



Informe Final de Pasantía

Licenciatura en Biología Humana UdelaR

**Nuevos abordajes experimentales para
el estudio de la neurogénesis en el
encéfalo de *Austrolebias charrua*
(*Cyprinodontiformes - rivulidae*)**

Maximiliano Torres Pérez

Tutora: PhD Anabel Fernández

Cotutora: MSc Gabriela Casanova

2014

Informe Final de Pasantía, Licenciatura en Biología Humana UdelaR

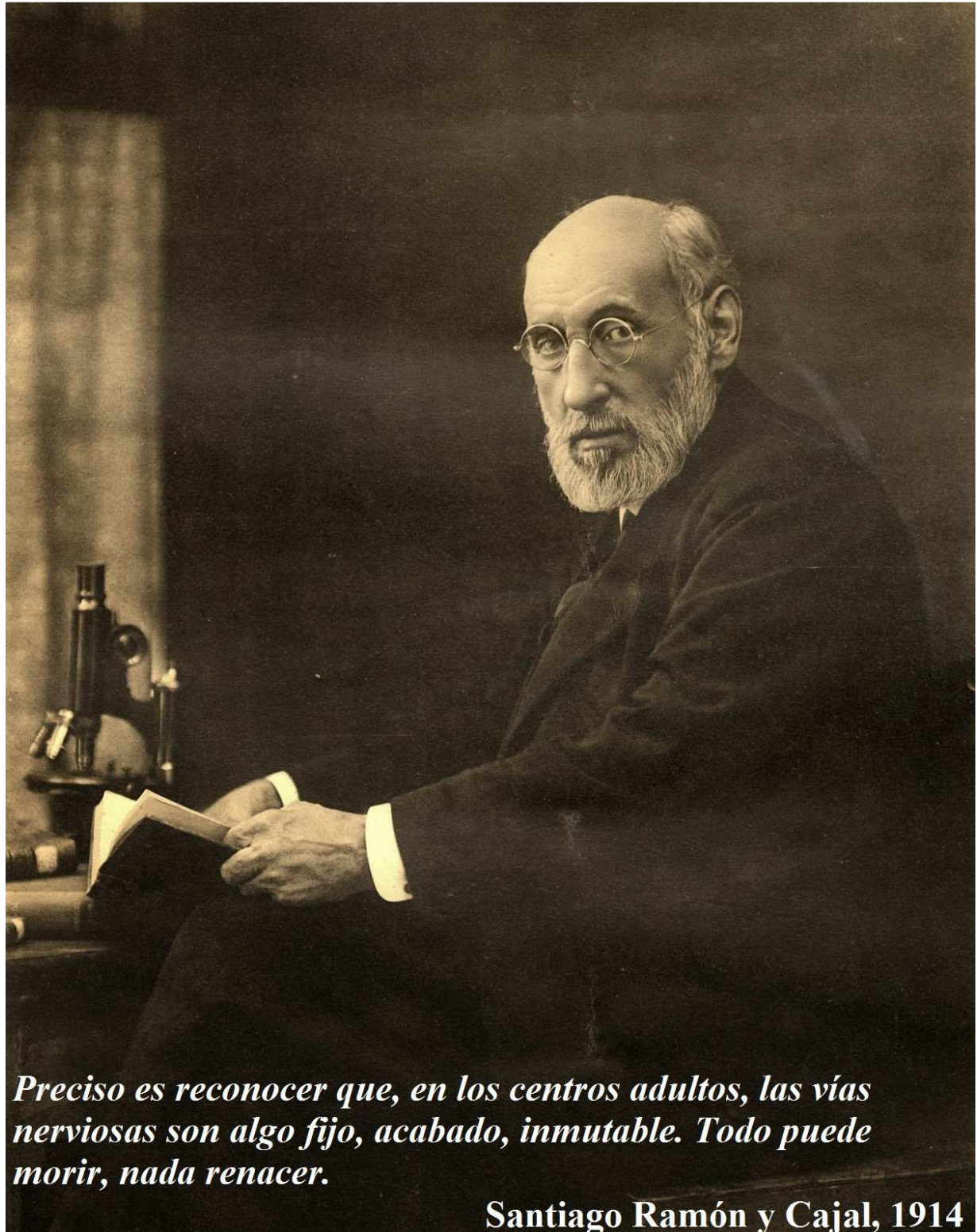
Nuevos abordajes experimentales para el estudio de la neurogénesis en el encéfalo de *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes - rivulidae)

Br. Maximiliano Torres Pérez

Tutora: PhD Anabel Fernández

Cotutora: MCs Gabriela Casanova

2014



Preciso es reconocer que, en los centros adultos, las vías nerviosas son algo fijo, acabado, inmutable. Todo puede morir, nada renacer.

Santiago Ramón y Cajal, 1914

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerle a mi tutora y madre en la ciencia Anabel Fernández, por la enseñanza que me ha brindado y por su tiempo invertido en mi formación. Porque directa e indirectamente ha dejado en mí buenas lecciones tanto profesionales como de la vida en general. Porque cuando me mandaba una macana me retaba si yo estaba bien, y me apoyaba si estaba mal. Por darme un lugar y confianza. Por ser una excelente tutora conmigo.

A mi cotutora Gabriela Casanova, por esa cálida modalidad de enseñanza que deja en nosotros sus estudiantes, con buena disposición y dedicación. Por sus consejos técnicos y de la vida en general.

A Juan Carlos Rosillo, por su enseñanza día a día y amabilidad cuando he necesitado de su ayuda.

Agradecerle enormemente a mi estimada Inés Reherrmann por “la profunda docencia de su lindo corazón”, por estar siempre dispuesta a ayudarme a pesar de estar metida en mil tareas.

A Silvia Olivera por sus valiosos aportes metodológicos en los aspectos cuantitativos de la tesis.

A mi compañera de laboratorio y de la vida Inés Berrosteguieta, por su buena onda constante y siempre caer en mis bromas.

A Gaby Martínez y Marcie Giménez, por sus valiosos aportes y enseñanza en microscopía electrónica.

A las chicas de Neurociencias Integrativas y Computacionales, Marita, Valentina y Moira, por su aliento y buena onda de todos los días.

A los demás compañeros con los que he compartido el laboratorio durante mi pasantía, neuroanatomía comparada - IIBCE, microscopía electrónica - Fcien.

A mis amigos y/o compañeros de facultad, por el constante aguante e inspiración.

Por sus aportes en mi formación: Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Facultad de Ciencias, Administración Nacional de Investigaciones e Innovaciones y Licenciatura en Biología Humana.

Por último, pero no menos importante, a mi madre, hermano y mi hermosa familia, porque el amor que nos une es un estímulo constante en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	6
PALABRAS CLAVE	7
ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	9
- Los marcadores de proliferación como herramienta para el estudio de la neurogénesis	10
- Ventajas de los peces como modelo biológico frente a los mamíferos	13
- Objetivos	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. El modelo biológico	15
2. Aplicación y revelado de los marcadores de proliferación celular	15
2.1. Diseño experimental	15
2.2 Administración de los marcadores de proliferación	16
2.3. Punto final y técnica de fijación de los peces	16
2.4. Técnica de disección, encastre y realización de los cortes	17
2.5. Detección inmunohistoquímica	17
2.6. Observación y fotografiado de los cortes	18
3. Cuantificación celular, cálculo de volúmenes y métodos de cuantificación	20
3.1. Cuantificación celular	20
3.2. Cálculos de volúmenes	20
3.3. Métodos de cuantificación	20
4. Procedimientos para microscopía electrónica de transmisión	21
4.1. Diseño experimental	21
4.2. Fijación, postfijación y primer contraste	21
4.3. Deshidratación del material biológico	21
4.4. Inclusión del material biológico	22

4.5. Realización de los cortes	23
4.6. Segundo contraste de los cortes	23
4.7. Observación en el microscopio electrónico	24
4.8. Procesamiento de imágenes	24
3. RESULTADOS	25
1. Detección inmunohistoquímica del IdU y CldU	25
1.1. Descripción de los tipos de núcleos marcados	25
1.2. Localización y distribución de las poblaciones celulares proliferantes en el encéfalo de <i>Austrolebias charrua</i>	28
1.2.1. Anatomía del encéfalo	28
1.2.2. Localización de las células proliferantes en las diferentes regiones cerebrales	29
1.3. Determinación de una zona para el estudio ultraestructural	32
2. Cuantificación celular	34
2.1. Cuantificación de las poblaciones celulares	34
2.2. Tasas de proliferación celular	36
3. Análisis ultraestructural de una región proliferativa	38
4. DISCUSIÓN	43
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA	50

Resumen

Las enfermedades neurológicas que afectan la salud humana causan importantes complicaciones en el funcionamiento normal del organismo y en muchos casos son debidas a la muerte neuronal y degeneración del tejido nervioso. El descubrimiento de que algunas neuronas siguen generándose en la etapa adulta, proceso denominado neurogénesis, ha generado nuevas expectativas sobre el conocimiento de la biología y salud humanas. La introducción de nuevos métodos para el estudio de la proliferación neural y neurogénesis ha logrado que entendamos mejor el mecanismo que subyace estos fenómenos. El objetivo de este trabajo es emplear análogos de la timidina para estudiar y discriminar temporalmente poblaciones de células proliferantes en el encéfalo de un vertebrado adulto, y realizar un análisis ultraestructural de una zona proliferativa mediante microscopía electrónica de transmisión. Se utilizaron seis machos adultos de *Austrolebias charrua* como modelo biológico, los cuales fueron inyectados intraperitonealmente con marcadores de proliferación celular, análogos halogenados de la timidina: iododesoxiuridina (IdU: día 0) y clorodesoxiuridina (CldU: día 29), para identificar y cuantificar las células proliferantes, mediante el revelado de los marcadores con técnicas inmunohistoquímicas, en todo el encéfalo. Para el análisis con microscopía electrónica se utilizaron 2 peces machos adultos y se procesaron las muestras del encéfalo correspondientes a una región proliferativa: la zona de transición entre los lóbulos telencefálicos y los bulbos olfatorios. La inmunohistoquímica reveló tres poblaciones celulares proliferantes: Células proliferantes que migran (las más abundantes), células altamente proliferantes (abundancia intermedia) y células que reentran al ciclo celular, firmes candidatas a células madre neurales (las menos abundantes). La región encefálica que posee mayor proliferación neta es el telencéfalo, y la que tiene mayor tasa de proliferación celular es el torus longitudinalis. La microscopía electrónica mostró que la zona de transición presenta características histológicas de nichos neurogénicos, como la presencia de glía radial.

Palabras Clave

Neurogénesis postnatal; Proliferación celular; Iododesoxiuridina, Clorodesoxiuridina; Glía radial; *Austrolebias charrua*

ABREVIATURAS

BrdU: Bromodesoxiuridina

IdU: Iododesoxiuridina

CldU: Clorodesoxiuridina

MET: Microscopía electrónica de transmisión

BO: Bulbo olfatorio

Tel: Telencéfalo

DE: Diencefalo

TL: Torus longitudinalis

TO: Tectum óptico

Cb: Cerebelo

ZT: Zona de transición bulbos olfatorios - lóbulos telencefálicos

Introducción

Las enfermedades neurológicas que afectan la salud humana son sumamente complejas, tanto en su biología como desde el punto de vista terapéutico. Estas enfermedades o el propio proceso de pérdida de neuronas, causan importantes complicaciones en el funcionamiento normal del organismo. La introducción de nuevas técnicas y metodologías, cambió la percepción de las posibilidades que tienen los individuos adultos de reparar su tejido nervioso mediante generación de nuevas neuronas. A consecuencia de esto, surgieron nuevas líneas de investigación en el campo de la neurociencia relacionadas con la generación de nuevas neuronas luego del nacimiento. La neurogénesis adulta se ha convertido en uno de los campos de estudio más importantes en relación al desarrollo del cerebro, el aprendizaje, la memoria, y el envejecimiento (Seki *et.al.*, 2011). El descubrimiento de que se pueden generar nuevas neuronas después del nacimiento, ha cambiado radicalmente conceptos fundamentales en neurociencias. Años atrás se pensaba que las neuronas en los individuos adultos solo podían morir, nunca generarse nuevas (Ramón y Cajal, 1914).

Se define a la célula madre como aquella célula que tiene la capacidad de dividirse (autorreplicarse), durante toda la vida de un individuo y que, bajo las condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente, puede dar origen (diferenciarse), a distintos linajes con características y funciones especializadas como miocitos, neuronas y hepatocitos (Rodríguez-Pardo, 2005).

El concepto de célula madre neural surge luego de la introducción de nuevas metodologías para el estudio del sistema nervioso. Fue en la década de 1960 que Joseph Altman demostró, mediante la utilización de timidina tritiada, que nuevas neuronas continuaban formándose en el hipocampo y en el bulbo olfatorio de roedores adultos (Altman, 1965). Sin embargo este descubrimiento no logró gran aceptación. En la década de 1980, utilizando timidina tritiada Fernando Nottebohm y su grupo realizaron estudios de la neurobiología del canto de las aves, con los cuales demostraron el nacimiento, migración y reclutamiento de nuevas neuronas en los núcleos de control del canto y en el resto del telencéfalo de canarios adultos (Nottebohm, 1985).

La neurogénesis postnatal es el proceso por el cual se generan nuevas neuronas en individuos adultos. Las neuronas generadas en adultos se encuentran en sitios del sistema nervioso central

denominados “nichos neurogénicos”, donde residen células madre neurales indiferenciadas con potencial proliferativo. Estas células son precursoras tanto de células gliales como de neuronales. En varias especies pertenecientes a diferentes grupos zoológicos, se ha demostrado la generación de nuevas neuronas durante la etapa postnatal y a lo largo de toda la vida. En vertebrados, la neurogénesis adulta presenta patrones anatómicos y funcionales conservados (Sullivan *et al.*, 2007). A fines del siglo pasado, con la utilización de diferentes técnicas histológicas, fue posible observar empíricamente procesos de neurogénesis, a lo largo de la escala zoológica (García-Verdugo *et al.*, 2002; Zupanc, 2001; Zupanc & Zupanc, 1992). Asimismo se ha comprobado que los peces presentan tasas de proliferación neural mucho mayores que otros vertebrados. Por ello resulta un modelo ventajoso para realizar estudios de proliferación neural, respecto de otros grupos.

Hasta hace unos años atrás se pensaba que la pérdida neuronal en el encéfalo humano adulto era un proceso irreversible, es decir, que las neuronas maduras estaban destinadas a morir y que no había generación neuronal. Esta incapacidad para generar neuronas que remplazan a las que degeneran y mueren era la base de muchos procesos neurodegenerativos conocidos. Sin embargo estudios realizados en humanos describieron neurogénesis en individuos adultos en el giro dentado del hipocampo (Eriksson, 1998). De esta manera, la comprensión de las diferencias en la proliferación en los nichos neurogénicos, es de fundamental importancia para entender los procesos de plasticidad que ocurren en el sistema nervioso en estado fisiológico normal y en la enfermedad.

En el momento actual se logran importantes avances en el estudio de la neurogénesis gracias a la introducción de métodos y marcadores moleculares que nos permiten identificar el nacimiento, diferenciación y migración de las poblaciones proliferativas en el encéfalo adulto.

1.2 Los marcadores de proliferación como herramienta para el estudio de la neurogénesis

Los estudios de proliferación celular estuvieron durante mucho tiempo restringidos a la detección de las imágenes de mitosis celular. Este era en un principio el único dato objetivable de la actividad proliferativa en los estudios de microscopía óptica. Se podía observar que una célula se dividía en dos células hijas repartiendo entre ellas el material nuclear y el contenido citoplásmico. Los fenómenos previos a la división celular, necesarios para que la célula duplique su dotación

genética, no se acompañan de modificaciones de la morfología celular, y por ello, estos fenómenos excedían los límites de las técnicas de microscopía convencional (Carbajo Pérez *et al.*, 1995).

En una población de células que están proliferando asincrónicamente, un porcentaje de ellas se encuentra en la fase S (fase del ciclo celular donde ocurre la duplicación de los cromosomas), donde el ADN se replica semiconservativamente. En esta síntesis se incorporan los nucleótidos que formarán las hebras hermanas de las hebras molde, y debido a que la timidina es un nucleótido exclusivo del ADN, se han desarrollado moléculas análogas a ésta que se incorporen en el ADN en síntesis para luego ser visualizables. Si se administran pulsos *in vitro* o *in vivo* de estas sustancias análogas a la timidina, nos permite identificar aquellas células que se encontraban en fase S en el momento del pulso y durante la vida media de la molécula en el organismo vivo o cultivo celular, es decir, células en activa división.

El desarrollo de las técnicas de autorradiografía hizo posible la identificación de las células en fase de síntesis de ADN. Si la timidina se marca con un radioisótopo (generalmente tritio, timidina-3H) y es administrada *in vivo* o *in vitro*, las secuencias de ADN en síntesis lo incorporarán, quedando marcadas con el radioisótopo. La energía emitida por estos radioisótopos marcará su impronta en una película de emulsión fotográfica, permitiendo la identificación de las células que están en fase S. En la práctica, las técnicas de autorradiografía para el estudio de proliferación celular son laboriosas, complejas y de lento procesamiento de las muestras, por esto, se han visto en gran medida sustituidas por técnicas inmunocitoquímicas (Carbajo Pérez *et al.*, 1995).

La bromodesoxiuridina (BrdU) es un nucleósido sintético que es un análogo de la timidina (figura 1). El nombre comercial es 5-Bromo-2'-desoxyuridine, la fórmula $C_9H_{11}BrN_2O_5$ y peso molecular de 307,11g/mol. Esta molécula puede ser incorporada en el ADN durante la fase S del ciclo celular, sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. En experimentos con cultivos celulares HAB (células de mamíferos) donde las células crecían en un medio que carece de timidina, y provistos de BrdU, se observó que la incorporación de éste al ADN es de un 99,8%, y posiblemente de un 100% (Bick & Davidson, 1974).

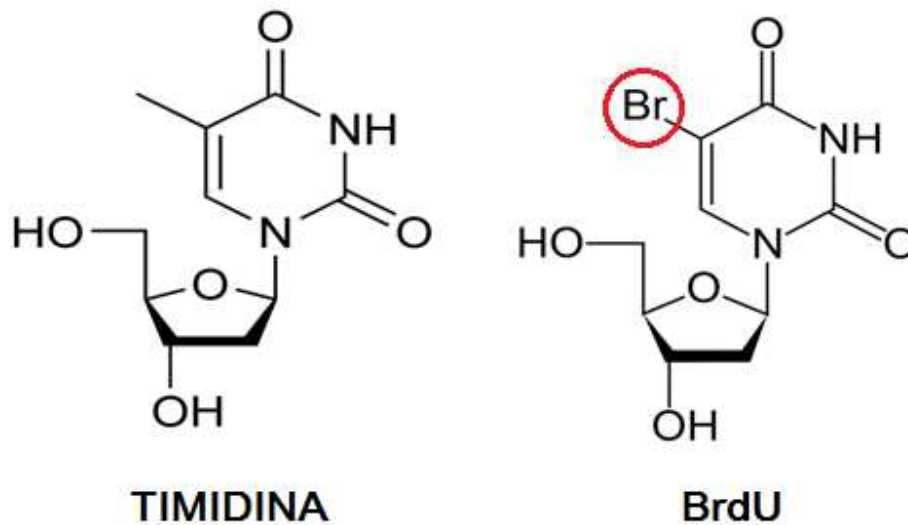


Figura 1. Esquema de la estructura molecular de la timidina (izquierda) y de la bromodesoxiuridina (derecha)

El desarrollo por Gratzner (1982) de anticuerpos monoclonales frente a la bromodesoxiuridina, ofrecía la posibilidad de identificar las células en fase S sin la necesidad de utilizar radioisótopos, obviando el laborioso procesamiento de éstos. Esta técnica ha experimentado una rápida expansión tanto , por, una gran simplicidad y relativa rapidez, como por su fidelidad en la identificación de las células que están duplicando su material genético. Por otra parte, se demostró una magnífica correspondencia entre la fracción de fase S del ciclo celular obtenidas tras el marcaje con timidina tritiada y tras el marcaje con BrdU (Silvestrini *et al.*, 1988). Una de las grandes ventajas que ofrece la técnica de marcaje con BrdU y su identificación inmunocitoquímica sobre secciones de tejido es que el resultado final de la reacción sobre los núcleos marcados es claro y bien definido (Carbajo Pérez *et al.*, 1995).

La fácil identificación de los núcleos marcados y el permitir el análisis topográfico de los mismos en el seno del tejido no son las únicas virtudes que adornan a las técnicas de proliferación celular mediante inmunocitoquímica actualmente. Se han desarrollado otros análogos halogenados de la timidina reemplazando en el BrdU el grupo bromo, con otros dos halógenos, yodo o cloro. Los productos finales de elaboración son el iododesoxiuridina (IdU) y clorodesoxiuridina (CldU), y presentan gran similitud química con el BrdU, y todas sus ventajas metodológicas. **Esto proporciona una técnica alternativa para marcar células en fase S en eventos temporales diferentes, administrando pulsos de ambos marcadores en el mismo animal, debido a que**

ambos marcadores son claramente discriminados con técnicas inmunohistoquímicas que no presentan reacciones cruzadas (Vega & Peterson, 2005) **marcando poblaciones de células equivalentes**. Esta capacidad para detectar estos marcadores de proliferación proporciona una herramienta para abordar la relación entre la historia de proliferación celular, establecimiento de relaciones entre células recientemente generadas y evaluar el estado proliferativo. Asimismo, la historia de proliferación celular individual puede hacer posible la identificación de células que captaron ambos marcadores en dos pulsos administrados en diferentes momentos. **Este es un enfoque adecuado para localizar a las posibles células madre neurales.**

En este trabajo se emplean el IdU y CldU separados en una ventana temporal, como metodología de estudio de la proliferación neural en el encéfalo de *Austrolebias charrua*. Este método permitió marcar las células que reentran en el ciclo celular y por lo tanto, la detección de las probables “células madre” que proliferan y quedan confinadas al nicho neurogénico. También es posible detectar las células que migran alejándose de su sitio de origen y determinar las rutas de migración.

1.3 Ventajas de los peces como modelo biológico frente a los mamíferos

La utilización de peces como modelo biológico, presenta varias ventajas a la hora de estudiar la neurogénesis adulta. En particular, representan un buen modelo para el estudio de neurogénesis ya que presentan tasas de proliferación neural elevadas, en contraste con lo que ocurre en los mamíferos (Zupanc, 2006). Poseen sitios de proliferación celular en muchas regiones encefálicas. Esta proliferación en peces supera ampliamente a la de los mamíferos, llegando a ser de por lo menos uno o dos órdenes de magnitud mayor (Hinsch & Zupanc, 2007). En estudios realizados en *Danio rerio*, el pez cebra, se describieron dieciséis zonas proliferativas en el encéfalo adulto, localizadas en su mayoría a lo largo de las paredes ventriculares y en algunas zonas más profundas en el parénquima nervioso (Zupanc *et al.*, 2005; Grandel *et al.*, 2006; Hinsch & Zupanc, 2007).

Las *Austrolebias* son un género de peces anuales que presentan características que lo convierten en un buen modelo biológico. Son peces autóctonos pequeños con un ciclo de vida corto, lo que facilita el manejo de variables como la edad. Sus ejemplares son fáciles de coleccionar y manipular,

siendo capaces de reproducirse en cautiverio. Como ventaja adicional, presentan gran capacidad neurogénica. La génesis de nuevas neuronas en diferentes regiones encefálicas de peces del genero *Austrolebias* fue demostrada en tres especies, mediante la utilización de BrdU e inmunohistoquímica, en bulbo olfatorio, paredes ventriculares telencefálicas, torus longitudinalis, tectum óptico y cerebelo (Rosillo, 2010; Fernández *et al.*, 2011).

Objetivos

1. Objetivo General

Emplear análogos halogenados de la timidina para estudiar y discriminar temporalmente poblaciones de células candidatas a célula madre en el cerebro de *Austrolebias charrua*.

2. Objetivos Específicos

A - Determinar por medio de la aplicación del IdU y CldU la localización y distribución de distintas poblaciones de células proliferativas en el encéfalo de *Austrolebias charrua*.

B - Cuantificar las células proliferantes marcadas con CldU, IdU y las que presentan ambos marcadores en bulbo olfatorio, lóbulos telencefálicos, diencéfalo, tectum óptico, torus longitudinalis y cerebelo .

C - Analizar mediante microscopía electrónica de transmisión las características ultraestructurales de la zona del ventrículo telencefálico ubicado en la transición bulbo olfatorio-lóbulos telencefálicos.

Materiales y métodos

1. El modelo biológico

Para la realización de esta tesis se utilizaron como modelo biológico *Austrolebias charrua* machos adultos, de tamaños similares. Los especímenes fueron obtenidos del acuario de facultad de Ciencias y mantenidos en el acuario del IIBCE durante todo el proceso de experimentación, en peceras individuales con agua de clorinada, con ambientación vegetal, a temperatura de 19°C, con aireadores permanentes y alimentados una vez al día con *Tubifex tubifex*.

El protocolo de experimentación realizado con *A. charrua*, ha sido evaluado y aceptado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

2. Aplicación y revelado de los marcadores de proliferación celular

2.1. Diseño experimental

Para los experimentos de proliferación celular se utilizaron seis machos de *Austrolebias charrua* y se realizaron tratamientos de treinta días. En el día cero, a los seis peces se les administró el primer marcador de proliferación (IdU) y se lo dejó en el acuario en iguales condiciones en las que estaban hasta entonces. En el día 29, a los mismos especímenes se les administró el segundo marcador de proliferación (CldU). En el día 30, se realizó el sacrificio de los peces. De esta forma, el tiempo de sobrevivencia post inyección del IdU es de 30 días y del CldU es de un día. En la figura 1 se muestra el esquema metodológico aplicado.

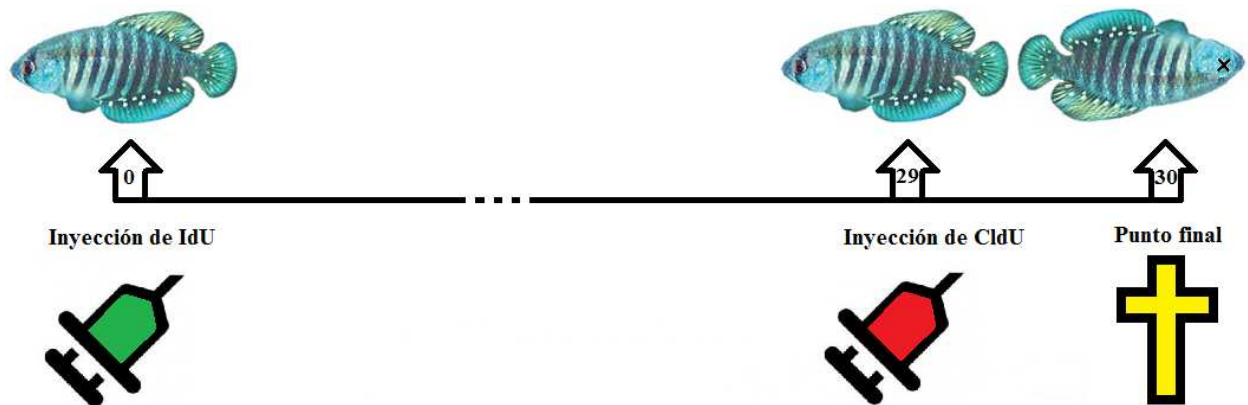


Figura 2. Esquema metodológico aplicado en *A. charrua*, en el día cero se inyecta intraperitonealmente la iododesoxiuridina, el día veintinueve se inyecta la clorodesoxiuridina y el día treinta se realiza el sacrificio del animal anestesiado por perfusión intracardiaca.

2.2. Administración de los marcadores de proliferación celular

Los marcadores de proliferación se administraron intraperitonealmente, esta vía de administración es elegida por su simplicidad de la maniobra en peces y porque la cavidad peritoneal tiene una gran superficie de absorción y las sustancias pasan al sistema circulatorio con facilidad. Para la inyección de los marcadores se determinó la masa de cada animal utilizado. El IdU se administró en una concentración de 57,5 mg/Kg y el CldU se administró en una concentración de 42,5 mg/Kg.

2.3. Punto final y técnica de fijación de los peces

Todos los especímenes fueron anestesiados con Eugenol (eugenol 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 removió la sangre del aparato circulatorio, realizando un lavado con solución salina la cual tiene un vasodilatador (Nitrito de sodio, NaNO_2) para facilitar el lavado y que los vasos no colapsen y un anticoagulante (Citrato de sodio, $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$), para evitar que se generen trombos cuando la sangre contacte con el fijador. Una vez realizado el lavado se pasó el fijador, paraformaldehído (de J.T. Barker) al 10% disuelto en buffer fosfato, por

el sistema circulatorio logrando la fijación de todos los tejidos corporales.

2.4.Técnica de disección, encastre y realización de los cortes

Una vez que el animal fue fijado e se realizó la disección del encéfalo y luego se lo encastró en una solución de gelatina (1,5%)-albúmina(45%) disuelta en cloruro de sodio (0.9%) y se agrega una gota de glutaraldehído logrando un bloque donde se encuentra el encéfalo. El bloque se posicionó en un vibrátomo LEICA VT100S para la realización de cortes seriados de 60 micrómetros de grosor en planos de corte transversales y sagitales. Una vez obtenidos los cortes, se realizó el tratamiento inmunohistoquímico para revelar los marcadores de proliferación por inmunofluorescencia.

2.5.Detección inmunohistoquímica

Los anticuerpos utilizados para detectar el IdU y CldU (ver tabla 1 sobre anticuerpos y sus características) son capaces de reconocer estas sustancias en ADN monocatenario, por lo tanto, para que estas sustancias queden expuestas para su reconocimiento antigénico, la doble cadena de ADN debe recibir un tratamiento previo en el cual sea reducida mediante hidrólisis con ácido clorhídrico diluído con buffer tritón (HCl 15% - BT 85%). El BT desorganiza la estructura lipídica y genera agujeros en las membranas biológicas para que el HCl penetre en las células hasta el nivel nuclear y reduzca el ADN exponiendo en él los antígenos (IdU/CldU) para el reconocimiento con los anticuerpos específicos. Una vez que los antígenos son expuestos, se incuban los cortes con los anticuerpos primarios y luego con los secundarios conjugados con un fluorocromo para la detección mediante inmunofluorescencia indirecta,El análisis de las secciones se realizó utilizando microscopía de láser confocal Se Procede de la de la siguiente manera:

- 1- Se lavan tres veces los cortes en buffer fosfato, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 2- Se incuban los cortes en la solución de BT-HCl, durante 40 minutos
- 3- Se realizan tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.

- 4- Se incuban los cortes en anticuerpos primarios toda la noche en BT, utilizando:
 - Anti IdU: mouse anti-BrdU(IdU)
 - Anti CldU: rat anti-BrdU(CldU)
- 5- Se realizan tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 6- Previo a la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados se realiza una incubación con un anticuerpo secundario biotinilado:
 - Biotinilado Donkey anti-rat
- 7- Se realizan tres lavados en BF, sobre un shaker, durante 10 minutos cada lavado.
- 8- Se incuban los cortes en anticuerpos secundarios conjugados con flourocromos, en BT durante una hora en oscuridad, utilizando:
 - Anti-mouse Alexafluor 488
 - Streptavidina de unión a la biotina Cy3

Una vez que se realiza el protocolo anterior con todos los cortes de los seis peces, se montaron en portaobjetos rotulados adecuadamente y se realiza el montaje de los cortes en glicerina y un cubreobjetos. Los cortes fueron mantenidos en heladera evitando procesos de crecimiento de microorganismos y en cajas opacas para que los conjugados fluorescentes no tengan excitación por la luz y no se pierda la fidelidad de la señal.

Tabla 1. Descripción de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, marca comercial y dilución recomendada.

Anticuerpos primarios	Marca	Dilución
Rat anti-BrdU (CldU)	Accurate	1/500
Mouse anti-BrdU (IdU)	Becton Dickenson	1/500
Anticuerpos secundarios	Marca	Dilución
Biotinilado Donkey anti-rat y Streptavidina-Cy3 de unión a la biotina	Jackson	1/500
Donkey anti-mouse Alexa 488	Molecular probes	1/500

2.6. Observación y fotografiado de los cortes

Los preparados histológicos, fueron observados y analizados con un Microscopio Confocal

Olympus FluoView™ 300 asistido por un software para Windows®, el FluoView™300. Para la visualización de los preparados se utilizaron dos opciones de láser respecto el tipo de fluorocromo conjugado a los anticuerpos secundarios:

- Láser de argón azul, de 488 nanómetros de longitud de onda, que excita el conjugado alexaflúo 488, de esta forma se obtiene una señal de color verde, que corresponde a las moléculas de ADN que portan al IdU. Los datos obtenidos por este láser se visualizan en el canal 1.

- Láser de helio-neón verde, de 543 nanómetros de longitud de onda, que excita el conjugado Cy3, de esta forma se obtiene una señal de color rojo, que corresponde a las moléculas de ADN que portan al CldU. Los datos obtenidos por este láser se visualizan en el canal 2.

Una vez especificados los parámetros de visualización de las imágenes en el FluoView™ 300 (línea de excitación e intensidad del láser, apertura del pinhole de detección, ganancia del fotomultiplicador, velocidad de barrido del láser, tamaño de la imagen), se seleccionó el modo de barrido XYZ, que capta una serie de imágenes ópticas confocales XY a través del espesor de la muestra. En cada corte (grosor 60 micrómetros) se estableció una ventana de 30 micrómetros donde se encuentra la información de interés (núcleos marcados) y se obtuvieron fotos de esa ventana cada un micrómetro (en el plano Z), de forma secuencial es decir, de cada corte se obtienen 30 fotografías de planos focales con los dos láseres utilizados. Una vez que se obtuvieron las 30 fotografías de cada corte, se realizó una superposición de éstas logrando una imagen única, utilizando el método de apilamiento brindado por el software del microscopio. En esta imagen se visualiza la información de los núcleos marcados en la ventana indicada en canales por separado y unidos. Es de este modo obtuvimos tres imágenes de cada corte:

- La imagen del canal 1, donde sólo se ven los núcleos IdU+,
- La imagen del canal 2, donde sólo se ven los núcleos CldU+,
- Y la imagen de ambos canales, donde se ven núcleos IdU+, CldU+ y doble marcados IdU+/CldU+.

Cada corte pertenece a una región encefálica determinada. En este estudio se divide el encéfalo en seis grandes regiones: Bulbo olfatorio, telencéfalo, diencéfalo, torus longitudinalis, tectum óptico y cerebelo.

3. Cuantificación celular, cálculo de volúmenes y métodos de cuantificación

3.1. Cuantificación celular

Una vez obtenidas las imágenes de las superposiciones de 30 micras de la suma de los 30 planos confocales (cada uno separado por una micra del subsiguiente), se cargaron estas imágenes en el programa ImageJ. Para cada trío de imágenes de cada corte, en la imagen del canal 1 se realizó la cuantificación de los núcleos IdU+, en la imagen del canal 2 se realizó la cuantificación de los núcleos CldU+ y en la imagen de ambos canales se realizó la cuantificación de doble marcados IdU+/CldU+. A cada imagen le corresponde un sector encefálico determinado, y de este modo se agrupó la información en una planilla según el número de pez, el nivel encefálico, cantidad de núcleos IdU+, cantidad de núcleos CldU+ y cantidad de núcleos doble marcados IdU+/CldU+. Se tuvieron algunas consideraciones para realizar la identificación y cuantificación tanto de células IdU+ (señal verde) y CldU+ (señal roja) como de las células doble marcadas IdU/CldU+, siguiendo los siguientes criterios:

- 1- Se utilizaron apilados de 30 micras, donde caben entre 4 a 5 núcleos si se tuviera una gran densidad celular(lo cual no representa una realidad ya que en muchos planos no hay marcación).
- 2- Se guardaron los canales por separados a los efectos de analizar los candidatos a doble marcados. Esto se pudo hacer dado que la densidad de los núcleos por corte fue muy baja, minimizando la posibilidad de apilado de núcleos en forma espacial.
- 3- También en cada caso se guardaron los planos individuales de una micra para recurrir a ellos cuando hubiera dudas de falsos doble marcados.
- 4- En caso de dudas se pudo utilizar la herramienta de planos múltiples del confocal.
- 5- La forma de los núcleos "amarillos" es un elemento decisivo a tener en cuenta para cerciorarse del doble marcado, donde una silueta bien definida no genera dudas de ser una célula doble marcada, mientras que en siluetas donde la forma de los núcleos es confusa, se recurre a los planos individuales.
- 6- Tener en cuenta que sesgo siempre hay en cualquier cuantificación, lo importante es hacer la muestra y contar siempre de la misma manera

3.2. Cálculos de volúmenes

Para utilizar herramientas estadísticas las cuales permitan establecer relaciones entre proliferación celular respecto el volumen de la región encefálica, se determinó el volumen de las 6 regiones estudiadas. Para esto, se observaron los cortes seriados de los encéfalos bajo

microscopía óptica, y se tomaron fotografías de cada uno de ellos con una cámara digital NIKON COLPIX 995. Las imágenes seriadas fueron ingresadas en el programa para Windows®, BioVis3D® y se realiza una reconstrucción tridimensional de cada región estudiada, determinando con herramientas del software el volumen promedio de cada una de ellas.

3.3. Métodos de cuantificación

Luego de realizar la cuantificación de los núcleos marcados en cada región encefálica, se realizó una tabla y un gráfico de frecuencias relativas simples para presentar las cantidades de núcleos IdU+, CldU+ y doble marcados IdU+/CldU+ en cada región encefálica estudiada. También se realizó una tabla y gráfico de la frecuencia absoluta de núcleos IdU+, CldU+ y doble marcadas IdU+/CldU+. Estos gráficos son realizados por el programa para Windows®, Microsoft Excel 2007.

Para determinar las tasas de proliferación de células IdU+, CldU+ y doble marcadas IdU+/CldU+ se utilizó el programa para Windows®, Microsoft Excel 2007, teniendo en cuenta la cuantificación celular respecto los volúmenes de las regiones.

4. Procedimientos para microscopía electrónica de transmisión

4.1. Diseño experimental

Para el estudio por microscopía electrónica de transmisión se utilizaron dos ejemplares de *Austrolebias charrua* macho adultos. Se eligió una zona del encéfalo que, mediante inmunofluorescencia haya mostrado núcleos IdU+, CldU+ y doble marcados IdU+/CldU+. Esta zona es la región de transición entre los lóbulos del bulbo olfatorio y los lóbulos telencefálicos. Se realizaron cortes semifinos y finos para realizar la descripción histológica y citológica de esta zona y estudiar la ultraestructura de la misma.

4.2. Fijación, postfijación y primer contraste

El procedimiento de anestesia y lavado del sistema circulatorio se realizó de igual manera que en los procedimientos anteriormente descritos para el revelado de marcadores de proliferación. En este caso particular, se utilizó un fijador químico en solución que permite preservar lo más posible las características ultraestructurales de las células “*in vivo*”. Para ello se utilizó una

solución fijadora de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en BF 0,1M pH = 7,2. Estos aldehídos reaccionan con los ácidos nucleicos, lípidos y glúcidos, y se unen covalentemente con las proteínas desnaturalizándolas (pierden parcial o totalmente sus funciones) anulando sus propiedades enzimáticas, evitando el deterioro celular postmortem (Vazquez Nin, 2000). Luego de perfundidos los animales, se disecaron los encéfalos y se sumergieron en la misma solución fijadora, dónde permanecieron hasta el día siguiente a 4°C. Ambos cerebros se cortaron en un vibrátomo en rodajas de 150 micrómetros de espesor. Se lavaron tres veces en BF durante diez minutos en agitación y se postfijaron con tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en BF durante una hora. El tetraóxido de osmio actúa como un agente de contraste uniéndose a proteínas, ácidos nucleicos y principalmente a lípidos apolares de las membranas biológicas visualizándose éstas como dos líneas oscuras separadas por una clara (Vazquez Nin, 2000). Para remover el exceso del tetróxido de osmio se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno en BF en agitación.

4.3. Deshidratación del material biológico

Una vez finalizada la fijación el material debe ser deshidratado. Para ello se realizan baños de etanol de concentración creciente de forma de retirar el agua de los tejidos sin que ocurra retracción de los mismos. Para esto se aplicó el siguiente protocolo:

- Etanol al 25%, durante 15 minutos
- Etanol al 50%, durante 15 minutos
- Etanol al 75%, durante 15 minutos
- Etanol al 90%, durante 60 minutos
- Etanol al 96%, durante 15 minutos
- Etanol al 100 %, durante 60 minutos
- Acetona anhidra ppa, durante 60 minutos

La acetona anhidra es miscible con el etanol y también con el medio de inclusión. Funciona como líquido intermediario, retirando el etanol de los tejidos y permitiendo el ingreso de la resina, sin alterar la estructura normal.

4.4. Imbibición e inclusión del material biológico

Durante la imbibición del material biológico, el mismo es impregnado con resinas epóxicas. Dichas resinas son sustancias plásticas que polimerizan en condiciones compatibles con la conservación de la estructura fina de las células, permitiendo paralelamente que adquieran la dureza necesaria para ser cortadas en secciones ultrafinas (40 – 60nm), que permitan su análisis mediante MET. En nuestro caso empleamos una resina epóxica de bajo punto de ebullición (Araldita Durcupan de Fluka). Para realizar la imbibición la resina se mezcla previamente con otras sustancias: el plastificador, que mejora sus propiedades de corte; el acelerador que cataliza la polimerización, y el endurecedor que determina la dureza del bloque sólido final,. Para realizar la mezcla se siguió la siguiente receta:

- Solución A, resina epóxica: 5.4 gr
- Solución B, endurecedor: 4.45 gr
- Solución C, acelerador: 0.25 gr
- Solución D, plastificador: 0,4 gr

Una vez realizada la mezcla de inclusión, las muestras fueron embebidas de acuerdo al siguiente protocolo:

- acetona-araldita (3:1), durante 60 minutos
- acetona-araldita (2:2), durante 60 minutos
- acetona-araldita (1:3), durante 60 minutos
- araldita absoluta (bien tapada) durante toda la noche a 4°C

Al día siguiente, se realizó un bloque con cada rodaja, empleando para ello moldes termorresistentes llenos de araldita, en los que se posicionó la muestra. La polimerización se realizó en estufa a 60°C durante 48hs.

4.5. Realización de los cortes

Del total de bloques realizados se escogieron los que pertenecen a la zona de estudio. Los bloques fueron tallados preservando la zona de interés. Los cortes semifinos (500 nanómetros de espesor) se realizaron en un utramicrótopo RMC MTX, en orientación transversal, con cuchilla de vidrio. Estos cortes se montaron en portaobjetos de vidrio, se secaron y adhirieron al mismo por calor, se tiñeron con azul de metileno boráxico al 1% y se observaron bajo microscopio de luz con el fin

de localizar con exactitud la zona de interés. Con el mismo ultramicrotomo se realizaron cortes finos (de 40 a 60 nm de espesor), también con cuchilla de vidrio. Estos cortes fueron colectados sobre rejillas de cobre de ranura (de 2mm de largo por 1mm de ancho), y colocados sobre una membrana de polivinilformvar (solución de FORMVAR al 0,3% diluido en cloroformo), la cual se adhiere a la rejilla y brinda soporte a los cortes finos.

4.6. Segundo contraste de los cortes

Para realizar el segundo contraste se utilizan sales con elevado número atómico con capacidad de ionzarse y unirse a proteínas y ácidos nucleicos de las células incluidas: el acetato de uranilo y el citrato de plomo (receta de Reynolds). Se realizó el siguiente protocolo:

- Se coloca cada rejilla con los cortes sobre una gota de acetato de uranilo acuoso al 2%, a 60°C durante 120 minutos.
- Se realizan tres lavados en agua bidestilada ó Milli Q, durante un minuto, con movimientos verticales.
- Se seca el borde de la rejilla con papel de filtro limpio
- Se coloca cada rejilla con los cortes sobre una gota de citrato de plomo, rodeada de lentejas de hidróxido de sodio para evitar que el plomo precipite.
- Se drena el agua de las rejillas con papel de filtro limpio
- Se guardan las rejillas en contenedores especiales que permiten la rápida localización de los cortes correspondientes a cada muestra y paralelamente evitan la contaminación y rotura del film que sostiene los cortes.

Este método de contraste permite la visualización de los diversos organelos celulares y elementos del intersticio.

4.7. Observación en el microscopio electrónico

Para la observación de los cortes se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010 ubicado en Facultad de Ciencias, operando con una aceleración de voltaje de 100Kv, a diferentes magnificaciones. Las micrografías electrónicas fueron tomadas con una cámara digital Hamamatsu Digital Camera C4742-95, utilizando el programa AMC

Adventage.

4.8. Procesamiento de imágenes

Las imágenes con el microscopio electrónico de transmisión, fueron procesadas con el programa Adobe photoshop 14.0 para Windows®.

Resultados

Parte 1. Detección inmunohistoquímica del IdU y CldU

1.1. Descripción de los tipos de núcleos marcados

Mediante la utilización de inmunohistoquímica se revelaron los marcadores de proliferación celular utilizados, es decir, el IdU y CldU. Células que captaron el IdU en el primer pulso administrado en el día cero, estuvieron en fase “S” de síntesis de ADN en el momento de la inyección y durante la vida media de la sustancia en el organismo.

1- Núcleos IdU+ La localización de los anticuerpos específicos para el reconocimiento del antígeno IdU, se realizó mediante inmunohistoquímica indirecta. El primer anticuerpo hecho en ratón (anti BrdU) y el anticuerpo secundario estaba unido a un fluoróforo Alexaflúo 488 cuya

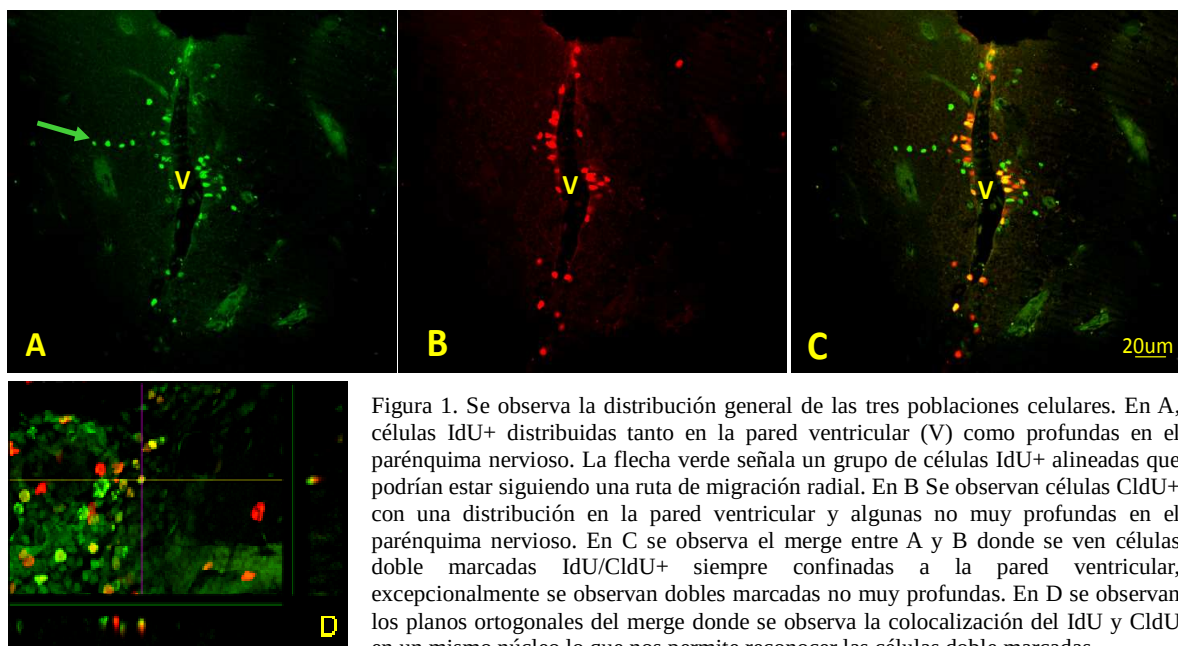


Figura 1. Se observa la distribución general de las tres poblaciones celulares. En A, células IdU+ distribuidas tanto en la pared ventricular (V) como profundas en el parénquima nervioso. La flecha verde señala un grupo de células IdU+ alineadas que podrían estar siguiendo una ruta de migración radial. En B Se observan células CldU+ con una distribución en la pared ventricular y algunas no muy profundas en el parénquima nervioso. En C se observa el merge entre A y B donde se ven células doble marcadas IdU/CldU+ siempre confinadas a la pared ventricular, excepcionalmente se observan dobles marcadas no muy profundas. En D se observan los planos ortogonales del merge donde se observa la colocalización del IdU y CldU en un mismo núcleo lo que nos permite reconocer las células doble marcadas.

señal se visualiza en color verde. Esta señal se observó homogéneamente distribuida por el núcleo celular proporcionando una marca clara para la interpretación de un núcleo IdU+ Figura 1A. El tiempo de sobrevivencia de estas células fue de 30 días postinyección, por lo cual, esa ventana temporal le permitió a esas células cumplir con ciclos mitóticos consecutivos y realizar

migraciones, por lo que se observó gran cantidad de núcleos IdU⁺ de variable intensidad de marcación, de diferente forma, tamaño y distribución. La forma de éstos es heterogénea, algunos presentan morfología redondeada, fundamentalmente cuando se encuentran dispersas en el parénquima nervioso y en algunos casos se observan más alargadas cuando se ubican en ciertas regiones proliferativas en la pared ventricular (Fig 1-A y Fig 2-A). En cuanto al tamaño, estos núcleos son de aproximadamente 5 micras de diámetro cuando su forma se presenta redonda. En todas las regiones del encéfalo las células IdU⁺ se localizaron tanto cerca a las paredes ventriculares como en el parénquima nervioso y en algunos niveles de corte se observaron rutas de migración celular desde la luz ventricular hacia regiones más profundas del parénquima (Fig 1-A flecha y Fig 2-A). A esta población celular con núcleos IdU⁺ las denominamos **células proliferantes que migran**.

2- Núcleos CldU⁺ En el segundo pulso el marcador de proliferación utilizado fue el CldU este análogo de la timidina al igual que el IdU es captado por las células que se encontraban en fase “S” al momento de la administración. Su aplicación se realizó al día 29 del experimento, se deja sobrevivir 24 horas, luego se sacrifica el animal y se realizan los procedimientos de fijación, cortes histológicos y técnicas de inmunohistoquímica para la detección del antígeno. La localización de la señal se realizó por medio de la utilización de un anticuerpo primario específico para CldU hecho en rata (anti-BrdU) y un secundario unido a un fluoróforo que emite longitud de onda en el rango de 530-545 por lo cual la señal se visualiza en color Rojo (Fig 1-B y Fig 2-B). La marca se observó homogéneamente distribuida por el núcleo celular proporcionando una señal clara para la interpretación de un núcleo CldU⁺. El tiempo de sobrevida de estas células fue de 24 horas postinyección, por lo cual no tuvieron tiempo de dividirse sucesivas veces como con el IdU. Por lo que se observan núcleos celulares con una marcación roja intensa. Estos núcleos se presentan bien definidos en cuanto a nitidez y morfología. Una característica importante de estas células es que muestran morfología alargada cuando se encuentran lindantes con la luz ventricular (Fig 2-B) sobretodo en regiones de alta proliferación celular, y pueden presentar formas más o menos redondeadas cuando se encuentran más profundas en el parénquima nervioso. Estas células CldU⁺ fueron localizadas en todos los cortes del cerebro del pez. En cuanto a la ubicación histológica de esta población de células CldU⁺ mostraron en general, una distribución confinada a las paredes ventriculares y en menor cantidad se observaron células CldU⁺ profundas en el parénquima, en todas las regiones

encefálicas estudiadas (Fig 1-B y 2-B). A esta población celular la denominamos **células activamente proliferantes**.

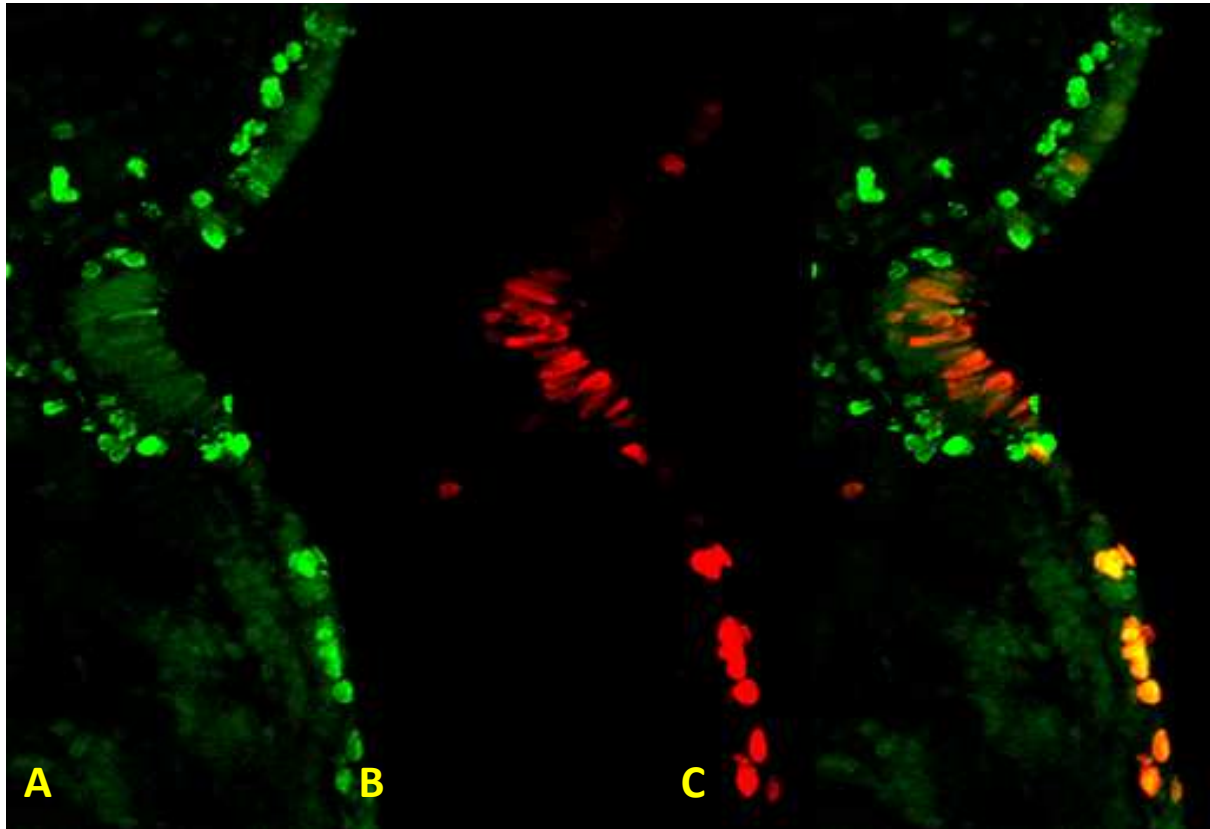


Figura 2. En A se observan los núcleos IdU+ en una ubicación sobre las paredes ventriculares y más profundas en el parénquima. En B se observan los núcleos CldU+ ubicados predominantemente en la pared ventricular. En C se observan los núcleos doble marcados IdU/CldU+ ubicados en la pared ventricular.

3- Núcleos IdU/CldU + En algunos casos se observaron células que fueron capaces de captar la marcación de ambas sustancias incorporadas al animal en ambos pulsos. La colocalización de los marcadores de proliferación revelados por inmunofluorescencia se visualizó en color amarillo. Esta corresponde a núcleos que captaron ambos marcadores celulares, es decir, células que se encontraban en fase “S” de síntesis de ADN en el momento de la primera (IdU) y la segunda inyección (CldU). Estas células IdU/CldU+, si bien se encontraron en todos los niveles de corte del encéfalo fueron menos abundantes que las demás poblaciones identificadas por separado con los marcados correspondientes. El tamaño y morfología de esta población fue particularmente diferente. En general el tamaño de los núcleos amarillos fue mayor que las que presentan un solo marcador. La morfología fue predominantemente redondeada. Esta población

celular presentó una distribución ventricular o subventricular, pero casi nunca a distancias muy alejadas de la luz ventricular. Además las células correspondientes a los núcleos doble marcados se ubicaron frecuentemente muy cerca de la luz ventricular o a penas desplazadas unas pocas micras (Fig 1-2 C). Estas células doble marcadas se las interpreta como las que reentran en el ciclo celular, sin migrar y se mantienen confinadas a las cercanías de las zonas ventriculares, y por esta razón las consideramos como las **principales candidatas a células madre neurales**.

En suma, la aplicación de este método entonces permitió determinar la presencia de tres poblaciones denominadas:

1-Células con núcleo IdU+, 30 días postinyección, denominadas células **proliferantes que migran**

2-Células con núcleo CldU+, 24 horas postinyección, denominadas **células activamente proliferantes**

3-Células con núcleo doble marcados IdU/CldU+, 30 días postinyección, denominadas como **principales candidatas a células madre neurales**

1.2. Localización y distribución de las poblaciones celulares proliferantes en el cerebro de *A. charrua*.

1.2.1 Anatomía del encéfalo

Si bien el objetivo de esta pasantía no fue la de profundizar en la localización anatómica de las poblaciones celulares proliferantes, es necesario realizar una pequeña introducción a la anatomía general del cerebro de *Austrolebias*. Esto ayudará a entender la distribución a grandes rasgos de las zonas proliferativas en las tres grandes divisiones cerebrales y servirá para explicar de qué manera se realizó la cuantificación.

El encéfalo de los teleósteos al igual que en el resto de los vertebrados, se divide en tres regiones principales: cerebro anterior (prosencéfalo), cerebro medio (mesencéfalo) y cerebro posterior (rombencéfalo). El análisis de la anatomía del cerebro de *Austrolebias charrua* (Fig 3), muestra similitud con otros teleósteos bien conocidos como el *Salmo gairdneri* (Butler y Hodos, 1996). En el cerebro anterior se observa en la porción más rostral, los bulbos olfatorios (OB) que son prominentes, pareados y separados entre sí. Estos OB se encuentran adosados a los lóbulos

telencefálicos por lo que se les denomina sésiles. La región adyacente a los lóbulos telencefálicos constituye una región ventricular muy proliferativa que nosotros denominamos **zona de transición**. Los lóbulos telencefálicos prominentes formados por dos hemisferios, derivan de la eversión producida durante el desarrollo embrionario. Esta eversión trae como consecuencia que los lóbulos telencefálicos se encuentren separados en la línea media por una cavidad única que constituye el ventrículo telencefálico.

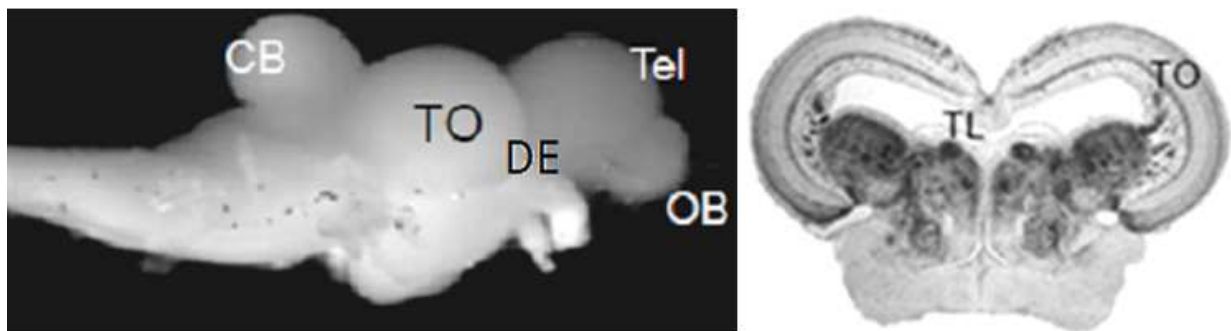


Figura 3. En A, anatomía del encéfalo de *Austrolebias charrua*. En B, corte transversal del cerebro medio. CB: cerebelo, TO: tectum óptico, DE: diencéfalo, OB: bulbo olfatorio, Tel: telencéfalo, TL: torus longitudinalis.

En el cerebro medio, la estructura predominante es el tectum óptico (TO) formado por una masa de tejido nervioso pareada y redondeada que forma el techo del cerebro medio. En su interior se encuentra el ventrículo tectal, también un ventrículo único, el más importante del encéfalo del pez. En la parte dorsal y medial del cerebro medio, existe una estructura única, particular de los peces que al corte transversal se la observa entre las dos valvas del TO, y se denomina torus longitudinalis Fig 2 b. Esta estructura tiene relación con el procesamiento de la actividad visual y de los movimientos oculares. En el romboencefalo se observa una estructura única, medial y prominente que es el cerebelo (CB) y posterior el bulbo raquídeo (BR) (Fig 3).

1.2.2. Localización de las células proliferantes en las diferentes regiones cerebrales

En el cerebro anterior la localización de los núcleos marcados con los análogos halogenados de la timidina fue predominantemente sobre las paredes ventriculares (Fig 4-A y Fig 5). En los bulbos olfatorios se observaron algunas de las células de las tres poblaciones, definidas en la

sección anterior, en todo el parénquima nervioso.

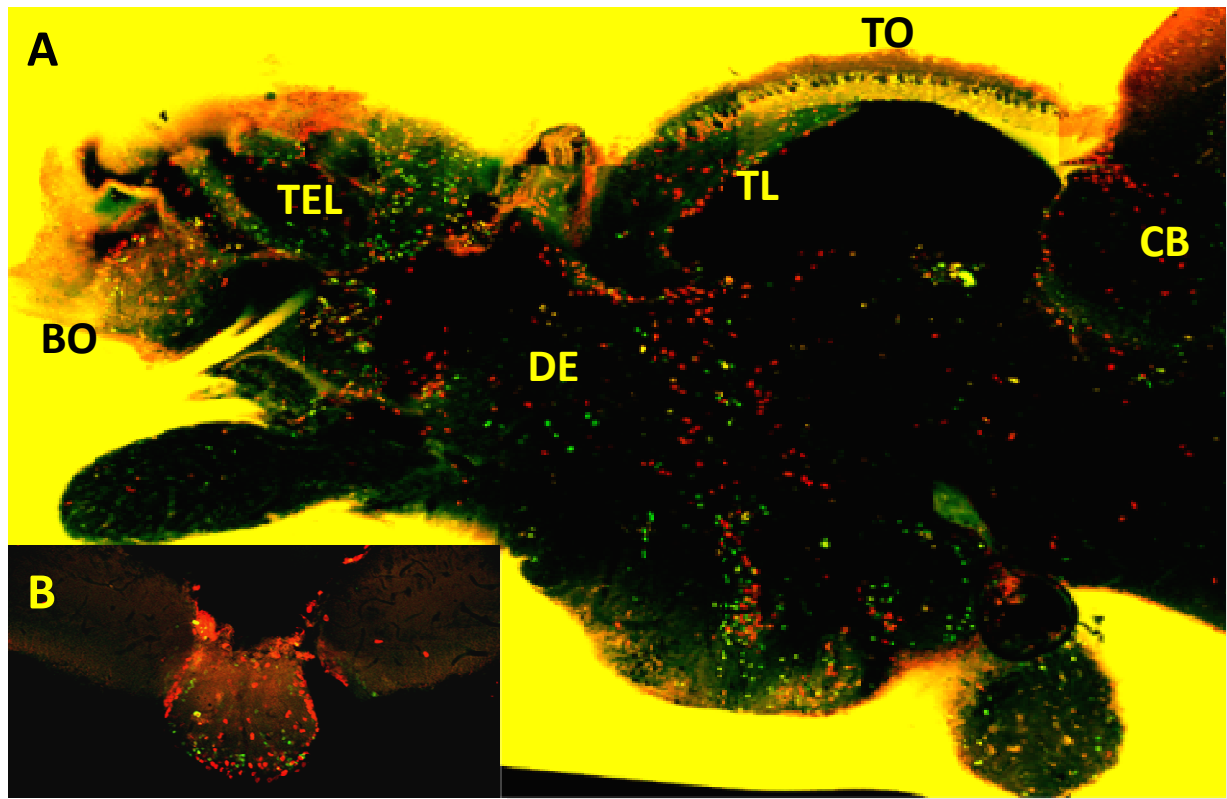


Figura 4. Imagen que muestra la localización de los núcleos de las tres poblaciones. En A, una sección parasagital del encéfalo de *A. charrua* donde se observan las regiones estudiadas, bulbo olfactorio (BO), telencéfalo (TEL), diencéfalo (DE), torus longitudinalis (TL), tectum óptico (TO) y cerebelo (CB). En B, sección transversal del torus longitudinalis.

En la zona de transición entre los bulbos olfatorios y los lóbulos telencefálicos se observaron núcleos marcados pertenecientes a las tres poblaciones proliferativas ubicadas a diferentes distancias en el parénquima nervioso desde la pared ventricular (Fig 4-A y Fig 5). Hacia el telencéfalo caudal se observa una gran cantidad de núcleos marcados IdU+, CldU+ y doble marcadas, sobre todo el área dorso-medial lindante con el ventrículo.

En el diencéfalo, células de las tres poblaciones, se observaron predominantemente sobre las paredes ventriculares, así como también se encontraron células IdU+ y CldU+ en el parénquima nervioso, profundas desde las paredes ventriculares (Fig 4-A).

La reconstrucción de varios cortes parasagitales que cubrieron las tres grandes divisiones cerebrales, mostró que las paredes ventriculares se encuentran tapizadas de núcleos marcados con ambos marcadores de proliferación (Fig 4-A), presentando células proliferativas de las tres

poblaciones. Las rojas (CldU+) se encontraron predominantemente más cerca de la luz ventricular que las verdes (IdU+). Asimismo, en los lóbulos telencefálicos se identificaron células marcadas sobre la superficie pial.

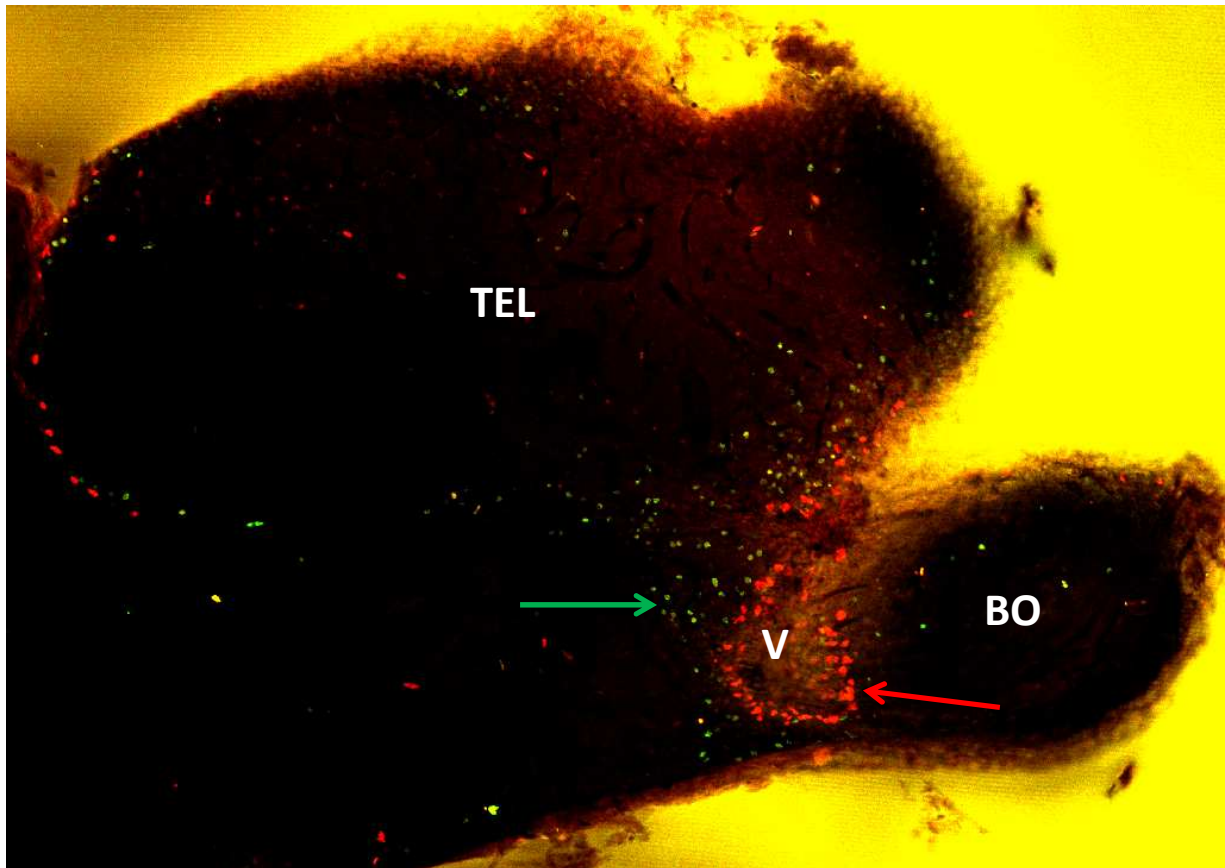


Figura 5. Corte parasagital del cerebro anterior de *Austrolebias charrua*. Superposición de planos focales que muestra la localización de las células proliferativas. En las paredes ventriculares se observa predominantemente células CldU+ (flechas rojas) y distribuidas más profundas en el parénquima las células IdU+ (flecha verde). BO: bulbo olfatorio, TEL: telencéfalo. V: ventrículo

En el torus longitudinalis se observaron células IdU+ a diferentes distancias desde la luz ventricular, profundas en el parénquima nervioso y las CldU+ se observaron generalmente ubicadas en la pared lindante con el ventrículo y algunas más profundas en el parénquima (Fig 4-B). En el cerebro posterior las células proliferativas de las tres poblaciones se encontraron en la Valvula cerebelli y en la zona de la capa granular del cerebelo, así como también células IdU+ y algunas CldU+ distribuidas por el parénquima nervioso.

1.3 Determinación de una zona para el estudio ultraestructural

Luego de determinar las diferentes poblaciones celulares y su localización, se eligió una región particular para el estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión.

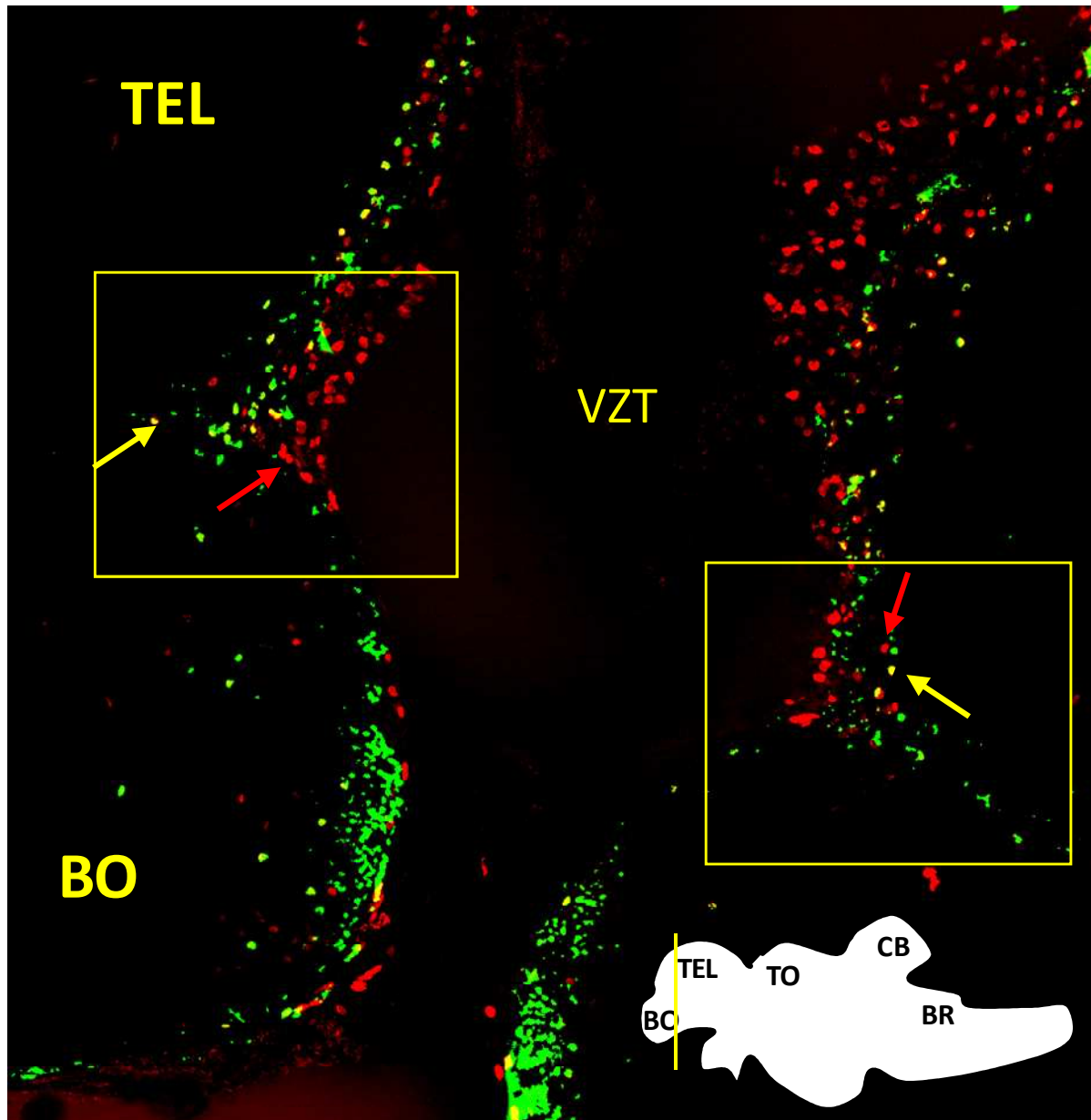


Figura 6. Zona de transición (recuadros) entre los lóbulos telencefálicos (TEL) y los bulbos olfatorios (BO). Se muestran núcleos CldU+ (flechas rojas) y doble marcados IdU/CldU+ (flechas amarillas) con una distribución particular de esta zona, ubicados tanto en la pared ventricular como más profundos. La distribución de núcleos IdU+ es la habitual, desde la pared ventricular hasta profundos en el parénquima nervioso. VZT: Ventrículo de la zona de transición. TO: Tectum óptico. CB: Cerebelo. BR: bulbo raquídeo.

La zona elegida es la región de transición entre los lóbulos telencefálicos y los bulbos olfatorios. Mediante inmunofluorescencia se observaron en esta zona las tres poblaciones celulares. Las células IdU+ mostraron la distribución similar a la observada en otras regiones cerebrales. Las células CldU+ fueron abundantes y al igual que en otras regiones ubicadas muy cercanas a la luz ventricular. En la zona de transición sobre la línea de transición se localizó un grupo de células CldU+ ubicadas más profundas hacia el interior del parénquima. Este grupo de células CldU+ se las observó entre 15 y 30 micras de distancia desde la luz ventricular (Fig 6). El hecho particular de este grupo de células proliferativas es que algunas de ellas captaron ambos marcadores de proliferación. En general, las células doble marcadas se encontraron mayoritariamente alejadas de la luz del ventrículo. Por este motivo se decidió estudiar la ultraestructura de esta región dado que podría mostrar características de un nicho neurogénico extraventricular. Los datos obtenidos se exponen en la sección 2 de los resultados.

Parte 2. Cuantificación celular

2.1. Cuantificación de las poblaciones celulares

El análisis cuantitativo de la proliferación de las tres poblaciones celulares, se realizó empleando la herramienta “Cell Counter” del programa ImageJ. Este abordaje permitió contar en los seis peces (n=6) analizados, los núcleos IdU+, CldU+ y doble marcados IdU+/CldU+ en todas las secciones consecutivas correspondientes a cada región estudiada. Estas regiones fueron el bulbo olfatorio, lóbulos telencéfalicos, diencéfalo, tectum óptico, torus longitudinalis y cerebelo.



Figura 7. Representación gráfica de los porcentajes del total de células IdU+, CldU+ y doble marcadas IdU/CldU+ en las seis regiones encefálicas estudiadas. En verde se representan los núcleos IdU+, en rojo se representan los núcleos CldU+ y en amarillo se representan los núcleos doble marcados IdU/CldU+, para cada región especificada en el eje de las abscisas. Los valores de los porcentajes se muestran en el eje de las ordenadas. Se puede observar que en todas las regiones, los núcleos IdU+ siempre son los más abundantes, seguidos por los CldU+ y por último los doble marcados IdU/CldU+. BO: Bulbo olfatorio, Tel: telencéfalo, DE: diencéfalo, TO: tectum óptico, TL: torus longitudinalis, Cb: cerebelo.

En cuanto a los porcentajes de las células IdU+, CldU+ y doble marcadas IdU/CldU+ (Fig 7) se determinó que las células IdU+ son las más abundantes en todas las regiones estudiadas, seguidas por las células CldU+. Las menos numerosas son las doble marcadas IdU/CldU+, en todas las regiones estudiadas. Esto puede deberse al tiempo de sobrevida postinyección (30 días), en el

cual, las células que captaron el IdU luego de la primera inyección pudieron dividirse consecutivamente hasta el sacrificio del animal. En cambio, las células que captaron el CldU luego del pulso de la sustancia tuvieron apenas un día de sobrevida para dividirse mitóticamente.

Los núcleos positivos para cada población fueron graficados (Fig 8) por región de estudio.

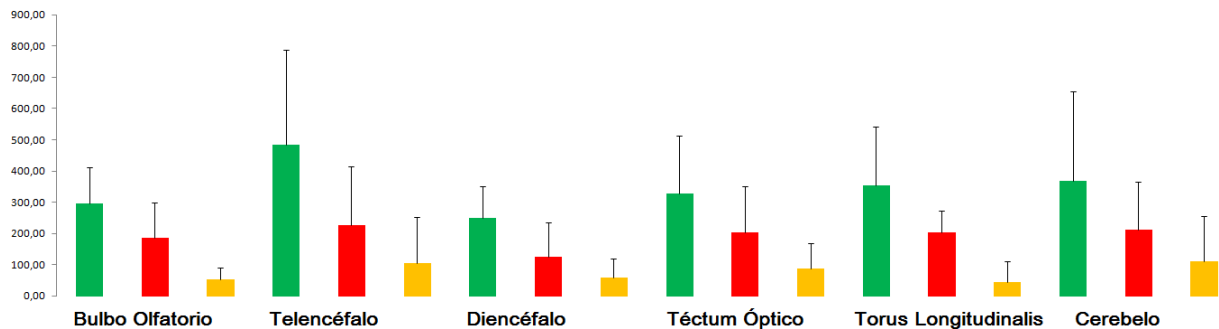


Figura 8. Gráfica que muestra los resultados de la cuantificación de los núcleos IdU+, CldU+ y células doble marcadas en cada región estudiada, con el desvío estándar. En verde se representan los núcleos IdU+ para cada región especificada en el eje de las abscisas, en rojo se representan los núcleos CldU+ y en amarillo se representan los núcleos doble marcados IdU/CldU+. Los valores de la cuantificación se muestran en el eje de las ordenadas.

Los valores absolutos de la cuantificación mostraron que la proliferación no es homogénea entre las regiones estudiadas para las tres poblaciones celulares. El telencéfalo es la región donde hay más cantidad de células IdU+ y CldU+ y el cerebelo es la región donde hay mayor proliferación de núcleos doble marcados IdU/CldU+, sin embargo los grandes desvíos impiden afirmar que estos resultados tengan significación estadística. El diencefalo mostró la menor cantidad de células IdU+ y CldU+ mientras que el torus longitudinalis fue el que tuvo menos proliferación de células doble marcadas IdU/CldU+.

2.2. Tasas de proliferación celular

Debido a que las diferentes regiones encefálicas estudiadas no son iguales en volumen, se realizó el cálculo de la tasa de proliferación celular por unidad de volumen (mm^3) teniendo en cuenta los volúmenes de las seis regiones individualmente, obtenidos con el programa BioVis3D[®], y la cuantificación celular, puede reflejar mejor la actividad mitótica presente en las diferentes regiones estudiadas.



Figura 9. Gráfica que representa las tasas de proliferación celular por mm^3 en cada región encefálica estudiada. En A se representan las seis regiones estudiadas y se observa que el torus longitudinalis es la que presenta mayor proliferación. En B se representan las regiones estudiadas excepto el torus longitudinalis, ya que en el gráfico A no se visualizan detalladamente. En verde se representan los núcleos IdU+, en rojo se representan los núcleos CldU+ y en amarillo se representan los núcleos doble marcados IdU/CldU+ para cada región, especificada en el eje de las abscisas. Los valores de la tasa de proliferación se muestran en el eje de las ordenadas. Se puede observar que el torus longitudinalis es la región que presenta mayor proliferación en relación a su volumen.

Los resultados de las tasas de proliferación (Fig 9) de cada población en las diferentes regiones muestra que el torus longitudinalis es la región que presenta la mayor proliferación por unidad de volumen. Seguido por el bulbo olfatorio y el diencéfalo que muestran tasas que rondan el 20-25% de las que muestra el TL. El tectum óptico presenta la menor tasa de proliferación de las regiones estudiadas

Parte 3. Análisis ultraestructural de una región proliferativa

Para este objetivo algunos peces fueron fijados para microscopía electrónica de transmisión. Se hicieron cortes de 150 micras en sección transversal y fueron seleccionados los niveles que correspondían a la zona de transición BO-Tel (Fig 6).

Luego de postfijado en tetraóxido de osmio e incluido en Araldita, se procedió a realizar cortes semifinos, a los efectos de encontrar el sitio de interés y realizar el tallado correspondiente para la obtención de cortes finos en el ultramicrotomo.

Con el objetivo de conocer las características ultraestructurales de las células que conforman la zona de transición entre los lóbulos telencefálicos y los bulbos olfatorios de *Austrolebias charrua*, se analizaron dos encéfalo

El análisis en la pared ventricular mostró gran densidad celular, donde se reconocieron diferentes tipos de células gliales, algunas de las cuales se localizaban lindantes con la luz ventricular y presentaban características de glía radial. Dichas células se disponen formando una empalizada perpendicular u oblicua al borde de la luz ventricular, extendiéndose desde la luz ventricular hacia la profundidad del parénquima dónde contactan con un grupo de células de morfología más o menos homogénea, ubicado a una distancia de 15 a 30 micras de la luz ventricular, que concuerdan con el grupo de células CldU+ y doble marcadas. Si bien las células de la glía radial comparten características en común como el ser muy alargadas (de entre 15 a 20 micras), también se observa que constituyen una población heterogénea en cuanto a las diferentes densidades que presentan en su citoplasma y su núcleo. Células electrondensas se intercalan con células electronlúcidas (Fig 10-A). Las que poseen núcleos eucromáticos, muestran habitualmente uno o dos nucléolos, los que no son visibles en aquellas células que poseen núcleos heterocromáticos. El citoplasma también presenta características diferenciales. En algunos casos existe un gran desarrollo del citoesqueleto, siendo fácil visualizar los gliofilamentos (Fig 10-B). Además estas glías emiten proyecciones citoplasmáticas que discurren entre las células del grupo antes mencionado, relacionándose estrechamente con ellas, habiendo escasa matriz extracelular entre un tipo celular y otro (Fig 10-B). Hacia la luz ventricular las glías radiales presentan diferentes especializaciones de membrana como microvellosidades y cilios. Las microvellosidades se disponen irregularmente y bien pueden terminar libres hacia la luz ventricular (figura 11-B), como disponerse rodeando el soma de células vecinas ó establecer contacto con

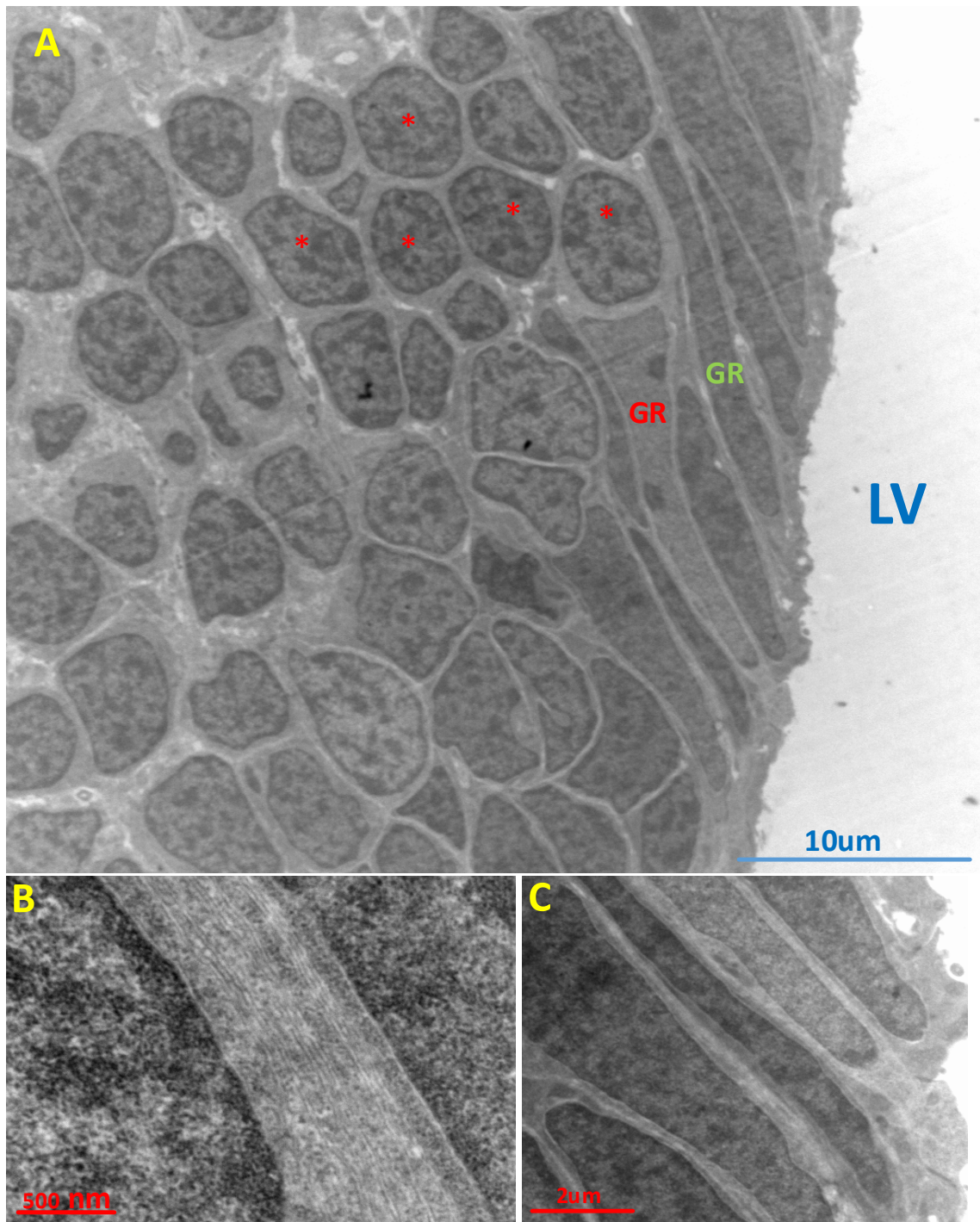


Figura 10. Micrografía electrónica que muestra la zona de transición entre los lóbulos telencefálicos y bulbos olfatorios (A). Se observan diferentes tipos de glías radiales con núcleos electronlúcidos (GR de color rojo) y otros electrondensos (GR de color verde) que contactan con un grupo de células de características similares. En B se observa una célula del grupo homogéneo (izquierda) y una glía radial (derecha) separadas por varias prolongaciones citoplasmáticas de otras glías radiales (por lo menos cinco). En C se observa la pared ventricular donde las células tienen distintas densidades citoplasmáticas y se mantienen unidas mediante uniones adherentes. LV: luz ventricular.

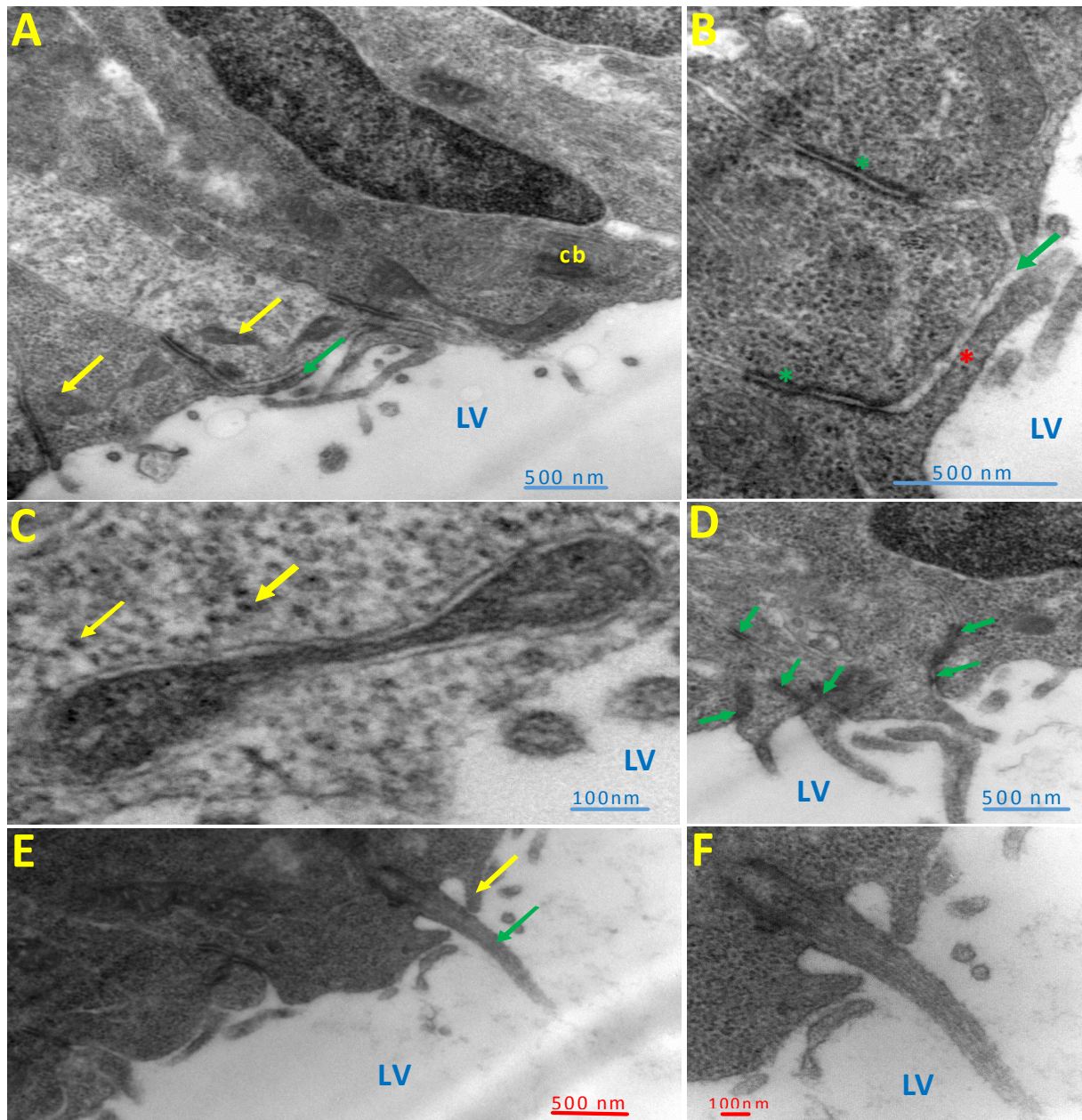


Figura 11. Micrografía electrónica que muestra diferentes características subcelulares de las glías radiales en la pared ventricular. En A se muestra diferentes densidades electrónicas de los citoplasmas celulares, microvellosidades de células que contactan con la membrana de células vecinas (flecha verde), corpúsculo basal de un flagelo (cb) y diversas mitocondrias con formas irregulares (flechas amarillas). En B se muestran detalles sobre las uniones adherentes (asteriscos verdes), cisternas del complejo de Golgi (flecha roja) y las microvellosidades (asterisco rojo) de una célula que contacta con otra mediante el glicocálix (flecha verde) de ambas que se entretreje. En C se muestra en detalle una mitocondria de forma irregular y varios ribosomas libres en el citoplasma celular (flechas amarillas). En D se muestran varios “pies” celulares en la pared ventricular, donde se desprenden de estas células microvellosidades libres, y las células se logran visualizar como individuales por sus uniones adherentes (flechas verdes). En E se muestra una célula en la luz ventricular que posee un flagelo (flecha verde) el cual es encapsulado en su base por la membrana celular manteniendo la unión por el glicocálix. En F se muestra en detalle el flagelo de la imagen E. LV: luz ventricular.

microvellosidades de otra célula (Fig. 11 -B). Frecuentemente las glías radiales emiten un cilio hacia la luz ventricular y, por lo general, la membrana celular de estas células rodea la base del cilio (Fig 11-E, F).

(Fig 11-A). A nivel de la membrana plasmática lateral, las células radiales se contactan y mantienen unidas mediante complejos de unión de tipo adherente (Fig 11-B asteriscos). Dichas uniones se visualizan como regiones electrondensas enfrentadas, presentes en ambas células, separadas por un espacio intercelular muy pequeño. Generalmente se extienden por aproximadamente 500 nanómetros de longitud,.

Generalmente, solo una escasa superficie de membrana de cada glía radial (en relación al tamaño de la célula), está destinada a tapizar la cavidad ventricular, En regiones es tan pequeña, que solo es posible discriminar células individuales, observando la presencia de uniones intercelulares (Fig 11-D). A nivel del citoplasma se constató la presencia de abundantes ribosomas (Fig 11-C), cisternas de Golgi (Fig 11-B) y mitocondrias con una morfología particular, lobuladas y con pequeñas crestas de forma tubular orientadas en distintas orientaciones, que recuerdan a mitocondrias de células secretoras de esteroides (Fig 11-A, C).

En cuanto al grupo de células ubicado más profundamente en el parénquima (y que contacta con la glía radial), su morfología es heterogénea y es posible diferenciar al menos tres tipos celulares que concuerdan con descripciones previas (Rosillo *et al.*, 2010). Células tipo I, con núcleos densos y contornos irregulares; células tipo II- con citoplasma electrondenso y núcleo redondeado y eucromático pero con sectores ocupados por cromatina condensada que podrían corresponder a cromosomas mitóticos en formación (Fig 10-A asteriscos). Finalmente células tipo III con citoplasma claro y núcleo de forma redondeada cuya cromatina se presenta laxa con sectores ligeramente condensados. Estas células podrían corresponder a neuroblastos recientemente formados.

Hacia los límites dorsales y ventrales de la zona de transición se observan células similares a las de tipo I, II y III y no se observan glías radiales. La densidad celular disminuye, el espacio intercelular es más abundante y se observaron algunas células de morfología atípica, núcleo fragmentado, con desorganización de la cromatina, citoplasma con abundantes vesículas e inclusiones citoplasmáticas que recuerdan a células apoptóticas (Fig. 12-B). Entre las células que

tapizan la luz ventricular de esa región, se observan abundantes desmosomas con un citoesqueleto de actina bien desarrollado, apareciendo a poca distancia de la luz (100 nanómetros aproximadamente), a veces en forma perpendicular y otras veces en forma paralela al borde de la luz ventricular y en muchos casos se visualizaron dos o tres dispuestos en tandem (figura 12-A).

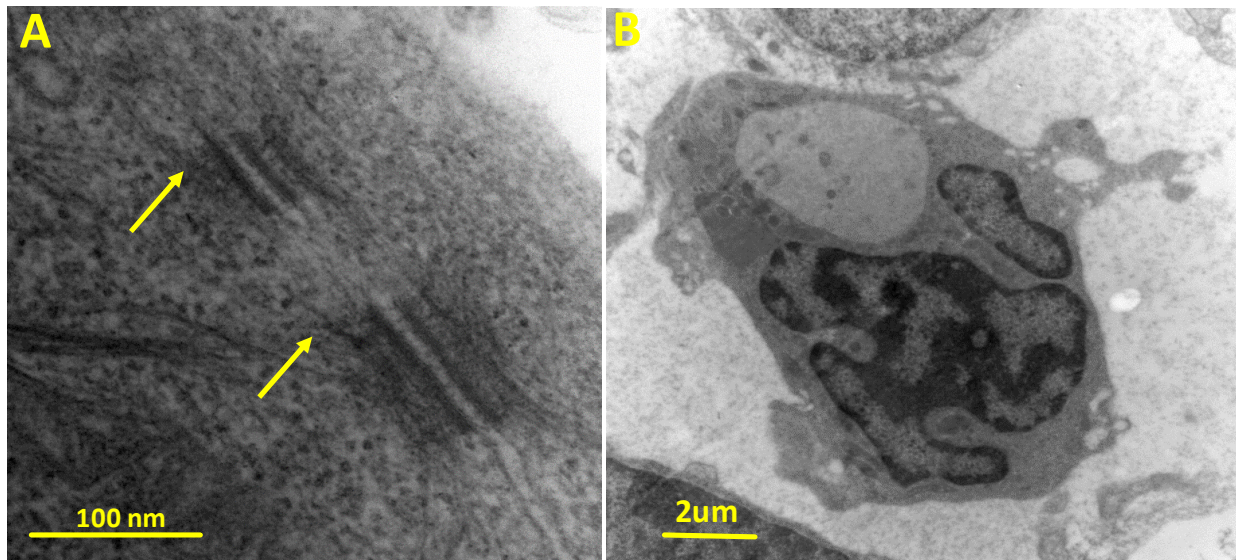


Figura 12. Micrografía electrónica que muestra en A uniones de tipo desmosomas relacionadas con elementos del citoesqueleto (flechas amarillas) y en B una célula de forma y características subcelulares irregulares que recuerda a una célula en apoptosis.

Discusión

Mediante la aplicación de los marcadores de proliferación celular en *Austrolebias charrua*, en una ventana temporal de 29 días, la inmunohistoquímica reveló tres poblaciones celulares inmunofenotípicas, las que captaron el IdU, las que captaron el CldU y las que captaron ambos marcadores. La señal de estos marcadores revelados, mostró la localización de estas tres poblaciones celulares a lo largo de todo el encéfalo.

Los marcadores de proliferación utilizados (IdU, CldU), son análogos de la timidina y al BrdU y presentan una estructura química que sólo varía en el halógeno. En estudios realizados con peces se determinó que el tiempo de biodisponibilidad metabólico del BrdU es de 30 minutos a 4 horas (Zupank y Horschke, 1995; Hinsch y Zupank 2007), por lo que podemos esperar que los tiempos de biodisponibilidad del IdU y el CldU sean similares al BrdU. De este modo, todas las células que se encontraron en alguna parte de la fase “S” de síntesis de ADN, captaron los marcadores de proliferación utilizados, durante el tiempo de biodisponibilidad.

Las células IdU+ que tuvieron un tiempo de sobrevida postinyección de 30 días, mostraron una localización dispersa, se encontraron localizadas en las paredes ventriculares así como también más o menos profundas en el parénquima nervioso. La distribución de las células IdU+ localizadas en las paredes ventriculares, corresponde a aquellas células que durante el tiempo de biodisponibilidad del IdU luego del pulso, y quedaron confinadas a las paredes ventriculares. Estas células que permanecieron en la pared ventricular, pueden ser progenitoras neurales. Las células IdU+ localizadas en zonas más profundas desde la pared ventricular, son células que están migrando y que captaron el IdU en el pulso administrado, y que podrían estar en vías o haber alcanzado su destino funcional final como neuronas o glías (lo que se podría demostrar eventualmente utilizando técnicas con doble marcación con IdU y marcadores de estirpe neuronal o glial). La señal de estas células se observó en diferentes intensidades debido al largo tiempo de sobrevida post administración del IdU, donde consecutivas divisiones mitóticas puede lograr una pérdida de la intensidad de señal con el paso del tiempo.

Las células CldU+ que tuvieron un tiempo de sobrevida postinyección de 24 horas, mostraron una localización en general sobre las paredes ventriculares lo que concuerda con lo esperado teóricamente, ya que las células progenitoras neurales, están confinadas a las paredes

ventriculares en todos los taxa de vertebrados, así como también en regiones más profundas en el parénquima nervioso del cerebelo en peces (Zupank, 2006). También se observaron células CldU+ en regiones más profundas en el parénquima nervioso, debido a que las células que se dividieron en la pared ventricular y comienzan a migrar hacia su localización final, y aún se mantienen indiferenciadas, todavía poseen la capacidad mitótica. Estas células ubicadas en las inmediaciones de las paredes ventriculares, pudieron captar el CldU administrado en el pulso del día 29, incorporando así la sustancia en el núcleo celular. La señal de estas células CldU+ siempre fue clara y de fácil reconocimiento, debido a que la sustancia captada, no se fracciona con eventuales mitosis consecutivas en el tiempo, debido al lapso de sobrevivencia de 24 horas.

Las células doble marcadas IdU/CldU+ captaron ambos marcadores de proliferación celular administrados separadamente en el tiempo, y en general permanecieron confinadas a las paredes ventriculares lo que concuerda con la proliferación celular en otros teleósteos (Zupank 2006; Ekström y col 2001) y con la ubicación periventricular de las células madre o progenitoras neurales. La actividad mitótica de estas células y su ubicación histológica permanente en el tiempo, nos lleva a proponerlas como las más firmes candidatas a células madre neurales, aunque para confirmar esto se tendrían que utilizar otros marcadores específicos para células madre neurales (e.g. vimentina, nestina). La colocalización de los marcadores es demostrada en el merge entre la imagen tomada en el canal 1 y el canal 2 del microscopio confocal es clara y no genera incertidumbre de su identificación como célula doble marcada. En la figura 3-D de los resultados se muestran los planos ortogonales del merge donde se observa la colocalización del IdU y CldU en un mismo núcleo lo que nos permite reconocer las células doble marcadas. El método empleado para la cuantificación de esta población celular permite realizar una aproximación de la realidad, y cabe destacar que utilizando esta metodología puede dar lugar a errores y obtener un sesgo que tienda a sobreestimar la población. Esto puede deberse a la presencia de al menos dos núcleos marcados cada uno con sólo un análogo (“verde” uno y “rojo” el otro) que se encuentran en la misma localización en los x e y pero en distinta localización en el eje z, donde la proyección de ambas imágenes en un único plano también es una figura “amarilla” por superposición de colores rojo y verde y no corresponde a la colocalización de las sustancias marcadas con ambos anticuerpos primarios, en este caso IdU y CldU.

En cuanto a los datos obtenidos de la cuantificación, la metodología empleada en esta pasantía no

permite fácilmente contrastar los resultados con otros trabajos realizados en peces anuales, ya que es un método recientemente descrito y la bibliografía es escasa. Al observar los datos de la cuantificación celular, las células IdU+ son las más abundantes en cada región encefálica estudiada y por tanto en la totalidad del encéfalo. Esto parece ser obvio, ya que el tiempo de sobrevida de los peces postinyección del IdU es de 30 días, y en este lapso, estas células han podido dividirse consecutivamente aumentando en número, comparando con la proliferación de un día como ocurre en el caso de las células CldU+. Si observamos la cuantificación neta de células IdU+, el telencéfalo es quien posee mayor cantidad de estas células, seguido por el cerebelo y el tectum óptico. Las células CldU+ son menos abundantes que las IdU+ pero siempre más abundantes que las doble marcadas en cada región encefálica estudiada, y por tanto, en el encéfalo en su totalidad. La región encefálica que posee mayor número de células CldU+ es el telencéfalo, cerebelo, tectum óptico y torus longitudinalis, lo que hace pensar en la cantidad de células generadas normalmente para sustentar su principal modalidad sensorial, es decir la visión, mientras que el diencéfalo es quien posee la menor cantidad de células CldU+. Las células doble marcadas, como era de esperar son las menos abundantes entre las tres poblaciones y es en el cerebelo donde se registró la mayor frecuencia de aparición de este tipo celular. Esto se puede relacionar con la vital función de la integridad histológica del cerebelo para estos vertebrados nadadores, es decir mantención del equilibrio y la regulación de la posición en la columna de agua.

Si tenemos en cuenta que los tamaños de las regiones encefálicas estudiadas no son similares, obteniendo la frecuencia de observación de las células de las tres poblaciones, es poco objetivable asumir que una región posee mayor proliferación que otra. Por este motivo se tuvo en cuenta el volumen de estas regiones individualmente y los datos de la cuantificación, para hallar una tasa de proliferación celular por milímetro cúbico de las tres poblaciones celulares. De esta manera la interpretación respecto a proliferación celular en las regiones estudiadas cambia respecto a la cuantificación neta. La región que posee mayor capacidad proliferativa de células IdU+ y células CldU+ por unidad de volumen son, el torus longitudinalis seguido por el bulbo olfatorio, esto se puede relacionar con la necesidad de mantener el número de células funcionales (o en vías de diferenciación) en las regiones encargadas de coordinar estímulos de sus modalidades sensoriales primordiales, es decir la visión y la olfacción respectivamente. Sin embargo en las células doble marcadas la tasa de proliferación celular cambia un poco, las regiones de mayor proliferación

celular es el torus longitudinalis seguida por el bulbo olfatorio y el diencéfalo. La gran proliferación en el diencéfalo se puede adjudicar a su rol neuroendócrino en estos peces anuales, en los que la madurez sexual se debe dar en lapsos cortos, amoldándose a las estrategias reproductivas de la especie.

Si observamos los gráficos de la cuantificación y las tasas de proliferación, las barras de dispersión presentan gran tamaño, lo cual se podría dar ya que no todos los peces presentaban el mismo tamaño corporal y el número de secciones de las regiones estudiadas es variable. Esto podría mejorar si aumentamos la cantidad de especímenes, y se estandariza el tamaño y peso de los ejemplares a tal punto de tener la misma cantidad de secciones iguales, para cada región estudiada, lo que permitiría manejar los datos cuantitativos en diferentes test estadístico.

La ultraestructura de la zona de transición entre los lóbulos telencefálicos y los bulbos olfatorios estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión, mostró la presencia de glías radiales de morfología nuclear diversa, conformando una población de glías radiales heterogéneas, que concuerda con datos experimentales obtenidos en otras especies (Malatesta *et al.*, 2008). El citoplasma de estas células concuerda con el descrito en células del cerebro de otros peces (nombrarlos), con forma alargada radialmente donde se emite un pie estrecho hacia la pared ventricular y con proyecciones radiales que penetran en el parénquima celular donde contactan con otros tipos celulares hasta perderse en la profundidad del intersticio y alcanzar la superficie pial (Arnold & Alvarez-Buylla, 2009). El grupo de células que se observa en contacto con la glía radial posee caracteres morfológicos poco diferenciados, como si se tratara de células recientemente generadas y en vías de migración o diferenciación.

La presencia de uniones adherentes entre glías radiales de la pared ventricular, recuerda a las uniones observadas en glías radiales de otros vertebrados (e.g. mamíferos), donde los precursores neuroepiteliales al diferenciarse en glías radiales, pierden las “tight junctions” y asientan acoplamientos celulares mediados por uniones adherentes que son más plásticas, permitiendo cierta flexibilidad en fenómenos de migración (Aaku-Saraste *et al.* 1996)

La morfología inusual de las mitocondrias presentes en la glía radial, (lobuladas y con pequeñas crestas de forma tubular que se presentan en distintas orientaciones), recuerda a las descritas en células secretoras de esteroides, donde también presentan una inusual diversidad en la forma de las crestas mitocondriales. Esto sugiere que podría tratarse de células que en el cerebro adulto de

los peces expresan activamente la aromatasa. Esta enzima cataliza la conversión de hormonas esteroideas, y es sintetizada durante la vida adulta de los teleósteos por la glía radial (Strobl-Mazzulla P, 2010). Los datos obtenidos demuestran que en las glías radiales de la pared ventricular, hay mitocondrias de características similares a las que presentan las células de Leydig en los testículos (Fawcett, 1981).

Las características observadas en estas células las califican como glías radiales que desempeñan un papel crucial en la proliferación y migración de células neurales durante el desarrollo de todos los vertebrados, así como también en la vida adulta de los teleósteos.

Conclusiones y perspectivas

En este estudio de la proliferación neural en los vertebrados, en el que tomamos a *Austrolebias charrua*, se utilizó por primera vez en este modelo de pez anual (ver ventajas del modelo en el apartado 1.3 de la introducción), la metodología de aplicación de dos marcadores de proliferación celular separados en una ventana temporal, con el objetivo de discriminar poblaciones celulares, realizar una cuantificación de éstas y analizar la ultraestructura de una zona proliferativa en particular. De este trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1- La inmunohistoquímica reveló tres poblaciones celulares inmunofenotípicas proliferantes en el encéfalo de *Austrolebias charrua*:
 - Células IdU+, que son células proliferantes que migran
 - Células CldU+, que son células activamente proliferantes
 - Células doble marcadas IdU/CldU+, que son células que reentran en el ciclo celular, y son las que proponemos como las principales candidatas a células madre neurales
- 2- Los tres tipos celulares revelados por inmunohistoquímica se identificaron en todas las regiones encefálicas

- 3- Las células IdU+ son las más abundantes en cada región encefálica, seguidas por las células CldU+ y por último las células doble marcadas IdU/CldU+
- 4- Las regiones encefálicas que poseen mayor proliferación absoluta son el telencéfalo, el cerebelo y el torus longitudinalis
- 5- Las regiones encefálicas que presentan mayor proliferación celular por unidad de volumen de células IdU+ y CldU+ son el torus longitudinalis y el bulbo olfatorio, y las que presenta mayor proliferación por unidad de volumen de células doble marcadas IdU/CldU+ son el torus longitudinalis, el bulbo olfatorio y el diencefalo.
- 6- La ultraestructura de la zona de transición entre los lóbulos telencefálicos y los lóbulos olfatorios presentaron características de nichos neurogénicos, tales como:
 - Presencia de glía radial
 - Células con características indiferenciadas
 - Uniones adherentes entre la glía radial
 - Mitocondrias con forma característica de células secretoras de esteroides que relacionamos con glías radiales sintetizadoras de aromatasa.

Es este estudio se describieron procesos implicados en la proliferación celular y en la neurogénesis de vertebrados que son frecuentes en individuos adultos de los diferentes taxa. El modelo utilizado en este estudio, resulta ser muy eficaz para profundizar en el conocimiento de la neurogénesis postnatal y en los procesos que subyacen a este fenómeno. Esto resulta muy esperanzador para la biología y medicina humanas, ya que a futuro se podrían desarrollar estrategias que estimulen la proliferación celular en el sistema nervioso, como medida terapéutica ante agresiones endógenas o exógenas indeseables, tales como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson, esclerosis múltiple, depresión, epilepsia, accidente vascular encefálico, entre otras.

Finalizado este trabajo, surgen ciertas cuestiones que sirven como perspectivas de investigación a

futuro, tales como:

- 1- ¿Cuál es el porcentaje de células proliferantes que se diferencian en nuevas neuronas y glías? Esto se podría contestar con la aplicación de anticuerpos específicos neuronales y gliales.
- 2- ¿Es la glía radial observada la productora de nuevas células? Esto se puede contestar utilizando técnica inmunohistoquímicas para microscopía electrónica de transmisión, donde la localización nuclear de las sustancias marcadoras de proliferación celular, serían visualizables *in situ*.
- 3- ¿Cuál es el verdadero valor de la supervivencia celular luego de la proliferación neural en vertebrados adultos? Esto se podría contestar conociendo un modelo matemático donde se tengan en cuenta las características biológicas sobre la proliferación celular y describa el crecimiento celular en tiempos determinados.
- 4- ¿Son las glías radiales de *A. charrua* productoras de aromatasa? Esto se puede contestar utilizando anticuerpos anti-aromatasa y revelándolos por inmunohistoquímica.

Bibliografía

- Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB, 1996. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure—remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol* 180:664–679
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogénesis in rats. *J Comp Neurol.* 124:319-35.
- Bick, MD, Davidson RL, 1974. Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71.5: 2082-2086.
- Butler, Ann B., and William Hodos. Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation. New York: John Wiley & Sons, 2005. 671 p.
- Carbajo Pérez E, Carbajo Pérez S, Triviño A, Hernández LC, López A. 1994. Análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica. *Univ Cor Serv Pub.* p. 135-156.
- Ekström P, Johnsson CM, Ohlin LM, 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J. Com. Neurol.* 436: 131-110.
- Eriksson, PS. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.* 4, 1313–1317.
- Fawcett W. The cell. Canada: W. B. Saunders Company, 1981. 862p.
- Fernández AS, Rosillo JC, Casanova G, Olivera-Bravo S. 2011. Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Ciprinodontiform: Rivulidae): A comparative study. *Neurosci* 189:12-24.
- García-Verdugo JM, 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.* Apr;57(6):765-75.
- 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.
- Hinsch K & Zupanc GKH. 2007. Generation and long-term survival in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neurosci* 146:679-696.

- Kriegstein A, Arturo Alvarez-Buylla A, 2009. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci.* 32: 149–184.
- Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F, 2008. Radial glía and neural stem cells. *Cell Tissue Res* 331:165–178
- Nottebohm, F. 1985. Neuronal replacement in adulthood. *Ann NY Acad Sci.* 457:143-161.
- Ramón y Cajal S. 1914. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Tomo II. Madrid, Hijos de Nicolás Moya (editores).
- Rodríguez-Pardo, M. 2005. Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación. *Univ Sci Vol.* 10, 1:5-14.
- Rosillo JC, Casanova G, Olivera S, Fernández A. 2010 Heterogeneidad celular en la zona ventricular telencefálica: una región neurogénica del cerebro de *Austrolebias charrua*. *Acta Microscop.* 19:152-159.
- Seki, T., Sawamoto, K., Parent, J. M., & Alvarez-Buylla, A. 2011. Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology (Vol. 1). Springer. 407 p.
- Silvestrini R, Costa A, Veneroni S, Bino G, Persici P, 1988. Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell Proliferation*, 21(2), 123-131.
- Strobl-Mazzulla, PH, Nuñez A, Pellegrini E, Gueguen MM, Kah O, Somoza GM, 2010. Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain, behavior and evolution*, 76(1), 20-31.
- Sullivan JM, Benton JL, Sandeman DC, Beltz BS, 2007. Adult neurogenesis: a common strategy across diverse species. *J. Comp. Neurol.* 500 (3):574-84.
- Vazquez Nin G, 2000. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a Las Ciencias Biológicas. UNAM, 2000. 168 p.
- Vega CJ, Peterson DA. 2005. Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog. *Nat meth* 3,2:167-169
- Zupanc GKH & Zupanc MM. 1992. Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (*Eigenmannia* sp.). *Proc Natl Acad Sci.* 89:9539-9543.
- Zupanc GKH, Horsche I, 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353: 213-233.
- Zupanc GKH. 2001. A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis.

Brain Behav Evol. 58:246-249.

-Zupanc GKH, Hinsch K, Gage FH. 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. J Comp Neurol. 488:290–319

-Zupanc GKH. 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. J. Comp. Physiol A. 192:649–670.