

PEDECIBA BIOLOGÍA – CIENCIAS FISIOLÓGICAS

TESIS DE MAESTRÍA

Neuroanatomía Comparada – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Laboratorio de Fisiología Reproductiva y Ecología de Peces – Facultad de Ciencias, UdelaR

A fluorescence microscopy image of brain tissue. The image shows numerous cells with bright green fluorescence, likely representing aromatase B expression. There are also scattered red fluorescent spots, possibly indicating proliferative zones. The background is dark, making the green and red signals stand out.

**Correlación entre la aromatasa B y las
zonas proliferativas en el encéfalo de
Austrolebias charrua adulto**

Lic. Maximiliano Torres Pérez

Directora: Anabel Fernández Constenla, PhD
Co-directora: Denise Vizziano Cantonnet, PhD

Tribunal: Presidenta: Alejandra Kun, PhD

Vocales: Laura Quintana, PhD, Nibia Berois, PhD

Montevideo – Uruguay, 2019

PEDECIBA BIOLOGÍA – CIENCIAS FISIOLÓGICAS

TESIS DE MAESTRÍA

Neuroanatomía Comparada – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Laboratorio de Fisiología Reproductiva y Ecología de Peces – Facultad de Ciencias, UdelaR

Correlación entre la aromatasa B y las zonas proliferativas en el encéfalo de *Austrolebias charrua* adulto

Lic. Maximiliano Torres Pérez

Directora: Anabel Fernández Constenla, PhD
Co-directora: Denise Vizziano Cantonnet, PhD

Tribunal: Presidenta: Alejandra Kun, PhD

Vocales: Laura Quintana, PhD, Nibia Berois, PhD

Montevideo – Uruguay, 2019

Dedicatoria

A mis profesoras de biología Malena Oholeguy y Cristina Rey,
porque en ellas encontré la pasión definitiva por la zoología, anatomía y fisiología.

A la memoria de Don Santiago y Don Clemente,
porque su obra es fuente de mi inspiración, y perseverancia.

RESUMEN

El sistema nervioso central mantiene la capacidad de génesis de nuevas neuronas en el cerebro adulto en todos los grupos de vertebrados, incluyendo el hombre. La generación de estas nuevas neuronas en estadio adulto, se da en sitios denominados nichos neurogénicos, donde residen las células madre neurales y células progenitoras con diferentes capacidades proliferativas. Estos nichos en general forman parte de las paredes ventriculares encefálicas, discriminando dos tipos de zonas, funcionalmente diferente: zonas en las que existen células de revestimiento ventricular y zonas en las que residen células madre y progenitores neurales que sirven a la neurogénesis en el estado adulto, denominadas zonas proliferativas. Uno de los tipos celulares vinculados a los procesos neurogénicos en diferentes grupos de vertebrados adultos, es la glía radial. Esta célula glial está reconocida por ser la principal fuente de generación de neuronas en varias regiones del sistema nervioso central de todos los grupos de vertebrados durante el desarrollo embrionario. La glía radial desaparece luego del nacimiento en los mamíferos, pero permanece en el sistema nervioso adulto de peces, anfibios, reptiles, y aves. Una característica que presentan estas glías radiales, es que son capaces de expresar aromatasa, que es la enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos. Estas hormonas esteroideas son de gran importancia funcional y ejercen efectos pleiotrópicos. En los teleósteos adultos se observa una intensa actividad de la aromatasa de hasta mil veces superior que en mamíferos, debido a la fuerte expresión de la aromatasa B (cerebral) (*cyp19a1b*) que es un parálogo de la aromatasa A (gonadal) (*cyp19a1a*) que surge en los peces teleósteos posiblemente luego de la tercera duplicación completa del genoma. Curiosamente, la aromatasa B sólo se expresa en células gliales radiales de peces en estadios larvarios y adultos y los datos recientes sugieren que esta situación en los peces bien podría ser una exageración de un mecanismo más general que involucran a los estrógenos en la neurogénesis, particularmente en la dinámica proliferativa. El objetivo general de esta tesis de maestría fue determinar la distribución de la aromatasa B en el encéfalo de *Austrolebias charrua*, su vinculación con las zonas proliferativas y conocer el efecto del bloqueo de la actividad enzimática de la aromatasa en relación a la proliferación celular. Para esto se realizó un análisis de la neuroanatomía encefálica de *A. charrua* mediante un estudio macro y microscópico que permitió identificar las diferentes estructuras del encéfalo. Luego de conocida la neuroanatomía y utilizando pulsos de un análogo halogenado de la timidina utilizado como marcador de proliferación celular, se determinó el sitio de origen de las células que proliferan activamente, logrando identificar 20 zonas proliferativas adultas.

Junto con este estudio de proliferación casi instantáneo, se realizaron experimentos de proliferación de 24h y 30 días, que permitió evaluar la dinámica proliferativa y el destino celular. Estos datos junto con los aportes anatómicos mencionados anteriormente, derivaron en la publicación de un artículo científico en la revista Brain Research (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689931730330X>). Luego del análisis de proliferación se logró evidenciar la presencia de la enzima aromatasa B en el encéfalo de *A. charrua* por análisis *in silico* de secuencias obtenidas del transcriptoma de *A. charrua* y se determinó la expresión en el encéfalo mediante RT-PCR. Para conocer la localización proteica, se realizaron inmunolocalizaciones de Aromatasa B en encéfalos de machos y hembras utilizando anticuerpos específicos para aromatasa B de teleósteos (*Danio rerio*) y se combinó con marcadores de estirpe celular y de proliferación celular. Esto logró evidenciar que las células radiales que presentan aromatasa B son glías y no neuronas y que no todas las células que proliferan en las zonas proliferativas son glías radiales positivas a la aromatasa B, en diversos nichos de todo el encéfalo. Y por último, mediante la aplicación de un inhibidor de la actividad aromatasa (Fadrozole), fue posible determinar que esta inhibición presenta un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la proliferación celular en el encéfalo de *A. charrua* y que este efecto es sexualmente dimórfico en varias regiones analizadas.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis consta de cuatro capítulos destinados a contestar la hipótesis general planteada, abordando los objetivos especiales en estos capítulos. En el capítulo 1 se realizó un estudio de la neuroanatomía del encéfalo de *A. charrua* adulto con el fin de conocer la organización del mismo. Una vez completado el capítulo 1 y conociendo la anatomía del encéfalo se realizó un estudio de proliferación celular que conformó el capítulo 2, logrando la identificación y localización de las zonas proliferativas (ZP) constitutivas de los individuos adultos. En el capítulo 3 se analiza la presencia de aromatasa B en el encéfalo adulto y se establece una correlación con las ZP descritas en el capítulo 2. En el capítulo 4 se muestran experimentos realizados con un inhibidor de la actividad enzimática de la aromatasa (que convierte andrógenos en estrógenos) para revelar los efectos de este inhibidor, en la proliferación celular de algunas ZP seleccionadas, representativas de las grandes divisiones encefálicas.

La organización de la escritura se resume en el siguiente cuadro:

1	Introducción			Pag 16-42
2	Capítulo	Objetivo específico	Resultados	Discusión
	1	1- Identificar y mapear en detalle las diversas estructuras encefálicas de <i>A. charrua</i> mediante un análisis morfológico e histológico.	Pag 71-103	Pag 104-112
	2	2- Identificar y localizar las ZP en el encéfalo adulto.	Pag 114-129	Pag 130-147
	3	3- Evidenciar la presencia de la enzima aroB en el encéfalo de <i>A. charrua</i>	Pag 149-175	Pag 176-187
		4- Revelar la distribución anatómica y localización celular de aroB en el encéfalo de machos y hembras adultos.		
4	5- Determinar los posibles efectos de un inhibidor de la actividad enzimática de la aromatasa sobre la proliferación celular en el encéfalo de <i>A. charrua</i> .	Pag 190-197	Pag 198-203	
3	Discusión general			Pag 204-208
4	Conclusiones y perspectivas			Pag 209-210

Agradecimientos

Quiero agradecerle muy especialmente a mi doble tutora Anabel por haberme aceptado como su estudiante en aquel junio de 2011. Poco a poco fui convirtiéndome en su discípulo, realizando mis tesis de grado y maestría con ella, las cuales disfruté como un aprendizaje más allá de lo técnico y científico, también filosóficamente. ¡Gracias! ¡Y gracias por el aguante!

Quiero agradecer también muy especialmente a mi otra tutora de maestría, Denise, porque me abrió las puertas en el mundo de la aromatasa y el mundo de los esteroides. No siendo *Austrolebias* su modelo de estudio, me recibió en su laboratorio donde me enseñó a pensar fisiológicamente y ese es un aporte que siempre quedará en mis buenos recuerdos. ¡Gracias!

Agradezco al tribunal que corrigió esta tesis, Laura Quintana, Nibia Berois y Alejandra Kun, sus aportes y comentarios han sido realmente enriquecedores.

Le agradezco a mi amigo Santiago di Landro, porque gracias a él me vinculé con el FREP, por ser tan de fierro y estar para todas y en todas, en las buenas y en las malas, siempre al pie del cañón. Incluso para acompañarme a coleccionar *Austrolebias* en bici y bajo lluvia. ¡Gracias Santi por tanto!

Agradezco por la compañía, colaboración y aguante a mis compañeros austrolebiólogos del laboratorio Neuroanatomía Comparada, Inesita (Ubi), Laurita, Juan Carlos y Gaby Casanova ¡Ah y también por su amistad extra-ciencia, la hemos pasado genial!

Agradezco también a mi compañero del FREP, André Lasalle por siempre, siempre estar dispuesto a colaborar conmigo y por su tiempo invertido en enseñarme.

A Miguel Allende, Luisa Pereiro y Felipe Gajardo por brindarme muy generosamente las secuencias génicas de *A. charrua* utilizadas en esta tesis.

A Cecilia Maciel por todo el aguante y cariño que me ha tenido durante la maestría, sin sus aportes no hubiese obtenido muchas de las imágenes lindas.

A Andrés di Paolo por su entrenamiento en microscopía confocal y siempre estar dispuesto a brindarme sus conocimientos y experiencia.

A Nicolás Papa, por su entrenamiento en la eclosión de *Austrolebias* y manejo en sus primeros estadios, y por todos los consejos y sugerencias que hasta hoy siguen siendo útiles.

Agradezco también a Alejandro Duarte por ser un profesor de acuarismo para mí y por brindarme sus conocimientos sobre *Austrolebias* y cuidar mis peces de forma tan excepcionalmente buena, al principio de esta tesis.

Agradezco a Joaquín Carrique por toda su colaboración y soporte informático durante todo este tiempo, sus aportes han sido realmente valiosos.

A Natalia Pan por su apoyo emocional en reiteradas ocasiones, y por fugarse de la ciudad conmigo a coleccionar *Austrolebias*.

A las instituciones financieras que aportaron en el desarrollo de esta tesis, la ANII y el PEDECIBA.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por permitirme desarrollar mis tesis en esta honorable institución fundada por uno de mis grandes maestros.

Por último, pero no menos importante sino todo lo contrario, quiero agradecerle a mi madre, porque ella siempre estuvo al firme y apoyándome en todo, desde antes del principio, desde siempre. ¡Gracias MADRE! A mi hermano Federico que ha estado a mi lado toda la vida apoyándome incondicionalmente. A mi abuela China, porque siempre apostó por mí y me ayudó cuando más la necesité. A mis hijos Oscar y Raquel, que son la luz de mis ojos y el amor y la fuerza de todos mis días. A Nancyta que es una segunda madre y mi primera profesora particular de matemática. A Milton por su generosidad y apoyo incondicional. A mi familia y amigos, por brindarme siempre su apoyo y hacerme el aguante en mis grandes desapariciones a causa del estudio. Todos han sido importantes para mí y para todos mis logros.

Contenido

Abreviaturas	12
INTRODUCCIÓN	16
Introducción general	17
Neurogénesis.....	18
Nicho neurogénico como un lugar anatómico.....	20
Neurogénesis en el encéfalo adulto de vertebrados: mamíferos, aves, reptiles, anfibios.....	21
Neurogénesis adulta en peces.....	24
Los progenitores neurales en peces teleósteos.....	25
Tres tipos celulares básicos presentes en la zona ventricular	25
Células de tipo NE.....	26
Células gliales radiales	27
La enzima aromatasa y la producción de neuroestrógenos	29
Esteroides en el encéfalo adulto	29
Breve reseña de la esteroidogénesis	30
Aromatasa y neuroestrógenos en el encéfalo de los vertebrados.....	31
El FAD como inhibidor de la actividad enzimático de la aromatasa	38
El modelo de estudio y antecedentes sobre la neurogénesis adulta.....	39
El modelo biológico	39
Antecedentes: estudio de la neurogénesis adulta en <i>Austrolebias sp.</i>	41
Resumen conceptual	42
Hipótesis.....	43
Objetivo general.....	43
Objetivos específicos.....	43
Materiales y Métodos	44
Consideraciones éticas en el uso de los peces en este trabajo.....	45
Objetivo 1 – Estudio neuroanatómico	45
Fijación por perfusión intracardiaca	45
Procesamiento histológico	46
Obtención de microfotografías y tratamiento de las imágenes	47
Objetivo 2 - Estudio de la proliferación celular.....	49
Inyección del marcador de proliferación y revelado	49
Objetivos 3 y 4– Detección de aroB en el encéfalo de <i>A. charrua</i>	50
Validación de la presencia de aromatasa en el encéfalo	51
Análisis filogenético.....	54
Inmunolocalización de aroB en el encéfalo junto con marcadores de estirpe celular	54
Inmunolocalización.....	56
Enzimo histoquímica NADPHd.....	60

Objetivo 5– Efecto de un inhibidor de la aromatasa en la proliferación celular	63
Expresión de aromatasa en el encéfalo de <i>A. charrua</i>	64
Efecto de las inyecciones con FAD en la proliferación celular	66
CAPÍTULO 1. Neuroanatomía del encéfalo de <i>Austrolebias charrua</i>	70
Objetivo	71
Resultados	71
Organización del Telencéfalo.....	72
Organización del diencefalo	75
Organización del mesencéfalo.....	98
Organización del rombencéfalo.....	100
Discusión	103
Aspectos metodológicos.....	104
Telencéfalo	104
Diencefalo	107
Mesencéfalo	110
Rombencéfalo	111
CAPÍTULO 2. Zonas proliferativas del encéfalo de <i>A. charrua</i> adulto	113
Objetivo	113
Resultados	113
Observaciones generales.....	113
Tipos de núcleos proliferativos.....	114
ZP del encéfalo	116
Telencéfalo	116
Diencefalo	119
Mesencéfalo	125
Metencéfalo (Rombencéfalo).....	126
Mielencéfalo (Rombencéfalo)	127
Discusión	128
Comentarios generales.....	129
Células madre y progenitoras neurales (CMPN).....	131
ZP del encéfalo de <i>A. charrua</i>	132
ZP del telencéfalo	133
ZP del diencefalo	136
ZP del mesencéfalo.....	137
ZP del rombencéfalo.....	141
CAPÍTULO 3. Distribución y localización de la aromatasa B en el encéfalo de <i>A. charrua</i> adulto	146
Objetivos	146
Resultados	146
Identidad de las aromatasas cerebral y gonadal en <i>A. charrua</i>	146

Localización de la aromatasa en el encéfalo.....	148
Identificación de estirpe celular	157
Colocalización de aroB con NADPHd	159
Expresión de aroB en las ZP	165
Discusión	173
Expresión de la aromatasa y filogenia	173
Localización de aroB en el encéfalo adulto e identificación de estirpe celular	174
Colocalización de aroB con NADPHd	176
Distribución de aroB en estructuras encefálicas y su relación con las ZP	178
Capítulo 4. Efecto de un inhibidor de la actividad aromatasa en la proliferación de células madre y progenitores neurales del encéfalo de <i>A. charrua</i> adulto.....	185
Figura 51.- Esquema representativo de las ZP elegidas para la cuantificación de la proliferación celular.	186
Objetivo.....	186
Resultados.....	186
Niveles de expresión	186
Actividad proliferativa global.....	187
Actividad proliferativa en el telencéfalo	189
Actividad proliferativa en el diencéfalo	191
Actividad proliferativa en el mesencéfalo	192
Actividad proliferativa en el rombencéfalo	192
Discusión	193
Expresión de la aromatasa en el encéfalo adulto de <i>A. charrua</i>	193
Expresión de <i>cyp19a1b</i> en tratamientos con FAD	194
Efectos del FAD en la proliferación celular en el encéfalo	196
Discusión general	199
Conclusiones y perspectivas.....	204

Abreviaturas

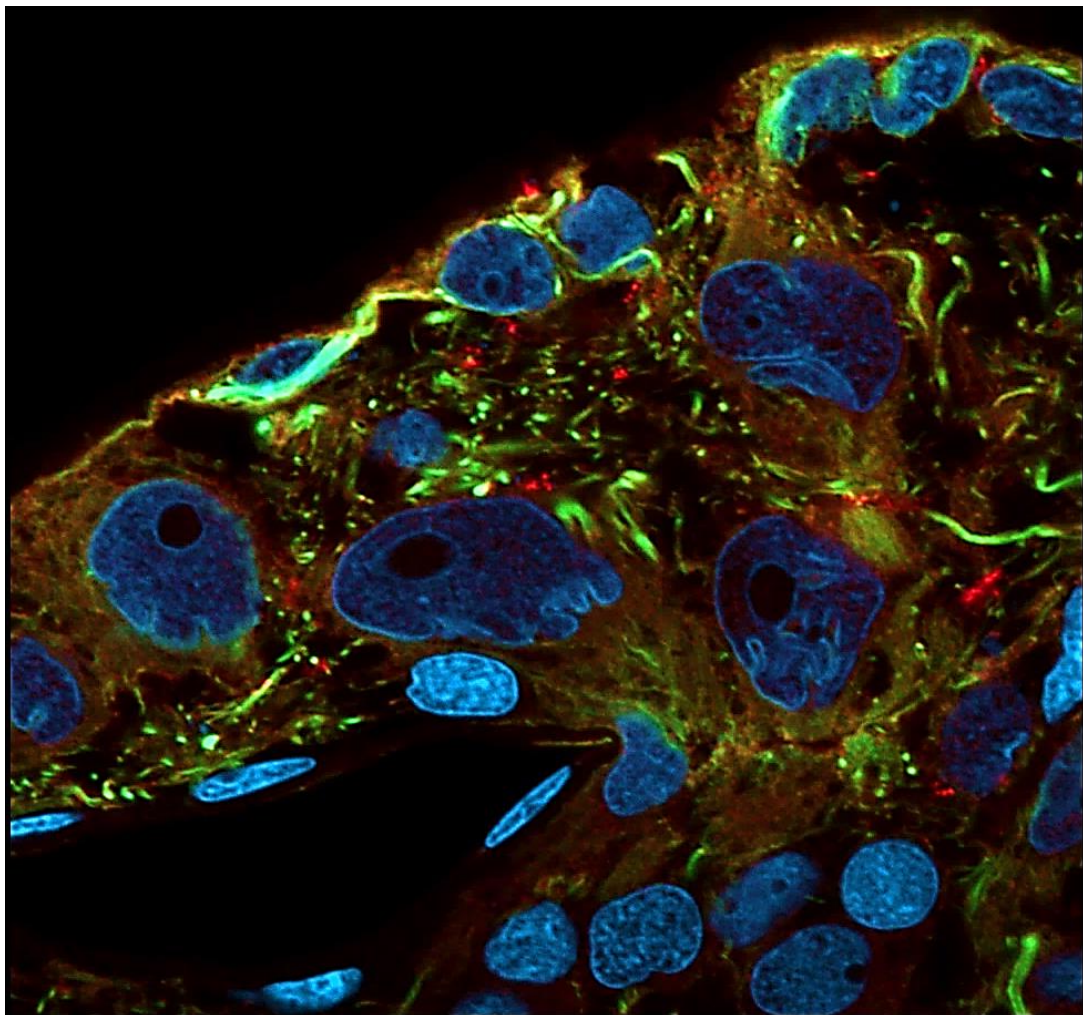
A: núcleo anterior	Chor: comisura horizontal	Dm: porción zona dorso-medial del área dorsal del telencéfalo
ADN: ácido desoxirribonucleico	CldU: clorodesoxiuridina	DMON: decusación del área octavolateralis
ALLN: Nervio anterior de la línea lateral	CM: cuerpo mamilar	DON: núcleo descendiente octavolateral
AON: núcleo anterior octavolateral	CON: núcleo caudal octavolateral	DOT: tracto óptico dorsomedial
APN: núcleo pretecal accesorio	CP: núcleo talámico central posterior	Dp: porción dorso-posterior del área dorsal del telencéfalo
ARN: ácido ribonucleico	CPMN: Células Madre y Progenitores Neurales	DT: tálamo dorsal
aroA: aromatasa isoforma A	Cpop: comisura postóptica	DTN: núcleo tegmental dorsal
aroB: aromatasa isoforma B	Cpost: comisura posterior	DWZ: zona blanca profunda
ATN: núcleo tuberal anterior	CR: receso cerebelar	E: epífisis
BLAST: herramienta local básica de búsqueda por alineamiento	Cven: comisura ventral	E1: estrona
BLBP: Proteína de unión a los lípidos cerebrales	DAO: núcleo óptico dorsal accesorio	E2: estradiol
BMR: banda migratoria rostral	DAPI: 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride	ECL: capa celular externa
BrdU: bromodesoxiuridina	Dc: porción dorso-central del área dorsal del telencéfalo	EG: eminencia granular
C: canal central	Dd: porción dorso-dorsal del área dorsal del telencéfalo	EN: núcleo entopeduncular
Cans: comisura ansulata	DH: astas dorsales	FAD: fadrozole
Cant: comisura anterior	DIL: núcleo difuso del lóbulo inferior	FCP: formación coroidea posterior
CC: crista cerebellaris	DiV: ventrículo diencefálico	Fd: fúniculos dorsal
CCe: <i>corpus cerebelli</i>	DI: porción dorso-lateral del área dorsal del telencéfalo	Fld: funículo latero-dorsal
CG: central gris		Flv: funículo latero-ventral
CGus: comisura gustativa		FR: fascículo retroflexo
Chab: comisura habenular		Fv: funículo ventral

GFAP: proteína fibrilar ácida de la glia	IRF: formación reticular inferior	ml: capa molecular, cerebelo
gl: capa de células granulares, cerebelo	IX: núcleo del nervio glosofaríngeo	MO: médula oblonga
GL: capa glomerular	LCA: lóbulo caudal	MON: núcleo medial octavolateral
GR: glía(s) radiale(s)	LFB: fascículos laterales del prosencéfalo	Musashi: Proteína reguladora de la expresión
H: hipotálamo	LH: núcleo hipotalámico lateral	NADPH: Nicotinamida- Adenina-Dinucleótido- Fosfato
H0: hipótesis nula	LLF: fascículo longitudinal lateral	NADPHd: NADPH diaforasa
H1: hipótesis alternativa	LLF: fascículo longitudinal lateral	NC: núcleo comisural de Cajal
Hab: habénula	LOT: tracto olfatorio lateral	NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica
Hd: masas celulares periventriculares	Lr: labio rómbico	NE: células de tipo neuroepiteliales
HRP: Peroxidasa de rábano	LR: receso lateral del ventrículo diencefálico	NG: núcleo glomerular
HuC: antígeno C humano específico de neuronas	LV: lóbulo vestibulolateralis	NI: núcleo istmo
Hyp: glándula pituitaria o hipófisis	LX: lóbulo vagal	NIII: núcleo del nervio oculomotor
In: núcleo intermedio	MA: axones de la célula gigante de Mauthner	NIn: núcleo interpeduncular
I: ventrículo del infundíbulo	MAC: células gigantes de Mauthner	NIV: núcleo del nervio troclear
IAF: comisura pequeña octavolateral	MaON: núcleo magnocelular octavolateral	NLV: núcleo valvular lateral
ICL: capa celular interna	MD: dendritas de la célula gigante de Mauthner	NMLF: fascículo longitudinal medial
IdU: iododesoxiuridina	ME: médula espinal	NT: núcleo Taenia
IgG: inmunoglobulina tipo G	Meis: Proteína meiótica de formación de la espinas	NVmd: grupos celulares motor dorsal del trigémico
IgM: inmunoglobulina tipo M	MFB: fascículos mediales del prosencéfalo	NVmv: grupos celulares motor ventral del trigémico
IL: lóbulo inferior del hipotálamo	MFN: núcleo funículo medial	
IMRF: formación reticular intermedia		
IO: oliva inferior		
IP: intraperitoneal		

OB: bulbos olfatorios	PPp: núcleo preóptico parvocelular posterior	TelV: ventrículo medial del telencéfalo
ON: nervios ópticos	PSm: núcleo magnocelular del POA	TeO: tectum óptico
OT: tractos ópticos	PSp: núcleo parvocelular del POA	TeV: ventrículo tectal
PAF: paraformaldehído	PTN: núcleo tuberal posterior	TL: <i>torus longitudinalis</i>
PB: buffer fosfato	PVO: órgano paraventricular	TLa: <i>torus lateralis</i>
Pb: pares de bases nucleotídicas	PZ: zona(s) proliferativa(s)	TPp: núcleo periventricular del tubérculo posterior
PBT: buffer fosfato tritón	QDE: químico disruptor endócrino	tt: <i>tela telencephali</i>
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	R: núcleo rostralateral	TTB: tracto tecto-bulbar
PG: masa granular celular periventricular	RT: núcleo tegmental rostral	TTBc: tracto tecto-bulbar medial
Pg: núcleo preglomerular	RV: ventrículo rombencefálico	TTBr: tracto tecto-bulbar lateral
PGZ (L1&2): zona gris periventricular - lámina 1 y lámina 2 del TeO	SC: núcleo supraquiasmático	TV: área ventral del telencéfalo
PGZ (L3): zona gris periventricular - lámina 3 del TeO	SD: saco dorsal	TVS: tracto vestibulo-espinal
PGZ: zona gris periventricular	SO: núcleo de la población octaval secundaria	V: núcleo del nervio trigémino
pl: capa de Purkinje, cerebelo	Sox2: de sus siglas en inglés Sex determining Region Y-box 2)	Val: valvula cerebelli
PL: núcleo perilemniscal	SRF: porción rostral de la formación reticular	VAO: núcleo óptico ventral accesorio
PLLN: Nervio posterior de la línea lateral	SWGZ: zona superficial gris y blanca	Vas: laguna vascular del área postrema
PM: núcleo preóptico magnocelular	SY: sulcus ypsiloniformis	VC: núcleo central
PMg: núcleo preóptico magnocelular	T: núcleo tangencial	VCS: centro superior de vocalización
PO: núcleo posterior pretectal	TBS: tracto bulbo-espinal	Vd: porción ventro-dorsal del lóbulo tencefálico ventral
POA: área preóptica	TD: área dorsal del telencéfalo	VH: astas ventrales
PON: núcleo posterior octavolateral	Tel: telencéfalo	VI: núcleo del nervio abducens
PPa: núcleo parvocelular anterior preóptico		VII: núcleo del nervio facial

VIII: núcleo del nervio octaval	ZP: zona proliferativa	ZPRPL: ZP del receso diencefálico posterior y lateral
VL: núcleo ventrolateral	ZPMT: ZP marginal tectal	ZPS: ZP del sinencéfalo
VM: núcleo ventromedial	ZPCC: ZP del canal central	ZPTD: ZP del telencéfalo dorsal
VOT: tracto óptico ventrolateral	ZPEG-VC: ZP de la eminencia granular-valvula cerebelli	ZPTL: ZP del <i>torus longitudinalis</i>
Vp: región postcomisural del lóbulo tencefálico ventral	ZPEp: ZP del epitálamo	ZPTID: ZP del tálamo dorsal
VR: laguna vascular rombencefálica	ZPGP: ZP granular periventricular	ZPTID: ZP del tálamo ventral
Vs: región supracomisural del lóbulo tencefálico ventral	ZPH: ZP del hipotálamo ventral	ZPTP: ZP del tubérculo posterior
Vv: Porción ventro-ventral del lóbulo tencefálico ventral	ZPOB: ZP del bulbo olfatorio	ZPT-S: ZP tegmento-semicircularis
X: núcleo del nervio vago	ZPPOA: ZP del área preóptica	ZPTV: ZP del telencéfalo ventral
ZC: zona central	ZPRC: ZP asociada al RC	ZSG: zona subgranular
	ZPRM: ZP rombencefálica medular	ZSV: zona subventricular
		ZV: zona ventricular

INTRODUCCIÓN



Introducción general

En relación a las observaciones histológicas y a los casos clínicos sobre traumas del sistema nervioso, el premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1906, Santiago Ramón y Cajal, sostenía que: “Preciso es reconocer que, en los centros adultos, las vías nerviosas son algo fijo, acabado, inmutable. Todo puede morir, nada puede renacer” (y Cajal, 1914). Con este postulado se establece que el individuo adulto era incapaz de poseer plasticidad neural que subyaciera en la generación de nuevas neuronas. Sin embargo Cajal reconoce que los axones periféricos dañados, presentan capacidad de reparación postlesión y que la observación de neurogénesis adulta en ese entonces, era una imposibilidad técnica. A mediados de la década de 1960 Joseph Altman utilizó la técnica autorradiográfica con timidina tritiada (H3 - timidina) con la que, visualizó neuronas postmitóticas marcadas en el encéfalo adulto, proponiendo la posibilidad de la generación de nuevas neuronas a partir de células madre residentes en las paredes de los ventrículos laterales. Sin embargo estas observaciones tuvieron un rechazo por la comunidad científica que, de modo dogmático, pensaba que era imposible la generación de nuevas neuronas en el adulto. A mediados de 1970 y principios de 1980, Michael Kaplan utilizando la microscopía electrónica añadió evidencia sustancial de que no solo la neurogénesis podría ocurrir en la zona descrita por Altman, sino que también en el giro dentado del hipocampo. En la década de 1980 cuando Fernando Nottebohm y Steve Goldman demostraron la presencia de neurogénesis en centros telencefálicos de los canarios relacionados con el aprendizaje de vocalizaciones (trinos y melodías). A pesar de todos estos hallazgos, el concepto de la neurogénesis postnatal no fue asimilado por la comunidad científica hasta 1998 cuando Gould et al., descubren la presencia de neurogénesis en regiones asociativas de primates. Simultáneamente, un grupo de investigadores encabezado por Eriksson utilizó BrdU con fines terapéuticos en pacientes con carcinomas, se comprobó la neurogénesis en humanos inclusive en etapas senescentes (Eriksson et al., 1998). A partir de este momento, hace menos de 20 años, la comunidad científica acepta la génesis de nuevas neuronas en estado adulto de todos los vertebrados, estableciéndose múltiples líneas de investigación científica básica y aplicada de la “neurogénesis postnatal o adulta” a lo largo de todo el mundo.

Neurogénesis

En términos generales, la neurogénesis es el fenómeno por el cual se generan neuronas a partir de una célula indiferenciada, denominada célula madre neural.

Durante el desarrollo embrionario en los vertebrados, en el tubo neural las células madre aparecen como un linaje de células neuroepiteliales (NE) ubicadas en la zona ventricular (ZV) (Alvarez-Buylla, 1995) que se dividen de forma simétrica aumentando el pool de células madre (Temple, 2001). Muchas de estas células experimentan un cambio morfológico, se alargan, aumentando su tamaño radialmente en el eje perpendicular a la pared ventricular y se transforman en un tipo particular de célula, denominado glía radial (Figura 1) (Hu *et al.*, 2017). Las glías radiales, mediante divisiones asimétricas, son capaces de generar neuronas directamente o a través de células progenitoras intermediarias (Noctor, 2000; Hu *et al.*, 2017). Estas células madre y progenitores neurales (CMPN) yacen a lo largo del tubo neural en desarrollo y van a dar lugar a la histogénesis y organogénesis primaria de todo el sistema nervioso y otras estructuras derivadas.

Al concluir el desarrollo general del sistema, persisten CMPN a lo largo de toda la vida posnatal o post eclosión, salvo que con diferencias cualitativas y cuantitativas en los distintos grupos de vertebrados. Esto involucra a los peces (Johns 1977; Raymond y Easter 1983; Zupanc y Zupanc 1992; Zupanc y Horschke 1995; Zupanc *et al.*, 1996, 2005; Zupanc 1999, 2001), anfibios (Bernocchi *et al.* 1990; Chetverukhin y Polenov 1993; Polenov y Chetverukhin 1993), reptiles (López-García *et al.*, 1988; García-Verdugo *et al.*, 1989; Pérez-Sánchez *et al.*, 1989; Perez-Cañellas y García-Verdugo 1996; Font *et al.*, 2001), aves (Goldman y Nottebohm 1983; Paton y Nottebohm 1984; Burd y Nottebohm 1985; Paton *et al.*, 1985; revisado en Nottebohm 2002) y mamíferos incluyendo humanos (Mares y Lodin 1974; Kaplan y Hinds 1977; Kaplan 1981; Bayer *et al.*, 1982; Kaplan y Bell 1983; Corotto *et al.*, 1993; Lois y Alvarez-Buylla 1993, 1994; Gould *et al.*, 1999; Eriksson *et al.*, 1998; van Praag *et al.*, 2002; Doetsch y Scharff 2001; Temple 2001; Gage 2002; Taupin y Gage 2002; Rakic 2002). El destino de las glías radiales depende de la región en la que se encuentren y del taxa. En peces, anfibios, reptiles y aves, varios grupos o 'clusters' de glías radiales permanecen en la vida adulta mientras que en mamíferos se diferencia postnatalmente en un tipo celular que posee estructura y

características moleculares de astrocitos, que ofician como CMPN (Doetsch *et al.*, 1999; Imura *et al.*, 2003; Laywell *et al.*, 2000; Seri *et al.*, 2001).

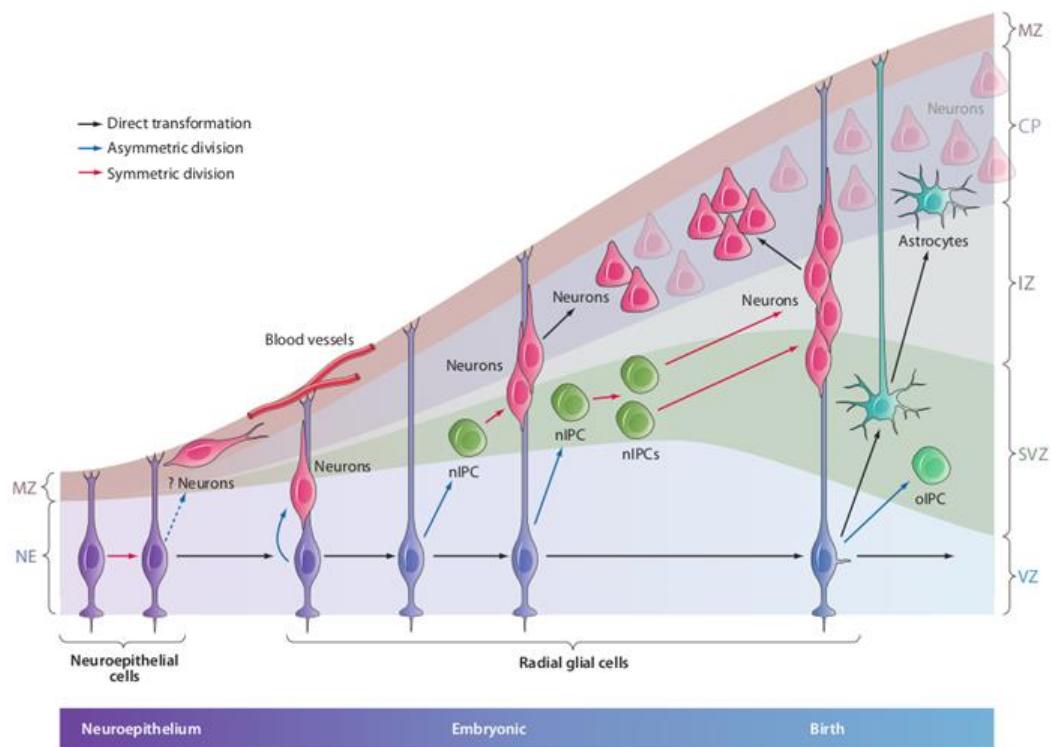


Figura 1. Tres modos de neurogénesis durante el desarrollo cortical. RG en la corteza genera neuronas (a) directamente a través de la división asimétrica; (b) indirectamente por generación de nIPC y una ronda de amplificación; o (c) indirectamente de nuevo a través de los nIPC, pero con dos rondas de división y amplificación adicional. Esta etapa de amplificación adicional puede ser fundamental para aumentar el tamaño cortical durante la evolución. Es probable que las subpoblaciones de nIPC se dividan más de una vez en las regiones cerebrales subcorticales, pero esto aún no se ha documentado. CP, placa cortical; IZ, zona intermedia; MZ, zona marginal; nIPC, célula progenitora intermedia neurogénica; RG, glía radial; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular. Tomado de Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009.

Las CMPN en la vida adulta, residen en sitios específicos restringidos del sistema nervioso denominados nichos neurogénicos, que producirán nuevas neuronas y glías. Estos nichos neurogénicos son lugares donde las CMPN, son mantenidas en un microambiente específico y son capaces de responder a señales externas e internas implicadas en la regulación de la dinámica neurogénica (Hsieh, 2012). Diversas señales moleculares como factores de crecimiento y la propia matriz extracelular, determinan el destino de las nuevas células generadas. Es decir, estas células son capaces de obedecer señales intrínsecas, generando una neurogénesis constitutiva, solventando la mantención de la organización histológica y funcional de los circuitos nerviosos y del sistema (Kaslin *et al.*, 2008). Por otra parte, también son capaces de responder a estímulos externos al nicho, modificando su dinámica

neurogénica, tanto para la reparación de estructuras dañadas (Zupanc y Ott 1999; Zupanc, 2006) como para responder en situaciones claves de la vida del animal, generando aumento del tamaño de ciertas estructuras nerviosas (Goldman y Nottebohm, 1983). De esta forma, se asociaría con una respuesta funcional adecuada, como puede ser el aprendizaje y la memoria en relación a nuevas experiencias o contextos (Garthe *et al.*, 2009; Imayoshi *et al.*, 2008; Santarelli *et al.*, 2003; Shors *et al.*, 2001).

El proceso de la neurogénesis tanto en el desarrollo embrionario como en la vida adulta, sigue una secuencia de eventos que incluyen la proliferación celular, producción de progenie y precursores neuronales migratorios, diferenciación celular y la integración en circuitos neurales (Bjornsson *et al.*, 2015).

Nicho neurogénico como un lugar anatómico

Los nichos neurogénicos son regiones restringidas presentes en el encéfalo adulto que, forman un lugar discreto donde residen células y existen señales locales; allí se preserva un microambiente con características embrionarias, capaces de mantener la neurogénesis a lo largo de la vida del animal (Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Bjornsson *et al.*, 2015). Los nichos neurogénicos varían en la ubicación, cantidad y composición celular en el sistema nervioso de los diversas taxa. Además, existen diferencias significativas en las tasas proliferativas y neurogénicas, respecto a la neurogénesis constitutiva y regenerativa (Fig 2) (Alvarez-Buylla y García-Verdugo 2002; Zupanc 1998). Por ejemplo, en mamíferos se generan nuevas neuronas en sólo dos nichos proliferativos y la capacidad neurogénica es extremadamente pequeña en comparación con la cantidad total de células del encéfalo, mientras que en peces la generación constante de nuevas neuronas es extremadamente grande, en diversos nichos neurogénicos extendidos por el encéfalo entero en condiciones fisiológicas (Zupanc, 2006).

Neurogénesis en el encéfalo adulto de vertebrados: mamíferos, aves, reptiles, anfibios

La neurogénesis constitutiva y regenerativa actúa a nivel fisiológico/homeostático y en respuesta a injurias (Chapouton *et al.*, 2007; Kaslin *et al.*, 2007; Becker y Becker, 2008; Zupanc y Sirbulescu, 2011; Alunni y Bally-Cuif, 2016; Barbosa y Ninkovic, 2016). En poiquilothermos la neurogénesis adulta se vincula a la capacidad de crecimiento corporal en la vida post eclosión y presentan buena capacidad neurogénica (Birse, 1980; López-García, 1988; Straznicky, 1972; García-Verdugo *et al.*, 1986; Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002), mientras que en endotermos está restringida.

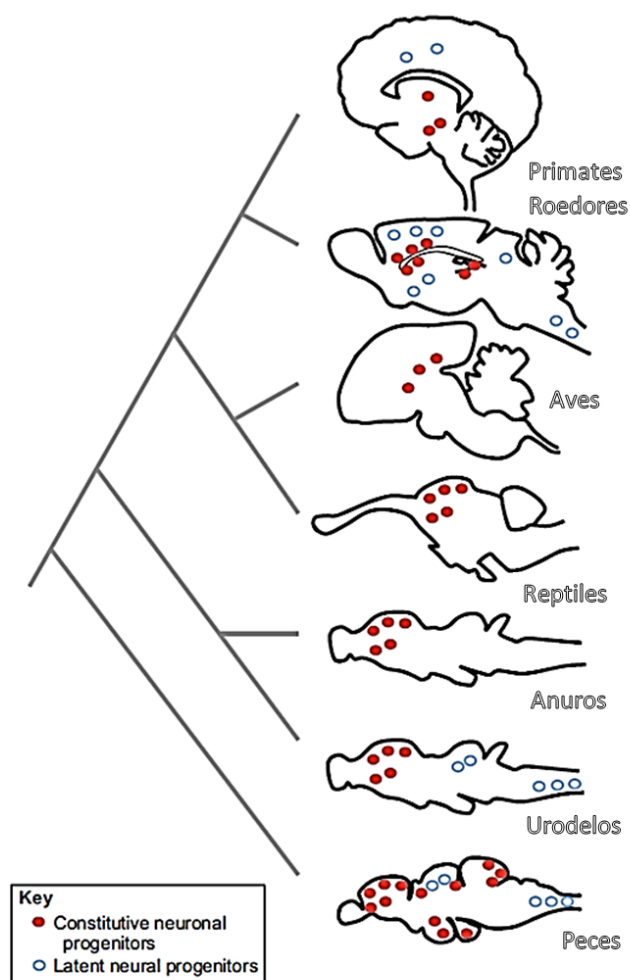


Figura 2. ZP en el encéfalo adulto de diversos vertebrados actinopterigios y sarcopterigios. Los puntos rojos indican la localización de progenitores en proliferación constitutiva y los celestes la ubicación de progenitores latentes. Tomado y modificado de Alunni A. y Bally-Cuif L, 2016.

En los mamíferos existen dos nichos neurogénicos bien establecidos localizados en el telencéfalo: uno en la zona subventricular (ZSV) de las paredes de los ventrículos laterales y otro en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Altman, 1965; Altman, 1969; Lindsey y Tropepe, 2006; Grandel y Brand, 2013). Las células generadas en la ZSV de los ventrículos laterales, comienzan la diferenciación a neuroblastos inmaduros durante su migración tangencial a grandes distancias en dirección rostral. Esta migración se da por una estructura de tipo túnel formada por astrocitos, denominada banda migratoria rostral (BMR), que va desde la ZSV hasta el bulbo olfatorio (Fig 3) (Lois *et al.*, 1996; Pencea *et al.*, 2001). En esa región los neuroblastos pueden migrar radialmente desde la BMR y alcanzar su diferenciación e integración funcional, dando lugar a nuevas interneuronas granulares GABAérgicas inhibitorias y neuronas periglomerulares dopaminérgicas (Luskin 1993; Lois y Alvarez-Buylla 1994; Carleton *et al.*, 2003). Las células generadas en el nicho de la zona subgranular, migran una distancia corta como neuroblastos, se diferencian en neuronas granulares y se integran al giro dentado del hipocampo (Gage, 2000; Bayer, 1982; Kaplan, 1977; Cameron *et al.*, 1993; Eriksson *et al.*, 1998; Seri *et al.*, 2001; Kempermann *et al.*, 2004; Seri *et al.*, 2004).

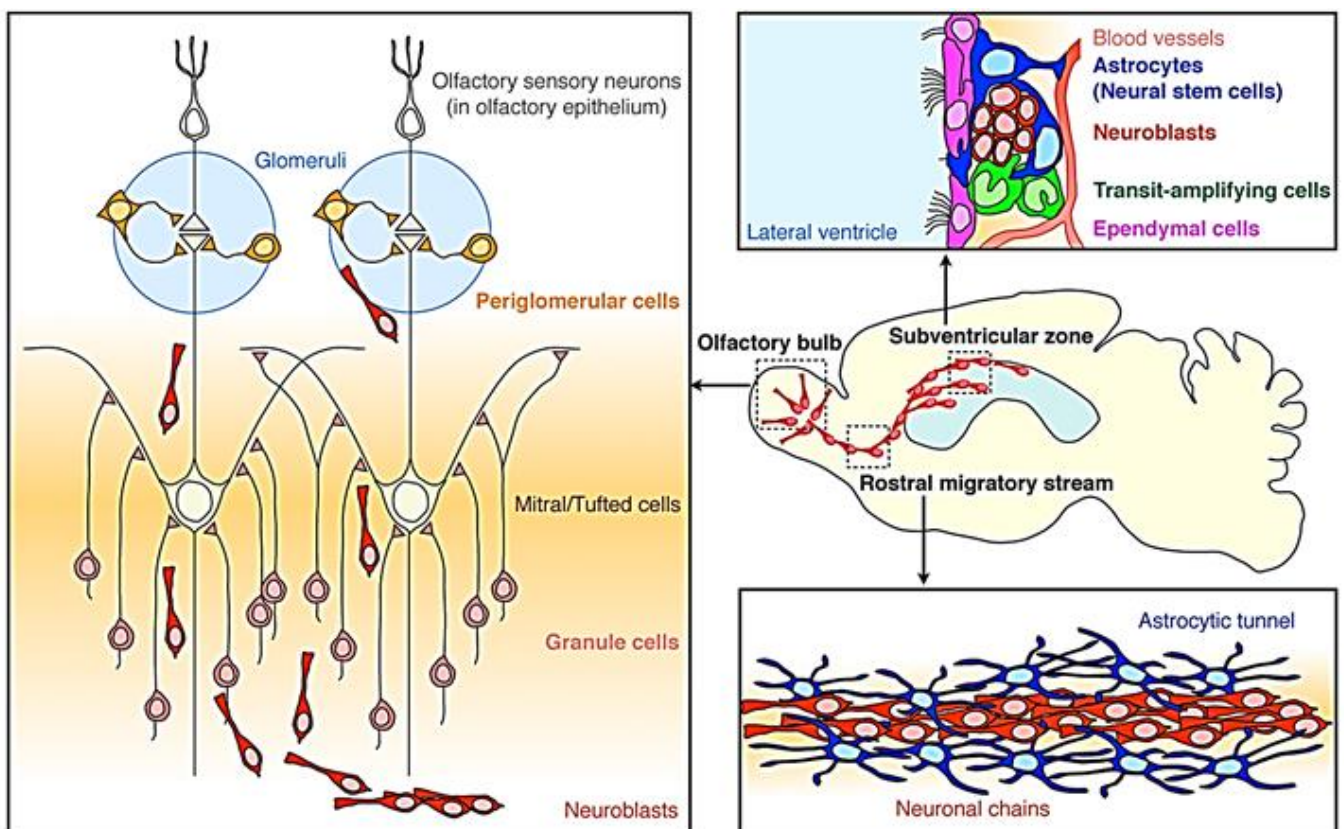


Figura 3. En la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral, hay cuatro tipos distintos de células: células endodiales (púrpura), astrocitos (azul), células amplificadoras transitorias (verde) y neuroblastos (rojo). Los

astrocitos SVZ entran en contacto con el ventrículo lateral y actúan como células madre neurales que generan células progenitoras neurales llamadas células amplificadoras transitorias las que proliferan activamente y generan neuroblastos. Los vasos sanguíneos que rodean estas células tienen funciones importantes en la regulación de la neurogénesis en la SVZ. Los neuroblastos generados en la SVZ migran hacia el bulbo olfatorio (OB) a través de la corriente migratoria rostral (RMS). Estas células forman agregados en cadena, que están rodeados por túneles compuestos por procesos astrocíticos. Después de llegar al OB, los neuroblastos formadores de cadena se disocian en células individuales y migran radialmente dentro del OB. La mayoría de los neuroblastos se diferencian en células granulares (rosadas) y forman sinapsis con células mitrales/ tufted (amarillas), que son neuronas de proyección en el OB. Una pequeña parte de los neuroblastos continúa su migración radial a los glomérulos ubicados en la capa superficial del OB, donde se diferencian en células periglomerulares (naranja) y forman sinapsis con las neuronas sensoriales olfativas (gris) y las células mitrales/tufted. Tomado de Sawada M y Sawamoto K, 2013.

En gatos y otros mamíferos se observó nuevas neuronas en el neocortex (Altman J. 1962; Kaplan MS, 1977; Gould, 1999; Koketsu *et al.*, 2003; Dayer *et al.*, 2005), aunque en esta región la neurogénesis es controversial y no es ampliamente aceptada. Fuera del telencéfalo, se describió neurogénesis adulta transitoria en el cerebelo (Jacobson 1991), amígdala (Bernier *et al.*, 2002), hipotálamo (Xu *et al.*, 2005), mesencéfalo (Zhao *et al.*, 2003), complejo vagal dorsal (Bauer *et al.*, 2005) y en la médula espinal (Yamamoto *et al.*, 2001).

En aves se han realizado estudios que confirman la existencia de proliferación y neurogénesis adulta constitutiva en las ZV de los ventrículos telencefálicos laterales, en diversas especies (Goldman y Nottebohm 1983; Nottebohm F. 1985; Alvarez-Buylla *et al.*, 1990; Alvarez-Buylla *et al.*, 1994). Al igual que el encéfalo de mamíferos, en las aves alcanzan su máximo tamaño y masa al mes del nacimiento. Sin embargo, en época reproductiva una notable plasticidad se exhibe en núcleos de control del canto (Arnold, 1986; DeVoogd, 1981) como el centro superior de vocalización (CSV) (Kirn *et al.*, 1991; Nottebohm *et al.*, 1994) y en otras regiones del telencéfalo (Nottebohm, 1985; Alvarez-Buylla, 1994) donde nuevas neuronas (Burd, 1985; Paton y Nottebohm, 1984) y glías (Nottebohm, 1985) son generadas constantemente y se integran a los circuitos preexistentes (Alvarez-Buylla y Nottebohm 1988; Alvarez-Buylla *et al.*, 1990; Alvarez-Buylla y Kirn 1997). En contraste con lo descrito en mamíferos, la migración tangencial de los neuroblastos por la BMR, tiene como destino el lóbulo para-olfatorio en los ganglios basales (Alvarez-Buylla *et al.*, 1997). En el hipocampo el número total de neuronas

permanece constante, ya que el reclutamiento de nuevas neuronas compensa la pérdida neta (Barnea y Nottebohm 1996).

En reptiles, se han realizado estudios morfométricos que demuestran un crecimiento significativo en la masa cerebral y del número de neuronas corticales, en la vida post eclosión (López-García *et al.*, 1984; Font *et al.*, 2001; Martínez-Guijarro *et al.*, 1994). Se ha reportado neurogénesis adulta en la cresta dorso-ventricular, la corteza medial (López-García, 1988; Marchioro *et al.*, 2005), en el núcleo esférico (Pérez-Sánchez, 1989) y en el bulbo olfatorio (García-Verdugo, 1989), en el estriado y en el cerebelo (Font *et al.*, 2001). Esto se produce tanto en condiciones fisiológicas como en respuestas a traumas o injurias, pudiendo resolver el daño generado mediante regeneración del parénquima nervioso (Minelli, 1977).

La neurogénesis adulta en anfibios ha sido poco estudiada en relación con otros vertebrados. Se ha descrito que en estos animales existe proliferación y neurogénesis constitutivas en diversas áreas encefálicas (d'Amico, 2001; Raucci *et al.*, 2006) tales como telencéfalo, área preóptica, tálamo, mesencéfalo y cerebelo (Kirsche, 1967; Richter y Kranz 1981; Chetverukhin y Polenov 1993; Bernocchi *et al.*, 1990; Raucci *et al.*, 2006). Los urodelos como las salamandras, presentan una gran capacidad regenerativa en el sistema nervioso, pudiendo reemplazar poblaciones neuronales y reparar fibras nerviosas dañadas recobrando la funcionalidad, tanto en el encéfalo como en médula espinal y retina (Joven y Simon 2018). Sin embargo, en anuros esta capacidad regenerativa en adultos se pierde (Lust y Tanaka 2019).

Neurogénesis adulta en peces

En peces condriictios y ciclóstomos la neurogénesis adulta ha sido poco estudiada, y algunas investigaciones indican neurogénesis adulta en el encéfalo y médula espinal de lampreas (Vidal Pizarro, 2004; Zhang, 2014).

En peces teleósteos una gran cantidad de estudios morfométricos han revelado que luego de la eclosión, el encéfalo aumenta su tamaño (masa) con el progreso de la edad y acompañado al crecimiento del tamaño y el largo corporal del animal (Leonard *et al.*, 1978; Birse *et al.*, 1980; Leyhausen *et al.*, 1987; Brandstatter y

Kotrschal 1989, 1990; Zupanc y Horschke, 1995). Los nichos neurogénicos en el encéfalo de teleósteos son múltiples y se han descrito más de diez presentes en todas las regiones encefálicas a lo largo de todo el eje rostro-caudal (Kirsche 1967; Meyer 1978; Zupanc y Horschke 1995; Byrd y Brunjes, 2001; Zikopoulos *et al.*, 2000; Ekstrom *et al.*, 2001; Zupanc 2000, 2001; Grandel *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2010; Kishimoto *et al.*, 2012; Lindsey y Tropepe, 2014; Lindsey *et al.*, 2014; Olivera-Pasilio *et al.*, 2014; Torres-Pérez *et al.*, 2017) llegando a ser 16 en el zebrafish (*Danio rerio*, Grandel *et al.*, 2006) y 17 en el medaka (*Oryzias latipes*, Kuroyanagi *et al.*, 2010). En estos nichos se ubican CMPN retenidas desde el desarrollo embrionario, generalmente en la ZV (Ekstrom *et al.*, 2001; Zupanc *et al.*, 2005), donde expresan un repertorio de factores de transcripción diferentes al expresados en embriones (Chapouton *et al.*, 2006). La generación de nuevas neuronas en los peces es un fenómeno constitutivo y/o regenerativo de especial relevancia por su gran potencial y capacidad de expresión, teniendo tasas proliferativas de magnitud muy superior frente a otros vertebrados (Lindsey *et al.*, 2018).

Los progenitores neurales en peces teleósteos

Tres tipos celulares básicos presentes en la zona ventricular

La zona ventricular se refiere a la región de la pared ventricular lindante con el líquido cefalorraquídeo. En los peces estos ventrículos son cavidades grandes en comparación con los mamíferos. El tejido que recubre estas cavidades se denomina epitelio endimario y en los peces en particular se conforma de variados tipos celulares entre los que se encuentran las CMPN. Las CMPN incluyen, glías radiales (GR) y células de tipo NE (NE) (Lindsey BW, 2012; Kaslin *et al.*, 2009, Alunni, 2010; Ito *et al.*, 2010, Recher *et al.*, 2013; Lindsey y Tropepe, 2014; Dambroise *et al.*, 2017).

Un tercer tipo celular frecuente poco conocido con respecto a su potencial contribución neurogénica, son las diversas células endimarias que revisten los ventrículos y que tienen características distintivas de las células NE y de las GR (Lindsey *et al.*, 2018). Hallazgos recientes sugieren que en los peces las células

ependimarias también pueden ser progenitores importantes, que participan activamente en la neurogénesis (Galant *et al.*, 2016; Dambrose *et al.*, 2017).

Células de tipo NE

Las progenitoras NE provienen de células madre generadas tempranamente en el desarrollo embrionario, presentan una polarización en el eje apical-basal, y pueden originar todos los tipos de neuronas, astrocitos y otros tipos gliales (Lindsey *et al.*, 2018). Las características relevantes del dominio apical de las células NE, son que presentan un cilio primario y uniones adherentes que establecen una barrera epitelial sobre el lumen ventricular (Seeley y Nachury, 2010). Estas células presentan dos tipos básicos de división, divisiones simétricas expansivas y divisiones asimétricas diferenciadas (Götz y Huttner, 2005; Willardsen y Link, 2011). Las NE forman parte de tres nichos neurogénicos en el adulto, hasta el momento confirmados: en el cerebelo, en el telencéfalo a nivel del *subpallium* y en el tectum óptico. En el cerebelo, estas células NE se ubican en el receso cerebelar, son polarizadas y expresan marcadores típicos de células madre como Nestina (proteína del citoesqueleto), la proteína Sox2 o SRY-box 2 (de sus siglas en inglés Sex determining Region Y-box 2), la homeoproteína Meis1 (Meis) y la proteína de unión al ARN Musashi homólogo 1 (Musashi), pero no marcadores típicos de GR (Kaslin *et al.*, 2009). Estas NE generan progenitores que migran hacia la capa granular donde se diferencian en neuronas granulares (Kaslin *et al.*, 2013). En el *subpallium* existen células NE definidas por la polaridad apical-basal y expresión de Nestina, pero no expresan marcadores específicos de GR (Ganz *et al.*, 2010). Sin embargo, éstas pueden dar lugar a GR en el pez adulto (Dirian *et al.*, 2014). En el tectum óptico se han descrito células NE que expresan Her-5 (marcador de células madre) retenidas en la región caudal y tienen un ciclo lento (Galant *et al.*, 2016). Estas NE dan lugar a progenitores amplificadores que residen en la zona marginal tectal, donde se ha definido que el linaje NE está compuesto de al menos tres estados de CMPN caracterizados por la expresión de marcadores y la cinética del ciclo celular (Galant *et al.*, 2016; Ito *et al.*, 2010).

Células gliales radiales

En aves, reptiles, anfibios y peces la GR, permanece en el encéfalo adulto y sustentan la actividad neurogénica, en peces la GR se distribuye en todo el sistema nervioso central (Pellegrini *et al.*, 2007; Rothenaigner *et al.*, 2011; Chapouton, 2010; März, 2010). Morfológicamente, estas células poseen un soma, que se ubica en las proximidades de la luz ventricular y emite una o dos proyecciones en sentido radial, respecto a la superficie del ventrículo (Alvarez-Buylla *et al.*, 1987; Alvarez-Buylla *et al.*, 1988; Gray y Sanes, 1992; Noctor *et al.*, 2002; Zupanc y Clint 2003). Este proceso radial puede terminar en la superficie pial o en un vaso sanguíneo (Fig 4). Cuando el soma se ubica en la ZSV es decir, distante de la superficie ventricular, además del proceso radial característico, emite un proceso pequeño denominado “pie”, dirigido hacia la luz ventricular, donde tiene contacto con el líquido cefalorraquídeo (Rakic, 1990; Cameron y Rakic, 1991; Bentivoglio y Mazzarello, 1999; Noctor *et al.*, 2002). El proceso radial de la GR participa en la guía de las neuronas jóvenes migratorias tanto en el encéfalo intacto como en el lesionado y posee un rol importante como fuente de sustancias tróficas que promueven la generación, diferenciación y supervivencia de nuevas neuronas (Zupanc y Clint, 2003).

En diferentes etapas del desarrollo del embrión, las células NE se transforman en células gliales radiales. Esta fase de transformación es detectada por la expresión de marcadores gliales específicos incluidos el transportador de glutamato/aspartato, la subunidad beta de la proteína de unión al calcio, la proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP) y la enzima glutamina sintetasa (Gotz y Huttner, 2005; Pinto y Gotz, 2007; Than-Tron y Bally-Cuif, 2015; Diotel, *et al.*, 2015). También comienza la expresión de una variedad de proteínas del citoesqueleto, particularmente filamentos intermedios tales como vimentina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Alvarez-Buylla *et al.*, 1987; Mori *et al.*, 2005). Estas proteínas del citoesqueleto van a otorgarles a las GR la estructura característica. La transición de NE a GR no ocurre abruptamente y las GR en vías de diferenciación aún mantienen algunos caracteres de las NE tales como expresión de Nestina, la polaridad apical-basal, uniones adherentes y cilio primario (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

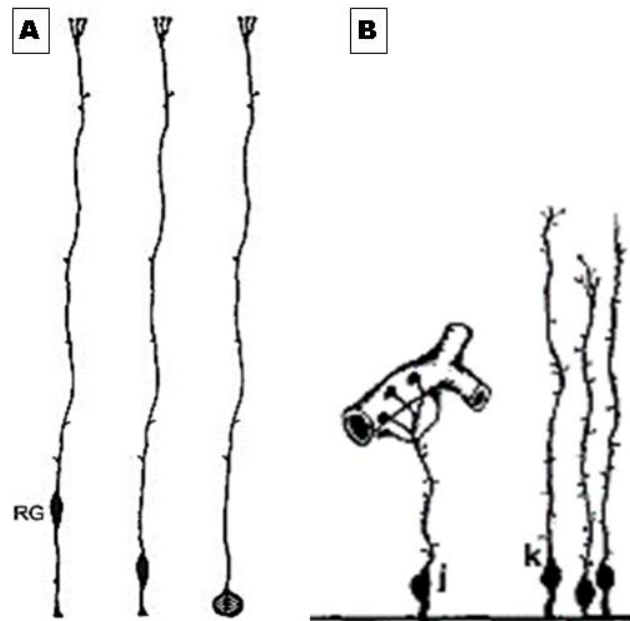


Figura 4. Glías radiales. En A se observa que las glías radiales tienen distintas morfologías dependiendo de la posición del núcleo. En B se observan glías radiales cuyos procesos radiales terminan en la superficie pial o en la pared de vasos sanguíneos. A Tomado de Noctor SC *et al.*, 2002. B Tomado de Rakic P y Cameron, 1991.

Las GR presentes en diferentes estructuras encefálicas de teleósteos adultos, representan una población altamente heterogénea llegando a constatarse la presencia de más de 6 morfologías ultraestructurales distintas en el telencéfalo (Lindsey *et al.*, 2012). Se han establecido relaciones jerárquicas de las CMPN en relación a su potencialidad como precursores neurales. Por ejemplo, en la ZV del telencéfalo de pez cebra se describieron, de mayor a menor jerarquía, células gliales radiales inducibles quiescentes (GRq; progenitores de tipo 1), células gliales radiales constitutivas de división activa (GRp; progenitores de tipo 2) y neuroblastos (progenitores de tipo 3) (März *et al.*, 2010). Sin embargo, en los lugares donde existen células NE (*e.g.* cerebelo, tectum óptico) parecen ser la población primaria de células madre ubicadas en la parte superior de la jerarquía neurogénica a pesar de la presencia de GR (Kaslin *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010; Alunni *et al.*, 2010; Lindsey *et al.*, 2018).

En todos los teleósteos estudiados (*Porichthys notatus*, *Odontesthes bonariensis*, *Oncorhynchus mykiss*, *Thalassoma bifasciatum*, *D. rerio*, *O. latipes*) además de los marcadores embrionarios y del citoesqueleto antes mencionados (*e.g.* vimentina, Nestina, GFAP, BLBP), se ha demostrado la presencia del ARN mensajero y la expresión de la aromatasa en la GR ubicada en todas las regiones encefálicas adultas (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003, 2005; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005, 2008, 2010; Marsh *et al.*, 2006; Pellegrini *et al.*, 2007; Diotel *et al.*, 2010;

März *et al.*, 2010). Esta enzima es funcional ya que se ha evidenciado su actividad enzimática mediante diversos estudios bioquímicos que revelaron producción local de estrógenos en el encéfalo entero y en los nichos neurogénicos. La presencia de la aromatasa en la glía radial y su activa síntesis de estrógeno en los nichos neurogénicos, podría ser uno de los mecanismos que gobiernan la alta actividad proliferativa y neurogénica en la vida adulta de los teleósteos.

La enzima aromatasa y la producción de neuroestrógenos

Esteroides en el encéfalo adulto

Las hormonas son elementos esenciales para la regulación de diversos mecanismos homeostáticos en la mayoría de los organismos. Éstas son liberadas por diversas glándulas endócrinas distribuidas por todo el organismo animal. Existen también células productoras de hormonas presentes en el sistema nervioso central, donde ejercen efectos en la adaptación funcional sináptica y en la plasticidad del encéfalo, que el ajuste del organismo a diferentes condiciones (Azcoitia *et al.*, 2017). Se sabe que el encéfalo de los vertebrados posee la capacidad de expresar todas las enzimas de la ruta esteroidogénica, pudiendo sintetizar *de novo* esteroides funcionales con efectos pleiotrópico locales (Zohar *et al.*, 2009). Diversos estudios muestran que las hormonas esteroideas, particularmente los esteroides sexuales como los estrógenos (Fester *et al.*, 2012; Brandt *et al.*, 2013; Sellers *et al.*, 2015; Sager *et al.*, 2017), progesterona (Sakamoto *et al.*, 2001, 2002; Zhao *et al.*, 2011), y testosterona (Manolides y Baloyannis, 1984; Devoogd *et al.*, 1985), modulan la plasticidad neuronal y la sinaptogénesis/espinogénesis. También se han caracterizado bien por su papel en los procesos de aprendizaje y memoria (Frye y Walf, 2008; Frye *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2012; Celec *et al.*, 2015; Frick *et al.*, 2015). Además, los estrógenos, progestinas y andrógenos muestran efectos neuroprotectores a través de mecanismos genómicos y no genómicos (García-Segura, 2009; López-Rodríguez *et al.*, 2015).

Los estrógenos son sintetizados a partir de la aromatización de andrógenos tales como la testosterona, por una enzima codificada en el gen *cyp19a1*, la aromatasa. El rol de esta enzima en el encéfalo se ha estudiado utilizando inhibidores tales

como letrozole o fadrozole, los cuales han indicado que la síntesis local de estradiol regula tanto el comportamiento y la cognición en animales machos y hembras, así como también posee grandes efectos neuroprotectores (Moradpour *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2013; Tuscher *et al.*, 2016; Azcoitia *et al.*, 2001; Saldanha *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014). Se ha revelado que la presencia y actividad de la aromatasa en el encéfalo, es un carácter conservado filogenéticamente, ya que se encuentra en todos los vertebrados (Balthazart *et al.*, 1990; Abdelgadir *et al.*, 1997; Ishunina *et al.*, 2005; Biegon *et al.*, 2010; Cohen y Wade, 2011).

Breve reseña de la esteroidogénesis

La esteroidogénesis es el proceso enzimático por el cual el colesterol es convertido en hormonas esteroideas biológicamente activas (Fig 5). Estas hormonas esteroideas surgen de diversos procesos catalíticos de la ruta esteroidogénica, que comienza en el colesterol de 27 carbonos (C27) y pasando por los andrógenos (C19) termina en estrógenos de 18 carbonos (C18). Esta ruta se lleva a cabo en varios compartimentos celulares de una o de diferentes células. La mayoría de las enzimas que actúan en la esteroidogénesis, pertenecen a la superfamilia de hemoproteínas citocromo P450, codificadas por los genes de la familia *CYP* (Nebert *et al.*, 2004; Uno, 2012). El primer paso enzimático y limitante de la velocidad del proceso esteroidogénico es la conversión del colesterol en pregnenolona por escisión de la cadena lateral P450 (P450_{scc}; *CYP11A1*). Luego ocurren una serie de catálisis de las que derivan progestágenos y andrógenos y, en un paso final, de estos últimos pueden derivar estrógenos. El complejo enzimático de la aromatasa, es encargado de convertir la androstenediona y la testosterona en estrona (E1) y estradiol (E2), respectivamente. Otras actividades enzimáticas colaterales de la vía, conducen a la síntesis de 5 α -dihidrotestosterona (DHT), cortisol y corticosterona, entre otros esteroides.

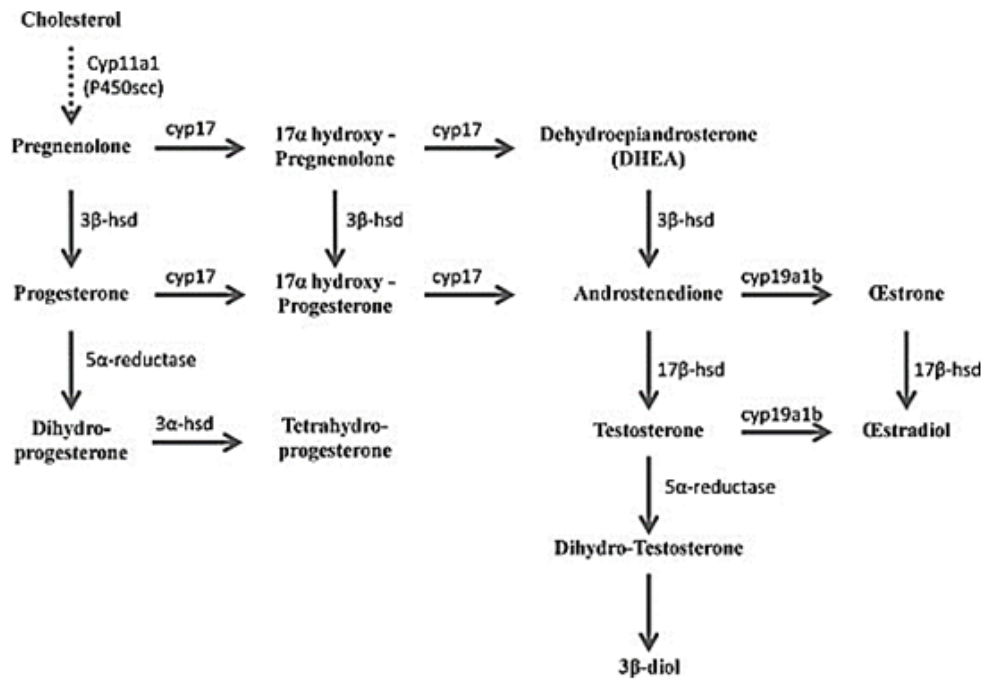


Figura 5. Esquema de la ruta esteroidogénica postulada para los vertebrados. Tomada de Diotel *et al.*, 2010.

Aromatasa y neuroestrógenos en el encéfalo de los vertebrados

Muchas regiones encefálicas expresan la aromatasa en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, incluidos los humanos, en los que ha sido identificada mediante hibridación *in situ*, análisis de ARNm, inmunohistoquímica y por evaluación de la actividad enzimática (Balthazart *et al.*, 1990; Abdelgadir *et al.*, 1997; Saldanha *et al.*, 2000; Menuet *et al.*, 2005; Cohen y Wade, 2011; Li *et al.*, 2016).

En condiciones fisiológicas, la aromatasa en el encéfalo de roedores, monos y humanos se expresa principalmente en neuronas y participa en la regulación de la función y plasticidad sináptica (Jakab *et al.*, 1994; Hojo *et al.*, 2004; Yague *et al.*, 2006; Biegon *et al.*, 2010). Se han identificado algunas células gliales inmunoreactivas a la aromatasa en la corteza temporal humana (Yague *et al.*, 2006). Además, la aromatasa se expresa en astrocitos de roedores y en la glía radial de las aves después de una lesión cerebral (García-Segura *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2001, 2004). Se ha detectado la aromatasa en núcleos específicos relacionados al canto en aves canoras (Saldanha *et al.*, 2000) y en el hipocampo de roedores, monos y humanos (Hojo *et al.*, 2004; Prange-Kiel *et al.*, 2006; Ishunina *et al.*, 2007; Ugur *et al.*, 2011; Pietranera *et al.*, 2011; Prange Kiel *et al.*, 2016). En contraste, en el encéfalo de los peces la expresión de la aromatasa se detecta únicamente en la glía

radial (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003; Pellegrini *et al.*, 2007; Strobl-Mazulla *et al.*, 2010).

La síntesis de estrógenos se da como consecuencia de la actividad de un complejo enzimático inmerso en la membrana del retículo endoplasmático liso, en el que participa la aromatasa anteriormente y una flavoproteína, la NADPH citocromo P450 reductasa (Lephart, 1996; revisado en Simpson y Davis, 2001). Estos estrógenos que se forman en el sistema nervioso, reciben el nombre de neuroestrógenos, pero no varían químicamente respecto a los estrógenos gonadales. Se sabe que la actividad de la aromatasa cerebral participa en la masculinización del encéfalo durante el desarrollo mediante la síntesis de estradiol a partir de testosterona secretada por los testículos fetales (MacLusky y Naftolin, 1981). El estradiol induce diferentes efectos sobre las neuronas y las células gliales en el encéfalo masculino para generar diferencias sexuales en la conectividad y función del encéfalo (Arnold y Gorski, 1984). Por otra parte, como ya se ha visto, en la vida adulta los neuroestrógenos cobran propiedades emergentes diferentes a las clásicas acciones en el desarrollo sexual y control de la actividad reproductiva.

Curiosamente, la aromatasa también se expresa en células progenitoras en la ZV y ZSV del neocortex embrionario de ratones (Martínez-Cerdeño *et al.*, 2006). También se ha detectado en células madre neurales aisladas de la ZSV de ratas adultas, mostrando una mayor expresión en machos que en hembras (Waldron *et al.*, 2010; Ransome y Boon, 2015). La expresión de la aromatasa y la síntesis de estradiol por parte de estas células, puede estar involucrada en la regulación de la neurogénesis (Mouriec *et al.*, 2008). De hecho, se ha demostrado que el estradiol derivado del encéfalo regula la neurogénesis en el pez cebra adulto (Diotel *et al.*, 2013) y en el hipocampo de rata en desarrollo (Bowers *et al.*, 2010). En el hipocampo, la actividad de la aromatasa ejerce una regulación de la neurogénesis diferencial entre machos y hembras. El estradiol derivado del encéfalo, promueve la génesis de nuevas neuronas en ratas macho en comparación con las hembras. Además, la aromatasa cerebral es necesaria para la neurogénesis en la ZSV después del accidente cerebrovascular en ratones (Li *et al.*, 2011).

En el libro “Evolución por duplicación de los genes” de Suzumu Ohno 1970, se sugiere que el vasto genoma de los vertebrados surge mediante eventos de duplicaciones completas. Tempranamente en vertebrados hubo dos duplicaciones

completas del genoma denominadas 1R y 2R. Una tercera duplicación conocida como 3R, se da únicamente en el linaje de los teleósteos ancestrales, donde los genes pueden tomar líneas evolutivas diferentes, conservarse o perderse (Ohno, 1970). Uno de los genes que dio lugar por evolución independiente a dos parálogos, fue el gen de la aromatasa, el *cyp19a1*. De esta forma los peces teleósteos tienen al menos dos loci *cyp19A1* separados y distintos con dominios de expresión subdivididos (Fig 6) (Jeng *et al.*, 2012). En la mayoría de los teleósteos estudiados, *cyp19a1b* codifica la isoforma P450aromB (aromB) en el encéfalo, retina y pituitaria. Estos tejidos expresan niveles de *cyp19a1b* excepcionalmente altos (Tchoudakova y Callard, 1998; Gelinad, *et al.*, 1998; Kishida y Callard, 2001; Jeng *et al.*, 2012). La otra isoforma de ARNm es P450aromA (aromA) codificada por uno o más genes *cyp19a1a*, y su expresión se da más que nada a nivel gonadal. Es decir, la *cyp19a1b* se expresa predominantemente en tejidos neurales o neuroendócrinos y *cyp19a1a* se expresa predominantemente a nivel gonadal si bien ambas son capaces de aromatizar andrógenos (Tchoudakova y Callard, 1998).

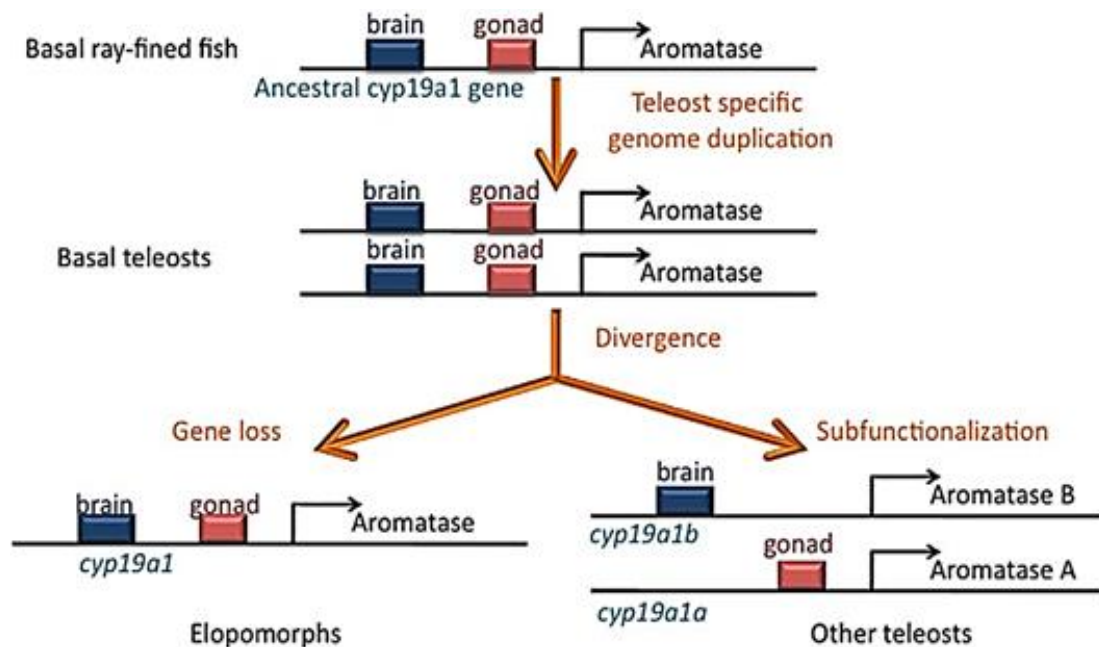


Figura 6. Esquema de la hipótesis sobre la evolución del gen *cyp19a1* en el linaje Actinopterygii (peces con aletas radiadas). De un gen ancestral que tiene funciones cerebrales y gonadales, la duplicación del genoma específico de teleósteos dio origen a dos copias que evolucionaron de manera diferente en teleósteos. Poco después de la duplicación, en elopomorfos (anguilas) probablemente perdieron una copia del gen *cyp19a1* y esta copia restante retuvo las funciones del cerebro y la gónada. En otros peces teleósteos, se produjo un proceso de subfuncionalización que llevó a la partición de funciones entre las dos copias, *cyp19a1a* (gónada) y *cyp19a1b* (cerebro). Tomada de Jeng, S-R *et al.*, 2012.

El árbol filogenético de aromatasas en vertebrados, muestra que las isoformas aroB forman un clado que se ramifica por separado de la isoforma aroA en peces teleósteos (Fig 7) (Kishida y Callard, 2001), y las secuencias de mamíferos y aves forman un tercer grupo distinto.

Por lo tanto, en peces teleósteos existe una expresión diferencial tejido-específica de dos aromatasas diferentes, aroA que tiene alta expresión y actividad enzimática a nivel gonadal y aroB que tiene alta expresión y actividad enzimática a nivel encefálico.

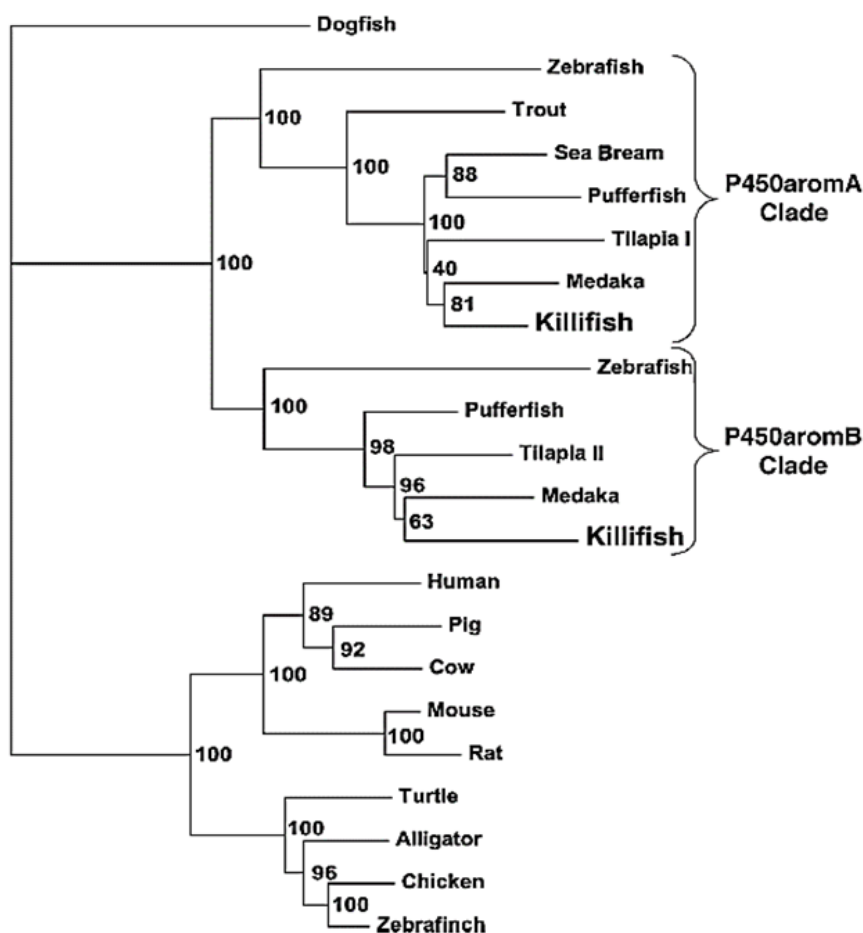


Figura 7. Árbol filogenético de proteínas aromatasas A y aromatasas B. Las secuencias de aminoácidos deducidas de killifish P450aromA y P450aromB se alinearon con aromatasas de vertebrados representativos, y se analizaron para producir un árbol de consenso de con el tiburón canino como grupo externo designado. Tomado De Greytak et al. (2005).

La aroB sólo se expresa en la GR de peces en estadíos larvarios y también en adultos (Santen *et al.*, 2009; Le Page 2010). Los datos recientes sugieren que esta situación en los peces bien podría ser una exageración de un mecanismo más general que comprometen a los neuroestrógenos en la neurogénesis (Mouriec, 2008). A diferencia de otros vertebrados, en los que la actividad de la aromatasas del encéfalo disminuye después del nacimiento, los teleósteos adultos exhiben una actividad de la aromatasas intensa, mucho mayor que otros vertebrados, siendo hasta mil veces

superior que en mamíferos (Fig 8) (Pasmanik, 1985; Mills, 2014). Este mecanismo implica receptores de estrógenos vinculados a un elemento de respuesta a los estrógenos (ERE) que se encuentra en el promotor *cyp19a1b*, y la especificidad celular se consigue mediante una cooperación obligatoria entre los receptores de estrógeno y factores gliales no identificados (Callard, 2001; Menuet *et al.*, 2005; Le Page *et al.*, 2008; Mouriec *et al.*, 2008).

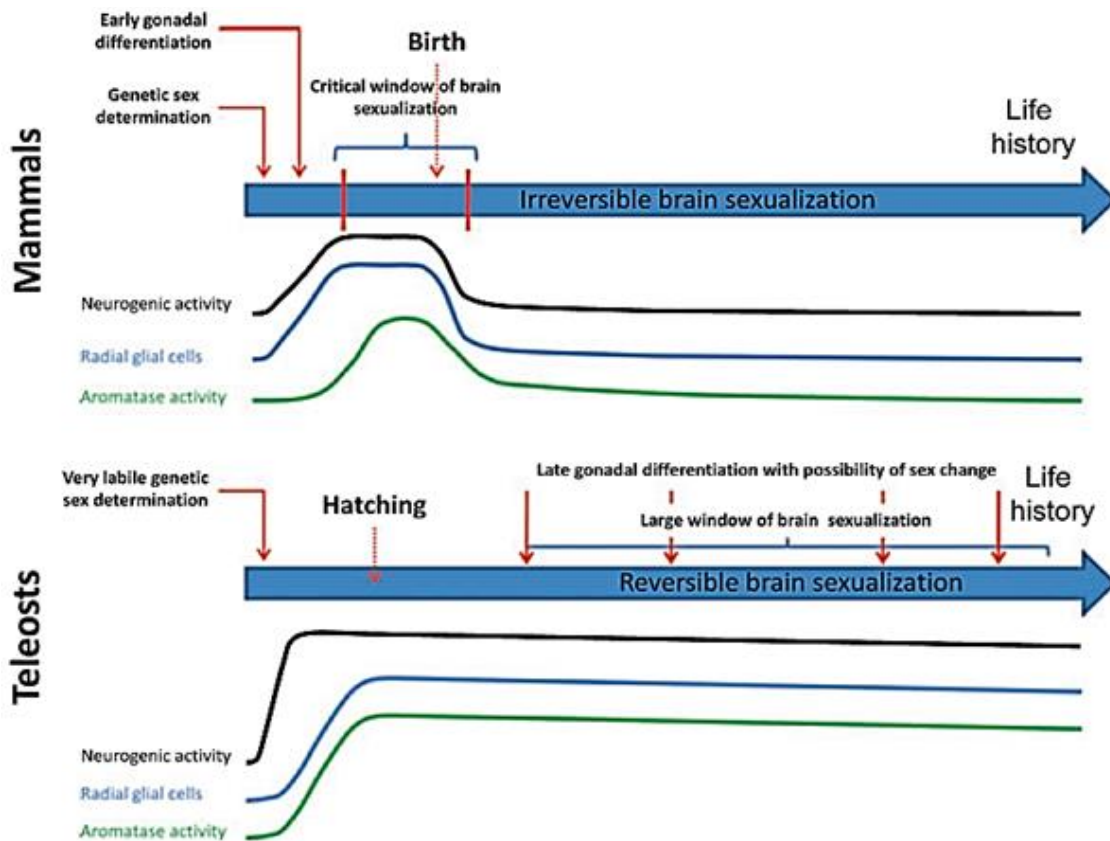


Figura 8. Comparación entre la actividad neurogénica, la presencia de glía radial y actividad de la aromatasa en el cerebro de mamíferos y teleosteos a lo largo de toda su vida. Tomado de De Le Page *et al.*, (2010).

Debido a su naturaleza lipídica, los estrógenos pueden atravesar fácilmente las membranas biológicas y contactar con los receptores de estrógeno (ER) donde por acción mediada por ERE, dan lugar a la expresión de *cyp19a1b*, aumentando la cantidad de aroB en la célula, y consigo más producción de estrógenos (Fig 9) (Callard, 2001; Menuet *et al.*, 2005; Le Page *et al.*, 2008). Esto forma un círculo en el que la expresión de aroB está regulada por el propio producto de su actividad enzimática. El hecho de que los ERE solo estén presentes dentro de la secuencia promotora de *cyp19a1b* y no de *cyp19a1a*, puede proporcionar evidencia de que ERE es un factor de transcripción funcional implicado en el proceso neurogénico y de otras actividades implicadas con aroB (Le Page *et al.*, 2008).

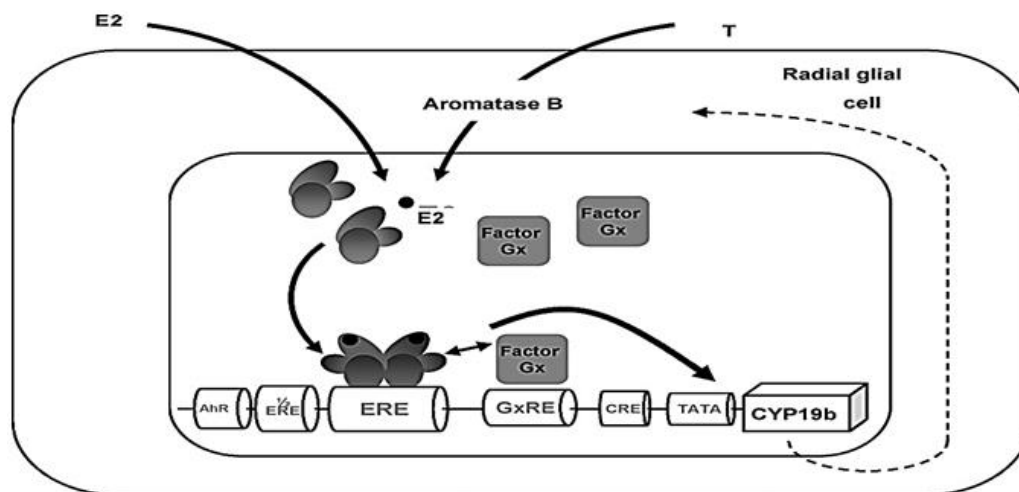


Figura 9. Representación esquemática de la hipótesis propuesta para la expresión de la aromatasa en las células de peces. La cooperación obligatoria entre el receptor de estrógenos y un factor específico glial (Gx), que se une a una secuencia de GxRE corriente arriba del ERE, produce una alta sensibilidad del gen *cyp19b* a E2. Esta hipótesis también explica cómo la testosterona (T) también regula la expresión de la aromatasa B. Tomada de Mouriec K *et al.* (2008).

Los peces tienen tres receptores de estrógenos nucleares resultantes de una de las ancestrales duplicaciones del genoma: un ER α y dos ER β . El ER α y el ER β probablemente surgieron de un primer evento de duplicación antes de la aparición de especies con aletas radiales. Una segunda duplicación llevó a la aparición de dos genes ER β y ER α , pero la segunda copia del ER α probablemente desapareció (Thornton, 2001; Bardet *et al.*, 2002; Nagler *et al.*, 2007). Se identificaron genes de receptores de estrógenos nucleares [ER α (*esr1*), ER β 1 (*esr2b*) y ER β 2 (*esr2a*)] en muchas especies de teleosteos, incluida la trucha arco iris (*O. mykiss*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), medaka (*O. latipes*), pez dorado (*C. aurata*) y pez cebra (*D. rerio*) (Pakdel *et al.*, 1990; Muñoz-Cueto *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2008; Menuet *et al.*, 2002; Forlano *et al.*, 2005; Nagler *et al.*, 2007; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2008; Chakraborty *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Katsu *et al.*, 2013), entre otros. Además, los tres receptores de estrógeno se describen en muchas áreas encefálicas de los peces teleosteos (Menuet *et al.*, 2002, 2004).

Actualmente, se sabe que al igual que en mamíferos, aves y anfibios, en el encéfalo de los peces teleosteos, se da un contexto esteroidogénico en el cual se expresan enzimas esteroidogénicas, éstas son funcionales y generan neuroesteroides activos y existen receptores de estrógeno en todo el encéfalo. Es probable que los receptores de estrógeno tengan una muy baja expresión, pero suficiente como para inducir la expresión de *cyp19a1b* (Diotel *et al.*, 2011).

En experimentos de lesión del encéfalo del pez cebra, la modulación del ambiente estrogénico por tratamiento con estradiol o con bloqueadores de ER, no genera diferencias significativas en la proliferación de CMPN (Diotel *et al.*, 2013). Además, no se mostró una sobre expresión de los receptores estrogénicos en el pez cebra lesionado, como se muestra para algunas isoformas en roedores (Diotel *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2015). Dichos datos no están de acuerdo con la literatura en roedores donde se reconoce que el estradiol favorece la proliferación celular después de un accidente cerebrovascular (Li *et al.*, 2011).

Sin embargo, en relación a la neurogénesis constitutiva del pez cebra, el tratamiento con estradiol disminuye la proliferación celular en varias regiones del encéfalo de machos y posiblemente afecta la migración y la supervivencia de las células, sin afectar la diferenciación (Diotel *et al.*, 2013) ya que se hipotetiza que los estrógenos participan tanto en los mecanismos de proliferación como en la migración y diferenciación (Fig 10). El bloqueo de ER condujo a un aumento en el número de células proliferantes en dos regiones, la transición de los bulbos olfativos/telencéfalo y el hipotálamo. Estos datos sugieren que el estradiol tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de GR en el pez cebra adulto, mediada por ER (Diotel *et al.*, 2013).

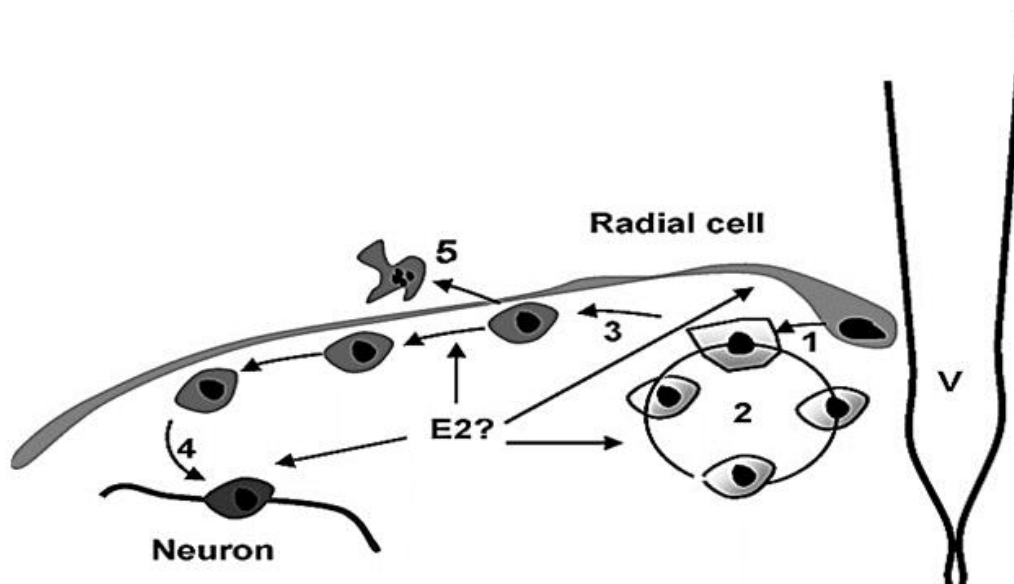


Figura 10. Representación esquemática de la hipótesis actual sobre el papel de las células gliales radiales en la neurogénesis de adultos en peces. Las células gliales radiales se dividen por división asimétrica y dan a luz nuevas células (1). Dichas células recién nacidas pueden ocasionalmente dividirse (2) o migrar a lo largo de los procesos radiales largos (3) para dar origen a nuevas neuronas (4). También es posible que las células recién nacidas se sometan a apoptosis. Tomada de Mouriec K *et al.* (2008).

Teniendo en cuenta los roles emergentes de los neuroestrógenos en la neurogénesis, conocer cómo el contexto esteroidogénico modula la neurogénesis adulta, podría ayudarnos a conocer la fisiología normal y patológica que subyace a este fenómeno.

El rol de los neuroestrógenos sobre la actividad proliferativa y por ende, de la neurogénesis adulta, puede ser analizado utilizando inhibidores de la aromatasa. Una molécula utilizada con este fin, es el fadrozole (Fad), que es altamente efectivo reduciendo la actividad enzimática de la aromatasa (Wade *et al.*, 1994).

El FAD como inhibidor de la actividad enzimático de la aromatasa

Un químico disruptor endócrino (QDE) ha sido definido por la Organización Mundial de la Salud (2002), como "*una sustancia o mezcla exógena que altera las funciones del sistema endocrino y, por consiguiente, produce efectos adversos para la salud en un organismo intacto, o su progenie, o (sub)poblaciones*". Los mecanismos de acción de los QDE se pueden dividir en: (1) efecto agonístico/antagonista ("hormonas imitadoras"), (2) interrupción de la producción, transporte, metabolismo o secreción de hormonas naturales, e (3) interrupción de la producción y/o función de los receptores hormonales.

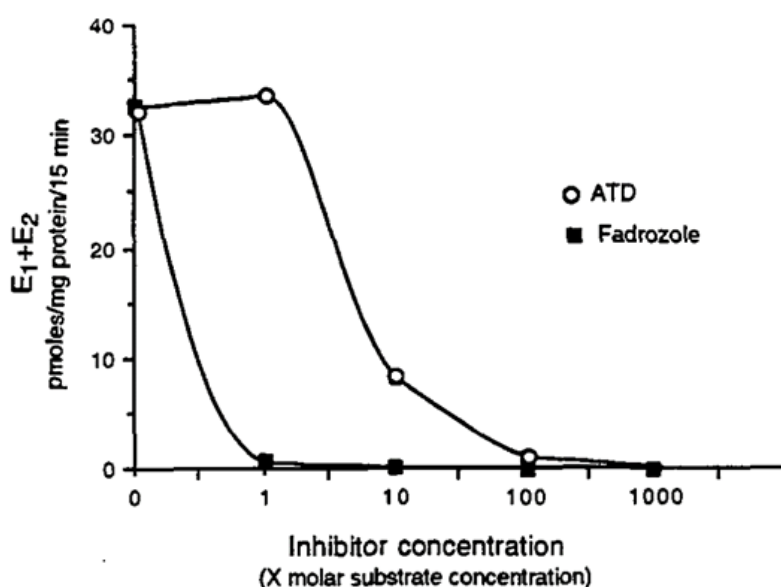


Figura 11. Inhibición de la actividad aromatasa en el encéfalo de pinzón, utilizando andostatriendiona (ATD) y FAD. Tomado de Wade *et al.* (1994).

Existen una serie de QDE naturales o de elaboración artificial, que son capaces de alterar una o varias de las vías de síntesis de hormonas incluyendo las esteroideas. El FAD es un competidor inhibitorio reversible de la aromatasa donde se ha descrito que baja significativamente la biosíntesis de estradiol en mamíferos, aves y peces (Fig 11) (Afonso *et al.*, 1999; Afonso *et al.*, 2000; Elbrecht y Smith, 1992; Schieweck *et al.*, 1988; Steele *et al.*, 1987; Ankley, 2002). También se ha comprobado que, en peces a diversas dosis y en tratamientos agudos y crónicos con Fad, se modifica la expresión del *cyp19a1b*, dependiendo del sexo y del estadio sexual (Villeneuve *et al.*, 2008; Shanthanagouda *et al.*, 2014).

El modelo de estudio y antecedentes sobre la neurogénesis adulta

El modelo biológico

En esta tesis de maestría, se utilizó un teleósteo nativo el Uruguay, cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

Orden: Ciprinodontiformes

Familia: Rivulidae

Género: *Austrolebias*

Especie: *Austrolebias charrua*

A. charrua pertenece al grupo de especies endémicas de las tierras bajas del sistema de drenaje Patos-Merin (Costa y Cheffe, 2001; García *et al.*, 2009; García y Loureiro, 2008). Al igual que otras especies en el complejo, *A. charrua* es altamente dimórfica sexualmente: los machos son más grandes y tienen un patrón de bandas verticales oscuras desde el ojo y por todo el cuerpo, sobre un fondo azul claro que aparece desde el cuerpo hasta las aletas dorsal, ventral y caudal. También presentan una serie de puntos blancos en el cuerpo y aletas (Figura 12). En cambio, las hembras son relativamente crípticas siendo de color pardo (Costa, 2006; García

et al., 2009). Los peces anuales *Austrolebias* comprenden más de 40 especies conocidas, distribuidas en el sureste de América del Sur y se estima que existen algunas más aún no descritas (Costa, 2006; Loureiro *et al.*, 2011; Serra W, 2018). Todas las especies de *Austrolebias* tienen un ciclo de vida particular, por lo que se les denomina peces anuales y comparten con otros rivúlidos y aplocheílidos un modo único de desarrollo embrionario que implica el depósito de huevos resistentes a la desecación en el sustrato de los charcos temporales que habitan (Simpson, 1979). Estos charcos, generalmente, tienen agua en otoño, invierno y primavera que es la estación de lluvias y el suelo es inundable, mientras que en verano se secan por completo. Los embriones pueden experimentar tres períodos de detención del desarrollo o diapausas (Berois *et al.*, 2012; Wourms, 1972), lo que tiene como consecuencia retrasos regulados por factores intrínsecos y/o ambientales del desarrollo hasta que las condiciones ambientales sean favorables para la eclosión de los alevines, es decir, entrada la estación de lluvias y los charcos se vuelvan a formar. Luego, los individuos eclosionan, maduran, se reproducen y mueren en el transcurso de una temporada muy corta (4-6 meses). Los machos y hembras participan en interacciones de cortejo antes de enterrarse total o parcialmente en el sustrato para depositar y fertilizar los huevos (Belote y Costa, 2002; García *et al.*, 2008; Vaz-Ferreira *et al.*, 1964). Estos peces alcanzan la madurez sexual rápidamente dependiendo de su condición corporal, llegando a la pubertad entre las 8 a 12 semanas poseclosión. Una vez alcanzada la madurez sexual, este estado no se revierte nunca, pasando su corta vida con una intensa actividad reproductiva hasta la muerte de los animales (Arezo *et al.*, 2016, pp. 75-92). Esto genera ventajas importantes a la hora de realizar estudios en cautiverio, que estén vinculados con la reproducción y el sistema hormonal reproductivo que el animal despliega, ya que, una vez alcanzada la madurez sexual, el animal se mantiene en ese estado funcional sin variaciones sustanciales (no cicla estacional o sexualmente).



Figura 12. *A. charrua* chacho (izquierda) y hembra (derecha).

Este género de peces se ha tomado como modelo de estudio en diversas disciplinas biológicas como etología, neurociencias, ecología, evolución, genética, biología celular, biología del desarrollo, entre otros. Particularmente para el estudio de la neurogénesis resulta ser un excelente modelo (si no el mejor) debido a que el adulto expresa todas sus potencialidades biológicas en el corto período de vida adulta, como por ejemplo, un rápido desarrollo y crecimiento corporal, y una gran capacidad y rápida neurogénesis ya ampliamente reportada (Fernández *et al.*, 2011).

Antecedentes: estudio de la neurogénesis adulta en *Austrolebias sp.*

El laboratorio de Neuroanatomía Comparada del IIBCE, ha estudiado la neurogénesis adulta en vertebrados, tomando como modelo biológico, entre otros vertebrados, peces del género *Austrolebias*. La génesis de nuevas neuronas en diferentes regiones encefálicas fue demostrada en tres especies de *Austrolebias*, mediante la utilización de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) e inmunohistoquímica (IHQ) en bulbo olfatorio, paredes ventriculares telencefálicas, *torus longitudinalis*, tectum óptico y cerebelo (Fernández *et al.*, 2011). Se ha demostrado que *A. charrua* presenta gran proliferación celular en nichos neurogénicos presentes en toda la ZV, que es capaz de dar lugar a nuevas neuronas en todo el encéfalo (Rosillo *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2011; Torres-Pérez *et al.*, 2017) así como también en la retina (Berrosteguieta *et al.*, 2016). Mediante microscopía electrónica de transmisión se describió la heterogeneidad celular en la región neurogénica de la ZV telencefálica de *A. charrua* en particular la zona transicional que separan los lóbulos telencefálicos de los bulbos olfatorios (Rosillo *et al.*, 2016). Las imágenes de inmunofluorescencia (IF) obtenidas con el anticuerpo anti proteína de unión al ARN específico de neuronas (HuC/D), confirmaron la identidad neuronal de estas células (Rosillo *et al.*, 2010). En mi tesis de grado, mediante la utilización de microscopía electrónica de transmisión, se describieron diferentes tipos de glías radiales diferenciadas por sus características ultraestructurales. Algunas de estas glías presentaron características de células esteroideogénicas que nosotros relacionamos con glías sintetizadoras de aromatasa.

Resumen conceptual

En este contexto los peces teleósteos, en particular *A. charrua*, pueden ser un excelente modelo para estudiar el rol de los estrógenos en los mecanismos que mantienen la neurogénesis constitutiva en la etapa adulta, la fisiología normal y la plasticidad del sistema, debido a que:

1. Muchas regiones encefálicas de peces teleósteos adultos presentan alta actividad neurogénica, la que está relacionada con la permanencia de una gran cantidad de células gliales radiales y otros precursores neurales.
2. El encéfalo de los peces teleósteos adultos presenta una altísima actividad de aromatasa, correspondiéndose con la expresión específica en el sistema nervioso del gen *cyp19a1b*.
3. El gen de aroB o *cyp19a1b* en peces se expresa en las células gliales radiales.
4. La aromatasa puede ser inhibida específicamente utilizando FAD que baja considerablemente los niveles de estradiol en algunas especies
5. *A. charrua* es un modelo biológico emergente donde se ha validado la neurogénesis constitutiva adulta y que posee la ventaja de que, en el estadio adulto se mantiene en estado reproductivo hasta que muere

En este contexto, en la presente tesis se realizó un análisis anatómico general y de distribución de las ZP y de la enzima aromatasa en el encéfalo adulto. Finalmente se estudió el efecto de un inhibidor de la aromatasa en la proliferación celular en las ZP.

Hipótesis

Esta tesis apunta al análisis anatómico macro y microscópico para la generación de un atlas topológico del encéfalo de *A. charrua* que nos permita localizar las zonas proliferativas en el estado adulto.

La hipótesis que postulamos establece que la aromatasa B se expresa en la glía radial del encéfalo adulto de *A. charrua* y produce neuroestrógenos que modulan la actividad proliferativa con potencialidad neurogénica.

Objetivo general

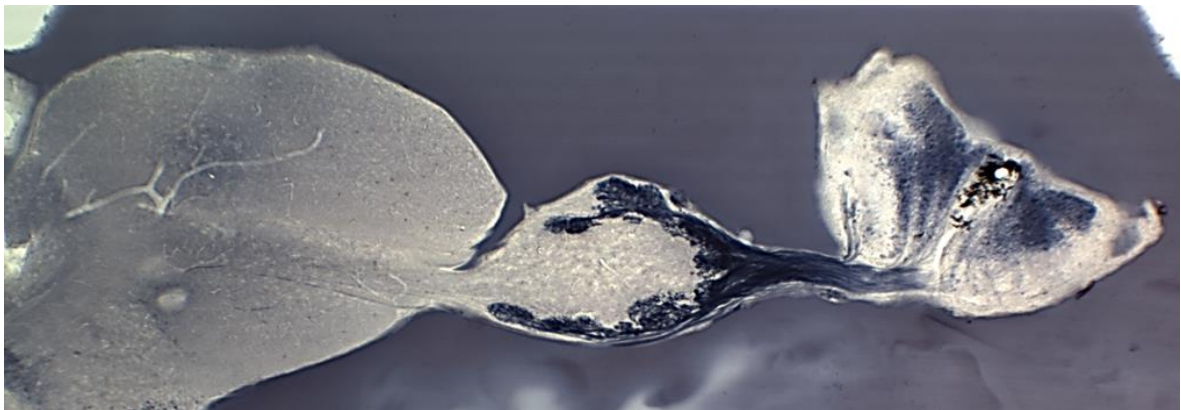
El objetivo general de esta tesis de maestría, fue determinar la distribución de aroB en el encéfalo de *A. charrua* y su vinculación con la actividad proliferativa de las células madre y precursoras neurales.

Objetivos específicos

Identificar y mapear en detalle las diversas estructuras encefálicas de *A. charrua* mediante un análisis morfológico e histológico.

- Identificar y localizar las ZP en el encéfalo adulto.
- Evidenciar la presencia de la enzima aroB en el encéfalo de *A. charrua*.
- Revelar la distribución anatómica y localización celular de aroB en el encéfalo de machos y hembras adultos.
- Determinar los posibles efectos de un inhibidor de la actividad enzimática de la aromatasa sobre la proliferación celular en el encéfalo de *A. charrua*.

Materiales y Métodos



Consideraciones éticas en el uso de los peces en este trabajo

Los protocolos experimentales realizados en esta maestría fueron presentados para su estudio y aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Ministerio de Educación y Cultura. El número de registro del protocolo que incluye los procedimientos es el 004/05/2012.

Objetivo 1 – Estudio neuroanatómico

Para el estudio neuroanatómico se utilizaron peces macho (n=10) y hembra (n=10) adultos de 5 a 6 meses de edad aproximadamente, colectados en charcos temporales localizados en La Coronilla – Rocha, Uruguay. Luego de la colecta se mantuvieron en bioterio a 19°C, alimentados una vez al día con *Tubifex spp.*, en peceras con iguales volúmenes de agua, agrupados de a 2 machos y 4 hembras por pecera, con agua desionizada con agregado de sal marina hasta una conductividad de 300 micro siemens aproximadamente, con aireación permanente.

Fijación por perfusión intracardiaca

Todos los especímenes fueron anestesiados con eugenol al 10% en etanol 96%, en concentración 1:1000. Luego que el animal entró en un plano anestésico profundo (sin reflejo de huida, sin regular la flotabilidad y con débiles movimientos operculares) se realizó la perfusión intracardiaca. Previo a la perfusión del fijador el pez es intubado con una cánula por la boca donde se hacer circular agua a los efectos de mantener bien oxigenado el animal, durante el procedimiento. Primero se removi6 la sangre del aparato circulatorio, realizando un lavado con solución salina (NaCl₂ en agua bidestilada, 0.9%) la cual tiene un vasodilatador (Nitrito de sodio, NaNO₂) para facilitar el lavado y que los vasos no colapsen y un anticoagulante (Citrato de sodio, NaH₂(C₃H₅O (COO)₃), para evitar que se generen trombos cuando la sangre contacte con el fijador. Una vez realizado el lavado se pas6 el fijador paraformaldehído (PAF) (Barker) al 10% disuelto en buffer fosfato (PB;

27,6g de $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 71,2g de Na_2HPO_4 + 2000ml H_2O destilada) 0,1M pH=7,2-7,4, por el sistema circulatorio hasta que el animal presenta signos de buena fijación por dureza de la pieza, logrando la fijación de todos los tejidos corporales. Se disecaron los encéfalos y se postfijaron por inmersión en el mismo líquido fijador en heladera a 4°C hasta el otro día.

Procesamiento histológico

Se lavaron los encéfalos en PB más de 4h y se fotografiaron bajo microscopio estereoscópico para analizar su anatomía externa macroscópica. Algunos encéfalos (2 machos y 2 hembras) fueron cortados en sentido transversal en secciones de 50 μm y montados con PB con el fin de que, por efecto de la densidad diferencial de las estructuras de los tejidos, se pueda detectar las zonas mielinizadas y no mielinizadas y así localizar diferentes vías, tractos y comisuras encefálicas.

Para lograr la preservación de las estructuras encefálicas y lograr cortes de 20 μm en forma seriada, los encéfalos fueron embebidos en gelatina (SIGMA) de concentraciones crecientes siguiendo los siguientes pasos:

- Colocar la pieza en agua destilada
- Colocar la pieza en gelatina al 10%, 37°C, 24h
- Colocar la pieza en gelatina al 20%, 37°C, 24h
- Lavado en agua a 37°C, 10 segundos

Luego de esta imbibición en gelatina realizamos un encastre de los encéfalos para lograr una pieza apta para orientarla en el instrumento de corte con el fin de obtener cortes precisos en los planos de corte deseados. El encastre se realizó en una solución de gelatina-albúmina colocando la pieza orientada en un molde y se le agregó la solución de gelatina 20% (una parte) + albúmina (dos partes) + glutaraldehído una gota. El bloque formado se sumergió en el PAF al 10% en el cual se fijó durante 24h.

El bloque se posicionó en una cubeta de vibrátomo (LEICA VT100S) para la realización de cortes de 20 μm de grosor y montados de forma seriada en portaobjetos gelatinizados. Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente

24h y se realizó la tinción según la técnica de Nissl con azul de metileno 1% en agua destilada, acorde al siguiente protocolo:

- Hidratación en agua destilada 1 min
- Azul de metileno en solución acuosa (1%), 3min
- Lavado en agua destilada
- Deshidratación y diferenciación en alcoholes progresivos:
 - Alcohol 70%, 10min
 - Alcohol 96%, 10min
 - Alcohol absoluto, 10min
- Aclaramiento en xilol con dos pasajes en diferente xilol
- Montado permanente con bálsamo de Canadá y cubreobjetos

Obtención de microfotografías y tratamiento de las imágenes

Se generaron preparados histológicos de secciones encefálicas en tres orientaciones (Fig 13): sagitales (4 machos y 4 hembras), horizontales (2 machos y 2 hembras) y parasagitales (2 machos y 2 hembras). Los cortes seriados finos teñidos con azul de metileno y los gruesos sin tinción fueron fotografiados bajo microscopio fotónico NIKON equipado con una cámara digital (AM Scope MA1000) asistida con el programa ISCapture a 150x de magnificación. En la región anterior y media del encéfalo, se realizó un muestreo de los cortes teñidos cada 60 μ m. En el nivel más caudal del encéfalo donde los cortes varían muy poco en composición histológica, se muestreó cada 150 μ m. Los niveles de corte son representados al lado de cada imagen.

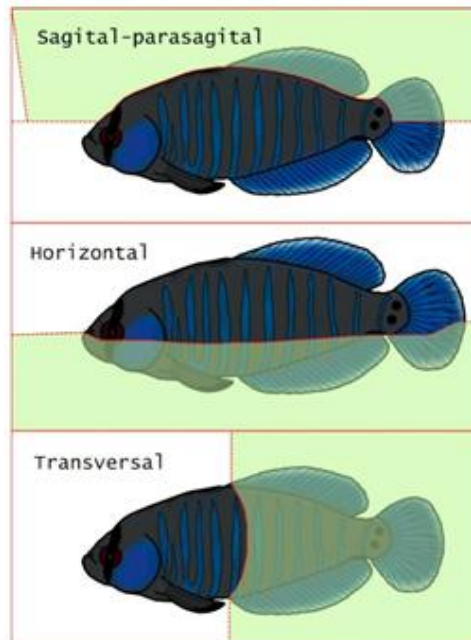


Figura 13. Esquema de los planos de cortes realizados para la obtención de cortes del encéfalo.

Las fotos seleccionadas se cargaron en el programa Adobe Photoshop CC 2017 directamente o utilizando la herramienta “photomerge” para generar composiciones en aquellos cortes en los cuales el tamaño obligó a generar varias fotografías. En este programa se hicieron ajustes mínimos de intensidad de luz, recorte y/o modificación de regiones sin interés, y convertidas en blanco y negro. Sobre las imágenes se dibujaron las diferentes áreas encefálicas localizadas topográficamente por las características de las diferentes estructuras. Fueron mapeados núcleos neuronales y los grupos celulares, localizados en los cortes cerebrales teñidos.

La comparación topológica se realizó en base a lo descrito por Meek y Nieuwenhuys (1998) para *Salmo gairdneri* (actualmente llamado *O. mykiss*) y a diversos atlas neuroanatómicos de teleosteos como *D. rerio* realizado por Wulliman *et al.* (1996), *Nothobranchius furzeri* realizado por D’Angelo (2013), *Sparus aurata* realizado por Muñoz-Cueto (2001), *Toxotes chatareus* realizado por Karoubi (2016), *Anguilla japonica* realizado por Mukauda y Ando (2003), *Oreochromis mossambicus* realizado por Simões (2012), *Tinca tinca* realizado por Arévalo *et al.* (1992), *Apteronotus leptorhynchus* realizado por Maler *et al.* (1991) y *Dicentrarchus labrax* realizado por Cerdá-Reverter *et al.* (2001a, b) para el telencéfalo y di encéfalo y por Cerdá-Reverter *et al.* (2008) para mesencéfalo y rombencéfalo. Para localizar los diferentes tractos y comisuras, se compararon los cortes teñidos con azul de metileno de 20 μ m con los cortes de 50 μ m montados en portaobjetos con PB y

fotografiados, permitiendo la clara localización de estas estructuras. Debido a la amplia utilización como modelo biológico y a los efectos de aplicar términos comparativos, la nomenclatura, terminología y abreviaciones empleadas para designar las diferentes regiones, fue en base a la utilizada en el atlas del encéfalo de *D. rerio* de Wullimann *et al.* (1996). Excepcionalmente se utilizó para la designación de la *tela telencephali* (tt) la nomenclatura de Meek y Nieuwenhuys (1998); la formación coroidea posterior (fcp) según Il (1958); el receso cerebelar (CR) designado en Kaslin *et al.* (2009); el ventrículo infundibular como se designa en Kah *et al.* (1993); y la decusación del área octavolateralis en Muñoz-Cueto *et al.* (2001). Las estructuras descritas son aquellas que se diagnosticaron con claridad y se delimitaron con línea continua en los casos en que sus límites se presentan bien definidos y con líneas punteadas aquellas que sus límites son irregulares o no bien definidos.

Objetivo 2 - Estudio de la proliferación celular

Inyección del marcador de proliferación y revelado

Para cumplir con el segundo objetivo se destinaron seis peces macho y seis hembras y se administró, mediante una inyección vía intraperitoneal (IP), un pulso de 5-bromo-2-desoxiuridina (bromodesoxiuridina o BrdU) a dosis de 100 mg/Kg. Esta sustancia actúa como marcador de proliferación celular ya que se incorpora al ADN nuclear en la fase S del ciclo celular y cada célula que esté en esta fase, desde el momento de administración y durante el tiempo de biodisponibilidad en el organismo, va a incorporarlo. Con un tiempo de una hora de sobrevida posinyección del BrdU, se realizó el anestesiado de los animales y la perfusión intracardiaca como se ha descrito en el apartado anterior. Luego de la perfusión se realizó la disección del encéfalo y se encastró en un bloque de gelatina-albúmina para realizarle cortes en sección transversal a un grosor de 50 μm . A estos cortes se le realizó un protocolo de inmunofluorescencia para el revelado del BrdU, siguiendo los siguientes pasos:

-Incubación en ácido para descubrir epítopes durante 40min: HCl 2N 1,5 ml + 8,5 ml de buffer fosfato tritón (PBT; 100 ml de PB + 300 µl de tritón X-100) 0,1M pH=7,2-7,4, a temperatura ambiente

-Tres lavados de 10min en PB, a temperatura ambiente

-Incubación con anticuerpo primario mouse anti-BrdU 1:500µl en PB, durante toda la noche, a temperatura ambiente

-Tres lavados de 10min en PB, a temperatura ambiente

-Incubación en el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a fluoróforo Alexafluor 488

-Tres lavados de 10min en PB, a temperatura ambiente

-Montaje en una solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y propan 1,2,3-triol (glicerol), en una relación 20:400µl. El DAPI se une fuertemente a los enlaces entre las adeninas y timinas del ADN, por lo que se usa como tinción nuclear y fluoresce en la longitud de onda 405nm.

Para este análisis se realizó un censo rostrocaudal de los cortes seriados, que fueron analizados en un microscopio láser confocal Zeiss Series 800, en el que se obtuvieron fotos panorámicas y en aumentos de 20x y 40x con el fin de analizar la citoarquitectura y morfología nuclear de las ZP.

Objetivos 3 y 4- Detección de aroB en el encéfalo de *A. charrua*

El tercer objetivo de esta tesis fue analizar la distribución de aroB en el encéfalo de *A. charrua*, conocer qué tipo de células la presentan y qué relación tienen con los nichos neurogénicos. Para ello se realizó una validación a nivel genómico de la presencia de aroB y aroA en el encéfalo de *A. charrua* y se realizaron experimentos de inmunolocalización utilizando un anticuerpo primario anti aroB de *D. rerio* (anticuerpo heterólogo) para determinar la distribución de esta enzima en el encéfalo.

Validación de la presencia de aromatasa en el encéfalo

El grupo de investigación de la Facultad de Ciencias-Universidad de Chile, de los doctores Miguel Allende, Luisa Pereiro y Felipe Gajardo, se encuentra ensamblando el genoma de *A. charrua* adulto y nos cedió la información de algunas secuencias compatibles con las secuencias de aroA y aroB en *A. charrua*, así como también una secuencia de ARN ribosomal 18S, utilizado como control de expresión constitutiva.

Las secuencias de *cyp19a1a* y *cyp19a1b* fueron obtenidas a partir del genoma de *A. charrua* y su identidad validada por Blastn (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias génicas de *cyp19a1a* y *cyp19a1b* obtenidas del genoma de *A. charrua*

Gen	Secuencia nucleotídica
<i>cyp19a1a</i>	CTCGTCAAGGCCTCGTGTGTATTGTTTACCGTTTCCCCCTTGCGATGTTGT GGCGTTTTGTTTTACCCTGACCTGGCTCAGAACCAGCTCGGAGGAGCGAC TATAAAGACAACGGTCGGACGATCGTTTGCCTCGCCACGACTCCGGAGC GCTGTTCTGTTCCCTTCTCATGGATCTGACCTGCGATCGGGCGATGATAC CTGTGGGTTTTGGCGGTGCTGTGACAGACCTGGTCTCCAGGTCCTCAAAT ACCACGGAAAGCCAGTCGTCTGGGATTGCCGTGGCGACCAGGACCCTCTT GTTGCTCGTTTGTCTGCTGCTGGTTGCCTGGAGTCACGCGGACAAGAAA CCATCCCAGGACCTTCGTTCTGCCTCGGTCTGGGCCACTGCTGTCTAC CTGAGGTTTCTGACTGGCATCGGAACAGCCAGCAACTACTACAACAA GAAGTACGGCGACATCGTGAGAGTGTGGATCGACGGAGAGGAGACCCTG ATCCTCAGCAGGGCCTCGGCCGTTTCATCACGTCCTCAGGAATGCAAAGTA CACGTCCCGTTTTGGGAGCCAGCGGGGACTCAGCTGCCTGGGCATGAAC GAGAGGGGCATCATCTTCAACAACAACGTGACGCTGTGGAGGAAGATCC GCACGTATTTACCAAAGCCCTGACGGGTCAAACCTGCAGCAGACCGTG GAGGTCTGCGTCTCGTCCACGCAGTTCCACCTGGACGAGCTGGACAGTTT GTCTCGCGTGGACGTCCTCGGTTTGCTGCGCTGCACCGTGGTGGACATCT CCAACAGGCTCTTCTGGACGTGCCTCTCAACGAGAAGGAGCTGCTGCTG AAGATCCAGAAGTACTTCGACACGTGGCAGAGCGTGCTCATCAAACCTGA CATCTACTTCAGGTTGGGCTGGATTCAGCAGAAGCACCAGGCCGCAGCCC AGGAGCTCCAAGACGCCATCGAGGCTCTGGTGGAACAGAAGAGGAGACG

	<p>CATGGAGCAGGCGGACAACTGGACAACATCAACTTCGCAGCAGATCTC ATTTTTGCACAAAACCACGGCGAGCTGTCTGCTGACAACGTGAGGCAGTG CGTGCTGGAGATGGTGATCGCGGGCGCCGGACACGCTCTCCATCAGCCTCT TCTTCATGCTGCTGCTCCTCAAACAGAACCCCGATGTGGAGCTGCAGCTG CTGCAGGAGATCGACTCGGTTCGTAGGAGACCAACAGCTGCAGAACGAAG ATCTCCTGAAGCTGCAGGTTCTGGAGAGTTTCATCAACGAATGCCTGCGC TTTCACCCGGTGGTGGACTTCACCATGCGCCGGGCCCTTTCTGATGACAT CATAGATGGATACAGGGTACCAAAGGGCACCAACATCATCCTGAACACG GGCCGGATGCACCGGACCGAGTTCTTCCACCGAGCAGACGAGTTCAGTCT GGAGAACTTCCAGAGGAATGCCCTCGCCGCTACTTCCAGCCGTTCCGGTT CAGGGCCCAGGGCCTGCGTTGGCAAACACATCGCCATGGTGATGATGAA GTCCATCTTGGTGA CTCTGCTCCGTCAGTACTCCGTGTGCCCCCACCAGG ACCTGAGCCTGGACCACCTCCCCAGACCAACAACCTGTCCCAGCAGCC CGTGGAGCCCCACGAGGGGGCCGAGAGCCTCAGCATGAGCTTTTTACCC CGACTCAGAGGAAAGAGGCTTCAGGCCCTGTAAACTACTCCCCACGTGCA CGCTCCCCACATGCACACGTCTCTGTGTTGCAGTGTGGTTGTAAAAGA AACTTGTATTATTTTGTGCTTTTTCTACACTCCTCGCGACGCATGAAGTA AATGTGAGTTCCTGTTTTCTGATTCATAAATTATTGTTGTTTCGTTGCTTC AGATTATTTAATCATTTTTAAATGAGCACAATAATTTTCAGAGTCTTTTCT CTGTTTTTAAAGTGAAATACACCAAACCTATTTTTATTAAAACGTTTTCTAA AACAACG</p>
<i>cyp19a1b</i>	<p>CAGTCCTTGTAACCTAACAGAATGTTTCTAAGCAACCAGGAGAGTGAAGG TCTAGTGTGCAAGGATTTATAAACACTTGAAGTGCTGTGATTTATTTGGTA CAGGAATGTAGATCACCTTAAAAGCAGAGGAGGGAGGCCTGCGTCTCAT CAAATCCACTTTCATCGTCAGGGACAGGAGACGATAACACAGAGGTGATG ATGCAACCAGAGGAGTTCATCGTGGTTAACAGTCTGCCTGCAGTCACCTC CCTCCTGCTGCTTCTGCTGCTCCTGGTTCTGTTGATCACCGCCTGGAGCC GAACACATCGGTCTCACACACCAGGCCCTTCTTCTTGGCAGGACTTGGT CCGATTCTCTCCTACAGCCGGTTCATTTGGACCGGGATTGGAACAGCGTG CAACTACTACAACCACAAATATGGCAGCACTGTGCGGGTATGGATTGACG GGGAGGAGACCCTCATTTTGGAGCAAGTCGTCTGCGGTGTACCACGTGTTG AGGAGCGCACACTACACCTCCAGATTCGGCAGCAAAGAGGCCTCGAGT GTGTTGGGATGGAGGGCAGGGGAATAATTTTCAACAGTGACATCCCCTC TGGA AAAAAGCGAGGACATCCTTTTCAAAGCTCTGAGCGGCCCCGGCCT TCAGAGGACAGTGGGGATCTGTGTGAGCTCCACA ACTAAACACCTGGACA</p>

<p>ACCTGCAGAGCGTGACCGATCCCTCTGGACACGTGGACACCCTGAGTCTC CTGAGAGCCATAGTGGTGGACATCTCCAACAGGCTGTTCTCAGGGTGCC CCTCAATGAGAAAGACCTGCTGATGAAAATCCACAACACTACTTTGAGACCT GGCAGACGGTTCTGATAAAGCCCGACATTTTCTTCAAGATTGGATGGTTG TACAACAAACACAAGAGAGCAGCCCAGGAGCTGCAGGACGAGATGGAGA GCCTGCTTGAAATAAAAAGAAAGATGATCAATGATGCTGAGAAGCTCGAT GACGACGATCGGGACTTTGCAACTGAGCTCATCTTTGCTCACAATCACGG GGAGCTCTCAGCAGACAACGTCAGGCAGTGCGTGCTGGAGATGGTG</p>

Estas secuencias fueron analizadas *in silico* siguiendo los siguientes pasos:

- Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas en primer lugar usando la herramienta BLAST (National Center for Biotechnology Information, NCBI), y resultaron ser identificadas como *cyp19a1a* y *cyp19a1b*.
- Luego, para confirmar su identidad se realizó la traducción de dichas secuencias en Expasy (<https://www.expasy.org/>). Las secuencias proteicas putativas fueron analizadas por BlastP (BLAST, NCBI) y se confirmó su identidad.
- En base a las secuencias nucleotídicas se diseñaron con el software Primer3plus, oligonucleótidos cebadores para la *cyp19a1a*, *cyp19a1b* y *18s* (Tabla 2)

Tabla 2. Secuencias de cebadores específicos utilizadas para realizar PCR y qPCR

Gen de estudio	Oligonucleótido FW 5'3'	Oligonucleótido RV 5'3'	Longitud en pb
Aromatas a B	CACAGGAGTTCATCGTGGT TAA	CAAGTCCTGCCAAGAAGGA A	149
Aromatas a A	CCAGGTCCTCAAATACCAC G	CAGAACGAAGGTCCTGGGA T	138
ARN 18S	GTGGAGCGATTTGTCTGGT	TCGGAGGAGGGTAGACAC	215

Con ellos se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras cerebrales de *A. charrua* macho y hembra y luego se realizó una corrida

electroforética en gel de agarosa para verificar los tamaños de los productos (Fig 14). También se incluyó un control de reactivos y un control blanco.

- En los geles de agarosa se recortaron las bandas de *cyp19a1a*, *cyp19a1b* y *18s* que fueron purificadas y enviadas a secuenciar en el Instituto Pasteur de Montevideo para corroborar la identidad de cada fragmento.

- Las secuencias obtenidas fueron analizadas con la herramienta BLAST del NCBI corroborándose que el amplicón obtenido correspondía al gen de estudio deseado.



Figura 14. Geles de agarosa donde se corrió la electroforesis de aroB, aroA y 18S donde los carriles de los 3 amplicones tuvieron presencia de productos correspondientes con los tamaños estimados. CR: Control de reactivos. CB: Control blanco.

Análisis filogenético

Usando las secuencias proteicas de *A. charrua*, de aroA y aroB de teleósteos se elaboró un árbol filogenético, de aromatasa de un actinopterigio no teleósteo y utilizando como grupo externo una serie de secuencias obtenidas de NCBI de peces sarcopterigios. Utilizando el programa MEGA v5.2 (por sus siglas en inglés, Molecular Evolutionary Genetics Analysis) se alinearon las secuencias de estudio y se corrieron para la formación de un árbol según el criterio de máxima parsimonia, con un soporte de 1000 *Bootstraps* y dejando las ramas con una confianza mayor a 50%.

Immunolocalización de aroB en el encéfalo junto con marcadores de estirpe celular

Validación del uso del anticuerpo heterólogo para reconocer aroB

Para validar el uso del anticuerpo anti aroB desarrollado contra la proteína de *D. rerio* en los encéfalos de *A. charrua*, se realizó un estudio comparativo del extremo

C- terminal de las aromatasas B de las dos especies, utilizando el soporte en línea Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), que mostró un alto porcentaje de coincidencia en la secuencia aminoacídica (estructura proteica primaria) entre las aromatasas B y menor en comparación con aroA (Fig 15). Por otra parte, al comparar la estructura secundaria las aromatasas B presentaron los mismos dominios conformacionales de hélices alfa y hojas beta, teniendo variaciones con aroA (Fig 15). El soporte Phyre2 generó un modelo tridimensional basado en datos obtenidos para otras secuencias enteras o dominios de gran similitud, la cual se realizó en base a lo descrito a la aromataasa placentaria humana, con la que presentó gran similitud. La representación tridimensional de estas proteínas mostró gran similitud en el plegamiento de la estructura terciaria entre aromatasas B, presentando algunas variantes para aroA, incluso el análisis de asociación con las membranas biológicas muestra que la región C-terminal de aroB, se localiza en un dominio celular diferente que el de aroA (Fig 15).

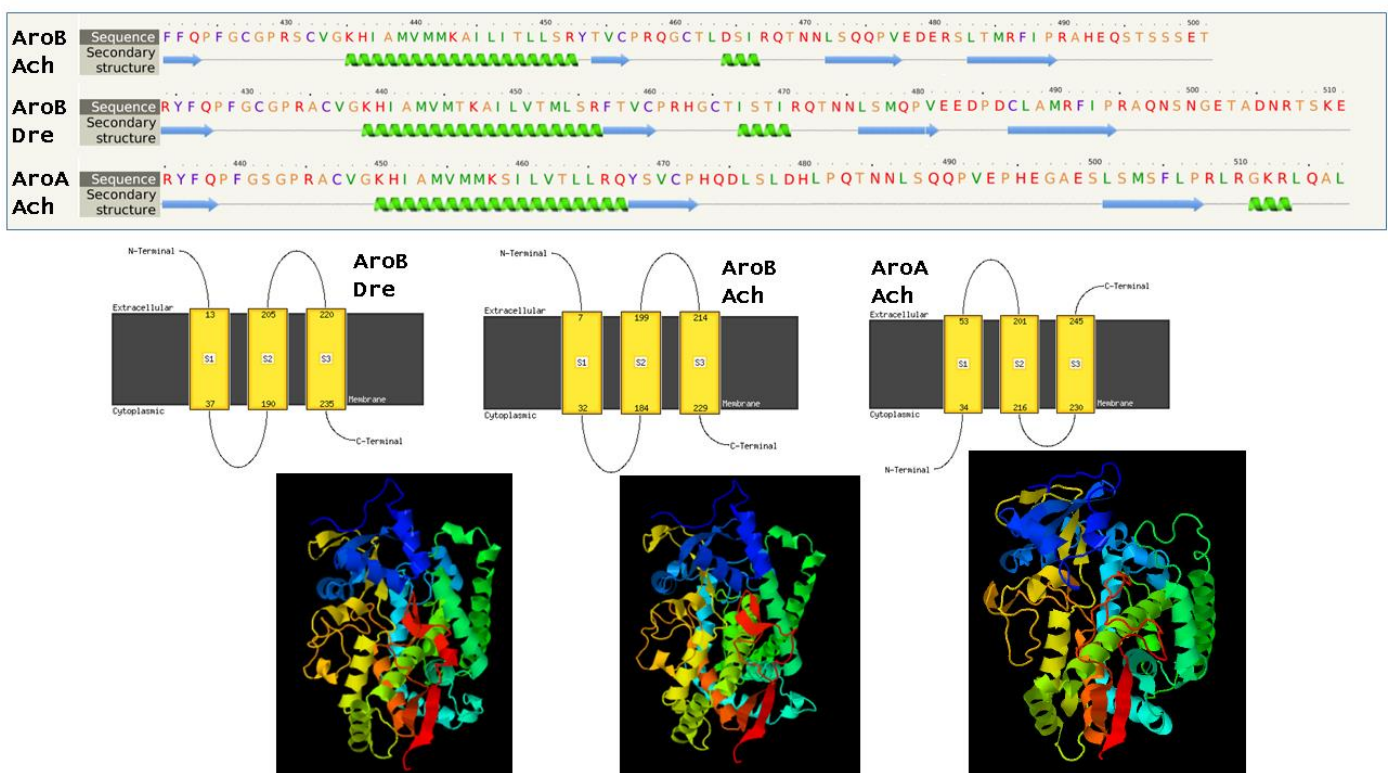


Figura 15. Estructura proteica de aromatasas. Se aprecian las estructuras primarias y secundarias (arriba) y terciarias (abajo) de aroA y aroB de *A. charrua* (Ach) y *D. rerio* (Dre). Las secuencias de aroB presentan gran similitud entre sí a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria. En el centro se muestra la interacción de las aromatasas con las membranas plasmáticas y vemos que en aroB de ambas especies corresponden los dominios celulares, mientras que aroA presenta dominios diferentes.

A pesar de que se trata de un anticuerpo heterólogo, la similitud en la secuencia de la aroB de *D. rerio* con la de *A. charrua*, nos estimuló a realizar los estudios de inmunodetección.

Inmunolocalización

Se realizó una inmunolocalización utilizando un anticuerpo primario anti aroB de *D. rerio* (anticuerpo heterólogo) para determinar la distribución de esta enzima en el encéfalo. También se realizó inmunolocalización en simultáneo de aroB con vimentina, aroB con Hu y aroB con la técnica de NADPH-diaforasa (NADPHd). La vimentina es una proteína que conforma el citoesqueleto de ciertas células que se expresa en las GR desde etapas embrionarias, sirviendo como marcador glial (Pixley y de Vellis, 1984). La proteína Hu se expresa en neuronas desde etapas tempranas en el desarrollo, sirviendo como marcador de estirpe neuronal. La técnica de NADPHd es utilizada para detectar células que presenten actividad diaforasa, habiéndose observado que en peces las GR son positivas a esta tinción (Pokay, 1993; Ma, 1993).

De esta manera se generaron dos grupos de inmunolocalización:

- Grupo A: para inmunolocalizar BrdU, aroB y vimentina.
- Grupo B: para inmunolocalizar BrdU, aroB y HuC.

Los peces fueron fijados por perfusión intracardiaca como se detalló anteriormente, se disecó el encéfalo, se encastró y se realizaron cortes de 50µm seriados a vibrátomo. Los cortes de cada encéfalo se fueron colocando alternados en dos pocillos diferentes a modo de que al final se hayan obtenido la mitad de los cortes del encéfalo en un pocillo y la otra mitad en el otro. A estas mitades, para cada pez, se realizaron inmunofluorescencias para los dos grupos de marcadores diferentes.

Para ambos grupos de experimentos se realizaron los siguientes protocolos de inmunolocalizaciones:

1- Para las inmunofluorescencias del grupo A, se siguió el siguiente protocolo:

- Tratamiento con HCL 2N en buffer fosfato con tritón X-100 0,3% 1M pH=7,2 (PBT), 40min

- Lavado de los cortes en PB 3x10min
- Incubación con, anticuerpos primarios en PBT, 24h, a temperatura ambiente:
- IgG2a anti BrdU, proveniente de rata 1:500
- IgG anti-*cyp19a1b*, proveniente de conejo 1:500
- IgM anti vimentina, proveniente de ratón 1:200
- Lavado en PB 3x10min
- Paso intermedio de incubación con biotinilado anti IgG de rata, 1:500 en PBT, 1 hora
- Lavado en PB, 3x10min
- Incubación con, anticuerpos secundarios en PBT, 90min, a temperatura ambiente:
- Estreptavidina-Cy3 de unión a la biotina, 1:500
- Anti IgG de conejo, proveniente de cabra, Alexa Fluor 647, 1:1000
- Anti IgM de ratón, proveniente de cabra Alexa Fluor 488, 1:1000
- Lavado en PB 3x10min
- Montado con Hoestch (para la tinción nuclear) que fluoresce en la longitud de onda 405 disuelto en glicerina (1:1000)

2- Para las inmunofluorescencias del grupo B, se siguió el siguiente protocolo:

- Tratamiento con HCL 2N en PBT, 40min
- Lavado de los cortes en PB 3x10min
- Incubación con, anticuerpos primarios en PBT, 24h, a temperatura ambiente:
- IgG2a anti BrdU, proveniente de rata 1:500
- IgG anti-*cyp19a1b*, proveniente de conejo 1:500
- IgG anti HuC, proveniente de ratón, 1:100
- Lavado en PB 3x10min

- Paso intermedio de incubación con biotinilado anti IgG de rata, 1:500 en PBT, 1 hora
- Lavado en PB, 3x10min
- Incubación con, anticuerpos secundarios en PBT, 90min, a temperatura ambiente:
- Estreptavidina-Cy 3 de unión a la biotina, 1:500
- Anti IgG de conejo, proveniente de cabra, Alexa Fluor 647, 1:1000
- Anti IgG de ratón, proveniente de cabra, Alexa Fluor 488, 1:1000
- Lavado en PB 3x10min
- Montado con Hoestch disuelto en glicerina (1:1000)

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el estudio de inmunolocalización de aroB, vimentina, BrdU y HuC.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Fluoróforo
BrdU	IgG2a anti BrdU, proveniente de rata (Accurate)	Biotinilado anti IgG de rata, hecho en burro (Jackson)/ Estreptavidina-Cy 3 de unión a la biotina (Jackson)	Cianina Cy 3 (550-570nm)
Aromatas a B	IgG anti- <i>cyp19a1b</i> , proveniente de conejo (abcam)	Anti IgG de conejo, proveniente de cabra (abcam)	Alexa Fluor 647
vimentina	IgM anti vimentina, proveniente de ratón (DSHB)	Anti IgM de ratón, proveniente de cabra (ThermoFisher)	Alexa Fluor 488
HuC	IgG anti HuC, proveniente de ratón (abcam)	Anti IgG de ratón, proveniente de cabra (abcam)	Alexa Fluor 488

Los cortes fueron analizados en un microscopio láser confocal Zeiss Series 800, en el que se obtuvieron fotos panorámicas y en aumentos de 20x, 40x y 63x con el fin de analizar la citoarquitectura y morfología nuclear de las ZP.

Controles

Se realizaron los controles negativos y positivos pertinentes para la utilización del anticuerpo anti aroB.

Control positivo: Como control positivo se perfundieron peces cebra (homólogo del anticuerpo) y *A. charrua* (heterólogo del anticuerpo) y se incubaron cortes de ambas especies con el anticuerpo primario y secundario. En los cortes de pez cebra se localizó la señal positiva restringida a las regiones descritas en la bibliografía (Tong *et al.*, 2009) y en *A. charrua* se constató la señal positiva en el encéfalo en forma localizada a estas regiones.

Control negativo: Algunos cortes de encéfalo fueron tomados como control negativo, a los cuales no se les realizó incubación con el anticuerpo primario, pero sí con el secundario. Los resultados de este control mostraron que no había falsos positivos debido a la interacción inespecífica del anticuerpo secundario con estructuras o epítopes encefálicos de estos peces.

Control de autofluorescencia: A otros cortes se les omitieron ambos anticuerpos y el resultado fue que los tejidos no presentan autofluorescencia detectable con los láseres utilizados en este estudio.

Para el resto de los anticuerpos se siguieron los mismos procedimientos de controles positivos y negativos. Éstos presentaron la distribución específica descrita en la bibliografía y en ningún caso los anticuerpos secundarios presentaron reacciones cruzadas con epítopes en los tejidos analizados, visibles con los láseres específicos para cada fluoróforo.

Enzimo histoquímica NADPHd

Se sabe que en teleósteos las GR son positivas a la técnica de la NADPHd, aunque no siempre se logra una clara visualización, por lo que ha generado confusiones entre investigadores los que han relacionado la señal positiva proveniente de GR como si se trataran de neuronas. Por lo tanto, esta sección está dedicada a establecer que la actividad NADPHd se encuentra en las GR presentes en las ZV en activa proliferación. La actividad NADPHd es el nombre genérico que se aplica para cualquier enzima con la capacidad de transferir electrones entre el NADPH o NADH y distintos aceptores, entre los que se encuentran las sales de tetrazolio. Las sales de tetrazolio reducidas forman moléculas insolubles y azuladas llamadas formazanos. Así, esta técnica pone de manifiesto cualquier deshidrogenasa que utilice NADPH como donador de hidrógenos y sales de tetrazolio como aceptor. Por ejemplo, se ha usado para poner de manifiesto la succinato deshidrogenasa. En el sistema nervioso central esta técnica pone de manifiesto diversas poblaciones de neuronas que expresan la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (eNOS), la cual produce óxido nítrico, considerado como un neurotransmisor atípico. Pero también detecta la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) endotelial en los vasos sanguíneos del encéfalo y células de tipo GR en el encéfalo de diversos vertebrados estudiados (*e.g.* teleósteos, mamíferos), aunque en estas últimas no sería una NOS la responsable de la tinción. Por tanto estas enzimas poseen actividad deshidrogenasa. La equivalencia entre la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa y la actividad NADPH diaforasa ha permitido estudiar estas poblaciones neuronales productoras de óxido nítrico de una manera sencilla y rápida. Aunque hay que tener precaución en la interpretación de los resultados, puesto que el resultado de la técnica depende en cierta medida del fijador y proceso de fijación de la muestra (tomado y modificado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-diaforasa.php>). Los resultados de esta tesis fueron obtenidos utilizando PAF al 4% como fijador y se realizó la técnica en el mismo día de fijado, debido a que las GR no se tiñen si el tejido es procesado días después de la fijación.

Esta técnica para detectar actividad diaforasa presente en algunas enzimas, se realizó de cuatro maneras según el objetivo a evidenciar: 1- detección simple en cortes a vibrátomo; 2- detección simple en cortes semifinos; 3- detección

combinada con anticuerpos para inmunofluorescencia; 4- detección combinada con anticuerpos para inmunohistoquímica anti BrdU.

1- Detección simple en cortes a vibrátomo: Adaptado del protocolo de Valtschanoff *et al.* (1992)

- Los peces fueron perfundidos intracardiácamente según el procedimiento detallado anteriormente, con PAF al 4%

- Luego de la fijación se disecó el encéfalo y se realizan lavados en PB 3x10min

- Se encastró cada encéfalo en un bloque de gelatina-albúmina como fue descrito anteriormente y se realizaron cortes seriados a vibrátomo de 50µm.

- A los cortes se los pre-incubó en PBT 0,1M, durante 5min

- A los cortes se los incubó en el medio de reacción enzimático, compuesto de la siguiente fórmula:

- 5mg de NADPH (SIGMA) en 2,5ml de agua bidestilada

- 2mg de nitroblue tetrazolium (SIGMA) en 2,5ml de agua bidestilada

- 5ml de buffer tris 1,0M, pH=8,0 (SIGMA) mezclado con 36µl de tritón X100 (SIGMA)

- 15ml de agua bidestilada

- La incubación se realizó durante 5min a temperatura ambiente sobre un agitador

- Luego la incubación continuó en estufa de 37°C durante 2-18h, corroborando en diferentes momentos la presencia de señal, evitando la sobrecoloración y formación de precipitados.

- Después de obtener la señal deseada, los cortes fueron lavados en PB 3x10min en agitador y montados en portaobjetos con glicerol.

2- Detección simple en cortes semifinos: Adaptado del protocolo de Valtschanoff *et al.* (1992)

Este protocolo es idéntico al anterior, excepto en el paso final. A los cortes que se les realizaron la tinción anterior descrita, se les agregó una imbibición en araldita

(resina epóxica; DURKUPAN) para lograr cortes semifinos que permitan un mejor detalle de las células NADPHd positivas, siguiendo el siguiente protocolo:

- Se colocan los cortes en alcohol 25°, 10min
 - Se colocan los cortes en alcohol 50°, 10min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en alcohol 75°, 10min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en alcohol 96°, 10min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en alcohol 100°, 10min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en acetona anhidra, 20min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en araldita-acetona (25%), 30min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en araldita-acetona (50%), 30min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en araldita-acetona (75%), 30min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en araldita absoluta, 30min temperatura ambiente
 - Se colocan los cortes en araldita absoluta durante toda la noche a 4 °C
 - Luego se realizó un bloque con araldita absoluta el que se dejó en estufa a 60°C para la polimerización y solidificación de las resinas epóxicas.
- Los bloques se cortaron en un ultramicrotomo Leica a 1 micrómetro de espesor y fueron contrateñidos con azul de metileno borácico 1% y montados en portaobjetos.

3- Detección combinada con anticuerpos para inmunofluorescencia: Adaptado del protocolo de Valtschanoff *et al.* (1992)

Este protocolo es idéntico al protocolo 1, excepto en el paso final. Una vez realizada la tinción a los cortes de 50µm, se los incubó con anticuerpos primarios para la detección de vimentina y/o aromatasa. Todo esto siguiendo los mismos pasos de detección para inmunofluorescencia explicados en el apartado anterior y teniendo en cuenta los mismos procedimientos de los controles. Se realizaron 3 grupos:

- 1: NADPHd + vimentina
- 2: NADPHd + aroB
- 3: NADPHd + vimentina + aroB

4- Detección combinada con anticuerpos para inmunohistoquímica anti BrdU

Adaptado del protocolo de Valtschanoff *et al.* (1992)

- Para este protocolo se utilizaron seis peces, tres de cada sexo.
- Los peces fueron inyectados IP con BrdU en dosis 100mg/Kg de animal.
- Los peces son perfundidos intracardiácamente según el procedimiento detallado anteriormente, con PAF al 4%
- El protocolo de detección de NADPHd es idéntico al protocolo 1, excepto en el paso final que se realiza un revelado de BrdU según se explica en el capítulo 4 de esta tesis, para el revelado de BrdU por inmunohistoquímica mediante la utilización de diaminobenzidina (ver en materiales y métodos - objetivo 4, revelado de los núcleos proliferativos)

Objetivo 5- Efecto de un inhibidor de la aromatasa en la proliferación celular

Para analizar los efectos de la inhibición de la aromatasa en la CMPN de los nichos neurogénicos, se realizaron experimentos de inyección IP con FAD que es un potente inhibidor de la actividad enzimática de la aromatasa.

Se realizaron 4 grupos experimentales, control y tratamientos de forma crónica para machos y para hembras. El FAD en polvo se reconstituyó en etanol absoluto (1g FAD en 100 μ l de etanol), se diluyó en PB y la dosis final de FAD fue de 10 μ g/gr de pez.

Los grupos experimentales son los siguientes:

Grupo 1. Machos control.

Inyectados IP de vehículo, PB y etanol absoluto durante 6 días.

Grupo 2. Machos tratados con Fad.

Inyectados IP con FAD más su vehículo PB y etanol, durante 6 días.

Grupo 3.-Hembras control.

Inyectadas IP de vehículo PB y etanol absoluto, durante 6 días.

Grupo 4.-Hembras tratadas con Fad.

Inyectadas IP con FAD más su vehículo PB y etanol absoluto, durante 6 días.

Expresión de aromatasa en el encéfalo de *A. charrua*

Para los análisis de expresión de *aroB* se utilizaron 3 machos y 3 hembras para los controles y 3 machos y 4 hembras para los tratamientos con Fad, los cuales fueron sacrificados por decervicación y los encéfalos fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido. Para determinar si el tratamiento crónico con FAD genera diferencias en la expresión de *cyp19a1b* respecto los controles, se realizaron PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificar los niveles de transcriptos en ambos grupos experimentales de:

1- ARN mensajero de *aroB*, para conocer los niveles de expresión

2- ARN ribosomal 18S, como control de expresión constitutiva

Para esto se realizó el análisis en tres etapas que son, la extracción de ARN, la retrotranscripción para generar ADN complementario y la PCR cuantitativa. Se realizaron los siguientes protocolos:

Extracción del ARN de los encéfalos

Se sacrificaron los especímenes por decervicación, se extrajo el encéfalo completo y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras permanecieron a -80°C hasta el siguiente paso.

Se utilizó un protocolo de extracción siguiendo un kit para tejidos sólidos “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)”, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se colocó la muestra en un tubo con $600\mu\text{l}$ de ZR RNA buffer y se homogenizó con un dispositivo motorizado que genera una licuefacción del encéfalo, durante 5 min y se aplicó el protocolo propuesto por el proveedor.

Retrotranscripción

La retro transcripción para la síntesis de ADN copia (cDNA) fue realizada partiendo de síntesis 1.5 o $2\mu\text{g}$ de RNA total. El ARN fue desnaturalizado mediante un ciclo de calentamiento a 65°C en presencia de “random primers” (200 ng/ml) t dNTP's (10 mM) durante 5 min, y luego enfriado en hielo rápidamente. El paso específico de retrotranscripción se produjo a 37°C por 50 min usando la enzima transcriptasa reversa “SuperScript II” o “M-MLV” (Invitrogen, Carlsbad, CA) y siguiendo todos los pasos mencionados por el fabricante. Luego de terminado el proceso el ADNc queda listo para ser utilizado en qPCR, y mientras tanto se mantiene en un freezer a -20°C .

Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen final de $12\mu\text{l}$ por pocillo y en placas que contienen 96. Cada una de las reacciones estaba compuesta a partir de 200nM de primers tanto Forward como Reverse para el gen correspondiente (ver tabla 3), PowerUp SybrGreen (Thermo Fischer Scientific) Master Mix, y 5 ng de cDNA para el gen objetivo y $1,6\text{ ng}$ para el gen constitutivo 18S. Para realizar las corridas experimentales se utilizó un Applied Biosystems instrument (ABI 7500). El ciclado experimental fue el siguiente: 50°C 2min (hold), 95°C 2min (hold), luego un ciclado 2 puntos compuesto por 95°C 15seg, y 60°C 1min repetido 40 veces. El paso de la curva de melt se compone de 95°C 15 seg, 60°C 1 min y 95°C 15seg.

La verificación de la calidad de la corrida fue verificada mediante réplicas de cada una de las muestras, el chequeo de la obtención de un único pico en las curvas de fusión (‘melt’) y la temperatura de fusión de las muestras. Además, se utilizaron blancos controles y controles de reactivos para asegurarse que no existieran

contaminaciones. Se calcularon las eficiencias (E) de las corridas mediante la utilización de una curva de dilución en cada una de las cajas y los “systemizing quotients” (SQ) se obtuvieron mediante la fórmula: $E = [10^{-1/\text{pendiente}}]$ y $SQ = [10^{((Ct-\text{intercepto})/\text{pendiente})-1}$ (Baron *et al.*, 2005). La expresión relativa se obtiene del resultado de dividir el SQ del gen objetivo (de estudio) sobre el gen de referencia (constitutivo) en nuestro caso el 18S, el cual fue validado en la sección de validación y caracterización de esta tesis.

Efecto de las inyecciones con FAD en la proliferación celular

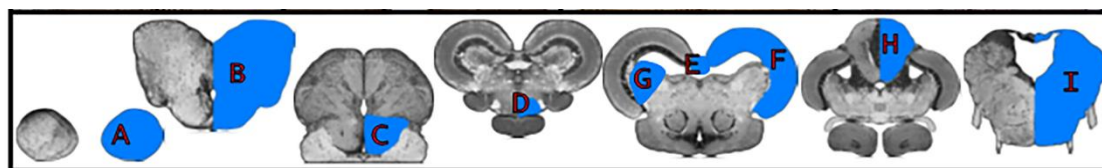
Para el análisis de la proliferación celular se utilizaron 6 peces para cada grupo experimental (24 peces en total). El sexto día de las inyecciones con Fad, se inyectó BrdU (100mg/kg) y se esperaron 24h para sacrificar a los animales. Los peces fueron fijados mediante perfusión intracardíaca con PAF al 10%, los encéfalos fueron disecados, encastrados y cortados seriadamente en vibrátomo a 50 μ m. En estos cortes se revelaron aquellos núcleos celulares que habían adquirido el BrdU, mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando el mismo anticuerpo primario anti BrdU utilizado anteriormente, pero con un anticuerpo secundario unido a HRP. El protocolo se detalla a continuación:

1. Tratamiento de los cortes con HCl₂N en PBT
2. Lavado en PB 3x10 min
3. Incubación overnight con anticuerpo primario mouse anti-BrdU
4. Lavado en PB 3x10 min
5. Incubación con anticuerpo secundario anti mouse conjugado a HRP, en PBT 1 hora
6. Lavado en PB 3x10 min
7. Revelado con diaminobenzidina
8. Montaje de los cortes con glicerol

Habiendo conocido las regiones encefálicas y la localización de las células proliferantes en las dos primeras partes de esta tesis, se realizó un muestreo en 9 áreas diferentes representativas de todas las divisiones encefálicas:

- Telencéfalo: (A) bulbo olfatorio; (B) lóbulos telencefálicos.
- Diencefalo: (C) región preóptica; (D) hipotálamo ventral
- Mesencéfalo: (E) *torus longitudinalis*; (F) tectum óptico; (G) *torus semicircularis*
- Rombencéfalo: (H) *corpus cerebelli* (metencéfalo); (I) médula oblonga (mielencéfalo)

Las áreas cuantificadas mencionadas anteriormente se esquematizan en la siguiente imagen:



Muestreo: De cada región se tomaron 4 cortes consecutivos y se les tomaron fotografías en un microscopio NIKON asistido por una cámara digital y su programa de obtención ISCapture. En base a estas fotos se realizó una cuantificación de los núcleos BrdU positivos y de áreas de cada corte cuantificado, utilizando el programa Image J con las siguientes herramientas:

- 1- Núcleos BrdU positivos, con la herramienta “multi-point”
- 2- Áreas de cada corte, con la herramienta “Polygon selection” y “analyze + measure”.

Con los valores de área y núcleos en cada una de éstas, se halló la tasa de proliferación por unidad de área para cada región de cada pez: núcleos BrdU positivos/mm². Con estas tasas se procedió al análisis estadístico de los datos entre los diferentes grupos tratados y controles. Para estos análisis se utilizó el software de estadísticas NCSS donde se realizaron los análisis siguientes:

Análisis de la varianza (ANOVA) de los 4 grupos experimentales. Se utilizó el análisis de Bonferroni con rechazo de la hipótesis nula cuando z-valor > 3,2608.

H0: Todas las medianas son iguales

H1: Al menos dos medianas no son iguales

Análisis de normalidad, homogeneidad de varianzas y test de comparación de medias por región de estudio, machos vs hembras y controles vs tratamientos. Se utilizaron test paramétricos (T-test) y no paramétricos (U de Mann-Whitney) en relación a la normalidad y homogeneidad de varianzas, con rechazo de la hipótesis nula con un p-valor $< 0,05$

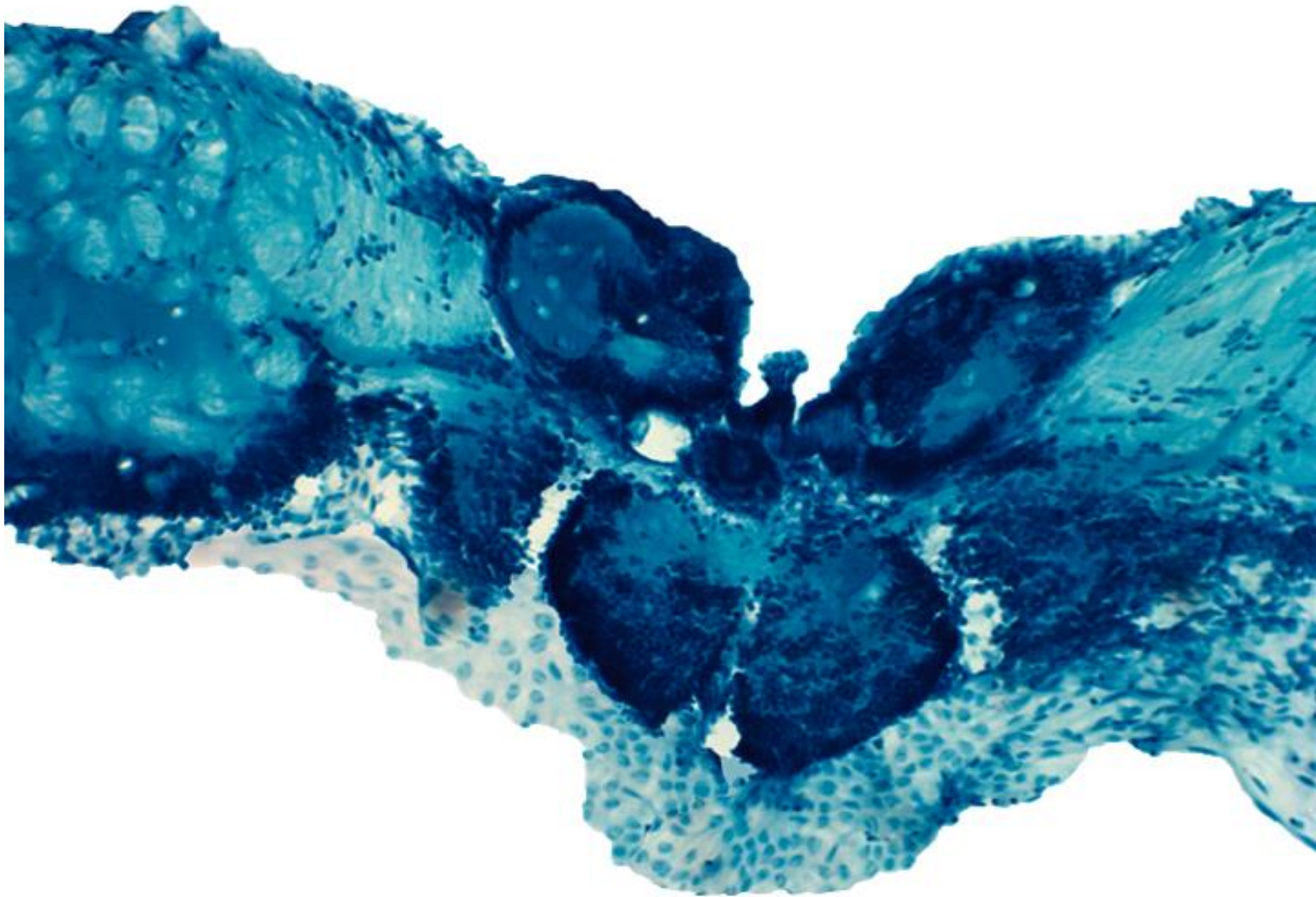
H0: Las medias son iguales

H1: Las medias no son iguales

Las gráficas de estos resultados se realizaron con el programa Prism-GraphPad.

CAPÍTULO 1

Neuroanatomía macro y microscópica del encéfalo de *Austrolebias charrua* adulto



“Las neuronas son como misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas
quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental”

Santiago Ramón y Cajal

CAPÍTULO 1. Neuroanatomía del encéfalo de *Austrolebias charrua*

Los peces presentan una diversidad mayor a 25.000 especies con representantes adaptados a todos los ambientes acuáticos del planeta (Nelson, 2016). Esta radiación adaptativa ha llevado a que estos vertebrados posean en la actualidad una gran diversidad fenotípica tanto a nivel morfológico como fisiológico, obtenidos en más de 400 millones de años de evolución bajo distintas presiones. Uno de los sistemas que tiene gran variabilidad entre diferentes grupos y especies es el sistema nervioso, el cual respondiendo a las demandas ecológicas y comportamentales, ha convertido a los peces en excelentes modelos de estudio sobre neurobiología evolutiva y ecomorfología (Meek y Nieuwenhuys., 1988). Al servicio de las facultades de percepción sensorial, procesamiento central y respuestas comportamentales los peces exhiben un amplio repertorio de morfologías encefálicas que pueden variar en menor o mayor grado dependiendo de diversos factores (Ishikawa *et al.*, 1999; Körttschal *et al.*, 1998 a, b). Algunos de los factores que determinan crucialmente la morfología encefálica son el estilo de vida, la utilización de ciertas estructuras o núcleos neuronales encargada del procesamiento y evocación de conductas, y la utilización y especialización de ciertos sistemas sensoriales (Wagner 2001 a, b; Wagner, 2003). Se ha demostrado que diversas áreas encefálicas que son sustrato del procesamiento de algún tipo de modalidad sensorial, puede desarrollarse más o menos según la importancia funcional de dichos sistemas (Leonard *et al.*, 1978; Birse *et al.*, 1980; Brandstatter y Körttschal 1989, 1990). Esto genera patrones de crecimiento especie-específicos, por ejemplo en Ciprínidos bénticos que se alimentan en zonas profundas de la columna de agua, lograr una captación y procesamiento de la información sensorial provenientes de las señales químicas del medio, es de vital importancia. En cambio para Ciprínidos que se alimentan en zonas más superficiales de la columna de agua, es más ventajoso tener un sistema octavolateralis bien desarrollado. Para cumplir eficientemente con la captación sensorial, las regiones encefálicas relacionadas con estas modalidades, presentan un gran desarrollo (Brandstatter y Körttschal 1989; Körttschal y Palzenberger 1992). Si bien el encéfalo de estos dos tipos de Ciprínidos en el momento de la eclosión es altamente similar, estas estructuras atraviesan un patrón diferencial de desarrollo dirigido a la especialización, que comienza desde la etapa larvaria y se extiende hacia toda la etapa juvenil (Brandstatter y Körttschal

1989, 1990). Dentro del género *Austrolebias* se ha visto que existen diferencias en la morfología en diversas estructuras encefálicas (Fernández *et al.*, 2011). Dada la gran variabilidad y plasticidad neuroanatómica que poseen los peces y que ésta puede ser modificada en la ontogenia bajo presiones ambientales, es necesario como punto de partida consolidar el conocimiento específico sobre la neuroanatomía del animal que se investiga. De este modo la primera parte de esta tesis está dedicada al estudio anatómico e histológico del encéfalo de *A. charrua*.

Objetivo

Identificar y mapear en detalle las diversas estructuras encefálicas de *A. charrua* mediante un análisis morfológico e histológico.

Resultados

En este estudio, en el que se analizó el encéfalo de ambos sexos, se observó que macroscópicamente presentan diferencias en la forma de los lóbulos del telencéfalo dorsal, en la separación de los bulbos olfatorios y en la forma del *corpus cerebelli* (CCe). También se detectó de forma cualitativa que el tamaño de la glándula hipófisis presenta variaciones individuales en tamaño que no relacionados con la edad o el sexo. En relación a la organización histológica y de citoarquitectura no se han detectado diferencias evidentes entre machos y hembras en el análisis comparativo de los cortes seriados de 20 μ m con la tinción de Nissl. Esta tinción resultó muy adecuada para el análisis de la citoarquitectura ya que el colorante básico azul de metileno tiene afinidad por las estructuras ácidas en los elementos formes, como núcleos celulares y grumos de Nissl en el citoplasma de las neuronas (Fig 22 H, I). Para la presentación de las estructuras macro y microscópicas, se optó por las imágenes de encéfalos de machos, debido a que la gran mayoría de los estudios realizados previamente en peces, han sido en base a éstos.

El encéfalo de *A. charrua* sigue el plan general de los vertebrados y su organización estructural concuerda con la mayoría de los teleosteos estudiados.

Rostrocaudalmente se pueden observar el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (metencéfalo y mielencéfalo) y se continúa caudalmente por la médula espinal.

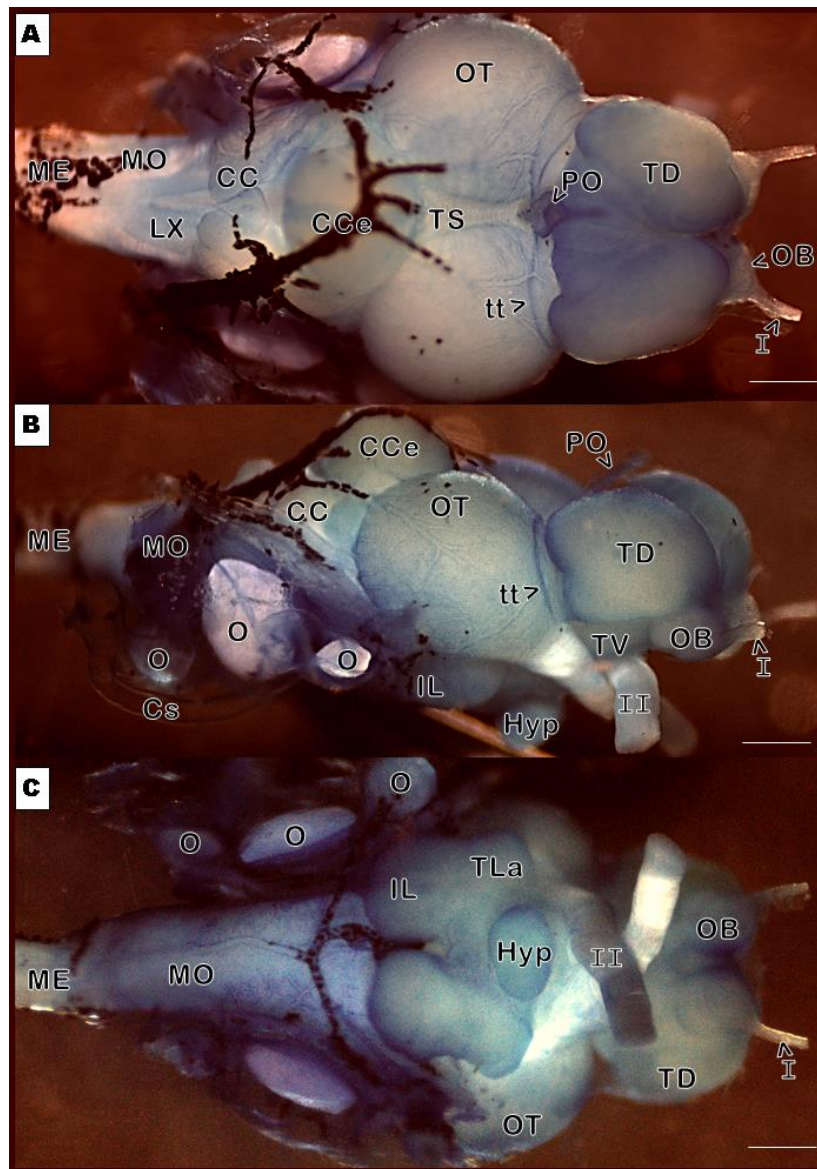


Figura 16. Vistas dorsal, lateral y ventral del encéfalo de *A. charrua*. Barras: 400µm

Organización del Telencéfalo

El telencéfalo (Tel) está constituido por dos hemisferios que se componen por dos grandes regiones: Los bulbos olfatorios y los lóbulos telencefálicos. Los bulbos olfatorios (OB) son las estructuras más rostrales y se presentan como dos masas pareadas esféricas u ovaladas (Fig 16; Fig 17) y sésiles, es decir, se encuentran adosados al resto del telencéfalo, donde gran parte del mismo se ubica por debajo del área dorsal más rostral de los lóbulos telencefálicos. Rostralmente se continúa

con los nervios olfatorios o par craneal I, que trae la información sensorial desde las aferencias primarias desde los órganos olfatorios (epitelio olfativo) hasta los glomérulos olfatorios (Fig 1; 2 A). Cada nervio olfatorio penetra el cuerpo del bulbo (Fig 18 A-B) y emite una serie de ramificaciones eferentes rostrocaudales formando la capa glomerular (GL) que ocupa gran parte de la región ventro-lateral (ver técnica de NADPHd en el capítulo 3). Hacia la zona medial y hasta un tercio de la región medio-dorsal, se ubica la capa celular interna (ICL) y en la región medio-dorsal, se encuentra la capa celular externa (ECL) (Fig 18 A-B). Debido a su situación, parte del OB está dorsalmente en contacto con el TD aunque son estructuras discretas conectadas por el tracto olfatorio lateral (LOT) (Fig 18 D). Caudalmente se comunica con la región ventral del telencéfalo y parte de esa conexión se da a través del tracto olfatorio medial (MOT) (Fig 18 C-D).

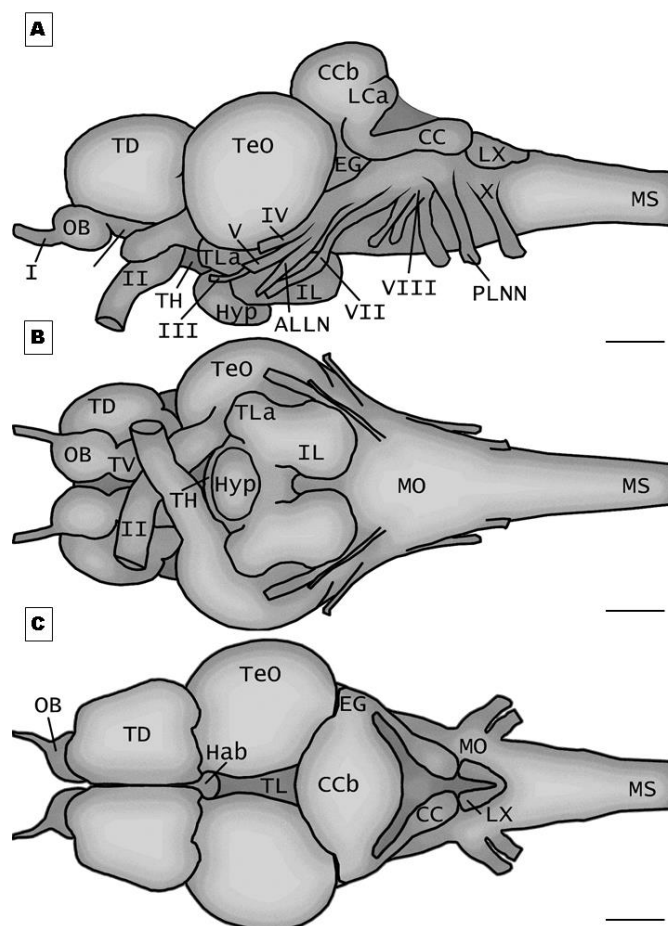


Figura 17. Esquemas de vistas lateral, ventral y dorsal del encéfalo adulto de *A. charrua*.

Los lóbulos telencefálicos están subdivididos a su vez en dos áreas, el área ventral del telencéfalo (TV) y el área dorsal del telencéfalo (TD). El área dorsal telencefálica presenta la morfología evertida típica de los teleósteos donde la *Tela telencephali* (tt) cubre ambos hemisferios, desde la región lateral de cada lóbulo donde se une

a la parte ventral del telencéfalo presentando un ventrículo medial (TelV) que se extiende por la superficie dorso-lateral acompañando a la tt (Fig 18 E-J). En la región caudal del telencéfalo dorsal se asocian a la tt dos estructuras epitalámicas que discurren medialmente, el saco dorsal y la epífisis (Fig 18 E-G). El área dorsal está formada por distintas masas celulares encontradas en otros teleósteos tales como la zona dorso-medial (Dm), dorso-dorsal (Dd), dorso-lateral (DI), dorso-posterior (Dp) y dorso-central (Dc). La Dm, Dd, DI y Dp se presentan superficialmente y sus límites en general se establecen por continuas líneas celulares estrechas (Fig 18 E-H; Fig 19 B-F; Fig 20 C, D). Las neuronas presentes en estas zonas, se ubican formando estratos (Fig 18 E-H; Fig 21) bien definidos. Los límites centrales de estas zonas, no son claramente definidos. La Dd en ciertos niveles presentó dos subdivisiones (Fig 18 F-G). La Dc se presenta hacia el centro de la D donde rostralmente está poco organizada y medio-caudalmente se dispone como un macizo celular bien definido, de forma tubular rostrocaudalmente, que en sección transversal es circular (Fig 18 E-G). Caudalmente, en la región ventro-lateral de la D, se localizó el Núcleo Taenia (NT).

El área ventral del telencéfalo se ubica por debajo de los lóbulos del telencéfalo dorsal, por detrás de los bulbos olfatorios y presenta en su región caudal una relación anatómica con el diencéfalo. Se reconocieron 4 grandes núcleos dispuestos en la zona medial en contacto con la línea endimaria del ventrículo medial, el ventro-ventral (Vv), el ventro-dorsal (Vd), el supracomisural (Vs) y el postcomisural (Vp) (Fig 18 D-H; Fig 19 B-F; Fig 20 C, D). Existe una conexión entre ambos hemisferios telencefálicos denominada comisura anterior (Cant) (Fig 18 F; Fig 19 G, Fig 20 E) al igual que en el resto de los vertebrados. Esta comisura delimita los núcleos del TV con regiones denominadas postcomisurales que son propias del área preóptica (POA), la región más rostral del diencéfalo. De esta forma los núcleos Vv y Vd son rostrales a Cant; el Vd se continúa caudalmente con el Vs a nivel dorsal de la Cant y éste se comunica caudalmente con el Vp. No se encontró el núcleo periventricular denominado "otro núcleo" en Nieuwenhuys, (1963). Se localizaron dos núcleos separados de la región medial que son el núcleo lateral (VI) rostral a la Cant y el núcleo entopeduncular (EN) presente en la región lateral a nivel de la Cant extendiéndose caudalmente. El EN está determinado por un solo grupo celular, no así en otros teleósteos donde se discrimina una región dorsal y una ventral (Wulliman *et al.*, 1996). Asimismo no se identificó en la TV el núcleo central (Vc) (Wulliman *et al.*, 1996) y en la TD no se identificó el sulcus ypsiloniformis (SY)

(Nieuwenhuys, 1959) como en otros teleósteos. La comisura anterior se presentó como una comisura única continua, no como en otros teleósteos que se presentan como dos porciones comisurales diferenciándose una comisura anterior dorsal y una ventral (Wulliman *et al.*, 1996).

Organización del diencefalo

El diencefalo presenta 6 grandes divisiones características: área preóptica, epitálamo, tubérculo posterior, tálamo dorsal, tálamo ventral y el hipotálamo; y dos regiones diencefálicas adicionales: el pretectum y el sinencéfalo. Una estructura de interés en esta región es el quiasma óptico, que en *A. charrua* los nervios ópticos (ON) se cruzan por debajo de la primera porción del diencefalo pero sin contactarse anatómicamente (Fig 22 B), es decir no producen un quiasma propiamente dicho con decusación de vías (Fig 18 G-H). Sí se observó la comisura postóptica (Cpop) en el seno del POA, donde sí ocurre una decusación de la vía óptica en el interior del encéfalo (Fig 18 J). Macroscópicamente se pueden localizar tres grandes estructuras, el epitálamo representado por la habénula (Hab), la epífisis (E) y el saco dorsal (SD) (Fig 18 C; Fig 19 D-F; Fig 20 D) localizados dorsalmente entre los lóbulos dorsales del telencéfalo y el mesencéfalo; el hipotálamo que presenta dos grandes lóbulos en su región más caudal, que se denominan lóbulos inferiores (IL) (Fig 16; Fig 17); y el torus latetralis representado por una prominencia rostral de los IL (Fig 18 A, B; Fig 18 H). Por delante de estos lóbulos y en la región medial, el hipotálamo presenta una comunicación ventral con la glándula pituitaria o hipófisis (Hyp). En la región medial del diencefalo se localiza el denominado tercer ventrículo o ventrículo diencefálico (DiV) (Fig 18 I-N) que en la porción rostral es dorsal y de luz amplia y se va estrechando hacia caudal. A nivel infundibular en la zona ventral presenta un leve ensanchamiento ventral (Fig 18 M) y a nivel caudal del hipotálamo presenta dos recesos laterales (Fig 18 N-W). Se encontraron una serie de tractos y comisuras que discurren entre las estructuras diencefálicas, como los fascículos laterales y mediales del procencéfalo (LFB y MFB) (Fig 18 K-L); el entrecruzamiento de los nervios ópticos formando los tractos ópticos (OT) a nivel de la región preóptica (Fig 18 I-J); el fascículo retroflexo (FR) que proyecta desde la habénula (Fig 18 K); la comisura habenular (Chab) (Fig 18 L); la comisura postóptica (Cpop) (Fig 18 J-K); la comisura horizontal (Chor), que se extiende caudalmente hasta el seno de los

núcleos glomerulares y de ahí proyecta dorso-rostralmente hacia el tectum óptico (Fig 18 K-O); y la comisura posterior Cpost que se encuentra entre los núcleos dorsal y ventral del pretectum periventricular (Fig 18 M).

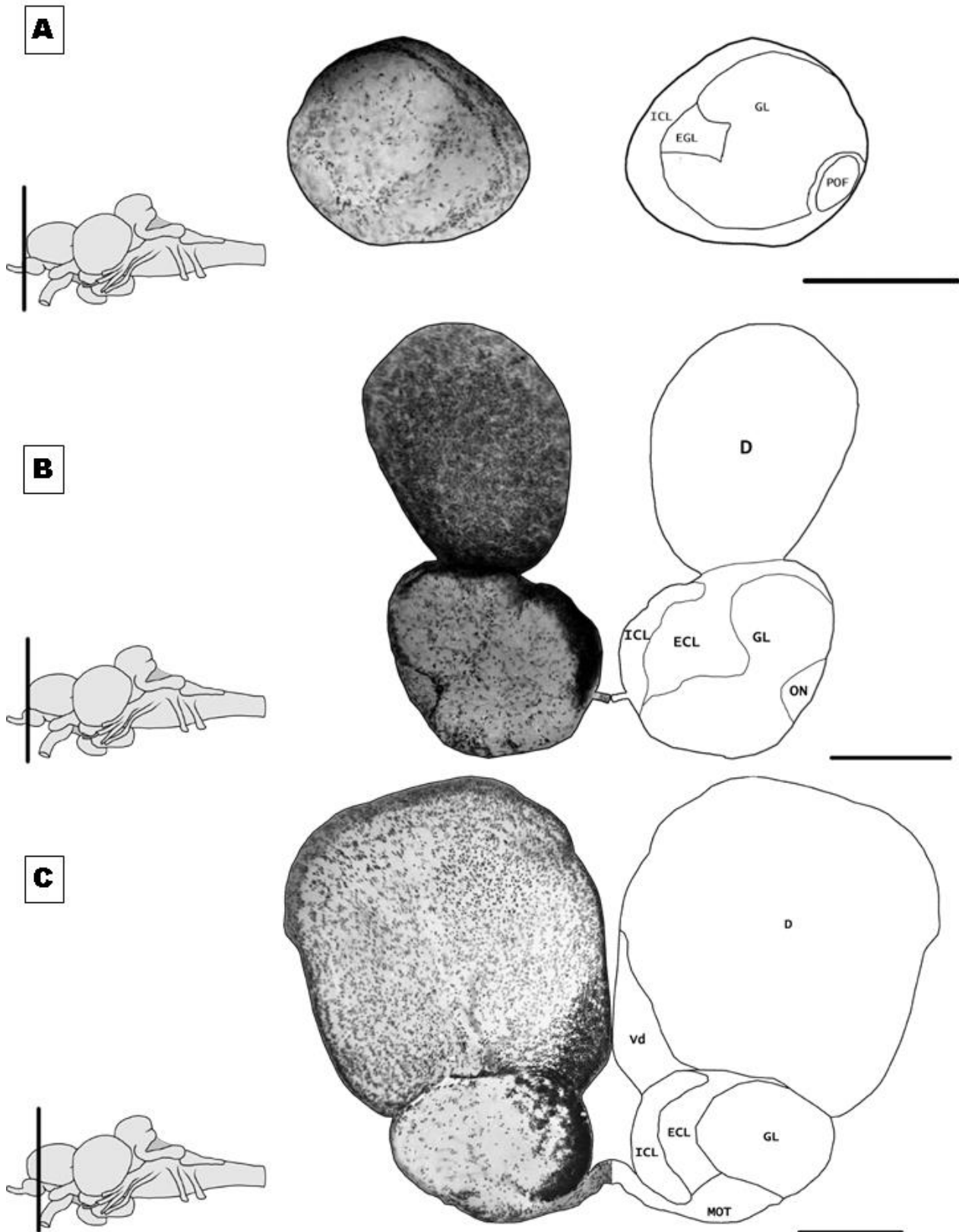


Figura 18. Cortes transversales de 20 μ m teñidos según la técnica de Nissl. Barras=200 μ m

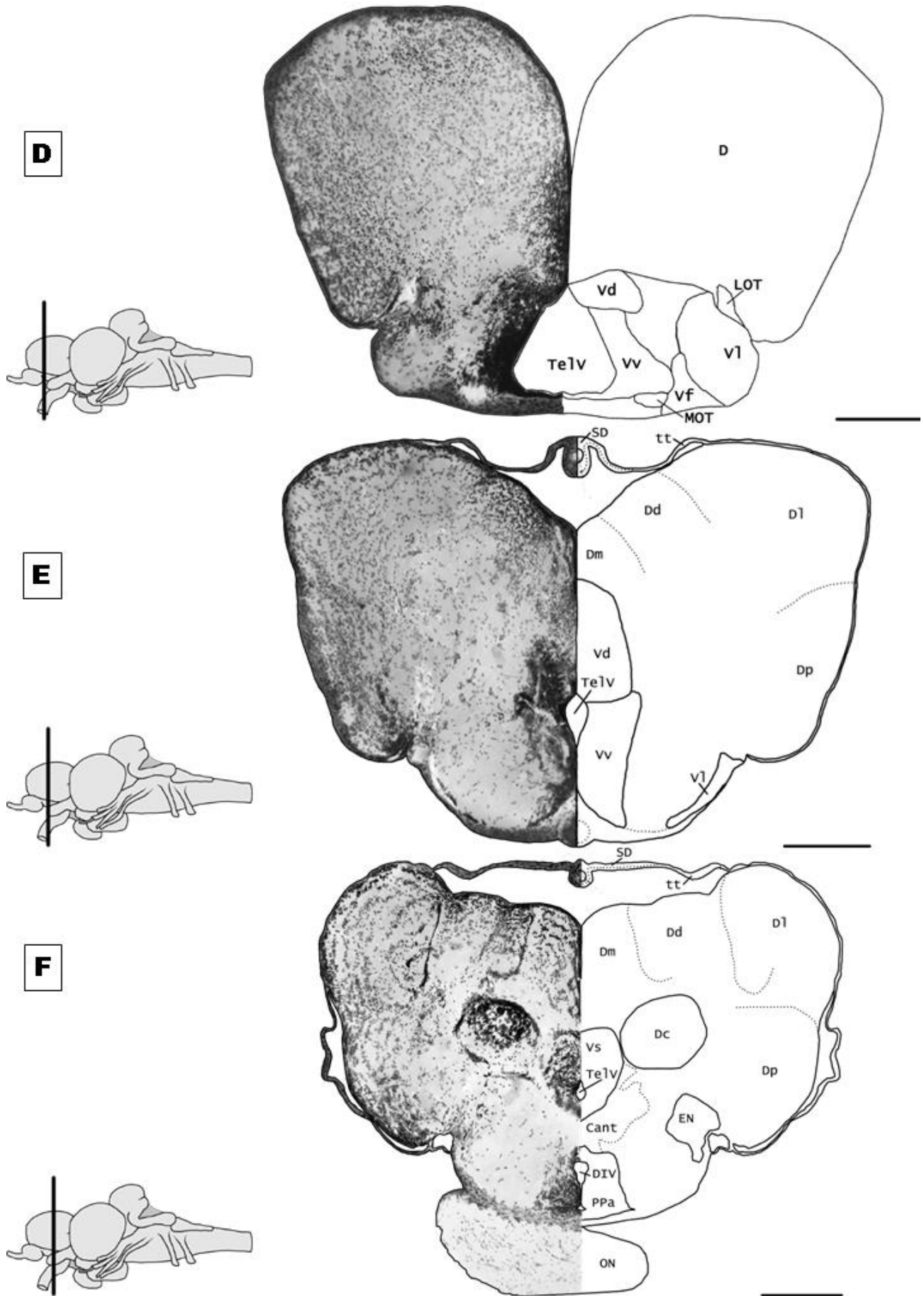
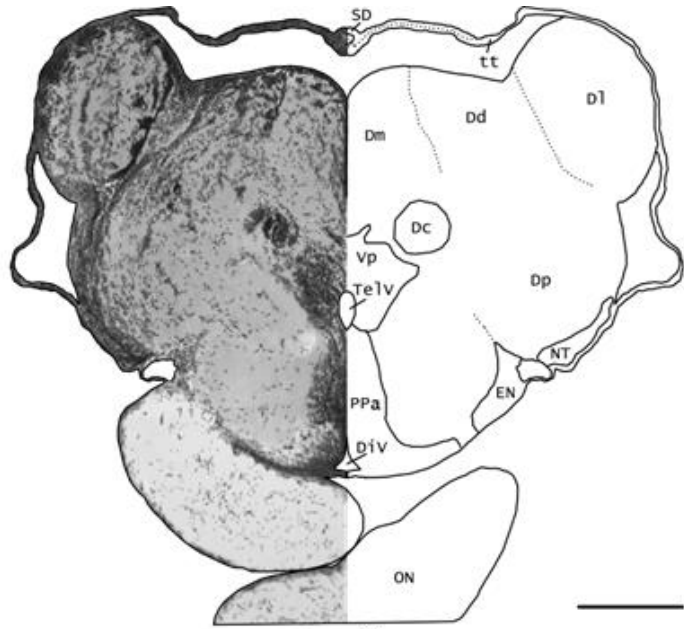
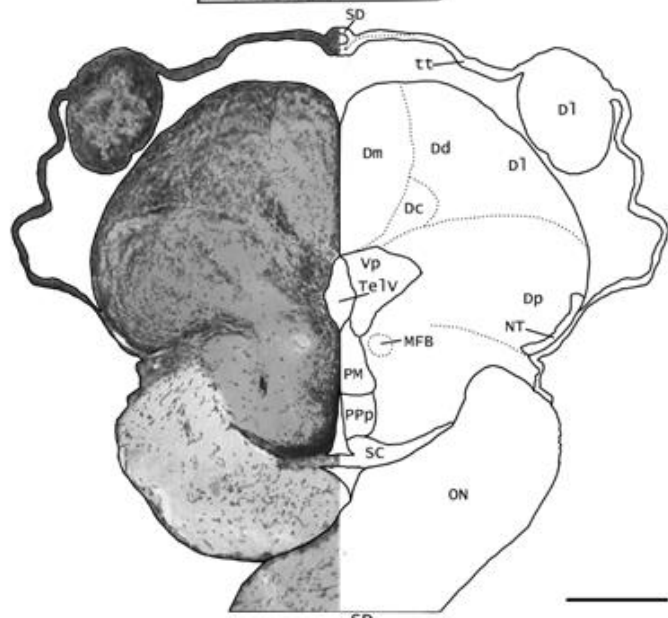


Figura 18 continuación

G



H



I

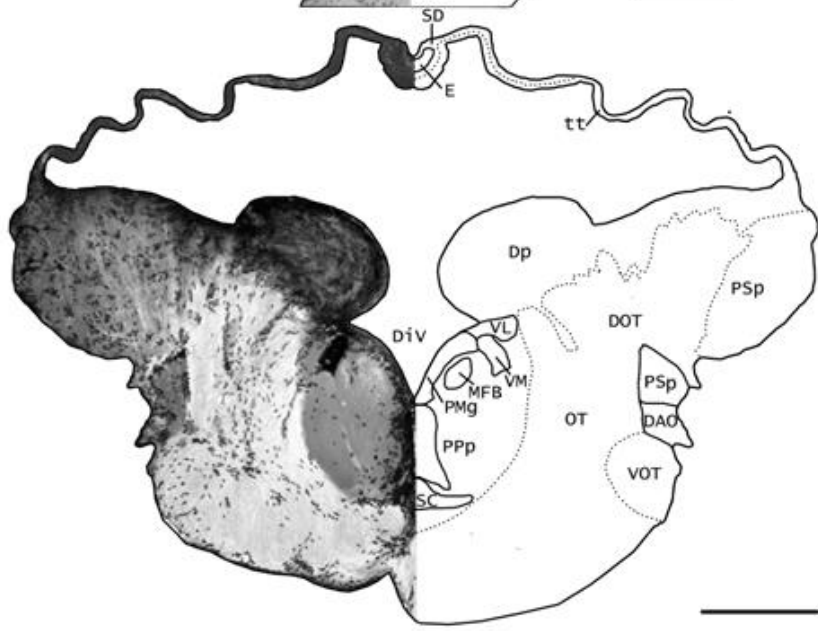


Figura 18 continuación

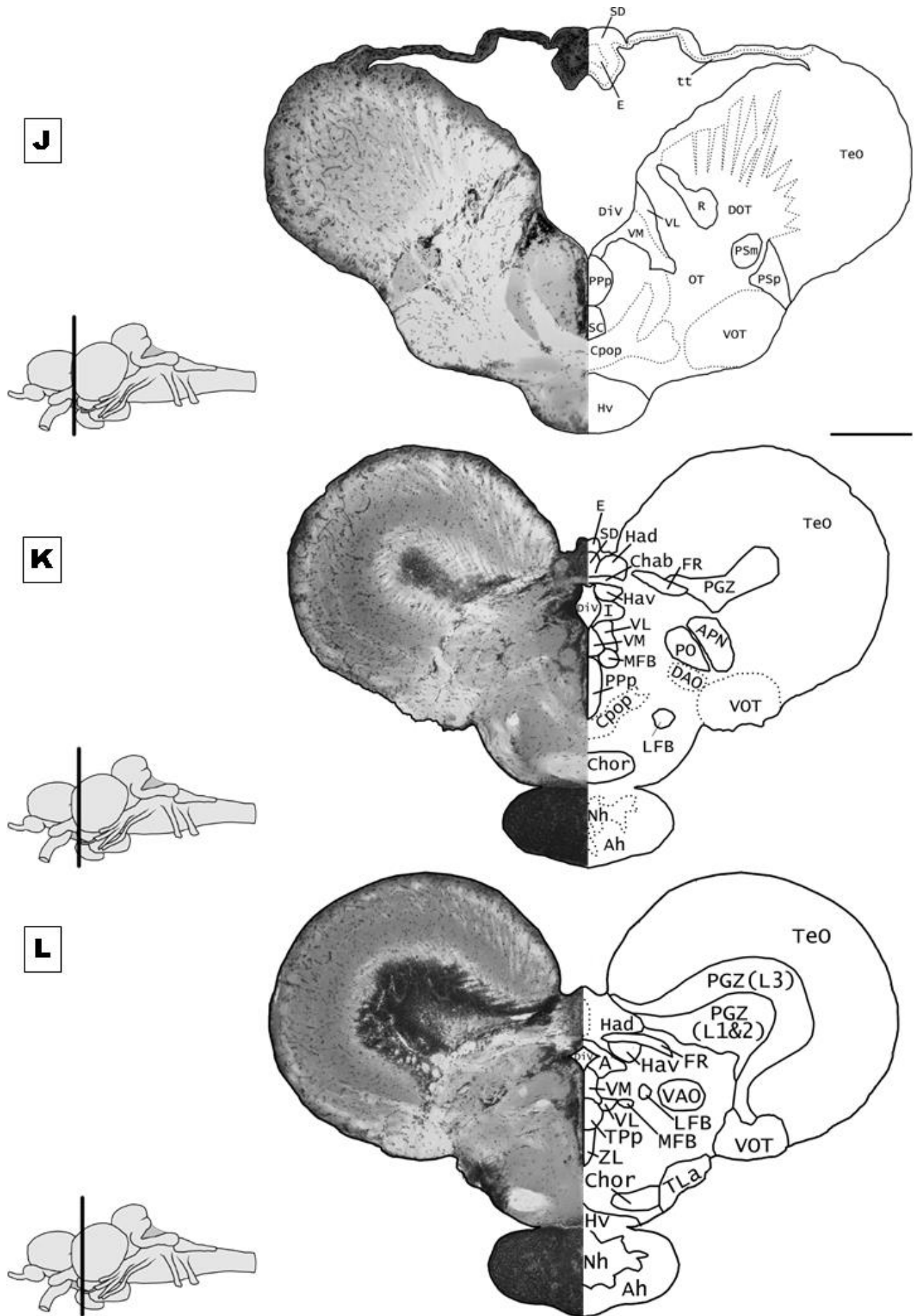


Figura 18 continuación

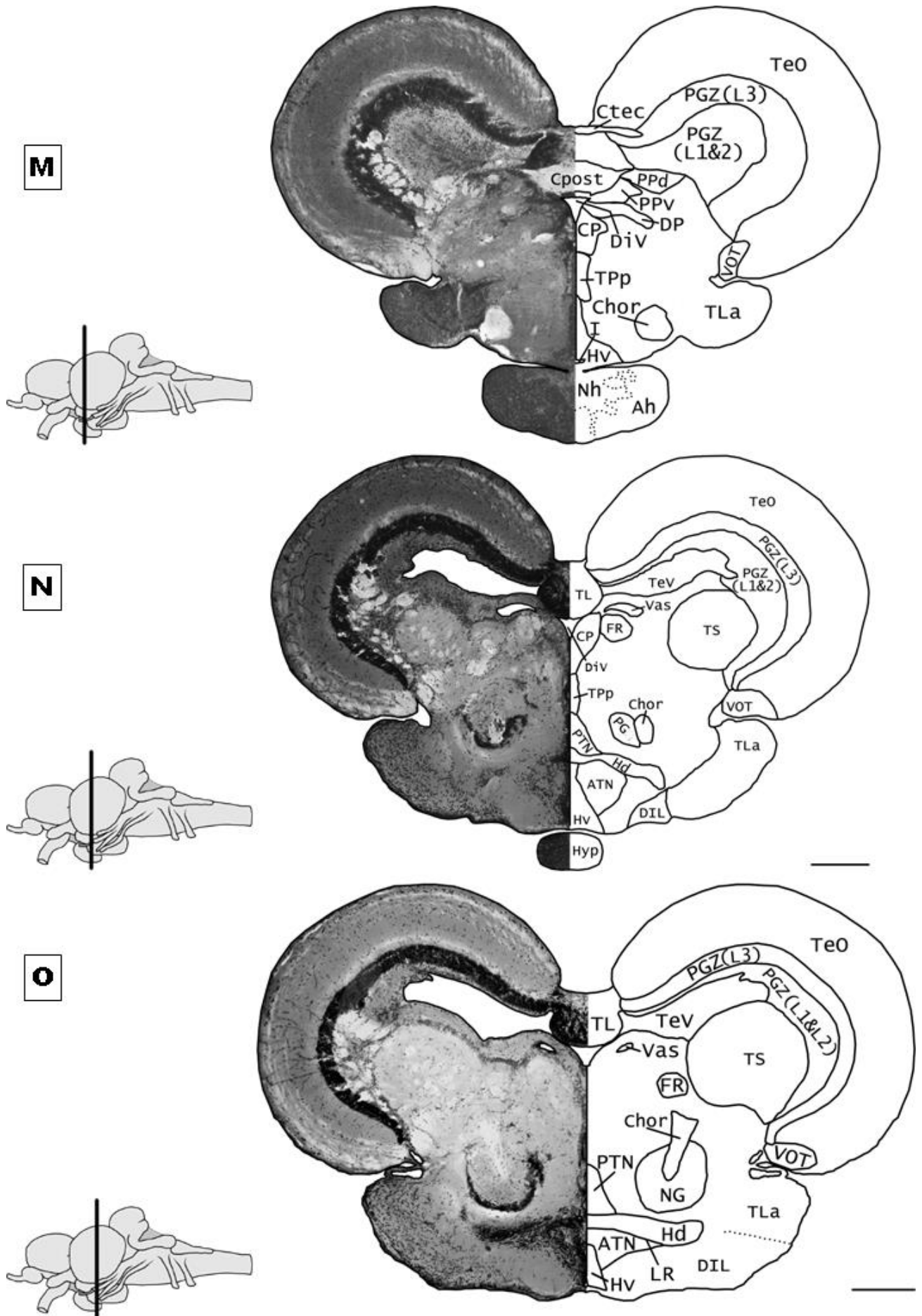


Figura 18 continuación

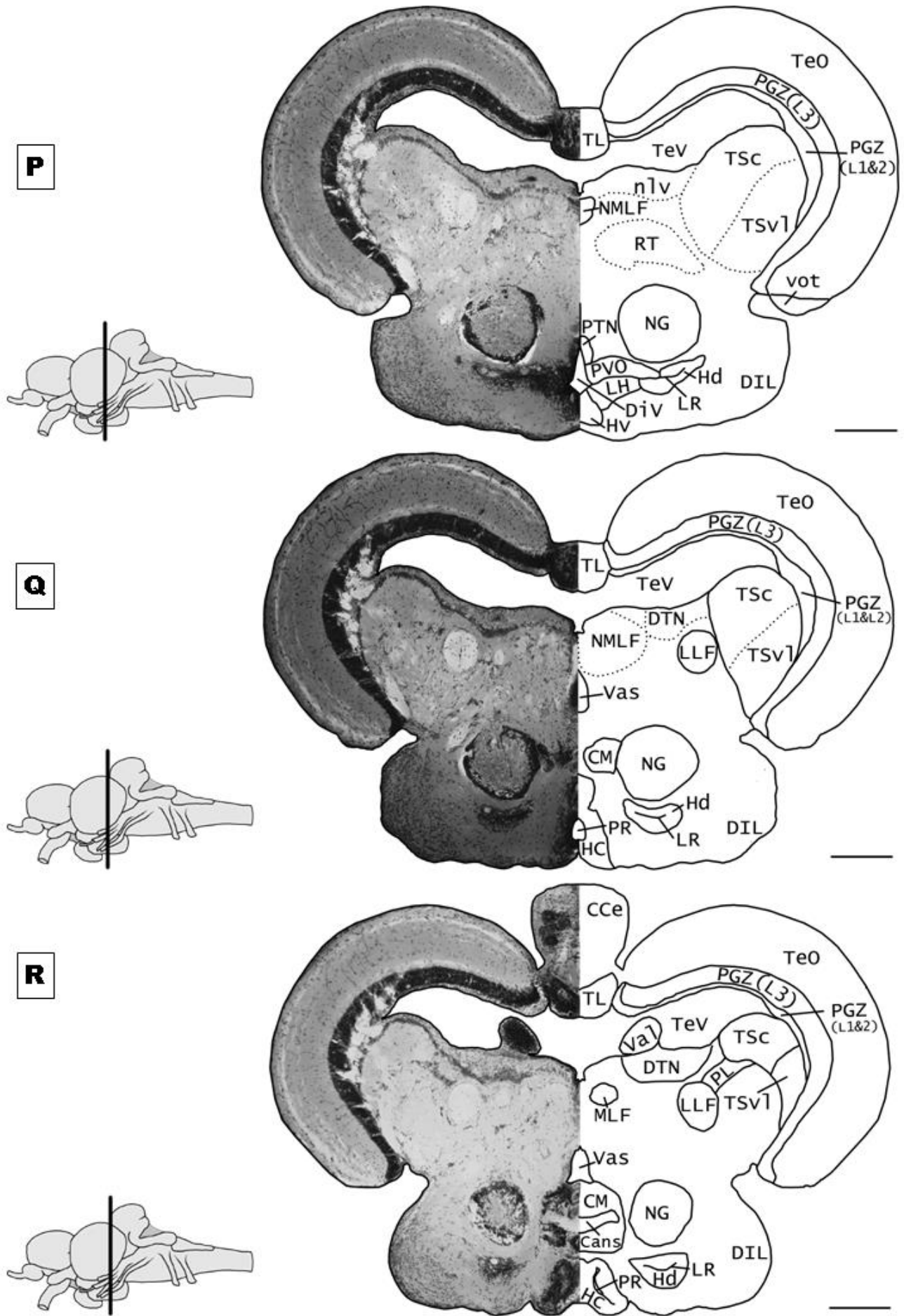
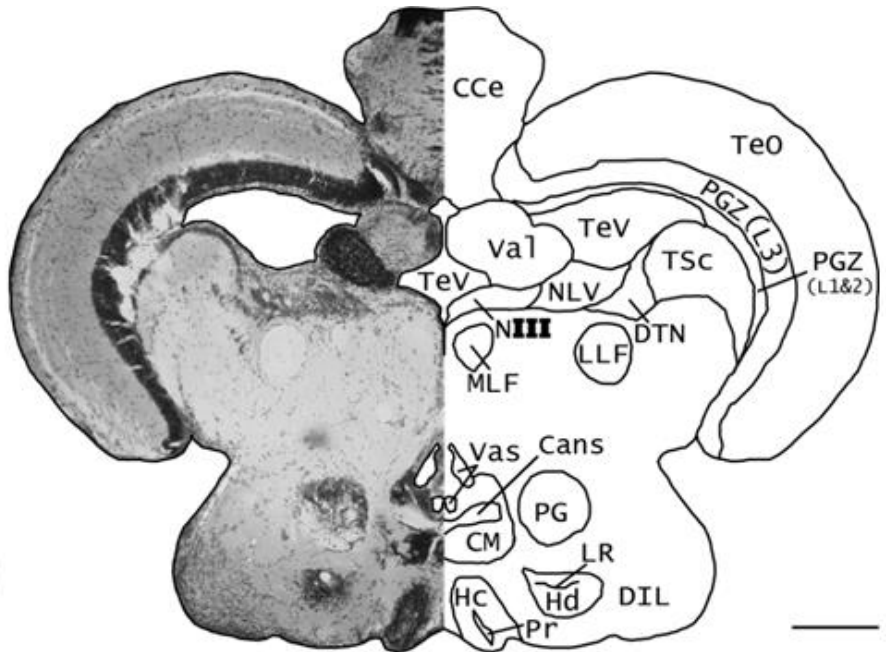
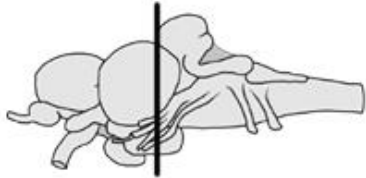
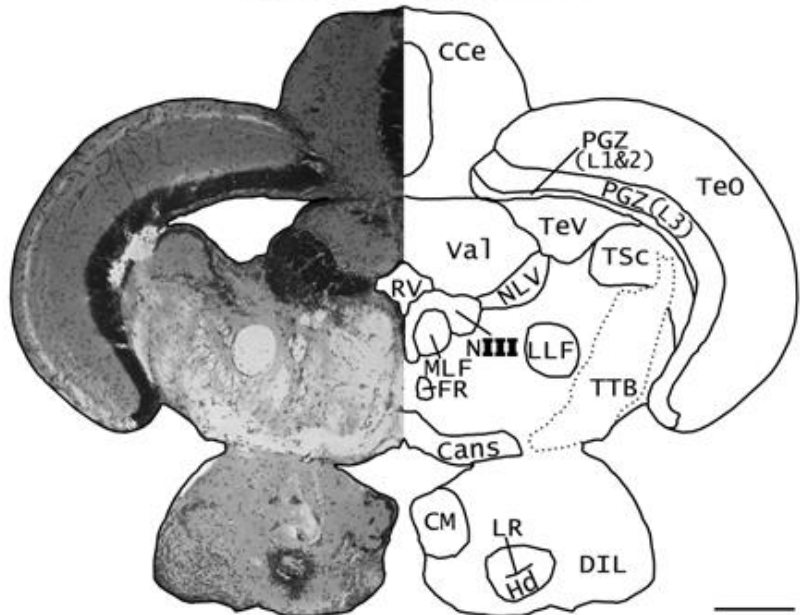
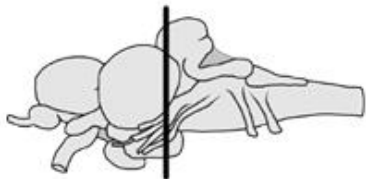


Figura 18 continuación

S



T



U

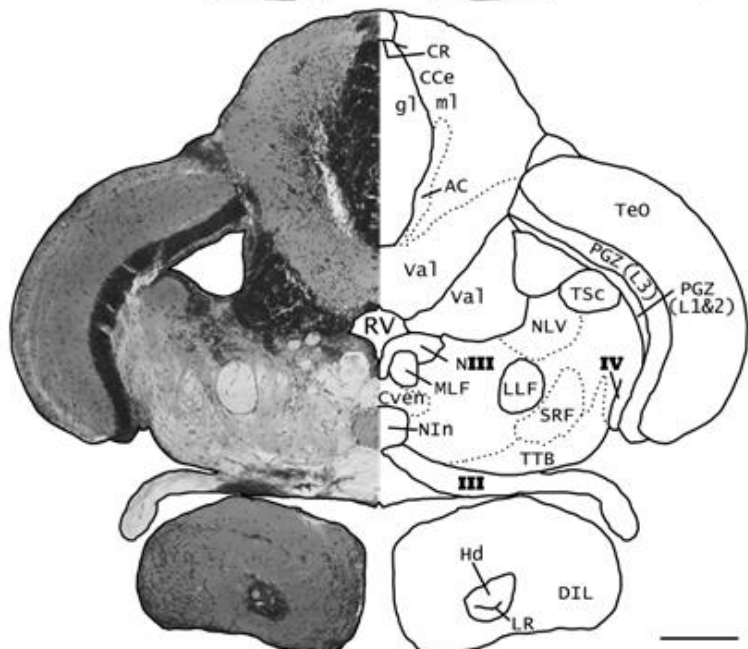
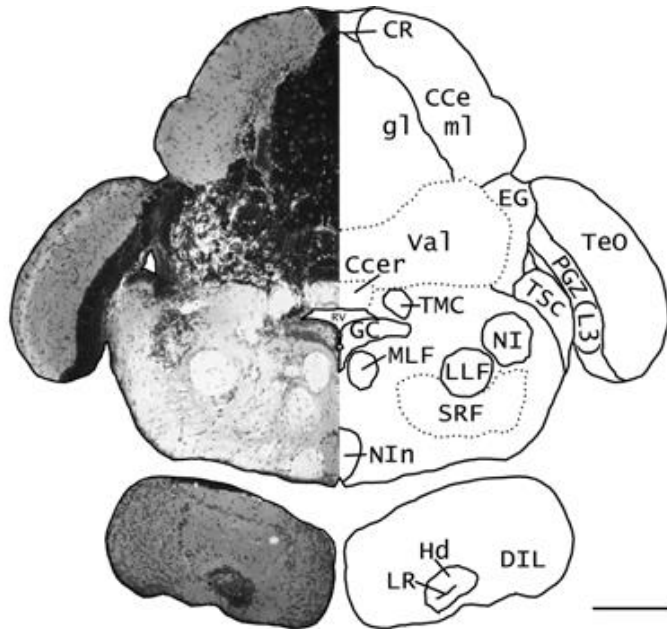
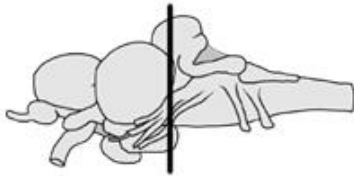
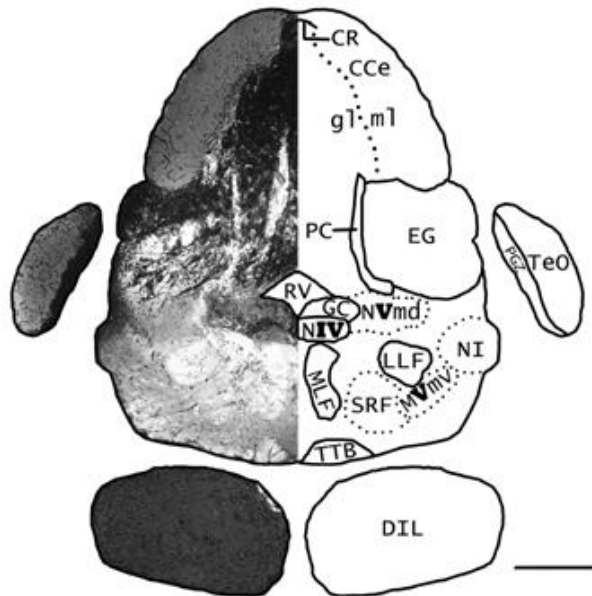


Figura 18 continuación

V



W



X

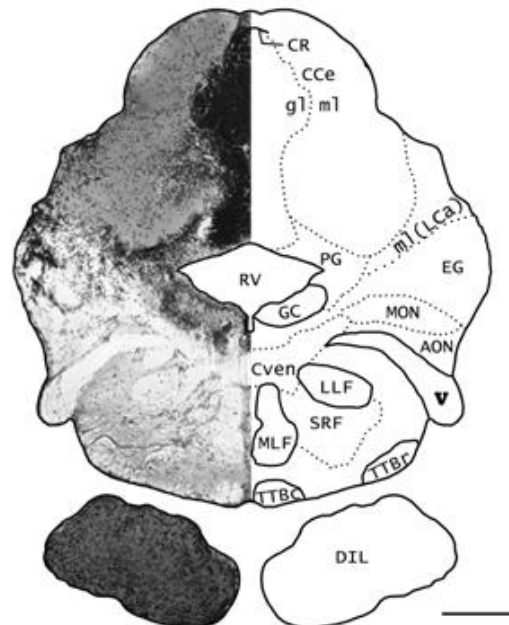
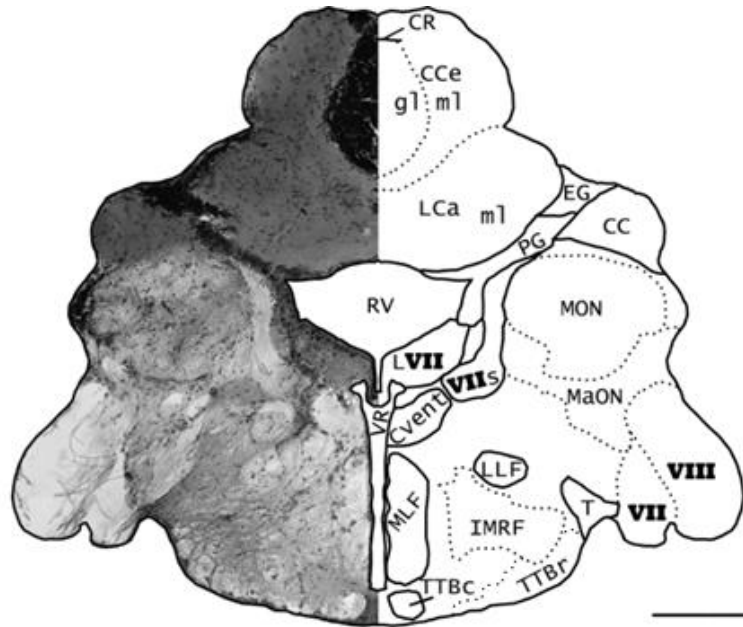
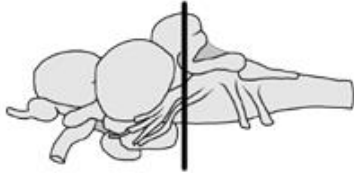
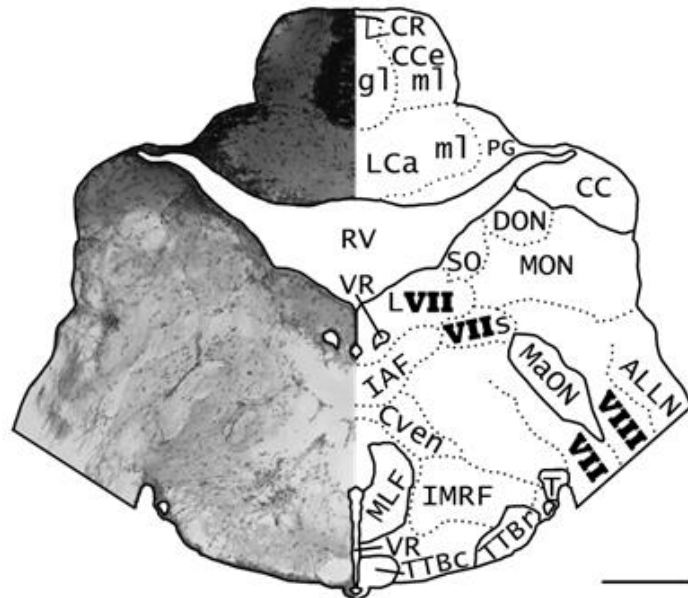
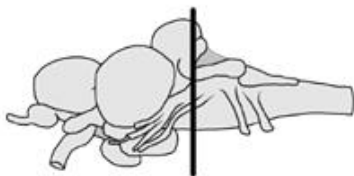


Figura 18 continuación

Y



Z



A'

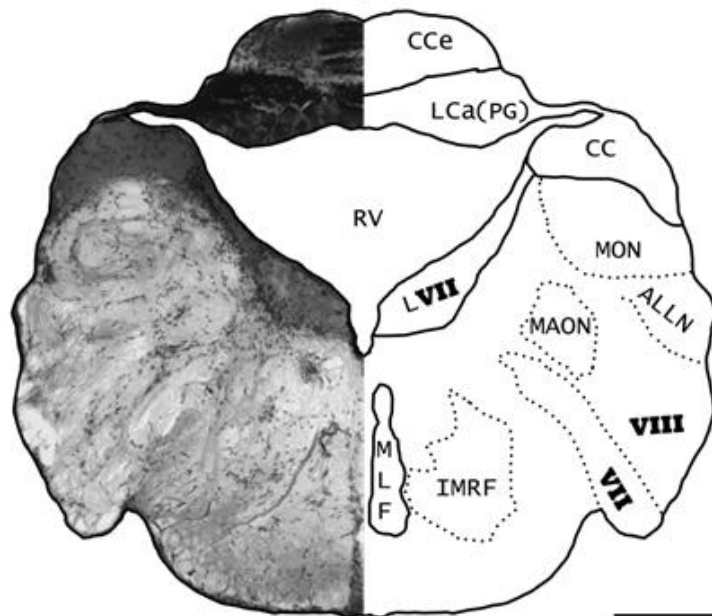
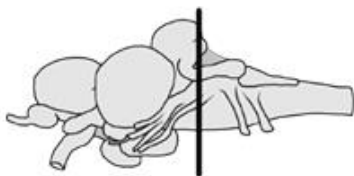
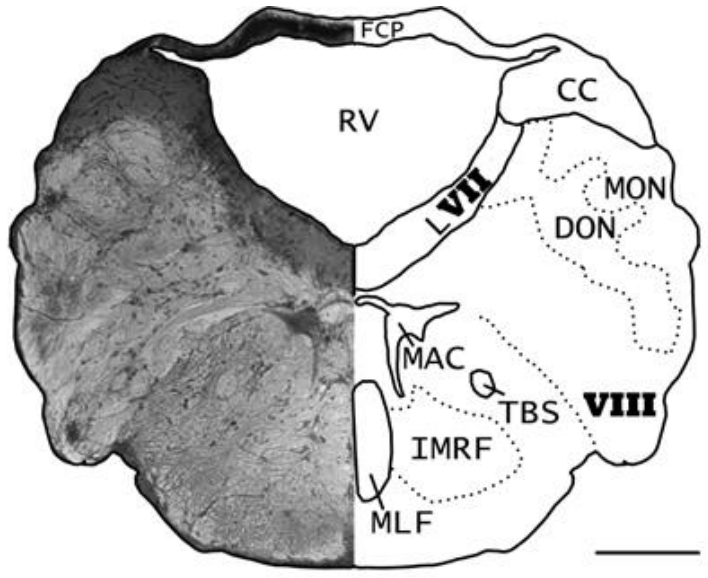
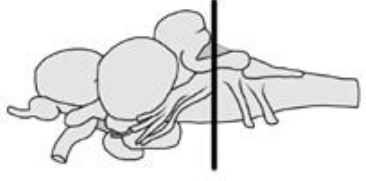
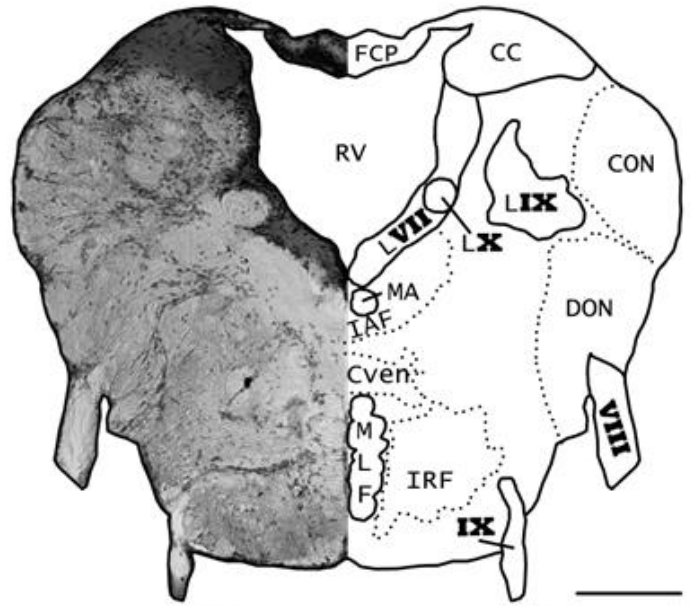
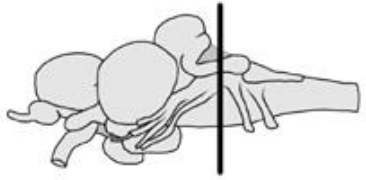


Figura 18 continuación

B'



C'



D'

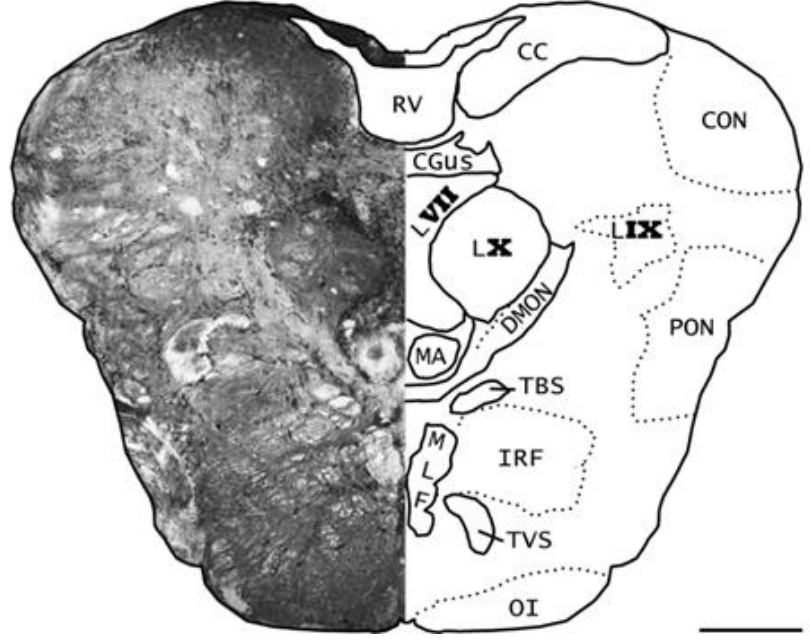
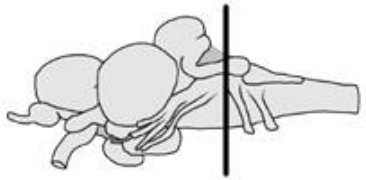
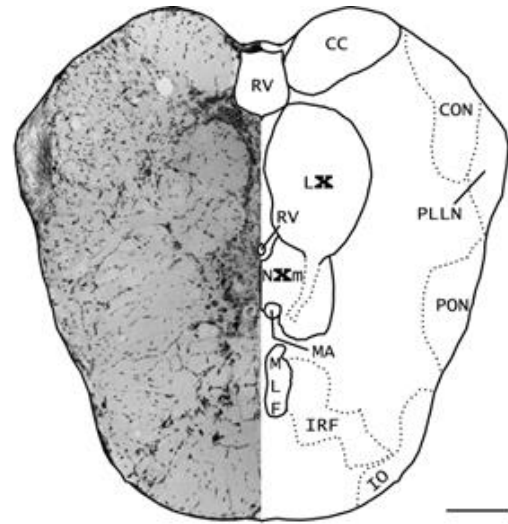
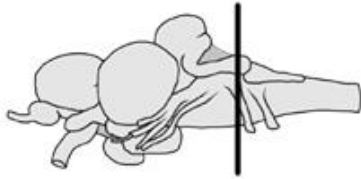
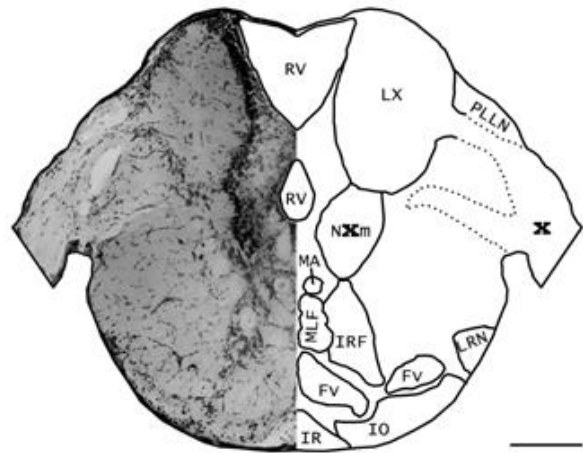
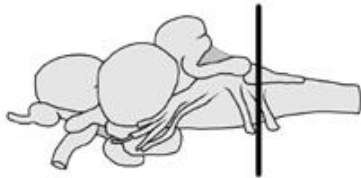


Figura 18 continuación

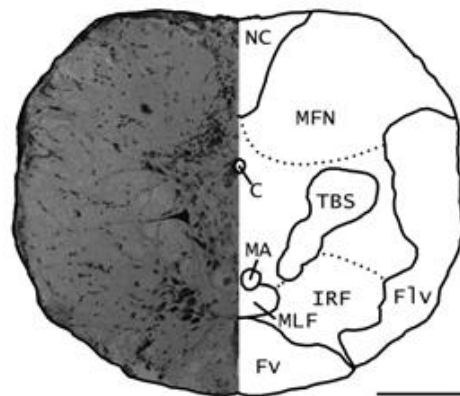
E'



F'



G'



H'

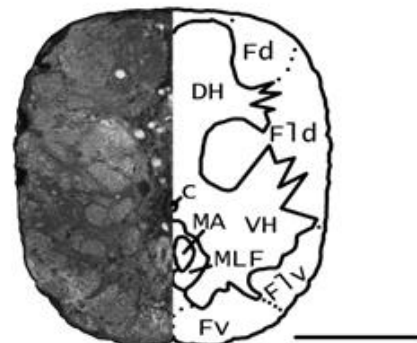


Figura 18 continuación

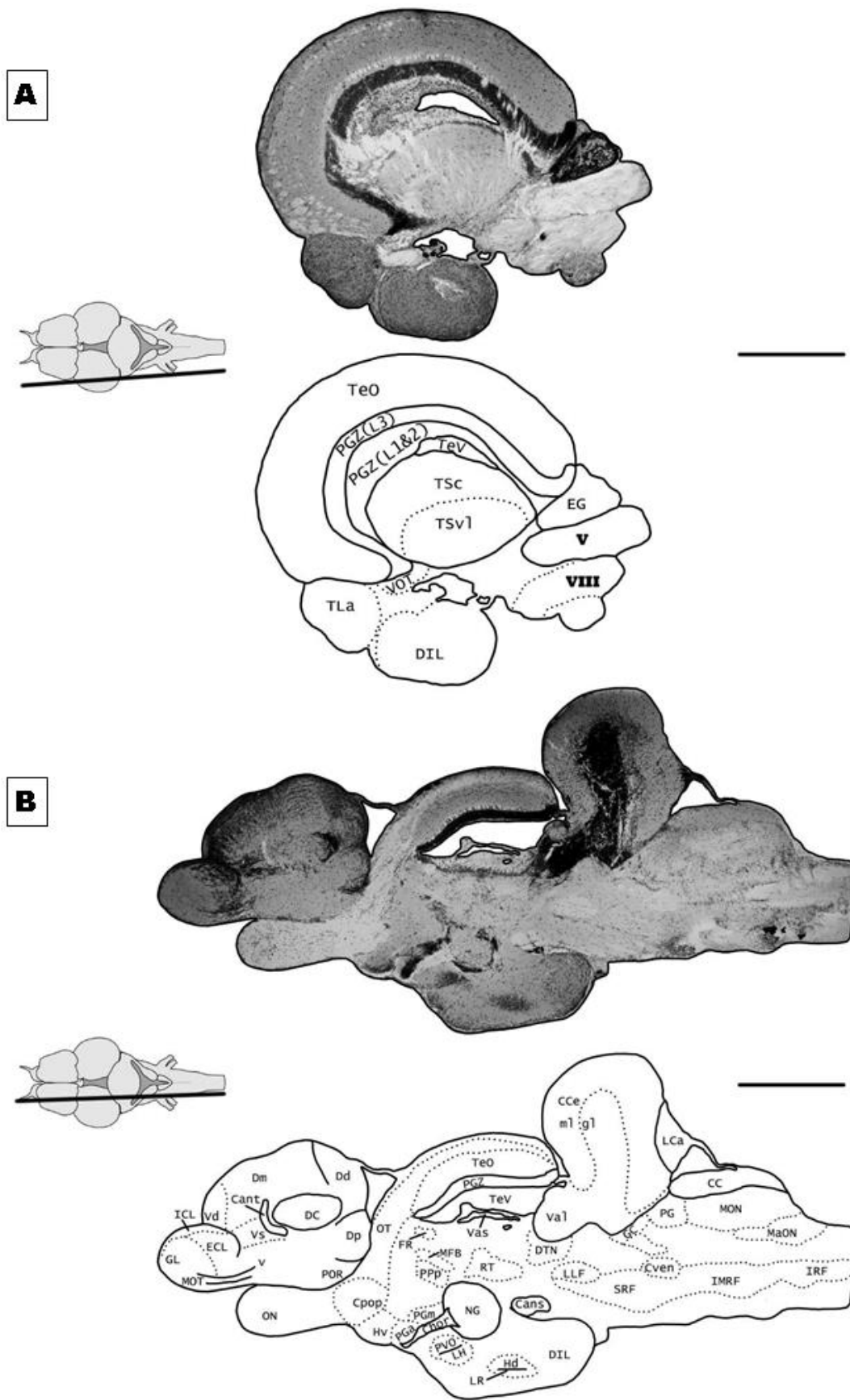


Figura 19. Cortes parasagitales de 20µm teñidos según la técnica de Nissl. Barras=200µm

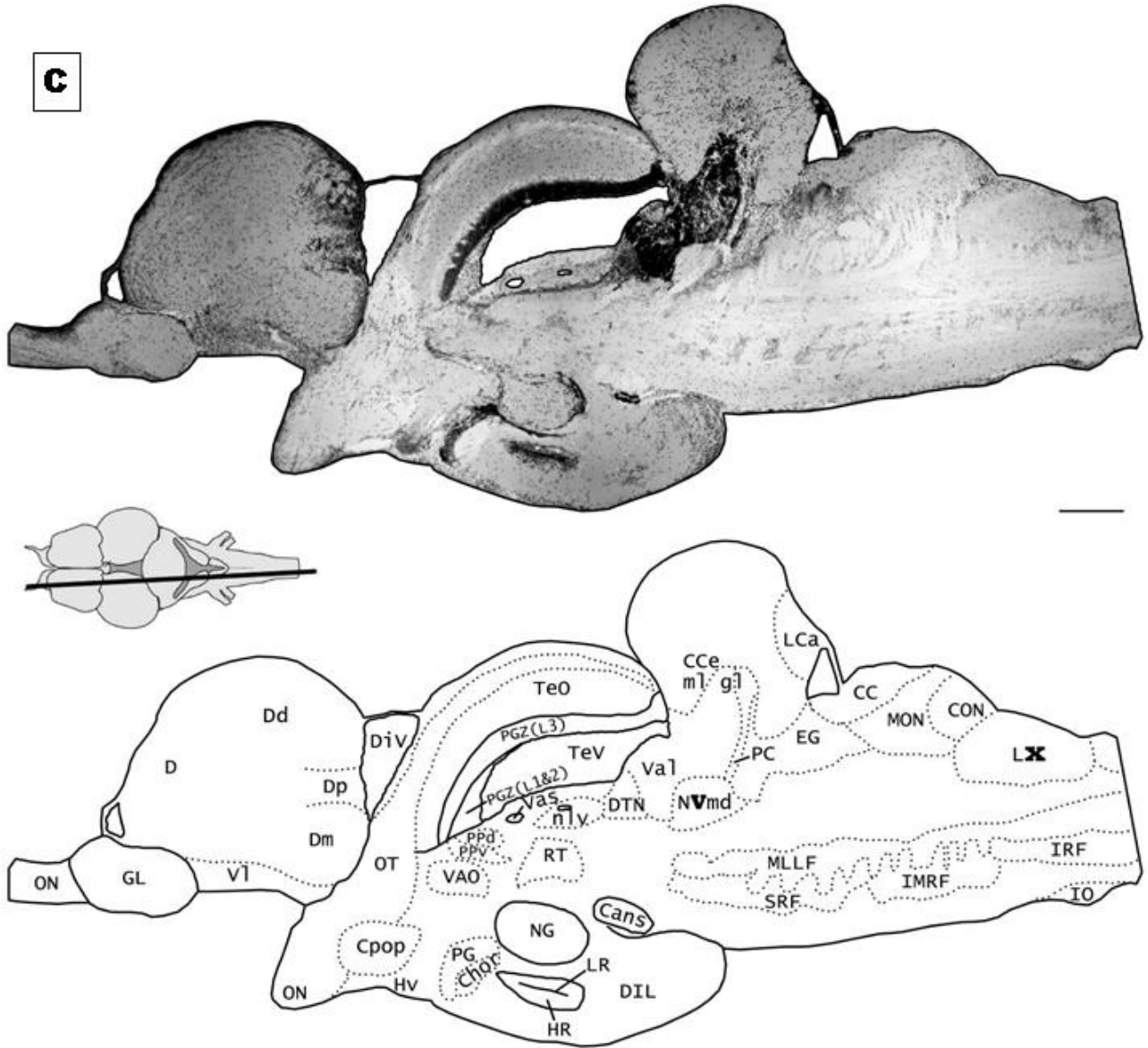


Figura 19 continuación

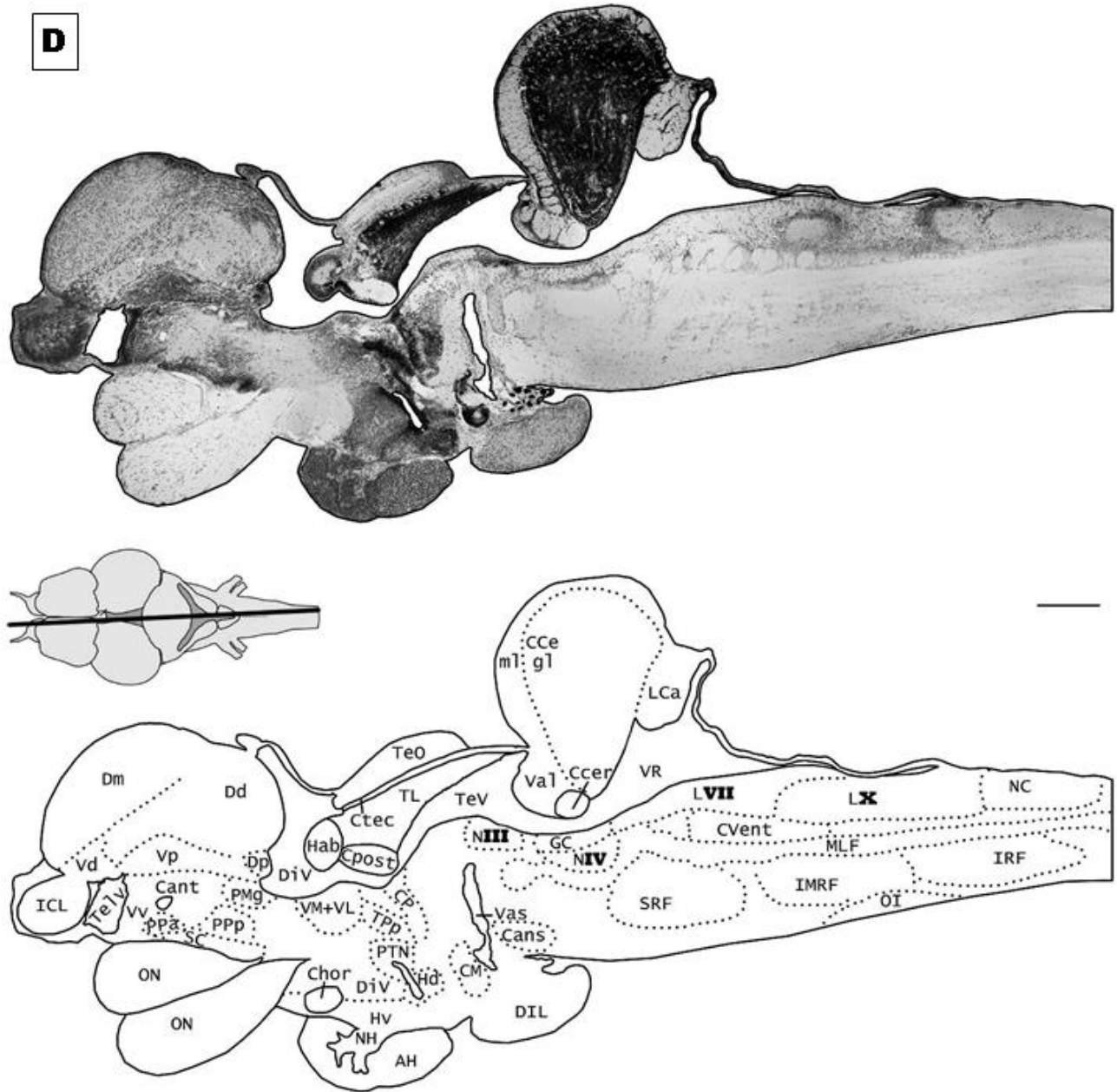


Figura 19 continuación

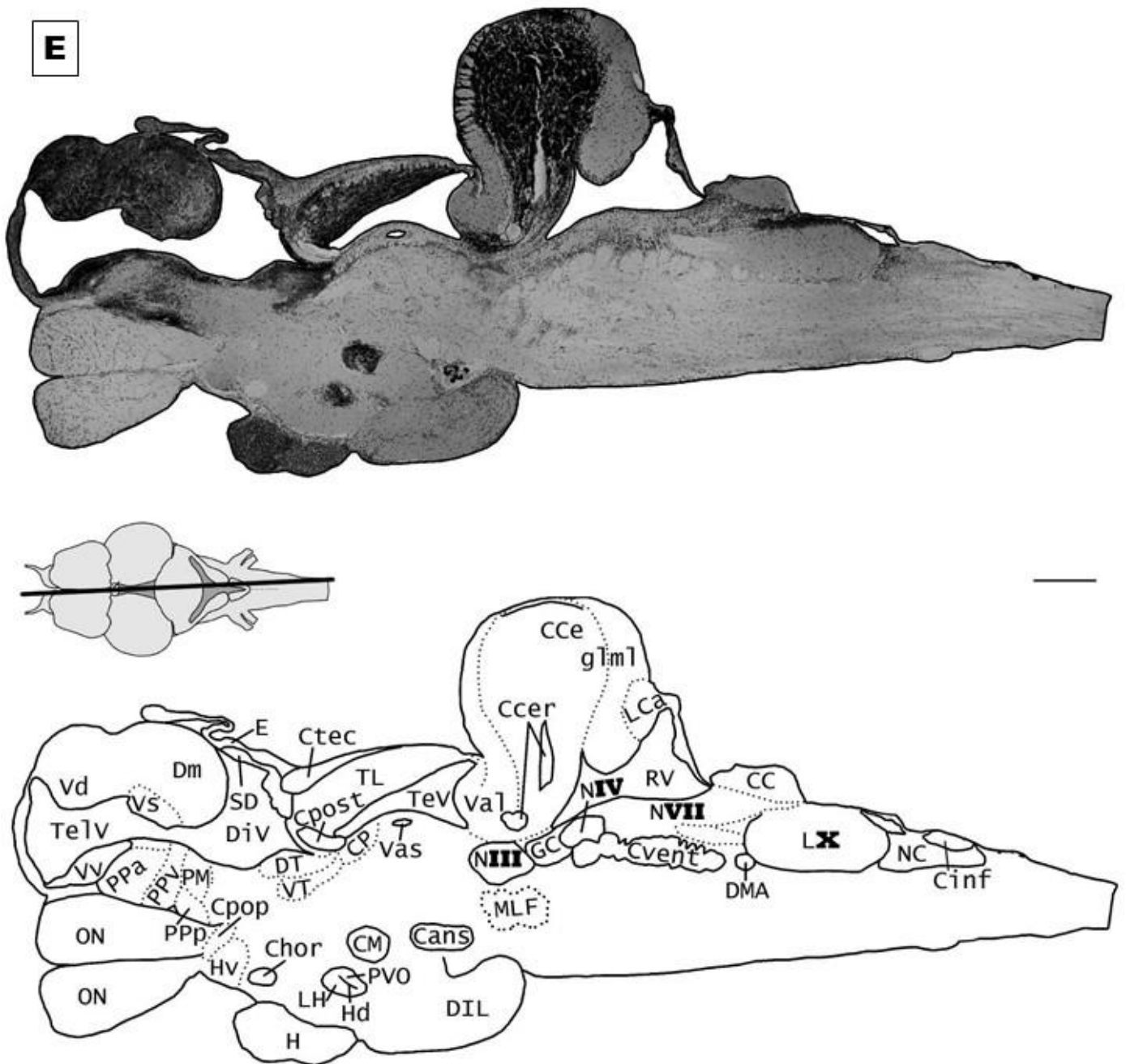


Figura 19 continuación

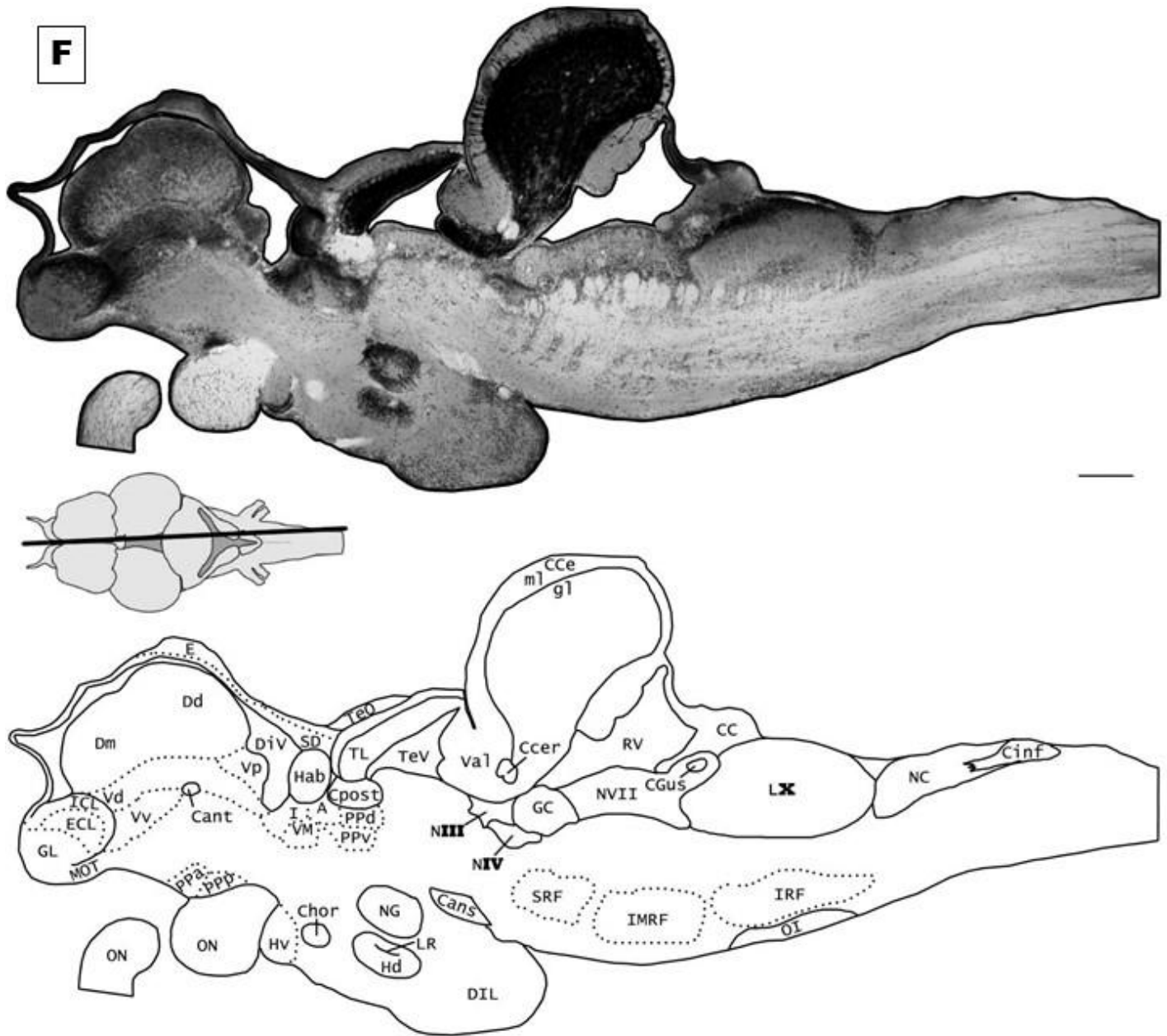


Figura 19 continuación

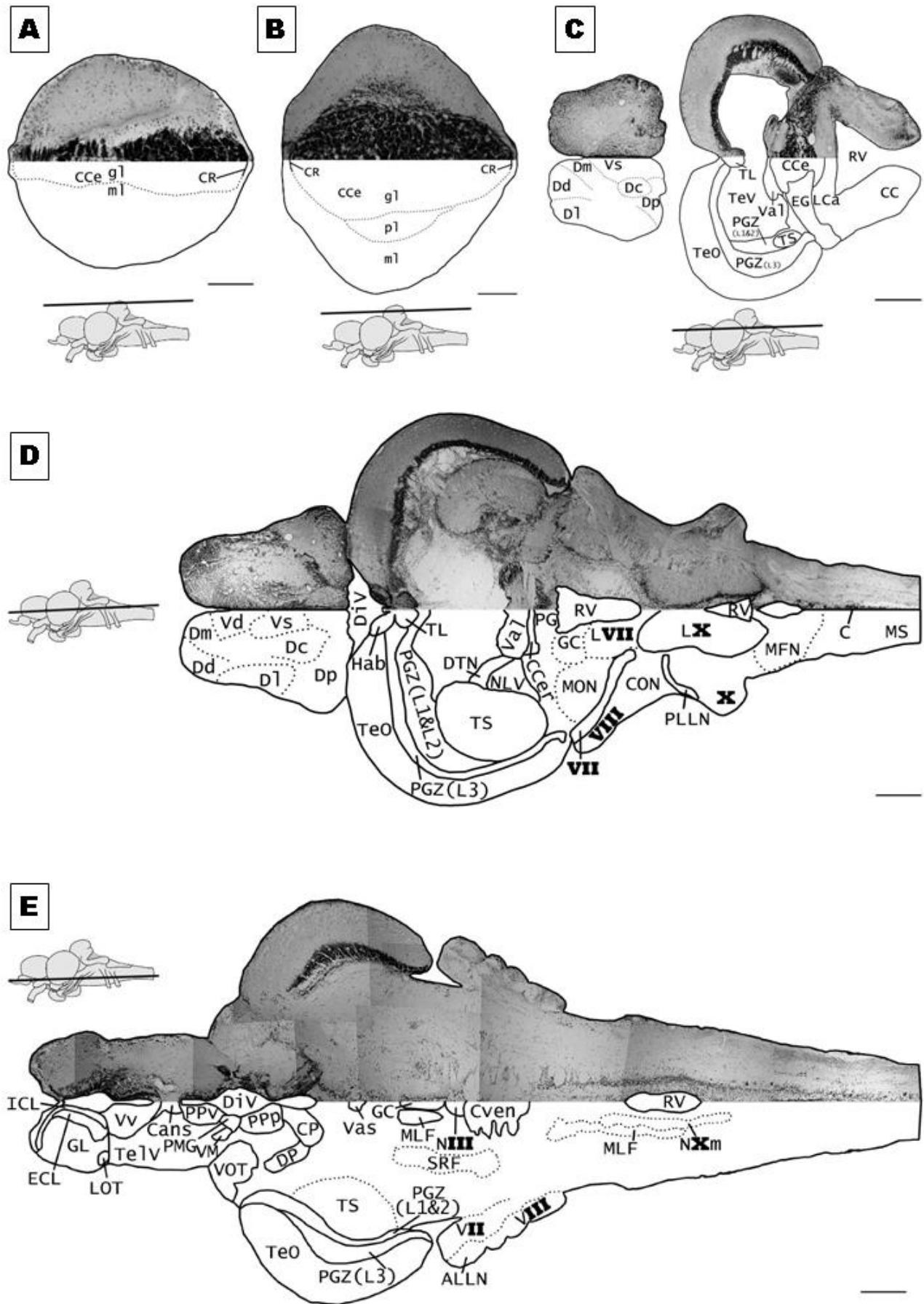


Figura 20. Cortes horizontales de 20µm teñidos según la técnica de Nissl. Barras=200µm

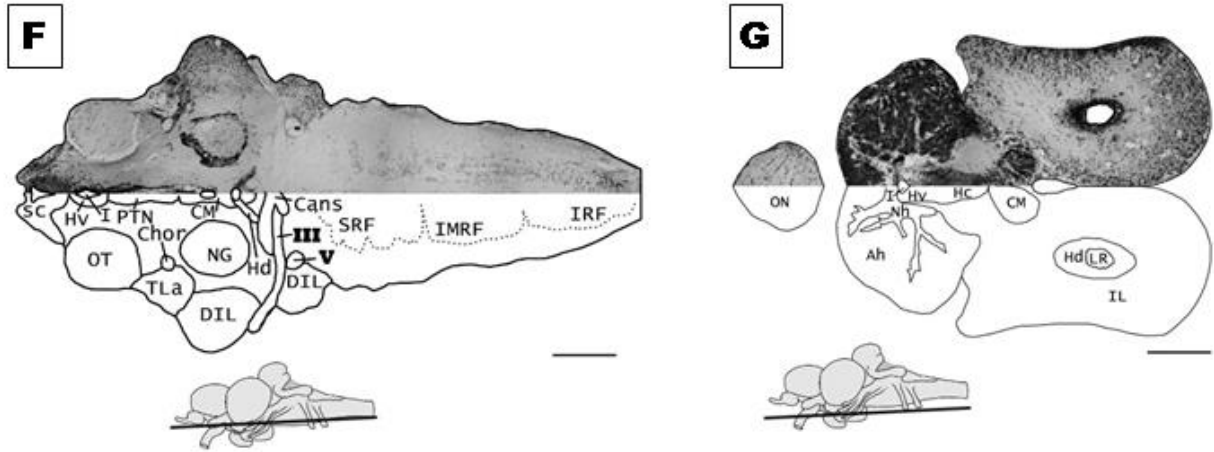


Figura 20 continuación

El diencéfalo posee un par de grandes senos vasculares denominados laguna vascular del área postrema (Vas), que penetra por la parte medio-ventral del hipotálamo a nivel de la zona caudal, se dorsalizan medialmente y se lateralizan hacia ambos hemisferios (Fig 18 N-T; Fig 19 D).

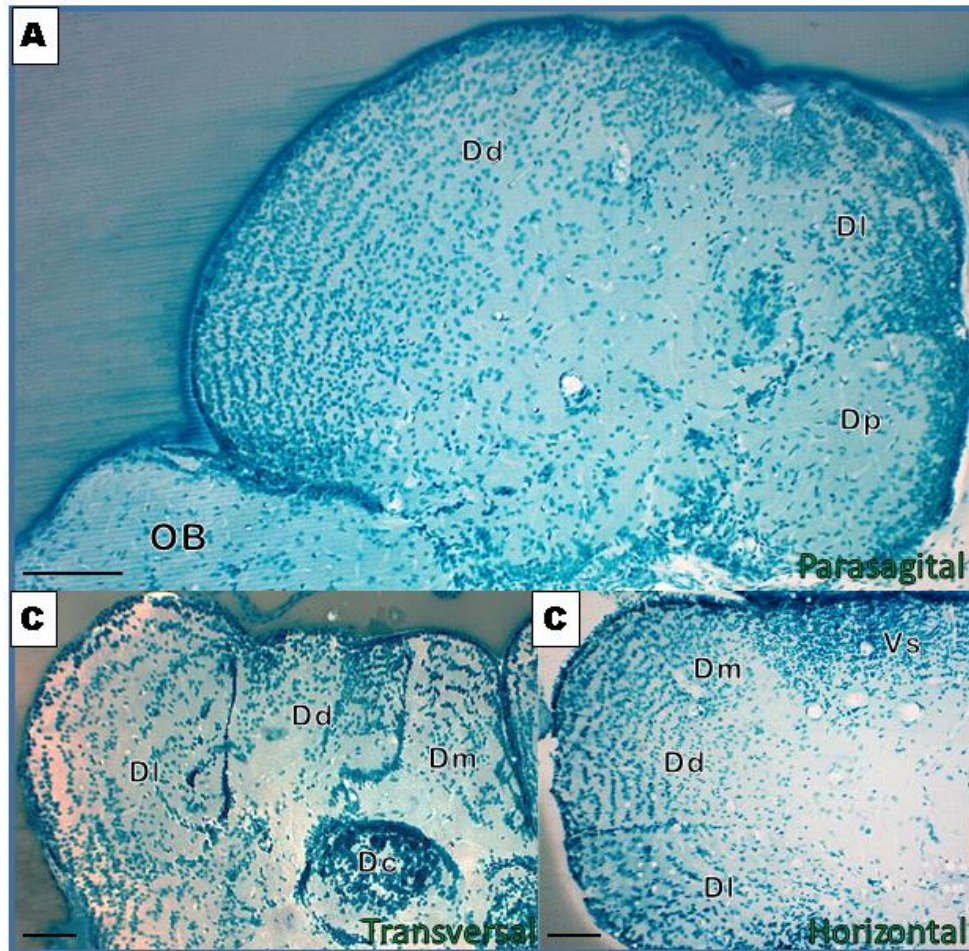


Figura 21. Cortes parasagital (A), transversal (B) y horizontal (C) del telencéfalo de *A. charrua*. Se puede apreciar la distribución en estrato de las neuronas del área dorsal del telencéfalo, excepto en la zona central

El área preóptica está situada desde la parte ventral de la comisura anterior (Fig 18 F) extendiéndose ventralmente hasta la porción más rostral del hipotálamo (H) y es dividida en una serie de núcleos dispuestos en la región medial, donde se encuentra la primera porción del ventrículo diencefálico (DiV) (Fig 18 F-H). En la porción más rostral se disponen los núcleos parvocelular anterior preóptico (PPa) localizado inmediatamente ventral a la comisura anterior en el telencéfalo (Fig 18 F) y es reemplazado caudalmente por el núcleo preóptico parvocelular posterior (PPp) que se extiende caudalmente hasta la región final de la comisura postóptica (Cpop) y del cruzamiento interhemisférico de la comisura horizontal (Chor) (Fig 18 G-K).

Desde la región medial y hasta el final del Pp en situación ventromedial se localizó el núcleo supraquiasmático (SC). Hacia la región caudal del Pp y dorsal a éste, se localiza el núcleo preóptico magnocelular (PM) (Fig 18 H) que caudalmente es sustituido por la porción gigantocelular del núcleo preóptico magnocelular (PMg).

El pretectum aparece como un grupo de diversos núcleos celulares en disposición intercalada con los tractos ópticos (tracto óptico, OT) centro-laterales respecto a la última porción de la POA. Se localizaron en la primera porción los núcleos parvocelular (PSp) y magnocelular (PSm) (Fig 18 I-J). El núcleo magnocelular se continúa caudalmente con el núcleo posterior pretectal (PO) respecto al cuál ventralmente se localiza el núcleo óptico dorsal accesorio (DAO) y dorsalmente el núcleo pretectal accesorio (APN) (Fig 18 K). Por último se logró reconocer el núcleo óptico ventral accesorio (VAO) en una posición centro-medial (Fig 18 L). Desde la región más caudal y en posición ventral a los núcleos pretectales se localizó el tracto óptico ventrolateral (VOT) que se extiende hasta las porciones finales del tectum óptico (Fig 18 I-Q) y en posición medio-dorsal se localizó el tracto óptico dorsomedial (DOT) (Fig 18 I-J).

El epitálamo está compuesto por la habénula (Ha) dividida en dorsal (Had) y ventral (Hav) separadas por la comisura habenular (Chab) (Fig 18 K-L; Fig 22 A). De la habénula surge el fascículo retroflexo (FR) como una proyección de ésta (Fig 18 K). En la porción medio-dorsal de la habénula emergen la epíffisis (E) y el saco dorsal (SD) (Fig 18 K).

El tálamo dorsal (DT) surge caudalmente a la habénula y en la porción más rostral se encuentra el núcleo anterior (A), rodeando el ventrículo diencefálico que en esta región se presenta como una luz estrecha en la región dorsal (Fig 18 L). Caudalmente al núcleo anterior se encuentran el núcleo talámico dorsal posterior (DP) y el núcleo talámico central posterior (CP). El tálamo ventral está organizado en cuatro núcleos donde los tres primeros surgen en una localización rostral a la habénula. El núcleo ventrolateral (VL) y el núcleo ventromedial (VM) se localizan en la región dorso-lateral de Pp (Fig 18 J) y se extienden caudalmente adoptando una localización medial y el núcleo rostralateral (R) se ubica lateralmente al VL y VM entremezclado con fibras del tracto óptico dorsomedial (Fig 18 K-L). Por último, el núcleo intermedio (In) se ubica en posición ventral a la parte rostral de la habénula (Fig 18 K) y ventral a éste discurre el haz medial del procencéfalo (MFB) (Fig 18 K-L).

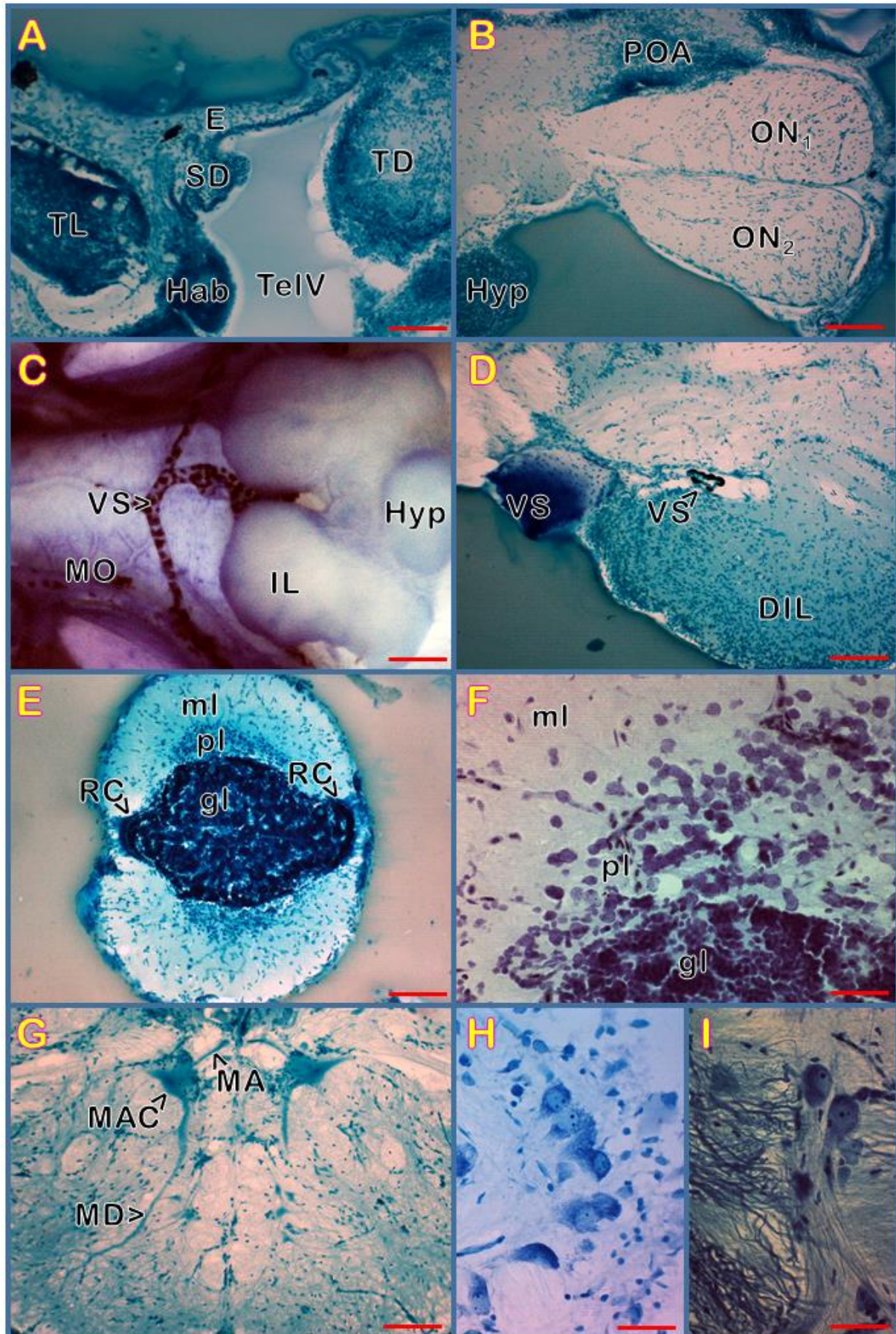


Figura 22. Cortes de diversas estructuras encefálicas teñidas con azul de metileno. A: órgano pineal, evidenciando la epífisis (E) y el saco dorsal (SD). B: entrecruzamiento de los nervios ópticos que no producen quiasma. C: Región ventral del encéfalo. No se localiza el saco vasculoso, en cambio, nótese la entrada de

grandes vasos con pigmentación (VS). D: se muestra un corte sagital de (B). E: Corte horizontal del *corpus cerebelli* en el que se encuentran sus capas típicas molecular (ml), Purkinje (pl) y granular (gl) y el receso cerebeloso CR tanto en la parte rostral como caudal. F: Ensanchamiento dorsolateral de la capa de Purkinje (pl) en el cerebelo. G: Detalle de las células gigantes de Mauthner (MAC), de sus axones (MA) y dendritas (MD). H-I: Neuronas teñidas con azul de metileno (40x) donde se aprecian núcleo claro, nucléolo basófilo intenso y citoplasma basófilo intenso producto de los grumos de Nissl.

El tubérculo posterior está conformado por diversos núcleos localizados en posición medial, central y lateral. En la región medial se ubican el núcleo periventricular del tubérculo posterior (TPp), el núcleo tuberal posterior (PTN) y el órgano paraventricular (PVO) localizados entre los núcleos talámicos e hipotalámicos (Fig 18 M-Q). A nivel del TPp el ventrículo diencefálico es tan estrecho que no se identifica la luz mientras que el PTN y PVO encierran una región ensanchada del ventrículo donde sí se observa una pequeña luz, donde nace el receso lateral del ventrículo diencefálico (LR) que se presenta como una luz estrecha que apenas se percibe (Fig 18 N-W). Hacia la porción central del tubérculo posterior se localiza el núcleo glomerular (NG) de forma cilíndrica rostrocaudalmente y rodeando a éste en toda su extensión, se ubica el núcleo preglomerular (Pg) formando una especie de cáscara (Fig 18 N-T). En la región medio-caudal se localiza el cuerpo mamilar (CM) (Fig 18 Q-S) que es interrumpido por la comisura ansulata (Cans), la cual lo divide en dos partes (Fig 18 S, T) y se extiende hasta la zona media de la región dorso-medial del lóbulo inferior. Desde la porción más rostral del tubérculo posterior hasta la más caudal, ubicado en la región ventro-lateral, se localizó el torus lateralis (TLa) como una estructura prominente de la región lateral del diencefalo el cuál termina fusionándose con el núcleo difuso del diencefalo (DIL) (Fig 18 L-O).

El hipotálamo (TH) (Fig 16; Fig 17; Fig 18 A-B) es la región más extensa del diencefalo y se divide en tres partes bien diferentes localizadas en tres grandes zonas, la ventral, dorsal y caudal. Macroscópicamente se puede observar la zona ventral que se conecta con la glándula hipófisis y una derivación de la región dorsal que se dispone como dos masas grandes, los lóbulos inferiores (IL) (Fig 16; Fig 17; Fig 18 A-B). En la zona ventral se localiza rostralmente el núcleo periventricular (Hv) que limita medialmente con el ventrículo del infundíbulo (I) (Fig 18 J-Q). En la porción medio-caudal y lateralmente al Hv se localizan el núcleo tuberal anterior (ATN) y reemplazándolo caudalmente el núcleo hipotalámico lateral (LH), quienes bordean la pared ventral del receso lateral del ventrículo diencefálico (LR) (Fig 18

N-Q). Este receso ventricular surge de la zona dorsal del hipotálamo y está rodeado dorsolateralmente por masas celulares periventriculares (Hd) (Fig 18 P-V). De la zona dorsal también surgen latero-ventralmente a este receso, el gran núcleo difuso del lóbulo inferior (DIL) que se continúa caudalmente y de forma discreta, hasta la mitad de la médula oblonga (MO) (Fig 18 N-Y). En la región dorso-medial del IL, se continúa el CM proveniente del tubérculo posterior (Fig 18 T). Caudalmente al surgimiento del LR y ventro-medial respecto a éste, surge un nuevo receso del ventrículo diencefálico de corta profundidad denominado receso posterior (PR), el que está bordeado por cúmulos celulares denominado núcleo periventricular (Hc) (Fig 18 R, S).

En el sinencéfalo se lograron detectar dos núcleos, ubicados entre la región dorsal de las estructuras hipotalámicas y el mesencéfalo. El núcleo del fascículo longitudinal medial (NMLF) del que se desprende el fascículo longitudinal medial (MLF) el que se extiende hasta la médula espinal (Fig 18 P-H'). En la región anterior del MLF y en posición latero-dorsal, se localiza el fascículo longitudinal lateral (LLF) que también se proyecta hasta regiones medulares (Fig 18 Q-F'). También se localizó el pretectum periventricular separado en parte dorsal y parte ventral (PPd y PPv, respectivamente) y en la zona medial a éstos cruza la comisura posterior (Cpost) (Fig 18 M).

Organización del mesencéfalo

El mesencéfalo se ubica entre los núcleos diencefálicos y los rombencefálicos. Consta de tres regiones que son el tectum óptico en situación dorsal y el *torus semicircularis* y tegmentum en situación ventral. Macroscópicamente se puede observar el tectum óptico (TeO) que se presenta como una estructura en forma de cascos pareados en el dorso del encéfalo (Fig 16; Fig 17) donde medial a éste e interconectándolo, se encuentra el *torus longitudinalis* (TL) (Fig 16; Fig 17; Fig 18C). Estos cascos encierran un gran ventrículo denominado ventrículo tectal (TeV) que se expande en toda la extensión rostrocaudal del mesencéfalo.

El TeO posee una compleja estructura de siete capas dispuestas en cuatro zonas (Fig 23), la zona gris periventricular (PGZ), la zona blanca profunda (DWZ), la zona central (ZC) y la zona superficial gris y blanca (SWGZ). La SWGZ se conecta con el

torus longitudinalis (TL) que es una eminencia medial de células granulares. En la zona dorsal del TL discurre la comisura intertectal (Ctec), que se presente como múltiples cordones de fibras que atraviesan el TL contactando ambos casquetes tectales siendo más grueso en la región rostral y va disminuyendo su grosor caudalmente (Fig 18 M; Fig 19 E). En secciones sagitales se puede apreciar que rostralmente presenta una conexión con la comisura posterior y en la región caudal está conectado con la valvula cerebelli (Fig 19 E).

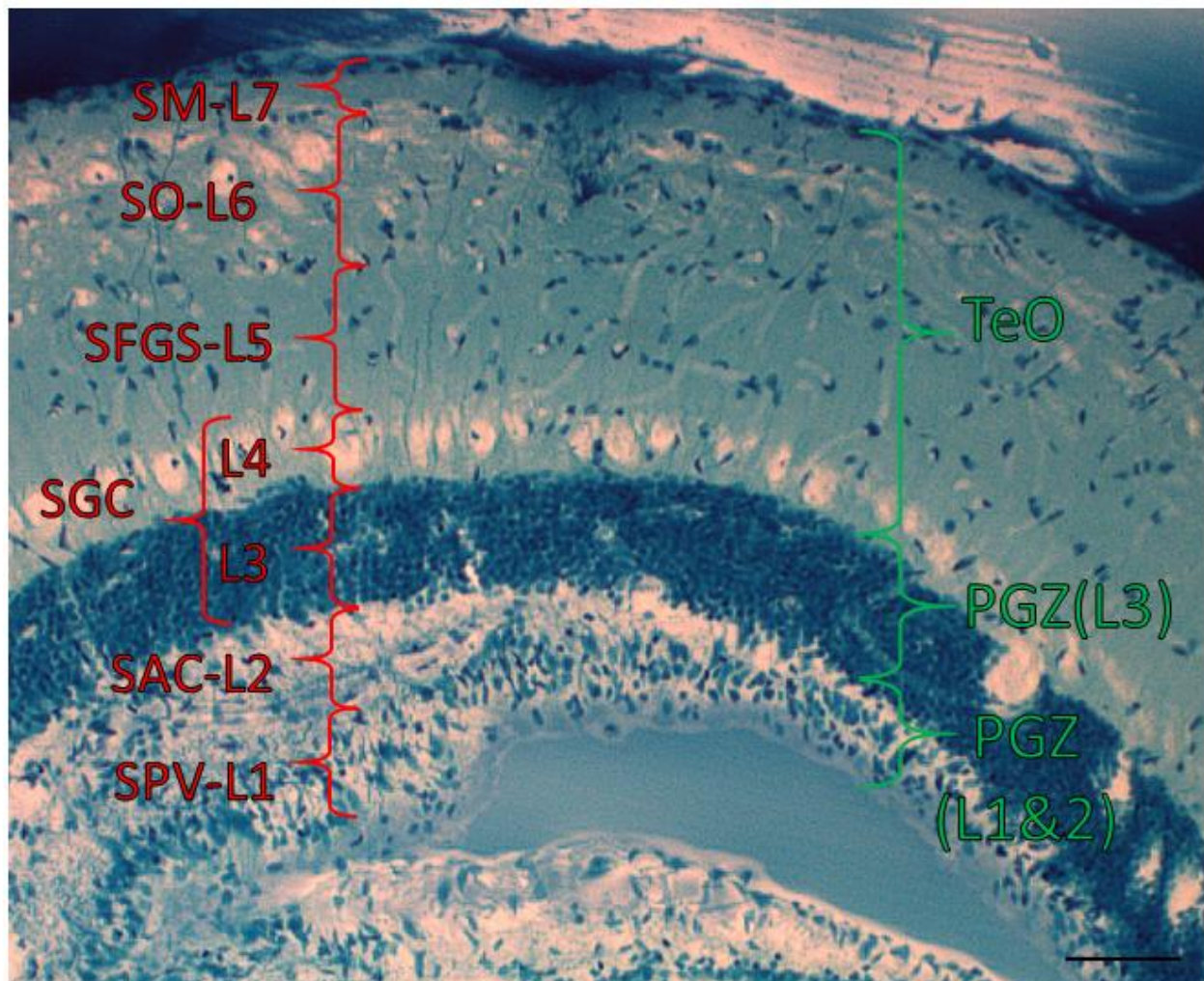


Figura 23. Histología del tectum óptico. Se observan las 7 capas que constituyen al tectum óptico, de ventrículo a superficie pial: SPV-L1: estrato periventricular, SAC-L2: estrato olbo central, SGC (L3-L4): estrato gris central, SFGS-L5: estrato fibroso y gris superficial, SO: estrato óptico, SM: estrato marginal. PGZ: zona gris periventricular. TeO: Tectum óptico. Barra=50 μ m

El *torus semicircularis* (TS) se presenta como masas bilaterales ubicadas latero-dorsalmente, por debajo del ventrículo tectal y en su región lateral, está en estrecho contacto con la región lateral del tectum óptico (Fig 18 N-V; Fig 19 A; Fig 20 E, F). La parte más dorsal se extiende en toda su longitud y se denomina núcleo central

(TSc) (Fig 18 N-V) y en la parte media se presenta ventral a éste el núcleo ventrolateral (TSvl) (Fig 18 P-R).

El tegmentum consta de una serie de núcleos relacionados con sistemas motores, como el núcleo del nervio oculomotor (NIII), el núcleo del nervio troclear (NIV) y la porción rostral de la formación reticular (SRF) (Fig 18 U-Y; Fig 19 F). También se localizan en esta región el núcleo tegmental rostral y dorsal (RT y DTN) (Fig 18 P-S), el núcleo perilemniscal (PL) (Fig 18 R), y el núcleo interpeduncular (NIn) (Fig 18 U, V). El DTN caudalmente da lugar a un núcleo con densidad celular mayor, denominado núcleo valvular lateral (NLV) (Fig 18 R-U). El origen aparente del nervio oculomotor se da lateral a la comisura ansulata (Cans) por debajo de la SRF y por encima del DIL, mientras que el origen aparente del nervio troclear se da en posición dorsal al oculomotor y lateral a la SRF (Fig 18 U).

Organización del rombencéfalo

El rombencéfalo o encéfalo posterior se subdivide en dos grandes regiones: una rostral o metencéfalo que está en contacto con tectum y tegmentum mesencefálico; y una caudal o mielencéfalo representado por la médula oblonga (Fig 16; Fig 17). La médula oblonga junto con la porción tegmental del mesencéfalo, forman el tronco encefálico. El metencéfalo de *A. charrua* se puede identificar macroscópicamente, ya que está formado por una serie de estructuras que forman el cerebelo (Ce). El cerebelo está dividido en tres grandes regiones, el lóbulo vestibulolateralis, el *corpus cerebelli* (CCe) y la valvula cerebelli (Val). Internamente se localiza el ventrículo rombencefálico (RV) o cuarto ventrículo conectado rostralmente con el ventrículo tectal (Fig 19 D) y caudalmente con el canal endimario. Este ventrículo es delimitado ventro-lateralmente por las estructuras rombencefálicas así como también la primera parte dorsal (Fig 19 D). En la parte dorsal a nivel caudal es delimitado por la formación coroidea posterior (FCP) (Fig 18 B'-G'; Fig 19 B-F).

La valvula cerebelli es una estructura pareada, localizada en la región más rostral del metencéfalo, de pequeño tamaño y se halla ubicada por dentro del ventrículo tectal, conectada a la región más caudal del *torus longitudinalis*. Está compuesta por dos capas muy claramente identificables, una capa granular que aparece

fuertemente teñida y una capa molecular de tinción débil (Fig 18 R-V). La capa molecular se presenta dorsal y la granular es ventral, donde contacta con el NLV (Fig 18 S-U). En la región medial de la capa molecular, rostral a la comisura cerebelosa, se observan grupos celulares dispuestos en columnas que atraviesan esta capa en toda su extensión (Fig 19 D).

El *corpus cerebelli* (CCe) se presenta como una estructura única en toda su extensión, voluminosa y ubicada dorsalmente sobresaliendo por detrás del tectum óptico (Fig 16; Fig 17; Fig 18 A-B). Está compuesto por una masa celular interna o capa de células granulares (gl) que son intensamente teñidas debido a su gran densidad; una capa molecular (ml) externa que recubre periféricamente la capa granular; y una intermedia (pl) entre las anteriores donde aparecen núcleos de células de tipo neuronas de Purkinje, mucho más grandes que las granulares (Fig 18 R-Z; Fig 19 B-F; Fig 20 A-C). Las células tipo Purkinje no se disponen en una monocapa en todo el CCe como sucede en otros vertebrados, sino que se observan grandes engrosamientos, en particular en la región dorso-medial (Fig 22 F; Fig 19 B). En la región medial entre la capa granular y la molecular se localiza el receso cerebelar (CR) que es una estructura de tipo ventrículo con una luz estrecha o nula (Fig 22 E, F; Fig 18 U-Z; Fig 20 D-F; Fig 19 A-B). Este receso se extiende desde la región rostro-ventral, bordea toda la región dorsal y termina en la porción ventro-caudal. Entre el receso y la superficie pial de la capa molecular se localizan una serie de células alargadas asociadas con otras células que no presentan esta morfología y forman columnas celulares que presentan una fuerte tinción, generando un aspecto de escalera (Fig 18 U-W; Fig 19 D-F; Fig 20 A-B).

El lóbulo vestibulolateralis (LV) consiste en dos grandes regiones metencefálicas, la eminencia granular (EG) y el lóbulo caudal (LCa) posicionados en la región caudo-lateral y caudo-central, respectivamente (Fig 16; Fig 17). La EG está compuesta por un grupo grande de células granulares contiguas a las capas granulares de la Val y del CCe (Fig 18 V-Y; Fig 20 C). En la región caudal del CCe se localiza el lóbulo caudal (LCa) que se presenta como una capa molecular dificultando su distinción de la molecular del CCe y de una masa granular celular periventricular (PG) (Fig 18 X-A'; Fig 20 B-E; Fig 19 C). Del extremo más caudal del LCa se desprende una tela de tipo coroidea que se denomina FCP que se extiende hasta la porción caudal de la médula oblonga encerrando por debajo al cuarto ventrículo o ventrículo rombencefálico (RV) (Fig 18 B'-G'; Fig 20 B-F). Las capas moleculares y granulosas del CCe y del LV se interconectan entre sí y la capa molecular del LCa se extiende

caudalmente por encima del área octavolateralis de la médula oblonga formando una estructura denominada crista cerebellaris (CC) (Fig 18 Z, A'; Fig 19 E, F; Fig 20 C).

La médula oblonga (MO) (Fig 18; Fig 17) se ubica en posición ventral al cerebelo y por detrás del tegmentum, abarcando una serie de núcleos sensitivos, viceromotores y somatomotores. En relación al núcleo del nervio trigémino (V), se localizaron dos grupos celulares motor dorsal (NVmd) y ventral (NVmv) (Fig 18 V, W). El núcleo del nervio abducens (VI) se localizó como un único grupo celular ventral a la primera porción de la formación reticular intermedia (IMRF) (Fig 18 Z). El núcleo del nervio facial (VII) o lóbulo facial, se localiza contínuo a la central gris (GC) y se extiende caudalmente hasta la parte media del lóbulo vagal (LX) donde presenta su comisura (CGus) (Fig 16; Fig 17; Fig 18 Y-D'; Fig 19 C-F; Fig 20 D). El núcleo del nervio octaval (VIII) forma una gran región denominada octavolateralis y está subdividido en una serie de núcleos de los que se localizó el núcleo tangencial (T) (Fig 18 X-Z), el núcleo de la población octaval secundaria (SO) (Fig 18 Z), el núcleo medial octavolateral (MON) (Fig 18 Y-B'), el núcleo anterior octavolateral (AON) (Fig 18 Y), el núcleo magnocelular octavolateral (MaON) (Fig 18 X-A'), el núcleo descendiente octavolateral (DON) (Fig 18 Z), el núcleo posterior octavolateral (PON) (Fig 18 D', E') y el núcleo caudal octavolateral (CON) (Fig 18 D', E'). El núcleo del nervio glosofaríngeo (IX) se ubica en posición dorsal y la salida del nervio es ventral (Fig 18 C'-D'). El núcleo del nervio vago (X) o lóbulo vagal (LX) se extiende dorsalmente y su nervio se desprende dorsolateralmente previo al cierre del ventrículo rombencefálico (Fig 16; Fig 17; Fig 18 C'-F'; Fig 20 D). Otros nervios craneales que presentan su origen en la médula oblonga son los nervios de la línea lateral anterior (ALLN) (Fig 16; Fig 17; Fig 18 X) y posterior (PLLN) (Fig 16; Fig 17; Fig 18 E', F'). Lateral a los núcleos motores del trigémino se localizó el núcleo istmo (NI) (Fig 18 V, W). La formación reticular se presenta como una estructura longitudinal al eje rostro-caudal, presentando 3 partes de la cual la más rostral, la formación reticular superior (SRF) tiene su origen en el mesencéfalo (Fig 18 U-W), y la formación reticular intermedia (IMRF) y la inferior (IRF) la reemplazan caudalmente en la médula oblonga (Fig 18 X-G'). En la médula oblonga se localizó el par de células gigantes de Mauthner (MAC) donde su soma (Fig 22 G) se posiciona por detrás de la comisura pequeña octavolateral (IAF) (Fig 18 B') y sus axones (MA) decusan y discurren medialmente en sentido caudal hacia la médula espinal (Fig 18 C'-H'). Hacia el final de la médula oblonga en posición dorsal se localiza el núcleo

comisural de Cajal (NC) (Fig 18 G') y ventralmente la oliva inferior (IO) (Fig D'-F'). En cuanto a los tractos que se localizaron en la médula oblonga tenemos el (TMC) en la porción rostral en posición dorsal (Fig 18 V); el fascículo longitudinal lateral (LLF) que se origina en el sinencéfalo (Fig 18 Q-W); el tracto tecto-bulbar (TTB) que se presenta como dos estructuras ventrales localizadas en posición medial (TTBc) y lateral (TTBr) (Fig 18 W-Z); el tracto bulbo-espinal (TBS) que emerge de la IMRF y se proyecta dorso-lateralmente hasta la región caudal (Fig 18 -B'); y el tracto vestibulo-espinal (TVS) que surge de la IRF y se proyecta caudalmente en posición ventromedial (Fig 18 D'). Se localizaron algunas comisuras tales como la IAF y CGus anteriormente mencionadas, así como también la decusación del área octavolateralis (DMON) (Fig 18 D') y la comisura ventral (Cven) que conecta los MLF contralaterales (Fig 18 Y-C'). Por último, a nivel del rombencéfalo se localizó una laguna vascular rombencefálica (RV) que penetra medialmente por la región ventral a nivel de la porción rostral del LVII y a nivel dorsal se bifurca (Fig 18 X-Z).

Hacia el final de la médula oblonga comienzan a aparecer estructuras propias de la médula espinal tales como el núcleo funículo medial (MFN) (Fig 18 G'). Ambas estructuras se conectan manteniendo una continuidad del parénquima y del ventrículo rombencefálico con el canal endimario o canal central (C) (Fig G'-H'). En la médula espinal la sustancia gris se localiza alrededor del canal central y posee dos astas dorsales (DH) muy próximas y dos astas ventrales (VH) separadas por cordones de sustancia blanca como el MLF y MA (Fig 18 H'). En la periferia se localiza la sustancia blanca donde se distinguen los fúnculos dorsal (Fd), laterodorsal (Fld), latero-ventral (Flv) y ventral (Fv) (Fig 18 H').

Discusión

Este es el primer análisis exhaustivo de la anatomía macro y microscópica del encéfalo de un pez del género *Austrolebias* que permite la utilización de su contenido en diversas áreas de estudio sobre estos teleósteos (*e.g.* desarrollo, neurociencias, endocrinología, etología). Asimismo es el primer atlas generado para una especie nativa del Uruguay.

En este primer capítulo se analizó la anatomía macroscópica y microscópica en los tres planos de corte del encéfalo adulto de *A. charrua*. La realización de cortes en

orientaciones parasagital, horizontal y transversal, permitió realizar un seguimiento tridimensional de las estructuras internas que, con un sólo plano, no se podría conocer completamente. Por ejemplo para describir la estructura y situación del receso cerebeloso es necesario utilizar un análisis basado en las tres orientaciones (Fig 22 E). En lo que respecta a la literatura sobre atlas encefálicos completos en los tres planos, tenemos disponible el realizado por Wullimann *et al.*, en 1996, el cual nos permitió comparar la topología interna, siempre guiado por los datos de los cortes en planos transversales. Para realizar los cortes seriados fue importante poner a punto una técnica de imbibición del encéfalo en un medio que permitiera orientar la pieza y que los grandes espacios ventriculares, característicos de los teleósteos, estén rellenos y que esto permita realizar cortes fieles a la realidad anatómica. Por este motivo, se realizaron las inclusiones y encastres en gelatina.

Aspectos metodológicos

La inclusión en gelatina resulta propicia para realizar los cortes del encéfalo ya que durante la imbibición de la gelatina en el tejido, los grandes ventrículos característicos de los peces se rellenan y permite que no se generen alteraciones en las relaciones anatómicas ni pérdidas de fracciones de tejido periventricular. Por ejemplo, permite conservar las estructuras epitalámicas y la glándula hipófisis, que protruyen por fuera del encéfalo. Asimismo, los cortes obtenidos a 20 μ m son de fácil obtención cuando se incluye en gelatina. El encastre de la pieza permite obtener un área de sujeción para montar sin dañar la integridad histológica y permite generar muescas para la correcta orientación a la hora de visualizar al microscopio. Otra ventaja de este procedimiento respecto a la inclusión en resinas, es que el material biológico (encéfalo) no es sometido a deshidrataciones o altas temperaturas durante el procedimiento, generando una fiel descripción de la morfología y textura del encéfalo en estadio vivo. La tinción de Nissl en cortes a 20 μ m, también tiene sus ventajas ya que se pueden visualizar alrededor de dos capas y genera la posibilidad de identificar grupos celulares mejor definidos, respecto los cortes de 5 μ m en resinas que dificultan la clara visualización.

Telencéfalo

Si bien el telencéfalo de diferentes teleósteos varía notablemente en topología y número de las masas celulares, el patrón de organización general coincide con el descrito en otras especies (Northcutt, 2008). El bulbo olfatorio de *A. charrua* está bien desarrollado teniendo un tamaño relativamente grande en comparación con otras estructuras encefálicas, sin llegar a ser una estructura exageradamente grande como en otros teleósteos como *Gymnothorax kidako*, donde es del mismo tamaño que los lóbulos telencefálicos (Ito *et al.*, 2007). Datos aún no publicados pero que surgen de finas disecciones del encéfalo junto con el nervio olfatorio y el epitelio olfatorio, sugieren que al igual que en otros teleósteos, el órgano olfatorio está directamente conectado con el bulbo olfatorio que, en el caso de *A. charrua* está adosado al resto de las estructuras encefálicas en lo que se denomina conformación sésil como lo descrito para *Anguilla japonica*, *Salmo gairdneri*, *Nothobranchius furzeri*, *Danio rerio*, *Sparus aurata*, *Toxotes chatareus*, *Gymnotus carapo*, *Oreochromis mossambicus*, *Dicentrarchus labrax* no siendo así en *Tinca tinca* donde se presentan pedunculados (Mukuda y Masaaki, 2003; Meek y Nieuwenhuys, 1998; D'Angelo 2010; Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; Karoubi N *et al.*, 2016; Arévalo Ro *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2012; Cerdá-Reverter *et al.*, 2001). La penetración del nervio en el bulbo olfatorio es en sentido ventro-lateral y profunda y en su trayectoria van desprendiéndose las ramas de las aferentes primarias olfativas que forman la capa glomerular que en *A. charrua* se presenta en la región latero-ventral. En contraparte la conformación de estas estructuras en otros peces es diferente, llegando a formarse una capa de fibras olfatorias primarias como en *D. rerio*, *A. japonica* y *N. furzeri*, donde además la capa glomerular se da en toda la periferia del bulbo, lo que conlleva a que la disposición de esta capa y la celular interna y externa se dispongan concéntricamente (D'Angelo 2010; Wulliman *et al.*, 1996). La nomenclatura de las diferentes capas del bulbo olfatorio hace referencia a una distribución concéntrica descrita en la mayoría de los teleósteos, y ésta no coincide con su localización anatómica en *A. charrua* debido a la diferencia notable que existe en la disposición de las capas del bulbo en esta especie (Mukuda y Masaaki, 2003; Meek y Nieuwenhuys, 1998; D'Angelo 2010; Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; Karoubi *et al.*, 2016; Arévalo *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2012; Cerdá-Reverter *et al.*, 2001).

Los lóbulos telencefálicos de *A. charrua* presentan la estructura característica de los actinopterigios adultos, es decir con la conformación evertida del telencéfalo

dorsal donde en teleósteos se observa un grado de eversión mayor que en los otros linajes (Nieuwenhuys R, 2011). Esta eversión (Fig 24) hace que el telencéfalo posea dos características, en primer lugar que la zona endodimial se extiende desde la región medial hacia la dorso-lateral, y en segundo lugar la línea celular que une a los hemisferios telencefálicos en la zona dorsal se expande lateroventralmente cubriendo la zona endodimaria y se denomina *tela telencephali* (Meek y Nieuwenhuys, 1998; II).

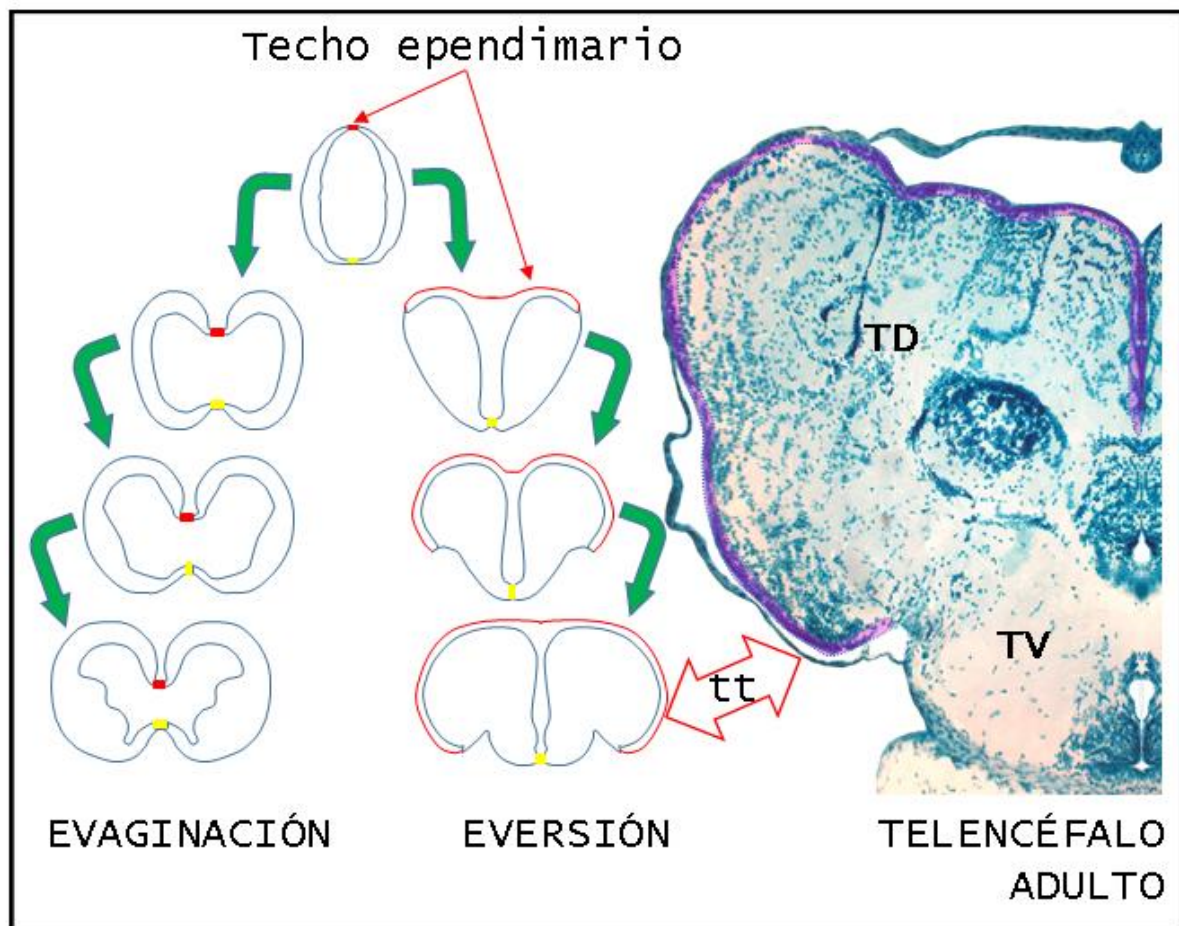


Figura 24. Eversión del telencéfalo durante el desarrollo. En la izquierda se esquematizan las modalidades evaginada y evertida de la morfogénesis del telencéfalo en vertebrados. En la derecha se muestra un corte de hemitelencéfalo de *A. charrua* donde se muestra la tela telencephali (tt) como producto final del techo endodimario y en lila se muestra la zona ventricular extendida dorso-latero-ventral.

La composición interna de los lóbulos telencefálicos es similar a la presentada en la mayoría de los teleósteos formando grupos celulares separados en cinco grandes áreas periféricas excepto el área central del telencéfalo dorsal que presenta forma de columna longitudinal como en *N. furzerii* y *A. japonica*, no así en *D. rerio* y otros teleósteos (Mukuda y Masaaki, 2003; D'Angelo 2010; Wulliman *et al.*, 1996;). El área dorsal y ventral del telencéfalo pueden ser denominada indistintamente como

pallium y *subpallium* respectivamente, nomenclatura que se acuña para realizar comparaciones funcionales con vertebrados tetrápodos (Yamamoto, 2009). La distribución de las neuronas en forma de capas (Fig 21) presentes en las áreas telencefálicas (excepto el área central) no ha sido descrita para otros teleósteos, pero sí en condrosteos como esturiones (Obukhov, 1999) sugiriendo que esta presentación ha surgido en dos eventos distintos en la evolución de los actinopterigios. Esta conformación es característica de la corteza hexalaminada compleja de los mamíferos denominada neocortex (Karten, 1991), aunque se han encontrado circuitos telencefálicos en teleósteos tan complejos como en los vertebrados laminados (Ito y Yamamoto, 2008). El núcleo taenia se presenta en el borde latero-ventral a nivel del surgimiento de la *tt* como se ha descrito en otros teleósteos como *T. japonicus* (Ou y Yamamoto, 2016). El telencéfalo ventral presentó las seis regiones descritas para la mayoría de los teleósteos que son la Vv, Vd, VI, Vs, y Vp (Mukuda y Masaaki, 2003; Meek y Niewwenhuys, 1998; D'Angelo 2010; Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; Karoubi N *et al.*, 2016; Arévalo Ro *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2012; Cerdá-Reverter *et al.*, 2001). Asimismo no se lograron localizar la parte intermedia (Vi) (Ou y Yamamoto, 2016) y la parte central (Vc) de la zona ventral como se ha descrito en algunos teleósteos (Maler *et al.*, 1991; Correa *et al.*, 1998; Northcutt, 2006; Burmeister *et al.*, 2009; Baile y Patle, 2011; D'Angelo 2013; Dewan y Tricas, 2014). La comisura anterior que marca el límite posterior del telencéfalo ventral y dónde, comienzan los núcleos del área preóptica, se presenta como una estructura única de decusación de fibras, diferenciada de la comisura anterior de *D. rerio* la cual está compuesta por varias partes (Wullimann *et al.*, 1996).

Diencefalo

El diencefalo de *A. charrua* presentó las estructuras y regiones características de los peces teleósteos, sin embargo se encontraron algunas diferencias (Ou y Yamamoto, 2016, Mukuda y Masaaki, 2003; Meek y Niewwenhuys, 1998; D'Angelo 2010; Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; Karoubi N *et al.*, 2016; Arévalo Ro *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2012; Cerdá-Reverter *et al.*, 2001). El área preóptica que en muchos vertebrados es considerada anatómicamente como parte del hipotálamo, en peces en general es considerada como una entidad discreta formando un puente entre el telencéfalo y el hipotálamo. En general está formada por una región de pequeñas neuronas (parvocelular) y una

región de grandes neuronas (magnocelular), con sus respectivas subdivisiones, de las cuales no se logró localizar la porción parvocelular del núcleo preóptico magnocelular como en goldfish, *Carassius auratus*, (Braford, 1983), pero si el resto de las subdivisiones parvo- y magnocelulares como en otros teleósteos (Wulliman *et al.*, 1996; Ou y Yamamoto, 2016; Mukuda y Masaaki, 2003; Meek y Niewwenhuys, 1998; D'Angelo 2010; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001).

En el pretectum no se localizó el núcleo central pretectal (PCN) como en *D. rerio* (Wulliman *et al.*, 1996).

El tálamo se dividió en tálamo ventral subdividido en ventrolateral, ventromedial y núcleo talámico intermedio, y el tálamo dorsal subdividido en tálamo anterior, central posterior y dorsal posterior, como lo descrito para otros teleósteos (Schnitzlein, 1962; Braford y Northcutt, 1983; Meek y Niewwenhuys, 1998; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; D'Angelo 2010; Ou y Yamamoto, 2016; Wulliman *et al.*, 1996).

No se lograron identificar el núcleo talámico posterior (P) y el núcleo subglomerulosus (SG) como han sido descritos en otros teleósteos (Wulliman *et al.*, 1996; Braford y Northcutt, 1983; Meek y Niewwenhuys, 1998; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001; D'Angelo 2010).

La conformación en forma de cáscara redondeada del complejo preglomerular no permite discriminar los subnúcleos como ocurre en otros teleósteos donde se encuentran como grupos celulares bien diferenciados entre sí (Wulliman *et al.*, 1996; Braford y Northcutt; Ou y Yamamoto, 2016). Sin embargo ésta morfología presentada en *A. charrua* se ha descrito en otras especies como *N. furzeri*, *T. chatareus* y *S. aurata* (D'Angelo 2010; Karoubi *et al.*, 2016; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001).

El ventrículo infundibular o receso infundibular se presentó como una luz estrecha encerrado por las paredes del hipotálamo ventral en la región de conexión hipotálamo-hipófisis. Cabe destacar que en las disecciones del encéfalo entero, este se extrae junto con la hipófisis de modo de no perder la relación y situación de ésta respecto el hipotálamo.

El receso lateral del ventrículo diencefálico está colapsado y en gran parte no se percibe claramente una luz, como ocurre con otros peces (Wulliman *et al.*, 1996).

El receso posterior (PR) en *A. charrua* se presenta estrecho y poco profundo en comparación con otros teleósteos en los cuales es vasto y profundo (Wulliman *et al.*, 1996).

La organización del tubérculo posterior presentó grandes similitudes con otros teleósteos (Wulliman *et al.*, 1996; Braford y Northcutt; 1983) sin embargo el cuerpo mamilar presentó diferencias con *Trachurus japonicus* y *O. niloticus* donde se distinguen tres subdivisiones (Ou y Yamamoto, 2016; Sawai *et al.*, 2000), en *Haplochromis burtoni* al igual que en *A. charrua* no se presentaron subdivisiones (Fernald y Shelton; 1985) y en *A. leptorhynchus* y *N. furzeri* no se describió esta estructura (Maler *et al.*, 1991; D'Angelo, 2013).

En el sinencéfalo únicamente se localizaron el núcleo del fascículo longitudinal medial y el pretectum periventricular, en contraste con otros teleósteos donde se han descrito también otras estructuras como, el núcleo paracomisural y el órgano subcomisural (Wulliman *et al.*, 1996). Para poder identificarlos de forma precisa, se tendría que realizar un estudio más fino que implique otras metodologías histológicas.

Existe una estructura diencefálica que se presenta en los peces y algunos anfibios, que es el saccus vasculosus. Este saco se forma en el piso del diencéfalo como un receso derivado del infundíbulo y que cumple algunas funciones importantes tales como censar la presión de la columna de agua en el punto donde está situado el animal, así como también censar el fotoperíodo a lo largo de las estaciones climáticas. Se ha descrito que este saco tiene una estructura y tamaño variables, siendo muy grande en peces de agua salada, de tamaño mediano en peces de río y muy reducido o ausente en peces de pequeños cuerpos de agua y charcos (Van de Kamer y Schuurmans, 1953). En *A. charrua*, luego de una búsqueda exhaustiva tanto en la anatomía externa como en los cortes seriados de todo el encéfalo, no se ha podido evidenciar la existencia del saccus vasculosus ni de algún primordio, aunque en esa zona se encontraron grandes vasos con pigmentación (Fig 22 C, D). Estos datos corresponden con lo descrito para peces en los cuales su hábitat es un charco (Van de Kamer y Schuurmans 1953). Asimismo en otros teleósteos cuyos hábitats naturales son cuerpos de agua mayores que el hábitat de *A. charrua*, tampoco se ha encontrado esta estructura, como es el caso de *D. rerio* (Wullimann *et al.*, 1996).

Mesencéfalo

El tectum óptico es el centro visual primario en todos los teleósteos y en *A. charrua* presentó la morfología y composición celular similar al de otras especies. A efectos de mantener la nomenclatura de Wullimann *et al.*, 1996 se ordenaron gráficamente las capas del tectum óptico en dos regiones. En primer lugar se denominó TeO a la suma de las tres capas externas, la ZC, DWZ y SWGZ. Por otra parte se distinguieron dos grandes partes de la PGZ, lámina 1 y lámina 2 formando la PGZ (L1y2) y la lámina 3 como PGZ (L3). PGZ (L1y2) está en contacto con el ventrículo tectal y se extiende rostrocaudalmente como un tejido de morfología más o menos laxa. PGZ (L3) está constituida por una capa celular gruesa y homogénea, inmediatamente por encima de la PGZ (L1y2) (Wulliman *et al.*, 1996, Peter y Gill, 1975; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001). La conexión entre el *torus longitudinalis* y la valvula cerebelli está descrita para *S. aurata* (Muñoz-Cueto *et al.*, 1998) y otros teleósteos. Una característica importante del tectum óptico es su organización retinotópica (Nieuwenhuys *et al.*, 1998). Una segunda característica notable es su organización laminar donde la mayoría de las neuronas tectales están fuertemente empaquetadas en la PGZ, mientras que las otras capas tienen mucho menor densidad celular (Meek 1983; Wullimann *et al.*, 1996; Nieuwenhuys *et al.*, 1998).

El *torus semicircularis* está dividido en dos partes como se ha descrito para los Ciprínidos, no encontrándose la estratificación en varias láminas como en *N. furzerii* o en cuadrantes como en *S. aurata* (Wulliman *et al.*, 1996; D'Angelo L, 2013; Muñoz-Cueto *et al.*, 2001).

En el tegmentum la organización de los núcleos fue similar a la de otros teleósteos excepto algunos núcleos que no se lograron identificar en *A. charrua* como el núcleo parasimpático de Edinger-Westphal, el núcleo ruber (NR) y el núcleo del lemnisco lateral (NLL). El origen aparente del nervio troclear se da en una posición ventro lateral del tegmentum, mientras que en otros teleósteos su origen aparente se da en regiones más dorsales asociado a estructuras cerebelosas (Wullimann *et al.*, 1996).

Rombencéfalo

Algunos autores consideran que los términos metencéfalo y mielencéfalo, estrictamente se pueden utilizar únicamente en aves y mamíferos, donde hay una clara separación de ambas estructuras. Estos autores utilizan la denominación <<rombencéfalo>> para aludir conjuntamente a ambas estructuras, al igual que la vesícula caudal neural que se forma en el desarrollo embrionario. En este trabajo se utiliza esta nomenclatura a modo de consenso con lo descrito por otros estudios neuroanatómicos realizados en peces (Wulliman, 1996; Karoubi N, *et al.*, 2016). El cerebelo resultó ser la estructura más voluminosa en el rombencéfalo como se conoce para otros teleósteos. El *corpus cerebelli* que está involucrado en el control motor (Tuge, 1934 a, b) presentó la organización laminar descrita para otros teleósteos. La valvula cerebelli es de pequeño tamaño respecto la de otros teleósteos la cual se proyecta rostralmente y ocupa una pequeña porción del ventrículo tectal en contraste con lo descrito para otros teleósteos (Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto 2001). En mormíridos y gymnotiformes la valvula cerebelli es aún más evidente ya que se observa proyectada dorsalmente hasta regiones telencefálicas y está implicada en la capacidad electroceptiva de esos animales (Finger *et al.*, 1981; Maler *et al.*, 1991). La valvula cerebelli no presenta homologías con estructuras metencefálicas de otros vertebrados, siendo característica únicamente de los peces con aletas radiales (Larsell 1967; Nieuwenhuys 1967).

El lóbulo vagal que es centro gustatorio primario, en *A. charrua* es de gran tamaño siendo una estructura notoria en el dorso de la médula oblonga, sin presentar un desarrollo exuberante como en *Ciprinus carpio* donde llega a ser muy prominente (Ito *et al.*, 2007).

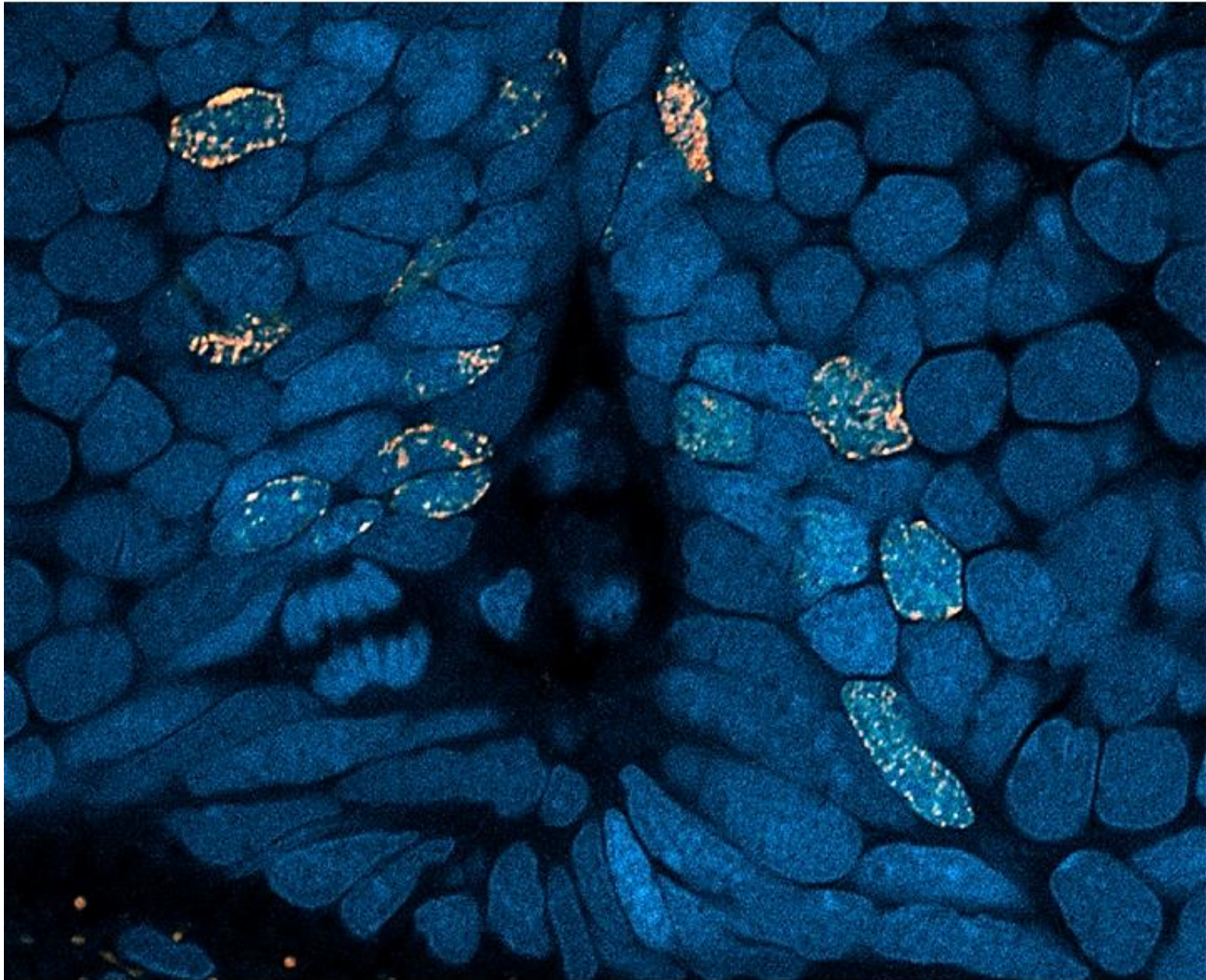
La crista cerebelli es el centro primario de la línea lateral (Yamamoto *et al.*, 2010). Esta última y otras estructuras metencefálicas analizadas no presentaron diferencias notorias con otros teleósteos.

La presencia de una laguna vascular rombencefálica encontrada en *A. charrua* no ha sido descrita para otros teleósteos, al menos en la literatura consultada.

El resto de las estructuras mielencefálicas presentaron gran similitud con lo descrito en otros teleósteos excepto en los especialistas en la percepción gustatoria, donde se han visto de forma notoriamente expandidos los lóbulos facial y/o vagal (Braford y Northcutt, 1983; Meek y Nieuwenhuys, 1998; Wullimann *et al.*, 1996; Muñoz-Cueto 2001; D'Angelo, 2013).

CAPÍTULO 2

Zonas proliferativas del encéfalo de *Austrolebias charrua* adulto



“Quien pretende conocer una ciencia no debe limitarse a recoger frutos maduros, sino que ha de procurar investigar dónde y cómo se ha desarrollado”

Santiago Ramón y Cajal

CAPÍTULO 2. Zonas proliferativas del encéfalo de *A. charrua* adulto

Se han descrito múltiples ZP en los diferentes taxa de vertebrados adultos, las cuales poseen CPMN en microambientes específicos denominados nichos neurogénicos. El término 'adulto' hace referencia a animales que han alcanzado su madurez sexual. La proliferación en estas zonas puede ser neurogénica o gliogénica, es decir, las CPMN presentes en los adultos pueden dar origen a nuevas neuronas y nuevas glías. La proliferación constitutiva en estas zonas varía según diferentes factores (*e.g.* edad, sexo) y puede ser constitutiva (proliferación fisiológica u homeostática) o reparativa (proliferación frente a una injuria). Existen ZP comunes a todos los vertebrados, como la telencefálica que está presente en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Otras zonas son más variables en relación a su presencia, y pueden ser específicas de los taxa, de las especies y del sexo. En teleósteos se ha visto que existen varias ZP, algunas conservadas entre especies y otras con características especie-específicas y sexo-específicas. Por este motivo, es importante conocer la proliferación constitutiva en *A. charrua* machos y hembras como punto de partida para los subsiguientes análisis proliferativos o de localización de diferentes marcadores en las ZP.

Objetivo

Identificar y localizar las ZP en el encéfalo adulto

Resultados

Observaciones generales

En este estudio se analizaron a modo de censo las ZP del encéfalo de *A. charrua* administrando un análogo de la timidina (BrdU) como marcador de proliferación celular y el tiempo de sobrevivencia de los animales fue de una hora hasta el momento

de la perfusión, por lo cual en esa ventana temporal las células que estaban en ciclo celular, particularmente en fase S, captaron la sustancia y no tuvieron tiempo para realizar divisiones o migraciones postmitóticas. Esto permite conocer la localización de las células proliferativas *in situ*.

Los núcleos de las células proliferativas se localizaron en toda la extensión del encéfalo en estrecho vínculo con los ventrículos formando parte de la pared ventricular o inmediatamente por debajo de esta, es decir la ZV y ZSV respectivamente. Estos ventrículos pueden presentar una gran luz o ser tan estrechos que ésta llega a ser imperceptible formando una línea media entre ambos hemisferios (*e.g.* telencéfalo dorsal, área preóptica, hipotálamo) o formando derivaciones o cisternas ventriculares denominadas recesos (*e.g.* receso diencefálico, RC), pero en todos los casos estas regiones presentaron núcleos positivos a la inmunolocalización del BrdU (Fig 26). También hubo señal de núcleos positivos profundos en el parénquima nervioso en todas las regiones, sobre todo en la medula oblonga, aunque siempre fue mucho menor que la proliferación asociada a los ventrículos (Fig 26). Junto con los datos anatómicos e histológicos del encéfalo obtenidos en el capítulo anterior y a la presencia de núcleos BrdU positivos en experimentos de sobrevivida de una hora postinyección, se pudieron determinar zonas con actividad proliferativa constitutiva o fisiológica, que denominamos zonas proliferativas (ZP). Es decir, localizar de forma precisa las células proliferantes en las regiones encefálicas conocidas en el capítulo 1.

Tipos de núcleos proliferativos

En las ZP asociadas a las paredes ventriculares se reconocieron diversas morfologías de núcleos pertenecientes a células proliferativas que captaron el BrdU con un tiempo de sobrevivida de una hora (Fig 25). Para describir estos núcleos se utilizaron cortes transversales y se tomó como referencia las medidas de ancho y de largo de los mismos, siendo el ancho la medida de espesor en el eje paralelo de la superficie ventricular y el largo, la medida de espesor en el eje perpendicular respecto la superficie ventricular. Los núcleos presentaron diferentes intensidades de marcación, diversidad de formas y tamaños. La gran mayoría son núcleos esferoides (Fig 25 A), es decir núcleos redondeados o irregulares de dimensiones similares. Esta morfología estuvo presente en todas las regiones encefálicas con actividad

proliferativa. Otro tipo de núcleo encontrado fue de tipo ovoide u ovalado (Fig 25 B) que posee una dimensión, el largo más pronunciado que el resto y en general se presentan con su eje mayor en posición perpendicular a la luz ventricular aunque también en paralelo. Un tercer tipo de núcleo tuvo morfología triangular (Fig 25 C) y en general su lado más largo se presenta en paralelo con la superficie ventricular. Un cuarto tipo de núcleo encontrado es de morfología alargada (Fig 25 E) que presenta un eje que determina un largo muy superior a su ancho. Estos pueden tener bordes regulares o irregulares y en general su eje mayor se dispone perpendicular a la superficie ventricular. Un último tipo de núcleo localizado tuvo una morfología plana (Fig 25 D), con su eje mayor o largo, en paralelo a la superficie ventricular. En estas regiones donde se localizaron los núcleos BrdU positivos, también se lograron visualizar núcleos celulares en distintas fases de mitosis (Fig 25 F-H) así como también núcleos con figuras apoptóticas (Fig 25 I).

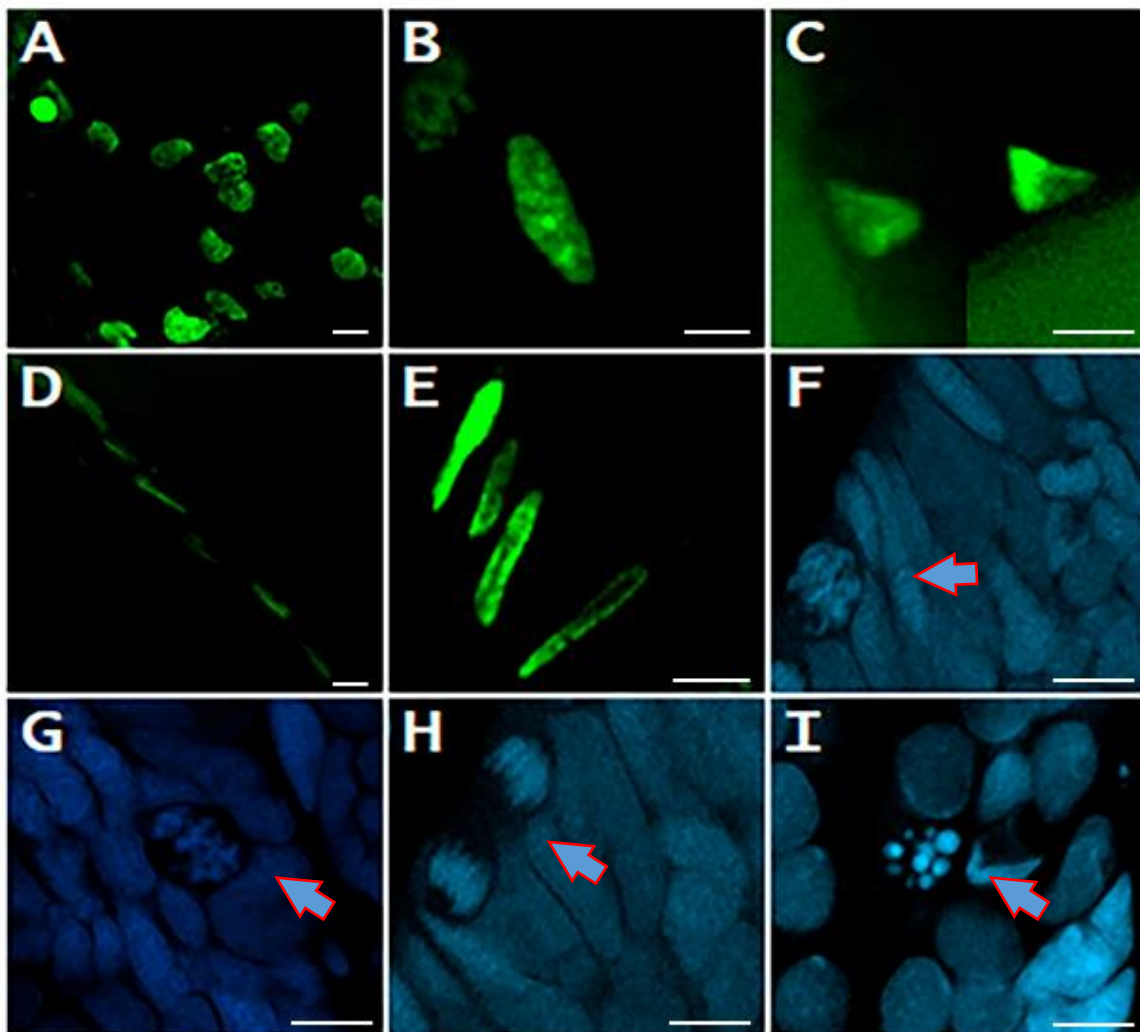


Figura 25. Diversidad de núcleos en las ZP. A: núcleos esferoides. B: núcleos ovaladas. C: núcleos triangulares. D: núcleos aplanados. E: núcleos alargados. F: figuras mitótica de profase (flecha). G: figura mitótica de metafase (flecha). H: figura mitótica de telofase (flecha). I: Figura apoptótica (flecha).

ZP del encéfalo

El estudio de la proliferación celular realizado fue de tipo censo, donde se analizaron todos los cortes seriados de los encéfalos de machos y hembras. En cada división encefálica se localizaron ZP llegando a ser veinte numeradas desde la región rostral hasta la caudal.

Telencéfalo

El telencéfalo presentó gran cantidad de núcleos proliferativos, generalmente ubicados en la ZV (Fig 26 A-D). En el bulbo olfatorio (OB) los núcleos BrdU positivos se presentaron en toda la extensión formando parte de la capa celular interna (ICL) de la pared del ventrículo telencefálico medial (Fig 26 A). En la región dorsal del bulbo olfatorio que corresponde con la transición con los lóbulos telencefálicos (D) se localizaron núcleos positivos en la línea divisoria entre ambas estructuras (Fig 26 A). Los núcleos BrdU positivos encontrados en el OB esta región fueron esferoides, ovalados, alargados y planos (Fig 27 A). A esta ZP asociada a la pared ventricular se le asignó el número 1 (Fig 27 A) y se denominó “ZP del bulbo olfatorio” (ZPOB) (Fig 28). En los lóbulos telencefálicos la mayoría de los núcleos encontrados también se localizaron en la ZV del ventrículo medial y en toda su extensión dorsolateral (Fig 26 A-D). En el área ventral del telencéfalo (V) de los núcleos positivos están restringidos a la pared ventricular medial, donde se encontraron núcleos esferoides, ovalados, planos y en su gran mayoría fueron alargados (Fig 27 C). Los núcleos esferoides y ovalados se localizaron principalmente en la pared ventricular de la porción dorsal del área ventral telencefálica (Vd). Los núcleos alargados se localizaron densamente en la ZV del núcleo ventral (Vv) formando un gran clúster o franja nuclear que tapiza la pared del ventrículo medial donde también hay algunos núcleos BrdU positivos ovalados y esferoides (Fig 27 C). Estos núcleos se encuentran en la porción rostral de Vv bien extendidos por la ZV mientras que en la porción caudal se achica. A esta ZP ventral se le asignó el número 2 y se denomina “ZP del telencéfalo ventral” (ZPTV) (Fig 28). En el área dorsal del

telencéfalo (D) existe una gran cantidad de núcleos BrdU positivos en la región más rostral y también

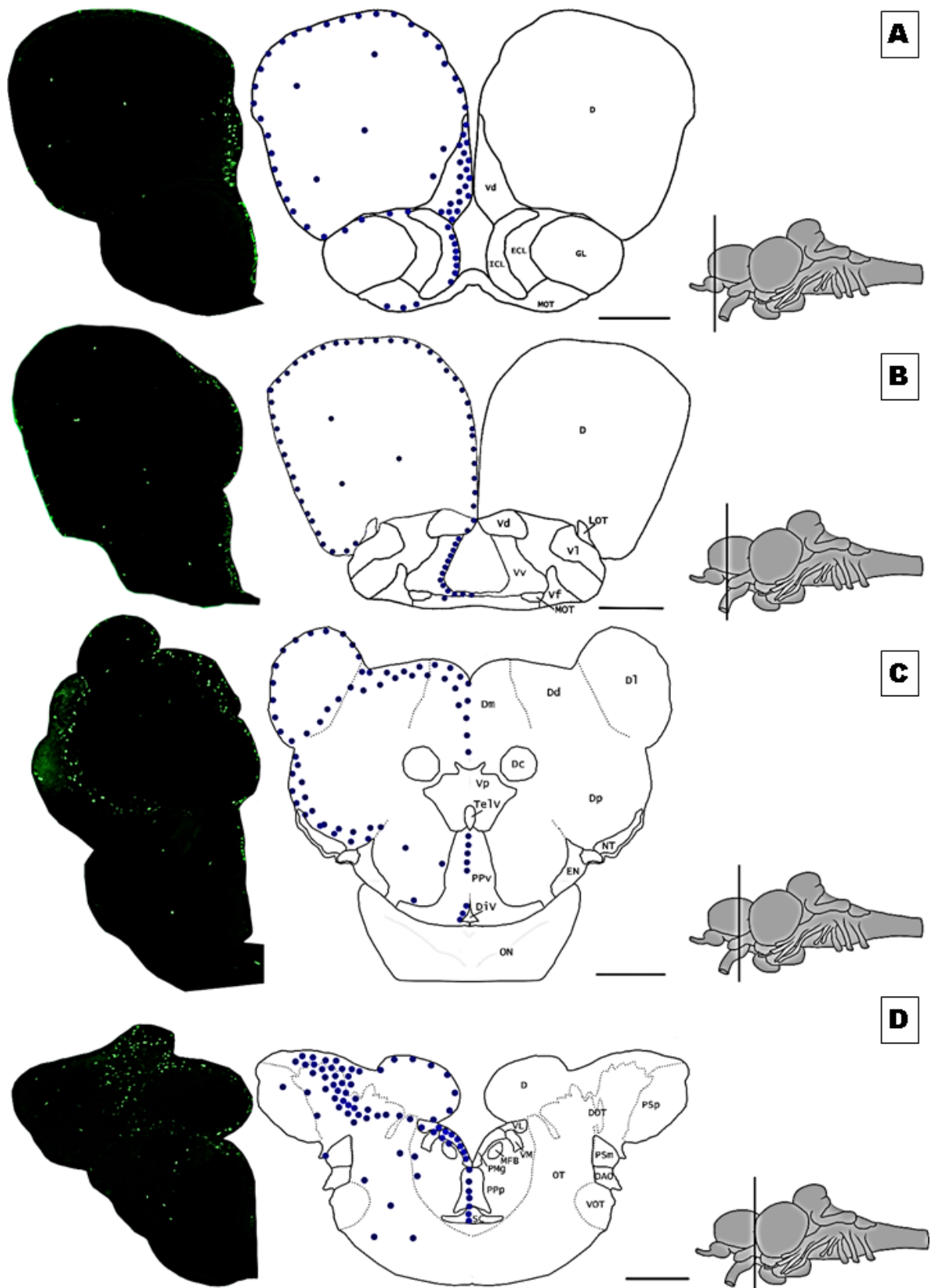


Figura 26. Proliferación en el encéfalo adulto. Izquierda: Inmunofluorescencia anti-BrdU, una hora postinyección. Centro: Esquema de proliferación en los diferentes niveles, los puntos azules representan la localización de las células proliferativas. Derecha: esquema representativo del plano de corte.

Figura 26 continuación

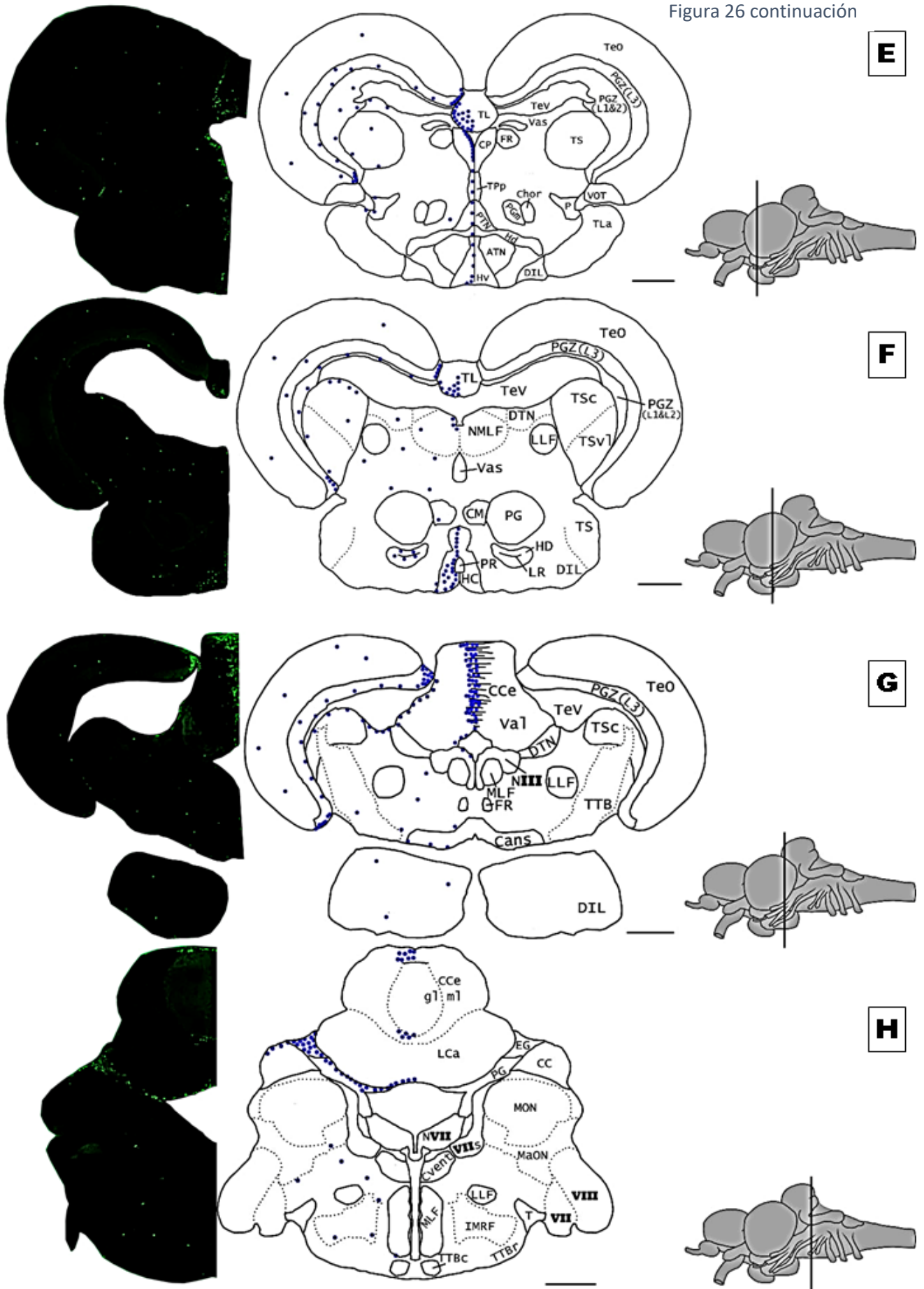
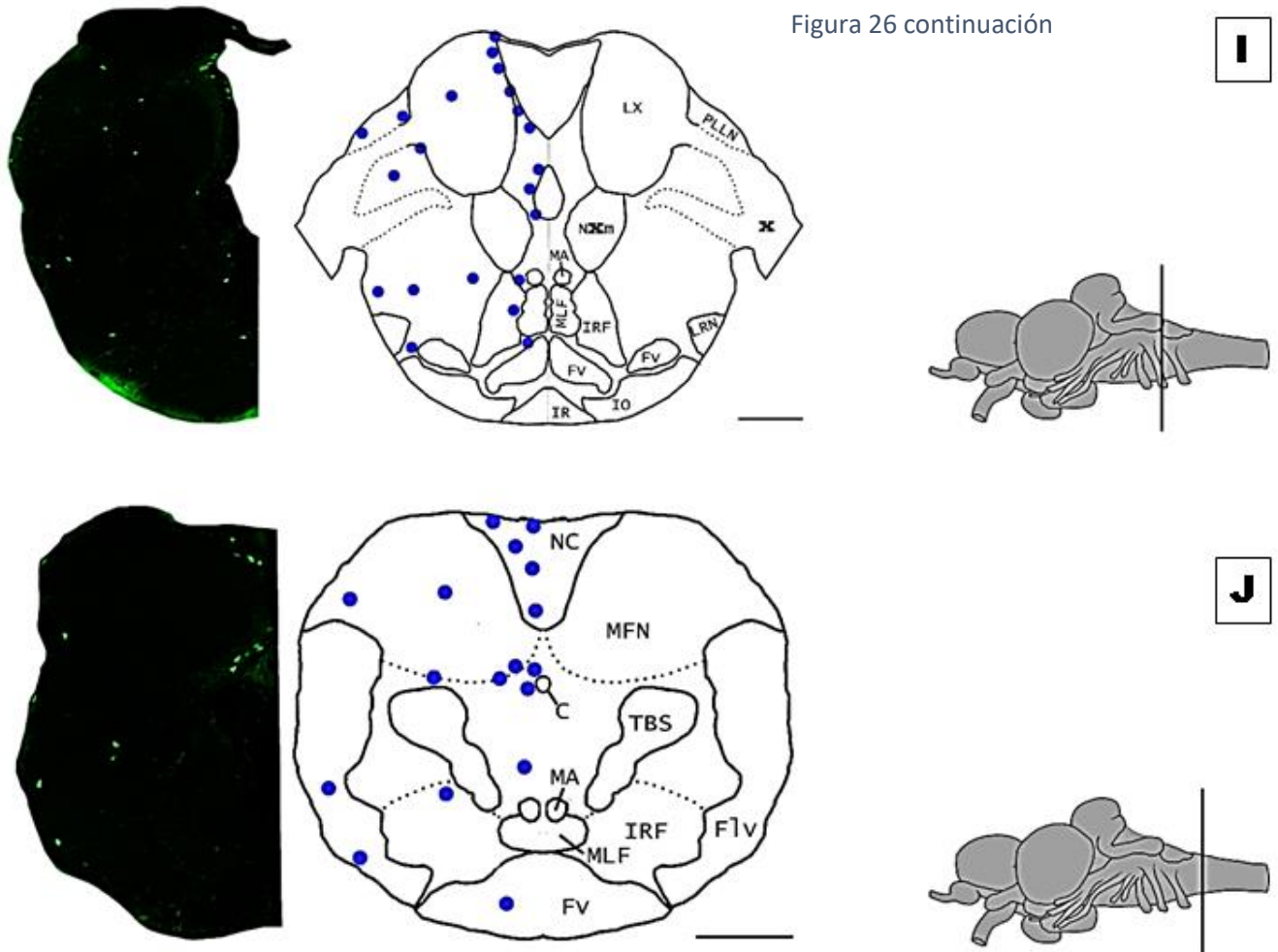


Figura 26 continuación



en la región caudal (Fig 26 A, D). Se encontraron núcleos esféricos y ovalados principalmente en el ventrículo medial desde ventral a dorsal y dorsolateralmente, abarcando la ZV del área dorsomedial (Dm), dorsodorsal (Dd), Dorsolateral (DI) y dorsoposterior (Dp) (Fig 27 B). En la región dorsolateral que corresponde a la zona endimaria ventricular proveniente de la eversión del telencéfalo dorsal y que es recubierto por la tt, también se localizaron estos tipos de núcleos, pero principalmente los de morfología triangular (Fig 27 B). En estas regiones también se encontraron núcleos planos pero poco abundantes. A esta ZP asociada a la pared ventricular del telencéfalo dorsal, en toda su extensión rostrocaudal tanto medial como dorsolateral, se le asignó el número 3 y se denominó “ZP del telencéfalo dorsal” (ZPTD) (Fig 28).

Diencefalo

En el diencefalo el revelado de los núcleos BrdU positivos y su mapeo en las diferentes divisiones diencefálicas, mostró que la proliferación celular está asociada

a las paredes ventriculares y recesos, encontrándose también algunas pocas células proliferantes más profundas en el parénquima nervioso, alejadas de la ZV y ZSV (Fig 26 C-F). De este modo en el diencefalo se localizaron ocho ZP asociadas a las paredes ventriculares y recesos en el área preóptica (Fig 27 D), epitálamo (Fig 27 F), tubérculo posterior (Fig 27 H), tálamo (Fig 27 E, G), hipotálamo (Fig 27 J) y sinencéfalo (Fig 27 I).

El área preóptica presentó núcleos esferoides y ovalados dispuestos sin presentar un patrón regular (Fig 27 D). La proliferación está asociada a las paredes del ventrículo medial en su extensión medio-dorsal (Fig 26 C, D), es decir en la ZV del PPa, PM, PMg, Pp y SC. A esta zona se le asignó el número 4 y se denominó “ZP del área preóptica” (ZPPOA) (Fig 26).

En la región dorsal del área preóptica surge el tálamo ventral en cuya pared ventricular se localizó la ZP (Fig 26 D, E) que presentó núcleos de tipo esferoides y ovalados dispersos, y a nivel del núcleo ventromedial talámico (VM) (Fig 27 C), se localizan diversos clusters pequeños de núcleos alargados BrdU positivos. En la ZV de las regiones I, VL y VM se localizaron clusters de núcleos esferoides u ovalados, segregados de clusters de núcleos alargados, dispersos en toda la extensión de estas regiones. A esta zona se le asigna el número 5 y se denomina “ZP del tálamo ventral” (ZPTIV) (Fig 27 E).

Desde la parte media de la región dorsal del tálamo ventral, surgen el tálamo dorsal en el que la proliferación en esta zona también estuvo asociada a la pared ventricular en toda su extensión (Fig 26 E) como la ZV de A, DP y CP, presentando núcleos esferoides y alargados, así como también clusters de núcleos alargados BrdU positivos (Fig 27 G). A esta zona se le asignó el número 7 y se denomina “ZP del tálamo dorsal” (ZPTID) (Fig 28).

En la zona dorsal del tálamo emerge el epitálamo en cuya pared ventricular de la habénula, se localizan núcleos proliferativos dispersos de morfología esferoide, ovalados y algunos alargados (Fig 27 F). También se constató la presencia de abundante núcleos esferoides BrdU positivos en los elementos epitalámicos que protruyen dorsales a la habénula, como la epífisis y el saco dorsal. A esta zona se le asignó el número 6 y se denomina “ZP del epitálamo” (ZPEp) (Fig 28).

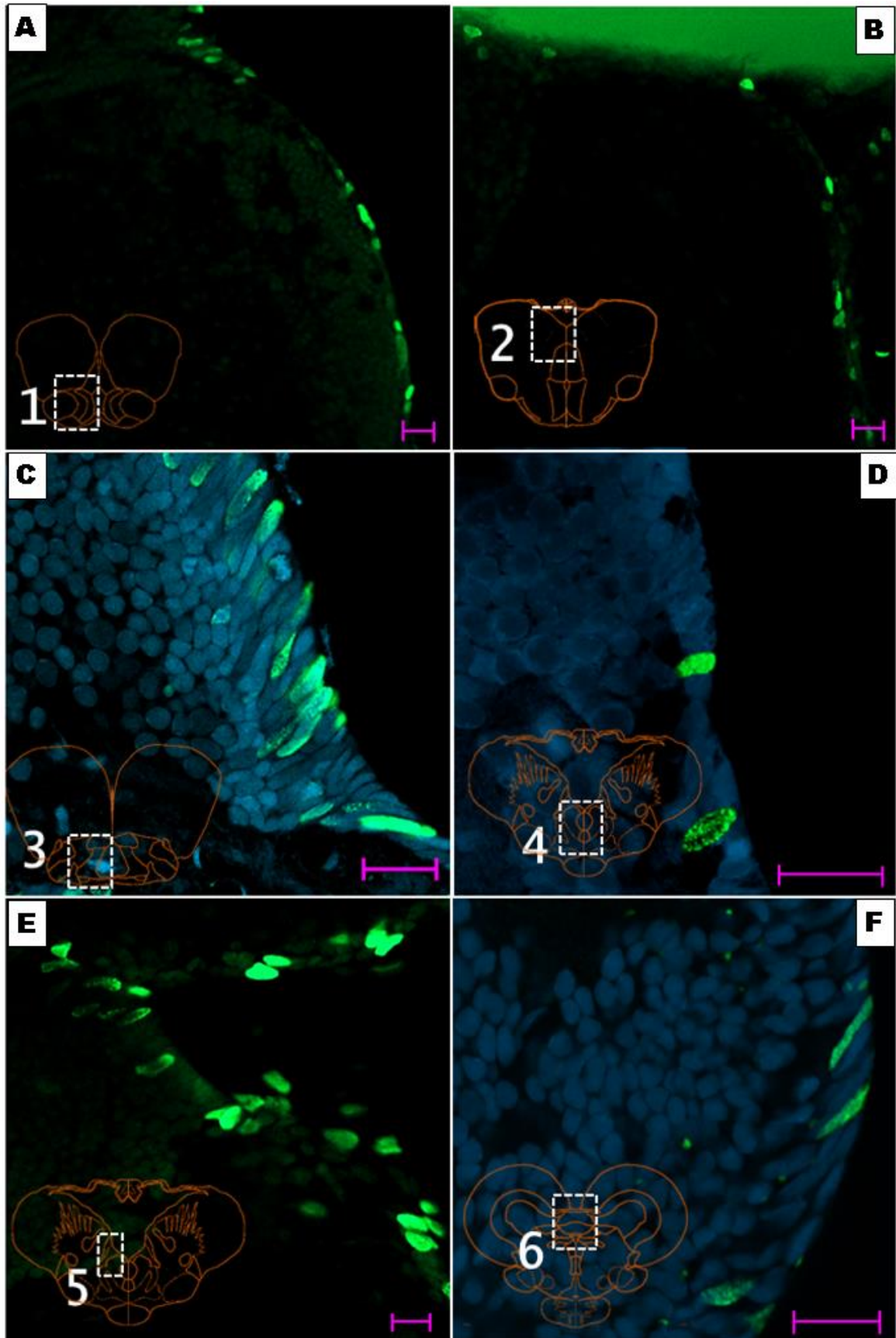


Figura 27. ZP del encéfalo adulto de *A. charrua*. Se describieron 20 ZP en todo el eje rostrocaudal. En verde se muestran los núcleos BrdU positivos detectados por inmunofluorescencia y en algunos casos se realizaron las contratinciones con DAPI (celeste). Barras=20 μ m

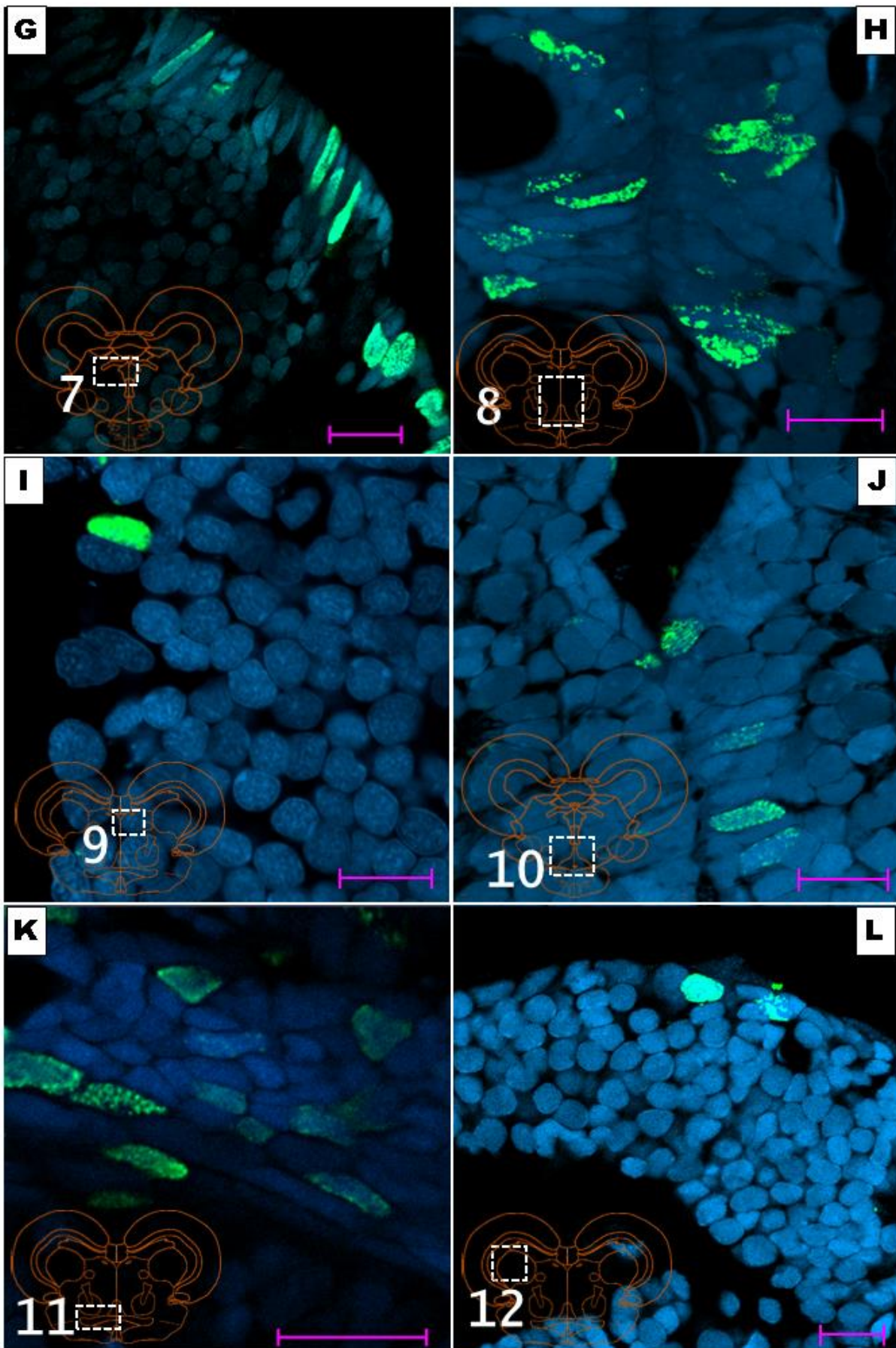


Figura 27 continuación

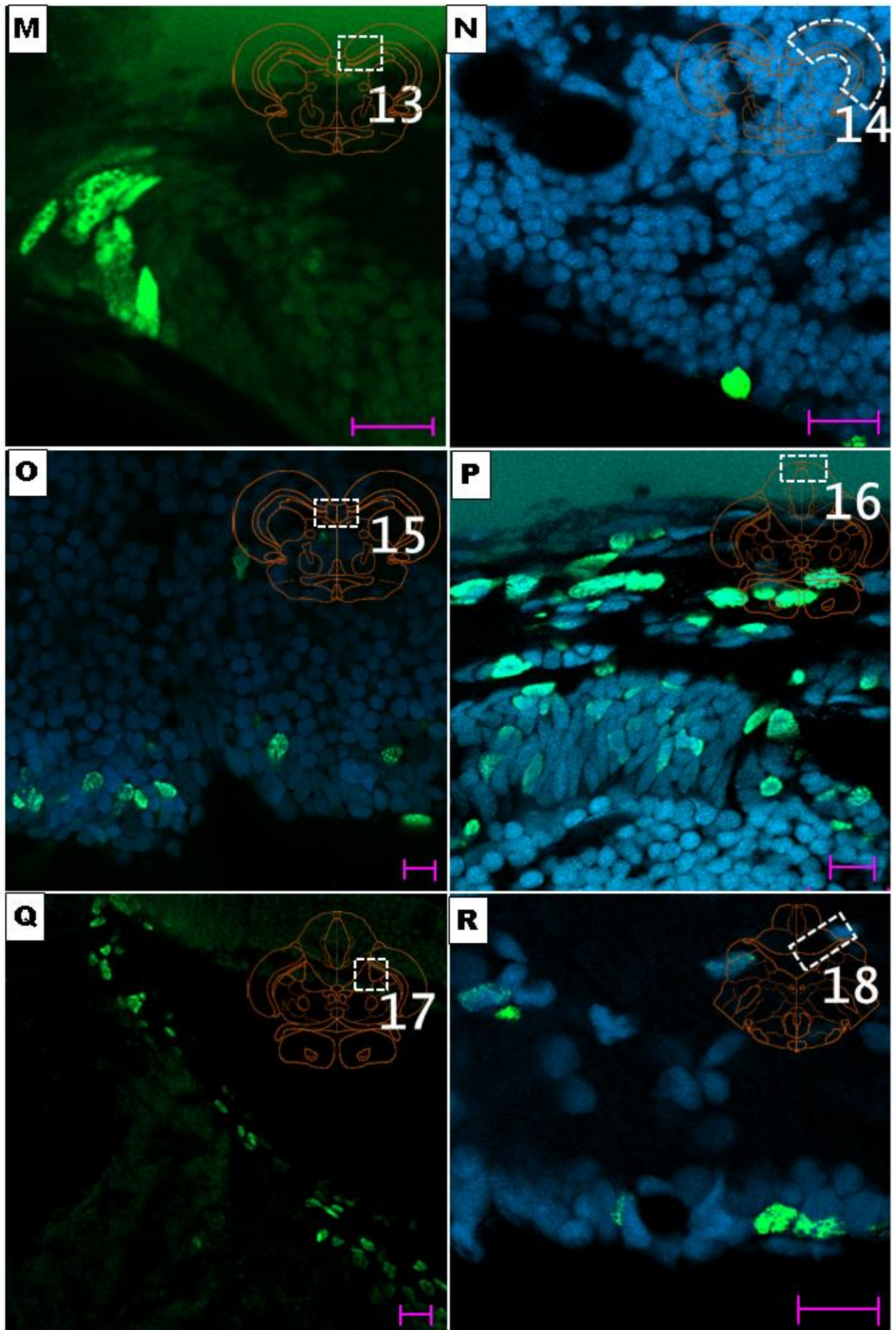


Figura 27 continuación

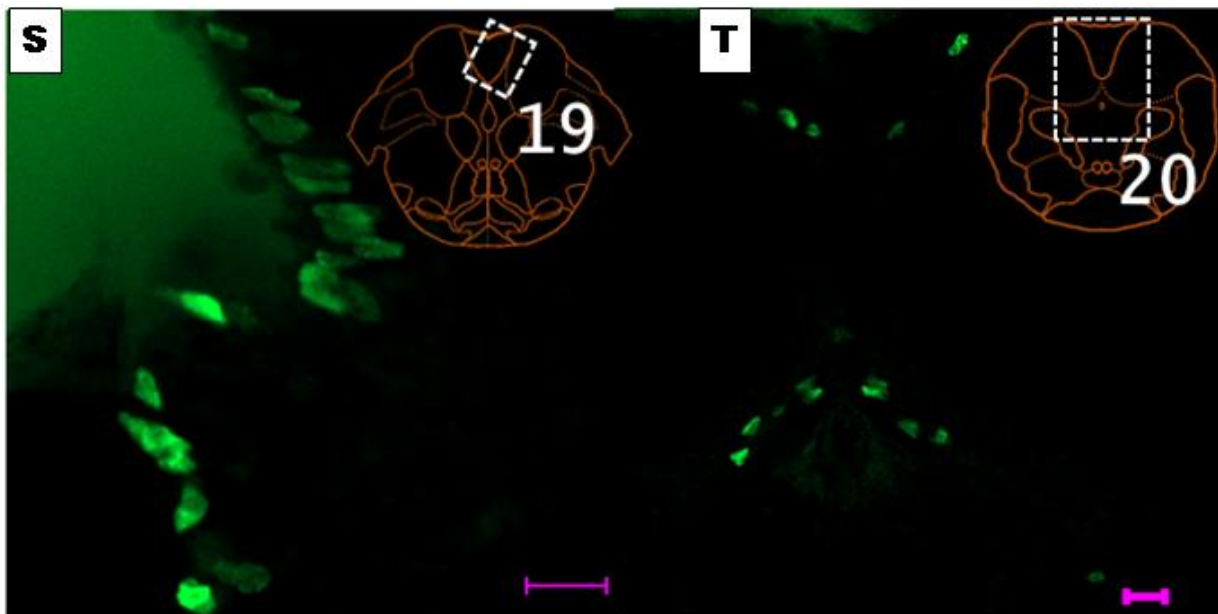


Figura 27 continuación

En la región ventral del diencefalo se localiza el hipotálamo que presentó proliferación asociada a las paredes ventriculares a nivel del infundíbulo, en el tubérculo posterior y en la pared del receso lateral (Fig 26 E-G). En el hipotálamo ventral la proliferación se presentó asociada a las paredes del ventrículo infundibular de Hv, presentando núcleos esferoides, ovalados y algunos clusters pequeños de núcleos alargados (Fig 27 J). A esta zona se le asignó el número 10 y se denomina “ZP del hipotálamo ventral” (ZPH) (Fig 28). Caudalmente al hipotálamo ventral emerge el tubérculo posterior del diencefalo y éste presenta abundantes núcleos proliferativos a nivel de las paredes ventriculares mediales en contacto con el ventrículo diencefálico medial de TPp, PTN y PVO, los cuales tuvieron morfología esferoide, ovalados y alargados, estos últimos son los más numerosos (Fig 27 H). A esta zona se le asignó el número 8 y se denomina “ZP del tubérculo posterior” (ZPTP) (Fig 28). En la parte dorsal del tubérculo posterior y expandiéndose lateralmente hacia la porción basal del mesencéfalo se ubica el sinencéfalo el cual presenta núcleos proliferativos en su pared ventricular hacia la línea media del ventrículo diencefálico y hacia el ventrículo tectal (Fig 26 F, G), concretamente en la VZ del NMLF y en los núcleos periventriculares PPd y PPv. Estos núcleos presentaron morfología esferoide y ovalada predominantemente (Fig 27 I) y a ésta zona se le asignó el número 9 y se denomina “ZP del sinencéfalo” (ZPS) (Fig 28). Como continuación caudal del ventrículo diencefálico medial, surgen los recesos posterior y lateral que están inmersos dentro del lóbulo inferior del hipotálamo y ambos recesos presentan núcleos proliferativos (Fig 26 F) asociados a sus paredes en PVO,

LH, HC y toda la Hd. En estos recesos se localizaron núcleos de morfología esferoide y ovaladas pero presentaron mayormente clusters de núcleos alargados en diversas orientaciones (Fig 27 K) en relación a la superficie de la pared. A esta zona se le asigna el número 11 y se denomina “ZP del receso diencefálico posterior y lateral” (ZPRPL) (Fig 28).

Mesencéfalo

En el mesencéfalo que incluye tectum óptico, *torus longitudinalis*, tegmentum y *torus semicircularis*, los núcleos BrdU positivos se localizaron mayoritariamente en relación con el ventrículo tectal, formando parte de la pared ventricular (Fig 26 E-G) con una distribución no homogénea que se describe en detalle a continuación. En el tectum óptico, con el análisis de los cortes transversales, se localizaron tres regiones diferentes con núcleos proliferantes. Una de estas es el extremo dorsal-medial que está en contacto con el *torus longitudinalis* y presenta una alta densidad nuclear BrdU positiva (Fig 26E-G) donde estos son de morfología alargada en su mayoría y algunos de morfología esferoide (Fig 27 M). Otra región proliferativa es el extremo ventral que contacta con el *torus semicircularis* y presenta las mismas características nucleares que el anterior pero menos cantidad de núcleos proliferativos. Estas regiones corresponden con el margen más distal de los casquetes ópticos que no presentan PGZ (L1y2) y se les denominan zona marginal tectal (ZMT) dorsal y ventral. Estas dos regiones se presentan como una región proliferativa continua rostrocaudalmente y tanto la porción más rostral como la más caudal, tienen una gran cantidad de núcleos BrdU positivos en comparación con regiones medias. Si bien estas regiones no están en completo contacto con la luz del ventrículo tectal debido a la morfogénesis de esta estructura en estadios embrionarios, éstas derivan de la pared ventricular. A los efectos de clasificación como ZP se las agrupa como una única zona a la que se le asigna el número 13 (a-dorsal; b-ventral) y se denomina “ZP marginal tectal” (ZPMT) (Fig 28). La tercera región del tectum óptico se ubica en la zona gris periventricular (PGZ L1y2) lindante con el ventrículo tectal (Fig 26 E-G), donde presenta núcleos proliferativos de morfología esferoide y ovalada (Fig 27 N) dispuestos en toda su extensión rostro-caudal. A esta zona se le asigna el número 14 y se le denomina “ZP granular periventricular” (ZPGP) (Fig 28). En el *torus longitudinalis* la proliferación celular se

da en toda su extensión rostrocaudal a nivel de la pared ventricular (Fig 26 E-G) teniendo una gran cantidad de núcleos proliferativos en la región rostral, los cuales presentan morfología esferoide y ovalada primordialmente, aunque puede presentar en su línea media algunos núcleos alargados (Fig 27 O). A esta zona se le asigna el número 15 y se denomina “ZP del *torus longitudinalis*” (ZPTL) (Fig 28).

En el mesencéfalo basal los núcleos BrdU positivos se localizaron en la pared ventricular tanto del tegmentum como del *torus semicircularis* (Fig 26 G) formando parte de la ZV del TSc, DTN, NLV, NIII y NIV. En ambos casos los núcleos proliferativos presentan morfología esferoide u ovalada (Fig 27 P). A los efectos de clasificarlas como ZP, en base a que forman un continuo de núcleos proliferativos que dificulta la clara resolución de ambas, se consideran como una sola, se le asigna el número 12 y se denomina en conjunto “ZP tegmento-semicircularis” (ZPT-S) (Fig 28).

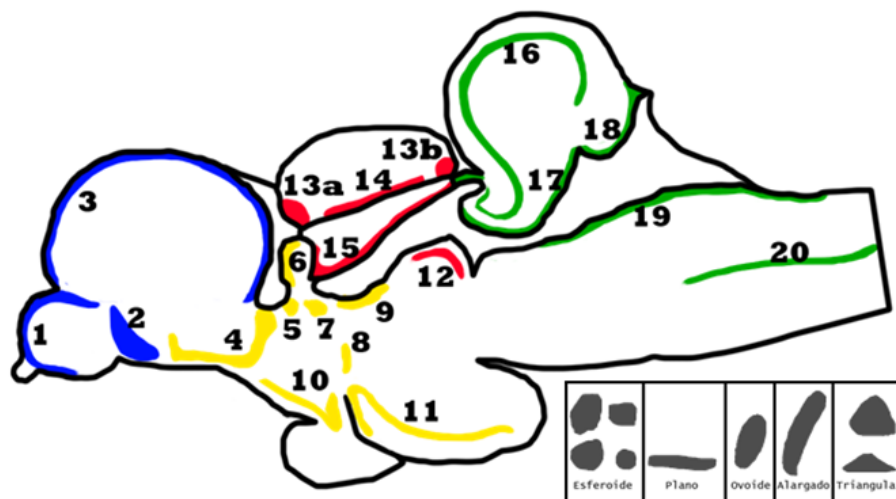
Metencéfalo (Rombencéfalo)

En el metencéfalo los núcleos BrdU se localizan en la pared ventricular del ventrículo tectal, ventrículo rombencefálico y en el CR (Fig 20 E; Fig 26 G. H). En la valvula cerebelli hay una gran proliferación tanto en la pared ventricular de la capa granular lateral que contacta con el ventrículo tectal (Fig 26 G). En la porción rostral, donde se observan grupos celulares dispuestos en columnas (Fig 27 D) también se observaron núcleos proliferativos. Los núcleos proliferantes en estas regiones presentaron morfología esferoide, ovalada y plana (Fig 27 Q). En la región caudal, esta ZP genera un continuo con la ZV de la eminencia granular cuyas células proliferativas, poseen las mismas características. Cabe destacar que todas las regiones que conforman el cerebelo están compuestas por las mismas capas (molecular y granular) y que anatómicamente algunas no pueden ser discriminadas entre sí, aún más cuando se trata de la ZV proliferativa. Las demás ZP del cerebelo sí se pueden discriminar como entidades discretas. A estas zonas en conjunto se les asigna el número 17 y se denomina “ZP de la eminencia granular- valvula cerebelli” (ZPEG-VC) (Fig 28). En el *corpus cerebelli* los núcleos proliferativos se disponen formando parte de la pared del CR (Fig 26 G, H), este receso se ubica medialmente por toda la extensión del *corpus cerebelli* separando la capa granular y molecular. Algunos núcleos de morfología esferoide u ovalada se ubican del lado

que se dirige al interior del corpus (Fig 27 P), lindando con la capa granular. La gran mayoría se localizan en la región molecular y presentan morfología alargada (Fig 27 P), mientras que otros más alejados de la pared del receso presentan morfología esferoide (Fig 27 P). Este patrón se presenta desde la región rostral, hacia dorsal y caudal generando en sección sagital una forma de semicírculo proliferativo que acompaña al CR y en cortes transversales rostrales se visualizan grandes cantidades de núcleos proliferativos organizados en bandas a nivel medial del *corpus cerebelli* (Fig 26 G). A esta zona se le asigna el número 16 y se denomina “ZP asociada al RC” (ZPRC) (Fig 28). En el lóbulo caudal los núcleos BrdU positivos se ubican en la pared ventricular del ventrículo rombencefálico, en la masa granular periventricular (PG), y en las zonas lindantes con la eminencia granular (EG) en su parte posterior (Fig 26 H). Los núcleos presentan morfología esferoide básicamente, aunque se pueden encontrar también ovalados y planos (Fig 27 R). A esta zona se le asigna el número 18 y se denomina “ZP del lóbulo caudal” (ZPLC) (Fig 28).

Mielencéfalo (Rombencéfalo)

En el mielencéfalo los núcleos BrdU positivos se localizan en la pared ventricular del ventrículo rombencefálico, en la pared del canal central, en la región dorsal del canal central a nivel del núcleo comisural de Cajal y también presenta gran cantidad de núcleos proliferativos en el parénquima nervioso (Fig 26 I, J). Los que aparecen profundos en el parénquima son de forma esferoidal y se localizaron planos en la superficie pial. Los que forman parte de la pared del ventrículo rombencefálico presentan morfología esferoidal, ovalada, algunos planos y existen clusters de núcleos alargados en la región dorsal a nivel del núcleo vagal (Fig 27 S). A esta zona se le asigna el número 19 y se denomina “ZP rombencefálica medular” (ZPRM) (Fig 28). Los núcleos proliferativos que se disponen en la pared del canal central o endimario son de morfología esferoidal y ovalada (Fig 27 T) y a esta zona se le asigna el número 20 y se denomina “ZP del canal central” (ZPCC) (Fig 28).



Zona	Tipo de núcleo				
	Esferoide	Plano	Ovalado	Alargado	Triangular
1	+++	+	+++	-	-
2	++	+	+	++++	-
3	++	+	++	+	++++
4	+++	-	++	-	-
5	++	-	+	++	-
6	++	-	++	-	-
7	++	-	++	++	-
8	++	-	++	+++	-
9	+++	-	+++	-	-
10	++	-	++	++	-
11	++	-	+	++++	-
12	+++	-	++	-	-
13	++	-	-	++++	-
14	+++	-	+++	-	-
15	+++	-	+++	-	-
16	+++	-	-	++++	-
17	+++	+	+	-	-
18	+++	+	+	-	-
19	++	+	++	+	-
20	++	-	++	-	-

Figura 28. Esquema representativo de las ZP. Arriba se esquematizan las ZP: azul: telencefálicas; amarillo: diencefálicas; rojo: mesencefálicas; verde: rombencefálicas. Abajo se muestran esquemas de las morfologías de los núcleos BrdU positivos y en el cuadro la presencia (+) o ausencia (-) de los mismos en las ZP enumeradas del 1 al 20.

Discusión

El aporte original de este capítulo, es un mapeo exhaustivo de las zonas proliferativas del encéfalo adulto de *Austrolebias charrua* y en ellas se describieron las diferentes morfologías de núcleos proliferantes.

En este capítulo se utilizó el BrdU como marcador de proliferación celular y se analizó la forma y distribución de los núcleos de las células proliferativas en el encéfalo entero, con un tiempo de sobrevida de una hora post administración. Esto

permite conocer la localización precisa de las células proliferativa, por lo tanto, el origen de las células neoformadas. Con esto se logró identificar veinte ZP en toda la extensión rostrocaudal del encéfalo adulto (5 meses), con potencialidad neurogénica, sirviendo al crecimiento de las estructuras, recambio de células neurales o adaptación a diversas condiciones en la vida adulta.

Junto con este estudio de proliferación casi instantáneo, se realizaron experimentos de proliferación de 24h y 30 días, que permitió evaluar la dinámica proliferativa y el destino celular. Estos datos junto con algunos de los aportes sobre la anatomía analizados en el capítulo 1, derivaron en la publicación de un artículo científico en la revista *Brain Research*, adjuntado como anexo.

Comentarios generales

Al momento de la eclosión, el encéfalo de los teleósteos no presenta la morfología ni la organización interna característica de un encéfalo adulto, por lo que continúa desarrollándose histológica y morfológicamente post eclosión y a lo largo de toda la vida (Brandstätter y Kotrschal 1989, 1990; Zupanc y Horschke 1995; Nieuwenhuys *et al.*, 1998). El número de células del encéfalo, neuronas y glías, aumenta conforme avanza la edad y el tamaño corporal del animal y, la mayor parte de estas células neoformadas se originan en ZP específicas (Kaslin *et al.*, 2008). El concepto de ZP aplica a una región encefálica definida por caracteres anatómicos discretos en los que existe activa proliferación celular que, en el caso del encéfalo, tiene como objetivo la formación de precursores neurales que se diferencien en nuevas neuronas capaces de integrarse en circuitos preexistentes. En concordancia con lo descrito en otros teleósteos, estas zonas fueron siempre localizadas en relación a ventrículos (Candal *et al.*, 2005) o derivaciones de éstos provenientes del epitelio endimario ventricular originario del estadio embrionario o juvenil (Zupanc y Sîrbulescu, 2011). En estas pueden presentarse uno o varios nichos neurogénicos, es decir clusters de células proliferativas mantenidas en un microambiente específico, como ocurre en la ZP del bulbo olfatorio (ZPBO) de *A. charrua* donde se describieron 3 nichos neurogénicos que se han vinculado al servicio de tres modalidades de percepción olfativa diferentes (Rosillo *et al.*, 2016). Es pertinente mencionar que los nichos neurogénicos no presentan un patrón de

células diferenciadas que hacen de soporte a células madre, encerrándolas y propiciando un microambiente para la mantención de las mismas durante largos períodos, como ocurre en otros tejidos u órganos (*e.g.* gónadas). En contraparte, los nichos neurogénicos de las ZP del encéfalo de los teleósteos, suelen estar formados por uno o unos pocos estratos de células, en su mayoría CPMN, y que forman parte de la pared ventricular en la ZV y/o ZSV. Como es característico para teleósteos muchos de los núcleos neuronales tienden a localizarse en la periferia de las masas encefálicas, tanto en contacto con los ventrículos como con la superficie pial, por lo que los estratos germinativos están en contacto directo con los elementos neuronales y gliales del parénquima nervioso.

Los datos recolectados de las ZP en este análisis han sido a partir de individuos machos y hembras adultos de aproximadamente 5 meses de vida, al igual que los individuos utilizados en toda esta tesis. Esto es importante de resaltar, debido a que es probable que la edad sea una variable que determine tanto la composición de las células proliferativas como del número y extensión de las ZP o nichos neurogénicos. Por ejemplo en individuos más jóvenes, se ha evidenciado mayor actividad proliferativa (datos no publicados), y es probable que haya diferencias en la composición celular incluso en el número de ZP. De igual manera hemos encontrado que en individuos adultos de mayor edad (*e.g.* 8 meses) la actividad proliferativa es menor que los individuos más jóvenes (datos no publicados) y es probable que tanto la composición celular como el número de ZP sea menor (Kaslin *et al.*, 2013; Edelman *et al.*, 2013). Por ejemplo la ZP del *torus semicircularis* (ZPT-S) descrita en esta tesis para *A. charrua*, en juveniles de *S. trutta* se encontró proliferación, pero no así en individuos adultos (Candal *et al.*, 2005). En cambio en *A. leptorhynchus*, que muestra un aumento lineal en el peso encefálico y el número total de células neurales en relación a la longitud corporal a lo largo de la vida, no muestra cambios relacionados con la edad en la neurogénesis adulta (Zupanc y Horschke 1995; Traniello *et al.*, 2014).

Una característica que diferencia a los mamíferos de los peces como *A. charrua*, es que tienen en las ZP células multiciliadas y monociliadas, respectivamente (Doetsch, 2003; Rosillo *et al.*, 2016). En peces *D. rerio* de gran edad, las células proliferativas encefálicas se convierten en multiciliadas, quizás como una disminución en la capacidad proliferativa en ese estadio, como ocurre con los mamíferos adultos y otros vertebrados, en los que su capacidad proliferativa es muy inferior y menos extendida que la de un teleósteo (Zupanc y Horschke 1995; Zikopoulos *et al.*, 2000;

Zupanc *et al.*, 2005; Adolf *et al.*, 2006; Grandel *et al.*, 2006; Lindsey y Tropepe 2006; Pellegrini *et al.*, 2007; Kaslin *et al.*, 2009; Alunni *et al.*, 2010; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2010; Fernandez *et al.*, 2010; Grandel *et al.*, 2006; Maruska *et al.*, 2012).

Células madre y progenitoras neurales (CMPN)

A través de diversos modos de división, linajes celulares y subconjuntos de señales inductivas, las CMPN organizan el crecimiento de las estructuras encefálicas a medida que avanzan hacia su forma adulta. En *A. charrua* se localizaron diversos tipos de núcleos de células en activa proliferación en las ZP encefálicas, descritas por su morfología. Algunas de estas morfologías se pueden correlacionar con algunos tipos de CMPN ya descritas para otros teleosteos, por ejemplo los núcleos redondeados u ovalados presentes en la mayoría de las ZP, junto con los triangulares del telencéfalo dorsal, pueden corresponder con células gliales radiales (GR), así como también células amplificadoras transitorias. Las GR encontradas en diversas estructuras encefálicas adultas mantienen la morfología y marcadores característicos desde el desarrollo y por ejemplo, en el telencéfalo dorsal, son responsables de conducir al linaje neurogénico, donde se han descrito más de 6 morfologías ultraestructurales distintas que componen esta ZP (Lindsey *et al.*, 2012).

Las células proliferativas que presentan los núcleos alargados, presentes en algunos nichos neurogénicos, podrían corresponder con células NE (NE). En ciertas regiones encefálicas tales como telencéfalo ventral, cerebelo y el tectum óptico, las células NE parecen ser la población primaria de células madre ubicadas en la parte superior de la jerarquía neurogénica a pesar de la presencia de GR (Kaslin *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010; Alunni *et al.*, 2010; Lindsey *et al.*, 2018). Un trabajo reciente en el tectum caudal ha definido que el linaje NE se compone de al menos tres estados de CMPN caracterizados por la expresión de marcadores y la cinética del ciclo celular (Galant *et al.*, 2016). Una característica distintiva de las células NE es que están polarizadas a lo largo de su eje apico-basal y en las zonas ventriculares del telencéfalo de *A. charrua*, se ha determinado que muchas de las células que forman parte de la pared ventricular, presentan un único cilio con morfología heterogénea agrupadas en dominios (Rosillo *et al.*, 2016).

Es importante destacar que mientras NE y GR funcionan para expandir el SNC desde el desarrollo embrionario hasta el nacimiento en mamíferos, las células NE postnatalmente están totalmente ausentes, mientras que las GR se encuentra en un estado de reposo (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

Los núcleos proliferativos aplanados encontrados en las ZP de *A. charrua*, podrían corresponder con células endimarias características de los teleósteos. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde se presentan con morfología cuboidea y son multiciliadas, en *D. rerio* se ha visto que las células endimarias telencefálicas y diencefálicas, muestran una morfología epitelial plana u ovoide y son uni o biciliadas (Lindsey *et al.*, 2012). Se ha discutido si estas células presentan capacidad neurogénica y algunos autores las han considerado CMPN participando activamente en la formación de neuronas (Galant *et al.*, 2016; Dambrose *et al.*, 2017). En *A. charrua* se ha visto que células con características endimarias son positivas a marcadores de células madre neurales como Pax-6 (datos no publicados, comunicados personalmente por Anabel Fernández).

ZP del encéfalo de *A. charrua*

Se han identificado áreas de proliferación asociadas a las paredes ventriculares del encéfalo de varios teleósteos adultos incluyendo *Poecilia reticulata* (Kranz y Richter), *S. aurata* (Zikopoulos *et al.*, 2000), *Salmo trutta fario* (Candal *et al.*, 2005), *O. latipes* (Candal *et al.*, 2005), *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horschke 1995), *Gasterosteus aculeatus* (Grandel *et al.*, 2006), *D. rerio* (Zupanc *et al.*, 2005, Grandel *et al.*, 2006), *N. furzeri* (Tozzini *et al.*, 2011), *Gymnotus omarorum* (Olivera-Pasilio *et al.*, 2014) y *Austrolebias spp.* (Fernández *et al.*, 2011). En 3 especies se ha realizado un análisis exhaustivo y se ha determinado que el número total de ZP es variable, pudiendo ser doce, dieciséis o diecisiete zonas de proliferación a lo largo del eje rostrocaudal (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Maruska *et al.*, 2012). Curiosamente y a pesar de varias diferencias especie-específicas, la distribución de las zonas de proliferación muestra una notable conservación incluso entre especies de teleósteos muy distantes, aunque existen algunas diferencias específicas de las especies en el patrón de proliferación. Por ejemplo, la proliferación masiva en la eminencia granular de *A. leptorhynchus*, llegando a ser del 75% del total de proliferación de todo el encéfalo (Zupanc y Horschke 1995).

En contraste con los teleósteos, en los mamíferos estas zonas están limitadas a solo dos regiones del telencéfalo, el giro dentado y la ZSV, aunque recientes estudios han descrito nichos neurogénicos "no clásicos" adicionales en otras partes, como en el hipotálamo, pero aún está por verse si muestran una neurogénesis continua y sólida en el adulto (Maggi *et al.*, 2014; Rojczyk-Golebiewska *et al.*, 2014).

En el análisis realizado para cumplir con el objetivo de este capítulo, se han localizado veinte ZP en todo el encéfalo de *A. charrua* adulto, de las cuales la mayoría han sido descritas para otros peces y algunas se describen por primera vez. En tres especies de teleósteos se han realizado un análisis exhaustivo de las ZP en todo el encéfalo, estas son el pez cebra (*D. rerio*) que es un Cipriniforme que habita en ríos y arroyos poco profundos de la India, medaka (*O. latipes*) que es un Beloniforme que habita en ríos y lagos de países del oriente asiático; y un pez eléctrico "cuchillo negro" (*A. leptorhynchus*) que es un Gymnotiforme que habita en lagunas y arroyos selváticos de América del Sur (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke, 1995). Esto resulta un elemento comparativo importante, por lo que el análisis estuvo centrado en el contraste con las ZP de *A. charrua*, un Ciprinodontiforme nativo del Uruguay. En estos animales las ZP tienen denominaciones diferentes y no todas fueron identificadas en todas las especies, esto determina un mantenimiento de las ZP en los teleósteos adultos especie-específico. Aunque algunas zonas ventriculares con actividad proliferativa están altamente conservadas y son mantenidas en muchos vertebrados, tales como la ZV del telencéfalo como anfibios, aves, reptiles y mamíferos.

ZP del telencéfalo

En un estudio comparativo entre especies de *Austrolebias* se ha descrito que en la pared ventricular del bulbo olfatorio existe proliferación (Fernández *et al.*, 2011) y que en esta zona extendida dorsomedialmente existen al menos tres nichos neurogénicos con diferentes características celulares (Rosillo *et al.*, 2016). En el análisis realizado en este capítulo para *A. charrua* se confirma la presencia de proliferación en la pared ventricular medial y dorsal con inyecciones de BrdU y tiempos de sobrevivencia de una hora, es decir, el bulbo olfatorio tiene una activa proliferación intrínseca con núcleos proliferativos muy heterogéneos ya que se localizaron esferoides, ovalados, alargados y planos. Esta ZPBO tuvo una

distribución similar a la observada en *D. rerio* y *A. leptorhynchus* (Grandel *et al.*, 2006; Zupanc y Horschke, 1995), no encontrándose en *O. latipes* (Kuroyanagi *et al.*, 2010). Esta ZP podría participar en la neurogénesis intrínseca del bulbo olfatorio mientras que en este, también existe neurogénesis extrínseca vinculada a la migración de células neoformadas a través de la banda migratoria rostral (BMR) desde el área ventral del telencéfalo. En *D. rerio* se ha demostrado que los precursores migran de forma tangencial desde la zona de proliferación telencefálica rostroventral (ZPTV) hacia el bulbo olfatorio similar a la BMR de los mamíferos (Kishimoto *et al.*, 2012). No se sabe aún si los progenitores ubicados caudalmente en la ZPTV, contribuyen a la neurogénesis del bulbo olfatorio, o que migren por la BMR. En contraste con la BMR, los precursores neuronales no migran dentro de los tubos gliales (ver imagen 3 de la introducción), sino cerca o por los vasos sanguíneos, que pueden servir como andamios (Kishimoto *et al.*, 2012). En *A. charrua* se ha demostrado la migración tangencial por los vasos sanguíneos desde el telencéfalo ventral hacia el bulbo olfatorio (Rosillo *et al.*, 2016).

En el área dorsal del telencéfalo existe una gran proliferación en toda su extensión rostrocaudal en la pared ventricular latero-dorso-medial, producida en la eversión de esta área durante el desarrollo y definen la ZPTD. Es importante destacar que en *D. rerio* se describe esta zona de igual manera pero, en *O. latipes* se han considerado como 4 zonas diferentes del telencéfalo. Una de ellas definida para la porción rostral del lóbulo dorsal; otra definida para la ZV del ventrículo medial abarcando toda su extensión dorsoventral del lóbulo dorsal y ventral; otra zona cubriendo la región dorsomedial donde también se observó proliferación en la zona latero-ventral del telencéfalo ventral; y por último una ZP definida para la porción caudal del telencéfalo dorsal (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010). Tanto la ZP de la región rostral como caudal del telencéfalo dorsal, resultan tener una gran cantidad de núcleos proliferativos observados en cortes transversales en *A. charrua*. Esto nos hace pensar que la proliferación del telencéfalo dorsal participa en el crecimiento de esta estructura de forma expansiva en sentido dorsal, lateral, caudal y rostral.

Se ha visto que las neuronas neoformadas generalmente no migran muy lejos de la ZV, sino que permanecen a una pequeña distancia (Adolf *et al.*, 2006; Grandel *et al.*, 2006; Kroehne *et al.*, 2011; Rothenaigner *et al.*, 2011). Esto lo podríamos relacionar con un patrón de crecimiento del telencéfalo de *A. charrua*, en los que las neuronas presentan un patrón de distribución laminar de tipo concéntrico en

relación a la superficie ventricular. Podríamos hipotetizar que el telencéfalo dorsal se expande siguiendo un ritmo de crecimiento aposicional donde las CPMN presenten ondas o pulsos proliferativos determinados por diversos factores, dando lugar a nuevas capas neuronales (Fig 29).

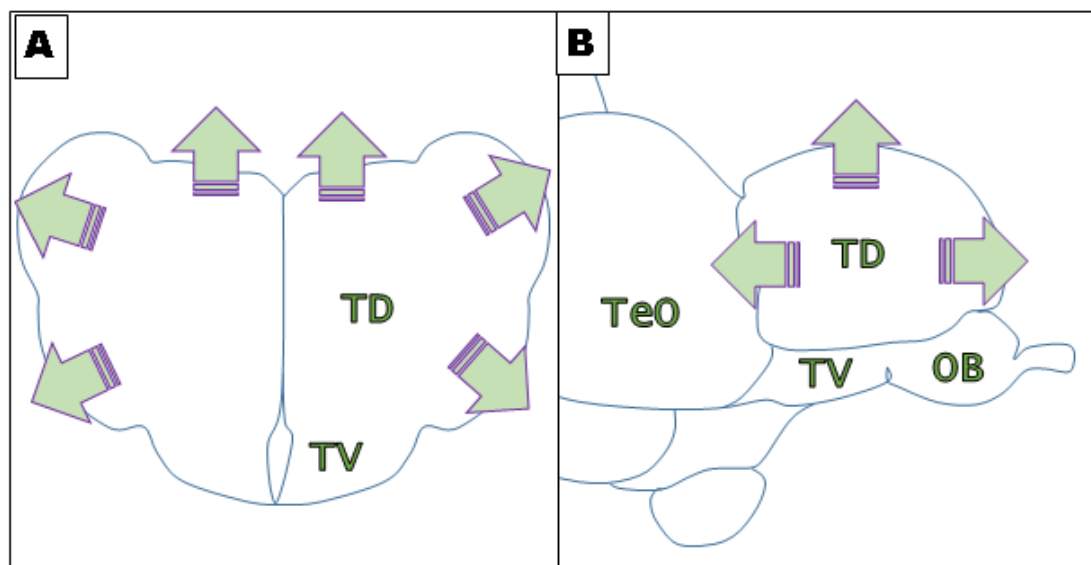


Figura 29. Esquema del probable crecimiento del telencéfalo dorsal en el adulto. A: Esquema representativo de un corte transversal. B: Esquema representativo de la parte anterior del encéfalo, vista lateral. Las flechas representan la dirección del crecimiento expansivo.

El telencéfalo ventral en los teleósteos se subdivide en parte ventral (núcleo ventral del telencéfalo ventral, Vv) y parte dorsal (núcleo dorsal del telencéfalo ventral, Vd). Las zonas de proliferación en la ZV de Vv y Vd tienen características distintas, siendo Vd más similar a las zonas de proliferación en el telencéfalo dorsal como se ha descrito para otros teleósteos (Adolf *et al.*, 2006; Grandel *et al.*, 2006; Lindsey y Tropepe 2006; Ganz *et al.*, 2010; Marz *et al.*, 2010; Lindsey *et al.*, 2012). De hecho en Vd las células en proliferación se dispersan a lo largo del ventrículo y expresan los marcadores de las típicas células de GR (Ganz *et al.*, 2010; Marz *et al.*, 2010; Lindsey *et al.*, 2012). En la ZV de Vv, las células en proliferación con núcleos alargados presentan la distribución característica descrita para otros teleósteos en las que comienza como una región densa de núcleos proliferativos que se extiende dorsoventralmente y hacia caudal se afina para eventualmente desaparecer (Grandel *et al.*, 2006; Ganz *et al.*, 2010; Lindsey *et al.*, 2012). Se ha visto que los progenitores de Vv tienen características NE, como la polaridad apico-basal y la migración nuclear intercinética (Ganz *et al.*, 2010; Lindsey *et al.*, 2012), y carecen de la expresión de marcadores gliales radiales típicos, pero expresan nestina (Ganz *et al.*, 2010; Marz *et al.*, 2010; Lindsey *et al.*, 2012). Esta ZPTV también se describió

para *D. rerio*, *A. leptorhynchus* y *O. latipes* aunque en este último no se hace distinción entre dorsal y ventral (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995). La expresión de PSA-NCAM en la parte lateral de la zona de proliferación sugiere que existen precursores neuronales localizados en la ZPTV (Adolf *et al.*, 2006; Marz *et al.*, 2010; Kishimoto *et al.*, 2012) mientras que a niveles mediales las células en proliferación son positivas para olig2, un marcador precursor de oligodendrocitos (Marz *et al.*, 2010). Por tanto en esta zona que ha sido bien estudiada, se sabe que existe neurogénesis y gliogénesis activa en la vida adulta. Además, estos progenitores también pueden generar células RG en el encéfalo maduro posicionándose por sobre las GR en la escala jerárquica de CPMN (Dirian *et al.*, 2014).

ZP del diencefalo

La proliferación celular también estuvo presente en todas las divisiones diencefálicas, siendo notable en el POA y a nivel del receso lateral y posterior. La ZPPOA fue descrita para *A. leptorhynchus*, *O. latipes* y *D. rerio*, salvo que en este último la parte dorsal de PPa no presentó proliferación (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995). Las dos ZP talámicas, ZPTIV y ZPTID, fueron localizadas tanto en *A. leptorhynchus* como en *D. rerio*, no así en *O. latipes* donde aparentemente están ausentes (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995). Es destacable la segregación en clúster de núcleos redondeados de los núcleos alargados, podríamos relacionarlos a GR y NE respectivamente, con funciones neurogénicas diferenciales. La ZPEp no se ha descrito para *A. leptorhynchus*, en *D. rerio* se describió únicamente proliferación en la habénula y en *O. latipes* existen ambas, tanto habenular como pineal y son consideradas como zonas diferentes (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995). La ZPTP fue descrita para los teleósteos estudiados con pocas diferencias entre sí (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995). Por otra parte la ZPS se localizó para *D. rerio* y *A. leptorhynchus* donde se las denomina como una ZP del núcleo pretectal, mientras que en *O. latipes* no se localizó (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995).

En el hipotálamo las células en proliferación están ubicadas a lo largo del ventrículo de las tres partes del hipotálamo y forman una zona de proliferación contigua (Zupanc y Horschke 1995; Ekstrom *et al.*, 2001; Zupanc *et al.*, 2005; Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Maruska *et al.*, 2012). En el hipotálamo de *A. charrua* se localizan dos zonas bien diferentes. Una en el hipotálamo ventral (ZPH) al igual que fue localizada en *D. rerio*, no así en *O. latipes* y *A. leptorhynchus* donde en este último se vio proliferación en otras regiones anteriores del hipotálamo, así como también en caudales (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995). Alrededor del receso lateral y posterior (ZPRPL), se encuentran células en proliferación dispersas a varios diámetros celulares del ventrículo medial (Ekstrom *et al.*, 2001; Grandel *et al.*, 2006; Maruska *et al.*, 2012). En *D. rerio* las células positivas para los marcadores gliales S100b, GFAP y aroB se alinean en el ventrículo excepto en el hipotálamo ventral, en el que S100b no se expresa (Menuet *et al.*, 2005; Grandel *et al.*, 2006; de Oliveira-Carlos *et al.*, 2013). Los componentes celulares de los nichos neurogénicos en el hipotálamo no se conocen bien. En el hipotálamo dorsal, están presentes dos poblaciones de células en proliferación, una positiva a marcadores gliales y otra negativa a estos marcadores (Pellegrini *et al.*, 2007; de Oliveira-Carlos *et al.*, 2013), esto podría corresponderse con lo observado en *A. charrua* donde se encontraron clusters de progenitores con núcleos esféricos/ovalados y clusters de progenitores alargados. En los experimentos de rastreo por pulsos de BrdU, la mayoría de las células en proliferación migran sólo a unos pocos diámetros celulares del ventrículo hacia los núcleos neuronales del hipotálamo ventral y en el hipotálamo dorsal alrededor del receso lateral (Grandel *et al.*, 2006; Maruska *et al.*, 2012) donde se han detectado neuronas positivas a tiroxina hidroxilasa neoformadas (BrdU+TH) (Grandel *et al.*, 2006). En el hipotálamo ventral, cae del piso del diencefalo la neurohipófisis que se rodea de células de la adenohipófisis y, en esta estructura conjunta neuroendócrina existe en *A. charrua* una gran proliferación celular que no presenta una localización específica, la cual ha sido reportada también para *D. rerio* y *O. latipes* (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010).

ZP del mesencéfalo

Está bien establecido que en los teleósteos el tectum óptico continúa creciendo durante toda la vida (Nieuwenhuys *et al.*, 1998; Raymond y Easter, 1983). En la

mayoría de los teleósteos las células proliferativas se han localizado en los márgenes dorsal, ventral y caudal del tectum óptico (Raymond y Easter 1983; Zupanc y Horschke 1995; Marcus *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 1999; Ekstrom *et al.*, 2001; Candal *et al.*, 2005; Grandel *et al.*, 2006; Alunni *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2010; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Maruska *et al.*, 2012; Teles *et al.*, 2012; Olivera-Pasilio *et al.*, 2014). En el tectum óptico de *A. charrua* se describen en esta tesis dos ZP, la ZPTM y la ZPPGZ, ambas con núcleos proliferativos bien diferentes. En *D. rerio* y *O. latipes* la mayoría de las células en proliferación se localizan en la parte caudal de la PGZ, en la que las células proliferativas se concentran en la parte dorsomedial del tectum óptico, y se dice que están presentes en una zona en forma de medialuna restringida al margen de la PGZ (Raymond y Easter 1983; Grandel *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2010). Curiosamente, las células en proliferación no muestran características típicas de la glía radial como la expresión de GFAP, S100beta o proteína de unión a lípidos en el cerebro (BLBP) (Grandel *et al.*, 2006; Alunni *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2010). En cambio, la zona progenitora muestra características de tipo NE en un nivel ultraestructural (Raymond y Easter 1983) y por expresión de los marcadores de polaridad apico-basal, zona occludens-1 (ZO1), gamma-tubulina y proteína cinasa atípica C (aPKC) (Ito *et al.*, 2010). En concordancia con esto, un trabajo reciente ha identificado un linaje NE bien definido ubicado en la región caudal del tectum adulto (Galant *et al.*, 2016). Recordemos que el tectum óptico se presenta como un par de casquetes a cada lado del *torus longitudinalis*, que cubren el techo del mesencéfalo. En *A. charrua* en cortes transversales, la ZPTM se presenta en el polo dorsal y en el polo ventral como si se trataran de dos nichos proliferativos diferentes. Haciendo una reconstrucción de la proliferación rostrocaudal la proliferación se presenta como un continuo, siendo la ZPTM una especie de anillo proliferativo presente en el extremo más distal de estos casquetes ópticos. Probablemente en los cortes transversales más rostrales y más caudales (Fig 30 A) esta zona se confunda con la ZPPGZ que los autores se refieren como la medialuna proliferativa antes mencionada (Raymond y Easter 1983; Grandel *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2010).

La ZPPGZ en *A. charrua* se extendió como una monocapa continua de células proliferativas a nivel de casi toda la extensión de L1y2 (ver capítulo 1, capas del TO) donde esta capa pareciera que fuese únicamente representada por la ZP. En regiones donde L1 y 2 se ensancha, con los cortes teñidos con azul de metileno,

esta capa se aprecia con un aspecto laxo donde se pueden observar células con morfología de GR.

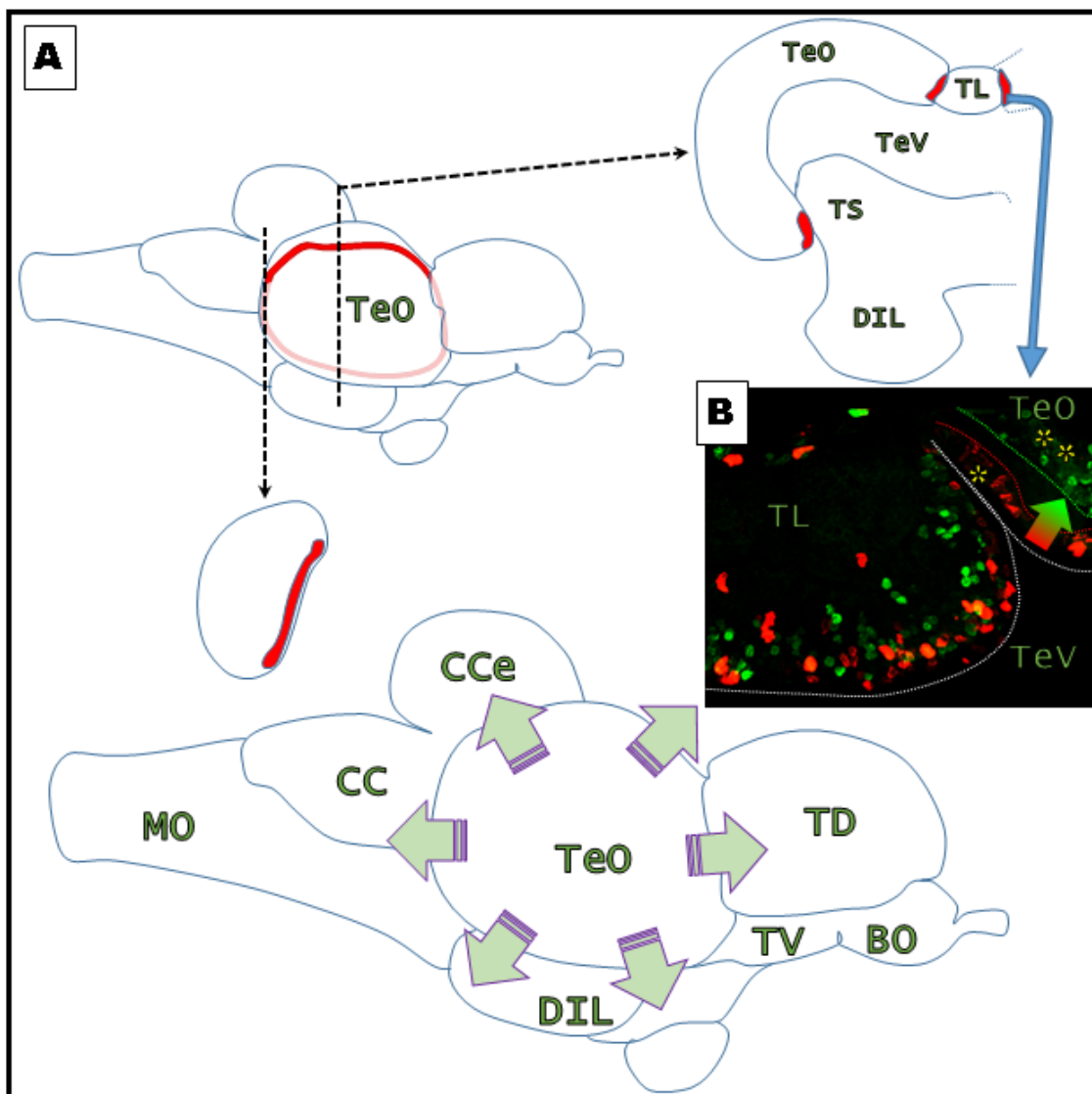


Figura 30. Crecimiento hipotético del tectum óptico. En (A) se muestra la distribución de las células proliferativas de la zona marginal tectal, que recuerda a un anillo proliferativo. Abajo se muestra el probable crecimiento expansivo de los casquetes ópticos, representado con flechas. En (B) se muestra una imagen en que los núcleos en verde corresponden a un marcador de proliferación celular aplicado en una ventana temporal de 30 días. Los núcleos en rojo corresponden a un marcador de proliferación aplicado en una ventana temporal de 24h. Se puede apreciar como las células que nacen en el tectum óptico en la ZP (*), son capaces de generar nuevas células del parénquima nervioso del TeO (**), que crece en el sentido indicado con la flecha.

En *D. rerio* ZPPGZ también tiene una capa de células gliales radiales positivas para GFAP, S100b que se ubican en la capa profunda de PGZ a lo largo del ventrículo tectal (Alunni *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2010). Estas células son capaces de aumentar la proliferación después del aplastamiento del nervio óptico (Stevenson y Yoon

1981; Ito *et al.*, 2010). En *D. rerio* la zona progenitora de PGZ contiene tanto células positivas a marcadores de proliferación celular, como progenitores tanto de ciclo lento como de ciclo más rápido (Raymond y Easter 1983; Grandel *et al.*, 2006; Alunni *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2010).

En el tectum óptico se agregan nuevas neuronas de una manera característica, en la que las células recién generadas en la ZPMT se desplazan lateralmente (Raymond y Easter 1983; Raymond *et al.*, 1983; Nguyen *et al.*, 1999; Grandel *et al.*, 2006). No hay una dispersión tangencial de las células generadas, pero se alejan como una cohorte de la zona progenitora (Nguyen *et al.*, 1999; Alunni *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2010). En *D. rerio* y *O. latipes*, se ha observado que las células recién generadas se pueden encontrar en todas las capas del tectum óptico, aunque la mayoría de las células recién generadas permanecen dentro de la PGZ (Nguyen *et al.*, 1999, 2001; Grandel *et al.*, 2006). En un estudio realizado en paralelo a esta tesis donde se usaron dos análogos halogenados de la timidina con dos ventanas temporales, el CldU con 30 días de sobrevida postinyección y el IdU con un día de tiempo de sobrevida, se registró este patrón de proliferación de tipo cohorte (Fig 28 B) que se van adicionando a las capas del TO (Torres-Pérez *et al.*, 2017). Este dato, sumado a que los progenitores NE se ubican en forma de cinturón por el borde del casquete óptico, hace pensar que el crecimiento del TO es expansivo (Fig 28 A) y podría obedecer a una ola proliferativa general al unísono, o ser diferencial para ciertas regiones en momentos determinados de la vida del animal. Las ZP del TO podrían obedecer a tipos neurogénicos constitutivos o fisiológicos diferenciales donde, la ZPMT se produzca para el aumento de tamaño o crecimiento de la estructura y la ZPPGZ esté destinada a la producción de nuevos elementos neurales para el recambio en los circuitos preexistentes.

La tercera ZP del mesencéfalo alar, es la del *torus longitudinalis* (ZPTL) la que está presente tanto en *D. rerio* (Candal *et al.*, 2005; Grandel *et al.*, 2006) como en *A. leptorhynchus*, mientras que en *O. latipes* no ha sido identificada (Kuroyanagi *et al.*, 2010).

La ZP del mesencéfalo basal que por razones de poca discriminación se tomaron en conjunto la tegmental y la del *torus semicircularis* (ZPT-S), fue descrita en *A. leptorhynchus*, mientras que en individuos adultos no fue localizada para *O. latipes* ni para *D. rerio* (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke 1995).

En *D. rerio* se describe una ZP mesencefálica adicional, que es la que está presente en la lámina posterior mesencefálica (Grandel *et al.*, 2006). Esta zona es una pequeña lámina celular que conecta la porción más caudal del *torus longitudinalis* con la porción más rostral de la valvula cerebelli y está presente en *A. charrua* evidenciada tanto por la localización de núcleos BrdU positivos como por la presencia de figuras mitóticas, pero no la podemos considerar como una ZP con capacidad neurogénica, sino más bien al propio crecimiento de esa lámina conectora, carente de células neurales.

ZP del rombencéfalo

En el rombencéfalo se localizaron cinco ZP con gran actividad, lo que hace que el encéfalo de *A. charrua* tenga una gran expresión proliferativa en todo su eje rostro-caudal y no localizada preferentemente en ciertas zonas o estructuras. La ZPEG-VC estuvo presente en *O. latipes* y *A. leptorhynchus*, no siendo descrita para *D. rerio* (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke, 1995). En *Apteronotus* en la porción de la eminencia granular tiene una gran proliferación celular como se ha mencionado anteriormente, al servicio de la mantención de esta estructura cerebelar cuya función es la integración y procesamiento de la información electroceptiva denominado lóbulo electrosensorial, característico de estos animales. Cabe destacar que esta, así como las demás estructuras cerebelares (CCe y Val) en especies tanto de Gymnotiformes como de Osteoglossiformes (mormíridos), ambos órdenes de peces eléctricos, presentan una hipertrofia llegando a ser una estructura tan prominente que se localiza en la línea media del encéfalo, desplazando estructuras mesencefálicas y llegando a cubrir el diencéfalo y parte del telencéfalo. Este notable desarrollo se asocia a la gran capacidad proliferativa a nivel cerebelar y la emergencia neurogénica por mantener los circuitos en la vida adulta. La ZPLC se detectó en *D. rerio* en la que no tuvo distinción con la ZPRC descrita para *A. charrua* (Grandel *et al.*, 2006). En *O. latipes* no estuvo presente la ZPLC y en *A. leptorhynchus* y hubo proliferación a nivel parenquimatoso en lo que correspondería con ZPLC y ZPRM pero no asociada a la pared ventricular (Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc y Horschke, 1995).

La ZPRC, que en cortes transversales se observa como un bandeo proliferativo rostral y caudal, mientras que a niveles medios ocupa el polo dorsal del *corpus cerebelli*, estuvo presente en *D. rerio*, *O. latipes* y *A. leptorhynchus*, ajustándose a la anatomía de cada animal (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010; Zupanc

y Horschke 1995). Esta ZP proviene de un primordio bien establecido durante el desarrollo embrionario en el que las neuronas y glías cerebelosas se originan a partir de dos zonas germinales principales en el rombencéfalo embrionario, pudiendo detectarse dos dominios neurogénicos distintos, el labio rómbico (Lr) y la ZV. La VZ consiste en la zona germinal interna que está ubicada directamente en el cuarto ventrículo, mientras que el Lr comprende la zona germinal externa dorsal que está ubicada en la interfaz del tubo neural dorsal y la placa del techo en el borde del cuarto ventrículo (Wingate, 2001). El Lr se divide además en una parte rostral superior (cerebelosa) y una parte inferior caudal (Altman y Bayer, 1997). En *D. rerio*, el primordio cerebeloso se hace morfológicamente distinguible durante las etapas de segmentación media (Langenberg *et al.*, 2006). Poco después de la formación del primordio cerebeloso en el Lr, se detecta la expresión de marcadores de progenitores neurales lo que marca el inicio de la neurogénesis y en este momento, las primeras células comienzan a migrar desde el Lr (Koster y Fraser, 2001) a lo largo de distintos caminos para generar los primordios cerebelosos del *corpus cerebelli*, de la eminencia granular y del lóbulo caudal (CCe, EG y LCa) (Volkman *et al.*, 2008; Rieger *et al.*, 2009). La actividad de los progenitores cerebelosos y la neurogénesis continúan hasta la edad adulta (Grandel *et al.*, 2006; Kaslin *et al.*, 2009, 2013) y el labio rómbico se cierra en el borde medial del cerebelo, generando un receso ventricular cerebelar (Fig 32). La VZ permanece como una ZP en la porción basal, formando la ZPLC y ZPEG-VC. El nicho de las células madre del *corpus cerebelli* consiste en progenitores de tipo NE polarizados que habitan la parte dorsal del receso cerebeloso, mientras que en la parte ventral del receso se encuentran células positivas a S100beta y GFAP, ambos marcadores gliales. Además, los progenitores de tipo NE están coronados medialmente por la glía radial y lateralmente por la glía de Bergmann (considerada un tipo particular de GR). Los progenitores de tipo NE dan lugar a una población de progenitores intermedios en división que migran en sentido dorsolateral, pudiendo ser esas células con núcleo esferoide observadas en esta zona (Fig 27 P). Las células NE y los progenitores intermedios expresan marcadores característicos del RL superior como *atoh1c*, *zic1*, *zic3*, *reelina*, *neurod*, *Pax6*, *Meis1* y *GAP-43* (Costagli *et al.*, 2002; Kaslin *et al.*, 2009; Chaplin *et al.*, al. 2010; Kani *et al.*, 2010). En *D. rerio* adultos estos progenitores migran y se diferencian en 3 días a células granulares (Kaslin *et al.*, 2009).

A nivel mielencefálico la ZPRM y la ZPCC estuvieron presentes en *D. rerio* y estas no presentaron grandes variaciones en el análisis comparativo, mientras que no se constataron en *O. latipes* (Grandel *et al.*, 2006; Kuroyanagi *et al.*, 2010). En *A. leptorhynchus* la ZPCC no fue estudiada (Zupanc y Horschke 1995).

Teniendo en cuenta lo descrito para el desarrollo del cerebelo en las etapas larvianas y lo observado en la ZPRC podemos pensar que el crecimiento del cerebelo adulto es en forma medial acompañando el semicírculo proliferativo, lo que tiende a un aumento de tamaño expansivo hacia rostral, dorsal y caudal (Fig 31).

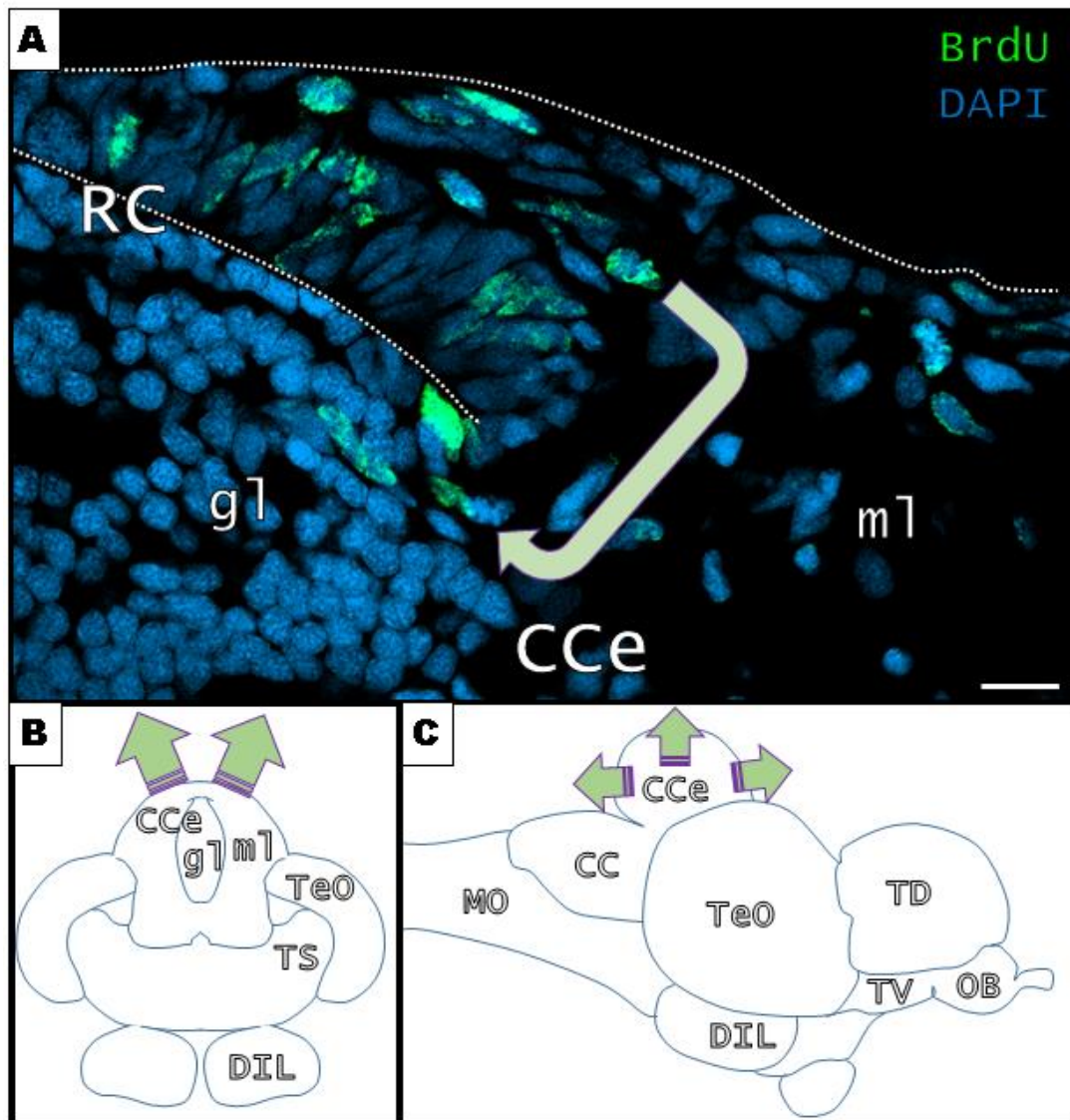
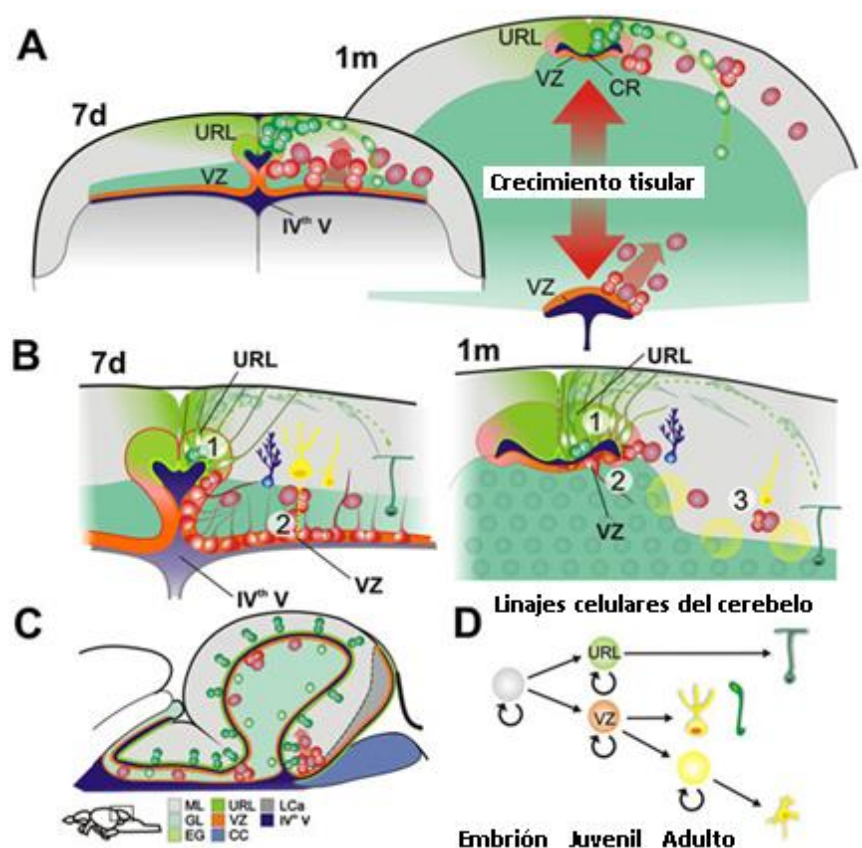
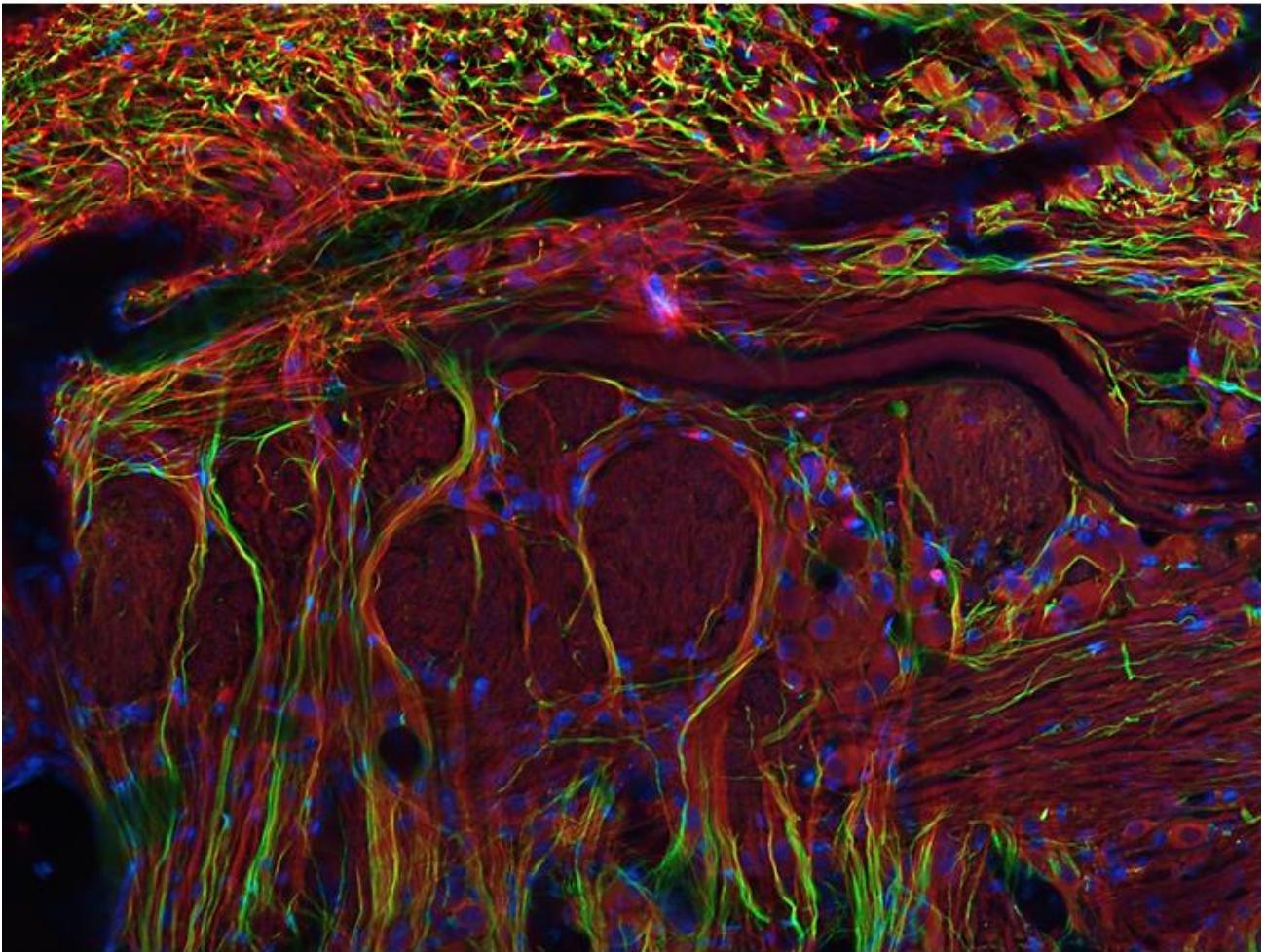


Figura 31. Crecimiento del *corpus cerebelli*. En (A) se muestra un estudio hecho aen paralelo a esta tesis, corresponde con una inmunofluorescencia anti BrdU de una semana de tratamiento, en la cual se ve el origen de las células por encima del receso cerebeloso (RC) y algunas células ya integradas a la capa granular pudiendo migrar por el trayecto indicado por el sentido de la flecha. En (B) se representa un esquema de corte transversal y en (C) una vista lateral del encéfalo. Las flechas indicanla dirección del crecimiento expansivo. Barra=20µm

Lo observado en *A. charrua* permite clasificarlo como un animal cuyo encéfalo retiene una gran cantidad de ZP y las mantiene activas en su vida adulta. También es importante considerar que, si bien se han descrito células de tipo NE con potencial neurogénico en la vida adulta de los teleósteos, *A. charrua* posee la capacidad de retener células candidatas a NE no sólo a nivel del RC, de la ZMT y del *subpallium*, sino que también en muchas ZP diencefálicas y mielencefálicas. Aunque esto se debe confirmar mediante la localización de marcadores específicos de células NE. Por lo tanto, los datos demuestran que *A. charrua* posee CMPN ventriculares con diferentes jerarquías al servicio de la neurogénesis adulta, en todas las divisiones encefálicas. Esta distribución de las ZP y los diversos tipos CPMN, podría estar vinculada al requerimiento del crecimiento de diversas estructuras encefálicas y favorecer la plasticidad neural en respuesta a las presiones selectivas. Es de considerar que la historia de vida del ciclo anual y su reproducción continua una vez alcanzada la adultez, exige el mantenimiento y recambio circuitual sustentado en la proliferación celular, sobre todo en aquellas implicadas en la detección de coespecíficos (To y OB) o encargados de coordinación motriz de los complejos despliegues reproductivos (CCb).

Figura 32. Resumen de los progenitores cerebelosos y el nicho progenitor en el pez cebra. (A) Durante las etapas larval y juvenil, el labio róbico superior (URL) y una porción de la zona ventricular (VZ) junto con una parte del IV ventrículo (receso cerebeloso, CR) se desplaza del resto del ventrículo a través del crecimiento del tejido (flechas rojas opuestas). Los progenitores neurales en el URL (parte dorsal) permanecen activos durante toda la vida, mientras que los progenitores VZ (parte ventral) se vuelven inactivos en el adulto. Durante las etapas larval y juvenil, los progenitores se delaminan de la VZ al parénquima. Tomado de Kaslin *et al.* (2013).



CAPÍTULO 3**Distribución y localización de la
aromatasa B en el encéfalo de *Austrolebias
charrua* adulto**

“Todos alabamos la belleza del árbol; todos elogiamos el encanto de la flor; todos saboreamos el fruto maduro; todos escanciamos el zumo que fermenta... y pocos, muy pocos, se acuerdan de la oscura raíz que trabaja en profundidad”

Clemente Estable

CAPÍTULO 3. Distribución y localización de la aromatasa B en el encéfalo de *A. charrua* adulto

En los teleósteos, las enzimas aromatasas son tejido específicas, presentando una isoforma cerebral (aroB) con una fuerte expresión a nivel de sistema nervioso y una isoforma gonadal (aroA) que presenta una fuerte expresión a nivel de las gónadas de machos y hembras. En la mayoría de las especies de teleósteos aroB se expresa de forma diferente respecto al sexo, siendo mucho mayor en machos que en hembras (al igual que otros vertebrados) (Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Roselli *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2005; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005). Asimismo, se ha visto que en algunos teleósteos aroB se expresa sobre todo en gónadas y no en sistema nervioso y en algunas especies la expresión de aroB en el sistema nervioso es mayor en hembras que en machos (Okubo *et al.*, 2011; Chaube *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). Por lo tanto, en este capítulo se realizó una validación de la expresión génica de aromatasas a nivel encefálico y la localización de la proteína en las diferentes divisiones encefálicas y su vinculación con las ZP.

Objetivos

Evidenciar la presencia de la enzima aroB en el encéfalo de *A. charrua*.

Revelar la distribución anatómica y localización celular de aroB en el encéfalo de machos y hembras adultos.

Resultados

Identidad de las aromatasas cerebral y gonadal en *A. charrua*

La secuencia proteica obtenida para las dos aromatasas (aroA, y aroB) obtenidas a partir de las secuencias nucleótidas (Tabla 1 de materiales y métodos) se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias proteicas de aroB y aroA encontradas en el genoma de *A. charrua*

Proteína	Secuencia aminoacídica
aroA	MDLTCDRAMIPVGFGGAVTDLVSRSSNTTESQSSGIAVATRLLLLVCLLLVAWS HADKKTIPGPSFCLGLGPLLSYLRFIWTGIGTASNYYNKKYGDIVRVWIDGEETLILS RASAVHHVLRNAKYTSRFGSQRGLSCLGMNERGIIFNNNVTLWRKIRTYFTKALT GPNLQQTVEVCVSSTQFHLDELDSLRSVDVLGLLRCTVVDISNRLFLDVPLNEKEL LLKIQKYFDTWQSVLIKPDYFRLGWIQQKHQAAAQELQDAIEALVEQKRRRMEQ ADKLDNINFAADLIFAQNHGELSADNVRQCVLEMVIAAPDTLSISLFFMLLLLKQN PDVELQLLQEIDSVVGDQQQLQNEDLLKLQVLESFINECLRFHPVVDFTMRRALSD DIIDGYRVPKGTNIILNTGRMHRTEFFHRADEFLENFQRNAPRRYFQPFQSGPRA CVGKHIAMVMMKSILVTLRQYSVCPHQDLSLDHLPQTNNLSQQPVEPHEGAESL SMSFLPRLRGKRLQAL
aroB	MMQPEEFIVVNSLPAVTSLLLLLLLLVLLITAWSRTHRSHTPGPSFLAGLGPILSYSRF IWTGIGTACNYYNHKYGSTVRVWIDGEETLILSKSSAVYHVLRSAHYTSRFGSKRG LECVGMEGRGIIFNSDIPLWKKARTSFSKALSGPGLQRTVGICVSSTTKHLDNLQS VTDPSGHVDTLSLLRAIVVDISNRLFLRVPLNEKDLLMKIHNYFETWQTVLIKPDIF KIGWLYNKHKRAAQELQDEMESLLEIKRKMINDAEKLDLDDDRDFATELIFAHNHG ELSADNVRQCVLEMVIAAPDTLSISLFFMLMLLKQNPVELQIVEEMNAALNGKA VEDVDYEKLVKVMESFISECLRFHPVVDFTMRKALEDDDDIDGTNIRKGTNIILNIGLM HKTEFFPKPREFSLTNFDSPVPSRFFQPFQCGPRSCVKGKHIAMVMMKAILITLLSRY TVCPRQGCTLDSIRQTNNLSQQPVEDERSLTMRFIIPRAHEQSTSSSET

Con el análisis filogenético se generó un árbol con tres ramas en las cuales se separaron tres grupos de vertebrados diferentes. Por un lado, se separó el grupo externo cuyas relaciones filogenéticas recapitulan el árbol de estos vertebrados presentando dos grandes ramas, una con el pez sarcopterigio *Latimeria chalumnae* y otra de vertebrados tetrápodos. En las otras dos ramas se encontraron actinopterigios en las cuales una rama posee al pez no teleósteo *Lepisosteus oculatus* y en la otra rama, que está subdividida en dos grandes grupos, se obtuvo por una parte el grupo de aroA y por otra parte el grupo de aroB.

El estudio filogenético de estas dos proteínas mostró que son proteínas ortólogas de las aromatasas a y b de otros teleósteos. No hay ninguna ambigüedad en este resultado como se observa en la Fig. 33, ya que la secuencia proteica de la aroA

arma un grupo con otras aromatasas a de peces teleósteos, mientras que la aroB arma un grupo con las aromatasas b de peces teleósteos.

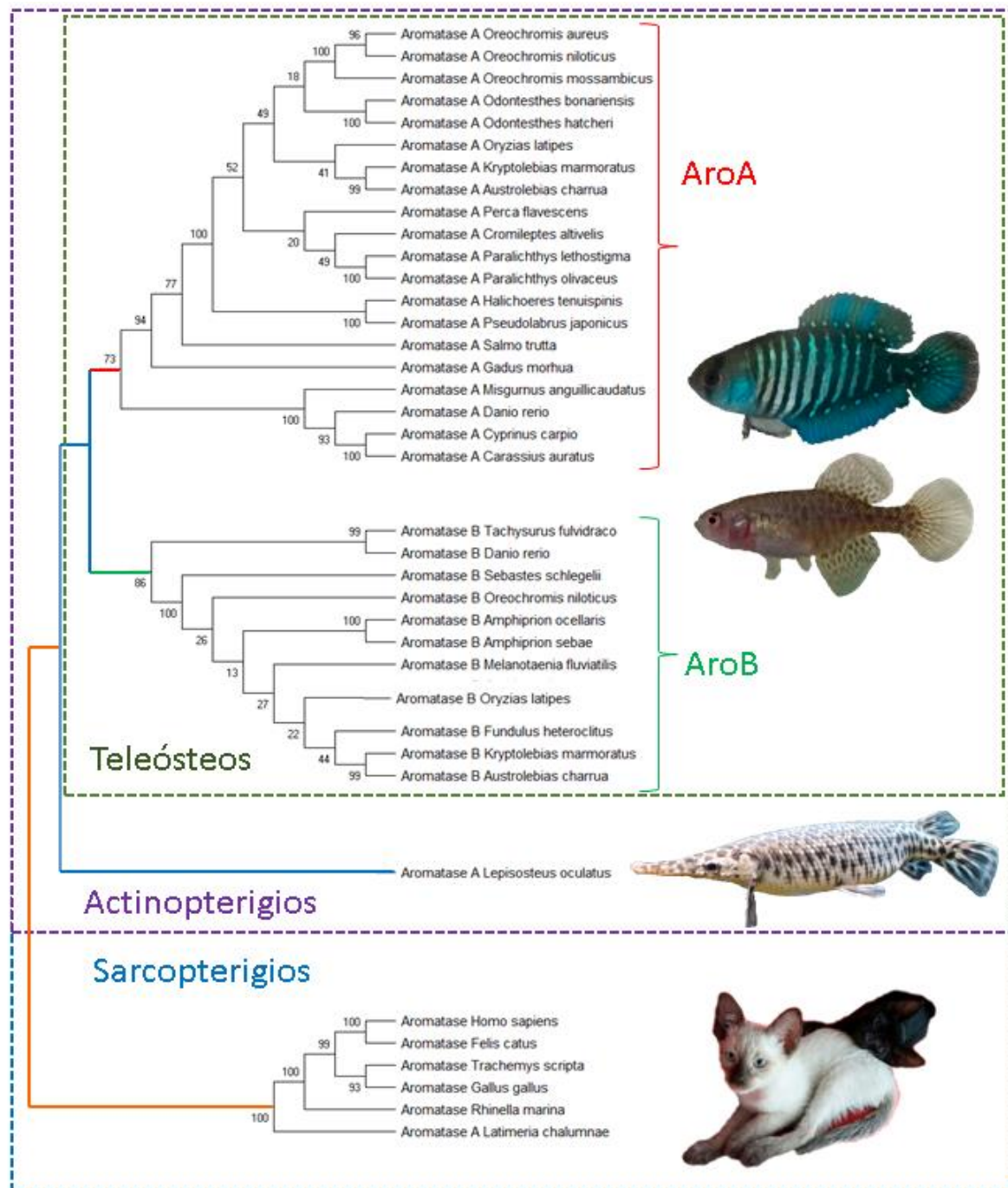


Figura 33. Filogenia de aromatasas. Las aromatasas utilizadas para la filogenia se segregaron en dos grandes grupos, actinopterygios y sarcopterygios/tetrápodos. Dentro de los actinopterygios se dividieron en no-teleósteos (*L. oculatus*) y teleósteos. En el grupo de los teleósteos se segregaron dos grupos, uno correspondiente con aroA y otro correspondiente con aroB, concordante con lo descrito por otros autores. La imagen de *Lepisosteus sp.* fue cedida generosamente por Fernando Peña.

Localización de la aromatasas en el encéfalo

Observaciones generales

La señal positiva a la inmunofluorescencia para aroB (Fig. 35) fue localizada en todo el eje rostrocaudal del encéfalo incluyendo la porción más rostral de la médula espinal (Fig 35). En general la inmunorreactividad se presentó como una señal intensa en la ZV y ZSV de las diferentes regiones encefálicas. Esta señal se localizó formando grandes extensiones positivas o formando 'clusters' en sitios específicos. La morfología presentada por las células inmunorreactivas fue en general (Fig 35 señal en azul) de tipo glía radial presentando dos formas. Un tipo de célula cuyo soma reside en la ZV y una proyección radial hacia la región basal; a estas células las denominaremos glía radial tipo 1 (GR1) (Fig 34). El otro tipo de célula con morfología radial presenta el soma subventricular, una proyección corta y apical que contacta con la luz ventricular, y otra proyección radial larga y basal, que se extiende profunda en el parénquima; a estas células las denominaremos glía radial tipo 2 (GR2) (Fig 34). Existen otras células localizadas alejadas de la ZV y estructuras que presentaron inmunorreactividad, pero no poseen una morfología de célula radial (Fig. 35 señal en verde). Si bien se utilizaron machos y hembras, no se analizaron las muestras cuantitativamente según intensidad de fluorescencia y no se observaron diferencias evidentes entre sexos según la localización de la inmunorreactividad en las distintas regiones encefálicas.

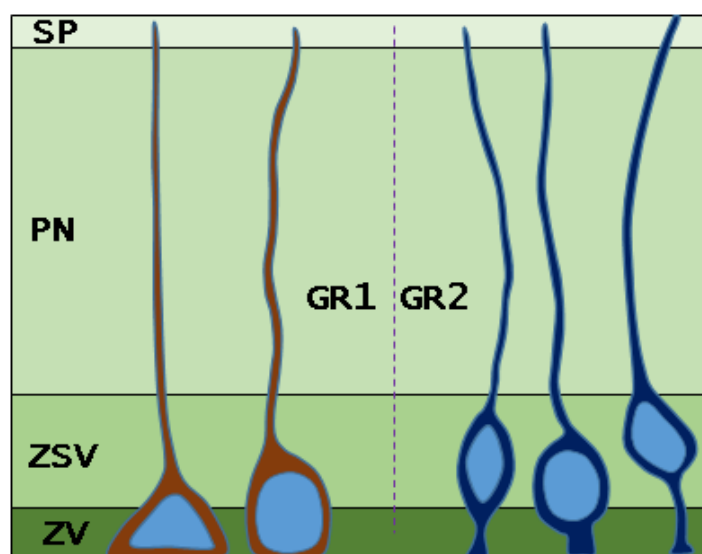


Figura 34. Morfologías de GR descritas por inmunorreactividad para aroB. Las GR1 presentan una localización en la zona ventricular (ZV) y su soma forma parte de la pared del ventrículo y presenta un único proceso radial que se extiende por el parénquima nervioso (PN) hasta la superficie pial (SP). Las GR2 presentan el

soma a diferentes distancias de la ZV, sobre todo ubicándose en la ZSV y presentan además de su largo proceso radial, un proceso apical corto, en contacto con el ventrículo.

Telencéfalo

En el telencéfalo se registró gran intensidad de marcación (Fig 35 A-C; Fig 36 A-E). En el bulbo olfatorio la inmunorreactividad se dio en diferentes regiones y la señal tuvo diferentes características estructurales. Células GR1 principalmente y algunas GR2 se encontraron en forma dispersa o en clusters en la ZV medial de la lámina celular interna, así como profundas en la zona dorsal transicional con el telencéfalo dorsal (Fig 35 A; Fig 36 A-C). En esta región dorsal fue intensamente inmunorreactiva y se presentaron células GR1 y GR2 de diferentes tamaños y con su proceso radial dirigido hacia la profundidad del parénquima de la lámina celular externa y la lámina glomerular. En la capa glomerular se presentó gran intensidad de señal (Fig 36 A) y el nervio olfatorio que penetra en el bulbo es intensamente positivo a la señal de aroB (Fig 36 A), en esta capa la señal parece estar asociada a las arborizaciones de los glomérulos olfativos y no a células localizadas en esa región ya que no es acompañada por señal nuclear (Fig 36 A). En la estructura de tipo puente que conecta ambos bulbos olfatorios por donde discurre el tracto olfatorio medial y parte del nervio terminal, a nivel de la lámina celular que limita con el ventrículo se presentan células inmunorreactivas de tipo epitelio (Fig 35 A).

En el área dorsal telencefálica se encuentran células GR1 y GR2 intercaladas y agrupadas en pequeños clusters (Fig 35 A-D). La región dorso-lateral presenta GR1 que recubren toda esta superficie ventricular originada por la eversión en el desarrollo embrionario, y entre éstas se localizan algunas GR2 dispersas (Fig 35 A-D). Los procesos radiales de estas células proyectan profundas en el parénquima en dirección a la unión lateral del área dorsal y ventral, en contacto con el tracto olfatorio lateral y el núcleo taenia.

En el área ventral telencefálica se localizan pequeños clusters de GR1 y GR2 en la ZV del núcleo dorsal y en zonas ventrales del núcleo ventral, separadas por grandes extensiones sin presencia de células inmunorreactivas (Fig 35 B; Fig 36 D, E). En la conexión ventral de esta área también se describieron células inmunorreactivas sin

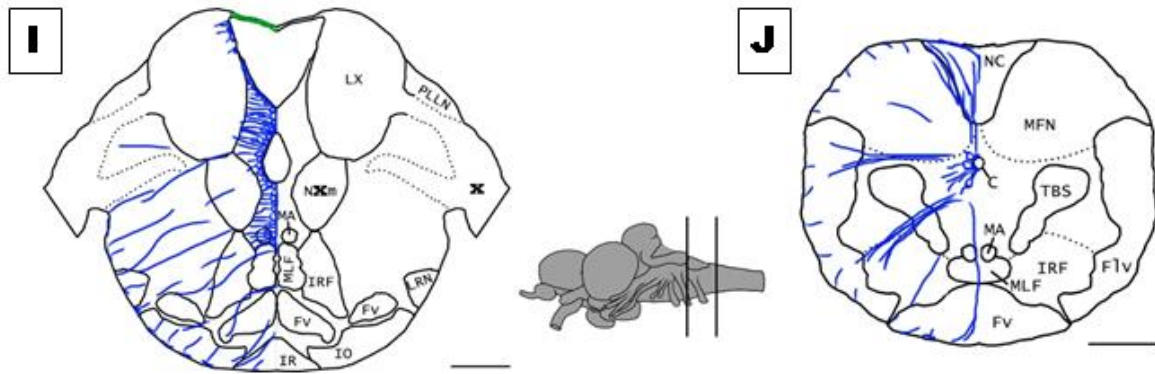


Figura 27 continuación

Diencefalo

En todas las regiones ventriculares del diencefalo se localizaron células aroB positivas (Fig 35 D-G; Fig 37 B, C D, F, G). El área preóptica presentó intensa inmunorreactividad rostrocaudal en la región ventricular presentando GR1 y GR2 entremezcladas (Fig 35 C, D; Fig 37 A, B, C, E, F, G). El tálamo presentó inmunorreactividad en la ZV presentando GR1 y GR2 en clusters separados por zonas sin señal (Fig 37 B). El epitálamo presentó inmunorreactividad en la ZV presentando GR1 y GR2 en la habénula y en el saco dorsal que se proyecta hacia el telencéfalo en posición medial, también presentó células intensamente reactivas (Fig 35 C). El hipotálamo ventral resultó intensamente inmunorreactivo en la ZV presentando GR1 y GR2 dispersas, sobre todo a nivel del infundíbulo donde las células en la parte ventral adoptan una morfología no radial (Fig 35 E; Fig 37 C). En la hipófisis se localizó intensa señal tanto a nivel de la neurohipófisis como en la adenohipófisis (Fig 37 C). El ventrículo diencefálico se continúa caudalmente con el receso lateral y el receso posterior y ambos presentan inmunorreactividad en la pared ventricular ventro-lateral y proyectan radialmente hacia la parte ventral (Fig 35 F, G; Fig 37 G). El tubérculo posterior que posee comunicación con el ventrículo diencefálico medial, se localizaron GR1 y GR2 dispersas en la ZV (Fig 35 G). En el sinencéfalo se localizó inmunorreactividad en la ZV lindante con el ventrículo tectal presentando GR1 y GR2 las que proyectan radialmente hacia la región ventral (Fig 35 G).

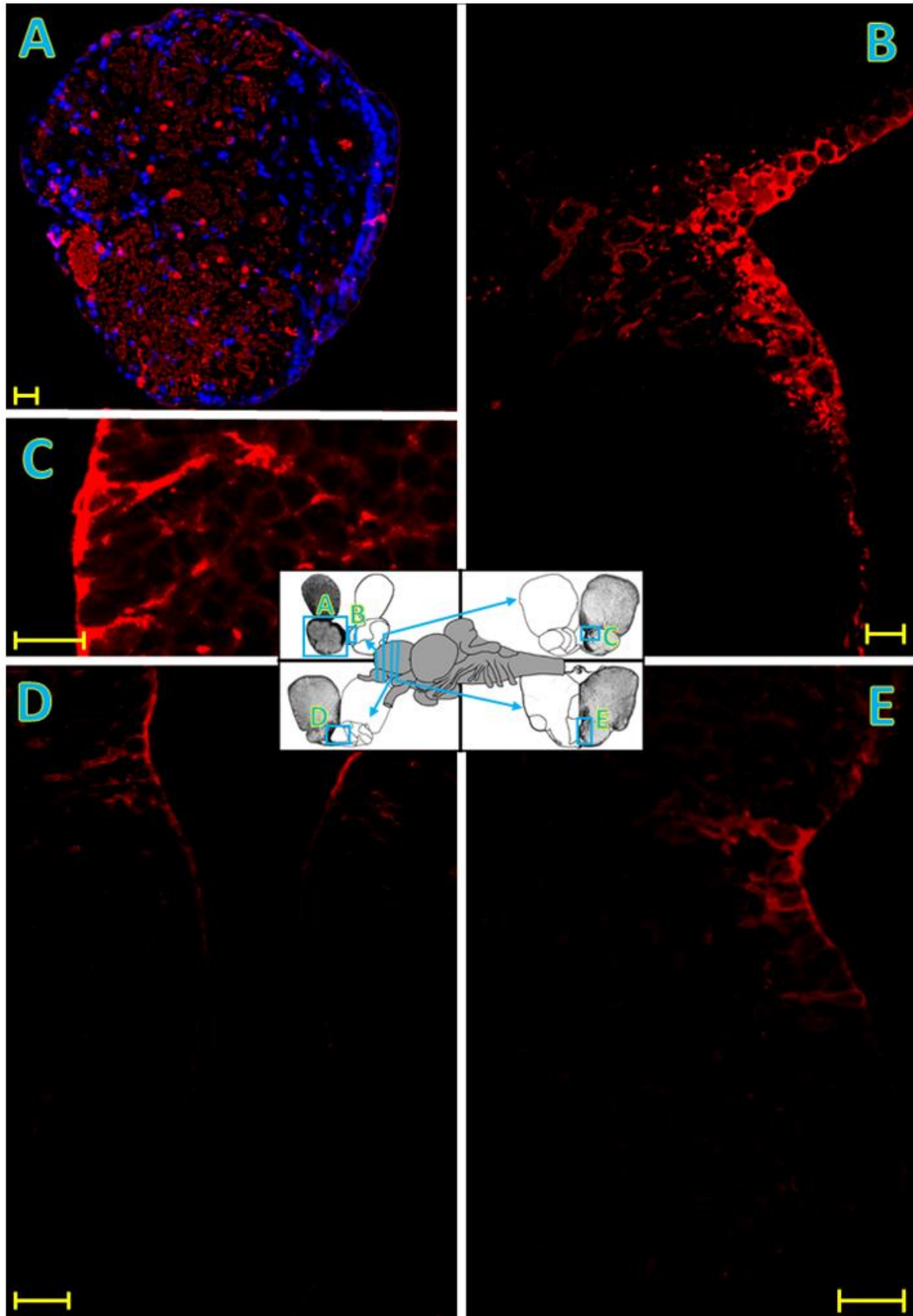


Figura 36. Inmunolocalización de aroB (rojo) en el encéfalo adulto entero. Niveles rostrales. Contraintinción con DAPI (azul). A: Bulbo olfatorio. B: transición bulbo olfatorio-lóbulos telencefálicos dorsales. C: Tpared medial del bulbo olfatorio. D: area dorsoventral y dorsodorsal del telencéfalo ventral rostral. E: area dorsoventral y dorsodorsal del telencéfalo ventral caudal. Barras=20 μ m

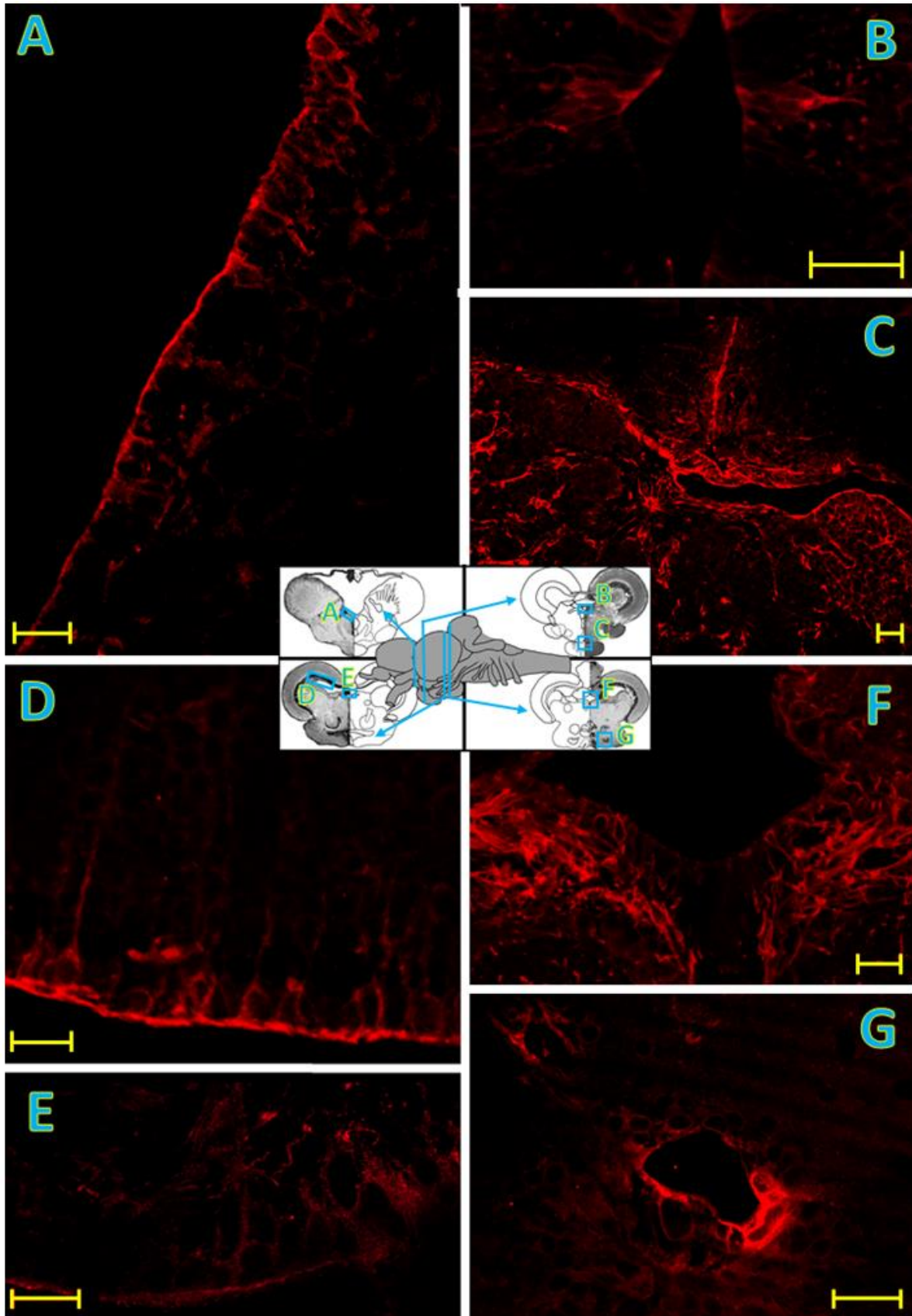


Figura 37. Inmunolocalización de aroB (rojo) en el encéfalo adulto entero. Niveles mediales. A: área preóptica. B: tálamo dorsal. D: hipotálamo-hipófisis. D: tectum óptico zona gris periventricular. E: *torus longitudinalis*. F: paredes del comienzo del ventrículo rombencefálico, a nivel de tegmentum. G: receso laeral del diencefalo. Barras= 20 μ m

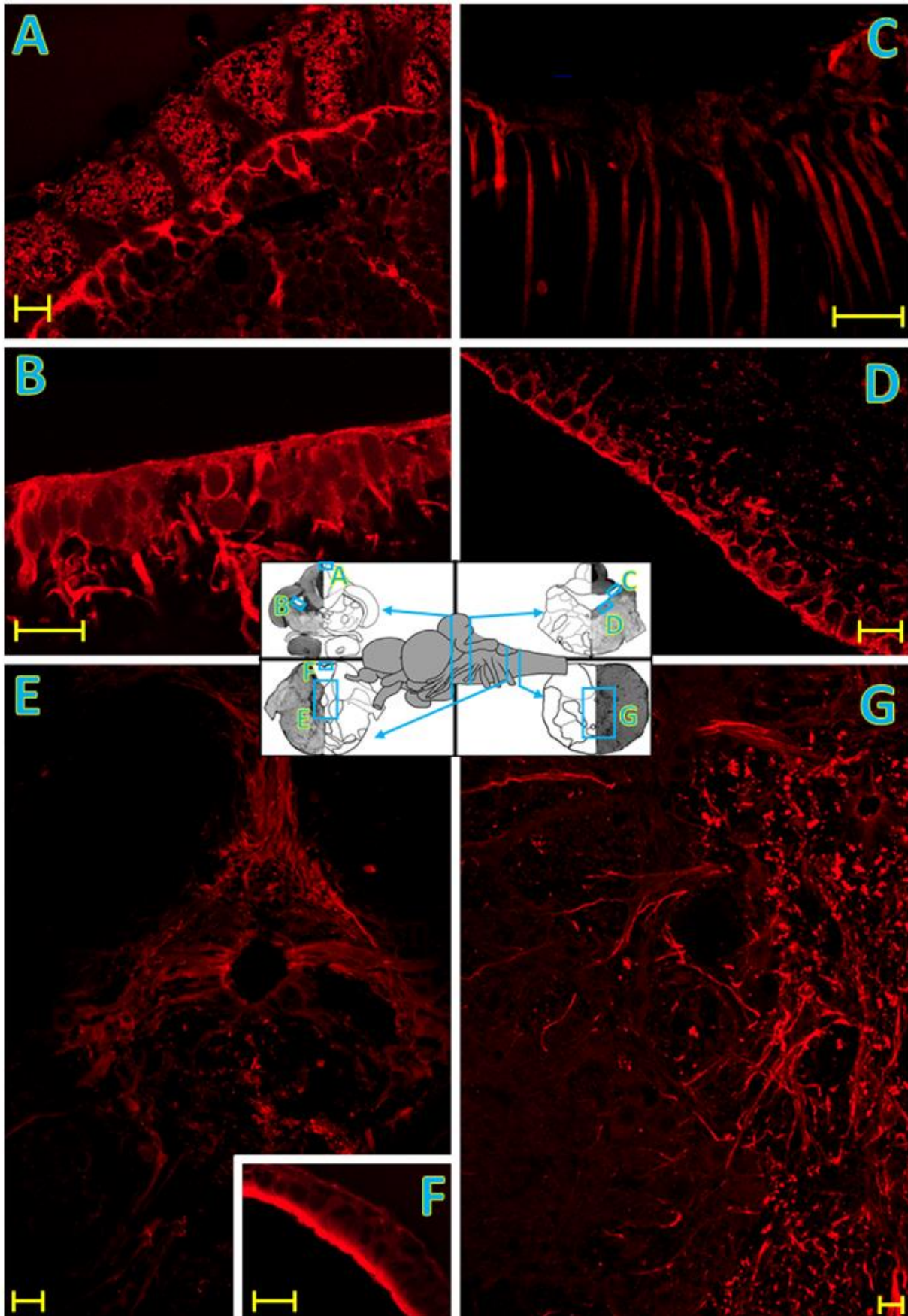


Figura 38. Inmunolocalización de aroB (rojo) en el encéfalo adulto entero. Niveles caudales. A: receso cerebelar. Btorus semicircularis. C y D: pared del cuarto ventrículo porción metencefálica. E: cuarto ventrículo

porción mielencefálica. F: formación coroidea posterior. G: canal central, mielencéfalo-médula espinal.

Barras=20µm

Mesencéfalo

En el tectum óptico se localizaron GR1 mayormente en la lámina 1 y 2 de la zona gris periventricular en contacto con el ventrículo tectal y algunas GR2 localizadas en la lámina 3 (Fig 35 E, F; Fig 37 D). Éstas forman un continuo que tapizan la pared ventricular del lado tectal y proyectan hacia la capa molecular del tectum óptico (Fig 37 D). En el *torus longitudinalis* se localizaron también GR1 y GR2 inmunorreactivas presentes en la ZV (Fig E, F; Fig 37 E). En la región medial del *torus longitudinalis* se observa un clúster de GR2 que proyectan profundas en el parénquima (Fig 35 E, F). El *torus semicircularis* presenta en toda su ZV GR2 inmunorreactivas dorso-lateralmente que proyectan en dirección ventral profundas en el parénquima hasta contactar los grupos neuronales (Fig 35 E-G; Fig 38 B). El tegmentum presenta también inmunorreactividad en la ZV, presentando GR2 principalmente y GR1 entre las anteriores, estas células proyectan radialmente en dirección ventral (Fig 35 G, H; Fig 37 F).

Metencéfalo (Rombencéfalo)

En el Rombencéfalo hubo señal positiva a aroB asociada a las paredes ventriculares pero también intensa señal profunda en el parénquima de varias estructuras (Fig 35 G-J; Fig 38 A-G). La valvula cerebelli (Val) en la ZV lindante con el ventrículo tectal presenta inmunorreactividad siendo mayormente en GR1 (Fig 35 G). El *corpus cerebelli* (CCe) presenta gran inmunorreactividad en la pared interna del receso cerebeloso, es decir la región que tiene contacto con la capa granular, allí residen GR1 y GR2 tapizando toda la pared (Fig 35 G, H; Fig 38 A). Estas glías presentan su proyección hacia la profundidad de la capa granular, donde se observa inmunorreactividad difusa entre las neuronas granulares (Fig 35 G, H). Hacia la parte dorsal del receso que tiene contacto con la capa molecular, es en su mayoría negativo a la señal de aroB, pero pueden existir algunas GR1 y GR2 dispersas. El lóbulo caudal (LCa) del cerebelo presenta inmunorreactividad en GR1 de la ZV del

cuarto ventrículo a nivel de la capa molecular y GR1 y GR2 en la masa granular periventricular (PG) (Fig 35 H).

Mielencéfalo (Rombencéfalo)

La médula oblonga presentó una alta inmunorreactividad donde GR1 y GR2 tapizan la ZV del cuarto ventrículo y del canal central, como las de la crista cerebellaris (CC), lóbulo facial (LVII) y lóbulo vagal (LX) (Fig 35 I, J; Fig 38 C, E, G). Algunas proyecciones de estas células llegan hasta la superficie pial atravesando en paquetes el parénquima medular (Fig 35 I, J; Fig 38 G). En la FCP hubo una gran inmunorreactividad para aroB en toda su extensión (Fig 35 I; Fig 38 F).

Identificación de estirpe celular

Con los experimentos de doble inmunolocalización de aroB junto con el marcador neuronal Hu y aroB junto con el marcador de glía radial vimentina, se pudo obtener la localización específica de estos marcadores para machos y hembras. Se pudo constatar que las células GR1 y GR2 siempre colocalizan con la vimentina en todas las áreas encefálicas (Fig 39 A, B) aunque en la mayoría de los casos la señal de la vimentina que se localiza profunda en el parénquima no colocaliza con aroB ya que la señal de esta última, está restringida al soma y una porción del proceso radial (Fig 39 A, B).

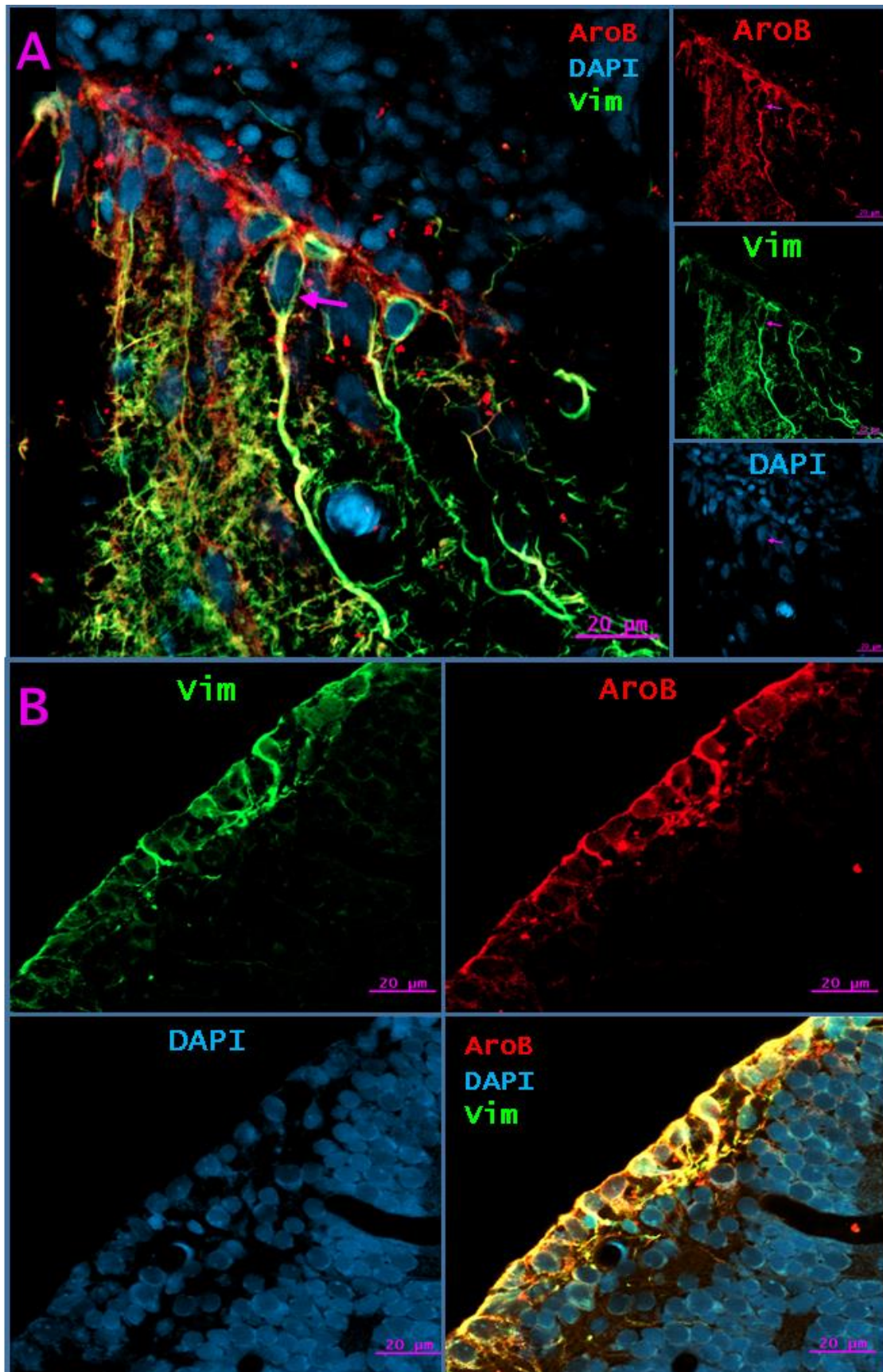


Figura 39. Colocalización de inmunoreactividad para la aroB (rojo) en células que expresan vimentina (verde). Contratación con DAPI (azul). En (A) se muestra un corte a nivel rombencefálico donde hay tres paneles chicos a la derecha que corresponden a aroB en rojo, vimentina en verde, y DAPI en azul, y en grande a la izquierda se muestra la combinación de todas las señales donde se observa la colocalización de

señal de aroB con vimentina. En (B) se observa un corte a nivel mesencefálico en que arriba a la izquierda se presenta la señal de vimentina y a la derecha la de aroB, mientras que abajo a la izquierda es la señal del DAPI y a la derecha la combinación de los canales. Se puede observar que ambos marcadores colocalizan generando una señal naranja.

Por otra parte, la inmunofluorescencia con Hu no mostró colocación con aroB en ninguna región encefálica (Fig 40). Estos datos junto con los morfológicos revelan que las GR presentes en todas las áreas encefálicas de *A. charrua*, asociadas a las paredes ventriculares, presentan aroB.-

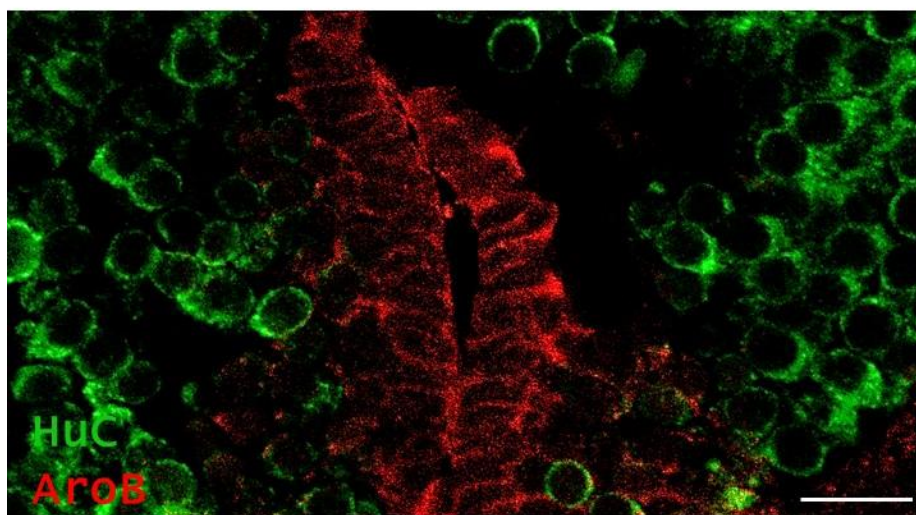


Figura 40. Inmunofluorescencia de aroB (rojo) y el marcador neuronal HuC (verde), en telencéfalo dorsal. Se puede observar que ambos marcadores no colocalizan. Barra=20 μ m.

Colocalización de aroB con NADPHd

Como aroB actúa en cooperación con la enzima citocromo P-450-NADPH-reductasa, poder identificar ambas enzimas en la misma célula, podría evidenciar con mayor respaldo la formación de neuroestrógenos en las células proliferativas.

La localización de la tinción por la precipitación de formazán, se registró tanto en neuronas (Fig 41 A-D), como en vasos sanguíneos y GR detectadas por su morfología característica (Fig 41). Las células positivas que se localizaron en la pared ventricular presentaron la morfología característica de GR1 y GR2 descritas anteriormente según la inmunoreactividad de aroB (Fig 34 A, B).

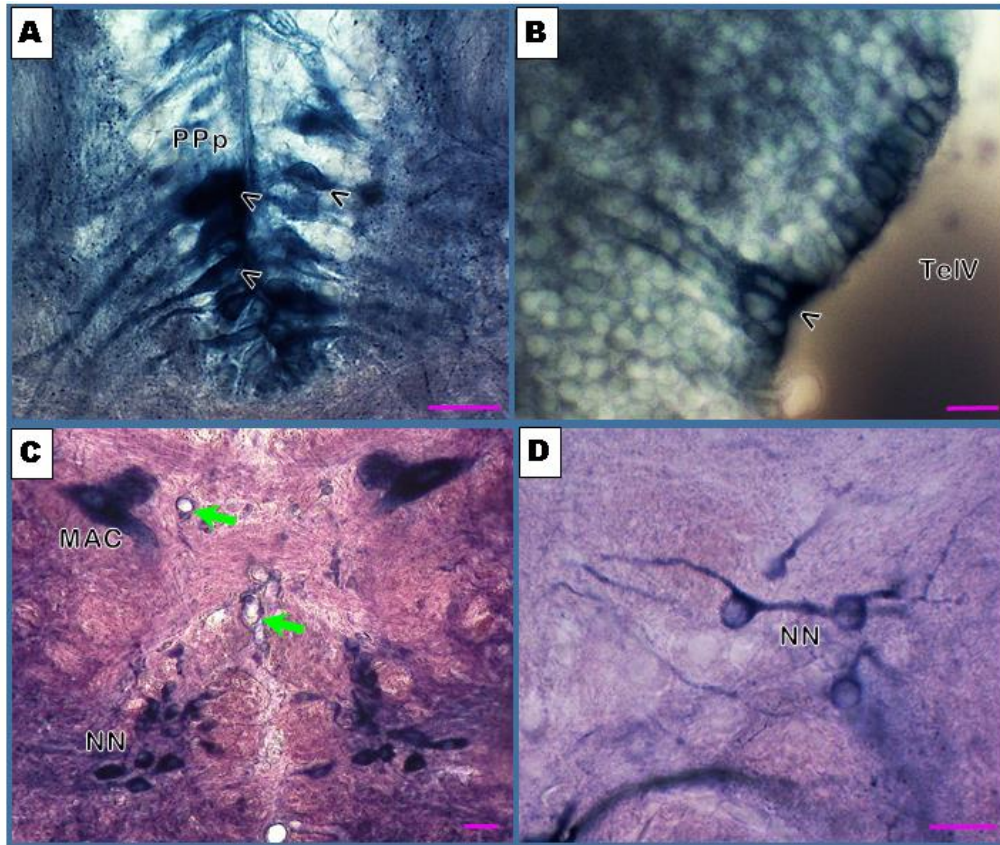


Figura 41. NADPHd (señal azul) en el encéfalo de *A. charrua*. A: células positivas con morfología de GR del POA (<). B: células positivas con morfología de GR (<) en telencéfalo dorsal. C: Señal específica en neurona gigante de Mauthner (MAC) y en vasos sanguíneos (flechas verdes). D: Neuronas nitroérgicas tegmentales.

Barras=20μm

Los cortes semifinos (1 micrómetro de espesor) revelaron su localización formando parte de la ZV (Fig 42 A, B, C), siendo una célula que forma la pared ventricular, y por lo tanto, no son de naturaleza neuronal.

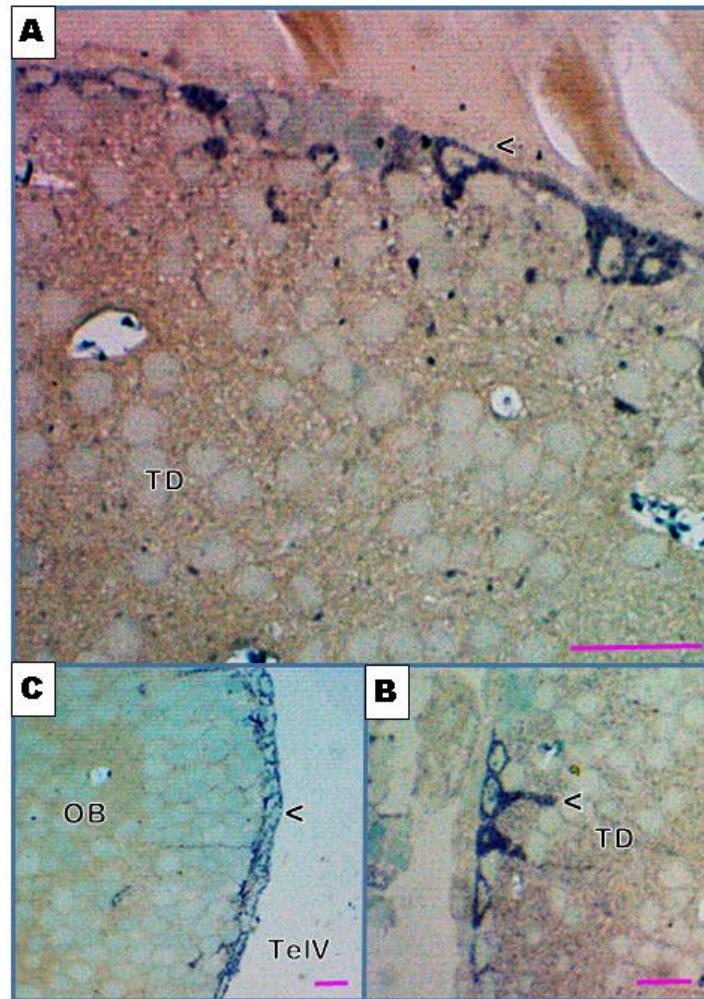


Figura 42. Cortes semifinos ($1\mu\text{m}$) a nivel del telencéfalo teñidos con NADPHd (Senal azul). A: Telencéfalo a nivel del área dorso-dorsal presentando células positivas cuyo núcleo es de forma triangular (<). C: pared medial del bulbo olfatorio presentando un fila de células positivas (<) en la ZV. Telencéfalo a nivel del área dorso-medial mostrando células positivas con morfología de GR (<). Barras= $20\mu\text{m}$

Asimismo, en los cortes semifinos del telencéfalo dorsal, se pudo constatar que varias células positivas a NADPHd presentaron núcleos triangulares o piramidales, característicos de las células proliferativas de esta región, descritos en el capítulo anterior (Fig 42 A, B, C). Resultó ser una técnica propicia y sencilla para revelar la localización de las células con actividad diaforasa y permitió evidenciar las GR presentes en todas las divisiones encefálicas concordantes con las zonas de detección de aroB (Fig 43 A, B, C, D).

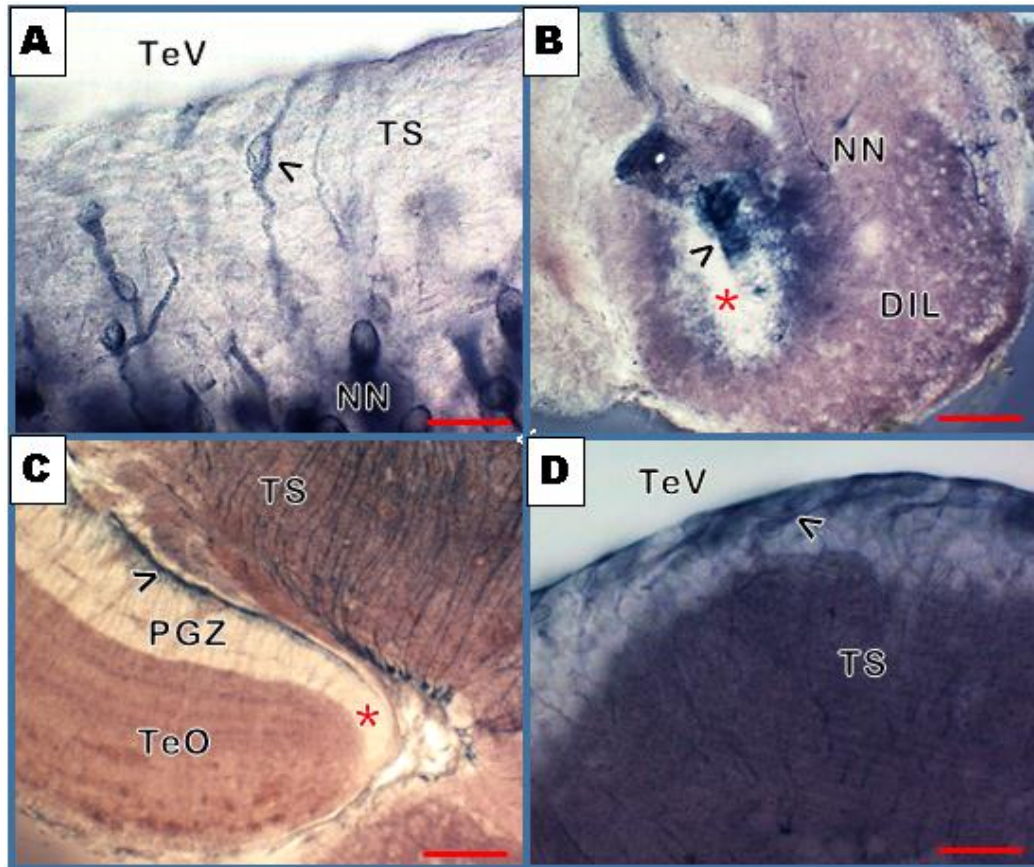


Figura 43. Señal NADPHd positiva en células con morfología de GR en las ZP del encéfalo de *A. charrua*. A: Región del tegmentum lindante con el torus semicircularis (TS) presentando positividad a la técnica en células con morfología de GR2. Barra=25µm. B: receso diencefálico presentando positividad (>) a nivel dorsal y negatividad (*) a nivel ventral, esta distribución fue descrita para la señal de aroB. Barra=100µm. C: polo ventral del TeO mostrando positividad en la PGZ (>) y negatividad (*) en la ZMT, tal como se describe la señal de aroB en estas regiones. Barra=100 µm. D: positividad en células de tipo GR1 (<) en el *torus longitudinalis*. Barra=25µm.

Para constatar que las GR positivas a NADPHd son células en activa proliferación se realizaron las inyecciones con BrdU, se perfundieron los animales una hora post-inyección y este se reveló mediante inmunohistoquímica junto con el revelado de la actividad diaforasa. Los resultados mostraron que efectivamente las GR positivas a NADPHd que se ubican en la ZV, poseen actividad proliferativa al colocalizar con BrdU Fig 44 A, B).

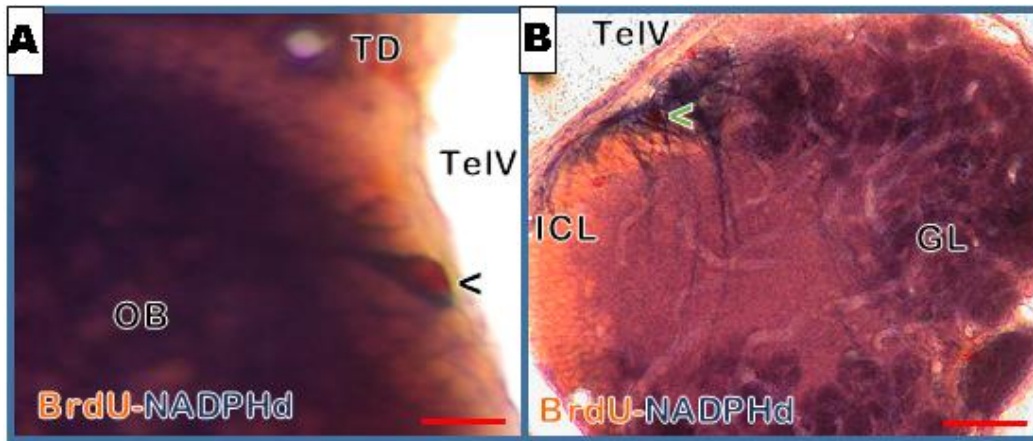


Figura 44. Colocalización de señal NADPHd con BrdU localizado por inmunohistoquímica. A: Zona de transición BO-Tel presentando una célula NADPHd con un núcleo positivo al BrdU (<), barra=10 μ m. Bulbo olfatorio porción rostral presentando una célula NADPHd con un núcleo positivo al BrdU (<), barra=80 μ m.

Por otra parte la señal de la inmunolocalización de aroB fue coincidente con la tinción de NADPHd colocalizando entre sí en todas las regiones donde se detectó aroB por inmunorreactividad, incluso en los glomérulos olfatorios y nervio olfatorio, donde presentó gran intensidad de marcado con ambas técnicas (Fig 45).

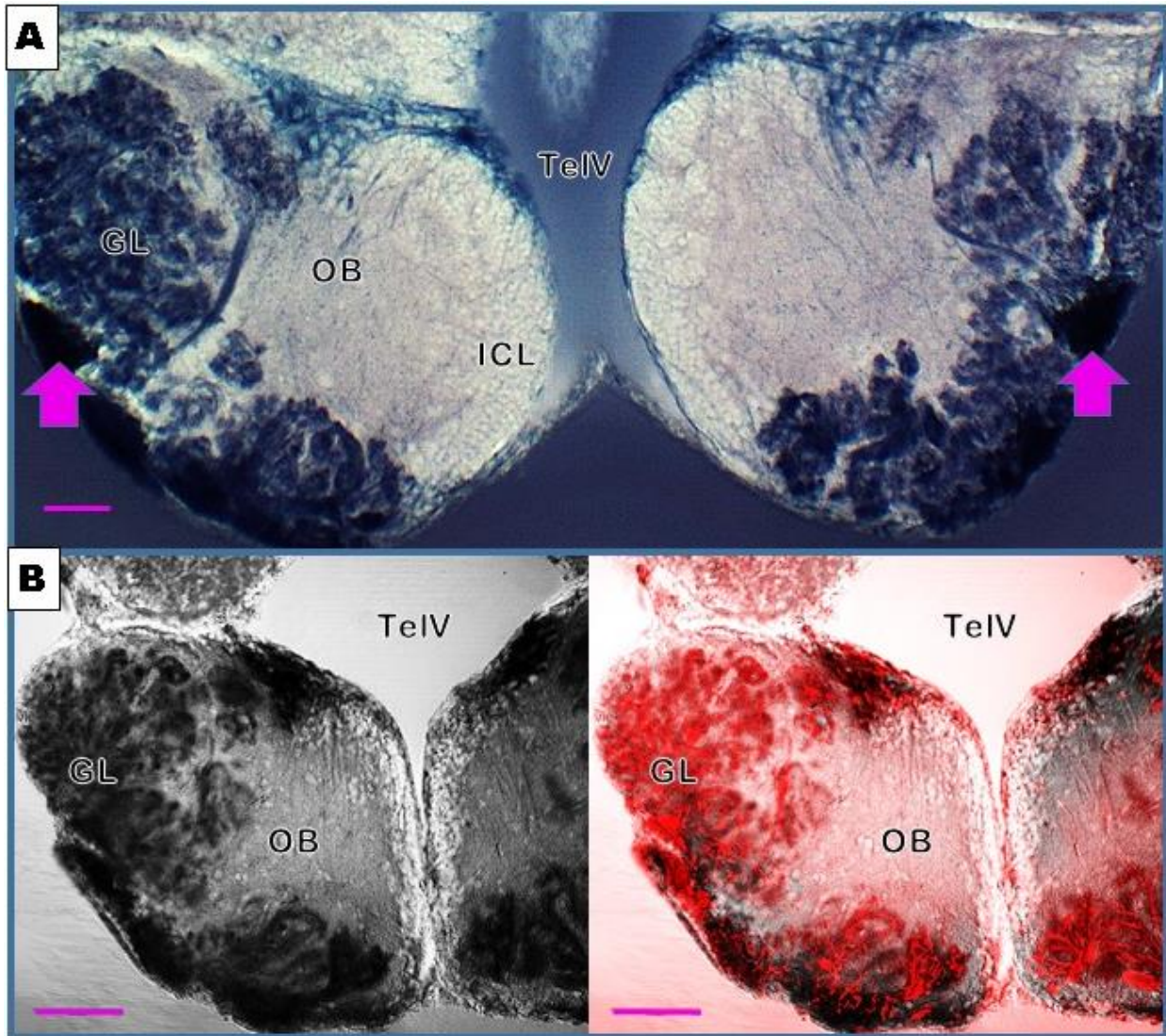


Figura 45. Colocalización de aroB con NADPHd. En (A) se observa un corte de telencéfalo rostral con la tinción NADPHd donde se observan las GR en la transición bulbos olfatorios-lóbulos telencefálicos. También presenta gran tinción a nivel de los glomérulos (GL) y del nervio olfatorio (flechas). En (B) se observa que la señal de NADPHd colocaliza siempre con la inmunoreactividad de aroB, tanto en GR como en las zonas donde no presenta morfología de GR. Barra=50 μ m. OB: bulo olfatorio. TelIV: ventrículo telencefálico. ICL: capa celular interna

Utilizando la microscopía confocal con análisis de mayores aumentos, se pudieron obtener imágenes de colocalizaciones entre las células aroB⁺ y NADPHd⁺, por lo que, como en teleosteos la señal aroB está limitada principalmente a GR, es preciso considerar que según la ubicación, forma, y la localización con aroB, estas células sean GR.

Para revelar definitivamente la naturaleza GR de las células NADPHd positivas, se realizaron triples localizaciones con vimentina, aromatasa y actividad diaforasa. Cortes consecutivos de encéfalo de *A. charrua* se utilizaron según dos protocolos, en un corte la actividad diaforasa para microscopía óptica, en el consecutivo se

realizó además, una inmunolocalización de vimentina y aroB. Los resultados muestran que en las zonas ventriculares, las células NADPHd positivas expresan vimentina y aroB (Fig 46 B), por lo que se revela definitivamente su naturaleza de GR.

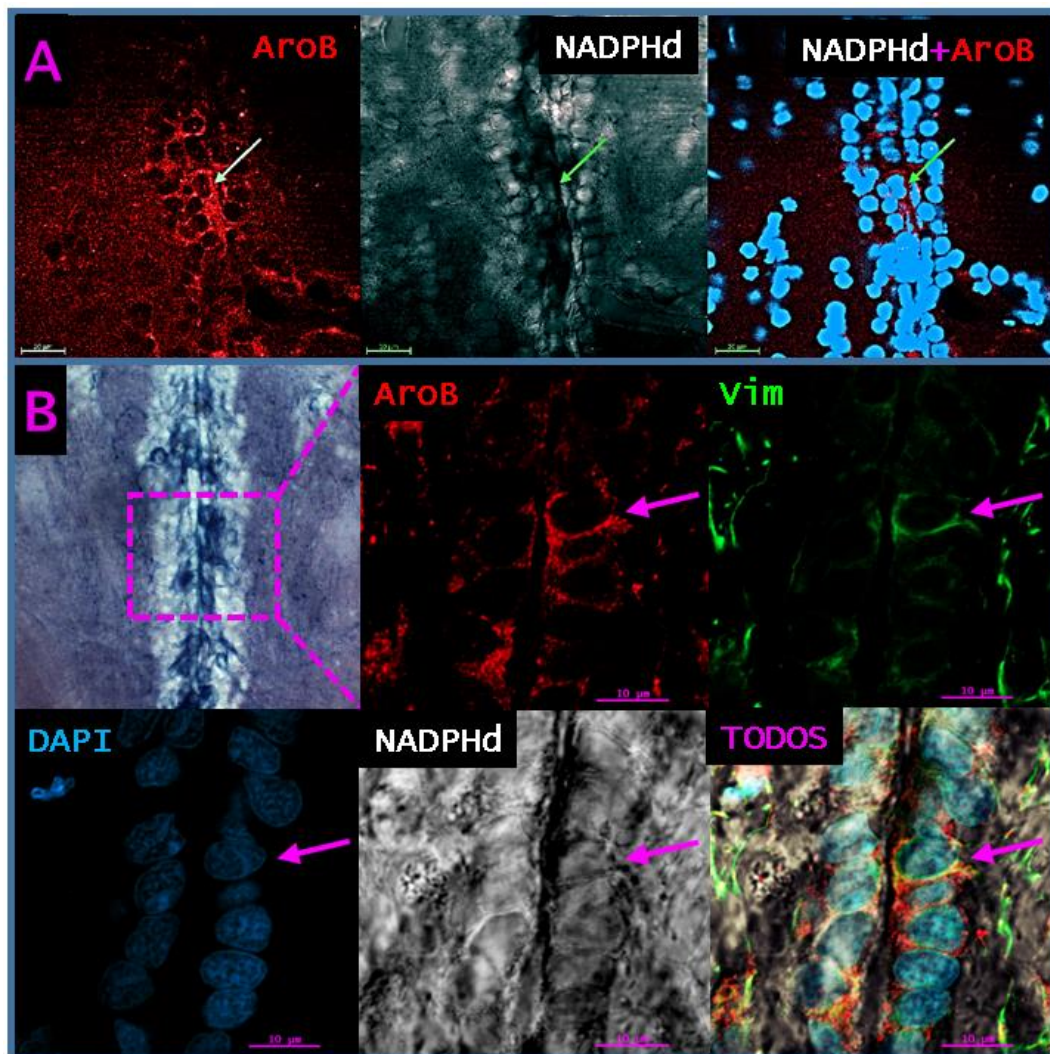


Figura 46. Colocalización de NADPHd con aroB (rojo) y vimentina (verde). En el telencéfalo (A) se observa la colocalización de aroB (rojo) con NADPHd (negro), contrateñidos con DAPI (celeste). En el recuadro superior derecho de (B) se muestra un corte teñido con NADPHd fotografiado con microscopio óptico y las demás imágenes corresponden a un corte consecutivo procesado para microscopía confocal revelando además aroB (rojo) y vimentina (Verde). La triple colocalización de estos marcadores revela que las GR que expresan aroB presentan actividad diaforasa. Barras en A=20µm. Barras en B=10µm

Expresión de aroB en las ZP

En el capítulo 2 se conocieron veinte ZP en el encéfalo de *A. charrua* que estaban asociadas a las paredes ventriculares. Este capítulo se refiere a la localización de las células aromatasas B positivas, vinculadas a las ZP.

Se realizaron experimentos de proliferación de una hora de sobrevida con el propósito de demostrar el origen de la generación de nuevas células y se detectó por inmunofluorescencia la colocalización de aroB con BrdU, correspondientes con células GR debido a su coexpresión con vimentina (Fig 39 B). Por contrario las células que se localizaron como proliferativas mediante inmunorreactividad con BrdU, colocalizaron con aroB y nunca con HuC, incluso generaron dominios donde la señal aroB positiva está segregada de HuC (Fig 47 A, B, C).

En el telencéfalo se han descrito núcleos BrdU positivos ubicados en toda la ZV, aunque aroB se distribuyó a nivel se bulbo olfatorio y del área dorsal ventricular de los lóbulos telencefálicos. Sin embargo, aroB no se expresó en el área ventral.

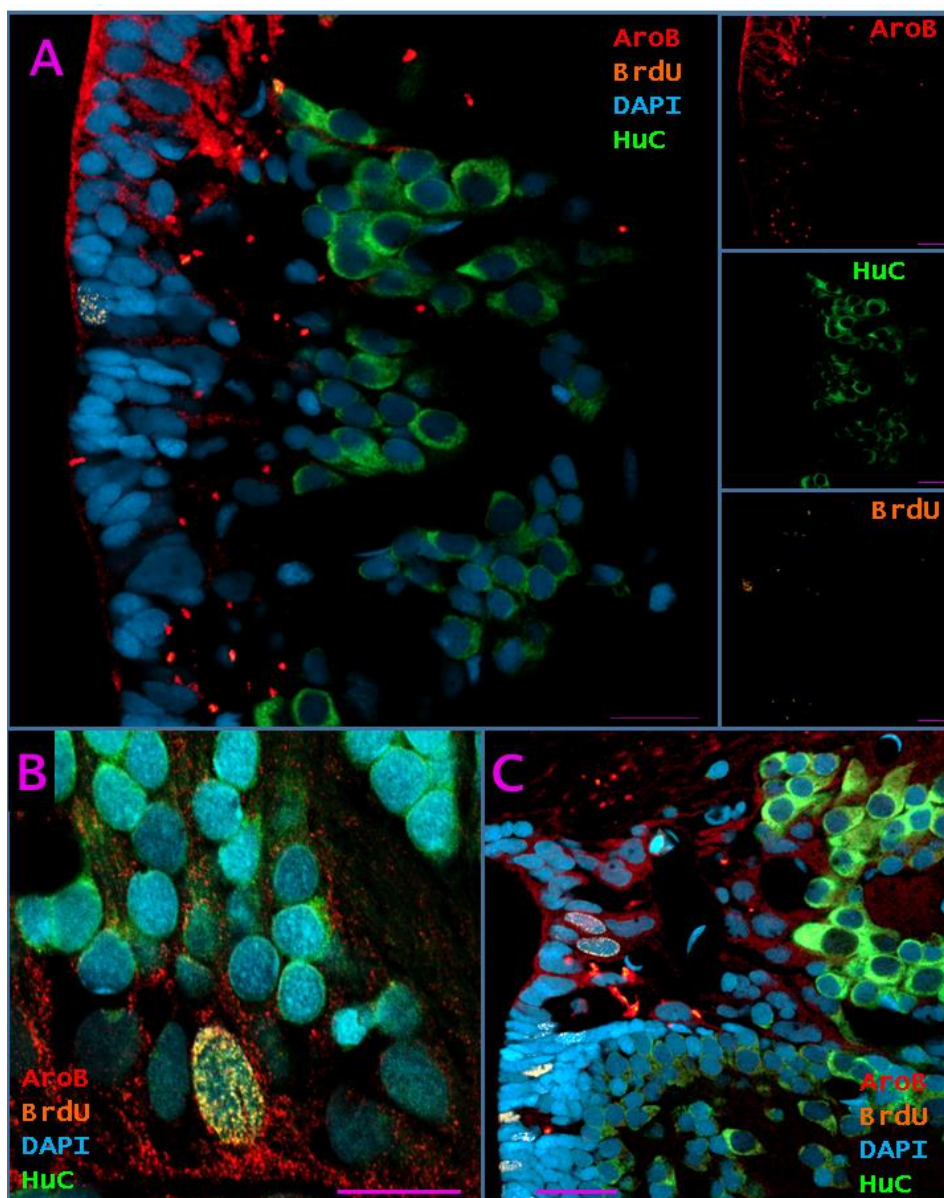


Figura 47. Colocalizaciones entre aroB (rojo), BrdU (anaranjado) y HuC (verde). A: tálamo dorsal. B: Tectum óptico. C: Tálamo ventral. La señal de aroB que presenta colocalización con BrdU, pero no con HuC, las presenta como GR con capacidad proliferativa.

En la ZPOB se demostró colocalización entre BrdU y aroB en células con morfología de glías radial (Fig 48 A).

En la ZPTV a nivel de los grandes clusters ventrales de núcleos alargados no se registró colocalización de núcleos proliferativos con aroB (Fig 48 C). En la zona dorsal del telencéfalo ventral se registraron algunas GR aromatasa + que también son BrdU+. En la ZPTD la gran mayoría de las células aroB+ con morfología de glía radial presentaron núcleos BrdU+ (Fig 48 B). En el diencéfalo todas las ZP presentaron células positivas a la aromatasa. En la ZPPOA la mayoría de los núcleos proliferativos presentaron inmunorreactividad para aroB, excepto aquellos de morfología alargada (Fig 48 D).

Tanto en la ZP del tálamo ventral (ZPTIV) como en la ZP del tálamo dorsal (ZPTID) hubo colocalización aroB/BrdU, excepto en nucleos alargados que forman pequeños clusters (Fig 48 E, G).

En la ZP del epítalamo (ZPEp) los núcleos proliferativos de morfología alargada no presentaron señal positiva a aroB pero sí hubo núcleos proliferativos ovalados y esferoides que presentaron inmunorreactividad (Fig 48 F).

En la ZP del hipotálamo ventral (ZPH) los núcleos proliferativos presentaron inmunorreactividad para aroB excepto aquellos que presentaron morfología alargada (Fig 48 J). En la ZP del tubérculo posterior (ZPTP) se localizaron núcleos BrdU positivos que colocalizan con aroB y algunos que no, estos últimos en general presentaron morfología alargada (Fig 48 H).

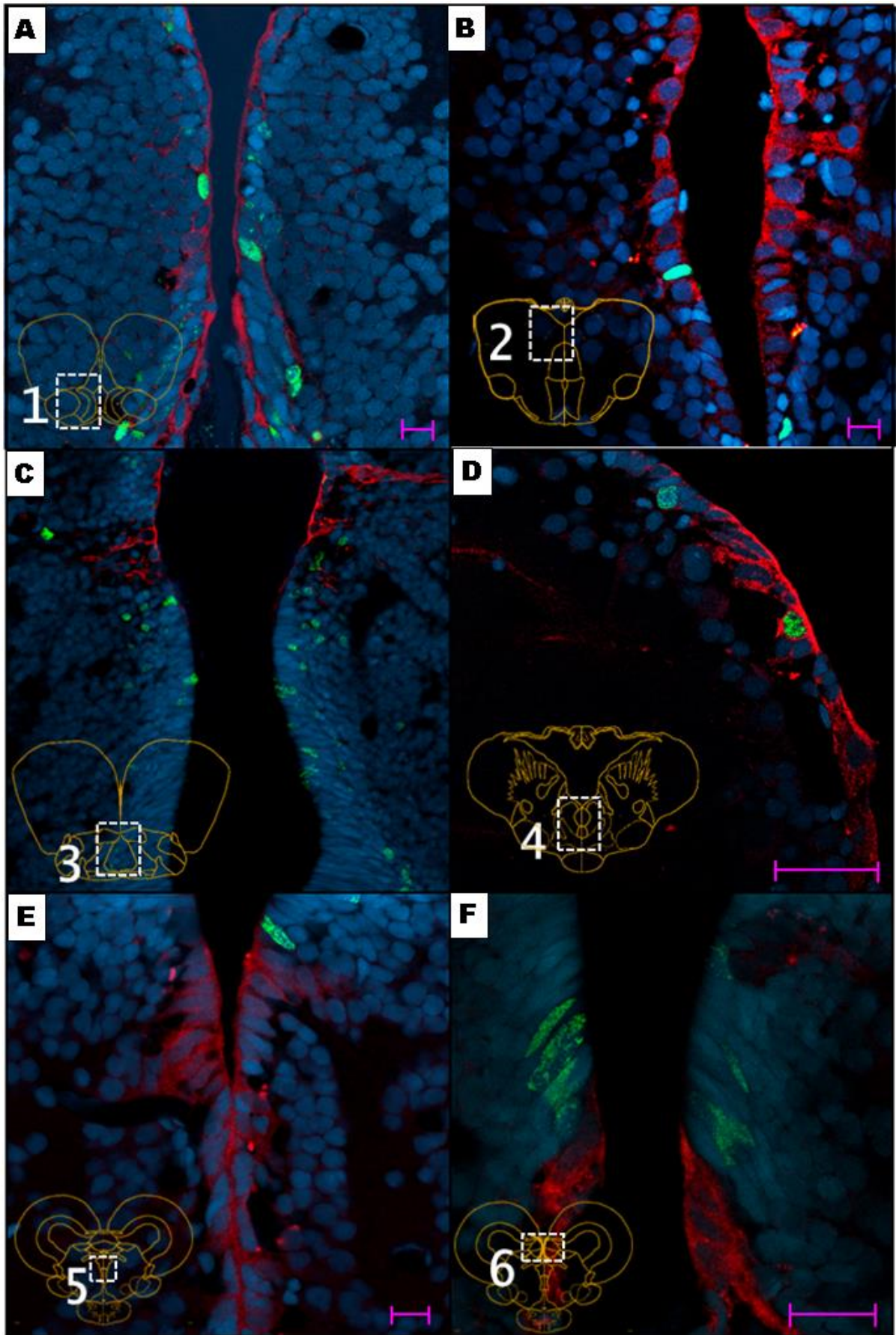


Figura 48. Presencia de aroB en las 20 ZP del encéfalo adulto de *A. charrua*. En rojo se muestra la señal aroB positiva, en verde la señal BrdU positiva y en azul la contraindicación con DAPI. Barras=20μm

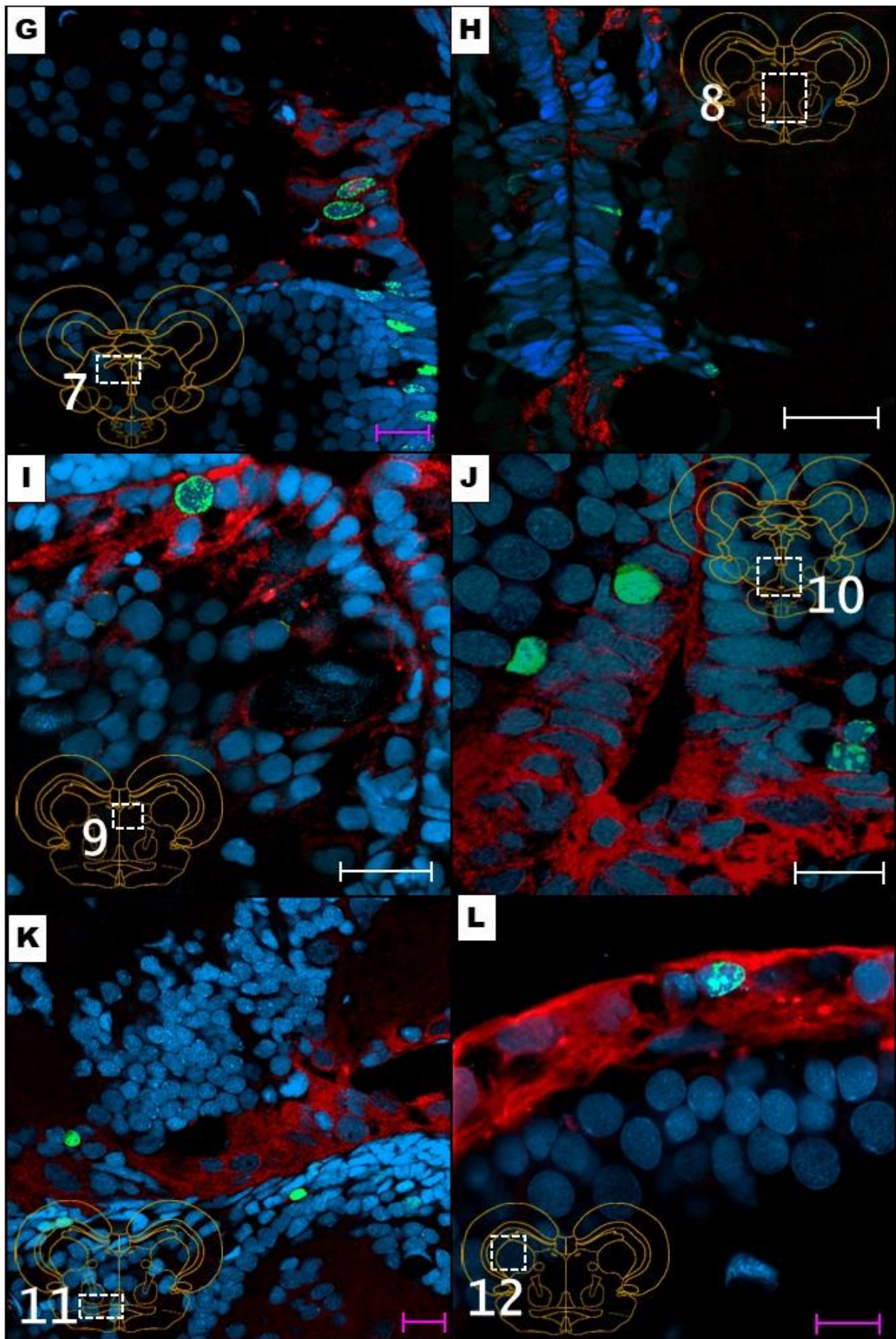


Figura 48 continuación

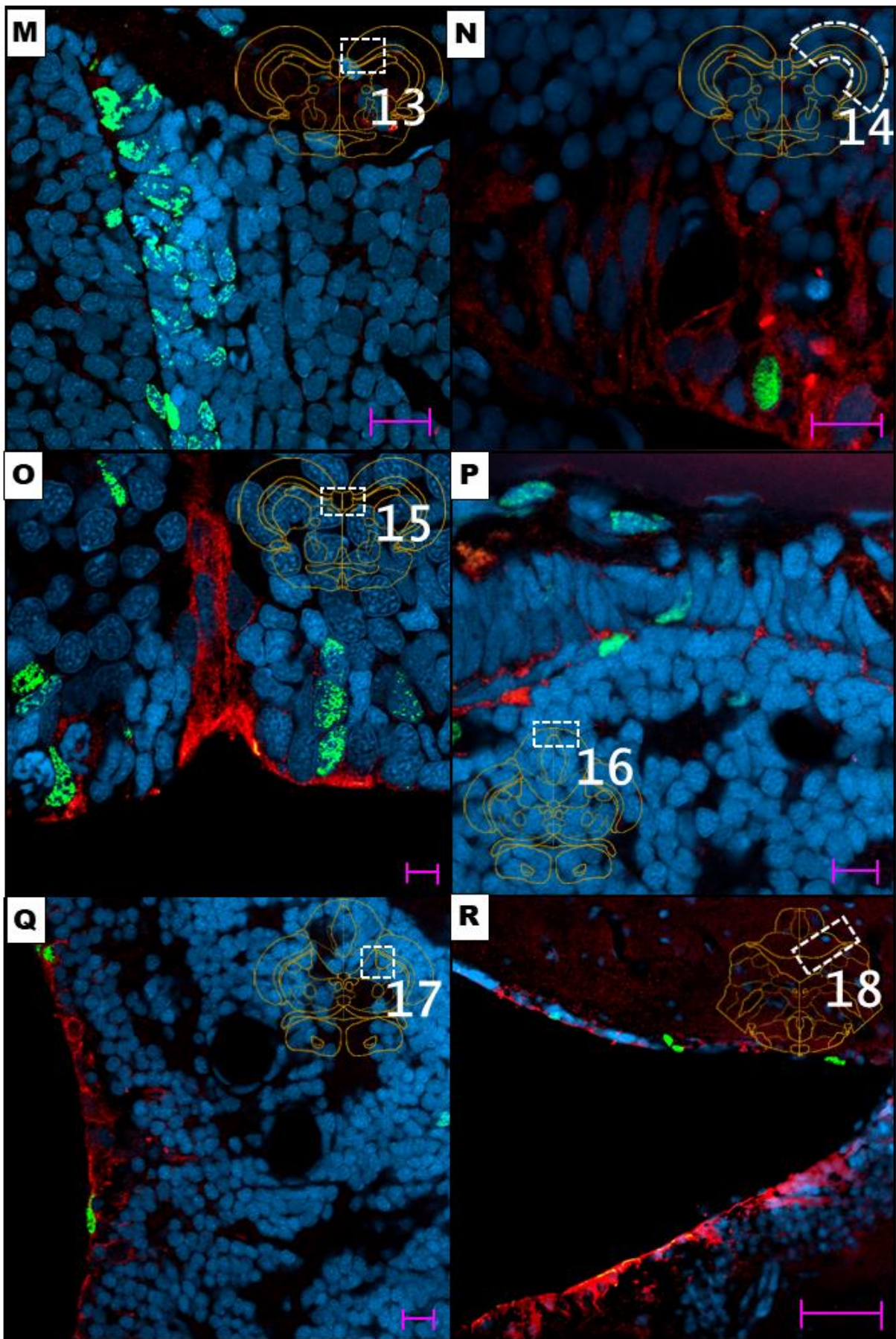


Figura 48 continuación

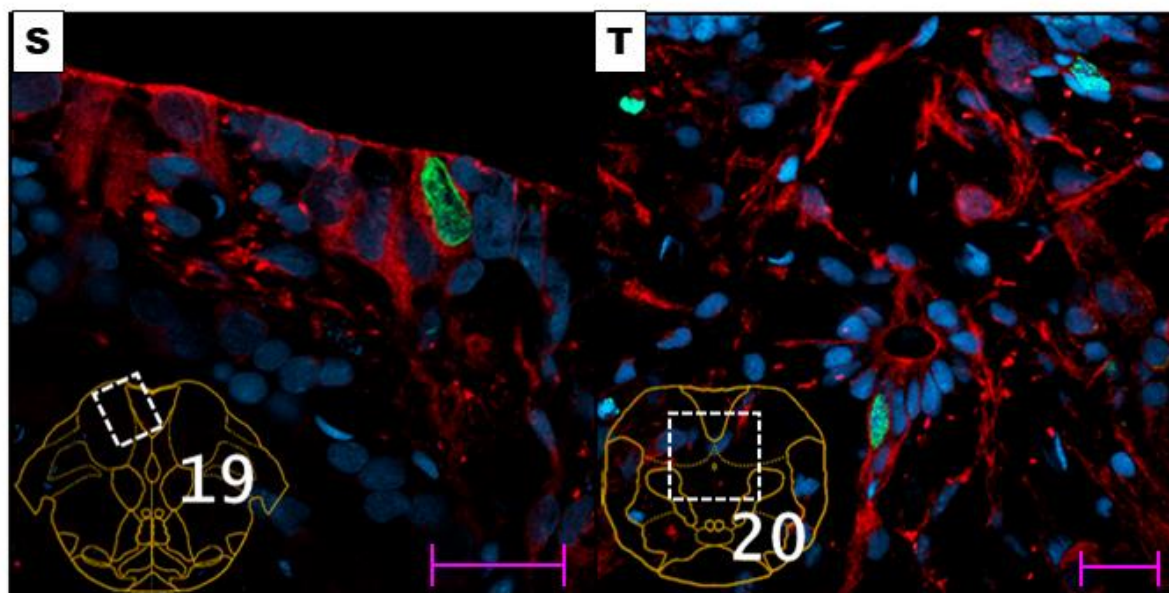


Figura 48 continuación

En la ZP del sinencéfalo (ZPS) todos los núcleos proliferativos encontrados presentaron inmunorreactividad para aroB (Fig 48 I). En la ZP del receso diencefálico posterior y lateral (ZPRPL) las GR aroB positivas se presentaron abundantes en la pared ventral y algunas presentaron núcleos BrdU positivos (Fig 48 K). En la pared dorsal se detectó muy poca señal de aromatasa y algunos núcleos proliferativos colocalizan con ésta pero los proliferativos que presentaron morfología alargada no pertenecen a células inmunorreactivas para aroB (Fig 48 K).

En el mesencéfalo la mayoría de las ZP presentan inmunorreactividad para aroB y las que no, están en regiones aledañas a otras que presentan positividad a la aromatasa. En la ZP marginal tectal (ZPMT) que presenta en su región dorsal y ventral gran cantidad de núcleos proliferativos alargados, no presentó inmunorreactividad para aroB asociada a éstos aunque en la vecindad hubo presencia de células aromatasa positivas (Fig 48 M). En la ZP granular periventricular (ZPGP) del tectum óptico todos los núcleos proliferativos presentaron inmunorreactividad para aroB (Fig 48 N). En la ZP del *torus longitudinalis* (ZPTL) la mayoría de los núcleos proliferativos son positivos a aroB excepto algunos que se registraron fuera de la ZV (Fig 20 O). En la ZP tegmento-semicircularis (ZPT-S) tanto en la parte tegmental como en el *torus semicircularis* todos los núcleos proliferativos presentaron inmunorreactividad a aroB (Fig 48 L).

En el metencéfalo todas las regiones presentaron células aromatasa positivas las cuales algunas son proliferativas y otras no, pero siempre en estrecho vínculo con

las inmunorreactivas para aroB. La ZP de la valvula cerebelli (ZPVC) todas las células proliferativas presentaron colocación con aroB (Fig 48 Q), mientras que en la ZP del lóbulo caudal (ZPLC) presentaron algunos núcleos proliferativos positivos a la aromatasa y otros no (Fig 48 R). En la ZP asociada al CR (ZPRC) las células proliferativas del lado granular presentaron positividad para la aromatasa mientras que las del lado molecular algunas fueron positivas para la aromatasa y otras no, siendo estas últimas con núcleos de morfología alargadas en su mayoría (Fig 48 P).

En las ZP del mielencéfalo también se localizan células aroB positivas. En la ZP rombencefálica medular (ZPRM) asociada a las paredes ventriculares del cuarto ventrículo la mayoría de las células proliferativas presentaron inmunorreactividad para aroB, excepto algunas que presentaron núcleos con morfología alargada (Fig 48 S). En la ZP del canal central (ZPCC) presenta muchas células positivas a la aromatasa que pertenecen a la pared endimaria siendo muchas de éstas positivas al BrdU (Fig 48 T).

Este análisis revela que las células proliferativas son aromatasa positivas cuando presenta núcleos proliferativos que no son alargados, si bien éstos siempre estuvieron en la vecindad de células inmunorreactivas para aroB.

Discusión

En este capítulo se analizó mediante distintas técnicas la secuencia, estructura y distribución neuroanatómica de aroB en el encéfalo de *A. charrua*. A pesar de que diversos estudios en varias especies de peces teleósteos han demostrado la presencia de aroB y su alta expresión y alta actividad enzimática a nivel del sistema nervioso central, fue necesario recurrir a una validación génica y localización en el encéfalo de *A. charrua*. Se utilizó un anticuerpo primario heterólogo elevado contra la proteína de *D. rerio*, previa validación del extremo C-terminal contra el cual fue elevado. El extremo C-terminal de la aroB de *A. charrua* presentó un alto nivel de conservación (90%) cuando se lo comparó al extremo C-terminal de la aroB de *D. rerio*, es por ello que decidimos usarlo para evaluar la expresión de la proteína en el sistema nervioso central de *A. charrua*.

El uso de este anticuerpo heterólogo mostró una buena intensidad de señal, aunque en los casos donde se realizaron tratamientos ácidos para la exposición de los epítopes de BrdU, la señal estuvo un poco disminuida, sobre todo en la proyección radial. En estos casos la señal se mostró más restringida a localizaciones celulares donde la señal tiende a ser más intensa, como en el soma celular, particularmente a nivel apical, en la región más próxima a la pared ventricular.

Expresión de la aromatasa y filogenia

El análisis *in silico* reveló la presencia de dos isoformas de aromatasa que concuerda con lo observado en otros teleósteos tales como en *C. auratus*, *O. mykiss*, *D. rerio*, *O. niloticus*, *D. labrax*, *Halichoeres tenuispinis*, *Fundulus heteroclitus*, *Odontestes bonariensis*, *Epinephelus coioides* y *Monopterus albus* (Tchoudakova y Callard, 1998; Blazquez y Piferrer, 2004; Chiang *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2001; Kishida y Callard, 2001; Valle *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Estas dos isoformas no han sido reportadas para los anguílidos (Elopomorpha) ya que presentan un único gen que codifica una aromatasa (Ijiri *et al.*, 2003; Tzchori *et al.*, 2004), y se piensa que esto es debido a una pérdida de la segunda copia del gen inmediatamente después de la 3R (Jeng *et al.*, 2012). El porcentaje de similitud de aroB de *A. charrua* fue elevado con las de otros

teleósteos. Además, fue alto con la aromatasa placentar humana, lo que permitió el modelado tridimensional de las aromatasas, ya que presenta un patrón conformacional similar al de otros modelos de proteínas *CYP19* (Graham-Lorence *et al.*, 1995). El extremo C-terminal de la molécula presenta una conservación de las secuencias de aminoácidos entre los distintos P-450s mayor que la región N-terminal (Graham y Peterson, 1999). El árbol filogenético fue concluyente con estas isoformas que las separó junto con las de los demás teleósteos. La separación de la aromatasa de *L. oculatus* del grupo de aromatasas de teleósteos está relacionado con el evento de 3R ocurrido en estos últimos y no en el primero, considerado como una rama temprana con historia evolutiva independiente a los teleósteos. Esto correspondería con la teoría de la duplicación de los genes en peces teleósteos provenientes de la duplicación completa del genoma ocurrida hace 320-350 millones de años (Glasauer y Neuhauss, 2014; Steinke *et al.*, 2006). Esta 3R (tercera duplicación completa del genoma) dio origen a una *aroB* y por lo menos uno o dos loci *aroA*, generando líneas evolutivas diferentes por las cuales se generó especificidad tisular cerebral y gonadal, así como variaciones estructurales de la proteína sin perder su función estrogénica. En estudios de cinética enzimática de *aroA* y *aroB* realizados en otros teleósteos, se determinó que la afinidad (K_m) por el sustrato es la misma para ambas, pero la velocidad de reacción (V_m) es mayor en *aroB* (Zhao *et al.*, 2001). La separación del grupo externo sarcopterigio, a pesar de estar comparando genes similares, es congruente con la filogenia de los vertebrados y estos animales poseen un único gen de aromatasa que se expresa tanto en gónadas y en encéfalo, como en otros tejidos (Simpson *et al.*, 1994).

Localización de *aroB* en el encéfalo adulto e identificación de estirpe celular

Desde el descubrimiento por parte de Gloria Callard y sus colaboradores de que en el encéfalo de teleósteos ocurre una gran producción de estrógenos por aromatización de andrógenos (Callard *et al.*, 1979) y que ésta es entre cien y mil veces superior que en otros vertebrados (Callard *et al.*, 1986; Pasmanik y Callard, 1985; Pasmanik y Callard, 1988), los peces han sido utilizados como modelo para estudios tanto bioquímicos como anatomo-funcionales sobre la aromatasa y los estrógenos. En este estudio se realizó por primera vez un mapeo completo de la

localización de la enzima aromatasa en el encéfalo de un pez anual como lo es *A. charrua*. Esta enzima se observó distribuida en todas las regiones encefálicas a nivel de las paredes ventriculares, localizada mayoritariamente en la glía radial que se determinó por morfología y por la coexpresión con vimentina y la presencia de actividad diaforasa. Se sabe que en *P. notatus*, *O. mykiss* y *D. rerio* (Forlano et al., 2001; Menuet et al., 2005; Menuet et al., 2007), la proteína aroB solo se expresa en células que se asemejan a las células gliales radiales. El patrón de distribución ventricular o subventricular coincide con los de otras especies de teleósteos estudiadas en las cuales también se identificó la aromatasa en las tres grandes divisiones encefálicas (Goto-Kazeto et al., 2004; Pellegrini et al., 2007; Menuet et al., 2003; Marsh et al., 2006; Strobl-Mazzulla et al., 2005; Forlano et al., 2001). En *A. charrua* hay una fuerte reactividad a aroB en el rombencéfalo, lo que contrasta con otros teleósteos como *D. rerio*, *O. mykiss* y *P. notatus* donde los niveles de expresión de aroB disminuyen hacia las estructuras caudales del encéfalo (Goto-Kazeto et al., 2004; Menuet et al., 2003; Forlano et al., 2001).

Si bien *A. charrua* posee células y estructuras aroB positivas que no presentaron morfología característica de GR, en contraste con lo observado en otros teleósteos, gran parte de la señal aroB positiva proviene de la glía radial, lo que es concordante con lo descrito para todos los teleósteos estudiados (Diotel et al., 2010; Forlano et al., 2001; Menuet et al., 2005; Menuet et al., 2003; Pellegrini et al., 2007; Forlano et al., 2005; Jeng et al., Strobl-Mazulla 2010; Okubo et al., 2011). Con los ensayos realizados en esta tesis no podríamos indicar si estas células positivas a aroB pero que no presentan morfología radial tienen o no potencialidad proliferativa. La distribución de aroB parece estar bastante restringida a las paredes ventriculares en las diversas especies de teleósteos estudiadas, si bien existen diferencias inter e intra-específicas. Estas diferencias han sido objeto de reflexión y se han atribuido a consecuencias ecológicas donde algunos autores sugieren que la presencia de aroB en el tectum óptico de los peces diurnos *T. bifasciatum*, *O. mykiss* y *D. rerio* y la ausencia en el pez nocturno *P. notatus*, estaría relacionada a la mayor dependencia a las claves sensoriales que experimentan estas especies (Marsh et al., 2006).

Las detecciones de aroB colocalizando con vimentina y con BrdU muestra una fuerte asociación entre la aromatasa y vimentina con la proliferación de células gliales radiales en el encéfalo adulto de estos peces, como ha sido reportado en otros teleósteos (Forlano et al., 2001; Diotel et al., 2015). Los datos obtenidos en peces

eléctricos *A. leptorhynchus*, indican que las células recién nacidas pueden migrar a lo largo de los procesos radiales en el encéfalo de los peces adultos (Clint y Zupanc, 2001).

Las GR aroB positivas presentaron gran heterogeneidad morfológica, observada sobre todo a nivel de la morfología nuclear y de su proximidad a la luz ventricular, que permitió distinguir al menos dos formas diferentes, GR1 y GR2. Esto podría suponer diferentes estados funcionales en los que la célula podría estar en G0 o en ciclo celular, y dentro de este, la distancia hacia el ventrículo podría corresponder con una migración nuclear intercinética (Kosodo *et al.*, 2012; Lindsey *et al.*, 2018). Tal heterogeneidad de la glía radial se describió previamente en los mamíferos y actualmente no se comprende completamente (Pinto y Gotz, 2007). Esta heterogeneidad podría deberse a las distintas propiedades neurogénicas frente a las gliogénicas, a la tasa de proliferación (a largo plazo ya corto plazo, a la renovación automática) o también a propiedades regenerativas distintas.

Asimismo, no se detectó colocalización de aroB con el marcador neuronal, revelando que la estirpe productora de estrógeno es únicamente la glía radial como se ha establecido para todos los teleósteos estudiados hasta el momento (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003; Menuet *et al.*, 2005). En mamíferos en cambio, la expresión de la aromatasa en estadios adultos se presenta en las neuronas (Beyer *et al.*, 1994; Jakab *et al.*, 1994; Hojo *et al.*, 2008; Yague *et al.*, 2006, 2008; Takahashi *et al.*, 2006; Biegón *et al.*, 2010).

Finalmente, no se observaron diferencias obvias en el patrón de distribución de aroB entre sexos, utilizando el análisis de inmunodetección de aroB. En algunas especies de teleósteos como *P. notatus* se ha reportado expresión sexualmente dimórfica a nivel del núcleo motor sónico, donde el macho presenta expresión y no así la hembra (Forlano *et al.*, 2001). Esto está relacionado con la utilización del macho de este centro durante el comportamiento vocalizador en el cortejo (Forlano *et al.*, 2001).

Colocalización de aroB con NADPHd

Como se ha visto anteriormente el complejo aromatasa está compuesto por la aromatasa propiamente dicha y por la reductasa con actividad diaforasa. La

cooperación entre estas dos enzimas conlleva a la producción efectiva de estrógenos, a partir de andrógenos. Por tanto, poder colocalizarlas dentro de una célula estaría implicando que ambas enzimas estén presentes en ellas y con una conformación funcional. La antigüedad de la NOS se ha confirmado al observarse la formación de NO en hemocitos de un crustáceo encontrado en la pezuña del caballo, el *Limulus polyphemus*, que puede considerarse una reliquia de la evolución filogenética. Dentro del grupo de los mamíferos sólo se ha encontrado una enzima que emplee el mismo sistema de transporte electrónico que la NOS, la citocromo P-450 reductasa. Parece probable que el proceso evolutivo de la enzima citocromo P-450 reductasa donase electrones a la NOS y en algún momento ambas enzimas se fusionaron (Revisado en de Artiñano y Mateo, 2000). Se han purificado, clonado y caracterizado tres isoformas de la NOS: dos de ellas son constitutivas (cNOS) y la tercera es inducible (iNOS). Las cNOS se aislaron originariamente en el cerebro (bNOS, nNOS o isoforma I) y en el endotelio (eNOS o isoforma III), respectivamente. Estas proteínas son dímeros activos que contienen lugares de unión para la L-arginina, el grupo hemo y la tetrahidrobiopterina (BH₄) en la porción N-terminal (dominio con actividad oxigenasa). En la cNOS hay además un lugar para la fosforilación por la proteína Kinasa adenisín monofosfato cíclico (AMP-c)-dependiente en la porción N-terminal. Existe asimismo un lugar de unión a la calmodulina en la parte media, y unas secuencias de unión al Fad, FMN y NADPH en la porción C-terminal (dominio con actividad reductasa). Esta porción C-terminal posee actividad NADPHd que sirve para la localización tisular de la enzima. Los lugares de unión a las flavinas y al NADPH están situados entre los aminoácidos 532 y 1444 en la iNOS de ratón, y en regiones homólogas en las otras isoformas, mostrando una estructura similar a la de la enzima NADPH-citocromo P450-reductasa (CPR) (Fig 49 A). Ambas enzimas transfieren electrones del NADPH a un grupo hemo endógeno o a una hemoproteína y en ambas el hemo está coordinado axialmente mediante un grupo cisteína-tiolato. En la síntesis de estrógenos actúa el complejo aromatasa-CPR estabilizados por interacciones hidrofóbicas de los dominios intramembrana (Fig 49 B) e interacciones electrostáticas por residuos positivos y negativos en el dominio citosólico (Hong *et al.*, 2011). Es probable que la actividad NADPHd provenientes de las GR sea producto de la CPR, localizada junto con la aromatasa formando ese complejo y que la actividad reductasa se mantenga activa en los cerebros frescos recién fijados, pudiendo lograr las tinciones. En presencia de NADPH, la CPR podría generar una reducción del nitroblue tetrazolium, generando el precipitado azul *in situ* (Fig 49 B). Esto puede

significar una fuerte relación funcional entre ambas enzimas que están presentes en GR, suponiendo un completo potencial estrogénico.

En el bulbo olfatorio de mamíferos se han descrito células NADPHd positivas caracterizadas como neuronas y confirmadas por inmunolocalización de nNOS, sin embargo existen otras células con actividad diaforasa, que no presentaron inmunorreactividad, sugiriendo que otra enzima con actividad oxigenasa/reductasa podría estar generando la reacción necesaria para la tinción (Briñón *et al.*, 1998).

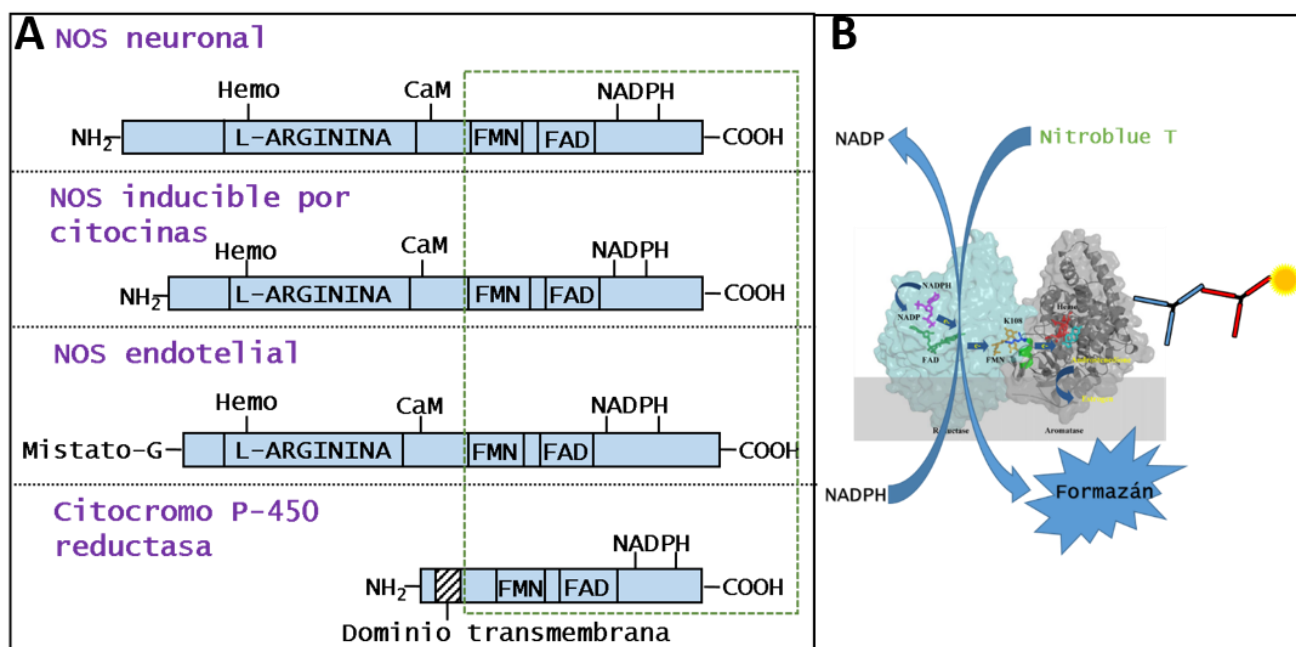


Figura 49. Hipótesis sobre la tinción de NADPHd en las GR. En A se muestra el dominio con actividad diaforasa en común con las NOS (cuadro punteado verde). EN B se muestra el esquema de reacción del nitroblue terazolium para la formación de formazán por parte de la CPR y a la unión de anticuerpos primarios y secundarios con la aromatasa.

Distribución de aroB en estructuras encefálicas y su relación con las ZP

En el telencéfalo de diferentes teleosteos las GR han sido bien descritas en la ZV, presentando la morfología característica de GR cuyo soma está ubicado próximo o en la pared ventricular y presenta una proyección radial que atraviesa el parénquima nervioso (Diotel 2015; Bentivoglio y Mazzarello, 1999; Rakic, 1978; Stevenson y Yoon, 1982). Estas glías revisten el telencéfalo dorsal evertido de *A. charrua* tanto a nivel medial como dorso-lateral, acompañando toda la superficie endimaria

como se ha descrito en *P. notatus* y *D. rerio* (Forlano *et al.*, 2001). Se vio que la señal positiva a aroB se localizó en mayor parte en GR pero también en otras estructuras que no presentan morfología de GR. En otros teleósteos estudiados, la expresión de aroB no se restringió a las GR (Diotel *et al.*, 2010), sino que se ha podido confirmar la existencia en células germinales del ovario (Caulier *et al.*, 2015) y testículo (Caulier *et al.*, 2015; Hinfrey *et al.*, 2013). Por otra parte, en *A. charrua* se localizó una fuerte intensidad de inmunolocalización a nivel de la hipófisis, donde se ha visto recientemente que aroB en *M. albus* se expresa en células gonadotropas sintetizadoras de hormona luteinizante (LH) (Zhang *et al.*, 2014).

La señal positiva localizada en los glomérulos olfatorios no ha sido descrita en otros teleósteos estudiados y ésta probablemente provenga de células cuyo soma esté en el epitelio olfatorio debido a que el nervio olfatorio es intensamente inmunorreactivo a aroB. En cortes realizados del epitelio olfatorio de *A. charrua* hemos detectado inmunolocalización de aroB, pero no se ha identificado la estirpe celular (Datos no publicados). En *D. Rerio*, en esta capa localizaron gran expresión de BLBP (marcador glial) pero lo han asociado a los pies basales de la glía radial que contactan con la superficie pial (Diotel *et al.*, 2015). La expresión de aroB en los glomérulos olfatorios observada en *A. charrua* la convierte en una interesante perspectiva de investigación para conocer si la señal proviene de neuronas aferentes primarias o de glía que acompañan los axones hasta los glomérulos olfativos.

En las ZP del bulbo olfatorio y de los lóbulos telencefálicos (ZPOB; ZPTD) dorsales o *pallium* hubo una fuerte colocalización entre núcleos proliferantes BrdU+ con GR1 y GR2 aroB+, sugiriendo una gran capacidad proliferativa de estas células en estas regiones. Esto concuerda con lo descrito en otros teleósteos estudiados como *D. rerio* (Diotel *et al.*, 2015) y con lo observado en *A. charrua* utilizando otros marcadores gliales, donde se constató alta heterogeneidad de la glía radial y gran capacidad proliferativa (Rosillo *et al.*, 2016).

La ausencia de señal aroB en gran parte de la ZP de los lóbulos telencefálicos ventrales (ZPTV) donde se localizaron núcleos proliferativos alargados, corresponde a una región que posee gran proliferación y se denomina banda migratoria rostral. En esta región que no se observaron células aromatasa positivas con morfología de glía radial en *A. charrua*, tampoco se han encontrado estas células en otros peces

y esta contiene progenitores denominados NE (März *et al.*, 2010; Diotel *et al.*, 2015; Lindsey *et al.*, 2018).

En el diencefalo la gran cantidad de señal aroB positiva presente a nivel ventricular de todas las regiones encefálicas asociadas al tercer ventrículo. Esto último coincide con lo descrito para *P. notatus* (Forlano *et al.*, 2001) y en *D. rerio* donde en algunos lugares como el área preóptica anterior e hipotálamo ventral, la señal aroB cubre totalmente la superficie ventricular sin interrupción (Menuet *et al.*, 2005). Como se ha dicho anteriormente, a nivel diencefálico la localización de aroB presentó en la hipófisis una gran inmunorreactividad, compatible con estudios realizados en *M. albus* (Zhang *et al.*, 2014).

En adición a la intensa marcación de aroB en el área preóptica, en la ZP de esta, también hubo gran cantidad de núcleos BrdU+, lo que sugiere que esta región encargada del procesamiento de comportamiento social y reproductivo (entre otros), está en activa neurogénesis y por lo tanto plasticidad y/o recambio neuronal. Las ZP talámicas, epitalámicas, e hipotalámicas (ZPTID, ZPTIV, ZPEp, ZPH, ZPTP, ZPS, ZPRPL) también presentaron gran cantidad de GR aroB positivas en activa proliferación. A diferencia de lo que ocurre en otros teleósteos estudiados, en estas ZP también se encontraron abundantes células proliferantes con núcleos alargados que pueden corresponder a las células NE, características de otras ZP (März *et al.*, 2010; Diotel *et al.*, 2015; Lindsey *et al.*, 2018). Esto posiciona a *A. charrua* adulto como un teleósteo que posee una gran capacidad para retener células NE desde el estadio embrionario, en diversas regiones encefálicas.

A nivel del mesencéfalo también se encontraron células positivas para aroB en el *torus semicircularis*, en el tectum óptico, en el tegmentum del encéfalo medio y alrededor del ventrículo rombencefálico como en todas las paredes ventriculares tectales como se ha reportado en *D. rerio* tanto en localización del ARNm (Goto-Kazeto *et al.*, 2004) como la proteína (Menuet *et al.*, 2005). De manera similar en *O. mykiss* se detectaron células que expresan ARNm de aroB y células inmunorreactivas aroB en el tectum óptico y el *torus semicircularis* (Menuet *et al.*, 2003). Sin embargo, en estas regiones del encéfalo, el número de células positivas fue mucho menor que en el encéfalo anterior. La localización de la glía radial aroB positiva en tectum óptico y *torus semicircularis* no se ha reportado en teleósteos como *P. notatus* donde no tuvo inmunorreactividad en estas regiones (Forlano *et al.*, 2001).

En las ZP marginales tectales (ZPMT) tanto en la región dorsal como ventral se observaron núcleos proliferativos de morfología alargada que no presentaron inmunorreactividad para aroB, coincidiendo con células no gliales descritas en otros teleósteos (März *et al.*, 2010; Diotel *et al.*, 2015; Lindsey *et al.*, 2018). Las células BrdU positivas presentes en las ZP del tectum óptico lindante con el ventrículo tectal (ZPGP) así como las ZP del *torus longitudinalis* (ZPTL) y *semicircularis* (ZPT-S), presentaron únicamente morfologías de GR, posicionando a la glía radial como la principal célula progenitora en estas estructuras mesencefálicas. Esto en particular concordancia con lo establecido en otros peces diurnos en los que se ha relacionado la presencia de aromatasa en el tectum óptico con su modalidad de procesamiento de la información sensorial (Marsh *et al.*, 2006) y, *A. charrua* que es un pez macróptico posiblemente la gran cantidad de aromatasa en esta región y la gran capacidad proliferativa, estén al servicio de la mantención del sistema visual.

En el rombencéfalo localización de la señal aroB tanto en la pared ventricular de la médula oblonga y del canal central a nivel mielencefálico coincide con lo descrito en otros teleósteos (Forlano *et al.*, 2001). Las proyecciones de las células radiales con fuerte marcado con aroB en esta región y que atraviesan todo el parénquima hasta contactar con la superficie pial, coincide con la descrita en otros teleósteos donde también se ha presentado los paquetes de fibras hacia la región ventral y ventro-lateral (Forlano *et al.*, 2001). En los niveles cerebelares también tuvo gran marcación de aroB en la ZV o derivadas de ventrículos (CR) la que no se ha reportado para otros teleósteos (Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Menuet *et al.*, 2003; Forlano *et al.*, 2001) y posiciona a *A. charrua* como un teleósteo con una gran expresión de aroB en todo el eje rostro-caudal del encéfalo.

La formación coroidea anterior (saco dorsal) que proyecta hacia el ventrículo telencefálico y la FCP del cuarto ventrículo presentan una intensa inmunorreactividad, por lo que se puede asociar a la producción de neuroestrógenos que se liberen hacia el líquido cefalorraquídeo pudiendo tener blancos distantes de la zona de producción.

Sumada a la gran inmunorreactividad de la aromatasa a nivel rombencefálico, se ha determinado una gran proliferación en la ZV tanto en válvula cerebelli (ZPVC), lóbulo caudal (ZPLC), algunas en el CR (ZPRC), en médula oblonga a nivel de cuarto ventrículo (ZPRM) y en el canal central (ZPCC), lo que probablemente refleje la importancia que tienen los estrógenos en la actividad proliferativa de estas zonas.

Los núcleos proliferativos alargados negativos para aroB encontrados en la pared dorsal del RC, coinciden con los descritos en otras especies donde se han hecho análisis con otros marcadores y se los han calificado como células NE (Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Menuet *et al.*, 2003; Forlano *et al.*, 2001). Curiosamente, estos progenitores son positivos para nestina pero no expresan marcadores gliales radiales o astrogiales como S100beta, GFAP, vimentina, BLBP o aroB (Kaslin *et al.*, 2009). Esta información sumada a la presentación de núcleos alargados en la parte dorsal, determina que en la parte dorsal haya células NE proliferativas negativas a la aromatasa, aunque se presentan algunas de núcleo esferoide, positivas a aroB y con la morfología característica de GR. La localización de núcleos alargados aroB negativos en zonas ventriculares de la médula oblonga, nos da la pauta de que en *A. charrua*, el mantenimiento de células NE en la vida adulta, se da en todas las regiones encefálicas localizadas en clusters específicos con actividad proliferativa.

Como se ha descrito en la introducción general de esta tesis, los progenitores neurales presentan diferentes jerarquías en función de la capacidad proliferativa. Las células NE son capaces de dar origen a las GR y a su vez a progenitores intermedios y amplificadores, neuroblastos y glioblastos. Por tanto las células NE podrías estar retenidas en el encéfalo de *A. charrua* adulto para cumplir con su rol jerárquico sirviendo a la neurogénesis y manteniendo poblaciones de GR y y otras CMPN con capacidad neurogénica y gliogénica.

Con las diversas técnicas histológicas utilizadas en este capítulo, se logró identificar clusters de células aroB positivas presentes en las paredes ventriculares. En algunos lugares, como el tálamo, esos 'cluster' positivos a la localización de aroB son interrumpidos por espacios negativos para las tinciones de aroB (Fig 50 E), aunque existe proliferación por toda la ZV de esa región. En otras regiones, como el lóbulo telencefálico ventral, la señal positiva para aroB se localiza en una gran área, mientras que otras grandes áreas son negativas, si bien toda esa región a nivel ventricular presenta proliferación celular (Fig 50 A, B, C, D). En un estudio en paralelo a esta tesis, se realizó la inmunodetección de BrdU y BLBP, que es un marcador glial por excelencia, revelando que la región del telencéfalo ventral dorsal, que presenta núcleos proliferativos de morfología redondeada y ovalada, son positivas al BLBP y BrdU, mientras que la región ventral es negativa al BLBP y positiva a BrdU, confirmando la regionalización de los linajes de CPMN. Esto podría estar revelando el aspecto de mosaico de las CPMN presentes en las paredes ventriculares donde existen GR con capacidad proliferativa y estrogénica y en su

vecindad, otros tipos de CPMN (*e.g.* NE) con actividad proliferativa, pero que no expresan aAroB ni los marcadores típicos de GR.

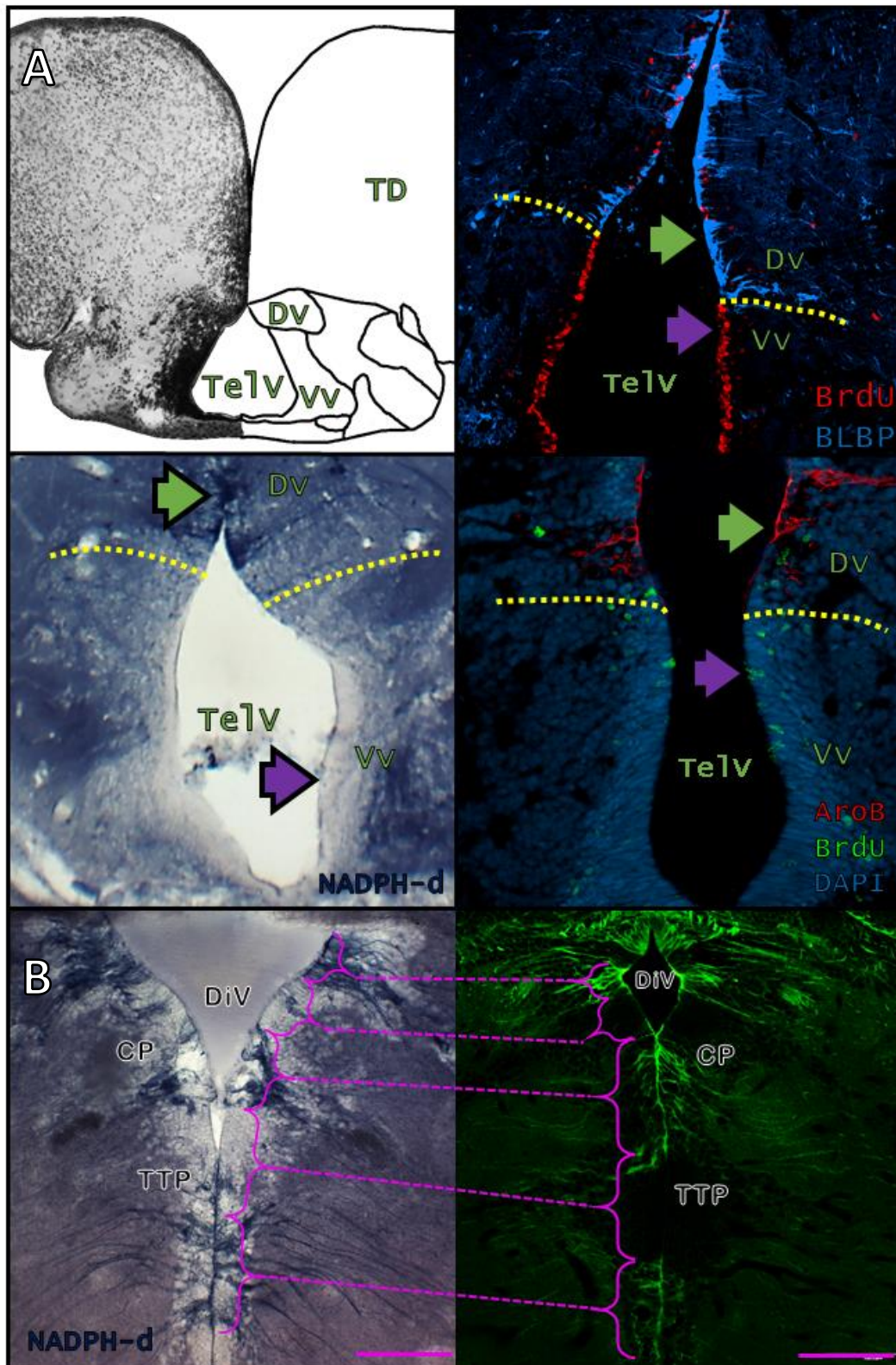
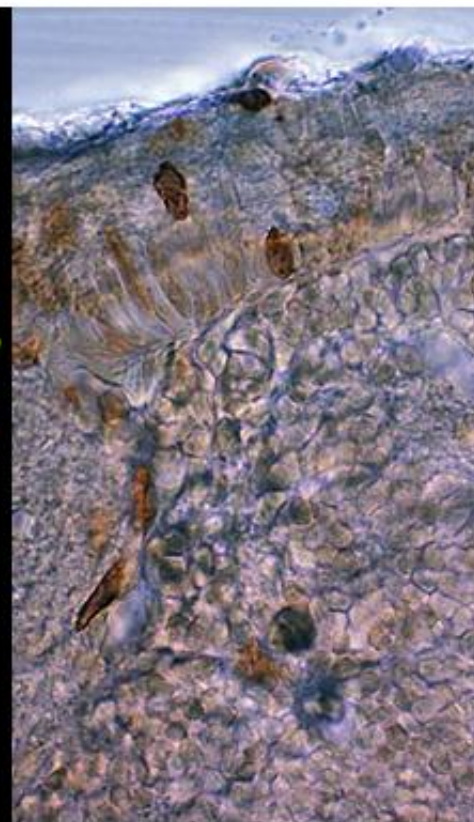
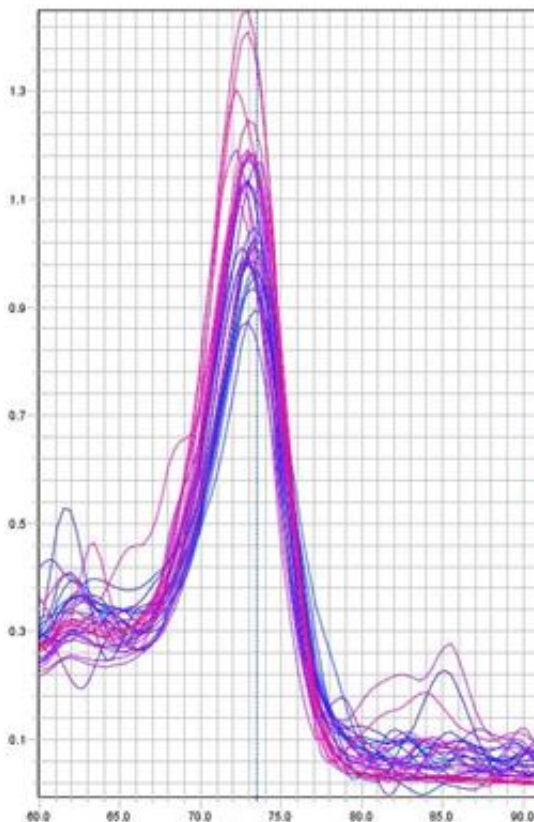


Figura 50. Regionalización de la señal de aroB. En A se muestra cómo el telencéfalo ventral posee una región positiva a diversos marcadores de estirpe glia (AroB, vimentina y NADPHd) | a nivel dorsal mientras que es negativo a nivel ventral. La región ventral se muestra muy proliferativa a pesar de que no existen células gliales radiales. En B se muestra la regionalización de la expresión de marcadores de GR en el tálamo, en la izquierda con la técnica NADPHd y a la derecha mediante inmunolocalización de vimentina.

CAPÍTULO 4

Efectos de un inhibidor de la actividad aromatasa en la proliferación de células madre y progenitoras neurales del encéfalo de *Austrolebias charrua* adulto



“La estabilidad del medio interno es una primera condición para la libertad y la independencia de determinados órganos de la vida en relación con el medio ambiente que les rodea.”

Claude Bernard

Capítulo 4. Efecto de un inhibidor de la actividad aromatasa en la proliferación de células madre y progenitores neurales del encéfalo de *A. charrua* adulto

La neurogénesis en adultos es un proceso complejo y de múltiples etapas regulado por factores intrínsecos y extrínsecos (Hieh, 2012). Entre estos factores, las hormonas, especialmente los estrógenos, ejercen acciones pleiotrópicas que modulan varios aspectos de la neurogénesis, como la proliferación, la diferenciación neuronal y la supervivencia (Brock *et al.*, 2010; Diotel *et al.*, 2013; Galea *et al.*, 2006, 2008; García-Segura, 2008). Estudios previos en peces han propuesto que los estrógenos estarían regulando la neurogénesis en cerebros en desarrollo y adultos (Morris *et al.*, 2004). En peces, se ha descrito la expresión de *cyp19a1b* en la glía radial tanto del cerebro en desarrollo como del cerebro adulto (Tong *et al.*, 2009; Mouriec *et al.*, 2008). En el capítulo anterior hemos mostrado que la distribución de la aromatasa B se corresponde con la glía radial al igual que en otros teleósteos. Según la hipótesis de aromatización del cerebro, los andrógenos se transforman en estrógenos (MacLusky *et al.*, 1981), dada la alta actividad de la aromatasa cerebral y estos serían reguladores de distintas funciones. Una de las funciones propuestas es la regulación de la neurogénesis que se inicia en las zonas de proliferación del encéfalo.

Por lo tanto, para conocer funcionalmente el rol de la aromatasa en las ZP definidas en el capítulo 2, se realizaron ensayos de inhibición de su actividad enzimática con FAD, para contrastar los efectos de ese bloqueo a nivel de la proliferación celular en las ZP.

Luego de realizar los experimentos con FAD como inhibidor de la actividad de la aromatasa, se realizaron las cuantificaciones tanto de los niveles de expresión de *cyp19a1b* mediante qPCR, como de la proliferación celular en las 9 regiones encefálicas elegidas, que se esquematizan en la Fig 51.



Figura 51.- Esquema representativo de las ZP elegidas para la cuantificación de la proliferación celular.

Objetivo

Determinar los posibles efectos de un inhibidor de la actividad enzimática de la aromatasa sobre la proliferación celular en el encéfalo de *A. charrua*

Resultados

Niveles de expresión

Los resultados de los estudios cuantitativos (qPCR) muestran que la *cyp19a1b* presenta una expresión significativamente mayor ($p < 0,05$) en el encéfalo de las hembras respecto del encéfalo de los machos (Fig 52). Por otra parte cuando comparamos los niveles de expresión en los controles respecto de los tratamientos con FAD (Fig 52), no observamos diferencias significativas.

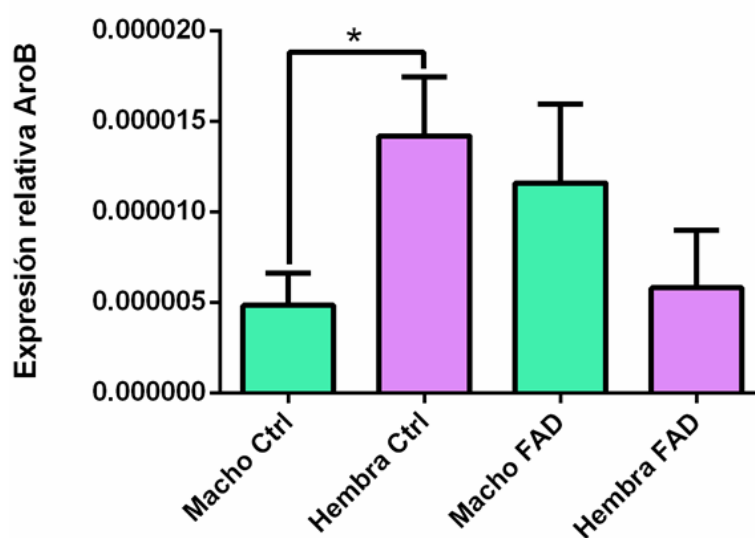


Figura 52. Niveles de expresión de ARNm de aroB en los controles y tratamientos con FAD. La hembra presenta mayor expresión que los machos ($p < 0,05$) en condiciones basales mientras que los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas significativas respecto los machos ($p < 0,05$). Cada grupo experimental cuenta con 6 animales.

Actividad proliferativa global

Se eligieron nueve regiones con actividad proliferativa representativas de todas las divisiones encefálicas en las que se cuantificaron los núcleos proliferativos y se estimaron las tasas proliferativas de los tratamientos y los controles con FAD (Fig 53).



Figura 51. Efectos del FAD en la proliferación celular. Se muestran las imágenes obtenidas de los cortes de encéfalo en los que se detectó el BrdU mediante inmunohistoquímica, en las 9 regiones estudiadas: Bulbo

olfatorio (A), lóbulos telencefálicos (B), POA (C), hipotálamo ventral (D), *torus longitudinalis* (E), tectum óptico (F), *torus semicircularis* (G), *corpus cerebelli* (H), médula oblonga (I).

El análisis de las tasas proliferativas que compara las distintas regiones elegidas muestra que tanto para machos como para hembras el *torus longitudinalis* presenta una tasa de proliferación significativamente mayor ($p < 0.05$) que el resto de las áreas (Fig 54; Fig 55). Los tratamientos con FAD mostraron que hubo una respuesta diferencial entre machos y hembras. En los machos tratados con FAD, la tasa de proliferación fue radical y significativamente menor ($p < 0,05$) que en los machos control para todas las áreas estudiadas y la diferencia estadística entre el *torus longitudinalis* y las demás áreas se mantuvo. En las hembras la aplicación de FAD no generó menores tasas de proliferación, excepto en el bulbo olfatorio, tectum óptico y *torus longitudinalis* donde hubo una respuesta opuesta de la observada en los machos mayor proliferación ($p < 0.05$; Fig 54).

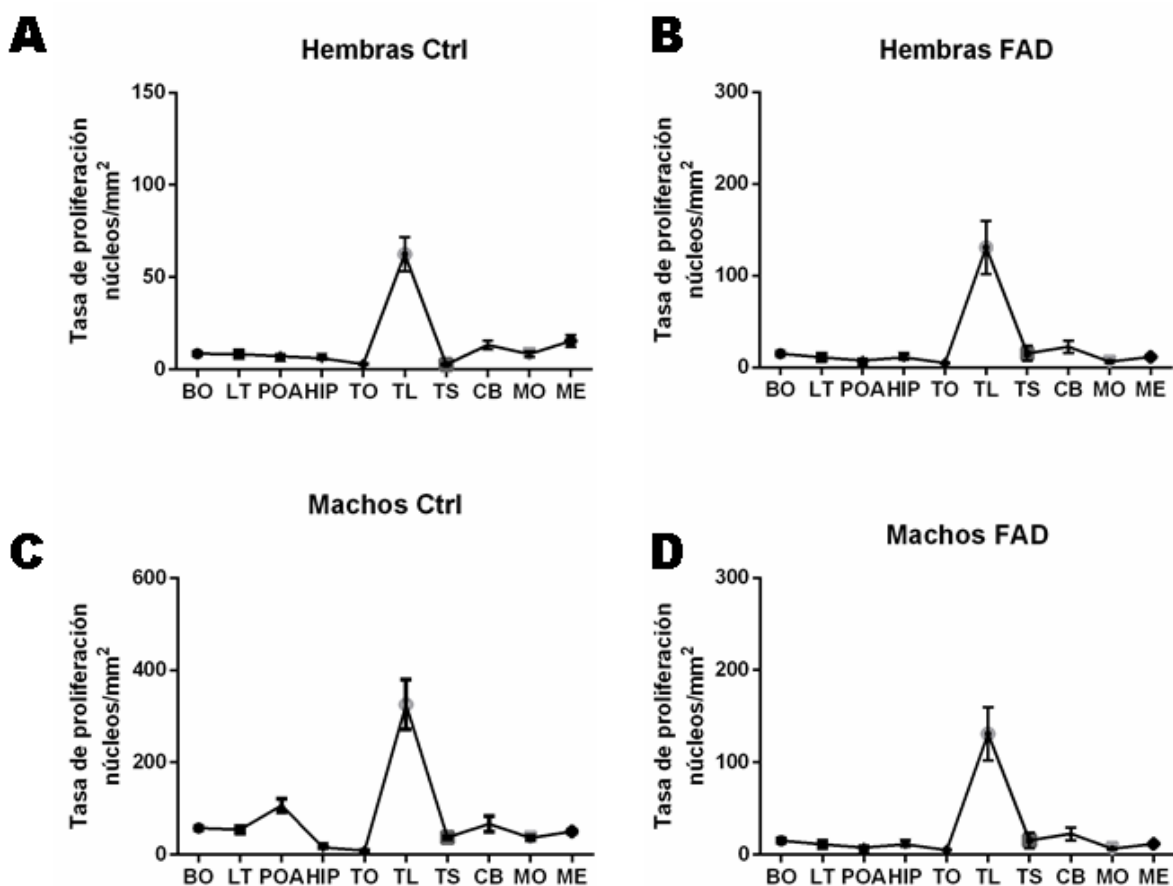


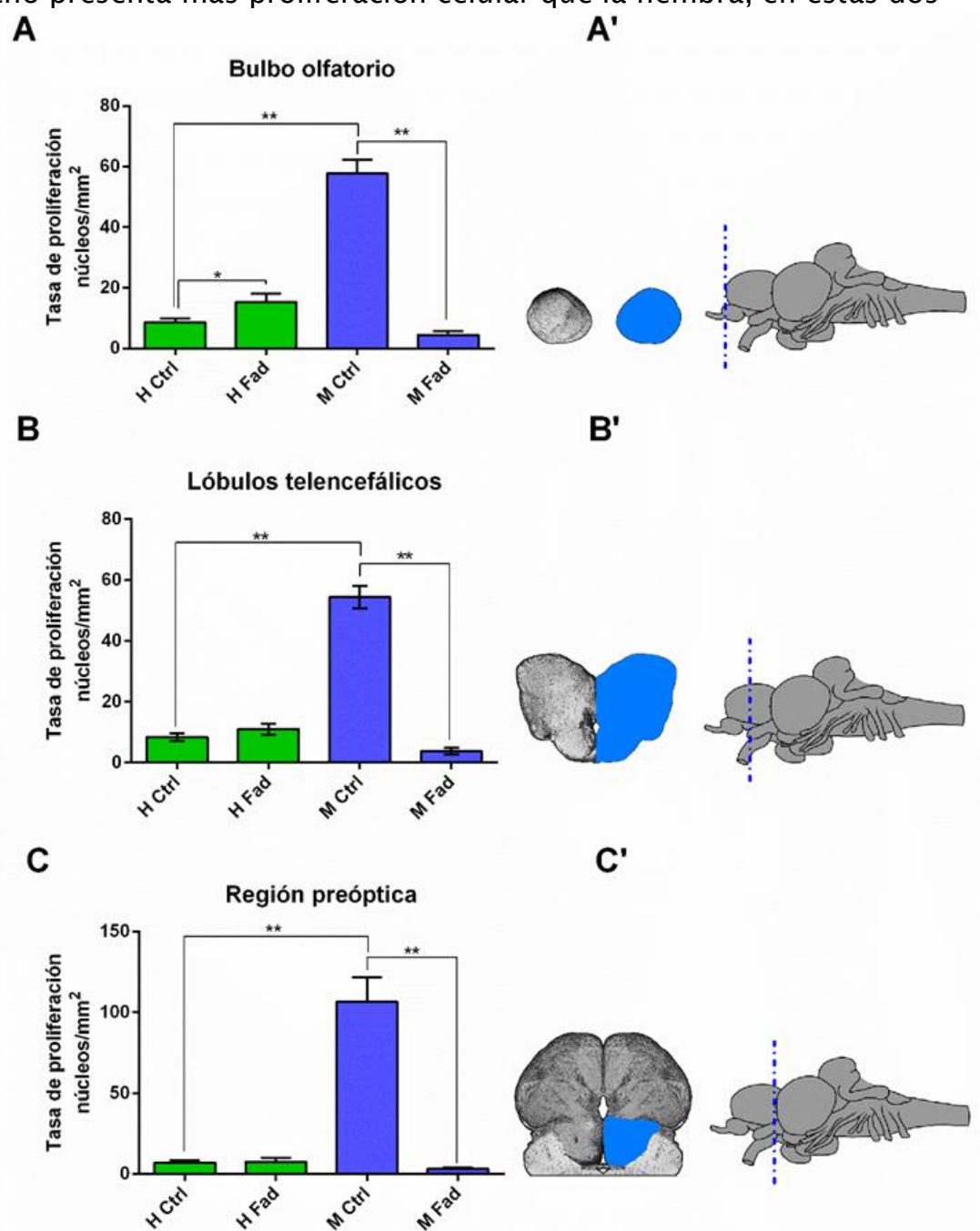
Figura 52. Tasas proliferativas de las nueve zonas estudiadas. Vemos que el *torus longitudinalis* es la zona con mayor proliferación por unidad de área, y que en los tratamientos con FAD este patrón no se modifica, si bien las tasas proliferativas son menores en los tratamientos respecto los controles.

Actividad proliferativa en el telencéfalo

En el telencéfalo fueron analizadas las regiones del bulbo olfatorio entero y de los hemisferios telencefálicos en la región entre el bulbo olfatorio y el área preóptica abarcando tanto el área dorsal como ventral. En el bulbo olfatorio y lóbulos telencefálicos de machos, la aplicación del FAD generó tasas de proliferación radicalmente menor ($p < 0,05$) respecto del control (Fig 55 A, B). En cambio, en las hembras el FAD indujo en el bulbo olfatorio tasas proliferativas mayores ($p < 0,05$) respecto a los controles, no constatándose diferencias significativas para los lóbulos telencefálicos (Fig 55 A, B). A su vez se observó que en las situaciones controles el macho presenta más proliferación celular que la hembra, en estas dos regiones

telencefálicas analizadas (Fig 55 A, B).

Figura 55. Tasas proliferativas de los controles versus tratamientos con FAD en encéfalos de machos y hembras de *A. charrua*.



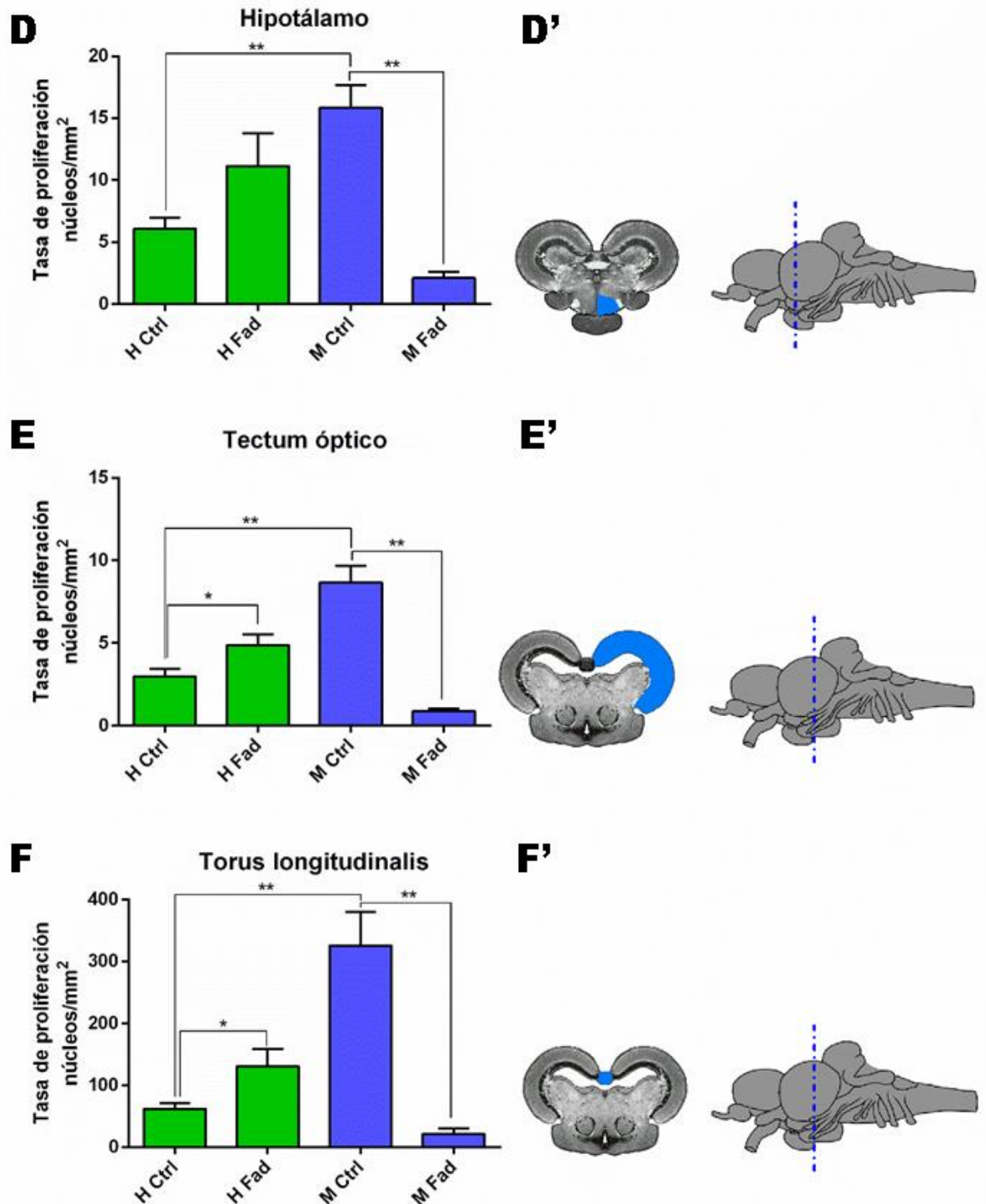


Figura 55 continuación

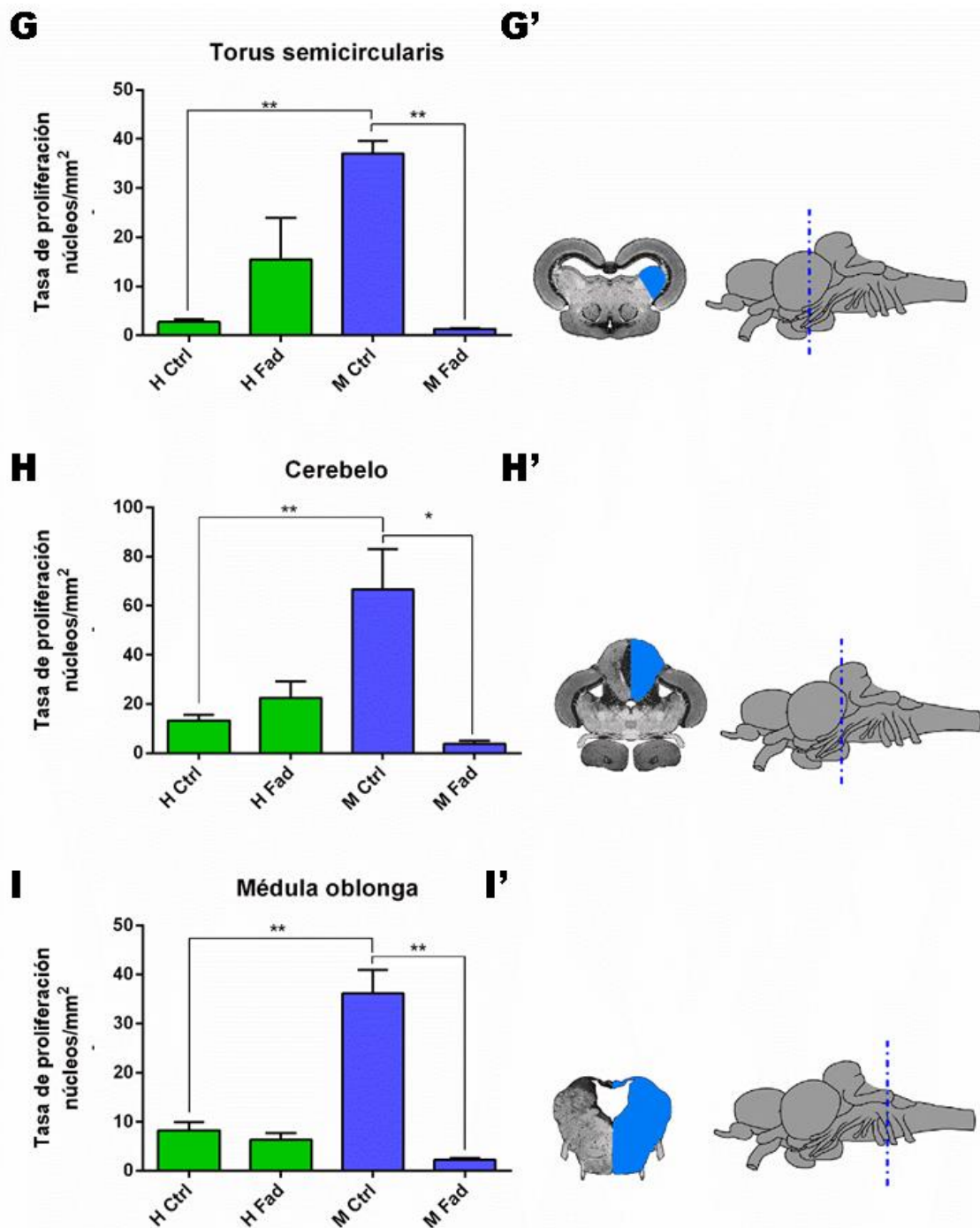


Figura 55 continuación

Actividad proliferativa en el diencéfalo

En el diencéfalo se analizaron el área preóptica e hipotálamo ventral. Una vez más el tratamiento con el FAD inhibió radicalmente y en forma significativa ($p < 0.05$) la tasa proliferativa (Fig 55 C y D), mientras que el tratamiento no afectó la proliferación en el encéfalo de las hembras. La comparación entre sexos de las

tazas proliferativas de los controles mostró que el macho tiene mayor proliferación respecto de la hembra ($p < 0,05$) (Fig 55 C, D).

Actividad proliferativa en el mesencéfalo

En el mesencéfalo las regiones analizadas fueron el tectum óptico, el *torus longitudinalis* y el *torus semicircularis*. En los machos la aplicación de FAD también generó una respuesta radical con disminución significativa ($p < 0.05$) de la proliferación celular respecto del control en las tres áreas estudiadas (Fig 55 E-G). En hembras la tasa de proliferación en el *torus semicircularis* no mostró diferencias significativas entre el tratamiento con FAD y los controles (Fig 55 E-G). En el tectum óptico y *torus longitudinalis* el FAD indujo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la proliferación respecto de los controles (Fig 55 E-G). La proliferación en los casos control comparada entre sexos, mostró que los machos poseen mayor tasa proliferativa que la hembra en estas tres regiones mesencefálicas analizadas al igual que en el resto de las regiones ya analizadas (Fig 55 E-G).

Actividad proliferativa en el rombencéfalo

En el rombencéfalo se analizaron dos regiones, una metencefálica, el *corpus cerebelli* y otra mielencefálica, la médula oblonga. Para ambas estructuras, la aplicación de FAD en machos indujo una reducción clara y significativa ($p < 0.05$) de la tasa proliferativa respecto el control (Fig 55 H, I). En el caso de las hembras, la aplicación de FAD no generó diferencias significativas en la tasa de proliferación (Fig 55 H, I). Al comparar las tasas proliferativas de los controles entre sexos, se determinó que el macho presenta mayor proliferación en estas dos regiones rombencefálicas analizadas y que esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,05$, Fig 55 H, I).

Discusión

Expresión de la aromatasa en el encéfalo adulto de *A. charrua*

En este capítulo se pudo determinar que existe expresión del *cyp19a1b* en el encéfalo tanto de machos como de hembras adultos, como se ha descrito en todos los teleósteos estudiados hasta el momento (Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). Este gen se expresa mayoritariamente a nivel encefálico aunque puede expresarse también en otros tejidos como gónada (Böhne *et al.*, 2013), hipófisis, músculo y branquias (Ramallo *et al.*, 2017). En el encéfalo de la trucha arco iris hembra, se detectaron ARNm y proteínas de aromatasa en la hipófisis, el telencéfalo ventral y dorsolateral, y las regiones preóptica e hipotalámica del diencéfalo ventral (Menuet *et al.*, 2003). Un caso excepcional lo constituye *Astatotilapia burtoni* donde *cyp19a1b* se sobreexpresa en testículo, siendo mucho mayor que en el encéfalo (Böhne *et al.*, 2013). Lo más extendido dentro de los vertebrados estudiados (aves, mamíferos, peces) es que la expresión de *cyp19a1b* a nivel encefálico es superior en machos que en hembras (Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Roselli *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2005; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005). Sin embargo, en *A. charrua* se presentó un panorama diferente, siendo mayor la expresión en hembras que en machos. Este contexto existe en otros teleósteos estudiados, aunque han sido la minoría entre ellos *O. latipes* (Okubo *et al.*, 2011), *Heteropneustes fossilis* (Chaube *et al.*, 2015) y *Plecoglossus altivelis* (Wang *et al.*, 2014). Esta gran versatilidad refleja la variabilidad en fenómenos biológicos que es característica en los peces y probablemente esté asociada al gran repertorio de expresiones conductuales relacionado a lo social y a lo reproductivo de los teleósteos (Ramallo *et al.*, 2017) en los que están presentes todos los tipos de reproducción y sistemas sociales y de cuidado parental descritos para vertebrados (Desjardins y Fernald, 2009). Por ejemplo, se ha visto que *aroB* está involucrada en la modulación de comportamientos sociales y reproductivos (Halgren *et al.*, 2006; Huffman *et al.*, 2013) y que, a su vez estos comportamientos pueden regular la *aroB* (Iwata *et al.*, 2012; Maruska *et al.*, 2013). El patrón de expresión de *cyp19a1b* se ha asociado al ambiente social de los individuos de una especie y al modelo reproductivo de ésta o de un grupo en particular. *A. charrua* forma entonces una especie atípica según el patrón de expresión general de *cyp19a1b*, y esto puede

estar implicado en su estrategia reproductiva y en el gran repertorio de comportamientos sociales y reproductivos que expresa. El ciclo de vida anual y las emergencias que conlleva para la vida del animal, puede ser clave para entender la amplia localización de *aroB* por todo el encéfalo, analizado en el capítulo anterior.

Es importante resaltar que en el encéfalo de *A. charrua* la *aroB* mediante la producción de estrógenos podría estar también influenciando diversos pasos en relación al proceso de la neurogénesis adulta, como la diferenciación celular y/o la migración de progenitores, como se ha visto en *D. rerio* (Diotel *et al.*, 2013).

Expresión de *cyp19a1b* en tratamientos con FAD

En relación a los niveles de expresión de aromatasa B entre machos y hembras controles y tratados con FAD, resultó llamativo el hecho de que no hubiese habido efectos en la expresión de *cyp19a1b* detectables a nivel de ARN mensajero, en animales tratados. El estudio realizado intentó verificar si los niveles de expresión eran disminuidos con el inhibidor de FAD. Los resultados se explican porque en el encéfalo, a diferencia de lo que ocurre en las gónadas, el efecto del FAD en el encéfalo de *D. rerio* genera una potente reducción de la actividad enzimática (producción de estrógenos) en un 93,4% (Gould *et al.*, 2019). De modo que no se trataría de un efecto genómico. Según lo planteado en la introducción, lo esperado era que con el tratamiento hubiese disminuido la expresión de *cyp19a1b* debido al bucle que se genera cuando existe un contexto estrogénico, la presencia de estrógeno activa el elemento de respuesta a los estrógenos (ERE) en el gen de *cyp19a1b* que favorece la expresión de esta (Mouriec *et al.*, 2008). Al haber menos estrógenos debido al bloqueo de la aromatasa, lo esperable hubiese sido que no se hubiera estimulado la expresión génica y que los niveles de mensajeros hubieran decaído. Esto no se pudo comprobar estadísticamente y se pueden atribuir a diversas causas: (a) que en *A. charrua* el efecto del FAD sea a nivel de actividad enzimática y no tenga relación con la transcripción de los mensajeros; (b) cuando se bloquea la aromatasa, podría existir una compensación funcional que determine que habiendo poca cantidad de estrógenos, se sigan sintetizando los mensajeros; (c) que las dosis de FAD utilizadas no generaron niveles suficientemente bajos de estrógenos como para observar un efecto génico. Diversos ensayos realizados en teleósteos con administraciones de FAD en diferentes concentraciones y en

diferentes tiempos, han mostrado panoramas diferentes de respuesta a los tratamientos. Se ha visto que en *Pimephales promelas* en siete días de administración de FAD con diferentes dosis de concentración, bajan los niveles de expresión de *cyp19a1b* (Villeneuve *et al.*, 2006). Sin embargo, en este teleósteo a los dos y tres días no se observaron diferencias significativas excepto en un grupo de baja concentración al tercer día (Villeneuve *et al.*, 2009). Esto nos hace pensar que la respuesta en relación al tiempo de administración y a la dosis, genera una respuesta diferente dentro de la misma especie. En *Melanotaenia fluviatilis* se vio que a concentraciones bajas y altas, en machos, se produce una disminución de la expresión de *cyp19a1b* a uno, dos, tres y cuatro días de tratamiento con FAD (Shanthanagouda *et al.*, 2014). Sin embargo, en las hembra, en uno y dos días de tratamiento, aumenta la expresión para ambas dosis utilizadas, mientras que a los tres y cuatro días baja la expresión de *cyp19a1b* para concentraciones bajas de FAD y aumenta para concentraciones altas (Shanthanagouda *et al.*, 2014). Esto sugiere que la respuesta es sexo dependiente y que dependiendo de la dosis y del tiempo de tratamiento, varía la respuesta en relación a la expresión de *cyp19a1b*. Un estudio realizado en *C. auratus* donde se trabajó siempre con la misma concentración, pero en un tiempo de cuarenta días y discriminando diversas regiones encefálicas, se vio que bajan los niveles de expresión de *cyp19a1b* en el telencéfalo y el hipotálamo (Zhang *et al.*, 2009). Este es otro dato que además de lo conocido anteriormente sobre dosis y sexo, establece que la respuesta puede variar según la localización anatómica en la que se esté expresando la aromatasa en el individuo. Para *A. charrua* lo conveniente de realizar en subsiguientes estudios de esta índole, sería establecer a qué tiempo y con qué dosis para cada sexo, se establece menor expresión de los mensajeros de *cyp19a1b* en los tratamientos respecto los controles. Una vez dilucidados estos tiempos, realizar ensayos bioquímicos para revelar si existe efectivamente un efecto no genómico, es decir, que disminuyan radicalmente los niveles de estrógenos como se ha descrito en muchos otros peces y tetrápodos (Wade *et al.*, 1994). Se ha visto que el FAD presenta un potente efecto no genómico de rápida acción (Cornil y Charlier, 2010; Charlier y Cornil, 2010) y que los efectos genómicos/no genómicos dependen de la etapa del período reproductivo que el animal se encuentre y a ciertos comportamientos sociales (Heimovics *et al.*, 2012; Heimovics *et al.*, 2015 a, b).

Efectos del FAD en la proliferación celular en el encéfalo

En las nueve zonas seleccionadas para realizar la cuantificación de núcleos BrdU positivos, se vio que la proliferación celular basal fisiológica, es sexualmente dimórfica, debido a que en machos es mayor que en hembras. Esto está siendo confirmado para peces sin administración del vehículo, en una tesis de grado sobre la proliferación en el encéfalo *A. charrua* donde se analizaron bulbos olfatorios, lóbulos telencefálicos y área preóptica (datos aún no publicados por Laura Herrera, Anabel Fernández y Maximiliano Torres).

La hipótesis en la presente tesis supone que los estrógenos poseen un efecto en la proliferación de las células madre y progenitores neurales en el encéfalo de *A. charrua*. Mediante los experimentos de administración de FAD durante 6 días y del marcador de proliferación celular en una ventana temporal de 24 h, se pudo determinar que en los machos existe un marcado efecto induciendo la disminución en la proliferación celular. Esto podría deberse a que los estrógenos producidos por *cyp19a1b*, en machos de *A. charrua*, tienen un efecto estimulador de la proliferación de CMPN. Al inhibir la catálisis de la aromatasa, bajan los estrógenos y por tanto, baja la actividad proliferativa de las células en las ZP. Esto se vio para las nueve zonas elegidas para la cuantificación que son representativas de las grandes divisiones encefálicas (tel-, di-, mes-, met- y mielencéfalo). Este fenómeno también fue sexualmente dimórfico debido a que la respuesta en las hembras fue diferente, en la mayoría de las áreas estudiadas no hubo efecto sobre la proliferación con significancia estadística. Sin embargo, en bulbo olfatorio, tectum óptico y *torus longitudinalis* hubo diferencias estadísticas, pero en el caso de las hembras la proliferación fue mayor en los animales tratados con FAD. Esto hace suponer que la depleción de estrógenos en la hembra tanto a nivel encefálico como gonadal/periférico, genera un aumento en la proliferación celular en esas tres zonas y por lo tanto, los estrógenos circundantes provenientes de la gónada estén generando un entorno poco proliferativo, a nivel de las ZP. Es decir que en las hembras los estrógenos (provenientes de las gónadas y circulando en sangre) están inhibiendo la proliferación celular fisiológica y por tanto en estas condiciones es más baja que en machos. En los tratamientos con FAD, se asemeja al encéfalo macho en el que un entorno con niveles bajos de estrógenos (únicamente producción local de neuroestrógenos a nivel encefálico), es muy proliferativo. De hecho, en estudios realizados en *D. rerio* en los cuales se inyectaron individuos

hembra con estradiol durante siete días, se vio que genera una disminución en la proliferación celular en telencéfalo dorsal y ventral, en el área preóptica y en valvula y *corpus cerebelli* (Makantasi y Dermon, 2014). Asimismo, los tratamientos prolongados con estradiol en *D. rerio* durante cien días, generan una disminución de la proliferación celular en el bulbo olfatorio, en la transición bulbo olfatorio-lóbulos telencefálicos, el núcleo pretectal y el hipotálamo mediobasal a nivel del receso lateral (Diotel *et al.*, 2013). Asimismo, la inhibición de la actividad aromatasa y el bloqueo de los receptores de estrógenos, condujeron a un aumento en las células proliferativas en procencéfalo de *D. rerio* (Diotel *et al.*, 2013). Los datos obtenidos en esta tesis junto con los reportados por la bibliografía muestran que los efectos de los inhibidores de la aromatasa o de la inyección directa de estrógenos (*e.g.* estradiol), genera respuestas de aumento o disminución de la proliferación y que esta respuesta depende del tiempo de administración, de la especie, del sexo, región anatómica y de la edad (Makantasi y Dermon, 2014). El FAD es un inhibidor de la aromatasa por excelencia (Wade *et al.*, 1994) y se ha utilizado en diversos taxa en innumerables estudios de diferente índole. En ratones hembra adultos, el tratamiento a corto plazo con estradiol disminuyó la proliferación celular en la ZSV, lo que llevó a una disminución de las células recién nacidas en el bulbo olfatorio (Brock *et al.*, 2010), lo que también ha sido demostrado en ratas (Hoyk *et al.*, 2006). En el giro dentado del hipocampo, el otro nicho neurogénico descrito para mamíferos, la administración de estrógenos suprimió la proliferación de células granulares a las 48h, en ratas hembras adultas (Ormerod *et al.*, 2003).

Las ZP en los machos de *A. charrua* parecen ser reguladas por los estrógenos al igual que el bulbo olfatorio, tectum óptico y *torus semicircularis* de las hembras. Las *Austrolebias* son peces macrópticos (buena capacidad visual) y que las señales químicas olfativas tienen un rol importante en la comunicación social y reproductiva (Passos *et al.*, 2014). También presentan adaptaciones en la retina que se ha relacionado con la capacidad visual en los charcos donde vive, con diferentes niveles de turbidez a lo largo de su ciclo vital (Berrosteguieta *et al.*, 2018). Sumado a esto se han establecido conexiones neurales por la vía olfatorio-retinalis que conecta estructuras olfativas con las visuales (Rosillo *et al.*, 2013). Esto podría estar relacionado con la buena cantidad de proliferación (Capítulo 2) y una intensa inmunorreactividad a aroB (Capítulo 3) en estructuras relacionadas con el procesamiento de la información visual (tectum óptico y *torus*

longitudinalis) y olfativa (bulbo olfatorio), que tanto en machos y hembras, son sensibles a los tratamientos con FAD en términos proliferativos. Los estrógenos producidos localmente en esas regiones podrían estar participando en un tipo de proliferación vinculada a estímulos sociales o reproductivos en base a estímulos químicos olfativos y visuales relacionados con una neurogénesis homeostática de los sistemas olfativos y visuales. Como se ha visto, la aromatasa es modulable por el comportamiento (Iwata *et al.*, 2012; Maruska *et al.*, 2013) y en nuestra especie de estudio hemos visto que tanto el nervio olfativo como los glomérulos olfatorios son positivos tanto para la inmunolocalización de aroB como positivos a la actividad diaforasa (Capítulo 3). Esto podría estar relacionado a los sistemas feromona-hormonal que entre por la vía olfativa generando señales específicas para desencadenar respuestas neuroendocrinas a nivel encefálico.

Discusión general

Esta tesis se enmarcó en la hipótesis de que la inhibición de la actividad aromatasas generaría cambios en la dinámica proliferativa de las CPMN, en particular disminuiría las tasas proliferativas. Este encuadre está relacionado con el hecho de que los estrógenos ejercen efectos pleiotrópicos en diversos tejidos y órganos, y uno de estos es estimular la proliferación celular. Incluso está asociado a la proliferación descontrolada de las células que residen en tejidos sensibles a los estrógenos (y/o progestágenos) como la glándula mamaria en mamíferos. Para conocer sobre los efectos de la inhibición de la aromatasas y consecuentemente de la bajada en la producción de estrógenos y sus efectos en el encéfalo de *A. charrua* adulto, se siguió una secuencia analítica que determinó: el conocimiento sobre la anatomía macro y microscópica del encéfalo; la identificación y localización de las CPMN residentes de ZP encefálicas; la identificación de la expresión del gen de la aromatasas a nivel encefálico y localización de la proteína a nivel celular; y por último evidenciar los efectos de la inhibición de la aromatasas en las tasas proliferativas.

La anatomía macro y microscópica del encéfalo de *A. charrua* mostró que, si bien el encéfalo sigue el plan de organización general de los teleósteos, presenta diferencias notorias respecto a otras especies y que en la anatomía externa la forma de diversas estructuras es sexualmente dimórfica. Esto era algo esperable ya que los encéfalos de los teleósteos son muy variables entre e intraespecíficamente. El hecho de que la morfología del área dorsal del telencéfalo sea sexualmente dimórfica, subyace en una diferencia en la composición interna de las diferentes subdivisiones que, en el caso de *A. charrua*, son fácilmente discernibles. Dado que estas regiones del telencéfalo están destinadas –entre otros– a coordinar información sensorial, integrativa y motora para la evocación de conductas, es probable que con un análisis morfométrico fino se puedan dilucidar qué estructuras subáreas son las encargadas del dimorfismo macroscópico y eventualmente adjudicar la base neural que subyace a diversos tipos de comportamientos también sexo dimórficos (e.g. sociales, reproductivos).

En esta tesis se realizó un censo corte a corte de forma seriada para poder evidenciar todas las regiones con células en activa proliferación que, junto con datos anatómicos e histológicos obtenidos en el capítulo 1, permitió la identificación y localización de las 20 zonas proliferativas. Todas estas zonas están

ubicadas en la pared ventricular o de recesos ventriculares derivados de la morfogénesis del desarrollo embrionario. A nivel mielencefálico se constató la existencia de proliferación instantánea en zonas profundas desde la pared ventricular, en esta zona también se constataron rayos medulares formados por grupos de procesos radiales positivos a la aromatasa, determinados por una intensa inmunorreactividad. Esto podría implicar que en esos rayos existe una fuerte actividad estrogénica que siga modulando la proliferación de células que migran por esas proyecciones radiales y que aún están en ciclo celular, y podrían officar como amplificadores migratorios. La suma de todas las zonas proliferativas determina que *A. charrua* sea el teleósteo con la proliferación más extendida en todo el encéfalo, que sirven a la neurogénesis constitutiva o fisiológica destinada tanto para el crecimiento como al recambio neural. Si bien es el teleósteo que presenta más zonas proliferativas activas, no se describieron nuevas zonas, es decir, en otros teleósteos pueden existir potenciales CPMN residentes en las paredes ventriculares.

Los núcleos proliferativos de morfología alargada que postulamos como putativas neuroepiteliales, están distribuidas no sólo en los tres sitios clásicos descritos para los teleósteos. En cambio, se encontraron distribuidas en otras regiones, describiéndose por primera vez en *A. charrua* en todas las divisiones encefálicas. Esto demuestra que este teleósteo es capaz de retener células neuroepiteliales desde la etapa embrionaria, y que aparte de ser células en una jerarquía superior a las glías radiales y por tanto, dar origen a estas. Por otra parte, el proceso neurogénico podría ser diferencial respecto del precursor (NE o GR), es decir, dar origen a diferentes estirpes neuronales o gliales (gliogénesis). Las células correspondientes a estos núcleos alargados, sin excepción no presentaron inmunorreactividad para aroB. Por tanto la actividad proliferativa de estas células podría estar bien poco o nada influenciadas por los estrógenos, o bien bajo una modulación en base a estos, pero vía parácrina o como un factor hormonal liberado al líquido cefalorraquídeo. De hecho dos estructuras no GR con inmunorreactividad para aroB son las formaciones coroideas anterior y posterior, es decir, el filtrado plasmático y la consecuente formación de líquido cefalorraquídeo, podría estar cargado con estrógenos, estimulando las células de las paredes ventriculares, entre ellas las putativas NE y endimarias.

Por otra parte los datos anatómicos y de la proliferación basal, permitieron hipotetizar sobre el crecimiento de ciertas estructuras encefálicas en la vida adulta,

tales como telencéfalo dorsal, corpus cerebelli y tectum óptico. En estas estructuras el crecimiento se presenta como un modelo multidireccional, en contraposición a lo establecido en otros teleósteos en que diversos autores establecen que las estructuras encefálicas en la vida posnatal crecen en dirección caudal. Esto nos hace pensar que lo que se conoce como “neurogénesis constitutiva” puede desglosarse en dos procesos, uno dirigido al crecimiento de las estructuras encefálicas, y otro dirigido al recambio neural y mantenimiento de los circuitos preestablecidos durante el desarrollo embrionario.

La distribución de aroB se registró en todo el eje rostro-caudal con gran intensidad de inmunorreactividad, esto no ha sido descrito para otros teleósteos en los que se postula un gradiente de expresión de aroB donde es mayor en las estructuras rostrales y va disminuyendo notoriamente hacia caudal. Esto podría obedecer a la gran capacidad proliferativa en todo el encéfalo de *A. charrua*, debido a que aroB estuvo presente en las células GR proliferantes de la mayoría de las ZP, pudiendo los estrógenos sintetizados por esta enzima, generar efectos intrácrinos.

En las zonas donde se alternaron grupos de células positivas a la aroB alternando con zonas negativas, podemos interpretar que las GR pueden ejercer igualmente un efecto sobre las que no expresan aromatasa. Dado que los esteroides son hormonas de naturaleza lipídica y debido a su liposolubilidad, podrían estar difundiendo y generando efectos parácrinos en las células que no expresan aroB.

La distribución de la aroB dentro de la célula en que presenta mayor inmunorreactividad hacia la superficie ventricular a nivel del soma y va disminuyendo a medida que el proceso radial va siendo más profundo en el parénquima. Esto genera un aspecto de gradiente de expresión de aroB y podría estar vinculado al rol de los estrógenos en la migración celular, diferenciación y/o establecimiento funcional en los circuitos preexistentes (Fig 56). Los efectos de los estrógenos producidos por la glía radial en los teleósteos desencadenan también otros efectos a nivel comportamental y de sexualización del encéfalo, entre otros. El hecho de que exista una especie de gradiente de concentración de aroB desde la superficie ventricular, podría determinar la generación diferencial de estrógenos, teniendo diversos efectos en distintas subregiones del parénquima nervioso, modulando la actividad de neuronas y glías.

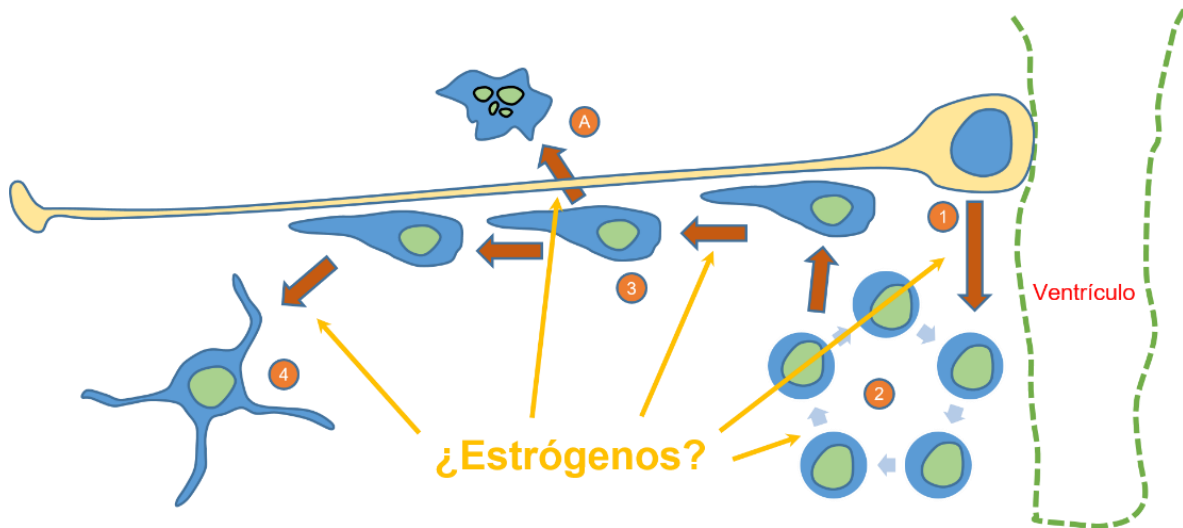


Figura 56. Potencial modulación de los estrógenos sobre las diferentes etapas de la neurogénesis: 1: División asimétrica. 2: Amplificadores transitorios. 3: Migración. 4: Diferenciación y establecimiento funcional en circuitos preexistentes. A: Apoptosis.

Los resultados sobre la respuesta sexo dimórfica en los tratamientos con FAD, pueden deberse a un ambiente estrogénico específico para cada sexo, en el cuál se establece su medio interno específico. Por ejemplo, en la hembra el medio interno genera un contexto estrogénico a nivel encefálico alto (debido a la gran cantidad de estrógenos producidos en la gónada y circulantes en sangre) y en función de este nivel, se generan las respuestas moduladora de los estrógenos a diversos niveles. En estas también podría haber una cantidad y/o distribución diferencial de los receptores estrogénicos, determinando los efectos más por su capacidad de acción, frente a su capacidad de producción. En machos el medio interno genera un contexto estrogénico a nivel encefálico bajo (poco estrógeno circulante en sangre) y en función de ese nivel, generar respuestas, en este caso particular, la caída de estrógenos por bloqueo de la aromatización, genera tasas proliferativas abruptamente menores.

Esto implicaría que la tasa de proliferación celular más bajas en las hembras, obedece al hecho de que, como en otros grupos de vertebrados, las hembras tengan una inversión energética diferente al macho priorizando la actividad gonadal, frente a la generación de células neurales a nivel encefálico.

Finalmente, los datos obtenidos con los experimentos de inhibición de la actividad aromatasa puede suponer que en condiciones de un contexto estrogénico local (en general no circulan estrógenos en sangre) el encéfalo del macho posee una gran capacidad proliferativa, pero que cuando se inhibe la síntesis local de estrógenos, la proliferación decae. En hembras que, en general poseen grandes cantidades de

estrógenos circulantes en sangre provenientes de los ovarios, podría haber un mecanismo de compensación para regular una proliferación en exceso. Al inhibir la aromatasa en un tratamiento crónico de seis días, esto puede generar que haya niveles de estrógenos bajos tanto en sangre como a nivel encefálico, y en este contexto el cerebro hembra asemeje su actividad proliferativa al macho, es decir, que con poca cantidad de estrógenos, haya una alta tasa de proliferación. Esto podría indicar la mayor capacidad proliferativa en OB, TL y TeO de las hembras tratadas con FAD. La hipótesis general en la que se enmarcó esta tesis, que postulaba que la inhibición de la actividad aromatasa disminuiría las tasas proliferativas, se confirmó en los machos, pero no en las hembras. Esto genera una serie de nuevas preguntas sobre el papel de los estrógenos en la proliferación celular del encéfalo de *A. charrua*. Como perspectiva futura, sería interesante investigar el efecto de inyecciones de estradiol-17 β sobre las ZP en la especie.

En esta tesis se logró evidenciar un fuerte dimorfismo sexual del encéfalo, evidenciado a diversos niveles: molecular, respecto la expresión de *aroB*; celular, respecto a las tasas proliferativas basales; histofisiológico, en relación a la respuesta al FAD; y anatómico, en relación a la morfología y localización de estructuras encefálicas. La fuerte presión ambiental a la que son sometidos estos individuos hace que cada sexo posea estrategias diferenciales en relación a diversos procesos o fenómenos en todo el organismo, especialmente lo vinculado al comportamiento y su base orgánica: el sistema nervioso.

Conclusiones y perspectivas

En el capítulo 1 se logró conocer la neuroanatomía macro y microscópica del encéfalo adulto de *A. charrua*. Existen diferencias notorias con otras especies de teleósteos como la distribución en estrato de las neuronas del área dorsal del telencéfalo (*pallium*), distribución de las capas de bulbo olfatorio y la ausencia de saco vasculoso en el hipotálamo. También se encontraron diferencias sexualmente dimórficas en diversas estructuras como bolbos olfatorios, y *corpus cerebelli*.

En el capítulo 2 se identificaron veinte ZP en el encéfalo adulto de *A. charrua* de machos y hembras en las que existen diversas morfologías de núcleos celulares proliferantes. Esto posiciona a *A. charrua* como un teleósteo en el que las ZP en el adulto se mantienen por todo el encéfalo y poseen gran actividad proliferativa.

En el capítulo 3 se logró identificar la presencia y distribución de aroB en todo el encéfalo adulto de machos y hembras. Esto es característico de *A. charrua* donde la aromatasa presente una localización en todo el eje rostrocaudal, sobre todo a nivel de la ZV y subventricular. La aroB se expresa principalmente en células con morfología de GR, confirmando su identidad mediante la colocalización con vimentina y actividad diaforasa. La localización de células proliferativas que expresan aroB, se presenta formando clusters o grupos celulares, de mayor o menor tamaño dependiendo de la zona, regionalizando la presencia de estas células.

En el capítulo 4 se comprobó que aroB presenta mayor nivel de expresión en el encéfalo de hembras respecto los machos. La proliferación basal es mayor en machos en diversas ZP de todo el encéfalo. La aplicación de FAD (inhibidor de la actividad aromatasa) generó que en machos las tasas de proliferación fuesen menores respecto los controles. En hembras el tratamiento con FAD generó que en el BO, OT y TL la tasa de proliferación fuese mayor, respecto los controles. Esta respuesta es sexualmente dimórfica y especulamos que los neuroestrógenos producidos por aroB tienen un rol fundamental en la dinámica proliferativa en las ZP del encéfalo adulto.

Como perspectivas a futuro se plantea:

- Avanzar en el conocimiento sobre la anatomía sexualmente dimórfica del encéfalo, haciendo énfasis a nivel histológico.
- Conocer la estructura de las neuronas mediante técnicas de impregnaciones argénticas, para determinar las relaciones sinápticas entre los diferentes estratos del área dorsal del telencéfalo.
- Dilucidar si efectivamente el telencéfalo crece posteclosión mediante ondas proliferativas que generen nuevos estratos aposicionalmente.
- Determinar la identidad de las células NE putativas, mediante el uso de marcadores de estirpe de células madre (*e.g.* nestina).
- Realizar un análisis por microscopía electrónica de transmisión en las 20 ZP para determinar su composición celular y subcelular.
- Realizar ensayos con inyecciones de estrógenos (*e.g.* estradiol 17- β) para determinar si efectivamente los estrógenos causan variaciones en las tasas proliferativas en las ZP.
- Realizar ensayos bioquímicos de cinética enzimática para dilucidar el efecto no genómico del FAD y determinar en qué tiempos y en qué dosis para cada sexo, genera una caída en la producción de estrógenos.
- Realizar un análisis comparativo con otras especies de teleósteos con una modalidad sensorial claramente predominante, tanto de las zonas proliferativas como de la distribución de la aromatasa y efecto de los estrógenos.

Bibliografía

1. Abdelgadir, S. E., Roselli, C. E., Choate, J. V., & Resko, J. A. (1997). Distribution of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in adult rhesus monkey brains. *Biology of reproduction*, 57(4), 772-777.
2. Afonso, L. O., Iwama, G. K., Smith, J., & Donaldson, E. M. (1999). Effects of the aromatase inhibitor fadrozole on plasma sex steroid secretion and ovulation rate in female coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, close to final maturation. *General and comparative endocrinology*, 113(2), 221-229.
3. Afonso, L. O., Iwama, G. K., Smith, J., & Donaldson, E. M. (2000). Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on reproductive steroids and spermiation in male coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during sexual maturation. *Aquaculture*, 188(1-2), 175-187.
4. Altman J, Bayer SA (1997) Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions. CRC Press, Boca Raton
5. Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals?. *Science*, 135(3509), 1127-1128.
6. Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4), 433-457.
7. Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335.
8. Alunni, A., & Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development*, 143(5), 741-753.
9. Alunni, A., Hermel, J. M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., & Joly, J. S. (2010). Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Developmental neurobiology*, 70(10), 693-713
10. Alvarez-Buylla, A., & Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 629-634.
11. Alvarez-Buylla, A., & Kirn, J. R. (1997). Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *Journal of neurobiology*, 33(5), 585-601.

12. Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5), 683-686.
13. Alvarez-Buylla, A., & Lois, C. (1995). Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*, 13(3), 263-272.
14. Alvarez-Buylla, A., & Nottebohm, F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*, 335(6188), 353.
15. Alvarez-buylla, A., Buskirk, D. R., & Nottebohm, F. (1987). Monoclonal antibody reveals radial glia in adult avian brain. *Journal of Comparative Neurology*, 264(2), 159-170.
16. Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., & Nottebohm, F. (1990). Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron*, 5(1), 101-109.
17. Ankley, G. T., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Hornung, M. W., Korte, J. J., Makynen, E. A., & Leino, R. L. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological sciences*, 67(1), 121-130.
18. Arévalo, R., Alonso, J. R., Bri on, J. G., & Garcia-Ojeda, E. (1992). An atlas of the brain of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; Cyprinidae, Teleostei). *Journal fur Hirnforschung*, 33, 487-487.
19. Arnold, A. P. (1990). The passerine bird song system as a model in neuroendocrine research. *Journal of Experimental Zoology*, 256(S4), 22-30.
20. Arnold, A. P., & Gorski, R. A. (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annual review of neuroscience*, 7(1), 413-442.
21. Azcoitia, I., Santos-Galindo, M., Arevalo, M. A., & Garcia-Segura, L. M. (2010). Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *European Journal of Neuroscience*, 32(12), 1995-2002.
22. Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., Honda, S. I., Harada, N., & Garcia-Segura, L. M. (2001). Brain aromatase is neuroprotective. *Journal of neurobiology*, 47(4), 318-329.
23. Baile, V. V., & Patle, P. J. (2011). Cytoarchitectonic study of the brain of a dwarf snakehead, *Channa gachua* (Ham.). I. The telencephalon. *Fish physiology and biochemistry*, 37(4), 993-1004.
24. Bailey, D. J., Ma, C., Soma, K. K., & Saldanha, C. J. (2013). Inhibition of hippocampal aromatization impairs spatial memory performance in a male songbird. *Endocrinology*, 154(12), 4707-4714.

25. Balthazart, J., Foidart, A., Surlemont, C., Vockel, A., & Harada, N. (1990). Distribution of aromatase in the brain of the Japanese quail, ring dove, and zebra finch: an immunocytochemical study. *Journal of comparative neurology*, 301(2), 276-288.
26. Barbosa, J. S., Di Giaimo, R., Götz, M., & Ninkovic, J. (2016). Single-cell in vivo imaging of adult neural stem cells in the zebrafish telencephalon. *Nature protocols*, 11(8), 1360.
27. Bardet, P. L., Horard, B., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., & Vanacker, J. M. (2002). Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of molecular endocrinology*, 28(3), 153-163.
28. Barnea, A., & Nottebohm, F. (1996). Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), 714-718.
29. Barry, G. (2014). Integrating the roles of long and small non-coding RNA in brain function and disease. *Molecular psychiatry*, 19(4), 410.
30. Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A., & Moyses, E. (2005). In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience*, 130(1), 75-90.
31. Bayer, S. A., Yackel, J. W., & Puri, P. S. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 216(4548), 890-892.
32. Becker, C. G., & Becker, T. (2008). Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restorative neurology and neuroscience*, 26(2, 3), 71-80.
33. Bentivoglio, M., & Mazzarello, P. (1999). The history of radial glia. *Brain research bulletin*, 49(5), 305-315.
34. Bernier, P. J., Bédard, A., Vinet, J., Lévesque, M., & Parent, A. (2002). Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(17), 11464-11469.
35. Bernocchi, G., Scherini, E., Giacometti, S., & Mareš, V. (1990). Premitotic DNA synthesis in the brain of the adult frog (*Rana esculenta* L.): An autoradiographic 3H-thymidine study. *The Anatomical Record*, 228(4), 461-470.

36. Berois, N., Arezo, M. J., & de Sá, R. O. (2014). The Neotropical genus *Austrolebias*: an emerging model of annual killifishes. *Cell & Developmental Biology*, 3(2), 1000136.
37. Berois, N., Garcia, G., & de Sa, R. O. (2016). Annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution. CRC Press.
38. Berrostequieta, I., Rosillo, J. C., Torres-Pérez, M., & Fernández, A. S. (2018). Caracterización histológica de adaptaciones de la retina de peces anuales *Austrolebias charrua*, en relación a cambios en la luminosidad en su ciclo de vida. *Acta Microscopica*, 27(1).
39. Biegón, A., Kim, S. W., Alexoff, D. L., Jayne, M., Carter, P., Hubbard, B. & Schlyer, D. (2010). Unique distribution of aromatase in the human brain: In vivo studies with PET and [N-methyl-11C] vorozole. *Synapse*, 64(11), 801-807.
40. Birse, S. C., Leonard, R. B., & Coggeshall, R. E. (1980). Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, *Lebistes*. *Journal of Comparative Neurology*, 194(2), 291-301.
41. Bjornsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., & Temple, S. (2015). It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Developmental cell*, 32(4), 435-446.
42. Blázquez, M., & Piferrer, F. (2004). Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular and cellular endocrinology*, 219(1-2), 83-94.
43. Böhne, A., Heule, C., Boileau, N., & Salzburger, W. (2013). Expression and sequence evolution of aromatase *cyp19a1* and other sexual development genes in East African cichlid fishes. *Molecular biology and evolution*, 30(10), 2268-2285.
44. Bowers, J. M., Waddell, J., & McCarthy, M. M. (2010). A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biology of sex differences*, 1(1), 8.
45. Braford Jr, M. R. (1995). Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not?. *Brain, Behavior and Evolution*, 46(4-5), 259-274.
46. Brandstätter, R., & Kotschal, K. (1989). Life history of roach, *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain, behavior and evolution*, 34(1), 35-42.

47. Brandstätter, R., & Kotrschal, K. (1990). Brain growth patterns in four European cyprinid fish species (Cyprinidae, Teleostei): roach (*Rutilus rutilus*), bream (*Abramis brama*), common carp (*Cyprinus carpio*) and sabre carp (*Pelecus cultratus*). *Brain, behavior and evolution*, 35(4), 195-211.
48. Brandt, N., Vierk, R., & Rune, G. M. (2013). Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus. *International Journal of Developmental Biology*, 57(5), 351-356.
49. Briñón, J. G., Crespo, C., Weruaga, E., Alonso, J., Sobreviela, T., Aijón, J., & Alonso, J. R. (1998). NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase-positive elements in the human olfactory bulb. *Neuroreport*, 9(14), 3141-3146.
50. Brock, O., Keller, M., Veyrac, A., Douhard, Q., & Bakker, J. (2010). Short term treatment with estradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. *Neuroscience*, 166(2), 368-376.
51. Burd, G. D., & Nottebohm, F. (1985). Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 240(2), 143-152.
52. Burmeister, S. S., Munshi, R. G., & Fernald, R. D. (2009). Cytoarchitecture of a cichlid fish telencephalon. *Brain, behavior and evolution*, 74(2), 110-120.
53. Byrd, C. A., & Brunjes, P. C. (2001). Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish. *Neuroscience*, 105(4), 793-801.
54. Callard, G. V., Hoffman, R. A., Petro, Z., & Ryan, K. J. (1979). In vitro aromatization and other androgen transformations in the brain of the hamster (*Mesocricetus auratus*). *Biology of reproduction*, 21(1), 33-38.
55. Callard, G. V., Mak, P., & Solomon, D. J. (1986). Effects of short days on aromatization and accumulation of nuclear estrogen receptors in the hamster brain. *Biology of reproduction*, 35(2), 282-291.
56. Callard, G. V., Tchoudakova, A. V., Kishida, M., & Wood, E. (2001). Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 79(1-5), 305-314.
57. Cameron, H. A., McEwen, B. S., & Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 15(6), 4687-4692.

58. Cameron, R. S., & Rakic, P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia*, 4(2), 124-137.
59. Candal, E., Anadón, R., DeGrip, W. J., & Rodríguez-Moldes, I. (2005). Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Developmental Brain Research*, 154(1), 101-119.
60. Carleton, A., Petreanu, L. T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., & Lledo, P. M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature neuroscience*, 6(5), 507.
61. Caulier, M., Brion, F., Chadili, E., Turies, C., Piccini, B., Porcher, J. M., & Hinfrey, N. (2015). Localization of steroidogenic enzymes and Foxl2a in the gonads of mature zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 188, 96-106.
62. Celec, P., Ostatníková, D., & Hodosy, J. (2015). On the effects of testosterone on brain behavioral functions. *Frontiers in neuroscience*, 9, 12.
63. Cerdá-Reverter, J. M., Muriach, B., Zanuy, S., & Muñoz-Cueto, J. A. (2008). A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): the midbrain and hindbrain. *Acta histochemica*, 110(6), 433-450.
64. Cerdá-Reverter, J. M., Zanuy, S., & Muñoz-Cueto, J. A. (2001). Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). II. The diencephalon. *Journal of morphology*, 247(3), 229-251.
65. Chakraborty, M., & Burmeister, S. S. (2015). Effects of estradiol on neural responses to social signals in female túngara frogs. *Journal of Experimental Biology*, 218(22), 3671-3677.
66. Chaplin N, Tendeng C, Wingate RJ (2010) Absence of an external germinal layer in zebrafish and hark reveals a distinct, anamniote ground plan of cerebellum development. *J Neurosci* 30:3048-3057
67. Chapouton, P., Adolf, B., Leucht, C., Tannhäuser, B., Ryu, S., Driever, W., & Bally-Cuif, L. (2006). *her5* expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain. *Development*, 133(21), 4293-4303.
68. Chapouton, P., Jagasia, R., & Bally-Cuif, L. (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *Bioessays*, 29(8), 745-757.
69. Chapouton, P., Skupien, P., Hesel, B., Coolen, M., Moore, J. C., Madelaine, R. & Bally-Cuif, L. (2010). Notch activity levels control the

- balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, 30(23), 7961-7974.
70. Charlier, T. D., Cornil, C. A., Ball, G. F., & Balthazart, J. (2010). Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(10), 1094-1105.
71. Chaube, R., Rawat, A., & Joy, K. P. (2015). Molecular cloning and characterization of brain and ovarian cytochrome P450 aromatase genes in the catfish *Heteropneustes fossilis*: sex, tissue and seasonal variation in, and effects of gonadotropin on gene expression. *General and comparative endocrinology*, 221, 120-133.
72. Chiang, E. F. L., Yan, Y. L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., & Chung, B. C. (2001). Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Molecular biology and evolution*, 18(4), 542-550.
73. Clint, S. C., & Zupanc, G. K. (2001). Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia. *Developmental Brain Research*, 130(1), 15-23.
74. Cohen, R. E., Roach, J., & Wade, J. (2012). The distribution of estrogen receptor β mRNA in male and female green anole lizards. *Brain research*, 1430, 43-51.
75. Cornil, C. A., & Charlier, T. D. (2010). Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *Journal of neuroendocrinology*, 22(7), 664-673.
76. Corotto, F. S., Henegar, J. A., & Maruniak, J. A. (1993). Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neuroscience letters*, 149(2), 111-114.
77. Costa, W. J. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, (1213), 1-162.
78. Costa, W. J. E. M., & Cheffe, M. M. (2001). Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the laguna dos Patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (Ahl)(Cyprinodontiformes: Rivulidae).

- Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia, 14(2), 179-200.
79. Costagli A, Kapsimali M, Wilson SW, Mione M (2002) Conserved and divergent patterns of Reelin expression in the zebrafish central nervous system. *J Comp Neurol* 450:73–93
 80. Coumailleau, P., Pellegrini, E., Adrio, F., Diotel, N., Cano-Nicolau, J., Nasri, A., & Kah, O. (2015). Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(2), 152-162.
 81. Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., & Colombo, L. (2002). Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 82(1), 19-32.
 82. Dambrose, E., Simion, M., Bourquard, T., Bouffard, S., Rizzi, B., Jaszczyszyn, Y., & Edouard, J. (2017). Postembryonic Fish Brain Proliferation Zones Exhibit Neuroepithelial-Type Gene Expression Profile. *Stem Cells*, 35(6), 1505-1518.
 83. d'Amico, L. A., Boujard, D., & Coumailleau, P. (2011). Proliferation, migration and differentiation in juvenile and adult *Xenopus laevis* brains. *Brain research*, 1405, 31-48.
 84. D'angelo, L. (2013). Brain atlas of an emerging teleostean model: *Nothobranchius furzeri*. *The Anatomical Record*, 296(4), 681-691.
 85. Dayer, A. G., Cleaver, K. M., Abouantoun, T., & Cameron, H. A. (2005). New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *The Journal of cell biology*, 168(3), 415-427.
 86. de Oliveira-Carlos, V., Ganz, J., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2013). Notch receptor expression in neurogenic regions of the adult zebrafish brain. *PLoS One*, 8(9), e73384.
 87. Devoogd, T. J., Nixdorf, B., & Nottebohm, F. (1985). Synaptogenesis and changes in synaptic morphology related to acquisition of a new behavior. *Brain research*, 329(1-2), 304-308.
 88. DeVoogd, T., & Nottebohm, F. (1981). Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science*, 214(4517), 202-204.
 89. Diotel, N., Le Page, Y., Mouriec, K., Tong, S. K., Pellegrini, E., Vaillant, C. & Kah, O. (2010). Aromatase in the brain of teleost fish: expression,

- regulation and putative functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(2), 172-192.
90. Diotel, N., Rodriguez Viales, R., Armant, O., März, M., Ferg, M., Rastegar, S., & Strähle, U. (2015). Comprehensive expression map of transcription regulators in the adult zebrafish telencephalon reveals distinct neurogenic niches. *Journal of Comparative Neurology*, 523(8), 1202-1221.
 91. Diotel, N., Vaillant, C., Gabbero, C., Mironov, S., Fostier, A., Gueguen, M. M., & Pellegrini, E. (2013). Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Hormones and behavior*, 63(2), 193-207.
 92. Dirian, L., Galant, S., Coolen, M., Chen, W., Bedu, S., Houart, C., ... & Foucher, I. (2014). Spatial regionalization and heterochrony in the formation of adult pallial neural stem cells. *Developmental cell*, 30(2), 123-136.
 93. Doetsch, F. (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nature neuroscience*, 6(11), 1127.
 94. Doetsch, F., & Scharff, C. (2001). Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain, behavior and evolution*, 58(5), 306-322.
 95. Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11619-11624.
 96. Edelman, G. M., & Gally, J. A. (2013). Reentry: a key mechanism for integration of brain function. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 63.
 97. Ekström, P., Johnsson, C. M., & Ohlin, L. M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *Journal of Comparative Neurology*, 436(1), 92-110.
 98. Elbrecht, A., & Smith, R. G. (1992). Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, 255(5043), 467-470.
 99. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), 1313.
 100. Fernández, A. S., Rosillo, J. C., Casanova, G., & Olivera-Bravo, S. (2011). Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study. *Neuroscience*, 189, 12-24.

101. Fester, L., Prange-Kiel, J., Zhou, L., Blittersdorf, B. V., Böhm, J., Jarry, H., & Rune, G. M. (2012). Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 131(1-2), 24-29.
102. Font, E., Desfilis, E., Pérez-Cañellas, M. M., & García-Verdugo, J. M. (2001). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain, behavior and evolution*, 58(5), 276-295.
103. Forlano, P. M., & Bass, A. H. (2005). Steroid regulation of brain aromatase expression in glia: female preoptic and vocal motor nuclei. *Journal of neurobiology*, 65(1), 50-58.
104. Forlano, P. M., Deitcher, D. L., Myers, D. A., & Bass, A. H. (2001). Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *Journal of Neuroscience*, 21(22), 8943-8955.
105. Frick, K. M., Kim, J., Tuscher, J. J., & Fortress, A. M. (2015). Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning & Memory*, 22(9), 472-493.
106. Frye, C. A., & Walf, A. A. (2008). Progesterone to ovariectomized mice enhances cognitive performance in the spontaneous alternation, object recognition, but not placement, water maze, and contextual and cued conditioned fear tasks. *Neurobiology of learning and memory*, 90(1), 171-177.
107. Frye, C. A., Koonce, C. J., Edinger, K. L., Osborne, D. M., & Walf, A. A. (2008). Androgens with activity at estrogen receptor beta have anxiolytic and cognitive-enhancing effects in male rats and mice. *Hormones and behavior*, 54(5), 726-734.
108. Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.
109. Gage, F. H. (2002). Neurogenesis in the adult brain. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 612-613.
110. Galant, S., Furlan, G., Coolen, M., Dirian, L., Foucher, I., & Bally-Cuif, L. (2016). Embryonic origin and lineage hierarchies of the neural progenitor subtypes building the zebrafish adult midbrain. *Developmental biology*, 420(1), 120-135.

111. Ganz, J., Kaslin, J., Hochmann, S., Freudenreich, D., & Brand, M. (2010). Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon. *Glia*, 58(11), 1345-1363.
112. García, D., Loureiro, M., & Tassino, B. (2008). Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 243-248.
113. García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Turner, B., Santiñaque, F., López-Carro, B., & Folle, G. (2014). Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 142(1), 87-98.
114. Garcia-Segura, L. M. (2008). Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 705-712.
115. Garcia-Verdugo, J. M., Llahi, S., Ferrer, I., & Lopez-Garcia, C. (1989). Postnatal neurogenesis in the olfactory bulbs of a lizard. A tritiated thymidine autoradiographic study. *Neuroscience letters*, 98(3), 247-252.
116. Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one*, 4(5), e5464.
117. Gelinas, D., Pitoc, G. A., & Callard, G. V. (1998). Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA:: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Molecular and cellular endocrinology*, 138(1-2), 81-93.
118. Glasauer, S. M., & Neuhauss, S. C. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular genetics and genomics*, 289(6), 1045-1060.
119. Goldman, S. A., & Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(8), 2390-2394.
120. Goto-Kazeto, R., Kight, K. E., Zohar, Y., Place, A. R., & Trant, J. M. (2004). Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *General and comparative endocrinology*, 139(1), 72-84.
121. Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). Developmental cell biology: The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(10), 777.
122. Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult

- monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3168-3171.
123. Gould, C. J., Saldanha, C. J., & Connaughton, V. P. (2019). Acute exposure to 4-OH-A, not PCB1254, alters brain aromatase activity but does not adversely affect growth in zebrafish. *Environmental toxicology and pharmacology*, 68, 133-140.
124. Gould, E., & Tanapat, P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*, 46(11), 1472-1479.
125. Graham-Lorence, S., Peterson, J. A., Amarneh, B., Simpson, E. R., & White, R. E. (1995). A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Science*, 4(6), 1065-1080.
126. Grandel, H., & Brand, M. (2013). Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Development genes and evolution*, 223(1-2), 131-147.
127. Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., & Brand, M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental biology*, 295(1), 263-277.
128. Gray, G. E., & Sanes, J. R. (1992). Lineage of radial glia in the chicken optic tectum. *Development*, 114(1), 271-283.
129. Hallgren, S. L., Linderoth, M., & Olsén, K. H. (2006). Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *General and Comparative Endocrinology*, 147(3), 323-328.
130. Heimovics, S. A., Ferris, J. K., & Soma, K. K. (2015). Non-invasive administration of 17 β -estradiol rapidly increases aggressive behavior in non-breeding, but not breeding, male song sparrows. *Hormones and behavior*, 69, 31-38.
131. Hinfray, N., Nobrega, R. H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Marechal, E., Chadili, E., & Brion, F. (2013). Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *Journal of Endocrinology*, 216(3), 375-388.
132. Hojo, Y., Murakami, G., Mukai, H., Higo, S., Hatanaka, Y., Ogiue-Ikeda, M., & Kawato, S. (2008). Estrogen synthesis in the brain—role in synaptic

- plasticity and memory. *Molecular and cellular endocrinology*, 290(1-2), 31-43.
133. Hong, Y., & Chen, S. (2011). Aromatase, estrone sulfatase, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Structure-function studies and inhibitor development. *Molecular and cellular endocrinology*, 340(2), 120-126.
134. Horschke, N., Shimizu, K., & Sawamoto, K. (2012). Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Disease models & mechanisms*, 5(2), 200-209.
135. Hoyk, Z., Varga, C., & Parducz, A. (2006). Estrogen-induced region specific decrease in the density of 5-bromo-2-deoxyuridine-labeled cells in the olfactory bulb of adult female rats. *Neuroscience*, 141(4), 1919-1924.
136. Hsieh, J. (2012). Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes & development*, 26(10), 1010-1021.
137. Hu, X. L., Chen, G., Zhang, S., Zheng, J., Wu, J., Bai, Q. R., & Li, J. (2017). Persistent expression of VCAM1 in radial glial cells is required for the embryonic origin of postnatal neural stem cells. *Neuron*, 95(2), 309-325.
138. Huffman, L. S., O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2013). Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Physiology & behavior*, 112, 77-83.
139. Ijiri, S., Kazeto, Y., Lokman, P. M., Adachi, S., & Yamauchi, K. (2003). Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development. *General and comparative endocrinology*, 130(2), 193-203.
140. Il, f. (1958). Tome xiii: agnathes et poissons anatomie, ethologie, systématique en trois fascicules (17, 5 x 25) FASCICULE I. 926 pages, 627 figures, 1 planche en couleurs. *Le Naturaliste canadien*, 85, 225.
141. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., & Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature neuroscience*, 11(10), 1153.
142. Imura, T., Kornblum, H. I., & Sofroniew, M. V. (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain

- but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2824-2832.
143. Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., & Ito, H. (1999). A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes* (< Special Issue> A Brain Atlas of Medaka). *The fish biology journal Medaka*, 10, 1-26.
144. Ishunina, T. A., Fischer, D. F., & Swaab, D. F. (2007). Estrogen receptor α and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 28(11), 1670-1681.
145. Ishunina, T. A., Swaab, D. F., & Fischer, D. F. (2005). Estrogen receptor- α splice variants in the medial mamillary nucleus of Alzheimer's disease patients: identification of a novel MB1 isoform. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(6), 3757-3765.
146. Ito, H., & Yamamoto, N. (2008). Non-laminar cerebral cortex in teleost fishes?. *Biology letters*, 5(1), 117-121.
147. Ito, Y., Tanaka, H., Okamoto, H., & Ohshima, T. (2010). Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Developmental biology*, 342(1), 26-38.
148. Iwata, E., Mikami, K., Manbo, J., Moriya-Ito, K., & Sasaki, H. (2012). Social interaction influences blood cortisol values and brain aromatase genes in the protandrous false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Zoological science*, 29(12), 849-856.
149. Jakab, R. L., Harada, N., & Naftolin, F. (1994). Aromatase-(estrogen synthetase) immunoreactive neurons in the rat septal area. A light and electron microscopic study. *Brain research*, 664(1-2), 85-93.
150. Jeng, S. R., Yueh, W. S., Pen, Y. T., Gueguen, M. M., Pasquier, J., Dufour, S., & Kah, O. (2012). Expression of aromatase in radial glial cells in the brain of the Japanese eel provides insight into the evolution of the *cyp19a* gene in Actinopterygians. *PloS one*, 7(9), e44750.
151. Johns, P. R. (1977). Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *Journal of Comparative Neurology*, 176(3), 343-357.
152. Joven, A., & Simon, A. (2018). Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. *Progress in neurobiology*, 170, 81-98.
153. Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., & de Monbrison, D. (1993). The reproductive brain in fish. *Fish Physiology and biochemistry*, 11(1-6), 85-98.

154. Kani S, Bae YK, Shimizu T, Tanabe K, Satou C, Parsons MJ, Scott E, Higashijima S, Hibi M (2010) Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Dev Biol* 343:1-17
155. Kaplan, M. S. (1981). Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 195(2), 323-338.
156. Kaplan, M. S., & Bell, D. H. (1983). Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent—radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Experimental brain research*, 52(1), 1-5.
157. Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092-1094.
158. Karoubi, N., Segev, R., & Wullimann, M. F. (2016). The brain of the archerfish *Toxotes chatareus*: a nissl-based neuroanatomical atlas and catecholaminergic/cholinergic systems. *Frontiers in neuroanatomy*, 10, 106.
159. Kaslin, J., & Brand, M. (2013). Cerebellar development and neurogenesis in zebrafish. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*, 1441-1462.
160. Kaslin, J., Ganz, J., & Brand, M. (2007). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1489), 101-122.
161. Kaslin, J., Ganz, J., Geffarth, M., Grandel, H., Hans, S., & Brand, M. (2009). Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6142-6153.
162. Kaslin, J., Kroehne, V., Ganz, J., Hans, S., & Brand, M. (2017). Distinct roles of neuroepithelial-like and radial glia-like progenitor cells in cerebellar regeneration. *Development*, 144(8), 1462-1471.
163. Katsu, Y., Lange, A., Miyagawa, S., Urushitani, H., Tatarazako, N., Kawashima, Y., & Iguchi, T. (2013). Cloning, expression and functional characterization of carp, *Cyprinus carpio*, estrogen receptors and their differential activations by estrogens. *Journal of Applied Toxicology*, 33(1), 41-49.
164. Kempermann, G. (2016). Adult neurogenesis: an evolutionary perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(2), a018986.

165. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences*, 27(8), 447-452.
166. Khaleque, M. A., Bharti, A., Gong, J., Gray, P. J., Sachdev, V., Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2008). Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1. *Oncogene*, 27(13), 1886.
167. Kirn, J. R., Alvarez-Buylla, A., & Nottebohm, F. (1991). Production and survival of projection neurons in a forebrain vocal center of adult male
168. Kirsche, W. (1967). On postembryonic matrix zones in the brain of various vertebrates and their relationship to the study of the brain structure. *Zeitschrift fur mikroskopisch-anatomische Forschung*, 77(3), 313.
169. Kishida, M., & Callard, G. V. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, 142(2), 740-750.
170. Kishida, M., McLellan, M., Miranda, J. A., & Callard, G. V. (2001). Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2-3), 261-268.
171. Koketsu, D., Mikami, A., Miyamoto, Y., & Hisatsune, T. (2003). Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 937-942.
172. Kosodo, Y. (2012). Interkinetic nuclear migration: beyond a hallmark of neurogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(16), 2727-2738.
173. Koster RW, Fraser SE (2001) Direct imaging of in vivo neuronal migration in the developing cerebellum. *Curr Biol* 11:1858-1863
174. Kotrschal, K., & Palzenberger, M. (1992). Neuroecology of cyprinids: comparative, quantitative histology reveals diverse brain patterns. In *Environmental biology of European cyprinids* (pp. 135-152). Springer, Dordrecht.
175. Kotrschal, K., Hirschenhauser, K., & Möstl, E. (1998). The relationship between social stress and dominance is seasonal in greylag geese. *Animal Behaviour*, 55(1), 171-176.

176. Kotschal, K., Van Staaden, M. J., & Huber, R. (1998). Fish brains: Evolution and environmental relationships. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(4), 373-408.
177. Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, 149-184.
178. Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831-4841.
179. Kuroyanagi, Y., Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Naruse, K., & Takeuchi, H. (2010). Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain research*, 1323, 33-40.
180. Kwon, J. Y., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2001). Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 59(4), 359-370.
181. Langenberg T, Dracz T, Oates AC, Heisenberg CP, Brand M (2006) Analysis and visualization of cell movement in the developing zebrafish brain. *Dev Dyn* 235:928-933
182. Larsell, O. (1967). *The comparative anatomy and histology of the cerebellum*. University of Minnesota Press.
183. Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., Holland, E. C., & Steindler, D. A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13883-13888.
184. Le Page, Y., Diotel, N., Vaillant, C., Pellegrini, E., Anglade, I., Mérot, Y., & Kah, O. (2010). Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. *European Journal of Neuroscience*, 32(12), 2105-2115.
185. Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., & Pakdel, F. (2008). Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(10), 1549-1557.
186. Leonard, P. M., & Orth, D. J. (1988). Use of habitat guilds of fishes to determine instream flow requirements. *North American Journal of Fisheries Management*, 8(4), 399-409.

187. Leonard, R. B., Coggeshall, R. E., & Willis, W. D. (1978). A documentation of an age related increase in neuronal and axonal numbers in the stingray, *Dasyatis sabina*, Leseuer. *Journal of Comparative Neurology*, 179(1), 13-21.
188. Lephart, E. D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain research reviews*, 22(1), 1-26.
189. Leyhausen, C., Kirschbaum, F., Szabo, T., & Erdelen, M. (1987). Differential growth in the brain of the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus* (Gymnotiformes), during ontogenesis (Part 1 of 2). *Brain, behavior and evolution*, 30(3-4), 230-238.
190. Li, J., Oberly, P. J., Poloyac, S. M., & Gibbs, R. B. (2016). A microsomal based method to detect aromatase activity in different brain regions of the rat using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 163, 113-120.
191. Li, S., & Francisco, G. E. (2015). New insights into the pathophysiology of post-stroke spasticity. *Frontiers in human neuroscience*, 9, 192.
192. Lindsey, B. W., & Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in neurobiology*, 80(6), 281-307.
193. Lindsey, B. W., & Tropepe, V. (2014). Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. *Developmental neurobiology*, 74(11), 1053-1077.
194. Lindsey, B. W., Aitken, G. E., Tang, J. K., Khabooshan, M., Vandestadt, C., & Kaslin, J. (2018). Tectal stem cells display diverse regenerative capacities. *bioRxiv*, 268136.
195. Lindsey, B. W., Darabie, A., & Tropepe, V. (2012). The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 520(10), 2275-2316.
196. Lindsey, B. W., Di Donato, S., Kaslin, J., & Tropepe, V. (2014). Sensory-specific modulation of adult neurogenesis in sensory structures is associated with the type of stem cell present in the neurogenic niche of the zebrafish brain. *European Journal of Neuroscience*, 40(11), 3591-3607.
197. Liu, Z. H., Lu, G. N., Yin, H., & Dang, Z. (2015). Do we underestimate the concentration of estriol in raw municipal wastewater?. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4753-4758.

198. Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5), 2074-2077.
199. Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.
200. Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271(5251), 978-981.
201. Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Garcia-Verdugo, J. M., & Ferrer, I. (1988). Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. *Developmental Brain Research*, 43(2), 167-174.
202. Lopez-Rodriguez, A. B., Acaz-Fonseca, E., Giatti, S., Caruso, D., Viveros, M. P., Melcangi, R. C., & Garcia-Segura, L. M. (2015). Correlation of brain levels of progesterone and dehydroepiandrosterone with neurological recovery after traumatic brain injury in female mice. *Psychoneuroendocrinology*, 56, 1-11.
203. Loureiro, M., Duarte, A., & Zarucki, M. (2011). A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology*, 9(2), 335-342.
204. Luskin, M. B., Zigova, T., Soteris, B. J., & Stewart, R. R. (1997). Neuronal progenitor cells derived from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain continue to proliferate in vitro and express a neuronal phenotype. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 8(5), 351-366.
205. Lust, K., & Tanaka, E. M. (2019). A comparative perspective on brain regeneration in amphibians and teleost fish. *Developmental neurobiology*.
206. MacLusky, N. J., & Naftolin, F. (1981). Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, 1294-1303.
207. Maggi, R., Zasso, J., & Conti, L. (2015). Neurodevelopmental origin and adult neurogenesis of the neuroendocrine hypothalamus. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 440.
208. Makantasi, P., & Dermon, C. R. (2014). Estradiol treatment decreases cell proliferation in the neurogenic zones of adult female zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neuroscience*, 277, 306-320.
209. Maler, L., Sas, E., Johnston, S., & Ellis, W. (1991). An atlas of the brain of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Journal of chemical neuroanatomy*, 4(1), 1-38.

210. Manolides, L. S., & Baloyannis, S. J. (1984). Influence of Hydrocortizone, Progesterone and Testosterone on Dendritic Growth In Vitro. *Acta oto-laryngologica*, 97(5-6), 509-522.
211. Marchioro, M., Nunes, J. M. D. A. M., Ramalho, A. R., Molowny, A., Perez-Martinez, E., Ponsoda, X., & Lopez-Garcia, C. (2005). Postnatal neurogenesis in the medial cortex of the tropical lizard *Tropidurus hispidus*. *Neuroscience*, 134(2), 407-413.
212. Mares, V. L., & Lodin, Z. (1974). An autoradiographic study of DNA synthesis in adolescent and adult mouse forebrain. *Brain research*, 76(3), 557-561.
213. Marsh, K. E., Creutz, L. M., Hawkins, M. B., & Godwin, J. (2006). Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, *Thalassoma bifasciatum*: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase. *Brain research*, 1126(1), 91-101.
214. Martínez-Cerdeño, V., Noctor, S. C., & Kriegstein, A. R. (2006). The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 16(suppl_1), i152-i161.
215. Martínez-Guijarro, F. J., Blasco-Ibán, J. M., & Lopez-Garcia, C. (1994). Postnatal increase of GABA-and PV-IR cells in the cerebral cortex of the lizard *Podarcis hispanica*. *Brain research*, 634(1), 168-172.
216. Maruska, K. P., Zhang, A., Neboori, A., & Fernald, R. D. (2013). Social opportunity causes rapid transcriptional changes in the social behaviour network of the brain in an African cichlid fish. *Journal of neuroendocrinology*, 25(2), 145-157.
217. März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., & Strähle, U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia*, 58(7), 870-888.
218. Mateo, A. O., & de Artiñano, M. A. A. (2000). Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacological research*, 42(5), 421-427.
219. Meek, J., & Nieuwenhuys, R. (1998). Holosteans and teleosts. In *The central nervous system of vertebrates* (pp. 759-937). Springer, Berlin, Heidelberg.
220. Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., & Kah, O. (2003). Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and

- pituitary of female rainbow trout: comparison with estrogen receptor α . *Journal of Comparative Neurology*, 462(2), 180-193.
221. Menuet, A., Le Page, Y., Torres, O., Kern, L., Kah, O., & Pakdel, F. (2004). Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ER α , ER β 1 and ER β 2. *Journal of molecular endocrinology*, 32(3), 975-986.
222. Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., & Pakdel, F. (2002). Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of reproduction*, 66(6), 1881-1892.
223. Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M. M., Anglade, I., Pakdel, F., & Kah, O. (2005). Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *Journal of Comparative Neurology*, 485(4), 304-320
224. Meyer, Y., & Herth, W. (1978). Chemical inhibition of cell wall formation and cytokinesis, but not of nuclear division, in protoplasts of *Nicotiana tabacum* L. cultivated in vitro. *Planta*, 142(3), 253-262.
225. Mills, L. J., Gutjahr-Gobell, R. E., Zaroogian, G. E., Horowitz, D. B., & Laws, S. C. (2014). Modulation of aromatase activity as a mode of action for endocrine disrupting chemicals in a marine fish. *Aquatic toxicology*, 147, 140-150.
226. Minelli, G., & Mambelli, M. C. (1977). Preliminary study of the regenerative processes of the dorsal cortex of the telencephalon of *Lacerta viridis*. *Zeitschrift fur mikroskopisch-anatomische Forschung*, 91(2), 241-256.
227. Moradpour, F., Naghdi, N., & Fathollahi, Y. (2006). Anastrozole improved testosterone-induced impairment acquisition of spatial learning and memory in the hippocampal CA1 region in adult male rats. *Behavioural brain research*, 175(2), 223-232.
228. Morris, J. A., Jordan, C. L., & Breedlove, S. M. (2004). Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nature neuroscience*, 7(10), 1034.
229. Mouriec, K., Pellegrini, E., Anglade, I., Menuet, A., Adrio, F., Thieulant, M. L., & Kah, O. (2008). Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism

- implicating estrogens in neurogenesis?. Brain research bulletin, 75(2-4), 274-280.
230. Mukuda, T., & Ando, M. (2003). Brain atlas of the Japanese eel: comparison to other fishes. Mem Fac Integrated Arts and Sci, Hiroshima Univ, Ser IV, 29, 1-25.
231. Muñoz-Cueto, J. A. (2001). An atlas of the brain of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Sea Grant.
232. Muñoz-Cueto, J. A., Burzawa-Gérard, E., Kah, O., Valotaire, Y., & Pakdel, F. (1999). Cloning and sequencing of the gilthead sea bream estrogen receptor cDNA. DNA Sequence, 10(2), 75-84.
233. Nagler, J. J., Davis, T. L., Modi, N., Vijayan, M. M., & Schultz, I. (2010). Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. General and comparative endocrinology, 167(2), 326-330.
234. Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., & Gonzalez, F. J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. Journal of Biological Chemistry, 279(23), 23847-23850.
235. Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). Fishes of the World. John Wiley & Sons.
236. Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J. S., Wittbrodt, J., ... & Bourrat, F. (1999). Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): a morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. Journal of Comparative Neurology, 413(3), 385-404.
237. Nguyễn, V., Joly, J. S., & Bourrat, F. (2001). An *in situ* screen for genes controlling cell proliferation in the optic tectum of the medaka (*Oryzias latipes*). Mechanisms of development, 107(1-2), 55-67.
238. Nieuwenhuys, R. (1959). The structure of the telencephalon of the teleost *Gasterosteus aculeatus*. In Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. Ser. C (Vol. 62, pp. 341-362).
239. Nieuwenhuys, R. (1963). The comparative anatomy of the actinopterygian forebrain. Journal fur Hirnforschung, 7, 171.
240. Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., & Kriegstein, A. R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical

- ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *Journal of Neuroscience*, 22(8), 3161-3173.
241. Northcutt, R. G. (2006). Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. *Journal of Comparative Neurology*, 494(6), 903-943.
242. Nottebohm, F. (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 457(1), 143-161.
243. Nottebohm, F. (2002). Why are some neurons replaced in adult brain?. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 624-628.
244. Nottebohm, F., O'loughlin, B., Gould, K., Yohay, K., & Alvarez-Buylla, A. (1994). The life span of new neurons in a song control nucleus of the adult canary brain depends on time of year when these cells are born. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(17), 7849-7853.
245. Obukhov, D. K., Mayden, R. L., & Kuhajda, B. R. (2007). Comparative neuromorphology of the telencephalon of sturgeon of the genera *Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus* (Actinopterygii; Acipenseridae). *Journal of Applied Ichthyology*, 23(4), 348-353.
246. Okubo, K., Takeuchi, A., Chaube, R., Paul-Prasanth, B., Kanda, S., Oka, Y., & Nagahama, Y. (2011). Sex differences in aromatase gene expression in the medaka brain. *Journal of neuroendocrinology*, 23(5), 412-423.
247. Olivera-Pasilio, V., Peterson, D. A., & Castelló, M. E. (2014). Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum*. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 88.
248. Ormerod, B. K., Lee, T. T. Y., & Galea, L. A. M. (2003). Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Journal of neurobiology*, 55(2), 247-260.
249. Ou, R., & Yamamoto, N. (2016). Forebrain atlas of Japanese jack mackerel *Trachurus japonicus*. *Ichthyological research*, 63(3), 405-426.
250. Pakdel, F., Le Gac, F., Le Goff, P., & Valotaire, Y. (1990). Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. *Molecular and cellular endocrinology*, 71(3), 195-204.
251. Pasmanik, M., & Callard, G. V. (1985). Aromatase and 5 α -reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *General and comparative endocrinology*, 60(2), 244-251.

252. Pasmanik, M., & Callard, G. V. (1988). Changes in brain aromatase and 5 α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, 122(4), 1349-1356.
253. Passos, C., Tassinio, B., Reyes, F., & Rosenthal, G. G. (2014). Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. *PloS one*, 9(7), e101649.
254. Paton, J. A., & Nottebohm, F. N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225(4666), 1046-1048.
255. Paton, J. A., O'Loughlin, B. E., & Nottebohm, F. (1985). Cells born in adult canary forebrain are local interneurons. *Journal of Neuroscience*, 5(11), 3088-3093.
256. Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M. M., ... & Kah, O. (2007). Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 501(1), 150-167.
257. Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J., & Luskin, M. B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 21(17), 6706-6717.
258. Pérez-Cañellas, M. M., & García-Verdugo, J. (1996). Adult neurogenesis in the telencephalon of a lizard: a [3 H] thymidine autoradiographic and bromodeoxyuridine immunocytochemical study. *Developmental brain research*, 93(1-2), 49-61.
259. Pérez-Sanchez, F., Molowny, A., Garcia-Verdugo, J. M., & Lopez-Garcia, C. (1989). Postnatal neurogenesis in the nucleus sphericus of the lizard, *Podarcis hispanica*. *Neuroscience letters*, 106(1-2), 71-75.
260. Peterson, R. S., Yarram, L., Schlinger, B. A., & Saldanha, C. J. (2005). Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1576), 2089-2096.
261. Phan, A., Gabor, C. S., Favaro, K. J., Kaschack, S., Armstrong, J. N., MacLusky, N. J., & Choleris, E. (2012). Low doses of 17 β -estradiol rapidly

- improve learning and increase hippocampal dendritic spines. *Neuropsychopharmacology*, 37(10), 2299.
262. Pietranera, L., Bellini, M. J., Arevalo, M. A., Goya, R., Brocca, M. E., Garcia-Segura, L. M., & De Nicola, A. F. (2011). Increased aromatase expression in the hippocampus of spontaneously hypertensive rats: effects of estradiol administration. *Neuroscience*, 174, 151-159.
263. Pinto, L., & Götz, M. (2007). Radial glial cell heterogeneity—the source of diverse progeny in the CNS. *Progress in neurobiology*, 83(1), 2-23.
264. Polenov, A. L., & Chetverukhin, V. K. (1993). Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. *Cell and tissue research*, 271(2), 351-362.
265. Prange-Kiel, J., & Rune, G. M. (2006). Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience*, 138(3), 765-772.
266. Prange-Kiel, J., Dudzinski, D. A., Pröls, F., Glatzel, M., Matschke, J., & Rune, G. M. (2016). Aromatase expression in the hippocampus of AD patients and 5xFAD mice. *Neural plasticity*, 2016.
267. Rakic, P. (1978). Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgraduate medical journal*, 54, 25-40.
268. Rakic, P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46(9), 882-891.
269. Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 614-618.
270. Ramallo, M. R., Morandini, L., Birba, A., Somoza, G. M., & Pandolfi, M. (2017). From molecule to behavior: Brain aromatase (cyp19a1b) characterization, expression analysis and its relation with social status and male agonistic behavior in a Neotropical cichlid fish. *Hormones and behavior*, 89, 176-188.
271. Ransome, M. I., & Boon, W. C. (2015). Testosterone-induced adult neurosphere growth is mediated by sexually-dimorphic aromatase expression. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 253.
272. Raucci, F., Di Fiore, M. M., Pinelli, C., D'Aniello, B., Luongo, L., Polese, G., & Rastogi, R. K. (2006). Proliferative activity in the frog brain: a PCNA-immunohistochemistry analysis. *Journal of chemical neuroanatomy*, 32(2-4), 127-142.

273. Raymond, P. A., & Easter, S. S. (1983). Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. I. Location of germinal cells and numbers of neurons produced. *Journal of Neuroscience*, 3(5), 1077-1091.
274. Recher, G., Jouralet, J., Brombin, A., Heuzé, A., Mugniery, E., Hermel, J. M., ... & Peyriéras, N. (2013). Zebrafish midbrain slow-amplifying progenitors exhibit high levels of transcripts for nucleotide and ribosome biogenesis. *Development*, 140(24), 4860-4869.
275. Richter, W., & Kranz, D. (1981). Autoradiographic investigations on postnatal proliferative activity of the telencephalic and diencephalic matrix-zones in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*), with special references to the olfactory organ (author's transl). *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*, 95(6), 883-904.
276. Rieger S, Senghaas N, Walch A, Koster RW (2009) Cadherin-2 controls directional chain migration of cerebellar granule neurons. *PLoS Biol* 7:e1000240
277. Rojczyk-Gołębiewska, E., Pałasz, A., & Wiaderkiewicz, R. (2014). Hypothalamic subependymal niche: a novel site of the adult neurogenesis. *Cellular and molecular neurobiology*, 34(5), 631-642.
278. Roselli, C. E., Larkin, K., Schrunk, J. M., & Stormshak, F. (2004). Sexual partner preference, hypothalamic morphology and aromatase in rams. *Physiology & behavior*, 83(2), 233-245.
279. Rosillo Martí, J. C., Larrosa, G. C., Bravo, S. O., & Fernández, A. (2010). Heterogeneidad celular en la zona ventricular telencefálica: una región neurogénica del cerebro de *Austrolebias charrua*. *Acta Microscopica*, 19(2).
280. Rosillo, J. C., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., Garcia-Verdugo, J. M., & Fernandez, A. S. (2013). Olfacto-retinalis pathway in *Austrolebias charrua* fishes: a neuronal tracer study. *Neuroscience*, 253, 304-315.
281. Rosillo, J. C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J. M., & Fernández, A. S. (2016). Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall organization in *Austrolebias charrua*: cytoarchitecture, proliferation dynamics, neurogenesis and migration. *Neuroscience*, 336, 63-80.
282. Rothenaigner, I., Krecsmarik, M., Hayes, J. A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., ... & Bally-Cuif, L. (2011). Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon

- and characterizes their division properties and fate. *Development*, 138(8), 1459-1469.
283. Sager, T., Kashon, M. L., & Krajnak, K. (2018). Estrogen and environmental enrichment differentially affect neurogenesis, dendritic spine immunolabeling and synaptogenesis in the hippocampus of young and reproductively senescent female rats. *Neuroendocrinology*, 106(3), 252-263.
284. Sakamoto, T., Eguchi, H., Omoto, Y., Ayabe, T., Mori, H., & Hayashi, S. I. (2002). Estrogen receptor-mediated effects of tamoxifen on human endometrial cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 192(1-2), 93-104.
285. Saldanha, C. J., Rohmann, K. N., Coomaringam, L., & Wynne, R. D. (2005). Estrogen provision by reactive glia decreases apoptosis in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Journal of neurobiology*, 64(2), 192-201.
286. Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., ... & Belzung, C. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *science*, 301(5634), 805-809.
287. Santen, R. J., Brodie, H., Simpson, E. R., Siiteri, P. K., & Brodie, A. (2009). History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrine reviews*, 30(4), 343-375.
288. Schieweck, K., Bhatnagar, A. S., & Matter, A. (1988). CGS 16949A, a new nonsteroidal aromatase inhibitor: effects on hormone-dependent and-independent tumors in vivo. *Cancer research*, 48(4), 834-838.
289. Schnitzlein, H. N. (1964). Correlation of habit and structure in the fish brain. *American zoologist*, 21-32.
290. Seeley, E. S., & Nachury, M. V. (2010). The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J Cell Sci*, 123(4), 511-518.
291. Sellers, K. J., Erli, F., Raval, P., Watson, I. A., Chen, D., & Srivastava, D. P. (2015). Rapid modulation of synaptogenesis and spinogenesis by 17 β -estradiol in primary cortical neurons. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 137.
292. Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478(4), 359-378.

293. Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7153-7160.
294. Serra, W. S., & Loureiro, M. (2018). *Austrolebias* queguay (Cyprinodontiformes, Rivulidae), a new species of annual killifish endemic to the lower Uruguay river basin. *Zoosystematics and Evolution*, 94, 547.
295. Shanthanagouda, A. H., Guo, B. S., Rui, R. Y., Chao, L., Chiang, M. W., Singaram, G., ... & Au, D. W. (2014). Japanese medaka: a non-mammalian vertebrate model for studying sex and age-related bone metabolism in vivo. *PloS one*, 9(2), e88165.
296. Shanthanagouda, A. H., Nugegoda, D., & Patil, J. G. (2014). Effects of bisphenol A and fadrozole exposures on cyp19a1 expression in the Murray rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 67(2), 270-280.
297. Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., & Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410(6826), 372.
298. Simões, J. M., Teles, M. C., Oliveira, R. F., Van der Linden, A., & Verhoye, M. (2012). A three-dimensional stereotaxic MRI brain atlas of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *PloS one*, 7(9), e44086.
299. Simpson, E. R., & Davis, S. R. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives. *Endocrinology*, 142(11), 4589-4594.
300. Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., ... & Mendelson, C. R. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine reviews*, 15(3), 342-355.
301. Steele, R. E., Mellor, L. B., Sawyer, W. K., Wasvary, J. M., & Browne, L. J. (1987). In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition with the nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 16949A. *Steroids*, 50(1-3), 147-161.
302. Steinke, D., Hoegg, S., Brinkmann, H., & Meyer, A. (2006). Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. *BMC biology*, 4(1), 16.

303. Stevenson, J. A., & Yoon, M. G. (1982). Morphology of radial glia, ependymal cells, and periventricular neurons in the optic tectum of goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative Neurology*, 205(2), 128-138.
304. Straznicky, K., & Gaze, R. M. (1972). The development of the tectum in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *Development*, 28(1), 87-115.
305. Strobl-Mazzulla, P. H., Lethimonier, C., Gueguen, M. M., Karube, M., Fernandino, J. I., Yoshizaki, G., ... & Somoza, G. M. (2008). Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: neuroanatomical and functional relations. *General and comparative endocrinology*, 158(2), 191-201.
306. Strobl-Mazzulla, P. H., Moncaut, N. P., López, G. C., Miranda, L. A., Canario, A. V., & Somoza, G. M. (2005). Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *General and comparative endocrinology*, 143(1), 21-32.
307. Susumu Ohno (1970). *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag. ISBN 0-04-575015-7.
308. Suzuki, T., Miki, Y., Nakamura, Y., Ito, K., & Sasano, H. (2011). Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas. *Molecular and cellular endocrinology*, 340(2), 148-153.
309. Takahashi, K., Bergström, M., Frändberg, P., Vesström, E. L., Watanabe, Y., & Långström, B. (2006). Imaging of aromatase distribution in rat and rhesus monkey brains with [¹¹C] vorozole. *Nuclear medicine and biology*, 33(5), 599-605.
310. Taupin, P., & Gage, F. H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of neuroscience research*, 69(6), 745-749.
311. Tchoudakova, A., & Callard, G. V. (1998). Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, 139(4), 2179-2189.
312. Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), 112.
313. Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), 112.

314. Than-Trong, E., & Bally-Cuif, L. (2015). Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system. *Glia*, 63(8), 1406-1428.
315. Thornton, M. J., Nelson, L. D., Taylor, A. H., Birch, M. P., Laing, I., & Messenger, A. G. (2006). The modulation of aromatase and estrogen receptor alpha in cultured human dermal papilla cells by dexamethasone: a novel mechanism for selective action of estrogen via estrogen receptor beta? *Journal of investigative dermatology*, 126(9), 2010-2018.
316. Tong, S. K., Mouriec, K., Kuo, M. W., Pellegrini, E., Gueguen, M. M., Brion, F., ... & Chung, B. C. (2009). A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis*, 47(2), 67-73.
317. Torres-Pérez, M., Rosillo, J. C., Berrosteguieta, I., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J. M., & Fernández, A. S. (2017). Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain. *Brain research*, 1673, 11-22.
318. Traniello, I. M., Sîrbulescu, R. F., Ilieș, I., & Zupanc, G. K. (2014). Age-related changes in stem cell dynamics, neurogenesis, apoptosis, and gliosis in the adult brain: A novel teleost fish model of negligible senescence. *Developmental neurobiology*, 74(5), 514-530.
319. Tuge, H. (1934). Studies on cerebellar function in the teleost. I. Reactions resulting from cerebellar ablation. *Journal of Comparative Neurology*, 60(2), 201-224.
320. Tuge, H. (1934). Studies on cerebellar function in the teleost. II. Is there a cerebello-tectal path? Marchi method. *Journal of Comparative Neurology*, 60(2), 225-236.
321. Tuscher, J. J., Luine, V., Frankfurt, M., & Frick, K. M. (2016). Estradiol-mediated spine changes in the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex of ovariectomized female mice depend on ERK and mTOR activation in the dorsal hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 36(5), 1483-1489.
322. Tzchori, I., Zak, T., & Sachs, O. (2004). Masculinization of genetic females of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) by dietary administration of an aromatase inhibitor.
323. Ugur, P. K., Lule, S., Cincioglu, M., Pekiner, C., & Gursoy-Ozdemir, Y. (2011). Megestrol acetate inhibits the expression of cytoplasmic aromatase

- through nuclear C/EBP β in reperfusion injury-induced ischemic rat hippocampus. *European journal of pharmacology*, 654(3), 217-225.
324. Uno, T., Ishizuka, M., & Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34(1), 1-13.
325. Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., & Rustioni, A. (1992). NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *Journal of Comparative Neurology*, 321(2), 209-222.
326. Van de Kamer, J. C., & Schuurmans, A. J. (1953). Development and structure of the saccus vasculosus of *Scylliorhinus caniculus* (L.). *Development*, 1(1), 85-96.
327. van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030.
328. Vaz-Ferreira, Raúl, Sierra, B., & Scaglia, S. (1964). Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo, 26, 44-49.
329. Vidal Pizarro, I., Swain, G. P., & Selzer, M. E. (2004). Cell proliferation in the lamprey central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 469(2), 298-310.
330. Villeneuve, D. L., Knoebel, I., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Hammermeister, D. E., Greene, K. J., ... & Ankley, G. T. (2006). Relationship between brain and ovary aromatase activity and isoform-specific aromatase mRNA expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic toxicology*, 76(3-4), 353-368.
331. Villeneuve, D. L., Mueller, N. D., Martinović, D., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Jensen, K. M., ... & Ankley, G. T. (2008). Direct effects, compensation, and recovery in female fathead minnows exposed to a model aromatase inhibitor. *Environmental health perspectives*, 117(4), 624-631.
332. Volkmann K, Rieger S, Babaryka A, Koster RW (2008) The zebrafish cerebellar rhombic lip is spatially patterned in producing granule cell populations of different functional compartments. *Dev Biol* 313:167-180
333. Wade, J., Schlinger, B. A., Hodges, L., & Arnold, A. P. (1994). Fadrozole: a potent and specific inhibitor of aromatase in the zebra finch brain. *General and comparative endocrinology*, 94(1), 53-61.

334. Wagner, H. J. (2001). Brain areas in abyssal demersal fishes. *Brain, Behavior and Evolution*, 57(6), 301-316.
335. Wagner, H. J. (2001). Sensory brain areas in mesopelagic fishes. *Brain, Behavior and Evolution*, 57(3), 117-133.
336. Wagner, H. J. (2003). Volumetric analysis of brain areas indicates a shift in sensory orientation during development in the deep-sea grenadier *Coryphaenoides armatus*. *Marine Biology*, 142(4), 791-797.
337. Waldron, J., McCourty, A., & Lecanu, L. (2010). Neural stem cell sex dimorphism in aromatase (CYP19) expression: a basis for differential neural fate. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 3, 175.
338. Wang, C., Wang, J., Li, M., Miao, L., Zhao, L., & Chen, J. (2014). The genomic structure and expression patterns of *cyp19a1a* and *cyp19a1b* genes in the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(3), 785-793.
339. Wang, J., Liu, X., Wang, H., Wu, T., Hu, X., Qin, F., & Wang, Z. (2010). Expression of two cytochrome P450 aromatase genes is regulated by endocrine disrupting chemicals in rare minnow *Gobiocypris rarus* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 313-320.
340. Willardsen, M. I., & Link, B. A. (2011). Cell biological regulation of division fate in vertebrate neuroepithelial cells. *Developmental Dynamics*, 240(8), 1865-1879.
341. Wingate RJ (2001) The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* 11:82-88
342. Wourms, J. P. (1972). The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 182(3), 389-414.
343. Wulliman, M. F., Rupp, B., & Reichert, H. (1996). Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas. Birkhäuser.
344. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Morton, G. J., Ogimoto, K., Stanhope, K., Graham, J., ... & Barsh, G. S. (2005). Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. *PLoS biology*, 3(12), e415.
345. y Cajal, S. R. (1914). Degeneración y Regeneración de los Centros Nerviosos. In *Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del Sistema Nervioso* (Vol. 2). Moya Madrid.

346. Yague, J. G., Munoz, A., de Monasterio-Schrader, P., Defelipe, J., Garcia-Segura, L. M., & Azcoitia, I. (2006). Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience*, 138(2), 389-401.
347. Yague, J. G., Wang, A. C. J., Janssen, W. G., Hof, P. R., Garcia-Segura, L. M., Azcoitia, I., & Morrison, J. H. (2008). Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain research*, 1209, 115-127.
348. Yamamoto, S. I., Yamamoto, N., Kitamura, T., Nakamura, K., & Nakafuku, M. (2001). Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Experimental neurology*, 172(1), 115-127.
349. Yamamoto, T., & Ueji, K. (2011). Brain mechanisms of flavor learning. *Frontiers in systems neuroscience*, 5, 76.
350. Zhang, G., Pizarro, I. V., Swain, G. P., Kang, S. H., & Selzer, M. E. (2014). Neurogenesis in the lamprey central nervous system following spinal cord transection. *Journal of Comparative Neurology*, 522(6), 1316-1332.
351. Zhang, J. Y., He, S. B., Li, L., & Yang, H. Q. (2014). Auxin inhibits stomatal development through MONOPTEROS repression of a mobile peptide gene STOMAGEN in mesophyll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), E3015-E3023.
352. Zhang, J., Zuo, Z., Zhu, W., Sun, P., & Wang, C. (2013). Sex-different effects of tributyltin on brain aromatase, estrogen receptor and retinoid X receptor gene expression in rockfish (*Sebastes marmoratus*). *Marine environmental research*, 90, 113-118.
353. Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Wang, T., Dong, W., Chen, X., & Tao, L. (2014). Hydrogen sulfide offers neuroprotection on traumatic brain injury in parallel with reduced apoptosis and autophagy in mice. *PloS one*, 9(1), e87241.
354. Zhang, Q. G., Wang, R., Tang, H., Dong, Y., Chan, A., Sareddy, G. R., & Brann, D. W. (2014). Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. *Molecular and cellular endocrinology*, 389(1-2), 84-91.
355. Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, L., Zhao, H., Li, X., Huang, H., & Lin, H. (2007). The mRNA expression of P450 aromatase, gonadotropin β -subunits

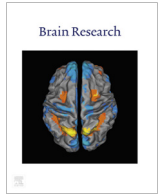
- and FTZ-F1 in the orange-spotted grouper (*Epinephelus Coioides*) during 17α -methyltestosterone-induced precocious sex change. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 74(6), 665-673.
356. Zhang, Y., Zhang, W. M., Yang, H. Y., Zhou, W. L., Hu, C. Q., & Zhang, L. H. (2008). Two cytochrome P450 aromatase genes in the hermaphrodite ricefield eel *Monopterus albus*: mRNA expression during ovarian development and sex change.
357. Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645-660.
358. Zhao, J., Dasmahapatra, A. K., Khan, S. I., & Khan, I. A. (2008). Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *Journal of ethnopharmacology*, 120(3), 387-393.
359. Zhao, Z., Fan, L., Fortress, A. M., Boulware, M. I., & Frick, K. M. (2012). Hippocampal histone acetylation regulates object recognition and the estradiol-induced enhancement of object recognition. *Journal of Neuroscience*, 32(7), 2344-2351.
360. Zikopoulos, B., Kentouri, M., & Dermon, C. R. (2000). Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). *Brain, behavior and evolution*, 56(6), 310-322.
361. Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., & Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 438-455.
362. Zupanc, G. K. (1999). Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain. *Journal of experimental biology*, 202(10), 1435-1446.
363. Zupanc, G. K. (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain, behavior and evolution*, 58(5), 250-275.
364. Zupanc, G. K. (2008). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *Journal of physiology-paris*, 102(4-6), 357-373.
365. Zupanc, G. K. H. (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *Journal of Comparative Physiology A*, 192(6), 649.
366. Zupanc, G. K., & Clint, S. C. (2003). Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia*, 43(1), 77-86.

367. Zupanc, G. K., & Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *Journal of Comparative Neurology*, 353(2), 213-233.
368. Zupanc, G. K., & Ott, R. (1999). Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced. *Experimental neurology*, 160(1), 78-87.
369. Zupanc, G. K., & Sîrbulescu, R. F. (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 917-929.
370. Zupanc, G. K., & Zupanc, M. M. (1992). Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (*Eigenmannia* sp.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9539-9543.
371. Zupanc, G. K., Hirsch, K., & Gage, F. H. (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 488(3), 290-319.
372. Zupanc, G. K., Horschke, I., Ott, R., & Rascher, G. B. (1996). Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. *Journal of Comparative Neurology*, 370(4), 443-464.

“La investigación científica original comienza en el preciso momento en que la sabiduría nos deja en la ignorancia”.

Clemente Estable

Anexo



Research report

Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain



Maximiliano Torres-Pérez^a, Juan Carlos Rosillo^{a,e}, Ines Berrosteguieta^a, Silvia Olivera-Bravo^b, Gabriela Casanova^c, José Manuel García-Verdugo^f, Anabel Sonia Fernández^{a,d,*}

^a Departamento NCIC, Neuroanatomía Comparada, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Avenida. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

^b Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE), Avenida. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

^c Unidad de Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^d Neuroanatomía Comparada, Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^e Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina UdelaR, Avda. General Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

^f Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, Paterna 46980, CIBERNED, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2017

Received in revised form 27 July 2017

Accepted 3 August 2017

Available online 8 August 2017

Keywords:

Stem cell

Fish brain

Cell proliferation

Austrolebias

ABSTRACT

Our previous studies demonstrated that *Austrolebias charrua* annual fish is an excellent model to study adult brain cell proliferation and neurogenesis due to the presence of active and fast neurogenesis in several regions during its short lifespan. Our main goal was to identify and localize the cells that compose the neurogenic areas throughout the *Austrolebias* brain. To do this, we used two thymidine halogenated analogs to detect cell proliferation at different survival times: 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) at 1 day and 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) at 30 days. Three types of proliferating cells were identified: I – transient amplifying or fast cycling cells that uptake CldU; II – stem cells or slow cycling cells, that were labeled with both CldU and IdU and did not migrate; and III – migrant cells that uptake IdU. Mapping and 3D-reconstruction of labeled nuclei showed that type I and type II cells were preferentially found close to ventricle walls. Type III cells appeared widespread and migrating in tangential and radial routes. Use of proliferation markers together with Vimentin or Nestin evidenced that type II cells are the putative stem cells that are located at the ventricular lumen. Double label cells with IdU+ and NeuN or HuC/D allowed us identify migrant neurons. Quantitation of labeled nuclei indicates that the proportion of putative stem cells is around 10% in all regions of the brain. This percentage of stem cells suggests the existence of a constant brain cell population in *Austrolebias charrua* that seems functional to the maintenance of adult neurogenesis.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The study of proliferation in the adult brain in different vertebrate taxa, has shown the existence of important differences in relation to the proliferative and neurogenic capacities (Font et al.,

2001; Nottebohm, 2002; Chapouton et al., 2007; Kaslin et al., 2008; Gould, 2007; Ming and Song, 2011; Maruska et al., 2012; Grandel and Brand, 2013). Proliferative capacity in the brain fulfill two essential objectives, first to generate new cells that support the structural growth and secondly, generate neurons that

Abbreviations: A, anterior thalamic nucleus; CC, crista cerebellaris; CCe, corpus cerebelli; Dc1, central zone of dorsal telencephalon; Dc2, central zone of dorsal telencephalon; Dd, dorsal zone of dorsal telencephalon; DIL, diffuse interior lobe of hypothalamus; DiV, diencephalic ventricle; Dm1-2-3-4, medial zone of dorsal telencephalon; Dp, posterior zone of dorsal zone of telencephalon; Dlv, ventro-lateral zone of dorsal telencephalon; Dld, dorso-lateral zone of dorsal telencephalon; gl, granular layer of cerebellum; ECL, external cellular layer; EG, eminentia granularis; GL, glomerular layer; H, hypothalamus; Hyp, hypophysis; ICL, internal cellular layer; IL, inferior lobe; OB, olfactory bulb; ON, optic nerve; OT, optic tectum; PGZ, periglomerular gray zone; PM, magnocellular preoptic nucleus; PoA, preoptic area; Ppp, parvocellular portion of preoptic nucleus; RMS, rostral migratory stream; SC, suprachiasmatic nucleus; Tel-D, dorsal zone of telencephalon; Tel-V, ventral zone of telencephalon; TeV, tectal ventricle; TL, torus longitudinalis; TS, torus semicircularis; Va, valvula cerebelli; Vd, dorsal zone of ventral telencephalon; VL, ventricular lumen; VM, ventro-medial thalamic nucleus; Vs, supracommisural zone of ventral telencephalon; Vv, ventral zone of ventral telencephalon.

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE), Avenida Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay.

E-mail addresses: mtorres@iibce.edu.uy (M. Torres-Pérez), jrosillo@iibce.edu.uy (J.C. Rosillo), solivera@iibce.edu.uy (S. Olivera-Bravo), casanova@fcien.edu.uy (G. Casanova), j.manuel.garcia@uv.es (J.M. García-Verdugo), anabelsonia@gmail.com, afernandez@iibce.edu.uy (A.S. Fernández).

contribute to the regulation of the correct activity of brain circuits (Song et al., 2002; Doesch, 2003a,b; Shen et al., 2004; Ma et al., 2005). New neurons continue to be added to specific regions like in the hippocampus of mammals throughout adulthood (Kempermann et al., 1997). Adult-born neurons are the progeny of precursor cells residing within specialized brain regions, termed neurogenic niches (García-Verdugo et al., 2002; Doesch, 2003a; Ma et al., 2005) that present some conserved characteristics across the species (Sullivan et al., 2007).

However, while the existence of postnatal neurogenesis has been demonstrated in all vertebrate groups studied, an important reduction in neurogenic sites is observed in more evolved brains. In mammals and birds, adult neurogenesis is restricted at telencephalic areas (Nottebohm, 2002; Sawada and Sawamoto, 2013). For instance, it occurs primarily in the telencephalic areas ventricular/subventricular zone (V-SVZ) (Lim and Álvarez-Buylla, 2014) of the lateral ventricle, which generates olfactory bulb interneurons, and the subgranular zone of the dentate gyrus, which produces hippocampal granular neurons (Abrous et al., 2005; Ming and Song, 2011). In reptiles, amphibians and fishes, the proliferative and neurogenic capacity is more widespread (Bernocchi et al., 1990; Chetverukhin and Polenov, 1993; Font et al., 2001).

In contrast, cell proliferation in teleost fish brain, which continues to grow throughout life, is one or two orders of magnitude greater than that observed in mammals. This cell proliferation occurs throughout the brain in dozens of well-defined areas called “proliferation zones”, that are located primarily at or near the surfaces of ventricles (Kirsche, 1967; Fernald, 1991; Zupanc and Horschke, 1995; Zikopoulos et al., 2000; Ekström et al., 2001; Kuroyanagi et al., 2010; Fernández et al., 2011; Tozzini et al., 2012). This widespread and abundant brain cell proliferation makes teleost useful to study adult neurogenesis and its influencing factors. In fishes, differences in brain cell proliferation is associated with environmental complexity and rearing conditions (Lema et al., 2005; von Krogh et al., 2010; Dunlap et al., 2011), sex and season (Zikopoulos et al., 2000, 2001; Ampatzis and Dermon, 2007; Dunlap et al., 2011) and social interactions and stress (Dunlap et al., 2006, 2008; Sorensen et al. 2007, 2011; Passos et al., 2013). However, most of these studies were performed in some species of fishes like *Danio rerio* (zebrafish) or *Oryzias latipes* (medaka) and have only examined a limited number of brain areas. In young zebrafish, Grandel's group demonstrates that neurogenesis increases over the course of the days, and the new neurons migrate surrounding the proliferation zones (Grandel et al., 2006). On the other hand, in zebrafish telencephalon, decreased neurogenesis in the physiologically aging specimens is correlated with an increasing quiescence of radial glia (Edelmann et al., 2013). In medaka fish, using PCNA and BrdU at different time points, it was possible to discriminate and localize fast and slow cycling cells in optic tectum (Alunni et al., 2010). Other works investigated neurogenesis in diverse teleost species at different experimental time-steps and age points. By using the annual fish *Nothobranchius furzeri* to study the effects of ageing on adult neurogenesis, Tozzini et al. (2012) compared the number of proliferating cells on the optic tectum between young and adult subjects, and the fate (migration and integration) of new born neurons by performing double staining of Ethinyl deoxyuridine (EDU) and neuronal markers (HuC/D) on brains taken at 5 and 11 weeks after analog injection. These authors demonstrated that exist a significant age-dependent decay in fish adult neurogenesis.

Our model, *Austrolebias charrua*, belongs to a genus of annual fishes withstand extreme environmental conditions, which put much of their life under pressure. Annual killifishes must endure a high degree of daily and seasonal variation in important environmental parameters such as temperature, oxygen concentration, pH, salinity, and, of course, water availability (Podrabsky et al., 2015).

When the puddles dry, *Austrolebias sp* die while being at full reproductive activity. They possess an uncharacteristically short life cycle among vertebrates, that is, less than a yearlong (maximum 8 months). This unique life cycle is correlated to the seasonal pools of water they inhabit both in the Africa and South America. The term “annual fishes” was coined to specifically refer to these short-lived vertebrates.

Therefore, according to fish metabolic status, it is highly probable that neurogenic activity is occurring at the time that ponds dry and the fish dies (Berois et al., 2015; Passos et al., 2014). In their short life *Austrolebias* presents sustained cell proliferation in all brain regions allowing that brain grows many times from the original size after hatching. These characteristics enable studies of the dynamics of cell proliferation and migration in short periods of time. It also allows quantitating and mapping of cell proliferation along the ventricular areas. To do this, we applied two similar proliferation markers at two different times, with a temporary window of 30 days. This window represents an important period of time taking into account the short life of the fish. This approach permits to observe what happen with cellular proliferation along the time, the fate and final location of newly generated cells and to recognize if migrant cells remain proliferating. It also allowed to quantitate cell proliferation, identify the main proliferative regions, and estimate the amount of putative stem cells relative to other proliferating cell populations.

We were able to demonstrate the presence of three proliferating populations: fast cycling cells confined to ventricular areas, migrant cells, and the third population of cells that do not migrate and capture both markers. These cells are the best candidates to be the brain stem cells. We expect that putative stem cells should be located near to the ventricular areas because these regions exhibited the highest cell proliferation indexes (Fernández et al., 2011; Rosillo et al., 2016).

2. Results

2.1. Immunohistochemistry for CldU and IdU

We used CldU and IdU labeling to obtain information about the origin, dynamics and migration of proliferating cells. Short (1 day CldU) and long (30 days IdU) experiments (Fig. 1) showed the temporal distribution of cell proliferating populations in the whole brain. Three populations of proliferative cells were identified: 1) CldU+ fast cycling cells were located close or at the ventricular zones; 2) IdU+ cells that migrate different distances from the ventricular lumen, and 3) CldU/IdU+ slow proliferating cells that do not migrate but reenter into the cell cycle indicated by the presence of the uptake of the second proliferation marker (Figs. 2 and 3A–C). The analysis of confocal orthogonal planes of brain serial sections, demonstrated the precise co-localization of CldU/IdU markers in cells that were confined to the ventricular lumen. Some of these double labeled cells were also positive to Vimentin (Figs. 3 and 8), or Nestin (Fig. 7).

2.2. Shape and size of labeled nuclei

CldU+ nuclei are predominantly elongated with a major axis of between 8 and 12 μm and a minor axis around 4–6 μm , with an intense and homogeneous label. IdU+ nuclei are rounded with about 5–7 μm of diameter and present heterogeneous intensity of IdU and CldU/IdU+ label are generally rounded with a diameter of about 6 μm and different intensities of each label. Orthogonal plane analysis of a 30 μm stack of confocal images showed both markers incorporated into different DNA fragments of a single nucleus (Fig. 3F).

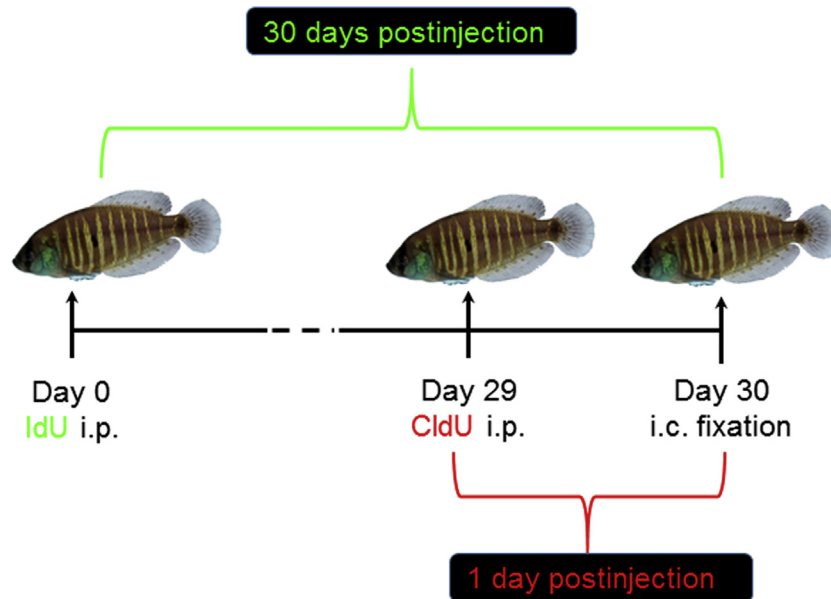


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design used for the intraperitoneal (i.p.) application of IdU (5-iodo-2'-deoxyuridine) and CldU (5-chloro-2'-deoxyuridine). Fishes were processed by intracardiac (i.c.) fixation at 30 days postinjection of IdU and 1 day postinjection of CldU, respectively.

2.3. Distribution of proliferative cells

We found CldU, IdU and CldU/IdU+ cells in brain regions studied. To identify the anatomical structures where the labeled cells are located, we correlated the sections stained with CldU and IdU with sections at the same level of the brain stained with methylene blue (Fig. 4). Brain structures were identified based on comparative information from other fish brain atlas (Wulliman et al., 1996; D'Angelo, 2013). The analysis of proliferative cells per region was made at the forebrain, midbrain and hindbrain.

2.3.1. Telencephalon

In the forebrain, at the most rostral portion is located the olfactory bulb (OB), that in *Austrolebias's* is composed by the internal cellular layer, (ICL) close to ventricular wall; the external cellular layer (ECL) in the middle of the OB and the glomerular layer (GL) in the periphery and the most peripheric band correspond to the olfactory nerve layer. CldU+ cells were preferentially found in the ventricular wall. Less abundant CldU+ cells were located in sub-ventricular zone. A band of proliferative cells showing different labels were recognized as the rostral migratory stream (RMS) commonly described in mammals from subventricular zone to OB (Fig. 2). In *Austrolebias*, RMS runs ventrally in the OB from the ventral ventricle of the telencephalon to the rostral portion of the OB. The migratory band of neurons runs through the olfactory nerve layer to the internal cellular layer. IdU+ cells were found in glomerular layer, external cellular layer and internal cellular layer. Some IdU+ cells were present in the ventricular lumen. CldU/ IdU+ cells were found in the ventricular wall along the entire OB from rostral to caudal.

The telencephalic hemispheres are separated by a prominent ventricle that extends from dorsal up to ventral zones. The neuronal groups are divided into two main areas: dorsal and ventral. The dorsal area is characterized by extensive medial (Dm), central (Dc), dorsal (Dd), lateral (Dl) and posterior (Dp) divisions. In the ventral telencephalon, dorsal (Vd) and ventral (Vv) cell groups were observed like in *Nothobranchius furzeri* (D'Angelo, 2013).

CldU+ nuclei were found preferentially in all ventricular telencephalic walls from the ventral up to the most dorsal portion. The highest concentration of CldU nuclei were observed in the

Vd and in the Vv that is coincident with OBS-Telencephalic transitional zone. There are CldU+ nuclei along of transitional zone between dorsal and ventral Telencephalon, (Figs. 2 and 3).

IdU+ cells were predominantly found in the ventral and medial zones located at different distances from the ventricular lumen. In the dorsal portion of the caudal telencephalon, IdU+ cells were widespread distributed and particularly abundant in the central zone (Dc1), in this zone were also found some CldU+ cells. There is a clear migratory line of IdU+ cells that was observed limiting the dorsal and ventral zone of dorsal Tel. IdU+ nuclei were located in the most ventral portion of the ventro-lateral zone of the dorsal telencephalon (Dlv) (Fig. 4). CldU/IdU+ nuclei were preferentially found in medial regions attached to the ventricular wall (Figs. 3 and 4).

2.3.2. Diencephalon

Cells labeled with both proliferation markers were found in the preoptic area (PoA) of the rostral diencephalic region. CldU+ and IdU+ cells were located in the wall of the diencephalic ventricle (DiV) in the magnocellular preoptic (PM), the anterior parvocellular preoptic (PPp) and suprachiasmatic (SC) nuclei (Fig. 4). Labeled cells were also found in other diencephalic areas including the epithalamus, dorsal thalamus, ventral thalamus and posterior tuberculum. IdU+ cells were identified at different distances from the ventricular wall in all of these regions (Fig. 2). Double labeled CldU/IdU+ nuclei were found at diffuse interior lobe of hypothalamus (DIL) and DiV predominantly in ventral zones (Fig. 2).

2.3.3. Torus longitudinalis and optic tectum

In multisensorial structures including the optic tectum (OT), torus longitudinalis (TL) and torus semicircularis (TS), CldU+ cells were mainly located at the adjoining wall of the tectal ventricle (TeV) as well as in the TL periphery. In this region, IdU+ cells seemed arranged in a second line that appears more internal than the row of CldU+ cells. CldU/IdU+ cells also were found in the TL (Fig. 4).

The medial pole of the OT preserved the TL pattern of proliferative cells with CldU+ cells forming a line that delineates the ventricular lumen and IdU+ cells arranged in a more internally line of likely migrating cells.

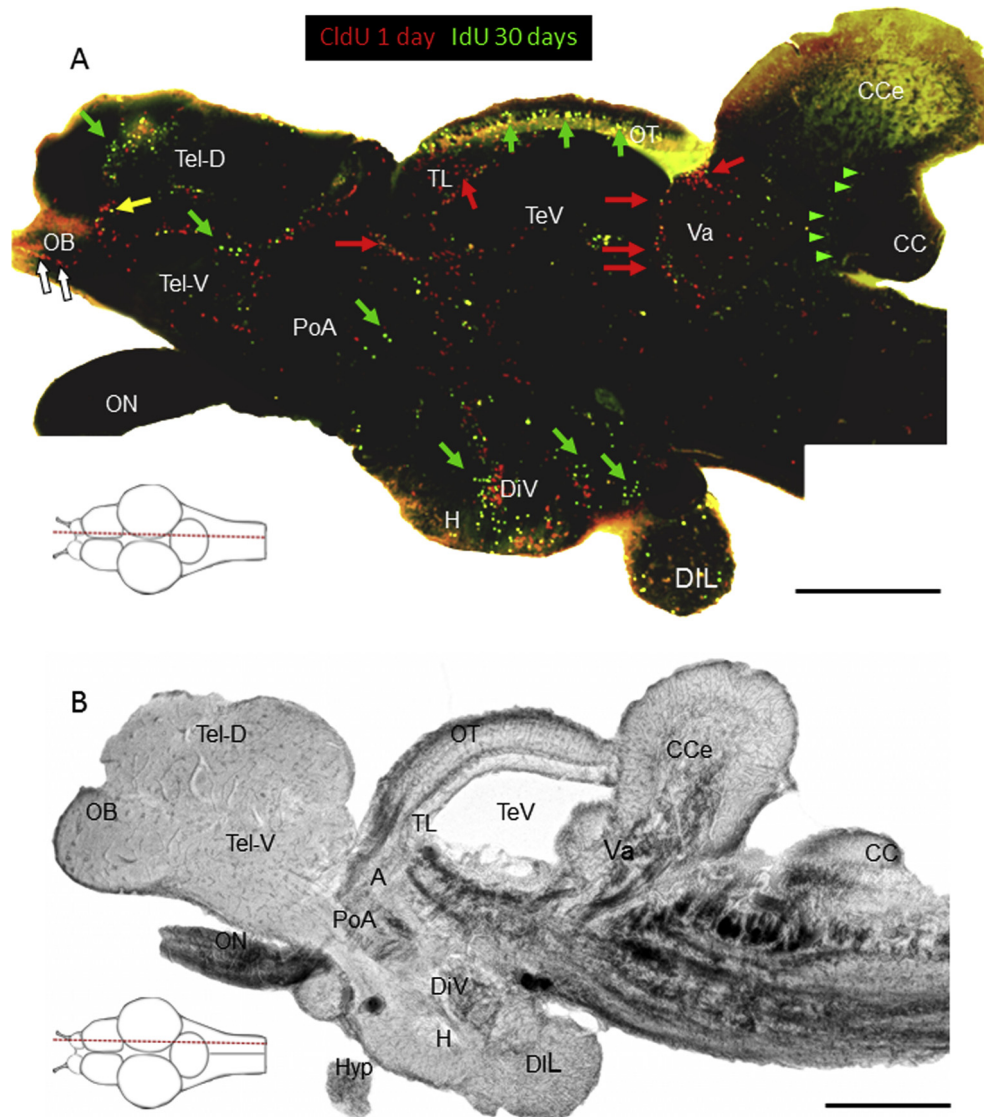


Fig. 2. A: Sagittal section of *Austrolebias charrua* brain evidencing a widespread cell proliferation. Fast proliferating cells line the ventricle walls (red arrows, CldU+) and the *valvula cerebelli* (Va). IdU+ cells are distributed deeper into the parenchyma and running in different migratory pathways (green arrows), as in the *cerebellum* (green arrowheads). The migratory rostral band that runs toward the rostral portion of the olfactory bulb (OB) is also evident (white arrows). CldU/IdU+ cells (yellow arrows) are also found in the ventricle zones of the whole brain. B: Unstained parasagittal vibratome section showing the areas where labeled nuclei were found. The schemes illustrate the level of each section. A, anterior thalamic nucleus; CC, crista cerebellaris; CCe, corpus cerebelli; DIL, diffuse interior lobe of hypothalamus; DiV, diencephalic ventricle; H, hypothalamus; Hyp, hypophysis; OB, olfactory bulb; ON, optic nerve; OT, optic tectum; PoA, preoptic area TL, torus longitudinalis; Tel-D, dorsal zone of telencephalon; Tel-V, ventral zone of telencephalon; TeV, tectal ventricle; VA, valvula cerebelli. Scale bar A and B: 1 mm.

2.3.4. Cerebellum

The cerebellum of *Austrolebias* fish exhibit four main divisions like in other teleosts: in the rostral pole is the *valvula* (Va) placed in ventricular area of the mesencephalon, the corpus cerebelli (CCe); eminentia granularis (EG) and cerebellar cristae (CC). Va and CCe shows similar layer organization consisting of molecular and granular layers and Purkinje cellular layer.

The three proliferative cell populations were mainly found in the *valvula cerebelli*, corpus cerebelli and caudal pole of the cerebellum. Most of the CldU+ cells were in the molecular layer of the corpus cerebelli with a minor number found in the granular cell layer. In some, but not in all transverse sections, lines of CldU labeled cells appeared oriented horizontally across the granular zone at the corpus cerebelli level. A mass of CldU+ cells was concentrated in a band beneath the pial surface in the medial apical pole of the corpus cerebelli. In the caudal pole, most of CldU+ cells were concentrated in the granular layer, predominantly in the ven-

tral region adjacent to the wall of the ventricle, which also had the highest number of labeled cells. IdU+ cells seemed concentrated bordering the granular layer suggesting migration from the *valvula cerebelli* (Fig. 2). A high concentration of CldU/IdU double labeled cells was observed in granular layer next to the *valvula cerebelli* (Fig. 4).

2.4. Quantitation of cell proliferation in *Austrolebias charrua* brain

Quantitation of the three cell proliferative populations was made in the olfactory bulbs, telencephalic lobes, diencephalon, optic tectum, torus longitudinalis and corpus cerebelli and *valvula cerebelli* of the cerebellum and caudal pole of the cerebellum (Fig. 5).

Proliferative cells were counted at the vicinity of ventricular zones (light blue areas in each scheme of Fig. 5). IdU+ cells were the most abundant and represented around the 55–60% of prolifer-

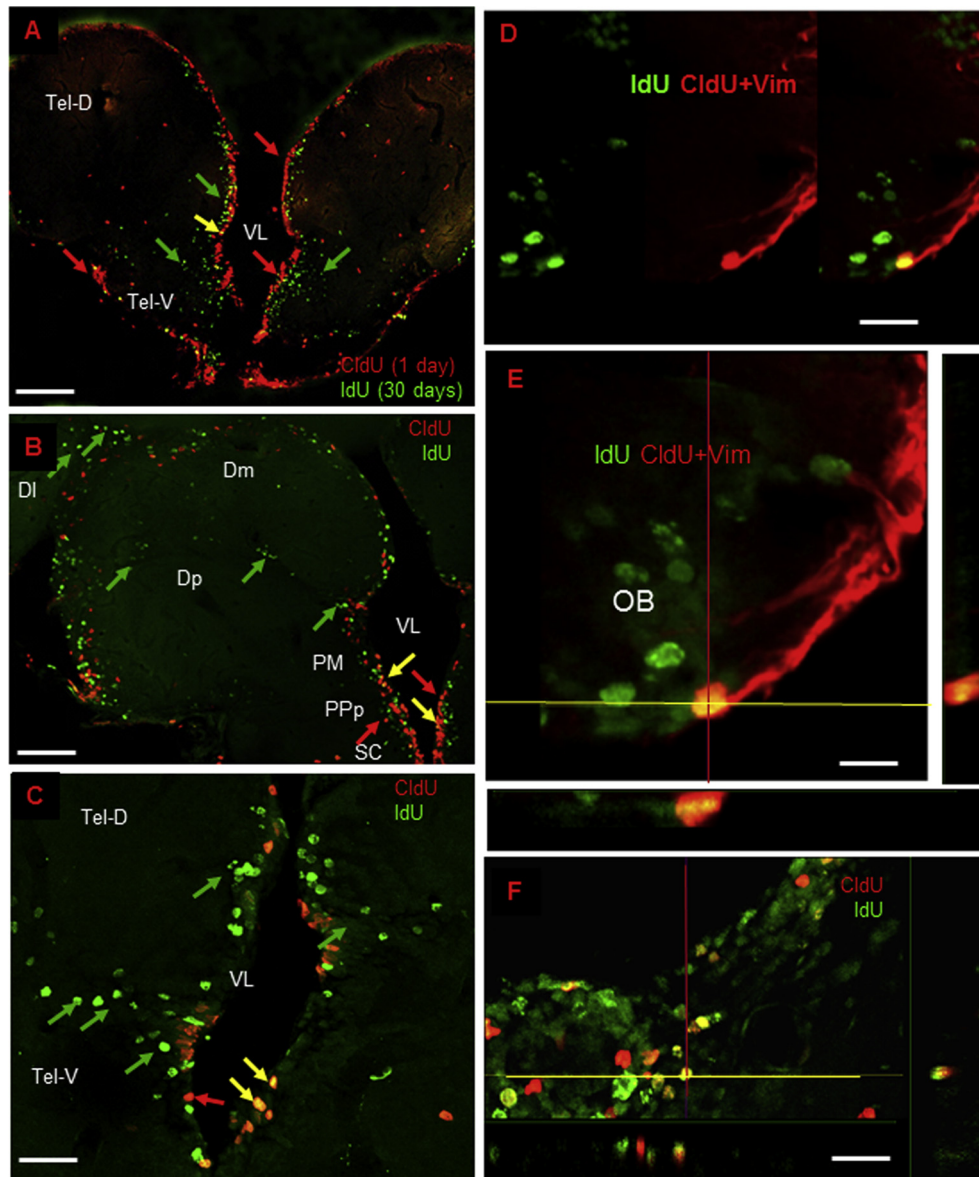


Fig. 3. CldU and IdU immunohistochemistry. **A–C:** Panoramic transverse section of the telencephalon showing the types and distribution of proliferative cells: IdU+ (green arrows); CldU+ (red arrows) and CldU/IdU+ cells (yellow arrows), respectively. Note the location of the putative stem cells and as IdU+ cells migrate in limiting or transitional areas. **D:** Separated channels showing the signal for the stem cell marker vimentin (Vim), CldU (red) and IdU (green). **E:** The merge of the three channels show as a CldU/IdU+ cell also express vimentin+ processes. **F:** Orthogonal plane analysis of a 30 µm stack of confocal images showing the signal for each proliferation marker in a single cell. **DI:** lateral zone of dorsal zone of telencephalon; **DM,** medial zone of dorsal zone of telencephalon; **Dp,** posterior zone of dorsal zone of telencephalon; **PM,** magnocellular preoptic nucleus; **PPp,** parvocellular portion of preoptic nucleus; **SC,** suprachiasmatic nucleus; **Tel-D,** dorsal zone of telencephalon; **Tel-V,** ventral zone of telencephalon; **VL,** Ventricular lumen. Scale bars: **A:** 150 µm; **B:** 50 µm; **C:** 30 µm; **D, E:** 20 µm; **F:** 25 µm.

ative cells in each area counted. These cells that had 30 days to migrate, were found disperses in the parenchyma and in many case forming cellular lines limiting anatomical structures (Fig. 3). CldU+ cells were preferentially located in the ventricular wall or at very few micrometers away from the lumen and are around the 30–35% of the total number of proliferative cells. CldU/IdU+ cells do not migrate, are predominantly located in the ventricular wall and represent around the 5–10% of total labeled cells. The percentage of each type of proliferative cell was maintained in all brain regions analyzed (Fig. 5).

2.5. Distribution of CldU+ and IdU+ cells in whole brain

The position of each labeled nucleus was plotted in brain serial transverse sections. Then these sections were uploaded to the soft-

ware BioVis3D to make the 3D-reconstruction of proliferative areas allowing the observation of the topographic location of each labeled nuclei in the whole brain.

Labeling of CldU+ cells demonstrated the contiguity of the location of proliferative cells along of rostro-caudal axis close to all ventricular regions throughout the brain (Fig. 6). Nevertheless, few CldU+ cells were found away from ventricular lumen in the optic tectum, the torus longitudinalis and cerebellum.

The mapping of IdU+ cells showed a radial distribution in all brain regions and a location at different distances from the ventricular lumen. The 3D-reconstruction allowed visualizing the existence of a flow of proliferative cells that are migrating from the ventricles or from other sites where new cells are continuously generated (Fig. 6).

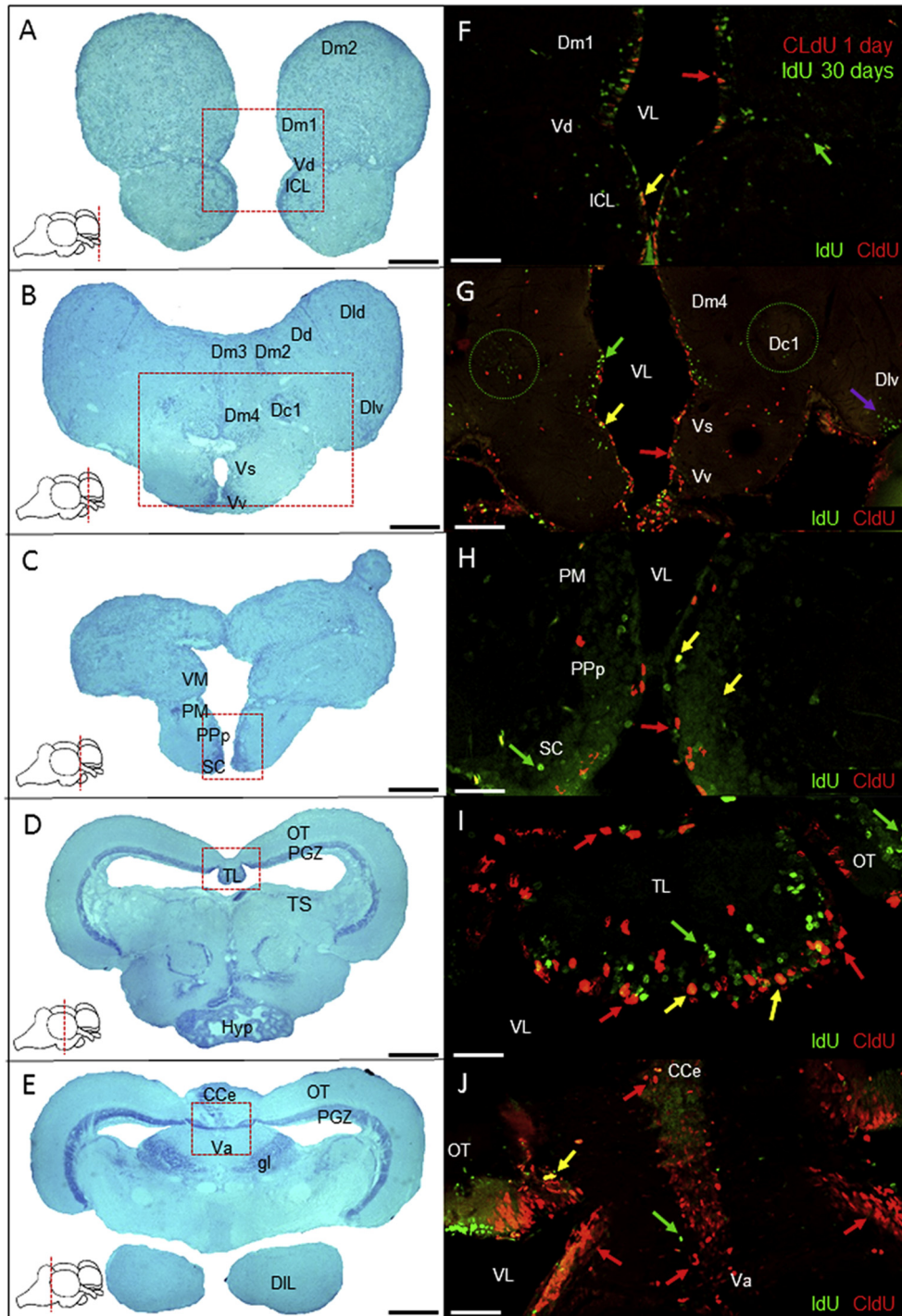


Fig. 4. Brain transverse sections at different rostro-caudal levels stained with Methylene blue (left images) and enlarged areas (red boxes) labeled with proliferation markers employed. Abundant IdU+ nuclei were found at the central zone of dorsal telencephalon (circle) and in the dorso-lateral zone of the dorsal telencephalon (violet arrow). IdU+ cells, green arrows; CldU+ cells, red arrows; CldU/IdU+ cells, yellow arrows; Cce, corpus cerebelli; DIL, diffuse inferior lobe of hypothalamus; Dm 1-2-3-4, medial zone of dorsal telencephalon; Dc1, central zone of dorsal telencephalon; Div, entro-lateral zone of dorsal telencephalon; Dd, dorsal zone of dorsal telencephalon; Dld, dorso-lateral zone of dorsal telencephalon; gl, granular layer of cerebelli; ICL, internal cellular layer; PM, magnocellular preoptic nucleus; PPp, parvocellular portion of preoptic nucleus; OT, optic tectum; PGZ, periglomerular gray zone; SC, suprachiasmatic nucleus; TL, longitudinal torus; Hyp, hypophysis; Va, valvula cerebelli; Vd, dorsal zone of ventral telencephalon; VM, ventro-medial thalamic nucleus; VL, ventricular lumen; Vs, supracommisural zone of ventral telencephalon; Vv, ventral zone of ventral telencephalon. Scale bars: A, C: 200 μ m; B: 150 μ m; D, E: 100 μ m, F, G: 50 μ m; H-J: 30 μ m, I: 20 μ m.

2.5.1. IdU positive cells co-localize with neuronal markers

IdU+ cells were found at different distances of ventricular light depending on the brain zone. In telencephalic areas the greatest numbers of IdU+ nuclei were found between 40 and 200 μ m of distance from ventricular lumen, since they had 30 days to migrate.

However in other structures like TL or in medial pole of OT, the IdU cells are organized in a second line near the CldU+ nuclei. These arrangements suggest that there are different rates of migration depending on the brain area. Moreover, IdU+ cells were found disperse for all regions of the brain, co-localizing with both

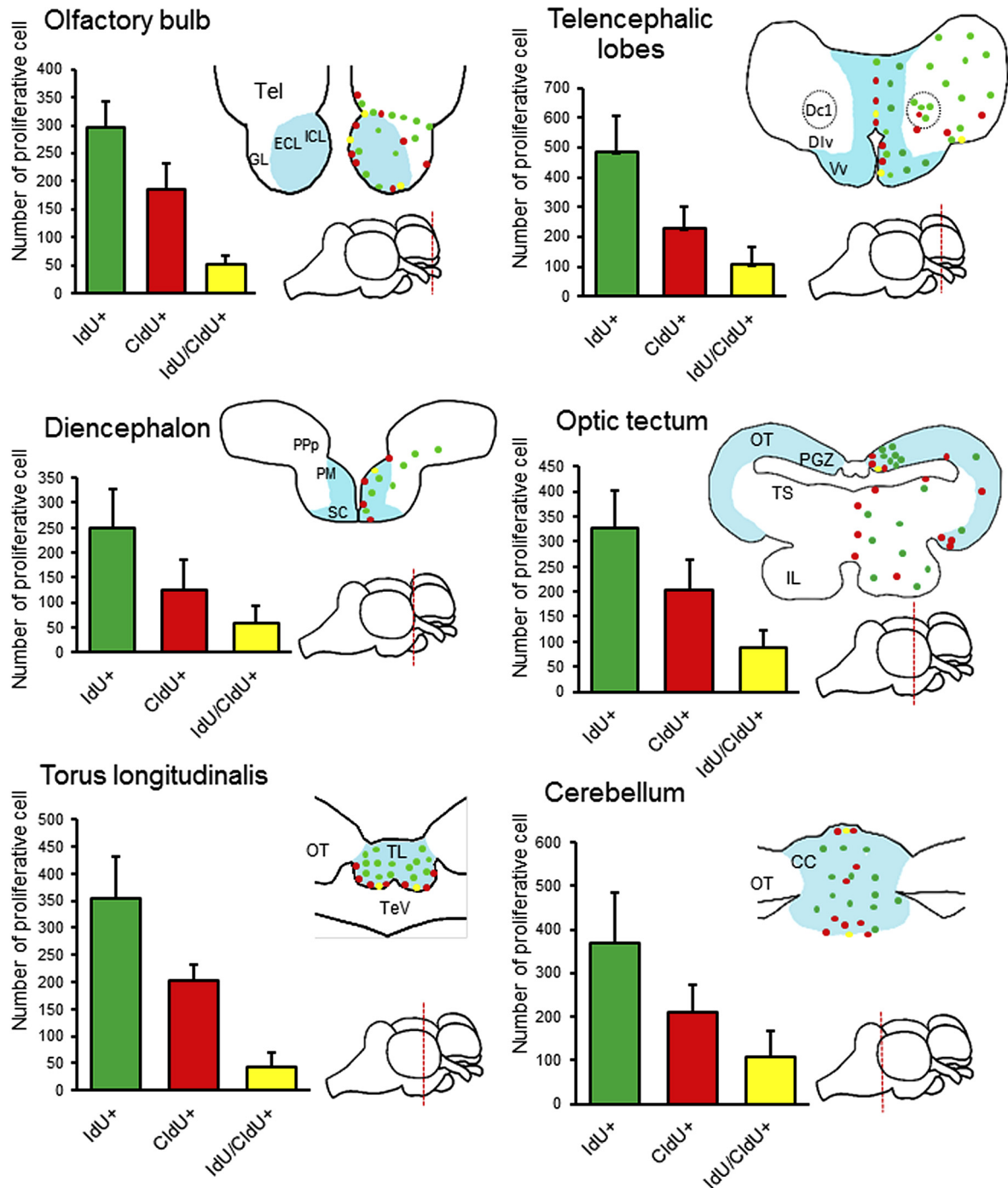


Fig. 5. Charts showing the quantitation of the three types of proliferating cells in six regions of six *Austrolebias charrua* brain. Each scheme shows the brain section at the level analyzed and the area quantitated is colored in light blue. Different color dots represent the distribution of the three proliferative cells. Six animals were employed to make the quantitation. CC, corpus cerebelli. DC1, central zone of dorsal telencephalon; Div: ventro-lateral zone of dorsal telencephalon; ECL, external cellular layer; GL, granular layer; ICL, internal cellular layer; IL, inferior lobe; OT, optic tectum; PGZ, periventricular gray zone of optic tectum, Ppp, parvocellular portion of preoptic area; PM, magnocellular preoptic nucleus; SC, suprachiasmatic nucleus; Tel, telencephalon; TeV, tectal ventricle; TS, torus semicircularis; TL, torus longitudinalis; Vv, ventral nucleus of ventral telencephalon.

neuronal markers NeuN and HuC/D that labels mature and young neurons, respectively (Fig. 7).

2.5.2. CldU/IdU+ cells (slow cycling cells) co-localize with Vimentin and Nestin

CldU/IdU+ cells, those that were found in minor proportion, were mainly rounded and located at ventricular lumen. These cells frequently co-localized with radial glial markers like Vimentin

(Fig. 3) and Nestin (Fig. 7) that is an intermediate filament protein known as a neural stem/progenitor cell marker (Chen et al., 2010). Vimentin co-localized with CldU+ cells in all ventricular regions as well as in the periphery. Cell processes positive to Vimentin were found throughout the whole *Austrolebias* brain parenchyma (Fig. 8). In contrast, Nestin expression were found in cells confined to the ventricular lumen and co-localized with CldU/IdU+ cells.

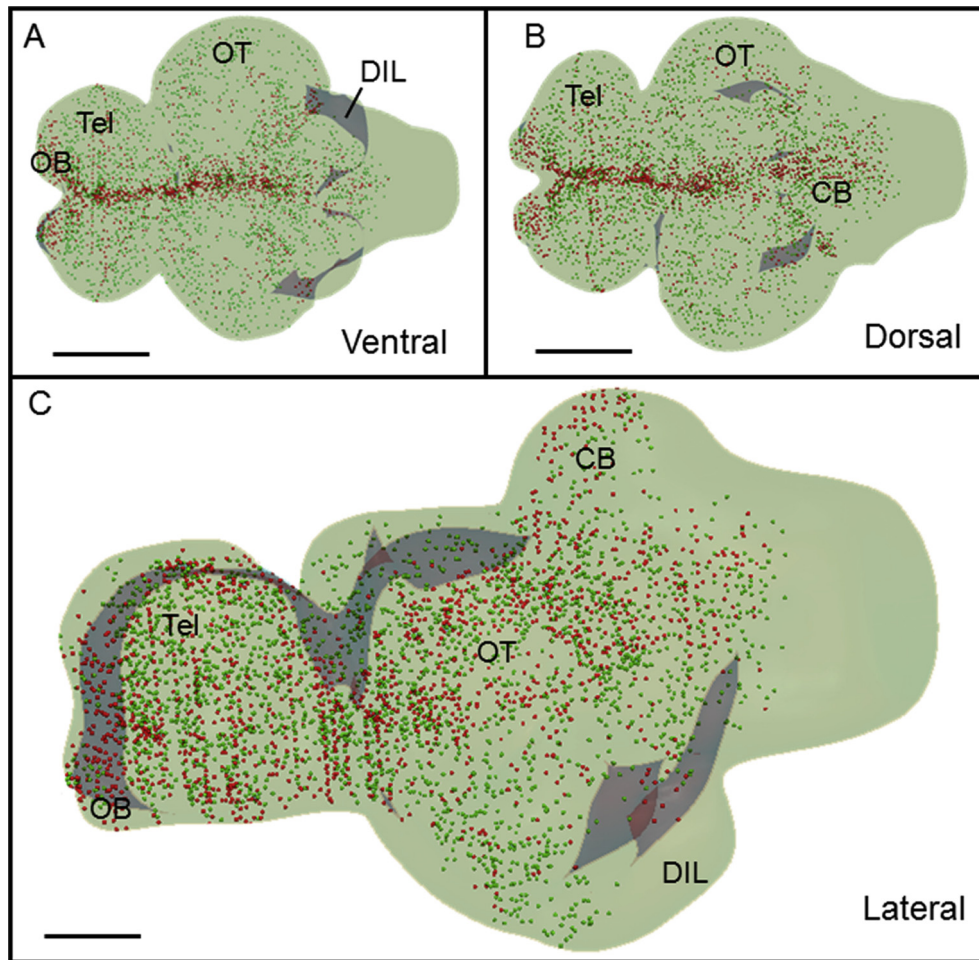


Fig. 6. Three-dimensional reconstruction of *Austrolebias charrua* brain showing the fast proliferating type I cells (red) and migratory type III cells (green) in three different views (ventral, dorsal and lateral). Note the concentration of CldU+ cells around the ventricle walls and the widespread location of IdU+ cells following sagittal and radial migrations. CB, cerebellum; DIL, diffuse inferior lobe of hypothalamus; OB: olfactory bulb, OT, optic tectum; Tel, telencephalon; TL, Torus longitudinalis; Scale bars: A, B: 1 mm; C: 500 μ m.

3. Discussion

In this study we combined two thymidine analogs (Vega and Peterson, 2005) to analyze the distribution and quantitate the newborn cells and the putative stem cells in the brain of adult *Austrolebias charrua* fish.

3.1. Types of proliferating cells

In our previous work in three species of *Austrolebias* fishes, we identified multiple proliferative places and species-dependent differences in cell proliferation indexes in olfactory and visual structures (Fernández et al., 2011). On the other hand, the use of CldU and IdU applied in dissimilar experimental survival time, showed different kind of progenitor cells distributed along the ventricular wall of the olfactory bulb of the *Austrolebias charrua* fish (Rosillo et al., 2016). The three types of cells that we previously described were coincident with that reported in vertebrate neurogenic niches and in zebrafish niches (Doetsch et al., 1998; García-Verdugo et al., 2002; Lindsey et al., 2012; see review Sawada and Sawamoto, 2013). In this work, we demonstrated that these three types of cells are distributed in a similar numerical proportion in ventricular zones of brain studied areas.

3.2. The temporal discrimination and identity of proliferating cells

The temporal discrimination of proliferating cell populations allowed us detecting three cell populations that are differentiable by their rate of proliferation, location and morphology in ventricular telencephalic walls of *Austrolebias charrua* (Rosillo et al., 2010, 2016). These data are concordant with our present studies. Therefore, CldU+ cells (1 day post-injection) are the fast proliferating or “transient amplifying” non migrating cells previously named as type I. These cells are coincident with fast proliferating cells described by Adolf in zebrafish using PCNA (Adolf et al., 2006) or fast cycling cells described by Grandel et al. (2006). IdU+ cells (30 days post-injection), denominated as type III cells, are those that maintain their proliferative state and migrate at different distances from the ventricular lumen. Migrant new born neurons identified by co-labeling of IdU together with NeuN and HuC/D are included within this population since they had time to differentiate and continue to proliferate at the time they are migrating. This finding coincides with the results described for the first time by Lois and Álvarez-Buylla (1994) in rodents. CldU/IdU+ cells, type II cells in Rosillo et al. (2010, 2016) are the best candidates to be the stem cells since they are slowly cycling and do not migrate (Wurmser et al., 2004). These results seem concordant with other studies performed with similar approaches in zebrafish (Grandel et al., 2006;

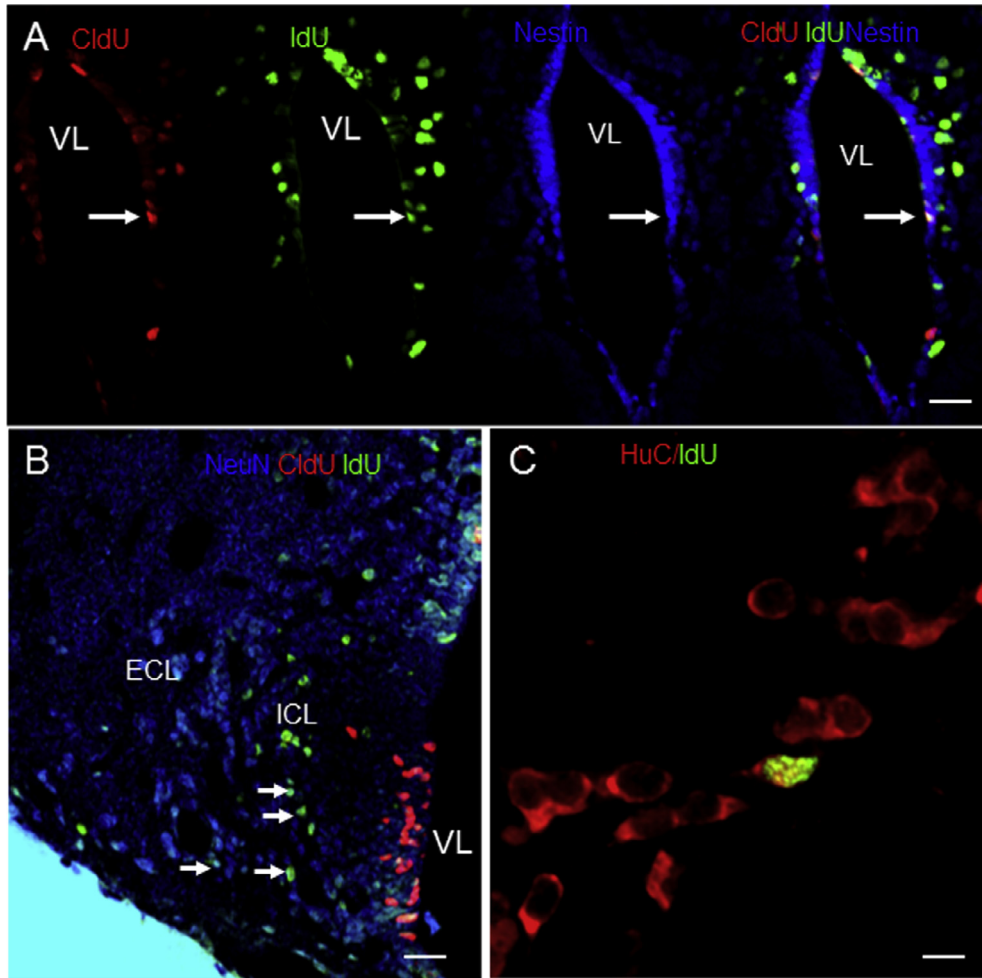


Fig. 7. A: Triple labeling of CldU/IdU/nestin (white arrow) found in the ventricular lumen. B: Co-labeling of CldU/IdU with NeuN evidencing that the neuronal marker only co-localizes with IdU (white arrows) in the ICL, farther from the OB ventricular lumen. C: Co-localization of IdU together with HuC deeper into the caudal telencephalic parenchyma. ECL, external cellular layer, ICL, internal cellular layer, VL, ventricular lumen. Scale bars: A: 40 μ m, B: 20 μ m; C: 10 μ m.

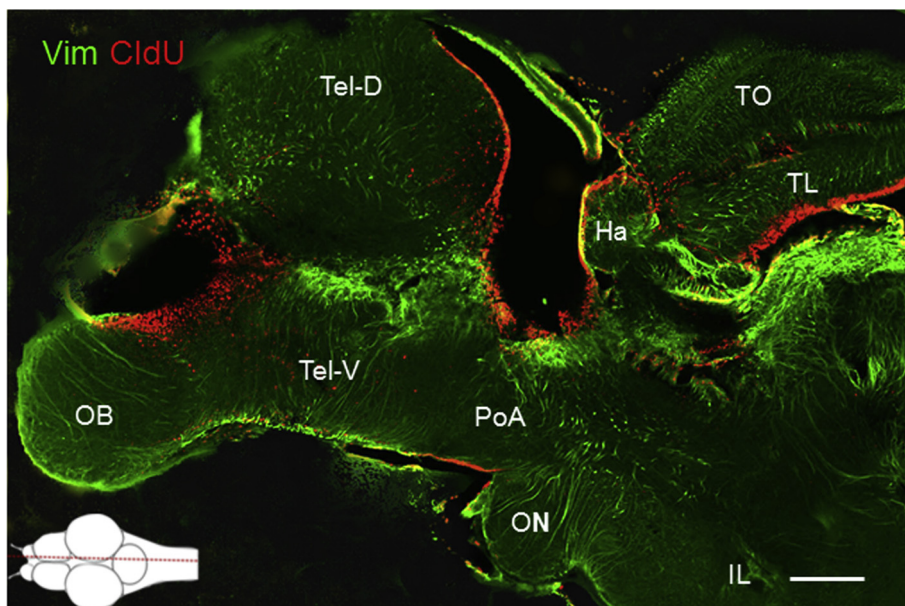


Fig. 8. Parasagittal section showing the distribution of radial glial cells, in the anterior and middle brain. Many of the vimentin+ cells co-localize with CldU in ventricular and peripheral zones. The scheme shows the level of the section. IL, inferior lobe; Ha, habenula; OB, olfactory bulb; ON, optic nerve; OT, optic tectum; PoA, preoptic area; TL, torus longitudinalis; Tel-D, dorsal zone of telencephalon; Tel-V, ventral zone of telencephalon. Scale bar: 200 μ m.

Edelmann et al., 2013), medaka (Alunni et al., 2010); and *Gymnotus omarorum* (Olivera-Pasilio et al., 2014). In our model we found the major population of IdU+ cells like migrated neurons HuC+ in many neurogenic niches (Rosillo et al., 2010, 2016).

For the first time, the three populations of proliferative cells were identified, quantitated and mapped in the main brain regions of *Austrolebias charrua* fish. Quantitation reveals a similar proportion of each proliferating cell type in all brain regions studied. IdU+ cells were the most abundant and almost duplicated the number of CldU+ cells. Likely, IdU+ cells are more abundant because there are 30 days of survival between the injection of the proliferation marker and the process of the fish. However the number of these cells could be underestimated because of the successive divisions can cause the loss of the signal. It is also probable that inside the IdU+ cells are found progenitor cells in different stages of differentiation and migrant neurons. IdU+ nuclei were arranged aligned behind of CldU+ cells, delimiting different brain areas, located in zones of transition. IdU+ cells were found in all cerebral structures from ventricular wall deeper into the parenchyma and its distribution in all regions serve as evidence of multi-migratory tangential and radial ways (Fig. 6).

We postulated that CldU+ cells are the transient amplifying cells described in mammal niches (Doetsch et al., 1997). In the sub-ventricular zone of the rodents these cells do not contact the ventricular lumen (Doetsch et al., 1998). However CldU+ cells are lining the ventricular lumen in *Austrolebias charrua* fish brain. However, in the valvula cerebelli we found CldU+ cells deeper into the parenchyma likely attending some functional cues about the cerebellum growth.

CldU/IdU+ cells were the less abundant and constitute up to 10% of the total proliferating cells. Likely, these cells are the stem cells because they do not migrate, uptake both markers of proliferation and also express Vimentin and Nestin, a validated marker of stem cells (Zupanc and Clint, 2003; Chen et al., 2010; Lindsey et al., 2012). Most of the CldU/IdU+ cells were found in the ventricular wall except in the granular layer of the cerebellum.

4. Conclusion

Our results strongly support the existence of significant cell proliferation in all brain areas of adult *Austrolebias charrua* fish. The three types of proliferating cells identified share a similar proportion and location in each brain area analyzed in spite of their own features regarding proliferation. Type I cells (the highly proliferative cells) are consistently found in ventricular walls along the whole rostro-caudal axis. The putative stem cells (type II) are the less abundant and predominantly located in the medial portions of the ventricular wall. Type III cells including migrated neurons are distributed along the ventricular areas beneath the type I cells and widespread in the brain parenchyma following migratory routes that are found very often in zones limiting different brain areas or structures. The proportion of putative stem cells found in this work suggests the existence of significant adult neurogenesis that likely is functional to the short lifespan and environmental challenges that *Austrolebias* support.

5. Experimental procedures

5.1. Animals

Austrolebias charrua fish (Cyprinodontiformes-Rivulidae) is a freshwater teleost that inhabits temporary ponds. When the ponds dry, all specimens die but desiccation-resistant embryonated eggs remain buried into the mud in developmental arrests or “diapauses” during 4 or 5 months (Wourms, 1972). Once the ponds

flooded in the next rainy season early in April, most embryos hatch at the same time. Fishes employed in this study were collected during September to November in transient ponds close to the major rivers in Rocha and Treinta y Tres, Uruguay. Therefore, fishes used in experiments were between 5 and 6 months of age and had an average length of 5 cm. Once fishes were collected, they were kept in 30 L glass aquariums with aerated, de-chlorinated tap water (pH 7–7.5) and exposed to natural light (14 h light/10 h darkness). Water (temperature 19 ± 1 °C) was partially changed every 5 days and the fishes were fed daily with live *Tubifex* sp. Before processing the fishes were deeply anesthetized by adding a 1:1000 v/v solution 10% Eugenol (Sigma, St. Louis, MO, USA) to the aquarium water until opercular movement ceased. After that, each fish was intracardially perfused with saline solution to wash the vascular system and then with specific fixative solutions according to the method employed. All procedures were approved by the local Committee for Animal Care and Research (CHEA, Udelar and CEUA, IIBCE), which follows NIH guidelines for maintenance and use of laboratory animals.

5.2. Experimental procedures to evaluate temporal discrimination of cell proliferation

One week later after the capture, twenty-eight adult males were employed in these experiments. The administration of different halogenated thymidine analogs that can be distinguished by specific primary antibodies together with careful timing between administrations has allowed for discriminating proliferating cell subpopulations in the brains of amniotes (Vega and Peterson, 2005; Llorens-Martín et al., 2010), anamniotes (Grandel et al., 2006; Alunni et al., 2010) and invertebrates (Sullivan et al., 2007). Therefore, to study dynamics of cell proliferation in neurogenic niches of the *Austrolebias charrua* brain, 18 adult fishes were used for this study. Twelve were injected via intraperitoneal with two halogenated thymidine analogs (IdU, CldU) at day 0 and/or 29, respectively. In all cases, thymidine analog administrations were done at 12 pm. Fishes were fed and housed in standard conditions since the capture until the processing.

5.2.1. CldU/ IdU-Experiments

Equimolar administration of IdU (57.5 mg/kg body weight) at day 0 and of CldU (42.5 mg/kg body weight) 29 days later were performed. At day 30, fishes were anesthetized and fixed with 10% PFA. In all experiments, IdU was dissolved in 0.7% NaCl and 0.04 N NaOH, and CldU in 0.7% NaCl, respectively (Fig. 1).

5.3. Sectioning brains

After fixation, dissection and post-fixation, tissue was transferred to phosphate buffer (PB) and maintained at 4 °C until processing. Fixed brains were serially sectioned (60 μ m thickness) in a Vibratome S1000 (Leica, Buffalo Grove, IL, USA), following sagittal and transverse planes. Finally, sections were transferred to multi-well plates for further free-floating immunohistochemistry processing.

5.4. Immunohistochemistry

Eight animals were used for combination with halogenated analogs and neuronal and glial markers, 6 were used for quantitation. Proliferation markers incorporated during S-phase were analyzed in tissue sections pretreated to break double-stranded DNA into single strands by incubation in 2 N HCl in PB containing 0.3% Triton X-100 (PB-T) for 45 min at room temperature. After several washes with PB (3 \times 10 min), proliferating cells were recognized immunohistochemically. To visualize CldU and IdU, tissue sections were

incubated 48 h at 4 °C with 1:500 dilutions of both rat anti-CldU/BrdU (Accurate, New York, USA) and mouse anti-IdU/BrdU (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Sections were rinsed in PB (3 × 10 min) and incubated in donkey anti-rat biotinylated secondary antibody at 1:500 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) in PB-T for 1 h. After that, sections were quickly washed 3 times in PB and incubated in a mixture of streptavidin conjugated to Cy3 at 1:500 and donkey anti-mouse Alexa 488 at 1:500 in PB-T for 90 min. Different triple label were performed combining CldU/IdU with mouse anti-vimentin 1:50 (Hybridoma Bank 40E); chicken anti-nestin 1:1000 (abcam); rabbit anti-NeuN (abcam) 1:500; rabbit anti HuC/D 1:100 (abcam). All sections were mounted with glycerol mounting medium and photographed. Fluorescent images were obtained using a confocal FV300 Olympus microscope with Fluoview 5.0 software. Sequential imaging and multi-plane view analysis were done using 20× (0.50 N.A.), 40× (0.75 N.A.) and 60× (1.42 N.A.) lenses.

5.5. Methylene blue staining

To stain sections of *Austrolebias charrua* brain with Methylene blue that allow recognizing cerebral regions and nuclei, six fixed brains were embedded in increasing concentrations of gelatin (10% and 20% for 24 h at 37 °C). Gelatin embedded brains were serially sectioned in a Vibratome S1000 (Leica, Buffalo Grove, IL, USA) at 20 μm of thickness following the transverse plane. Each section was collected in PB at 4 °C, mounted in gelatin covered slides until dry. Then, sections were washed in distilled water, stained with 1% aqueous solution of Methylene blue, dehydrated and finally mounted with Canada balsam mounting media. All stained sections were serially photographed under a Nikon light microscope with an attached Nikon Coolpix 995 camera.

5.6. Quantitation of proliferating cell number in six brain regions

Positive CldU and IdU nuclei present in consecutive brain sections were counted in six adult fishes. Image stacks of 30 μm with steps of 1 μm were obtained to quantitate cells labeled with both proliferation markers. The total average number of CldU (red), IdU (green), and CldU/IdU (yellow) cells in each region per fish (±S.D.) was plotted using Origin 8.0. Descriptive statistical analysis was done using Sigma Stat 2.0.

5.7. 3-D visualization of proliferative zones

Four brains were used for 3-D mapping of proliferative zones. Brains were serially sectioned in the transverse plane, and CldU and IdU immunofluorescence was performed. Confocal images were obtained and draw profiles of regions and positive nuclei were uploaded to the BioVis3D software. Each labeled nucleus was represented by dots of different colors that identify a different proliferation marker (CldU: red dots, IdU: green dots). Then, section profiles with corresponding colored dots were stacked to obtain the topographic representation of the proliferative zones along the whole brain.

References

- Abrous, D.N., Koehl, M., Le Moal, M., 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.* 85, 523–569.
- Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C.S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., Götz, M., Bally-Cuif, L., 2006. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol.* 295 (1), 278–293.
- Alunni, A., Hermel, J.M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., Joly, J., 2010. Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev. Neurobiol.* 70, 693–713.
- Ampatzis, K., Dermon, C.R., 2007. Sex differences in adult cell proliferation within the zebrafish (*Danio rerio*) cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1030–1040.
- Bernocchi, G., Scherini, E., Giacometti, S., Mares, V., 1990. Premitotic DNA synthesis in the brain of the adult frog (*Rana esculenta* L.): an autoradiographic 3H-thymidine study. *Anat. Rec.* 228, 461–470.
- Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G., Chalar, C., 2015. Life cycle, reproduction, and development in annual fishes: cellular and molecular aspects. In: Berois, N., García, G., de Sá, R.O. (Eds.), *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, Francis and Taylor Group, pp. 33–46.
- Chen, H.-L., Yuh, C.-H., Wu, K.K., 2010. Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PLoS ONE* 5 (2), e9318.
- Chapouton, P., Jagasia, R., Bally-Cuif, L., 2007. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays* 29, 745–757.
- Chetverukhin, V.K., Polenov, A.L., 1993. Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus I. Ventricular zone cell proliferation. *Cell Tissue Res.* 271, 341–350.
- D'Angelo, L., 2013. Brain atlas of an emerging teleostean model. *Nothobranchius furzeri* 296, 681–691.
- Doesch, F., 2003a. A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 543–550.
- Doesch, F., 2003b. The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 6, 1127–1134.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., Álvarez-Buylla, A., 1998. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., Álvarez-Buylla, A., 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17 (13), 5046–5061.
- Dunlap, K.D., Castellano, J.F., Prendaj, E., 2006. Social interaction and cortisol treatment increase cell addition and radial glia fiber density in the diencephalic periventricular zone of adult electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Horm. Behav.* 50, 10–17.
- Dunlap, K.D., McCarthy, E.A., Jashari, D., 2008. Electromunication signals alone are sufficient to increase neurogenesis in the brain of adult electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Dev. Neurobiol.* 68, 1420–1428.
- Dunlap, K.D., Silva, A.C., Chung, M., 2011. Environmental complexity, seasonality and brain cell proliferation in a weakly electric fish, *Brachyhyppopomus gauderio*. *J. Exp. Biol.* 214, 794–805.
- Edelmann, K., Glashauser, L., Sprungala, S., Hesel, B., Fritschle, M., Ninkovic, J., Godinho, L., Chapouton, P., 2013. Increased radial glia quiescence, decreased reactivation upon injury and unaltered neuroblast behavior underlie decreased neurogenesis in the aging zebrafish telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 521 (13), 3099–3115.
- Ekström, P., Johnsson, C.M., Ohlin, L.M., 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J. Comp. Neurol.* 436, 92–110.
- Fernald, R.D., 1991. Teleost vision: seeing while growing. *J. Exp. Zool.* 5167–5180.
- Fernández, A.S., Rosillo, J.C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S., 2011. Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (cyprinodontiform: rivulidae): a comparative study. *Neuroscience* 189, 12–24.
- Font, E., Desfilis, E., Pérez-Cañellas, M.M., García-Verdugo, J.M., 2001. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav. Evol.* 58, 276–295.
- García-Verdugo, J.M., Ferron, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E., Font, E., 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds and mammals. *Brain Res. Bull.* 57, 765–775.
- Gould, E., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (6), 481–488.
- Grandel, H., Brand, M., 2013. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Dev. Genes. Evol.* 223, 131–147.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., Brand, M., 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol* 295, 263–277.
- Kaslin, J., Ganz, J., Brand, M., 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. B* 363, 101–122.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495.
- Kirsche, W., 1967. Über postembryonale Matrixzonen im Gehirn verschiedener Vertebraten und deren Beziehung zur Hirnbauplanlehre. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 77, 313–406.
- Kuroyanagi, Y., Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Kubo, T., Takeuchi, T., 2010. Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain Res.* 1323, 33–40.
- Lema, S.C., Hodges, M.J., Marchetti, M.P., Nevitt, G.A., 2005. Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate. *Comp. Biochem. Phys. A* 141, 327–335.
- Lim, D.A., Álvarez-Buylla, A., 2014. Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci.* 37 (10), 563–571.
- Lindsey, B.W., Darabie, A., Tropepe, V., 2012. The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *J. Comp. Neurol.* 520, 2275–2316.
- Lorens-Martín, L., Torres-Alemán, M., Trejo, J.L., 2010. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behavior. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 109–117.
- Lois, C., Álvarez-Buylla, A., 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145–1148.

- Ma, D.K., Ming, G.L., Song, H., 2005. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 514–520.
- Maruska, K.P., Carpenter, R.E., Fernald, R.D., 2012. Characterization of Cell Proliferation throughout the Brain of the African Cichlid Fish *Astatotilapia burtoni* and its Regulation by Social Status.
- Ming, G.L., Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.
- Nottebohm, F., 2002. Neuronal replacement in adult brain. *Brain Res. Bull.* 6, 737–749.
- Olivera-Pasilio, V., Peterson, D.A., Castelló, M.E., 2014. Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum*. *Front. Neuroanat.* 8, 1–19.
- Passos, C., Tassino, B., Loureiro, B., Rosenthal, G.G., 2013. Intra and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behav. Proc.* 96, 20–26.
- Passos, C., Tassino, B., Reyes, F., Rosenthal, G., 2014. Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish *Austrolebias reicherti*. *PLoS One* 9, e101649.
- Podrabsky, J.E., Riggs, C.L., Wagner, J.T., Berois, N., García, G., de Sá, R.O., 2015. Tolerance of environmental stress. In: *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, Francis and Taylor Group, pp. 159–180.
- Rosillo, J.C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S., Fernández, A.S., 2010. Heterogeneidad celular en la zona ventricular telencefálica: una región neurogénica del cerebro de *Austrolebias charrua*. *Acta Microscópica* 2, 1521–1519.
- Rosillo, J.C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., Fernández, A.S., 2016. Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall Organization in *Austrolebias charrua*: cytoarchitecture, proliferation dynamics, Neurogenesis and migration. *Neuroscience* 336, 63–80.
- Sawada, M., Sawamoto, K., 2013. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio J. Med.* 62, 13–28.
- Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304 (5675), 1338–1340.
- Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H., 2002. Astroglia induces neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39–44.
- Sorensen, C., Bohlin, L.C., Orveli, O., Nilsson, G.E., 2011. Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol. Behav.* 102, 518–523.
- Sorensen, C., Orveli, O., Summers, C.H., Nilsson, G.E., 2007. Social Regulation of Neurogenesis in Teleosts. *Brain Behav. Evol.* 70, 239–246.
- Sullivan, J.M., Sandeman, D.C., Benton, J.L., Beltz, B.S., 2007. Adult neurogenesis and cell cycle regulation in the crustacean olfactory pathway: from glial precursors to differentiated neurons. *J. Mol. Hist.* 38, 527–542.
- Tozzini, E.T., Baumgart, M., Battistoni, G., Cellierino, A., 2012. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell* 11 (2), 241–251.
- Vega, C.J., Peterson, D.A., 2005. Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nat. Methods* 2, 167–169.
- von Krogh, K., Sorensen, C., Nilsson, G.E., Orveli, O., 2010. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiol. Behav.* 101, 32–39.
- Wourms, J.P., 1972. The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.* 182 (3), 389–414.
- Wulliman, M.F., Rupp, B., Reichert, H., 1996. Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas. Birkhäuser Verlag, Inc, Basel. 144 p.
- Wurmser, A., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2004. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 304, 1253–1255.
- Zikopoulos, B., Kentouri, M., Dermon, C.R., 2000. Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). *Brain Behav. Evol.* 56, 310–322.
- Zikopoulos, B., Kentouri, M., Dermon, C.R., 2001. Cell genesis in the hypothalamus is associated to the sexual phase of a hermaphrodite teleost. *Dev. Neurosci.* 12, 2477–2481.
- Zupanc, G.K.H., Horschke, I., 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353, 213–233.
- Zupanc, G.K.H., Clint, S.C., 2003. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia* 43 (1), 77–86.