10 kd, siendo el primero más sensible como trazador retrógrado mientras que el segundo lo es más como anterógrado (Reiner et al., 2000).

La *biocitina* es un trazador eminentemente anterógrado (Tabla 1), dando un marcaje muy bueno de espinas dendríticas, axones colaterales y varicosidades. Se puede utilizar en algunos casos como trazador retrógrado, aunque según algunos autores sólo tras grandes inyecciones de trazador (Vercelli et al., 2000). Una ventaja del uso de biocitina es que requiere periodos cortos de supervivencia tras el marcaje “*in vivo*” (ver Tabla 1).

Las *carbocianinas* son colorantes fluorescentes de carácter lipofílico utilizados para el estudio de la dinámica y estructura de las membranas, como marcadores de células en cultivo (Honig y Hume, 1986) y como trazadores neuronales. Las carbocianinas más utilizadas como trazadores neuronales son las octadecil indocarbocianinas (DiI) (Fig.16), las octadecil oxocarbocianinas (DiO), y las 4-[4-(dihexadecilamino)estiril]-*N*-yoduro de metilpiridinio (DiA ó DiAsp) (Haugland, 1996; Vercelli et al., 2000).

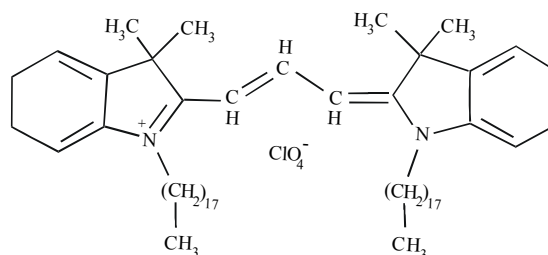


Fig. 16. Molécula de DiI (Reproducido de Kiernan, 1999).

Una vez aplicadas al tejido, las carbocianinas se insertan en las bicapas lipídicas (Fig.17) y son

transportadas principalmente mediante difusión lateral en sentido retrógrado y anterógrado gracias a la movilidad de los lípidos de membrana (Godement et al., 1987; Honig, 1993).

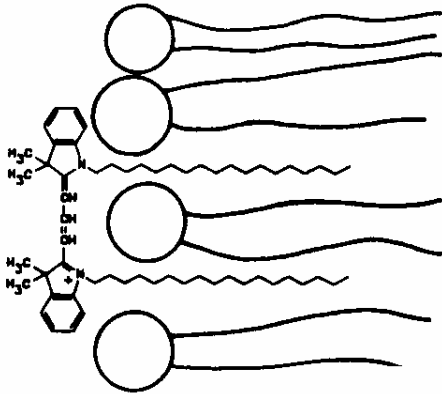


Fig. 17. Molécula de carbocianina insertada en una hemicapa fosfolipídica de una membrana celular (Reproducido de Haugland, 1996).

Dado que el transporte del trazador no se realiza activamente sino por un proceso de difusión pasiva, las carbocianinas se pueden utilizar como trazadores tanto en tejido vivo como en tejido fijado (Tabla 1). Esto evita los problemas de supervivencia del animal que conllevan otras técnicas de marcaje y permiten una mayor precisión en la inserción del trazador. El tejido con el trazador se puede mantener a temperaturas que oscilan de 4°C a 37-40 °C, siendo mayor la tasa de difusión a temperaturas más altas (Honig, 1993).

Se han citado algunos casos de marcaje transneuronal, pero parecen ser esporádicos y debidos mayoritariamente a que el tejido no ha sido procesado

óptimamente, como la pobre fijación del tejido, el mantenimiento del mismo a temperaturas demasiado altas (Snider y Palavali, 1990; Honig, 1993) o durante demasiado tiempo (Godement et al., 1987; Erzurumlu et al., 1990; Holmqvist et al., 1992; Honig, 1993; Lukas et al., 1998). El problema de marcaje transneuronal no es exclusivo de las carbocianinas, por lo que los resultados deben estar siempre sujetos a un análisis cuidadoso y se deben evaluar las condiciones óptimas de transporte. Así mismo, la comparación de los datos obtenidos mediante DiI con los obtenidos mediante la utilización de otros trazadores muestra que no hay prácticamente diferencias en los resultados obtenidos (Godement et al., 1987; Holmqvist et al., 1992).

En el presente estudio, hemos seleccionado como trazador neuronal el DiI (perclorato 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) (Fig.17) en forma de cristales (D-282, Molecular Probes, Inc.) para realizar la caracterización hodológica de distintas áreas del sistema nervioso central de la trucha.

Como ya mencionamos anteriormente, las carbocianinas son trazadores fluorescentes, aunque la fluorescencia se puede convertir en un precipitado estable mediante la fotooxidación de la diaminobenzidina (Sandell y Masland, 1988; von Bartheld et al., 1990; Papadopoulos y Dori, 1993). El DiI y el DiA presentan color naranja-rojo que se puede observar en un microscopio de fluorescencia usando una combinación de filtros para rodamina, siendo sus máximos de emisión 565 nm y 590 nm respectivamente. El DiO presenta un máximo de emisión de 501 nm, emitiendo dentro de las longitudes de onda del verde, por lo que puede ser observado con un cubo de filtros para fluoresceína (Haugland, 1996).

Trazador	Funcionamiento in vivo	Funcionamiento en tejido fijado	Difusión en el punto de inyección	Dirección de transporte*	Marcaje de fibras al paso
HRP/ WGA-HRP	+++	+/-	++	R	+
BDA	+++	+/-	++	A / R (según peso molecular)	+/-
Dextranos fluorescentes	+++	+/-	++	A / R (según peso molecular)	+/-
Biotina	+++	+/-	+	A y R	+/-
DiI (cristales)	++	+++	+/-	A y R	+++
DiA	++	++	+/-	A y R	+++
DiO	++	+	+/-	A y R	+++

Tabla 1. Propiedades de algunos de los trazadores utilizados habitualmente para estudios hodológicos del sistema nervioso central en peces (Vercelli et al., 2000).

+/-, muy limitado o inconsistente; +, pobre; ++, moderado; +++, alto.

*Dirección de transporte: A, anterógrado, R, retrógrado.

BIBLIOGRAFÍA

- Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366-375.
- Alheid GF, Heimer L. 1988. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27: 1-39.
- Alunni A, Blin M, Deschet K, Bourrat F, Vernier P, Rétaux S. 2004. Cloning and developmental expression patterns of *Dlx2*, *Lhx7* and *Lhx9* in the medaka fish (*Oryzias latipes*). *J Comp Neurol* 121: 977-983.
- Amano M, Ashihara M, Yoshimura Y, Kitamura S, Ikuta K, Aida K. 1998. Two differing salmon GnRH precursor mRNAs co-expressed in the brain of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Cell Tissue Res* 292: 267-273.
- Anadón R, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Becerra M. 1995. Neurons of the olfactory organ projecting to the caudal telencephalon and hypothalamus: a carbocyanine-dye labelling study in the brown trout (Teleostei). *Neuroscience Lett* 191: 157-160.
- Anadón R, Rodríguez-Moldes I, González A. 2002. Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the forebrain of the trout: organization, cellular features and innervation. *Brain Res Bull* 57: 389-392.
- Anglade I, Mazurais D, Douard V, Jossic-Corcós C, Mañacos EL, Michel D, Kah O. 1999. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by *in situ* hybridization. *J Comp Neurol* 410: 277-289.
- Anglade I, Wang Y, Jensen J, Tramu G, Kah O, Conlon JM. 1994. Characterization of trout galanin and its distribution in trout brain and pituitary. *J Comp Neurol* 350: 63-74.
- Anzelius M, Ekström P, Möhler H, Richards JG. 1995. Immunocytochemical localization of GABA_A receptor β_2/β_3 subunits in the brain of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Chem Neuroanat* 8: 207-221.
- Ariens Kappers CU, Huber GC, Crosby E. 1936. The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man. Hafner Publishing Co, New York.
- Atema J. 1971. Structures and functions of the sense of taste in the catfish. *Brain Behav Evol* 4: 273-294.
- Bachy I, Berthon J, Rétaux S. 2002. Defining pallial and subpallial divisions in the developing *Xenopus* forebrain. *Mech Develop* 117: 163-172.
- Bailhache T, Arazam A, Klungland H, Aleström P, Breton B, Jego P. 1994. Localization of salmon gonadotropin-releasing hormone mRNA and peptide in the brain of atlantic salmon and rainbow trout. *J Comp Neurol* 347: 444-454.
- Bateson W. 1890. The sense-organs and perceptions of fishes, with remarks on the supply of bait. *J Mar Biol Ass* 11: 225-256.
- Bazer TG, Ebbesson SOE, Reynolds JB, Bailey RP. 1987. A cobalt-lysine study of primary olfactory projections in king salmon fry (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum). *Cell Tissue Res* 248: 499-503.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1994. Primary olfactory fibers project to the ventral telencephalon and preoptic region in trout (*Salmo trutta*): a developmental immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 342: 131-143.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1995. Ontogeny of somatostatin-immunoreactive systems in the brain of the brown trout (Teleostei). *Anat Embryol* 191: 119-137.
- Beidenbach ME. 1973. Functional properties and projection areas of cutaneous receptors in catfish. *J Comp Physiol* 84: 227-250.
- Bergqvist H. 1932. Zur Morphologie des Zwischenhirns bei niederen Wirbeltieren. *Acta Zool.* 13: 57-304.
- Bergqvist H, Källen B. 1954. Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates. *J Comp Neurol* 100: 627-660.
- Björklund A, Lindvall O. 1984. Dopamine-containing system in the CNS. En: *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol 2. Classical transmitters in the CNS. Part I. Björklund A, Hökfelt T (editores). Elsevier, Amsterdam, pp. 55-122.
- Bolliet V, Ali MA. 1992. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the brain of the brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Brain Behav Evol* 40: 234-249.
- Boudriot F, Reutter K. 2001. Ultrastructure of the taste buds in the blind cave fish *Astyanax jordani* ("Anotichthys") and the sighter river fish *Astyanax mexicanus* ("Teleostei, Characidae). *J Comp Neurol* 434: 428-444.
- Braford MR Jr. 1995. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? *Brain Behav Evol* 46: 259-274.
- Braford MR Jr, Northcutt RG. 1983. Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. E: Northcutt RG, Davis RE (editores). *Fish Neurobiology*, Vol. II. Michigan: The University of Michigan Press. pp. 117-163.
- Bruno S, Maugeri S. 1995. Peces de agua dulce de Europa. Omega, Barcelona, pp. 46-79.
- Bulfone A, Puelles L, Porteus, MH, Forman MA, Martin GR, Rubenstein JLR. 1993. Spatial restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2* (*Tes-1*), *Gbx-2* and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci* 13: 3155-3172.
- Butler AB. 2000. Topography and topology of the teleost telencephalon: a paradox resolved. *Neurosci Letters* 293: 95-98.
- Butler AB, Hodos W. 1996a. Vertebrate phylogeny and diversity in brain organization. En: *Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and adaptation*. Wiley-Liss, New York, pp. 54-68.
- Butler AB, Hodos W. 1996b. Terminal nerve and olfactory forebrain. En: *Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and adaptation*. Wiley-Liss, New York, pp. 423-437.
- Butler AB, Hodos W. 1996c. Limbic telencephalon. En: *Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and adaptation*. Wiley-Liss, New York, pp. 438-460.
- Cajal SR. 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol.II. Maloine, Paris.
- Carelli RM. 2004. Nucleus accumbens cell firing and rapid dopamine signaling during goal-directed behaviors in rats. *Neuropharmacology* 47: 180-189.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 1999. Development of immunoreactivity to neuropeptide Y in the brain of brown trout (*Salmo trutta fario*). *J Comp Neurol* 414: 13-32.
- Castro A, Becerra M, Anadón R, Manso MJ. 2001. Distribution and development of FMRFamide-like immunoreactive neuronal systems in the brain of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 440: 43-64.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2003. Distribution and development of calcitonin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467: 254-269.
- Chanconie M, Clairambault P. 1975. Development of the telencephalon of *Salmo irideus* Gib. *J Hirnforsch* 16: 75-89.
- Chozick BS. 1985. The behavioral effects of lesions of the septum: a review. *Int J Neurosci* 26: 197-217.
- Cooper JC, Hirsch PJ. 1982. The role of chemoreception in salmonid homing. En: *Chemoreception in fishes. Developments in aquaculture and fisheries science*. Volume 8. Hara T (editor). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, pp. 343-362.
- Corujo A, Anadón R. 1990. The development of the diencephalon of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Thalamus and hypothalamus*. *J Hirnforsch*, 31: 669-680.
- Cuadrado MI, Coveñas R, Tramu G. 1994. Distribution of gastrin-releasing peptide/bombesin-like immunoreactivity in the rainbow trout brain. *Peptides* 15: 1027-1032.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. 2004. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47: 227-241.
- Díaz ML, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2001. Development of thyrotropin-releasing hormone immunoreactivity in the brain of the brown trout *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 429: 299-320.
- Díaz-Regueira S, Anadón R. 1992. Central projections of the vagus nerve in *Chelon labrosus* Risso (Teleostei, O. Perciformes). *Brain Behav Evol* 40: 297-310.
- Ekström P, Ebbesson SO. 1989. Distribution of serotonin-immunoreactive neurons in the brain of sockeye salmon fry. *J Chem Neuroanat* 2: 201-213.
- Ekström P, Vanecek J. 1992. Localization of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in the brain of the atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Neuroendocrinology* 55: 529-537.

- Eller P, Rowley JC, Moran DT. 1985. The "rod cell" in trout olfactory epithelium: fact or artefact? *Chem Sens* 10: 392.
- Endepols H, Roden K, Luksch H, Dicke U, Walkowiak W. 2004. Dorsal striatopallidal system in anurans. *J Comp Neurol* 468: 299-310.
- Endepols H, Roden K, Walkowiak W. 2005. Hodological characterization of the septum in anuran amphibians: II. Efferent connections. *J Comp Neurol* 483: 437-457.
- Erzurumlu R, Javeri S, Schneider GE. 1990. Use of brainstem flat-mounts for visualizing DiI filled axons in the developing rodent visual system. *J Neurosci Methods* 33: 81-89.
- Evans RE, Zielinski B, Hara TJ. 1982. Development and regeneration of the olfactory organ in rainbow trout. En: *Chemoreception in fishes. Developments in aquaculture and fisheries science. Volume 8.* Hara T (editor). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, pp. 15-37.
- Farbman AI. 1992. Olfactory bulb. En: *Cell biology of olfaction.* Cambridge University Press, Canada, pp. 132-166.
- Fernández A, Anadón R. 1978. Núcleos y conexiones centrales del nervio facial de *Salmo irideus* Gibb. *Rev Fac Cienc Oviedo*, 17-19: 163-170.
- Figdor MC, Stern CD. 1993. Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* 363: 630-634.
- Finger TE. 1976. Gustatory pathways in the bulbhead catfish. I. Connections of the anterior ganglion. *J Comp Neurol* 165: 513-526.
- Finger TE. 1981. Enkephalin-like immunoreactivity in the gustatory lobes and visceral nuclei in the brains of goldfish and catfish. *Neuroscience* 6: 2747-2758.
- Finger TE. 1983. The gustatory system in teleost fish. En: *Fish neurobiology.* Northcutt RG, Davis RE (editores). Ann Arbor, MI: University of Michigan Press, pp. 285-319.
- Finger TE. 1988. Organization of chemosensory systems within the brains of bony fishes. En: *Sensory biology of aquatic animals.* Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavolga WN (editores). Springer Verlag, New York.
- Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang S-L, Anderson DJ, Guillemot F. 2000. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Gene Dev* 14: 67-80.
- Font C, Martínez-Marcos A, Lanuza E, Hoogland PV, Martínez-García F. 1997. Septal complex of the telencephalon of the lizard *Podarcis hispanica*. II. Afferent connections. *J Comp Neurol* 383: 489-511.
- Font C, Lanuza E, Martínez-Marcos A, Hoogland PV, Martínez-García F. 1998. Septal complex of the telencephalon of the lizard *Podarcis hispanica*. III. Efferent connections and general discussion. *J Comp Neurol* 401: 525-548.
- Frankenhuis-van den Heuvel THM, Nieuwenhuys R. 1984. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the diencephalon and mesencephalon of the trout, *Salmo gairdneri*. Cellbodies, fibres and terminals. *Anat Embryol* 169: 193-204.
- Fraser S, Keynes R, Lumsden A. 1990. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 344: 431-435.
- Frost WE, Brown ME. 1967. The trout. Collins, London, pp. 11-286.
- Fujita I, Sorensen PW, Stacey NE, Hara TJ. 1991. The olfactory system, not the terminal nerve, functions as the primary chemosensory pathway mediating responses to sex pheromones in male goldfish. *Brain Behav Evol* 38: 313-321.
- Fuxe K, Agnati LF, Goldstein M, Anderson K, Härfstrand. 1985. Dopaminergic systems in the brain and pituitary. En: *Basic and clinical aspects of neuroscience.* Flückiger E, Müller EE, Thoner MO (editores). Springer-Verlag, Berlin, pp. 11-25.
- Gage SP. 1893. The brain of *Diemyctilus viridescens* from larval to adult life and comparison with the brain of *Amia* and *Petromyzon*. Wilder Quarter Century Book, Ithaca, NY, pp. 259-314.
- García-Fernández JM, Brío MA, Cernuda R, Coto A, Riera P. 1992. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of *Salmo salar* and *Gambusia affinis*. *Histol Histopathol* 7: 385-392.
- Geneser F. 1990. Aparato digestivo. En: *Histología.* Editorial Panamericana, México, pp. 391-456.
- Gerking ShD. 1994. Feeding territory. En: *Feeding ecology of fish.* Academic Press, San Diego, California, pp. 223-241.
- Gilland E, Baker R. 1993. Conservation of neuroepithelial and mesodermal segments in the embryonic vertebrate head. *Acta Anat* 148: 110-123.
- Godement P, Vasselov J, Thanos S, Bonhoeffer F. 1987. A study in developing visual systems with a new method of staining neurons and their processes in fixed tissue. *Development* 101: 697-713.
- González A, López JM, Sánchez-Camacho C, Marín O. 2002. Regional expresión of the homeobox gene NKX2-1 defines pallidal and interneuronal populations in the basal ganglia of amphibians. *Neuroscience* 114: 567-575.
- Gray JA, McNaughton N. 1983. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 7: 119-188.
- Gribnau AA, Geijsberst LG. 1985. Morphogenesis of the brain in staged rhesus monkey embryos. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 91: 1-69.
- Guirao M. 1980. Los sistemas químicos. En: *Los sentidos, bases de la percepción.* Alhambra DL, Madrid, pp. 280-313.
- Haller B. 1897. Der Ursprung der Vagusgruppe bei den Teleostiern. En: *Festschrift zum siebenzigsten Geburtstage von Carl Gegenbauer am 21. Vol 3.* pp. 45- 102.
- Hannemann E, Trevarrow B, Metcalfe WK, Kimmel CB, Westerfield M. 1988. Segmental pattern of development in the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. *Development* 103: 49-58.
- Hara TJ. 1993. Role of olfaction in fish behavior. En: *Behavior of teleosts fishes.* Pitcher TJ (editor). Chapman and Hall, London.
- Haugland RP. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals.* Eugene, OR: Molecular Probes Inc.
- Hauptmann G, Söll I, Gerster T. 2002. The early embryonic zebrafish forebrain is subdivided into molecularly distinct transverse and longitudinal domains. *Brain Res Bull* 57: 371-375.
- Herrick CJ. 1899. The cranial and first spinal nerves of *Menidia*: a contribution upon the nerve components of the bony fishes. *J Comp Neurol* 9: 153-455.
- Herrick CJ. 1901. The cranial nerves and cutaneous sense organs of the North American siluroid fishes. *J Comp Neurol* 11: 177-247.
- Herrick CJ. 1905. Central gustatory paths in brains of bony fishes. *J Comp Neurol* 15: 375-456.
- Herrick CJ. 1927. The amphibian forebrain. IV. The cerebral hemispheres of *Amblyostoma*. *J Comp Neurol* 43: 231-325.
- Herrick CJ. 1948. The brain of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- His W. 1888. Zur Geschichte des Gehirns, sowie der centralen und peripherischen Nervenbahnen beim menschlichen Embryo. *Abh D math-phys Kl D Königl Sächsischen Gesellschaft d Wiss* 14: 341-392.
- His W. 1893. Über das frontale Ende des Gehirnrohres. *Arch Anat Entwicklung* 17: 157-171.
- Holmgren N. 1920. Zur Anatomie und Histologie des Vorder- und Zwischenhirns der Knochenfische hauptsächlich nach untersuchungen an *Osmerus eperlanus*. *Acta Zool* 1: 137-153.
- Holmqvist BI, Ekström P. 1991. Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleosts: distribution and relation to substance P, vasotocin, and isotocin in the atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Comp Neurol* 306:361-381.
- Holmqvist BI, Ostholm T, Ekstrom P. 1992. DiI tracing in combination with immunohistochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in a teleosts, the atlantic salmon. *J Neurosci Methods* 36: 17-25.
- Holmqvist BI, Östholm T, Ekström P. 1994. Neuroanatomical analysis of the visual and hypophysiotrophic systems in atlantic salmon (*Salmo salar*) with emphasis on possible mediators of photoperiodic cues during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 121: 1-12.
- Honig MG, Hume RI. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 103: 171-187.
- Honig MG. 1993. DiI labeling. *Neuroscience Protocols* 93-050-16-01.
- Huesa G. 1999. Estudio experimental de las proyecciones aferentes y eferentes del sistema olfatorio del esturión (*Acipenser baeri*, Brant) y su relación con el sistema del nervio terminal. Tesis de Licenciatura. Universidad de A Coruña.
- Humphrey T.1936. The telencephalon of the bat. I. The noncortical nuclear masses and certain pertinent fiber connections. *J Comp Neurol* 65: 603- 711.

- Ito H, Yoshimoto M, Albert JS, Yamane Y, Yamamoto N, Sawai N, Kaur A. 1997. Terminal morphology of two branches arising from a single stem-axon of pre-tectal (PSm) neurons in the common carp. *J Comp Neurol* 378: 379-388.
- Jarrard HE. 1997. Postembryonic changes in the structure of the olfactory bulb of the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) across its life history. *Brain Behav Evol* 49: 249-260.
- Kanwal JS, Finger TE. 1992. Central representation and projections of gustatory systems. En: *Fish chemoreception*. Hara TJ (editor). Chapman & Hall. Fish and Fisheries, Series 6, London, pp. 80-103.
- Karlson P, Lüscher M. 1959a. Pheromone. En: *Nomenklaturvorschlag für eine Wirkstoffklasse*. Naturwissenschaften 46: 63-64.
- Karlson P, Lüscher M. 1959b. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-56.
- Kosaka T, Hama K. 1979. Ruffed cell: a new type of neuron with distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). I. Golgi impregnation and serial thin sectioning studies. *J Comp Neurol* 186: 301-320.
- Kosaka T. 1980. Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). II. Fine structure of the ruffed cell. *J Comp Neurol* 193: 119-145.
- Kosaka T, Hama K. 1980. Presence of the ruffed cell in the olfactory bulb of the catfish, *Parasilurus asotus*, and the sea eel, *Conger myriaster*. *J Comp Neurol* 193: 103-117.
- Kosaka T, Hama K. 1981. Ruffed cell: a new type of neuron with distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). III. Three-dimensional structure of the ruffed cell dendrite. *J Comp Neurol* 201: 571-587.
- Kuhlenbeck H. 1973. The central nervous system of vertebrates, Vol.3, Part II: Overall morphologic pattern. Karger, New York.
- Lamb CF, Caprio J. 1993. Diencephalic gustatory connections in the channel catfish. *J Comp Neurol* 337: 400-418.
- Landacre FL. 1910. The origin of the cranial ganglia in *Amiurus*. *J Comp Neurol* 20: 309-411.
- Larsen CW, Zeltser LM, Lumsden A. 2001. Boundary formation and compartment in the avian diencephalon. *J Neurosci* 21: 4699-4711.
- Levine RL, Dethier S. 1985. The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* 237: 427-444.
- Lukas J-R, Aigner M, Denk M, Heinzl H, Burian M. 1998. Carbocyanine postmortem neural tracing: influence of different parameters on tracing distance and combination with immunocytochemistry. *J Cistochem Cytochem* 46: 901-910.
- Lumsden A, Keynes R. 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337: 424-428.
- Manso MJ, Becerra M, Mollist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 34: 239-260.
- Marín O, González A, Smeets WJAJ. 1997a. Basal ganglia organization in amphibians: afferent connections to the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378: 16-49.
- Marín O, González A, Smeets WJAJ. 1997b. Basal ganglia organization in amphibians: catecholaminergic innervation of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378: 50-69.
- Marín O, Smeets WJAJ, González A. 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends Neurosci* 21: 487-494.
- Martin JH. 1989. Neuroanatomy. Text and atlas. Elsevier, New York, pp. 375-396.
- Marui T, Caprio J. 1992. Teleost gustation. En: *Fish chemoreception*. Hara TJ (editor). Chapman & Hall. Fish and Fisheries, Series 6, London, pp. 171-198.
- Matz SP, Takahashi TT. 1994. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the brain of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J Comp Neurol* 345: 214-223.
- Matz SP. 1995. Connections of the olfactory bulb in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Brain Behav Evol* 46: 108-120.
- Mayser P. 1881. Vergleichend anatomische Studien über das Gehirn der Knochenfische mit besonderer Berücksichtigung der Cyprinoiden. *Arch Wiss Zool* 36: 259-366.
- Medina M, Repérant J, Dufour S, Ward R, Le Belle N, Miceli D. 1994. The distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of the silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *Anat Embryol* 189: 25-39.
- Meek J, Nieuwenhuys R. 1998. Holosteans and teleosts. En: *The central nervous system of vertebrates*, Vol 2. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (editores). Springer Verlag Berlin, Heidelberg New York, pp. 759-937.
- Meléndez-Ferro M. 2001. Distribución de la inmunoreactividad al ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso central de la lamprea de mar durante el desarrollo y en la etapa adulta. Tesis doctoral, Univ. de Santiago de Compostela.
- Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Villar-Cheda B, Abalo XM, Rodríguez-Muñoz R, Rodicio MC, Anadón R. 2002. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neuronal populations in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. *J Comp Neurol* 446: 360-376.
- Mink JW. 2003. Basal Ganglia. En: *Fundamental neuroscience*. Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ (editores). Academic Press, Elsevier Science, USA, pp.815-839.
- Morita Y, Finger TE. 1985. Reflex connections of the facial and vagal gustatory systems in the brainstem of the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* 231: 547-558.
- Morita Y, Finger TE. 1998. Differential projections of ciliated and microvillous olfactory receptor cells in the catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Comp Neurol* 398: 539-550.
- Muller JF, Marc RE. 1984. Three distinct morphological classes of receptors in fish olfactory organs. *J Comp Neurol* 222: 482-495.
- Münz H, Claas B, Stumpf WE, Jennes L. 1982. Centrifugal innervation of the retina by luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleosts fishes. *Cell Tissue Res* 222: 313-332.
- Murakami T, Ito H, Morita Y. 1986a. Telencephalic afferent nuclei in the carp diencephalon, with special reference to fiber connections of the nucleus preglomerulosus pars lateralis. *Brain Research* 382: 97-103.
- Murakami T, Fukuoka T, Ito H. 1986b. Telencephalic ascending acousticolateral system in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*), with special reference to the fiber connections of the nucleus preglomerulosus. *J Comp Neurol* 247: 383-397.
- Nadal J. 2001. Nivel Teleostomi, Clase Acanthoidei, Clase Osteichthyes. En: *Vertebrados: origen, organización diversidad y biología*. Ed. Omega, Barcelona.
- Nelson JS. 1994. *Fishes of the world*. Third Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 189-194.
- Nestler EJ. 2004. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47: 24-32.
- Neyt C, Welch M, Langston A, Kohtz J, Fishell G. 1997. A short-range signal restricts cell movement between telencephalic proliferative zones. *J Neurosci* 17: 9194-9203.
- Nieuwenhuys R. 1959. The structure of the telencephalon of the teleost *Gasterosteus aculeatus*. *I K Ned Akad Wet Proc Ser C* 62: 341-362.
- Nieuwenhuys R. 1962. The morphogenesis and the general structure of the actinopterygian forebrain. *Acta Morph Neerl Scand* 5: 65-78.
- Nieuwenhuys R. 1963. The comparative anatomy of the actinopterygian forebrain. *J Hirnforsch* 6: 171-192.
- Nieuwenhuys R. 1998. Morphogenesis and general structure. En: *The central nervous system of vertebrates*, Vol 2. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (editores). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 159-228.
- Nieuwenhuys R, Meek J. 1990. The telencephalon in actinopterygian fishes. En: *Cerebral cortex*, 8A. Comparative structure and evolution of the cerebral cortex, Part 1. Jones EG, Peters A (editores). Plenum Press, New York, pp. 31-73.
- Northcutt RG. 1995. The forebrain of gnathostomes: in search of a morphotype. *Brain Behav Evol* 46: 275-318.
- Northcutt RG, Braford MRJr. 1980. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes. En: *Ebbesson SOE (editor). Comparative neurology of the telencephalon*. New York: Plenum Press. pp. 41-98.
- Northcutt RG, Davis RE. 1983. Telencephalic organization in ray-finned fishes. In: *Northcutt RG, Davis RE (editores). Fish Neurobiology*, Vol. II. Michigan: The University of Michigan Press. pp. 203-236.
- O'Rahilly R, Müller F, Bossy J. 1989. Atlas des stades de développement de l'encephale chez l'embryon humain étudié par des reconstructions graphiques du plan médian. *Arch Anat Histol Embryol* 72: 3-34.

- Oka Y, Ichikawa M, Ueda K. 1982. Synaptic organization of the olfactory bulb and central projection of the olfactory tract. En: Chemoreception in Fishes. Hara TJ (editor). Elsevier, New York, pp. 61-76.
- Orr HA. 1887. Contributions to the embryology of the lizard. *J Morphol* 1:311-372.
- Östholm T, Ekström P, Ebbesson SO. 1990. Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain, retina and nervus terminalis of the sockeye salmon parr, *Oncorhynchus nerka*. *Cell Tissue Res* 261: 403-418.
- Oztaş E. 2003. Neuronal tracing. *Neuroanatomy* 2: 2-5.
- Papadopoulos, GC, Dori I. 1993. Dil labeling combined with conventional immunocytochemical techniques for correlated light and electron microscopic studies. *J Neurosci Methods* 46: 251-258.
- Parent A. 1986. Comparative neurobiology of the basal ganglia. Wiley, New York.
- Pérez SE, Yáñez J, Marín O, Anadón R, González A, Rodríguez-Moldes I. 2000. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout, and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J Comp Neurol* 428: 450-474.
- Pfeiffer W. 1982. Chemical signals in communication. En: Chemoreception in fishes. Developments in aquaculture and fisheries science, Vol. 8. Hara TJ (editor). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, pp. 307-341.
- Pinkus F. 1984. Über einen noch nicht beschriebenen Hirnnerv des *Protopterus annectens*. *Anat Anz* 9: 562-566.
- Puelles L, Doménech-Ratto G, Martínez-de-la-Torre M. 1987. Location of the rostral end of the longitudinal brain axis: review of an old topic in the light of marking experiments on the closing rostral neuropore. *J Morphol* 194: 163-171.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx2.1*, *Pax-6*, *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424: 409-438.
- Puelles L, Rubenstein JL. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16: 472-479.
- Puelles L, Rubenstein JLR. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26: 469-476.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig G. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Meth* 103: 23-37.
- Reutter K. 1992. Structure of the peripheral gustatory organ, represented by the silurid fish *Plotosus lineatus* (Thunberg). En: Fish chemoreception. Hara TJ (editor). Chapman & Hall. Fish and Fisheries, Series 6, London, pp. 60-78.
- Riddle DR, Oakley B. 1992. Immunocytochemical identification of the primary olfactory afferents in rainbow trout. *J Comp Neurol* 324: 575-589.
- Rink E, Wullimann MF. 1998. Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate Dil application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394: 152-170.
- Rink E, Wullimann MF. 2001. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889: 316-330.
- Rink E, Wullimann MF. 2002. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleosts. *Brain Res Bull* 57: 385-387.
- Risold PY, Swanson LW. 1997a. Chemoarchitecture in the rat lateral septal complex. *Brain Res Rev* 24: 91-113.
- Risold PY, Swanson LW. 1997b. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Rev* 24: 115-195.
- Rodríguez MA, Anadón R, Rodríguez-Moldes I. 2003. Development of galanin-like immunoreactivity in the brain of the brown trout (*Salmo trutta fario*), with some observations on sexual dimorphism. *J Comp Neurol* 465: 263-285.
- Sánchez-Camacho C, Peña JJ, González A. 2003. Catecholaminergic innervation of the septum in the frog: a combined immunohistochemical and tract-tracing study. *J Comp Neurol* 455: 310-323.
- Sandell JH, Masland RH. 1988. Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. *J Histochem Cytochem* 36: 555-559.
- Satou M. 1992. Synaptic organization of the olfactory bulb and its central projection. En: Fish chemoreception. Hara TJ (editor). Chapman & Hall. Fish and Fisheries, Series 6, London, pp. 40-59.
- Sawai N, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 2000. Fiber connections of the corpus mamillare in a percomorph teleost, *Tilapia Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol* 55: 1-13.
- Schober A, Malz CR, Meyer DL. 1993. Enzyme histochemical demonstration of nitric oxide synthase in the diencephalon of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neurosci Letters* 151: 67-70.
- Schroeder DM. 1980. The telencephalon of teleosts. En: Comparative neurology of the teleosts. Ebbesson SOE (editor). Plenum Press, New York, pp. 99-115.
- Sneddon LU. 2003. Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Res* 972:44-52.
- Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc R Soc Lond B* 270: 1115-1121.
- Snider WD, Palavali V. 1990. Early axon and dendritic outgrowth of spinal accessory motor neurons studied with Dil in fixed tissues. *J Comp Neurol* 297: 227-238.
- Stabell OB. 1992. Olfactory control of homing behaviour in Salmonids. En: Fish chemoreception. Hara TJ (editor). Chapman & Hall. Fish and Fisheries, Series 6, London, pp. 249-270.
- Stephan H, Andy OJ. 1977. Quantitative comparison of the amygdala in insectivores and primates. *Acta Anat* 98: 130-153.
- Stephan, Frahm HD, Baron G. 1987. Comparison of brain structure volumes in insectivora and primates. VII: Amygdaloid components. *J Hirnforsch* 28:571-584.
- Striedter GF. 1991. Auditory, electrosensory, and mechanosensory lateral line pathways through the forebrain in channel catfishes. *J Comp Neurol* 312: 311-331.
- Striedter GF. 1992. Phylogenetic changes in the connections of the lateral preglomerular nucleus in ostariophysan teleost: a pluralistic view of brain evolution. *Brain Behav Evol* 39: 329-357.
- Striedter GF. 1997. The telencephalon of tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol* 49: 179-213.
- Strong OS. 1895. The cranial nerves of Amphibia. *J Morphol* 10: 101-231.
- Studnicka FK. 1986. Beiträge zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte des Vorderhirns der Cranioten. *Sitzungsber Akad Boehm Wiss Math Nat Kl, Abt 2*, pp. 1-32.
- Swanson LW, Petrovich GD. 1998. What is the amygdala? *TINS* 21: 323-331.
- Teitsma CA, Anglade I, Toutirais G, Munoz-Cueto JA, Saligaut D, Ducouret B, Kah O. 1998. Immunohistochemical localization of glucocorticoid receptors in the forebrain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Neurol* 401: 395-410.
- ten Donkelaar HJ, Nicholson C. 1998. Notes on techniques. En: The central nervous system of vertebrates, Vol 2. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (editores). Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 327-337.
- Vaage S. 1969. The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos. *Adv Anat, Embryol Cell Biol* 41:7-87.
- Vacher C, Pellegrini E, Anglade I, Ferrière F, Saligaut Ch, Kah O. 2003. Distribution of dopamine D2 receptor mRNAs in the brain and the pituitary of female rainbow trout: and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 458: 32-45.
- Valentincic T, Caprio J. 1997. Visual and chemical release of feeding behavior in adult rainbow trout. *Chem senses* 22: 375-82.
- van den Dungen HM, Buijs RM, Pool CW, Terlouw M. 1982. The distribution of vasotocin and isotocin in the brain of the rainbow trout. *J Comp Neurol* 212: 146-157.
- Vecino E, Coveñas R, Alonso JR, Lara J, Aijón J. 1989. Immunocytochemical study of substance P-like cell bodies and fibers in the brain of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Anat* 165: 191-200.
- Vecino E, Pérez MT, Ekström P. 1995. Localization of enkephalinergic neurons in the central nervous system of the salmon (*Salmo salar* L.) by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Chem Neuroanat* 9: 81-97.

- Vercelli A, Recipi M, Garbossa D, Grimaldi A. 2000. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull* 51: 11-28.
- Vetillard A, Benanni S, Saligaut C, Jego P, Bailhache T. 2002. Localization of tyrosine hydroxylase and its messenger RNA in the brain of rainbow trout by immunocytochemistry and in situ hybridization. *J Comp Neurol* 449: 374-389
- von Batherld CS, Cunningham DE, Rubel EW. 1990. Neural tracing with Dil: decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis. *J Histochem Cytochem* 38: 725-733.
- von Frisch K. 1938. Zur Psychologie des Fisch-Schwarmes. *Naturwissenschaften* 26: 601-606.
- von Kupffer C. 1906. Die Morphogenesis des Centralnervensystems. En: *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere*, Vol 2, Part 3. Hertwig O (editor). Gustav Fischer, Jena.
- Voogd J, Nieuwenhuys R, Dongen PAM, ten Donkelaar HJ. 1998. Mammals. En: *The central nervous system of vertebrates*, Vol 3. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (editores). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 1871- 1952.
- Weiss O, Meyer DL. 1988. Odor stimuli modulate retinal excitability in fish. *Neuroscience Lett* 93: 209-213.
- Wilder BG. 1875. In the brains of *Amia*, *Lepidosteus*, *Acipenser* and *Polyodon*. *Proc Amer Ass Adv Sc.* 24:168-196.
- Wullimann MF. 1998. The central nervous system. En: *The physiology of fishes*. Evans DH (editor). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 247-284.
- Wullimann MF, Mueller T. 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior. *J Comp Neurol* 475:143-162.
- Wullimann MF, Northcutt G. 1990. Visual and electrosensory circuits of the diencephalon in mormyrids: an evolutionary perspective. *J Comp Neurol* 297: 537-552.
- Wullimann MF, Puelles L. 1999. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. *Anat Embryol* 329: 329-348.
- Wullimann MF, Rink E. 2002. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res Bull* 57: 363-370.
- Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu N, Ito H. 1998. Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. *J Comp Neurol* 392: 209-226.
- Yoshimoto M, Ito H. 1993. Cytoarchitecture, fiber connections, and ultrastructure of the nucleus pretectalis superficialis pars magnocellularis (PSm) in carp. *J Comp Neurol* 336: 343-446.
- Zeiske E, Theisen B, Breucker H. 1992. Structure, development, and evolutionary aspects of the peripheral olfactory system. En: *Fish chemoreception*. Hara TJ (editor). Chapman & Hall. Fish and Fisheries, Series 6, London, pp. 13-39.

Justificación y objetivos

El telencéfalo dorsal de peces teleósteos se origina por un proceso único durante el desarrollo temprano denominado eversión, que sólo se ha descrito dentro del grupo de los actinopterigios. Como consecuencia de este proceso, el telencéfalo de los peces teleósteos presenta una serie de características exclusivas, siendo el área encefálica menos conocida y peor caracterizada desde el punto de vista neuroanatómico y ontogenético. Además la organización de las áreas telencefálicas que resulta de este proceso de desarrollo ontogenético, junto con otras características exclusivas del encéfalo de los teleósteos, complica los estudios neuroanatómicos comparados. Los datos sobre conexiones telencefálicas son además escasos y fragmentarios, existiendo pocos estudios que realicen un análisis completo y coherente dentro de una misma especie.

Los objetivos que nos hemos planteado a la hora de realizar el presente estudio han sido los que se detallan a continuación:

1. Lograr una mejor caracterización citoarquitectónica y neuroquímica de las distintas áreas telencefálicas y del área preóptica de la trucha arco iris mediante diversas técnicas histológicas que puedan complementar los estudios posteriores.

2. Conocer mediante técnicas experimentales las vías de integración olfativa y gustativa, determinando cuáles son los centros implicados en el procesamiento de estas modalidades sensoriales y la relación entre dichos centros. Estudiar si existe interrelación entre el sistema olfativo y gustativo, así como con otros sistemas.

3. Conocer mediante técnicas experimentales la hodología de las distintas áreas telencefálicas y del área preóptica de la trucha arco iris, determinando en la medida de lo posible las modalidades sensoriales que procesan dichas áreas así como sus vías eferentes.

4. Caracterizar de forma precisa las vías de integración sensorial que implican al complejo preglomeruloso y establecer la relación entre este centro migrado del tubérculo posterior y las diversas áreas telencefálicas.

5. Comparar desde un punto de vista neuroanatómico los resultados obtenidos en la trucha arco iris con los disponibles en otras especies de peces y en otros grupos de vertebrados tetrápodos, tratando de establecer posibles homologías.

*Material y
Métodos*

Para el presente estudio se utilizaron ejemplares juveniles de trucha arco iris (3,5- 8 cm de longitud estándar) que fueron obtenidos de la Piscifactoría Berxa (Mesía, A Coruña) y se transportaron al laboratorio en tanques con agua del río, manteniéndola aproximadamente a 7°C con la ayuda de acumuladores de frío.

Una vez en el laboratorio, los animales fueron anestesiados por inmersión en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222, Sigma, St. Louis, MO) diluido al 0,1% en agua de río. Los individuos se perfundieron inyectando el fijador apropiado para cada caso transcardíacamente a través del ventrículo, practicando a la vez una pequeña incisión al nivel de la aurícula para que pudiese salir del sistema circulatorio tanto la sangre como el exceso de fijador. Una vez perfundido cada animal, fueron medidos. Los encéfalos fueron extraídos de la caja craneana y se postfijaron en el fijador adecuado según la técnica utilizada posteriormente.

MARCAJE NEURONAL CON CARBOCIANINAS

La perfusión y postfijación de los encéfalos se realizó en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 (P4%). Para la aplicación del trazador neuronal se siguieron dos estrategias: 1) si el núcleo o área a marcar es accesible desde el exterior, se realizó la aplicación del trazador “in toto”; 2) en aquellos casos en los que la zona de interés para el marcaje se localiza en zonas profundas del encéfalo, inaccesibles para marcar “in toto”, la aplicación del trazador se realizó incluyendo previamente el encéfalo en agarosa y realizando posteriormente secciones hasta alcanzar la zona deseada. Ambas técnicas se describen brevemente a continuación en los apartados correspondientes (ver Capítulos 2, 3 y 4 de “Resultados y Discusión” para una descripción más detallada).

Elección del trazador neuronal

Como ya se comentó anteriormente (ver el apartado *Los trazadores neuronales como herramienta para estudios hodológicos*), el DiI y el DiA presentan color naranja-rojo que se puede observar en un microscopio de fluorescencia utilizando una combinación de filtros para rodamina, mientras que el DiO emite dentro de las longitudes de onda del verde (Haugland, 1996). En nuestro laboratorio se venía utilizando con éxito el DiI (perclorato 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina; Molecular Probes, Eugene, OR), por lo se optó por elegir este trazador. Dado que las diferencias en los rangos de longitud de onda de emisión permitirían

combinar el DiO con el DiI para realizar dobles marcajes, se realizaron varias pruebas para optimizar el uso de DiO como segundo trazador. Para dichas pruebas se utilizó DiO dispensado en forma de pasta (NeuroTrace™ DiO tissue-labeling paste; N-22881, Molecular Probes, Inc.) o polvo (3, 3'-dioctadeciloxacarbocianina perclorato; D-285, Molecular Probes, Inc.) en combinación con DiI. Sin embargo los resultados no fueron buenos, ya que el trazador en forma de pasta sólo se transportaba hasta distancias muy próximas a la zona de aplicación y en forma de polvo no era captado por las células y se producía la disolución del trazador en el medio intercelular. También se probó diluyendo DiO en etanol, dimetilformamida y dimetilsulfóxido (Honig y Hume, 1986; Honig, 1993), pero los resultados tampoco fueron buenos. Estos datos están de acuerdo con las observaciones de otros autores, según las cuales el DiI y DiA dan mejores resultados que el DiO como trazadores en tejido fijado (Haugland, 1996; Vercelli et al., 2000) y nos han limitado en nuestro estudio a la utilización del DiI como único trazador.

Protocolo de aplicación del trazador en áreas encefálicas superficiales

El trazador se inserta en los núcleos neuronales a caracterizar mediante punciones externas con un alfiler entomológico bajo un estereomicroscopio, retirando en algunos casos aquellas estructuras que ocultan la zona donde se va realizar la aplicación del trazador. El lugar de aplicación del cristal se sella dejando solidificar una gota de agarosa líquida para evitar la posible dispersión de los cristales fuera de la zona de interés. Se realizaron habitualmente fotografías con una cámara digital (Nikon Coolpix 950) adaptada a una lupa binocular para dejar constancia del lugar exacto de aplicación del trazador. Transcurrido el periodo de incubación (a 37°C, en P4%, 2 - 4 meses), se procede a la elaboración de los bloques incluyendo el encéfalo en agarosa al 3%. Los bloques se cortaron en un vibratomo (Campden, Sibley, UK) en secciones transversales de 50 µm de grosor que fueron recogidos sobre portaobjetos gelatinizados. Las secciones montadas con tampón fosfato, se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon E-1000, tomando tanto fotografías en blanco y negro mediante una cámara analógica como en color mediante una cámara digital (Nikon Digital Camera DXM 1200). Las imágenes fueron procesadas según se indica en el apartado correspondiente (ver apartado *Procesamiento de las imágenes y edición de los esquemas*).

Protocolo de aplicación del trazador neuronal en regiones encefálicas profundas

A diferencia del método anteriormente descrito, en este caso la inclusión del encéfalo en agarosa es previa a la aplicación del cristal de DiI, por lo que se accede al núcleo donde se desea aplicar el trazador cortando secciones en un vibratomo. Cuando se alcanzan zonas próximas a donde se localiza el núcleo a marcar, cada una de las secciones que se obtienen son teñidas en azul de metileno fenicado al 50% (35-60 seg.), y son observadas en un microscopio óptico para determinar cuándo efectivamente se ha llegado al nivel deseado. El cristal de trazador se aplica con ayuda de una minucia y se continua con el procesamiento de los bloques con el tejido incluido de forma similar a lo anteriormente descrito para los bloques con los encéfalos marcados “*in toto*”.

TÉCNICAS DE TINCIÓN HISTOLÓGICA COMPLEMENTARIAS

En algunos casos existían datos disponibles en la bibliografía sobre la neuroquímica y la anatomía del encéfalo de salmónidos. Sin embargo, nos interesaba disponer tanto de ciertos datos neuroanatómicos de nuestra especie y de los tamaños correspondientes que veníamos utilizando, como de las preparaciones de las secciones para nuestra observación directa al microscopio y poder compararlas con los resultados obtenidos en los estudios histológicos. Para este fin utilizamos una tinción clásica de Nissl (Martoja y Martoja, 1970; ver Capítulo 2 de “Resultados y Discusión” para una descripción detallada del protocolo utilizado), la técnica enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa (Karnovsky y Roots, 1964; Martoja y Martoja, 1970; Pérez, 1998) y la tinción de Golgi. Además se realizaron técnicas inmunohistoquímicas dirigidas hacia la tirosín hidroxilasa (TH), calretinina (CR) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) siguiendo los protocolos obtenidos a partir de la bibliografía disponible (TH: Manso et al., 1993; Anadón et al., 2002; CR: Castro et al., 2003; CGRP: Finger y Kanwal, 1992). El objetivo que se perseguía no es tanto dar una descripción pormenorizada de la distribución de las sustancias neuroactivas en el encéfalo, sino disponer de una mejor caracterización y localización de distintos núcleos, así como lograr una descripción precisa de los tipos neuronales que constituyen dichos núcleos, con un especial interés en el telencéfalo.

Técnica enzimohistoquímica para la detección de acetilcolinesterasas

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima implicada en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. En el presente estudio hemos seguido el método Karnovsky y Roots (1964) para visualizar la actividad del enzima acetilcolinesterasa. Este método revela la presencia de la actividad enzimática de la AChE introduciendo el tejido que contiene la enzima en un medio que contiene un sustrato específico, la acetiltiocolina iodada. Esta última es hidrolizada por la AChE y tras una serie de reacciones con diversos

sustratos presentes en el medio de incubación, finalmente se produce un precipitado de color marrón que aparece donde tiene lugar la reacción.

Técnicas inmunohistoquímicas para la detección de la tirosín hidroxilasa y la calretinina

Las técnicas inmunohistoquímicas se basan en la detección por parte de anticuerpos del antígeno para el cual es específico. Esta reacción se puede hacer visible acoplado una molécula fluorescente a los anticuerpos o bien acoplado una enzima que reaccionara sobre un sustrato específico dando un precipitado de color. Actualmente las más utilizadas son las técnicas de inmunofluorescencia indirecta donde se emplea un anticuerpo primario no marcado y uno secundario que se acopla al marcador. En este estudio hemos utilizado el método de detección indirecto donde el anticuerpo secundario se acopla al complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) que en combinación con un sustrato cromógeno, la 3,3' diaminobenzidina (tetrahidrocloruro) (DAB) da lugar a un precipitado marrón oscuro visible al microscopio óptico. Para el presente estudio hemos realizado el estudio de la distribución en el telencéfalo de la tirosín hidroxilasa (TH), calretinina (CR) y de la distribución en regiones rombencefálicas del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) utilizado anticuerpos primarios policlonales (anti-CR, 1:1000, Swant; anti-TH, 1:500, Chemicon; anti-CGRP, 1:1000, Sigma) y siguiendo los protocolos obtenidos a partir de la bibliografía disponible (TH: Manso et al., 1993; Anadón et al., 2002; CR: Castro et al., 2003; CGRP: Finger y Kanwal, 1992).

Tinción de Golgi

Realizamos varias pruebas siguiendo la variante sin osmio del protocolo “*Tinción Golgi rápida*” de González Burgos y colaboradores (1992), pero sin conseguir que resultaran neuronas impregnadas. Posteriormente, seguimos los protocolos *Golgi Meyer* (1982) y *Golgi Colonnier* (1964) (Alonso, 1994) cuya aplicación daba buenos resultados en encéfalos de carpín dorado (Dr. Salas, comunicación personal), si bien hemos introducido algunas variaciones metodológicas a la hora de seccionar el tejido.

Golgi Meyer

La perfusión del individuo se realiza con tampón fostato salino 0,1 M a pH 7,4 (TFS) hasta eliminar la sangre y a continuación con glutaraldehído al 4%. El encéfalo se mantendrá en oscuridad y a temperatura constante de 22 °C en una solución fijadora formada por glutaraldehído al 25% (5ml), dicromato potásico al 3% (45 ml) e hidrato de cloral (0,5 g). Transcurridos entre 3 y 6 días, se introduce el encéfalo en una solución de nitrato de plata al 0,75% donde se mantiene 3 días en oscuridad y a temperatura constante de 22 °C. Posteriormente, el tejido se incluye en agarosa al 6% en agua destilada y es cortado en secciones de aproximadamente 100 µm en un vibratomo.

Golgi Colonnier

En este caso la solución fijadora es glutaraldehído al 2% en tampón fostato salino a pH 7.2 y la solución

postfijadora es glutaraldehído al 25% (5ml) y dicromato potásico al 3% (45 ml). Los pasos restantes y las condiciones óptimas son como se ha descrito para el protocolo Golgi Meyer.

PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES Y EDICIÓN DE LOS ESQUEMAS

Las imágenes de las secciones con fluorescencia se tomaron tanto en blanco y negro utilizando un sistema de fotografía analógico como en color utilizando una cámara digital Nikon (DXM 1200). La película en blanco y negro (TMAX 400, Kodak, Las Rozas, Madrid), fue revelada en nuestro laboratorio y a continuación aquellas fotografías seleccionadas se digitalizaron utilizando un escáner (Epson Film Scan 200, Tokio, Japón). Las imágenes escaneadas desde el negativo no fueron invertidas a positivo, ya que la calidad visual de las imágenes parecía ser mayor de esta manera. El ajuste del brillo y contraste de las imágenes se realizó utilizando el programa Adobe Photoshop (Adobe, San José, CA) y el montaje de las láminas de fotografías se realizó con el Corel Draw.10 (Ottawa, Canadá).

Los dibujos esquemáticos que representan el perfil de las secciones del encéfalo de trucha y algunos de los núcleos presentes en ese nivel, se realizaron mediante un microscopio óptico Nikon con cámara clara acoplada. Tras digitalizar los perfiles, se utilizó el Corel OCR-Trace para realizar su vectorización y posteriormente se procesaron mediante el programa CorelDraw.

Se realizaron fotografías de campo claro, utilizando una cámara digital Nikon, de algunas de las secciones que habían sido procesadas con las distintas técnicas de tinción histológica. En el caso de la Técnica Golgi, algunas de las fotografías que se presentan en el presente trabajo son el resultado de la fusión en una única fotografía de varios planos distintos tomados en el eje Z, para lo cual se utilizó el programa informático analySIS.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso JR. 1994. Los métodos de Golgi. Acta Salamanticensia. Biblioteca de las Ciencias, Ediciones Universidad Salamanca, pp. 96-98.
- Anadón R, Rodríguez-Moldes I, González A. 2002. Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the forebrain of the trout: organization, cellular features and innervation. Brain Res Bull 57: 389-392.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2003. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. J Comp Neurol 467: 254-269.
- Finger TE, Kanwal JS. 1992. Ascending general visceral pathways within the brainstems of two teleost fishes: *Ictalurus punctuatus* and *Carassius auratus*. J Comp Neurol 320: 509-520.
- González-Burgos I, Tapia-Arizmendi G, Feria-Velasco A. 1992. Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. Biotech Histochem 67: 288-296.
- Haugland RP. 1996. Handbook of fluorescent probes and researchchemicals. Eugene, OR: Molecular Probes Inc.
- Honig MG. 1993. DiI labeling. Neuroscience Protocols 93-050-16-01.
- Honig MG, Hume RI. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. J Cell Biol 103: 171-187.
- Karnovsky MJ, Roots L. 1964. A direct colouring thiocholine method for cholinesterases. J Histochem Cytochem 12: 219-221.
- Manso MJ, Becerra M, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. J Hirnforsch 34: 239-260.
- Martoja R, Martoja M. 1970. Técnicas de histología animal. Toray-Masson, Barcelona, pp. 134-135.
- Pérez SE. 1998. Estudio de la distribución en el sistema nervioso central de marcadores de sistemas colinérgicos durante el desarrollo y etapa adulta de la trucha mediante técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Vercelli A, Recipi M, Garbossa D, Grimaldi A. 2000. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. Brain Res Bull 51: 11-28.

Resultados y Discusión

Capítulo 1

Estudio de la citoarquitectura de las áreas telencefálicas y área preóptica de juveniles de la trucha arco iris

ESTUDIO DE LA CITOARQUITECTURA DE LAS ÁREAS TELENCEFÁLICAS Y ÁREA PREÓPTICA DE JUVENILES DE LA TRUCHA ARCO IRIS

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de tinción histológica que hemos realizado sobre encéfalos de individuos de trucha arco iris nos han permitido una mejor caracterización citoarquitectónica de las distintas áreas telencefálicas de juveniles de trucha arco iris, permitiendo comparar los resultados obtenidos con los descritos en individuos adultos de esta misma especie y de la trucha común (*Salmo trutta*) (Danner y Turowski, 1977; Turowski y Danner, 1977; Manso et al., 1999; Pérez et al., 2000; Anadón et al., 2002; Castro et al., 2003), una especie filogenéticamente muy próxima. Las técnicas que hemos utilizado para dicho estudio han sido la tinción de Nissl, la técnica enzimoquímica de la acetilcolinesterasa, las técnicas inmunohistoquímicas dirigidas contra la tirosín hidroxilasa y la calretinina y la técnica de Golgi.

La tinción de Nissl se trata de una tinción general con la que los núcleos de las células se tiñen de azul-violeta, observándose en su interior el nucleolo o nucleolos más claros. Los grumos de Nissl de las neuronas se tiñen de azul-violeta, observándose como pequeños depósitos dispersos por el citoplasma. En las neuronas de mayor tamaño es posible observar en el soma las porciones proximales de las dendritas de mayor calibre.

Hemos estudiado la distribución de la enzima acetilcolinesterasa utilizando la técnica de Karnovsky y Roots (1964), un método de coloración directa donde el resultado de la reacción enzimoquímica de la acetilcolinesterasa se observa como un precipitado de color marrón o rojo, de aspecto granular en el soma y en las porciones proximales de las células. Como han demostrado trabajos previos que han estudiado la distribución de las acetilcolinesterasas en el encéfalo de la trucha adulta (*O. mykiss*: Danner y Turowski, 1977; *Salmo trutta*: Pérez, 1998), esta reacción tiene la propiedad de expresarse de forma diferencial según áreas y núcleos encefálicos, permitiendo la caracterización y delimitación de los mismos. La tonalidad de la tinción varía de unas células a otras, por lo que se ha clasificado cualitativamente en débil, moderada y fuerte.

Las técnicas inmunohistoquímicas dirigidas contra la calretinina (CR) y la tirosín hidroxilasa (TH) detectan la presencia del antígeno correspondiente gracias a la interacción bioquímica antígeno-anticuerpo. Para visualizar los lugares de reacción, hemos utilizado anticuerpos unidos al complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) que en presencia del sustrato cromógeno 3, 3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) resulta en un precipitado marrón oscuro.

La calretinina es una proteína ligante de calcio de aproximadamente 29 kDa que fue identificada por primera vez a partir de retina de pollo (Rogers, 1987). Esta proteína forma parte de la misma familia que otras proteínas ligantes de calcio, como son la parvalbumina y la calbindina 28kDa, con las que comparte entre un 50 y un 60% de su secuencia de aminoácidos. Parece que la función de este tipo de proteínas es contribuir a la homeostasis del calcio actuando como tampón de la concentración de calcio libre intracelular (Miller, 1991; Baimbridge et al., 1992; Lledo et al., 1992; Chard et al., 1993). Los estudios de la distribución de los sistemas inmunoreactivos a la calretinina tanto en peces teleosteos (Porteros et al., 1997, 1998; Díaz-Regueira y Anadón, 2000; Castro et al., 2003) como en otros anamniotas (Pombal y Puelles, 1999; Milán y Puelles, 2000; Brox et al., 2002; Pombal et al., 2002), indican que la calretinina es muy útil para definir una gran variedad de poblaciones neuronales y para la caracterización de núcleos en el prosencéfalo. En nuestro trabajo, la distribución de la inmunoreactividad frente a la calretinina ha sido estudiada en juveniles de trucha arco iris, con la finalidad de obtener una mejor caracterización de las áreas telencefálicas y región preóptica en estadio juvenil y observar si existen diferencias con los resultados descritos en individuos adultos de la trucha común (*Salmo trutta*, Castro et al., 2003).

Las catecolaminas son un grupo de compuestos orgánicos formados por un núcleo catecol (un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo adyacentes) y una cadena amino. Normalmente este término se utiliza para referirse a tres neurotransmisores, dopamina, noradrenalina (norepinefrina) y adrenalina (epinefrina), que juegan un papel funcional clave en el sistema nervioso central y cuyo estudio ha suscitado mucho interés en gran medida debido al papel que juega en procesos patológicos como el Parkinson, estados de ansiedad y depresión o la esquizofrenia. La tirosín hidroxilasa (TH) es la primera enzima en la ruta de síntesis de catecolaminas, que tiene lugar a partir del aminoácido L-tirosina, transformándolo en L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina). La TH es la enzima limitante de la reacción y está presente en todas las neuronas catecolaminérgicas.

En 1873 Camilo Golgi describe una reacción negra (reazione nera) que permite el estudio de la morfología neuronal gracias a un proceso de impregnación metálica. Esta reacción se basa en el endurecimiento del tejido nervioso en bicromato de potasio y ácido ósmico, y la

posterior impregnación con nitrato de plata. Fue una técnica revolucionaria y extremadamente útil, ya que permite observar con gran detalle la morfología de las neuronas y de sus prolongaciones axónica y dendrítica, pudiéndose observar incluso la existencia de espinas dendríticas si el resultado de la impregnación es lo suficientemente bueno. Sin embargo el problema de la reacción negra, o también llamada la tinción de Golgi, es que se trata de una técnica caprichosa y extremadamente impredecible que impregna un número limitado de neuronas al azar, por razones hasta hoy desconocidas (Alonso, 1994). Esto a llevado a que en muchos casos la tinción de Golgi es relegada a un segundo plano y muchas veces sustituida por la utilización de técnicas de marcaje intracelular para el estudio de la morfología neuronal.

Los resultados obtenidos se describen de forma detallada a continuación dentro del presente capítulo y serán en su mayoría discutidos dentro de la Discusión general en el capítulo 7. A efectos descriptivos las células se clasificaron en tamaño pequeño (2,5-4 μm), medio (4-6 μm) y grande (6-10 μm).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los protocolos seguidos para realizar las técnicas histológicas complementarias que se han utilizado en el presente trabajo (la tinción general Nissl, la técnica enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa y las técnicas inmunohistoquímicas dirigidas contra la calretinina y la tirosín hidroxilasa) aparecen brevemente comentados en el apartado de "Material y Métodos general" del este trabajo, por lo que no serán nuevamente comentadas en el presente capítulo.

RESULTADOS

Lóbulos telencefálicos

Bulbo olfatorio:

En niveles rostrales del bulbo olfatorio, aparece en posición ventromedial un escaso número de cuerpos neuronales que presentan actividad acetilcolinesterasa y que pertenecen a células del ganglio del nervio terminal (Fig.1A).

En la capa de glomérulos se observa poca actividad acetilcolinesterásica, apareciendo algunos glomérulos que sí presentan cierta actividad tanto a nivel dorsomedial, como dorsal y ventral (Fig.1B). Los glomérulos olfativos presentan también muy intensa inmunoreactividad a la

Abreviaturas

CA	comisura anterior
CI	capa celular interna o granular
CE	capa celular externa o de células mitrales
Dc	área central del telencéfalo dorsal
Dd+Dl-d	área dorsal más la parte dorsal del área lateral del telencéfalo dorsal
Dl-p	parte posterior del área lateral del telencéfalo dorsal
Dl-v	parte ventral del área lateral del telencéfalo dorsal
Dm	área medial del telencéfalo dorsal
Dp-d	parte dorsal del área posterior del telencéfalo dorsal
Dp-v	parte ventral del área posterior del telencéfalo dorsal
Ent	núcleo entopeduncular
Pp	núcleo preóptico parvicelular
Vd	área dorsal del telencéfalo ventral
Vl	área lateral del telencéfalo ventral
Vs	área supracomisural del telencéfalo ventral
Vp	área posterior del telencéfalo ventral
Vv	área ventral del telencéfalo ventral

calretinina (Fig.1C).

En la capa celular externa o capa de células mitrales (CE), con la técnica del Nissl se observan células piriformes y fusiformes de gran tamaño que se organizan en grupos (Fig.1D). En algunas de ellas se aprecia una gruesa prolongación de donde surgen las dendritas proximales. La tinción Nissl y las técnicas histoquímicas utilizadas no permiten diferenciar el tipo células de que se trata, células mitrales o células borladas, aunque probablemente la mayoría de las células observadas son células mitrales ya que cabe esperar una mayor abundancia de éstas en el bulbo olfatorio. Sin embargo tras realizar la técnica de Golgi, sí observamos la morfología de las células mitrales (Figs.1E,F) que aparecen como células bipolares con su arborización dendrítica surgiendo del polo de la célula que se orienta hacia la capa glomerular y su prolongación axónica localizada en el polo opuesto. Algunas de las células de esta capa aparecen teñidas tras realizar la tinción enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa (Fig.1B) y muestran inmunoreactividad a la TH, demostrando además muchas de ellas fuerte inmunoreactividad para la calretinina (Fig. 1C). En la capa celular interna o capa granular (CI) se localizan las células grano (Figs.1A-B,D,G-I), células pequeñas, bipolares, redondas o piriformes y densamente agrupadas. La tinción Golgi permite observar los procesos dendríticos que surgen desde ambos polos de estas células (Fig.1G). Presentan actividad acetilcolinesterásica, diferenciándose unos somas más intensamente teñidos que otros (Fig.1B). El neuropilo que rodea a las células grano presenta una

Fig.1. Fotografías de secciones transversales a distintos niveles telencefálicos ventrales de encéfalos de trucha procesados con una tinción general de Nissl (D), con la técnica enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa (A, B), con las técnicas inmunohistoquímicas dirigidas hacia la calretinina (C) y la tirosín hidroxilasa (TH) (H, I) y con la técnica del Golgi (E-G, J-L). **A)** Sección transversal al nivel del bulbo olfatorio mostrando células con actividad acetilcolinesterasa positiva en el ganglio del nervio terminal (cabeza de flecha). Se observan células en la capa celular externa (flecha) que también muestran actividad positiva. **B)** Glomérulos olfatorios (cabeza de flecha) y células en la capa celular externa (flechas) mostrando actividad acetilcolinesterasa positiva. **C)** Sección transversal a nivel del bulbo olfatorio mostrando glomérulos (cabeza de flecha) y células en la capa celular externa (flecha) inmunoreactivos frente a la calretinina. **D)** Sección transversal a través del bulbo olfatorio mostrando la densa agrupación de células en la capa celular interna y la organización celular en la capa celular externa (flecha). **E, F)** Células mitrales del bulbo olfatorio, donde se observa la arborización dendrítica (flecha) dirigidas hacia la capa glomerular. En **F** puede apreciar además la salida del axón (cabeza de flecha). **G)** Células grano en la capa celular interna del bulbo olfatorio, observándose los procesos dendríticos apical y basal (flechas) de estas células. **H, I)** Neuronas inmunoreactivas a la TH localizadas en la capa celular interna caudal del bulbo olfatorio. En **I** se observa un detalle de los somas (cabeza de flecha) y de sus procesos celulares (flecha). **J)** Célula monopolar del área ventral del telencéfalo ventral (Vv) con su axón (flecha) dirigido hacia regiones paliales. **K)** Célula bipolar (cabeza de flecha) localizada en regiones laterales del subpalo, observándose su arborización dendrítica dirigida hacia regiones mediales y laterales (flecha). **L)** Células en el área dorsal del telencéfalo ventral (Vd). Nótese que la mayoría de estas células dirigen sus procesos hacia regiones paliales. Barras de escala: 75 μm en A, 100 μm en B, D, H, L; 150 μm en C; 50 μm en E-G, I, J, K. Ver lista de abreviaturas.

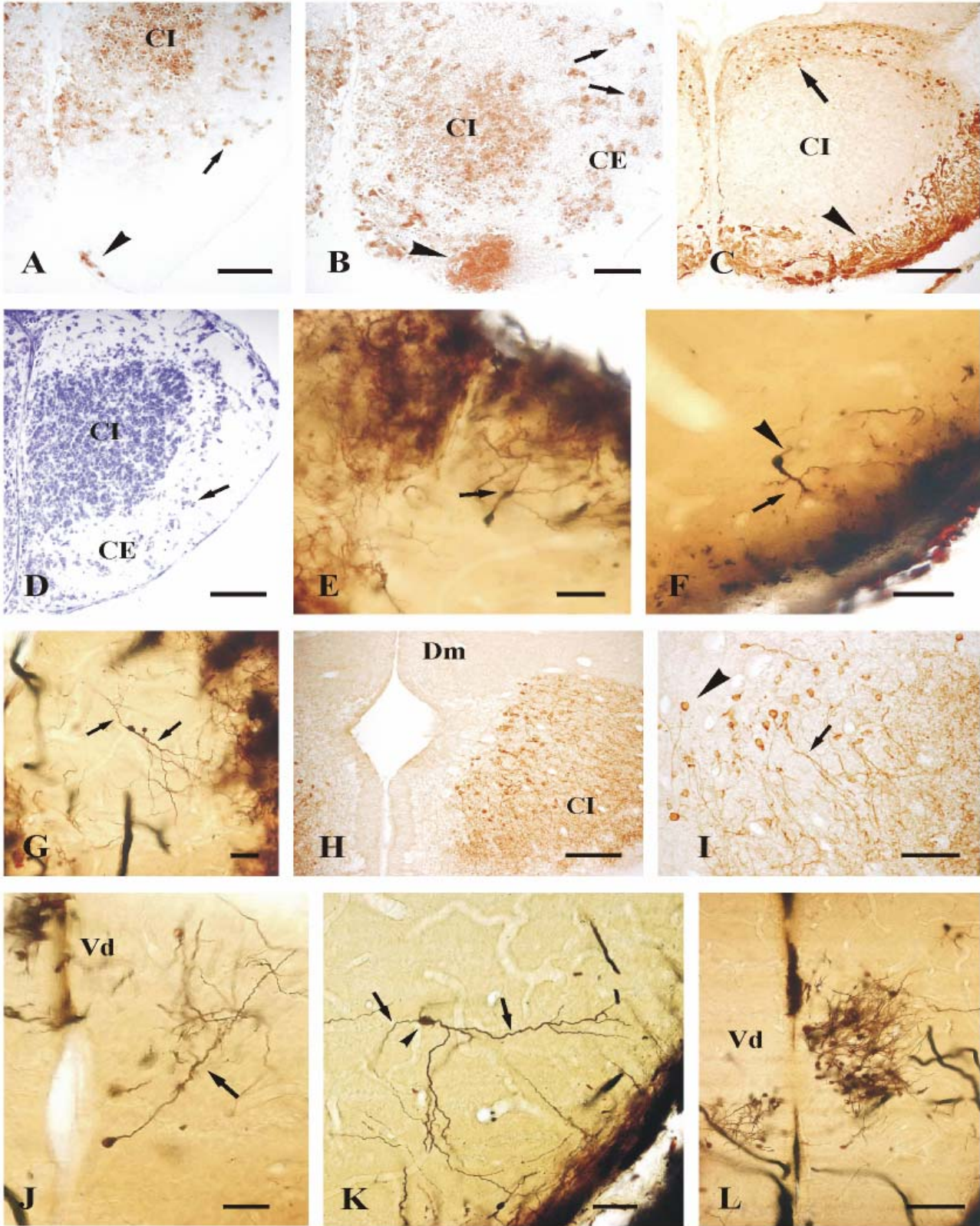


Figura 1

elevada reacción histoquímica a la acetilcolinesterasa (Fig.1B). Un gran número de somas de células grano son inmunoreactivos a la TH y se encuentran inmersos en un denso plexo originado de procesos celulares también inmunoreactivos (Figs.1H-I).

Telencéfalo ventral o subpalio:

La mayoría de las células localizadas en la región subpalial son células monopolares o bipolares que emiten sus prolongaciones perpendicularmente a la superficie del encéfalo o dirigidas hacia el palio (Figs.1J-L; 2A-C). En algunos casos, se produce una ramificación de la dendrita o la emisión de colaterales por parte del axón, de forma que una rama asciende a regiones paliales y otra se dirige hacia el tracto telencefálico lateral.

El área dorsal del telencéfalo ventral (Vd) es un área con forma triangular localizada próxima al ventrículo que presenta células densamente agrupadas, lo que hace se pueda identificar con cierta facilidad (Figs.2D-F, H-J). Sus células son pequeñas y presentan cierta actividad acetilcolinesterasa (Figs.2E-F), estando ligeramente más teñidos los somas de la región dorsal que los de la porción ventral. La técnica inmunohistoquímica de la tirosín hidroxilasa mostró abundantes somas inmunoreactivos junto con sus procesos celulares (Fig.2G). Algunos de estos somas están localizados en Vd, aunque la mayoría aparecen en zonas laterales adyacentes a Vd. Estas células presentan sus procesos celulares dirigidos hacia regiones laterales (Fig.2G). La porción más rostral de Vd presenta células inmunoreactivas para la calretinina, y se observan algunas fibras inmunoreactivas para la calretinina en toda su extensión rostrocaudal.

El área ventral del telencéfalo ventral (Vv) está situada inmediatamente debajo de Vd (Fig.2D). Presenta células más dispersas y de un tamaño ligeramente mayor que Vd. Se observan células que muestran distinta intensidad en su actividad acetilcolinesterasa desde moderada a fuerte (Figs.2E-F). A niveles rostrales del encéfalo sólo se observa inmunoreactividad frente a la calretinina en la porción dorsal de Vv y que en adelante denominaremos Vv-d (Fig.2H), mientras que hacia regiones caudales se observan células y fibras inmunoreactivas a la calretinina en todo Vv, aunque están más densamente agrupadas y hay un mayor número de células en Vv-d.

El área lateral del telencéfalo ventral (Vl) es una región próxima a la superficie lateral del encéfalo que

presenta células poco abundantes (Fig.2D), apareciendo teñida alguna de sus células tras realizar la tinción histoquímica de la acetilcolinesterasa (AChE) (Fig.2E). Presenta algunas fibras inmunoreactivas a la TH.

Tras realizar la técnica inmunohistoquímica dirigida contra la calretinina, se observaron células inmunoreactivas localizadas entre Vv y Vl, en una región central que podría corresponderse con lo que Braford y Northcutt (1980) denominan núcleo comisural (Vc).

El área supracomisural del telencéfalo ventral (Vs) se sitúa dorsalmente a la comisura anterior (Figs.2I-K). Desde el punto de vista morfológico no existen prácticamente diferencias entre las células del área supracomisural y las de Vv. En Vs se observan células que presentan elevada reactividad colinesterásica (Fig.2J), además de presentar inmunoreactividad frente a la calretinina (Fig.2K).

El área posterior del telencéfalo ventral (Vp) aparece en niveles caudales a la comisura anterior (Figs.2L,3A), dorsalmente a la región preóptica, presentando células pequeñas poco abundantes y dispersas. Algunas de estas células muestran cierta actividad acetilcolinesterasa (Fig.3A).

El núcleo entopeduncular aparece en niveles muy caudales y lateralmente en los lóbulos telencefálicos; es un núcleo redondeado formado por células pequeñas y densamente agrupadas (Fig.2L, 3A) que presentan una elevada actividad acetilcolinesterasa (Fig.3A). Dorsalmente al núcleo entopeduncular se observan las fibras del tracto telencefálico lateral que muestran una fuerte inmunoreactividad a la calretinina (Fig.3G).

Telencéfalo dorsal o palio:

Las tinciones Golgi demostraron que en zonas paliales abundan las células multipolares (Figs. 3B-C, I; 4A-D, F, I-J), con sus dendritas dirigidas radialmente (Figs. 4B-C), o bien con una dirección preferente hacia regiones lateroventrales o laterodorsales (Fig. 3B-C, I; 4A, F, J).

El área medial del telencéfalo dorsal (Dm) se localiza inmediatamente dorsal a Vd (Fig.2D). Tras aplicar la técnica de Golgi se observan células multipolares en esta área (Figs.3B-C). Parece que se podrían distinguir incluso cuatro regiones, sobre todo gracias a los datos de inmunoreactividad frente a la calretinina. La zona más rostral de Dm (Dm1) se caracteriza porque no presenta inmunoreactividad a la calretinina (Fig.3D) a diferencia del resto de subdivisiones de Dm, localizadas más caudalmente, que sí presentan elementos inmunoreactivos

Fig. 2. Fotografías de secciones transversales a distintos niveles telencefálicos ventrales y de la región preóptica de trucha procesados con la técnica Golgi (A-C), tinción de Nissl (D, I, L), con la técnica enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa (E, F, J) y con las técnicas inmunohistoquímicas dirigidas hacia la tirosín hidroxilasa (G) y la calretinina (H, K). **A)** Células en el área dorsal del telencéfalo ventral (Vd). La mayoría de estas células dirigen sus procesos hacia regiones paliales (flecha). **B)** Célula monopolar (flecha) localizada en el margen lateral de Vd, en uno de los pocos casos en los que se observaron células aisladas en este área telencefálica. **C)** Células monopolares (flecha) localizadas en el área supracomisural del telencéfalo ventral (Vs). **D)** Sección transversal donde se observa la organización celular en regiones telencefálicas precomisurales dorsales y ventrales tras realizar la tinción de Nissl. **E)** Sección transversal donde se observa la distinta actividad acetilcolinesterásica según áreas y la organización celular en regiones telencefálicas rostrales tras realizar la técnica enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa. **F)** Detalle donde se observa la actividad acetilcolinesterasa de las áreas dorsal (Vd) (cabeza de flecha) y ventral (Vv) del telencéfalo ventral. **G)** Somas (cabeza de flecha) y procesos celulares (flecha) inmunoreactivos a la TH en Vd. **H)** Células inmunoreactivas a la calretinina en la parte dorsal de Vv (cabeza de flecha). **I)** Organización celular a nivel de la comisura anterior. **J)** Sección transversal donde se observa la organización celular en regiones telencefálicas comisurales tras realizar la técnica enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa. **K)** Sección transversal a nivel comisural mostrando células inmunoreactivas a la calretinina en el área supracomisural del telencéfalo ventral (Vs) (cabeza de flecha). **L)** Organización celular en regiones telencefálicas postcomisurales y en la región preóptica tras realizar la tinción Nissl. Barras de escala: 100 µm en A-B, E, H, J, K; 50 µm en C, F; 150 µm en D, I, L; 75 µm en G. Ver lista de abreviaturas.

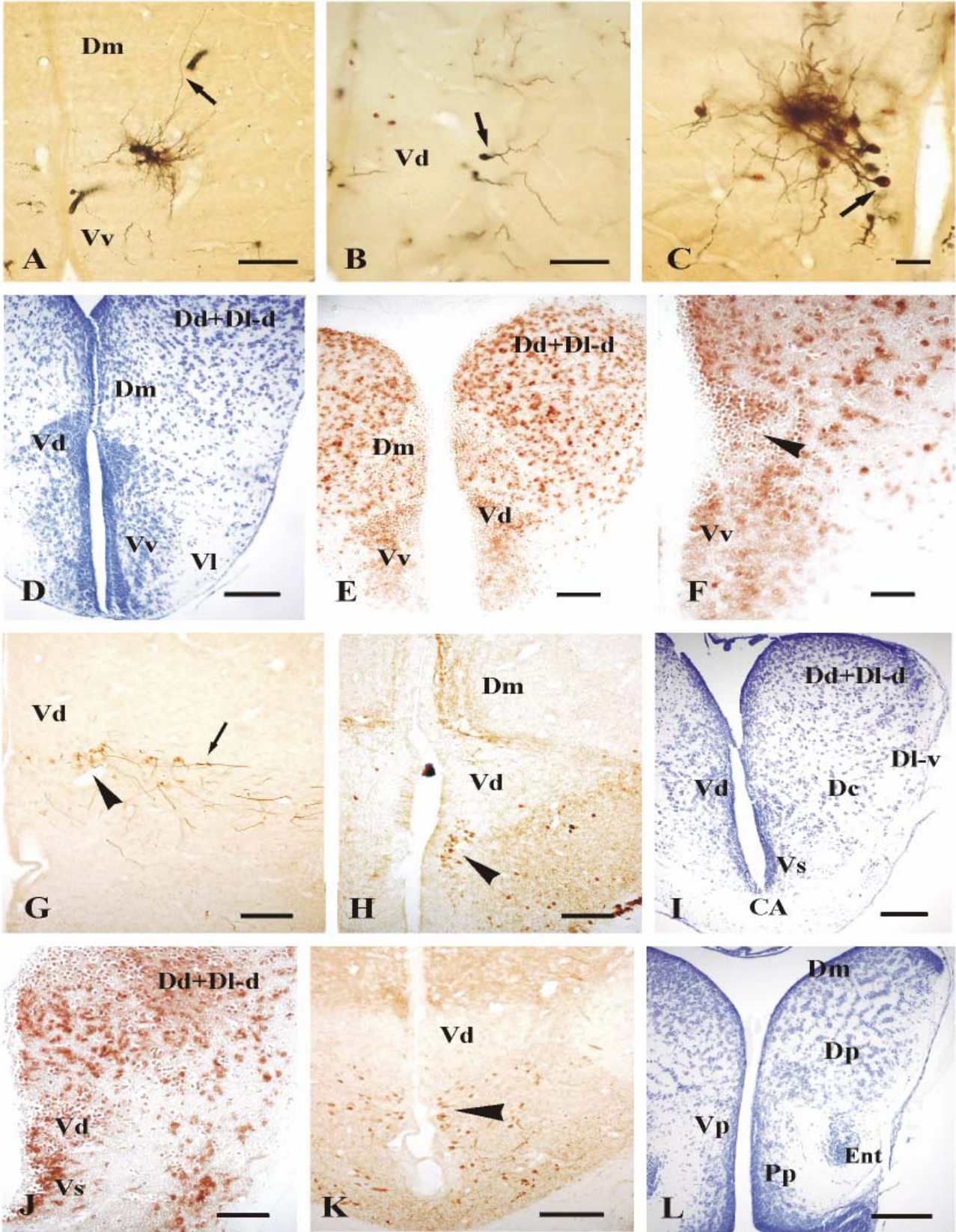


Figura 2

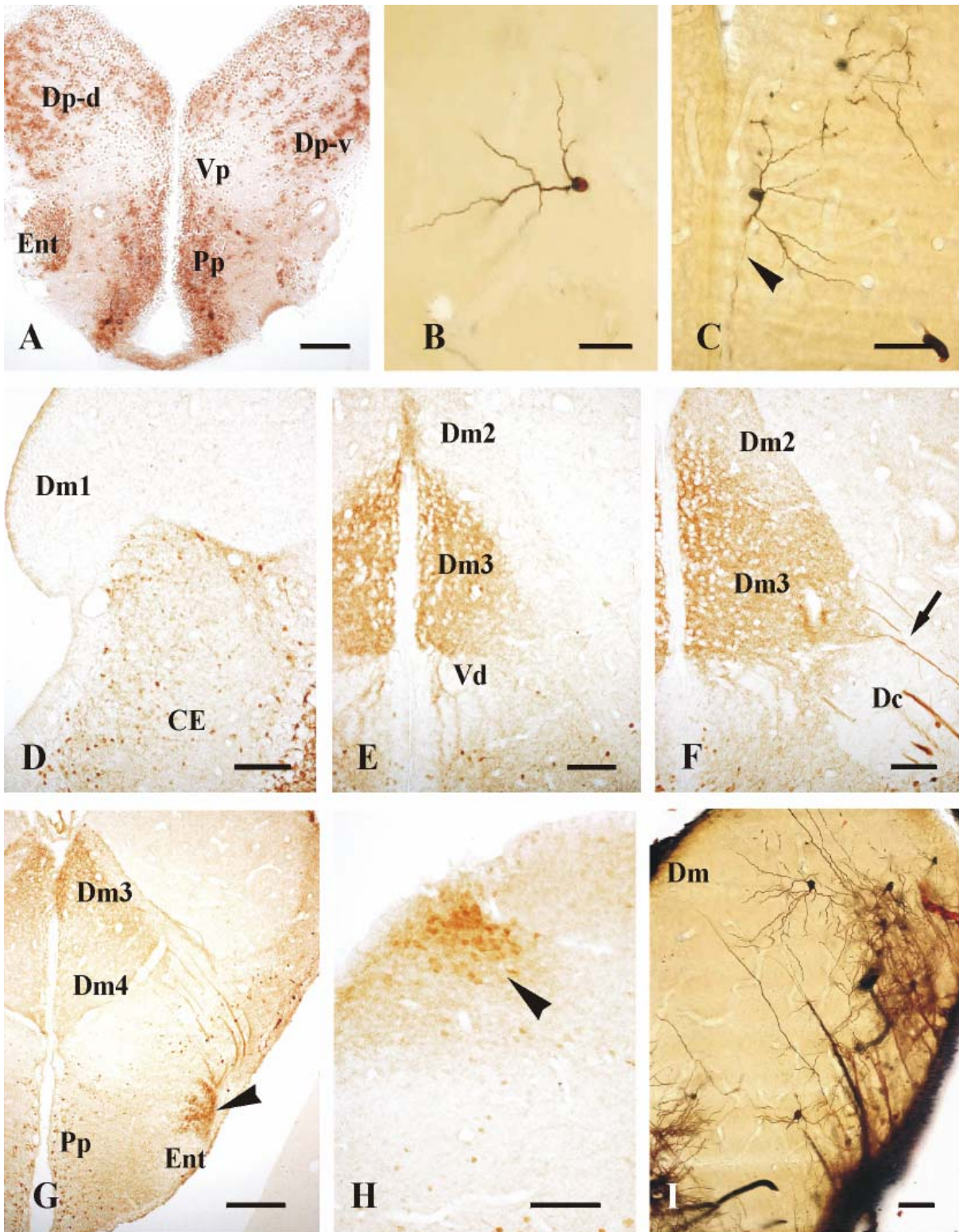


Fig. 3. Fotografías de secciones transversales a distintos niveles telencefálicos dorsales de encéfalos de trucha que fueron procesados con la técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa (A), con la técnica Golgi (B-C, I), y con las técnicas inmunohistoquímicas dirigidas hacia la calretinina (D-H). **A)** Sección transversal al nivel del área posterior del telencefalo dorsal (Dp) y región preóptica mostrando la distinta actividad enzimohistoquímica de la acetilcolinesterasa en las áreas telencefálicas. **B, C)** Neuronas localizadas en el área medial del telencefalo dorsal (Dm). En **C)** una proyección de la célula desciende hacia regiones subpaliales. **D)** Sección transversal a nivel del telencefalo rostral mostrando la ausencia de elementos inmunoreactivos a la calretinina en Dm1. **E, F)** Fibras inmunoreactivas a la calretinina en Dm2 y Dm3, siendo más fuerte la inmunoreactividad en Dm3. Obsérvese en **F)** que fibras inmunoreactivas a la calretinina del tracto telencefálico lateral atraviesan Dc (flecha) para alcanzar Dm. **G)** Vista general de Dm donde se observan las diferencias de inmunoreactividad a la calretinina entre Dm3, que muestra una mayor inmunoreactividad, y Dm4. El tracto telencefálico lateral se sitúa dorsalmente al núcleo entopeduncular (cabeza de flecha) y alcanza Dm. **H)** Células inmunoreactivas a la calretinina localizadas en Dm3 caudal. **I)** Célula multipolar del área Dd+Dl-d. Barras de escala: 100 μ m en A, D-F, H; 30 μ m en B-C; 200 μ m en G; 50 μ m en I. Ver lista de abreviaturas.

a la calretinina. Algo caudal a Dm1 aparecen dos nuevas subdivisiones del área medial, Dm2 y Dm3 (Figs. 3E, F). La primera está formada por células dispersas, pequeñas y redondas que presentan actividad acetilcolinesterasa moderada (Fig.2D-E) y en ella se observaron fibras inmunoreactivas a la calretinina (Fig.3E-F). Dm3 se localiza ventralmente a Dm2 e inmediatamente dorsal a Vd, con células también pequeñas y redondas, pero con un contorno más irregular que las células de Dm2. Esta región se diferencia además de Dm2 por estar sus células alineadas y formando bandas paralelas o ligeramente oblicuas al ventrículo (Fig.2D). Además el plexo de fibras inmunoreactivo a la calretinina en Dm3 presenta una intensidad de tinción mayor que el anteriormente descrito para Dm2 (Figs.3E,F). Dichas fibras calretinina positivas alcanzan Dm desde el tracto telencefálico lateral (Figs.3F, G). Hacia regiones caudales y ventralmente a Dm3 parece existir otra nueva subdivisión de Dm (Dm4) (Figs.2L, 3G), que presenta células pequeñas y dispersas. Esta subdivisión, Dm4, también muestra fibras inmunoreactivas a la calretinina, pero con una menor intensidad que Dm3 (Fig.3G). Hacia regiones muy caudales de Dm3 se observaron ocasionalmente células calretinina positivas débilmente teñidas (Fig. 3H).

El área lateral del telencéfalo dorsal se puede diferenciar en una parte dorsal (Dl-d) y una parte ventral (Dl-v). De estas subdivisiones de Dl, la parte dorsal no presenta ninguna diferencia citoarquitectónica con el área dorsal del telencéfalo dorsal (Dd) por lo que ambas regiones serán tratadas en conjunto.

El área dorsal junto la parte dorsal del área lateral del telencéfalo dorsal (Dd+Dl-d) es un área muy extensa del telencéfalo (Figs.2D,I,L) que va disminuyendo de tamaño caudalmente a la comisura anterior, hasta desaparecer totalmente en áreas muy caudales donde Dm pasa a ocupar la zona dorsal del telencéfalo (Fig.2L). Las células de Dd+Dl-d son algo mayores y aparecen más dispersas que las de Dm. Es llamativa la conspicua radiación dendrítica de estas células (Figs. 3I, 4A-C), que en regiones algo profundas de este área parece dirigirse radialmente pudiendo alcanzar varias áreas telencefálicas (Figs.4B-C). La parte ventral del área lateral del telencéfalo dorsal (Dl-v) apenas se diferencia por su citoarquitectura de Dd+Dl-d (Figs.2D, I, L). Lo que podría diferenciar ambas áreas es el hecho de que en la región lateral del palio, en lo que sería Dl-v, las células son más escasas y hay una banda estrecha paralela al ventrículo en la que prácticamente no hay células. Además, con la tinción Golgi se demuestran neuronas multipolares que, si bien presentan una importante arborización dendrítica (Fig.4D), esta no es tan abundante como la que se observa en Dd+Dl-d y en otras regiones telencefálicas. Se observaron somas moderadamente teñidos con la técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa localizados en Dd+Dl-d y en Dl-v (Fig. 2E), entre los cuales aparecen otros de mayor tamaño y muy intensamente teñidos en Dd+Dl-d (Figs. 2E-F), así como alguna fibra inmunoreactiva a la calretinina. En niveles muy rostrales de Dd+Dl-d,

inmediatamente dorsales a Dm, observamos algunas células con una débil inmunoreactividad para la calretinina.

Las células localizadas en Dl-v así como las fibras del tracto telencefálico lateral que discurren por este área presentan fuerte inmunoreactividad a la calretinina (Fig. 3G). En regiones muy caudales se observan células con una ligera inmunoreactividad para la calretinina en lo que podría ser una zona posterior de Dl (Fig.4H), siguiendo la nomenclatura de Braford y Northcutt (1980).

El área central del telencéfalo dorsal (Dc) aparece en la zona central del telencéfalo (Fig. 2I, 4G), siendo un núcleo muy evidente al nivel de la comisura anterior, ya que es en este nivel cuando el núcleo alcanza su mayor tamaño. Está formado por células grandes y dispersas (Fig. 4G) de forma piriforme. Estas células presentan una fuerte actividad acetilcolinesterasa (Fig.2E, F) y alguna de ellas presenta inmunoreactividad frente a la calretinina (Fig.3F). Fibras del tracto telencefálico lateral, inmunoreactivas a la calretinina, cruzan a través de Dc para alcanzar Dm (Fig.3F).

El área posterior del telencéfalo dorsal (Dp) es un área situada caudalmente, con células de tamaño medio agrupadas y formando bandas irregulares oblicuas (Fig.2L,3A), observándose muy bien las prolongaciones de estas células. Sus células aparecen teñidas tras realizar la tinción histoquímica de la AChE (Fig.3A). Este área se puede subdividir en una porción dorsal (Dp-d) y otra ventral (Dp-v) basándonos en la actividad acetilcolinesterasa y en la inmunoreactividad frente a la calretinina. Hay un gran número de somas situados en Dp-v que presentan una fuerte inmunoreactividad frente a la calretinina (Fig.3G, 4E, H), a diferencia de los localizados en Dp-d donde se observan escasos somas con cierta inmunoreactividad. Así mismo, los somas localizados en Dp-v presentan morfología multipolar (Figs. 4I-J), una mayor actividad acetilcolinesterasa (Fig.3A) que en Dp-d, están más densamente agrupados y son ligeramente mayores. En Dp-v se aprecian algunas fibras inmunoreactivas a la calretinina.

Área preóptica

El núcleo preóptico parvicelular (PP) aparece caudalmente a la comisura anterior, está formado por células de tamaño medio, piriformes y bastante agrupadas que se sitúan próximas al ventrículo (Figs. 2L, 3A, 4K). Ventralmente hay una mayor cantidad de células y también están más densamente agrupadas. Con la tinción de Golgi se observa que estas células emiten sus prolongaciones orientadas perpendicularmente al ventrículo (Fig. 4K).

Hacia porciones más caudales, se observan dos regiones en el área preóptica: una dorsal con células de gran tamaño que se corresponde con el núcleo preóptico magnocelular y otra ventral con células de menor tamaño que es el núcleo preóptico parvicelular. Las células del segundo muestran una actividad colinesterásica de moderada a intensa e inmunoreactividad frente a la calretinina.

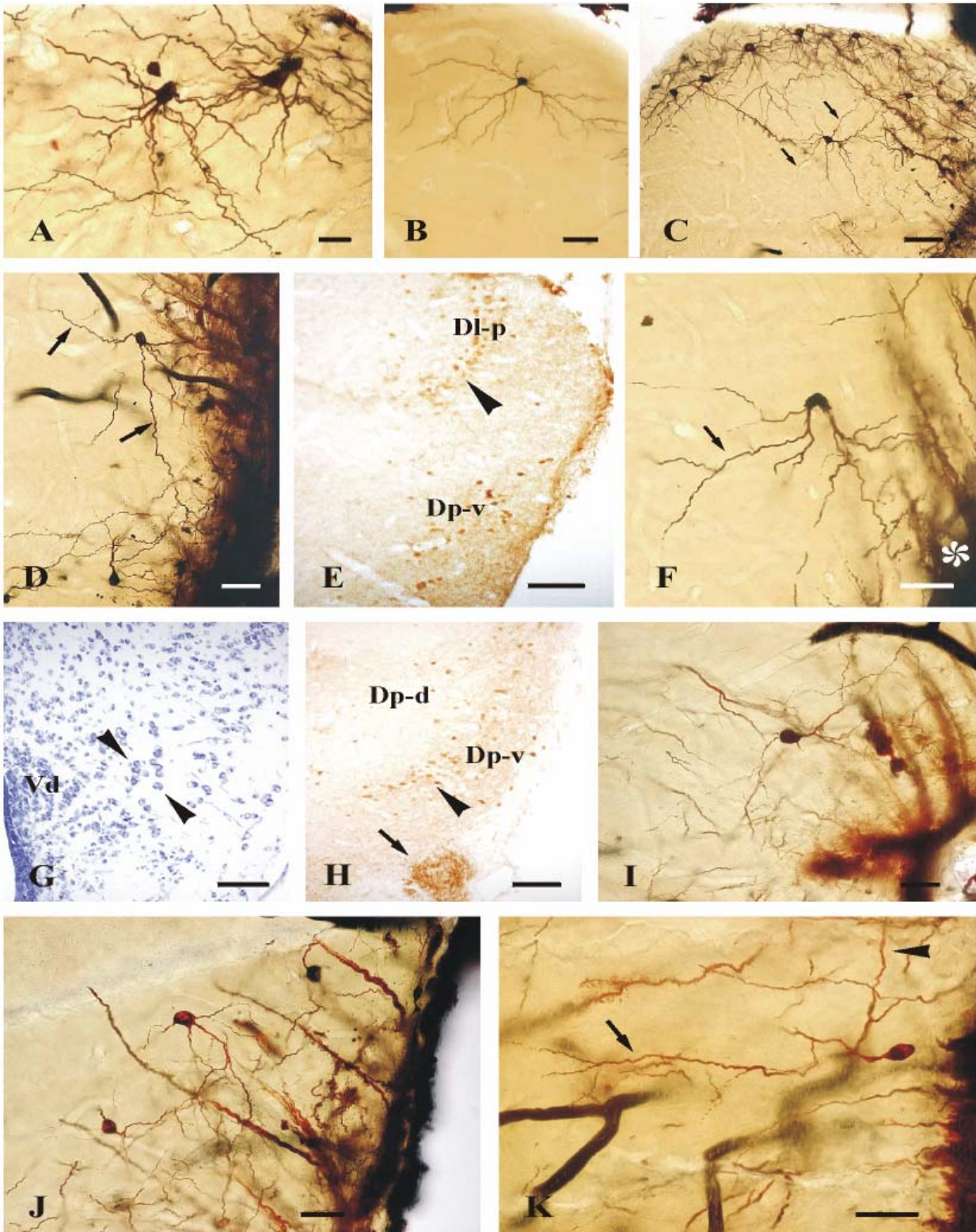


Fig. 4. Fotografías de secciones transversales a distintos niveles telencefálicos dorsales y de la región preóptica de encéfalos de trucha que fueron procesados con la técnica Golgi (A-D, F, I-K), con las técnicas inmunohistoquímica dirigida hacia la calretinina (E, H) y la técnica general Nissl (G). **A-C)** Células multipolares del área Dd+Dl-d. Obsérvese la conspicua arborización dendrítica, que en **B** y **C** se dirige de forma radial. **D)** Célula multipolar de la parte ventral área lateral del telencefalo dorsal (Dl-v), con sus dendritas dirigidas hacia regiones ventrolaterales y mediales (flechas). **E)** Células mostrando inmunoreactividad frente a la calretinina localizadas en Dl-p. **F)** Neurona multipolar perteneciente a Dc con sus dendritas dirigidas hacia regiones laterales, donde se localiza el tracto telencefálico lateral (asterisco), y hacia regiones mediales (flecha). **G)** Detalle de la organización celular a nivel de la comisura anterior, donde se observa que las células de Dc (cabezas de flecha) presentan un tamaño mayor que las células próximas de Vd. **H)** Células en Dp-v (cabeza de flecha) y fibras del tracto telencefálico lateral (flecha) inmunoreactivas frente a la calretinina. **I, J)** Células multipolares localizadas en Dp-v. **K)** Detalle de una célula monopolar del área preóptica parvicelular, observándose su arborización dendrítica dirigida hacia regiones laterales (flecha) y dorsales (cabeza de flecha). Barras de escala: 30 μ m en A- D, F, I-K; 100 μ m en E, G, H. Ver lista de abreviaturas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos nos han permitido una mejor caracterización de las áreas telencefálicas y región preóptica de individuos juveniles de trucha arco iris, estadio del desarrollo en el que hemos realizado nuestro posterior estudio hodológico. La comparación de los resultados con los disponibles en individuos adultos de trucha común muestra que no existen prácticamente diferencias en la distribución de la inmunoreactividad frente a la calretinina (Castro et al., 2003) y tirosín hidroxilasa (Manso et al., 1993; Anadón et al., 2002) y para la actividad enzimohistoquímica frente a la acetilcolinesterasa (Pérez, 1998). Estos resultados serán ampliamente comentados junto con los resultados hodológicos en el apartado de Discusión general.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso JR. 1994. Los métodos de Golgi. Acta Salamanticensia. Biblioteca de las Ciencias, Ediciones Universidad Salamanca, pp. 96-98.
- Anadón R, Rodríguez-Moldes I, González A. 2002. Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the forebrain of the trout: organization, cellular features and innervation. *Brain Res Bull* 57: 389-392.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15: 203-308.
- Brox A, Ferreiro B, Puelles L, Medina L. 2002. The telencephalon of the frog *Xenopus* based on calretinin immunostaining and gene expression patterns. *Brain Res Bull* 57: 381-384.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2003. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467: 254-269.
- Chard PS, Bleakman D, Christakos S, Fullner CS, Miller RJ. 1993. Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurons. *J Physiol* 472: 341-357.
- Danner H, Tuwoski A. 1977. The activities of the transmitter metabolizing enzymes monoamineoxidase and acetylcholinesterase and of succini dehydrogenase were investigated in the telencephalon of *Salmo irideus* (teleostei). *J Hirnforsch* 18: 293-300.
- Díaz-Regueira S, Anadón R. 2000. Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*). *J Comp Neurol* 426: 81-105.
- Golgi C. 1873. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana* 33: 244-246.
- Karnovsky M, Roots L. 1964. A direct colouring thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12: 219-221.
- Lledo PM, Somasundaram B, Morton AJ, Mesón PC, Mason WT. 1992. Stable transfection of calbindin-D28k into the GH3 cell line alters calcium currents and intracellular calcium homeostasis. *Neuron* 9: 943-954.
- Manso MJ, Becerra M, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 34: 239-260.
- Milán FJ, Puelles L. 2000. Patterns of calretinin, calbindin, and tyrosine-hydroxylase expression are consistent with the prosomeric map of the frog diencephalon. *J Comp Neurol* 419: 96-121.
- Miller RJ. 1991. The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog Neurobiol* 37: 255-285.
- Pérez SE. 1998. Estudio de la distribución en el sistema nervioso central de marcadores de sistemas colinérgicos durante el desarrollo y etapa adulta de la trucha mediante técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Pombal MA, Arriba MC de, Sampedro C, Álvarez R, Megías M. 2002. Immunocytochemical localization of calretinin in the olfactory system of the adult lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *Brain Res Bull* 57: 281-283.
- Pombal MA, Puelles L. 1999. Prosomeric map of the lamprey forebrain based on calretinin immunocytochemistry, Nissl stain, and ancillary markers. *J Comp Neurol* 414: 391-422.
- Porteros A, Arévalo R, Weruaga E, Crespo C, Briñón JR, Aijón J. 1997. Calretinin immunoreactivity in the developing olfactory system of the rainbow trout. *Dev Brain Res* 100: 101-109.
- Porteros A, Briñón JG, Arévalo R, Crespo C, Aijón J, Alonso JR. 1998. Transient expression of calretinin in the trout habenulo-interpeduncular system during development. *Neurosci Lett* 254: 9-12.
- Rogers JH. 1987. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol* 105: 1343-1353.
- Turowski A, Danner H. 1977. Zur Morphologie des Telencephalon von *Salmo irideus* (Teleostei) Golgi-Imprägnationsstudie. *J Hirnforsch* 18:37-51.

Capítulo 2

*Estudio experimental de las conexiones del sistema gustativo en la trucha arco iris, **Oncorhynchus mykiss.***

*Experimental study of the connections of the gustatory system in the rainbow trout, **Oncorhynchus mykiss.**
The Journal of Comparative Neurology 465: 604-619; 2003.*

Experimental Study of the Connections of the Gustatory System in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

MÓNICA FOLGUEIRA,¹ RAMÓN ANADÓN,² AND JULIÁN YÁÑEZ¹

¹Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

²Department of Ecology and Cell Biology, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

Salmonids are a group of teleosts with a nonspecialized gustatory system. With the aim of describing the gustatory connections in a member of this group, we carried out tract-tracing experiments using the lipophilic carbocyanine dye 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) in fixed brains of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The neural tracer was applied to the primary viscerosensory column, secondary gustatory visceral nucleus (SGN), torus lateralis (TL), and tertiary gustatory nucleus (TGN), the dorsal part of the ventral area of the telencephalon (dorsal-Vv), and the medial area of the dorsal telencephalon (Dm). The primary viscerosensory column projects mainly to the SGN. DiI application to the SGN showed a bilateral and reciprocal connection with the TGN and a rostral portion of the nucleus of the lateral hypothalamic recess. The application of DiI in the dorsal-Vv and Dm at levels rostral to the anterior commissure led to labeling of a restricted group of diencephalic neurons in the TGN and sending dendrites to the TL. DiI application to the TL/TGN anterogradely labeled fibers that coursed in the medial forebrain bundle innervating the precommissural portion of the dorsal-Vv and Dm. Caudally, this type of application led to labeling of fibers in the viscerosensory column and perikarya in the SGN. Tract-tracing results showed direct projections from the diencephalic and rhombencephalic gustatory nuclei to the telencephalon. There was a direct and reciprocal connection between the SGN and the ventral telencephalon. The results showed that the gustatory connections of the trout are similar to those of teleosts, with highly specialized gustatory centers as in cyprinids and ictalurids, and to that observed in the percomorph tilapia, thus demonstrating a basic organization that is shared by most teleosts. *J. Comp. Neurol.* 465: 604–619, 2003. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: vagal lobe; secondary gustatory nucleus; hypothalamus; telencephalon; teleosts

Some teleosts have a highly specialized gustatory system possessing large numbers of taste buds in the mouth and on the external surface of the body (Herrick, 1905; Barnard, 1936; Kappers et al., 1936; Finger, 1987; Yoshimoto et al., 1998). The gustatory system of these highly specialized teleosts has evolved to facilitate feeding by discriminating and localizing food stimuli in the nearby environment or in the oropharynx (Kanwal and Finger, 1992). In addition to selective ingestion, taste in teleost can be used for orientation and/or navigation toward a

food source (Herrick, 1904; Bardach et al., 1967; Atema, 1971; Holland, 1978; Kanwal and Finger, 1992). Three cranial nerves, the facial (VII), the glossopharyngeal (IX), and the vagal (X), carry taste information to the primary gustatory centers located in the rhombencephalon. The facial nerve conveys taste information from the extraoral taste buds of the head and trunk, and the glossopharynx-

Grant sponsor: Spanish Science and Technology Ministry; Grant number: BXX2000-0453-C02-01; Grant number: BXX2000-0453-C02-02; Grant sponsor: the Diputación Provincial de A Coruña (M.F.).

geal and vagal nerves are part of the intraoral system constituted by taste buds located in the oropharynx. In line with their highly developed taste sense, some ostariophysean teleosts (cyprinids and ictalurids) show hypertrophy of the lobes of the facial and vagus nerves in the medulla oblongata (Kappers et al., 1936; Morita et al., 1980; Finger, 1983; Kanwal and Finger, 1992; Rink and Wullimann, 1998; Yoshimoto et al., 1998). In other teleosts, including the rainbow trout, the viscerosensory centers form a continuous column in which differentiation between individual nuclei is not possible on cytoarchitectonic grounds (Fernández and Anadón, 1978; Díaz-Regueira and Anadón, 1992).

Most experimental studies of the gustatory system of teleosts have considered species of highly taste-specialized groups, such as cyprinids and ictalurids (Finger, 1978, 1983, 1987; Morita et al., 1980, 1983; Finger and Morita, 1985; Morita and Finger, 1985a,b; Kanwal et al., 1988; Wullimann, 1988; Kanwal and Finger, 1992; Lamb and Caprio, 1993; Rink and Wullimann, 1998), all of which pertain to the same subdivision of teleost fishes (Ostariophysi). In addition to ostariophyseans, only the gustatory connections of centrarchids (Wullimann, 1988) and cichlids (Yoshimoto et al., 1998; Ahrens and Wullimann, 2002), which pertain to the large radiations of the percomorphs (advanced teleosts), have been studied. Salmonids are a key group intermediate between the advanced teleosts and the highly specialized ostariophyseans, which lack extraoral taste buds and have a cytoarchitecturally simple viscerosensory column. In this group, the primary and secondary gustatory connections are partly known (Pérez et al., 2000), and higher-order taste centers have not been identified. We investigated the gustatory connections in a species of salmonids with a generalized gustatory system. Based on the key systematic position of salmonids, this study may shed new light on the phylogeny of taste centers in advanced teleosts.

MATERIAL AND METHODS

We used 66 young rainbow trout (30–60 mm of standard body length) obtained from a local fish farm (Piscifactoría Berxa, Mesía, Spain). Trout were deeply anesthetized with 0.1% tricaine methane sulfonate (MS-222; Sigma, St. Louis, MO) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4. Brains were then carefully dissected out of the skull and maintained in the same fixative until use. All procedures conformed to the European Community Guidelines on Animal Care and Experimentation.

Two 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application procedures were used. To label superficial nuclei and externally accessible brain areas, a small crystal of the lipophilic tracer DiI (Molecular Probes, Eugene, OR) was placed on the tip of an electrolytically sharpened insect pin and then directly applied to the brain under a stereomicroscope. The brain areas accessed by this procedure were the torus lateralis (TL; six cases) and the diffuse nucleus of the hypothalamic lobe (four cases). For labeling less accessible nuclei and areas, brains were previously embedded in 3% agarose and sectioned on a Vibratome. During this process, some sections were stained with an aqueous nuclear stain and immediately observed in a microscope to stop sectioning at the required level. The tracer was then applied as above. With this procedure, DiI was applied to the following areas: the dorsal part of the ventral region of the ventral telencephalon (three cases), the medial part of the dorsal telencephalon (Dm; nine cases), the preoptic nucleus (two cases), the tertiary gustatory nucleus (four cases), the subglomerular nucleus (SG; 11 cases), the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe (three cases), the TL (one case), the nucleus of the lateral hypothalamic recess (two cases), the secondary gustatory nucleus (SGN; 15 cases), and the viscerosensory column (six cases). In both procedures after DiI application, the area was sealed with melted agarose

Abbreviations

ATH	anterior thalamic nucleus of Holmgren (= nucleus glomerulosus)	PG	preglomerular complex
CB	cerebellum	PP	parvocellular preoptic nucleus
CC	corpus cerebelli	PR	posterior hypothalamic recess
cc	crista cerebelli	PRN	posterior recess nucleus
D	diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe	PSP	pretectal superficial nucleus, parvocellular part
Dd + Dl-d	dorsal region plus dorsolateral region of the dorsal telencephalic area	PTN	posterior tuberal nucleus
Dl-v	ventrolateral region of the dorsal telencephalic area	R	superior raphe nucleus
Dm	medial region of the dorsal telencephalic area	RF	reticular formation
dorsal-Vv	dorsal part of the ventral region of the ventral telencephalon	SG	nucleus subglomerulosus
Dp	posterior region of the dorsal telencephalic area	SGN	secondary gustatory visceral nucleus
FR	fasciculus retroflexus	SGT	secondary gustatory tract
H	habenula	SR	superior reticular nucleus
HL	inferior hypothalamic lobe	T	telencephalon
IP	interpeduncular nucleus	Td	dorsal thalamus
IX	glossopharyngeal nerve	TGN	tertiary gustatory nucleus
LR	lateral hypothalamic recess	TL	torus lateralis
LV	nucleus lateralis valvulae	Tlo	torus longitudinalis
MLF	medial longitudinal fascicle	TS	torus semicircularis
NI	nucleus isthmi	Tv	ventral thalamus
NLR	nucleus of the lateral hypothalamic recess	VC	valvula cerebelli
OB	olfactory bulb	Vd	dorsal region of the ventral telencephalic area
OC	optic chiasm	VII	facial nerve
OT	optic tectum	VI	lateral region of the ventral telencephalic area
		VS	viscerosensory column
		Vv	ventral region of the ventral telencephalic area
		X	vagal nerve

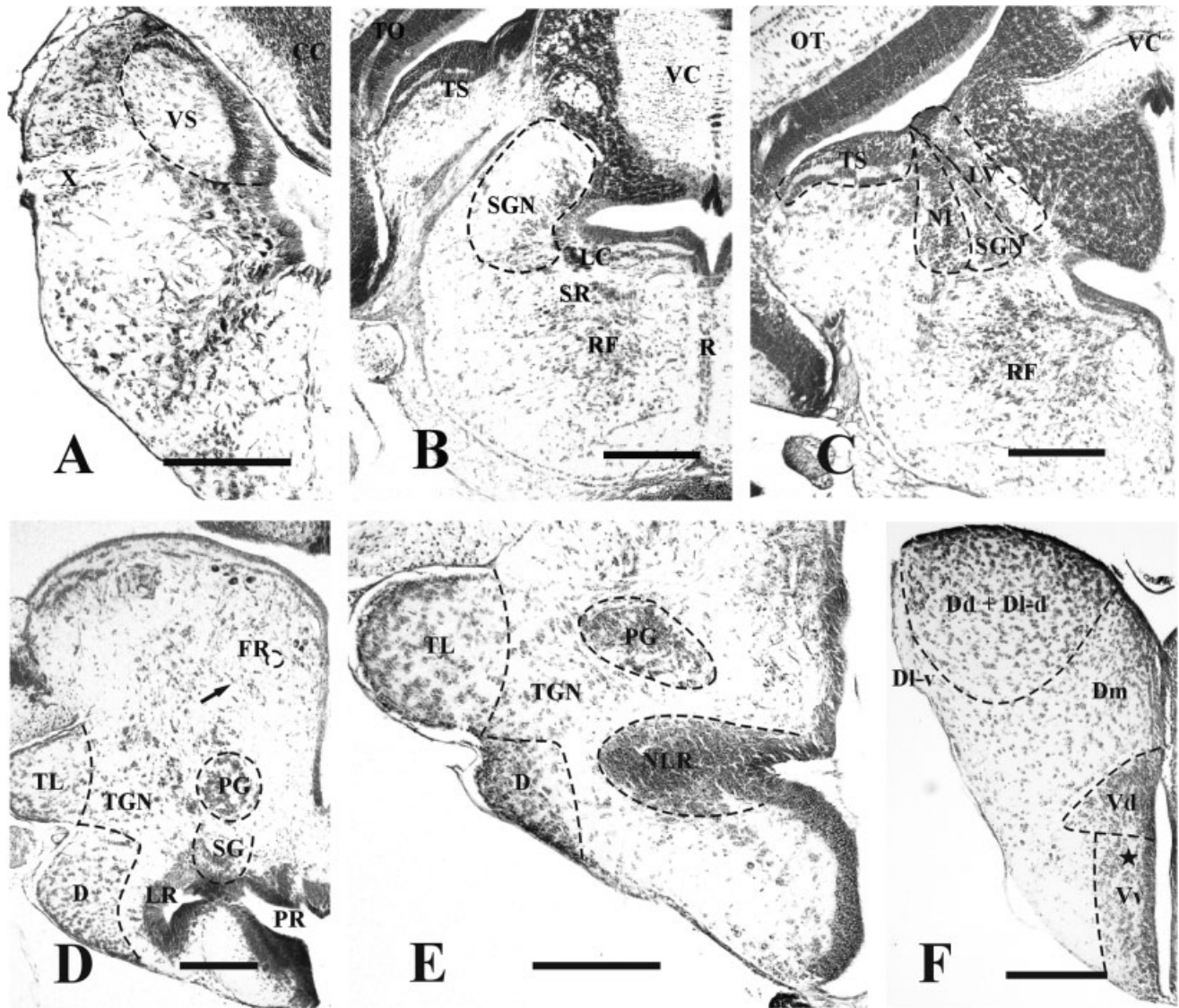


Fig. 1. Photomicrographs of Nissl-stained transverse sections through the brain of young trout showing the cytoarchitecture of the main gustatory centers. **A**: Section through the vagal medullary region. **B**, **C**: Sections through the caudal and rostral parts of the isthmus. **D**, **E**: Sections through the caudal and medial diencephalon.

The arrow in **D** points to the location of the gustatory nucleus of the rostral tegmental/thalamic region. **F**: Section through the precommissural telencephalon. For abbreviations in all figures, see Abbreviations list. Scale bars = 100 μ m.

and brains were left for 2 to 8 weeks in darkness at 37°C in frequently renewed fresh fixative. After this time, transverse or sagittal sections (50 μ m thick) were cut on a Vibratome (Campden, Sileby, UK) and mounted on gelatin-coated slides with phosphate buffer, pH 7.4. Sections were examined and photographed with a Nikon E-1000 fluorescence photomicroscope equipped with a rhodamine filter set and using black-and-white negative film (Tmax 400, Kodak, Las Rozas, Spain). Selected frames were scanned and digitized with a film scanner (Epson, Tokyo, Japan). The images were inverted to print them as positives, and their contrast and brightness were adjusted with Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA). Plates were assembled and lettered with CorelDraw (Ottawa, Canada).

Series of the brain of rainbow trout from our collection stained with Nissl and the acetylcholinesterase histochemical method were used for topographic purposes. The nomenclature for the different nuclei of trout was adopted from Holmgren (1920), Northcutt and Braford (1980), and Pérez et al. (2000).

RESULTS

The trout viscerosensory column extended from the entrance of the glossopharyngeal nerve to the obex and exhibited a similar cytoarchitecture along its length. In Nissl-stained sections, it consisted of compact neuronal band medially and a lateral region with scattered neurons (Fig. 1A). Representative Nissl-stained sections contain-

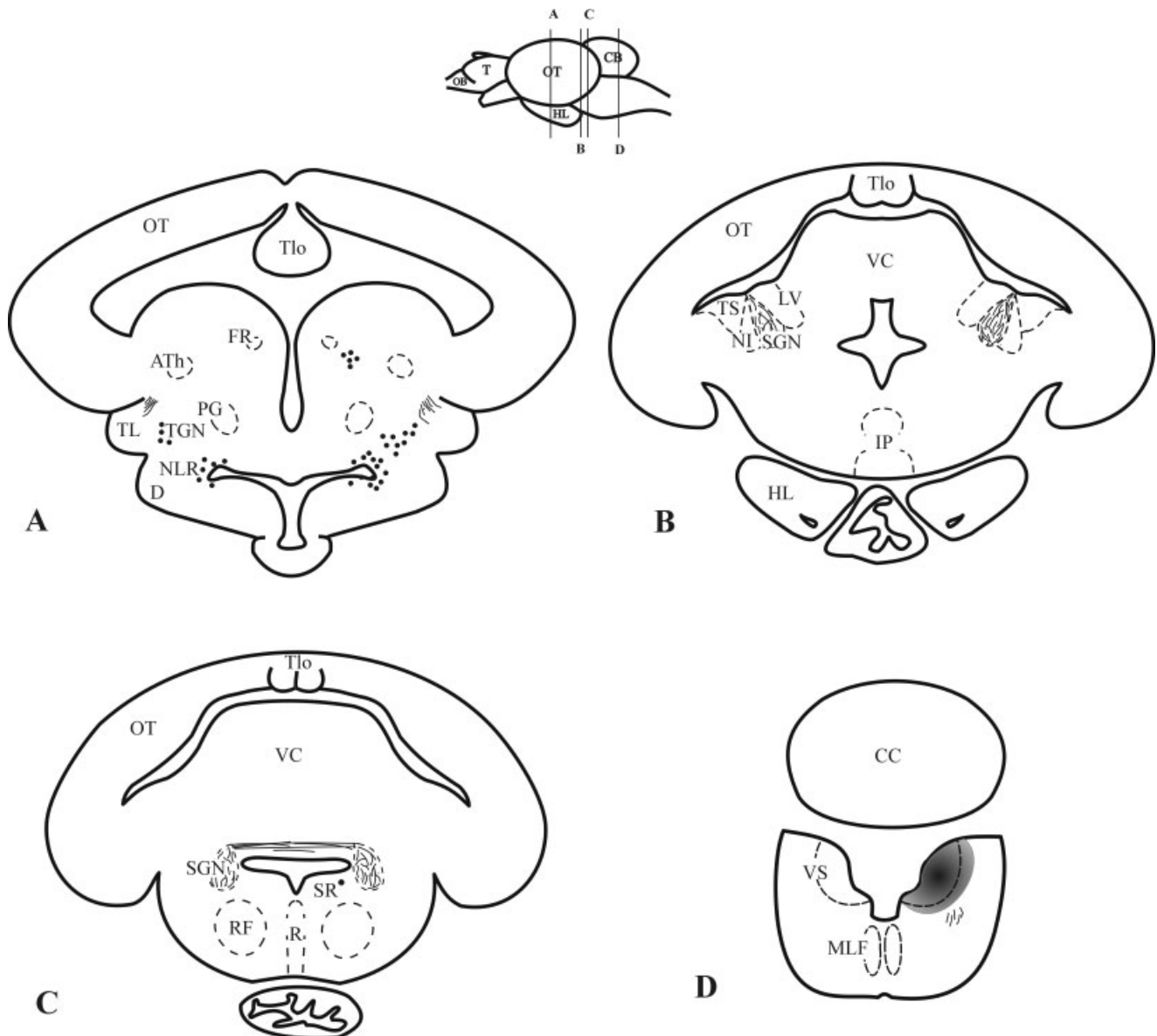


Fig. 2. A–D: Schematic drawings of selected transverse brain sections showing labeled fibers (dashes and lines) and perikarya (solid circles) after DiI application to the medullary viscerosensory column at the vagal level (in D). The shaded area in D represents the extent of the tracer at the application point. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain.

ing the different gustatory centers observed at isthmic, diencephalic and telencephalic levels are depicted in Figure 1B–F.

DiI application to the medullary viscerosensory column

To assess the connections of the medullary viscerosensory column, DiI was applied to its different rostrocaudal levels (from the glossopharyngeal nerve entrance to vagal levels), but no significant differences between these experiments were observed. This application led to labeling of secondary fibers and of neuronal perikarya in several nuclei of the visceral gustatory system. The results of DiI

application to the viscerosensory column are summarized in Figure 2.

In the rhombencephalon rostral to the viscerosensory column, we observed numerous anterogradely labeled fibers running in a thick tract ascending to the SGN, a rather large bean-shaped nucleus that is located in the cerebellar peduncle (Figs. 1B, 2C, 3A). This nucleus consists of a wide neuropil region with scarce neurons surrounded by layers of neurons (Fig. 1B). Some of the labeled fibers coursed to the contralateral nucleus through the thick secondary gustatory commissure (Fig. 2C). The SGN and its commissure were heavily labeled, but no labeled perikarya were observed in this nucleus. We also

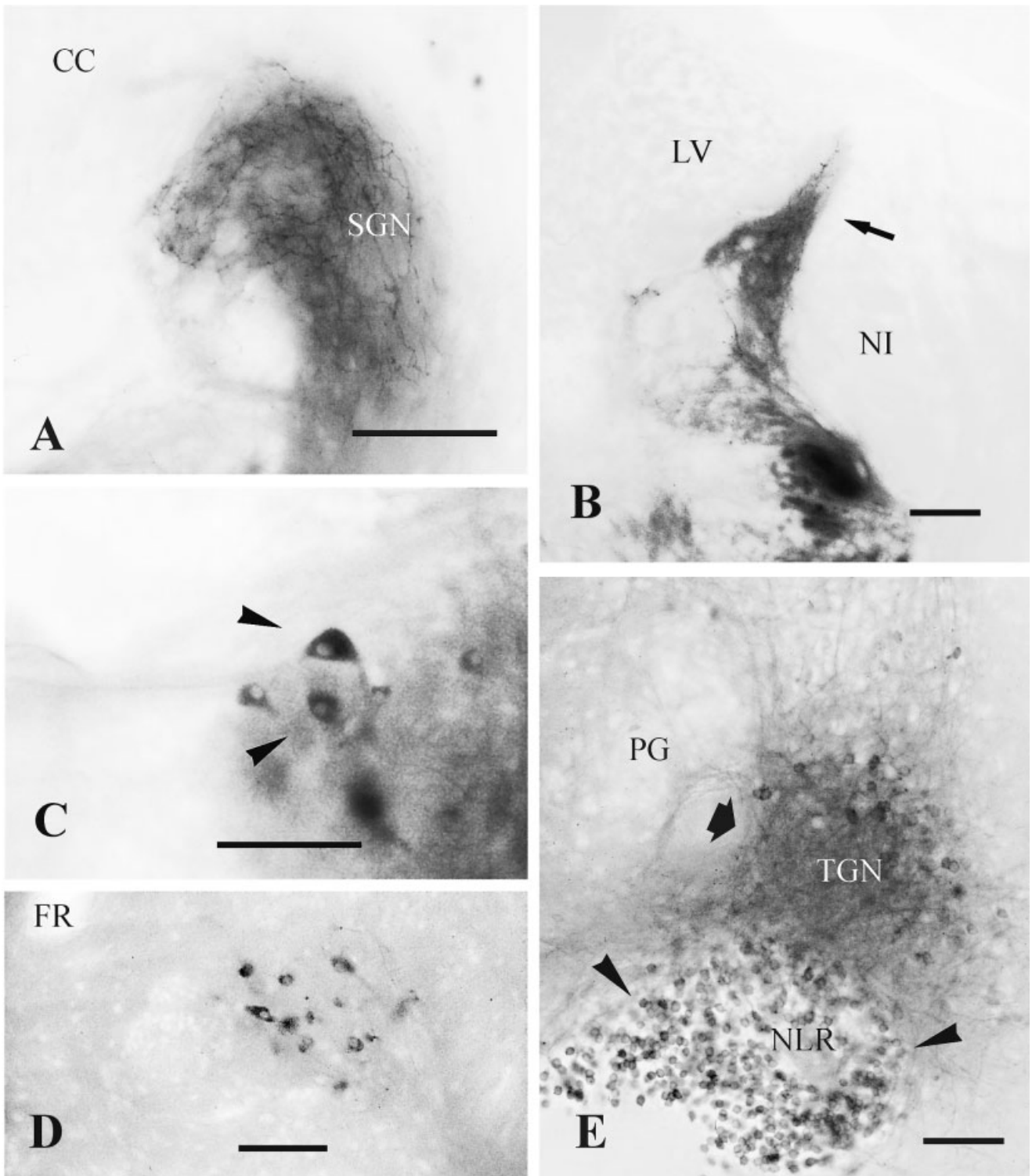


Fig. 3. Photomicrographs of transverse sections through the isthmic rhombencephalic (A-C) and diencephalic (D, E) levels after DiI application to the ipsilateral viscerosensory column. **A:** Anterogradely labeled fibers coursing to the secondary gustatory nucleus (SGN). **B:** Section showing labeled fibers (arrow) in the rostral extension of the SGN. **C:** Labeled cells (arrowheads) in the superior reticular

nucleus. **D:** Section showing a nucleus with labeled perikarya in the rostral tegmental/thalamic region. **E:** Section showing a group of small labeled neurons (arrowheads) in the dorsolateral wall of the lateral hypothalamic recess and more scattered cells in the tertiary gustatory nucleus (TGN; arrow). Scale bars = 200 μ m in A, C, 100 μ m in B, D, E.

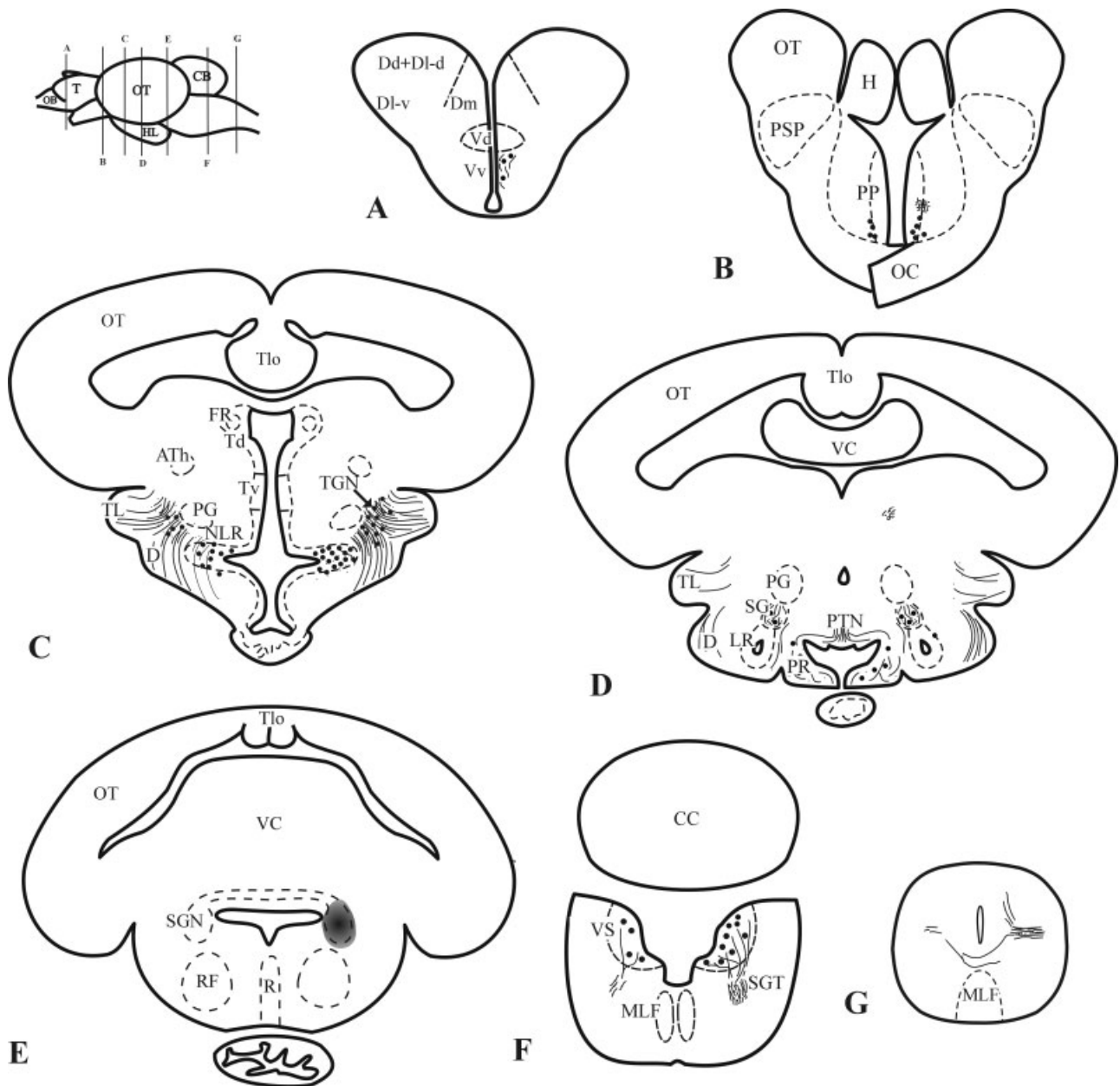


Fig. 4. A-G: Schematic drawings of transverse sections through the trout brain, showing the distribution of labeled fibers (dashes and lines) and perikarya (solid circles) after DiI application to the secondary gustatory nucleus (SGN). The shaded area in E represents the extent of the tracer at the application point. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain.

observed a number of labeled fibers in a rostral prolongation of the SGN between the nucleus lateralis valvulae and the nucleus isthmi (Figs. 1C, 2B, 3B). From this intermediate nucleus, labeled fibers could be followed through the midbrain in the direction of the hypothalamus. Ventromedial to the SGN, a few large multipolar cells were labeled in the superior reticular nucleus (Figs. 1B, 2C, 3C).

In the rostral tegmental region, ventrolateral to the nucleus of the medial longitudinal fascicle and dorsal to the nucleus preglomerulosus pars medialis, there was a

small group of scattered labeled perikarya (Figs. 2A, 3D). These spindle-shaped cells ($13.05 \pm 0.81 \mu\text{m}$ in diameter) occupied an intermediate region that showed low cell density in Nissl-stained sections (Fig. 1D). Whether this nucleus was thalamic or synencephalic could not be assessed.

A large number of labeled globular neurons ($10.1 \pm 0.14 \mu\text{m}$ in diameter) were observed in a conspicuous nucleus around the dorsolateral and rostral walls of the lateral hypothalamic recess (Figs. 1E, 2A, 3E). These cells exhibited very thin dendrites. Just dorsal to the nucleus of the lateral hypothalamic recess, there were more scattered

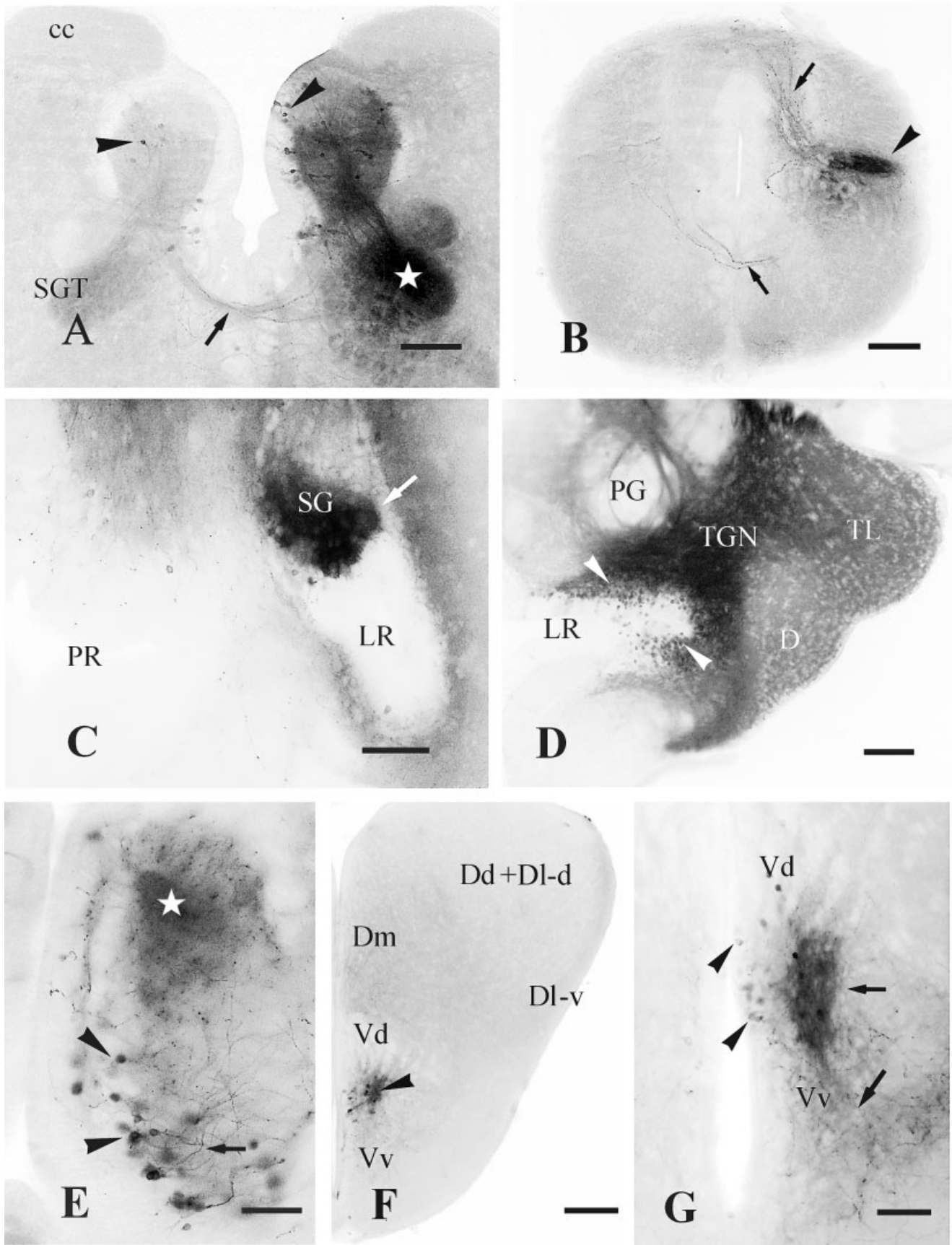


Figure 5

labeled cells pertaining to the tertiary gustatory nucleus (TGN; Figs. 2A, 3E), a triangular area between the TL, the nucleus of the lateral hypothalamic recess, and the nucleus preglomerulosus (Fig. 1D,E). These TGN cells were spindle shaped or slightly polygonal, with thicker dendrites extending dorsally and laterally.

Application of DiI to the SGN

The results of DiI application to the SGN are summarized in Figure 4. Carbocyanine application to the secondary SGN at the level of the SGN commissure (Fig. 4E) led to labeling of cells and fibers mainly at rhombencephalic, diencephalic, and telencephalic levels. In the rhombencephalon, numerous cells were labeled in the viscerosensory column (Figs. 4F, 5A), mostly ipsilaterally, with the exception of the commissural nucleus of Cajal and nearby regions, which almost completely lacked labeled cells. The labeled cells ($12.05 \pm 0.29 \mu\text{m}$) were mostly pear shaped and located in the thick periventricular layer of the perikarya or around the central neuropil region. At the level of the area postrema, a small bundle of labeled fibers was observed coursing ventrally to the spinal funiculus at the level of the transition between the rhombencephalon and the spinal cord (Figs. 4G, 5B).

In the rostral tegmentum, some labeled fibers were observed in the region dorsal to the nucleus preglomerulosus (Fig. 4D), but the destination of these fibers could not be assessed. In the hypothalamus, anterogradely labeled beaded fibers and a few retrogradely labeled monopolar perikarya were observed bilaterally in the SG (Figs. 4D, 5C), a U-shaped nucleus in the dorsolateral wall of the lateral hypothalamic recess (Fig. 1D). Labeled fibers and perikarya were more abundant in ventral regions of the SG. A large number of labeled globular cells was observed in the nucleus of the lateral hypothalamic recess, as indicated by the viscerosensory lobe (Figs. 4C, 5D). Some anterogradely labeled fibers were also observed. Further, DiI application to the SGN led to intense labeling of fibers in a triangular region corresponding to the TGN (Figs. 4C, 5D). The labeling was bilateral but much more intense on the ipsilateral side. Some scattered retrogradely labeled neurons also were observed in the TGN (Figs. 4C, 5D).

Some labeled fibers were observed in the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe, around the lateral hypothalamic recess, and in the torus lateralis (Figs. 4C,D, 5D). These structures were easily distinguished in Nissl-stained sections by their different cell densities (Fig. 1D,E). In the intermediate walls of the posterior hypothalamic lobe, a few small labeled cells were observed (Fig. 4D).

In the preoptic region, rather abundant small to medium-size cells ($11.7 \pm 0.32 \mu\text{m}$) and fibers were labeled in the lateral part of the posterior parvocellular nucleus and the magnocellular preoptic nucleus (Figs. 4B, 5E). In the telencephalon proper, a number of labeled fibers and some pear-shaped perikarya ($14.0 \pm 0.47 \mu\text{m}$) were observed in the dorsal part of the ventral region of the ventral telencephalic area, rostral to the anterior commissure, here referred to as the dorsal-Vv (Figs. 4A, 5F,G). The neuronal distributions of the different telencephalic regions are appreciable in Nissl-stained sections (Fig. 1F).

Application of DiI to the diencephalic gustatory centers

Having identified the diencephalic targets of the SGN, DiI was applied to the TGN, the TL, and the diffuse nucleus. For DiI application to the TGN, this nucleus was approached in brains sectioned at the level of the TL, so these experiments demonstrated only centers caudal to the application site. With this procedure, the DiI crystal affected practically only the TGN. The results of these experiments are summarized in Figure 6.

Caudal to the DiI application area, numerous labeled pear-shaped neurons ($11.39 \pm 0.39 \mu\text{m}$ in diameter) and processes were observed in the SGN (Figs. 6D, 7A). In addition, a band of labeled cells ($10.0 \pm 0.31 \mu\text{m}$ in diameter) was observed extending dorsolaterally from the rostral region of the SGN between the cerebellum and the nucleus isthmi (Figs. 6C, 7B). A few large cells were labeled ventromedially to the SGN, probably corresponding to cells of the locus coeruleus (Fig. 7A). Labeled fibers and occasional cells also were observed in the viscerosensory column at caudal rhombencephalic levels (Figs. 6E, 7C).

DiI was applied in toto to the TL. Although this type of application labeled more systems, it offered a first approximation to the study of the connections between the TL and TGN and the telencephalon. In the telencephalon, this type of DiI application led to ipsilateral labeling of fibers in the medial forebrain bundle that, rostral to the anterior commissure, innervated the dorsal-Vv and the medial region of the Dm (Figs. 6A, 7D,E). The precommissural Dm region receiving labeled fibers extended to far rostral telencephalic levels, close to the olfactory bulb. Although these results suggested that neurons of the TL project to the dorsal-Vv and Dm, reciprocal experiments indicated that these results were due to contamination of the TGN adjacent to the DiI application site (see below).

In addition to these ascending fibers, DiI application to the TL led to retrograde labeling of perikarya in the ventral part of the posterior region of the Dm, preoptic nucleus, periventricular regions of the dorsal and ventral thalami, preglomerulosus–mammillary complex, anterior thalamic nucleus of Holmgren (ATH; nucleus glomerulosus), a pretectotegmental nucleus (similar in location to the T2 nucleus of Ahrens and Wullimann, 2002), locus coeruleus, superior reticular nucleus, and SGN (results

Fig. 5. Photomicrographs of transverse sections through the rhombencephalon (A), hindbrain/spinal cord transition (B), diencephalon (C–E), and precommissural telencephalon (F, G), showing the structures labeled after DiI application to the secondary gustatory nucleus (SGN). **A:** Section showing bilaterally labeled perikarya in the viscerosensory column (arrowheads) and fibers crossing to the contralateral side (arrow; star, secondary gustatory tract). **B:** Section showing a bundle of labeled fibers (arrowhead) and fibers crossing to the contralateral side (arrows) at the caudal medullary level. **C:** Section showing a high concentration of anterogradely labeled fibers (arrow) in the ventral portion of the subglomerulosus nucleus (SG). **D:** Section showing numerous labeled fibers and some labeled monopolar perikarya in the tertiary gustatory nucleus (TGN) and the “gustatory nucleus” of the lateral hypothalamic recess (arrowheads). **E:** Section showing labeled cells in the lateral part of the posterior parvocellular preoptic nucleus (arrowheads) sending lateral processes (arrow; star, medial forebrain bundle). **F:** Section through the precommissural telencephalon showing labeled cells and fibers (arrowhead) in the dorsal part of the ventral region of the ventral telencephalon (Vv). **G:** Detail of the labeled perikarya (arrowheads) and fibers (arrows) of the dorsal-Vv. Scale bars = 150 μm in A, B, D, 100 μm in C, G, 75 μm in E, 200 μm in F.

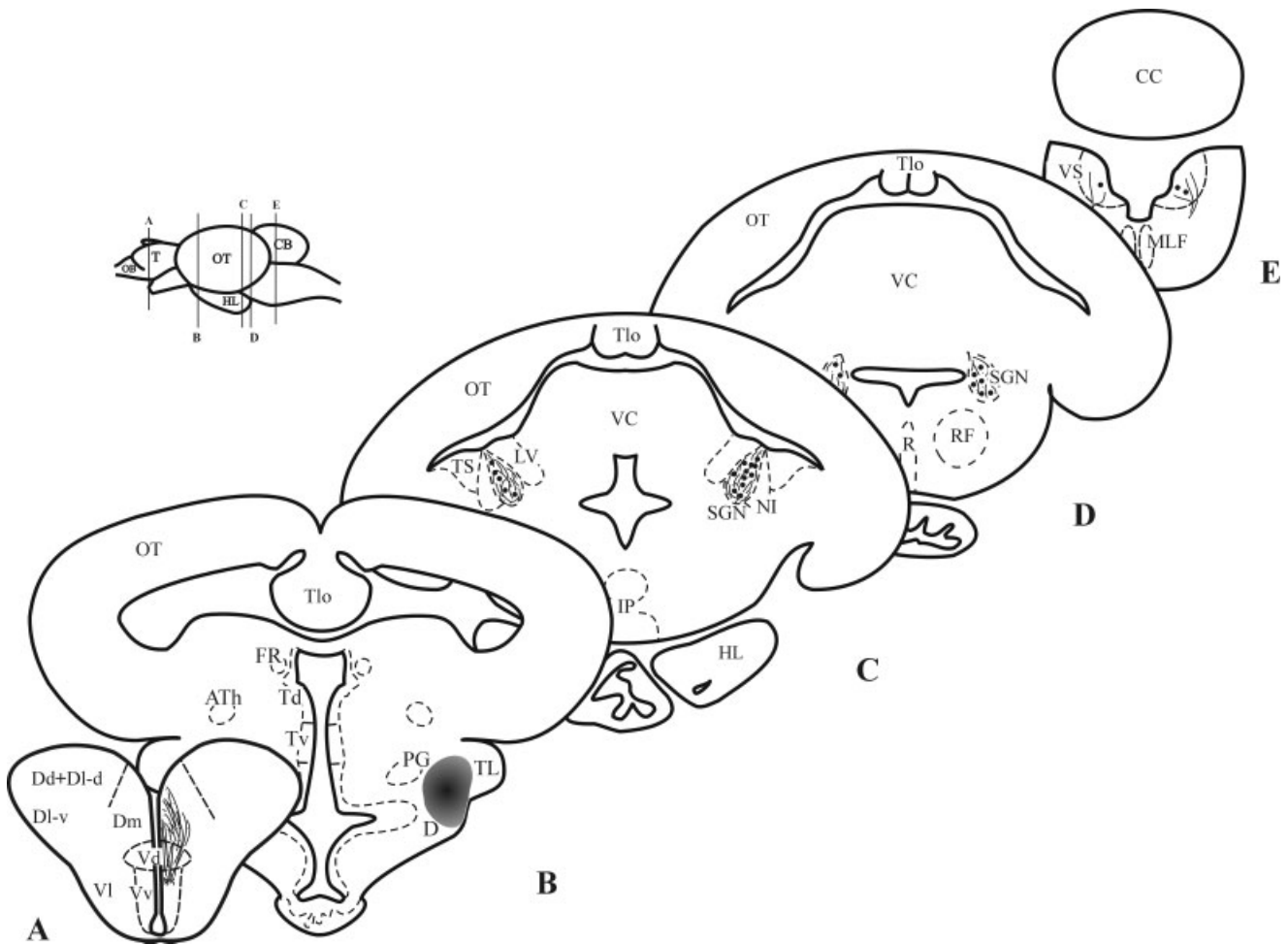


Fig. 6. A–E: Schematic drawings of selected transverse brain sections showing labeled fibers (dashes and lines) and perikarya (solid circles) after DiI application to the tertiary gustatory nucleus (TGN). The shaded area in B represents the extent of the tracer at the application point. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain.

not shown). Occasional cells were observed in the viscerosensory column.

After DiI application to the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe, labeled cells and fibers were observed bilaterally in the SGN (results not shown). At more caudal rhombencephalic levels, a few anterogradely labeled fibers originating from the secondary gustatory tract appeared in the viscerosensory column. DiI application to the diffuse nucleus also led to retrograde labeling of perikarya in the same nuclei as after DiI application to the TL, namely the ventral part of the posterior region of the Dm, preoptic nucleus, periventricular regions of the dorsal and ventral thalami, preglomerulosus–mammillary complex, ATh, a pretectotegmental nucleus, locus coeruleus, superior reticular nucleus, and SGN (results not shown). In addition to these nuclei, retrogradely labeled perikarya were observed in the postcommissural part of the dorso-medial region of the Dm.

To assess the gustatory origin of the anterogradely labeled fibers in the telencephalon from the TGN and/or the TL, DiI was applied to sectioned brains on the dorsal-Vv or

the Dm. The intratelenchephalic connections of these regions shown in these experiments will be addressed in further studies.

DiI application to dorsal-Vv

DiI application to the dorsal-Vv rostral to the anterior commissure led to labeling of a small compact group of pear-shaped perikarya ($12.95 \pm 0.37 \mu\text{m}$ in diameter) between the TL and the preglomerular complex (Fig. 8A). In view of its position, this group appears to correspond to the aforementioned TGN. These cells appeared bilaterally, but labeling was more intense on the ipsilateral side. Thin dendritic processes originating from this cell group (Fig. 8B,C) extended into the TL. Fibers coursing in the medial forebrain bundle and apparently originating from the TGN also were labeled.

At rhombencephalic levels, some monopolar cells in the SGN were retrogradely labeled, and some labeled fibers also innervated this nucleus (Fig. 8D). These structures were labeled bilaterally, but ipsilateral labeling was most

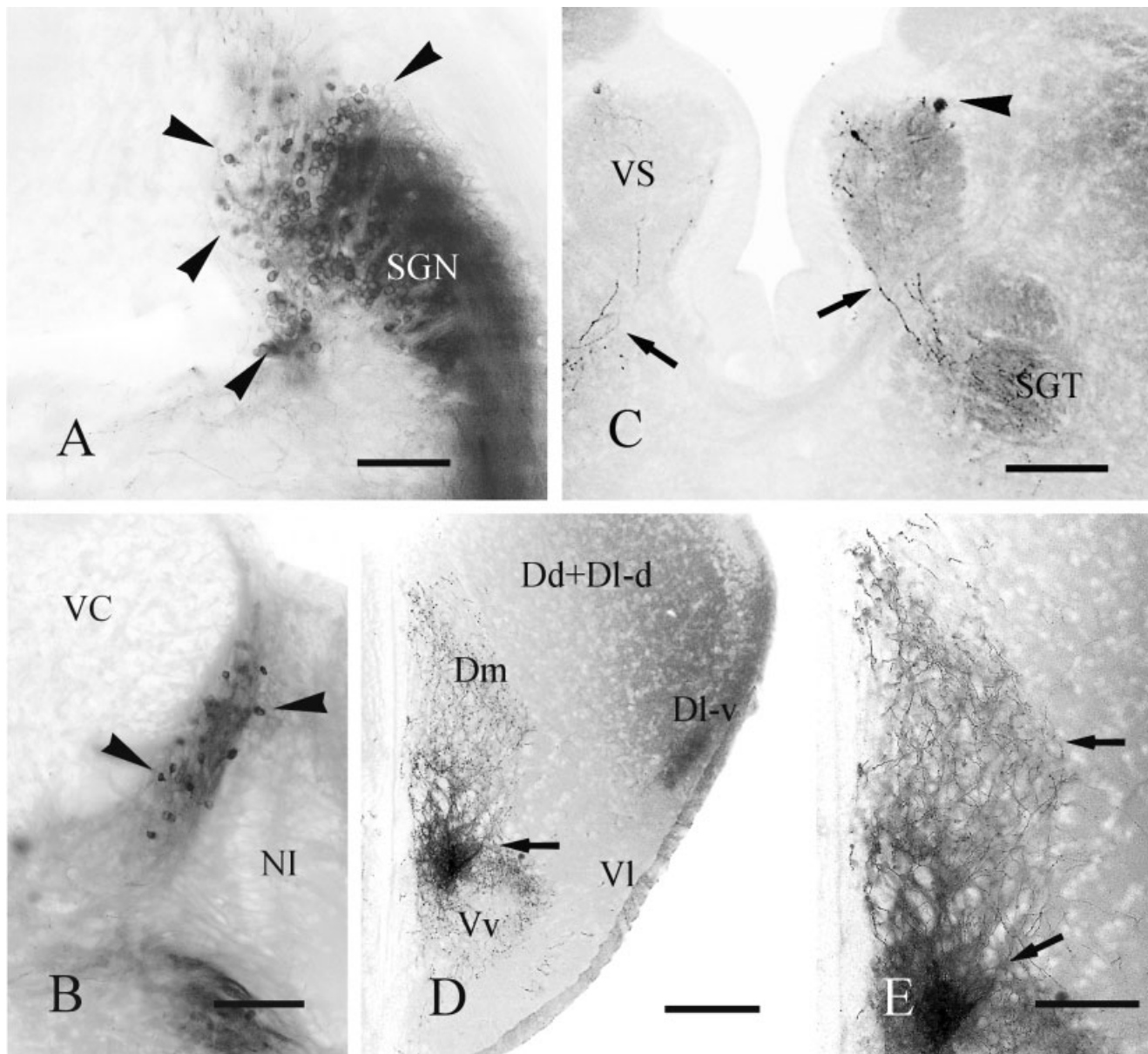


Fig. 7. Photomicrographs of transverse sections through the rhombencephalon (A,C), isthmus (B), and telencephalon (D,E), showing labeled structures after DiI application to the tertiary gustatory nucleus. **A:** Section showing labeled perikarya (arrowheads) and fibers in the secondary gustatory nucleus (SGN). **B:** Section through a rostral extension of the SGN showing labeled perikarya (arrowheads). **C:** Section showing labeled cells (arrowhead) and thin fibers (arrows)

in the viserosensory column (VS). **D:** Section showing labeled varicose fibers (arrows) in the periventricular precommissural telencephalon. **E:** Detail of the labeled fibers (arrows) in the medial region of the dorsal telencephalic area (Dm) and dorsal part of the ventral region of the ventral telencephalon (Vv). Scale bars = 100 μm in A, B, 150 μm in C, E, 225 μm in D.

intense. These results confirmed the presence of a reciprocal connection between the dorsal-Vv and the SGN.

In addition, other retrogradely labeled cells were observed outside the gustatory centers in several nuclei in the diencephalon (posterior periventricular nucleus, anterior tuberal nucleus, large cells of the diffuse nucleus, nucleus preglomerulosus, medial regions of the dorsal and ventral thalami, posterior tuberal nucleus, and posterior recess nucleus), mesencephalon (laminar nucleus, mesencephalic lateral reticular formation, and interpeduncular

nucleus), and rhombencephalon (superior raphe nucleus, locus coeruleus, central gray, and reticular formation; results not shown). These nongustatory populations are outside the scope of this study and not considered here.

DiI application to the Dm

To assess the origin of the fibers observed in Dm after DiI application to the TL/TGN, DiI was applied to precommissural levels of the Dm. In the diencephalon, some

retrogradely labeled perikarya were observed in the TGN. This group of cells was the same as that described after DiI application to the dorsal-Vv; thus, the TGN appears to innervate the dorsal-Vv and the Dm.

In addition, this type of application led to retrogradely labeled cells in the preoptic nucleus, posterior periventricular nucleus, pregglomerulosus–mammillary complex,

posterior tuberal nucleus, central posterior thalamic nucleus, superior raphe nucleus, locus coeruleus, and caudal rhombencephalic reticular formation. The connections of these nongustatory centers will be addressed in future studies.

Other sites of DiI application

Several additional tract-tracing experiments investigated whether other neural centers have connections, afferent or efferent, with taste centers. Application of DiI to the posterior part of the Dm, the parvocellular part of the pretectal superficial nucleus, the retina, the optic tectum, the parvocellular superficial pretectal nucleus, the torus semicircularis, the posterior tuberculum, the cerebellum, and the nucleus lateralis valvulae showed no labeled structures in the primary, secondary, or tertiary gustatory nuclei (results not shown). Accordingly, these nuclei were not considered part of the gustatory system of trout, and the structures labeled are not described here. However, application of DiI to the preoptic nucleus and the lateral recess nucleus labeled perikarya in the SGN, which confirmed the presence of SGN projections to these two nuclei (Fig. 9).

DISCUSSION

The central gustatory nuclei and their connection patterns have been experimentally studied mainly in cyprinids (Morita et al., 1980, 1983; Kanwal and Finger, 1992; Rink and Wullimann, 1998) and ictalurids (Finger, 1978, 1983; Finger and Morita, 1985; Morita and Finger, 1985a,b; Kanwal et al., 1988; Kanwal and Finger, 1992; Lamb and Caprio, 1993), in which this system is highly developed. A common pattern of ascending gustatory connections is shared by all these ostariophysean teleosts. The rhombencephalic primary gustatory nuclei project to an SGN, which in turn projects to the tertiary gustatory center(s) mainly in the diencephalon (Finger, 1987; Wullimann, 1998). In Perciformes species, projections from these diencephalic centers to telencephalic areas have been reported (Yoshimoto et al., 1998; Ahrens and Wullimann, 2002). In salmonids, a group of teleost fishes with relatively poorly developed gustatory centers, the projections of the SGN have been traced experimentally to (meso)diencephalic levels (Pérez et al., 2000). However, there is little information regarding the gustatory circuitry within the diencephalon in salmonids, and possible relationships between this system and the telencephalon have not been described. The experimental evidence obtained in the present study of the rainbow trout shows connections between the primary rhombencephalic gustatory centers

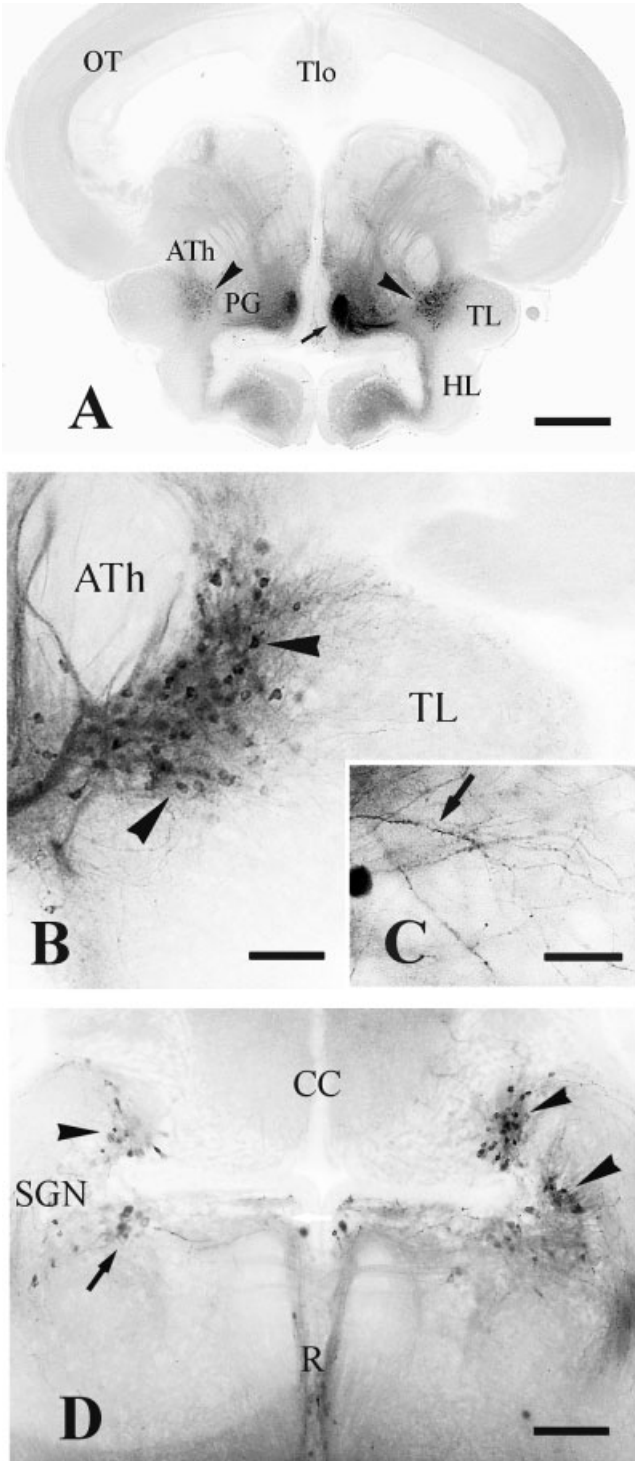


Fig. 8. Photomicrographs of transverse brain sections at mesodiencephalic (A–C) and rhombencephalic (D) levels after DiI application to the dorsal part of the ventral region of the ventral telencephalon. **A:** General view showing the bilateral location of labeled perikarya (arrowheads) in the tertiary gustatory nucleus (TGN; arrow) and axons coursing through the medial forebrain bundle (arrow). **B:** Detail of labeled TGN cells (arrowheads). **C:** Section showing thin spiny dendrites (arrow) of TGN cells extending into the torus lateralis (TL). **D:** Section showing labeled perikarya in the secondary gustatory nucleus (SGN; arrowheads) and in the raphe and locus coeruleus (arrow). Note the bilateral labeling of the SGN. Scale bars = 550 μ m in A, 130 μ m in B, 50 μ m in C, 200 μ m in D.

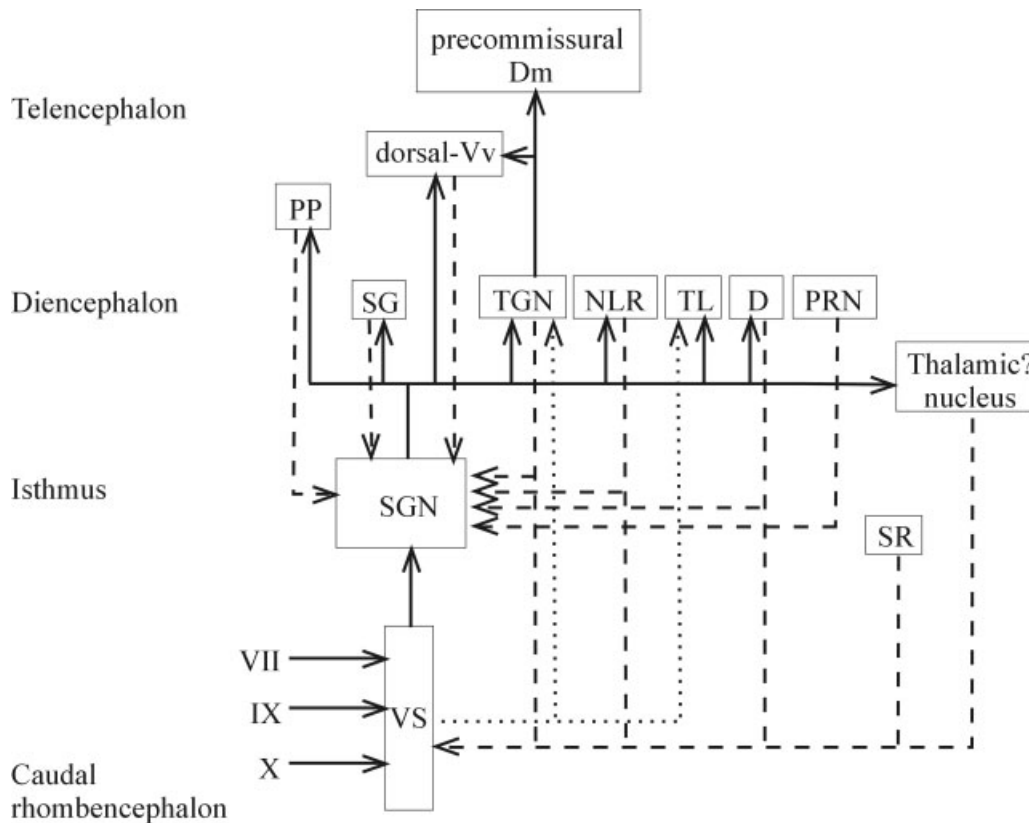


Fig. 9. Schematic diagram of the ipsilateral central gustatory connections of the rainbow trout. The solid lines represent ascending gustatory projections, and the dashed lines represent descending connections between gustatory centers. The dotted lines represent projections occasionally observed.

and telencephalic levels. These connections are summarized in Figure 9.

Primary gustatory centers

Ictalurids and cyprinids have a highly developed sense of taste, and this trait is reflected by the hypertrophy of the primary gustatory centers, which exhibit specialized lobes or nuclei (Finger, 1983; Kanwal and Finger, 1992; Lamb and Caprio, 1993; Rink and Wullmann, 1998). The primary gustatory centers of *Oncorhynchus mykiss* show a simpler pattern: the sensory centers of the facial, glossopharyngeal, and vagal nerves form a continuous column between the level of entrance of the glossopharyngeal nerve and the obex, and it is not possible to differentiate individual nuclei (Fernández and Anadón, 1978). Similar results have been reported in a Perciformes teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*; Díaz-Regueira and Anadón, 1992). Thus, in the rainbow trout, the organization of the viscerosensory column is similar to that observed in elasmobranchs (Anadón, 1978; Barry, 1987) and larval lamprey (González, 1990): cytoarchitectonic differences between the primary nuclei were not observed. This observation supports the idea that the trout is close to the ancestral pattern, in which there is a single primary visceral sensory nucleus.

Our results after DiI application to the SGN indicated that the cells of the primary gustatory centers that project to this nucleus have a rather simple morphology, similar

to the small pear-shaped cells observed in the facial and vagal lobes of catfish and goldfish (Finger, 1978; Morita et al., 1983). Although several types of neurons have been described after using Golgi methods in the vagal and facial lobes of goldfish, the cells projecting to the SGN appear to be of a single type (Morita et al., 1983), as we found in the trout. Similar results have been reported for the primary gustatory nuclei of a cichlid fish, the tilapia, although there were important size differences between labeled neurons of the vagal and facial lobes (Yoshimoto et al., 1998). Application of DiI to the trout primary gustatory column also indicated that the SGN does not project to this column (i.e., no labeled perikarya in this nucleus). This result is in agreement with observations in the goldfish, the bullhead catfish, and the tilapia after tracer application to the facial and vagal lobes (Morita et al., 1983; Morita and Finger, 1985a; Yoshimoto et al., 1998). Moreover, our results showed that the trout primary gustatory column receives important projections from neurons of the nucleus of the lateral hypothalamic recess and of the TGN. Neurons in both nuclei also were labeled after DiI application to the SGN, indicating that they might project to the primary and secondary gustatory centers. In the bullhead catfish, a single hypothalamic nucleus, the lobobulbar nucleus, was shown to project to the facial and vagal lobes (Morita and Finger, 1985a; Lamb and Caprio, 1993). In view of its position, the lobobulbar nucleus probably corresponds only to the TGN of trout. In the goldfish,

however, two nuclei afferent to the vagal and facial lobes have been reported, the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe and the posterior thalamic nucleus (Morita et al., 1983). Despite differences between goldfish and trout in the relative positions of these diencephalic nuclei, it seems probable that the TGN and lobobulbar nucleus are homologous structures, as are the parts of the goldfish diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe and the trout nucleus of the lateral hypothalamic recess that project to the SGN gustatory column. Also of interest is the presence in trout of a putative thalamic (synencephalic?) nucleus projecting to the primary gustatory lobes (present results) that may be similar to those observed in the thalamus of goldfish (Morita et al., 1983) and catfish (Morita and Finger, 1985a), which suggests significant conservation of these gustatory diencephalic rhombencephalic circuits in teleosts.

Secondary gustatory visceral nucleus

The SGN, or “superior secondary gustatory nucleus” (Herrick, 1905), is the only isthmic nucleus receiving ascending fibers from primary gustatory centers in all teleosts studied (Finger, 1978, 1983; Morita et al., 1980, 1983; Morita and Finger, 1985a,b; Wullimann, 1988; Yoshimoto et al., 1998; present results). In the trout, Pérez et al. (2000) found that neurons of a small medial portion of the SGN are cholinergic, in agreement with previous immunocytochemical results in *Carassius* (Zottoli et al., 1988) and the eel (Molist et al., 1993). This medial cholinergic portion and the main lateral part of the SGN receive fibers from all portions of the medullary viscerosensory column and project to the TGN (present results), which suggests that these portions have similar connections. Thus, the present results do not discriminate between the cholinergic and noncholinergic portions of the SGN on the basis of their connections and suggest that the medial cholinergic neurons are a chemically specialized part of the SGN. Whether there is a separate secondary visceral nucleus in the trout isthmus, as reported for goldfish and catfish (Finger and Kanwal, 1992) and suggested for *Hemichromis lifalili* (Ahrens and Wullimann, 2002), remains to be demonstrated.

A somatotopic representation of primary projections in the primary and secondary gustatory centers (ichthyunculus, piscunculus) has been described in teleosts with well-developed gustatory systems (Finger, 1976, 1978; Kanwal and Finger, 1992). In ictalurids (Finger, 1983) and goldfish (Morita et al., 1983; Rink and Wullimann, 1998), a certain degree of somatotopy of the secondary gustatory projections to the SGN has been described. Yoshimoto et al. (1998) also pointed out that the terminals of the facial and vagal lobes in the SGN of tilapia tend to be topographically separated in the medial–lateral direction, although there is some overlap. In the trout, tracer applications to different levels of the viscerosensory column do not show clear differences with regard to projections to the SGN (present results), suggesting that there is some correlation between the degree of specialization of the gustatory system (such as the presence of taste buds in barbels and other extraoral regions) and the degree of topographic organization of the secondary gustatory projections to the SGN. However, the small size of trout used in the present study could hinder a possible topographic relation, so the secondary projections should be further investigated in adult trout.

Our results indicated that the trout SGN projects to the diencephalon and telencephalon. In the diencephalon, four nuclei receive tertiary gustatory afferents: the TGN, the SG, the TL, and the inferior hypothalamic lobe (present results). Pérez et al. (2000) also indicated that the main targets are the preglomerular TGN and the diffuse nucleus. DiI application to the TGN also led to retrograde labeling of a large number of neurons in the SGN, largely ipsilateral to the application site. This type of DiI application also showed the presence of a rostradorsal extension of the SGN that is intercalated between the nucleus isthmi and the cerebellum and that also receives fibers from the primary gustatory centers. Moreover, in the present study, ipsilateral and reciprocal connections between the SGN and the preoptic region and the telencephalon were observed, thus extending the results of Pérez et al. (2000) in trout. Our results also suggested the possible existence of reciprocal connections of the TGN and the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobes with the SGN.

In goldfish and tilapia, horseradish peroxidase (HRP) injection into the SGN does not produce retrogradely labeled perikarya in the hypothalamus–posterior thalamus (Morita et al., 1983; Yoshimoto et al., 1998), although in catfish this type of injection retrogradely labels neurons in the nucleus lateralis thalami (Kanwal et al., 1988; Lamb and Caprio, 1993). This is a notable difference between the trout and the catfish, on the one hand, and between goldfish and tilapia, on the other.

Our results also showed the presence of an important projection from neurons of the preoptic nucleus to the SGN. Several immunocytochemical studies in trout have indicated that the SGN receives a number of peptidergic (i.e., somatostatin, neuropeptide Y, and Phe-Met-Arg-Phe-amide immunoreactive) fibers (Becerra et al., 1995; Castro et al., 1999, 2001), and similar results have been obtained in other teleosts (Batten et al., 1990). The trout preoptic nucleus contains neurons immunoreactive to these substances, mostly small or medium-size cells located externally or ventrally to the magnocellular cells, in positions similar to those of the cells demonstrated in our experiments. Together these results suggest that in the trout the preoptic nucleus modulates the SGN through rich and neurochemically varied projections. Surprisingly, similar SGN connections have not been reported with tracer methods in other teleosts. However, in the goldfish preoptic nucleus, cells have been labeled after HRP application to the vagal and facial lobes (Morita et al., 1983), although this labeling was attributed to probable uptake of HRP from blood vessels. Because this problem does not occur with DiI, in light of the present results we suggest that these investigators probably detected genuine preoptic primary gustatory column projections. Thus, preoptic SGN and/or preoptic primary gustatory column projections may form important neuroregulatory circuits in some teleosts.

Tertiary gustatory centers

Several diencephalic targets of the SGN have been reported in teleosts with specialized gustatory systems (Finger, 1983; Finger and Kanwal, 1992; Lamb and Caprio, 1993; Lamb and Finger, 1996; Rink and Wullimann, 1998; Yoshimoto et al., 1998). Whereas homologies between primary and secondary gustatory nuclei seem to be well established, to establish homologies between diencephalic

and telencephalic nuclei involved in processing gustatory information is difficult because of the numerous anatomic and hodologic differences observed between species.

In trout, DiI application to the SGN enabled us to delimit the TGN, which receives the bulk of the SGN projection. In the diencephalon, our experiments also showed labeled fibers in the TL, the SG, and the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe, thereby confirming and extending the results of Pérez et al. (2000). Moreover, the TGN and the diffuse nucleus could be considered as secondary and tertiary gustatory centers, because our results demonstrated a direct connection between the viscerosensory column and the TGN. The TGN and the nucleus of the lateral hypothalamic recess project in turn to the SGN. The projections from the SGN to the diffuse nucleus, TL, and a tertiary nucleus (TGN, nucleus glomerulosus, or preglomerular nucleus) have been reported in other teleosts (Morita et al., 1980, 1983; Wullimann, 1988; Lamb and Finger, 1996; Rink and Wullimann, 1998; Yoshimoto et al., 1998; Ahrens and Wullimann, 2002). Although there appears to be some topographic relationship between parts of the SGN and the tertiary gustatory centers in goldfish (Rink and Wullimann, 1998) and a cichlid (Ahrens and Wullimann, 2002), our results of DiI application to the TL and diffuse nucleus of trout showed no difference in the regions of the SGN with retrogradely labeled perikarya, suggesting that trout lack a topographic organization of tertiary gustatory projections similar to that observed in other teleost species.

The SG of trout is a large U-shaped nucleus located just dorsal to the lateral hypothalamic recess (Holmgren, 1920). Tracing studies have indicated that this nucleus receives afferents from the posterior part of the dorsal telencephalic area (Dp) and the SGN and projects to the optic tectum (Folgueira et al., 2002). A small projection from the SG to the SGN also has been observed. The Dp is a region of the dorsal telencephalic area involved in processing primary and secondary olfactory information, as reported for several teleosts (Honkanen and Ekström, 1990; Szabo et al., 1991; Matz, 1995; Meek and Nieuwenhuys, 1998; unpublished results). Thus, the SG appears to be a link between the gustatory and olfactory systems and the optic tectum (Folgueira et al., 2002). A topologically similar SG associated with the lateral hypothalamic recess has been reported in several Perciformes teleosts (Gómez-Segade and Anadón, 1987). However, the SG of trout probably does not correspond with the homonymous nucleus described in catfish, which has a different topography and neither receives SGN projections (Kanwal et al., 1988; Lamb and Caprio, 1993) nor projects to the optic tectum (Striedter, 1990).

The TL receives secondary gustatory fibers in cyprinids and percomorphs but not in ictalurids (Wullimann, 1998; Yoshimoto et al., 1998). The cyprinid TL is almost exclusively associated with the gustatory system, whereas the inferior lobe has additional connections with other functional systems, such as the octavolateralis and visual systems (Rink and Wullimann, 1998). Our tract-tracing experiments suggested that the trout TL is involved in the processing of gustatory information, being closely associated with the TGN, although it also receives projections from other telencephalic and diencephalic centers not directly associated with gustatory centers (see Results). In catfish, several discrete fields of the inferior lobes receive abundant SGN projections (Kanwal et al., 1988). In gold-

fish, tilapia, and trout, the SGN also projects to the diffuse nucleus (Morita et al., 1980; Rink and Wullimann, 1998; Yoshimoto et al., 1998; present results), although these projections do not appear to be discretely organized. In cyprinids and cichlids, the TL seems to be involved exclusively with gustatory and general visceral systems, whereas the inferior lobe likely represents a multisensory integration center (Rink and Wullimann, 1998; Ahrens and Wullimann, 2002). However, the connections of the TL and diffuse nucleus appear to be rather similar in trout (present results), suggesting that this species is less specialized.

The gustatory telencephalon of trout

Our results in trout showed that the secondary and tertiary gustatory centers send projections to specific telencephalic regions, suggesting that they are involved in processing gustatory information. These areas were pallial (Dm) and subpallial (dorsal-Vv) in receiving projections from the SGN and/or a thalamic nucleus (TGN). Thus, these gustatory pathways might be considered a lemniscal system (Finger, 1983; Yoshimoto et al., 1998).

Application of DiI to the trout SGN labeled cells and fibers in the dorsal-Vv. After application to the TGN/TL, we observed anterogradely labeled fibers in two telencephalic regions: the dorsal-Vv and the precommissural Dm. Reciprocal experiments with DiI application to the dorsal-Vv and precommissural Dm confirmed that the TGN projects to the Dm and the dorsal-Vv. Projections from the SGN to the telencephalon, but not retrogradely labeled cells, also have been observed in tilapia (Yoshimoto et al., 1998). These investigators described tertiary gustatory fibers coursing in the medial forebrain bundle to the area ventralis pars intermedia (Vi) and fibers coursing in the lateral forebrain bundle to the Vi and the Dp. The dorsal-Vv and Dm of trout and the Vi/Dp of tilapia thus appear to be gustatory centers. In catfish, the lobobulbar nucleus projects to the ventral portion of Dm and to the central portion of the dorsal telencephalic area (Dc) (Kanwal et al., 1988; Kanwal and Finger, 1992; Lamb and Caprio, 1993). Whether the differences observed between the gustatory telencephalic areas reflect (a) methodologic constraints, (b) real differences between species, or (c) nonhomology of the homonymous telencephalic areas described in different teleosts (due to between-species variation of the degree of telencephalic eversion, growth, and subdivision) is not known. In some mammals, the parabrachial nucleus (considered the homologue of the teleost SGN) projects directly to forebrain (part of the amygdaloid complex, the substantia innominata, and the bed nucleus of the stria terminalis) and to the thalamus and hypothalamus (Norgren and Leonard, 1973; Norgren, 1974, 1976; Yoshimoto et al., 1998). The Vi and the Dp of tilapia (Yoshimoto et al., 1998) and Dm and the ventral telencephalon in salmonids (Bazer et al., 1987; Holmqvist et al., 1992; Becerra et al., 1994; Matz, 1995; unpublished results) receive olfactory projections. Because the amygdaloid complex and lateral pallium of mammals also receive terminals from the olfactory bulb (Henry, 1995), the telencephalic gustatory areas of tilapia and trout could be homologous to a part of the amygdaloid complex and lateral pallium of mammals, as suggested by Yoshimoto et al. (1998).

The inferior hypothalamic lobes receive gustatory fibers from the SGN in all teleosts studied (Finger, 1983; Morita

et al., 1983; Wullimann, 1988; Kanwal and Finger, 1992; Lamb and Caprio, 1993; Lamb and Finger, 1996; Rink and Wullimann, 1998; Yoshimoto et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Ahrens and Wullimann, 2002; present results), these projections being considered extralemniscal (Finger, 1987; Yoshimoto et al., 1998). In trout, as reported for other teleosts, the telencephalon is connected with hypothalamic centers of this extralemniscal gustatory pathway. Our results showed that postcommissural Dm neurons project to the lateral region of the inferior hypothalamic lobe. In goldfish, DiI application to the inferior lobe of the hypothalamus and to the TL label perikarya in Dc, Dm, and the supracommissural nucleus of the ventral telencephalic area (Rink and Wullimann, 1998). Similarly, the dorsal region of Dm innervates the inferior hypothalamic lobe in tilapia (Yoshimoto et al., 1998) and *Thamnaconus modestus* (Shimizu et al., 1999). This telencephalic region may be the homologue of the postcommissural subdivision of Dm of trout. Other connections of the trout inferior hypothalamic lobes are roughly similar to those reported for goldfish (Rink and Wullimann, 1998) and tilapia (Ahrens and Wullimann, 2002).

The functional significance of the telencephalic gustatory centers of teleosts is at present unknown. A behavioral study in goldfish showed that the telencephalon has almost no regulatory effect on food intake and growth rate (Roberts and Savage, 1978). Instead, electric stimulation of the diencephalon evokes complex feeding behavior in various teleosts, e.g., the goldfish and the sunfish (Demski et al., 1975; Demski, 1983). However, recent studies of bilateral ablation of the medial (Dm) or lateral (DI) regions of the pallium in goldfish (Salas et al., 1996a,b; López et al., 2000; Rodríguez et al., 2002; Portavella et al., 2002) have suggested that these telencephalic centers play a role in subtle aspects of behavior such as learning and memory. These goldfish experiments have selectively implicated the DI region in complex aspects of spatial memory and navigation and the Dm region in emotional learning; this findings suggest a similarity of function between the DI and the mammalian hippocampus and between the Dm and the amygdala (Portavella et al., 2002). These findings and the neuroanatomic data indicating the presence of gustatory centers in Dm in various teleosts suggest that the telencephalic gustatory centers are involved in long-term aversive responses, i.e., emotional learning.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Pilar Gómez (Piscifactoría Berxa, Mesía, A Coruña) for supplying the biological material used in this study.

LITERATURE CITED

- Ahrens K, Wullimann M. 2002. Hypothalamic inferior lobe and lateral torus connections in a percomorph teleost, the red cichlid (*Hemichromis lifalili*). *J Comp Neurol* 449:43–64.
- Anadón R. 1978. Núcleos y conexiones primarias de los nervios branquiales de *Torpedo marmorata* (Risso) y otros selacios. *Trab Inst Cajal* 69:55–66.
- Atema J. 1971. Structures and functions of the sense of taste in the catfish (*Ictalurus natalis*). *Brain Behav Evol* 4:273–294.
- Bardach JE, Todd JH, Crickmer R. 1967. Orientation by taste in fish of the genus *Ictalurus*. *Science* 155:1276–1278.
- Barnard JW. 1936. A phylogenic study of the visceral afferent area associated with the facial, glossopharyngeal, and vagus nerves, and their fiber connections. The efferent facial nucleus. *J Comp Neurol* 65:503–602.
- Barry MA. 1987. Central connections of the IX and X cranial nerves in the clearnose skate, *Raja eglanteria*. *Brain Res* 425:159–166.
- Barry MA, Norton LE. 1989. Organization of primary gustatory nuclei in a goatfish, *Parupeneus multifaciatius*. *Am Zool* 29:13A.
- Batten TF, Cambre ML, Moons L, Vandesande F. 1990. Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol* 302: 893–919.
- Bazer TG, Ebbesson SOE, Reynolds JB, Bailey RP. 1987. A cobalt-lysine study of primary olfactory projections in king salmon fry (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum). *Cell Tissue Res* 248:499–503.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1994. Primary olfactory fibers project to the ventral telencephalon and preoptic region in trout (*Salmo trutta*): a developmental immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 342:131–143.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1995. Ontogeny of somatostatin-immunoreactive systems in the brain of the brown trout (Teleostei). *Anat Embryol* 191:119–137.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 1999. Development of immunoreactivity to neuropeptide Y in the brain of brown trout (*Salmo trutta fario*). *J Comp Neurol* 414:13–32.
- Castro A, Becerra M, Anadón R, Manso MJ. 2001. Distribution and development of FMRFamide-like immunoreactive neuronal systems in the brain of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 440:43–64.
- Demski LS. 1983. Behavioral effects of electrical stimulation of the brain. In: Davis RE, Northcutt RG, editors. *Fish neurobiology*. Volume 2. Higher brain areas and functions. Ann Arbor: University of Michigan Press. p 317–359.
- Demski LS, Evan AP, Saland LC. 1975. The structure of the inferior lobe of the teleost hypothalamus. *J Comp Neurol* 161:483–498.
- Díaz-Regueira S, Anadón R. 1992. Central projections of the vagus nerve in *Chelon labrosus* Risso (Teleostei, O. Perciformes). *Brain Behav Evol* 40:297–310.
- Fernández A, Anadón R. 1978. Núcleos y conexiones centrales del nervio facial de *Salmo irideus* Gibb. *Rev Fac Cien Oviedo* 17–19:163–170.
- Finger TE. 1976. Gustatory pathways in the bullhead catfish. I. Connections of the anterior ganglion. *J Comp Neurol* 165: 513–526.
- Finger TE. 1978. Gustatory pathways in the bullhead catfish. II. Facial lobe connections. *J Comp Neurol* 180:691–705.
- Finger TE. 1983. The gustatory system in teleost fish. In: Northcutt RG., Davis RE, editors. *Fish neurobiology*. Ann Arbor: University of Michigan Press. p 285–319.
- Finger TE. 1987. Gustatory nuclei and pathways in the CNS. In: Finger TE, Silver WL, editors. *Neurobiology of taste and smell*. New York: John Wiley & Sons. p 285–319.
- Finger TE, Kanwal JS. 1992. Ascending general visceral pathways within the brainstems of two teleost fishes: *Ictalurus punctatus* and *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 320:509–520.
- Finger TE, Morita Y. 1985. Two gustatory systems: facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. *Science* 227:776–778.
- Folgueira M, Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2002. The nucleus subglomerulosus of the trout is a link between chemosensory and visual systems: a DiI study. *Brain Res Bull* 57:427–430.
- Gómez-Segade P, Anadón R. 1988. Specialization in the diencephalon of advanced teleosts. *J Morphol* 197:71–104.
- González MJ. 1990. Estudio de los núcleos y nervios bulbares de larvas de la lamprea marina, *Petromyzon marinus* L (PhD thesis). Santiago de Compostela, Spain: University of Santiago de Compostela.
- Henry G. 1995. Nervous system: telencephalon. In: Berrey MM, Standing SM, Bannister LH, editors. *Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery*. New York: Churchill Livingstone. p 1107–1185.
- Herrick CJ. 1904. The organ and sense of taste in fishes. *Bull U S Fish Comm* 22:237–272.
- Herrick CJ. 1905. Central gustatory paths in brains of bony fishes. *J Comp Neurol* 15:375–456.
- Holmgren N. 1920. Zur Anatomie und Histologie des Vorder- und Zwischenhirns der Knochenfische hauptsächlich nach Untersuchungen an *Osmierus eperlanus*. *Acta Zool* 1:137–153.
- Holmqvist BI, Östholm T, Ekström P. 1992. DiI tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoar-

- chitectonics of specific neural systems in a teleost, the Atlantic salmon. *J Neurosci Methods* 42:45–63.
- Holland K. 1978. Chemosensory orientation to food by a Hawaiian goatfish (*Parupeneus porphyreus*, Mullidae). *J Chem Ecol* 4:173–186.
- Honkanen T, Ekström P. 1990. An immunocytochemical study of the olfactory projections in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, L. *J Comp Neurol* 292:65–72.
- Kanwal JS, Finger TE. 1992. Central representation and projections of gustatory systems. In: Hara TJ, editor. *Fish chemoreception*. London: Chapman & Hall. p 80–103.
- Kanwal JS, Finger TE, Caprio J. 1988. Forebrain connections of the gustatory system in ictalurid catfishes. *J Comp Neurol* 278:353–376.
- Kappers CUA, Huber C, Crosby EC. 1936. *The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man*. New York: McMillan.
- Lamb CF, Caprio J. 1993. Diencephalic gustatory connections in the channel catfish. *J Comp Neurol* 337:400–418.
- Lamb CF, Finger TE. 1996. Axonal projection patterns of neurons in the secondary gustatory nucleus of channel catfish. *J Comp Neurol* 365:585–593.
- López JC, Broglio C, Rodríguez F, Thinus-Blanc C, Salas C. 2000. Reversal learning deficit in a spatial task but not in a cued one after telencephalic ablation in goldfish. *Behav Brain Res* 109:91–98.
- Matz SP. 1995. Connections of the olfactory bulb in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Brain Behav Evol* 46:108–120.
- Meek J, Nieuwenhuys R. 1998. *Holosteans and teleosts*. In: Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors. *The central nervous system of vertebrates*. Volume 2. New York: Springer-Verlag. p 759–937.
- Molist P, Maslam S, Velzing E, Roberts BL. 1993. The organization of cholinergic neurons in the mesencephalon of the eel, *Anguilla anguilla*, as determined by choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Cell Tissue Res* 271:555–566.
- Morita Y, Finger TE. 1985a. Reflex connections of the facial and vagal systems in the brainstem of the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* 231:547–558.
- Morita Y, Finger TE. 1985b. Topographic and laminar organization of the vagal gustatory system in the bullhead catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Comp Neurol* 264:231–249.
- Morita Y, Ito H, Masai H. 1980. Central gustatory paths in the goldfish, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol* 191:119–132.
- Morita Y, Murakami T, Ito H. 1983. Cytoarchitecture and topographic projections of the gustatory centres in a teleost, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol* 218:378–394.
- Norgren R. 1974. Gustatory afferents to ventral forebrain. *Brain Res* 81:285–295.
- Norgren R. 1976. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol* 166:17–30.
- Norgren R, Leonard CM. 1973. Ascending central gustatory pathways. *J Comp Neurol* 150:217–238.
- Northcutt RG, Braford MR Jr. 1980. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes. In: Ebesson SOE, editor. *Comparative neurology of the telencephalon*. New York: Plenum Press. p 41–98.
- Pérez SE, Yáñez J, Marín O, Anadón R, González A, Rodríguez-Moldes I. 2000. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout, and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J Comp Neurol* 428:450–474.
- Portavella M, Vargas JP, Torres B, Salas C. 2002. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Res Bull* 57:397–399.
- Rink E, Wullimann MF. 1998. Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394:152–170.
- Roberts MG, Savage GE. 1978. Effects of hypothalamic lesions on the food intake of the goldfish (*Carassius auratus*). *Brain Behav Evol* 15:150–164.
- Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C. 2002. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull* 57:499–503.
- Salas C, Broglio C, Rodríguez F, López JC, Portavella M, Torres B. 1996a. Telencephalic ablation in goldfish impairs performance in a “spatial constancy” problem but not in a cued one. *Behav Brain Res* 79:193–200.
- Salas C, Rodríguez F, Vargas JP, Durán E, Torres B. 1996b. Spatial learning and memory deficits after telencephalic ablation in goldfish trained in place a turn maze procedures. *Behav Neurosci* 110:965–980.
- Shimizu M, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 1999. Fiber connections of the inferior lobe in a percomorf teleost, *Thamnaconus (Navodon) modestus*. *Brain Behav Evol* 54:127–146.
- Striedter GF. 1990. The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II. Retinal, tectal, cerebellar and telencephalic connections. *Brain Behav Evol* 36:355–377.
- Szabo T, Blahser S, Denizot JP, Ravaille-Veron M. 1991. Extrabulbar primary olfactory projection in teleost fishes. *C R Acad Sci* 312:555–560.
- Wullimann MF. 1988. The tertiary gustatory center in sunfishes is not nucleus glomerulosus. *Neurosci Lett* 86:6–10.
- Wullimann MF. 1998. The central nervous system. In: Evans DH, editor. *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC Press. p 245–283.
- Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu N, Ito H. 1998. Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. *J Comp Neurol* 392:209–226.
- Zottoli SJ, Rhodes KJ, Corrodi JG, Mufson EJ. 1988. Putative cholinergic projections from the nucleus isthmi and the nucleus reticularis mesencephali to the optic tectum in the goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Neurol* 273:385–398.

Capítulo 3

Estudio experimental de las conexiones del telencéfalo de la trucha arco iris (O. mykiss). I. Bulbo olfatorio y área ventral.

An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (O. mykiss). I. Olfactory bulb and ventral area.

The Journal of Comparative Neurology 480: 180-203; 2004.

An Experimental Study of the Connections of the Telencephalon in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). I: Olfactory Bulb and Ventral Area

MÓNICA FOLGUEIRA¹, RAMÓN ANADÓN,² AND JULIÁN YÁÑEZ¹

¹Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

²Department of Ecology and Cell Biology, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

ABSTRACT The fluorescent carbocyanine dye 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) was used in fixed tissue to comprehensively analyze the connections of the olfactory bulbs and the different regions of the ventral (V) area of the telencephalic lobes (subpallium) of the rainbow trout. With this goal, DiI was applied to the different telencephalic nuclei and zones, as well as to the olfactory nerve, the olfactory bulb, the retina, and to several structures in the diencephalon and brainstem of juvenile trout. The olfactory bulbs maintain reciprocal connections with several regions of the telencephalon [ventral nucleus of V (Vv), supracommissural nucleus (Vs), posterior zone of D (Dp), preoptic nucleus], and also project to the diencephalon (posterior tuberal nucleus, posterior hypothalamic lobe). Vv receives afferents from Vs, the dorsal nucleus of V (Vd), the preoptic nucleus, and from several nuclei in the diencephalon and brainstem (suprachiasmatic nucleus, anterior and lateral tuberal nuclei, preglomerular complex, tertiary gustatory nucleus, posterior tubercle, inferior hypothalamic lobes, thalamus, torus semicircularis, secondary gustatory nucleus, locus coeruleus, superior raphe nucleus, central gray, and reticular formation), and projects to dorsal (pallial) regions and most of the nuclei afferent to Vv. The dorsal nucleus of V (Vd) and Vs mainly project to the dorsal area. In an accompanying article (Folgueira et al., 2004), we present the results of application of DiI to dorsal (pallial) telencephalic regions, as well as of several experiments of tracer application to extratelencephalic regions. The results presented here, together with those of the accompanying article, reveal a complex connectional pattern of the rainbow trout ventral telencephalon, most of these connections having not been described previously in salmonids. *J. Comp. Neurol.* 480: 180–203, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: olfactory bulb, subpallium, pallium, thalamus, torus semicircularis, teleost.

The telencephalon of teleosts has a characteristic appearance, with solid paired telencephalic lobes separated by a single median and dorsal telencephalic ventricle covered by a dorsal choroid tela. The current model of the organization of the telencephalic lobes of actinopterygians is based on the eversion hypothesis, which states that the lobes originate by an outward dorsolateral bending of the embryonic telencephalic walls, followed by the expansion of the tela (see Northcutt and Braford, 1980; Northcutt

and Davis, 1983; Northcutt, 1995). Moreover, in diverse teleosts, the telencephalon undergoes different degrees of eversion, as well as distinct patterns of neuroblast migration from the ventricular zone of the telencephalic vesicle. Therefore, homologies between the telencephalic centers of teleost and land vertebrates, which have paired tubular

Grant sponsor: Spanish Science and Technology Ministry. Grant number: BXX2000-0453-C02-01; Grant number: BFU2004-03144/BFI; Grant sponsor: Xunta de Galicia (Spain) (to M.F.).

("inverted") telencephalic lobes, are not clear (Northcutt, 1995). In adult teleosts, telencephalic regions are mainly defined by topographical criteria, and the telencephalic lobes have been divided into two main regions, the dorsal area (D; area dorsalis telencephali) and the ventral area (V; area ventralis telencephali), which most authors consider homologues of the pallium and subpallium of land vertebrates, respectively (Nieuwenhuys, 1962, 1963; Northcutt and Braford, 1980; Northcutt and Davis, 1983; Northcutt, 1995). Developmental studies also support this division (Chanconie and Clairambault, 1975; Mueller and Wullimann, 2003; Castro et al., 2003). Both areas have also been subdivided into various zones and nuclei on the basis of cytoarchitectural and, sometimes, neurochemical and hodological criteria (see Northcutt and Braford, 1980; Northcutt and Davis, 1983; Northcutt, 1995; Castro et al., 2003).

The first experimental studies on the connectivity of the teleost telencephalon were based on degeneration techniques and horseradish peroxidase (HRP) tracing involving extensive telencephalic areas (Vanegas and Ebbesson, 1976; Ito and Kishida, 1978; Northcutt, 1981; Bass, 1981b). More detailed studies of telencephalic connections have been based on application of neural tracers to restricted areas of the telencephalic lobes (Ito et al., 1980, 1982; Echteler and Saidel, 1981; Shiga et al., 1985a,b; Wullimann and Rooney, 1990; Wullimann and Meyer, 1993; Yamane et al., 1996; Wong, 1997; Zupanc, 1997; Corrêa et al., 1998; Yoshimoto et al., 1998; von der Emde and Prechtel, 1999; Yamamoto and Ito, 2000) or to other brain regions (Ito and Kishida, 1977; Finger, 1980; Echteler, 1984; Ito et al., 1986; Murakami et al., 1986a, b;

Kanwal et al., 1988; Wullimann and Northcutt, 1990; Striedter, 1991, 1992; Lamb and Caprio, 1993; Wullimann and Roth, 1994; Yáñez and Anadón, 1996; Shimizu et al., 1999; Sawai et al., 2000; Folgueira et al., 2002, 2003; Imura et al., 2003). These studies have given rise to a rather heterogeneous collection of data on pallial and subpallial connections; the differences between studies might result from the different methodologies used, and/or from genuine between-species differences in telencephalic connections. As far as we know, the only comprehensive study of the connectivity of the different areas of the telencephalon in a single species was performed in an advanced teleost, *Sebastes marmoratus* (Acanthopterygii, Percomorpha, Scorpaeniformes; Murakami et al., 1983). Because teleosts are a highly diversified group, establishment of homologies on the basis of fragmentary data obtained in only a few species is rather problematic.

Teleosts are the most numerous and diversified group of vertebrates, their brains showing diverse degrees of specialization, depending on the ecological and the behavioral constraints of each species. The salmonids, belonging to the protacanthopterygian group, have a telencephalon with little eversion and a relatively simple dorsal area by comparison with most specialized euteleosts (Northcutt and Braford, 1980; Northcutt and Davis, 1983). In recent years, an increasing number of neurotransmitters and neuropeptides have been mapped in telencephalic and extratelencephalic areas of salmonids (van den Dungen et al., 1982; Ekström and Ebbesson, 1989; Östholm et al., 1990; Amato et al., 1991; Holmqvist and Ekström, 1991; Manso et al., 1993; Anglade et al., 1994, 1999; Bailhache et al., 1994; Holmqvist et al., 1994; Matz and Takahasi,

Abbreviations

AC	anterior commissure	OB	olfactory bulb
ATh	anterior thalamic nucleus of Holmgren (= nucleus glomerulosus)	OC	optic chiasm
ATN	anterior tuberal nucleus	OT	optic tectum
BC	body of the cerebellum	OVLT	organum vasculosum of the terminal lamina
CB	cerebellum	PC	paracommissural nucleus
CC	cerebellar crest	PG	preglomerular complex
CP	central posterior nucleus of the thalamus	PM	magnocellular preoptic nucleus
D	diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe	PO	preoptic region
Dc	central area of the dorsal telencephalon	PP	parvocellular preoptic nucleus
Dd+Dl-d	dorsal region plus dorsolateral region of the dorsal telencephalic area	PR	posterior recess
Dl-v	ventrolateral region of the dorsal telencephalic area	PSP	superficial pretectal nucleus, parvocellular part
Dm	medial area of the dorsal telencephalon	PT	posterior tubercle
Dp	posterior area of the dorsal telencephalon	PTN	posterior tuberal nucleus
Dp-d	dorsal part of Dp	R	superior raphe nucleus
Dp-v	ventral part of Dp	RF	reticular formation
ENT	entopeduncular nucleus	SC	suprachiasmatic nucleus
fr	fasciculus retroflexus	SG	nucleus subglomerulosus
GC	Goldstein's commissure	SGN	secondary gustatory visceral nucleus
GL	glomerular layer of the olfactory bulb	T	telencephalon
GR	granular layer of the olfactory bulb	Td	dorsal thalamus
H	habenula	TGN	tertiary gustatory nucleus
HL	hypothalamic lobe	TL	torus lateralis
IP	interpeduncular nucleus	Tlo	torus longitudinalis
LC	locus coeruleus	TS	torus semicircularis
lot	lateral olfactory tract	Tv	ventral thalamus
LR	lateral recess	VC	valvula cerebelli
LTN	lateral tuberal nucleus	Vd	dorsal area of the ventral telencephalon
LV	lateral nucleus of the valvula	VI	lateral area of the ventral telencephalon
MB	mamillary body	Vs	supracommissural region of the ventral telencephalic area
ML	mitral layer of the olfactory bulb	VS	vagal viscerosensory column
mlf	medial longitudinal fascicle	Vv	ventral area of the ventral telencephalic area
mot	medial olfactory tract	Vv-d	dorsal part of Vv
NI	nucleus isthmi	Vv-v	ventral part of Vv

1994; Becerra et al., 1995; Vecino et al., 1995; Castro et al., 1999, 2001; Pérez et al., 2000; Díaz et al., 2001; Anadón et al., 2002; Rodríguez et al., 2003). In contrast with these numerous neurochemical studies, there have been very few hodological studies. There have been some neuroanatomical studies on the primary and secondary projections of the olfactory system in salmonids (Northcutt and Davis, 1983; Bazer et al., 1987; Anadón et al., 1995; Matz, 1995) but no comprehensive studies of the connectivity of the salmonid telencephalon.

To expand our understanding of the organization of the telencephalon in salmonids, the connections of the different telencephalic nuclei and zones were examined using the 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) tracing technique with the aim of integrating as far as possible the results on afferent and efferent telencephalic projections with existing neurochemical data in salmonids. A further aim was to compare the pattern of telencephalic connections in salmonids with those reported in other fishes, to gain insight into the evolution of telencephalic connections. The connections of the olfactory bulb and ventral area (subpallium) are presented here, whereas the connections of the dorsal area (pallium) and the preoptic region are presented in the accompanying article (Folgueira et al., 2004).

MATERIALS AND METHODS

We used 201 young adult rainbow trout (4–7 cm in standard body length) obtained from a local fish farm (Piscifactoría Berxa, Mesía, Spain). Trout were deeply anesthetized with 0.1% tricaine methane sulfonate (MS-222, Sigma, St. Louis, MO) and transcardially perfused with cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 (PB). Brains were then carefully dissected out of the skull and stored at 4°C in the same fixative until use. All experiments were approved by the University of A Coruña Animal Care and use Committee and conform to the European Community guidelines.

Two different procedures of application of the lipophilic tracer DiI (Molecular Probes, Eugene, OR) were used. To apply the tracer to superficial nuclei and externally accessible brain areas, a small crystal of DiI was placed on the tip of an electrolytically sharpened insect pin, which was directly inserted into the brain under a stereomicroscope. For DiI application to deeply located or less accessible nuclei and areas, brains were previously embedded in a block of 3% agarose and sectioned on a Vibratome. To determine the appropriate level for the injection, some sections were stained during the procedure with 0.1% methyl blue, cover-slipped with PB, and immediately observed under a microscope. When the appropriate level was reached, the tracer was applied as above. The size of typical DiI crystals was of approximately 25 × 12 μm, and the smallest crystals (used for small nuclei and areas) was of approximately 17 × 7 μm. The brain areas injected by these procedures are summarized in Table 1.

In all cases, after DiI application to the brain, the area was sealed with melted agarose and brains were left in the dark for 2–8 weeks in frequently renewed fresh fixative at 37°C. After the transport period, transverse and sagittal sections (50 μm thick) were obtained on a Vibratome (Campden Instruments, Ltd., Sileby, UK), and mounted on gelatin-coated slides. Sections were examined and photographed with Tmax-400 black-and-white film (Kodak,

TABLE 1. Number of Fish Investigated and Areas Injected

Injection site	Whole brain	Sectioned brain
Olfactory nerve	—	3
Olfactory bulb	7 (lateral and dorsal)	—
Lateral part of the dorsal telencephalon (Dl)	—	4
Dorsal part of the dorsal telencephalon (Dd)	—	15
Medial part of the dorsal telencephalon (Dm)	—	14
Central part of the dorsal telencephalon (Dc)	—	9
Posterior part of the dorsal telencephalon (Dp)	—	12
Ventral part of the ventral telencephalon (Vv)	—	12
Dorsal part of the ventral telencephalon (Vd)	—	3
Lateral part of the ventral telencephalon (Vl)	—	2
Supracommissural part of the ventral telencephalon (Vs)	—	3
Posterior part of the ventral telencephalon (Vp)	—	4
Entopeduncular nucleus	—	2
Preoptic region	—	4
Preglomerular nuclei	5 (lateral part)	6 (lateral and medial nuclei)
Torus lateralis (TL)/TGN	8	1 (TL)
Mamillary body	—	3
Nucleus subglomerulosus	—	11
Dorsal thalamus	—	5
Ventral thalamus	—	5
Lateral tuberal nucleus	—	2
Hypothalamic lobe	5 (diffuse nucleus)	3 (diffuse nucleus) + 2 (medial part)
Posterior tubercle	2	16 (medial, lateral, rostral, caudal)
Parvocellular superficial pretectal nucleus	1	—
Optic tectum (dorsal and lateral parts)	4	—
Torus semicircularis	2	2
Cerebellum	3	—
Lateral nucleus of the valvula	—	2
Secondary gustatory nucleus	—	5
Interpeduncular nucleus	—	4
Superior raphe nucleus	—	4

Las Rozas, Spain) in a fluorescence photomicroscope (Nikon E-1000) equipped with a rhodamine filter set. Negative films were digitally scanned (Epson scanner; Tokyo, Japan), inverted, and balanced for brightness and contrast with Photoshop (Adobe, San Jose, CA), then printed as positive. Unless otherwise stated, the nomenclature for forebrain nuclei and areas is adopted from Northcutt and Braford (1980), Northcutt and Davis (1983), and Castro et al. (2003).

RESULTS

DiI application to the olfactory nerves

The pattern of primary olfactory projections in salmonids has already been established (Riddle and Oakley, 1992; Riddle et al., 1993; Becerra et al., 1994; Anadón et al., 1995). Here, the neural tracer was applied to the surface of a sectioned olfactory nerve to compare in detail the extrabulbar primary olfactory projections and secondary olfactory projections (Fig. 1). No labeled neurons were found in the olfactory bulb, indicating that the bulb was not affected by the injection. Most of the labeled primary olfactory fibers entered the ipsilateral olfactory bulb and ended massively in the glomerular layer (Fig. 1A). Some labeled olfactory fibers entered the telencephalic lobes and continued caudally along the lateral and medial olfactory

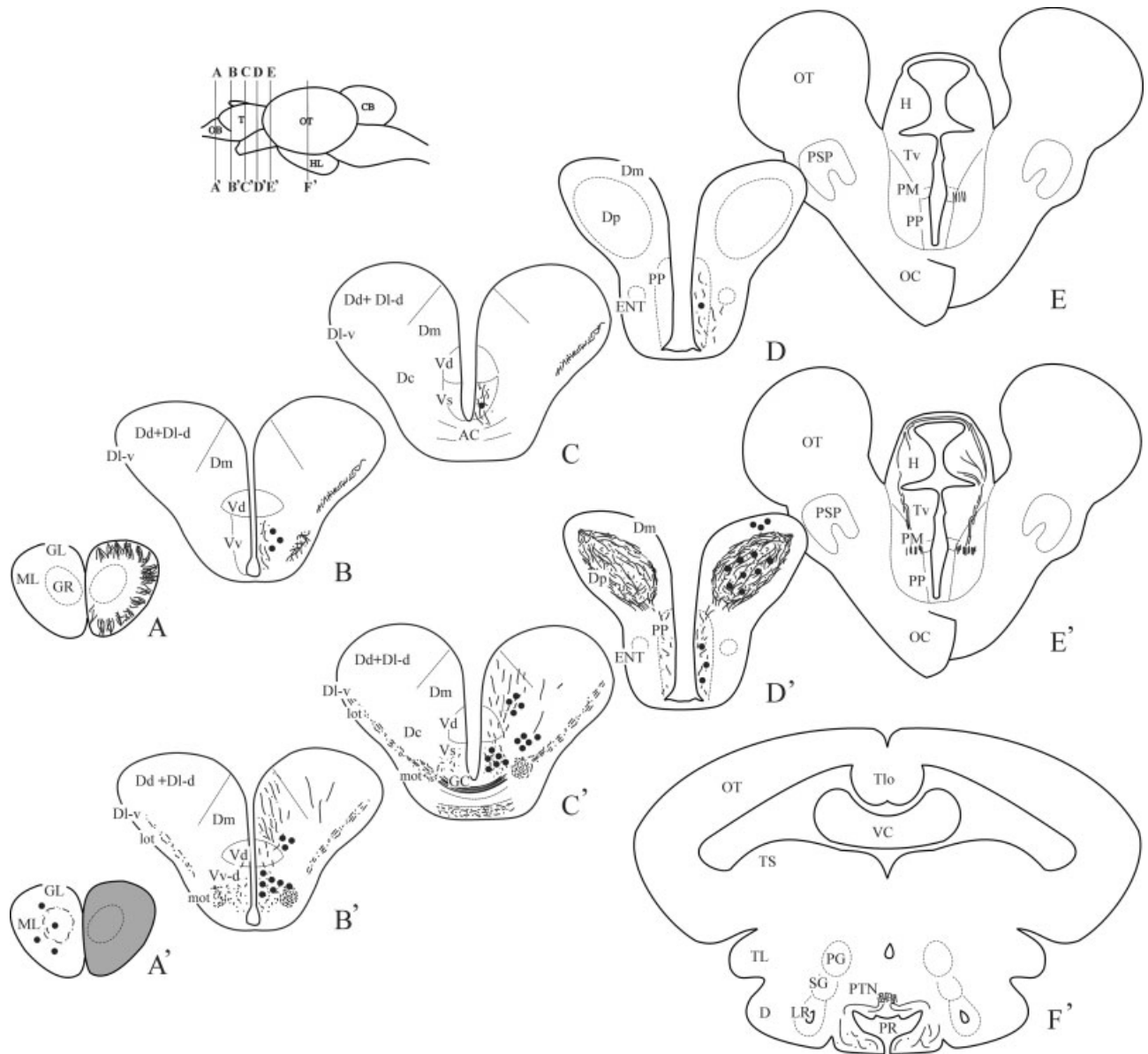


Fig. 1. A–F': Schematic drawings of selected transverse brain sections showing labeled fibers (dashes and lines) and perikarya (solid circles) after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to an olfactory nerve (A–E, upper series)

and the olfactory bulb (A'–F', lower series). The shaded area in A' represents the maximal application region. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

tracts reaching the ventral nucleus (Vv) and supracommissural nucleus (Vs) of V, the ventrolateral zone of D (Dl-v), the parvocellular preoptic nucleus (Fig. 1B–D), and the hypothalamus–posterior tubercle (not shown). In one of the three cases, a few labeled fibers were observed in Dp. Unlike in previous tracing studies in salmonids, a few retrogradely labeled perikarya were seen in Vv, Vs, and the preoptic region (Figs. 1B–D, 2A). At diencephalic levels, the labeled primary olfactory fibers ran through the medial preoptic area (Fig. 1D,E) to the caudal hypothalamic regions (medial tuberal regions, posterior tubercle). Because the targets of these caudal primary olfactory fibers in trout have been previously studied (Anadón et al., 1995), they will not be further described.

DiI application to the olfactory bulb

In these experiments, DiI was placed both in the dorsal and lateral regions of the bulb. In all cases, we observed retrogradely labeled perikarya and anterogradely labeled efferent fibers bilaterally in the telencephalon, mostly on the ipsilateral side (Fig. 1A'–D').

Retrogradely labeled perikarya. In the contralateral olfactory bulb, most labeled cells were found in the mitral cell layer, whereas only a few were located in the granular cell layer (Fig. 1A'). In the ipsilateral telencephalic lobe, we observed numerous labeled unipolar cells in the dorsal part of Vv (Vv-d; Figs. 1B', 2B). These Vv-d cells were located close to the ventricle, and their den-

drites coursed perpendicularly away from the ventricle. Some more laterally located labeled cells were intermingled among the labeled fibers of the medial olfactory tract (mot). At the level of the anterior commissure, several labeled cells with similar morphology to those labeled in Vv-d were observed in Vs (Fig. 1C'). Some large unipolar labeled cells were observed in the central zone of D (Dc) extending to the ventral portion of Dl-v, and a few labeled cells were also observed ventrolaterally in the medial zone of D (Dm; Figs. 1C', 2C). Some labeled cells were also observed in the ipsilateral posterior zone of D (Dp), but they were obscured by the high density of anterogradely labeled fibers found in this region. In the ipsilateral preoptic region, there were some faintly labeled cells in the parvocellular preoptic nucleus (Fig. 1D').

Labeled fibers. Labeled fibers crossing through the commissure of Goldstein (dorsal part of the anterior commissure) reached the contralateral bulb and were observed between the internal and the external granule cell layer (Fig. 1A'). Labeled olfactory fibers coursed caudally along the ipsilateral medial olfactory tract (mot) to innervate the ipsilateral Vv, Vd, Dm, and Dl-v (Fig. 1B', C'). The secondary olfactory fibers were sparsely distributed in the ipsilateral precommissural Dm, and some labeled axons also entered the ipsilateral dorsal plus dorsolateral zone of D (Dd+Dl-d). At the level of the anterior commissure thin labeled varicose fibers ran between other intertelencephalic commissural tracts reaching Vs. The lateral olfactory tract (lot) gave off labeled fibers that innervated Dl-v. At commissural and postcommissural levels, labeled fibers of the lot and the mot formed rich terminal fields in the Dp (central region) (Figs. 1D', 2D). Secondary olfactory fibers also projected to the preoptic area (Fig. 1D').

At the diencephalic level, several fascicles of secondary olfactory fibers passed bilaterally through the preoptic region and coursed in the ventral thalamus toward the habenula (olfactohabenular tract; Fig. 1E') and in the medial forebrain bundle to the posterior tubercle (olfactotuberal tract; Figs. 1F', 2E). Dorsally, labeled secondary olfactory fibers ran to the contralateral telencephalic lobe through the habenular commissure (Fig. 1E'), but the targets of these fibers were not determined.

Reciprocal experiments. Some cells (mainly mitral cells) were labeled in the olfactory bulbs after DiI application to Vv, Vs, Vp, Dl-v, and Dp (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004). Occasional cells were labeled after DiI application to Dd+Dl-d. In addition to the habenular connections described previously in adult trout (Yáñez and Anadón, 1996), after DiI application to the habenula affecting the habenular commissure some retrogradely labeled mitral cells were observed in the olfactory bulb (Fig. 2F). When DiI was applied to the posterior tubercle, a few labeled cells were seen both in the inner and the outer cellular layers of the olfactory bulb (Fig. 2G), confirming that these neurons are the source of the secondary olfactory fibers found in this region. The olfactory bulb afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

DiI application to the ventral area (subpallium) of the telencephalon

The ventral area of the trout telencephalon is composed of several medial nuclei rich in cells, namely the ventral (Vv), dorsal (Vd), supracommissural (Vs), and postcommissural (Vp) nuclei, as well as by the lateral (Vl) and

central (Vc) nuclei (Northcutt and Braford, 1980). Here, Vv, Vd, Vl, Vp, and Vs were selected for experiments of DiI application (see Materials and Methods section). Owing to the lipophilic nature of the tracer, the tracer was restricted to a small portion of each target area, approximately the size of the crystal of DiI. These experiments have revealed several subpallial afferents and efferents caudal to the application site (nuclei were injected after eliminate rostral structures, see Materials and Methods section). Many other experiments of DiI application to different brain structures were also used to reveal the cells of the subpallium projecting to different telencephalic and extratelencephalic targets.

Ventral and lateral nuclei of the ventral area

The results of the experiments in which DiI was applied to Vv are summarized in Figure 3. Retrogradely labeled neurons were observed in the telencephalon, diencephalon, mesencephalon, and at isthmo-rhombencephalic levels, mostly ipsilateral to the application site. Because the afferents revealed after application of DiI to Vl were rather similar to those of Vv, they will only be mentioned when differences appear as regards Vv connections. However, the only efferents of Vl revealed by reciprocal experiments were the projections to Dm (for details, see the accompanying paper, Folgueira et al., 2004), unlike Vv.

Retrogradely labeled cells. After DiI application to Vv from a caudal approach, a few labeled neurons were observed in the ipsilateral olfactory bulb (mitral cells), rostral Vv, and Vd (Fig. 3A). (Note that the anterior commissure was removed in this type of application). In cases of DiI application to Vv from a rostral approach, at telencephalic levels, retrogradely labeled cells were observed bilaterally in Vd and Vs (Figs. 3B,C, 4A). In one case, ipsilaterally labeled cells were also seen in the ventromedial region of Dl-v (Figs. 3C, 4B) and in Dp (Figs. 3D, 4C). More caudally, some retrogradely labeled perikarya were observed bilaterally in the preoptic nucleus (parvocellular and magnocellular parts; Figs. 3D, 4D), the suprachiasmatic nucleus (= anterior periventricular nucleus; see Discussion section), the lateral and anterior tuberal nuclei, periventricular regions of the dorsal and ventral thal-

Fig. 2. Photomicrographs of transverse sections through the telencephalon (A–D), posterior tubercle (E), and olfactory bulb (F,G) showing labeled neurons and fibers after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the ipsilateral olfactory nerve (A), olfactory bulb (B–E), habenula (F), and posterior tuberal nucleus (G). **A:** Section showing retrogradely labeled cells (arrowheads) in Vv. Arrow, small labeled tracts. **B:** Section showing retrogradely labeled cells (arrowheads) in Vv-d. **C:** Section showing retrogradely labeled cells in Dm (outlined arrowhead) and Dc (solid arrowheads). The black arrows point to anterogradely labeled fibers in Dm, and the outlined arrow to fibers in Dd+Dl-d. **D:** Section from an experiment of application of a very small DiI crystal to the olfactory bulb resulting in anterogradely labeling of a small number of fibers (arrows) in Dp. **E:** Section showing a field of anterogradely labeled fibers (arrow) in the posterior tuberal nucleus. **F:** Section showing labeled mitral cells (black arrowhead) and cells in the granule cell layer (outlined arrowhead). **G:** Section showing retrogradely labeled mitral cells (arrow). The arrowhead points to terminal dendritic branches in the glomerular region. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 100 μm in A,C,E; 75 μm in B,G; 125 μm in D,F.

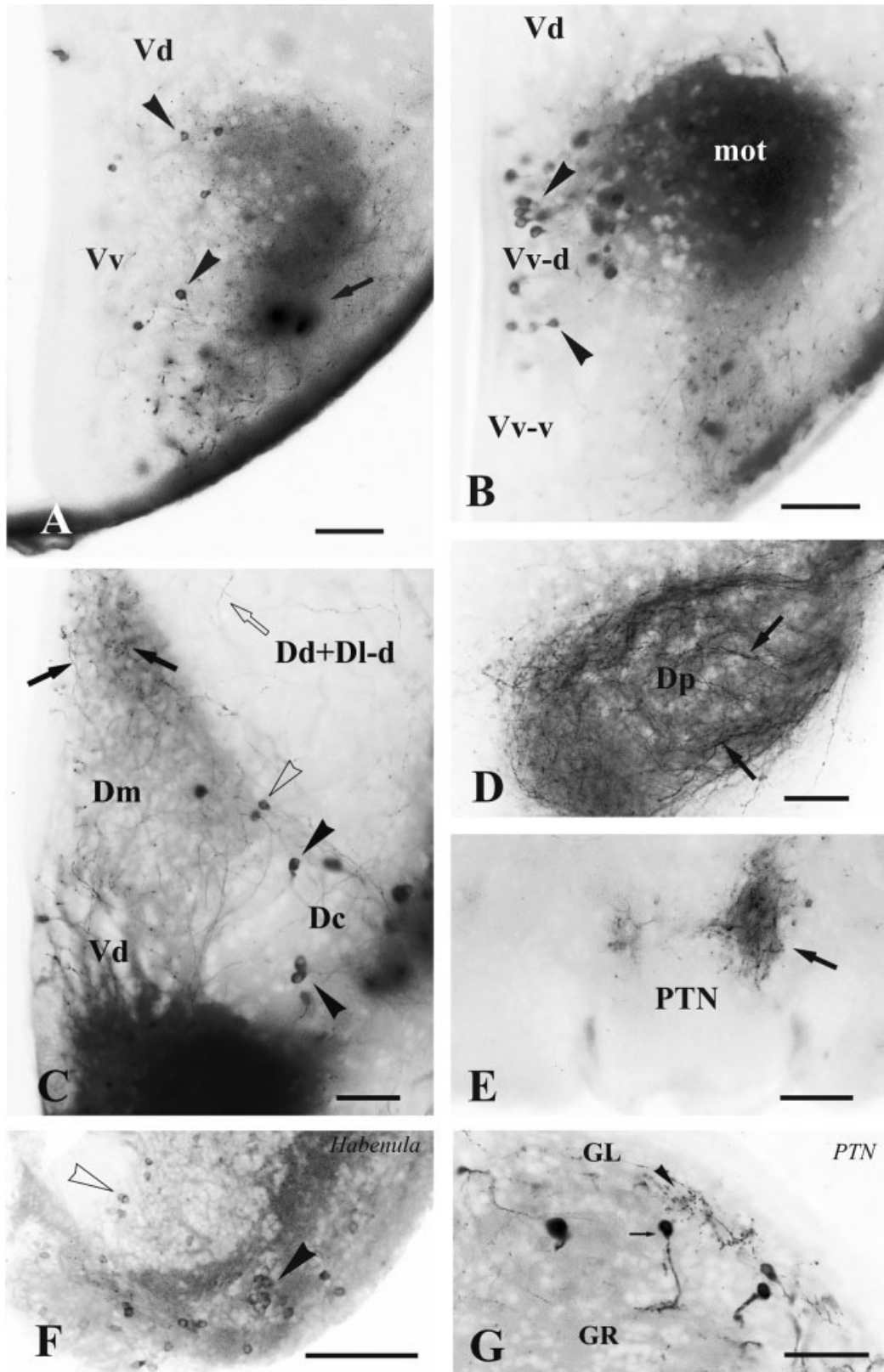


Figure 2

TABLE 2. Summary of Connections of the Olfactory Bulb and Ventral Telencephalic Area¹

Brain area	Afferents	Efferents
OB	OB, Vv-d, Vs, Dm, Dc, Dp, preoptic region	OB, Vv, Vs, Vp, Dd + Dl-d, Dl-v, Dp, PTN, LP
Vv (Vv-v, Vv-d)	OB, Vv, Vd, Vs, preoptic region, SC, Tv, Td, CP, LTN, ATN, PG, MB, TGN, HL, PTN, PL, periventricular PT, TS, SGN, LC, R, RF, CG	See Vv-v and Vv-d
Vv-d	See Vv	OB, Vv, Vs, Vp, Dm, Dd + Dl-d, Dl-v, Dc, Dp, preoptic region, Tv (eminencia thalami), Td, LTN, PG, MB, HL, SG, PTN, PL, periventricular PT, TS, LV, SGN, IP, R, RF*, CG
Vv-v	See Vv	Vv, Vs, Vp, Dm, Dd + Dl-d, Dl-v, Dc, Dp, Preoptic region, Tv (eminencia thalami), Td, LTN, ATN, PG, MB, HL, SG, PTN, PL, periventricular PT, TS, LV, IP, R, RF*
Vd	Vv, Vs, Dm, Dc, Dp, ENT, preoptic region, Tv, Td, CP, SC, LTN, ATN, PG, TGN, D, PTN, PL, periventricular PT, TS, LC, R, RF	Vv, Vs, Vp, Dm, Dd + Dl-d, Dl-v, Dc, Tv (eminencia thalami), LTN, MB, D, SG, PTN
Vs	OB, Vv, Vd, preoptic region, SC, Tv, Td, LTN, ATN, PG, TGN, PTN, PL, periventricular PT, TS, LC, RF	OB, Vv, Vd, Vp, Dm, Dd + Dl-d, Dl-v, Dc, Dp, Tv (eminencia thalami), LTN, ATN, PG, MB, HL, SG, PTN, PL, periventricular PT
Vp	OB, Vv, Vd, Vs, preoptic region, Td, LTN, ATN, periventricular hypothalamic nuclei, TS, R, lateral reticular tegmentum, RF	LTN, PTN

¹Efferent connections were only those confirmed by reciprocal experiments, except for the nuclei indicated by an asterisk (reciprocal experiments were not done). For abbreviations, see list.

amus, and the central posterior nucleus of the thalamus (Figs. 3E–G, 4E,F). More caudally, we observed retrogradely labeled neurons in the tertiary gustatory nuclei defined by Folgueira et al. (2003), and some labeled cells were also found in the nucleus of the lateral recess and in the preglomerular nuclei and the mamillary body complex (Figs. 3H,I, 4G). Notably, when the DiI crystal affected the dorsal part of Vv and Vs, a larger number of retrogradely labeled cells were observed in the suprachiasmatic nucleus. Moreover, several labeled cells were observed in the posterior tubercle (the nucleus of the posterior tubercle and associated periventricular nuclei), and a few cells were labeled around the lateral recess of the inferior hypothalamic lobe and in the diffuse nucleus (Figs. 3I,J, 4H,I). At more caudal levels, labeled cells were also observed in the laminar (medial) nucleus of the torus semicircularis (Figs. 3J, 5A,B), the secondary gustatory/visceral nucleus (Folgueira et al., 2003), and the isthmic medial raphe nucleus (Fig. 3K,L). Moreover, a few labeled cells were also seen in different reticular areas: the dorsal raphe nucleus, superior reticular nucleus, and the isthmic central gray (Figs. 3K,L, 5C–E). After DiI application to VI, a few retrogradely labeled (reticular) cells were found in the rhombencephalon between the level of entrance of the octaval nerve and the level of the viscerosensory column (Fig. 3M,N). Occasionally, large somata were also seen in the locus coeruleus after DiI application to Vv and VI.

Anterogradely labeled fibers. At telencephalic levels, using a rostral application approach, we observed anterogradely labeled fibers bilaterally in Dm, Dl-v, and Dp (Fig. 3B–D). A few faintly labeled fibers were also observed bilaterally in Dd+Dl-d (Fig. 3B,C). By using a caudal approach, some anterogradely labeled fibers were observed in Dm, Dd+Dl-d, and the granular layer of the olfactory bulb (Fig. 3A,B). At more caudal levels, labeled fibers were observed in the preoptic region and crossing in the habenular commissure (Fig. 3D,E). Several labeled fibers were also observed bilaterally in the preglomerular complex, around the lateral recess of the inferior hypothalamic lobes, the nucleus subglomerulosus, and the posterior tubercle (Figs. 3G–J, 4I). Some labeled fibers were seen in the dorsal and ventral thalamic region (Fig. 3F), as well as in the lateral and the anterior tuberal nuclei (Fig. 3H). Labeled fibers were also seen coursing through the medial telencephalic bundle, and running toward the dor-

sal mesencephalic tegmentum through the pretectum, where they were concentrated in a subventricular plexus in its dorsolateral part (pretectal paracommissural nucleus; see Discussion section; Fig. 3G,H). In the midbrain and isthmus, sparse labeled fibers appeared in the torus semicircularis, the lateral nucleus of the valvula, the secondary gustatory nucleus, the lateral region close to the interpeduncular nucleus, the raphe nucleus, and lateral reticular areas (Figs. 3I–L, 5C–F).

Reciprocal experiments. Experiments in which DiI was applied to Dm, Dd+Dl-d, and Dl-v, either in toto or using a rostral approach, showed some labeled cells in Vv (see the accompanying article). Application of DiI to Vv, Vs, Vp, Dc, and Dp, using caudal approaches, led to labeling of some Vv cells. Experiments of application of DiI to extratelencephalic Vv-projecting nuclei indicated that several of these nuclei maintain bidirectional connections with Vv. Application of DiI to the olfactory bulb led to labeling of cells in Vv-d.

After DiI application to the ventral thalamus (eminencia thalami), some retrogradely labeled cells and anterogradely labeled fibers were observed in Vv, mostly in its dorsal portion (Fig. 6A–C). The application of DiI to the dorsal thalamus led to labeling of fibers and occasional cells in Vv. Similarly, DiI application to the preglomerular nuclei and mamillary body led to labeling of cells and fibers in Vv (Fig. 6D,E).

Experiments in which DiI was applied to the lateral and anterior tuberal nuclei, the nucleus subglomerulosus, the diffuse nucleus and the periventricular cell layer of the lateral hypothalamic recess, led to labeling of cells in Vv and, therefore, confirmed these Vv efferent connections. Moreover, DiI application to the posterior tubercle (the nucleus of the posterior tubercle and associated periventricular nuclei) led to labeling of several cells and fibers in Vv (which confirms the reciprocal character of this connection), and of fibers in VI. The projections of Vv to the torus semicircularis, secondary gustatory nucleus, isthmic central gray, the lateral nucleus of the valvula cerebelli, and the superior raphe nucleus (Fig. 6G) were confirmed by reciprocal experiments (see also Folgueira et al., 2004). However, no cells were labeled in Vv after application of DiI to the pretectal paracommissural nucleus. After DiI application to the interpeduncular nucleus, some labeled cells were observed in both the dorsal and ventral parts of Vv. We did not do experiments involving DiI

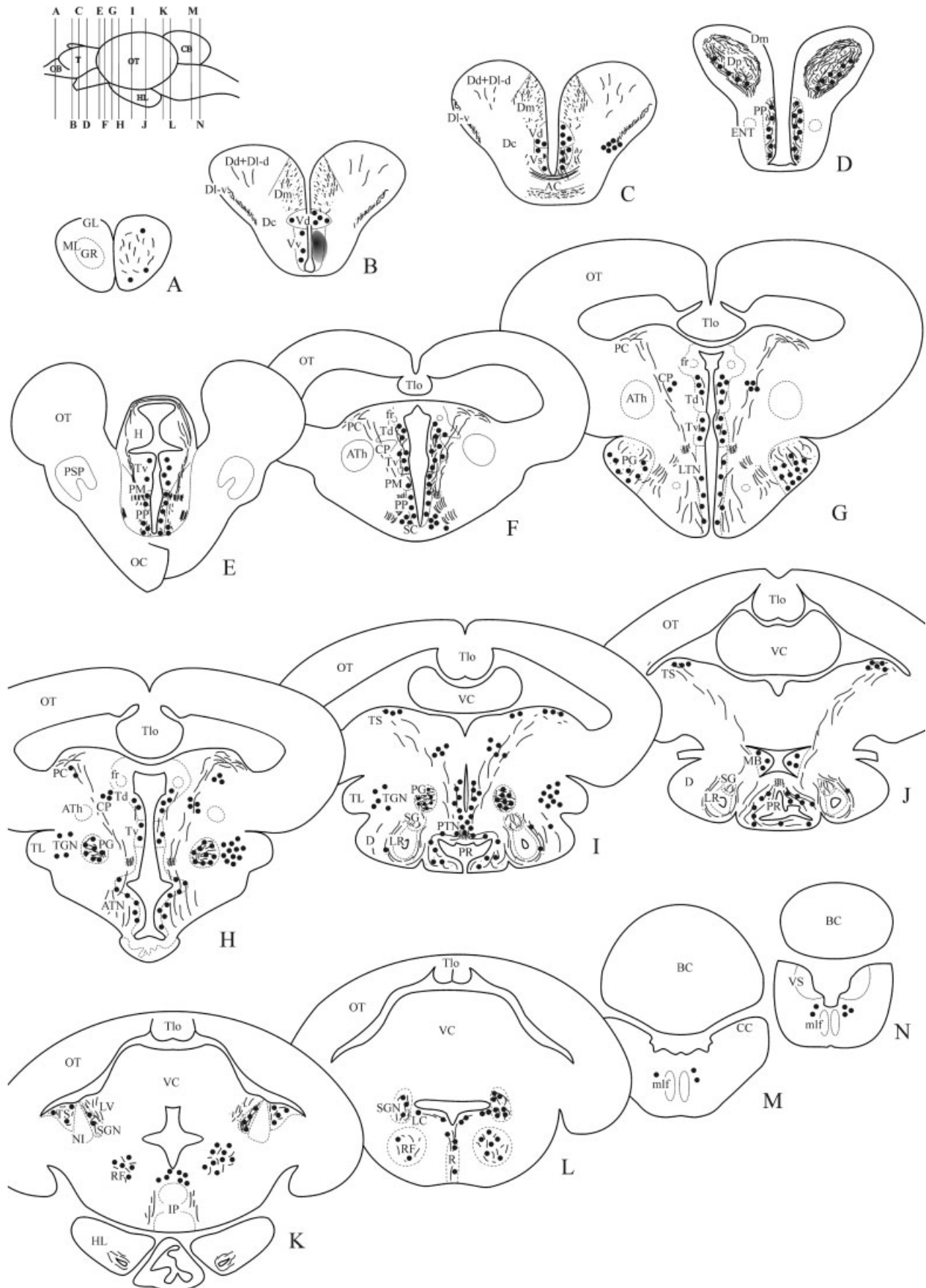


Fig. 3. A-N: Schematic drawings of transverse brain sections showing perikarya (solid circles) and fibers (dashes and lines) labeled after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Vv. The shaded area in B represents the application site. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

application to the lateral reticular area of the isthmus. The Vv afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Dorsal nucleus of the ventral area (Vd)

Retrogradely labeled cells. Application of DiI to Vd led to labeling of perikarya bilaterally in Vv, the entopeduncular nucleus and the preoptic nucleus, contralaterally in Vs and ipsilaterally in Dm, Dc, Dp, and caudal Dm (Dm3 of Northcutt and Braford, 1980; Figs. 7A–C, 8A,B). In the diencephalon, labeled perikarya were observed ipsilaterally in the ventral thalamus (eminencia thalami, caudal ventral thalamus), dorsomedial and central posterior nuclei of the dorsal thalamus, suprachiasmatic nucleus, tertiary gustatory nucleus, and the periventricular region of the lateral and anterior tuberal nuclei, and bilaterally in the preglomerular complex, posterior tuberal nucleus, the posterior hypothalamic lobe, periventricular nucleus of the posterior tubercle and, occasionally, in the diffuse nucleus (Figs. 7D–I, 8C,D). Further labeled cells were observed in the torus semicircularis and dorsal reticular tegmentum (bilaterally), the secondary gustatory nucleus and locus coeruleus (ipsilaterally), as well as in the superior raphe nucleus (Fig. 7H–K); in addition, a few reticular neurons were labeled in the midbrain and in the medullary superior, middle, and caudal reticular regions (Figs. 7L,M, 8E).

Anterogradely labeled fibers. Application of DiI to Vd led to labeling of numerous fibers in different brain regions. In the telencephalon, some Vd efferent fibers were observed in the contralateral Vd (Fig. 8A), in the ipsilateral Dd+Dl-d and Dl-v, around the anterior commissure, and bilaterally in Dp (Fig. 8B), caudal Dm (Dm3), and the preoptic nucleus (Fig. 7C). In the diencephalon, labeled fibers were observed bilaterally in the periventricular thalamus, periventricular hypothalamus (Figs. 7F,G, 8D), posterior tubercle, posterior hypothalamic lobe, the preglomerular complex (Fig. 7G–I) and, occasionally, in the nucleus subglomerulosus. Labeled fibers were also found coursing to the habenula (Fig. 7D), the torus semicircularis, dorsomedial tegmentum, and the region of the lateral nucleus of the valvula (Fig. 7I,J), but the origin of these fibers from Vd was not confirmed.

Reciprocal experiments. After application of DiI to Dm, Dd+Dl-d, Dl-v, Dc, Vv, Vs, and Vp, some labeled cells were found in Vd (Fig. 8F,G; see also the accompanying article, Folgueira et al., 2004). In addition, labeled cells were observed in Vd after DiI application to the eminentia thal-

ami, lateral tuberal nucleus (a few cells), diffuse nucleus (occasional cells in rostral Vd), posterior tuberal nucleus (in caudal Vd), nucleus subglomerulosus (occasional cells), and the preglomerular complex, mainly after application of DiI to the mamillary body (Fig. 8H,I; see also the accompanying article, Folgueira et al., 2004). The Vd afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Supracommissural nucleus of the ventral area (Vs)

Retrogradely labeled cells. Application of DiI to Vs was done in sectioned brains, either by caudal or rostral approaches. The results of rostral approach experiments were rather similar to those of applications to Vv. Numerous labeled perikarya were observed bilaterally in the preoptic nucleus, suprachiasmatic nucleus, anterior tuberal nucleus, preglomerular complex, periventricular nucleus of the posterior tubercle, posterior tuberal nucleus, posterior hypothalamic lobe, and ipsilaterally in the tertiary gustatory nucleus and the torus semicircularis. Some labeled neurons were also observed in the ventral and dorsal thalamus (bilaterally). A few retrogradely labeled cells were found in the locus coeruleus, and small neurons were also observed in the reticular region of the medulla from the level of entrance of the octaval nerve to the level of the viscerosensory vagal column (Fig. 9A).

Application of DiI to Vs by using a caudal approach led to labeling of cells bilaterally in Vv (numerous cells) and Vd (a few), and ipsilaterally in the olfactory bulb (cells in the granule cell layer, and a few cerebrospinal fluid-contacting cells in the ventral wall of the olfactory ventricle). This type of approach also led to anterograde ipsilateral labeling of fibers in Dm, Dd+Dl-d, and olfactory bulb, and bilateral fiber labeling in Vd.

Reciprocal experiments. Reciprocal experiments showed the presence of labeled neurons in Vs after application of DiI to the olfactory bulb, Dm, Dc, Dl-v, Dd+Dl-d, Dp, Vv, Vd, and Vp, and after DiI application to the ventral thalamus (eminencia thalami), the anterior and lateral tuberal nuclei, posterior hypothalamic lobe (Fig. 9B), posterior tuberal nucleus (Fig. 9C), periventricular nucleus of the posterior tubercle, medial region of the inferior hypothalamic lobe, diffuse nucleus, nucleus subglomerulosus, and preglomerular complex (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004). The Vs afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Fig. 4. Photomicrographs of transverse sections through the brain showing labeled neurons and fibers after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Vv. **A:** Section at the level of the anterior commissure showing labeled cells (arrowheads) in the contralateral Vd and Vs (arrow). **B:** Labeled neurons (arrowheads) scattered in the ventral region of Dl-v. **C:** Section through the caudal part of D showing labeled neurons (arrowheads) in the Dp. In the ventral part of Dp, the very high density of labeled processes hides the visibility of the numerous labeled perikarya. **D:** Section through the parvocellular preoptic nucleus showing numerous labeled neurons (arrowheads). Note the paler entopeduncular nucleus. **E:** Section through the thalamus showing labeled neurons in the dorsal (arrowheads) and ventral thalamus (arrow). **F:** Section of the anterior hypothalamus showing labeled neurons (arrowheads) in the periventricular part of the lateral tuberal

nucleus. **G:** Section through the region of the posterior tubercle showing labeled neurons in the periventricular nucleus (outlined arrowhead), medial preglomerular nucleus, and in the tertiary gustatory nucleus (thick arrow). Note also labeled cells of the central posterior nucleus of the thalamus (arrow) and the anterior tuberal nucleus (arrowhead). The white star indicated the medial forebrain bundle. **H:** Section showing labeled neurons in the posterior tuberal nucleus (arrowheads) and the periventricular nucleus of the posterior tubercle (arrows). Note strong fiber labeling of the ipsilateral medial forebrain bundle (white star). **I:** Labeled neurons (arrowheads) and fibers in the mamillary body and posterior lobe. Note a DiI-labeled tracts (white star) passing to the posterior hypothalamic lobe and the mamillary body. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 100 μ m in A,C,D,H,I, 75 μ m in B,F, 150 μ m in E, 200 μ m in G.

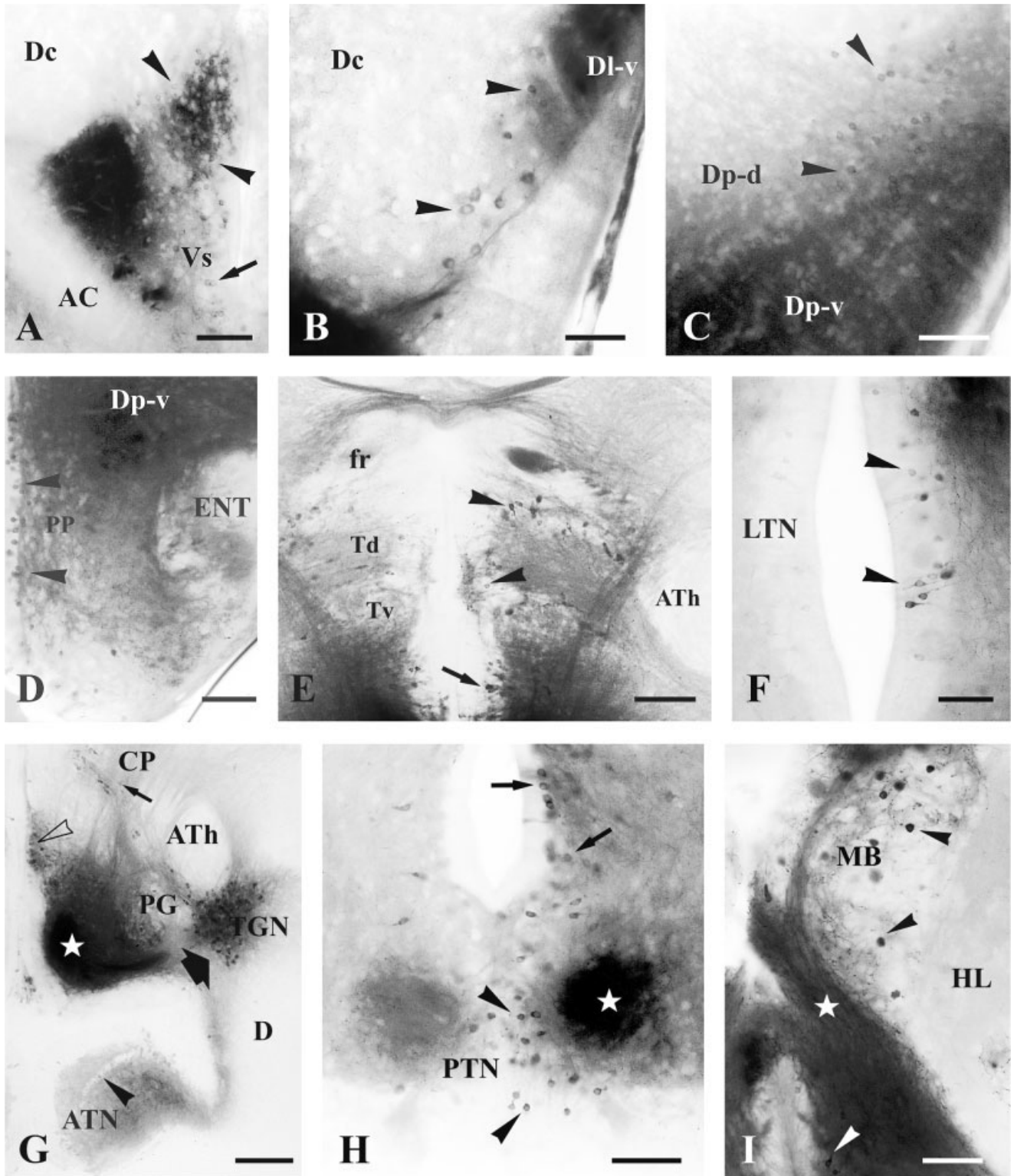


Figure 4

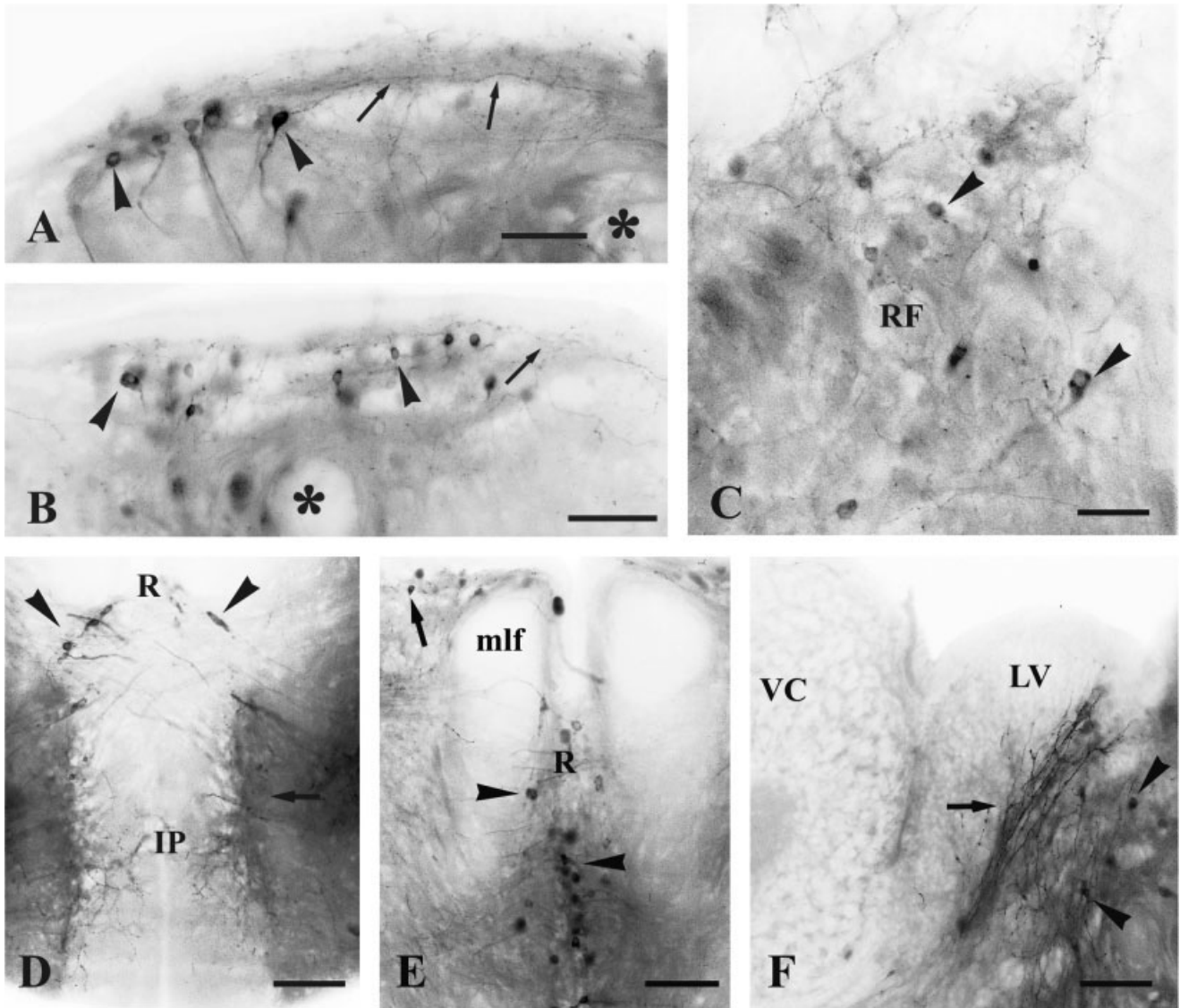


Fig. 5. Sections showing labeled neurons in the brainstem after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Vv. **A,B:** Labeled neurons (arrowheads) in the laminar nucleus of the torus semicircularis. The arrows point to labeled axons. Asterisk, pretectal (paracommissural)-cerebellar tract. **C:** Detail of labeled reticular cells (arrowheads) of the caudal mid-brain. **D:** Labeled neurons (arrowheads) in the superior raphe nucleus. Note plexuses of labeled fibers (arrow) close to the interpedun-

cular nucleus. **E:** Section through the pretrigeminal region showing labeled neurons of the intermediate raphe nucleus (arrowheads) and the central gray (arrow). **F:** Section showing anterogradely labeled fibers ending in the lateral nucleus of the valvula (arrow) and cells in the torus semicircularis (arrowheads). All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 75 μm in A, 100 μm in B,F, 60 μm in C, 225 μm in D, 125 μm in E.

Posterior nucleus of the ventral area (Vp)

Application of DiI to Vp in sectioned brains using a rostral approach led to labeling of cells in the preoptic nucleus, hypothalamic anterior and posterior periventricular nuclei, anterior and lateral tuberal nuclei, caudal dorsal thalamus, torus semicircularis, lateral reticular tegmentum, superior raphe nucleus, and a few reticular cells located lateral to the medial longitudinal fascicle from the trigeminal to the vagal region. In addition, abundant labeled fibers were observed in the medial forebrain bundle, the anterior tuberal nucleus (Fig. 9D), and the

periventricular region of the inferior hypothalamic lobe. It is worth noting that some labeled fibers were also observed in the lateral nucleus of the valvula, and numerous fibers ended in the dorsal neuropil of the interpeduncular nucleus (Fig. 9E). Application of DiI using a caudal approach permitted the study of the rostral connections of Vp. In these experiments, labeled cells were observed in the ipsilateral Vs, Vd (a few), Vv, and olfactory bulb (a few granular and mitral cells). Anterogradely labeled fibers were observed bilaterally in Dp, Dl, and Vd, and ipsilaterally in Dm.

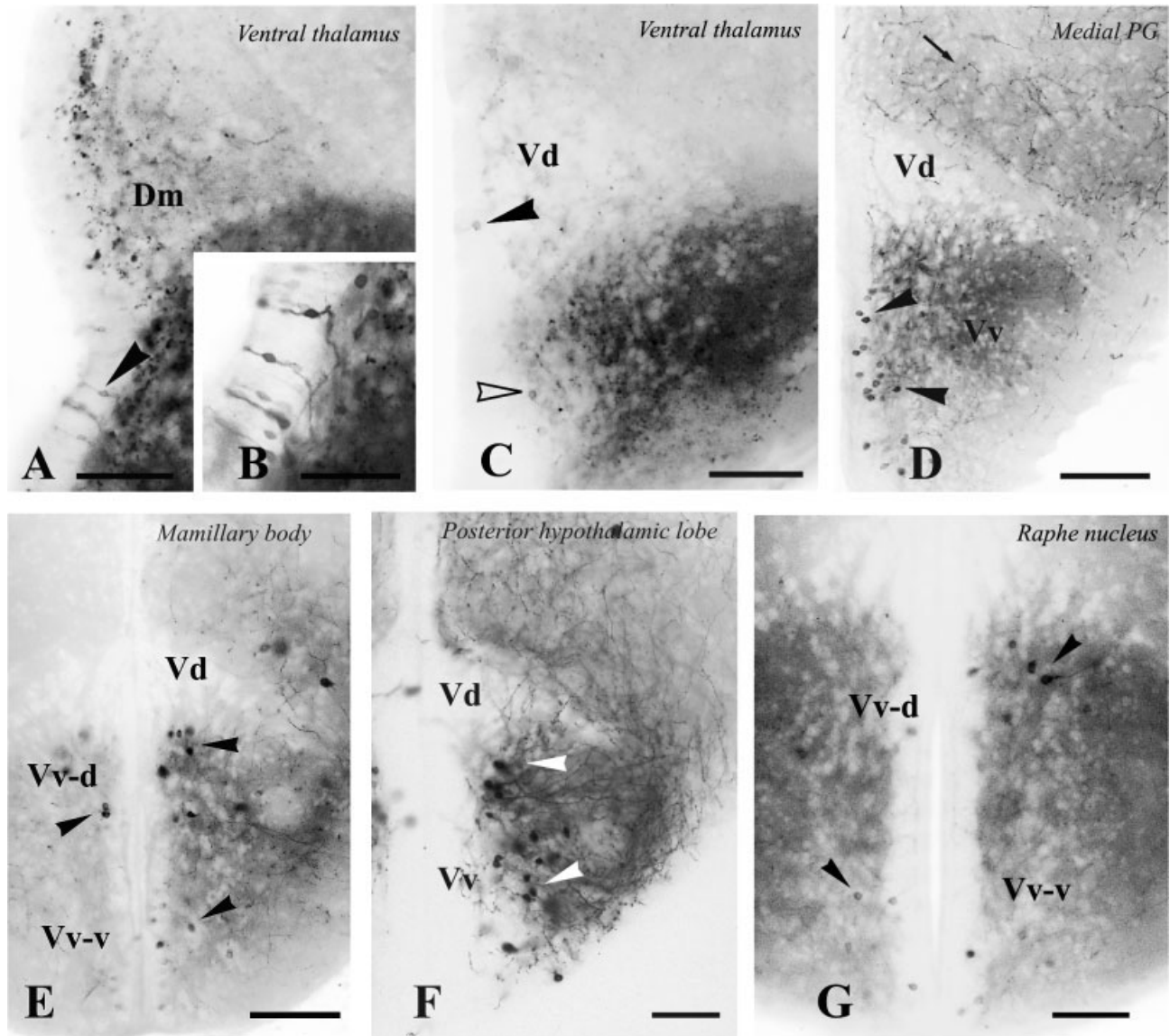


Fig. 6. A–G: Photomicrographs of transverse sections of the subpallium showing retrogradely labeled neurons in Vv after application of 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) to presumed targets of Vv. The point of DiI application is indicated in the top of the figures (A–C, ventral thalamus; D, medial preglomerular nucleus; E, mamillary body; F, posterior hypothalamic lobe; G, raphe nucleus). **A,B**: Labeled bipolar cells (arrowhead in A) in the periventricular layer of the most rostral Vv (retrobulbar region). Note also labeled fibers in the rostralmost Dm. **C**: Labeled cells in

precommissural Vv (outlined arrowhead) and a faintly labeled cell in Vd (black arrowhead). **D**: Section showing numerous labeled cells (arrowheads) in Vv and labeled fibers (arrow) in rostral Dm. **E**: Section showing labeled neurons (arrowheads), mainly in the ipsilateral Vv. **F**: Labeled neurons in Vv (arrowheads) and numerous labeled fibers in Vv and rostral Dm. **G**: Labeled cells in Vv and Vd (arrowheads). All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 125 μm in A, 100 μm in B,F,G, 150 μm in C–E.

Reciprocal experiments only clearly labeled cells in Vp after DiI application to the posterior tuberal nucleus (Fig. 9F,G) and the lateral tuberal nucleus. The Vp afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

DISCUSSION

The principal aim of this hodological study and the accompanying article (Folgueira et al., 2004) was to per-

form the first comprehensive analysis of the connections of the telencephalon in a salmonid species. The connections of the olfactory bulb and ventral telencephalic area are schematically summarized in the Figure 10. Integrative studies on telencephalic projections have only been performed in the advanced teleost *Sebastiscus marmoratus*, by using HRP transport and degeneration methods (Murakami et al., 1983).

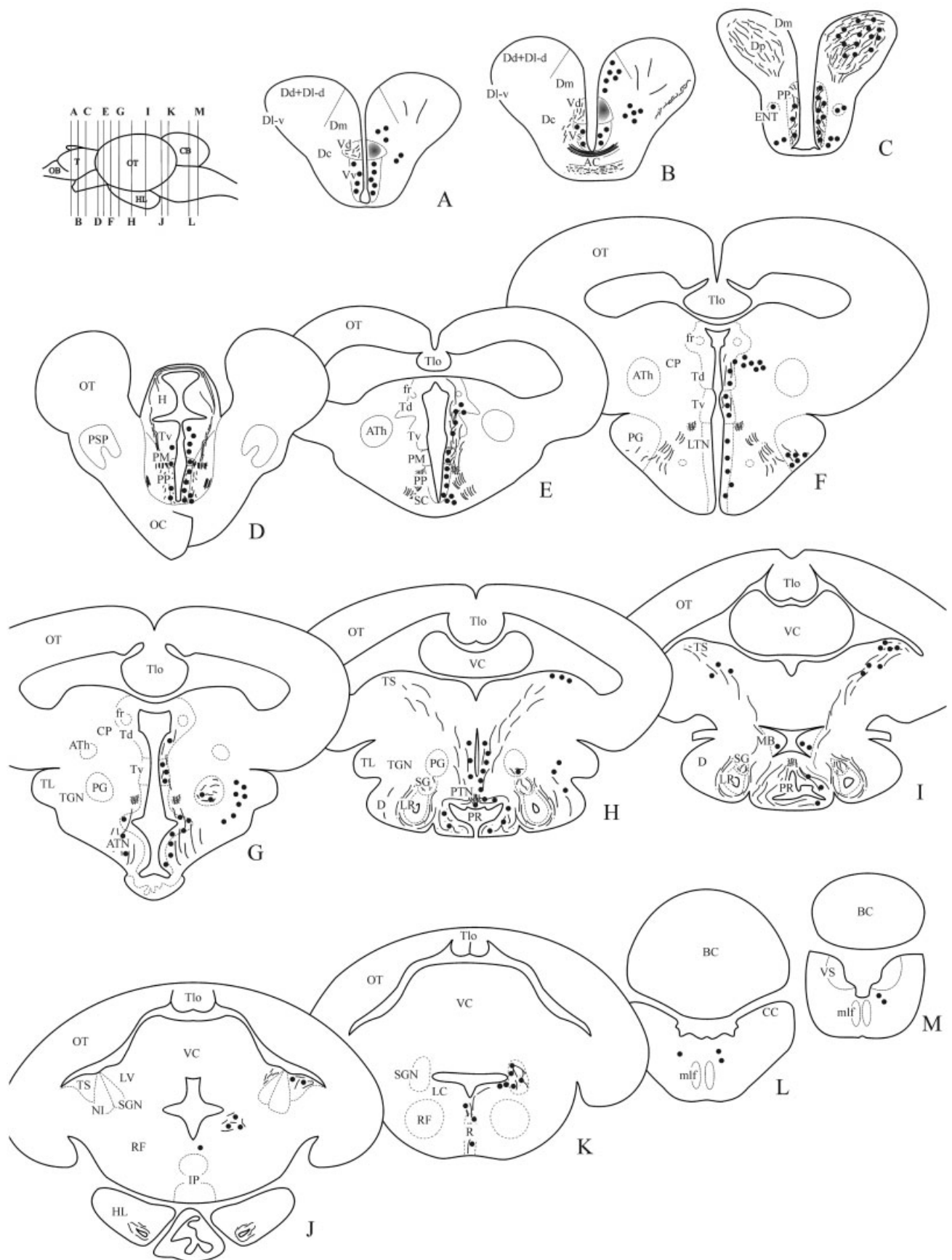


Fig. 7. **A-M**: Schematic drawings of transverse brain sections showing perikarya (solid circles) and fibers (dashes and lines) labeled after 1,1'-diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the Vd. The shaded areas in A,B represent the application site. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

Methodological considerations: DiI methodology

The DiI methodology used in fixed tissue is highly sensitive (Godement et al., 1987; Holmqvist et al., 1992) and offers the possibility of tracing the connections of very small structures, or of structures that are very difficult to access by other means using highly localized applications. However, results of DiI-tracing experiments in the central nervous system should always be interpreted with caution for several reasons.

First, because of the possible diffusion of this lipophilic tracer to neighboring areas. Because DiI is applied as a water-insoluble crystal, diffusion is primarily limited to the area immediately adjacent to the crystal, the amount of tracer incorporated into cell membranes in this area is enough to show intense labeling far from the area of interest. When using long incubation periods, it is possible to get nonspecific diffusion of the tracer from the application point to adjacent zones, because DiI has a very low but nonnegligible aqueous solubility. Regions near the point of application often acquire some fluorescence nonspecifically, which makes difficult the analysis of possible connections with immediately adjacent areas. We have tried to minimize this problem by increasing the number of experiments and optimizing (reducing) incubation times.

Second, because of the problem of mixed (i.e., both retrograde and anterograde) diffusion of DiI from the branching points of fibers (tracts, collateral fibers) passing through the application area. When applying DiI to a target of a nucleus giving rise to bifurcated fibers also projecting to a second nucleus, the existence of labeled fibers in the second target can lead wrongly to the conclusion that the first target projects on the other. This type of problem can be solved by applying DiI to the second target.

Third, because of possible labeling of tracts passing through a nucleus or region but not projecting to them. This problem surfaces particularly when studying connections of nuclei of regions of passage of main tracts or commissures. In most cases, this problem can be solved by applying DiI to the neuronal source of the tract. To a different extent, similar methodological problems may also affect the results of experimental studies based on application of other types of neuronal tracer (HRP, biocytin, dextran amine).

In our experience, there is a further type of problem when using DiI tracing methods that may lead to erroneous conclusions (unpublished observations). Specifically, in trout, DiI generally fails to diffuse efficiently along highly myelinated pathways (unpublished observations), which may lead to false-negative results (i.e., to nondetection of a connection between centers). To minimize this problem, we used small juvenile specimens that show a brain organization similar to that of adults but with poorly myelinated pathways. With this approach, it is possible that some late-appearing connections will not be demonstrated in juveniles (such as the galaninergic innervation observed only in the adult trout optic tectum; see Rodríguez et al., 2003), but comparison of present results with those obtained in the telencephalon of other teleosts with other tracing methods (see below) indicates that the present approach reveals most, if not all, the extratelen- cephalic connections reported in other teleosts.

Olfactory telencephalon of the trout

Primary olfactory/terminal nerve connections. Discrimination between extrabulbar primary olfactory projections and the components of the terminal nerve in trout is possible with various immunocytochemical markers, as discussed previously (Becerra et al., 1994; Anadón et al., 1995). However, because in our experiments DiI was applied to an olfactory nerve, which also contains fibers of the terminal nerve system, the labeled extrabulbar processes probably include both olfactory and terminal nerve components. The targets of the olfactory nerve fibers revealed after DiI application to an olfactory nerve are in agreement with the results of previous studies in salmonids with tract tracing methods and immunocytochemical markers (Bazer et al., 1987; Riddle and Oakley, 1992; Becerra et al., 1994; Anadón et al., 1995). Efferent projections from the olfactory epithelium were predominantly distributed in the glomerular layer of the olfactory bulb, but several extrabulbar primary olfactory/terminal nerve projections also reached the ventral area of the telencephalon, the preoptic region, and the posterior tubercle. In addition, some labeled olfactory nerve fibers were observed in Dp, as reported in other teleosts (Szabo et al., 1991; Honkanen and Ekström, 1992) and in sturgeon (Huesa et al., 2000).

The presence of a few labeled neurons in Vv, Vs, and the preoptic area after DiI application to an olfactory nerve suggests that these cells are related to the terminal nerve system, which was also affected by this DiI application. In developing salmonids, the terminal nerve system exhibits GnRH- and FMRF-immunoreactive cells that appear to migrate from the terminal ganglion (located below the olfactory epithelium) to the ipsilateral olfactory nerve and the ventral telencephalic area during development (Chiba et al., 1994; Castro et al., 2001). In the tilapia, the ganglion of the terminal nerve receives a projection from neurons located in Vv-Vs (Yamamoto and Ito, 2000). The scarcity of these neurons in trout make it difficult to assess whether these labeled Vv, Vs, and preoptic neurons represent cells that project to terminal nerve ganglion cells intermingled in the olfactory nerves or whether they are intratelencephalic terminal ganglion cells with peripheral processes coursing in the olfactory nerves. Because DiI application in Dp also led to labeling of neurons in the same Vv, Vs, and preoptic regions (see the accompanying article), we cannot rule out that the "primary olfactory/terminal fibers" observed in Dp might represent collaterals of axons of central neurons projecting toward the terminal/olfactory nerves.

Telencephalic connections of the olfactory bulb. The telencephalic projections of the olfactory bulb of adult rainbow trout have been charted by using degeneration methods by Northcutt and Davis (1983) and those of *Onchorhynchus tshawytscha* studied by using biotinylated dextran amine as a tracer (Matz, 1995). These studies indicated the existence of heavy olfactory projections on Dp, and also projections to some subpallial zones (Vv, Vd, Vi, Vc, Vp). Present results (Fig. 10) in the trout after DiI application to the olfactory bulbs largely confirm these projections in salmonid species. However, these authors have not described olfactory bulb afferents, with the exception of those coming from the contralateral bulb. In both rainbow trout and *O. tshawytscha*, the secondary olfactory projections reached the contralateral olfactory

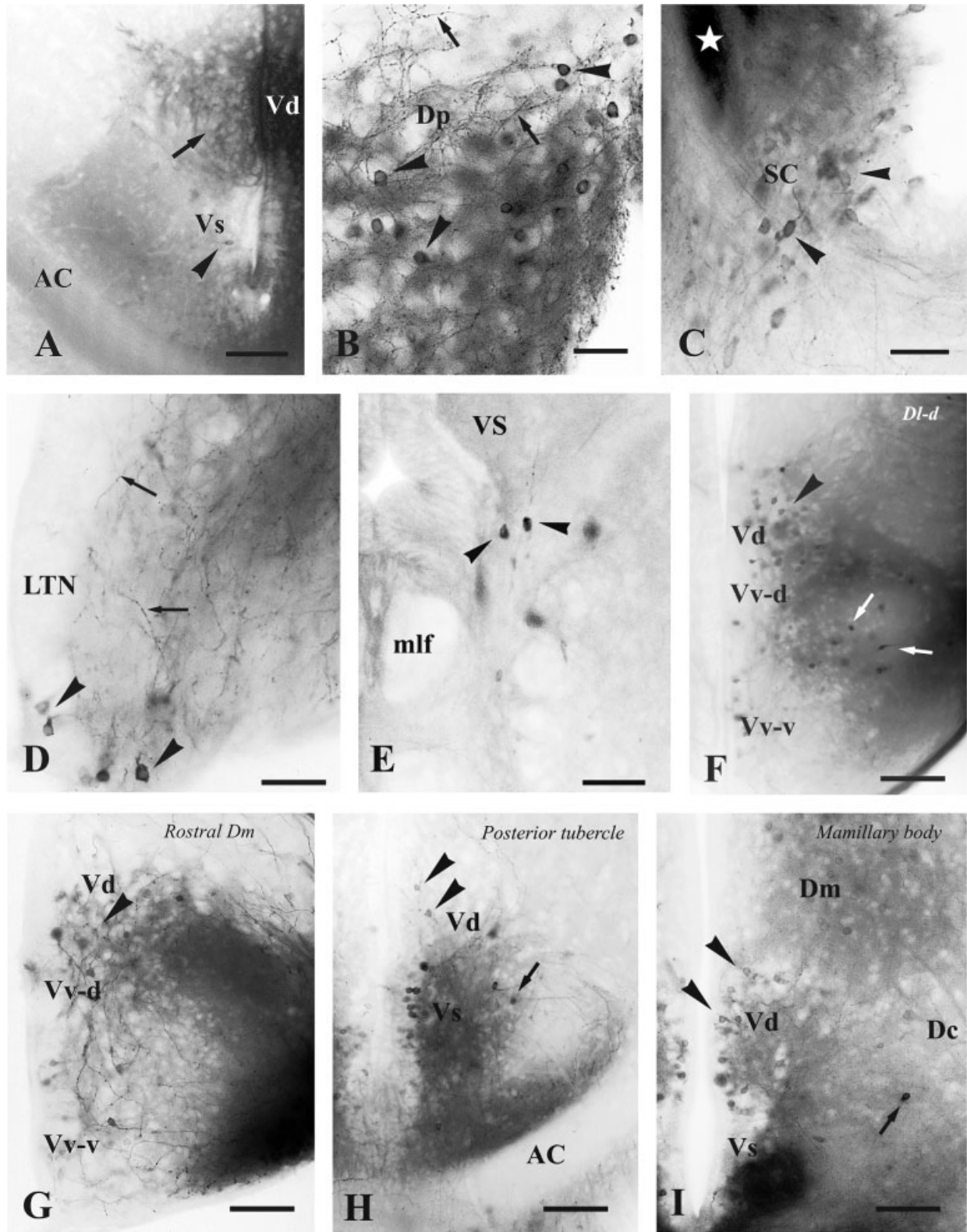


Figure 8

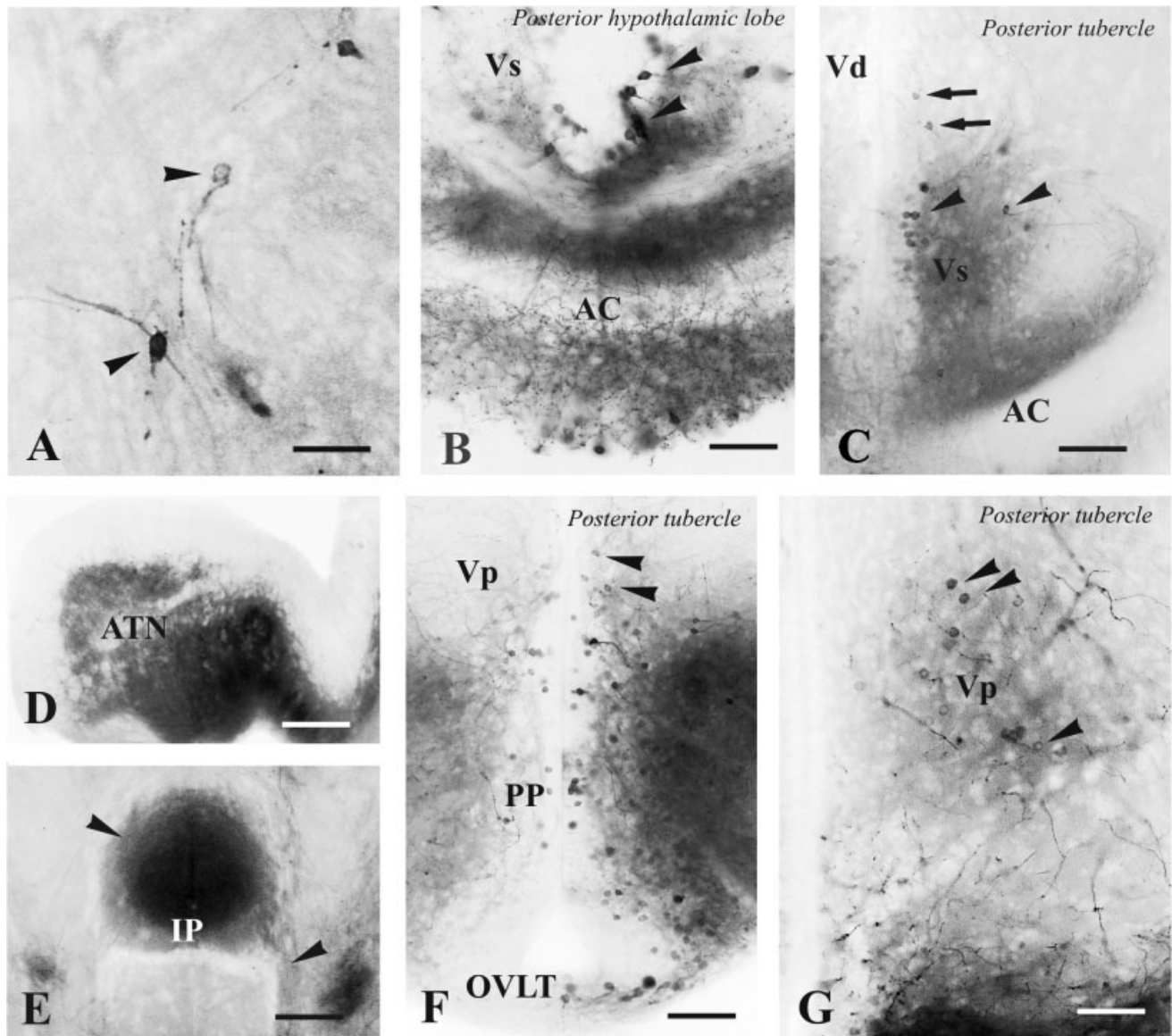


Fig. 9. **A:** Transverse section at the level of the vagal region showing retrogradely labeled small reticular cells (arrowheads) after tracer application to Vs. **B,C:** Transverse sections through the telencephalon at commissural level showing labeled neurons in Vs (arrowheads) after tracer application to the posterior hypothalamic lobe (B) and posterior tuberal nucleus (C). In C, note also retrogradely labeled cells in Vd (arrows). **D:** Section through the anterior tuberal nucleus showing a large number of labeled fibers after 1,1'-diocetadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to

Vp. **E:** Section through the interpeduncular nucleus after DiI application to Vp showing labeled fibers (arrowheads) mainly in the dorsal neuropil. **F,G:** Transverse sections through the caudal telencephalon showing labeled cells in Vp (arrowheads) after tracer application to the posterior tuberal nucleus. Note also in F labeled cells in the organum vasculosum of the terminal lamina and parvocellular part of the preoptic nucleus. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 45 μm in A; 75 μm in B,G; 100 μm in C,F; 125 μm in D,E.

Fig. 8. A-I: Transverse sections through the telencephalon (A,B), suprachiasmatic region (C), lateral tuberal nucleus (D), and reticular region of the rhombencephalon at octaval levels showing labeled neurons (arrowheads) and fibers (arrows) after 1,1'-diocetadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Vd, and sections through Vd showing labeled neurons after application of DiI to D1-d (F), rostral part of Dm (G), posterior tuberal nucleus (H), and mammillary body (I). **A:** Contralateral side to the application site showing labeled neurons in Vs (arrowhead) and fibers in Vd (arrow). **B:** Section showing labeled perikarya (arrowheads) and fibers (arrows) in Dp. **C:** Section showing labeled bipolar neurons (arrowheads) of the suprachiasmatic nucleus. Star, lateral forebrain bundle. **D:** La-

tered perikarya (arrowheads) in the ventral region of the lateral tuberal nucleus. Arrows, beaded fibers. **E:** Small labeled neurons (arrowhead) in the medial rhombencephalic reticular formation. **F:** Section showing labeled cells in Vd (arrowhead) and Vv. Note that labeled cells extend to rather lateral regions (arrows). **G:** Section showing labeled cells in Vd (arrowhead) and Vv. **H:** Section showing labeled cells in Vd (arrowheads) and Vs. Note a laterally located labeled cell (arrow). **I:** Section showing labeled perikarya in Vd (arrowheads). Note also a laterally migrated labeled cell (arrow). All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 125 μm in A; 50 μm in B; 60 μm in C; 75 μm in D,E; 150 μm in F-I.

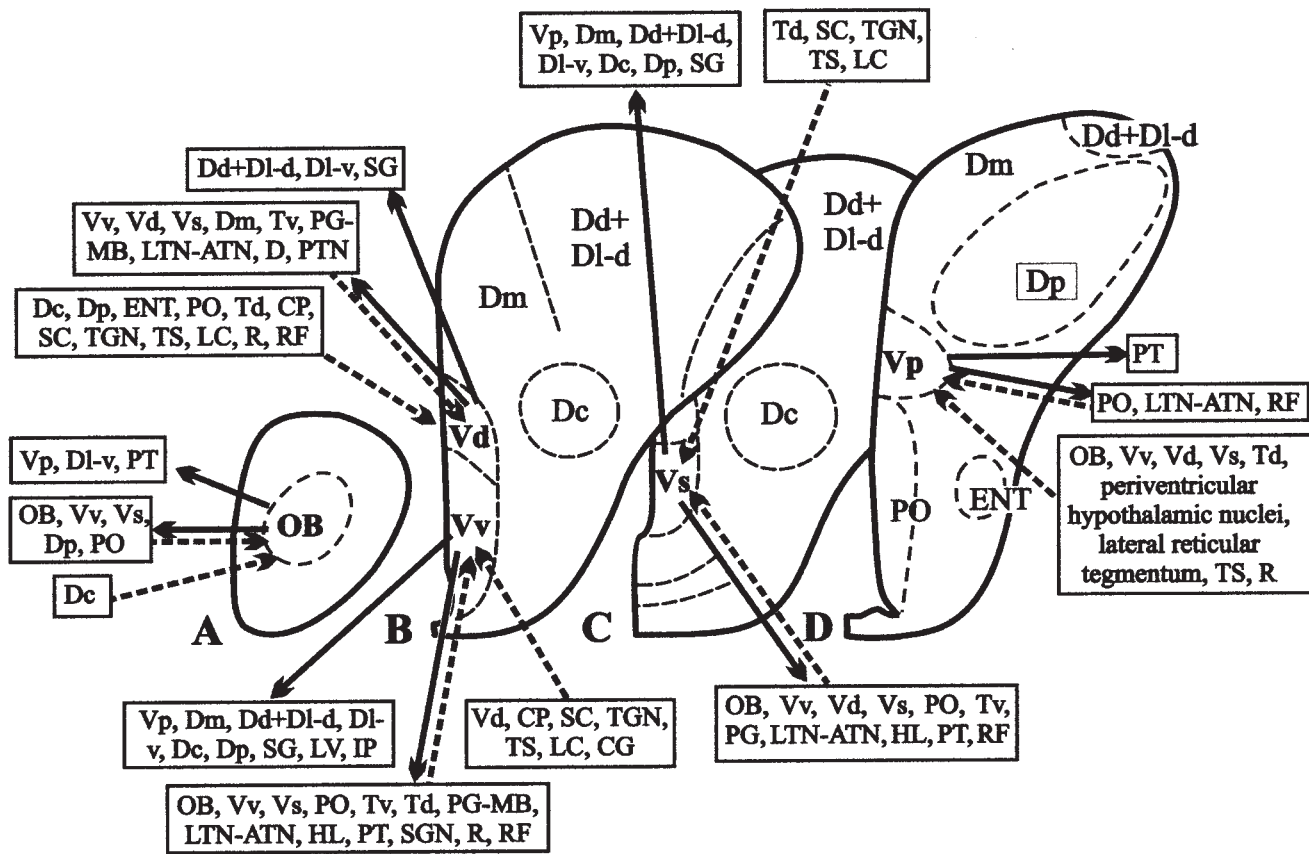


Fig. 10. A-D: Schematic drawings of transverse sections of the trout telencephalon at bulbar (A), precommissural (B), commissural (C), and caudal (D) levels summarizing the confirmed connections of the olfactory bulb and subpallium. For the sake of clarity, the centers

maintaining afferent (dashed arrows), efferent (continuous arrows), and reciprocal connections with each telencephalic region are indicated in separated boxes. For abbreviations, see list.

bulb, the ventral telencephalon, the DI-v, and the posterior zone of the dorsal telencephalon (Dp). Accordingly, Dp and DI-v (in part corresponding to the nucleus taenia of other authors) appear to represent the secondary olfactory integration centers of the salmonid dorsal telencephalon (pallial olfactory regions). DI-v is also traversed by the lateral olfactory tract. These telencephalic projections roughly correspond to those found in other teleosts with either the Fink-Heimer method or with application of different neuronal tracers (Finger, 1975; Bass, 1981a; Davis et al., 1981; Ebbesson et al., 1981; Murakami et al., 1983; Northcutt and Davis, 1983; Prasada Rao and Finger, 1984; von Bartheld et al., 1984; Levine and Dethier, 1985; Rooney et al., 1992; Sas et al., 1993; Riedel and Krug, 1997). In the bichir (Cladistia), the olfactory bulb projects to the medial division of the pallium (P1; Northcutt and Bradford, 1980; von Bartheld and Meyer, 1986), whereas in a sturgeon (Chondrostei) the main targets of axons from the olfactory bulb appear to be the posterior and medial pallium (Huesa et al., 2000). Dm was also suggested as an olfactory processing area in tilapia (Yamamoto and Ito, 2000). Although we also found some DiI-labeled fibers in the precommissural Dm of trout, they probably represent fibers of neurons projecting simultaneously to the olfactory bulb and Dm, because no labeled cells were observed in the bulbs after DiI application to

Dm (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004). Accordingly, our results suggest the possibility that labeled fibers in Dm represent collaterals from subpallial (Vv, Vs) neurons projecting to the bulbs and/or of the ventrolateral labeled population observed in Dm itself after DiI application to the bulbs. The same holds for the scarce labeled fibers observed in Dd+DI-d after application of DiI to the olfactory bulbs, because Dd+DI-d also receives fibers from Vv and Vd (see the accompanying article). However, in one Dd+DI-d case (see the accompanying article), some labeled cells were seen in the ipsilateral olfactory bulb. Olfactory projections to the posterior tuberal nucleus have been reported in several teleost species.

Bulbopetal neurons. Our results showing that the olfactory bulb of *O. mykiss* receives information from other telencephalic areas, mainly from the ventral telencephalon (Vv-d, Vs, and the preoptic area) and, likely, from some ipsilateral cells located in Dc and in the most dorsal portion of postcommissural levels of Dm, confirm and expand the results obtained with anterograde degeneration in *O. nerka*, showing bulbopetal projections from Vs (Shiga et al., 1985b). Intratelencephalic bulbopetal neurons similar to those observed in the rainbow trout (present results) have also been reported in other teleosts (Oka, 1980; Bass, 1981b; Murakami et al., 1983; Prasada-Rao and Finger,

1984; Levine and Dethier, 1985; Sas et al., 1993) and in *Polypterus* (von Bartheld and Meyer, 1986), so the discrepancy with respect to previous results in *O. tshawytscha*, in which no bulbar afferents were described with the exception of those from the contralateral bulb (Matz, 1995), appears to be due to methodological differences, possibly because the biotinylated dextran amine (10 kDa) used in Matz's study was preferentially transported anterogradely (Reiner et al., 2000). In other teleosts, numerous Dp cells project to the olfactory bulbs (Bass, 1981b; Prasada Rao and Finger, 1984; von Bartheld et al., 1984; Levine and Dethier, 1985). The large number of labeled fibers found in the ipsilateral Dp after DiI application to the bulb of trout makes it difficult to confirm the presence of bulbopetal cells in Dp, but the presence of these cells is supported by the abundance of labeled fibers in the ipsilateral bulb after DiI application to Dp (see the accompanying article), suggesting that these bulbar afferents in trout are similar to those observed in other teleost species. No bulbopetal neurons were observed in Dm of *Sebastes* (Murakami et al., 1983), which is in contrast with the results obtained in trout (present results) and in sturgeon (Huesa et al., 2000). Experiments in the silver lamprey indicate that some cells of the dorsal and lateral pallium project to the olfactory bulb (Northcutt and Puzdrowski, 1988).

Connections of the ventral area

The ventral area of teleosts is considered homologous to the subpallium of land vertebrates, which is supported by results of developmental studies (Chanconie and Clairambault, 1975; Mueller and Wullimann, 2003; Castro et al., 2003) and by the high proportion of γ -aminobutyric acid (GABA)ergic cells in this area in adult trout (Anglade et al., 1999). The similar expression of Dlx2 gene in the subpallium primordium of zebrafish (Hauptmann and Gerster, 2000), chick, and mouse (Puelles et al., 2000) also supports this homology. At precommissural levels, the ventral area of salmonids is commonly subdivided into dorsal (Vd), ventral (Vv), and lateral (Vl) nuclei, whereas at commissural and postcommissural levels further subdivisions appear, such as the supracommissural (Vs), intermediate (Vi), central (Vc), and posterior (Vp) nuclei (see Northcutt and Braford, 1980). The limits and indeed the existence in trout of some of these nuclei (Vi and Vc) are uncertain (Northcutt and Braford, 1980). In the present study, some of these subdivisions could not be specifically approached because of their small size in the small fish used here and/or their close proximity to neighboring telencephalic areas or tracts. Therefore, the analysis of the connections of these ventral area nuclei was based both on results of direct application of tracer to the Vv, Vd, Vs, Vl, and Vp, and on results of cases of application of DiI to several nuclei in the telencephalon, diencephalon, and brainstem. These results are summarized in Figure 10.

Ventral nucleus (Vv)

Intratelencephalic afferents. Only a few experimental studies have analyzed the connections of the ventral area of the teleost telencephalon, either partially (the Vv/Vs connections in a salmonid: Shiga et al., 1985a, b) or systematically (electric fish: Wong, 1997). In addition, a few studies have provided either indirect (*Sebastes*: Murakami et al., 1983) or direct data (goldfish: Sloan, 1989, as cited in Wong, 1997; zebrafish: Rink and Wullimann, 2001; sturgeon: Huesa, 2002) on some Vv afferents. De-

spite the different species and methodologies used, our results confirm the existence in the trout of some of the afferent projections to Vv reported in these studies. Our results show that, in addition to the primary olfactory afferents, the main telencephalic afferents to the precommissural Vv of trout come ipsilaterally from the olfactory bulb, and bilaterally from Vd, Vs, and the preoptic region. Furthermore, the terminal nerve might also be afferent to Vv in trout (Chiba et al., 1994; Castro et al., 2001). The existence of afferents to Vv from Vd, Vs, and the preoptic region has been reported in other salmonid species (Shiga et al., 1985a). In the specialized electric fish *Eigenmannia*, the nucleus taenia and the medial region of the Dp (mDp) have also been reported as afferent to Vv (Wong, 1997). Although two additional small ipsilateral groups of labeled cells were occasionally observed in the pallium of trout (Dp, ventromedial Dv), these pallial projections to Vv could not be unequivocally confirmed (see the accompanying study, Folgueira et al., 2004). The probable absence of pallial projections to Vv would be in agreement with results in other species of teleost (*Sebastes*: Murakami et al., 1983; *Carassius*: Sloan, 1989, as cited by Wong, 1997; *Danio*: Rink and Wullimann, 2001) and in chondrostean (*Acipenser*: Huesa, 2002).

Extratelencephalic afferents. Present results indicate that the putative extratelencephalic Vv afferents originate from several nuclei of the diencephalon, midbrain, and rhombencephalon. Some extratelencephalic afferent connections of Vv in trout arise from neurons located in the periventricular thalamus, mainly in the dorsomedial and ventromedial nuclei, and in a more lateral nucleus (central posterior nucleus) of the dorsal thalamus. The same nuclei also appear to project to Dc and, in part, to Dp and Dd+Dl-d (see the accompanying article). Vv also receives afferent projections from the suprachiasmatic nucleus, the lateral and anterior tuberal nucleus, the tertiary gustatory nucleus, the ventral portion of the anterior preglomerular nucleus, and other nuclei of the preglomerular complex (medial preglomerular nucleus and mammillary body), the posterior recess nucleus, the posterior and periventricular tubercular nuclei, the inferior hypothalamic lobe, the torus semicircularis, the secondary gustatory/visceral nucleus, the locus coeruleus, the superior raphe nucleus, the rhombencephalic central gray, and different parts of the rhombencephalic reticular formation. Although there exists the possibility that DiI application to Vv may also label *en passant* fiber systems coursing in the medial forebrain bundle to telencephalic regions other than Vv, various reciprocal experiments confirmed that most of these nuclei are actually afferent to Vv. Taken together, our results reveal that the trout Vv receives afferents from many extratelencephalic centers, which markedly contrasts with the report in another salmonid that the only extratelencephalic afferents to Vs and caudal Vv arise from the posterior tuberal nucleus and the dorsomedial thalamic nucleus (Shiga et al., 1985a).

The suprachiasmatic nucleus of teleosts (= anterior periventricular nucleus; see Holmqvist et al., 1994, and Holmqvist and Ekström, 1995, for a comprehensive review of its neurochemistry) is generally considered as a retinorecipient nucleus (Northcutt and Wullimann, 1988). In the rainbow trout, the region located ventrally just caudal to the optic chiasm contains migrated suprachiasmatic neurons that are afferent to Vv, and appears to receive a rich plexus of retinofugal fibers (see the accompanying

article, Folgueira et al., 2004). In trout, this nucleus also projects to pallial areas (see the accompanying article). Tract-tracing studies in zebrafish and sturgeon indicate that this nucleus is afferent to Vv (Rink and Wullimann, 2001; Huesa, 2002). However, there was no reference to the suprachiasmatic nucleus as a possible origin of Vv/Vs afferents either in the study by Shiga et al. (1985a) in salmonids or in Wong's (1997) study in a gymnotiform fish. In the trout, the cells and dendritic processes of this putative suprachiasmatic nucleus were frequently intermingled among optic fibers (see Folgueira et al., 2004), as in the catfish (Striedter, 1990a, b). Clarification of whether some optic fibers establish synaptic contacts with these cells will require further ultrastructural studies. The telencephalo-projecting suprachiasmatic nucleus reported here represents a part of the anterior periventricular nucleus, probably different from that which in the Atlantic salmon was shown to be hypophysiotrophic (Holmqvist et al., 1994; Holmqvist and Ekström, 1995). Some cells of the suprachiasmatic nucleus appear to synthesize dopamine in salmonids (Holmqvist and Ekström, 1995; Anadón et al., 2002).

In the trout, the anterior tuberal nucleus (ATN) seems to project to ventral areas of the telencephalon (precommissural Vv, Vp) and also to dorsal (Dc, Dd+Dl-d, Dp) areas (see also Folgueira et al., 2004), whereas our experiments of application of Dil to the ATN revealed telencephalic projections from the ventral area (Vv-v, Vv-d, and Vp) and pallial regions (Dp). Telencephalic/preoptic region projections to the ATN and the lateral hypothalamus were observed in goldfish using the Fink-Heimer degeneration method (Airhart et al., 1988). In a salmonid, Shiga et al. (1985a) have also reported projections from the posterior tuberal nucleus to Vs.

Various thalamic nuclei project to Vv in ray-finned fishes (Shiga et al., 1985a; Ito et al., 1986; Wong, 1997; Albert et al., 1999; Rink and Wullimann, 2001; Huesa, 2002). The central posterior nucleus is the main thalamic nucleus afferent to Vv in an electric fish (*Eigenmania*: Wong, 1997) and to Vv/Vs in the goldfish (Sloan, 1989, as cited by Wong, 1997). In *Eigenmania*, the dorsal posterior and the caudal ventromedial nuclei also give rise to a minor projection to Vv (Wong, 1997). In *Sebastiscus*, the ventromedial thalamic nucleus projects to Vs (Ito et al., 1986), whereas in the zebrafish, the ventromedial, anterior and dorsal posterior thalamic nuclei were reported to be afferent to the precommissural Vv (Rink and Wullimann, 2001). Our results in trout (the present study and the accompanying article) confirm and extend those of Shiga et al. (1985a) in a salmonid, in which the dorsomedial and ventromedial nuclei were reported to be afferent to caudal Vv/Vs. In addition, at the level of the posterior commissure, a small dorsolateral thalamic cell group (central posterior nucleus) sends fibers bilaterally to Vv and to regions of the pallium (precommissural Dm, Dd, Dc, and Dp).

The preglomerular complex of teleosts is generally considered as a migrated posterior tubercular center (Braford and Northcutt, 1983), although it receives some hypothalamic contributions during development (Bergqvist, 1932; Corujo and Anadón, 1990). In the zebrafish, occasional retrogradely labeled cells were found in the preglomerular area after tracer application to the ventral telencephalon (Rink and Wullimann, 2001). In trout, the connections of the preglomerular complex with Vv seem to be bilateral

and reciprocal (present results). The connections of the preglomerular complex with dorsal regions (Dc, Dd+Dl-d, precommissural Dm, Dp) will be considered in the accompanying article (Folgueira et al., 2004). Our reciprocal labeling experiments from the posterior tubercular region confirm that Vv and Vs have reciprocal connections both with the dorsal and ventral periventricular area of the posterior tubercle and with the posterior tubercular nucleus.

Present results in trout show for the first time in an actinopterygian the presence of direct bilateral toral projections to Vv and Vs, and also indicate the probable presence of direct Vv efferents to the torus semicircularis. Additional direct toral projections to Dc and Dp have also been observed (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004). These results do not exclude the existence in trout of indirect connections between the torus semicircularis and the telencephalon by means of diencephalic nuclei, such as those proposed in a cladistic analysis of the phylogeny of the ascending electrosensory, auditory, and mechanosensory pathways to the telencephalon by means of the dorsal thalamus, the posterior tubercle, the nucleus electrosensorius, and the hypothalamus (Striedter, 1991). A recent study of toral projections in *Opsanus tau* using biotin as a tracer has found ipsilaterally labeled fibers in Vv (Bass et al., 2000), although whether these fibers represent a direct toro-Vv projection, are axons of medullary neurons projecting both to the torus and the telencephalon, or are the result of transneuronal labeling of diencephalic neurons could not be determined. Our results in trout support that the fibers observed in Vv of *Opsanus* by Bass et al. (2000) represent a true toral-Vv projection. Striatal afferents from the torus semicircularis have been described in amphibians (Vesselkin et al., 1980; Marín et al., 1997a), whereas in agnathans the septo-striatal region appears to project to the torus semicircularis (González et al., 1999), and the septal areas also appears to send efferents to the torus in reptiles (Font et al., 1998).

Vv efferents. The intratelencephalic efferent connections of the precommissural Vv in trout are distributed bilaterally in some regions of the pallium (Dm, Dd+Dl-d, Dl-v, Dp; present results), but we could not confirm the presence of an efferent connection to Dc like that reported in *Sebastiscus* (Murakami et al., 1983). In the subpallium, Vv efferents course ipsilaterally in Vs and, caudally, in the periventricular preoptic nucleus. Vv efferents to the thalamus, the preglomerular nuclei, nucleus subglomerulosus, the nucleus of the hypothalamic lateral recesses, the nucleus of the posterior tubercle, the torus semicircularis, the lateral nucleus of the valvula, the secondary gustatory nucleus, the interpeduncular nucleus, and the superior raphe nucleus were also observed (see also the accompanying article, Folgueira et al., 2004). Our results show that the Vv efferent projections are more extensive in trout than those reported in other teleosts. In the electric fish *Eigenmannia*, Vv projections were mainly distributed in the subpallium, preoptic and other hypothalamic nuclei, dorsal thalamus, and the specific nucleus electrosensorius in the pretectum (Wong, 1997). In goldfish (Sloan, 1989, as cited by Wong, 1997), the Vv/Vs efferents mainly ran both in the subpallium (Vc) and the pallium (Dc, Dl), whereas the scarce extratelencephalic projections were restricted to the anterior periventricular preoptic nucleus and the habenula. In tilapia, Vv/Vs efferents were distributed in Dp and Vi (Yamamoto and Ito, 2000). The Vv-

interpeduncular nucleus projection observed in trout resembles the telencephalo-interpeduncular projection observed in the goldfish (Villani et al., 1996), although in the goldfish it arises from Vd. In the trout, a minor efferent projection was also observed in the ipsilateral habenula, but this projection should be interpreted with caution, because many telencephalic systems seem to use the habenular commissure as a telencephalic commissure. The contralateral targets of telencephalic efferent fibers crossing the habenular commissure need to be determined.

Dorsal part of Vv (Vv-d). Application of DiI to the secondary gustatory nucleus showed a small group of labeled neurons in the precommissural ventral telencephalon located between Vd and Vv (see Folgueira et al., 2003), there named as the dorsal part of Vv (Vv-d), which appears to correspond with the intermediate part of V (Vi) of Anadón et al. (2002) but not with the homonymous nucleus described in other species of teleost (Murakami et al., 1983; Wong, 1997; Zupanc, 1997; Yoshimoto et al., 1998; Yamamoto and Ito, 2000). Characteristically, Vv-d exhibits a rich galaninergic innervation (Rodríguez et al., 2003; Castro et al., 2003) and probably coincides with the area of Vv lacking glucocorticoid receptors located below Vd (Teitsma et al., 1998). Moreover, like Vd and Vs, in adult trout this Vv-d (Vi) region contains catecholaminergic cells with complex (spiny) dendrites (Anadón et al., 2002). Together with these immunocytochemical data, our connectional results in trout support the existence of two subdivisions in the precommissural Vv, namely Vv-d and the ventral part of Vv (Vv-v). At least, Vv-d appears to be functionally related with the olfactory and the gustatory systems. Moreover, our connectional data indicate that Vv-d does not represent a simple rostral continuation of Vs.

Comparison with other vertebrates. The homology of Vv of ray-finned fishes is problematic, although most authors consider Vv as a septal region (Northcutt and Braford, 1980). On the basis of the connections of Vv with the dorsal and lateral pallium of *Polypterus*, it has been suggested that Vv may be a field homologue of nucleus accumbens, the lateral septum, and substantia innominata of other gnathostomes (Northcutt, 1995). Results in the frog *Rana perezi* (Sánchez-Camacho et al., 2003) indicate that the septum receives projections from the preoptic nucleus, suprachiasmatic nucleus, ventral thalamus, posterior tubercle, parabrachial nucleus, locus coeruleus, and nucleus solitarius. Moreover, detailed experimental studies in the lizard *Podarcis hispanica* (Font et al., 1997, 1998; see this article for older literature on reptiles) afferents to the septum come from the preoptic area, hypothalamus (anterior, lateral, and posterior), supramamillary/mamillary nuclei, dorsal thalamus, ventral tegmental area, raphe nucleus, central gray, and locus coeruleus (Font et al., 1997). The structures corresponding to most of the nuclei and regions afferent to the septum reported in the frog and lizard also project to Vv in trout (present results). However, in the frog and lizard, there are important cortico-septal projections (Northcutt and Kicliter, 1980; Font et al., 1997), unlike trout Vv.

Lateral nucleus (VI). On the basis of cytoarchitectonic considerations, the lateral nucleus of V (and Vn) of actinopterygians has been hypothesized to be a field homologue of the olfactory tubercle and the medial septal nucleus (Northcutt and Braford, 1980; Northcutt, 1995).

However, our results on VI connections (present study; accompanying article) suggest that it neither receives a substantial olfactory projection nor projects to the "olfactory" pallium (Dp, DI-v), which together suggests nonhomology between the trout VI and the olfactory tubercle of land vertebrates. In a case of DiI application to caudal Dm (see the accompanying article; Folgueira et al., 2004), a large proportion of VI neurons were labeled, which indicates the existence of a specific projection of VI to caudal Dm. No evidence of VI projections to other regions of the pallium, or to extratelencephalic nuclei, was observed in this study. Whether caudal Dm is the only intratelencephalic target of trout VI, or whether other intratelencephalic VI efferents have been overlooked as a result of our selection of points of DiI application, needs further investigation. In *Polypterus*, VI does not project to the pallium (Holmes and Northcutt, 2003). On the other hand, the trout VI appears to receive extratelencephalic projections roughly similar to those of Vv. Because VI cells are located in a region of fiber passage, clarification of the existence of synaptic contacts of the labeled fibers with VI neurons needs further investigation.

In salmonids, the lateral nucleus of V (VI) is neurochemically characterized by the presence of scattered neurons immunoreactive to somatostatin (Becerra et al., 1995), neuropeptide Y (González-Fernández et al., 1992; Castro et al., 1999), choline acetyltransferase (ChAT; Pérez et al., 2000), and FMRFamide (Castro et al., 2001). That the only cholinergic cells of the trout telencephalic lobes were observed in VI (Pérez et al., 2000) suggests that these neurons correspond to the cholinergic populations reported in the amygdala and/or of the septum of amphibians (Marín et al., 1997c). On the basis of the presence of cholinergic cells in VI and its projections to hypothalamus, it has been suggested that VI is homologous to the septum (Wullmann and Rink, 2002). In the frog, the cholinergic neurons of the septum project to the medial pallium (González and López, 2002), which is unlike the VI projection to Dm (putative lateral pallium; Northcutt and Braford, 1980) observed in the trout (present results). Moreover, no evidence of projections of VI to hypothalamic nuclei was obtained in the present study (see also Folgueira et al., 2004), which argues against homology between the trout VI and the septum of land vertebrates (Font et al., 1998).

Dorsal nucleus of V (Vd). The connections of the dorsal nucleus of V have received scarce attention. Present results and those of the accompanying study (Folgueira et al., 2004) indicate that Vd projects to Dd+DI-d, DI-v, Dm, Dc, Vs, Vp, and Vv. Moreover, some Vd cells project to a few extratelencephalic regions (eminentia thalami, diffuse nucleus of the inferior lobes, posterior tubercular nucleus, nucleus subglomerulosus, mamillary body, and lateral tuberal nucleus), as indicated by reciprocal experiments (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004). In the rockfish, Vd has been reported to give rise to bulbar afferents (Murakami et al., 1983) but our results do not confirm the existence of these projections in trout, or even the existence of projections from the olfactory epithelium or the olfactory bulb to the Vd. Vd has been proposed to be homologous to the medial septum (Northcutt and Braford, 1980) or to the striatum of land vertebrates (Northcutt, 1995; Rink and Wullmann, 2001). In trout, the Vd region of Northcutt and Braford (1980) receives only very scarce tyrosine hydrox-

ylase (TH) -immunoreactive innervation, although it exhibits some TH-immunoreactive perikarya (Anadón et al., 2002). Moreover, unlike the striatum of land vertebrates (see Marín et al., 1997b, 1998, for a review), that the trout Vd projects directly to pallial regions (Dd+Dl-d, Dm, Dl-v) argues against the hypothesis of homology between Vd and the striatum. Alternatively, these large differences observed between the connections of Vd and the striatum might be the result of divergent evolution of the striatal subpallium in lines leading to teleosts and those leading to tetrapods. In the bichir, projections from Vd (probable homologue of the striatum; Northcutt, 1995) to the pallium have been reported recently (Holmes and Northcutt, 2003), and some striato-pallial projections have also been observed in the silver lamprey (Northcutt and Wicht, 1997).

Supracommissural nucleus (Vs). The position of teleost Vs is comparable to that of the bed nucleus of the stria terminalis, and along with Vp, it may be homologous to the amygdala (Northcutt and Braford, 1980; Northcutt, 1995). Present experiments of application of DiI to different brain areas in trout indicate that the supracommissural nucleus has specific efferent projections, sending axons ipsilaterally to the olfactory bulb, Vv, and Dp, and bilaterally to Dd+Dl-d and Dl-v (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004). In the case of the Vs projections to Vv, the possibility that these putative projections represent only fibers of passage cannot be ruled out. Our results after application of DiI to several brain centers also indicate that Vs projects to the eminentia thalami, anterior and lateral tuberal nuclei, preglomerular nucleus/mamillary body complex, diffuse nucleus, nucleus of the lateral recess, posterior hypothalamic lobe, posterior tuberal nucleus, nucleus subglomerulosus, and periventricular nucleus of the posterior tubercle (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004). A previous study of anterograde degeneration in *O. nerka* has described efferents from the Vs and caudal-Vv to the olfactory bulb, to several parts of dorsal telencephalon (Dm, Dp, Dc, Dd+Dld) and ventral telencephalon (Vd, Vv, Vl, Vc, Vp), the habenula, the hypothalamus, and the mid-brain tegmentum (Shiga et al., 1985b), which is in rather good agreement with our observations. In tilapia, efferents from Vs/Vv to the ventromedial thalamic nucleus and the posterior tubercle have been described (Yamamoto and Ito, 2000).

In frogs, the amygdala (medial amygdala) receives massive projections from the accessory olfactory bulbs, which receive projections from the vomeronasal organ (Kemali and Guglielmotti, 1987; Moreno and González, 2003). In addition, the frog amygdala maintains connections with several brain structures, including afferents from the main olfactory bulb (Moreno and González, 2003). Teleosts, as the other ray-finned fishes, have not a vomeronasal organ, but the olfactory epithelium contains two types of olfactory receptor neurons, ciliated and microvillar, that morphologically correspond to the receptor neurons of the main olfactory mucosa and that of the vomeronasal organ of land vertebrates, respectively (see Yamamoto, 1982). Genes of the vomeronasal olfactory receptor family are expressed in cells of the olfactory epithelium of teleosts (Asano-Miyoshi et al., 2000). Experimental studies indicate that trout Vs receives primary and secondary olfactory fibers (Matz, 1995; present results) and indicate the existence of Vs efferents to many subpal-

lial regions, to the hypothalamus and posterior tubercle (Shiga et al., 1985b; present results). These connections, although not identical with those of frogs, are roughly similar. Together, these results give support to the hypothesis of homology between Vs and the amygdala (at least as a field homology). Other authors have proposed a homology between the teleost Dp and Vi and the mammalian amygdala on the base of similarity of their connections (Yoshimoto et al., 1998).

Posterior nucleus of V (Vp). The posterior nucleus of V, together the nucleus taenia, Vs, and Vc have been proposed to be homologous to the amygdala of amphibians (Northcutt and Braford, 1980). The trout Vp is located caudally in the subpallium and may be distinguished from the Vs by the absence of calretinin-immunoreactive cells (Castro et al., 2003). Vp gives rise to a large projection on the medial hypothalamus coursing in the medial forebrain bundle, and appears to receive inputs from the preoptic nucleus, some hypothalamic periventricular nuclei, dorsal thalamus, torus semicircularis, and rhombencephalic reticular and raphe neurons (present results). These connections are reminiscent of the projections to caudal centers from the anuran medial amygdala (Moreno and González, 2003). In frogs, the medial amygdala receives major projections from the accessory olfactory bulb (and, hence, receives inputs from the vomeronasal system) and mainly projects to hypothalamic areas, whereas the cortical amygdala maintains connections with both the main and accessory olfactory bulb (Scalia et al., 1991; Moreno and González, 2003). In the rockfish, Vp receives olfactory fibers (Murakami et al., 1983), but in the trout, Vp does not appear to receive significant olfactory projections (Matz, 1995; present results). Thus, whether Vp is homologous to the amygdala needs further clarification.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Pilar Gómez (Piscifactoría Berxa, Mesía, A Coruña) for supplying the biological material used in this study.

LITERATURE CITED

- Airhart MJ, Shirk JO, Kriebel RM. 1988. Telencephalic projections to the goldfish hypothalamus: an anterograde degeneration study. *Brain Res Bull* 20:503-514.
- Albert JS, Yamamoto N, Yoshimoto M, Sawai N, Ito H. 1999. Visual thalamotelencephalic pathways in the sturgeon *Acipenser*, a non-teleost actinopterygian fish. *Brain Behav Evol* 53:156-172.
- Amano M, Oka Y, Aida K, Okumoto N, Kawashima S, Hasegawa Y. 1991. Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *J Comp Neurol* 314:587-597.
- Anadón R, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Becerra M. 1995. Neurons of the olfactory organ projecting to the caudal telencephalon and hypothalamus: a carbocyanine-dye labelling study in the brown trout (Teleostei). *Neurosci Lett* 191:157-160.
- Anadón R, Rodríguez-Moldes I, González A. 2002. Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the forebrain of the trout: organization, cellular features and innervation. *Brain Res Bull* 57:389-392.
- Anglade I, Wang Y, Jensen J, Tramu G, Kah O, Conlon JM. 1994. Characterization of trout galanin and its distribution in trout brain and pituitary. *J Comp Neurol* 350:63-74.
- Anglade I, Mazurais D, Douard V, Le Jossic-Corcós C, Mañanos EL, Michel D, Kah O. 1999. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 410:277-289.
- Asano-Miyoshi M, Suda T, Yasuoka A, Osima S, Yamashita S, Abe K,

- Emori Y. 2000. Random expression of main and vomeronasal olfactory receptor genes in immature and mature olfactory epithelia of *Fugu rubripes*. *J Biochem (Tokyo)* 127:915–924.
- Bailhache T, Arazam A, Klungland H, Alestrom P, Breton B, Jego P. 1994. Localization of salmon gonadotropin-releasing hormone mRNA and peptide in the brain of Atlantic salmon and rainbow trout. *J Comp Neurol* 347:444–454.
- Bass AH. 1981a. Olfactory bulb efferents in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Morphol* 169:91–111.
- Bass AH. 1981b. Telencephalic efferents in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: projections to the olfactory bulbs and optic tectum. *Brain Behav Evol* 19:1–16.
- Bass AH, Bodnar DA, Marchaterre MA. 2000. Midbrain acoustic circuitry in a vocalizing fish. *J Comp Neurol* 419:505–531.
- Bazer GT, Ebbesson SO, Reynolds JB, Bailey RP. 1987. A cobalt-lysine study of primary projections in king salmon fry (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum). *Cell Tissue Res* 248:499–503.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1994. Primary olfactory fibres project to the ventral telencephalon and preoptic region in trout (*Salmo trutta*): a developmental immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 342:131–143.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1995. Ontogeny of somatostatin-immunoreactive systems in the brain of the brown trout (Teleostei). *Anat Embryol (Berl)* 191:119–137.
- Bergqvist H. 1932. Zur Morphologie des Zwischenhirns bei niederen Wirbeltieren. *Acta Zool* 13:57–303.
- Braford MR Jr, Northcutt RG. 1983. Organization of the diencephalon and preteum of the ray-finned fishes. In: Northcutt RG, Davis RE, editors. *Fish neurobiology*. Vol. II. Michigan: University of Michigan Press. p 117–163.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 1999. Development of immunoreactivity to neuropeptide Y in the brain of brown trout (*Salmo trutta fario*). *J Comp Neurol* 414:13–32.
- Castro A, Becerra M, Anadón R, Manso MJ. 2001. Distribution and development of FMRFamide-like immunoreactive neuronal systems in the brain of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 440:43–64.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2003. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467:254–269.
- Chanconie M, Clairambault P. 1975. Development of the telencephalon of *Salmo irideus* Gib. *J Hirnforsch* 16:75–89.
- Chiba A, Oka S, Honma Y. 1994. Ontogenetic development of gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in the brain of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Neurosci Lett* 178:51–54.
- Corréa SA, Grant K, Hoffmann A. 1998. Afferent and efferent connections of the dorsocentral telencephalon in an electrosensory teleost, *Gymnotus carapo*. *Brain Behav Evol* 52:81–98.
- Corujo A, Anadón R. 1990. The development of the diencephalon of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Thalamus and hypothalamus*. *J Hirnforsch* 31:669–680.
- Davis RE, Chase R, Morris J, Kaufman B. 1981. Telencephalon of the teleost *Macropodus*: experimental localization of the secondary olfactory areas and of components of the lateral forebrain bundle. *Behav Neural Biol* 33:257–279.
- Díaz ML, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2001. Development of thyrotropin-releasing hormone immunoreactivity in the brain of the brown trout *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 429:299–320.
- Ebbesson SO, Meyer DL, Scheich H. 1981. Connections of the olfactory bulb in the piranha (*Serrasalminus nattereri*). *Cell Tissue Res* 216:167–180.
- Echteler SM. 1984. Connections of the auditory midbrain in a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *J Comp Neurol* 230:536–551.
- Echteler SM, Sidel WM. 1981. Forebrain connections in the goldfish support telencephalic homologies with land vertebrates. *Science* 212:683–685.
- Ekström P, Ebbesson SO. 1989. Distribution of serotonin-immunoreactive neurons in the brain of sockeye salmon fry. *J Chem Neuroanat* 2:201–213.
- Finger TE. 1975. The distribution of the olfactory tracts in the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* 161:125–142.
- Finger TE. 1980. Nonolfactory sensory pathway to the telencephalon in a teleost fish. *Science* 210:671–673.
- Folgueira M, Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2002. The nucleus subglomerulosus of the trout hypothalamus is a link between chemosensory and visual systems: a DiI study. *Brain Res Bull* 57:427–430.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2003. Experimental study of the connections of the gustatory system in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Comp Neurol* 465:604–619.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II. Dorsal area and preoptic region. *J Comp Neurol* 480:204–233.
- Font C, Martínez-Marcos A, Lanuza E, Hoogland PV, Martínez-García F. 1997. Septal complex of the telencephalon of the lizard *Podarcis hispanica*. II. Afferent connections. *J Comp Neurol* 383:489–511.
- Font C, Lanuza E, Martínez-Marcos A, Hoogland PV, Martínez-García F. 1998. Septal complex of the telencephalon of lizards: III. Efferent connections and general discussion. *J Comp Neurol* 401:525–548.
- 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.
- González A, López JM. 2002. A forerunner of septohippocampal cholinergic system is present in amphibians. *Neurosci Lett* 327:111–114.
- González MJ, Yáñez J, Anadón R. 1999. Afferent and efferent connections of the torus semicircularis in the sea lamprey: an experimental study. *Brain Res* 826:83–94.
- González-Fernández MA, del Brío MA, Cernuda R, Coto A, Riera P. 1992. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of *Salmo salar* and *Gambusia affinis*. *Histol Histopathol* 7:385–392.
- Hauptmann G, Gerster T. 2000. Regulatory gene expression patterns reveal transverse and longitudinal subdivisions of the embryonic zebrafish forebrain. *Mech Dev* 91:105–118.
- Holmes PH, Northcutt RG. 2003. Connections of the palial telencephalon in the Senegal bichir, *Polypterus*. *Brain Behav Evol* 61:113–147.
- Holmqvist BI, Ekström P. 1991. Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleosts: distribution and relation to substance P, vasotocin, and isotocin in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Comp Neurol* 306:361–381.
- Holmqvist BI, Ekström P. 1995. Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonapeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *J Chem Neuroanat* 8:125–145.
- Holmqvist BI, Östholm T, Ekström P. 1992. DiI 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.
- Holmqvist BI, Östholm T, Ekström P. 1994. Neuroanatomical analysis of the visual and hypophysiotrophic systems in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with emphasis on possible mediators of photoperiodic cues during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 121:1–12.
- Honkanen T, Ekström P. 1992. Comparative study of the olfactory epithelium of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and the nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*). *Cell Tissue Res* 269:267–273.
- Huesa G. 2002. Estudio holológico de las conexiones telencefálicas de *Acipenser baeri*, con especial referencia a los sistemas quimiosensoriales. PhD Thesis. University of A Coruña, Spain.
- Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2000. Olfactory projections in a chondrosteian fish, *Acipenser baeri*: an experimental study. *J Comp Neurol* 428:145–158.
- Imura K, Yamamoto N, Sawai N, Yoshimoto M, Yang CY, Xue HG, Ito H. 2003. Topographical organization of an indirect telencephalo-cerebellar pathway through the nucleus paracommissuralis in a teleost, *Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol* 61:70–90.
- Ito H, Kishida R. 1977. Tectal afferent neurons identified by the retrograde HRP method in the carp telencephalon. *Brain Res* 130:142–145.
- Ito H, Kishida R. 1978. Telencephalic afferent neurons identified by the retrograde HRP method in the carp diencephalon. *Brain Res* 149:211–215.
- Ito H, Morita Y, Sakamoto N, Ueda S. 1980. Possibility of telencephalic visual projections in teleosts, Holocentridae. *Brain Res* 197:219–222.
- Ito H, Murakami T, Morita Y. 1982. An indirect telencephalo-cerebellar pathway and its relay nucleus in teleosts. *Brain Res* 249:1–13.
- Ito H, Murakami T, Fukuoka T, Kishida R. 1986. Thalamic fiber connections in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*): visual somatosensory, octavolateral, and cerebellar relay region to the telencephalon. *J Comp Neurol* 250:215–227.

- Kanwal JS, Finger TE, Caprio J. 1988. Forebrain connections of the gustatory system in ictalurid catfishes. *J Comp Neurol* 278:353–376.
- Kemali M, Guglielmotti V. 1987. A horseradish peroxidase study of the olfactory system of the frog, *Rana esculenta*. *J Comp Neurol* 263:400–417.
- Lamb CF, Caprio J. 1993. Diencephalic gustatory connections in the channel catfish. *J Comp Neurol* 337:400–418.
- Levine RL, Dethier S. 1985. The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* 237:427–444.
- Manso MJ, Becerra M, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 34:239–260.
- Marín O, González A, Smeets WJ. 1997a. Basal ganglia organization in amphibians: afferent connections to the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378:16–49.
- Marín O, González A, Smeets WJ. 1997b. Basal ganglia organization in amphibians: efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378:16–49.
- Marín O, Smeets WJ, González A. 1997c. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltli*) amphibians. *J Comp Neurol* 382:499–534.
- Marín O, Smeets WJ, González A. 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS* 21:487–494.
- Matz SP. 1995. Connections of the olfactory bulb in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Brain Behav Evol* 46:108–120.
- Matz SP, Takahashi TT. 1994. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the brain of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J Comp Neurol* 345:214–223.
- Moreno N, González A. 2003. Hodological characterization of the medial amygdala in anuran amphibians. *J Comp Neurol* 466:389–408.
- Mueller T, Wullimann MF. 2003. Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain. *Dev Brain Res* 140:137–155.
- Murakami T, Morita Y, Ito H. 1983. Extrinsic and intrinsic fiber connections of the telencephalon in a teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *J Comp Neurol* 216:115–131.
- Murakami T, Fukuoka T, Ito H. 1986a. Telencephalic ascending acousticolateral system in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*), with special reference to the fiber connections of the nucleus preglomerulosus. *J Comp Neurol* 247:383–397.
- Murakami T, Ito H, Morita Y. 1986b. Telencephalic afferent nuclei in the carp diencephalon, with special reference to fiber connections of the nucleus preglomerulosus pars lateralis. *Brain Res* 382:97–103.
- Nieuwenhuys R. 1962. Trends in evolution of the actinopterygian forebrain. *J Morphol* 111:69–88.
- Nieuwenhuys R. 1963. The comparative anatomy of the teleostean forebrain. *J Hirnforsch* 6:171–192.
- Northcutt RG. 1981. Localization of neurons afferent to the telencephalon in a primitive bony fish, *Polypterus palmas*. *Neurosci Lett* 22:219–222.
- Northcutt RG. 1995. The forebrain of gnathostomes: in search of a morphotype. *Brain Behav Evol* 46:275–318.
- Northcutt RG, Bradford MR Jr. 1980. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes. In: Ebbesson SOE, editor. *Comparative neurology of the telencephalon*. New York: Plenum Press. p 41–98.
- Northcutt RG, Davis RE. 1983. Telencephalic organization in ray-finned fishes. In: Northcutt RG, Davis RE, editors. *Fish neurobiology*. Vol. II. Michigan: University of Michigan Press. p 203–236.
- Northcutt RG, Kikliter E. 1980. Organization of the amphibian telencephalon. In: Ebbesson SOE, editor. *Comparative neurology of the telencephalon*. New York: Plenum Press. p 203–255.
- Northcutt RG, Puzdrowski RL. 1988. Projections of the olfactory bulb and nervus terminalis in the silver lamprey. *Brain Behav Evol* 32:96–107.
- Northcutt RG, Wicht H. 1997. Afferent and efferent connections of the lateral and medial pallia of the silver lamprey. *Brain Behav Evol* 49:1–19.
- Northcutt RG, Wullimann MF. 1988. The visual system in teleost fishes: morphological patterns and trends. In: Atema J, Fay JJ, Popper AN, Tavolga WN, editors. *Sensory biology of aquatic animals*. Berlin: Springer. p 515–552.
- Oka Y. 1980. The origin of centrifugal fibers to the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*: an experimental study using the fluorescent dye primuline as a retrograde tracer. *Brain Res* 185:215–225.
- Östholm T, Ekström P, Ebbesson SO. 1990. Distribution of FMR/Famide-like immunoreactivity in the brain, retina and nervus terminalis of the sockeye salmon parr, *Oncorhynchus nerka*. *Cell Tissue Res* 261:403–418.
- Pérez SE, Yáñez J, Marín O, Anadón R, González A, Rodríguez-Moldes I. 2000. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J Comp Neurol* 428:450–474.
- Prasada Rao PD, Finger TE. 1984. Asymmetry of the olfactory system in the brain of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *J Comp Neurol* 225:492–510.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424:409–438.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 103:23–37.
- Riddle DR, Oakley B. 1992. Immunocytochemical identification of primary olfactory afferents in rainbow trout. *J Comp Neurol* 324:575–589.
- Riddle DR, Wong LD, Oakley B. 1993. Lectin identification of olfactory receptor neuron subclasses with segregated central projections. *J Neurosci* 13:3018–3033.
- Riedel K, Krug L. 1997. The forebrain of the blind cave fish *Astyanax hubbsi* (Characidae). II. Projections of the olfactory bulb. *Brain Behav Evol* 49:39–52.
- Rink E, Wullimann MF. 2001. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889:316–330.
- Rodríguez MA, Anadón R, Rodríguez-Moldes I. 2003. Development of galanin-like immunoreactivity in the brain of the brown trout (*Salmo trutta fario*), with some observations on sexual dimorphism. *J Comp Neurol* 465:263–285.
- Rooney D, Doving KB, Ravaille-Veron M, Szabo T. 1992. The central connections of the olfactory bulbs in cod, *Gadus morhua* L. *J Hirnforsch* 33:63–75.
- Sánchez-Camacho C, Pena JJ, González A. 2003. Catecholaminergic innervation of the septum in the frog: a combined immunohistochemical and tract-tracing study. *J Comp Neurol* 455:310–323.
- Sas E, Maler L, Weld M. 1993. Connections of the olfactory bulb in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol* 335:486–507.
- Sawai N, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 2000. Fiber connections of the corpus mamillare in a percomorph teleost, tilapia *Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol* 55:1–13.
- Scalia F, Gallousis G, Roca S. 1991. Differential projections of the main and accessory olfactory bulb in the frog. *J Comp Neurol* 305:443–461.
- Shiga T, Oka Y, Satou M, Okumoto N, Ueda K. 1985a. An HRP study of afferent connections of the supracommissural ventral telencephalon and the medial preoptic area in himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *Brain Res* 361:162–177.
- Shiga T, Oka Y, Satou M, Okumoto N, Ueda K. 1985b. Efferents from the supracommissural ventral telencephalon in the himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*): an anterograde degeneration study. *Brain Res Bull* 14:55–61.
- Shimizu M, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 1999. Fiber connections of the inferior lobe in a percomorph teleost, *Thamnaconus (Navodon) modestus*. *Brain Behav Evol* 54:127–146.
- Sloan HE. 1989. Neuroanatomical substrates of reproductive behavior in goldfish. PhD Thesis. University of Kentucky, Lexington.
- Striedter GF. 1990a. The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. I. Nuclear organization. *Brain Behav Evol* 36:329–354.
- Striedter GF. 1990b. The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II. Retinal, tectal, cerebellar and telencephalic connections. *Brain Behav Evol* 36:355–377.
- Striedter GF. 1991. Auditory, electrosensory, and mechanosensory lateral line pathways through the forebrain in channel catfishes. *J Comp Neurol* 312:311–331.
- Striedter GF. 1992. Phylogenetic changes in the connections of the lateral preglomerular nucleus in ostariophysan teleosts: a pluralistic view of brain evolution. *Brain Behav Evol* 39:329–357.
- Szabo T, Blahser S, Denizot JP, Ravaille-Veron M. 1991. Extra-bulbar

- primary olfactory projection in teleost fishes. C R Acad Sci Paris 312: 555–560.
- Teitsma CA, Anglade I, Toutirais G, Munoz-Cueto JA, Saligaut D, Ducouret B, Kah O. 1998. Immunohistochemical localization of glucocorticoid receptors in the forebrain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Comp Neurol 401:395–410.
- van den Dungen HM, Buijs RM, Pool CW, Terlouw M. 1982. The distribution of vasotocin and isotocin in the brain of the rainbow trout. J Comp Neurol 212:146–157.
- Vanegas H, Ebbesson SO. 1976. Telencephalic projections in two teleost species. J Comp Neurol 165:181–195.
- Vecino E, Perez MT, Ekström P. 1995. Localization of enkephalinergic neurons in the central nervous system of the salmon (*Salmo salar* L.) by in situ hybridization and immunocytochemistry. J Chem Neuroanat 9:81–97.
- Vesselkin NP, Ermakova TV, Kenigfest NB, Goikovic M. 1980. The striatal connections in frog *Rana temporaria*: an HRP study. J Hirnforsch 21:381–392.
- Villani L, Zironi I, Guarnieri T. 1996. Telencephalo-habenulo-interpeduncular connections in the goldfish: a DiI study. Brain Behav Evol 48:205–212.
- von Bartheld CS, Meyer DL. 1986. Central connections of the olfactory bulb in the bichir, *Polypterus palmas*, reexamined. Cell Tissue Res 244:527–535.
- von Bartheld CS, Meyer DL, Fiebig E, Ebbesson SOE. 1984. Central connections of the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*. Cell Tissue Res 238:475–487.
- von der Emde G, Prechtl JC. 1999. Anatomical connections of auditory and lateral line areas of the dorsal telencephalon (Dm) in the osteoglossomorph teleost, *Gnathonemus petersii*. Brain Res 818:355–367.
- Wong CJ. 1997. Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*. J Comp Neurol 389:49–64.
- Wullimann MF, Meyer DL. 1993. Possible multiple evolution of indirect telencephalo-cerebellar pathways in teleosts: studies in *Carassius auratus* and *Pantodon buchholzi*. Cell Tissue Res 274:447–455.
- Wullimann MF, Northcutt RG. 1990. Visual and electrosensory circuits of the diencephalon in mormyrids: an evolutionary perspective. J Comp Neurol 297:537–552.
- Wullimann MF, Rink E. 2002. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. Brain Res Bull 57:363–370.
- Wullimann MF, Rooney DJ. 1990. A direct cerebello-telencephalic projection in an electrosensory mormyrid fish. Brain Res 520:354–357.
- Wullimann MF, Roth G. 1994. Descending telencephalic information reaches longitudinal torus and cerebellum via the dorsal preglomerular nucleus in the teleost fish, *Pantodon buchholzi*: a case of neural pre-aptation? Brain Behav Evol 44:338–352.
- Yamamoto M. 1982. Comparative morphology of the peripheral olfactory organs in teleosts. In: Hara TJ, editor. Chemoreception in fishes. Amsterdam: Elsevier. p 39–59.
- Yamamoto N, Ito H. 2000. Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. J Comp Neurol 428:355–375.
- Yamane Y, Yoshimoto M, Ito H. 1996. Area dorsalis pars lateralis of the telencephalon in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*) can be divided into dorsal and ventral regions. Brain Behav Evol 48:338–349.
- Yáñez J, Anadón R. 1996. Afferent and efferent connections of the habenula in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an indocarbocyanine dye (DiI) study. J Comp Neurol 372:529–543.
- Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu M, Yamamoto N, Ito H. 1998. Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. J Comp Neurol 392:209–226.
- Zupanc GK. 1997. The preglomerular nucleus of gymnotiform fish: relay station for conveying information between telencephalon and diencephalon. Brain Res 761:179–191.

Capítulo 4

Estudio experimental de las conexiones del telencéfalo de la trucha arco iris (O. mykiss). II. Área dorsal y región preóptica.

An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (O. mykiss). II. Dorsal area and preoptic region.

The Journal of Comparative Neurology 480: 204-233; 2004.

Experimental Study of the Connections of the Telencephalon in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). II: Dorsal Area and Preoptic Region

MÓNICA FOLGUEIRA,¹ RAMÓN ANADÓN,² AND JULIÁN YÁÑEZ¹

¹Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

²Department of Ecology and Cell Biology, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

In this study and the accompanying article (Folgueira et al., 2004a), the fluorescent carbocyanine dye 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) was used in fixed tissue to comprehensively analyze the connections of the different regions of the telencephalic lobes and the preoptic region of the rainbow trout. Here, we analyze the connections of the dorsal area (D; pallium) of the telencephalon, and the preoptic region, as well as the telencephalic connections of several structures in the diencephalon and brainstem of juvenile trout. The dorsal plus dorsolateral pallial zone of D (Dd+Dl-d) receives afferents from contralateral Dd+Dl-d, the ventral area of the telencephalon, preoptic nucleus, suprachiasmatic nucleus, medial thalamus, preglomerular complex, anterior and lateral tuberal nuclei, posterior tuberal nucleus, posterior hypothalamic lobe, superior raphe nucleus, and the rhombencephalic central gray and reticular formation, and projects to the central zone of D (Dc), medial thalamus, and some caudomedial hypothalamic regions. The medial zone of D (Dm) maintains reciprocal connections with the preglomerular complex and also receives afferents from the preoptic nucleus, suprachiasmatic nucleus, anterior tuberal nucleus, preglomerular tertiary gustatory nucleus, posterior tubercle, superior raphe nucleus, locus coeruleus, and the rhombencephalic central gray, and reticular formation. Dc receives fibers mainly from Dd+Dl-d, preoptic nucleus, preglomerular complex, and torus semicircularis and projects to several extratelencephalic centers, including the paracommissural nucleus, optic tectum, torus semicircularis, thalamus, preglomerular complex, posterior tubercle nuclei, and inferior hypothalamic lobes. The posterior zone of D (Dp) is mainly connected with the olfactory bulbs, the ventral and supracommissural nuclei of the ventral area (subpallium), the preoptic nucleus, and the preglomerular complex and projects to wide hypothalamic and posterior tubercular regions. The preoptic nucleus projects to the olfactory bulb, to most regions of the telencephalic lobes, and to several diencephalic and brainstem structures. These results reveal complex and specialized connectional patterns in the rainbow trout dorsal telencephalon and preoptic region. Most of these connections have not been described previously in salmonids. These connections indicate that the salmonid telencephalon is involved in multisensorial processing and modulation of brain activity. *J. Comp. Neurol.* 480:204–233, 2004.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: olfactory bulb; pallium; thalamus; torus semicircularis; cerebellum; teleost

As indicated in the accompanying paper (Folgueira et al., 2004a), the current model of the organization of the telencephalic lobes of actinopterygians is based on the eversion hypothesis (see Northcutt and Braford, 1980; Northcutt and Davis, 1983; Northcutt, 1995). As a result of the eversion, the different telencephalic territories are not placed around a central telencephalic ventricle, and homologies between the telencephalic centers in teleosts

and land vertebrates are not clear (Northcutt, 1995). In teleosts, telencephalic regions are mainly named by topographical designations, and the telencephalic lobes have

Grant sponsor: Spanish Science and Technology Ministry. Grant number: BXX2000-0453-C02-01; Grant number: BFU2004-03144/BFI.

been divided into the dorsal area (D) and the ventral area (V), which most authors consider homologues of the pallium and subpallium of land vertebrates, respectively (Nieuwenhuys, 1962, 1963; Northcutt and Braford, 1980; Northcutt and Davis, 1983; Northcutt, 1995). This division is supported by developmental studies of gene expression (Mueller and Wullimann, 2003). The dorsal area of teleosts has been subdivided into medial, dorsal, lateral, posterior, and central parts following cytoarchitectural and, sometimes, neurochemical and hodological criteria (see Northcutt and Braford, 1980; Northcutt and Davis, 1983; Northcutt, 1995), although there is considerable anatomical variation in the organization and relative extension of the subdivisions among teleosts (Schnitzlein, 1977; Northcutt and Braford, 1980; Schroeder, 1980; Wullimann et al., 1996; Riedel, 1997; Cerdá-Reverter et al., 2001). A recent immunohistochemical study has presented a detailed comparison of the distribution of calretinin and other neuronal markers in the telencephalon of a salmonid (Castro et al., 2003), providing new criteria for characterizing the subdivisions of the dorsal area designated by Northcutt and Braford (1980), and revealing additional subdivisions. Studies of telencephalic connections have been made after application of neural tracers to restricted areas of the telencephalic lobes (Echteler and Saidel, 1981; Ito et al., 1980, 1982; Shiga et al., 1985; Wullimann and Meyer, 1993; Yamane et al., 1996; Wong, 1997; Zupanc, 1997; Corrêa et al., 1998; Yoshimoto et al., 1998; von der Emde and Prechtel, 1999; Yamamoto and Ito, 2000) or to other brain regions (Ito and Kishida, 1977; Finger, 1980; Echteler, 1984; Ito et al., 1986; Murakami et

al., 1986a,b; Kanwal et al., 1988; Wullimann and Northcutt, 1990; Striedter, 1991, 1992; Lamb and Caprio, 1993; Wullimann and Roth, 1994; Yáñez and Anadón, 1996; Shimizu et al., 1999; Sawai et al., 2000; Folgueira et al., 2002, 2003a; Imura et al., 2003). These studies have given rise to a heterogeneous collection of data on pallial and subpallial connections, probably due to both the different methods used and real interspecific differences in connections.

The telencephalic stalk of teleosts is organized around the preoptic recess, and mainly consists a large preoptic nucleus that is subdivided into magnocellular and parvocellular parts, a vascular organ (the organum vasculosum of the terminal lamina; Gómez-Segade et al., 1991) and a migrated nucleus located at the transition with the telencephalic lobes, the entopeduncular nucleus. Classic embryological studies in trout and other vertebrates (von Kupffer, 1906; Bergqvist, 1932) indicate that the preoptic region develops rostral to the von Kupffer's anterior intraencephalic sulcus and, hence, is telencephalic. Modern studies of early gene expression in mammals also indicate that the preoptic region arises from the alar region of the secondary prosencephalon (Puelles and Rubenstein, 1993, 2003). In teleost fishes, most studies of the preoptic nucleus have centered in its neurochemistry and connections with the neurohypophysis (Kah et al., 1987; Olivereau et al., 1988, 1990; Batten et al., 1990; Olivereau and Olivereau, 1991; Holmqvist et al., 1994; Holmqvist and Ekström, 1995), whereas experimental studies on the extra-hypophyseal connections of the preoptic nucleus are scarce (Shiga et al., 1985). In rainbow trout, the entope-

Abbreviations

AC	anterior commissure	NI	nucleus isthmi
ATh	anterior thalamic nucleus of Holmgren (= nucleus glomerulosus)	OB	olfactory bulb
ATN	anterior tuberal nucleus	OC	optic chiasm
BC	body of the cerebellum	ON	olfactory nerve
CB	cerebellum	OT	optic tectum
CC	cerebellar crest	PC	paracommissural nucleus
CG	central gray	PG	preglomerular complex
CP	central posterior nucleus of the thalamus	PL	posterior tubercular lobe
D	diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe	PM	magnocellular preoptic nucleus
Dc	central region of the dorsal area	PO	preoptic region
Dd+Dl-d	dorsal plus dorsolateral region of the dorsal area	PP	parvocellular preoptic nucleus
Dl-v	ventrolateral region of the dorsal area	PR	posterior recess
Dm	medial region of the dorsal area	PSP	superficial pretectal nucleus, parvocellular part
Dm1	part 1 of Dm	PT	posterior tubercle
Dm2	part 2 of Dm	PTN	posterior tuberal nucleus
Dm3	part 3 of Dm	R	superior raphe nucleus
Dm4	part 4 of Dm	RF	reticular formation
Dp	posterior region of the dorsal area	SC	suprachiasmatic nucleus
Dp-d	dorsal part of Dp	SG	nucleus subglomerulosus
Dp-v	ventral part of Dp	SGN	secondary gustatory visceral nucleus
ENT	entopeduncular nucleus	SGP	stratum griseum periventriculare
fr	fasciculus retroflexus	T	telencephalon
GL	glomerular layer of the olfactory bulb	Td	dorsal thalamus
GR	granular layer of the olfactory bulb	TGN	preglomerular tertiary gustatory nucleus
H	habenula	TL	torus lateralis
hc	horizontal commissure	Tlo	torus longitudinalis
HL	hypothalamic lobe	TS	torus semicircularis
IP	interpeduncular nucleus	Tv	ventral thalamus
LC	locus coeruleus	VC	valvula cerebelli
LR	lateral recess	Vd	dorsal nucleus of the ventral area
LTN	lateral tuberal nucleus	VI	lateral nucleus of the ventral area
LV	lateral nucleus of the valvula	Vp	posterior nucleus of the ventral telencephalic area
MB	mamillary body	Vs	supracommissural nucleus of the ventral area
ML	mitral layer of the olfactory bulb	VS	vagal viscerosensory column
mlf	medial longitudinal fascicle	Vv	ventral nucleus of the ventral area

duncular nucleus of trout has been reported to project to the habenula (Yáñez and Anadón, 1996).

To contribute to our understanding of the organization of the telencephalon in salmonids, the connections of the different pallial zones and the preoptic nucleus were examined with the 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) tracing technique. A further aim was to compare the pattern of telencephalic connections in salmonids obtained with those reported in other fishes to gain insight into the evolution of telencephalic connections.

MATERIALS AND METHODS

We used the same biological material as in the accompanying study (Folgueira et al., 2004a). Young adult rainbow trout (201 specimens, 4–7 cm in standard body length) were supplied by a local fish farm (Piscifactoría Berxa, Mesía, Spain). Trout were deeply anesthetized with 0.1% tricaine methane sulfonate (MS-222, Sigma, St. Louis, MO) and transcardially perfused with cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 (PB). Brains were then carefully dissected out and stored at 4°C in the same fixative until use. Two different procedures of application of the lipophilic tracer DiI (Molecular Probes, Eugene, OR) were used. To apply tracer to superficial nuclei and externally accessible brain areas, a small crystal of DiI was placed on the tip of an electrolytically sharpened insect pin, which was directly inserted into the brain under a stereomicroscope. For DiI application to deeply located or less accessible nuclei and areas, brains were previously embedded in a block of 3% agarose and sectioned on a Vibratome (for details, see Folgueira et al., 2004a). The brain areas accessed by these procedures are indicated in Table 1.

All experiments were conform to the European Community's guidelines on animal care and experimentation. Unless otherwise stated, the nomenclature for forebrain nuclei and areas was adopted from Northcutt and Braford (1980), Northcutt and Davis (1983), and Castro et al. (2003).

RESULTS

DiI application to pallial regions are detailed.

Medial zone of the dorsal area (Dm)

In the trout telencephalon, Dm occupies a medial region in the dorsal area throughout most telencephalic levels, extending more laterally at caudal level. In terms of cytoarchitectural and neurochemical criteria, this region appears to be heterogeneous both along the rostrocaudal axis and within each transverse section, having been subdivided into zones Dm1, Dm2, Dm3, and Dm4 (see Northcutt and Braford, 1980; Castro et al., 2003). In the present study, DiI was applied to three rostrocaudal levels of Dm: anterior, precommissural, and postcommissural. Application of DiI to Dm led to labeling of cells and fibers in several brain regions, including the forebrain, the mid-brain, and the rhombencephalon. Results of the precommissural Dm experiments are schematically represented in Figure 1.

Anterior Dm (Dm1). Application of DiI to the anterior region of Dm led to labeling of neuronal perikarya in neighboring Dm1 regions, the middle and caudal parts of

TABLE 1. Number of Fish Investigated and Areas Injected

Injection site	Whole brain	Sectioned brain
Olfactory nerve	—	3
Olfactory bulb	7 (lateral and dorsal)	—
Lateral part of the dorsal telencephalon (Dl)	4	4
Dorsal part of the dorsal telencephalon (Dd)	1	15
Medial part of the dorsal telencephalon (Dm)	2	14
Central part of the dorsal telencephalon (Dc)	—	9
Posterior part of the dorsal telencephalon (Dp)	—	12
Ventral part of the ventral telencephalon (Vv)	—	12
Dorsal part of the ventral telencephalon (Vd)	—	3
Lateral part of the ventral telencephalon (Vl)	—	2
Supracommissural part of the ventral telencephalon (Vs)	—	3
Posterior part of the ventral telencephalon (Vp)	—	4
Entopeduncular nucleus	—	2
Preoptic region	—	4
Preglomerular nuclei	5 (lateral part)	6 (lateral and medial nuclei)
Torus lateralis (TL)/ TGN	8	1 (TL)
Mamillary body	—	3
Nucleus subglomerulosus	—	11
Dorsal thalamus	—	5
Ventral thalamus	—	5
Lateral tuberal nucleus	—	2
Hypothalamic lobe	5 (diffuse nucleus)	3 (diffuse nucleus) + 2 (medial part)
Posterior tubercle	2	16 (medial, lateral, rostral, caudal)
Parvocellular superficial pretectal nucleus	1	—
Optic tectum (dorsal and lateral parts)	4	—
Torus semicircularis	2	2
Cerebellum	3	—
Lateral nucleus of the valvula	—	2
Secondary gustatory nucleus	—	5
Interpeduncular nucleus	—	4
Superior raphe nucleus	—	4

Dm (mainly Dm3), the preoptic nucleus, the ventrolateral part of the anterior preglomerular nucleus (high proportion of cells labeled), and the anterior tuberal nucleus (only a few cells; Fig. 2A–C).

In addition to labeling of perikarya, this type of application led to labeling of several fibers that coursed in the lateral forebrain bundle passing ventral to the anterior preglomerular nucleus and coursing to the anterior tuberal nucleus, where they formed a very dense terminal field (Fig. 2C), and extending to the posterior hypothalamic lobe to end massively in its lateral and ventral parts (Fig. 2D).

Precommissural Dm

Retrogradely labeled cells. Application of DiI to the precommissural Dm led to labeling of telencephalic cells mainly in the postcommissural Dm and in the preoptic nucleus, on both the ipsi- and contralateral side (Figs. 1A, 2E–G). Moreover, sometimes labeled cells were observed in the ventral nucleus of V (Vv), dorsal nucleus of V (Vd), supracommissural nucleus of V (Vs), and, in one case, a few labeled cells were seen in the posterior zone of D (Dp; Figs. 1A,B, 2H,I). At diencephalic levels, a few labeled cells were observed in the central posterior thalamic nucleus, which lies between Holmgren's anterior thalamic nucleus (= nucleus glomerulosus) and the dorsomedial thalamic nucleus (Figs. 1D–F, 2J). Moreover, spindle-shaped labeled cells were observed in the suprachiasmatic

nucleus bilaterally, mainly after DiI application to the dorsalmost portion of Dm (Figs. 1D, 2K). Labeled cells were also observed bilaterally in the preglomerular tertiary gustatory nucleus, the preglomerular nuclei, mamillary body, and the posterior tubercle (Figs. 1E–H, 2L–N). Caudally, labeled cells were observed in the rhombencephalic reticular formation, the superior raphe nucleus, the locus coeruleus, and the rhombencephalic central gray (Figs. 1I–L, 3A,B). Occasional labeled cells were also observed in the secondary gustatory nucleus (Fig. 3B).

Labeled fibers. In the telencephalon, labeled fibers from Dm were observed crossing in the anterior commissure and ending in the contralateral Dm. Moreover, labeled fibers and terminals were observed in the subpallium and the preoptic region (Fig. 1A–C). The Dm efferents to diencephalic levels were represented by labeled fibers coursing in the medial and the lateral forebrain bundle toward the preglomerular complex, the periventricular cell layer of the inferior hypothalamic lobes, and the posterior tubercle (Figs. 1G–I, 3C). Some labeled fibers reached the ipsilateral habenula and crossed in the habenular commissure (Fig. 1C). Apparently, these fibers did not end in the habenula, because no clear terminal fields or varicose fibers were observed.

Postcommissural Dm. Application of DiI to the postcommissural Dm (after removal of the contralateral telencephalic lobe) led to labeling of some cells in the lateral nucleus of V (VI; Fig. 3D), as well as a few cells in the precommissural region of the central zone of D (Dc) close to Dm and the preoptic nucleus. Some labeled cells were observed in the thalamic central posterior nucleus, preglomerular nuclei, mamillary body, and also in the anterior tuberal nucleus (only a few labeled cells).

In the telencephalon, this type of application led to labeling of abundant fibers in the granular cell layer of the olfactory bulb (Fig. 3E), as well as of numerous beaded fibers in the dorsal plus dorsolateral zone of D (Dd+Dl-d), Dm (Fig. 3F), and Vv. In the preoptic region, numerous labeled beaded fibers were distributed throughout the preoptic area and several labeled fibers coursed in the lateral forebrain bundle, which was conspicuously labeled. In the diencephalon, the labeled fibers coursing in this bundle richly innervated the preglomerular nuclei (anterior and medial), the mamillary body, the torus lateralis, the diffuse nucleus, the neuropil of the lateral recess nucleus, and the nucleus subglomerulosus (Fig. 3G,H). The medial regions of the thalamus also received some DiI-labeled fibers. A few labeled beaded fibers were observed in a small terminal field of the ventrolateral region of the habenula. The Dm afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Dorsal and lateral zone of the dorsal area (Dd+Dl-d)

In trout, the Dd+Dl-d is a rather homogeneous telencephalic region from both cytoarchitectonical and neurochemical points of view (Northcutt and Braford, 1980; Castro et al., 2003). Application of DiI to different rostrocaudal levels of Dd+Dl-d (precommissural, commissural, and postcommissural) gave similar results. Therefore, the results of these different experiments will be considered together, and the minor differences observed will be noted when necessary. Results of these experiments are schematically represented in Figure 4.

Labeled perikarya. After application of DiI to rostral (precommissural) levels of Dd+Dl-d, a few retrogradely labeled neurons were observed in the contralateral Dd+Dl-d (Fig. 4A,B), and occasional cells in the ipsilateral olfactory bulb. Some labeled cells were also seen bilaterally in the subpallium [Vv, Vd, supracommissural nucleus of V (Vs)] and, mostly ipsilaterally, in the preoptic region (Figs. 4A–D, 5A,B). In the diencephalon, a few labeled perikarya were observed in medial regions of the dorsal and ventral thalamus (Fig. 4D–F), as well as in the central posterior thalamic nucleus (in 2 of 15 fish; Fig. 4E,F). In most fish, a group of labeled cells was observed in the suprachiasmatic nucleus (Fig. 4E); the number of labeled cells was largest in experiments in which DiI was applied to commissural levels of Dd+Dl-d. Densely packed labeled cells were found in the anterior and lateral preglomerular nuclei, mainly in its ventral portion, and more caudally some retrogradely labeled cells were observed in the medial preglomerular nucleus (Figs. 4F–H, 5C). Labeled perikarya were also observed in the anterior and lateral tuberal nuclei, and the posterior lobe (Figs. 4F–H, 5D). The projections from the anterior+lateral preglomerular nuclei and the medial preglomerular nucleus to Dd+Dl-d were confirmed by DiI application to these nuclei, which produced several anterogradely labeled fibers in Dd+Dl-d. These fibers were not noted in cases of the DiI application to the mamillary body. In the isthmus, DiI application to Dd+Dl-d led to labeling of a few cells in the central gray, superior reticular formation and superior raphe nucleus (Fig. 4I), although the number of these cells varied among cases.

Labeled fibers. After DiI application to the rostral Dd+Dl-d, labeled fibers were observed in the contralateral Dd+Dl-d, and some labeled fibers also reached the precommissural levels of Dm (Fig. 4A,B). At commissural levels, a terminal field of labeled fibers appeared to be restricted to the Dc. At diencephalic levels, all DiI applications to Dd+Dl-d led to labeling of fibers reaching the ipsilateral habenula and crossing in the habenular commissure (Fig. 4D), although no terminal field could be clearly appreciated in the habenular nuclei (dorsal and ventral). A few labeled fibers were also observed both in the dorsomedial and ventromedial thalamus, as well as in the more lateral thalamic nucleus already described. Ventrally, labeled fibers were observed coursing in the medial and the lateral forebrain bundle. The lateral bundle (*lfb*) was less compact than the median forebrain bundle (*mfb*), containing labeled fibers that bilaterally reached the preglomerular complex and also labeled axons that originated from preglomerular nucleus neurons. Labeled fibers were observed bilaterally in the posterior tubercle, around the posterior recess, and also entering the inferior hypothalamic lobes, mainly in the periventricular region, whereas at rhombencephalic levels some labeled fibers were observed running bilaterally close to the interpeduncular nucleus, reaching the superior raphe nucleus (Figs. 4G–I, 5D). The origin of these fibers from Dd+Dl-d cells could not be confirmed in reciprocal experiments of DiI application to the hypothalamus (including the posterior tubercle) or to isthmus regions. The Dd+Dl-d afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Lateroventral zone of the dorsal area (Dl-v)

The lateroventral region of the dorsal area of trout shows several cytoarchitectonic and neurochemical differ-

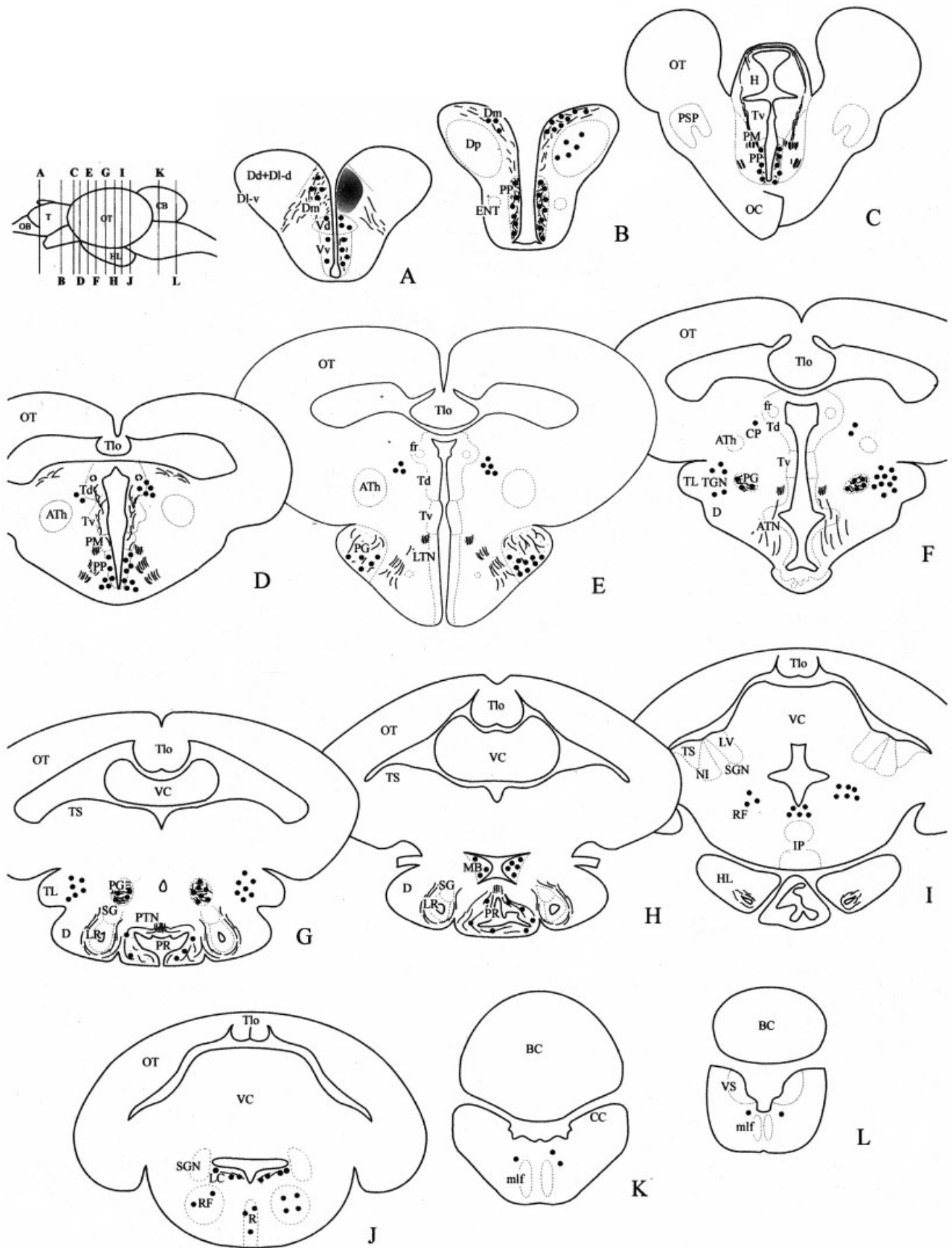


Fig. 1. A-L: Schematic drawings of transverse brain sections showing perikarya (solid circles) and fibers (dashes and lines) labeled after 1,1'-diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the precommissural Dm. The shaded area in A represents the application site. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

ences from Dd+Dl-d (see Castro et al., 2003); notably, this region is traversed by the lateral olfactory tract. The point of tracer application was in the dorsolateral part of the dorsal telencephalon just ventral to the insertion of the dorsal tela, so that application affected the Dl-v and, possibly, the most lateral region of Dd+Dl-d. In three fish, DiI was applied in toto to follow connections both rostrally and caudally from the application point. Most labeled structures were observed bilaterally, but stronger labeling was observed on the ipsilateral side. The results obtained in these experiments are summarized in Figure 6.

Labeled perikarya. In the olfactory bulbs, numerous retrogradely labeled mitral cells were distributed in the external cellular layer (Figs. 6A, 7A), and a rich plexus of mitral cell dendritic processes was observed in the olfactory glomeruli. Moreover, a few labeled cells were located in the inner cellular layer (Fig. 6A). At the level of the telencephalic lobes, some retrogradely labeled cells were observed in the Vd, Vv, and Vs (Figs. 6B,C, 7B–D). At diencephalic levels, labeled cells were observed in the preglomerular complex (Fig. 6F), although the existence of preglomerular projections to Dl-v could not be confirmed in reciprocal experiments of DiI application to this complex.

Labeled fibers. Application of DiI to the Dl-v led to labeling of fibers close to the glomerular layer of the olfactory bulb, and also of a few varicose fibers in the inner cellular layer (Fig. 6A). In the ipsilateral telencephalic lobe, labeled fibers were observed in the precommissural Dm, Dd+Dl-d, Vv, and Vs (Fig. 6B,C). Some labeled fibers crossed the anterior commissure to reach the contralateral Dl-v and Vv (Fig. 6C). At caudal telencephalic levels, a dense terminal field was observed bilaterally in Dp (Figs. 6D, 7E). Some labeled fibers, likely coursing from the medial forebrain bundle, entered the habenula crossing to the contralateral side through the habenular commissure (Fig. 6E). Labeled fibers coursing in the lateral forebrain bundle reached the preglomerular complex and the posterior tubercle (Fig. 6F). In some cases (3 of 8), labeled fibers arising from the lateral forebrain bundle entered the ventral region of the preglomerular complex. At the level of the posterior tubercle, the bundles of labeled fibers coursing bilaterally in the medial forebrain bundle joined together in the midline at the level of the nucleus of the saccus vasculosus (Figs. 6F, 7F). Some labeled fibers also reached the periventricular nuclei of the lateral and posterior hypothalamic recesses (Fig. 6F,G). Occasionally, a few labeled fibers were observed in the interpeduncular nucleus (Fig. 6G).

Because no labeled cells were observed in Dl-v in any of the reciprocal experiments in which DiI was applied to the several extratelencephalic regions containing labeled fibers, these fibers are probably not Dl-v efferents. The Dl-v afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Central zone of the dorsal area.

In trout, Dc is a central region located mainly at precommissural levels below Dd+Dl-d and ventrolateral to Dm, consisting of rather large neurons and a neuropil traversed by conspicuous bundles of fibers derived from the *lfb* and coursing toward the Dm (Northcutt and Braford, 1980; Castro et al., 2003; present results). Application of DiI to Dc through a rostral approach led to labeling of cells and fibers in several brain regions caudal

to the point of application, including the forebrain, the midbrain, and the isthmus, whereas application by a caudal approach revealed its rostral connections. Results of these experiments are schematically represented in Figure 8.

Labeled perikarya. The caudal approach to Dc led to labeling of some cells in Vv, Vd, and Vs (Fig. 8A,B). At caudal telencephalic levels, application of DiI to Dc led to labeling of some perikarya ipsilaterally at postcommissural levels of Dm and Dp, and bilaterally in the preoptic nucleus close to the ventricle (Figs. 8C,D, 9A). At diencephalic levels, this type of application sometimes led to bilateral labeling of cells in the suprachiasmatic nucleus (3 of 7 fish) (Fig. 8E). Labeled cells were observed bilaterally in the medial region of the dorsal and ventral thalamus, and a small bilateral group of cells (central posterior nucleus) was also sometimes labeled in more lateral regions of the dorsal thalamus (5 of 7 fish; Figs. 8D–F, 9B,C). Reciprocal experiments of DiI application to the dorsal and ventral thalamus labeled fibers in Dc, which confirms this thalamic projection to Dc.

In the hypothalamus/posterior tubercle, densely packed labeled cells were observed bilaterally throughout the preglomerular nuclei and mamillary body (Figs. 8F–H, 9D). Some retrogradely labeled cells were observed in the anterior and lateral tuberal nuclei, mostly ipsilaterally, whereas in some cases labeled neurons appeared in the posterior tubercle close to the ventricle and the posterior hypothalamic lobe (Fig. 8F–H). In the brainstem, some retrogradely labeled cells were seen bilaterally in the torus semicircularis (Figs. 8G–I, 9E), the secondary gustatory nucleus, the locus coeruleus, the central gray, the superior reticular formation, and the superior raphe nucleus (Figs. 8I,J, 9F,G). The projections of the secondary gustatory nucleus to Dc were not confirmed in reciprocal experiments (see Folgueira et al., 2003a).

Labeled fibers. In the telencephalon, DiI application to Dc led to labeling of fibers in Dm, Dd+Dl-d, Dp, and the preoptic region. At diencephalic levels, labeled fibers were observed bilaterally coursing in the medial and the lateral forebrain bundles, and also coursing through the habenular nuclei and the habenular commissure (Fig. 8D,E). At postchiasmatic levels, labeled fibers of the lateral forebrain bundle ran toward ventrolateral regions, reaching the preglomerular complex (Fig. 8F). In the posterior tubercle, labeled fibers coursing bilaterally in the medial forebrain bundles joined in the midline, giving off fibers to the posterior tubercle and the nuclei of the lateral and posterior recesses bilaterally, although labeling was more intense on the ipsilateral side (Fig. 8G,H). Reciprocal tracing experiments showed retrogradely labeled cells in Dc only after DiI application to the preglomerular complex; the number of labeled cells observed in Dc was clearly larger when the tracer was applied to the mamillary body and medial preglomerular nucleus than when it was applied to more rostral parts of the complex.

In the pretectum, labeled fibers from the medial forebrain bundle coursed to the dorsolateral pretectal area and subventricular tegmental plexus (Figs. 8E,F, 9H). From this region, some labeled fibers reached the optic tectum, where varicose labeled fibers were observed in the stratum periventriculare and stratum album centrale (Fig. 8D–J, 9I). These Dc projections were confirmed by DiI application to both the dorsolateral part of the sub-

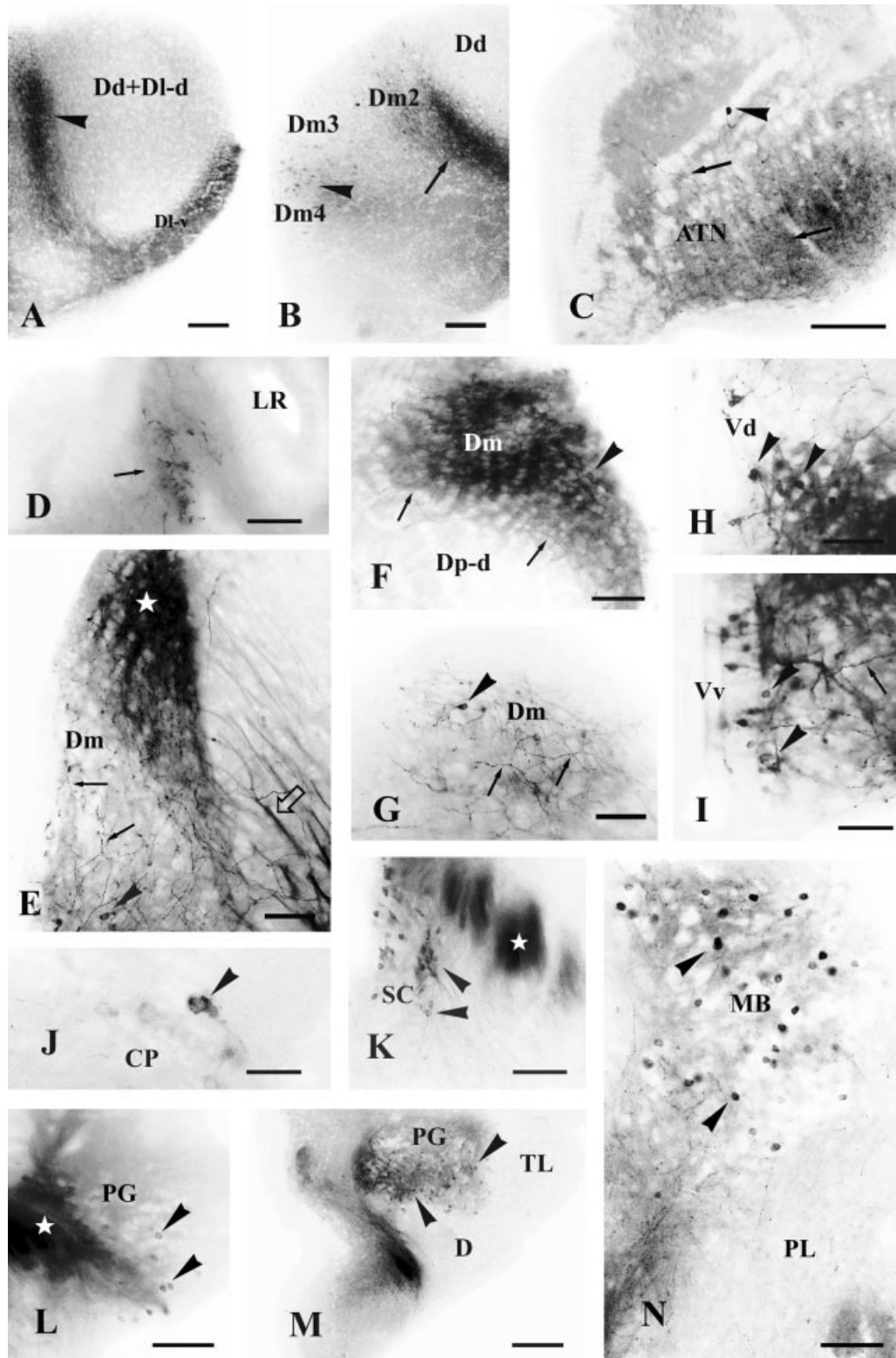


Figure 2

ventricular tegmental plexus and to the nearby region of the optic tectum.

Ipsilaterally labeled varicose fibers were also observed in the torus semicircularis and in an area close, but lateral, to the lateral nucleus of the valvula (Fig. 8G–I). After DiI application to the torus semicircularis we observed retrogradely labeled cells in Dc. The Dc afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Posterior zone of the dorsal area (Dp)

The posterior zone of the dorsal area of trout is an olfacto-recipient region (Northcutt and Bradford, 1980; Folgueira et al., 2004a). In the Dp, a dorsal (Dp-d) and a ventral (Dp-v) part can be distinguished by using some immunocytochemical markers (Castro et al., 2003), but our attempts of DiI application to these Dp subzones have not revealed clear connectional differences and will be treated together. Application of DiI to Dp led to labeling of neurons and fibers in the olfactory bulbs, telencephalic lobes, diencephalon, midbrain, and rhombencephalon, mostly bilaterally to the application site. The results of these experiments are summarized in Figure 10.

Labeled cells. In the olfactory bulbs, mitral cells and occasional granule cells were retrogradely labeled bilaterally (Figs. 10A, 11A). In the telencephalic lobes, labeled cells were also seen in the ipsilateral Vv and Vs (Fig. 10B,C). In the preoptic region, DiI application to Dp led to labeling of cells in the preoptic nucleus, mostly ipsilaterally (Fig. 10D,E). Occasionally (in 3 of 11 fish), a few faintly labeled cells appeared in the suprachiasmatic nucleus. At thalamic levels, some labeled cells were also observed bilaterally in the dorsomedial thalamic nucleus (6 of 11 fish), and in the central posterior thalamic nucleus (5 of 11 fish; Figs. 10F,G, 11B). Reciprocal experiments of DiI application to the thalamus revealed in some cases a

small number of labeled cells in a thin ventrolateral superficial layer of Dp.

In the hypothalamus/posterior tubercle, strong labeling was observed in cells of the preglomerular nuclei, as well as in some cells of the mamillary body (Fig. 10G–I). Projections from these nuclei on Dp were not confirmed by the reciprocal experiments, with the exception of the medial preglomerular nucleus. In most cases of DiI application to Dp, a few labeled neurons were found in the bilateral anterior and lateral tuberal nuclei, and in the ipsilateral inferior hypothalamic lobe, both in the diffuse nucleus and in the periventricular region (Fig. 10H). In the periventricular posterior tubercle, posterior tuberal nucleus, and posterior hypothalamic lobe, occasional labeled cells were observed bilaterally forming a cell band parallel to the third ventricle (Fig. 10H,I). The posterior tubercle–Dp projection was confirmed by reciprocal experiments.

At midbrain and isthmic levels, several labeled cells were observed bilaterally in the torus semicircularis and a few in the lateral nucleus of the valvula, secondary gustatory nucleus, and superior raphe nucleus (Figs. 10H–K, 11C,D). These projections were not confirmed by reciprocal experiments, suggesting that these nuclei project to Dp-adjacent areas rather than to the Dp itself. There were also labeled cells in the central gray (5 of 11 fish), in the locus coeruleus, and the isthmo-rhombencephalic reticular formation (5 of 11 fish; Figs. 10K,L, 11D,E).

Labeled fibers. After DiI application to Dp, a large number of labeled varicose fibers were observed in the ipsilateral olfactory bulb, both in the inner cellular layer and in the adjacent plexiform layer, but only a few fibers were observed in the contralateral bulb (Figs. 10A, 11A). Some labeled varicose fibers appeared ipsilaterally in D1-v and in the precommissural region of Dm, mainly in its ventral portion (Figs. 10B,C, 11F). The postcommissural region of Dm was not analyzed due to its closeness to the point of DiI application. In the ventral telencephalon, there were some labeled fibers distributed in Vv, mainly ipsilaterally (Fig. 10B,C). Some labeled fibers also crossed in the anterior commissure to the contralateral side, where they ran in the medial olfactory tract through D1-v (Fig. 10B,C).

At diencephalic levels, some labeled fibers ascended to the habenula and crossed to the contralateral side through the habenular commissure (Fig. 10E). Some labeled fibers were observed bilaterally in the dorsomedial thalamus and in the nucleus medial to the anterior thalamic nucleus (Fig. 10F). Moreover, DiI application to Dp revealed an ipsilateral projection to the hypothalamus, producing rather dense terminal fields in the nucleus subglomerulosus and anterior tuberal nucleus, as well as labeled fibers running close to the periventricular nucleus of the lateral hypothalamic recess, and also coursing to the posterior tubercle, and to the torus lateralis, mainly in its dorsal region (Figs. 10F–J, 11G–I). The Dp projection to the nucleus subglomerulosus has been confirmed by reciprocal experiments described elsewhere (Folgueira et al., 2002). DiI application to the torus lateralis led to the labeling of several cells in the ventrolateral region of Dp. After application of DiI to the inferior hypothalamic lobe, both to the medial part and to the diffuse nucleus, retrogradely labeled cells were observed in the ventrolateral region of Dp, which confirms the presence of these Dp projections. DiI application to the nucleus of the posterior tubercle revealed only a few very faintly labeled neurons in Dp,

Fig. 2. Transverse sections through the telencephalon (A,B,E–I) and diencephalon (C,D,J–N) showing labeled structures after 1,1'-diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Dm. The level of application was in anterior Dm (A–D) and precommissural Dm (E–N). **A:** Labeled cells and fibers (arrowhead) in dorsal postcommissural Dm (Dm2). Note also numerous labeled fibers in D1-v. **B:** Labeled perikarya in caudal Dm4 (arrowhead). Note the band of labeled cells and fibers in Dm2 close to caudal Dd+Dl-d (arrow). **C:** Labeled fibers (arrows) and a perikaryon (arrowhead) in the anterior tuberal nucleus. **D:** Labeled fibers (arrow) in the ventrolateral wall of the posterior hypothalamic lobe. **E:** Labeled fibers in dorsal Dm (Dm2; white star) caudal to the point of DiI application, and labeled cells in Vd (arrowhead) extending dendrites to the ventral part of Dm (Dm3, arrows). The outlined arrow points to bundles of fibers reaching Dm2. **F:** Labeled neurons (arrowhead) and fibers (arrows) in the contralateral caudal Dm. **G:** Detail of labeled neurons (arrowhead) and fibers (arrows) in the most caudal ipsilateral Dm (a case with light labeling). **H:** Detail of labeled neurons (arrowheads) in Vd. **I:** Labeled neurons in Vv (arrowheads) extending lateral dendrites (arrow). **J:** Detail of a few labeled neurons (arrowhead) in the central posterior thalamic nucleus. **K:** Labeled cells (arrowheads) in the suprachiasmatic nucleus just caudal to the optic chiasm. Note the labeled fiber bundles of the lateral forebrain bundle (white star). **L:** Labeled cells (arrowheads) in the anterior preglomerular nucleus. White star, lateral forebrain bundle. **M:** Labeled cells in the medial preglomerular nucleus (arrowheads). **N:** Labeled neurons (arrowheads) in the mamillary body. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 200 μm in A,B; 100 μm in C,F,G,H,N; 75 μm in D,E,I; 125 μm in J,L; 50 μm in K; 225 μm in M.

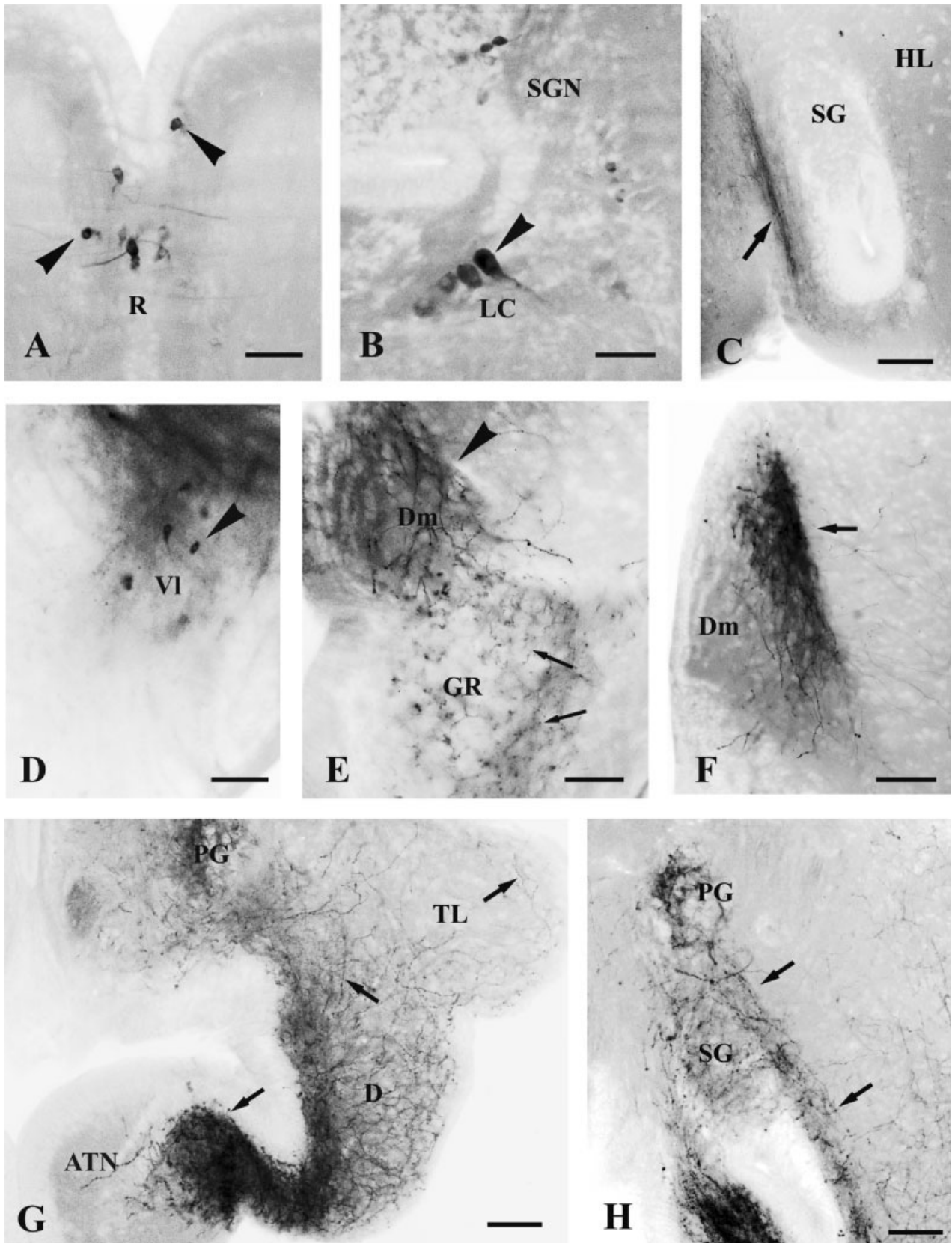


Figure 3

TABLE 2. Summary of the Connections of the Dorsal Telencephalic Area Observed in This Study¹

Brain area	Afferents	Efferents
Anterior Dm Dm (precommissural)	Dm, preoptic region, PG, ATN Vv, Vd, Vs, Dm, postcommissural Dm, Dp, preoptic region, SC, Td, CP, PG, MB, TGN, PL, LC, R, RF, CG	ATN, PL Vv, Dm, preoptic region, PG, MB, TL, HL, PTN, PL, periventricular PT
Dm (postcommissural) Dd + Dl-d	Vl, Dc, preoptic region, CP, ATN, PG, MB OB, Vv, Vd, Vs, Dd + Dl-d, preoptic region, SC, Tv, Td, CP, LTN, ATN, PG, PL, R, RF, CG	PG, MB, TL, SG, HL, PL, periventricular PT Dd + Dl-d, Dm, Dc, Td, PL
Dl-v Dc	OB, Vd, Vv, Vs Vv, Vd, Vs, Dm, Dp, preoptic region, SC, Tv, Td, CP, LTN, ATN, PG, MB, PL, periventricular PT, TS, LC, R, RF, CG	OB, Vv, Vs OB, preoptic region, Tv (eminencia thalami), Td, PC, PG, MB, HL, PTN, PL, periventricular PT, OT, TS See Dp-d and Dp-v
Dp (Dp-d, Dp-v)	OB, Vv, Vs, preoptic region, SC, Td, CP, LTN, ATN, PG, MB, HL, PTN, PL, periventricular PT, TS, LV, LC, R, RF, CG	See Dp-d and Dp-v
Dp-d Dp-v	See Dp See Dp	OB, Vv, Vd, Dm, Dl-v, PTN Tv (eminencia thalami), LTN, ATN, medial PG, TL, HL, SG, PTN, PL, periventricular PT

¹Efferent connections were only those confirmed by reciprocal experiments. For abbreviations, see list.

indicating that the projections from Dp to the diffuse nucleus or the posterior tubercle should be cautiously interpreted. The Dp afferent and efferent connections are summarized in Table 2.

Telencephalic regions of origin of some extratelencephalic projections

To gain better knowledge of the nuclei and zones of the telencephalon that give rise to extratelencephalic projections (see also the accompanying paper, Folgueira et al., 2004a), several experiments were done with application of DiI to different targets of these projections. Additionally, these experiments revealed several extratelencephalic connections of the preoptic nucleus. In the following sections, we present the results obtained after application of DiI to the most important targets, as well as to the retina.

Retina. In many teleosts, the retina receives projections from cells located in the telencephalon. Application of DiI to the trout retina led to labeling of terminal nerve ganglion cells at the entrance level of the ipsilateral olfactory nerve in the olfactory bulbs (Fig. 12A) but not to labeling of any cell in the telencephalic lobes. Some labeled fibers were observed in the preoptic region (anterior and posterior) and Vv, mostly in intermediate neuropil regions (Fig. 12B). It is also interesting to note that some labeled retinal fibers coursed to the supra/postchiasmatic region at a level rostral to the horizontal commissure (hc), forming bilateral terminal fields in the region of the su-

prachiasmatic nucleus (= anterior periventricular nucleus), ending both in perineuronal location and in the neuropil ventral to the nucleus (Fig. 12C). Cells of the suprachiasmatic nucleus were labeled after DiI application to most telencephalic regions (Vv, Vd, Vs, Dm, Dd+Dl-d, Dc, Dp; see above, and Folgueira et al., 2004a). The retinal targets observed in the diencephalon and optic tectum were similar to those reported in the rainbow trout (Pinganaud and Clairambault, 1979) and in *Oncorhynchus nerka* (Shiga et al., 1987; Ebbesson et al., 1988) and will not be described here.

Habenula. In toto application of DiI to the habenula led to two very different patterns of retrograde labeling in the telencephalon, depending on whether or not the application affected the habenular commissure. In cases in which the habenular commissure was affected (this led to labeling of the stria terminalis), numerous labeled neurons were observed in the olfactory bulbs and telencephalic lobes (Vv, Dm), as well as in the preoptic and entopeduncular nuclei.

In the cases in which the habenular commissure was not affected, no labeled cells were observed in the olfactory bulbs or pallial regions, and only a few cells were labeled in subpallial regions, in agreement with previous results (Yáñez and Anadón, 1996). In these cases, numerous labeled neurons were observed in the entopeduncular nucleus. The preoptic nucleus lacked labeled neurons.

Rostral ventral thalamus (eminencia thalami). As indicated above, the rostral part of the ventral thalamus (eminencia thalami) appears to maintain connections with some telencephalic regions and, in addition, is anatomically easily distinguishable. For these reasons, we have selected it for tracer application as a representative region of the ventral thalamus. Application of DiI to the eminencia thalami of the rainbow trout led to labeling of several cells in both telencephalic lobes and, mainly ipsilaterally, in the preoptic region. A large number of labeled cells were observed in the ipsilateral preoptic nucleus, and labeled neurons were also observed in periventricular location in the caudal ipsilateral Vd, in Vv-d (mostly ipsilateral), in Vv-v, and in Vs (bilaterally). In the pallium, large labeled cells were observed in Dc (Fig. 12D). In addition, labeled bipolar neurons were observed in a thin band of labeled processes located in the most superficial (submeningeal) layer of the ventrocaudal Dp (Fig. 12E). In the caudal region of the olfactory bulbs, some labeled cells of cerebro-

Fig. 3. Transverse sections through the isthmus (A,B), diencephalon (C,G,H), and telencephalon (D–F) showing labeled structures after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Dm. The point of application was in precommissural Dm (A–C) and in postcommissural Dm (D–H). **A:** Labeled cells (arrowheads) in the superior raphe nucleus. **B:** Large labeled cells (arrowhead) of the locus coeruleus. A few small cells are also labeled in the secondary gustatory nucleus. **C:** Anterogradely labeled fibers (arrow) around the periventricular region of the inferior hypothalamic lobe. **D:** Labeled cells in the lateral nucleus of V (arrowhead). **E:** Labeled fibers in the anterior Dm (Dm1, arrowhead) and in the granular layer of the olfactory bulb (arrows). **F:** Heavy innervation of the dorsal part of precommissural Dm (Dm2, arrow). **G:** Labeled fibers (arrows) in the hypothalamus (anterior tuberal nucleus, diffuse nucleus, torus lateralis, and medial preglomerular nucleus). **H:** Labeled fibers (arrows) in the nucleus subglomerulosus and the lateral recess nucleus. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 75 μ m in A,B,D; 125 μ m in C; 100 μ m in E,F; 150 μ m in G; 200 μ m in H.

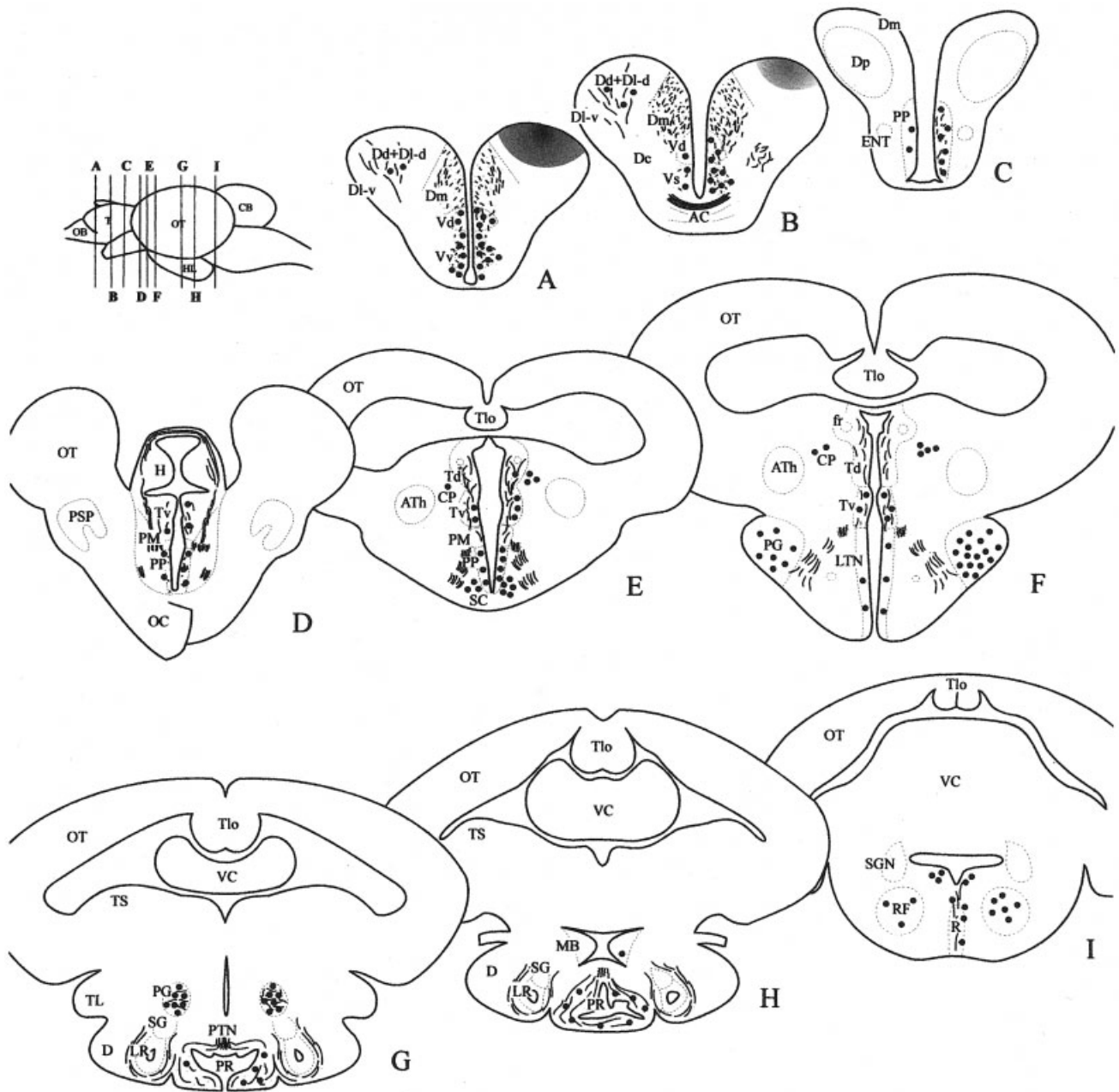


Fig. 4. Schematic drawings of transverse brain sections (A–I) showing perikarya (solid circles) and fibers (dashes and lines) labeled after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the Dd+Dl-d. The shaded areas in A,B represent the application site. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

spinal fluid–contacting type were observed in the thick peryndema of this region.

Dorsal thalamus. In these cases, DiI was applied to the dorsomedial–intermediate region of the dorsal thalamus. This type of application led to retrograde labeling of neurons in Dc and of a few neurons in caudal regions of Dd+Dl-v. In ventral regions, a few labeled neurons were also observed in Vv, and in the caudal preoptic nucleus. In addition, it is worth noting that, in the pineal organ (ep-

ithalamus), this type of application systematically led to labeling of numerous neurons (ganglion cells).

Preglomerular nuclei–mamillary body complex. To identify the origin of the telencephalic efferents to this complex, DiI was applied to different nuclei of the preglomerular complex: the anterior+lateral preglomerular nuclei, the medial preglomerular nucleus, and the mamillary body. In toto application of DiI to the anterior+lateral preglomerular nuclei led to retrograde labeling of numer-

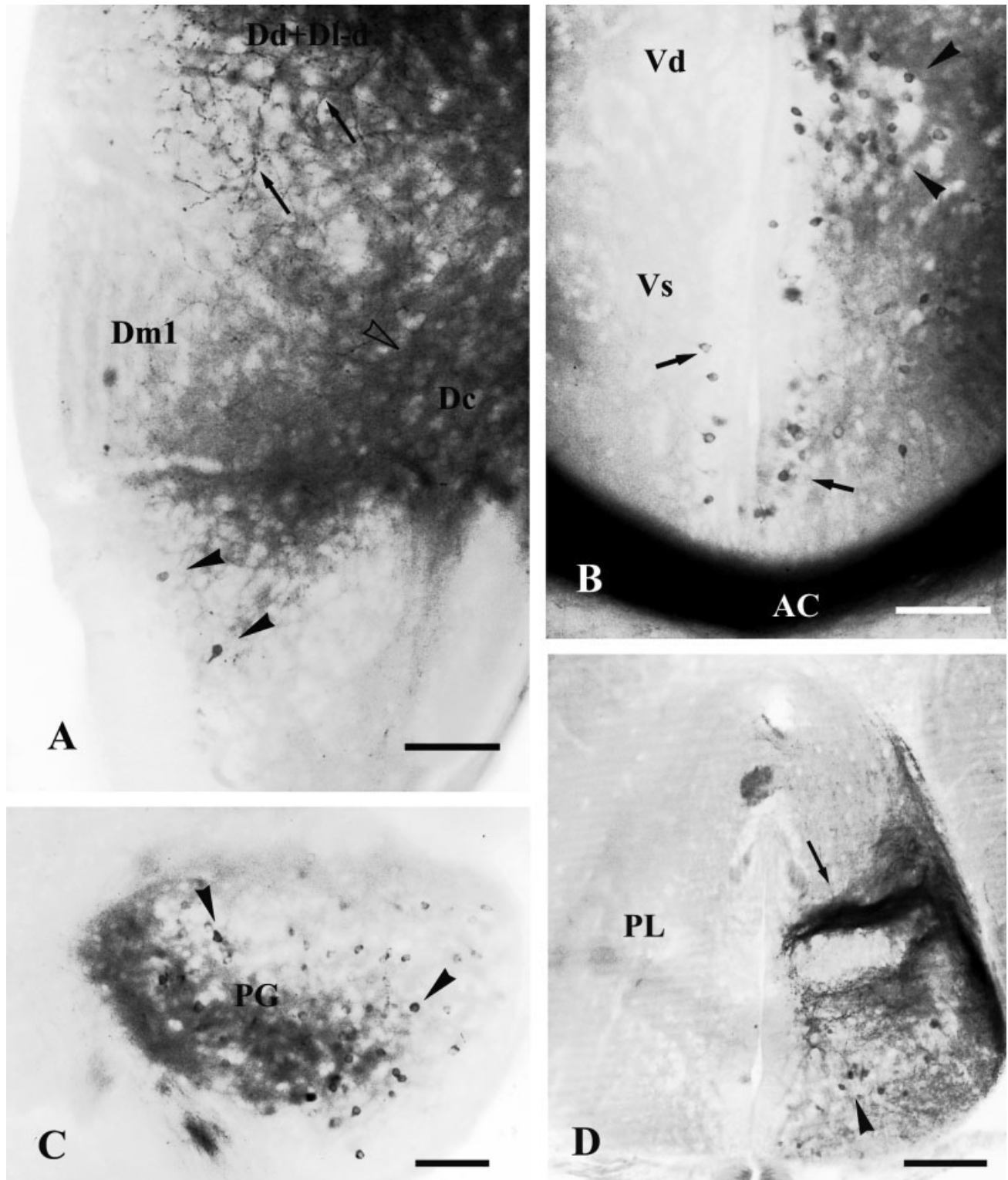


Fig. 5. Photomicrographs of transverse sections through the pre-commissural (A) and commissural (B) telencephalon and the dienkephalon (C,D) showing labeled structures after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Dd+DI-d. **A:** Labeled cells in Vv (arrowheads), and fibers (arrows) in Dd+DI-d outside the point of DiI application and in Dc (outlined arrowhead). **B:** Labeled neurons in Vs (arrows) and ipsilateral Vd

(arrowheads). Note the heavy labeling of Goldstein's anterior commissure. **C:** Labeled perikarya (arrowheads) in the anterior and lateral preglomerular nuclei. **D:** Labeled perikarya (arrowhead) in the ventral region of the posterior hypothalamic lobe. Note the heavily labeled fiber bundles (arrow) and terminal fields. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 100 μ m in A-C; 125 μ m in D.

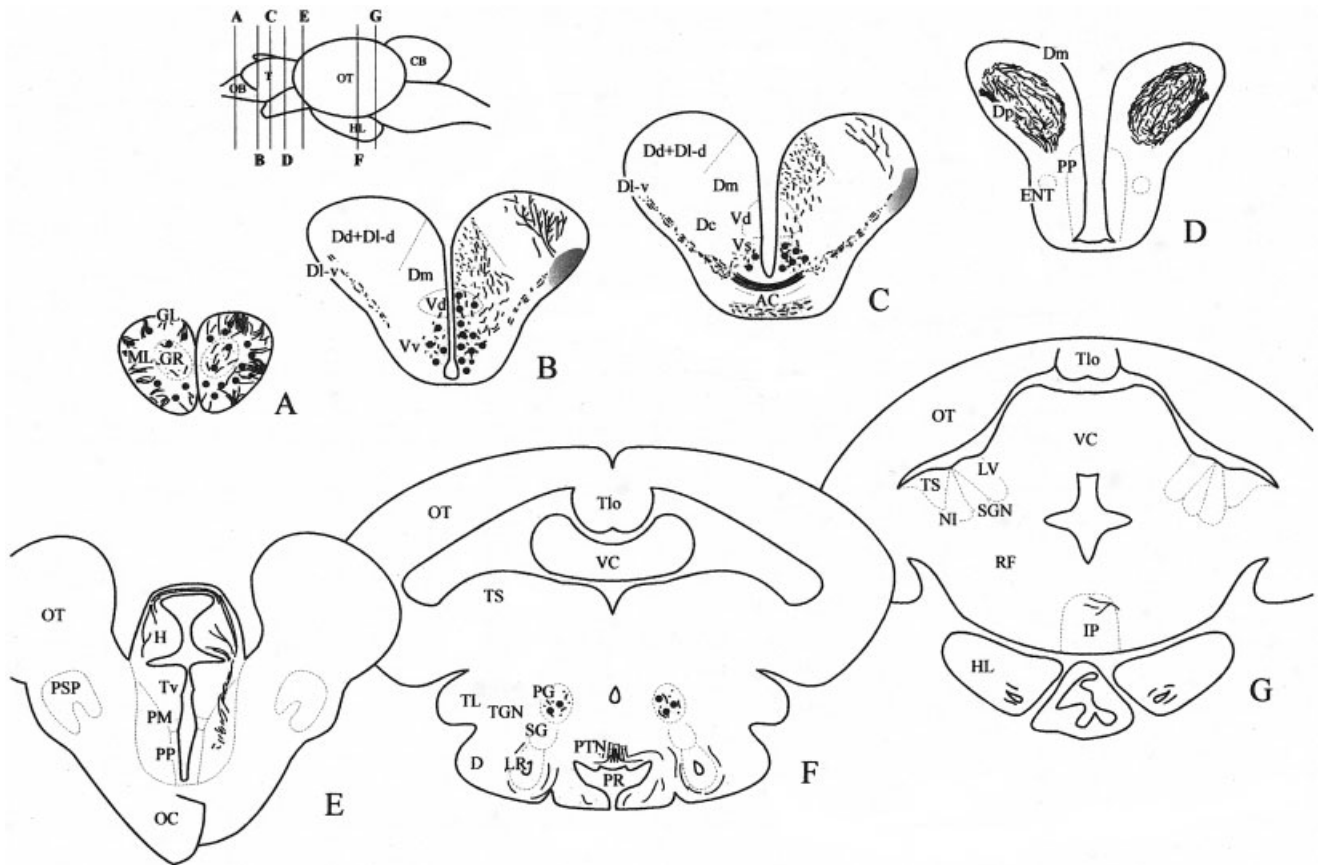


Fig. 6. A-G: Schematic drawings of transverse brain sections showing perikarya (solid circles) and fibers (dashes and lines) labeled after 1,1'-diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the DL-v. The shaded areas in B,C represent the application site. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

ous neurons in Vv (mostly in rostral parts), a few neurons in Vs, and neurons in the preoptic nucleus, including its magnocellular part. In the pallium, numerous labeled cells were observed bilaterally in middle-caudal regions of the Dm, whereas the rostral parts of Dm only contained labeled fibers (Fig. 12F,G). Retrogradely labeled neurons in Dm exhibited complex (spiny) dendrites (Fig. 12H). No labeled neurons were observed in DL-v, Dp, or Dc. In the pallium, labeled fibers were observed in Dd+Dl-d and Dm.

Application of DiI to the medial preglomerular nucleus was done in sectioned brains. In the pallium, this type of application led to labeling of neurons mainly in Dc, Dm3, Dp-v, and (only a few cells) in a region of DL-v close to Dc (Fig. 12I-K). A few labeled neurons were also observed in caudal Dd+Dl-d close to the Dm2. Labeled Dc cells were clearly larger than those of the other regions. Labeled fibers were observed in Dd+Dl-d (Fig. 12L), Dm3, and Dp. Subpallial labeled neurons were observed in Vs and Vv-d; a few labeled neurons were also observed in Vv-v. Labeled cells were also observed in the parvocellular preoptic nucleus (anterior and posterior parts).

Application of DiI to the mamillary body was again done in sectioned blocks. This type of application led to labeling of numerous neurons in Vs, Vv-d, and Vv-v, as well as in the anterior and posterior parts of the parvocellular pre-

optic nucleus, whereas only occasional labeled cells were observed in Vd. In pallial regions, retrogradely labeled neurons were observed in Dm3, caudal Dm4, and Dc (Fig. 12M). Labeled Dm3 cells were scarce and mainly periventricular. Owing to the difficult access to the mamillary body, application often affected the interpeduncular nucleus, as indicated by the presence of some labeling in the fasciculus retroflexus and the habenula.

Torus lateralis. In toto application of DiI to the torus lateralis led to retrograde labeling of neurons in Dp-v (Fig. 13A,B) and of cells in DL-v accompanying the lateral olfactory tract. In a few cases, some palely labeled cells were also observed in Dm. In the subpallium, labeled neurons were observed in Vv-d and in the magnocellular preoptic nucleus.

Diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobes. Application of DiI to the lateral region of the inferior hypothalamic lobes (diffuse nucleus) led to labeling of numerous neurons in the preoptic region and in the telencephalon proper. In the preoptic region, labeled neurons were observed in the organum vasculosum of the terminal lamina (OVLt) and in the preoptic nucleus, mostly at chiasmatic levels. In this preoptic region, a very conspicuous band of large neurons was observed bilaterally in intermediate-dorsal regions of the preoptic nucleus. In

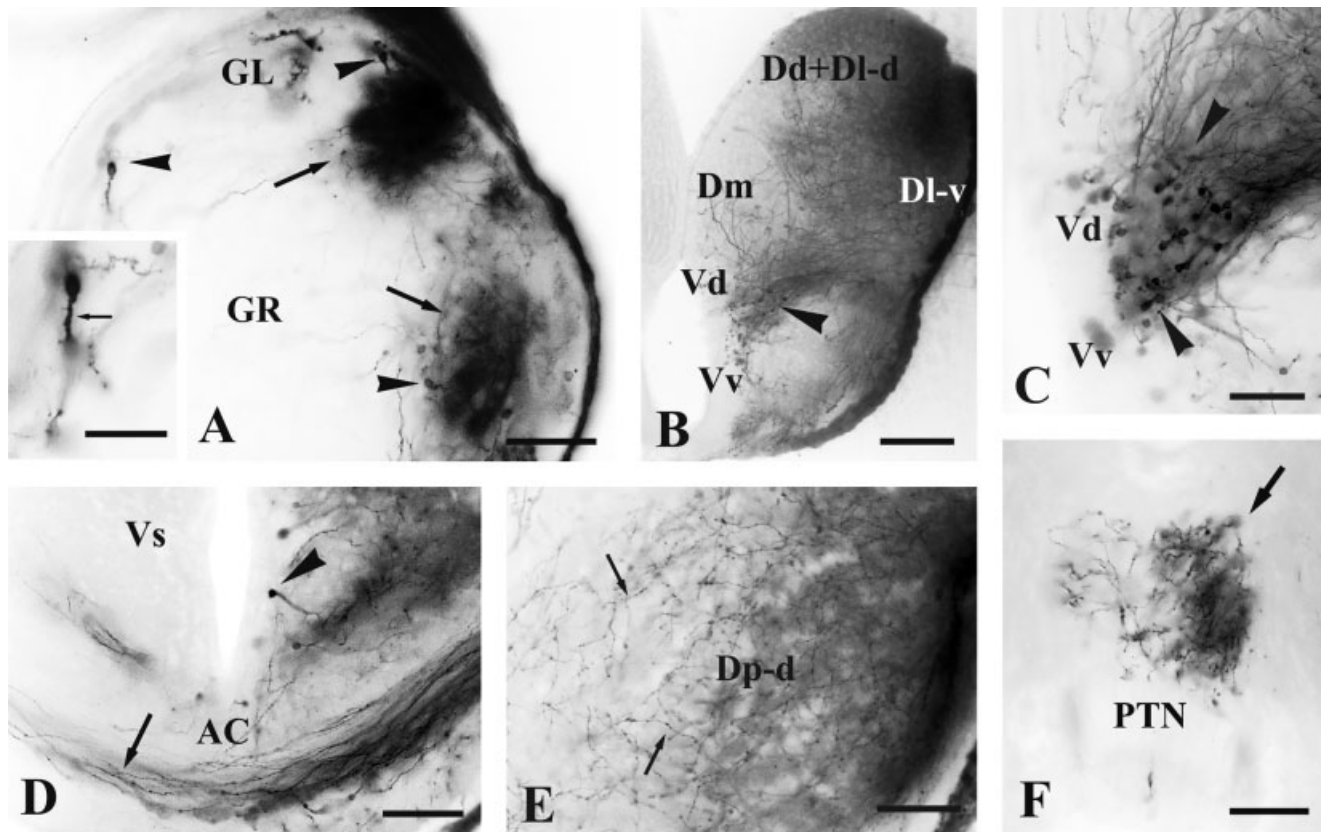


Fig. 7. Photomicrographs of transverse sections through the olfactory bulb (A), telencephalic lobes (B–E), and posterior tubercle (F) showing labeled structures after 1,1'-dioctadecyl 3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Dl-v. **A:** Labeled cells (arrowheads) in the external cell layer. The arrows point to labeled olfactory glomeruli. Inset, detail of a labeled mitral cell with a thick dendritic trunk (arrow). **B:** Labeled perikarya in anterior Vd and Vv just caudal to the olfactory bulb (arrowhead).

C: Detail of labeled anterior Vd cells (arrowheads). **D:** Labeled cells (arrowhead) in the ipsilateral Vs. Note labeled fibers (arrow) coursing in Goldstein's anterior commissure. **E:** Field of labeled terminal fibers (arrows) in Dp-d. **F:** Field of labeled fibers (arrow) in the posterior tuberal nucleus. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 100 μm in A,D; 15 μm in B; 225 μm in C; 125 μm in E,F.

other parts of this nucleus, the labeled cells were more sparse (Fig. 13C). In the telencephalic lobes, some labeled neurons were observed in the ventral area, mainly in Vv-v and Vv-d, a few in Vs and occasional cells in the rostral part of Vd (Vd-a). In the dorsal area, some labeled cells were observed in Dm3 (Fig. 13C–E), Dc, medial part of Dl-v, and Dp-v. Numerous labeled fibers were observed in Vd (especially in its rostral region), in other regions of V, and also in the internal cellular layer of the olfactory bulbs.

Medial region of the inferior hypothalamic lobes (nucleus of the lateral recess). Application of DiI to the medial region of the inferior hypothalamic lobes led to labeling of numerous neurons in the preoptic region and the telencephalic lobes. In the preoptic region, labeled cells were observed in the outer regions of the parvocellular preoptic nucleus and in the OVLTL (Fig. 13F). In the dorsal area, numerous labeled neurons were observed in Dm, mostly in Dm3 (Fig. 13G), whereas the rostral part of Dm lacked these neurons. In Dp-v, but not in Dp-d, there were a moderate number of labeled neurons (Fig. 13H). Some labeled cells were observed in Dc, in the medial region of Dl-v adjacent to Dc, and in medial and rostral

parts of Dd+Dl-d. In the ventral telencephalic area, labeled cells were observed mainly in Vv-v and Vv-d, Vs, and occasionally in the posterior nucleus of V (Vp; Fig. 13H), but no labeled cells were observed in Vd at any level. A few labeled mitral cells were also observed in the olfactory bulb. This type of application also led to labeling of numerous fibers in the inner cellular layer of the bulbs, as well as in Dm and Vv.

Posterior hypothalamic lobe. In some posterior hypothalamic lobe experiments, DiI was applied to dorsal regions. In the telencephalon, this type of application led to retrograde labeling of neurons and fibers in the olfactory bulb, telencephalic lobes, and anterior and posterior parts of the parvocellular preoptic nucleus (Fig. 14A–D). A large number of cells were labeled in Vv, both in periventricular regions and within intermediate neuropil region (Fig. 14B). Labeled cells were also observed in Vs and in the preoptic nucleus (Fig. 14D). In the pallium, a few labeled cells were observed in Dp-v (Fig. 14D), a few cells in Dc, Dm3, and also in the rostral part of Dd+Dl-d close to Dm (Dd-a; Castro et al., 2003) (Fig. 14B). Dm received numerous labeled fibers (Fig. 14A–C). The number of these labeled Dd-a cells was rather variable among exper-

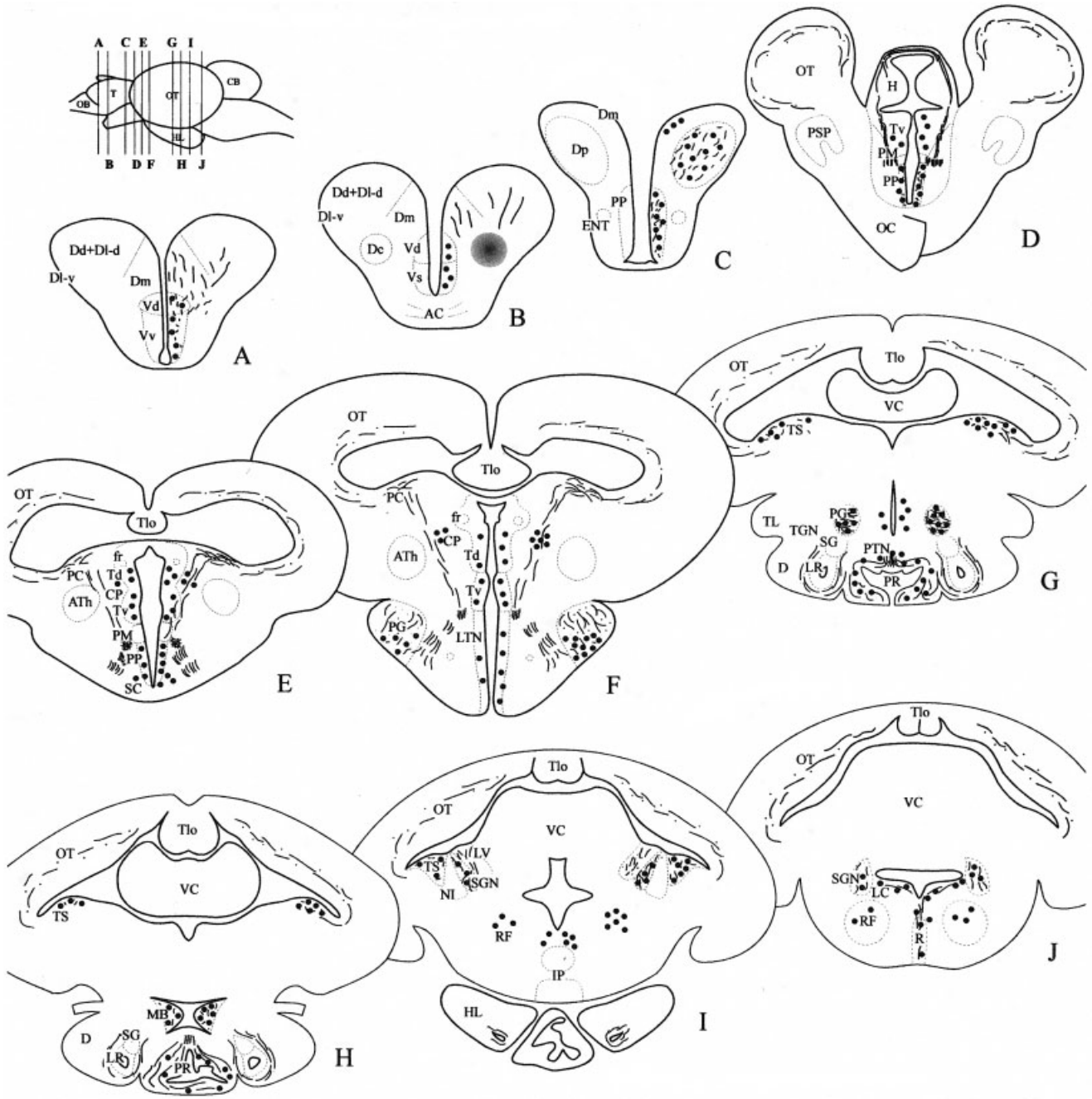


Fig. 8. **A-J**: Schematic drawings of transverse brain sections showing perikarya (solid circles) and fibers (dashes and lines) labeled after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the Dc. The shaded area in A represents the application site. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

iments. Occasional labeled mitral cells were observed in the olfactory bulbs.

In experiments in which the posterior hypothalamic lobe was approached from its ventrolateral surface, labeled cells were observed in the rostral part of Dm (Dm1) and in the nearby Dd-a (Fig. 14B). Labeled cells were also abundant in rostral Vv and in Dp-v.

Lateral tuberal nucleus. Application of DiI to the lateral tuberal nucleus, located rostrally to the hypophy-

sis, led to labeling of a large number of neurons in the preoptic nucleus, both in the magnocellular (rostral and caudal) and parvocellular parts, indicating that the preoptico-hypophyseal tract passing through the lateral tuberal nucleus was affected by the injection. In the preoptic region, labeled neurons were also observed in the OVLT. In the telencephalic lobes, labeled neurons were observed in the ventral and dorsal parts of Vv (Vv-v, Vv-d), in Vs, in Vp near the preoptic nucleus, in the ventromedial

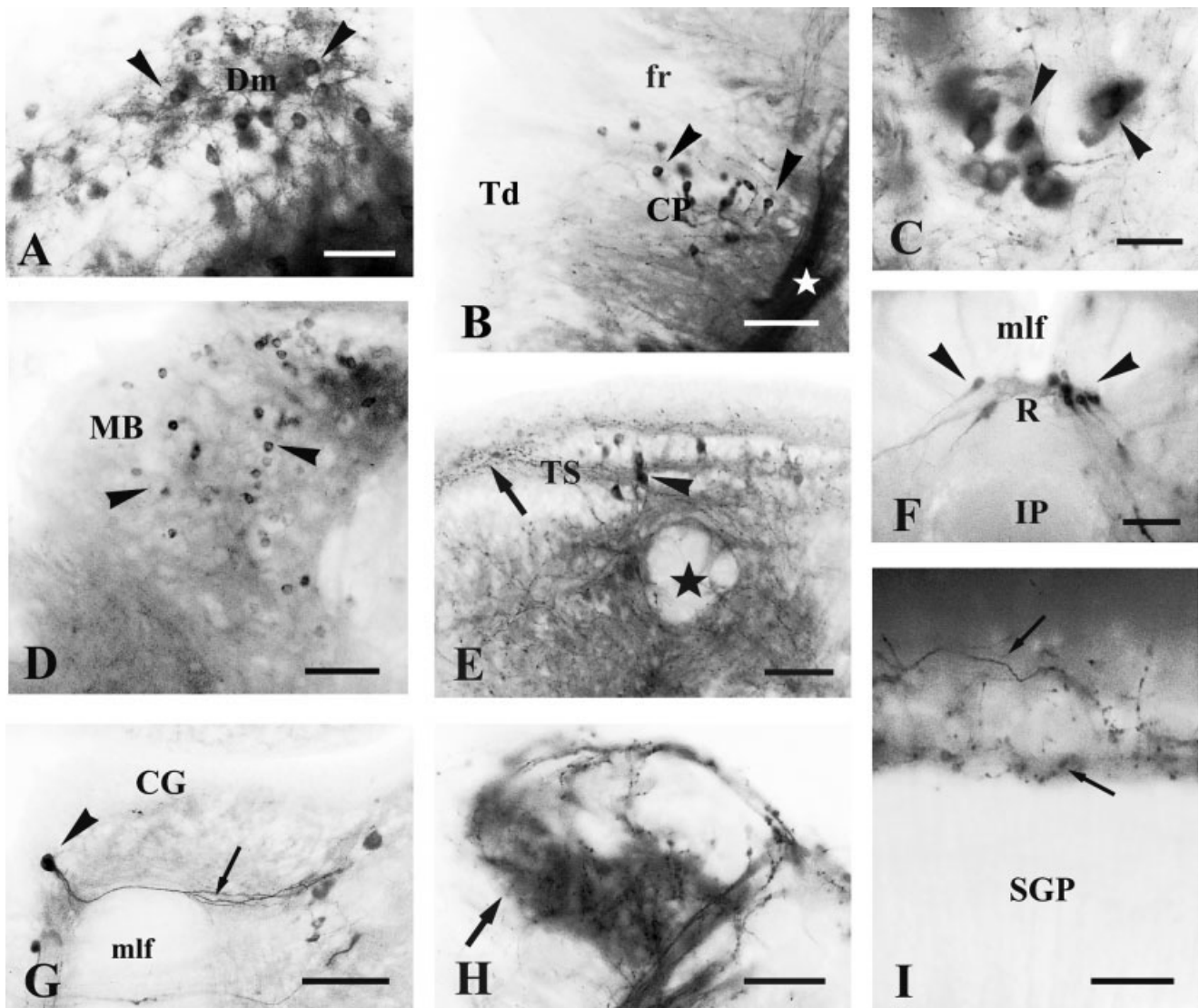


Fig. 9. Transverse sections through the telencephalon (A), dien-cephalon (B–D), and brainstem (E–I) showing labeled structures after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Dc. **A:** Labeled cells (arrowheads) in the ipsilateral Dm. **B:** Labeled perikarya (arrowheads) in the central posterior nucleus of the thalamus. The white star indicates a bundle of labeled fibers ascending toward the pretectal paracommissural nucleus. **C:** Detail of cells of the central posterior nucleus (arrowheads). **D:** Labeled neurons (arrowheads) in the mamillary body. **E:** Labeled neurons (arrowhead) in the medial periventricular region of the torus

semicircularis. The arrow points to labeled fibers in the periventricular neuropil. Star, pretecto-cerebellar tract. **F:** Labeled neurons (arrowheads) in the superior raphe nucleus. **G:** Labeled cells (arrowhead) in the central gray. Note long processes of these cells (arrow). **H:** Field of labeled fibers in the pretectal paracommissural nucleus (arrow). **I:** Labeled fibers (arrows) in the stratum album centrale of the optic tectum. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 75 μm in A,H; 100 μm in B,D–F; 45 μm in C,I; 150 μm in G.

part of rostral Dd+Dl-d and also in a ventral band in Dp-v (Fig. 14E,F). Labeling in Vv-d, Vp, and Dd+Dl-d was mainly ipsilateral, but cells were labeled bilaterally in Vv-v and Dp.

Posterior tuberal nucleus. As indicated in the accompanying article (Folgueira et al., 2004), the medial region of the posterior tuberal nucleus appears to be a principal target of the caudal projections of the olfactory bulb. Application of DiI to the middle of this nucleus led to labeling of numerous mitral cells, but only occasional labeled neurons were found in the inner cellular layer of the olfactory

bulbs, indicating that the bulbo-posterior tuberal nucleus (PTN) projection mainly arises from mitral cells. In sub-pallial regions, numerous labeled neurons were observed in Vs (Fig. 14G), and labeled neurons were also found in middle-caudal regions of Vd, and in Vp, Vv-d, and Vv-v. Labeled neurons were also observed in the anterior and posterior parts of the parvocellular preoptic nucleus. In the pallium, labeled neurons were mainly observed in Dp-v (Fig. 14G,H), but a few labeled cells were also observed in Dp-d, Dm, and Dc. Labeled fibers were observed in Dm and Dp-d (Fig. 14H).

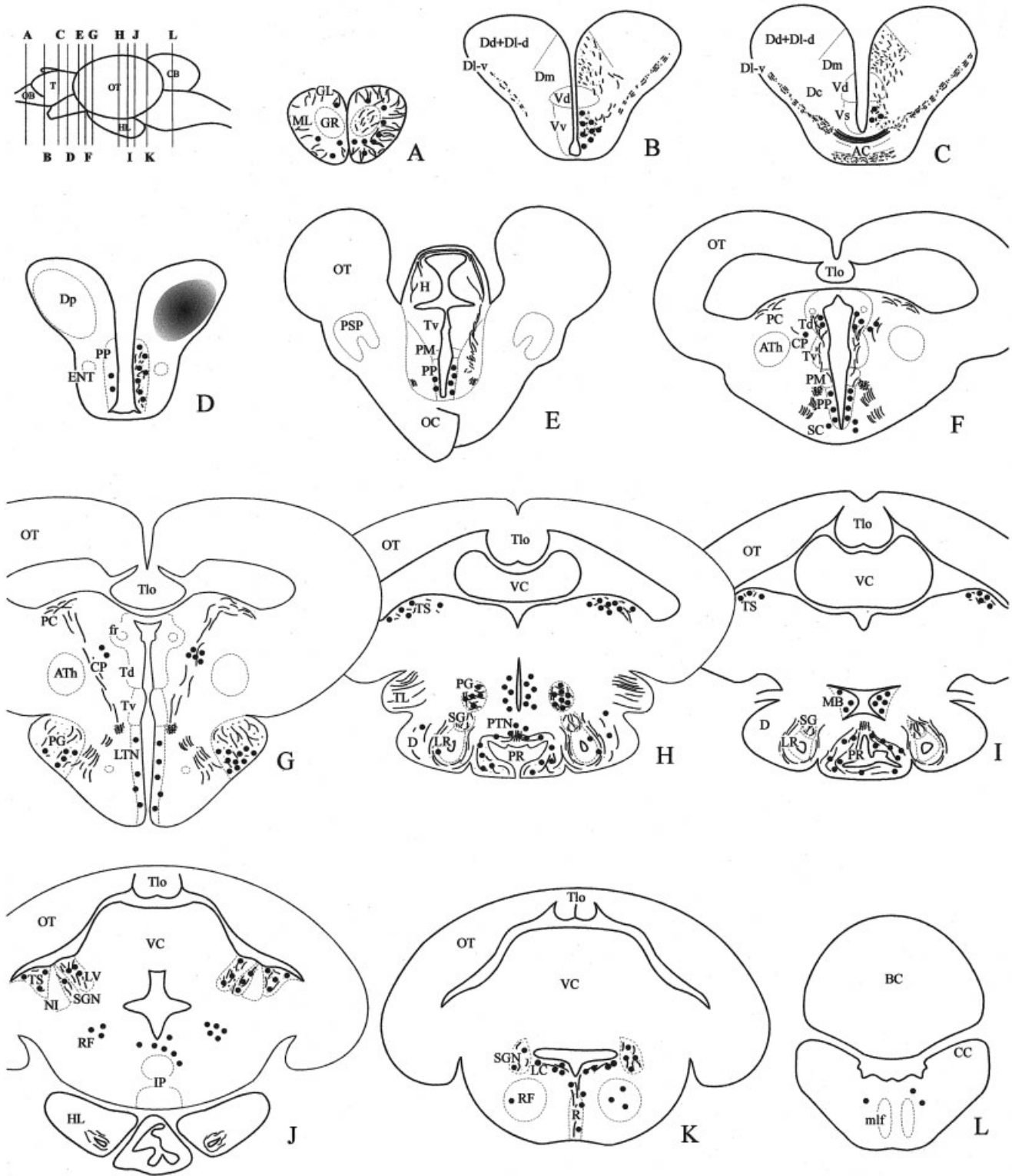


Fig. 10. A-L: Schematic drawings of transverse brain sections showing perikarya (solid circles) and fibers (dashes and lines) labeled after 1,1'-diocetadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the Dp. The shaded area in D represents the application site. The levels of the sections are indicated in the lateral view of the brain. For abbreviations, see list.

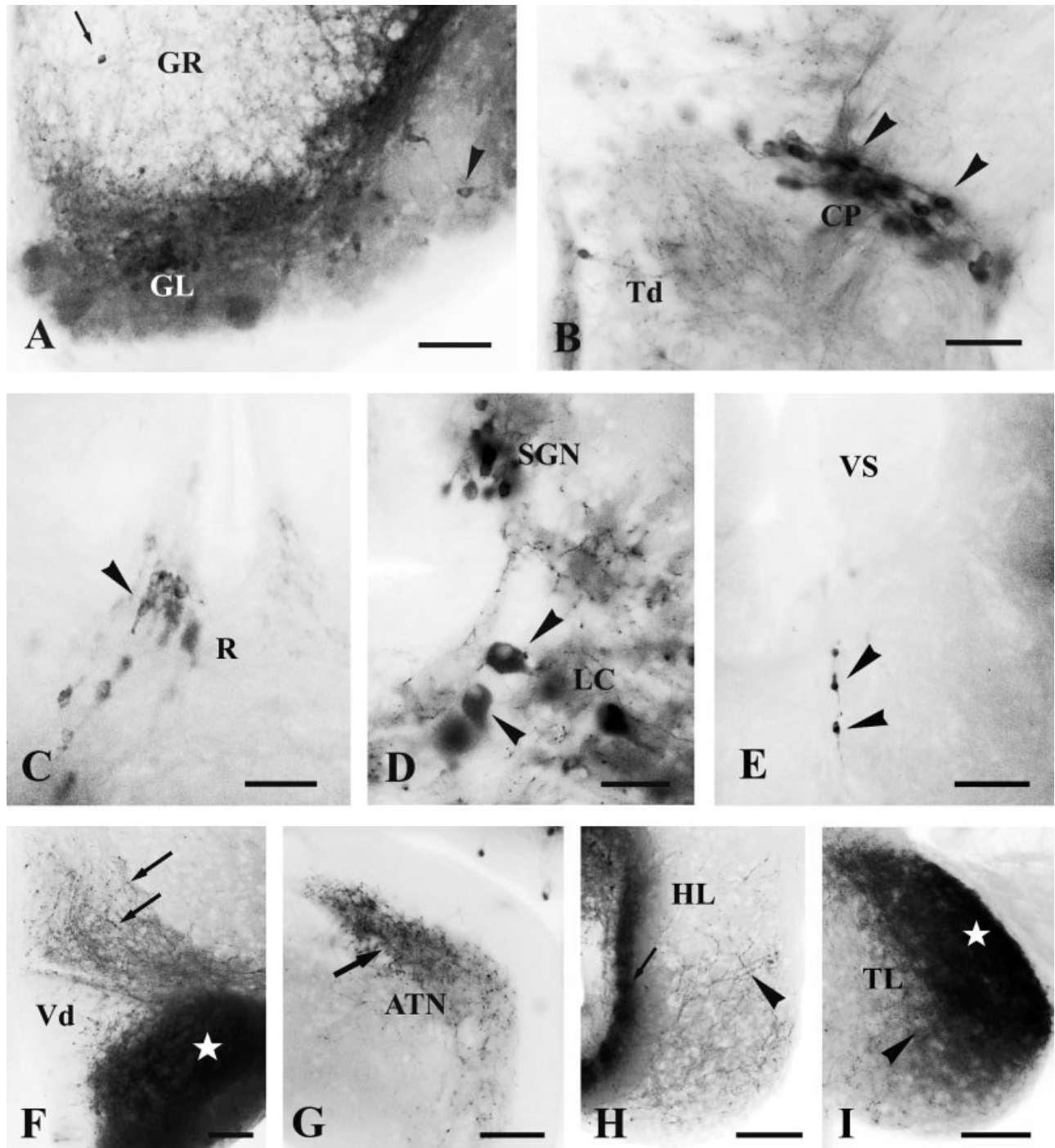


Fig. 11. Photomicrographs of transverse sections showing labeled structures in the olfactory bulb (A), telencephalic lobe (F), diencephalon (B,G-I), and brainstem (C-E) after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to Dp. **A:** Dense labeling of cells (arrowhead) and processes in the external cell layer of the bulb. Note also a small labeled perikaryon (arrow) and beaded fibers in the internal granular layer. **B:** Detail of a band of labeled cells in the central posterior nucleus (arrowheads). **C:** Group of labeled cells (arrowhead) in the superior raphe nucleus. **D:** Large labeled neurons in the locus coeruleus (arrowheads). Note also small labeled cells in the secondary gustatory nucleus. **E:** Small labeled cells (arrowheads) in the medial reticular region at the level of

the vagal viscerosensory column. **F:** Field of labeled fibers in rostral ipsilateral Dm (arrow). The white star indicates the strongly labeled caudal region of the olfactory bulb. **G:** Dense terminal field of labeled fibers (arrow) in the periventricular region of the contralateral anterior tuberal nucleus. **H:** Ipsilateral inferior hypothalamic lobe showing labeled fibers in the periventricular region (arrow) and diffuse nucleus (arrowhead). **I:** Field of labeled fibers (arrowhead) in the ipsilateral torus lateralis. Note the high concentration in the lateral region (white star). All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 175 μm in A; 75 μm in B,C,H; 60 μm in D; 125 μm in E,I; 100 μm in F; 150 μm in G.

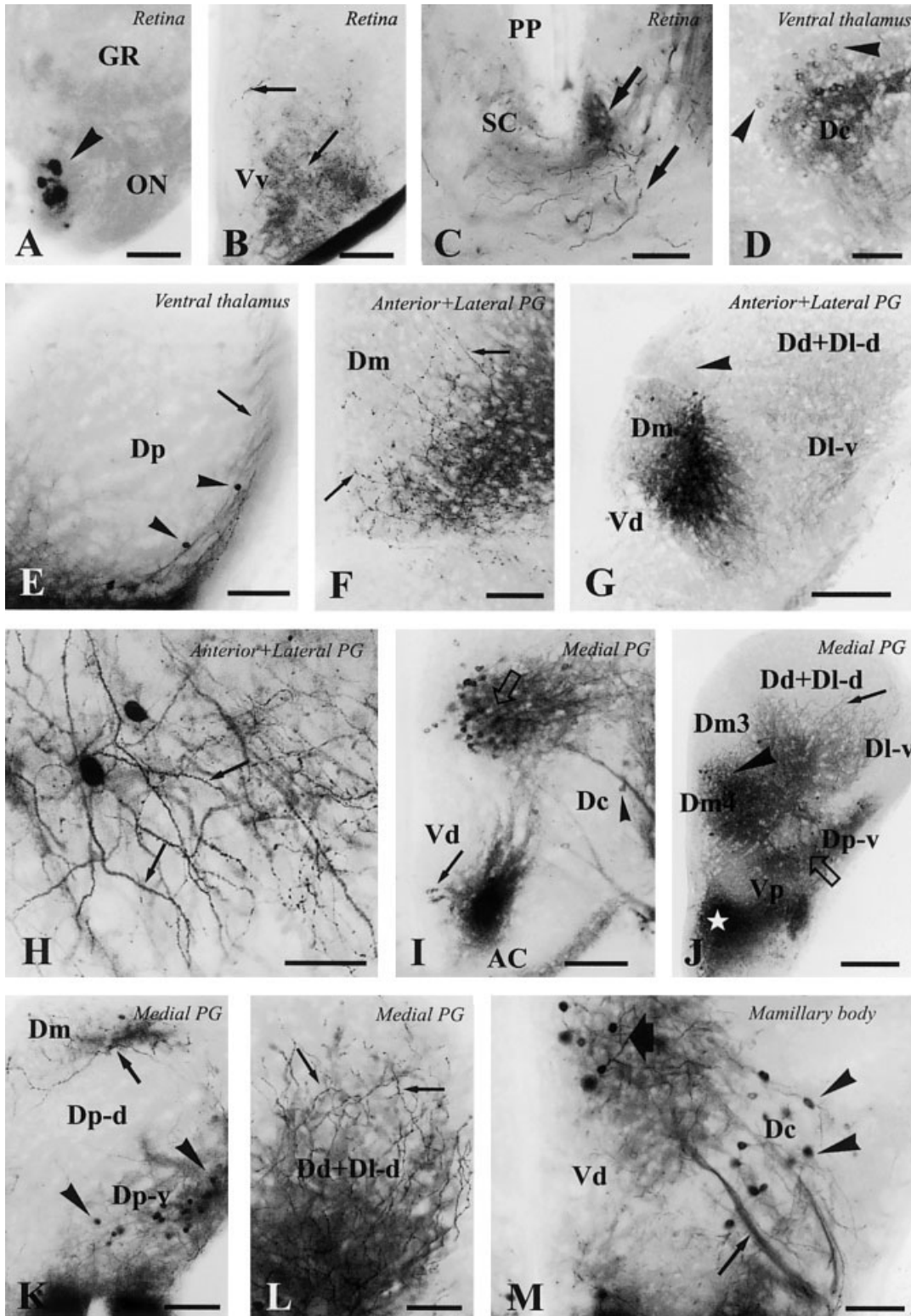


Figure 12

Periventricular nucleus of the posterior tubercle. Application of DiI to the periventricular nucleus of the posterior tubercle led to bilateral labeling of neurons in rostral and middle–dorsal regions of the preoptic nucleus, mostly periventricularly. Occasional cells were observed in the OVLT. In the telencephalic lobes, labeled cells were observed mainly in ventral regions (Vv-v, Vv-d, Vs). In one of three cases, some faintly labeled cells were observed in Dc and Dm3, and in the ventrolateral superficial region of Dp-v. Labeled fibers were observed mainly in ventral regions, but in all cases, some labeled fibers were observed in Dm and Dp-v. In the olfactory bulbs, a few labeled small cells were observed in the internal cellular layer, in addition to some labeled fibers.

Lateral pretectum (paracommissural nucleus). In these experiments, DiI was applied to the lateral pretectal field that appears to receive a large number of fibers from Dc (Fig. 14I), Vv, and other telencephalic regions. In all three fish, this type of application labeled numerous cells in Dc and in a lateral extension of Dc directed toward the medial region of Dl-v. No other labeled cells were observed in the dorsal area or in the preoptic region. In only one case, a few labeled cells were observed in Vv.

Torus semicircularis. Application of DiI to the torus semicircularis led to labeling of numerous large neurons in Dc. Some labeled cells were also observed in Vv-d rostral to the anterior commissure, and a few labeled cells in rostral Vv-v. In the preoptic region, labeled cells were numerous in the parvocellular preoptic nucleus. In addition, this type of application led to the labeling of numerous fibers in the preoptic area, and in most regions of Vv (Vv-v and Vv-d) and around the anterior commissure. In these experiments, Vd and most regions of the dorsal area did not contain labeled fibers.

Raphe nucleus. As indicated above and in the accompanying article (Folgueira et al., 2004a), the superior raphe nucleus projects to several telencephalic regions. The application of DiI to the raphe nucleus at pretrigeminal level led to labeling of a horizontal band of neurons in the Vv, indicating that the connection of the superior raphe nucleus with Vv is reciprocal. No other labeled cells were observed in the telencephalon proper or in the olfactory bulbs, but a few labeled cells were observed in the anterior part of the parvocellular preoptic nucleus (Fig. 14J). A result of interest in these experiments is the finding of some labeled cells confined to the ventrolateral region of the habenula, which confirms the presence of habenulo-raphal projections reported in trout (Yáñez and Anadón, 1996) and indicates that the cells originating this projection are not distributed throughout the habenula but lie within a small region. Labeled cells were also fairly abundant in the pineal organ, indicating the existence of significant pinealofugal projections to the superior raphe nucleus.

DISCUSSION

The principal aim of this hodological study and the accompanying article (Folgueira et al., 2004a) was to perform the first comprehensive analysis of the connections of the dorsal telencephalon in a salmonid species. The connections of the dorsal pallium and the efferents of the preoptic area are schematically summarized in the Figure 15. In this study, we used small crystals of DiI (7–25 μm in diameter) in juvenile (4–7 cm) trout to apply the tracer to only a part of the required target without affecting neighbor areas (DiI is a hydrophobic tracer that dissolves into adjacent cell membranes), and to facilitate diffusion along unmyelinated or poorly myelinated pathways (the method does not work well in highly myelinated pathways). The possible problems with the DiI tracing methods have been thoroughly discussed in a previous article (Folgueira et al., 2004a) and will not be considered here. Integrative studies on telencephalic projections have only been performed in the advanced teleost *Sebastiscus marmoratus* by using horseradish peroxidase transport and degeneration methods (Murakami et al., 1983). The telencephalic and extratelencephalic connections of the olfactory bulb and the ventral telencephalic area have been considered in detail in the accompanying study (Folgueira et al., 2004a); therefore, these regions are only considered when appropriate in the context of the connections of the dorsal area and the preoptic region.

Connections of the dorsal+dorsolateral zone of the dorsal telencephalon (Dd+Dl-d)

In salmonids, the dorsal (Dd) and dorsolateral (Dl-d) parts of the dorsal telencephalon are hardly distinguishable on the basis of embryological (Chanconie and Clairambault, 1975; Castro et al., 2003), cytoarchitectural, and neurochemical criteria (Northcutt and Braford, 1980; Castro et al., 2003). Owing to the lack of clear boundaries, the current nomenclature used in the salmonid literature groups both zones into a single one (Dd+Dl-d). The lateroventral zone of D (Dl-v), however, shows many neurochemical and cytoarchitectonic differences with respect to Dd+Dl-d, which indicates that it is a different region (Northcutt and Braford, 1980; Castro et

Fig. 12. Photomicrographs of transverse sections of the telencephalon showing labeled structures after 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) application to the retina (A–C), ventral thalamus (D,E), and preglomerular nuclei/mamillary body complex (F–M). **A:** Labeled cells of the nucleus olfactorialis (arrowhead) in the ipsilateral olfactory nerve at the entrance in the bulb. **B:** Labeled fibers (arrows) in the ventral nucleus of the ventral telencephalon. **C:** Field of labeled fibers (arrows) in the ipsilateral suprachiasmatic nucleus. **D:** Labeled cells (arrowheads) in Dc. **E:** Labeled neurons (arrowheads) and fibers (arrow) in the superficial ventrolateral region of ipsilateral Dp. **F:** Detail of the labeled fibers (arrows) in rostral Dm after DiI application to anterior plus lateral preglomerular nucleus. **G:** Section at a precommissural level showing labeled cells in Dm (arrowhead) after DiI application to anterior plus lateral preglomerular nucleus. **H:** Detail of the spiny dendrites (arrows) of Dm cells projecting to the medial preglomerular nucleus. **I:** Labeled neurons (outlined arrow) in Dm at the level of the anterior commissure after DiI application to the medial preglomerular nucleus. Note also labeled cells in Dc (arrowhead) and Vd (arrow). **J:** Section at a postcommissural level showing labeled cells in Dm (arrowhead), Dp-v (outlined arrow), and the anterior preoptic region (white star) after DiI application to the medial preglomerular nucleus. Note dense innervation of Dd+Dl-d by labeled fibers (arrow). **K:** Labeled fibers in caudal Dm (arrow) and neurons (arrowheads) in Dp-v. DiI application was in the medial preglomerular nucleus. **L:** Detail of labeled fibers (arrows) in Dd+Dl-d. **M:** Labeled neurons in precommissural Dm (wide arrow) and Dc (arrowheads) after DiI application to the mamillary body. The thin arrow points to labeled fiber bundles crossing Dc. In C, the ipsilateral side is at the left. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 100 μm in A,B,H,J; 125 μm in C; 250 μm in D; 35 μm in E; 175 μm in F; 275 in G; 150 μm in I,K.

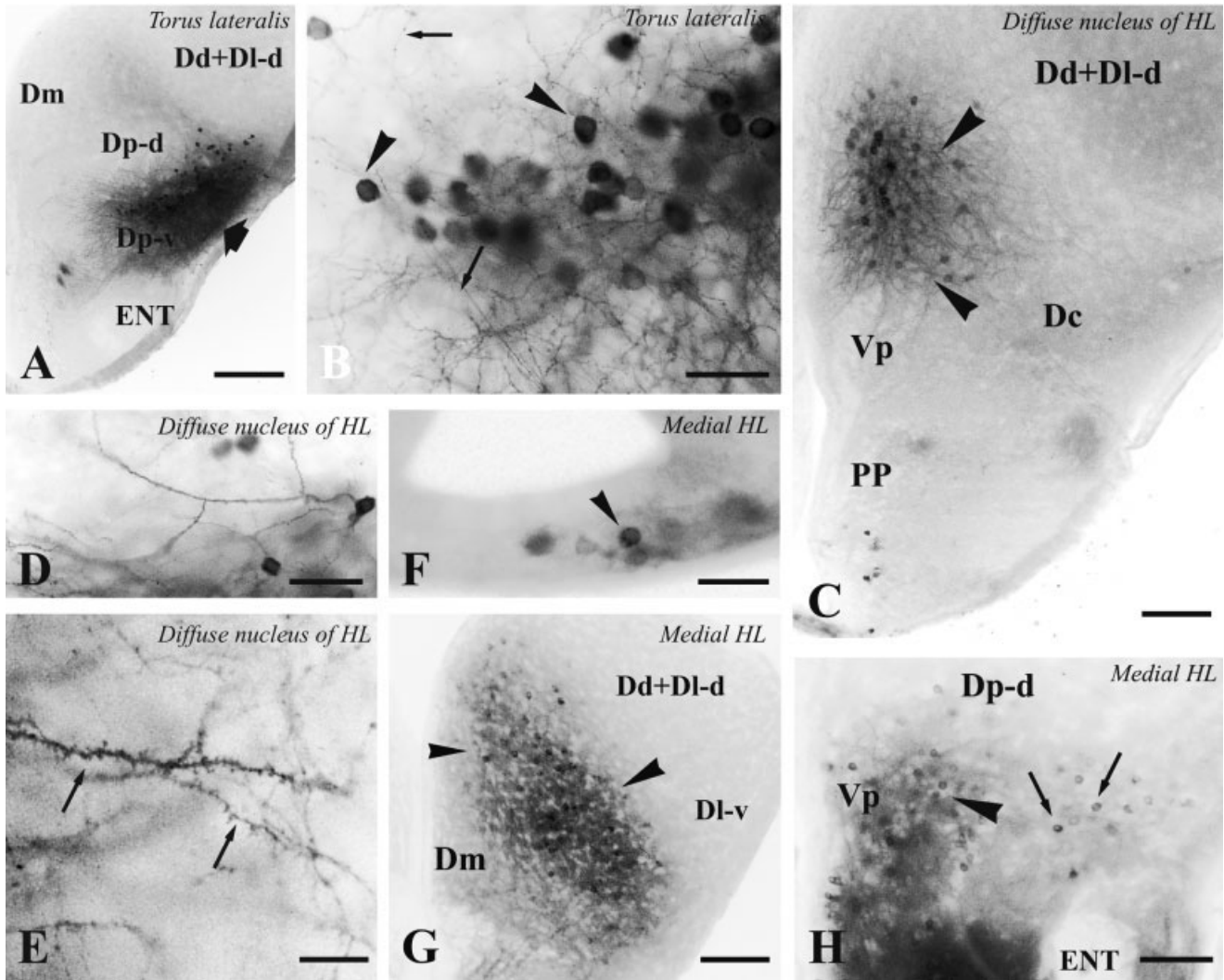


Fig. 13. Photomicrographs of transverse sections of the telencephalon showing labeled structures after application of 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) to the torus lateralis (A,B), the diffuse nucleus (C-E), and the medial region of the inferior hypothalamic lobe (F-H). **A:** Heavily labeled cells in Dp-v (wide arrow). **B:** Detail of the labeled cells of Dp-v (arrowheads) and fibers (arrows). **C:** Labeled neurons in postcommissural Dm (arrowheads). Note labeled cells in the ventral preoptic region. **D:** Detail of a labeled neuron in Dm. **E:** Detail of spiny dendrites of Dm cells

(arrows). **F:** Ventral wall of the preoptic recess showing labeled neurons (arrowhead) in the organum vasculosum of the terminal lamina. **G:** Section through the rostral telencephalon showing numerous labeled neurons in the ventromedial region of Dd+Dl-d (arrowheads). **H:** Section through the caudal telencephalon showing labeled cells in Dp-v (arrows) and Vp (arrowhead). All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 275 μm in A, 100 μm in B,H, 125 μm in C, 75 μm in D, 20 μm in E, 400 μm in F, 150 μm in G.

al., 2003). To distinguish the afferent connections of these areas, DiI was applied either to different regions of Dd+Dl-d or to Dl-v. In ostariophysan teleosts, a small Dd and a large Dl-v region are found laterally to Dm (see Striedter, 1992), which is rather large by comparison with the trout Dm. In *Sebastiscus* and other advanced teleosts, Dd and Dl regions are also distinguishable (Yamane et al., 1996). Because the trout Dd+Dl-d appears to correspond to both the Dl-d and the Dd of ostariophysan/perciform teleosts, we will compare its connections with those reported for these regions.

In trout, the intratelencephalic connections of Dd+Dl-d are represented by afferents from the contralateral Dd+Dl-d, and bilateral afferents from Vd, Vv, Vs, and the

preoptic nucleus, whereas extratelencephalic afferents to Dd+Dl-d originate from the suprachiasmatic nucleus, the anterior and lateral tuberal nuclei, the ventral and dorsal thalamus, the preglomerular complex, the posterior hypothalamic lobe, and from isthmic reticular populations. Of these extratelencephalic afferents, those originated from the preglomerular complex were confirmed by reciprocal experiments. In *Sebastiscus*, the ventral thalamus projects to Dd (Ito et al., 1986). Afferent projections to Dd and Dl-d originating from the lateral preglomerular nuclei have also been reported in ostariophysans by DiI application to the latter nuclei (Striedter, 1991, 1992). In trout, intratelencephalic Dd+Dl-d efferents were observed in the contralateral Dd+Dl-d, and ipsilateral Dc. Although

putative Dd+Dl-d efferent fibers were observed bilaterally in Dm, no labeled cells were observed in Dd+Dl-d after application of DiI to Dm, which suggests that the labeled fibers originate from cells simultaneously projecting to Dd+Dl-d and Dm. No projection of Dd+Dl-d to extratelencephalic structures was observed in this study, in contrast with the Dd-torus semicircularis projection observed in *Sebastiscus* (Murakami et al., 1986a). The Dd+Dl-d region of trout appears anatomically poorly differentiated by comparison with the corresponding region of *Sebastiscus* and other acanthopterygian teleosts, which exhibit well-differentiated parts in this region. It is possible that the anatomical and connectional differences observed between trout and *Sebastiscus* reflect a high degree of specialization of the pallium in acanthopterygian species.

Connections of the ventrolateral zone of the dorsal telencephalon (Dl-v)

In the scorpaeniform *Sebastiscus*, both the dorsal (dDl) and ventral (vDl) regions of the conspicuous Dl have reciprocal connections with Dc, Vs, and the conspicuous prethalamic nucleus, and receive afferents from Vl, intermediate nucleus of V (Vi), raphe nucleus, and locus coeruleus (Murakami et al., 1983). Moreover, dDl also receives afferents from the contralateral Dc, Dd, Dm, and Dp (Yamane et al., 1996). Instead, our results in trout show that Dl-v has mainly intratelencephalic connections with Vv, Vs, and the olfactory bulbs, whereas its extratelencephalic connections appear to be very restricted by comparison with those of Dd+Dl-d. The different results obtained in trout and *Sebastiscus* can be attributed to the fact that both dDl and vDl of the latter species corresponds to differentiated parts of the trout Dd+Dl-d, not to Dl-v. On the other hand, analysis of the connections of trout Dl-v is complex, because this is a region of passage for fibers of various telencephalic systems. Thus, although results obtained after DiI application to Dl-v suggest that it sends efferents to Dp, these connections could not be confirmed by reciprocal experiments, suggesting that DiI application to Dl-v resulted in *en passant* labeling of the bulbar-Dp projection. Moreover, although Dl-v appears both to receive fibers from the ventral telencephalon (Vv and Vs) and to send axons to the ipsilateral Dm and the contralateral Dl-v, these connections need further confirmation. In addition, a minor projection from the ipsilateral entopeduncular nucleus to Dl was reported in the goldfish (Echteler and Saidel, 1981), but in all experiments performed in the trout Dl-v, only a single entopeduncular cell was retrogradely labeled (present results), indicating that, in salmonids, the entopeduncular nucleus does not project to this pallial region. Moreover, no connection between Dl-v and Dc was demonstrated in trout (present results), in contrast with the results in *Sebastiscus* (Murakami et al., 1983; Yamane et al., 1996). Although these different results between species could be due to the different methodologies used, the scarcity of Dl-v connections in trout probably reflects poor development of this area and, consequently, reduced functional significance in salmonids by comparison with the homonymous region of other advanced euteleosts (Braford, 1995).

Connections of the medial zone of the dorsal telencephalon (Dm)

It has been proposed that the medial zone of D of teleosts is partially homologous to the dorsal striatum (cau-

doputamen) of land vertebrates (Northcutt and Braford, 1980; Northcutt and Davis, 1983). However, developmental studies in trout indicate that Dm is pallial (Chanconie and Clairambault, 1975; Castro et al., 2003), which is also supported by the low proportion of γ -aminobutyric acid (GABA)ergic (glutamic acid decarboxylase mRNA-expressing) neurons observed in this nucleus, in clear contrast with the nuclei of the ventral area (Anglade et al., 1999). In salmonids, Dm have been subdivided into several zones from rostral to caudal and from dorsal to ventral using cytoarchitectonic criteria (Northcutt and Braford, 1980; Piñuela et al., 1992), and it has been suggested that the most caudal parts (Dm3, Dm4) form a functional unit (Northcutt and Davis, 1983). Because the present procedures did not allow us to inject each of these Dm subdivisions independently, the experiments were designed to apply DiI to the most anterior region of Dm, to the precommissural Dm and to the postcommissural Dm (although note that, in each type of experiment, more than one of the Dm subdivisions of Northcutt and Braford may be affected). Nevertheless, the reciprocal experiments shed some light on the rostrocaudal differentiation of Dm.

With regard to the intratelencephalic connections of Dm, our results show the existence of ipsilateral connections between rostral, intermediate, and caudal levels of Dm, as was also reported with biocytin in a cichlid (Yoshimoto et al., 1998), as well as the existence of some interconnections with the contralateral Dm, like those reported in *Sebastiscus* (Murakami et al., 1983). In trout, Dm is innervated by vasotocinergic fibers originating from the magnocellular preoptic nucleus (van den Dungen et al., 1982), and it is also richly innervated by thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immunoreactive fibers (Díaz et al., 2001). TRH-expressing neurons have been demonstrated in locations including the Vs, Vp, the preoptic nucleus, the suprachiasmatic nucleus, the superior reticular nucleus, and the isthmus central gray (Matz and Takahashi, 1994; Ando et al., 1998; Díaz et al., 2001), all of which contain cells projecting to Dm (present results). Comparison of the nuclei afferent to Dm (present results) with these TRH-immunoreactive cell groups suggests that the rich TRHir innervation found in the Dm may arise from the preoptic nucleus and/or suprachiasmatic region, or (less probably) from TRH-immunoreactive nuclei of the isthmus. Other extratelencephalic afferents to the trout Dm arose from neurons of the dorsolateral thalamic nucleus, preglomerular tertiary gustatory nucleus, the preglomerular complex, the anterior tuberal nucleus, and from caudal hypothalamic periventricular cells, although there were large differences in connections between Dm regions.

A small group of retrogradely labeled neurons appears in the dorsolateral thalamic nucleus (= central posterior thalamic nucleus) in cases of DiI application to the pre- and postcommissural Dm, to Vv, Vd, Dd+Dl-d, Dc, and especially to Dp. A central posterior thalamic nucleus has not been recognized in most studies on the salmonid dienkephalon, but the telencephalon-projecting dorsolateral thalamic nucleus may correspond to this nucleus, because large piriform cells were labeled in a similar location after DiI application to the preglomerular nuclei (unpublished results), and this area receives axons from the torus semicircularis; these connections are similar to those of the central posterior nucleus of cyprinids (Echteler, 1984; Mu-

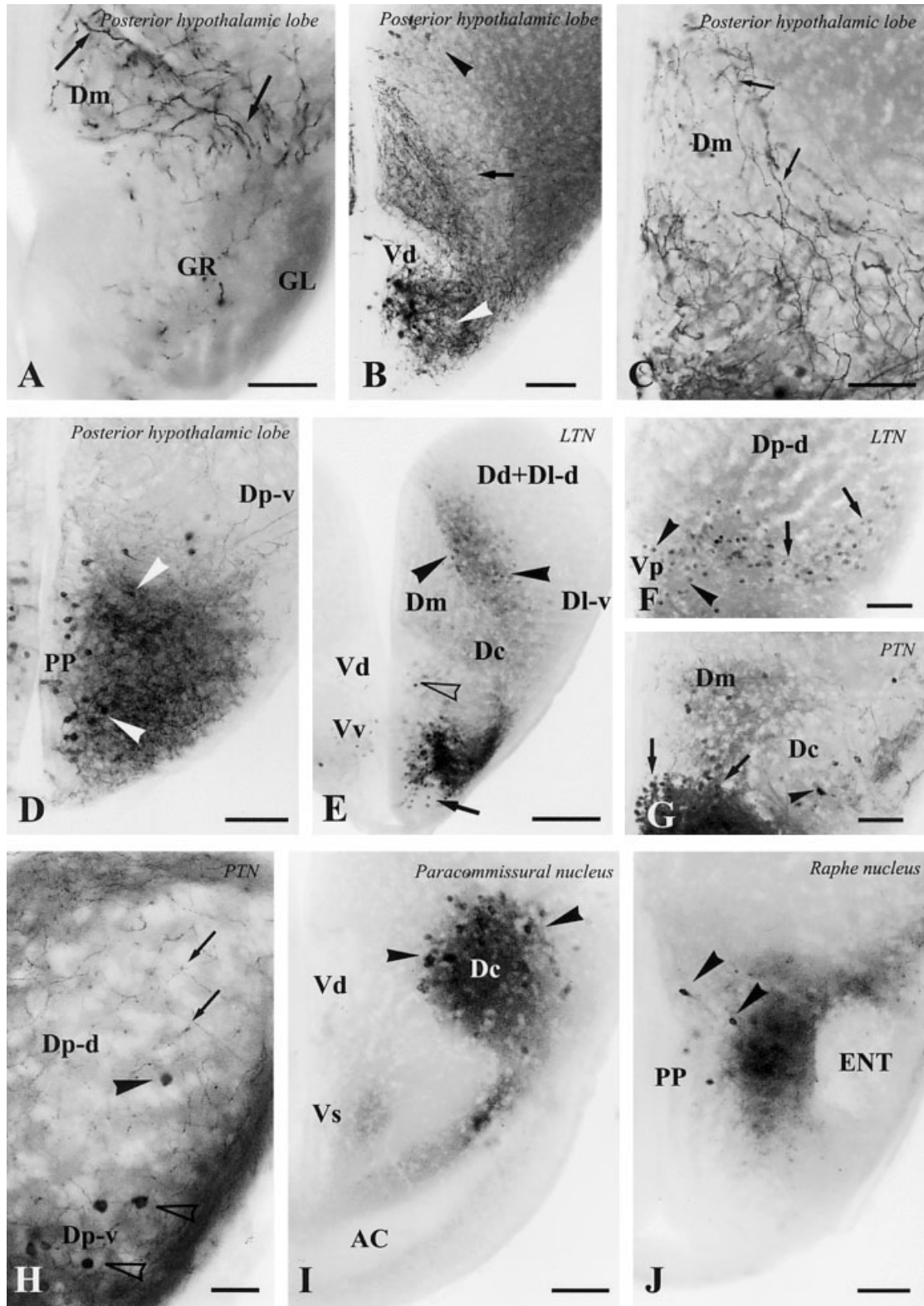


Figure 14

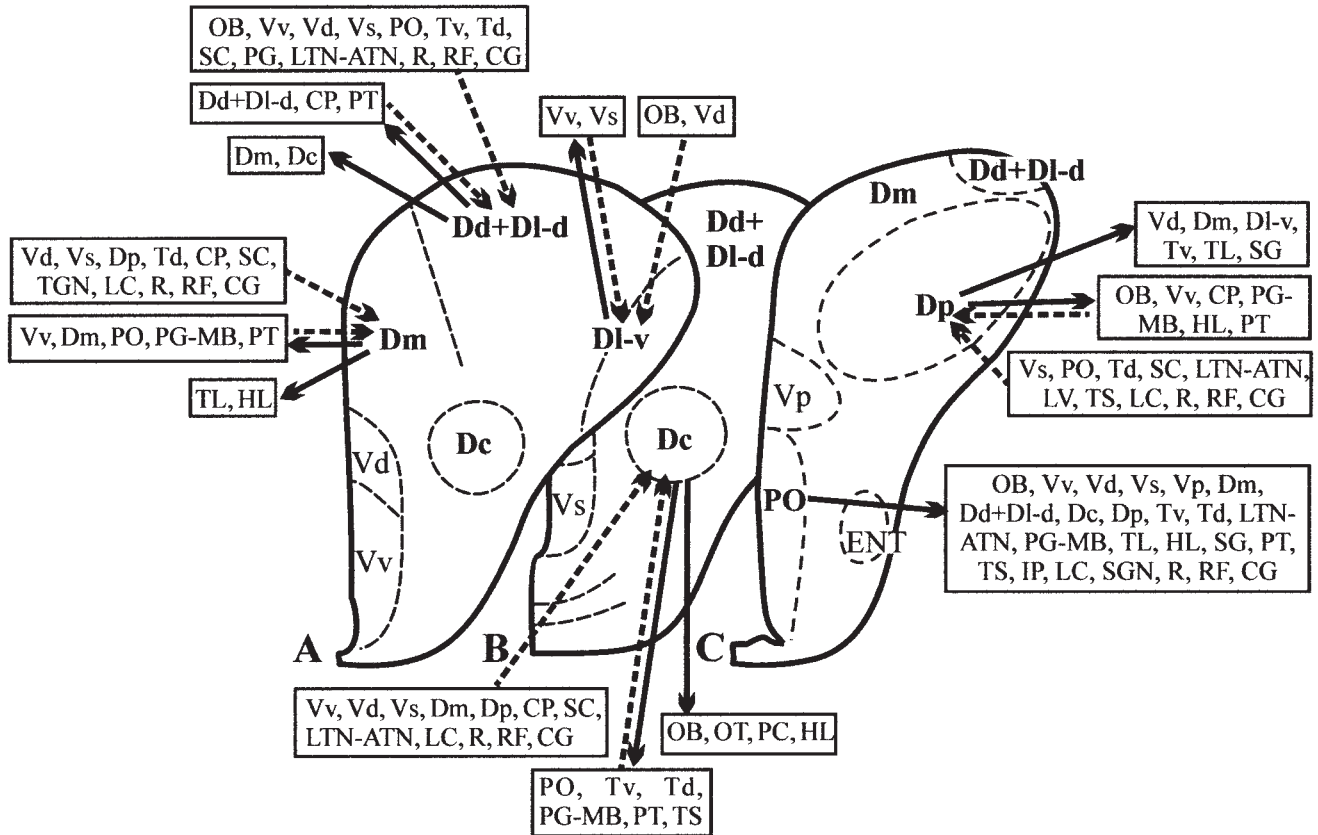


Fig. 15. **A–C**: Schematic drawings of transverse sections of the trout telencephalon at precommissural (A), commissural (B), and caudal (C) levels summarizing the confirmed connections of the pallium. For the sake of clarity, the centers maintaining afferent (dashes

arrows), efferent (continuous arrows), and reciprocal connections with each telencephalic region are indicated in separated boxes. For abbreviations, see list.

Fig. 14. Photomicrographs of transverse sections through the telencephalon showing labeled structures after application of 1,1'-diiodoacetyl 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) to the posterior hypothalamic lobe (A–D), lateral tuberal nucleus (E,F), posterior tuberal nucleus (G,H), pretectal paracommissural nucleus (I), and superior raphe nucleus (J). **A**: Field of labeled fibers in the rostral Dm (arrows). **B**: Section to the rostral telencephalon showing labeled neurons in the medial part of Dd+Dl-d (arrowhead) and Vv (white arrowhead), and the dense field of labeled fibers in Dm (arrow). **C**: Detail of labeled fibers in Dm (arrows). **D**: Labeled neurons (arrowheads) and fibers in the anterior parvocellular preoptic nucleus. **E**: Section through the rostral telencephalon showing a ventromedial band of labeled cells in Dd+Dl-d (arrowheads) and also labeled cells in Vv (arrow) and Vd (outlined arrowhead). **F**: Section through the caudal telencephalon showing a band of labeled cells extending from Vp (arrowheads) to Dp-v (arrows). **G**: Section at a commissural level showing densely labeled cells in Vd (arrows), and also labeled cells in Dc (arrowhead) and Dm. **H**: Section through the caudal pallium showing labeled neurons in Dp-v (outlined arrowheads) and fibers distributed throughout Dp (arrows). The arrowhead points to a labeled cell in ventral Dp-d. **I**: Section at a commissural level showing numerous labeled perikarya in Dc (arrowheads). **J**: Section through the preoptic region showing labeled cells (arrowheads) in the anterior parvocellular preoptic nucleus. All photomicrographs are negative images of fluorescent data. For abbreviations, see list. Scale bars = 75 μm in A,C; 150 μm in B; 125 μm in D,F,G,J; 225 μm in E; 50 μm in H; 100 μm in I.

rakami et al., 1986b). In *Sebastiscus*, the ventral thalamus (nucleus ventromedialis) projects to Dm (Ito et al., 1986).

The most important afferents to Dm (anterior and precommissural parts) come from the preglomerular complex, which in trout is formed by several nuclei (the anterior, lateral, and medial preglomerular nuclei, and the mamillary body). Experimental studies in other teleosts suggest that the nuclei of the preglomerular complex are relay centers of the ascending electrosensory, auditory, and mechanosensory pathways by means of the torus semicircularis to the telencephalon, mainly to Dm (Murakami et al., 1983, 1986a; Striedter, 1991, 1992; Zupanc, 1997; Yoshimoto et al., 1998; von der Emde and Prechtel, 1999), but also to other pallial areas (Dd: Striedter, 1992; Dl: Zupanc, 1997; Corrêa and Hoffmann, 1999; Dc: Murakami et al., 1983, 1986a,b; Striedter, 1992; Corrêa et al., 1998; Dp: Striedter, 1992; Zupanc, 1997). The preglomerular tertiary gustatory nucleus also projects to Dm in a cichlid (Yoshimoto et al., 1998) and in the trout (Folgueira et al., 2003a; present results). Projections from the mamillary body to dDm were also demonstrated in tilapia (Sawai et al., 2000). The mamillary body of trout receives telencephalic efferents from Dm and, likely, from Dc. Studies in percomorphs have suggested that the mamillary body forms part of the ascending gustatory pathways to the dorsomedial telencephalon and optic tectum, based on in-

direct (gustatory) inputs to the mamillary body by means of the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe, which receives afferents from the secondary gustatory nucleus (Sawai et al., 2000). In trout, a study of gustatory connections did not reveal any direct relation with the mamillary body (Folgueira et al., 2003a). Moreover, the mamillary body of trout receives tectal afferents but does not send efferents to the optic tectum (Folgueira et al., 2004b), suggesting that it forms part of ascending visual circuits. This finding is unlike that reported in tilapia (Sawai et al., 2000), suggesting divergent evolution from common ancestors of salmonid and percomorph species. Studies of connections of more teleost species appear necessary to trace the evolutionary history of this nucleus.

The inferior hypothalamic lobe, which constitutes a multisensory center, receives some projections from the dorsal telencephalon in the goldfish and in a cichlid, mainly from Dm and Dc (Rink and Wullimann, 1998; Ahrens and Wullimann, 2002). First, either the dorsal (Yoshimoto et al., 1998; Shimizu et al., 1999) or the ventral (Murakami et al., 1983) subdivisions of Dm have been reported to be afferent to the diffuse nucleus of the inferior hypothalamic lobe in ostariophysans (Kanwal et al., 1988; Rink and Wullimann, 1998) and advanced percomorphs (Shimizu et al., 1999). In trout, there are efferent projections from both the pre- and postcommissural Dm to the diffuse nucleus (Folgueira et al., 2003a; present results). In addition, present results indicate that the postcommissural Dm region heavily projects to the preoptic area and to several regions of the inferior hypothalamic lobe (preglomerular complex, torus lateralis, diffuse nucleus, lateral recess nucleus, and nucleus subglomerulosus). The precommissural Dm is related with the ascending gustatory information by means of the preglomerular tertiary gustatory nucleus (Folgueira et al., 2003a; present results), whereas this connection does not apply to postcommissural Dm. Second, ascending projections from the inferior hypothalamic lobe and/or torus lateralis to DI have been described in *Thamnaconus* (Navodon; Shimizu et al., 1999), and projections from these regions to Dc have been described in *Carassius* (Rink and Wullimann, 1998), *Ictalurus* (Lamb and Caprio, 1993), and *Osteoglossum* (Wullimann et al., 1991); however, no such projections have been detected in trout. Over and above differences in methodology, these different results suggest the existence of genuine differences between teleost species regarding the pallial circuits of integration of gustatory information.

Connections of the central zone of the dorsal telencephalon (Dc)

In the rainbow trout, the central zone of D (Dc) consists of large neurons, and no subdivisions have been recognized (Northcutt and Davis, 1983). In this species, experiments in which DiI is applied to Dc at the level of the anterior commissure indicate that Dc receives fibers from the Dd+DI-d, the preoptic nucleus, preglomerular complex, central posterior thalamic nucleus, torus semicircularis, and, likely, from isthmic reticular neurons (present results). Results of reciprocal DiI application to different extratelencephalic centers indicate that Dc sends efferents to the paracommissural nucleus, optic tectum, and torus semicircularis, and also projects to different diencephalic structures, namely the ventral and dorsal thalamus, medial preglomerular nucleus, mamillary body, posterior tuberal nucleus, periventricular nucleus of the

posterior tuberculum, and medial and lateral regions of the inferior hypothalamic lobes (present results). In cyprinids, projections from Dc to the optic tectum (Ito and Kishida, 1977), to the preglomerular nucleus pars lateralis (Murakami et al., 1986b; Striedter, 1992), and to the auditory part of the torus semicircularis (Echteler, 1984) have been reported. In *Sebastiscus marmoratus* (Murakami et al., 1983, 1986a) and *Gymnotus carapo* (Corrêa et al., 1998), Dc has extensive connections with most parts of the telencephalon and also sends projections to the medial preglomerular nucleus, mamillary body, inferior hypothalamic lobes, paracommissural nucleus, optic tectum, torus semicircularis, and mesencephalic tegmentum. Connections of Dc with Dm have been reported previously in the goldfish (Echteler and Saidel, 1981). With the present procedures, we could not effectively study the intratelencephalic connections of Dc with adjacent territories. However, the central localization of the nucleus in the dorsal telencephalon, the large size and long spiny dendrites of its neurons (Turowski and Danner, 1977), and the number of extratelencephalic projections observed suggest that these neurons receive information from different parts of the telencephalon, and that they constitute the most important efferent nucleus of the dorsal area. Below, some of these Dc efferents are discussed in detail.

It has been proposed that the central nucleus of D of teleosts is in part homologous to the ventral striatum (globus pallidus) of land vertebrates (Northcutt and Bradford, 1980; Northcutt and Davis, 1983). Although Dc has some of the connections reported for the ventral striatum of tetrapods (Marín et al., 1997a,b, 1998; present results), its origin is clearly pallial (Chanconie and Clairambault, 1975; Castro et al., 2003), which is also supported by the low proportion of GABAergic (glutamic acid decarboxylase mRNA-expressing) neurons observed in this nucleus, unlike the nuclei of the ventral area (Anglade et al., 1999).

Telencephalo-cerebellar projections by means of the pretectal paracommissural nucleus. Different indirect telencephalo-cerebellar projections have been reported in different species of teleosts (see Wullimann and Meyer, 1993; Imura et al., 2003). Indirect projections from the telencephalon to the cerebellum (body of the cerebellum) by means of the pretectal paracommissural nucleus have been reported in various species of teleost (Ito et al., 1982; Striedter, 1990; Imura et al., 2003). The paracommissural nucleus projects to the cerebellum in cyprinids, ictalurids, and advanced teleosts (Ito et al., 1982; Wullimann and Northcutt, 1988; Striedter, 1990; Imura et al., 2003). Recent observations in a cichlid indicate that the telencephalic projections to the paracommissural nucleus arise from Dc and Dd (Imura et al., 2003). In trout, present results indicate that the telencephalon projects heavily to a dorsolateral paracommissural region that topographically corresponds to the pretectal region strongly immunoreactive to GABA_A-receptor β_2 - β_3 -subunits (Anzelius et al., 1995), and that finding appears to correspond to the paracommissural nucleus described in advanced teleosts (Ito et al., 1982). Telencephalic neurons projecting to the trout paracommissural nucleus were observed only in Dc (present results); this finding is similar to the above-mentioned findings of Imura et al. (2003) in a cichlid. Moreover, our experimental results indicate that the trout paracommissural nucleus gives rise to a conspicuous tract coursing to the body and valvula of the cerebellum, and

also to the lateral nucleus of the valvula (Folgueira et al., 2003b). Together, our results in trout suggest that the paracommissural nucleus conveys inputs from Dc to the cerebellum, as reported for other teleosts. Whether more indirect telencephalo-cerebellar pathways, such as that of the dorsal preglomerular nucleus, that of the dorsal tegmental nucleus, or that of the lateral nucleus of the valvula (see Wullimann and Northcutt, 1990; Wullimann and Meyer, 1993; Wullimann and Roth, 1994; Imura et al., 2003), are present in trout is beyond the scope of the present study.

Telencephalo-tectal projections. The existence in bony fishes of direct telencephalic projections to the optic tectum has been reported in both nonteleost (Northcutt, 1981) and teleost (Vanegas and Ebbesson, 1976; Striedter, 1990) species. In teleosts, various experimental studies have shown telencephalo-tectal projections originating from Dc in ostariophysans (carp: Ito and Kishida, 1977; Ito et al., 1980; Grover and Sharma, 1981; Luiten, 1981; Bass, 1981; Fiebig et al., 1983) and mormyrids (Wullimann and Northcutt, 1990), and originating from Dc and neighboring areas (Dd+Dm and Dl) in *Sebastiscus* (Murakami et al., 1983; Yamane et al., 1996). In *Ictalurus*, both the "medial zone of the dorsal telencephalon" (which in fact corresponds to Dc) and the entopeduncular nucleus have been reported as candidates for the origin of the telencephalo-tectal projections (Northcutt, 1982; Schlussman et al., 1990). Functional and electrophysiological studies also support the involvement of Dc and Dl in visual roles (Lee and Bullock, 1990; Saidel et al., 2001). Our results in trout show that the telencephalic afferents to the optic tectum are labeled only after DiI application to Dc and that this projection is restricted to the rostral half of the optic tectum, as indicated by our reciprocal experiments. No evidence was obtained of tectal afferents originating from the Dd+Dl-d, Dl-v, or entopeduncular nucleus (present results). The entopeduncular nucleus of trout is characterized by its massive projections to the habenula (Yáñez and Anadón, 1996), and these were the only projections observed in the present experiments, with the exception of a small projection to Vd (Folgueira et al., 2004a).

Telencephalo-toral projections. Present results in trout reveal that the torus semicircularis sends fibers to Vv and Dc, and possibly to Dp and caudal Dm, as reported in other teleosts (Echteler, 1984; Corrêa et al., 1998), but also that the torus semicircularis receives fibers from Dc, as reported in *Gymnotus* (Corrêa et al., 1998) and tilapia (Imura et al., 2003). Direct telencephalo-toral afferent projections from Dc, Dd, and the dorsal portion of Dm (dDm) were reported previously in *Sebastiscus* (Murakami et al., 1983, 1986a). The torus semicircularis of the trout, a non-electroreceptive teleost, receives octaval and lateral line inputs (De Wolf et al., 1983; Schellart, 1983) and sends efferents to the telencephalon (present results). Our results demonstrate that Dc is the only pallial structure directly and reciprocally connected with the torus semicircularis. Different regions of the telencephalon might exert an indirect influence on the torus through the Dc efferents, because Dc receives inputs from most pallial zones. Therefore, Dc may represent a key nucleus for modulation and feedback control of ascending information from the acoustic-lateral system to the telencephalon.

Comparisons with other fishes. It is unclear which structures of other fishes may be homologous to the teleost

Dc, which has been considered a migrated subdivision of one or more primary pallial divisions (Northcutt, 1995; Holmes and Northcutt, 2003). Knowledge of pallial connections of other groups of jawed fishes is very scarce; only those of *Polypterus senegalus* (bichirs, Cladistia; primitive ray-finned fishes) have been experimentally approached (Holmes and Northcutt, 2003). Bichirs are believed to represent the primitive pattern for ray-finned fishes. However, none of the three pallial regions recognized in *Polypterus* appears to have connections similar to those of trout Dc (Holmes and Northcutt, 2003; present results). In the adult silver lamprey (agnathan), only the medial pallium has extensive projections to the thalamus, optic tectum, torus semicircularis, and midbrain tegmentum (Northcutt and Wicht, 1997). However, the topology and the large number of afferents from the olfactory bulb of this pallial region are unlike trout Dc.

Connections of the posterior zone of the dorsal telencephalon (Dp)

In teleosts, Dp is considered to be one of the telencephalic areas involved in processing of secondary olfactory information (see the accompanying article, Folgueira et al., 2004a). In addition to the massive olfactory inputs, tract-tracing studies in *Sebastiscus* indicate that Dp receives intratelencephalic afferents from Dc, Dd, and dDm, and projects to Vd, Vs, and vDm (Murakami et al., 1983). In trout, Dp seems to receive intratelencephalic ipsilateral afferents from Vv and Vs, and, mainly ipsilaterally, from the preoptic region, but not from other pallial regions (present results). Intratelencephalic efferents from Dp course to the ventral telencephalon (Vv and Vs) and pre-commissural Dm. These intratelencephalic connections of Dp are similar to those reported in perciformes (Yamamoto and Ito, 2000).

The presence of reciprocal connections between Dp and the preglomerular nuclei has been described in the gymnotiform *Apteronotus* (Zupanc, 1997). Our results confirm the presence of connections between the preglomerular complex and Dp-v in trout but also reveal projections of Dp-v to several hypothalamic centers, as well as the existence of major differences between the connections of the dorsal and the ventral parts of Dp. These two parts of the trout Dp have already been characterized on the basis of the differential distribution of some immunocytochemical markers, the ventral part containing a population of calretinin-immunoreactive neurons (Castro et al., 2003). Present results indicate that cells in Dp-v project to wide hypothalamic regions, numerous Dp-v cells having been labeled after DiI application to the posterior hypothalamic lobe, medial and lateral regions of the inferior hypothalamic lobes, torus lateralis, anterior and lateral tuberal nuclei, and medial preglomerular nucleus. Cells in Dp-v project to the subglomerular nucleus, which also receives a conspicuous projection from the secondary gustatory nucleus and in turn projects to the optic tectum (Folgueira et al., 2002). By contrast, cells in Dp-d were only labeled in experiments in which DiI was applied to the posterior tuberal nucleus and olfactory bulb (present results). Together with the observed neurochemical differences between the Dp-d and Dp-v (Castro et al., 2003), the present results indicate that these Dp components are specialized in different circuits.

In goldfish, no labeled cells were observed in Dp after DiI application to the torus lateralis or the inferior hypo-

thalamic lobes (Rink and Wullimann, 1998), although these authors have reported the presence of labeled neurons in the caudal Dc. However, comparison of their caudal Dc region with the olfactory-recipient Dp region described in the same species by Levine and Dethier (1985) suggests that these labeled "Dc cells" are actually in Dp, which would be in agreement with present results in trout indicating that Dp projects to both the torus lateralis and inferior hypothalamic lobe. A telencephalic projection from Dp to the torus lateralis was also observed in perciformes (Yamamoto and Ito, 2000). Present results indicate the existence of a minor projection from the inferior hypothalamic lobe to Dp in trout. Therefore, two indirect ascending pathways carrying gustatory information may reach the pallium in salmonids, one by means of the preglomerular tertiary gustatory nucleus to the precommissural Dm (Folgueira et al., 2003a) and other by means of the inferior hypothalamic lobe to Dp. Certainly, both the Dm and the Dp appear to represent chemosensory pallial areas in salmonids.

Comparison of the dorsal area with the pallium of other anamniotes

The various pallial regions of the trout, like other teleosts, exhibit several afferents from various extratelencephalic nuclei, including projections from the preglomerular complex and other posterior tubercular derivatives (see above). Instead, the posterior tubercle does not appear to project to the pallium in the silver lamprey (Northcutt and Wicht, 1997). In elasmobranchs, a sister group of the ray-finned fishes, the pallium receives fibers from the posterior tubercle and posterior lateral thalamic nucleus (Smeets and Northcutt, 1987; Northcutt, 1995). Projections from various pallial (dorsal and medial pallium) and subpallial regions (septum, striatum, basal superficial area) to the hypothalamic lobes in elasmobranchs appear to be extensive (Smeets and Boord, 1985; Northcutt, 1995), which somewhat resembles the pattern observed in teleosts. In contrast, the projections from the posterior tubercle to the second division of the pallium (P2) are practically the only extratelencephalic afferents observed in *Polypterus senegalus* (Holmes and Northcutt, 2003), a connective pattern much different from that observed in the trout and other teleosts. In frogs, most of the extratelencephalic afferents to the pallium come from the anterior and central thalamic nuclei, whereas there are scarce if any posterior tubercular afferents (Northcutt and Ronan, 1992; Northcutt, 1995), again unlike teleosts. It has been suggested that only the olfactory recipient region of the dorsal area (Dp) of teleosts can be directly compared with pallial regions of bichirs and amphibians and that the other divisions of the dorsal area are uniquely derived features of the teleost telencephalon (Holmes and Northcutt, 2003).

Telencephalic connections of the preoptic, suprachiasmatic, and anterior tuberal nuclei

Preoptic nucleus. Preoptico-hypophyseal pathways have been long studied in the brain of vertebrates, including teleosts, by using a variety of classic staining methods for neurosecretion, and more recently, with immunocytochemistry. The projections of the preoptic nucleus to the hypophysis have also been studied with experimental methods in a salmonid (Holmqvist et al., 1992, 1994; Holmqvist and Ekström, 1995) and will not be discussed

here. Less well known are the extrahypophyseal projections of the preoptic nucleus in teleosts. The telencephalic stalk is used as a way of passage by a large number of fibers coursing to and from the telencephalon, so application of DiI to the preoptic nucleus will not clearly discriminate between fibers of passage and fibers originating in the preoptic nucleus neurons. Accordingly, we used an indirect approach analyzing the results of several cases of DiI application to different brain structures. Obviously, the list of targets of the preoptic nucleus revealed in these experiments is far from complete (we have not applied DiI to all brain structures), but the origin of the projections can unambiguously be assigned to the preoptic nucleus.

Present results after DiI application to telencephalic and extratelencephalic regions have revealed several extrahypophyseal projections of the preoptic nucleus of trout, most arising from parvocellular regions of the nucleus. In the telencephalon, we observed bilateral projections from the preoptic nucleus to Vv, Vd, Vs, Vp, Dm, Dc, and Dp, and ipsilateral projections to Dd+Dl-d and the olfactory bulb (present results; Folgueira et al., 2004a), indicating that, in rainbow trout, the preoptic nucleus projects to most telencephalic regions, which has not been observed previously in teleosts. Indeed, only the projection from the preoptic nucleus to Vv has been reported previously with experimental methods, in *Eigenmannia* (Wong, 1997). In turn, some of the preoptico-recipient regions (Vv and Vd) also project to the preoptic nucleus in salmonids (Shiga et al., 1985; Folgueira et al., 2004a). Several neuroreactive substances have been demonstrated in the preoptic nucleus of trout and other teleosts (van den Dungen et al., 1982; Olivereau et al., 1988, 1990; Batten et al., 1990; Olivereau and Olivereau, 1991; Manso et al., 1993; Holmqvist and Ekström, 1995; Becerra et al., 1995; Díaz et al., 2001; Rodríguez et al., 2003), and fibers immunoreactive to some of these substances are widely represented in telencephalic structures. Our results, together with the immunocytochemical studies of the teleost forebrain, suggest that the preoptic nucleus may directly modulate the activity of wide regions of the teleost telencephalon. Moreover, there is experimental evidence in salmonids that the preoptic nucleus receives fibers from the retina (Ebbesson et al., 2003; present results), which suggests that light might modulate the activity of the telencephalon, and other brain regions, by means of the preoptic nucleus (and suprachiasmatic nucleus, see below), similarly to the postulated regulation by the retina of the brain-pituitary axis (Ebbesson et al., 2003).

Present results in trout also indicate that the preoptic nucleus projects to several diencephalic and brainstem structures, most of these revealed here for the first time with experimental methods. Thus, present results show that a large number of neurons of the preoptic nucleus, mostly parvocellular cells, project to diencephalic centers such as the eminentia thalami, the anterior and medial preglomerular nuclei, the mamillary body, the nucleus subglomerulosus, the diffuse nucleus, the medial region of the inferior hypothalamic lobes, the lateral and posterior tuberal nuclei, and the periventricular nucleus of the posterior tubercle, whereas fewer cells project to the dorsal thalamus. Moreover, numerous preoptic neurons project to the torus semicircularis, and a few preoptic cells were DiI-labeled from the superior raphe nucleus. The existence of projections from the preoptic nucleus to the secondary gustatory nucleus and torus lateralis has been

reported previously in trout (Folgueira et al., 2003a). In the percomorph *Hemichromis lifalili*, projections from the magnocellular preoptic nucleus to the inferior lobe have also been observed (Ahrens and Wullimann, 2002). The substances released by these preoptic nucleus extrahypothalamic projections need further study. In the rainbow trout, it has been reported previously that isotocin- and vasotocin-immunoreactive fibers, presumably originating from magnocellular preoptic neurons, innervate most regions of the brain (van den Dungen et al., 1982), which is in line with present tract-tracing results. A tract-tracing study in salmonids has shown, in turn, that some hypothalamic nuclei (nucleus of the posterior recess, lateral tuberal nucleus, nucleus of the posterior tubercle, nucleus sacci vasculosi) project to the preoptic nucleus (Shiga et al., 1985). Together, these results considerably expand the significance of the preoptic nucleus as a center directly involved in the modulation of neuronal circuits in wide regions of the teleost brain. On the other hand, in the goldfish, projections to the spinal cord from the magnocellular preoptic nucleus have also been reported (Demski and Sloan, 1985; Prasada Rao et al., 1987), although such projections were not detected in a salmonid with tracing methods (Oka et al., 1986).

Comparison with other fishes. Knowledge of extrahypophyseal connections of the preoptic nucleus of non-teleost fishes is very scarce. However, there is experimental evidence in lampreys indicating that cells of the preoptic nucleus project to the medial and lateral pallia (Northcutt and Wicht, 1997), the striatum (Pombal et al., 1997), the dorsal thalamus (Northcutt and Wicht, 1997), and the torus semicircularis (González et al., 1999), which is in line with the widespread distribution of preoptic nucleus projections observed in trout. Instead, in *Polypterus* the projections from the preoptic nucleus to pallial regions appear to be limited, only tracer application to the first pallial division led to labeling a few cells in the preoptic nucleus (Holmes and Northcutt, 2003).

Suprachiasmatic nucleus. The suprachiasmatic nucleus (= anterior periventricular nucleus; see Holmqvist et al., 1994, and Holmqvist and Ekström, 1995, for a review of its neurochemistry) of teleosts is generally considered to be a retinorecipient nucleus (Northcutt and Wullimann, 1988). In the rainbow trout, the region located ventrally just caudal to the optic chiasm both contains partially migrated neurons that are afferent to pallial areas (Dc, Dd+Dl-d, Dm, Dp) and appears to receive a rich plexus of retinofugal fibers (present results). In trout, this nucleus also projects to Vv, Vd, and Vs (Folgueira et al., 2004a).

Anterior tuberal nucleus. In the trout, the anterior tuberal nucleus (ATN) seems to project to the dorsal area (Dc, Dd+Dl-d, Dp) of the telencephalon, whereas the reciprocal experiments (application of DiI to the ATN) reveal telencephalic projections from a pallial region (Dp) and the ventral area (Vv-v, Vv-d, and Vp; present results; accompanying article). Telencephalic/preoptic region projections to the ATN and the lateral hypothalamus were observed in goldfish by using the Fink-Heimer degeneration method (Airhart et al., 1988). In salmonids, Shiga et al. (1985) have reported projections from the ATN to the preoptic nucleus. Studies in catfish have shown that the ATN is related with ascending octavolateral pathways to the pallium (Dd, Dm) by means of the torus semicircularis, involving both auditory and mechanosensory information

(Finger, 1980; Striedter, 1990, 1991). Likewise, the existence in the trout of projections from the torus semicircularis to the ATN (unpublished results) suggests that this nucleus is part of the acousticolateral ascending pathways (see also above).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Pilar Gómez (Piscifactoría Berxa, Mesía, A Coruña) for supplying the biological material used in this study.

LITERATURE CITED

- Ahrens K, Wullimann MF. 2002. Hypothalamic inferior lobe and lateral torus connections in a percomorph teleost, the red cichlid (*Hemichromis lifalili*). *J Comp Neurol* 449:43–64.
- Airhart MJ, Shirk JO, Kriebel RM. 1988. Telencephalic projections to the goldfish hypothalamus: an anterograde degeneration study. *Brain Res Bull* 20:503–514.
- Ando H, Ando J, Urano A. 1998. Localization of mRNA encoding thyrotropin-releasing hormone precursor in the brain of the sockeye salmon. *Zool Sci* 15:945–953.
- Anglade I, Mazurais D, Douard V, Le Jossic-Corcous C, Mañanos EL, Michel D, Kah O. 1999. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 410:277–289.
- Anzelius M, Ekström P, Möhler H, Richards JG. 1995. Immunocytochemical localization of GABA_A receptor β_2/β_3 -subunits in the brain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Chem Neuroanat* 8:207–221.
- Bass AH. 1981. Telencephalic efferents in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: projections to the olfactory bulbs and optic tectum. *Brain Behav Evol* 19:1–16.
- Batten TF, Cambre ML, Moons L, Vandesande F. 1990. Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol* 302:893–919.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1995. Ontogeny of somatostatin-immunoreactive systems in the brain of the brown trout (*Teleostei*). *Anat Embryol (Berl)* 191:119–137.
- Bergqvist H. 1932. Zur Morphologie des Zwischenhirns bei niederen Wirbeltieren. *Acta Zool* 13:57–303.
- Bradford MR Jr. 1995. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? *Brain Behav Evol* 46:259–274.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2003. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467:254–269.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Muñoz-Cueto JA. 2001. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *J Morphol* 247:217–228.
- Chanconie M, Clairambault P. 1975. Development of the telencephalon of *Salmo irideus* Gib. *J Hirnforsch* 16:75–89.
- Corrêa SA, Hoffmann A. 1999. Reciprocal connections between the ploglomerular complex and the dorsolateral telencephalon in the weakly electric fish, *Gymnotus carapo*. *Neurosci Lett* 261:131–134.
- Corrêa SA, Grant K, Hoffmann A. 1998. Afferent and efferent connections of the dorsocentral telencephalon in an electrosensory teleost, *Gymnotus carapo*. *Brain Behav Evol* 52:81–98.
- De Wolf FA, Schellart NA, Hoogland PV. 1983. Octavolateral projections to the torus semicircularis of the trout, *Salmo gairdneri*. *Neurosci Lett* 38:209–213.
- Demski LS, Sloan HE. 1985. A direct magnocellular-preopticospinal pathway in goldfish: implications for control of sex behavior. *Neurosci Lett* 55:283–288.
- Díaz ML, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2001. Development of thyrotropin-releasing hormone immunoreactivity in the brain of the brown trout *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 429:299–320.
- Ebbesson SO, Bazer GT, Reynolds JB, Bailey RP. 1988. Retinal projections in sockeye salmon smolts (*Oncorhynchus nerka*). *Cell Tissue Res* 252: 215–218.
- Ebbesson LOE, Ekström P, Ebbesson SOE, Stefansson SO, Holmqvist B. 2003. Neural circuits and their structural and chemical reorganization

- in the light-brain-pituitary axis during parr-smolt transformation in salmon. *Aquaculture* 222:59–70.
- Echteler SM. 1984. Connections of the auditory midbrain in a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *J Comp Neurol* 230:536–551.
- Echteler SM, Saidel WM. 1981. Forebrain connections in the goldfish support telencephalic homologies with land vertebrates. *Science* 212:683–685.
- Fiebig E, Ebbesson SO, Meyer DL. 1983. Afferent connections of the optic tectum in the piranha (*Serrasalmus nattereri*). *Cell Tissue Res* 231:55–72.
- Finger TE. 1980. Nonolfactory sensory pathway to the telencephalon in a teleost fish. *Science* 210:671–673.
- Folgueira M, Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2002. The nucleus subglomerulosus of the trout hypothalamus is a link between chemosensory and visual systems: a DiI study. *Brain Res Bull* 57:427–430.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2003a. Experimental study of the connections of the gustatory system in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Comp Neurol* 465:604–619.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2003b. Estudio experimental de las conexiones cerebelares en el salmónido *Oncorhynchus mykiss*. *Rev Neurol* 37:1171A.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004a. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. Olfactory bulb and ventral area. *J Comp Neurol* 480:180–203.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004b. Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res Bull* (in press).
- Gómez-Segade P, Segade LA, Anadón R. 1991. Ultrastructure of the organum vasculosum laminae terminalis in the advanced teleost *Chelon labrosus* (Risso, 1826). *J Hirnforsch* 32:69–77.
- González MJ, Yáñez J, Anadón R. 1999. Afferent and efferent connections of the torus semicircularis in the sea lamprey: an experimental study. *Brain Res* 826:83–94.
- Grover BG, Sharma SC. 1981. Organization of extrinsic tectal connections in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Neurol* 196:471–488.
- Holmes PH, Northcutt RG. 2003. Connections of the pallial telencephalon in the Senegal bichir, *Polypterus*. *Brain Behav Evol* 61:113–147.
- Holmqvist BI, Ekström P. 1995. Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonpeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *J Chem Neuroanat* 8:125–145.
- Holmqvist BI, Östholm T, Ekström P. 1992. Retinohypothalamic projections and the suprachiasmatic nucleus of the teleost brain. In: Ali MA, editor. *Rhythms in fishes*. New York: Plenum Press. p 293–318.
- Holmqvist BI, Östholm T, Ekström P. 1994. Neuroanatomical analysis of the visual and hypophysiotrophic systems in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with emphasis on possible mediators of photoperiodic cues during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 121:1–12.
- Imura K, Yamamoto N, Sawai N, Yoshimoto M, Yang CY, Xue HG, Ito H. 2003. Topographical organization of an indirect telencephalo-cerebellar pathway through the nucleus paracommissuralis in a teleost, *Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol* 61:70–90.
- Ito H, Kishida R. 1977. Tectal afferent neurons identified by the retrograde HRP method in the carp telencephalon. *Brain Res* 130:142–145.
- Ito H, Morita Y, Sakamoto N, Ueda S. 1980. Possibility of telencephalic visual projections in teleosts, Holocentridae. *Brain Res* 197:219–222.
- Ito H, Murakami T, Morita Y. 1982. An indirect telencephalo-cerebellar pathway and its relay nucleus in teleosts. *Brain Res* 249:1–13.
- Ito H, Murakami T, Fukuoka T, Kishida R. 1986. Thalamic fiber connections in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*): visual somatosensory, octavolateral, and cerebellar relay region to the telencephalon. *J Comp Neurol* 250:215–227.
- Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J, Peter RE. 1987. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptic-hypophysial pathway. *Neuroendocrinology* 45:451–458.
- Kanwal JS, Finger TE, Caprio J. 1988. Forebrain connections of the gustatory system in ictalurid catfishes. *J Comp Neurol* 278:353–376.
- Lamb CF, Caprio J. 1993. Diencephalic gustatory connections in the channel catfish. *J Comp Neurol* 337:400–418.
- Lee LT, Bullock TH. 1990. Responses of the optic tectum to telencephalic stimulation in catfish. *Brain Behav Evol* 35:313–324.
- Levine RL, Dethier S. 1985. The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* 237:427–444.
- Luiten PG. 1981. Afferent and efferent connections of the optic tectum in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Brain Res* 220:51–65.
- Manso MJ, Becerra M, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 34:239–260.
- Marín O, González A, Smeets WJ. 1997a. Basal ganglia organization in amphibians: afferent connections to the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378:16–49.
- Marín O, González A, Smeets WJ. 1997b. Basal ganglia organization in amphibians: efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378:16–49.
- Marín O, Smeets WJ, González A. 1998. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *TINS* 21:487–494.
- Matz SP, Takahashi TT. 1994. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the brain of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J Comp Neurol* 345:214–223.
- Mueller T, Wullimann MF. 2003. Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain. *Dev Brain Res* 140:137–155.
- Murakami T, Morita Y, Ito H. 1983. Extrinsic and intrinsic fiber connections of the telencephalon in a teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *J Comp Neurol* 216:115–131.
- Murakami T, Fukuoka T, Ito H. 1986a. Telencephalic ascending acousticolateral system in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*), with special reference to the fiber connections of the nucleus preglomerulosus. *J Comp Neurol* 247:383–397.
- Murakami T, Ito H, Morita Y. 1986b. Telencephalic afferent nuclei in the carp diencephalon, with special reference to fiber connections of the nucleus preglomerulosus pars lateralis. *Brain Res* 382:97–103.
- Nieuwenhuys R. 1962. Trends in evolution of the actinopterygian forebrain. *J Morphol* 111:69–88.
- Nieuwenhuys R. 1963. The comparative anatomy of the teleostean forebrain. *J Hirnforsch* 6:171–192.
- Northcutt RG. 1981. Localization of neurons afferent to the telencephalon in a primitive bony fish, *Polypterus palmas*. *Neurosci Lett* 22:219–222.
- Northcutt RG. 1982. Localization of neurons afferent to the optic tectum in longnose gars. *J Comp Neurol* 204:325–335.
- Northcutt RG. 1995. The forebrain of gnathostomes: in search of a morphotype. *Brain Behav Evol* 46:275–318.
- Northcutt RG, Braford MR Jr. 1980. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes. In: Ebbesson SOE, editor. *Comparative neurology of the telencephalon*. New York: Plenum Press. p 41–98.
- Northcutt RG, Davis RE. 1983. Telencephalic organization in ray-finned fishes. In: Northcutt RG, Davis RE, editors. *Fish neurobiology*, Vol. II. Michigan: University of Michigan Press. p 203–236.
- Northcutt RG, Ronan M. 1992. Afferent and efferent connections of the bullfrog medial pallium. *Brain Behav Evol* 40:1–16.
- Northcutt RG, Wicht H. 1997. Afferent and efferent connections of the lateral and medial pallia of the silver lamprey. *Brain Behav Evol* 49:1–19.
- Northcutt RG, Wullimann MF. 1988. The visual system in teleost fishes: morphological patterns and trends. In: Atema J, Fay JJ, Popper AN, Tavolga WN, editors. *Sensory biology of aquatic animals*. Berlin: Springer. p 515–552.
- Oka Y, Satou M, Ueda K. 1986. Descending pathways to the spinal cord in the hime salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *J Comp Neurol* 254:91–103.
- Olivereau M, Olivereau JM. 1991. Immunocytochemical localization of a galanin-like peptidergic system in the brain and pituitary of some teleost fish. *Histochemistry* 96:343–354.
- Olivereau M, Moons L, Olivereau J, Vandesande F. 1988. Coexistence of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and vasotocin in perikarya of the preoptic nucleus in the eel. *Gen Comp Endocrinol* 70:41–48.
- Olivereau M, Olivereau J, Vandesande F. 1990. Localization of growth hormone-releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophysial system of some teleost species. *Cell Tissue Res* 259:73–80.
- Pinganaud G, Clairambault P. 1979. The visual system of the trout *Salmo irideus* Gibb. A degeneration and radioautographic study. *J Hirnforsch* 20:413–431.

- Piñuela C, Baatrup E, Geneser FA. 1992. Histochemical distribution of zinc in the brain of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. I. The telencephalon. *Anat Embryol (Berl)* 185:379–388.
- Pombal MA, El Manira A, Grillner S. 1997. Afferents of the lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: a combined tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 386:71–91.
- Prasada Rao PD, Jadhao AG, Sharma SC. 1987. Descending projection neurons to the spinal cord of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 265:96–108.
- Puelles L, Rubenstein JL. 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16:472–479.
- Puelles L, Rubenstein JL. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469–476.
- Riedel G. 1997. The forebrain of the blind cave fish *Astyanax hubbsi* (Characidae). I. General anatomy of the telencephalon. *Brain Behav Evol* 49:20–38.
- Rink E, Wullimann MF. 1998. Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394:152–170.
- Rodríguez MA, Anadón R, Rodríguez-Moldes I. 2003. Development of galanin-like immunoreactivity in the brain of the brown trout (*Salmo trutta fario*), with some observations on sexual dimorphism. *J Comp Neurol* 465:263–285.
- Saidel WM, Marquez-Houston K, Butler AB. 2001. Identification of visual pallial telencephalon in the goldfish, *Carassius auratus*: a combined cytochrome oxidase and electrophysiological study. *Brain Res* 919:82–93.
- Sawai N, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 2000. Fiber connections of the corpus mamillare in a percormorph teleost, tilapia *Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol* 55:1–13.
- Schellart NA. 1983. Acoustic lateral and visual processing and their interaction in the torus semicircularis of the trout, *Salmo gairdneri*. *Neurosci Lett* 42:39–44.
- Schlussman SD, Kobylack MA, Dunn-Meynell AA, Sharma SC. 1990. Afferent connections of the optic tectum in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Cell Tissue Res* 262:531–541.
- Schnitzlein HN. 1977. The telencephala of Division I of the teleost fishes. *J Hirnforsch* 18:157–178.
- Schroeder DM. 1980. The telencephalon of teleosts. In: Ebbesson SOE, editor. *Comparative neurology of the telencephalon*. New York: Plenum Press. p 99–115.
- Shiga T, Oka Y, Satou M, Okumoto N, Ueda K. 1985. An HRP study of afferent connections of the supracommissural ventral telencephalon and the medial preoptic area in himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *Brain Res* 361:162–177.
- Shiga T, Oka Y, Satou M, Okumoto N, Ueda K. 1987. Retinal projections in the himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *Zool Sci* 6:885–898.
- Shimizu M, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 1999. Fiber connections of the inferior lobe in a percormorph teleost, *Thamnaconus (Navodon) modestus*. *Brain Behav Evol* 54:127–146.
- Smeets WJ, Boord RL. 1985. Connections of the lobus inferior hypothalami of the clearnose skate *Raja eglanteria* (Chondrichthyes). *J Comp Neurol* 234:380–392.
- Smeets WJ, Northcutt RG. 1987. At least one thalamotelencephalic pathway in cartilaginous fishes projects to the medial pallium. *Neurosci Lett* 78:277–282.
- Striedter GF. 1990. The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II. Retinal, tectal, cerebellar and telencephalic connections. *Brain Behav Evol* 36:355–377.
- Striedter GF. 1991. Auditory, electrosensory, and mechanosensory lateral line pathways through the forebrain in channel catfishes. *J Comp Neurol* 312:311–331.
- Striedter GF. 1992. Phylogenetic changes in the connections of the lateral preglomerular nucleus in ostariophysan teleosts: a pluralistic view of brain evolution. *Brain Behav Evol* 39:329–357.
- Turovski A, Danner H. 1977. Zur Morphologie des Telencephalons von *Salmo irideus* (Teleostei). Golgi-Imprägnationstudie. *J Hirnforsch* 18:37–51.
- van den Dungen HM, Buijs RM, Pool CW, Terlouw M. 1982. The distribution of vasotocin and isotocin in the brain of the rainbow trout. *J Comp Neurol* 212:146–157.
- Vanegas H, Ebbesson SO. 1976. Telencephalic projections in two teleost species. *J Comp Neurol* 165:181–195.
- von der Emde G, Prechtl JC. 1999. Anatomical connections of auditory and lateral line areas of the dorsal telencephalon (Dm) in the osteoglossomorph teleost, *Gnathonemus petersii*. *Brain Res* 818:355–367.
- von Kupffer C. 1906. Die Morphogenie des Zentralnervensystems. In: Hertwig O, editor. *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltieren*. Vol. 2. Part 3. Jena: Fischer. p 1–272.
- Wong CJ. 1997. Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*. *J Comp Neurol* 389:49–64.
- Wullimann MF, Meyer DL. 1993. Possible multiple evolution of indirect telencephalo-cerebellar pathways in teleosts: studies in *Carassius auratus* and *Pantodon buchholzi*. *Cell Tissue Res* 274:447–455.
- Wullimann MF, Northcutt RG. 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 MF, Northcutt RG. 1990. Visual and electrosensory circuits of the diencephalon in mormyrids: an evolutionary perspective. *J Comp Neurol* 297:537–552.
- Wullimann MF, Roth G. 1994. Descending telencephalic information reaches longitudinal torus and cerebellum via the dorsal preglomerular nucleus in the teleost fish, *Pantodon buchholzi*: a case of neural preadaptation? *Brain Behav Evol* 44:338–352.
- Wullimann MF, Meyer DL, Northcutt RG. 1991. The visually related posterior pretectal nucleus in the non-percomorph teleost *Osteoglossum bicirrhosum* projects to the hypothalamus: a DiI study. *J Comp Neurol* 312:415–435.
- Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. 1996. Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topological atlas. Basel: Birkhäuser.
- Yamamoto N, Ito H. 2000. Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. *J Comp Neurol* 428:355–375.
- Yamane Y, Yoshimoto M, Ito H. 1996. Area dorsalis pars lateralis of the telencephalon in a teleost (*Sebastes marmoratus*) can be divided into dorsal and ventral regions. *Brain Behav Evol* 48:338–349.
- Yáñez J, Anadón R. 1996. Afferent and efferent connections of the habenula in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an indocarbocyanine dye (DiI) study. *J Comp Neurol* 372:529–543.
- Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu M, Yamamoto N, Ito H. 1998. Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. *J Comp Neurol* 392:209–226.
- Zupanc GK. 1997. The preglomerular nucleus of gymnotiform fish: relay station for conveying information between telencephalon and diencephalon. *Brain Res* 761:179–191.

Capítulo 5

El núcleo subglomeruloso de la trucha es un nexa entre los sistemas quimosensoriales y el sistema visual: un estudio con DiI.

*The nucleus subglomerulosus of the trout is a link between chemosensory and visual systems: a DiI study.
Brain Research Bulletin 57: 327-330; 2002.*

The nucleus subglomerulosus of the trout hypothalamus is a link between chemosensory and visual systems: A DiI study

Mónica Folgueira,¹ Gema Huesa,¹ Ramón Anadón² and Julián Yáñez¹

¹Department of Cellular and Molecular Biology, University of A Coruña, A Coruña, Spain; and ²Department of Fundamental Biology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT: We have studied the connections of the nucleus subglomerulosus of the trout posterior tubercle. Main afferents to the nucleus subglomerulosus come from the dorsal telencephalon and the visceral (gustatory) secondary nucleus, while it projects to the optic tectum. In the light of the connections observed, the nucleus subglomerulosus of trout (and probably in other teleosts) appears to be involved in the modulation of sensory-motor tectal processing by olfactory and visceral information.

KEY WORDS: Chemoreception, Optic tectum, Secondary gustatory nucleus, Connections, Teleosts.

INTRODUCTION

The posterior tubercle of the diencephalon of trout and other teleosts contains a characteristic U-shaped nucleus referred to as nucleus subglomerulosus (SG) [1,2]. In the trout, the nucleus consists of a layer of pear-shaped perikarya that surrounds a core of neuropil [2]. Despite the outstanding appearance of this nucleus, no data about its connections are available. With the aim to know the afferent and efferent projections of SG, we have conducted experiments in fixed brains using DiI as a tracer. DiI is a lipophilic dye that diffuses along the plasma membrane of neurons in both retrograde and anterograde directions.

MATERIALS AND METHODS

Young trout (*Oncorhynchus mykiss*) were deeply anesthetized and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Brains were then dissected out and maintained in the same fixative. Two procedures of DiI application were conducted as elsewhere [5]. In brief, for labeling superficial nuclei and brain areas accessible externally, a small crystal of the lipophilic tracer DiI (Eugene, OR, USA) placed on the tip of an insect pin was directly applied under a stereomicroscope. For labeling other nuclei and areas, brains were previously embedded in agarose and sectioned on a vibratome at the required level, and the tracer was applied as above. The cut surface was sealed with melted agarose and brains were left for 2–8 weeks in darkness at 37°C in frequently renewed fresh fixative. Sites of DiI application were the olfactory bulbs (OB), several regions of the telencephalic

hemispheres, the superficial pretectal nuclei, the preglomerular complex, the SG, the diffuse nucleus of the lateral hypothalamic lobes (DLI), the torus lateralis, the dorsal optic tectum (OT) (dorsorostral, dorsomedial, and dorsocaudal parts), the torus semicircularis, the cerebellum, the nucleus lateralis valvulae, the nucleus isthmi, and the secondary visceral (gustatory) nucleus (SVN). Transverse vibratome sections (50 µm thick) were examined and photographed with a fluorescence microscope equipped with a rhodamine filter set. Negative films were scanned and printed as positive.

RESULTS

The SG of trout is a characteristic nucleus located in the dorsolateral region of the lateral hypothalamic recesses (Fig. 1). Application of DiI to the SG and to a series of brain nuclei and regions, showed that this nucleus has mainly telencephalic, tectal, and isthmic connections. Application of DiI to the SG-labeled neurons in the medial part (Dm) and in the ventrocaudal region of the posterior part (Dp) of the dorsal telencephalic area (Fig. 2), and fibers reaching Dm. As shown by DiI application to the OB, Dp was the main target for secondary olfactory projections in the dorsal telencephalon (Fig. 3), while no labeled fibers were observed in SG with this type of DiI application. DiI application to Dp confirmed the ipsilateral projection from this region to the SG, giving rise to a rather dense terminal field in SG and nearby periventricular cell layer of the lateral hypothalamic recess (Fig. 4).

Application of DiI to the SG also labeled a number of perikarya in the secondary visceral nucleus (Fig. 5) and fibers in the stratum opticum of the rostral optic tectum. Although DiI application to the nucleus isthmi produced intense labeling of numerous fibers in the SG originating from a conspicuous tract (Fig. 6), this labeling appears to be “en-passant” because SVN fibers cross this nucleus. DiI application to the rostral OT labeled bilaterally a number of SG perikarya (Fig. 7), whereas DiI crystals placed into the dorsomedial or dorsocaudal areas of the OT only labeled a few SG neurons (Fig. 8).

Although some SG perikarya can be labeled after DiI application to the nucleus preglomerulosus or the magnocellular and parvocellular superficial pretectal nuclei, these results appear to be due to “en-passant” tract labeling, since DiI application to the SG

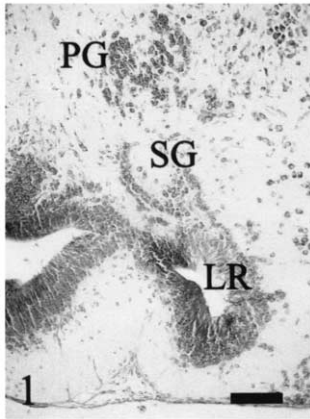


FIG. 1. Nissl-stained transverse section through the trout hypothalamus showing the rostral part of the nucleus subglomerulosus (SG). Scale bar: 70 μ m. See List of Abbreviations.

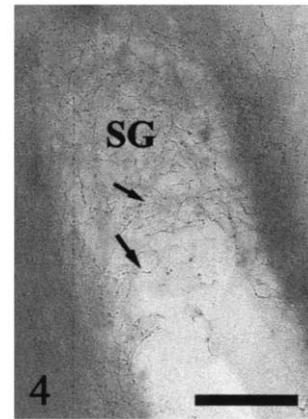


FIG. 4. Detail of a transverse section through the nucleus subglomerulosus (SG) to show anterograde varicose fibers (arrows) after DiI application to the Dp. Scale bar: 100 μ m. See List of Abbreviations.

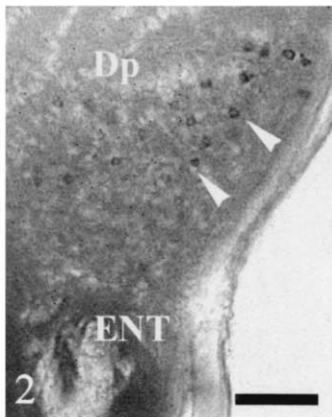


FIG. 2. Transverse section through the caudal telencephalon showing retrograde labeled cells (arrowheads) in the ventrocaudal region of Dp after DiI application to the nucleus subglomerulosus. Scale bar: 100 μ m. See List of Abbreviations.

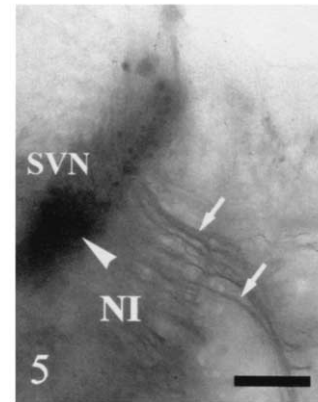


FIG. 5. Transverse section through the isthmus showing a dense group of retrograde labeled cells (arrowhead) in the secondary visceral nucleus (SVN) and their axons (arrows) crossing the nucleus isthmi (NI) after DiI application to the SG. Scale bar: 100 μ m. See List of Abbreviations.

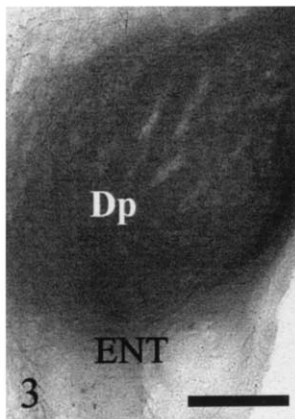


FIG. 3. Transverse section through the caudal telencephalon showing intensely labeled secondary olfactory projections in Dp after DiI application in the olfactory bulb. Scale bar: 100 μ m. See List of Abbreviations.

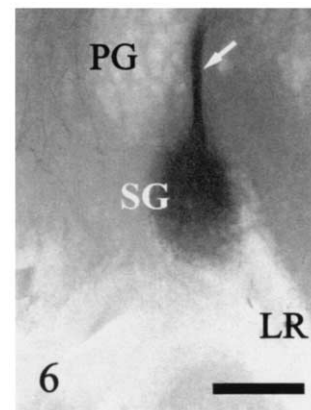
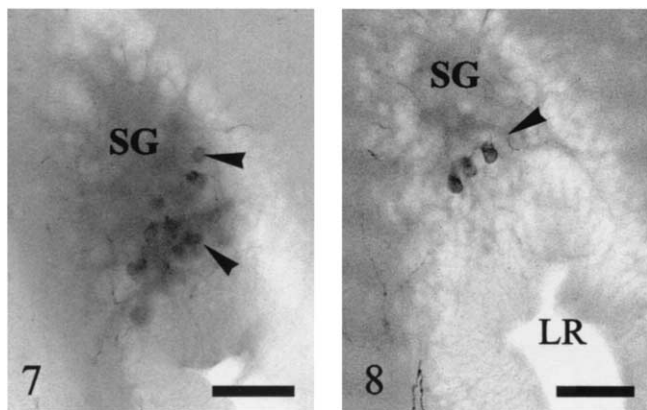


FIG. 6. Transverse section through the hypothalamus showing anterogradely labeled fibers (arrow) in the SG after DiI application to the isthmus. Scale bar: 100 μ m. See List of Abbreviations.



FIGS. 7 and 8. Transverse section through the SG after DiI application to the rostro- (7) and caudo-dorsal (8) region of the optic tectum (OT) showing retrogradely labeled perikarya (arrowheads). Scale bar: 60 μm. See List of Abbreviations.

does not label terminal fields in these nuclei. DiI application to other structures mentioned above did not label neurons or fibers in the SG, with the exception of DLI.

DISCUSSION

The present study demonstrates for the first time the connections of the SG. The afferents of the SG (summarized in Fig. 9)

appear to be mainly telencephalic (Dp and Dm) and isthmal (SVN). The afferent neurons located in Dp appear to overlap the main terminal field of the secondary olfactory projections ([4], present results). These results suggest that Dp transmits olfactory information to the SG. Extratelencephalic projections originating from Dp were not reported previously in teleosts (see [3]). The SVN of trout projects mostly to the ipsilateral tertiary gustatory nucleus of the hypothalamus [5]. The present results indicate that the SG is also a specific target of the SVN, a connection that was not previously reported in teleosts. Therefore, both tertiary visceral (gustatory?) and olfactory projections appear to be the most significant afferents to the SG.

The OT is the main visual center of teleosts [4]. Interestingly, it was the only target identified for the SG neurons. Our results also indicate that many more SG neurons were labeled when DiI was applied to the rostral OT than when it was applied to the caudal tectum, which indicates some topographical organization of the SG-tectal projection. Together, present experiments suggest that the SG of trout may have a role in the modulation of sensory-motor processing in the OT by both taste and olfactory inputs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Xunta de Galicia (PGIDT99BIO20002) and the Science and Technology Ministry (BXX2000-0453-CO2-01 and O2).

REFERENCES

1. Gómez Segade, P.; Anadón, R. Specialization in the diencephalon of advanced teleosts. *J. Morphol.* 197:71-104; 1988.

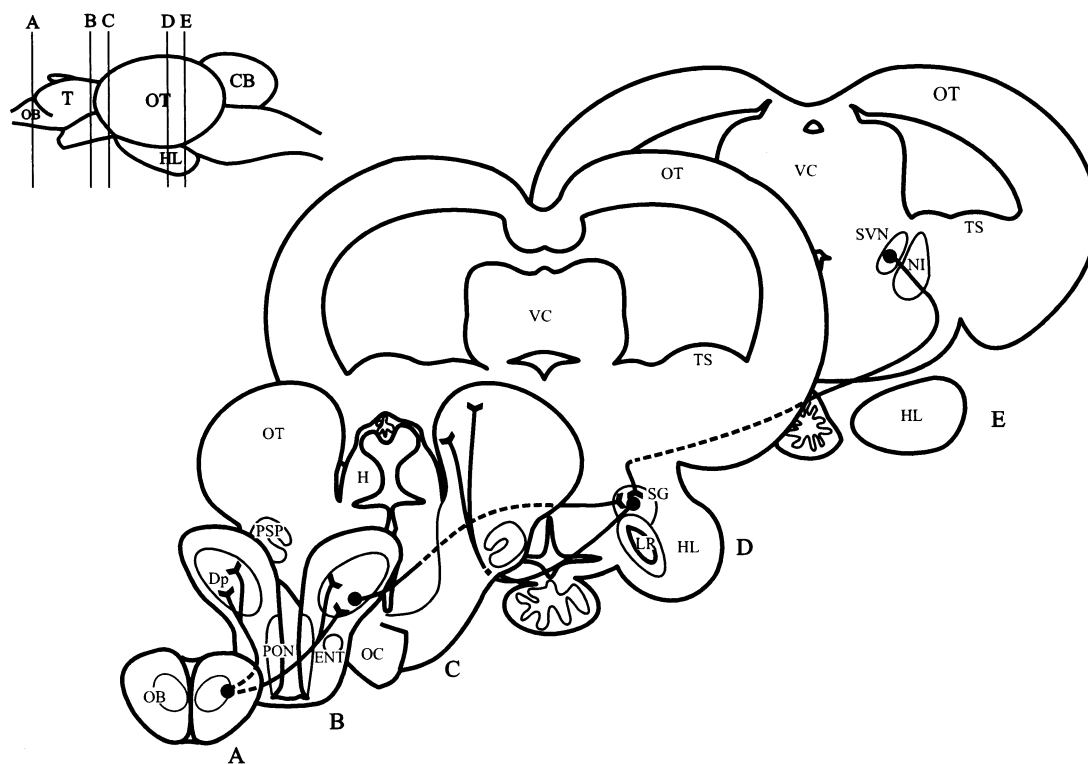


FIG. 9. Schematic drawings of transverse sections (A-E) of the trout brain (levels are indicated in the inset) showing the main connections of the SG. See List of Abbreviations.

2. Holmgren, N. Zur Anatomie und Histologie des Vorder- und Zwischenhirns der Knochenfische hauptsächlich nach Untersuchungen an *Osmerus eperlanus*. Acta Zool. (Stockh.) 1:137–153; 1920.
3. Matz, S. P. Connections of the olfactory bulb in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Brain Behav. Evol. 46:108–120; 1995.
4. Meek, J.; Nieuwenhuys, R. Holosteans and teleosts. In: Nieuwenhuys, R.; ten Donkelaar, H. J.; Nicholson, C., eds. The central nervous system of vertebrates, vol. 2. Berlin: Springer Verlag; 1998:759–937.
5. Pérez, S. E.; Yáñez, J.; Marín, O.; Anadón, R.; González, A.; Rodríguez-Moldes, I. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout, and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. J. Comp. Neurol. 428:450–474; 2000.

LIST OF ABBREVIATIONS

CB cerebellum
 DLI diffuse nucleus of the lateral hypothalamic lobes
 Dm medial part of the dorsal telencephalic area

Dp posterior part of the dorsal telencephalic area
 ENT entopeduncular nucleus
 H habenula
 HL lateral hypothalamic lobes
 LR lateral hypothalamic recess
 NI nucleus isthmi
 OB olfactory bulb
 OC optic chiasm
 OT optic tectum
 PG nucleus preglomerulosus
 PON preoptic nucleus
 PSP superficial pretectal nucleus, parvocellular part
 SG nucleus subglomerulosus
 SVN secondary visceral nucleus
 T telencephalon
 TS torus semicircularis
 VC valvula cerebelli

Capítulo 6

Estudio experimental de las conexiones de los núcleos preglomerulosos y cuerpo mamilar de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*.

*Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.*

Brain Research Bulletin, 2005, en prensa.

Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

M. Folgueira^a, R. Anadón^b, J. Yáñez^a

^a Department of Cellular and Molecular Biology, University of A Coruña, A Coruña 15007, Spain

^b Department of Cell Biology and Ecology, University of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain

Abstract

The preglomerular complex of trout consists of the anterior (aPGN) and medial (mPGN) preglomerular nuclei and the corpus mamillare (CM). In order to improve knowledge on this complex, we applied a lipophilic neuronal tracer (DiI) to the three nuclei. These nuclei received afferents from the medial part of the dorsal telencephalic area (Dm), the ventral part of the ventral telencephalic area (Vv), the preoptic nucleus, the periventricular layer of the rostral optic tectum and the central posterior thalamic nucleus. The aPGN also received numerous toral projections and, sent efferents to the anterior tuberal nucleus. In addition, both the aPGN and the mPGN nuclei gave rise to efferents to the dorsal region of the dorsal telencephalic area (Dd), whereas the medial preglomerular nucleus and the CM sent efferents to the torus lateralis and the diffuse nucleus, as confirmed by reciprocal labeling. A small mPGN/CM subgroup projected to the optic tectum. These results suggest close functional inter-relationship between the trout preglomerular complex and two telencephalic regions (Dm and Vv). In addition, all nuclei of the complex receive preoptic, tectal and dorsal thalamic afferents, whereas the aPGN and mPGN are related with acoustic-lateral ascending pathways, and the mPGN and CM with the central region of the dorsal telencephalic area and visceral/gustatory pathways.

© 2005 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Posterior tubercle; Telencephalon; Projections; Teleost; Optic tectum; Hypothalamic lobes

1. Introduction

The posterior tubercle of teleosts is a well-developed structure located at the transition between the diencephalon and mesencephalon, considered as a relay center of sensory information to the telencephalon from the acousticolateral and

gustatory systems (see [6]). The posterior tubercle consists of both non-migrated and migrated nuclei with no clear correspondence to any nuclei of other vertebrates [1,6]. At present, the boundaries, nomenclature and subdivisions of the migrated posterior tubercle nuclei in different species are not firmly established, showing substantial variations throughout the literature [6]. In the rainbow trout (*Protacanthopterygii*), the preglomerular complex is represented by a column of migrated cells grouped in the anterior preglomerular nucleus, the medial preglomerular nucleus (=Holmgren's nucleus pseudoglomerulosus), and the corpus mamillare. In percomorphs, the corpus mamillare appears clearly separated from the caudal preglomerular nucleus [4], but in salmonids such a distinction is not clear. Although most hodological studies have considered the rostralateral regions of the preglomerular complex as part of an ascending acoustic-lateral telencephalic relay center [7,12–14], data about the connections of the corpus mamillare are limited to cypriniformes

Abbreviations: aPGN, anterior preglomerular nucleus; CG, central gray; CM, corpus mamillare; Dc, central region of the dorsal telencephalon; Dd, dorsal region of the dorsal telencephalon; Dm, medial region of the dorsal telencephalon; fr, fasciculus retro cuneus; HL, inferior hypothalamic lobe; mPGN, medial preglomerular nucleus; mlf, medial longitudinal fascicle; NAT, anterior tuberal nucleus; NI, nucleus isthmi; OT, optic tectum; PL, posterior tubercular lobe; PO, preoptic region; R, superior raphe nucleus; SR, superior reticular nucleus; TL, torus lateralis; TS, torus semicircularis; Vd, dorsal region of the ventral telencephalon; Vv, ventral region of the ventral telencephalon

[5,15] and one species of percomorphs [10,16]. The aim of this hodological study is to expand our knowledge on the preglomerular complex of salmonids.

2. Material and methods

Sixty- v e juveniles of *Oncorhynchus mykiss* obtained from a local sh farm were deeply anesthetized with MS-222 and transcardially perfused with cold 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 (PB). Brains were then dissected out of the skull and maintained in the same xati ve at 4 °C until use. Two procedures of application of DiI (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were used as was previously described [3]. In brief, in order to label super cial nuclei (ex-

ternally and ventricular accessible brain areas), a small crystal of DiI was placed on the tip of an electrolytically sharpened insect pin and was then directly applied to the brain under a stereomicroscope. The brain areas accessed by this procedure in this report were the anterior preglomerular nucleus (aPGN). For labeling less accessible nuclei and areas, brains were previously embedded in 3% agarose and sectioned on a vibratome along the appropriate section plane to the required level. The tracer was then applied as above. Using this procedure, DiI was applied to the medial preglomerular nucleus (mPGN) and the corpus mamillare (CM). In order to con rm connections, additional DiI applications to several regions of the brain were made following the same procedures: different regions of the dorsal and ventral telencephalic areas (Dm, Dd, Vv), preoptic region, optic tectum, torus semicircularis, torus

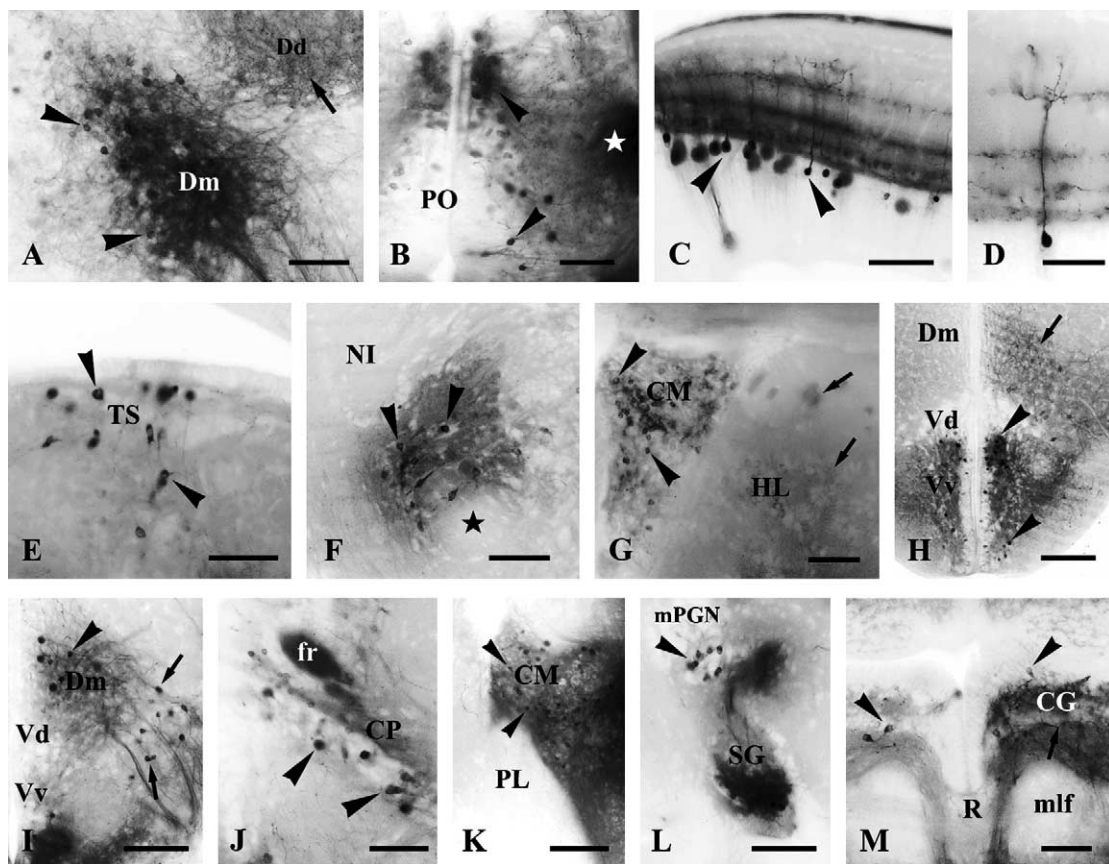


Fig. 1. Photomicrographs of selected transverse sections through the trout brain showing labeled structures after application of DiI to the aPGN (A–E), mPGN (F and G), CM (H–J and M), torus lateralis (K), and optic tectum (L). (A) Section through the telencephalon showing retrogradely labeled cells (arrowheads) in Dm and anterogradely labeled bers (arrow) reaching Dd. (B) Section through the preoptic region showing retrogradely labeled cells (arrowheads). Note labeled bers coursing in the lateral forebrain bundle (white star). (C) Section through the optic tectum showing retrogradely labeled cells (arrowheads) in the stratum griseum periventriculare. (D) Detail of a retrogradely labeled cell of the optic tectum projecting to the preglomerular complex. (E) Section through the mesencephalon showing retrogradely labeled perikarya (arrowheads) in the torus semicircularis. (F) Section through the isthmus showing retrogradely labeled cells (arrowheads) in the superior reticular nucleus close to the lateral lemniscus (star). (G) Section through the hypothalamus showing a number of retrogradely labeled cells (arrowheads) in the corpus mamillare and bers (arrows) in the hypothalamic lobe. (H) Section through the telencephalon showing retrogradely labeled cells (arrowheads) in the subpallium and labeled bers in Dm (arrow). (I) Section through the telencephalon showing retrogradely labeled cells in Dm (arrowhead) and in Dc (arrows). (J) Retrogradely labeled cells (arrowheads) in the central posterior nucleus of the dorsal thalamus. (K) Section showing retrogradely labeled cells (arrowheads) in the corpus mamillare. (L) A small group of tectal projecting neurons closely associated to the ventral mPGN-CM (arrowhead). (M) Section showing bilaterally labeled cells (arrowheads) and bers (arrow) in the rhombencephalic central gray. For abbreviations, see Abbreviations Section. Scale bars in (A, C and E): 125 μ m; (B, F, G and J): 100 μ m; (D): 80 μ m; (H and M): 200 μ m; (I and K): 180 μ m; (L): 150 μ m.

lateralis, and inferior and lateral hypothalamic lobes. In both procedures, the DiI application area was sealed with melted agarose and brains were left in frequently renewed xati ve for 2–8 weeks in darkness at 37 °C. After this time, transverse or sagittal sections (50 µm thick) were cut on a vibratome and mounted on gelatin-coated slides with PB. Sections were examined and photographed with a Nikon E-1000 uorescence photomicroscope equipped with a rhodamine lter set using black-and-white negative lm, which was then digitally scanned and printed as positives.

3. Results

DiI application to each nucleus of the preglomerular complex always produced labeling (both bers and cell bodies) in the other nuclei of the complex, indicating close interrelationship between its different parts. DiI application to the aPGN led to ipsilateral labeling of neurons in the medial region of the dorsal telencephalic area (Dm), the ventral telencephalic area (V), the preoptic region (PO), the central posterior thalamic nucleus, the stratum griseum periventriculare of the optic tectum, and the torus semicircularis (Fig. 1A–E). The main aPGN efferent projections con rmed by reciprocal experiments reach the ipsilateral dorsal part of the dorsal telencephalic area (Dd) (Fig. 1A), Dm, and Vv. Efferent projections to the anterior tubular nucleus were observed, though not con rmed experimentally.

The afferent connections of the mPGN were similar to those of the aPGN, except in that only a few afferent cells from the torus semicircularis were found, and that labeled cells were observed in the central region of the dorsal telencephalic area (Dc) and in the superior reticular nucleus close to the lateral lemniscus (Fig. 1F). The mPGN efferents con rmed by reciprocal experiments coursed to the torus lateralis and the lateral part of the hypothalamic lobe (Fig. 1G). In some experiments, anterogradely labeled bers in the nucleus subglomerulosus and retrogradely labeled neurons in the secondary gustatory nucleus were also observed. The connections between these later structures and the mPGN could not be con rmed by the reciprocal experiments (present results), labeling being probably produced via tertiary gustatory tracts running to the nucleus subglomerulosus close to the mPGN [2].

DiI application to the CM led to retrograde labeling of neurons in the telencephalon (Dm, Dc, Vv, PO) (Fig. 1H–I), central posterior thalamic nucleus (Fig. 1J), and the optic tectum but unlike the other preglomerular nuclei, no afferents from the torus semicircularis were observed. The efferent connections of the corpus mamillare con rmed by reciprocal labeling were those to the Dm, Vv, torus lateralis, and inferior hypothalamic lobe (Fig. 1H and K). DiI application to the optic tectum also led to labeling of a small group of neurons closely associated to the ventral mPGN-CM (Fig. 1L). In addition, reciprocal connections were observed between the CM and the isthmus central

gray (Fig. 1M), though no reciprocal experiment was performed.

4. Discussion

The connections of the trout preglomerular/CM complex are summarized in Fig. 2A and B. The three parts of the complex studied here (aPGN, mPGN, CM) are closely interrelated and show a rather similar pattern of telencephalic and tectal connections. In this regard, they can be considered as differentiated parts of the same system. The heavy reciprocal connections between this complex and the Dm and Vv reported here suggest that these interconnections are essential in their functions. In addition to the telencephalic connections, the preglomerular complex of the trout receives afferents from visual (optic tectum) and mechanosensory (torus

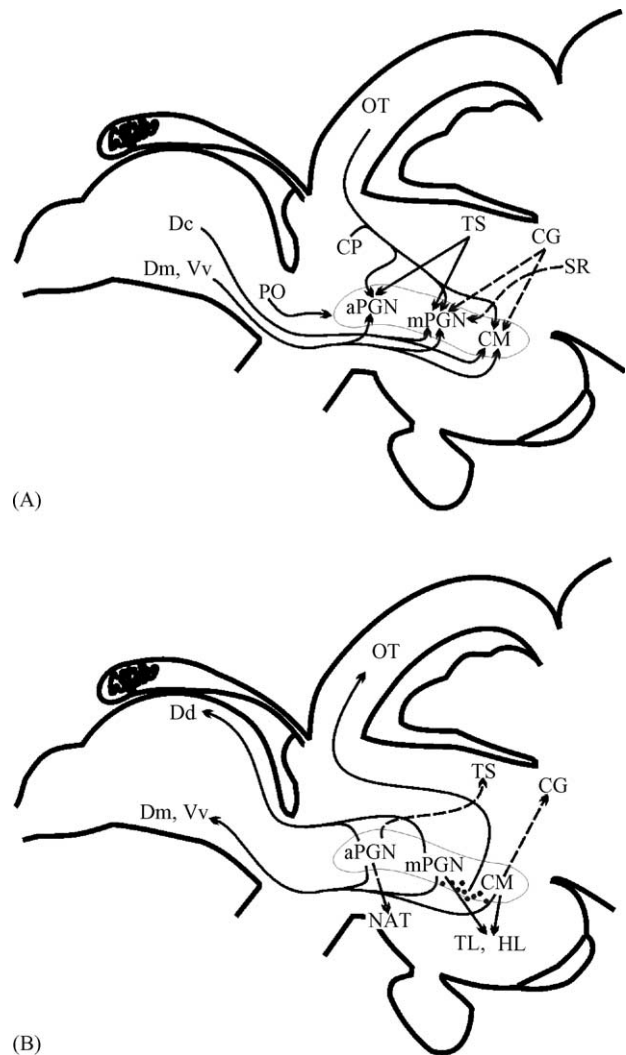


Fig. 2. Summary diagrams of the trout brain in a lateral view showing the afferent (A) and efferent (B) connections to the preglomerular complex. Broken arrows, projections without con rmatory reciprocal experiments.

semicircularis) centers. The trout preglomerular/CM complex does not receive projections from the primary or secondary gustatory nuclei, or from any pretectal nuclei ([3], present results). The hypothalamic tertiary gustatory nucleus of trout (preglomerular tertiary gustatory nucleus of Yoshimoto et al. [16]) appears to be part of a lemniscal system projecting to the precommissural Dm [3]. Since it is neither inter-related with the nuclei of the precommissural complex, nor receives projections from the dorsal telencephalon, the torus semicircularis or the optic tectum should not be considered a part of the preglomerular/CM complex.

There are striking differences between teleosts as regard the connections of the corpus mamillare. Unlike cyprinids [5,8,15], the corpus mamillare of trout does not receive afferents from the pretectal superficial nucleus pars magnocellularis or the secondary gustatory nucleus ([2,3], present results). The connections of the CM were also different in the percomorph *Oreochromis* [10]. In this species, the CM receives a projection from the diffuse nucleus of the torus lateralis and inferior hypothalamic lobe, and projects to the ventromedial thalamus, optic tectum, and telencephalon (PO, dDm). These remarkable differences between trout and the other teleost species studied to date suggest that either these CMs are not homologous or that they have highly different evolutionary histories from a generalized ancestor. By its connections, the trout CM is clearly a caudal part of the preglomerular complex, and it could correspond to the caudal commissural preglomerular nucleus of advanced teleosts, which in these species lies just dorsal to the CM [4,10]. The small group of neurons just ventral to the CM and projecting to the optic tectum observed in trout (present results) might correspond to the neurons of the pars magnocellularis dorsalis of the CM of *Oreochromis* giving rise to the tectal projections [10]. If this hypothesis was correct, most parts of the perciform CM would be absent in trout. Further hodological research in primitive groups of teleosts appears necessary to understand evolutionary trends of this puzzling system.

Although the teleost preglomerular/CM complex and the mammillary body of mammals are thought to be non-homologous [1,11], it is interesting to note that both are related with telencephalic centers involved in learning and memory. The trout complex has bi-directional relationships with Dm, which in the gold sh Dm appears involved in emotional learning [9], but not with the lateral part of the dorsal telencephalic area, which in gold sh is involved in spatial memory and has been proposed as the mammalian medial cortex homologue [9]. It could be hypothesized that the preglomerular/CM complex and Dm of teleosts would form part of a learning/memory circuitry analogous to the mammalian limbic system. Multisensory (visual, auditory/lateral line, gustatory, ...) inputs to the preglomerular/CM complex might be qualified in different teleosts by this learning/memory circuitry in an emotional context. In summary, the preglomerular/corpus mamillare system of the rainbow trout might be

a multi-integrative center involved in higher brain functions.

References

- [1] M.R. Braford Jr, R.G. Northcutt, Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-nned shes, in: R.E. Davis, R.G. Northcutt (Eds.), *Fish Neurobiology*, vol. 2, Ann Arbor, University of Michigan Press, 1983, pp. 117–163.
- [2] M. Folgueira, G. Huesa, R. Anadón, J. Yáñez, The nucleus subglomerulosus of the trout hypothalamus is a link between chemosensory and visual systems: a Dil study, *Brain Res. Bull.* 57 (2002) 427–430.
- [3] M. Folgueira, R. Anadón, J. Yáñez, Experimental study of the connections of the gustatory system in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *J. Comp. Neurol.* 465 (2003) 604–619.
- [4] P. Gómez-Segade, R. Anadón, Specialization in the diencephalon of advanced teleosts, *J. Morphol.* 197 (1988) 71–103.
- [5] H. Ito, M. Yoshimoto, J.S. Albert, Y. Yamane, N. Yamamoto, N. Sawai, A. Kaur, Terminal morphology of two branches arising from a single stem-axon of pretectal (PSm) neurons in the common carp, *J. Comp. Neurol.* 378 (1997) 379–388.
- [6] J. Meek, R. Nieuwenhuys, Holosteans and teleosts, in: R. Nieuwenhuys, H.J. ten Donkelaar, C. Nicholson (Eds.), *The Central Nervous System of Vertebrates*, vol. 2, Springer, Berlin, 1998, pp. 759–938.
- [7] T. Murakami, T. Fukuoka, H. Ito, Telencephalic ascending acousticolateral system in a teleost (*Sebastes marmoratus*), with special reference to the ber connections of the nucleus preglomerulosus, *J. Comp. Neurol.* 247 (1986) 383–397.
- [8] R.G. Northcutt, M.R. Braford, Some efferent connections of the superficial pretectum in the gold sh, *Brain Res.* 296 (1984) 181–184.
- [9] M. Portavella, J.P. Vargas, B. Torres, C. Salas, The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in gold sh, *Brain Res. Bull.* 57 (2002) 397–399.
- [10] N. Sawai, N. Yamamoto, M. Yoshimoto, H. Ito, Fiber connections of the corpus mamillare in a percomorph teleost, tilapia *Oreochromis niloticus*, *Brain Behav. Evol.* 55 (2000) 1–13.
- [11] G.F. Striedter, The diencephalon of the channel cat sh, *Ictalurus punctatus*. I. Nuclear organization, *Brain Behav. Evol.* 36 (1990) 329–354.
- [12] G.F. Striedter, Auditory, electrosensory, and mechanosensory lateral line pathways through the forebrain in channel cat shes, *J. Comp. Neurol.* 312 (1991) 311–331.
- [13] G.F. Striedter, Phylogenetic changes in the connections of the lateral preglomerular nucleus in ostariophysan teleosts: a pluralistic view of brain evolution, *Brain Behav. Evol.* 39 (1992) 329–357.
- [14] M.F. Wullimann, R.G. Northcutt, Visual and electrosensory circuits of the diencephalon in mormyrids: an evolutionary perspective, *J. Comp. Neurol.* 297 (1990) 537–552.
- [15] M. Yoshimoto, H. Ito, Cytoarchitecture, ber connections, an ultrastructure of the nucleus pretectalis superficialis pars magnocellularis (PSm) in carp, *J. Comp. Neurol.* 336 (1993) 343–446.
- [16] M. Yoshimoto, J.S. Albert, N. Sawai, M. Shimizu, N. Yamamoto, H. Ito, Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid sh, *Oreochromis (Tilapia) niloticus*, *J. Comp. Neurol.* 392 (1998) 209–226.

Capítulo 7

Resumen de los resultados y discusión general

RESUMEN GENERAL DE RESULTADOS

En el **Capítulo 1** realizamos una breve descripción de los resultados neuroquímicos y citoarquitectónicos que hemos obtenido en nuestro estudio. En líneas generales, gracias a la técnica de Golgi se observa que si bien en regiones subpaliales se encuentran principalmente células mono y bipolares, en regiones paliales aparecen mayoritariamente células multipolares con una arborización dendrítica mucho más compleja que en regiones subpaliales. Los resultados inmunohistoquímicos concuerdan en líneas generales con los que habían sido descritos en la trucha común (Manso et al., 1993; Vetillard et al., 2002; Castro et al., 2003) y muestran que en áreas como Vv, Dm y Dp se pueden diferenciar subáreas, una dorsal y otra ventral en el caso de Vv y Dp, y al menos 4 subáreas en el caso de Dm.

En el **Capítulo 2** hemos estudiado las conexiones del sistema gustativo en la trucha arco iris, un representante del grupo de los salmónidos que, como el resto de especies de este grupo, presenta un sistema gustativo no especializado. Para llevar a cabo dicho estudio, aplicamos el trazador neuronal DiI en núcleos del rombencéfalo (columna viscerosensorial y núcleo gustativo secundario), diencefalo (toro lateral y núcleo gustatorio terciario) y telencéfalo (la parte dorsal el área ventral del telencéfalo, Vv-d, y el área medial del telencéfalo dorsal, Dm).

Hemos demostrado que existe una vía ascendente gustativa que alcanza áreas telencefálicas desde regiones sensoriales primarias de la columna viscerosensorial a través de una serie de núcleos que funcionan como

centros de relevo en esta vía. Además existen conexiones descendentes desde muchos de estos centros que llegan a alcanzar incluso el área sensorial primaria. Esta vía aparece representada en la figura 1.

La columna viscerosensorial, que es el centro sensorial primario en el que terminan esencialmente las proyecciones que viajan en los nervios facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X), proyecta principalmente al núcleo gustatorio secundario. El núcleo gustatorio secundario a su vez proyecta a varios núcleos diencefálicos (núcleo gustatorio terciario, núcleo del receso hipotalámico lateral, núcleo subglomeruloso y núcleo difuso del lóbulo hipotalámico lateral), a la región preóptica y a la región telencefálica Vv-d. La información gustativa alcanza el telencéfalo además a través de la proyección desde el núcleo gustatorio terciario que alcanza Vv-d y Dm precomisural a través del tracto telencefálico medial.

Hemos observado proyecciones descendentes desde gran parte de los núcleos implicados en el procesamiento de la información gustativa secundaria, terciaria y de cuarto orden. Es el caso del área Vv-d, que presenta una proyección directa al núcleo gustatorio secundario, estableciéndose así un diálogo bidireccional entre ambos núcleos. El núcleo gustatorio secundario recibe también fibras aferentes desde la región preóptica y los núcleos diencefálicos anteriormente citados como implicados en el procesamiento de información gustativa terciaria, a excepción del toro lateral que no parece proyectar al núcleo gustatorio secundario. Así mismo, proyecciones descendentes originadas en el núcleo gustatorio terciario, núcleo del receso lateral hipotalámico y núcleo difuso alcanzan la columna viscerosensorial.

Se observó además que regiones que no parecen recibir aferencias de carácter gustativo, como el núcleo del receso posterior, áreas del núcleo reticular superior y un núcleo talámico o sinencefálico, emiten fibras eferentes a núcleos gustativos primarios, como es el caso del primero de los núcleos mencionados, o a núcleos gustativos secundarios, en el caso de los dos últimos núcleos.

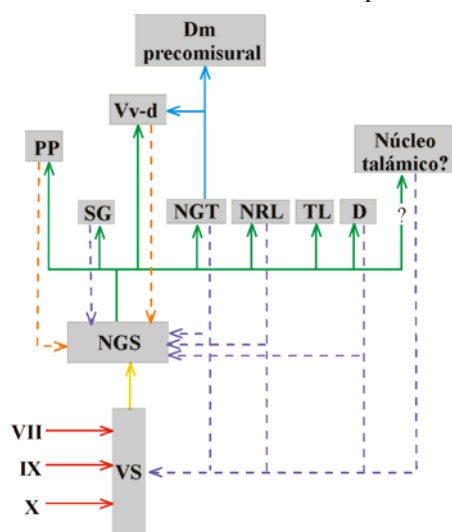


Figura 1

Fig.1. Representación esquemática de las conexiones del sistema gustativo en la trucha arco iris. Abreviaturas: D: núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico; Dm: área medial del telencéfalo dorsal; NGS: núcleo gustatorio secundario; NGT: núcleo gustatorio terciario; NRL: núcleo del receso lateral; PP: área preóptica; SG: núcleo subglomeruloso de Holmgren; TL: toro lateral; VS: columna viscerosensorial; Vv-d: parte dorsal del área ventral del telencéfalo ventral; VII: nervio facial; IX: nervio glossofaríngeo; X: nervio vago.

Estos resultados son similares a los observados en otras especies de teleosteos con sus sistemas gustativos muy especializados, como ciprínidos e ictalúridos, así como con los descritos en ciclidos, lo que parece indicar que existe una organización básica en este sistema que es compartida por la mayoría de los teleosteos (ver *El sistema gustativo* en “Discusión general”).

En los **Capítulos 3 y 4** hemos estudiado las conexiones de las distintas áreas telencefálicas y de la región preóptica aplicando el trazador neuronal DiI no sólo a estas áreas, sino también mediante marcajes recíprocos en un gran número de núcleos del encéfalo. Tras dicho estudio y derivado del análisis de las conexiones del bulbo olfativo, hemos podido revisar también las conexiones del sistema olfativo, detallando más cuáles son los centros implicados en el procesamiento de esta modalidad sensorial. Además

hemos podido determinar las conexiones intra- y extratelencefálicas (Fig.2A,B) de las distintas áreas telencefálicas y de la región preóptica. Dichos resultados revelan que las distintas áreas telencefálicas de la trucha arco iris presentan un patrón hodológico complejo, estando el telencéfalo implicado en el procesamiento multisensorial y en la modulación de la actividad encefálica. Las implicaciones que se derivan del patrón hodológico observado para las distintas áreas telencefálicas serán ampliamente comentadas en la discusión general del presente capítulo.

En el **Capítulo 5** hemos estudiado las conexiones del núcleo subglomeruloso, un núcleo migrado del tubérculo posterior que estaba poco caracterizado hodológicamente hasta el momento. Los resultados de dicho estudio aparecen representados en la figura 3.

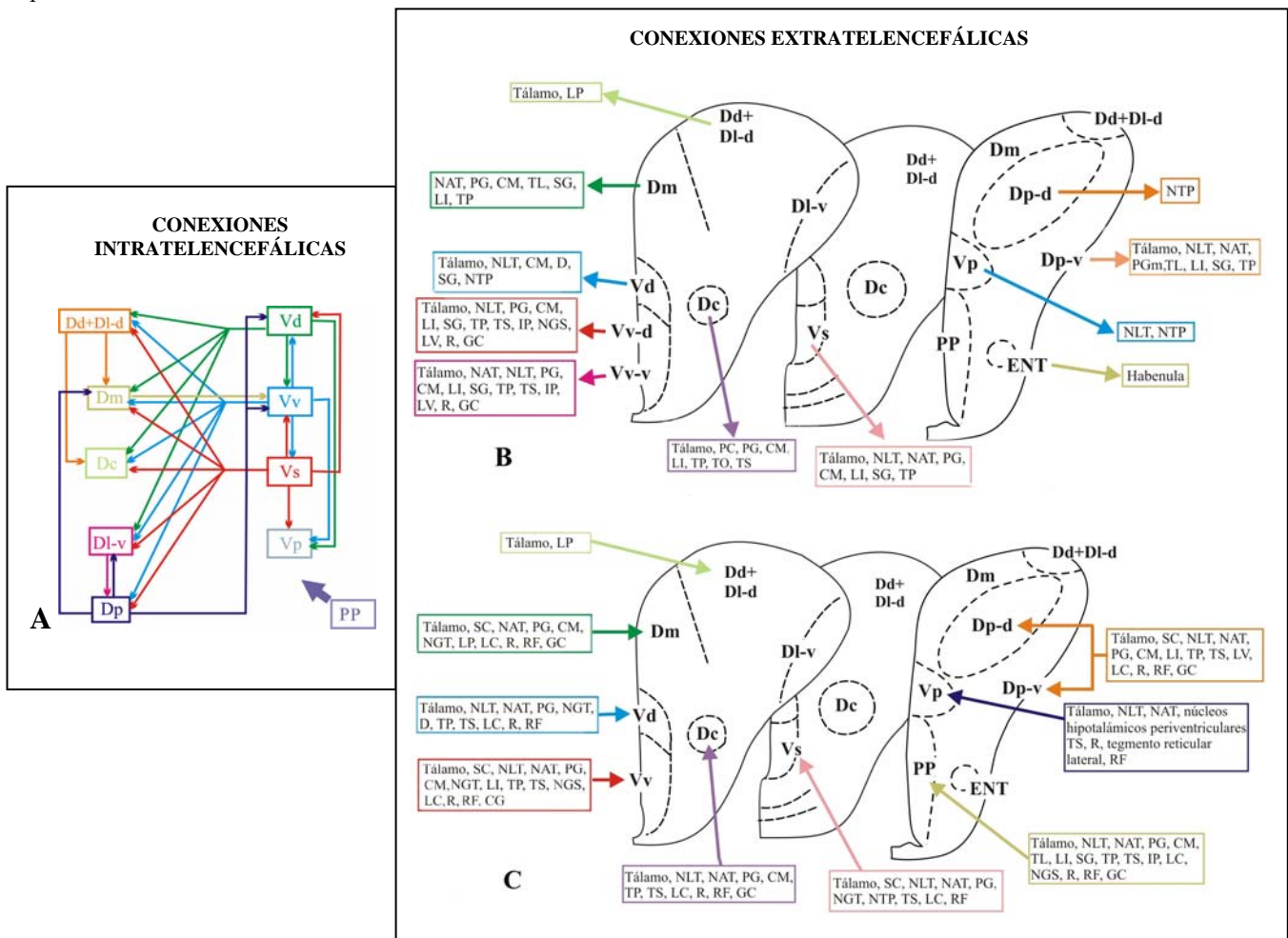


Fig.2. **A:** Representación esquemática donde se observa el complejo patrón de conexiones intratelencefálicas observado en la trucha arco iris. La flecha que surge del área preóptica (**PP**) indica que se observaron células retrógradamente marcadas en este área tras la aplicación de trazador en todas las regiones telencefálicas estudiadas. **B, C:** Conexiones extratelencefálicas eferentes (**B**) y aferentes (**C**) del subpalio, palio y región preóptica de la trucha arco iris. (Modificado de Folgueira et al., 2004a, b, donde se muestran además las conexiones intratelencefálicas). Abreviaturas: CM: cuerpo mamilar; D: núcleo difuso; Dc: área central del telencéfalo dorsal; Dd+Dl-d: área dorsal más la parte dorsal del área lateral del telencéfalo dorsal; Dl-v: parte ventral del área lateral del telencéfalo dorsal; Dm: área medial del telencéfalo dorsal; Dp-d: parte dorsal del área posterior del telencéfalo dorsal; Dp-v: parte ventral del área posterior del telencéfalo dorsal; ENT: núcleo entopeduncular; GC: gris central; IP: núcleo interpeduncular; LC: *locus coeruleus*; LI: lóbulo inferior hipotalámico; LP: lóbulo posterior hipotalámico; LV: núcleo lateral de la válvula; NAT: núcleo anterior del túbere; NGS: núcleo gustatorio secundario; NGT: núcleo gustatorio terciario; NLT: núcleo lateral del túbere; NTP: núcleo del tubérculo posterior; PC: núcleo paracomisural; PG: núcleos preglomerulosos anterior y medial; PGm: núcleo preglomeruloso medial; PP: región preóptica; R: rafe; RF: formación reticular; SC: núcleo supraquiasmático; TO: techo óptico; TP: tubérculo posterior; TS: toro semicircular; Vd: área dorsal del telencéfalo ventral; Vl: área lateral del telencéfalo ventral; Vs: área supracomisural del telencéfalo ventral; Vv: área ventral del telencéfalo ventral; Vv-d: parte dorsal de Vv; Vv-v: parte ventral de Vv.

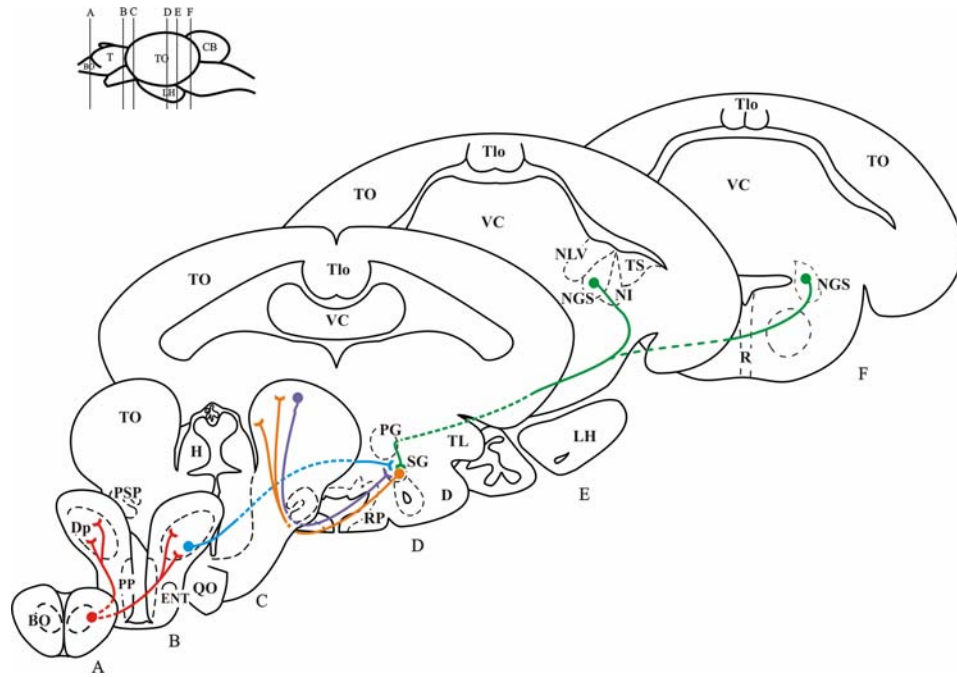


Fig.3. Representación esquemática de las aferencias y eferencias del núcleo subglomeruloso en la trucha arco iris. Los niveles de las secciones aparecen representados en el esquema general del encéfalo que aparece representado en la parte superior de la figura. Abreviaturas: *BO*, bulbo olfatorio; *D*, núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico; *Dp*, área posterior del telencéfalo dorsal; *ENT*, núcleo entopeduncular; *H*, habénula; *LH*, lóbulo inferior hipotalámico; *NGS*, núcleo gustatorio secundario; *NI*, núcleo del istmo; *NLV*, núcleo lateral de la válvula; *PG*, núcleo preglomeruloso medial; *PP*, núcleo preóptico parvocelular; *PSP*, núcleo pretectal superficial parvocelular; *QO*, quiasma óptico; *R*, rafe; *RP*, receso posterior; *SG*, núcleo subglomeruloso; *Tlo*, toro longitudinal; *TO*, techo óptico; *TS*, toro semicircular; *VC*, válvula cerebelosa.

Las principales aferencias a este núcleo provienen de regiones dorsales telencefálicas, del área medial del telencéfalo dorsal (*Dm*) y de la región ventral del área posterior del telencéfalo dorsal (*Dp-v*), y del núcleo (visceral) gustatorio secundario. A su vez el núcleo subglomeruloso mantiene una conexión recíproca con el techo óptico. Dado que *Dp* es la principal área de terminación de las fibras olfativas secundarias procedentes del bulbo olfatorio, el núcleo subglomeruloso parece recibir información de al menos dos categorías sensoriales: olfativa, procedente de *Dp-v*, y gustativa, procedente del núcleo gustatorio secundario. Estos resultados parecen sugerir que el núcleo

subglomeruloso es un centro donde tiene lugar la integración de información quimiosensorial y que podría estar implicado en la modulación del procesamiento de información sensorial-motora que tiene lugar en el techo óptico.

En el **Capítulo 6** hemos estudiado las conexiones del complejo preglomeruloso, un centro de procesamiento de información principalmente mecanosensorial y octavo-lateral que comprende los núcleos anterior (*NPGa*) y medial (*NPGm*) y el cuerpo mamar (CM). Los resultados de dicho estudio aparecen representados en la figura 4.

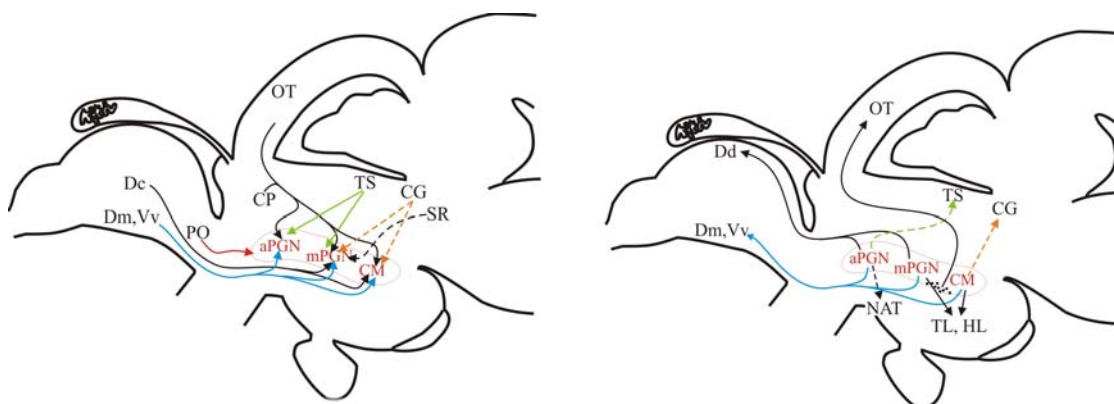


Fig.4. Representación esquemática de las conexiones aferentes (izquierda) y eferentes (derecha) del complejo preglomeruloso (núcleos anterior, medial y cuerpo mamar) en la trucha arco iris. Abreviaturas: *aPGN*: núcleo anterior del complejo preglomeruloso; *CG*: gris central; *CM*: cuerpo mamar; *CP*: núcleo central posterior talámico; *Dc*: área central del telencéfalo dorsal; *Dm*: área medial del telencéfalo dorsal; *HL*: lóbulo inferior hipotalámico; *mPGN*: núcleo medial del complejo preglomeruloso; *NAT*: núcleo anterior del túbulo; *OT*: techo óptico; *PO*: región preóptica; *SR*: núcleo reticular superior; *TL*: toro lateral; *TS*: toro semicircular; *Vv*: área ventral del telencéfalo ventral.

Estos núcleos parecen estar íntimamente relacionados con el telencéfalo, recibiendo aferencias desde el área medial del telencéfalo dorsal (Dm) y desde el área ventral del telencéfalo ventral (Vv), mientras que los núcleos NPGa y NPGm proyectan al área dorsal del telencéfalo dorsal (Dd).

Fibras procedentes de la región preóptica, techo óptico rostral y el núcleo talámico central posterior alcanzan todos los núcleos que constituyen el complejo preglomeruloso. A su vez, un pequeño subgrupo próximo que parece formar parte de las regiones caudales del complejo NPGm/ CM proyecta al techo óptico.

La aplicación del trazador en el NPGa puso de manifiesto que este núcleo recibe un gran número de

proyecciones desde el toro semicircular y envía fibras eferentes al núcleo anterior del túbulo. Por su parte, fibras procedentes de los núcleos NPGm y CM alcanzan el toro lateral y núcleo difuso. Estas conexiones pudieron confirmarse con los marcajes recíprocos, ya que tras la aplicación del trazador tanto en el toro lateral como en el núcleo difuso se observaron un gran número de células retrógradamente marcadas en el NPGm y CM.

La comparación de los resultados hodológicos obtenidos en la trucha arco iris con los descritos en otras especies de teleosteos muestran que existen importantes diferencias, sobre todo en lo que se refiere a las conexiones del cuerpo mamilar (ver "El complejo preglomeruloso y su relación con el telencéfalo").

REVISIÓN DE LAS ÁREAS TELENCEFÁLICAS EN LA TRUCHA ARCO IRIS SOBRE LA BASE DE SU HODOLOGÍA, CITOARQUITECTURA E INMUNOREACTIVIDAD

Los resultados obtenidos tras realizar la técnica clásica de tinción general Nissl, enzimoquímica de la acetilcolinesterasa y las técnicas inmunohistoquímicas dirigidas contra la tirosin hidroxilasa (TH) y la calretinina (CR) nos han permitido una mejor caracterización citoarquitectónica de las áreas telencefálicas identificadas en la trucha arco iris y el establecimiento de sus límites, como se muestra en la figura 5. Para este fin también han contribuido en gran medida los datos hodológicos de los que disponíamos. Además hemos podido apoyar con datos neuroquímicos la existencia de ciertas áreas telencefálicas en la trucha arco iris, como Vv-d y Dp-v, que habían sido ya descritas anteriormente sobre la base de resultados hodológicos (Folgueira et al., 2002, 2003a, 2004a,b). La inmunoreactividad frente a la TH y la calretinina ya habían sido estudiadas en la trucha común (*Salmo trutta fario*: Manso et al., 1993; Vetillard et al., 2002; Castro et al., 2003) y, en líneas generales, los resultados obtenidos en la trucha arco iris no muestran grandes diferencias con los descritos para la trucha común. Por su parte, y como ya había mostrado el trabajo previo de Castro y colaboradores (2003) en *S. trutta fario*, la calretinina resultó ser una excelente herramienta para diferenciar algunas áreas telencefálicas en la trucha.

En el género *Salmo*, Northcutt y Braford en 1980 identificaban los siguientes núcleos en el telencéfalo ventral o subpalio: núcleo dorsal (Vd), núcleo ventral (Vv), núcleo lateral (Vl), núcleo comisural (Vc), núcleo supracomisural (Vs), núcleo postcomisural (Vp) y núcleo entopeduncular (E).

La zona dorsal del área ventral del telencéfalo ventral (Vv-d) presenta rostralmente células inmunoreactivas a la calretinina que no se observan en la zona ventral (Vv-v), como ya había sido descrito en la trucha común (Castro et al., 2003). Los marcajes en el bulbo olfatorio y en el núcleo gustatorio secundario de la trucha arco iris resultaron en células retrógradamente marcadas prácticamente de forma exclusiva en la zona dorsal (Vv-d) y no en su porción ventral (Vv-v). Además, aparentemente hay un mayor número de células en Vv-d que en Vv-v que proyectan a zonas como el tálamo dorsal, el complejo preglomeruloso y la gris central. Por tanto, basándonos en resultados inmunohistoquímicos y hodológicos, podemos diferenciar definitivamente dos núcleos distintos en el área Vv de Northcutt y Braford (1980): una dorsal (Vv-d) y otra ventral (Vv-v).

Parece que en el área dorsal (Vd) se diferenciaría rostralmente una porción inmunoreactiva para la calretinina, denominada por Castro y colaboradores (2003) como Vd-a, y que parece corresponderse con la porción de Vd que muestra gran cantidad de células marcadas tras la aplicación del trazador en D1-v (Folgueira et al., 2004b, Capítulo 4).

Tras aplicar la técnica inmunohistoquímica dirigida contra la calretinina observamos células inmunoreactivas dispersas en lo que podría ser un área equivalente al núcleo comisural (Vc) de Northcutt y Braford (1980). Aunque la aplicación del trazador neuronal DiI en D1-d resultó también en el marcaje retrógrado de células en os

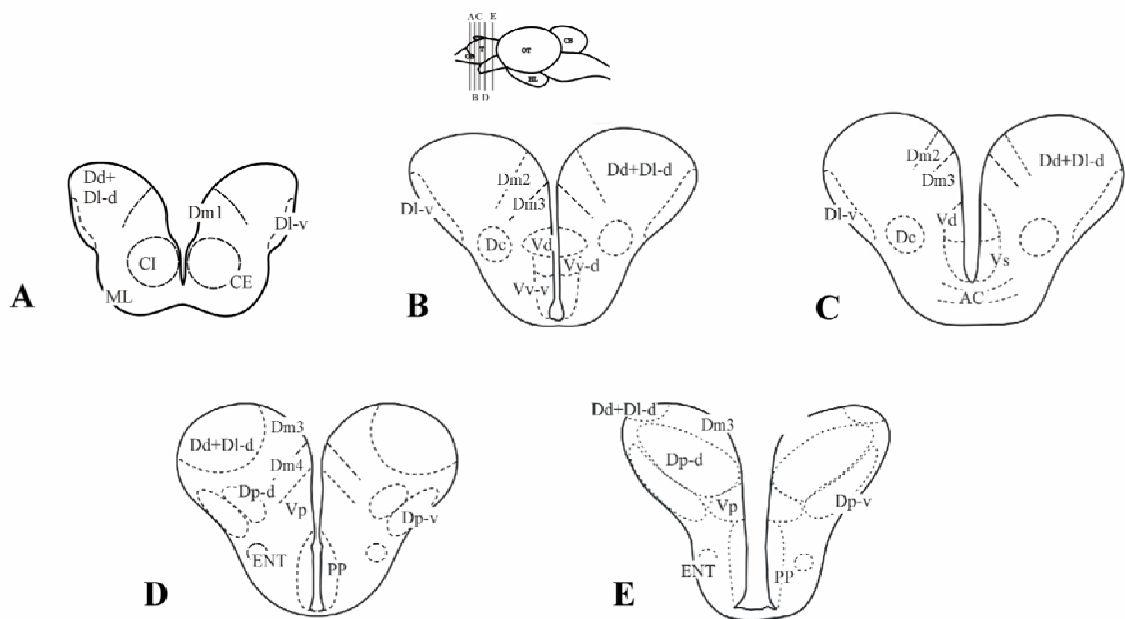


Fig.5. Áreas telencefálicas identificadas tras nuestro estudio neuroquímico del telencéfalo de la trucha arco iris, apoyado por datos hodológicos. Los niveles de las secciones aparecen representadas en el dibujo esquemático del encéfalo que aparece en la parte superior de la figura. AC, comisura anterior; CB, cerebelo; CE, capa celular externa del bulbo olfativo; CI, capa celular interna; Dc, área central del telencéfalo dorsal; Dd+Dl-d, área dorsal más parte dorsal del área lateral del telencéfalo dorsal; Dl-v, parte ventral del área ventral del telencéfalo dorsal; Dm, área medial del telencéfalo dorsal (1-4: subáreas); Dp-d, región dorsal del área posterior del telencéfalo dorsal; Dp-v, región ventral del área posterior del telencéfalo dorsal; ENT, núcleo entopeduncular; HL, lóbulo inferior hipotalámico; ML, capa molecular; OB, bulbo olfativo; OT, techo óptico; PP, área preóptica; T, telencéfalo; Vd, área dorsal del telencéfalo ventral; Vp, área posterior del telencéfalo ventral; Vs, área supracomisural del telencéfalo ventral; Vv-d, región dorsal del área ventral del telencéfalo ventral; Vv-v, región ventral del área ventral del telencéfalo ventral.

este área (no mostrada en la figura 5), no hemos logrado mejorar la caracterización previa de esta zona basándonos en el resto de datos hodológicos de los que disponíamos. En cualquier caso, dado que este área no sólo aparece en niveles comisurales, consideramos más apropiado denominarla como área central en lugar de núcleo comisural.

El área posterior del telencéfalo ventral (Vp) es un área que aparece caudalmente en el encéfalo, dorsalmente al núcleo preóptico. En *O. mykiss*, Vp es una zona que presenta pocas células y parece poco diferenciada, como había sido descrito en *Salmo* (Northcutt y Braford, 1980). Sin embargo, hemos observado células retrógradamente marcadas en Vp tras aplicar el trazador neuronal en el tubérculo posterior y en los núcleos tuberal anterior y lateral, por lo que el área Vp se confirma como núcleo independiente sobre la base de su hodología.

El resto de áreas identificadas en el telencéfalo ventral de la trucha arco iris coincide esencialmente con las descritas por Northcutt y Braford (1980) en *Salmo* (ver Fig.9 en la "Introducción general"), aunque la localización y sus límites pueden variar ligeramente.

Según la nomenclatura de Northcutt y Braford (1980), el telencéfalo dorsal (D) o palio de *Salmo* se divide en las siguientes zonas: zona medial (Dm) que a su vez se subdivide en 4 partes (Dm1-4); zona dorsal y parte dorsal de la zona lateral (Dd+Dl-d); zona lateral dorsal (Dl-d) y posterior (Dl-p), zona central (Dc) y zona posterior (Dp).

Consultando la bibliografía disponible, observábamos que las subdivisiones de Dm descritas en el telencéfalo de salmónidos varían según los autores que se consultaban. Por ejemplo, Nieuwenhuys en 1963, e incluso en trabajos posteriores (Meek y Nieuwenhuys, 1998), trata a Dm sin especificar la existencia o no de subdivisiones, mientras Northcutt y Braford (1980) reconocen 4 subdivisiones en Dm (Dm1, Dm2, Dm3 y Dm4). En nuestro trabajo, han sido claves los datos neuroquímicos de la distribución de la inmunoreactividad frente a calretinina para poder distinguir más claramente las subdivisiones de Dm. Estos datos mostraron que se diferencian al menos 4 subdivisiones, como había sido también descrito recientemente en la trucha común (Castro et al., 2003) y que hemos nombrado manteniendo la nomenclatura de Northcutt y Braford (1980). Cabe reseñar que en niveles caudales de Dm3 hemos observado células inmunoreactivas a la calretinina mientras que no habían sido observadas células inmunoreactivas en ninguna de las otras regiones más rostrales de Dm. Esto podría hacer pensar que esta región podría ser una nueva subdivisión de Dm, sin embargo los datos hodológicos de que disponemos no permiten confirmar la identidad de esta región como una entidad separada de Dm3.

Diferenciar dichas subdivisiones de Dm utilizando únicamente los datos hodológicos de los que disponíamos era complicado. En gran parte esta dificultad era debida al solapamiento de ciertas modalidades sensoriales que

parecen llegar a más de una región de Dm, así como a que en algún caso varias regiones de Dm proyectan a una misma región encefálica. Debido a estas limitaciones a la hora de definir las subdivisiones de Dm, en un principio optamos por evitar la nomenclatura de Northcutt y Braford (1980) que numera las regiones de rostral a caudal en Dm1-4 y nombramos a las regiones según su situación topográfica con respecto a la comisura anterior: Dm anterior, precomisural y postcomisural (Folgueira et al., 2003a; Capítulo 2). Como ya se ha indicado, en estudios posteriores tratamos ya de adoptar la nomenclatura Dm1-4 a la descripción de los resultados hodológicos (Folgueira et al., 2004a, b; Capítulos 3, 4).

Los datos inmunohistoquímicos y enzimo-histoquímicos, no muestran grandes diferencias entre Dd+Dl-d y Dl-v, siendo más útiles los datos hodológicos para diferenciar dichas áreas. Uno de los resultados que mejor diferencian Dd+Dl-d y Dl-v se obtuvo tras la aplicación del trazador neuronal en el complejo preglomeruloso (Folgueira et al., 2004b, 2005; Capítulos 4, 6), observando fibras anterógradamente marcadas alcanzando Dd+Dl-d y definiendo sus límites, sin observar fibras que terminasen en Dl-v. También los resultados inmunohistoquímicos para la calretinina diferencian Dl-v, con abundancia de elementos inmunoreactivos, frente a Dd+Dl-d, que apenas presenta inmunoreactividad. Northcutt y Braford (1980) diferencian una subdivisión posterior de Dl (Dl-p) en el palio de la trucha arco iris que también fue descrita por Castro y colaboradores (2003) en la trucha común. Si bien en nuestro material observamos unas células tenuemente inmunoreactivas para la calretinina en la región que correspondería con Dl-p, no hemos podido

caracterizar este área hodológicamente. Por tanto, y en espera de una mejor caracterización de este área, consideramos que Dl-p no tenía suficiente identidad como para ser tenida en cuenta como un área telencefálica independiente en nuestra representación de las áreas telencefálicas (Fig.5). Por otra parte, Castro y colaboradores (2003) describen en *Salmo trutta fario* una región en niveles rostrales de Dd+Dl-d con células inmunoreactivas para la calretinina y que denominan Dd-a. Tras realizar nuestro estudio hemos observado algunas células muy débilmente inmunoreactivas en una región que parece ser la equivalente en *O. mykiss*. Se han observado también células retrógradamente marcadas en dicha área tras aplicar el trazador neuronal en el lóbulo hipotalámico posterior (Folgueira et al., 2004b; Capítulo 4). Sin embargo y debido a la pobre caracterización de Dd-a que hemos logrado, no ha sido incluida en la representación de las áreas telencefálicas identificadas en el telencéfalo de la trucha arco iris (Fig.5).

En la parte caudal del telencéfalo se sitúa el área posterior del telencefalo dorsal Dp. Nuestros resultados inmunohistoquímicos de distribución de la calretinina y de conexiones, demuestran que es posible diferenciar Dp en dos subáreas o núcleos, ventral (Dp-v) y dorsal (Dp-d). Hemos observado que Dp-v presenta células inmunoreactivas a la calretinina y una mayor actividad acetilcolinesterasa e importantes proyecciones eferentes a regiones tuberales, al complejo preglomeruloso medial, al toro lateral y al núcleo subglomeruloso (Folgueira et al., 2002, 2004a,b). Por su parte, Dp-d presenta fundamentalmente conexiones recíprocas con el bulbo olfatorio (Folgueira et al., 2002, 2004a,b; Capítulos 3, 4, 5).

LOS SISTEMAS SENSORIALES Y SU RELACIÓN CON EL TELENCEFALO

SISTEMA OLFATIVO

Como ya hemos comentado anteriormente (ver "Introducción general"), en los primeros trabajos sobre el telencéfalo de peces teleósteos se consideraba que éste era un centro encargado exclusivamente de la integración de información olfativa y que posteriormente a lo largo de la evolución fue ampliando sus funciones hacia otras categorías sensoriales. De esta forma daría lugar al telencéfalo de otros vertebrados, en los que es un centro superior de integración sensorimotora responsable de conductas y comportamientos complejos. Sin embargo, estudios posteriores (Nieuwenhuys, 1963) demostraron que tal hipótesis carece de validez, ya que son áreas restringidas del telencéfalo de teleósteos las responsables de la integración de la información olfativa procedente de los bulbos olfatorios.

Comparación del sistema olfativo de peces

Los resultados obtenidos en la trucha para la distribución en el telencéfalo de las proyecciones

olfativas primarias y secundarias aparecen representados en las figuras 6A y 6B.

Las proyecciones primarias extrabulbares en la trucha alcanzan Dl-v y Vv en el telencéfalo y regiones hipotalámicas caudales, como ya había sido observado en estudios anteriores en salmónidos (Bazer et al., 1987; Riddle y Oakley, 1992; Becerra et al., 1994; Anadón et al. 1995) y en otros teleósteos (Honkanen y Ekström, 1990; Szabo et al., 1991). Además hemos observado células retrógradamente marcadas en el área ventral del telencéfalo ventral (Vv), aunque probablemente se trate de elementos pertenecientes al sistema del nervio terminal más que células eferentes al epitelio olfativo (ver Folgueira et al., 2004a). En un experimento se observaron fibras olfatorias primarias en Dp tras el marcaje de la mucosa olfativa, pero dichas fibras podrían tratarse de colaterales de las células subpaliales, por lo que la existencia de una proyección olfativa primaria a Dp no ha podido ser confirmada con toda seguridad.

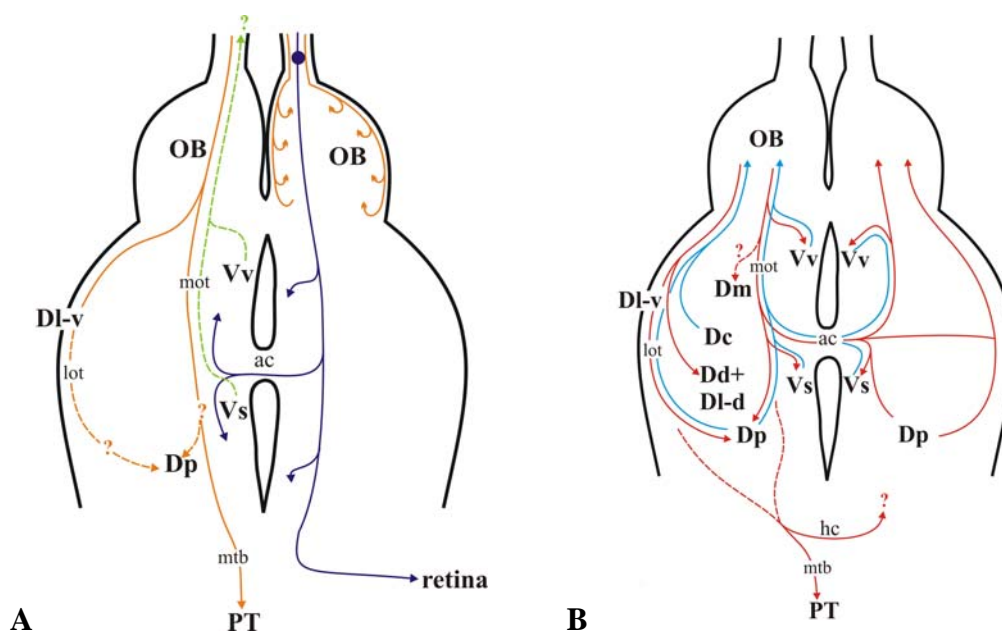


Fig.6. Representación esquemática de las conexiones olfativas primarias (A) y secundarias (B) en la trucha arco iris. En A las líneas de color naranja representan las eferencias de las células receptoras del epitelio olfativo, las líneas verdes las posibles aferencias al epitelio y las líneas violeta las eferencias del ganglio del nervio terminal. En B las eferencias del bulbo olfativo aparecen como líneas rojas mientras que las líneas azules representan las aferencias. Abreviaturas: *ac*: comisura anterior; *Dc*: área central del telencéfalo dorsal; *Dd+Dl-d*: área dorsal del telencéfalo dorsal más la parte dorsal del área lateral del telencéfalo dorsal; *Dl-v*: área ventral de la parte ventral del telencéfalo dorsal; *Dm*: área medial del telencéfalo dorsal; *Dp*: área posterior del telencéfalo dorsal; *hc*: comisura habenular; *lot*: tracto olfatorio lateral; *mot*: tracto olfatorio medial; *mtb*: tracto medial telencefálico; *PT*: tubérculo posterior; *Vs*: área supracomisural del telencéfalo ventral; *Vv*: área ventral del telencéfalo ventral.

La información olfativa secundaria es transmitida a los lóbulos telencefálicos a través de dos vías separadas anatómicamente, el tracto olfatorio medial y el tracto olfatorio lateral (von Bartheld et al., 1984; Levine y Dethier, 1985; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997). Parece que el primero estaría principalmente relacionado con comportamientos sociales (Resink et al., 1989; Stacey y Kyle, 1983; Laberge y Hara, 2001) mientras que el segundo parece estar implicado en comportamientos alimenticios (Döving y Selset, 1980; Stacey y Kyle, 1983; Laberge y Hara, 2001). Los campos terminales olfativos secundarios en el telencéfalo de la trucha se localizan ipsilateralmente en Dd+DI-d y bilateralmente en Vv, Vs, DI-v y Dp (Folgueira et al., 2004a; Capítulo 3), que en líneas generales coinciden con los observados en otras especies de peces (Braford, 1975; Northcutt y Braford, 1980; Bass, 1981a; von Bartheld et al. 1984; Levine y Dethier, 1985; Northcutt y Puzdrowski, 1988; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997; Huesa et al., 2000; ver discusión en Folgueira et al., 2004a; Capítulo 3). Hemos observado fibras anterógradamente marcadas en el área medial del telencéfalo dorsal ipsilateral, pero no hemos podido confirmar de forma inequívoca si estas fibras tienen su origen en células bulbares o si por el contrario son colaterales de células subpaliales (ver Folgueira et al., 2004a; Capítulo 3). Es destacable el campo terminal en Dp, siendo la principal área de proyección olfativa tanto en la trucha arco iris (Folgueira et al., 2004a) como en otros peces teleosteos (Bass, 1981a,b; von Bartheld et al., 1984; Levine y Dethier, 1985; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997; Meek y Nieuwenhuys, 1998) y condrosteos (Huesa et al., 2000). Dicha área presenta una elevada densidad de fibras que en muchos casos incluso enmascara las células eferentes bulbares presentes también en esta zona. Al nivel del diencéfalo, se observan fibras olfativas secundarias que se dirigen hacia las habénulas viajando en el tracto olfatorio para posteriormente cruzar al lado contralateral (Levine y Dethier, 1985; Sas et al., 1993). Un sistema comisural muy similar a éste observado en la trucha ha sido descrito en todas las especies de peces estudiadas (von Bartheld, 1984; Levine y Dethier, 1985; Northcutt y Puzdrowski, 1988; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997; Huesa et al., 2000). En la trucha arco iris hemos observado además una proyección directa desde el bulbo olfatorio al diencéfalo caudal similar a la observada en lampreas (Northcutt y Puzdrowski, 1988), elasmobranquios (observaciones no publicadas), condrosteos (Huesa et al., 2000) y teleosteos (von Bartheld et al., 1984; Levine y Dethier, 1985; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997).

Se han observado además células eferentes al bulbo olfativo en varias áreas telencefálicas (Vv, Vs, Dm, Dc y Dp) siendo estos resultados similares a los observados en otras especies de teleosteos (Oka, 1980; Bass, 1981b; Murakami et al., 1983; Prasada-Rao y Finger, 1984; Levine y Dethier, 1985; von Bartheld y Meyer, 1986; Sas et al., 1993). Es destacable el hecho de que las células eferentes al bulbo olfativo observadas en Vv no se

distribuyen por toda el área sino que se localizan exclusivamente en la zona dorsal de este área telencefálica, Vv-d, definiéndola desde un punto de vista hodológico como se ha comentado anteriormente.

En conjunto estos datos confirman que efectivamente la información olfativa no se distribuye por todas las áreas telencefálicas, sino que se alcanzan áreas discretas. Hemos podido delimitar las áreas telencefálicas implicadas en el procesamiento de información olfativa de primer y segundo orden en la trucha arco iris, permitiendo una mejor caracterización de esta región del encéfalo. En general se observa que el patrón de conexiones olfativas se mantiene conservado entre las distintas especies de teleosteos estudiados (Finger, 1975; Bass, 1981a,b; Davis et al., 1981; Ebbesson et al., 1981; Murakami et al., 1983; Northcutt y Davis, 1983; Prasada Rao y Finger, 1984; von Bartheld et al., 1984; Levine y Dethier, 1985; Rooney et al., 1992; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997), e incluso en condrosteos (Huesa et al., 2000) y en agnatos (Northcutt y Puzdrowski, 1988; Polenova y Vesselkin, 1993).

Consideraciones filogenéticas del sistema olfativo

El sistema olfativo parece ser el sistema sensorial que aparece más temprano a lo largo de la evolución. Es además un sistema peculiar en el sentido de que las fibras olfativas alcanzan directamente el telencéfalo y no utilizan centros de relevo, en contra de lo que ocurre con el resto de los sistemas sensoriales

Ciertos aspectos de la distribución general del sistema olfativo dentro del telencéfalo, como es el carácter bilateral de las proyecciones, la existencia de un tracto olfatorio lateral y otro medial, el sistema comisural habenuar y la existencia de campos terminales paliales y subpaliales, parece bien conservado a lo largo de la filogenia en los distintos grupos de anamniotas y en reptiles (peces: von Bartheld, 1984; Levine y Dethier, 1985; Northcutt y Puzdrowski, 1988; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997; Huesa et al., 2000; anfibios: Northcutt y Royce, 1975; Kemali y Guglielmotti, 1987; Scalia et al., 1991; reptiles: Gamble, 1952, 1956; Lohman y Smeets, 1993). En mamíferos parece que, como carácter apomórfico del grupo, las fibras olfativas se distribuyen únicamente de forma ipsilateral dentro del telencéfalo (Scalia y Winans, 1975; Broadwell, 1975; De Carlos et al., 1989).

Por otra parte, parece que las proyecciones olfativas tienden a quedarse restringidas en el telencéfalo a lo largo de la evolución, ya que si bien fibras olfativas primarias y secundarias alcanzan regiones del tubérculo posterior e hipotálamo en peces (agnatos: Northcutt y Puzdrowski, 1988; elasmobranquios: observaciones no publicadas; condrosteos: Huesa et al., 2000; teleosteos: von Bartheld et al., 1984; Levine y Dethier, 1985; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997), esta proyección no se observa en tetrápodos (anfibios: Kemali y Guglielmotti, 1987; Scalia et al., 1991; Moreno et al., 2003, 2004; reptiles: Lohman y Smeets, 1993; Reiner y Karten, 1985; aves: Reiner y Karten, 1985; mamíferos: Scalia y Winans, 1975; Skeen, 1976; Krettek y Price, 1978; De Carlos et al., 1989).

En reptiles y anfibios que presentan un bulbo olfativo principal y un bulbo olfativo accesorio, al que proyecta el órgano vomeronasal, se observa que existe una segregación de las proyecciones de ambos sistemas (Northcutt y Royce, 1975; Kemali y Guglielmotti, 1987; Scalia et al., 1991). Dentro del grupo de los peces teleósteos se han propuesto varias hipótesis acerca de cuál podría ser, dentro de su bulbo olfativo, la región homóloga al bulbo olfativo accesorio de tetrápodos (Finger, 1975; Bass et al., 1981b; Matz, 1995; Morita y Finger, 1998; Díaz et al., 2001). En este sentido, aunque la aplicación del trazador neuronal de forma diferencial en regiones laterales y dorsales del bulbo olfatorio de la trucha arco iris no muestra diferencias hodológicas, quizá serían necesarias aplicaciones más discretas de trazador y en un mayor número de regiones diferentes del bulbo para disponer de más datos acerca de la existencia o no de un bulbo olfativo accesorio en teleósteos.

En algunas especies de teleósteos (*Carassius auratus*, Levine y Dethier, 1985; *Pseudopleuronectes americanus*, Prasada Rao y Finger, 1984) y en mamíferos (insectívoros: Kunzle y Radtke-Schuller, 2000; roedores: De Olmos et al., 1978; Shipley y Adamek, 1984; Broadwell y Jacobowitz, 1976; ovejas: Levy et al., 1999) se han descrito células en áreas extratelencefálicas que proyectan al bulbo olfativo. Sin embargo, en la trucha arco iris, así como en otros peces teleósteos (Oka, 1980; Bass, 1981b; Murakami et al., 1983; von Bartheld y Meyer, 1986; Sas et al., 1993), condrósteos (Huesa et al., 2000), agnatos (Northcutt y Puzdrowski, 1988) y anuros (Kemali y Guglielmotti, 1987) no se han observado células bulbópetas extratelencefálicas, lo que llevó a creer que tal proyección había aparecido de forma secundaria en ciertos grupos (Huesa et al. 2000). Sin embargo, experimentos llevados a cabo recientemente en elasmobranchios (resultados no publicados) mostraron células aferentes bulbares en regiones caudales diencefálicas. Esto implica que quizá sea necesario la

reinterpretación evolutiva de la aparición de células bulbópetas extratelencefálicas a la luz de estos resultados, así como el análisis detallado en los distintos grupos de vertebrados ya que tal vez la condición plesiomórfica en vertebrados haya sido la que se observa en elasmobranchios, algunos teleósteos y mamíferos en lugar de la observada en agnatos y otras especies de teleósteos, en los que la pérdida de la proyección aferente bulbar representaría la condición derivada.

SISTEMA GUSTATIVO

Las conexiones del sistema gustativo han sido ampliamente estudiadas en grupos de peces que presentan importantes especializaciones del sistema, como son los ciprínidos (Morita et al., 1980, 1983; Marui, 1981; Finger y Kanwal, 1992; Rink y Wullimann, 1998) e ictalúridos (Fig.7A,B) (Finger, 1976, 1978, 1983; Finger y Morita, 1985; Kanwal et al., 1988; Finger y Kanwal, 1992; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y Caprio, 1993; Lamb y Finger, 1996). Sin embargo, existían muy pocos datos sobre las conexiones del sistema gustativo en especies que no presentan especializaciones del sistema, como cíclidos (Fig.7C) (Yoshimoto et al., 1998; Ahrens y Wullimann, 2002) y salmónidos (Pérez et al., 2000).

Pérez y colaboradores (2000) describieron experimentalmente proyecciones gustativas en la trucha hasta niveles diencefálicos, pero se desconocía la existencia de centros de integración gustativa superiores. En el presente estudio se describe de forma muy precisa la vía de integración gustativa hasta niveles telencefálicos en la trucha arco iris (Folgueira et al., 2003a; Capítulo 2), que aparece esquemáticamente representada en la figura 8A.

La comparación de estos resultados con los obtenidos en otras especies (Figs.8B-D) (ciprínidos: Morita et al., 1980, 1983; Kanwal y Finger, 1992; Rink y Wullimann, 1998; ictalúridos: Finger, 1978, 1983; Finger y Morita, 1985; Morita y Finger, 1985a,b; Kanwal et al., 1988; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y Caprio, 1993;

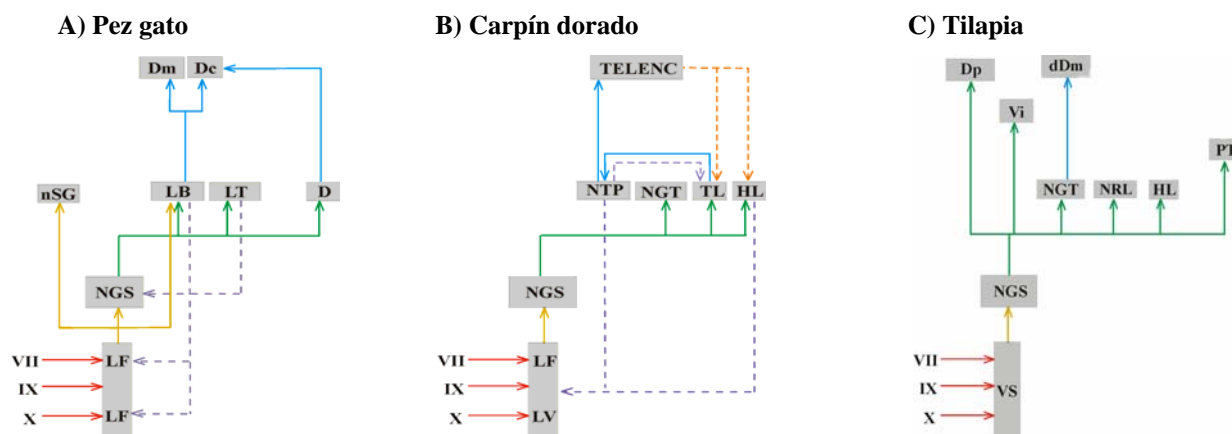


Fig.7. Representación esquemática de las conexiones del sistema gustativo basadas en los estudios en el pez gato (A) (Lamb y Caprio, 1993; Wullimann, 1998), el carpín dorado (B) (Rink y Wullimann, 1998) y en tilapia (C) (Yoshimoto et al., 1998). Comparar con la figura 1 en el *Resumen general de los resultados*, que representa las conexiones del sistema gustativo de la trucha arco iris siguiendo un código similar al que se muestra en la presente figura. Abreviaturas: D: núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico; Dc: área dorsal del telencefalo dorsal; dDm: parte dorsal de Dm; Dm: área medial del telencefalo dorsal; Dp: área posterior del telencefalo dorsal; HL: lóbulo inferior hipotalámico; LB: núcleo lobulbar; LF: lóbulo facial; LT: núcleo talámico lateral; LV: lóbulo vago; NGS: núcleo gustatorio secundario; NGT: núcleo gustatorio terciario; nSG: núcleo subglomeruloso de Lamb y Caprio (1993); NTP: núcleo tuberal posterior; PT: núcleo posterior talámico; TELENC: telencefalo; TL: toro lateral; Vi: área intermedia del telencefalo ventral; VS: columna viscerosensorial; VII: nervio facial; IX: nervio glossofaríngeo; X: nervio vago.

ciclidos: Yoshimoto et al., 1998; Ahrens y Wullimann, 2002) muestra que existe un patrón de conexiones gustativas ascendentes común a todos los teleósteos y que, por tanto, representaría el patrón ancestral: los núcleos gustativos primarios proyectan, a través del tracto gustativo secundario, a un núcleo gustatorio secundario localizado en el istmo, el cual proyecta a centros diencefálicos (en la acepción clásica, modelo His-Herrick, del término diencefalo), existiendo a su vez conexiones desde núcleos gustativos diencefálicos al telencéfalo. Este patrón se puede considerar bastante bien conservado en tetrápodos, al menos en lo que se refiere a los centros rombencefálicos, pues aparece en anfibios urodelos y anuros (Barnard, 1936; Herrick, 1944, 1948; Rubinson y Friedman, 1977; Matesz y Székely, 1978; ten Donkelaar, 1998a,b), reptiles (ten Donkelaar y de Boer-van Guisen 1981; ten Donkelaar, 1998c) e incluso en mamíferos (Voogd et al., 1998). Así el núcleo del tracto solitario de amniotas parece ser el centro homólogo al centro primario en teleósteos (Norgren y Leonard, 1973; Norgren, 1976; Morita et al., 1980, 1983; Finger, 1986, 1987), mientras que el núcleo parabraquial de amniotas parece ser el homólogo al núcleo gustatorio secundario (Norgren y Leonard, 1973; Norgren, 1976; Morita et al.,

1980, 1983; Finger, 1986, 1987). El establecimiento de homologías en niveles diencefálicos y telencefálicos es una tarea más complicada, si bien también se describen en anfibios y amniotas conexiones desde los centros gustativos rombencefálicos con regiones diencefálicas y telencefálicas (anfibios: Marín et al., 1997a,c; Allison y Wilzynski, 1991; Neary, 1995; Moreno y González, 2004; reptiles: ten Donkelaar y de Boer-van Guisen 1981; ten Donkelaar, 1998c; mamíferos: Norgren y Leonard, 1973; Beckstead et al., 1980; Yamamoto et al., 1980a,b; Hamilton et al., 1985).

Dado que la trucha arco iris posee un sistema gustativo generalista en comparación con otros teleósteos, el análisis de los resultados obtenidos en esta especie frente a los disponibles en especies de teleósteos con sistemas gustativos más complejos nos permiten extraer una serie de características que no están presentes en la trucha y probablemente aparecen con la especialización del sistema pudiéndose considerar caracteres apomórficos en teleósteos, como se detalla a continuación.

Comparación del sistema gustativo de varios teleósteos

Dentro del grupo de los teleósteos, prácticamente no existen dificultades a la hora de establecer homologías

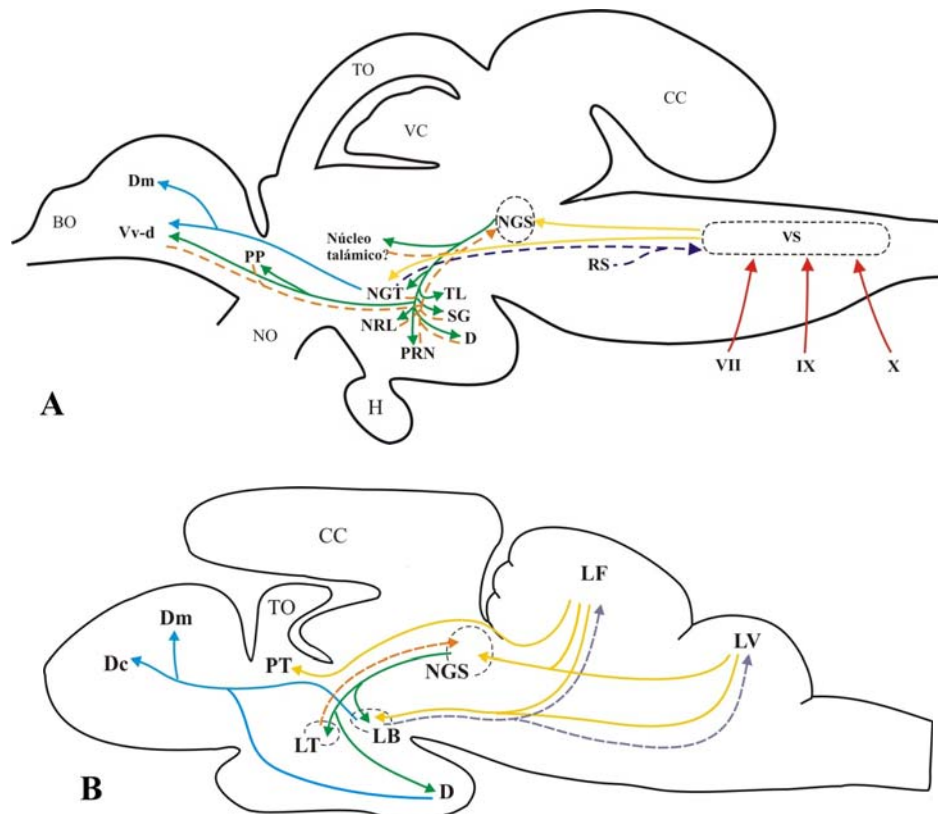


Fig. 8. Representación esquemática de una sección medio-sagital del encéfalo resumiendo las conexiones del sistema gustativo en la trucha arco iris (A), el pez gato (B) (Lamb y Caprio, 1993; Wullimann, 1998), el carpín dorado (C, página siguiente) (Rink y Wullimann, 1998) y la tilapia (D, página siguiente) (*Oreochromis*, Yoshimoto et al., 1998). En D, el asterisco indica que la proyección al toro lateral desde el núcleo gustatorio secundario ha sido descrita en el ciclido *Hemichromis* (Ahrens y Wullimann, 2002) pero no en la tilapia. Abreviaturas: BO: bulbo olfatorio; CC: cuerpo del cerebelo; D: núcleo difuso del lóbulo inferior hipotalámico; Dc: área central del telencéfalo dorsal; Dm: área medial del telencéfalo dorsal; H: hipófisis; HL: lóbulo inferior hipotalámico; LB: núcleo lobobulbar; LC: lóbulo caudal del cerebelo; LF: lóbulo facial; LT: núcleo lateral talámico; LV: lóbulo vago; NGT: núcleo gustatorio terciario; NO: nervio óptico; NRL: núcleo del receso lateral; NTP: núcleo talámico posterior; PP: núcleo preóptico parvicelular; PT: núcleo posterior talámico; RS: núcleo reticular superior; SG: núcleo subglomeruloso; T: lóbulos telencefálicos; TL: toro lateral; TO: techo óptico; VC: válvula cerebelosa; VS: columna viscerosensorial; Vv-d: región dorsal del área ventral del telencéfalo ventral; VII: nervio facial; VIII: nervio glossofaríngeo; X: nervio vago. Figura B modificada de Wullimann (1998), C modificada de Rink y Wullimann (1998), D modificada de Ahrens y Wullimann (2002).

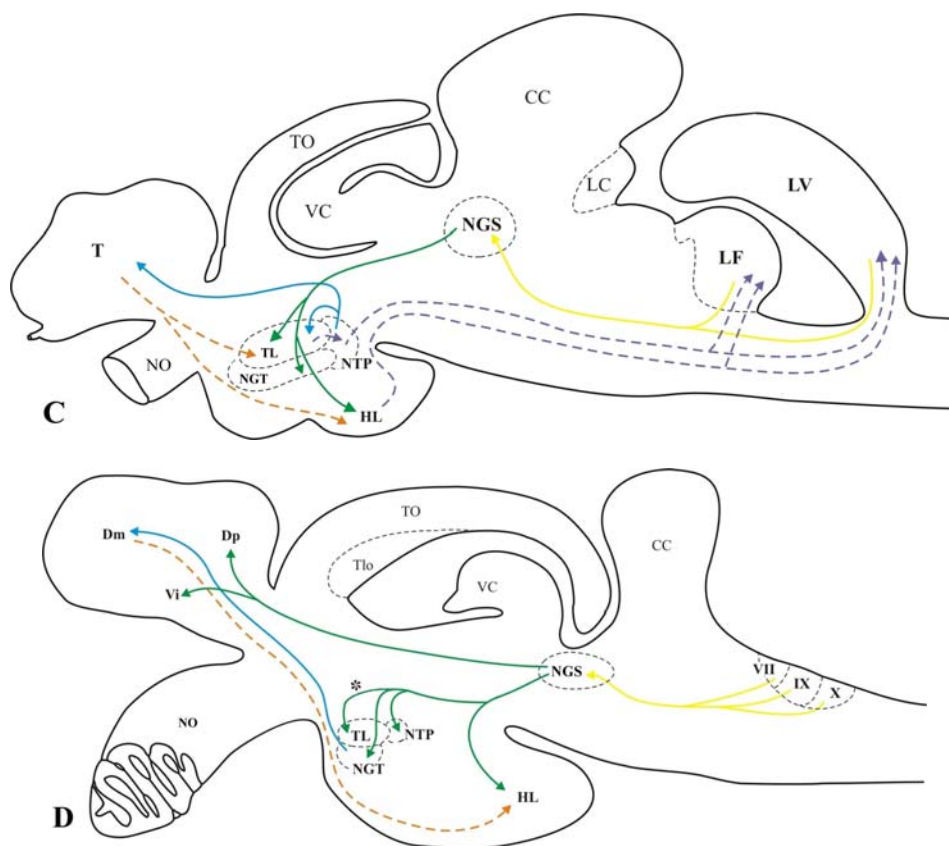


Figura 8 (Continuación)

entre los centros de integración gustativa en niveles rombencefálicos e ístmicos. Sin embargo la cuestión se complica cuando centramos nuestra atención en niveles diencefálicos, donde aparece un mayor número de centros implicados en el procesamiento de información gustativa.

Quizá cabría esperar que la trucha, que no depende en gran medida del sistema gustativo para cubrir sus necesidades fisiológicas relacionadas con la búsqueda de alimento, presentase una mayor simplicidad del sistema reduciendo el número de núcleos gustativos diencefálicos. No obstante, si comparamos los resultados en la trucha con los descritos en ciprínidos e ictalúridos (Figs. 1, 7, 8), en los que la información gustativa es de capital importancia en sus actividades, observamos que el número de núcleos que integran información gustativa no es mayor en estos grupos que en la trucha. Es más, parece incluso que el número de núcleos es menor que en la trucha, por lo que tal vez la especialización del sistema consista más en un refinamiento del sistema, de forma que se restrinjan los núcleos implicados en el procesamiento gustativo, con un consecuente mayor desarrollo de los centros. Así mismo parece que otra consecuencia de la especialización del sistema ha sido la aparición de somatotopía y la segregación de la información según su origen o naturaleza gustativa o visceral general.

Homologías entre centros gustativos diencefálicos de peces teleosteos

En la trucha hay una proyección procedente del núcleo gustativo secundario que alcanza el núcleo difuso

del lóbulo inferior hipotalámico (Folgueira et al., 2003a; Capítulo 2), al igual que en el resto de las especies estudiadas hasta el momento (Fig. 8) (Finger, 1983; Morita et al., 1983; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y Caprio, 1993; Rink y Wullimann, 1998; Yoshimoto et al., 1998; Ahrens y Wullimann, 2002).

El núcleo lobobulbar del pez gato es un centro de relevo de la información gustativa ascendente al telencefalo y presenta conexiones recíprocas con los lóbulos facial y vago (Fig. 8B) (Finger, 1978, 1983; Kanwal et al., 1988; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y Caprio, 1993). Se observó un patrón homológico similar para el núcleo gustatorio terciario de la trucha (Fig. 8A) (Folgueira et al., 2003a; Capítulo 2), lo que parece apuntar hacia la posible homología entre estos dos centros. En ciprínidos, el núcleo talámico posterior presenta a su vez una proyección eferente al telencefalo y a los lóbulos facial y vago (Fig. 8C), por lo que podría considerarse también homólogo a los núcleos lobobulbar y gustatorio terciario del pez gato y de la trucha, respectivamente. Sin embargo, el hecho de que el núcleo talámico posterior de ciprínidos no parece recibir conexiones aferentes directas desde el núcleo gustatorio secundario es un fuerte argumento para poner en duda dicha homología. Por otra parte, el núcleo talámico lateral de ictalúridos y el núcleo del receso lateral de trucha podrían ser a su vez homólogos, en vista de su conexión recíproca con el núcleo gustatorio secundario observada en ambos grupos (Figs. 8A,B) (Finger, 1978, 1983; Kanwal et al., 1988; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y

Caprio, 1993; Rink y Wullimann, 1998; Folgueira et al., 2003a).

Somatotopía

En algunas especies de teleósteos se ha descrito la existencia de una representación somatotópica de las aferencias gustativas a (1) los centros primarios correspondientes al facial y vago (Beidenbach, 1973; Finger, 1976, 1978), (2) de estos centros primarios al núcleo gustatorio secundario (Finger, 1983; Morita et al., 1983; Rink y Wullimann, 1998, Yoshimoto et al., 1998) e incluso parece existir somatotopía en las aferencias a (3) los centros gustativos diencefálicos (Rink y Wullimann, 1998; Ahrens y Wullimann, 2002). No hemos realizado estudios encaminados a estudiar la existencia de somatotopía dentro de los centros gustativos primarios de la trucha. En lo que se refiere al núcleo gustativo secundario, los experimentos realizados en la trucha para analizar este punto no nos han permitido encontrar una clara segregación somatotópica en las proyecciones desde la columna viscerosensorial, lo que podría ser el reflejo de la existencia de una correlación directa entre el grado de especialización del sistema gustativo y el grado de segregación topográfica de la información sensorial según su procedencia y/o naturaleza. Sin embargo se ha descrito la existencia de somatotopía en cíclidos, que no presentan un sistema gustativo especializado (Ahrens y Wullimann, 2002), por lo que no podemos descartar que la ausencia de somatotopía en los centros gustativos secundarios de la trucha pueda ser en parte debida a limitaciones metodológicas en nuestro estudio.

Segregación de la información según su naturaleza: núcleo visceral secundario

Tras la aplicación del trazador neuronal en el toro lateral/ núcleo gustatorio terciario y en el lóbulo inferior hipotalámico lateral, observamos la existencia de lo que parecía ser una continuación rostral no descrita anteriormente del núcleo gustatorio secundario (NGS), localizada entre el núcleo lateral de la válvula y el núcleo del istmo (Folgueira et al., 2002, 2003a; Capítulos 3 y 5).

Tras comprobar mediante aplicaciones del trazador dentro de la columna viscerosensorial que efectivamente este centro pertenecía al complejo ístmico gustativo-visceral, tratamos de dilucidar si era posible la separación de este complejo en una región implicada en el procesamiento exclusivamente de información visceral, como había sido descrito en otras especies (Finger y Kanwal, 1992), y en otra región exclusivamente gustativa. Tanto en *Ictalurus punctatus* como en *Carassius auratus* el nervio vago lleva información visceral a un núcleo visceral general primario, el cual está situado caudalmente al lóbulo vago y media en funciones cardiorrespiratorias y digestivas (Finger y Kanwal, 1992). A su vez, el núcleo visceral general primario proyecta a un núcleo visceral secundario (NVS) localizado a nivel ístmico, rostralmente al núcleo gustatorio secundario y próximo al núcleo lateral de la válvula (NLV).

En el múgil (*Chelon labrosus*), un teleósteo con un sistema gustativo "poco diferenciado" o generalista similar al caso de la trucha, Díaz-Regueira y Anadón

(1992) observaron que la rama caudal del nervio vago, que presumiblemente es visceral, proyecta a las porciones más caudales de la columna viscerosensorial, pero no se puede diferenciar claramente un núcleo visceral general primario. No hay datos a este respecto en la trucha, pero pensamos que tal vez cabría esperar el mismo patrón que el observado en el múgil, dado que ambas especies presentan una columna viscerosensorial poco diferenciada. Sin embargo, la aplicación del trazador en varios niveles rostrocaudales dentro de la columna viscerosensorial de la trucha que presumiblemente afectaran a la zona visceral no mostraron diferencias en el patrón hodológico que implicasen la existencia de una segregación de la información visceral respecto a la gustativa a nivel ístmico.

Finger y Kanwal (1992) encontraron que en *Ictalurus* y en *Carassius*, el núcleo visceral secundario es inmunoreactivo para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), mientras que no presentan tal inmunoreactividad el núcleo gustatorio secundario ni el núcleo lateral de la válvula, que se localizan próximos a él. Pérez et al. (2000) encuentran células CGRP inmunoreactivas distribuidas por todo el núcleo gustatorio secundario en *Salmo trutta*, pero probablemente en este estudio no se tuvo en cuenta la extensión rostral del núcleo ya que aun no había sido descrita. Nuestros resultados aplicando técnicas inmunohistoquímicas dirigidas contra el CGRP en *O. mykiss* para tratar de diferenciar el núcleo visceral secundario, no nos dieron resultados claros. Ahrens y Wullimann (2002) se basan en la naturaleza colinérgica de una porción del núcleo gustatorio secundario para ubicar el núcleo visceral secundario en *Hemichromis lifalili*. En trucha también existe una porción medial colinérgica en el núcleo gustatorio secundario (Pérez et al. 2000), sin embargo no encontramos diferencias en las aferencias de esta región, que por tanto parece ser más bien una especialización química del núcleo pero sin representar exclusivamente la componente visceral.

Por tanto hemos logrado delimitar con claridad el núcleo gustativo-visceral secundario, que presentaría una prolongación rostral no descrita hasta el momento, pero no ha sido posible, al menos con los resultados de que disponemos hasta el momento, la diferenciación regional del núcleo en base al carácter visceral o gustativo de la información aferente que recibe.

Áreas gustativas telencefálicas

Nuestros resultados en trucha han demostrado que las áreas telencefálicas Vv-d y Dm precomisural están implicadas en el procesamiento de información gustativo-visceral procedente de centros gustativos istmo-rombencefálicos y/o diencefálicos. Las proyecciones gustativas al telencéfalo han sido también descritas en ictalúridos, en ciprínidos y en tilapia (Kanwal et al., 1988; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y Caprio, 1993; Rink y Wullimann, 1998; Yoshimoto et al. 1998; ver Folgueira et al., 2003a). Es significativo que tanto en la trucha como en percomorfos (Yoshimoto et al., 1998) la información gustativa secundaria alcanza el telencéfalo,

mientras que no parece ser así en los grupos con un sistema gustativo más especializado como ciprínidos e ictalúridos (Kanwal et al., 1988; Kanwal y Finger, 1992; Lamb y Caprio, 1993; Rink y Wullimann, 1998).

El significado funcional de los centros gustativos telencéfalicos no está claro hasta el momento. Roberts y Savage (1978) demostraron en un estudio de comportamiento que el telencéfalo no tiene efecto regulador en la ingesta de comida o en la tasa de crecimiento, mientras que la estimulación eléctrica en el diencéfalo evoca comportamientos complejos de alimentación en varios teleósteos (Demski et al. 1975; Demski, 1983). Sin embargo, estudios recientes parecen mostrar que el telencéfalo estaría implicado en procesos de aprendizaje y memoria (Salas et al. 1996a,b) que a su vez podrían tener implicaciones en estos comportamientos alimenticios.

CONVERGENCIA DE LOS SISTEMAS OLFATORIO Y GUSTATIVO: EL NÚCLEO SUBGLOMERULOSO

Los marcajes realizados en el área posterior del telencéfalo dorsal (Dp), núcleo subglomeruloso (SG), núcleo gustativo secundario (NGS) y techo óptico (TO) nos han permitido describir una vía de integración sensorial en la que confluyen al menos dos modalidades sensoriales, gustativa y olfativa, pero también de otra u otras modalidades sensoriales a través de la aferencia desde el techo óptico. Esta vía de integración sensorial no había sido descrita hasta el momento en ninguna otra especie.

A pesar de que el núcleo subglomeruloso es un núcleo diencéfálico muy aparente, no se conocían sus conexiones. Nuestros resultados pusieron de manifiesto (Folgueira et al., 2002; Capítulo 5) que el núcleo subglomeruloso presenta una conexión recíproca con Dm y una conexión aferente desde células localizadas ventrolateralmente en Dp, en un área que hemos denominado Dp-v (Folgueira et al., 2002). Estas últimas parecen pertenecer al área que constituye el principal campo terminal de las proyecciones olfatorias. En secciones transversales de encéfalo de trucha con las que se realizó la Técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa observamos que las células de Dp-v presentan una mayor actividad acetilcolinesterasa, además de mostrar una fuerte inmunoreactividad a la calretinina (Castro et al., 2003; resultados propios). Por tanto, parece haber diferencias inmunohistoquímicas, además de hodológicas, entre la porción dorsal y ventral de Dp. Por su parte el área medial del telencéfalo dorsal parece ser una región donde se realiza el procesamiento de información multisensorial y que podría formar parte del sistema límbico en trucha (ver apartados posteriores).

Además el núcleo subglomeruloso recibe aferencias gustativas terciarias procedentes del núcleo gustatorio secundario y presenta una conexión recíproca con el techo óptico. En conjunto, estos resultados sugieren que el núcleo subglomeruloso de trucha podría jugar un papel fundamental en la modulación del procesamiento sensoriomotor en el techo óptico gracias a aferencias de naturaleza al menos gustativa y olfativa. Esta vía podría

ser la base neuroanatómica para explicar por qué la excitación alimenticia de la trucha arco iris es iniciada ante todo tras la apropiada estimulación visual u olfativa, aunque el control visual parece ser el predominante (Valentic y Caprio, 1997). En cualquier caso, el núcleo subglomeruloso de trucha no parece ser homólogo del homónimo en el pez gato (Kanwal et al., 1988; Lamb y Caprio, 1993), ya que presentan una situación anatómica y unas conexiones diferentes.

Los sistemas visual y quimiosensoriales no están íntimamente relacionados únicamente en la trucha, sino que también lo están en cierta medida en los mamíferos. En estos últimos, tanto los comportamientos reproductivos y la fisiología neuroendocrina están reguladas por estímulos visuales y quimiosensoriales (Cooper et al., 1994), tales como condiciones de fotoperiodo, oscuridad, exposición a feromonas o interrupción de las vías olfativas (Karsch et al., 1989; Meredith, 1991; Signoret, 1991; Urbanski, 1992; Cooper et al., 1994). Sin embargo, las bases neuroanatómicas de estas funciones descritas en mamíferos parece ser bien diferente a la descrita en la trucha.

EL COMPLEJO PREGLOMERULOSO Y SU RELACIÓN CON EL TELENCEFALO

Como ya hemos comentado anteriormente, la información quimiosensorial olfativa y gustativa alcanza el telencéfalo de forma segregada, siendo ciertas áreas telencéfalicas las encargadas del procesamiento de información de esta categoría sensorial. Nuestro estudio de las conexiones del complejo preglomeruloso ha demostrado que ocurre lo mismo con la información mecanosensorial y/o auditiva que utiliza este complejo como estación de relevo en su vía ascendente al telencéfalo. En nuestro estudio, dado que no hemos trazado la vía de integración sensorial desde áreas sensoriales primarias auditivas, octavas y de la línea lateral, no podemos determinar con plena certeza si la naturaleza de la información que alcanza el telencéfalo a través del preglomeruloso es auditiva y/o octavolateral.

La comparación entre los resultados obtenidos sobre las conexiones del complejo preglomeruloso en la trucha arco iris (ver Fig. 4 en "Resumen general de resultados") y los disponibles en otras especies de teleósteos (Northcutt y Braford, 1984; Striedter, 1991, 1992; Yoshimoto e Ito, 1993; Ito et al., 1997) muestra un patrón de conexiones similar para los núcleos preglomeruloso anterior y medial, que son las porciones rostrales del complejo. Sin embargo, se observa que existen importantes diferencias entre el patrón de conexiones del cuerpo mamilar, la región caudal del complejo, en salmónidos (Folgueira et al., 2005; Capítulo 6), ciprínidos (Northcutt y Braford, 1984; Yoshimoto e Ito, 1993; Ito et al., 1997) y percomorfos (Sawai et al., 2000), como se puede observar en la figura 9. Estas diferencias sugieren que o bien el cuerpo mamilar de estas especies no son centros homólogos o que presentan historias evolutivas muy diferentes desde un ancestro común.

El complejo preglomeruloso en la trucha y en otras especies de teleósteos recibe información mecanosensorial y/o auditiva al menos a través de una vía

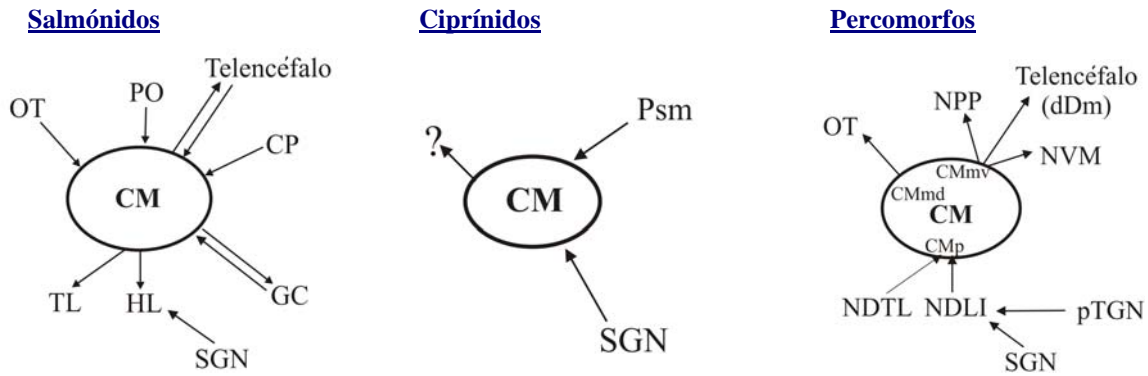


Fig.9. Representación esquemática de las conexiones del cuerpo mamilar descritas en salmónidos (izquierda), ciprínidos (centro) y percomorfos (derecha) (salmónidos: Folgueira et al., 2005; ciprínidos: Ito et al., 1997; Northcutt y Braford, 1984; Yoshimoto e Ito, 1993; percomorfos: Sawai et al., 2000). Abreviaturas: *CM*: cuerpo mamilar; *CMmd*: parte magnocelular dorsal del *CM*; *CMmv*: parte magnocelular ventral del *CM*; *CMp*: parte parvicelular del *CM*; *CP*: núcleo talámico central posterior; *dDm*: región dorsal del área medial del telencéfalo dorsal; *GC*: gris central; *HL*: lóbulo inferior hipotalámico; *NDLI*: núcleo difuso del lóbulo inferior; *NDTL*: núcleo difuso del toro lateral; *NPP*: núcleo posterior periventricular; *NVM*: núcleo ventromedial; *OT*: techo óptico; *PO*: región preóptica; *Psm*: núcleo pretectal superficial magnocelular; *pTGN*: núcleo gustatorio terciario preglomerular; *SGN*: núcleo gustatorio secundario; *TL*: toro lateral.

aférente desde el toro semicircular (Murakami et al., 1986a,b; Striedter, 1991, 1992; Folgueira et al., 2005) y/o desde el núcleo anterior del túber (Murakami et al., 1986b; Folgueira et al., 2005; Capítulo 6). Las aplicaciones de trazador neuronal en el complejo preglomerular de la trucha arco iris han mostrado (1) la existencia de una conexión recíproca entre este complejo y varias áreas telencefálicas (Vv, Vd, Vs y Dm), (2) una proyección eferente a Dd+Dl-d desde las porciones rostrales del complejo, además (3) de una proyección aférente desde Dc. No sólo la trucha muestra una estrecha relación entre el complejo preglomerular y el telencéfalo, especialmente con regiones paliales, sino que esto ha sido descrito también en todas las especies de teleosteos estudiadas hasta el momento (Ito y Kishida, 1978; Ehteler y Saidel, 1981; Murakami et al., 1983, 1986a,b; Northcutt y Wullimann, 1988; Striedter, 1991, 1992; Wullimann y Meyer, 1993).

El núcleo talámico central posterior recibe una proyección aférente desde el toro semicircular y parece que proyecta a varias áreas telencefálicas en la trucha (Folgueira et al., 2004a,b; Capítulos 3, 4). Además el toro semicircular también presenta una conexión recíproca con Vv (Folgueira et al., 2004a; Capítulo 3). Estos resultados parecen indicar que en la trucha arco iris la información mecanosensorial y/o auditiva alcanza el telencéfalo no sólo a través del relevo a nivel del complejo preglomerular, sino que también a través de

otras vías, como una directa desde el toro semicircular y otra vía indirecta a través del núcleo talámico central posterior.

Además de la implicación del complejo preglomerular en el relevo de información sensorial al telencéfalo, parece que la conexión entre las áreas telencefálicas y el complejo preglomerular podría estar implicada en procesos de aprendizaje y memoria, como será comentada en el próximo capítulo.

Comparaciones filogenéticas

Como ya se ha indicado, en peces teleosteos la información mecanosensorial y/o auditiva procedente del toro semicircular alcanza el telencéfalo a través de al menos tres vías, una vía directa y dos vías indirectas que utilizan como centros de relevo el complejo preglomerular y el núcleo talámico central posterior. Se ha propuesto que la existencia de la vía ascendente al telencéfalo a través del complejo preglomerular podría representar el patrón ancestral en vertebrados (Wullimann et al., 1998; Wulliman y Mueller, 2004). Sin embargo, no existe un centro homólogo al complejo preglomerular en agnatos, en otros actinopterigios y en tetrápodos, por lo que la existencia de una vía de relevo de información sensorial al telencéfalo a través del complejo preglomerular parece ser más un carácter apomórfico dentro del grupo de los teleosteos que la condición ancestral de tetrápodos.

ANÁLISIS NEUROANATÓMICO COMPARADO DEL TELENCEFALO DE LA TRUCHA ARCO IRIS

Al comienzo de este estudio nos marcamos un objetivo muy claro: realizar un estudio integral de las conexiones telencefálicas en la trucha arco iris, que sumado a datos citoarquitectónicos y neuroquímicos, nos permitiesen el establecimiento de homologías entre áreas telencefálicas de teleosteos con las de otros vertebrados con un alto grado de fiabilidad. Llegados al punto de nuestro estudio donde correspondía realizar el análisis de la ingente cantidad de datos de que disponíamos, el establecimiento de homologías con otros anamniotas y amniotas se perfiló cuando menos difícil. No sólo complicaba la tarea el extraordinario proceso por el cual se origina el telencefalo en los teleosteos, la eversión, sino que otras características únicas para el encéfalo de teleosteos introducían variables que aumentaban la dificultad de nuestros objetivos. Un buen ejemplo de esto es la existencia de los núcleos migrados del tubérculo posterior, como el complejo preglomeruloso, que juegan un papel fundamental en el procesamiento de información sensorial y su relevo al telencefalo, sustituyendo en gran medida al tálamo que es el principal encargado de tales funciones en otros vertebrados. Sin embargo, en los siguientes apartados analizamos a la luz de los nuevos datos aportados algunas posibles equivalencias.

TELENCEFALO VENTRAL O SUBPALIO

Si bien incluso en la lamprea se ha identificado lo que serían un estriado y un septo primitivos (Pombal et al., 1997a,b), en peces teleosteos el establecimiento de homologías con algunos de los componentes del subpalio de otros vertebrados es un tema aún sujeto a controversia.

El estudio hodológico del área ventral telencefálica está sujeto a diversas limitaciones inherentes a la organización neuronal de esta zona telencefálica, ya que está formada por áreas de pequeño tamaño, lo que hace difícil acceder a ellas para depositar el trazador neuronal, y además es atravesada o está próxima a tractos de fibras de paso.

Pese a todas estas dificultades, nuestro estudio hodológico, en el cual hemos realizado tanto marcajes en las áreas subpaliales de interés como marcajes recíprocos en regiones que parecían conectar con el subpalio, nos han dado gran cantidad de resultados que aportan datos pertinentes para la discusión sobre posibles homologías con estructuras subpaliales de tetrápodos.

Hemos observado que el área ventral del subpalio (Vv) se puede subdividir claramente en dos áreas bien definidas sobre la base de sus conexiones, una ventral

(Vv-v) y una dorsal (Vv-d) (Fig.5). Estas dos subáreas se pueden diferenciar por sus características neuroquímicas frente a la calretinina, como ya hemos comentado anteriormente, así como por la innervación galaninérgica (Rodríguez et al., 2003). Además desde el punto de vista hodológico, la zona dorsal Vv-d se diferencia claramente de la región ventral Vv-v porque presenta conexiones recíprocas con el núcleo gustatorio secundario y eferencias al bulbo olfativo (Folgueira et al., 2003a, 2004a,b; Capítulos 2, 3, 4). Pero además parecen existir otras diferencias hodológicas entre ambas zonas que, si bien no son tan claras, también parecen ser relevantes, como un mayor número de células localizadas en Vv-d con conexiones eferentes a regiones talámicas, fundamentalmente al tálamo dorsal, a regiones del complejo preglomeruloso y a regiones de la gris central rombencefálica. Tradicionalmente Vv se postulaba como una región homóloga al septo de otros vertebrados (Northcutt y Bradford, 1980; Rink y Wullimann, 2001; Wullimann y Mueller, 2004), mientras que Vd se identificaba como parte del septo o como estriado (Northcutt, 1995; Rink y Wullimann 2001; Wullimann y Reiner, 2004). Sin embargo, el que se hayan identificado nuevas áreas en la región subpalial, Vv-v y Vv-d, con unas conexiones bien diferenciadas, obligan a que tales regiones deban tenerse en cuenta a la hora de establecer homologías.

¿Se pueden establecer homologías entre áreas del telencefalo ventral de peces con núcleos de vertebrados amniotas? ¿Existen en peces estructuras que sean el esbozo o precursores de lo que a lo largo de la evolución dará lugar a los ganglios basales de amniotas?

Una de las características que mejor definen el cuerpo estriado de amniotas es la aferencia dopaminérgica desde la *substantia nigra*/ área tegmental ventral (SN/VT). En amniotas no se ha identificado como tal la SN/VT, pero regiones periventriculares del tubérculo posterior han sido identificadas como la fuente de la innervación catecolaminérgica al estriado en anfibios (Marín et al., 1997b). En nuestro estudio en la trucha arco iris hemos encontrado una importante proyección desde regiones periventriculares del tubérculo posterior al subpalio (Vv, Vv-v, Vv-d) (Folgueira et al., 2004a,b; Capítulos 3, 4). Dichas regiones del tubérculo posterior son también inmunoreactivas para la tirosín hidroxilasa (TH) en la trucha (Manso et al., 1993; Anadón et al., 2002; Vetillard et al., 2002; resultados propios). Rink y Wullimann (2001, 2002) llevaron a cabo un estudio de colocalización

en el pez cebra, aplicando el trazador neuronal en Vd/Vv y realizando una tinción inmunofluorescente dirigida contra la TH, lo que les llevó a observar algunas células doblemente marcadas en el tubérculo posterior. Por lo tanto parece que efectivamente hay una fuerte inervación dopaminérgica desde el tubérculo posterior al subpalio en peces teleósteos y que podría ser similar a la inervación dopaminérgica al estriado desde regiones del tubérculo posterior observada en anfibios (Marín et al., 1997b; Rink y Wullimann, 2001, 2002; Wullimann y Rink, 2002). Esto implicaría además que las regiones subpaliales que reciben aferencias desde regiones periventriculares del tubérculo posterior serían buenos candidatos para ser homólogos al estriado de tetrápodos.

Dentro del complejo estriado-palidal de mamíferos, el complejo estriado se caracteriza por ser el principal centro al que llegan las aferencias desde diversas regiones (corteza cerebral, tálamo, complejo *substantia nigra*-área tegmental ventral) mientras que el principal centro eferente lo constituye el globo pálido, que envía sus proyecciones al tálamo, al tronco encefálico y la médula espinal.

Es destacable que la aplicación del trazador en regiones dorsales periventriculares del tubérculo posterior resultó en la aparición de células retrógradamente marcadas sobre todo en Vv-d. La aplicación del trazador en regiones talámicas y en el complejo preglomeruloso, que en teleósteos es el principal centro de relevo de información sensorial ascendente al telencéfalo, muestran un mayor número de células retrógradamente marcadas en Vv-d que en Vd. Estas características hodológicas de Vv-d sugieren la relación de este área telencefálica con alguno de los componentes de los ganglios basales de tetrápodos más que como parte del septo. De hecho, dichos resultados podrían indicar que el área Vv-d de peces teleósteos podría ser el equivalente de lo que será el globo pálido de amniotas, mientras que Vd sería el homólogo del estriado. Ambas regiones presentan células que se presumen gabaérgicas ya que expresan la ácido glutámico descarboxilasa, además de receptores para glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Anzelius et al., 1995; Anglade et al., 1999; Vacher et al., 2003), características que también presentan el estriado y el globo pálido de otros vertebrados. En el estriado de amniotas se observan un gran número de interneuronas colinérgicas (Medina y Reiner, 1994), pero este criterio neuroquímico quizá no sea útil en anamniotas ya que en tetrápodos anamniotas se ha descrito un número escaso de células colinérgicas en el estriado (Marín et al., 1997d; Medina y Reiner, 1995). Esto posiblemente también ocurra en la trucha, ya que en el área Vd de la trucha no se han descrito células inmunoreactivas para la enzima acetilcolina transferasa (Pérez et al., 2000), aunque sí hemos observado gran cantidad de células que muestran una fuerte actividad acetilcolinesterasa. Sin embargo, la acetilcolinesterasa no es un marcador ideal de la presencia de la acetilcolina en determinadas neuronas (Pérez, 1998), aunque sí parece ser útil para la detección de posibles lugares del encéfalo en los cuales podría tener lugar transmisión sináptica colinérgica (Wächter, 1974).

El estudio sobre la distribución de los marcadores genéticos *Lhx7*, *Nkx2.1* y *Dlx2* en medaka (*Oryzias latipes*, Teleostei) parecen apoyar la existencia de un estriado y un globo pálido en el subpalio de teleósteos. Se observa que la que parece ser la hipotética división estriada del supalio (Vd) podría caracterizarse por la fuerte expresión de *Dlx2*, junto con *Lhx7* y *Nkx2.1*, y que la división palido-septal podría caracterizarse por la expresión de *Lhx7* y *Nkx2.1*, sin que se exprese *Dlx2* (Alunni et al., 2004). La localización de *Lhx7* y *Nkx2.1* en regiones estriadas podría deberse a la expresión de estos marcadores en interneuronas derivadas de la eminencia gangliónica medial (Marín et al., 2000; González et al., 2002).

Según lo anteriormente expuesto y a diferencia de lo propuesto por Wullimann y Mueller (2004), que proponen la existencia en Vd de células con naturaleza palidal entre células de naturaleza estriada, parece que podría existir un globo pálido (Vv-d) independiente del complejo estriado (Vd) en peces teleósteos. Wullimann y Mueller (2004) se basan en que el hexapéptido relacionado con la neurotensina (LANT6), un marcador muy bueno de los ganglios basales en amniotas que presenta su mayor densidad en el globo pálido (Reiner y Carraway, 1987), está presente exclusivamente en Vd en un actinopterigio no teleósteo (*Polypterus senegalus*; Reiner y Northcutt, 1992), y extienden estos resultados a peces teleósteos. Quizás lo que indique la presencia del LANT6 en el área Vd de *Polypterus* es que efectivamente en este grupo de peces (Polypteriformes, Chondrostei) las células con naturaleza palidal se localicen dispersas entre células estriadas, siendo tal vez ésta la condición ancestral en vertebrados.

En la trucha se han encontrado un gran número de células en Vd que presentan una conexión eferente a Dd+DI-d y Dm (Folgueira et al., 2004a,b; Capítulo 3, 4). En amniotas no han sido descritas eferencias desde el estriado a regiones paliales, lo que podría considerarse como un argumento en contra de la homología entre Vd y el estriado de amniotas (Folgueira et al., 2004a). Sin embargo, en la lamprea también se observaron células en el estriado y el septo tras realizar la aplicación del trazador en regiones paliales (Polenova y Vesselkin, 1993; Northcutt y Wicht, 1996; Pombal et al., 1997a,b). Así mismo, se ha observado también una proyección desde Vd a regiones paliales en *Polypterus* (Holmes y Northcutt, 2003) por lo que las eferencias desde regiones estriado-septales al palio podría representar la condición plesiomórfica en peces pero que se ha perdido a lo largo de la evolución en otros grupos.

Se ha sugerido la posibilidad de que la aparición de unos ganglios basales bien desarrollados durante la evolución tiene lugar durante la transición anamniota-amniota, basándose en la existencia de grandes diferencias en la organización de los ganglios basales entre estos dos grupos de vertebrados (Parent, 1986). No obstante, estudios recientes han demostrado que algunas características fundamentales en la organización de los ganglios basales de los amniotas están también presentes en anfibios (Marín et al., 1997a,b,c, 1998a,b; Bachy et

al., 2001, 2002; Brox et al., 2002, 2003; González et al., 2002), por lo que el desarrollo de los ganglios basales parece estar más relacionada con la adquisición de la condición de tetrápodo. Esto parece concordar con nuestros resultados, ya que si bien en teleósteos quizá podría diferenciarse un estriado y un globo pálido primitivos que en la trucha se corresponderían con Vd y Vv-d, estos centros están muy poco diferenciados en comparación con lo observado en tetrápodos.

El área septal o septo es una estructura telencéflica subcortical que ocupa una posición estratégica dentro del sistema límbico de vertebrados terrestres. El septo de anfibios recibe aferencias fundamentalmente desde regiones rombencefálicas como la gris central y el rafe (Kicliter y Northcutt, 1975; Roden et al., 2005), desde el hipotálamo (Neary y Wilczynski, 1977), regiones preópticas (Roden et al., 2005) y del palio medial (Northcutt y Ronan, 1992). Además presenta aferencias catecolaminérgicas desde la parte caudal del tálamo ventral, del tubérculo posterior y del núcleo del tracto solitario (Sánchez-Camacho et al., 2003). Así mismo, son destacables las conexiones eferentes desde el septo hasta regiones del tubérculo posterior e hipotálamo en anfibios (Endepols et al., 2005). En reptiles también se han descrito conexiones recíprocas con regiones del hipotálamo, tálamo, tegmento mesencefálico, núcleo A8/*substantia nigra*, rafe y gris central, así como aferencias desde el *locus coeruleus* y eferencias a la región preóptica (Font, 1997, 1998). La comparación de los resultados de las conexiones del septo en anfibios y reptiles permiten dilucidar que el patrón de conexiones es similar entre ambos. A su vez parece que un patrón similar de conexiones se observan para Vv-v en la trucha arco iris (Folgueira et al., 2004a, b; Capítulos 3, 4), a excepción de la aferencia desde regiones gustativas primarias observada en anfibios que no se ha detectado en la trucha. Así mismo, en vertebrados amniotas es una característica diagnóstica del septo la existencia de una vía descendente masiva a regiones hipotalámicas, una característica que presenta también Vv-v en la trucha (Folgueira et al., 2004a,b), así como Vv en el pez cebra (Rink y Wullimann, 2002, 2004) y en *Eigenmannia virescens* (Wong, 1997). Por tanto parece bien establecida la homología entre porciones ventrales del telencéfalo de peces teleósteos (Vv-v en la trucha, Vv en el pez cebra y en *Eigenmannia virescens*) y el septo de vertebrados tetrápodos.

El tubérculo olfativo de amniotas recibe proyecciones directas del bulbo olfativo, se localiza inmediatamente detrás del núcleo olfatorio anterior, cubriendo superficialmente la cabeza del núcleo caudado y el núcleo accumbens. El área lateral del telencéfalo ventral de peces actinoptergios (VI) ha sido propuesta como homóloga del tubérculo olfativo y del núcleo septal medial (Northcutt y Braford, 1980; Northcutt, 1995). En nuestro estudio, sólo hemos observado una proyección eferente desde células localizadas en VI a Dm. Por su parte las aferencias a VI son difíciles de delimitar debido a que dicho área se localiza en una zona de paso de fibras y tractos. Sí parece claro que fibras olfativas secundarias

no terminan en esta zona, criterio que iría en contra de la supuesta homología con el tubérculo olfativo. Además VI no proyecta a regiones hipotalámicas en peces actinoptergios, lo que rebatiría la homología VI-septo medial propuesta por Northcutt y Braford (1980) y Northcutt (1995). Aunque existen datos sobre la neuroquímica de las células de VI (somatostatina: Becerra et al., 1995; neuropéptido Y: García-Fernández et al., 1992; Castro et al., 1999; acetil colinesterasa: Pérez et al., 2000; FMRF: Castro et al., 2001) el análisis de dichos datos junto con los resultados hodológicos disponibles por el momento sugiere que son insuficientes por lo que se necesitan más estudios para el establecimiento de su posible homología (ver Folgueira et al., 2004a; Capítulo 3, para una discusión más extensa).

En el presente estudio se observa que el núcleo supracomisural (Vs) presenta conexiones recíprocas con el bulbo olfatorio, Vv, Vd, región preóptica, con regiones talámicas, con el complejo preglomeruloso, con regiones hipotalámicas y regiones no migradas del tubérculo posterior, así como con el rafe (Folgueira et al., 2004a,b; Capítulos 3, 4). Además Vs parece enviar eferencias al núcleo subglomeruloso y recibir aferencias desde el núcleo supraquiasmático, el núcleo gustatorio terciario, el toro semicircular y el *locus coeruleus* (Folgueira et al., 2004a,b; Capítulos 3, 4). Estos resultados concuerdan en general con los datos existentes para otras especies de teleósteos (Shiga et al., 1985; Yamamoto e Ito, 2000). En lo que se refiere al núcleo posterior (Vp), aunque esta área presenta otras conexiones de interés (aferencias desde el bulbo olfativo y otras regiones subpaliales, desde tálamo dorsal, etc), cabe destacar las eferencias a regiones tuberales e hipotalámicas (Folgueira et al., 2004a,b; Capítulos 3,4) En anfibios, se han descrito conexiones recíprocas entre la amígdala subpalial y diversas regiones subpaliales, como el septo y el estriado, la región preóptica, el tálamo, el núcleo supraquiasmático, el tubérculo posterior y el hipotálamo (Moreno y González, 2003, 2004). Además se observan aferencias a la amígdala desde el bulbo olfativo principal y accesorio, desde diversas regiones paliales, regiones tegmentales y desde el rafe (Moreno y González, 2003, 2004). Estas conexiones recuerdan a las anteriormente descritas para Vs y Vp en la trucha, por lo que ambas regiones podrían ser homólogas a la amígdala subpalial (amígdala extendida) de tetrápodos, aunque una vez más serían necesarios más estudios para confirmar dicha hipótesis (ver Folgueira et al., 2004a; Capítulo 3, para una discusión más extensa).

TELENCÉFALO DORSAL O PALIO

El telencéfalo dorsal (D) o palio de peces actinoptergios se ve directamente afectado por el peculiar proceso de desarrollo ontogénico de la eversión, lo que de nuevo viene a complicar la tarea de identificación de áreas homólogas entre peces teleósteos con los demás anamniotas y amniotas.

El área medial (Dm) es un área telencéflica implicada en el procesamiento de información multisensorial, con una aferencia gustativa y quizá también olfativa (Folgueira et al., 2003a, 2004a,b;

Capítulos 2, 3, 4), además de presentar importantes conexiones con regiones hipotalámicas y del complejo preglomeruloso (Folgueira et al., 2004b; 2005; Capítulos 4, 6). Sobre la base de estas características hodológicas, Dm podría ser el equivalente a la amígdala palial de amniotas. Esta hipótesis está apoyada por estudios de comportamiento que demuestran que el área telencefálica Dm está implicada en cierto aprendizaje emocional (Portavella et al., 2002, 2004a,b) como lo está la amígdala palial en vertebrados superiores. También se ha descrito que la estimulación eléctrica de este área produce cambios en el comportamiento agresivo y reproductor (De Bruin, 1980; Demski, 1983), efectos muy similares a los que se observan tras producir lesiones o estimular eléctricamente la amígdala de tetrápodos. Por tanto podría concluirse que Dm forma parte de lo que sería un sistema límbico primitivo en peces, siendo probable la equivalencia entre este centro en teleósteos y la amígdala palial de tetrápodos. En salmónidos parece estar bien establecida la existencia de 4 subdivisiones en Dm (Dm1, Dm2, Dm3 y Dm4; Braford y Northcutt, 1980; Castro et al., 2003, resultados propios), que presentan un patrón hodológico diferente al menos en lo que se refiere a ciertas modalidades sensoriales (Folgueira et al., 2004a, b). Por tanto parece existir una segregación funcional dentro de la amígdala palial de teleósteos, de forma similar a lo que ocurre también en amniotas (Martínez-García et al., 2002).

En el área dorsal y parte dorsal del área lateral (Dd+Dl-d), la técnica de Golgi muestra células multipolares que presentan una conspicua arborización dendrítica que en muchos casos se orienta prácticamente en todas direcciones. No hemos observado prácticamente en ningún caso de aplicación del trazador neuronal en diversas áreas encefálicas células marcadas en esta zona, por lo que asumimos que posiblemente no conocemos la totalidad de las conexiones de Dd+Dl-d. Dentro de las conexiones son destacables la conexión aferente desde Vd (Folgueira et al., 2004a, b; Capítulos 3, 4) y desde el complejo preglomeruloso (Folgueira et al., 2005). El complejo preglomeruloso en trucha presenta conexiones recíprocas con Dm, un área telencefálica que como comentábamos anteriormente podría formar parte del sistema límbico en peces y parece además estar relacionada con procesos de aprendizaje emocional. Por tanto, el conjunto del complejo preglomeruloso y Dm podría formar parte de un circuito de memoria-aprendizaje similar al descrito en mamíferos (ver Folgueira et al., 2005; Capítulo 6). Así mismo, parece que Dd+Dl-d, debido a la aferencia a este área desde regiones del complejo preglomeruloso, estaría de alguna forma implicada en este circuito. Sin embargo, interpretar el papel que juega Dd+Dl-d dentro de este circuito es aún difícil por la carencia de más datos sobre esta zona. A la vista de la morfología de sus neuronas, Dd+Dl-d parece un centro integrador al que llega información desde varias regiones telencefálicas. Sin más datos que los disponibles hasta el momento conocer la utilización que este área hace de esa información es muy difícil. Podría tratarse de un centro en el que se produce el

almacenamiento de información en forma de memoria o un centro modulador de la actividad telencefálica, con participación en ambos casos del complejo preglomeruloso... La enzima calcio- calmodulina proteína quinasa II (CaMKII) parece ser importante en procesos de plasticidad sináptica y por tanto quizá esté implicada en procesos de aprendizaje y memoria (Lisman, 1994; Fink y Meyer, 2002). Se observaron células que expresan esta enzima en regiones paliales dorsales y centrales de *Apteronotus leptorhynchus* (Maler y Hincke, 1999) que podrían ser el equivalente al área Dd+Dl-d en la trucha. Sería de gran interés el estudio de la distribución de la CaMKII en la trucha arco iris para confirmar que efectivamente se expresa en Dd+Dl-d y apoyar con más datos la hipótesis de la implicación de esta área en procesos de aprendizaje y memoria.

Si bien el estudio de las eferencias del área central del palio (Dc) es complicado debido a que se sitúa en un área de paso de numerosos tractos, la realización de marcajes recíprocos aportó numerosos datos sobre este área. Está constituida por grandes neuronas multipolares con dendritas espinosas que parecen recibir información aferente desde varias regiones telencefálicas (Turowski y Danner, 1977) y que proyectan a varias regiones del telencéfalo, tálamo, núcleo paracomisural, complejo preglomeruloso, regiones hipotalámicas, toro semicircular y techo óptico. De las proyecciones eferentes de Dc, quizá son destacables las eferencias al núcleo paracomisural, y al techo óptico, por ser la única área telencefálica en la trucha que presenta estas conexiones (Folgueira et al., 2004b; Capítulo 4). En la trucha, el núcleo paracomisural es un núcleo pretectal periventricular que mantiene conexiones recíprocas con el cerebelo (Folgueira et al., 2003b). Dado que Dc presenta una proyección eferente al núcleo paracomisural, este área telencefálica forma parte de una vía ascendente telencéfalo-cerebelar, la única que ha podido ser identificada claramente en la trucha arco iris hasta el momento (Folgueira et al., 2003b). A diferencia de lo que ocurre en otros vertebrados donde las imágenes se forman en el telencéfalo, parece que el techo óptico en peces es el principal centro encargado de la elaboración visual, ya que la ablación del telencéfalo aparentemente no produce un efecto claro en la formación de imágenes (Bernstein, 1962; Seegar, 1965; Savage y Swingland, 1969). Por tanto, la conexión desde niveles telencefálicos con el techo óptico en peces, en concreto desde Dc, podría estar implicada en la dotación de otros componentes a las imágenes formadas en el techo óptico, como por ejemplo componentes emocionales. Además, el conjunto de las aferencias y eferencias de Dc parece indicar que Dc sirve de centro modulador o de control por "retroalimentación" para sistemas que pueden jugar un papel significativo en el control motor, como son el sistema preglomeruloso, el toro semicircular, el techo óptico y el sistema cerebelar.

En el telencéfalo caudal se localiza la denominada área posterior del telencéfalo dorsal (Dp), un área que está implicada en el procesamiento de información olfativa como demostraron los resultados obtenidos tras la aplicación de trazador en el bulbo olfativo (Folgueira

et al., 2004a,b; Capítulos 3, 4), siendo esta proyección un carácter bien conservado en peces teleosteos (Bass, 1981a,b; von Bartheld et al., 1984; Levine y Dethier, 1985; Sas et al., 1993; Matz, 1995; Riedel y Krug, 1997; Meek y Nieuwenhuys, 1998) y condrosteos (Huesa et al., 2000). Además, Dp presenta una gran densidad de receptores para dopamina D1A (subtipo 2), que es característico del córtex olfativo de mamíferos (Wullimann y Mueller, 2004), lo que viene a apoyar aun más que Dp pueda ser el homólogo del palio olfativo o piriforme de otros vertebrados, que es la principal área de terminación del bulbo olfatorio en tetrápodos (Ariëns Kappers et al., 1936). Nuestros resultados hodológicos (Folgueira et al., 2002, 2004a,b; Capítulos 3, 4, 5) y de inmunoreactividad frente a la calretinina (Castro et al., 2003; resultados propios) han demostrado que hay una clara segregación de Dp en dos subáreas ó subnúcleos, ventral (Dp-v) y dorsal (Dp-d) (Fig.5). Mientras Dp-v presenta células inmunoreactivas a la calretinina e importantes proyecciones eferentes a regiones tuberales, al complejo preglomeruloso medial, al toro lateral, al núcleo subglomeruloso y a regiones del tubérculo posterior, Dp-d es un área implicada casi exclusivamente en el procesamiento de información olfativa.

Como ya hemos comentado anteriormente, parece que Dp-v constituye un centro de relevo de información olfativa hacia el núcleo subglomeruloso (Folgueira et al., 2002; Capítulo 6). Pero Dp-v presenta un patrón de conexiones relativamente complejo que parece indicar que existe una función más compleja y elaborada que el simple relevo de información olfativa a centros diencefálicos. Estudios de comportamiento sugieren que Dl en teleosteos podría ser el homólogo al hipocampo de vertebrados terrestres ya que está implicado en procesos de memoria espacial, como parece estarlo el hipocampo en amniotas (Portavella et al., 2002, 2004a; Rodríguez et al., 2002; Salas et al., 2003). En trucha, Dl es un área muy poco diferenciada citoarquitectónicamente, con una pobre identidad desde el punto de vista hodológico ya que parece ser poco más que un área de paso de las proyecciones olfativas hacia Dp. Debido a estas características de Dl en la trucha, parece poco probable que un área tan poco diferenciada sea el equivalente del hipocampo de vertebrados terrestres, dibujándose como mejor candidato Dp-v. Serían necesarios estudios de comportamiento en trucha que estimulen Dp-v para confirmar dicha hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahrens K, Wullimann MF. 2002. Hypothalamic inferior lobe and lateral torus connections in a percomorph teleost, the red cichlid (*Hemichromis lifaliti*). *J Comp Neurol* 449: 43-64.
- Allison JD, Wilzyski W. 1991. Thalamic and midbrain auditory projections to the preoptic area and ventral hypothalamus in the green treefrog (*Hyla cinerea*). *Brain Behav Evol* 38: 322-331.
- Alunni A, Blin M, Deschet K, Bourrat F, Vernier P, Rétaux S. 2004. Cloning and developmental expression patterns of *Dlx2*, *Lhx7* and *Lhx9* in the medaka fish (*Oryzias latipes*). *J Comp Neurol* 121: 977-983.
- Anadón R, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Becerra M. 1995. Neurons of the olfactory organ projecting to the caudal telencephalon and hypothalamus: a carbocyanine-dye labeling study in the brown trout (Teleostei). *Neurosc Letters* 191: 157-160.
- Anglade I, Mazurais D, Douard V, Jossic-Corcós C, Mañacos EL, Michel D, Kah O. 1999. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 410: 277-289.
- Anzeliús M, Ekström P, Möhler H, Richards JG. 1995. Immunocytochemical localization of GABA_A receptor β_2/β_3 -subunits in the brain of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Chem Neuroanat* 8: 207-221.
- Ariëns Kappers CU, Huber GC, Crosby EC. 1936. The comparative analysis of the nervous system of vertebrates, including man, 2 vols. MacMillan, New York.
- Bachy I, Berthon J, Rétaux S. 2002. Defining pallial and subpallial divisions in the developing *Xenopus* forebrain. *Mech Develop* 117: 163-172.
- Bachy I, Vernier P, Rétaux S. 2001. The lim-homeodomain gene family in the developing xenopus brain: conservation and divergences with the mouse related to the evolution of the forebrain *J Neurosci* 21: 7620-7629.
- Barnard JW. 1936. A phylogenetic study of the visceral afferent areas associated with the facial, glossopharyngeal, and vagus nerves, and their fiber connections. The efferent facial nucleus. *J Comp Neurol* 65: 503-602.
- Bass AH. 1981a. Telencephalic efferents in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: Projections to the olfactory bulb and optic tectum. *Brain Behav Evol* 19: 1-16.
- Bass AH. 1981b. Olfactory bulb efferents in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Morphol* 169: 91-111.
- Bazer TG, Ebbesson SOE, Reynolds JB, Bailey RP. 1987. A cobalt-lysine study of primary olfactory projections in king salmon fry (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum). *Cell Tissue Res* 248: 499-503.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1994. Primary olfactory fibers project to the ventral telencephalon and preoptic region in trout (*Salmo trutta*): a developmental immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 342: 131-143.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1995. Ontogeny of somatostatin-immunoreactive systems in the brain of the brown trout (Teleostei). *Anat Embryol* 191: 119-137.
- Beckstead RM, Morse JR, Norgren R. 1980. The nucleus of the solitary tract in the monkey: Projections to the thalamus and brain stem nuclei. *J Comp Neurol* 190: 259-282.
- Beidenbach ME. 1973. Functional properties and projection areas of cutaneous receptors in catfish. *J Comp Physiol* 84: 227-250.
- Bernstein JJ. 1962. Role of the telencephalon in color vision of fish. *Exp Neurol* 6: 173-185.
- Braford MR Jr. 1975. Olfactory bulb projections in the shovelnose sturgeon *Scaphirhynchus platyrhynchus*. American Society of Zoologists. University of Michigan Press, Ann Arbor, abstract 690.
- Broadwell RD. 1975. Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. II. An autoradiographic and horse radish peroxidase study of the efferent connections of the anterior olfactory nucleus. *J Comp Neurol* 164: 389-410.
- Broadwell RD, Jacobowitz DM. 1976. Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. III: The ipsilateral centrifugal fibers to the olfactory bulbar and retrobulbar formations. *J Comp Neurol* 163: 329-346.
- Brox A, Ferreiro B, Puelles L, Medina L. 2002. The telencephalon of the frog *Xenopus* based on calretinin immunostaining and gene expression patterns. *Brain Res Bull* 57: 381-384.
- Brox A, Puelles L, Ferreiro B, Medina L. 2003. Expression of the genes *GAD67* and *Distal-less-4* in the forebrain of *Xenopus laevis* confirms a common pattern in tetrapods. *J Comp Neurol* 461: 370-393.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 1999. Development of immunoreactivity to neuropeptide Y in the brain of brown trout (*Salmo trutta fario*). *J Comp Neurol* 414: 13-32.
- Castro A, Becerra M, Anadón R, Manso MJ. 2001. Distribution and development of FMRFamide-like immunoreactive neuronal systems in the brain of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 440: 43-64.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2003. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467: 254-269.

- Cooper HM, Parvopassu F, Herbin M, Magnin M. 1993. Neuroanatomical pathways linking vision and olfaction in mammals. *Psychoneuroendocrinology* 19: 623-639.
- Davis RE, Chase R, Morris J, Kaufman B. 1981. Telencephalon of the teleostean *Macropodus*: experimental localization of secondary olfactory areas and of components of the lateral forebrain bundle. *Behav Neural Biol* 33: 257-279.
- De Bruin JPC. 1980. Telencephalon and behavior in teleost fish. A neuroethological approach. En: *Comparative neurology of the telencephalon*. Ebbesson SOE (editor), Plenum Press, New York, pp. 175-201.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. 1989. Connections of the olfactory bulb and nucleus olfactorius anterior in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*): fluorescent tracers and HRP study. *J Comp Neurol* 279: 601-618.
- De Olmos J, Hardy H, Heimer L. 1978. The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP study. *J Comp Neurol* 181: 213-244.
- Demski LS. 1983. Behavioral effects of electrical stimulation of the brain. En: *Fish neurobiology Vol. 2, Higher brain areas and functions*. Davis RE, Northcutt RG (editores). Ann Arbor, University of Michigan Press, pp. 317-359.
- Demski LS, Evan AP, Saland LC. 1975. The structure of the inferior lobe of the teleost hypothalamus. *J Comp Neurol* 161: 483-498.
- Díaz ML, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2001. Development of thyrotropin-releasing hormone immunoreactivity in the brain of the brown trout *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 429: 299-320.
- Díaz-Regueira S, Anadón R. 1992. Central projections of the vagus nerve in *Chelon labrosus* Risso (Teleostei, O. Perciformes). *Brain Behav Evol* 40: 297-310.
- Döving KB, Selset R. 1980. Behavior pattern in cod released by electrical stimulation of olfactory tract bundles. *Science* 207: 559-560.
- Ebbesson SOE, Meyer LM, Scheich H. 1981. Connections of the olfactory bulb in the piranha (*Serrasalmus nattereri*). *Cell Tissue Res* 216: 167-180.
- Echteler SM, Saidel WM. 1981. Forebrain connections in the goldfish support telencephalic homologies with land vertebrates. *Science* 212: 683-684.
- Endepols H, Roden K, Walkowiak W. 2005. Hodological characterization of the septum in anuran amphibians: II. Efferent connections. *J Comp Neurol* 483: 437-457.
- Finger TE. 1975. The distribution of the olfactory tracts in the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* 161: 125-142.
- Finger TE. 1976. Gustatory pathways in the bullhead catfish. I. Connections of the anterior ganglion. *J Comp Neurol* 165: 513-526.
- Finger TE. 1978. Gustatory pathways in the bullhead catfish. II. Facial lobe connections. *J Comp Neurol* 180: 691-705.
- Finger TE. 1983. The gustatory system in teleost fish. En: *Fish neurobiology. Vol. I. Brain areas and functions*. Davis RE, Northcutt RG, (editores). Ann Arbor, New York, pp. 286-302.
- Finger TE. 1986. Organization of chemosensory systems within the brains of bony fishes. En: *Sensory biology of aquatic organisms*. Atema J, Fay RR, Porre AN, Tovalga WN, (editores). Springer Verlag New York, pp. 329-338.
- Finger TE. 1987. Gustatory nuclei and pathways in the central nervous system. En: *Neurobiology of taste and smell*. Finger TE, Silver WL, (editores). Wiley series in Neurobiology, New York, John Wiley & Sons, Inc, pp. 331-353.
- Finger TE, Kanwal JS. 1992. Ascending general visceral pathways within the brainstems of two teleost fishes: *Ictalurus punctuatus* and *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 320: 509-520.
- Finger TE, Morita Y. 1985. Two gustatory systems: facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. *Science* 227: 776-778.
- Fink ChC, Meyer T. 2002. Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 12: 293-299.
- Folgueira M, Huesa G, Yáñez J, Anadón R. 2002. The nucleus subglomerulosus of the trout is a link between chemosensory and visual systems: a DiI study. *Brain Res Bull* 57: 327-330.
- Folgueira M, Yáñez J, Anadón R. 2003a. Experimental study of the connections of the gustatory system in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Comp Neurol* 465: 604-619.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2003b. Estudio experimental de las conexiones cerebrales en el salmónido *Oncorhynchus mykiss*. *Rev Neurol* 37: 1171A.
- Folgueira M, Yáñez J, Anadón R. 2004a. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*O. mykiss*). I. Olfactory bulb and ventral area. *J Comp Neurol* 480: 180-203.
- Folgueira M, Yáñez J, Anadón R. 2004b. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*O. mykiss*). II. Dorsal area and preoptic region. *J Comp Neurol* 480: 204-233.
- Folgueira M, Yáñez J, Anadón R. 2005. Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res Bull* (en prensa).
- Font C, Martínez-Marcos A, Lanuza E, Hoogland PV, Martínez-García F. 1997. Septal complex of the telencephalon of the lizard *Podarcis hispanica*. II. Afferent connections. *J Comp Neurol* 383:489-511.
- Font C, Lanuza E, Martínez-Marcos A, Hoogland PV, Martínez-García F. 1998. Septal complex of the telencephalon of the lizard *Podarcis hispanica*. III. Efferent connections and general discussion. *J Comp Neurol* 401: 525-548.
- Gamble HJ. 1952. An experimental study of the secondary olfactory connections in *Lacerta viridis*. *J Anat Lond* 86:180-196.
- Gamble HJ. 1956. An experimental study of the secondary olfactory connections in *Testudo graeca*. *J Anat Lond* 90:15-29.
- García-Fernández JM, Brío MA, Cernuda R, Coto A, Riera P. 1992. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of *Salmo salar* and *Gambusia affinis*. *Histol Histopathol* 7: 385-392.
- González A, López JM, Sánchez-Camacho C, Marín O. 2002. Regional expression of the homeobox gene NKX2-1 defines pallidal and interneuronal populations in the basal ganglia of amphibians. *Neuroscience* 114: 567-575.
- Hamilton RB, Pritchard TC, Norgren R. 1985. Projections to the gustatory thalamus of New World primates. *Soc Neurosci Abstr* 11: 1259.
- Herrick CJ. 1944. The fasciculus solitarius and its connections in amphibians and fishes. *J Comp Neurol* 81: 307-331.
- Herrick CJ. 1948. The brain of the tiger salamander *Amblystoma tigrinum*. University of Chicago Press, Chicago.
- Holmes PH, Northcutt RG. 2002. Connections of the pallial telencephalon in the senegal bichir, *Polypterus*. *Brain Behav Evol* 61: 113-147.
- Honkanen T, Ekström P. 1990. An immunocytochemical study of the olfactory projections in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, L. *J Comp Neurol* 292: 65-72.
- Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2000. Olfactory projections in a chondrosteian fish, *Acipenser baeri*: an experimental study. *J Comp Neurol* 428: 145-158.
- Ito H, Kishida R. 1978. Telencephalic afferent neurons identified by the retrograde HRP method in the carp diencephalon. *Brain Res* 149: 211-215.
- Ito H, Yoshimoto M, Albert JS, Yamane Y, Yamamoto N, Sawai N, Kaur A. 1997. Terminal morphology of two branches arising from a single stem-axon of pretectal (PSm) neurons in the common carp. *J Comp Neurol* 378: 379-388.
- Kanwal JS, Finger TE, Caprio J. 1988. Forebrain connections of the gustatory system in the ictalurid catfishes. *J Comp Neurol* 278: 353-376.
- Kanwal JS, Finger TE. 1992. Central representation and projections of gustatory systems. En: *Fish chemoreception*. Hara TJ, (editor). Chapman & Hall. Fish and Fisheries, Series 6, London, pp. 80-103.
- Karsch FJ, Robinson JE, Woodfill CJI, Brown MB. 1989. Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: Evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol Reprod* 41: 1034-1046.
- Kemali M, Guglielmotti V. 1987. A horseradish peroxidase study of the olfactory system of the frog, *Rana esculenta*. *J Comp Neurol* 263: 400-417.
- Kicliter E, Northcutt RG. 1975. Ascending afferents to the telencephalon of ranid frogs: an anterograde degeneration study. *J Comp Neurol* 185: 75-86.
- Krettek JE, Price JL. 1978. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol* 178: 225-254.
- Künkle H, Radtke-Schuller S. 2000. Basal telencephalic regions connected with the olfactory bulb in a madagascan hedgehog tenrec. *J Comp Neurol* 423: 706-726.
- Laberge F, Hara TJ. 2001. Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Res Rev* 36: 46-59.

- Lamb CF, Caprio J. 1993. Diencephalic gustatory connections in the channel catfish. *J Comp Neurol* 337: 400-418.
- Lamb CF, Finger TE. 1996. Axonal projection patterns of neurons in the secondary gustatory nucleus of channel catfish. *J Comp Neurol* 365: 585-593.
- Levine RL, Dethier S. 1985. The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* 237: 427-444.
- Levy F, Meurisse M, Ferreira G, Thibault J, Tillet Y. 1999. Afferents to the rostral olfactory bulb in sheep with special emphasis on the cholinergic, noradrenergic and serotonergic connections. *J Chem Neuroanat* 16: 245-263.
- Lisman J. 1994. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory *TINS* 17: 406-412.
- Lohman AHM, Smeets WJAJ. 1993. Overview of the main and accessory olfactory bulb projections in reptiles. *Brain Behav Evol* 41: 147-155.
- Maler L, Hincke MT. 1999. Distribution of calcium/calmodulin-dependent kinase 2 in the brain of *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol* 408: 177-203.
- Manso MJ, Becerra M, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 34: 239-260.
- Marín O, Anderson SA, Rubenstein JLR. 2000. Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20: 6063-6076.
- Marín O, González A, Smeets WJAJ. 1997a. Basal ganglia organization in amphibians: afferent connections to the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378: 16-49.
- Marín O, González A, Smeets WJAJ. 1997b. Basal ganglia organization in amphibians: catecholaminergic innervation of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378: 50-69.
- Marín O, González A, Smeets WJAJ. 1997c. Basal ganglia organization in amphibians: efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 380: 23-50.
- Marín O, Smeets WJAJ, González A. 1997d. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltli*) amphibians. *J Comp Neurol* 382: 499-534.
- Marín O, Smeets WJAJ, González A. 1998a. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends Neurosci* 21: 487-494.
- Marín O, Smeets WJAJ, González A. 1998b. Basal ganglia organization in amphibians: chemoarchitecture. *J Comp Neurol* 392: 285-312.
- Martínez-García F, Martínez-Marcos A, Lanuza E. 2002. The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Res Bull* 57: 463-469.
- Marui T. 1981. Taste responses in the superior secondary gustatory nucleus of the carp, *Cyprinus carpio* L. *Brain Res* 217: 59-68.
- Matesz C, Székely G. 1978. The motor column and sensory projections of the branchial nerves in the frog. *J Comp Neurol* 178:157-176.
- Matz SP. 1995. Connections of the olfactory bulb in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Brain Behav Evol* 46: 108-120.
- Medina L, Reiner A. 1994. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J Comp Neurol* 342: 497-537.
- Medina L, Reiner A. 1995. Neurotransmitter organization and connectivity of the basal ganglia in vertebrates: implications for the evolution of basal ganglia. *Brain Behav Evol* 46: 235-258.
- Meek J, Nieuwenhuys R. 1998. Holosteans and teleosts. En: The central nervous system of vertebrates, Vol 2. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, (editores). Springer Verlag Berlin, Heidelberg New York, pp. 759-937.
- Meredith M. 1991. Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: Comparisons and contrasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39: 601-614.
- Moreno N, González A. 2003. Hodological characterization of the medial amygdala in anuran amphibians. *J Comp Neurol* 466: 389-408.
- Moreno N, González A. 2004. Localization and connectivity of the lateral amygdala in anuran amphibians. *J Comp Neurol* 479: 130-148.
- Morita Y, Finger TE. 1985a. Reflex connections of the facial and vagal systems in the brainstem of the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* 231: 547-558.
- Morita Y, Finger TE. 1985b. Topographic and laminar organization of the vagal gustatory system in the bullhead catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Comp Neurol* 264: 231-249.
- Morita Y, Finger TE. 1998. Differential projections of ciliated and microvillous olfactory receptor cells in the catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Comp Neurol* 398: 539-550.
- Morita Y, Ito H, Masai H. 1980. Central gustatory paths in the crucian carp, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol* 191: 119-132.
- Morita Y, Murakami T, Ito H. 1983. Cytoarchitecture and topographic projections of the gustatory centers in a teleost, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol* 218: 378-394.
- Murakami T, Fukuoka T, Ito H. 1986a. Telencephalic ascending acousticolateral system in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*), with special reference to the fiber connections of the nucleus preglomerulosus. *J Comp Neurol* 247: 383-397.
- Murakami T, Ito H, Morita Y. 1986b. Telencephalic afferent nuclei in the carp diencephalon, with special reference to fiber connections of the nucleus preglomerulosus pars lateralis. *Brain Res* 382: 97-103.
- Murakami T, Morita Y, Ito H. 1983. Extrinsic and intrinsic fiber connections of the telencephalon in a teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *J Comp Neurol* 216: 115-131.
- Neary TJ. 1995. Afferent projections to the hypothalamus in ranid frogs. *Brain Behav Evol* 46:1-13.
- Neary TJ, Wilczynski W. 1977. Autoradiographic demonstration of hypothalamic efferents in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat Rec* 187: 665.
- Nieuwenhuys R. 1963. The comparative anatomy of the actinopterygian forebrain. *J Hirnforsch* 13: 171-192.
- Norgren R. 1976. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol* 166: 17-30.
- Norgren R, Leonard CM. 1973. Ascending central gustatory pathways. *J Comp Neurol* 150: 217-238.
- Northcutt RG. 1995. The forebrain of gnathostomes: in search of a morphotype. *Brain Behav Evol* 46: 275-318.
- Northcutt RG, Braford MR Jr. 1980. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes. En: Comparative neurology of the telencephalon. Ebbesson SOE, (editor). New York: Plenum Press, pp. 41-98.
- Northcutt RG, Braford MR. 1984. Some efferent connections of the superficial pretectum in the goldfish. *Brain Res* 296: 181-184.
- Northcutt RG, Davis RE. 1983. Telencephalic organization in ray-finned fishes. En: Fish neurobiology. Davis RE, Northcutt RG, (editores). University of Michigan Press, Ann Arbor, Vol. 2, pp. 203-255.
- Northcutt RG, Puzdrowski L. 1988. Projections of the olfactory bulb and nervus terminalis in the silver lamprey. *Brain Behav Evol* 32: 96-107.
- Northcutt RG, Ronan M. 1992. Afferent and efferent connections of the bullfrog medial pallium. *Brain Behav Evol* 40: 1-16.
- Northcutt RG, Royce GJ. 1975. Olfactory bulb projections in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Morph* 145:251-267.
- Northcutt RG, Wicht H. 1996. Afferent and efferent connections of the lateral and medial pallia of the silver lamprey. *Brain Behav Evol* 49: 1-19.
- Northcutt RG, Wullmann M. 1988. The visual system in teleost fishes: morphological patterns and trends. En: Sensory biology of aquatic animals. Atema J, Fay RR, Poppema AN, Tavolga WN (editores). Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp. 515-552.
- Oka Y. 1980. The origin of the centrifugal fibers to the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*: an experimental study using the fluorescent dye primuline as a retrograde tracer. *Brain Res* 185: 215-225.
- Parent A. 1986. Comparative neurobiology of the basal ganglia. John Wiley and Sons.
- Pérez SE, Yáñez J, Marín O, Anadón R, González A, Rodríguez-Moldes I. 2000. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout, and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J Comp Neurol* 428: 450-474.
- Polenova OA, Vesselkin NP. 1993. Olfactory and nonolfactory projections in the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) telencephalon. *J Hirnforsch* 34: 261-279.
- Pombal MA, El Manira A, Grillner S. 1997a. Afferents of the lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: a

- combined tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 386: 71-91.
- Pombal MA, El Manira A, Grillner S. 1997b. Organization of the lamprey striatum-transmitters and projections. *Brain Res* 766: 249-254.
- Portavella M, Torres B, Salas C. 2004a. Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *J Neurosci* 24: 2335-2342.
- Portavella M, Torres B, Salas C, Papini MR. 2004b. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neurosci Lett* 362: 75-78.
- Portavella M, Vargas JP, Torres B, Salas C. 2002. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Res Bull* 57: 397-399.
- Prasada Rao PD, Finger TE. 1984. Asymmetry of the olfactory system in the brain of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *J Comp Neurol* 225: 492-510.
- Reiner A, Carraway RE. 1987. Immunohistochemical and biochemical studies on Lys8-Asn9-neurotensin8-13 (LANT6)-related peptides in the basal ganglia of pigeons, turtles, and hamsters. *J Comp Neurol* 257: 453-476.
- Reiner A, Karten HJ. 1985. Comparison of olfactory bulb projections in pigeons and turtles. *Brain Behav Evol* 27: 11-27.
- Reiner A, Northcutt RG. 1992. An immunohistochemical study of the telencephalon of the Senegal bichir (*Polypterus senegalus*). *J Comp Neurol* 319: 359-386.
- Resink JW, Voorthuis PK, van den Hurk R, Vullings HGB, van Oordt PGWJ. 1989. Pheromone detection and olfactory pathways in the brain of female African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cell Tissue Res* 256:337-345.
- Riddle DR, Oakley B. 1992. Immunocytochemical identification of the primary olfactory afferents in rainbow trout. *J Comp Neurol* 324: 575-589.
- Riedel G, Krug L. 1997. The forebrain of the blind cave fish *Astyanax hubbsi* (Characidae). I. Projections of the olfactory bulb. *Brain Behav Evol* 49: 39-52.
- Rink E, Wullimann MF. 1998. Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394: 152-170.
- Rink E, Wullimann MF. 2001. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889: 316-330.
- Rink E, Wullimann MF. 2002. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull* 57: 385-387.
- Rink E, Wullimann MF. 2004. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res* 1011: 206-220.
- Roberts MG, Savage GE. 1978. Effects of hypothalamic lesions on the food intake of the goldfish (*Carassius auratus*). *Brain Behav Evol* 15: 150-164.
- Roden K, Endepols H, Walkowiak W. 2005. Hodological characterization of the septum in anuran amphibians. I. Afferent connections. *J Comp Neurol* 483: 415-436.
- Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C. 2002. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull* 57: 499-503.
- Rodríguez MA, Anadón R, Rodríguez-Moldes I. 2003. Development of galanin-like immunoreactivity in the brain of the brown trout (*Salmo trutta fario*), with some observations on sexual dimorphism. *J Comp Neurol* 465: 263-285.
- Rooney D, Doving KB, Ravaille-Veron M, Szabo T. 1992. The central connections of the olfactory bulbs in cod, *Gadus morhua* L. *J Hirnforsch* 33: 63-75.
- Rubinson K, Friedman B. 1977. Vagal afferent projections in *Rana pipiens*, *Rana catesbeiana*, and *Xenopus mulleri*. *Brain Behav Evol* 14: 368-380.
- Salas C, Broglio C, Rodríguez F, López JC, Portavella M, Torres B. 1996a. Telencephalic ablation in goldfish impairs performance in a "spatial constancy" problem but not in a cued one. *Behav Brain Res* 79: 193-200.
- Salas C, Rodríguez F, Vargas JP, Durán E, Torres B. 1996b. Spatial learning and memory deficits after telencephalic ablation in goldfish trained in place and turn maze procedures. *Behav Neurosci* 110: 965-980.
- Salas C, Broglio C, Rodríguez F. 2003. Evolution of forebrain and spatial cognition in vertebrates: conservation across diversity. *Brain Behav Evol* 62: 72-82.
- Sánchez-Camacho C, Peña JJ, González A. 2003. Catecholaminergic innervation of the septum in the frog: a combined immunohistochemical and tract-tracing study. *J Comp Neurol* 455: 310-323.
- Sas E, Maler L, Weld M. 1993. Connections of the olfactory bulb in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol* 335: 486-507.
- Savage GE, Swingland IR. 1969. Positively reinforced behaviour and forebrain in goldfish. *Nature (Lond.)* 221: 878-879.
- Sawai N, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 2000. Fiber connections of the corpus mamillare in a percomorph teleost, tilapia *Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol* 55: 1-13.
- Scalia F, Gallousis G, Roca S. 1991. Differential projections of the main and accessory olfactory bulb in the frog. *J Comp Neurol* 305: 443-461.
- Scalia F, Winans SS. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161: 31-55.
- Seegar J. 1965. Behavioral aspects of degeneration in fish brain: a comparison with higher vertebrates. *Prog Brain Res* 14: 143-231.
- Shiga T, Oka Y, Satou M, Okumoto N, Ueda K. 1985. An HRP study of afferent connections of the supra commissural ventral telencephalon and the medial preoptic area in hime salmon (Landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *Brain Res* 361: 162-177.
- Shiple MT, Adamek GD. 1984. The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 12: 669-688.
- Signoret JP. 1991. Sexual pheromones in the domestic sheep: importance and limits in the regulation of reproductive physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39: 639-645.
- Skeen LC. 1976. Sources of olfactory projections to the dorsal thalamus in the tree shrew (*Tupaia glis*). *Neurosci Abstr* 2: 63.
- Stacey NE, Kyle AL. 1983. Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol Behav* 30: 621-628.
- Striedter GF. 1991. Auditory, electrosensory, and mechanosensory lateral line pathways through the forebrain in channel catfishes. *J Comp Neurol* 312: 311-331.
- Striedter GF. 1992. Phylogenetic changes in the connections of the lateral preglomerular nucleus in ostariophysan teleost: a pluralistic view of brain evolution. *Brain Behav Evol* 39: 329-357.
- Szabo T, Blähser S, Denizot JP, Ravaille-Véron M. 1991. Extensive primary olfactory projections beyond the olfactory bulb in teleost fish. *CR Acad Paris* 312: 555-560.
- ten Donkelaar HJ, de Boer-van Guisen R. 1981. Ascending projections of the brain stem reticular formation in a non-mammalian vertebrate (the lizard *Varanus exanthematicus*), with notes on the afferent connections of the forebrain. *J Comp Neurol* 200: 501-528.
- ten Donkelaar HJ. 1998a. Urodeles. En: En: The central nervous system of vertebrates. Vol 2. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, (editores). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp.1045-1150.
- ten Donkelaar HJ. 1998b. Anurans. En: The central nervous system of vertebrates. Vol 2. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, (editores). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1151-1314.
- ten Donkelaar HJ. 1998c. Reptiles. En: En: The central nervous system of vertebrates. Vol 2. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, (editores). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1315-1524.
- Turowski A, Danner H. 1977. Zur Morphologie des Telencephalon von *Salmo irideus* (Teleostei) Golgi-Imprägnationsstudie. *J Hirnforsch* 18: 37-51.
- Urbanski HF. 1992. Photoperiodic modulation of luteinizing-hormone secretion in orchidectomized syrian-hamsters and the influence of excitatory aminoacids. *Endocrinology* 131: 1665-1669.
- Vacher C, Pellegrini E, Anglade I, Ferrière F, Saligaut C, Kah O. 2003. Distribution of dopamine D₂ receptor mRNAs in the brain and the

- pituitary of female rainbow trout: an in situ hybridisation study. *J Comp Neurol* 458: 32-45.
- Valentic T, Caprio J. 1997. Visual and chemical release of feeding behavior in adult rainbow trout *Chem senses* 22: 375-82.
- Vetillard A, Benanni S, Saligaut C, Jégo P, Bailhache T. 2002. Localization of tyrosine hydroxylase and its messenger RNA in the brain of rainbow trout by immunocytochemistry and in situ hybridization. *J Comp Neurol* 449: 374-389.
- von Bartheld CS, Meyer DL, Fiebig E, Ebbesson SOE. 1984. Central connections of the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res* 238: 475-487.
- von Bartheld CS, Meyer DL. 1986. Central connections of the olfactory bulb in the bichir, *Polypterus palms*, reexamined. *Cell Tissue Res* 244: 527-535.
- Voogd J, Nieuwenhuys R, van Dongen PAM, ten Donkelaar HJ. 1998. Mammals. En: The central nervous system of vertebrates. Vol 3. Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, (editores). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1637- 2097.
- Wächtler K. 1974. The distribution of the acetylcholinesterase in the cyclostome brain. I. *Lampetra planeri*. *Cell Tissue Res* 152:259-270.
- Wong CJH. 1997. Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*. *J Comp Neurol* 389: 49-64.
- Wullimann MF. 1998. The central nervous system. En: The physiology of fishes. Evans DH (editor). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 247-284.
- Wullimann MF, Meyer DL. 1993. Possible multiple evolution of indirect telencephalo-cerebellar pathways in teleosts: studies in *Carassius auratus* and *Pantodon buchholzi*. *Cell Tissue Res* 274: 447-455.
- Wullimann MF, Mueller T. 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior. *J Comp Neurol* 475: 143-162.
- Wullimann MF, Rink E. 2002. The teleostean forebrain: A comparative and developmental view based on early proliferation, *Pax6* activity and catecholaminergic organization. *Brain Res Bull* 57: 363-370.
- Yamamoto N, Ito H. 2000. Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. *J Comp Neurol* 428: 355-375.
- Yamamoto T, Matsuo R, Kawamura Y. 1980a. The pontine taste area in the rabbit. *Neurosci Lett* 16: 5-9.
- Yamamoto T, Matsuo R, Kawamura Y. 1980b. Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination *J Neurophysiol* 44: 440-455.
- Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu N, Ito H. 1998. Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. *J Comp Neurol* 392: 209-226.
- Yoshimoto M, Ito H. 1993. Cytoarchitecture, fiber connections, and ultrastructure of the nucleus pretectalis superficialis pars magnocellularis (PSm) in carp. *J Comp Neurol* 336: 343-446.

Conclusiones

Las conclusiones que hemos extraído del presente estudio son las que se describen a continuación:

1. Se han identificado varios núcleos o áreas en el encéfalo de la trucha arco iris que no habían sido descritos o bien caracterizados en esta especie: Vv-d y Dp-v en el telencéfalo, el núcleo talámico central posterior y el núcleo supraquiasmático en el diencefalo y la porción rostral del NGS en el rombencéfalo. Estos centros han podido caracterizarse hodológicamente, demostrando que poseen conexiones específicas que los diferencian claramente.

2. Las distintas áreas telencefálicas de la trucha arco iris muestran un patrón hodológico complejo. La información sensorial se distribuye de forma diferente en el telencéfalo según sea su naturaleza olfativa, gustativa o mecanosensorial, siendo posible la caracterización de las distintas áreas telencefálicas en función de la naturaleza de la información que integran. El área Dc es la única área telencefálica que podría estar implicada de algún modo en el procesamiento de información visual a través de una conexión directa con el techo óptico.

3. La vía de integración gustativa en la trucha arco iris es una vía lemniscal que alcanza varias áreas telencefálicas desde niveles sensoriales primarios de la columna viscerosensorial, gracias a centros de relevo localizados en niveles rombencefálicos y diencefálicos. Existen a su vez conexiones descendentes desde centros que forman esta vía hacia centros de integración de niveles inferiores. El patrón de conexiones gustativas es un patrón conservado dentro del grupo de los peces teleósteos, e incluso parece conservarse a lo largo de la evolución en tetrápodos. La especialización del sistema parece revertir más en la existencia de somatotopía, en la hipertrofia de ciertos centros implicados en el procesamiento de información gustativa y en la segregación de la información según su naturaleza visceral o gustativa.

4. La información olfativa es integrada fundamentalmente en áreas discretas del telencéfalo, siendo el área posterior del telencéfalo dorsal (Dp) la principal área palial implicada en el procesamiento de la información de naturaleza olfativa. Estos resultados concuerdan con los observados en otras especies de teleósteos.

5. Varios núcleos migrados del tubérculo posterior, como son el núcleo gustatorio terciario y el complejo preglomeruloso, se confirman como centros clave en el relevo de información sensorial de distinta naturaleza hasta el telencéfalo, siendo cuantitativamente más importantes las conexiones desde estos centros con el telencéfalo que desde regiones talámicas. Además, algunos de los centros del tubérculo posterior, como el núcleo subglomeruloso, son claves para establecer la comunicación entre distintos sistemas de integración.

6. Las conexiones de las distintas áreas telencefálicas observadas en la trucha arco iris parecen mostrar que varias áreas podrían estar implicadas en funciones superiores de integración, como son aprendizaje, memoria, dotación de componentes emocionales a información sensorial, y control motor superior, al igual que ocurre en tetrápodos. De esta forma, parece que existen áreas telencefálicas que forman parte de un sistema límbico primitivo y de lo que podía ser un ancestro de los gánglios basales de tetrápodos en peces.

En general, este estudio muestra que el establecimiento de homologías entre centros telencefálicos de peces teleósteos y de tetrápodos es una tarea compleja. Para el establecimiento de dichas homologías deben ser tenidas en cuenta las nuevas áreas telencefálicas descritas en la trucha arco iris, ya que por su patrón hodológico parecen jugar un papel específico dentro del telencéfalo.

Agradecimientos

Llegados a este punto es el momento de dar las gracias a *todos aquellos* que de alguna manera han colaborado para que este trabajo haya sido posible. *Algunos de ellos* han contribuido en gran medida en mi formación durante todo este tiempo, contagiándome de su pasión por la ciencia. *Éstos y algunos otros* han seguido el día a día de este trabajo, proporcionándome su compañía y muchos buenos e inolvidables momentos. *Muchos otros* han contribuido de otra forma bien diferente pero no menos importante, con su amistad, apoyo y cariño.

Por eso quisiera dedicar mi más sincero agradecimiento:

A mi director de tesis, Dr. D. *Julián Yáñez*, por todo lo que me ha enseñado durante estos años, por contagiarme de su entusiasmo por la ciencia y la neuroanatomía comparada, por su paciencia, comprensión y buenos consejos.

Al profesor Dr. D. *Ramón Anadón*, por su inestimable ayuda y sus consejos, por su cercanía y accesibilidad en todo momento, así como por contribuir también en gran medida a contagiarme de un enorme interés por la neuroanatomía comparada y la ciencia en general.

A todos mis compañeros del área de Biología Celular, tanto a los que aún siguen por aquí como a los que ya se han ido para seguir otros caminos (*May, Ángeles, Oscar, Lula, Tony, Chus, María José, Sofía, Sylvia, Iván, Merce, Patri, etc.*). Con todos ellos he tenido el placer de compartir muy buenos momentos en el día a día en el laboratorio. En especial a *Gema*, por su inestimable ayuda en todo momento, su apoyo, sus consejos y por los buenos momentos compartidos. Además gracias a ella he vivido un periodo inolvidable en mi vida.

A todos mis compañeros de la facultad, por su amistad, por todos esos buenos momentos compartidos, (...y por todas las fiestas de estos años...).

A *Isa*, por todos estos años de convivencia durante los cuales siempre me he sentido como en mi propia casa y hemos sabido llevarnos siempre tan bien. La verdad es que me llena de tristeza el tener que separarnos, casi seis años de convivencia no se olvidarán fácilmente.

A toda mi familia, en especial a mis padres y abuelos, por su cariño, comprensión y apoyo en todo momento. Y a mi primo *Iván* (que lo que no se dijo entonces se diga ahora), por ser lo más parecido que tengo a un hermano.

A *Migue*, por muchísimas e incontables razones, entre ellas el haber sido siempre tan paciente y comprensivo conmigo y haber aceptado tener que compartirme con este trabajo en algunas ocasiones.

También quisiera agradecer a Dña. *Pilar Gómez*, propietaria de la Piscifactoría Berxa, por facilitarme de forma totalmente desinteresada los ejemplares de trucha arco iris utilizados en este estudio.